

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:  
Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:  
Molekulární biologie a biochemie organismů



**Marie Pangrácová**

**Úloha D-aminokyselin v centrální nervové soustavě**  
The role of D-amino acids in central nervous system

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2015

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za laskavost a ochotu vždy poradit. Mgr. Barboře Vorlové za podnětné konzultace, její čas a velmi cenné připomínky. Bc. Janě Tvarůžkové za její potřebné rady předem. Svým blízkým děkuji za veškerou podporu při psaní této práce.

**Prohlášení:**

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

V Praze dne .....

Podpis .....

## ABSTRAKT

Teprve poměrně nedávno byla potvrzena přítomnost D-aminokyselin v centrální nervové soustavě savců a definována jejich biologická funkce. Mezi nejlépe popsané D-aminokyseliny v současnosti řadíme D-serin a D-aspartát, koagonisty aktivující NMDA receptory. D-serin a D-aspartát takto mimo jiné ovlivňují synaptickou plasticitu, základ buněčného mechanismu učení a paměti. Patologické změny v hladinách těchto D-aminokyselin nebo jejich metabolických enzymů mohou vést k rozvoji epilepsie, schizofrenie a neurodegenerativních onemocnění, jako jsou amyotrofická laterální skleróza, Huntingtonova choroba či Alzheimerova choroba. Hlavní úlohu v biosyntéze D-serinu v centrální nervové soustavě savců zastává serinracemasa, v případě D-aspartátu potom aspartátracemasa. Mezi enzymy klíčové pro degradaci obou těchto D-aminokyselin řadíme DAAO (oxidasa D-aminokyselin) a DAspO (oxidasa D-aspartátu). Tato práce představuje přehled dostupných poznatků o jednotlivých D-aminokyselinách a příslušných metabolických enzimech v centrální nervové soustavě savců – jejich distribuci, buněčné lokalizaci, metabolismu a významu. Dále se zaměřuje na možnosti regulace metabolických enzymů, na jejich význam v patogenezi i na možnosti jejich terapeutického ovlivnění v případě vzniku uvedených onemocnění.

**Klíčová slova:** D-serin, D-aspartát, CNS, neurotransmise, epilepsie, schizofrenie

## ABSTRACT

Only recently, the presence of D-amino acids in the mammalian central nervous system has been confirmed and their biological functions revealed. D-serine and D-aspartate, the best described D-amino acids, have been found to be the co-agonists activating NMDA receptors. In this way D-serine and D-aspartate, among other functions, affect synaptic plasticity which is the basic cellular mechanism for learning and memory. Pathological changes in the levels of these D-amino acids and their metabolical enzymes can lead to the development of epilepsy, schizophrenia, and neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, Huntington disease or Alzheimer disease. The main role in the D-serine synthesis is played by serin racemase while D-aspartate is synthesised with the help of aspartate racemase. The key enzymes for the degradation of D-amino acids are DAAO (D-amino acid oxidase) and DAspO (D-aspartate oxidase). This thesis presents an overview of available knowledge on the individual amino acids and their respective metabolical enzymes in the mammalian central nervous system, i.e. their distribution, cell localizations, metabolism and functions. Furthermore, the emphasis is put on the possibilities of inhibition and activation of the metabolical enzymes and their importance with respect to pathogenesis, and the possibility of a therapy affecting the enzymes in the case of these diseases.

**Key words:** D-serine, D-aspartate, CNS, neurotransmission, epilepsy, schizophrenia

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AD</b>	Alzheimerova choroba (z angl. <i>Alzheimer disease</i> )
<b>ADP</b>	adenosindifosfát (z angl. <i>adenosine diphosphate</i> )
<b>AIS</b>	iniciální segment (z angl. <i>axon initial segment</i> )
<b>ALS</b>	amyotrofní laterální skleróza
<b>AMK</b>	aminokyselina
<b>AMPAR</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionátový receptor (z angl. <i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i> )
<b>AP</b>	akční potenciál
<b>Asc-1</b>	alanin-serin-cystein transportér 1
<b>ASCT</b>	alanin-serin-cystein transportérový systém
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát (z angl. <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	vápenatý iont
<b>CaMK II</b>	kalmodulin dependentní kinasa II (z angl. <i>calmodulin-dependent protein kinase II</i> )
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava
<b>Co<sup>2+</sup></b>	kobaltnatý iont
<b>-COOH</b>	karboxylová funkční skupina
<b>CTP</b>	cytidintrifosfát (z angl. <i>cytidine triphosphate</i> )
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	měďnatý iont
<b>D-3-PGD</b>	D-3-fosfoglycerát dehydrogenasa (z angl. <i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i> )
<b>DAAO</b>	oxidasa D-aminokyselin (z angl. <i>D-amino acid oxidase</i> )
<b>D-AMK</b>	D-aminokyselina
<b>DAspO</b>	oxidasa D-aspartátu (z angl. <i>D-aspartate oxidase</i> )
<b>DISC1</b>	<i>disrupted in schizophrenia 1</i>
<b>DR</b>	aspartátracemasa (z angl. <i>D-aspartate racemase</i> )
<b>EPSC</b>	excitační postsynaptický proud (z angl. <i>excitatory postsynaptic current</i> )
<b>FAD</b>	flavinadenindinukleotid
<b>FADH<sub>2</sub></b>	redukovaný flavinadenindinukleotid
<b>GRIP</b>	<i>glutamate receptor interacting protein</i>
<b>GTP</b>	guanosintrifosfát (z angl. <i>guanosine triphosphate</i> )
<b>H</b>	vodík
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxid vodíku
<b>HD</b>	Huntingtonova choroba (z angl. <i>Huntington's disease</i> )
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinná chromatografie (z angl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>iGluR</b>	ionotropní glutamátový receptor
<b>IMK</b>	iminokyselina

<b>ITP</b>	inosinotrifosfát (z angl. <i>inosine triphosphate</i> )
<b>K<sup>+</sup></b>	draselný iont
<b>KAR</b>	kainátový receptor
<b>LTD</b>	dlouhodobá deprese (z angl. <i>long term depression</i> )
<b>LTP</b>	dlouhodobá potenciace (z angl. <i>long term potentiation</i> )
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	hořečnatý iont
<b>MGluR</b>	metabotropní glutamátový receptor
<b>MK-801</b>	dizocilpin
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	manganatý iont
<b>Na<sup>+</sup></b>	sodný iont
<b>-NH<sub>2</sub></b>	aminová funkční skupina
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartát
<b>NMDAR</b>	N-methyl-D-aspartátový receptor
<b>nNOS</b>	neuronální NO syntasa
<b>NO</b>	oxid dusnatý
<b>O<sub>2</sub></b>	kyslík
<b>PCP</b>	fencyklidin (z angl. <i>phencyclidine</i> )
<b>PICK1</b>	<i>protein interacting with C-kinase 1</i>
<b>PIP2</b>	fosfatidylinositol(4,5)-bisfosfát (z angl. <i>phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate</i> )
<b>PLC</b>	fosfolipasa C (z angl. <i>phospholipase C</i> )
<b>PLP</b>	pyridoxal-5-fosfát (z angl. <i>pyridoxal-5-phosphate</i> )
<b>PP1</b>	protein fosfatasa 1 (z angl. <i>protein phosphatase 1</i> )
<b>PSP</b>	postsynaptický potenciál
<b>R</b>	uhlovodíkový zbytek
<b>-SH</b>	sulfanylová funkční skupina
<b>SR</b>	serinracemasa
<b>UTP</b>	uridinotrifosfát (z angl. <i>uridine triphosphate</i> )
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	zinečnatý iont

# OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. Základní vlastnosti D-aminokyselin, jejich detekce a výskyt u savců .....	2
2.1. Výskyt D-aminokyselin u savců .....	2
3. Úloha D-aminokyselin v centrální nervové soustavě .....	4
3.1. Neurotransmise.....	4
3.2. NMDA receptor a jeho úloha v neurotransmisi .....	6
3.3. D-aminokyseliny jako agonisté NMDA receptoru .....	9
3.3.1. D-serin jako agonista NMDA receptoru .....	9
3.3.1.1. Distribuce D-serinu .....	10
3.3.2. D-aspartát jako agonista NMDA receptoru.....	12
3.4. Další působení D-aminokyselin v centrální nervové soustavě .....	12
4. Biosyntéza D-aminokyselin.....	13
4.1. Serinracemasa.....	13
4.1.1. Úloha a distribuce serinracemasy v centrální nervové soustavě .....	13
4.1.2. Ovlivnění aktivit serinracemasy.....	16
4.1.3. Inhibice serinracemasy .....	17
4.2. Aspartátracemasa .....	18
5. Degradace D-aminokyselin v CNS .....	18
5.1. Oxidasa D-aminokyselin.....	19
5.1.1. Úloha oxidasy D-aminokyselin v CNS.....	19
5.1.2. Distribuce oxidasy D-aminokyselin v CNS .....	20
5.2. Oxidasa D-aspartátu .....	21
5.2.1. Úloha a distribuce oxidasy D-aspartátu v CNS .....	21
5.3. Inhibitory oxidasy D-aminokyselin a oxidasy D-aspartátu .....	22
6. Onemocnění spojená se změnou hladin D-aminokyselin v mozku.....	22
6.1. Schizofrenie.....	23
6.2. Alzheimerova choroba.....	25
6.3. Amyotrofická laterální skleróza.....	25
6.4. Epilepsie.....	26
6.5. Další onemocnění .....	26
7. ZÁVĚR .....	27
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	28

