

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyziologie živočichů**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Jiří Navrátil**

Glutamátem řízené iontové kanály – jejich úloha, struktura a mechanismus působení  
Glutamate ion channels – their function, structure and mechanism of action

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Aleš Balík, Ph.D.

Praha, 2014

## **Abstrakt**

Glutamátem řízené iontové kanály zprostředkovávají excitační přenos signálu v centrální nervové soustavě. Jsou nezbytné při zpracování vnějších podnětů, v procesech učení a během vzniku paměti. Molekulární mechanismus činnosti jednotlivých kanálů není doposud plně objasněn, avšak přibývající strukturální a elektrofyziologická data přináší nové detaily o způsobu, jakým tyto kanály fungují.

## **Klíčová slova**

Glutamát, iontové kanály, struktura, transmembránové helixy

## **Abstract**

Glutamate gated ion channels mediate the excitatory signal transduction in the central nervous system. They are essential in the processing of external stimuli, in the process of learning and during the formation of memory. Molecular mechanism of action single channels is not still fully understood. However increasing number of structural and electrophysiological data provides new details describing the mechanism for ion channel action.

## **Key words**

Glutamate, ion channels, structure, transmembrane helices

**Prohlášení:**

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

V Praze, 14.5.2014

.....

Jiří Navrátil

**Poděkování:**

Za cennou pomoc a vstřícný přístup při psaní této práce chci poděkovat svému školiteli RNDr. Aleši Balíkovi, Ph.D. Mé díky patří i mým nejbližším, kteří mne podporovali při studiu, a kolegům z oddělení buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR, mezi nimiž jsem našel příjemné pracovní prostředí.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
<b>2. Obecná charakteristika a struktura glutamátem řízených iontových kanálů</b> ....	2
2.1. <i>Farmakologické členění</i> .....	2
2.2. <i>Typy podjednotek a skládání funkčních kanálů</i> .....	2
2.3. <i>Struktura podjednotek a jejich vzájemné interakce</i> .....	3
2.3.1. Amino-terminální doména.....	5
2.3.2. Ligand vázající doména.....	5
2.3.3. Transmembránová doména.....	6
2.3.4. Karboxy-terminální doména.....	7
<b>3. Mechanismus působení glutamátových iontových kanálů</b> .....	8
3.1. <i>Farmakologie</i> .....	8
3.1.1. Agonisté AMPA, kainátových a delta receptorů.....	9
3.1.2. Agonisté NMDA receptorů.....	9
3.1.3. Antagonisté glutamátových receptorů a allosterická modulace.....	10
3.2. <i>Mechanismus otevírání iontového kanálu</i> .....	11
3.2.1. Aktivace.....	12
3.2.2. Desensitizace.....	12
3.2.3. Linkery.....	13
<b>4. Funkce glutamátem řízených kanálů v centrální nervové soustavě</b> .....	14
4.1. <i>Synaptický přenos a role v plasticitě synapsí</i> .....	14
4.2. <i>Funkce AMPA receptorů</i> .....	14
4.3. <i>Funkce kainátových receptorů</i> .....	15
4.4. <i>Funkce NMDA receptorů</i> .....	16

<b>5. Některé patofyziologické stavy spojené s glutamátovými iontovými kanály.....</b>	<b>18</b>
5.1. Cévní mozková příhoda a traumatické poranění mozku.....	18
5.2. Deprese.....	20
<b>6. Závěr.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Seznam použité literatury.....</b>	<b>22</b>

# 1. Úvod

Glutamátem řízené iontové kanály jsou podstatné pro přenos excitačního signálu na synapsích v centrální nervové soustavě a významně se podílejí na jejich vývoji a způsobu fungování. Tyto receptory také stojí v pozadí různých neurofyziologických poruch, ať už akutních jako v případě cévní mozkové příhody či traumatického poranění mozku, tak i těch dlouhodobých neurodegenerativních (Alzheimerova a Parkinsonova choroba) či psychiatrických (deprese, schizofrenie) onemocnění.

Navzdory jejich zásadní roli v organismu není dosud velká část detailů o fungování glutamátem řízených ionotropných kanálů objasněna. Například nativní konformace glutamátových iontových kanálů dosud není známa, zejména kvůli pro funkci nezbytné intramembránové lokalizaci kanálu a z toho vyplývající složité izolaci nativního receptoru. Pomocí krystalografických technik se však již podařilo zjistit strukturu ligand vázající domény u různých typů podjednotek všech tříd glutamátem řízených iontových kanálů (Armstrong et al., 1998; Armstrong a Gouaux, 2000; Furukawa a Gouaux, 2003; Mayer, 2005). V posledních letech se podobných výsledků povedlo dosáhnout i u amino-terminální domény (Clayton et al., 2009). Velkým krokem kupředu pak byla nepochybně první a doposud jediná krystalografická studie celého receptoru, konkrétně typu AMPA v zavřeném stavu s navázaným antagonistou (Sobolevsky, 2009). Tyto pokroky pak umožnily detailnější studium glutamátem řízených iontových kanálů na molekulární úrovni a přinesly nové poznatky pro pochopení struktury a s ní související funkce těchto receptorů.

Tato práce přináší přehled současných molekulárně biologických poznatků společně s předchozími převážně farmakologickými daty tak, aby byla přehledně shrnuta současná základní představa o glutamátem řízených iontových kanálech. Práce je pak zaměřena zejména na strukturní detaily jednotlivých tříd kanálů, jejich mechanismu působení v buňce a z toho vyplývající funkci glutamátem řízených iontových kanálů. Závěrečná kapitola je pak věnována krátkému úvodu do patofyziologie spojené s chybnou funkcí glutamátových kanálů, poukazující na důležitost výzkumu glutamátových receptorů pro humánní medicínu.

## **2. Obecná charakteristika a struktura glutamátem řízených iontových kanálů**

### **2.1. Farmakologické členění**

L-glutamát je nejrozšířenějším neurotransmiterem v centrální nervové soustavě savců, v níž zprostředkovává většinu excitačního synaptického přenosu. Působí na dva hlavní typy glutamátových receptorů – receptory metabotropní, které účinkují skrze spřažené G-proteiny (Pin a Archer, 2002), a receptory ionotropní, jež po své aktivaci přímo propouštějí ionty skrze transmembránový kanál (Dingledine et al., 1999).

Glutamátem řízené iontové kanály se dělí do čtyř tříd. Tři z nich jsou historicky pojmenovány dle svých specifických agonistů. Jde o receptory  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionátové (AMPA), kainátové (KA) a N-methyl-D-aspartátové (NMDA). Čtvrtou, minoritní třídu tvoří kanály delta, u kterých vazba agonisty pravděpodobně vůbec nenavozuje otevření iontového kanálu (Naur et al., 2007) a proto se jim nebudu dále věnovat. Všechny třídy těchto receptorů mají shodné základní strukturní rysy, ale navzájem se liší svou kinetikou, farmakologickými vlastnostmi i svou funkcí v buňce.

### **2.2. Typy podjednotek a skládání funkčních kanálů**

Ionotropní glutamátové receptory jsou integrální membránové proteiny, které fungují ve formě tetramerů (Laube et al., 1998; Mano a Teichberg, 1998; Rosenmund et al., 1998). Většina se sdružuje do heterotetramerů složených z alespoň dvou různých typů podjednotek stejné třídy, ale v jistých případech (viz níže) mohou formovat i funkční homotetramery. Každá třída glutamátových receptorů je složena z několika typů podjednotek – u AMPA receptorů to jsou podjednotky GluA1-GluA4, u KA receptorů GluK1-GluK5 a u NMDA receptorů GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A a B. Podjednotky AMPA receptorů GluA1-GluA4 mohou tvořit funkční homo- i heteromery, stejně jako podjednotky GluK1-GluK3 u kainátových receptorů (Traynelis et al., 2010). Rozdílná je situace u podjednotek GluK4 a GluK5, které tvoří funkční receptor jen v koexpresi s GluK1 až GluK3, a je jim přisuzována pouze modifikační role, kdy mění biofyzikální a farmakologické charakteristiky receptoru (Contractor a Swanson, 2008).

Sestavení funkčních NMDA receptorů je složitější. Tento typ kanálů se liší tím, že ke své aktivaci potřebuje kromě glutamátu i navázání glycinu (Johnson a Ascher, 1987; Kleckner a Dingledine, 1988; Lerma et al., 1990). Ten se váže na podjednotky GluN1, případně GluN3 (Kleckner a Dingledine, 1988), zatímco místo pro navázání glutamátu je utvořeno na podjednotkách GluN2 (Furukawa et al., 2005). Kromě glycinu coby fyziologického koagonisty se diskutuje o této funkci i u D-serinu, viz kapitola 3.1.2.

Ke složení funkčního NMDA receptoru je třeba dvou podjednotek GluN1, spolu s nimiž se spojují buď dvě identické podjednotky GluN2, nebo kombinace podjednotek GluN2 a GluN3 (Monyer et al., 1992; Schorge a Colquhoun, 2003). Funkční NMDA receptory mohou být tvořeny i ve formě heteromerů, kde je zkombinována podjednotka GluN1 s dvěma různými typy podjednotek GluN2 – ku příkladu jde o receptory složené z podjednotek GluN1/GluN2A/GluN2B či GluN1/GluN2A/GluN2C a několik dalších. Tímto způsobem vytvořené NMDA receptory najdeme jen v určitých oblastech mozku a ve specifických neuronálních subpopulacích (Chazot et al., 1994; Chazot a Stephenson, 1997). Samotné podjednotky GluN3 netvoří v kombinaci s GluN1 funkční receptor v savčích buňkách (Chatterton et al., 2002). Nicméně při endogenní expresi lidských receptorů na oocytech *Xenopus laevis* bylo zjištěno, že v koexpresi s podjednotkou GluN1 tvoří GluN3 funkční receptory, které jsou aktivovány samotným glycinem (Chatterton et al., 2002). Tyto pouze glycinem aktivované receptory ale dosud nebyly pozorovány v GluN3-exprimujících neuronech (Matsuda et al., 2003) a jejich existence in vivo zůstává spornou. V laboratorně používané buněčné linii HEK293 je povrchová exprese funkčních glycinem aktivovaných receptorů GluN1/GluN3A nebo GluN1/GluN3B záležitostí dosud nevyřešenou, u triheteromerů GluN1/GluN3A/GluN3B ale byla pozorována jistá míra funkční exprese (Smothers a Woodward, 2007).

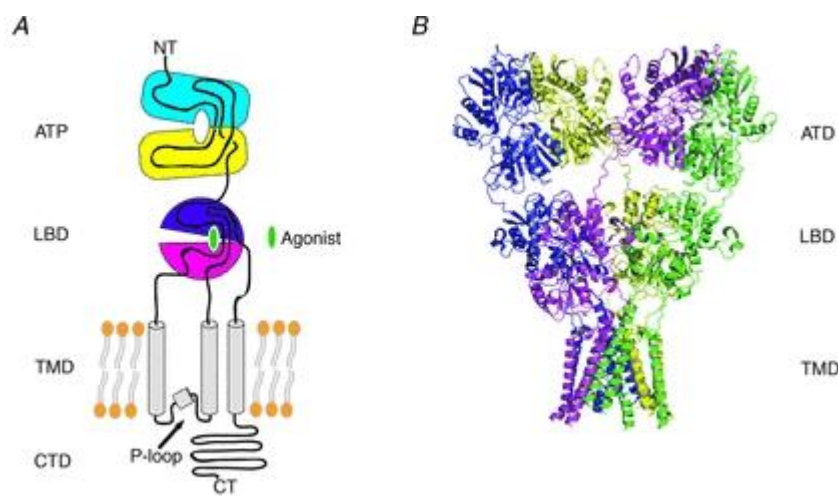
### **2.3. Struktura podjednotek a jejich vzájemné interakce**

Funkční glutamátový iontový kanál nabývá z bočního pohledu tvaru velkého písmene Y (obr. 1.B). Jeho strukturu lze rozdělit na čtyři funkční semiautonomní domény (obr. 1.A), konkrétně na amino-terminální (ATD), ligand vázající (LBD), na níž se váží molekuly agonistů a kompetitivních antagonistů, transmembránovou (TMD) a karboxy-terminální (CTD). ATD a LBD jsou lokalizovány extracelulárně a v určitých případech zaujímají až 85 % objemu receptoru (Mayer, 2011), zatímco C-konec je intracelulární a je v kontaktu



s proteiny uvnitř buňky, čímž může docházet k regulaci samotného kanálu i k regulaci intracelulární signalizace.

K největší interakci v celé struktuře receptoru dochází mezi transmembránovými doménami. K vytvoření vrátek kanálu je nutné spojení TMD ze všech čtyř podjednotek v jeden celek. Interakce mezi TMD je pro složení tetramerního kanálu zcela nezbytná. Tomu odpovídá i fakt, že mutace ve vzájemně interagujících částech TMD narušují správnou oligomerizaci podjednotek (Salussolia et al., 2013) či zapříčiňují zásadní změny ve funkci glutamátových iontových kanálů (Sieglér Retchless et al., 2012). Kromě TMD spolu silně interagují AMT domény za vzniku dvojice dimerů. Totožná je i situace u LBD.



**Obr. 1.** Obecná struktura glutamátového iontového kanálu. Na obrázku A je vidět pozice a struktura jednotlivých domén (NT – N-konec, ATP – amino-terminální doména, LBD – ligand vázající doména, TMD – transmembránová doména, CTD – karboxy-terminální doména, CT – C-konec, P-loop – částečně vnořený úsek M2). Na obrázku B je pak ukázáno složení receptoru ze čtyř podjednotek – každá je označena jinou barvou (převzato dle Furukawa, 2012).

Skládání glutamátových ionotropních receptorů do správné konformace probíhá v endoplazmatickém retikulu (ER). Správné sbalení proteinu je pro jeho funkci zásadní a je zajištěno mnoha kontrolními mechanismy. Zdá se, že správná konformace receptoru hraje roli i v „traffickingu“, tedy v dopravě na cílové místo v membráně (Grunwald a Kaplan, 2003). To lze dokladovat takovou mutací konformačně významných center, která znemožní správné sbalení proteinu. Mutantní varianta receptoru, která nemůže být kvůli změně aktivována

agonistou, nedokáže efektivně opouštět lumen ER v porovnání s funkční variantou. Tento jev byl pozorován u AMPA (Greger et al., 2006) i kainátových receptorů (Priel et al., 2006).

### 2.3.1. Amino-terminální doména

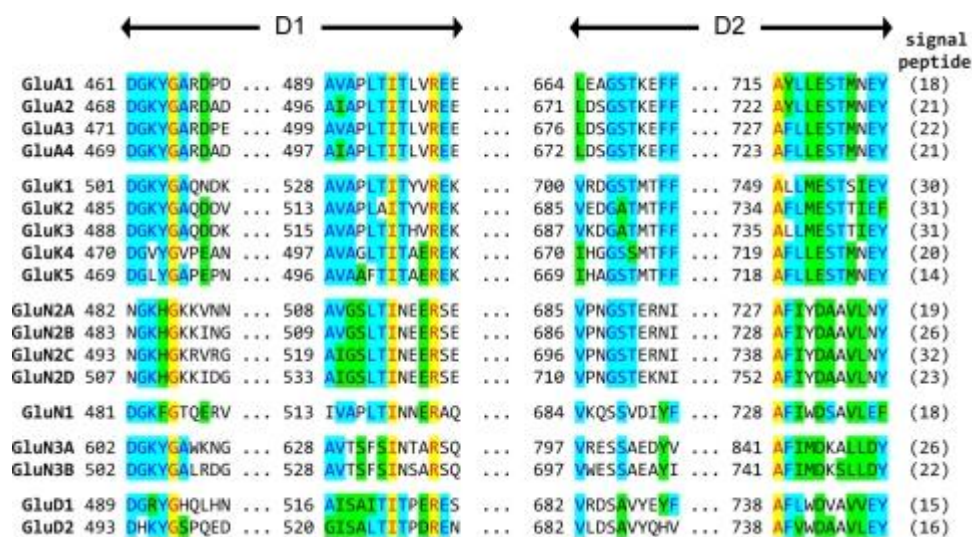
Jak bylo uvedeno výše, ATD je umístěna extracelulárně. Tvoří ji prvních 400-450 aminokyselin, přičemž před ně je ještě translatován krátký signální peptid, který je tvořen 14-33 aminokyselinami. Tento peptid slouží jako signál k nasměrování receptoru do plazmatické membrány a poté je odštěpen. Ačkoliv se ATD, až na jednu výjimku v podobě bakteriálního receptoru GluR0, vyskytuje u všech podjednotek glutamátových receptorů (u veškerých organismů, které tyto receptory mají), tak její přítomnost není nezbytná pro složení funkčního kanálu. Tyto výsledky byly pozorovány v několika studiích, kde byly exprimovány mutantní podjednotky bez ATD. Mutované podjednotky v zásadě fungovaly podobně jako přirozené nemutované receptory (Pasternack et al., 2002; Matsuda et al., 2005). Rozdíly však byly zaznamenány v pravděpodobnosti otevření kanálu, jeho deaktivaci, desensitizaci a v regulaci podjednotkového složení (Leuschner a Hoch, 1999; Ayalon et al., 2005). Z těchto výsledků se vyvozuje regulační funkce této domény pro činnost kanálu.

Tomu napovídá i sekvenční homologie se skupinou rozpustných periplazmatických bakteriálních proteinů, které váží určité typy aminokyselin (Masuko et al., 1999). ATD glutamátových iontových kanálů se sice od těchto bakteriálních proteinů liší pozicí disulfidických můstků či insercemi a delecemi některých aminokyselin, avšak funkce by mohla být podobná – vázat ligandy, indukovat regulační změny a regulovat tak aktivitu kanálu.