# 1. ÚVOD

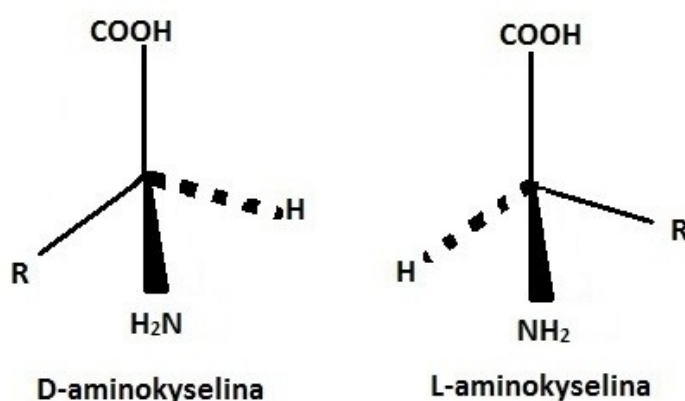
Základním stavebním kamenem proteinů jsou aminokyseliny (AMK). Ze dvou možných enantiomerů, dvou zrcadlových obrazců totožných molekul, byly evolucí vybrány L-AMK, přičemž pro biologickou účinnost je důležitá jejich homochiralita. Proto se také dlouhá léta neuvažovalo o tom, že by druhá možná konfigurace aminokyselin (D-AMK) mohla mít nějakou fyziologickou funkci. Zároveň ani neexistovaly žádné analytické metody, které by umožnily jejich detekci. Teprve v druhé polovině 20. století byly s použitím pokročilých analytických technik – plynové chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) – separovány dva enantiomery AMK. To také vedlo k objevení přítomnosti některých D-AMK v buněčné stěně bakterií, jako například peptidoglykanu. V posledních desetiletích byly volné D-isomery AMK postupně nalezeny také u nižších a vyšších živočichů.

Volné D-AMK mohou hrát v mozku savců velmi důležitou roli, a to zejména v excitační glutamátové neurotransmisi. Jakožto koagonisté NMDA receptoru se totiž D-AMK uplatňují v procesu vzniku synaptické plasticity, základním buněčném mechanismu učení a paměti. Podle výsledků experimentálních a animálních pokusů s D-AMK a jejich metabolickými enzymy se D-AMK v mozku navíc pravděpodobně podílí na patologických procesech, které stojí za vznikem epilepsie, schizofrenie nebo neurodegenerativních onemocnění – Alzheimerovy choroby, Huntingtonovy choroby a amyotrofické laterální sklerózy.

Cílem této práce je zpracovat rešerši o biosyntéze, metabolismu a funkci hlavních D-AMK v mozku savců. Získané informace mohou poskytnout nový náhled na možné terapeutické využití těchto látek nebo jejich derivátů pro léčbu nemocí ovlivněných D-AMK a jejich metabolickými enzymy.

## 2. Základní vlastnosti D-aminokyselin, jejich detekce a výskyt u savců

Většina základních  $\alpha$ -aminokyselin ( $\alpha$ -AMK) (s výjimkou glycinu) je chirální (Ilisz *et al.*, 2008), protože obsahuje alespoň jedno stereogenní centrum. To je lokalizováno na asymetrickém  $\alpha$ -uhlíku, který váže čtyři různé substituenty (viz obrázek č. 1). Další stereocentra mohou být na postranních řetězcích AMK. Podle prostorového postavení substituentů se definují odlišné enantiomery (L-AMK a D-AMK), které jsou si navzájem zrcadlovými obrazy. Enantiomery stáčí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ovšem opačným směrem. I když mají oba enantiomery shodné chemické i fyzikální vlastnosti (s výjimkou odlišného stáčení polarizovaného světla), často se liší svou biologickou aktivitou (Smith, 2009).



**Obrázek č. 1: Enantiomery AMK.** Asymetrický  $\alpha$ -uhlík AMK váže čtyři různé substituenty – aminovou ( $-\text{NH}_2$ ) a karboxylovou ( $-\text{COOH}$ ) funkční skupinu, atom vodíku (H) a jeden postranní uhlovodíkový řetězec (R). Vzájemné postavení H a R vůči funkčním skupinám  $-\text{NH}_2$  a  $-\text{COOH}$  je u enantiomeru L- a D- zrcadlově obrácené.

### 2.1. Výskyt D-aminokyselin u savců

Vývoj analytických metod umožnil přesnější a citlivější detekci a stanovení obsahu D-AMK ve tkáních savců, a to jak D-AMK vázaných v peptidech/proteinech, tak volných. Volné D-AMK v mozku byly poprvé stanoveny u potkanů Hashimotem a kolegy, kteří detekovali koncentraci volného D-serinu na  $0,27 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$  mozkové tkáně (Hashimoto *et al.*, 1992). U člověka se D-serin vyskytuje v koncentraci  $66 \pm 41 \text{ nmol/g}$  mozkové tkáně (Nagata *et al.*, 1995). Velké množství D-serinu bylo detekováno zejména v přední části mozku – v mozkové kůře, hipokampu, čichovém bulbu a hypothalamu potkanů, lidí a myši (Hashimoto *et al.*, 1992; Nagata *et al.*, 1995; Miyoshi *et al.*, 2009). V mozečku a v prodloužené míše myši byl naopak D-serin nalezen pouze ve stopových množstvích (Miyoshi *et al.*, 2009). Relativní množství D-serinu v lidské moči se pohybuje okolo 34 % – 51 % celkového serinu



(Brückner *et al.*, 2001). V periférii nervové soustavy a v ostatních orgánech člověka je množství D-serinu stopové (Hashimoto *et al.*, 1995).

Druhou nejznámější D-AMK je D-aspartát, který se vyskytuje v různých endokrinních orgánech savců. U potkanů je D-aspartát přítomen v epifýze (Sakai *et al.*, 1997; Hamase *et al.*, 1997; Schell *et al.*, 1997b), adenohipofýze (Hamase *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; D'Aniello *et al.*, 2000a,b), hypothalamu (D'Aniello *et al.*, 2000a), nadledvinkách (Sakai *et al.*, 1997; D'Aniello *et al.*, 2000a) a ve varlatech (D'Aniello *et al.*, 1996; D'Aniello *et al.*, 2000a,b). Ve volné formě jej u potkanů nalezneme rovněž v sítnici oka (Lee *et al.*, 1999).

U člověka byl D-aspartát ( $1,2 \pm 0,8$  nmol/ml) spolu s D-serinem ( $1,8 \pm 1,2$  nmol/ml) a D-alaninem ( $0,7 \pm 0,3$  nmol/ml) detekován v mozkomíšním moku pocházejícím z mozkových komor (Fisher *et al.*, 1998). Dále se D-aspartát vyskytuje v mozkové kůře, konkrétně v její frontální, temporální a parietální části, v amygdale a hipokampu člověka (D'Aniello *et al.*, 1998). Nalezen byl i v pohlavních buňkách, například ve spermiích (D'Aniello *et al.*, 2005). Pozůstatky D-aspartátu v proteinech lze prokázat i v lidské čočce (Fujii *et al.*, 1994) a v membráně erytrocytů (McFadden *et al.*, 1982).

Koncentrace D-alaninu je v mozku, periferních tkáních a v krevní plazmě potkanů (Morikawa *et al.*, 2003) nižší než u dvou předchozích D-AMK, pouze hypofýza představuje výjimku (Hamase *et al.*, 1997). Nejvyšší množství D-alaninu se u potkanů vyskytuje v adenohipofýze, konkrétně v buňkách sekretujících adrenokortikotropní hormony, zatímco v neurohypofýze je jeho koncentrace šestkrát nižší. Vysokou koncentraci D-alaninu nalezneme rovněž v pankreatu potkanů (Morikawa *et al.*, 2003). D-alanin byl kromě toho detekován také v játrech a ledvinách potkanů a myši (D'Aniello *et al.*, 1993), v krevním séru myši a člověka (Brückner *et al.*, 2001; Miyoshi *et al.*, 2009) a v lidské moči (Brückner *et al.*, 2001).

V případě D-prolinu se jeho významnější koncentrace v porovnání s ostatními částmi mozku myši nachází pouze v hypofýze (Hamase *et al.*, 2001) a spolu s D-leucinem i v epifýze (Inoue *et al.*, 2000; Hamase *et al.*, 2001). D-leucin byl u potkanů detekován v hipokampu (Hamase *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 2000) a v epifýze (Hamase *et al.*, 1997).

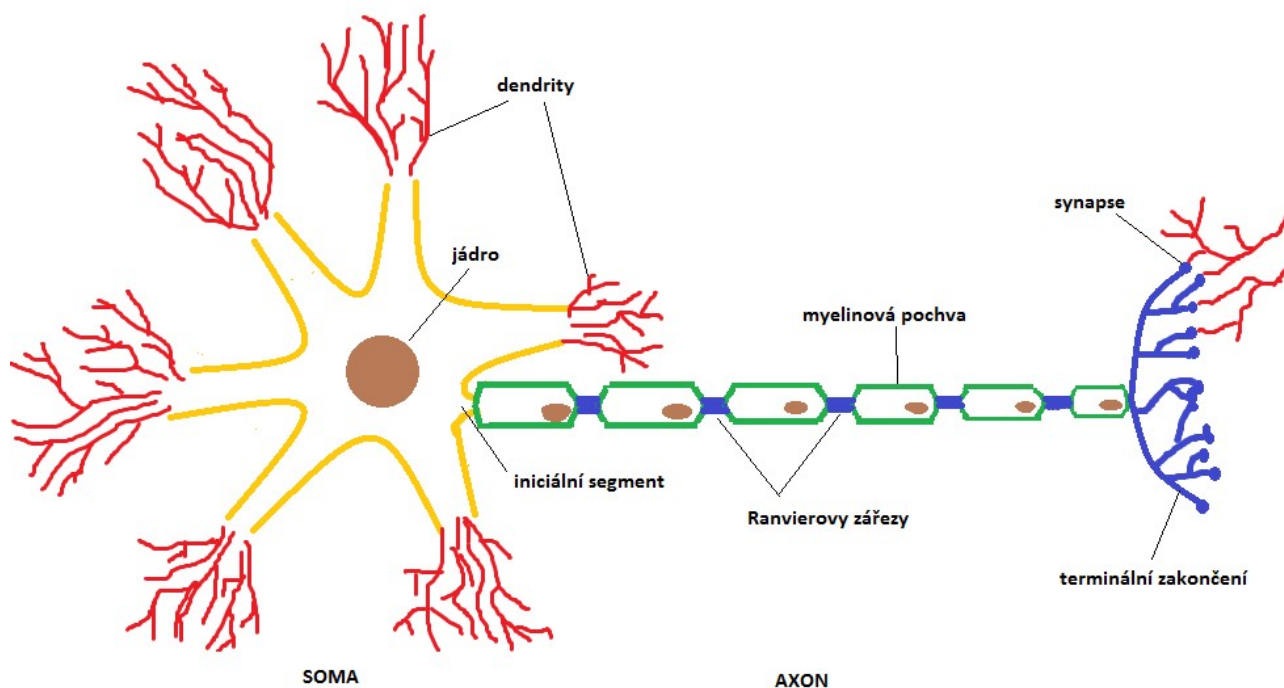
V moči člověka jsou přítomny i některé další D-AMK, a to konkrétně D-asparagin, D-glutamin, D-glutamová kyselina, D-lysin, D-fenylalanin (Brückner *et al.*, 2001), D-threonin a D-valin (Brückner *et al.*, 1994).