### 2.3.2. Ligand vázající doména

LBD je umístěna také na extracelulární straně plazmatické membrány. Navazuje z jedné strany na ATD a z druhé na TMD. Její sekvence aminokyselin je mezi všemi třídami glutamátových iontových kanálů vysoce evolučně konzervovaná (obr. 2). Strukturně se LBD dělí na dva úseky označované jako S1 a S2, jejich část tvoří polypeptidickými segmenty D1 (pro S1) a D2 (pro S2). Segment D1 se nachází mezi ATD a prvním transmembránovým helixem (M1), segment D2 pak mezi transmembránovými helixy M3 a M4. Úseky S1 a S2 dávají doméně tvar otevřené lastury, kdy část S1 tvoří jednu polovinu schránky, část S2 druhou a mezi nimi se vytváří prohlubeň pro navázání agonisty. Po navázání agonisty dojde

ke změně konformace úseků S1 a S2, která se jeví jako uzavírání obou polovin lastury. Změna konformace úseků S1 a S2 se pak přenáší na další části receptoru a dochází k otevření vrátek kanálu. Podrobnější popis této klíčové funkce LBD je uveden níže v kapitole 3.



Obr. 2. Sekvenční homologie úseků D1 a D2 ligand vázající domény mezi jednotlivými typy podjednotek glutamátových iontových kanálů. Žlutě jsou označeny pozice úplně konzervovaných aminokyselin, modře částečně zakonzervovaných a zeleně sobě podobné nebo příbuzné aminokyseliny (upraveno dle Traynelis et al., 2010).

### 2.3.3. Transmembránová doména

TMD prochází skrze membránu a je spojena s LBD třemi krátkými spojovacími úseky „linkery“, které jsou detailně popsány v kapitole 3.2.3. TMD se skládá ze čtyř transmembránových segmentů, ačkoliv v pravém slova smyslu jsou to pouze tři transmembránové helixy. Úsek označovaný jako M2 se totiž do membrány vnořuje pouze částečně na intracelulární straně a neprochází jí skrz (Sobolevsky et al., 2009). Před transmembránovým úsekem M1 se navíc nachází malý helix označovaný jako pre-M1, který je orientován souběžně s membránou.

Právě helixy M1, M3 a M4 všech čtyř podjednotek společně vytvářejí vrátka kanálu, kterými po vazbě ligandu při otevřeném stavu mohou procházet specifické ionty mezi vnějším a vnitřním prostředím. Přesná konformace vrátek stále není objasněna, protože krystalografickými technikami byl zatím získán receptor pouze v zavřeném stavu. Bylo ale zjištěno, že určitá místa vrátek kanálu vykazují vysokou strukturní homologii s K<sup>+</sup> kanály

(Sobolevsky, 2013), které sice mají jiný počet transmembránových helixů a jsou v membráně opačně orientovány, ale byly pro ně získány krystaly v otevřeném i zavřeném stavu. Proto můžeme hledat analogii pro funkci či strukturu i u glutamátém řízených iontových kanálů.

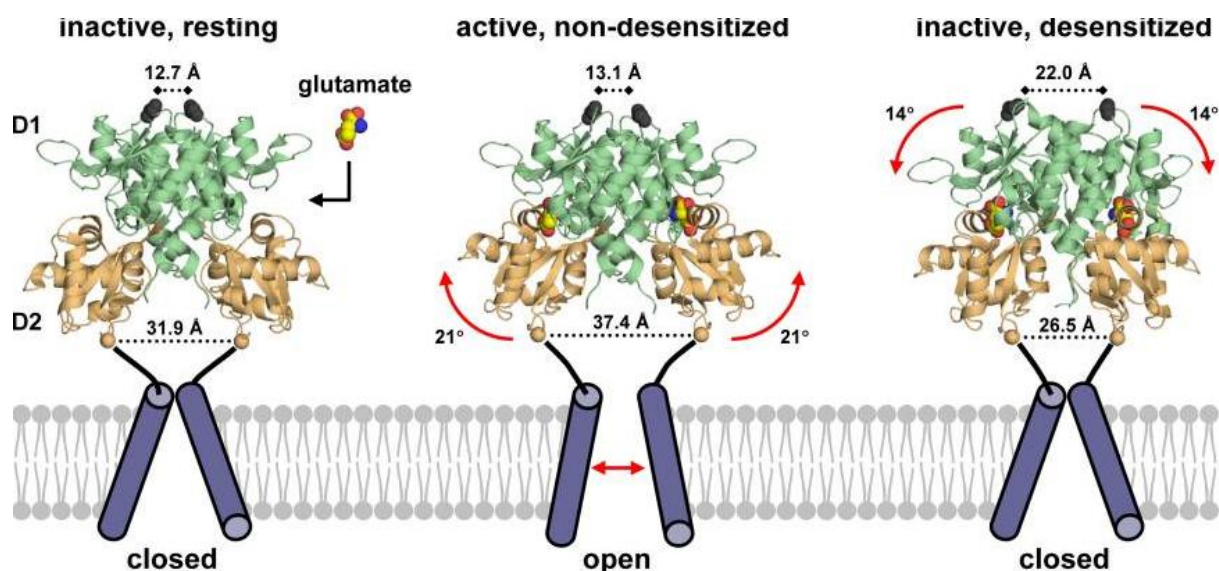
#### 2.3.4. Karboxy-terminální doména

CTD je lokalizována intracelulárně a je svou strukturou nejrozmanitější ze všech domén. Mezi jednotlivými typy podjednotek se může výrazně lišit jak ve své délce, tak v sekvenci aminokyselin. CTD nevykazuje žádnou sekvenční homologii s dosud známými proteiny. O její struktuře toho dosud není příliš známo, více je známo o místech, kam se vážou různé regulační proteiny. Například na podjednotce GluN1 je specifický vazebný motiv, na který se váže kalmodulin. Skrze něj se uplatňuje negativní zpětná vazba vůči zvýšené koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v buňce. Aktivované NMDA receptory propouštějí vápníkové ionty dovnitř buňky, kde se mimo jiné váží na kalmodulin, čímž ho aktivují. Aktivovaný kalmodulin pak zpětnovazebně interaguje přímo s CTD GluN1 podjednotky, což má za následek sníženou pravděpodobnost a dobu otevření iontového kanálu (Ehlers et al., 1996).

Podobně jako v případě ATD byly prováděny mutační pokusy, kdy byla CTD odstraněna celá, nebo jen její části reprezentující různé regulační motivy. Iontový kanál sice zůstal funkční, ale došlo ke změnám v jeho regulaci. Příkladem může být vliv kalcineurinu na desensitizaci NMDA receptorů skrze CTD podjednotky GluN2A, kdy kalcineurin snižuje odpovědi NMDA receptorů na synapsích potencování na glycinu nezávislé desensitizace (Krupp et al., 2002). Vzhledem k dalším experimentálním datům je CTD považována za důležitého účastníka stabilizace receptoru v membráně, je důležitá pro procesy post-translačních modifikací receptoru, zacílení proteinu na membránu, ale také pro zprostředkování signálů vedoucích k degradaci receptoru (Hawkins et al., 2004).

### 3. Mechanismus působení glutamátových iontových kanálů

Iontové kanály obecně se mohou vyskytovat ve třech stavech. Ve stavu zavřeném aktivovatelném, otevřeném a zavřeném inaktivovaném (desenzitizovaný stav) (obr. 3). U glutamátem řízeného iontového kanálu v zavřeném aktivovatelném stavu se dramaticky zvyšuje šance na jeho otevření v přítomnosti specifického ligandu/agonisty. V otevřeném stavu jsou vrátka kanálu otevřená a ionty mohou postupovat dovnitř či vně buňky dle charakteristiky kanálu. Po zavření kanálu dochází k refrakterní fázi, během níž ani nadprahová stimulace signálem nevede k otevření kanálu. V této fázi dochází k uvolnění navázaného ligandu a následnému přechodu zpět do fáze zavřené aktivovatelné.



Obr. 3. Tři konformační stavy a změny mezi nimi u AMPA receptoru. Zleva doprava: zavřený aktivovatelný (*inactive, resting*), otevřený (*active, non-desensitized*) a zavřený inaktivovaný (*inactive, desensitized*) (převzato dle Traynelis et al., 2010).

#### 3.1. Farmakologie

Glutamátové iontové kanály patří do skupiny chemicky řízených iontových kanálů, jež jsou aktivovány po navázání agonisty. Jde o látku, která se váže na LBD, kde způsobuje konformační změny. Ty se dále přenášejí receptorem a vyústí v otevření kanálu. Na LBD se mohou také vázat i látky antagonistické, ty ale nespouštějí biologickou odpověď receptoru,

kteřý nadále zůstává v zavřeném stavu. Agonisté a antagonisté mohou být plní či parciální. Plnými agonisty a antagonisty jsou látky, které u receptoru vyvolají plnou stimulaci či inhibici, oproti látkám parciálním, které ho stimulují/inhibují pouze částečně.