I přes relativně vysoké koncentrace dalších D-AMK v savčích tkáních nebyly dosud u většiny z nich dobře prozkoumány jejich funkce, distribuce, metabolismus ani možnosti regulace. Výjimku tvoří D-serin a D-aspartát, které se zde vyskytují v nejvyšších koncentracích ze všech D-AMK a mají prokazatelnou biologickou funkci v centrální nervové soustavě (CNS) savců (Hashimoto *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1993; Kumashiro *et al.*, 1995).

### 3. Úloha D-aminokyselin v centrální nervové soustavě

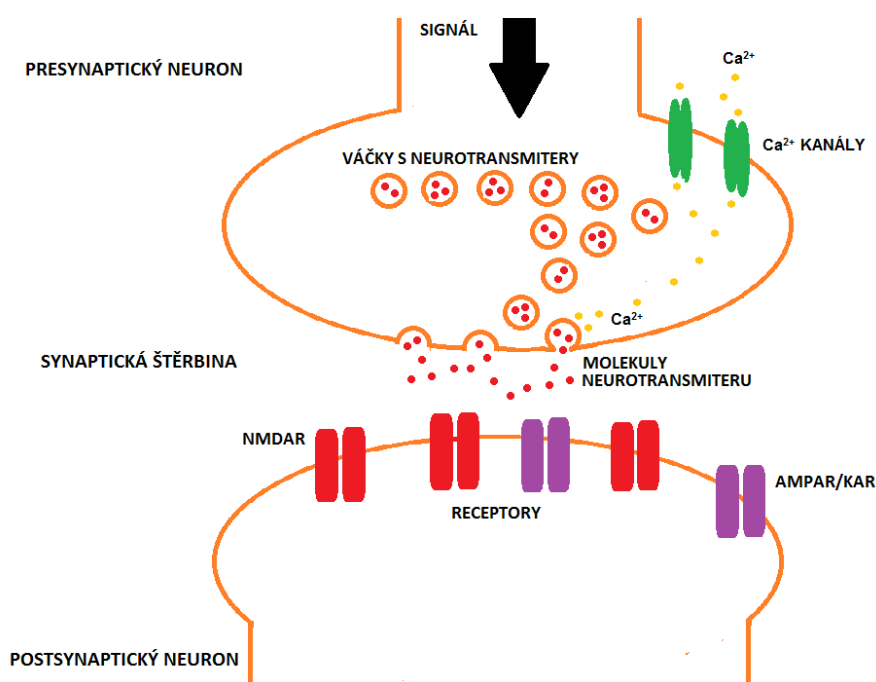
#### 3.1. Neurotransmise

Základní funkční a anatomickou jednotkou nervové soustavy je nervová buňka – neuron (viz Obrázek č. 2). Typický neuron se skládá z těla neuronu (soma), jednoho či více dendritů a jednoho axonu (neurit), který slouží k přenosu digitalizovaného signálu ve formě akčního potenciálu (AP) až k presynaptickým zakončením na terminálech neuronu. Tento přenos se uskutečňuje prostřednictvím napěťově řízených kanálů reagujících na depolarizaci membrány svým otevřením. To umožňuje tok specifických kationtů dovnitř a ven z buňky, což vede k další depolarizaci v bezprostřední blízkosti otevřených kanálů. Některé axony jsou obaleny myelinovou pochvou, která slouží k izolaci axonu od extracelulárního prostředí a také zvyšuje rychlost nervového přenosu. První úsek axonu před myelinovou pochvou se nazývá iniciální segment (AIS, z angl. *axon initial segment*) (Ganong, 2001, str. 53).



**Obrázek č. 2: Schematické zobrazení neuronu.** Neuron se skládá ze soma s jádrem, jednoho nebo více rozvětvených dendritů a jednoho axonu obaleného myelinovou pochvou přerušovanou Ranvierovými zářezy. Mezi somatem a axonem se nachází iniciální segment – místo, kde se sumací postsynaptických potenciálů rozhodne, zda vznikne AP. Synapse je místo, kde dochází k přenosu nervového vzruchu mezi neurony, nejčastěji z terminálního zakončení axonu prvního neuronu na dendrity druhého neuronu.

Místo přenosu signálu mezi dvěma neurony se nazývá synapse. U savců se synapse nejčastěji skládá z presynaptického zakončení jednoho neuronu, postsynaptického zakončení dalšího neuronu a synaptické štěrbině oddávající obě tato zakončení. Na těchto synapsích dochází k jednosměrnému přenosu nervových signálů, a to díky specifitě pre- a postsynaptického zakončení (viz Obrázek č. 3). Presynaptické zakončení obsahuje váčky s neurotransmitery, větší množství mitochondrií a  $\text{Ca}^{2+}$  napětově řízené kanály. Postsynaptické zakončení má na své membráně receptory, jejichž konformace se mění po navázání neurotransmiterů. Díky tomu se receptory otevírají pro konkrétní ionty, jejichž přenosem dochází k depolarizaci membrány a vzniku postsynaptického potenciálu (Sakmann, 1992; Ganong, 2001, str. 89).



**Obrázek č. 3: Schematické zobrazení synapse a neurotransmise.** Synapse se skládá z presynaptického zakončení prvního neuronu, synaptické štěrbině a postsynaptického zakončení druhého neuronu. Signál se může přenášet pouze jedním směrem díky pre- a postsynaptické specifitě obou zakončení. Presynaptická synapse obsahuje váčky s neurotransmitery a  $\text{Ca}^{2+}$  napětově řízené kanály. Postsynaptická synapse má na své membráně receptory (NMDAR, AMPAR, KAR), na které se vážou neurotransmitery.

Časoprostorová sumace postsynaptických potenciálů (PSP) umožňuje přenos signálu dále do buňky změnou membránového potenciálu dendritů. Přenos signálu pokračuje s úbytkem úměrným vzdálenosti přes tělo neuronu až k AIS axonu. AIS obsahuje velký počet napětově řízených  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  kanálů a představuje místo, kde se rozhoduje o vzniku AP (Meeks *et Mennerick*, 2007; Kole *et al.*, 2008).

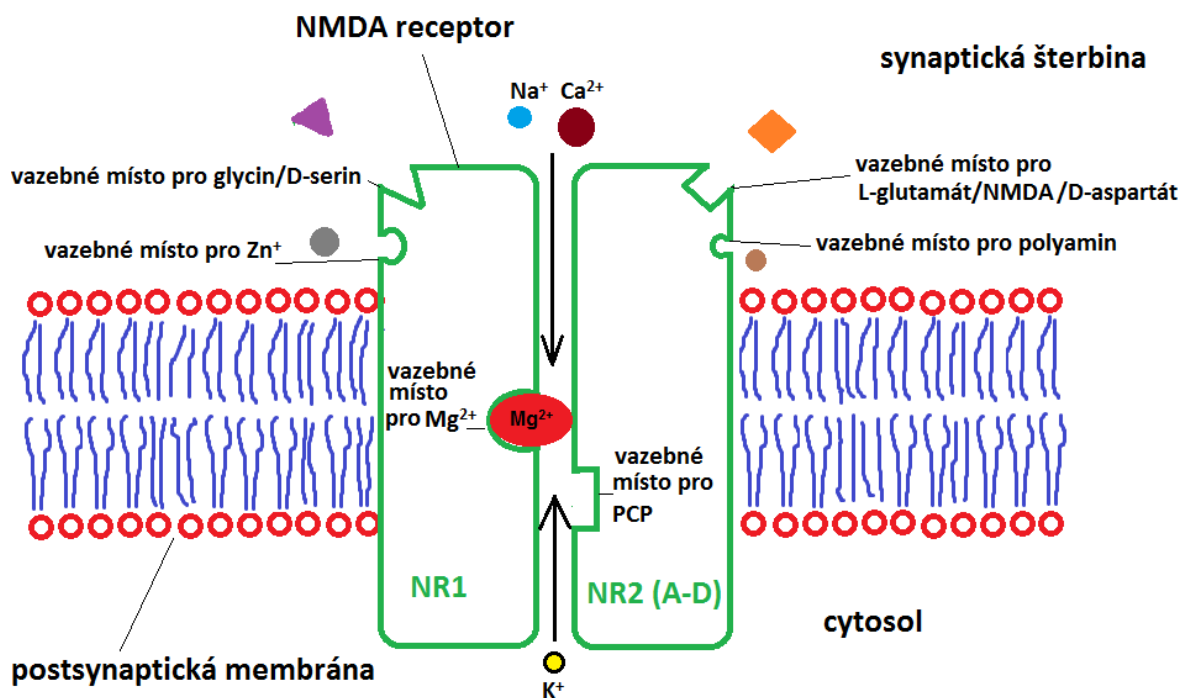
Vzniklý AP se šíří bez úbytku až k presynaptickým zakončením na terminálech axonu, kde iniciuje influx  $\text{Ca}^{2+}$  prostřednictvím napětově řízených  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů.  $\text{Ca}^{2+}$  poté vyvolají exocytózu vezikulů

s neurotransmitery, které se uvolní do synaptické štěrbině, kde se mohou vázat na receptory následujícího neuronu (Katz *et Miledi*, 1968; Takahashi *et Momiyama*, 1993).