### 3.1.1. Agonisté AMPA, kainátových a delta receptorů

K aktivaci AMPA, kainátových a delta receptorů stačí na rozdíl od NMDA receptorů pouze navázání přirozeného agonisty glutamátu. Rozdíly ve farmakologii AMPA a kainátových receptorů nejsou příliš výrazné. AMPA receptory aktivuje  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionát, který ale funguje i jako parciální agonista určitých podjednotek receptorů kainátových (Swanson et al., 1996). Stejně tak kainát působí jako silný agonista kainátových receptorů, ale zároveň může vyvolávat velmi rychlou desenzitizaci neuronálních AMPA receptorů (Patneau et al., 1993). Ze strukturálního hlediska se kainátové receptory liší od AMPA typu větším prostorem v oblasti pro navázání ligandu. Oproti podjednotce GluA2 je tento prostor větší o 40 % u podjednotky GluK1 a o 16 % u podjednotky GluK2 (Mayer, 2005). Ve výsledku tak mohou kainátové receptory vázat jako ligandy větší molekuly. Oba typy kanálů pak mohou být aktivovány například v přírodě se vyskytujícími molekulami, jako jsou kyselina ibotenová (kyselina 3-hydroxyisoxazolyl-5- $\alpha$ -aminoctová), willardiin a jejich analogy (Stein et al., 1992; Coquelle et al., 2000).

### 3.1.2. Agonisté NMDA receptorů

Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, tetramer NMDA receptoru obsahuje dvě vazebná místa pro glutamát na podjednotce GluN2 a dvě pro koagonistu glycin na podjednotce GluN1 a je aktivována simultánním navázáním obou látek. Na rozdíl od AMPA, kainátových a delta receptorů se liší tím, že NMDA receptory jsou aktivovatelné i pomocí N-methyl-D-aspartátu a L-aspartátu, které se váží do glutamátového vazebného místa. Dalšími látkami, které mohou aktivovat NMDA receptory, jsou pro podjednotku GluN1 například L-serin-O-sulfát či D-alanin a pro podjednotku GluN2 L- a D-cysteinát nebo L-homocysteinát (Mayer et al., 1992). Podobných přirozených i uměle vytvořených agonistů je celá řada a navzájem se liší mírou vazby v LBD.

Za fyziologický ligand NMDA receptorů se považuje glycin (Johnson a Ascher, 1987), nicméně na jeho koagonistické místo se mohou vázat a aktivovat ho i neutrální aminokyseliny malé velikosti – D- a L- izomery serinu a alaninu (Furukawa a Gouaux, 2003). Zajímavá je

situace pro D-serin, u něhož byla objevena relativně vysoká koncentrace v mozku (Hashimoto et al., 1992). Existují tak hypotézy, které považují D-serin za dalšího fyziologického agonistu NMDA receptorů (Mothet et al., 2000; Wolosker et al., 2008) s významnou rolí ve fungování mozku. Tyto teorie podporují i studie sledující vliv nedostatku D-serinu na funkci NMDA receptorů v sítnici (Stevens et al., 2003) a hipokampu (Mothet et al., 2000). Protiargumentem byly však studie, podle jejichž výsledků je D-serin syntetizován pouze v gliových buňkách, konkrétně astrocytech (Schell et al., 1995). Nově byl ale D-serin detekován i v neuronech (Miya et al., 2008), což je dalším podpůrným argumentem pro jeho zařazení mezi neurotransmitery.

Mezi parciální agonisty glycinového vazebného místa NMDA receptorů se řadí i D-cykloserin, u něhož je zajímavé, že vyvolává podstatně větší odpověď u receptorů s podjednotkou GluN2C než u receptorů s dalšími GluN2 podjednotkami (Sheinin et al., 2001). D-cykloserin se využívá při léčbě psychiatrických onemocnění (Norberg et al., 2008), konkrétně například pomáhá k lepšímu zvládnání strachu při úzkostech (anxiety). Proto se nabízí možnost ovlivnění exprese receptorů u neuronů tak, aby se podpořil vznik NMDA receptorů s GluN2C podjednotkou a bylo tak dosaženo většího léčebného účinku D-cykloserinu.

### 3.1.3. Antagonisté glutamátových receptorů a allosterická modulace

Antagonistické látky se dělí podle místa působení na kompetitivní, akompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní antagonisté se vážou na stejné místo jako agonisté, s kterými tak o vazebné místo soupeří. Mezi nejvýznamnější kompetitivní antagonisy glutamátových iontových kanálů patří quinoxalinediony (konkrétně například 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione či 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione) u AMPA a kainátových receptorů (Wilding a Huettner, 1996) a kyselina kynurenová u NMDA receptorů (Perkins a Stone, 1982).

Za akompetitivní antagonisy jsou označovány látky, jež se vážou přímo do vrátek iontového kanálu, čímž znemožňují průchod iontů do buňky. Pro to, aby se tak stalo, musí být receptor nejprve aktivován. Akompetitivními antagonisy u glutamátových iontových kanálů jsou např. pro NMDA receptory  $Mg^{2+}$  či memantin, který je v současné době využíván pro léčbu Alzheimerovy demence.



Nekompetitivní antagonisté se váží na místo jiné, čímž například mění konformaci receptoru tak, že znemožňují navázání agonisty. Nekompetitivními antagonisty u AMPA receptorů jsou třeba 2,3-benzodiazepiny (Gito et al., 2003). U NMDA receptorů jsou jimi například dvojmocné ionty zinku, kadmia a mědi, polyaminy a ifenprodil (fenylethanolamin), první objevený na podjednotku (konkrétně ATD) specificky se vážící antagonist (Legendre a Westbrook, 1991).

Podobným způsobem jako nekompetitivní antagonisté ovlivňuje funkci receptorů velká skupina látek – allosterické modulátory. Tyto látky účinkují skrze allosterický efekt, což je konformační změna proteinu, která je vyvolána navázáním allosterického modulátoru. Allosterický modulátor tak ovlivňuje pozitivně nebo negativně činnost a funkci receptoru, aniž by se vázal do vazebného místa agonisty v LBD. Z tohoto důvodu mají allosterické modulátory terapeutické výhody oproti agonistům a kompetitivním antagonistům. Jsou lépe snášeny, protože funkci receptoru pouze upravují, zatímco léčebně využívání agonisté ho mohou aktivovat přespříliš a naopak kompetitivní antagonisté ho nadměrně blokuji či inhibují. Allosterické modulátory lze proto rozdělit na pozitivní a negativní. Pozitivní zvyšují aktivitu receptorů například tím, že modifikují dobu deaktivace a desensitizace (Stäubli et al., 1994). Negativní allosterické modulátory, mezi něž patří například neurosteroidy nebo protony, naopak aktivitu receptorů snižují.

### ***3.2. Mechanismus otevírání iontového kanálu***

Glutamátové receptory jsou, co se týče kinetiky otevírání iontového kanálu, velice různorodou skupinou, u které se odpověď na podnět a průběh samotné odpovědi výrazně liší v závislosti na typu kanálu, jeho podjednotkovém složení či post-translačních modifikacích. Pro příklad, rekombinantní typy AMPA receptorů se vyznačují rychlým průběhem aktivaci i deaktivace a rychlou a silnou desensitizací, zatímco tyto procesy jsou u NMDA receptorů řádově pomalejší a vyvolávají jen slabou či žádnou desensitizaci (Edmonds et al., 1995). Následující popisy procesů aktivace a desensitizace platí zejména pro AMPA a kainátové receptory. Podobné fungování se navzdory odlišné kinetice předpokládá i u NMDA receptorů, nicméně pro tento typ kanálů máme zatím na rozdíl od kanálů AMPA a kainátových méně experimentálních dat.



### 3.2.1. Aktivace

Aktivace glutamátém řízeného iontového kanálu začíná navázáním agonisty, zpravidla glutamátu, na ligand vázající doménu. Míra uzavření LBD po navázání agonisty je závislá na typu navázaného ligandu. Například navázáním agonisty glutamátu dochází na prototypické podjednotce GluA2 k posunu spodní části LBD směrem k horní o 20 stupňů, zatímco u částečného agonisty kainátu to je jen o stupňů 12 a u kompetitivního antagonisty 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dionu (DNQX) pouze o 2,5 stupně (Armstrong et al., 2000). Tato konformační změna se přenáší na  $\alpha$ -helixy v TMD a posléze vede k otevření kanálu. Přesný mechanismus přenosu konformační změny z LBD na TMD ale zatím zůstává neznámý, ačkoliv experimentální data ukazují na klíčovou roli linkerů (viz kapitola 3.2.3) a evolučně konzervované transmembránové sekvence SYTANLAAF v M3 úseku. Konkrétně aminokyselina Alanin-621 v tomto motivu má klíčovou funkci při ohýbání M3 úseku, které nastává při aktivaci kanálu. Záměna Alaninu-621 za menší glycin způsobila snadnější ohybatelnost M3 úseku, v důsledku čehož bylo zabráněno desensitizovanému stavu (Moore et al., 2013). Důležitou funkci při otevírání vrátek kanálu zastává i Methionin-629, který je situován nad vrátky a měl by přenášet či se podílet na přenosu konformační změny z LBD na TMD (Moore et al., 2013). Význam sekvence SYTANLAAF podporují i výsledky získané pomocí mutagenese, kdy záměna alaninů za threoniny v této sekvenci vede ke změnám v aktivitě kanálu (Kohda et al., 2000; Klein et al., 2004). Podobné výsledky byly pozorovány i při substituci za cysteiny (Chang a Kuo, 2008).