Hlavním excitačním neurotransmiterem v CNS savců je glutamát, který může aktivovat metabotropní a ionotropní glutamátové receptory na postsynaptickém neuronu. Metabotropní glutamátové receptory (mGluR) jsou spřaženy se skupinou G-proteinů, prostřednictvím kterých aktivují efektní signální kaskády. mGluR označujeme jako mGluR1 – mGluR8 (Bruno *et al.*, 2001). Ionotropní glutamátové receptory (iGluR) jsou ligandem řízené iontové kanály, které zprostředkovávají většinu excitační neurotransmise v mozku. Mezi tyto receptory patří NMDA receptor (NMDAR), pojmenovaný podle selektivního agonisty N-methyl-D-aspartátu, AMPA receptor (AMPA), jehož selektivním agonistou je kyselina  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionátová, a dále kainátový receptor (KAR) (Traynelis *et al.*, 2010).

### **3.2. NMDA receptor a jeho úloha v neurotransmisí**

NMDAR je heterotetramer složený ze sedmi možných typů podjednotek (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B), které dohromady tvoří iontový kanál propustný pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  (Furukawa *et al.*, 2005). Model struktury receptoru s vazebnými místy zobrazuje Obrázek č. 4. Kombinací a zastoupením jednotlivých podjednotek během ontogeneze a dlouhodobé synaptické plasticity se mění vlastnosti receptorů – především jejich vodivost, a to konkrétně pravděpodobnost otevření kanálu a délka tohoto otevření. Nejrozšířenější kombinací podjednotek NMDAR v dospělém frontálním mozku je spojení podjednotky NR1 s glycinovým vazebným místem a podjednotky NR2A/B s glutamátovým vazebným místem (Furukawa *et al.*, 2005; Traynelis *et al.*, 2010).



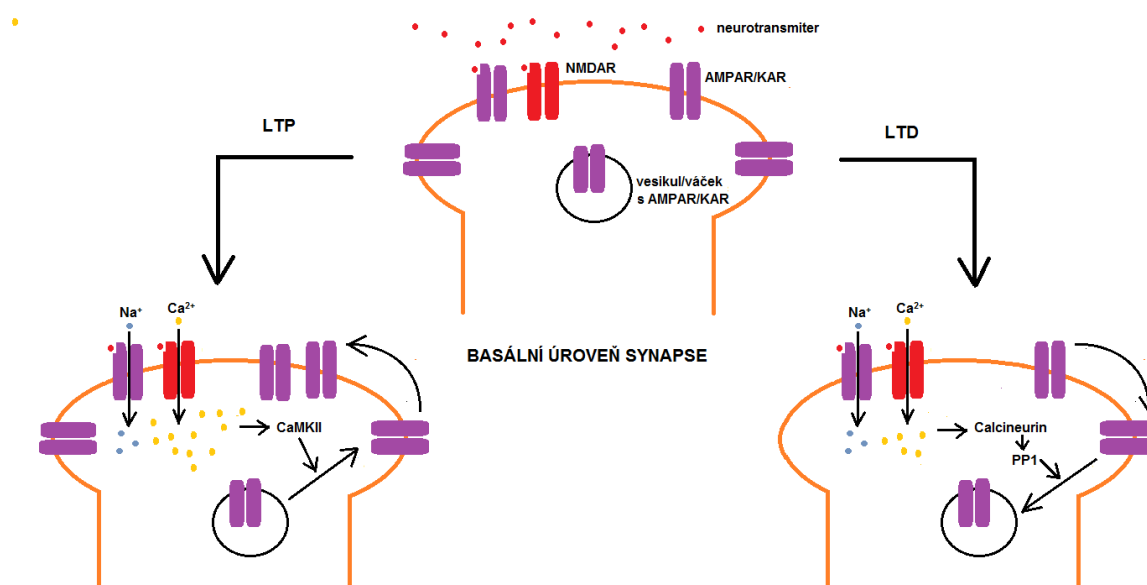
**Obrázek č. 4: Schematické zobrazení NMDAR** (upraveno podle Koupparis, 2005). Jedná se o iGluR, který je aktivován navázáním agonisty glutamátu a jednoho ze dvou koagonistů – glycinu nebo D-serinu. Po uvolnění  $Mg^{2+}$  následuje odblokování iontového kanálu a tím jeho otevření pro tok  $Na^+$  a  $Ca^{2+}$  do buňky a  $K^+$  z buňky ven. Specifické polyaminy mohou stimulovat funkci NMDAR, PCP a  $Zn^{2+}$  ji naopak inhibují.

Aktivace NMDAR při neurotransmisí závisí na napětí a na vazbě ligandů. K plné fyziologické aktivaci NMDAR je vedle vazby dvou ligandů – přirozeného agonisty NMDAR glutamátu a přirozeného koagonisty glycinu/D-serinu – potřebná i depolarizace postsynaptické membrány. Při klidovém membránovém potenciálu je totiž kanál NMDAR blokován  $Mg^{2+}$  (Johnson *et al.*, 1990; Kampa *et al.*, 2004), čímž se snižuje pravděpodobnost otevření kanálu a jeho afinita ke glutamátu. V postsynaptické membráně jsou ale přítomny rovněž AMPARs, které odpovídají na vazbu glutamátu rychlými excitačními postsynaptickými proudy (EPSC, z angl. *excitatory postsynaptic current*) a ty pak způsobí depolarizaci potřebnou pro uvolnění  $Mg^{2+}$  v NMDAR (Forsythe *et al.*, 1988; Kampa *et al.*, 2004).

NMDARs, koaktivované AMPARs výše uvedeným způsobem, se účastní důležitého procesu – synaptické plasticity. Tímto termínem označujeme změny v účinnosti přenosu nervového signálu, konkrétně její zesílení či zeslabení (Mc Naughton *et al.*, 1987). Dlouhodobá synaptická plasticita vzniká prostřednictvím indukce synapsí vysokofrekvenčním stimulem, který vyvolá zesílení synaptického přenosu – dlouhodobou potenciací (LTP, z angl. *long term potentiation*) nebo jeho oslabení – dlouhodobou depresi (LTD, z angl. *long term depression*). LTP a LTD představují základní buněčné mechanismy tvorby paměti a učení a jsou zobrazeny na Obrázku č. 5 (Mc Naughton *et al.*, 1987; Bliss *et al.*, 1993; Malenka *et al.*, 1993).

Podstatou dlouhodobých změn účinnosti synaptického přenosu jsou posttranslační modifikace a aktivace NMDARs a AMPARs, vložení/odebrání AMPAR do/ze synaptické membrány (tzv. trafficking) a tím přetrvávání změny (zvýšení/snížení) amplitudy EPSC (Malenka *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999).

Fosforylací těchto receptorů nebo jejich přesunem mezi intracelulárními kompartmenty dochází ke změně citlivosti postsynaptického zakončení vůči neurotransmitteru. Může se též zvýšit koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a tím i pravděpodobnost uvolňování vezikulů s neurotransmitterem z presynaptického zakončení. Následný  $\text{Ca}^{2+}$  signál v neuronu aktivuje široký rozsah signálních cest – mimo jiné i  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní kinyasy, například kalmodulin dependentní kinasu II (CaMKII, z angl. *calmodulin-dependent protein kinase II*), které spouští kaskádu dalších dějů, jejichž cílem je aktivace nebo deaktivace enzymů prostřednictvím jejich fosforylace nebo defosforylace. To může vést až k průniku signálu do jádra neuronu k transkripčním faktorům indukujícím změnu genové exprese projevující se proteosyntézou AMPAR *de novo* (Derkach *et al.*, 1999; Opazo *et al.*, 2010; Carasatorre *et al.*, 2013).

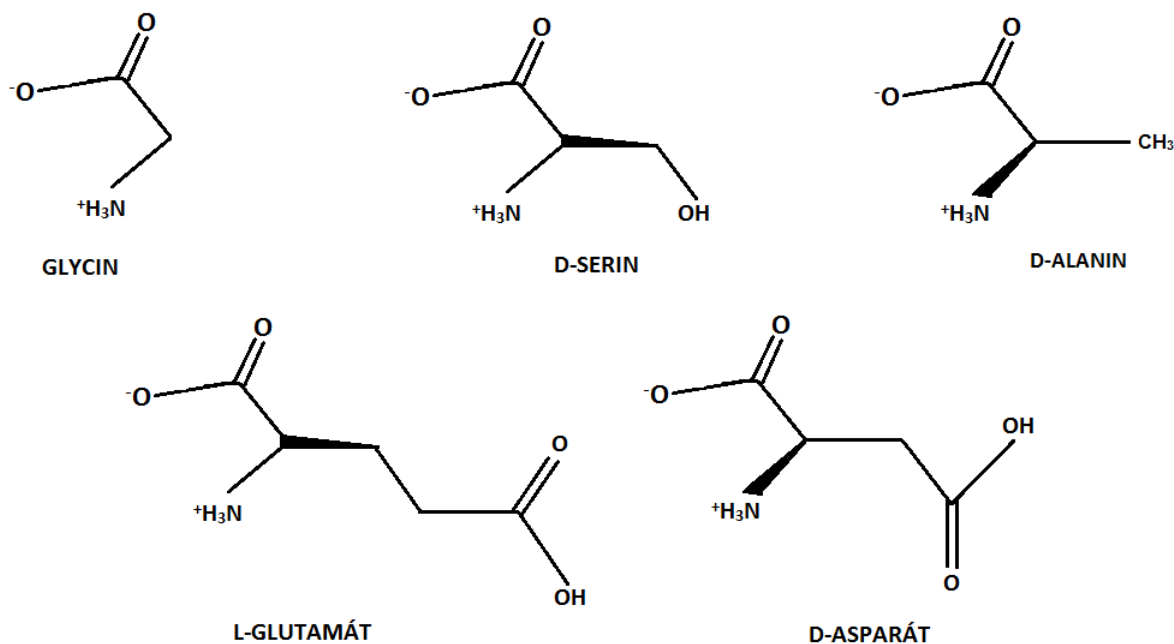


**Obrázek č. 5: Schematické zobrazení mechanismu LTP a LTD** (upraveno podle Citri *et al.*, 2008).

Při LTP se po navázání neurotransmiterů na receptory otevírají iontové kanály a nastává influx  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky.  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce spouští kaskádu signálů přes vazbu na CaMKII až ke genové expresi a proteosyntéze *de novo*. Ta se může projevit expresí dalších AMPAR na postsynaptické membráně, čímž dochází k zesílení EPSC. Při LTD spustí menší množství  $\text{Ca}^{2+}$  kaskádu přes fosfatasy – calcineurin a protein fosfatasu 1 (PP1) k odebrání AMPAR z postsynaptické membrány a snížení EPSC.

### 3.3. D-aminokyseliny jako agonisté NMDA receptoru

Za přirozené modulátory NMDAR (viz Obrázek č. 6) jsou považovány L-glutamát, vážící se na glutamátové místo v NR2 (Forsythe *et al.*, 1988), kde se může vázat i D-aspartát (Fagg *et al.*, 1988), a dále glycin nebo D-serin, které se váží na glycinové místo v NR1 (Forsythe *et al.*, 1988; Berger *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 2003). Na glycinové místo NMDAR se může vázat i D-alanin (Tsai *et al.*, 2006).



**Obrázek č. 6: Strukturní vzorce AMK, které se váží na glycinové a glutamátové vazebné místo NMDAR.**

Na glycinové místo NMDAR se váže buď glycin, nebo D-serin, s nižší afinitou i D-alanin. Na glutamátové místo receptoru se váže přednostně glutamát a s nižší afinitou i D-aspartát.

#### 3.3.1. D-serin jako agonista NMDA receptoru

Od okamžiku zjištění role D-serinu jako možného koagonisty NMDAR se vedou diskuze o tom, který ze dvou koagonistů – glycin nebo D-serin – je hlavním modulátorem NMDAR. Schell a jeho výzkumná skupina porovnávali distribuci NMDAR s lokalizací D-serinu a glycinu u potkanů (Schell *et al.*, 1995; 1997a). Hashimoto *et al.* poté srovnávali distribuci D-serinu s distribucí L-glutamátu a L-serinu (Hashimoto *et al.*, 1995).

Na rozdíl od L-glutamátu a L-serinu se D-serin vyskytuje v mozku nerovnoměrně a jeho lokalizace v přední části mozku odpovídá distribuci NMDAR více než je tomu v případě glycinu (Schell *et al.*, 1995). D-serin nalezneme především ve frontální a mediální mozkové kůře, v amygdale, hipokampu a ve striatu (Hashimoto *et al.*, 1995; Kumashiro *et al.*, 1995; Schell *et al.*, 1997a), tedy v místech s vysokou hustotou výskytu NMDAR (Schell *et al.*, 1997a). Naopak v zadní části mozku – v mozečku, mozkovém kmeni a míše,

kde se D-serin vyskytuje jen ve stopovém nebo nedetekovaném množství, je množství glycinu vysoké a hustota NMDAR naopak nízká (Kumashiro *et al.*, 1995; Schell *et al.*, 1995; 1997a). Pouze ve druhém týdnu postnatálního vývoje potkanů bylo detekováno vyšší množství D-serinu v mozečku. Zde se předpokládá jeho schopnost regulovat migraci granulárních buněk a vývoj jejich synapsí i vývoj jiných neuronů prostřednictvím vazby D-serinu na NMDARs (Schell *et al.*, 1997a).

Roli D-serinu v glutamátové excitační neurotransmisi potvrzují rovněž experimenty s oxidasou D-AMK (DAAO, z angl. *D-amino acid oxidase*), která degraduje D-serin (viz kapitola 5). Její aplikace do hipokampu potkana způsobuje snížení hladiny D-serinu a tím také signifikantní pokles amplitudy EPSC NMDAR (Mothet *et al.*, 2000). Po následném podání exogenního D-serinu se amplituda EPSC navrácí k původním hodnotám (Mothet *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2003). Na druhou stranu degradace glycinu glycinovou oxidázou v hypothalamu nebo v mozkové kůře nemá na NMDAR odpověď žádný efekt (Panatier *et al.*, 2006).

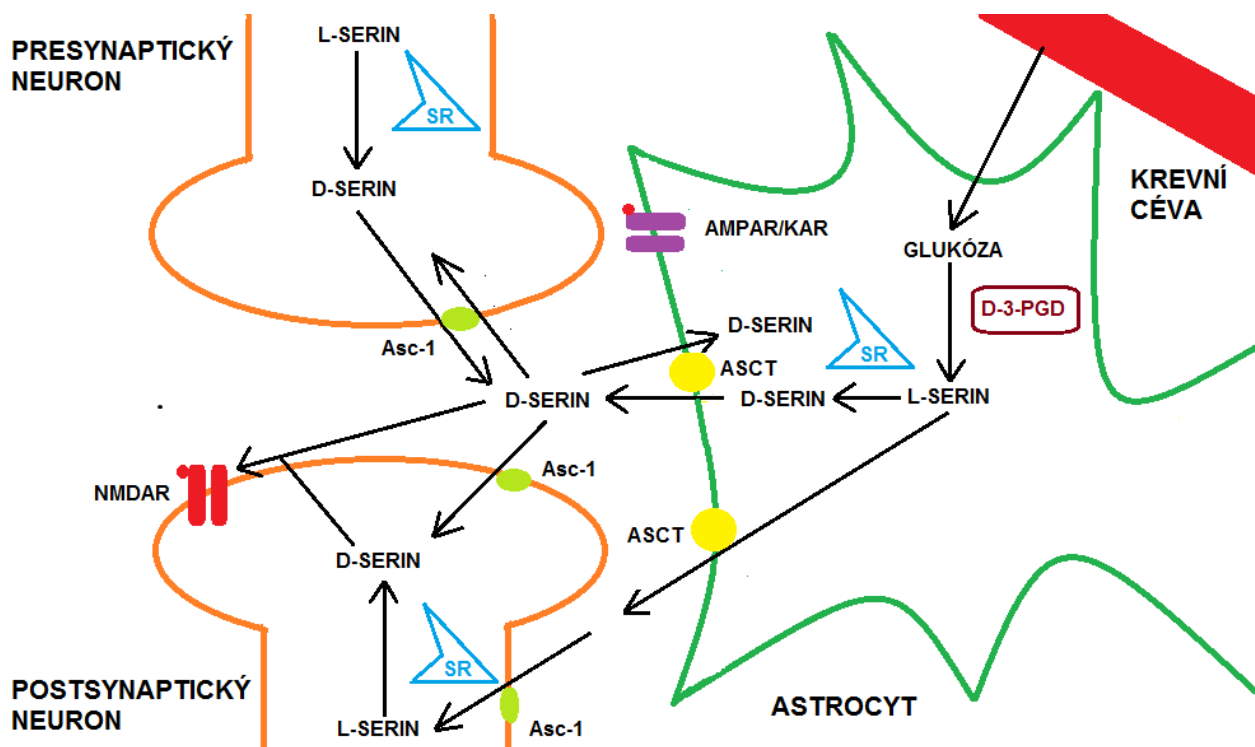
Pro agonisty vázající se na NMDAR je důležitá jejich afinita a také dostupnost v místě výskytu NMDAR. D-serin vázaný na glycinovém místě NMDAR vykazuje stokrát vyšší účinnost než glycin vázaný na téže receptoru (Hashimoto *et al.*, 1995; Berger *et al.*, 1998; Mothet *et al.*, 2000). Buněčné transportéry pro příjem D-serinu z extracelulárního prostředí mají navíc nízkou efektivitu, proto se D-serin může akumulovat ve vyšší koncentraci v synaptické štěrbině. Následkem toho je pak hladina D-serinu v některých částech mozku vyšší než hladiny většiny hlavních intracelulárních AMK, jako jsou glutamát, aspartát a glycin (Ribeiro *et al.*, 2002). Na význam delšího setrvání D-serinu ve tkáních ukazuje i jeho dlouhý biologický poločas, který činí 16,9 hodin u myši a 18,2 hodin u potkanů (Dunlop *et Neidle*, 1997).

Všechna tato zjištění naznačují, že je D-serin dominantním endogenním ligandem NMDAR v předním mozku, konkrétně v prefrontální kůře a v hipokampu. D-serin navíc moduluje aktivitu NMDAR a zesiluje glutamátovou excitační neurotransmisi a tím i synaptickou odpověď (Mothet *et al.*, 2000; Shleper *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2008).

### 3.3.1.1. Distribuce D-serinu

Nejvyšší množství D-serinu není detekováno v neuronech, ale v astrocytech, ve kterých se D-serin akumuluje (Kartvelishvily *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2008). Pravděpodobné cesty distribuce D-serinu zobrazuje Obrázek č. 7.