### 3.2.2. Desensitizace

Desensitizace je proces zavření kanálu, který následuje po jeho krátkém otevření, a zavřený stav, ve kterém kanál posléze zůstane i při nadprahové koncentraci agonisty – jedná se o tzv. refrakterní fázi. Příčinou je změna konformace transmembránových domén. Ty uzavrou vrátka kanálu i přes to, že jsou ve vazebných místech navázáni agonisté. Poté následuje prodleva, během které se vyváží agonisté a kanál může být následně znovu aktivován.

Desensitizace, trvající typicky déle než aktivace kanálu, je ochranným procesem, který neuronální buňky chrání před nadměrnou aktivitou kanálů, při níž by došlo k přílišnému vniku iontů  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Vysoká intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů je nebezpečná vzhledem ke své schopnosti vyvolat excitotoxický stav v buňce (podrobněji popsáno v kapitole 5.1).

Podobně jako u aktivace hraje i u desensitizace zásadní roli LBD, konkrétně část tvaru lastury, kam se váže ligand (viz kapitola 2.3.2). Při pokusech s AMPA receptory se podařilo zjistit, že LBD tvoří dimery a že stabilizace těchto styčných ploch v receptoru ať už pomocí mutací, či allosterické modulace, snižuje míru desensitizace. Naopak destabilizace styčných ploch LBD vede ke zvýšení míry desensitizace (Sun et al., 2002). Desensitizaci se dá u AMPA receptoru i úplně zabránit skrze pouhou vhodnou bodovou mutací centra LBD, při níž je toto centrum stabilizováno v aktivní konformaci. Podobná bodová mutace, která zamezí desensitizaci, byla nedávno objevena i u kainátových receptorů. Konkrétně jde o výměnu aspartátu 776 za lysin (Nayeem et al., 2009). Klíčová role styčné plochy mezi dvěma ligand vázajícími doménami byla potvrzena i při allosterické modulaci pomocí aniracetamu nebo CX614 (Jin et al., 2005).

### 3.2.3. Linkery

Linkery jsou krátká polypeptidová spojení mezi jednotlivými doménami. Je uvažováno, že právě skrze ně či s jejich pomocí se při otevírání kanálu přenáší konformační změny z ligand vázající domény na doménu transmembránovou. Mezi těmito doménami se u glutamátových iontových kanálů nacházejí tři linkery. Jde o linkery spojující úseky S1-M1, M3-S2 a S2-M4 (popis úseků viz kapitoly 2.3.2 a 2.3.3).

Kromě role při otevírání iontového kanálu, za kterou jsou zodpovědné linkery spojující LBD s TMD, mohou linkery zastávat i další regulační funkci. V receptoru jsou i linkery mezi ATD a LBD. Předpokládá se, že právě skrze ně se uplatňují změny při allosterické modulaci na amino-terminální doméně. Vzhledem k rozdílné velikosti ATD u různých typů podjednotek by i funkce linkerů v této oblasti mohla být dosti variabilní (Furukawa, 2012).

## 4. Funkce glutamátem řízených kanálů v centrální nervové soustavě

### 4.1. Synaptický přenos a role v plasticitě synapsí

Synapse je místem spojení dvou neuronů (případně i neuronu a smyslové či svalové buňky), kde dochází k přenosu vzruchů. Neurony v synapsi nejsou v přímém kontaktu, odděluje je synaptická štěrbinu o obvyklé šířce 20-30 nm. Při přenosu nervového signálu dojde k vylití neurotransmiteru z váčků na presynaptické straně. Neurotransmitter prochází štěrbinou a váže se na receptory na postsynaptické membráně. Synapse se dělí na inhibiční a excitační.

Jak bylo popsáno výše, ligandem glutamátových receptorů je kyselina L-glutamová. Ta plní v savčí nervové soustavě funkci základního excitačního neuropřenašeče a receptory glutamátového typu tak můžeme najít na většině rychlých excitačních synapsí. Glutamátem řízené iontové kanály jsou tudíž zodpovědné za většinu excitačního nervového přenosu (Traynelis et al., 2010).

Kromě základní úlohy v přenosu nervového signálu je popsán i související vliv glutamátových ionotropních receptorů na plasticitu synapsí, což je schopnost upravit funkční vlastnosti synapse v závislosti na aktivitě, které jsou vystaveny. Změna synapsí v čase je závislá i na ontogenetickém stadiu vývoje jedince. Jiné receptorové složení můžeme pozorovat u novorozenců a jiné u dospělých jedinců. Právě plasticita synapsí je důležitou a nedílnou součástí procesů učení a vzniku paměti.

### 4.2. Funkce AMPA receptorů

Převážná většina rychlého excitačního synaptického přenosu se odehrává prostřednictvím heteromerních AMPA receptorů složených z různých kombinací podjednotek GluA1 – GluA4. AMPA receptory jsou na většině excitačních synapsích CNS, na kterých se vyskytují, společně s NMDA receptory, které s nimi funkčně souvisí. Při vylití glutamátu dochází nejprve ke krátkodobé aktivaci AMPA receptorů, které částečně depolarizují membránu. Depolarizaci membrány je odstraněna blokace NMDA receptorů ionty  $Mg^{2+}$ . Dochází k aktivaci NMDA receptorů, vtoku vápníku do buňky a přenosu signálu (Petralia a Wenthold, 2008).

V základních typech neuronů předního mozku, včetně hipokampu a mozkové kůry, dospělého člověka se převládající podtyp AMPA receptorů skládá z podjednotek GluA1 a GluA2. Minoritní roli pak ještě mají GluA2/GluA3 receptory (Lu et al., 2009). Stěžejní je pro funkci podjednotka GluA2, která determinuje vodivost kanálu a jeho propustnost pro ionty  $Ca^{2+}$ . V případě její absence je navíc receptor senzitivní k extra- i intracelulárnímu polyaminovému bloku (Isaac et al., 2007).

Expresí typu podjednotek je vývojově regulována, je místně specifická a závislá na buněčném typu i samotné aktivitě synapse. Nízká postnatální hladina exprese podjednotky GluA2 spolu s přechodně vysokou expresí podjednotky GluA4 zapříčiňuje propustnost receptorů pro  $Ca^{2+}$  v předním mozku novorozence (Pickard et al., 2000; Zhu et al., 2000). To může hrát roli v maturaci synapsí a v tvorbě nervových okruhů (Aizenman et al., 2002; Kumar et al., 2002). Brzy po narození pak dochází k potlačení exprese podjednotky GluA4 a naopak ke zvýšení exprese podjednotky GluA2, která přetrvává i v dospělosti (viz výše).

### **4.3. Funkce kainátových receptorů**

Kainátové receptory jsou rozšířené v celé centrální nervové soustavě a mohou se v místě synaptické štěrbině vyskytovat pre- i postsynapticky, přičemž jejich podjednotkové složení je odlišné na pre- a postsynaptické membráně. Například u synapsí axonů granulárních buněk dentate gyrus s dendrity pyramidálních buněk v CA3, které jsou nejlépe prozkoumaným místem přenosu vzruchu pomocí kainátových receptorů, se presynapticky nacházejí heterotetramery kombinací GluK1, GluK2 a GluK3, zatímco postsynaptické kainátové receptory jsou tvořeny kombinacemi GluK2 a GluK5. Právě presynaptické kainátové receptory tu fungují v roli tzv. autoreceptorů, které ovlivňují, a v tomto konkrétním případě podporují, vylití neurotransmiterů na synapsích (Kwon a Castillo, 2008).

Důležitou roli hrají kainátové receptory i ve vývoji jedince, při kterém procházejí silnými regulačními změnami. Například thalamokortikální synaptický přenos je v prvním týdnu po narození člověka uskutečňován prostřednictvím kainátových receptorů. Ty jsou ale poté nahrazeny AMPA receptory, které signál přenášejí rychleji (Kidd a Isaac, 1999).

Mimo výše uvedené příklady mohou kainátové receptory skrze G-proteiny a následně kaskády druhých posílů snižovat množství vylité GABA (kyselina  $\gamma$ -aminomáselná)

v inhibičních synapsích v hipokampu a tím tak tyto synapse regulovat (Rodríguez-Moreno a Lerma, 1998). Přesný mechanismus ale dosud znám není.