**Obrázek č. 7: Distribuce D-serinu na buněčné úrovni** (upraveno podle Wolosker *et al.*, 2011). Syntéza L-serinu z glukózy probíhá v astrocytech prostřednictvím enzymu D-3-PGD. Menší část L-serinu se přeměňuje na D-serin v astrocytech, větší část L-serinu se uvolňuje do extracelulárního prostředí, odkud je přijat do neuronů prostřednictvím Asc-1 pro hlavní (neuronální) syntézu D-serinu. Astrocyty i neurony přeměňují L-serin na D-serin prostřednictvím enzymu SR. D-serin se z astrocytů uvolňuje prostřednictvím ASCT po aktivaci AMPAR a/nebo KAR glutamátem, z neuronů pak prostřednictvím Asc-1 transportérů po aktivaci NMDAR glutamátem. Následně se D-serin po uvolnění z neuronů akumuluje v astrocytech.

Astrocyty jsou primárním zdrojem L-serinu v CNS a L-serin se zde syntetizuje zejména z glukózy (Yamasaki *et al.*, 2001) za pomoci enzymu D-3-fosfoglycerát dehydrogenasy (D-3-PGD, z angl. *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase*) (Yang *et al.*, 2010). Následně se L-serin uvolňuje do extracelulárního prostředí, odkud jej přijímají neurony pro tvorbu D-serinu (Fukasawa *et al.*, 2000). V neuronech vzniká D-serin racemizací L-serinu (viz kapitola 4) a následně se z nich uvolňuje zpět do extracelulárního prostředí, odkud jej znovu vychytávají astrocyty k jeho akumulaci (Yoshikawa *et al.*, 2007). Význam biosyntézy L-serinu v astrocytech dokládá studie, ve které inaktivace enzymu D-3-PGD u dospělých myší vedla až k 90% úbytku hladiny D-serinu v mozku (Yang *et al.*, 2010).

Uvolnění D-serinu z astrocytů nastává zejména v reakci na aktivaci AMPAR či KAR příslušnými agonisty (Schell *et al.*, 1995; Wolosker *et al.*, 1999a). Transport D-serinu a neutrálních D-AMK obecně zde zajišťuje alanin-serin-cystein transportérový systém (ASCT), který je založen na Na<sup>+</sup> závislém antiportu

s L-lysinem a který má vyšší afinitu pro L-serin. S nízkou afinitou se na ASCT váže také D-serin (Ribeiro *et al.*, 2002). Přenos D-serinu z neuronů do extracelulárního prostředí je spuštěn stimulací NMDAR indukovanou glutamát (Kartvelishvily *et al.*, 2006) a zprostředkován alanin-serin-cysteinovým transportérem 1 (Asc-1). Jedná se o Na<sup>+</sup> nezávislý způsob transportu (Fukasawa *et al.*, 2000), kdy Asc-1 váže D-serin s vyšší afinitou než ASCT v astrocytech (Ribeiro *et al.*, 2002).

### 3.3.2. D-aspartát jako agonista NMDA receptoru

D-aspartát, který se v CNS nachází přibližně ve stokrát nižší koncentraci než L-aspartát a L-glutamát, se může na glutamátové místo NMDAR vázat stejně jako samotný glutamát (Fagg *et Matus*, 1988; D'Aniello *et al.*, 1998). Afinita D-aspartátu k NMDAR je nižší než afinita L-glutamátu (Ishida *et Fain*, 1981; Fagg *et Matus*, 1988), proto není přesná funkce D-aspartátu v modulaci NMDAR ještě zcela známá. Podle dostupných údajů však D-aspartát svou vazbou na NMDAR může posílit synaptickou odpověď v glutamátové neurotransmisi jako možný agonista místo glutamátu (Schell *et al.*, 1997b; Errico *et al.*, 2006, Errico *et al.*, 2014). Experimentálně zvýšená hladina D-aspartátu prodlužuje v hipokampu trvání LTP závislé na NMDAR, podporuje růst dendritů a také zlepšuje kognitivní funkce (Errico *et al.*, 2008; Errico *et al.*, 2014).

D-aspartát se v rámci CNS v nejvyšším množství nachází v přední a střední části mozku, zatímco v nejnižší koncentraci v dospělém mozečku (Wolosker *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2010). V prenatálním období savců, například myši, je v mozku detekována vysoká hladina D-aspartátu a nízká hladina jeho degradačního enzymu – oxidasy D-aspartátu (DAspO, angl. *D-aspartate oxidase*). Exprese DAspO se v průběhu postnatálního období začíná výrazně zvyšovat a souběžně s jeho narůstající koncentrací se snižuje hladina D-aspartátu. To naznačuje, že D-aspartát může hrát roli ve vývoji nervové soustavy (Lee *et al.*, 1999; Wolosker *et al.*, 2000; Errico *et al.*, 2014).

Na buněčné úrovni je D-aspartát lokalizován pouze v neuronech, nikoli v gliích (Wolosker *et al.*, 2000). Nejvyšší hladiny D-aspartátu se nacházejí v synaptických váčcích na nervovém terminálu (D'Aniello *et al.*, 2011). D-aspartát z buněk je uvolňován Ca<sup>2+</sup> závislým způsobem a jeho transport do buněk je zajišťován závislým Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> antiportem s L-glutamát/L-aspartátem (Wolosker *et al.*, 2000).

## 3.4. Další působení D-aminokyselin v centrální nervové soustavě

Největší počet studií ve srovnání s ostatními D-AMK se zabývá významem D-serinu v mozku savců, zatím však nic neukazuje na to, že by měl jinou významnou roli než jako koagonista NMDAR. Naproti tomu D-aspartát plní vedle své méně významné role koagonisty NMDAR ještě navíc důležitou úlohu ve vývoji orgánů včetně mozku a nervové soustavy. D-aspartát se totiž podílí na proliferaci a diferenciaci buněk – jeho koncentrace dosahuje nejvyšších úrovní v době, kdy už jsou orgány – srdce, retina a mozek (např. hypofýza) – morfologicky a funkčně zralé (Hashimoto *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1999). Jeho nejvíce prozkoumanou

funkcí je úloha v regulaci syntézy hormonů a v jejich sekreci v ose hypothalamus-hypofýza-gonády (D'Aniello *et al.*, 2000a).

Podle práce Wang *et al.* interaguje D-aspartát přímo s jadernými proteiny a geny. Prostřednictvím genové exprese tak reguluje hormonální sekreci (Wang *et al.*, 2002). Konkrétně v epifýze reguluje syntézu melatoninu (Ishio *et al.*, 1998) a v hypothalamu koncentraci oxytocinu (Wang *et al.*, 2000). Také sekrece hormonu uvolňujícího gonadotropin v hypothalamu je řízena prostřednictvím D-aspartátu (D'Aniello *et al.*, 2000a,b). V adenohipofýze D-aspartát ovlivňuje sekreci prolaktinu (Lee *et al.*, 1999, D'Aniello *et al.*, 2000b) a podílí se na regulaci vyplavování luteinizačního a růstového hormonu z adenohipofýzy (D'Aniello *et al.*, 2000a).

V adenohipofýze se vedle D-aspartátu vyskytuje ve významné hladině také D-alanin, a to v buňkách produkujících adrenokortikotropní hormon. Nejvyšší hladinu D-alaninu lze nalézt kromě adenohipofýzy rovněž v pankreatických  $\beta$ -buňkách, které syntetizují a uvolňují insulin. Tento fakt poukazuje na možnou funkci D-alaninu v regulaci plasmatické hladiny glukózy u savců (Morikawa *et al.*, 2007; Etoh *et al.*, 2009).

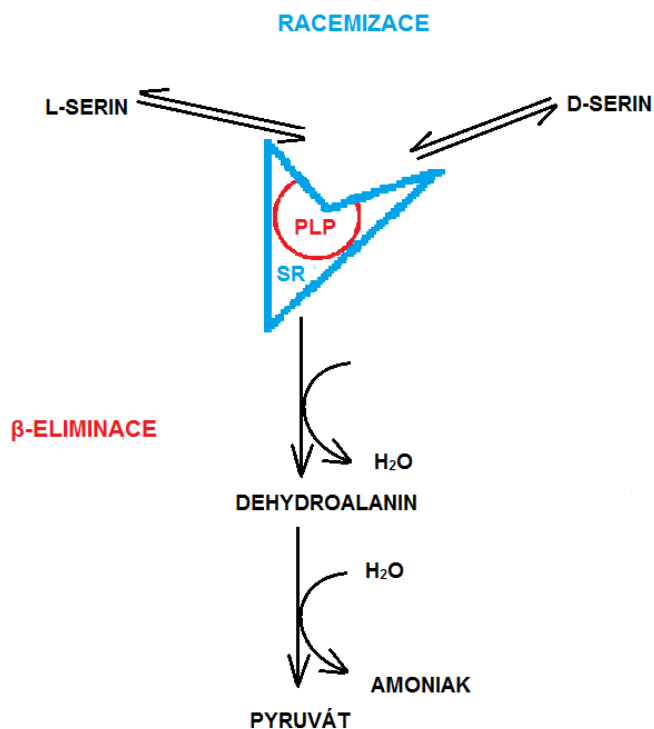
## 4. Biosyntéza D-aminokyselin

Po zjištění přítomnosti D-AMK u savců byla další pozornost soustředěna na jejich původ a cesty, kterými se D-AMK do organismu dostávají. Uvažovalo se o možnosti jejich příjmu potravou, syntéze střevními mikroorganismy, spontánní racemizací z L-serinu při hydrolyze proteinů a také o tvorbě D-AMK přímo ve tkáních, kde se vyskytují (Corrigan, 1969; Konno *et al.*, 1990; Basu *et al.*, 2009).

### 4.1. Serinracemasa

#### 4.1.1. Úloha a distribuce serinracemasy v centrální nervové soustavě

Nejlépe prostudovanou D-AMK u savců je D-serin. Tato D-AMK v organismu vzniká racemizací z L-serinu za katalýzy enzymem serinracemasou (SR) (Wolosker *et al.*, 1999a,b). SR se v organismu vyskytuje ve formě homodimeru a její reakční aktivitu podmiňuje vazba kofaktoru pyridoxal-5-fosfátu (PLP, z angl. *pyridoxal-5-phosphate*) (Wolosker *et al.*, 1999b; Kim *et al.*, 2005). Mimo reversibilní přeměny L-serinu na D-serin SR katalyzuje také  $\beta$ -eliminaci vody z L- i D-serinu, a to procesem přímé deaminace za vzniku pyruvátu a amoniaku (Panizzutti *et al.*, 2001; Stříšovský *et al.*, 2003). Reakci SR schematicky ukazuje Obrázek č. 8.



**Obrázek č. 8: Schematické zobrazení aktivit SR** (upraveno podle Ohide *et al.*, 2011). SR s nezbytným kofaktorem PLP katalyzuje více biochemických reakcí – biosyntézu D-serinu z L-serinu racemizací a degradaci L- nebo D-serinu  $\beta$ -eliminací vody přes dehydroalanin na pyruvát a amoniak.

Ve fyziologických podmínkách se v lidském mozku nachází přibližně 10× více L-serinu než D-serinu (Nagata *et al.*, 1995). SR dále má k L-serinu výraznější afinitu a preferuje proto racemizaci ve směru k D-serinu, ačkoliv tato reakce může probíhat v obou směrech (De Miranda *et al.*, 2002; Foltyn *et al.*, 2005). SR má nejvyšší katalytickou aktivitu v zásaditém prostředí, konkrétně při pH 8–9. Se snížením pH na hodnotu 7 pak její katalytická účinnost poklesne až 10×. Teplotní optimum SR odpovídá 37 °C (Wolosker *et al.*, 1999a). 3D strukturu SR zobrazuje Obrázek č. 9.



**Obrázek č. 9: 3D struktura SR** (převzato od Smith *et al.*, 2010 pod kódem 3HMK). Jedná se o krystalickou strukturu holoenzymu SR. K doménám SR (duhově zbarvené  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -listy) je navázán kofaktor PLP (modrorůžová struktura) a  $Mn^{2+}$  (šedá kulička).

Žádný jiný enzym tak významnou měrou nepřispívá ke zvýšení hladiny D-serinu v organismu jako právě SR (Wolosker *et al.*, 1999a). U transgenních myši s delecí exonu 1 kódujícího SR nastává až 90% pokles buněčné koncentrace D-serinu oproti kontrolním jedincům, což má za následek inhibici aktivity NMDAR (Inoue *et al.*, 2008; Basu *et al.*, 2009). Zbývajících 10 % D-serinu nejpravděpodobněji pochází z příjmu potravy, syntézy střevními mikroorganismy (Corrigan, 1969; Konno *et al.*, 1990; Basu *et al.*, 2009) a/nebo spontánní racemizací z L-serinu při hydrolýze proteinů (Corrigan, 1969) či z glycinu různou cestou (Iwama *et al.*, 1997). V experimentálních podmínkách inaktivace genu pro SR způsobuje významné změny v chování u myši, jako jsou zvýšení úzkosti, hyperaktivita, pokles LTP a u samců navíc porucha prostorové paměti (Basu *et al.*, 2009).

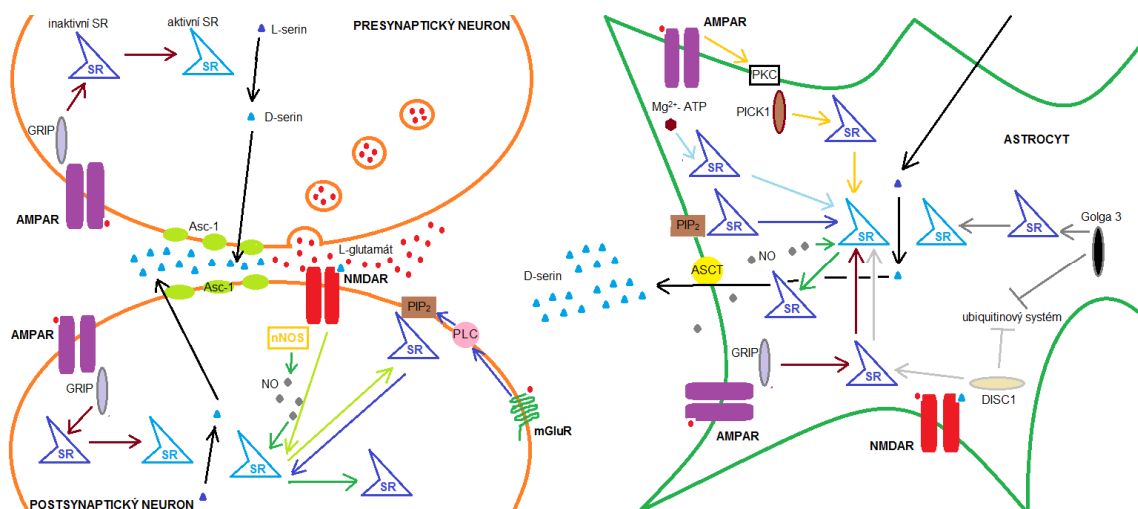
K intenzivní expresi SR v rámci CNS dochází především v buňkách vyžadujících vysoké hladiny D-serinu, tedy ve tkáních frontální části mozku – v mozkové kůře, striatu, hipokampu a v corpus callosum. Naopak velmi nízké koncentrace SR nalezneme v mozečku a mozkovém kmeni, stejně jako je tomu v případě D-serinu (Wolosker *et al.*, 1999b; Basu *et al.*, 2009). Informace ohledně lokalizace SR na buněčné úrovni se různí. Někteří autoři tvrdí, že SR se nachází výlučně v astrocytech (Schell *et al.*, 1995; Schell *et al.*, 1997a, Wolosker *et al.*, 1999b), zatímco jiní uvádějí, že se zvýšená míra exprese SR soustředí na neurony ve frontální a mediální části mozku (Yasuda *et al.*, 2001; Kartvelishvily *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2008), případně že je pouze v neuronech (Yoshikawa *et al.*, 2007). Předpokládá se, že nadměrné eliminaci D-serinu (přítomného v astrocytech a extracelulárně) brání jeho fyzické oddělení od SR (v neuronech) a její eliminační aktivity. To má význam pro regulaci hladiny D-serinu v CNS a napomáhá jeho vyšší stabilitě (více informací je v kapitole 5.1.2.) (Foltyn *et al.*, 2005).

#### 4.1.2. Ovlivnění aktivit serinracemasy

Katalytickou aktivitu SR lze v organismu ovlivňovat různými způsoby a na různé úrovni – působením interagujících proteinů, posttranslačními modifikacemi, nitrosylací, změnou její buněčné lokalizace nebo její degradací ubiquitinovým systémem.

SR je aktivní pouze ve stabilní formě – tedy ve vazbě s kofaktorem PLP, jehož funkce je navíc podmíněna vazbou alosterického modulátoru ATP. Během katalytické činnosti SR nedochází k hydrolýze ATP (De Miranda *et al.*, 2002). Dalšími aktivátory ovlivňujícími funkci SR mohou být i jiné nukleotidy (ADP, GTP, UTP, CTP, ITP), dvojmocné kationty ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) nebo jejich kombinace. Konkrétně při působení samostatného  $Mg^{2+}$  nebo samostatného ATP vzrůstá aktivita SR až 5×, při jejich přítomnosti v komplexu  $Mg^{2+}$ -ATP pak 10×. Ostatní nukleotidy a také vazba dvojmocného kationu  $Mn^{2+}$  sice rovněž přispívají ke stimulaci aktivity SR, avšak s nižší účinností ve srovnání s ATP a  $Mg^{2+}$  (De Miranda *et al.*, 2002).

Mezi proteiny interagující se SR a ovlivňující tak její katalytickou aktivitu řadíme GRIP (*glutamate receptor interacting protein*), PICK1 (*protein interacting with C-kinase 1*), Golga 3 a DISC1 (*disrupted in schizophrenia 1*). Obrázek č. 10 schematicky popisuje propojení jednotlivých drah regulace SR.



**Obrázek č. 10: Možné dráhy regulace SR** (upraveno podle Pollegioni *et Sacchi*, 2010). Regulační dráhy SR jsou spouštěny po aktivaci iGluR (AMPA, NMDAR, KAR) nebo mGluR prostřednictvím L-glutamátu, popřípadě i D-serinu. Jedná se o aktivační a inhibiční dráhy SR, která v aktivované formě syntetizuje D-serin z L-serinu. D-serin se následně uvolňuje prostřednictvím transportérů – Asc-1 z neuronu nebo ASCT z astrocytů (černé šipky) – do extracelulárního prostředí k aktivaci receptorů na membráně neuronů a astrocytů. Mezi aktivační dráhy řadíme interagující proteiny GRIP (hnědé šipky), PICK1 (oranžové šipky), DISC1 (světle šedé šipky), Golga3 (tmavě šedé šipky) a dále komplex  $Mg^{2+}$ -ATP (světle modré šipky). Dále aktivace mGluR indukuje PLC k degradaci PIP2, která způsobí uvolnění SR z vazby. Následně se SR translokuje z plasmatické membrány a stává se aktivní. K inhibičním drahám se řadí NO (tmavě zelené

šipky), a dále translokace SR z cytosolu směrem k plasmatické membráně (světle zelené šipky) a navázání k PIP2.