#### **4.4. Funkce NMDA receptorů**

Jak bylo uvedeno výše, NMDA receptory se podílejí na excitačním nervovém přenosu v součinnosti s AMPA receptory. Poměr AMPA a NMDA receptorů na excitačních synapsích se může významně lišit v závislosti na jejich pozici v centrální nervové soustavě (Petrálie a Wenthold, 2008). V současné době se uvádí, že synaptické NMDA receptory se vyskytují v podjednotkovém složení dvou GluN1 podjednotek a dvou podjednotek GluN2, nebo GluN3, ačkoliv je, například v exogenních expresních systémech, potvrzena nativní existence i NMDA receptorů jiného podjednotkového složení.

Podobně jako u AMPA a kainátových receptorů se mění exprese jednotlivých NMDA podjednotek během vývoje. Změna v expresi je patrná především na podjednotkách GluN2 a GluN3, protože podjednotka GluN1 je obligatorní. Dobře popsána byla změna v mozkové kůře, hipokampu a mozečku, kde se receptory složené z podjednotek GluN1/GluN2B, které se u člověka vyskytují po narození, mění na receptory s podjednotkovým složením GluN1/GluN2A, jež se vyskytují v dospělosti (van Zundert et al., 2004). Tato výměna zapříčiňuje změnu vodivosti kanálu a je podmíněna aktivitou synapsí (Barria a Malinow, 2002).

Zvláště významná ve vývoji centrální nervové soustavy se zdá být změna z podjednotky GluN3A na podjednotku GluN3B. Podjednotku GluN3A nacházíme v CNS člověka brzy po narození a její výměna za podjednotku GluN3B hraje významnou roli v tvorbě a maturaci synapsí a s tím související schopností utvářet dlouhodobou paměť (Roberts et al., 2009). O procesu výměny podjednotek během vývoje toho zatím není příliš známo. U výše uvedeného příkladu byla zjištěna složitě regulovaná endocytická aktivita vlastních nervových buněk, zahájená skrze CTD GluN3A podjednotky (Pérez-Otaño et al., 2006). Podobné vývojové změny byly pozorovány i na dalších podjednotkách (např. Cathala et al., 2000). Obecně se dá říci, že receptory s podjednotkami GluN2B, GluN2D a GluN3A jsou častější v brzké postnatální fázi života, zatímco v dospělosti jsou častější NMDA receptory s podjednotkami GluN2A a GluN2C (Watanabe et al., 1992, 1993, 1994a, b, c).

NMDA receptory mají oproti ostatním glutamátovým iontovým kanálům specifické funkční vlastnosti, které vyplývají z jejich koaktivace glutamátem a glycinem (případně i D-serinem) zároveň a zejména z jejich závislosti nejen na navázání ligandu ale i na změně napětí na membráně. Pro otevření NMDA receptoru musí být splněny oba požadavky – navázání ligandu i změna napětí na membráně, která vyváže blok  $Mg^{2+}$  iontů. Právě těmito vlastnostmi NMDA receptorů je vysvětlován princip dlouhodobé potenciace v nervové soustavě. Dlouhodobá potenciace je dlouhodobé zesílení synaptického přenosu mezi dvěma neurony v důsledku jejich současné stimulace a je považována za základní mechanismus učení a paměti. Stejnými funkčními vlastnostmi NMDA receptorů je vysvětlována i jejich předpokládaná role v plasticitě synapsí.

## **5. Některé patofyziologické stavy spojené s glutamátovými iontovými kanály**

Glutamátem řízené iontové kanály jsou esenciální složkou excitačního nervového přenosu savčí centrální nervové soustavy. Poruchy v jejich funkci jsou vzhledem k jejich důležitosti často spojeny s vážnými neurologickými onemocněními. Náprava jejich funkce k fyziologickým hodnotám je cílem léčby mnoha neurologických a neuropsychiatrických onemocnění.

Tato kapitola je zaměřena na popis pouze několika modelových příkladů onemocnění, která jsou také zapříčiněna špatnou funkcí glutamátergního systému. Zdaleka tedy nejde o úplný výčet onemocnění, u nichž se předpokládá spojitost s tímto systémem. Vedle níže uvedených onemocnění se předpokládá spojení chybné funkce glutamátových receptorů s autismem, diabetem, roztroušenou sklerózou, Huntingtonovou či Parkinsonovou chorobou, schizofrenií a s mnoha dalšími poruchami (Bowie, 2008).

### ***5.1. Cévní mozková příhoda a traumatické poranění mozku***

Cévní mozková příhoda (CMP, též ictus apoplecticus cerebri) je poškození nervové tkáně mozku zapříčiněné poruchou jejího prokrvení. Traumatickým poraněním mozku (TPM) je myšleno poranění mozkové tkáně fyzikálním traumatem. Jde o stavy, které mohou postiženého bezprostředně ohrozit na životě a které mohou vést k mnoha závažným zdravotním následkům. Se stárnoucí populací se navíc incidence ictu apoplecticu cerebri zvyšuje o 1 – 1,5 % ročně.

Léčba se dosud zaměřovala až na řešení následků, tedy výsledného stavu poškozené nervové tkáně, a byla prováděna buď pomocí trombolitik (v případě ischemického typu CMP), která rozpustila krevní sraženinu, nebo operačně. Poslední roky se výzkum v této oblasti ubírá i cestou neuroprotektce, pomocí které je snaha omezit ztrátám nervových buněk v důsledku poranění a která by měla výrazně snížit následky způsobené tímto akutním stavem. Právě mezi moderní neuroprotektivní metody se řadí ovlivnění glutamátových iontových kanálů pomocí jejich antagonistů (Kalia et al., 2008).

Glutamátové iontové kanály jsou cílem léčby vzhledem k neurotoxickým účinkům, které vyvolávají při stavech spojených s poraněním mozku. Tyto negativní účinky jsou způsobeny tzv. excitotoxicitou, kdy jsou kanály stimulovány vysokými koncentracemi glutamátu uvolňovaného z poškozené tkáně, což vede k nekontrolovanému otevření kanálů a z toho vyplývajícimu nadměrnému vtoku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky.  $\text{Ca}^{2+}$  ionty jsou obecnými aktivátory dalších signálních drah v buňce, což vede k nadměrné a nekontrolovatelné intracelulární aktivitě, která následně poškodí nervovou buňku.

Snahou výzkumu je nalézt takové antagonisticky působící látky, které by této nadměrné aktivitě receptorů zabránily a které by vedle toho měly i minimální vedlejší účinky. V preklinických studiích vykazovaly neuroprotektivní vlastnosti antagonisté NMDA receptorů mířící na glutamát i glycin vázající místa, na hrdlo kanálu i na alostericky modulovatelná místa GluN2B podjednotky. Doposud všechny klinické testy ale bohužel selhaly (Green, 2002; Hoyte et al., 2004).

Diskrepance mezi výsledky na animálních modelech a v klinických testech na lidech je předmětem studia. Vysvětluje se například nemožností dosáhnout dostatečné koncentrace testované látky (v citovaném příkladě lék Aptiganel blokující hrdlo kanálu) v krevní plazmě pro to, aby bylo dosaženo neuroprotektivního efektu, z důvodu vážných vedlejších účinků (Dyker et al., 1999). Tato hypotéza ale není plošným důvodem selhání antagonistů glutamátových kanálů při klinických testech neuroprotektce. Třeba antagonist glycinového místa Gavestinel byl dobře tolerován a v plazmě se vyskytoval v koncentracích, u kterých byla předpokládána neuroprotektivní účinnost, přesto také nemohl být uveden do klinické praxe (Lees et al., 2000). Nabízejí se tak další vysvětlení. Možností je, že CMP či TPM spouštějí i další neurotoxické kaskády (Doyle et al., 2008), při kterých blokace jenom NMDA receptorů nemusí stačit ke zlepšení klinických výsledků. Uvažuje se i o tom, že testované látky nebyly podávány v dostatečně krátké době po vzniku poškození – za kterou jsou považovány zhruba 2 hodiny, ale možná i méně (Dirnagl et al., 1999; Hoyte et al., 2004) - po CMP či TPM.

Jisté neuroprotektivní účinky vykazovaly i preklinické testy antagonistů AMPA a kainátových receptorů. Dalšímu rozvoji léčby tímto směrem ale prozatím zabránila špatná rozpustnost těchto látek (Akins a Atkinson, 2002) nebo vážné vedlejší účinky v kombinaci se zhoršováním projevů onemocnění v klinických testech (Walters et al., 2005).



V současné době se zdá, že neuroprotektivní účinky blokace NMDA receptorů nabízejí nové a zajímavé vyhlídky pro léčbu závažných stavů po cévní mozkové příhodě a traumatickém poranění mozku. Výzkumné týmy se ale nadále potýkají se zásadními problémy ohledně klinické účinnosti, které bude třeba vyřešit, pokud má tento nadějný směr léčby naplnit svůj předpokládaný potenciál.

## **5.2. Deprese**

Deprese je nejrozšířenější neuropsychiatrickou poruchou se závažnými důsledky. Přestože se k léčbě využívá široké spektrum farmak, tak se stále nedaří nalézt účinnou léčbu pro zhruba polovinu postižených (Insel, 2006). Pozitivní účinek léčby je navíc možné pozorovat až po několika týdnech podávání moderních antidepresiv. Snaha zbavit se těchto negativních aspektů léčby deprese vedla mimo jiné k testování krátkodobé inhibice NMDA receptorů coby nového léčebného postupu (Paul a Skolnick, 2003).

První pozitivní výsledky byly získány v roce 2000 v malé studii využívající látku ketamin, což je blokátor NMDA receptorů. Po jeho 40-minutové infuzi došlo do dvou hodin ke zlepšení depresivního stavu pacientů, které vydrželo po dobu 3 dnů (Berman et al., 2000). Podobně pozitivní výsledky bylo možné sledovat i u pacientů, u kterých nebyla zaznamenána pozitivní odpověď na běžnou léčbu antidepresivy (Zarate et al., 2006). Výrazným negativem léčby deprese pomocí ketaminu je však přítomnost halucinogenních projevů. Ty se ale vyskytovaly jen krátkodobě při infuzích ketaminu, na rozdíl od několik dnů přetrvávajících vedlejších účinků jiných antidepresiv.

Další studie se zaměřují na antagonisty podjednotky GluN2B, u kterých se předpokládá absence či mírnější průběh halucinogenních stavů při její blokaci. Provedena byla studie s aplikací traxoprodilu pacientům, na které neúčinkovala léčba antidepresivy. Výsledky byly příznivé - u některých pacientů došlo ke zlepšení stavu až na dobu 30 dní (Preskorn et al., 2008). Při vysokých dávkách traxoprodilu se však opět objevovaly obtíže s halucinacemi. Ty ustupovaly s klesající dávkou, navíc je nutné dodat, že zhruba polovina pacientů, na které měla léčba traxoprodilem pozitivní vliv, problémy s halucinacemi netrpěla (Preskorn et al., 2008). Další testy probíhají, protože je zřejmé, že krátkodobá inhibice NMDA receptorů je nová a nadějná cesta v léčbě deprese, která by mohla přinést řešení pozdního nástupu pozitivního účinku současných antidepresiv a která by mohla pomoci i pacientům, kterým současné léčebné postupy dosud nepomáhaly.

## 6. Závěr

Poslední roky přinesly řadu objevů, které upřesnily pohled na problematiku glutamátem řízených iontových kanálů. Detailní znalosti struktury, nativní konformace i funkce receptorů lze využít ve farmakologii pro přípravu účinných léků s méně nežádoucími vlastnostmi. Kromě toho studium glutamátergního systému přináší přesnější vhled do procesů lidského myšlení, vnímání i mechanismu paměti.

Přesto dosud zůstává neobjasněno množství důležitých podrobností o glutamátem řízených iontových kanálech. V současné době se s postupujícím rozvojem molekulární biologie vědecké týmy intenzivně věnují pátrání po vytvoření a zanalyzování co nejpřesnější a nejdetailnější struktury glutamátových ionotropních receptorů. Pro její zjištění bude klíčová úplná či alespoň částečná izolace některého z těchto receptorů v otevřeném stavu a nativní konformaci. S postupujícím poznáním strukturních podrobností se bude jistě upřeshňovat a zdokonalovat i naše představa o molekulárních mechanismech, skrze které glutamátové iontové kanály fungují.

Simultánně s biologickým výzkumem probíhá i lékařský výzkum patofyziologických stavů spojených se špatně fungujícím glutamátergním systémem. Tyto stavy jsou spojeny s mnohými významnými onemocněními současné civilizace a nalezení jejich řešení je významným cílem veřejného zdravotnictví. Na druhou stranu lze diskutovat o příčině špatné funkce glutamátových iontových kanálů a těchto nemocí. Je stále možné, že pozorované abnormality v glutamátergním systému jsou důsledkem některých onemocnění a nikoliv jejich příčinou. A pokud přeci ano, tak je možné, že nikoliv jedinou. Klinický projev onemocnění tak může být způsoben komplexnější sítí změn v systémech nervové soustavy, které na sebe vzájemně působí. I tak stále platí, že glutamátergní systém je v popředí zájmu studia patofyziologických stavů nervové soustavy.

## 7. Seznam použité literatury

- Aizenman, C. D., Muñoz-Elías, G., Cline, H. T. (2002) Visually driven modulation of glutamatergic synaptic transmission is mediated by the regulation of intracellular polyamines. *Neuron* 34:623-634.
- Akins, P. T., Atkinson, R. P. (2002) Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Curr Med Res Opin* 18:s9-s13.
- Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q., Gouaux, E. (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395:913–917.
- Armstrong, N., Gouaux, E. (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28:165-181.
- Ayalon, G., Segev, E., Elgavish, S. a Stern-Bach, Y. (2005) Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J Biol Chem* 280:15053-15060.
- Barria, A., Malinow, R. (2002) Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35:345-353.
- Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S., Krystal, J. H. (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47:351-354.
- Bowie, D. (2008) Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:129-143.
- Cathala, L., Misra, C., Cull-Candy, S. (2000) Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci* 20:5899-5905.
- Clayton, A., Siebold, C., Gilbert, R. J., Sutton, G. C., Harlos, K., McIlhinney, R. A., Jones, E. Y., Aricescu, A. R. (2009) Crystal structure of the GluR2 amino-terminal domain provides insights into the architecture and assembly of ionotropic glutamate receptors. *J Mol Biol* 392:1125–1132.
- Contractor, A., Swanson, G. T. (2008) Kainate receptors, v *The Glutamate Receptors* (Gereau, R. W., Swanson, G. T.) 99-158, Humana Press, Totowa, NJ.
- Coquelle, T., Christensen, J. K., Banke, T. G., Madsen, U., Schousboe, A., Pickering, D. S. (2000) Agonist discrimination between AMPA receptor subtypes. *Neuroreport* 11:2643-2648.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.

- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Doyle, K. P., Simon, R. P., Stenzel-Poore, M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55:310-318.
- Dyker, A. G., Edwards, K. R., Fayad, P. B., Hormes, J. T., Lees, K. R. (1999) Safety and tolerability study of aptiganel hydrochloride in patients with an acute ischemic stroke. *Stroke* 30:2038-2042.
- Edmonds, B., Gibb, A. J., Colquhoun, D. (1995) Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu Rev Physiol* 57:495-519.
- Ehlers, M. D., Zhang, S., Bernhardt, J. P., Huganir, R. L. (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84:745-755.
- Furukawa, H., Gouaux, E. (2003) Mechanism of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* 22:2873-2885.
- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., Gouaux, E. (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185-192.
- Furukawa, H. (2012) Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains. *J Physiol* 590:63-72.
- Gito, R., Barreca, M. L., De Luca, L., De Sarro, G., Ferreri, G., Quartarone, S., Russo, E., Constanti, A., Chimirri, A. (2003) Discovery of a novel and highly potent non-competitive AMPA receptor antagonist. *J Med Chem* 46:197-200.
- Green, A. R. (2002) Why do neuroprotective drugs that are so promising in animals fail in the clinic? An industry perspective. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:1030-1034.
- Greger, I. H., Akamine, P., Khatri, L., Ziff, E. B. (2006) Developmentally regulated, combinatorial RNA processing modulates AMPA receptor biogenesis. *Neuron* 51:85-97.
- Grunwald, M. E., Kaplan, J. M. (2003) Mutations in the ligand-binding and pore domains control exit of glutamate receptors from the endoplasmic reticulum in *C. elegans*. *Neuropharmacology* 45:768-776.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Hayashi, T., Fujii, N., Harada, K., Oka, T., Takahashi, K. (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett* 296:33-36.
- Hawkins, L. M., Prybylowski, K., Chang, K., Moussan, C., Stephenson, F. A., Wenthold, R. J. (2004) Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-D-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the c terminus of the NR2 subunit. *J Biol Chem* 279:28903-28910.
- Hoyte, L., Barber, P. A., Buchan, A. M., Hill, M. D. (2004) The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med* 4:131-136.

- Chang, H. R., Kuo, C. C. (2008) The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci* 28:1546-1556.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chazot, P. L., Coleman, S. K., Cik, M., Stephenson, F. A. (1994) Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *J Biol Chem* 269:24403-24409.
- Chazot, P. L., Stephenson, F. A. (1997) Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J Neurochem* 69:2138-2144
- Insel, T. R. (2006) Beyond efficacy: the STAR\*D trial. *Am J Psychiatry* 163:5-7.
- Isaac, J. T., Ashby, M., McBain, C. J. (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54:859-871.
- Jin, R., Clark, S., Weeks, A. M., Dudman, J. T., Gouaux, E., Partin, K. M. (2005) Mechanism of positive allosteric modulators acting on AMPA receptors. *The Journal of neuroscience* 25:9027-9036.
- Johnson, J. W., Ascher, P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Kalia, L. V., Kalia, S. K., Salter, M. W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol* 7:742-755.
- Kidd, F. L., Isaac, J. T. (1999) Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* 400:569-573.
- Kleckner, N. W., Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837.
- Klein, R. M., Howe, J. R. (2004) Effect of the lurcher mutation on GluR1 desensitization and activation kinetics. *J Neurosci* 24:4941-4951.
- Kohda, K., Wang, Y., Yuzaki, M. (2000) Mutation of glutamate receptor motif reveals its role in gating and delta2 receptor channel properties. *Nat Neurosci* 3:315-322.
- Krupp, J. J., Vissel, B., Thomas, C. G., Heinemann, S. F., Westbrook, G. L. (2002) Calcineurin acts via the C-terminus of NR2A to modulate desensitization of NMDA receptors. *Neuropharmacology* 42:593-602.

- Kumar, S. S., Bacci, A., Kharazia, V., Huguenard, J. R. (2002) A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 22: 3005-3015.
- Kwon, H. B., Castillo, P. E. (2008) Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 60:1082-1094.
- Laube, B., Kuhse, J., Betz, H. (1998) Evidence for tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.
- Lees, K. R., Asplund, K., Carolei, A., Davis, S. M. et al. (2000) Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators. *Lancet* 355:1949-1945.
- Legendre, P., Westbrook, G. L. (1991) Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol Pharmacol* 40:289-298.
- Lerma, J., Zukin, R. S., Bennett, M. V. (1990) Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2354-2358.
- Leuschner, W. D. a Hoch, W. (1999) Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their N-terminal domains. *J Biol Chem* 274:16907-16916.
- Lu, W., Shi, Y., Jackson, A. C., Bjorgan, K., Doring, M. J., Sprengel, R. (2009) Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62:254-268.
- Mano, I. a Teichberg, V. I. (1998) A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. *Neuroreport* 9:327-331.
- Masuko, T., Kashiwagi, K., Kuno, T., Nguyen, N. D., Pahk, A. J., Fukuchi, J., Igarashi, K., Williams, K. (1999) A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* 55:957-969.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y., Yuzaki, M. (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci* 23:10064-10073.
- Matsuda, S., Kamiya, Y., Yuzaki, M. (2005) Roles of N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 280:20021-20029.
- Mayer, M. L., Benveniste, M., Patneau, D. K., Vyklicky, L., Jr. (1992) Pharmacologic properties of NMDA receptors. *Ann N Y Acad Sci* 648:194-204.
- Mayer, M. L. (2005) Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron* 45:539-552.

- Mayer, M. L. (2011) Emerging Models of Glutamate Receptor Ion Channel Structure and Function. *Structure* 19:1370-1380.
- Miya, K., Inoue, R., Takata, Y., Abe, M., Natsume, R., Sakimura, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol* 510:641-654.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Moore, B. S., Mirshahi, U. L., Ebersole, T. L., Mirshahi, T. (2013) A conserved mechanism for gating in an ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 288:18842-18852.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., Jr., Linden, D. J., Ferris, C. D., Rogawski, M. A., Snyder, S. H. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4926-4931.
- Naur, P., Hansen, K. B., Kristensen, A. S., Dravid, S. M., Pickering, D. S., Olsen, L., Vestergaard, B., Egebjerg, J., Gajhede, M., Traynelis, S. F. (2007) Ionotropic glutamate-like receptor delta 2 binds D-serine and glycine. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14116-14121.
- Nayeem, N., Zhang, Y., Schweppe, D. K., Madden, D. R., Green, T. (2009) A nondesensitizing kainate receptor point mutant. *Mol Pharmacol* 76:534-542.
- Norberg, M. M., Krystal, J. H., Tolin, D. F. (2008) A meta-analysis of D-cycloserine and the facilitation of fear extinction and exposure therapy. *Biol Psychiatry* 63:1118-1126.
- Pasternack, A., Coleman, S. K., Jouppila, A., Mottershead, D. G., Lindfors, M., Pasternack, M., Keinänen, K. (2002) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor channels lacking N-terminal domain. *J Biol Chem* 277:49662-49667.
- Patneau, D. K., Vyklicky, L., Jr., Mayer, M. L. (1993) Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate. *J Neurosci* 13:3496-3509.
- Paul, I. A., Skolnick, P. (2003) Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann NY Acad Sci* 1003:250-272.
- Peréz-Otaño, I., Luján, R., Tavalin, S. J., Plomann M., Modregger, J., Liu, X. B., Jones, E. G., Heinemann, S. F., Lo, D. C., Ehlers, M. D. (2006) Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat Neurosci* 9:611-621.
- Perkins, M. N., Stone, T. W. (1982) An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res* 247:184-187.
- Petralia, R. S., Wenthold, R. J. (2008) NMDA receptors, v *The Glutamate Receptors* (Gereau, R. W., Swanson, G. T.) 45-98, Humana Press, Totowa, NJ.

- Pickard, L., Noel, J., Henley, J. M., Collingridge, G. L., Molnar, E. (2000) Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:7922-7931.
- Pin, J. P., Archer, F. (2002) The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:297-317.
- Preskorn, S. H., Baker, B., Kolluri, S., Menniti, F. S., Krams, M., Landen, J. W. (2008) An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28:631-637.
- Priel, A., Selak, S., Lerma, J., Stern-Bach, Y. (2006) Block of kainate receptor desensitization uncover a key trafficking checkpoint. *Neuron* 52:1037-1046.
- Roberts, A. C., Díez-García, J., Rodriguiz, R. M., Lopéz, I. P., Luján, R., Martínez-Turrillas, R., Picó, E., Henson, M. A., Bernardo, D. R., Jarrett, T. M. et al. (2009) Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63:342-356.
- Rodríguez-Moreno, A., Lerma, J. (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves metabotropic function. *Neuron* 20:1211-1218.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C. F. (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Salussolia, C. L., Gan, Q., Kazi, R., Singh, P., Allopenna, J., Furukawa, H., Wollmuth, L. P. (2013) A eukaryotic specific transmembrane segment is required for tetramerization in AMPA receptors. *J Neurosci* 33:9840-9845.
- Sheinin, A., Shavit, S., Benveniste, M. (2001) Subunit specificity and mechanism of action of NMDA partial agonist D-cycloserine. *Neuropharmacology* 41:151-158.
- Siegler Retchless, B., Gao, W., Johnson, J. W. (2012) A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction. *Nat Neurosci* 15:406-413.
- Schell, M. J., Molliver, M. E., Snyder, S. H. (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3948-3952.
- Schorge, S., Colquhoun, D. (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23:1151-1158.
- Smothers, C. T., Woodward, J. J. (2007) Pharmacological characterization of glycine-activated currents in HEK 293 cells expressing N-methyl-D-aspartate NR1 and NR3 subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 322:739-748.
- Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P., Gouaux, E. (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462:745-756.



- Sobolevsky, A. I. (2013) Structure and gating of tetrameric glutamate receptors. *J Physiol* 2013 Published online before print October 28, 2013, doi: 10.1113/jphysiol.2013.264911
- Stäubli, U., Perez, Y., Xu, F. B., Rogers, G., Ingvar, M., Stone-Elander, S., Lynch, G. (1994) Centrally active modulators of glutamate receptors facilitate the induction of long-term potentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11158-11162.
- Stein, E., Cox, J. A., Seeburg, P. H., Verdoorn, T. A. (1992) Complex pharmacological properties of recombinant alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 42:864-871.
- Stevens, E. R., Esguerra, M., Kim, P. M., Newman, E. A., Snyder, S. H., Zahs, K. R., Miller, R. F. (2003) D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6789-6794.
- Sun, Y., Olson, R., Horning, M., Armstrong, N., Mayer, M., Gouaux, E. (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417:245-253.
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., Cull-Candy, S. G. (1996) Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J Physiol* 492:129-142.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., Dingledine, R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496.
- van Zundert, B., Yoshii, A., Constantine-Paton, M. (2004) Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci* 27:428-437.
- Walters, M. R., Kaste, M., Lees, K. R., Diener, H. C., Hommel, M., De Keyser, J., Steiner, H., Versavel, M. (2005) The AMPA antagonist ZK 200775 in patients with acute ischaemic stroke: a double-blind, multicentre, placebo-controlled safety and tolerability study. *Cerebrovasc Dis* 20:304-309.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishima M. (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishima M. (1993) Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol* 338:377-390.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Mishima M. (1994a) Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the brainstem. *J Comp Neurol* 343:520-531.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Mishima M. (1994b) Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. *J Comp Neurol* 343:513-519.

- Watanabe, M., Inoue, Y., Mishima M. (1994c) Distinct spatiotemporal distributions of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. *J Comp Neurol* 345:314-319.
- Wilding, T. J., Huettner, J. E. (1996) Antagonist pharmacology of kainate- and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preffering receptors. *Mol Pharmacol* 49:540-546.
- Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., Foltyn, V. N. (2008) D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *Febs J* 275:3514-3526.
- Zarate Jr, C. A., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S., Manji, H. K. (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:856-864.
- Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y., Malinow, R. (2000) Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3:1098-1106.