GRIP se váže na AMPAR, po jehož aktivaci disociuje a následně se váže na C-konec molekuly SR, čímž ji aktivuje a fyziologicky tak zvyšuje syntézu D-serinu (Kim *et al.*, 2005). Stejnou schopnost vazby na C-konec SR vykazuje i PICK1 (Fujii *et al.*, 2006; Hikida *et al.*, 2008). Protein Golga 3 asociuje se SR prostřednictvím vazby na její N-konec a snižuje tak degradační aktivitu ubiquitinového systému. Tímto mechanismem Golga 3 molekulu SR stabilizuje, oddaluje její degradaci a nepřímo tak ovlivňuje hladinu D-serinu (Dumin *et al.*, 2006). Podobným mechanismem SR stabilizuje taktéž DISC1 s tím rozdílem, že se váže k jejímu C-konci (Ma *et al.*, 2012).

Aktivita SR je na základě hladiny D-serinu regulována také několika negativními zpětnovazebnými procesy. D-serin s glutamátem aktivují postsynaptický NMDAR, který spouští influx  $\text{Ca}^{2+}$ . Tyto ionty pak spolu s kalmodulem aktivují neuronální NO syntasu (nNOS) k produkci NO. To následně vede k S-nitrosylaci presynaptické SR, což blokuje vazbu ATP na SR a inhibuje syntézu D-serinu (Mustafa *et al.*, 2007). Kromě toho NO stimulačně působí na aktivitu degradačního enzymu D-serinu DAAO (*D-amino acid oxidase*, viz kapitola 5) (Shoji *et al.*, 2006). Dalším příkladem negativní zpětné vazby předcházející nadměrné aktivaci NMDAR je proces translokace SR z cytosolu k plasmatické membráně, která vede ke snížení syntézy koagonisty D-serinu potřebného pro aktivaci NMDAR až o 90 % (Balan *et al.*, 2009). SR se pevně váže k plasmatické membráně díky interakci s fosfatidylinositol(4,5)-bisfosfátem (PIP2, z angl. *phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate*). PIP2 současně kompetitivně inhibuje katalytickou aktivitu SR (Mustafa *et al.*, 2009). Opětovná aktivace SR je umožněna vazbou agonisty na mGluR a následnou indukci katalytické činnosti fosfolipasy C (PLC, z angl. *phospholipase C*), která štěpí PIP2. Po degradaci PIP2 dochází k uvolnění SR z membrány a tedy k opětovnému navýšení produkce D-serinu (Mustafa *et al.*, 2009).

#### 4.1.3. Inhibice serinracemasy

Vzhledem k podílu D-serinu na různých patologických procesech prostřednictvím aktivace NMDAR (viz kapitola 6) by mohla specifická inhibice SR poskytnout způsob, kterým by bylo možné zmírnit či úplně zablokovat škodlivé účinky nadměrné glutamátové neurotransmise (Hoffman *et al.*, 2009; Vorlová *et al.*, 2015).

Jako inhibitory SR byly doposud identifikovány některé dvojmocné kationty (s nejvýraznějším účinkem  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ ) (De Miranda *et al.*, 2002), malé peptidy, dikarboxylové kyseliny (malonát), AMK (glycin, L-asparagin/L-aspartát, L-serin) a jejich deriváty a sloučeniny s  $\beta$  SH-skupinou, reagující s PLP za vzniku thiazolidového derivátu (Dunlop *et al.*, 2005; Stříšovský *et al.*, 2005). Nižší inhibiční potenciál vykazují rovněž hydroxamové kyseliny a jejich deriváty. Ty ale inhibují i jiné enzymy závislé na PLP (Hoffman *et al.*, 2009).

Z dosud identifikovaných kompetitivních inhibitorů SR byla nejvyšší účinnost zjištěna u malonátu, L-erythro-3-hydroxyaspartátu, L-serin-O-sulfátu (Dunlope *et Neidle*, 2005; Stříšovský *et al.*, 2005; Jirásková-Vaničková *et al.*, 2011) a 2,2-dichloromalonát (Vorlová *et al.*, 2015), které ale nemohou být vzhledem ke své nedostatečné inhibiční účinnosti ve farmakologickém množství uvedeny do klinické praxe (Jirásková-Vaničková *et al.*, 2011). L-erythro-3-hydroxyaspartát byl už aplikován v primární kultuře astrocytů, kde indukce LTP byla potlačena jeho blokací SR (Henneberger *et al.*, 2010), byla prokázána i jeho účinnost *in vivo* (spolu s L-serin-O-sulfátem), kdy po aplikaci potkanům došlo jak ke snížení hladiny D-serinu v mozku, tak i ke zmírnění klinických příznaků neurotoxicity (Laurido *et al.*, 2012).

V současné době je proto věnována pozornost hledání co možná nejúčinnějšího a současně specifického inhibitoru SR, aby jeho aplikaci *in vivo* nedocházelo k nežádoucím vedlejším účinkům.

## 4.2. Aspartátracemasa

Druhou nejlépe prozkoumanou D-AMK v CNS je D-aspartát. V případě této AMK existuje však jen málo informací ohledně její syntézy v cytoplasmě savčích buněk (Long *et al.*, 1998).

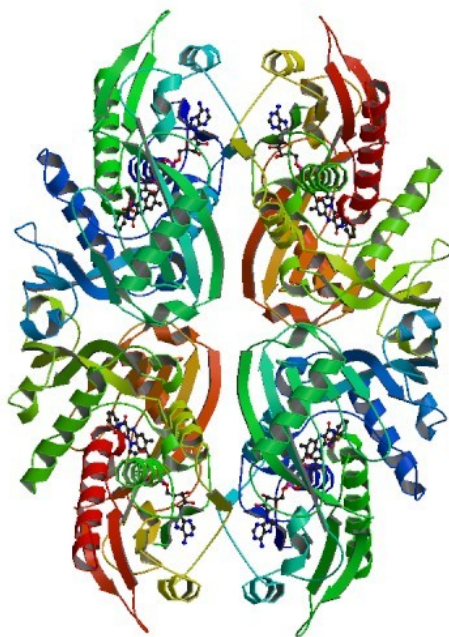
Enzym aspartátracemasa (DR, z angl. *D-aspartate racemase*) je hlavním biosyntetickým enzymem katalyzujícím racemizaci L-aspartátu na D-aspartát (Wolosker *et al.*, 2000). DR vykazuje nejvyšší katalytickou aktivitu v zásaditém prostředí, konkrétně při pH 7,5–8, a při teplotě 37 °C (Kim *et al.*, 2010; D'Aniello *et al.*, 2011). Stejně jako v případě SR je kofaktorem DR PLP (Wolosker *et al.*, 2000).

DR se v rámci CNS, stejně jako D-aspartát, nachází v nejvyšším množství v přední a střední části mozku, zatímco nejnižší koncentrace obou nalezneme v dospělém mozečku (Wolosker *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2010). Ačkoliv množství D-aspartátu dosahuje celkově nižších hodnot než je tomu u L-glutamátu, vyskytuje se ve vyšší koncentraci spolu s DR v blízkosti NMDARs, což může zvyšovat selektivitu jeho účinku na příslušný receptor (viz kapitoly 3.3.2. a 5.2.1.) (Kim *et al.*, 2010).

## 5. Degradace D-aminokyselin v CNS

Na degradaci D-serinu se kromě SR ( $\beta$ -eliminací – viz kapitoly 4.1.1. a 5.1.2.) podílí ještě jeden významný enzym – DAAO (Krebs *et al.*, 1935). DAAO u savců přispívá k udržování optimálních hladin všech neutrálních a polárních D-AMK včetně D-serinu. Hladinu kyselých D-AMK, mezi které řadíme D-aspartát, D-glutamát a NMDA, reguluje enzym DAspO (D'Aniello *et al.*, 1993). 3D strukturu DAAO zobrazuje Obrázek č. 11.



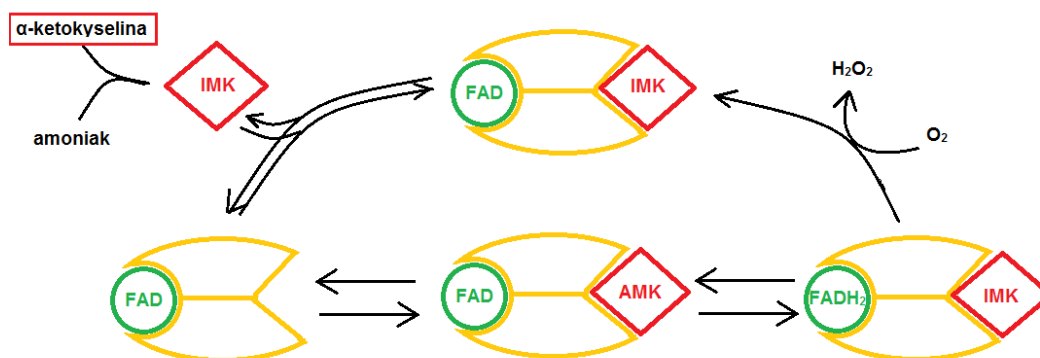


**Obrázek č. 11: 3D struktura lidské DAAO** (převzato od Kawazoe *et al.*, 2006 pod kódem 2DU8). Jedná se o krystalickou strukturu homodimeru lidské DAAO (duhově zbarvené  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -listy) s kofaktorem FAD (strukturní vzorec).

## 5.1. Oxidasa D-aminokyselin

### 5.1.1. Úloha oxidasy D-aminokyselin v CNS

DAAO je flavoprotein, který nekovalentně váže svůj kofaktor flavinadeninindinukleotid (FAD) a katalyzuje stereospecifickou oxidativní deaminaci D-AMK na odpovídající  $\alpha$ -ketokyseliny a amoniak. V průběhu této reakce je kofaktor FAD redukován na redukovaný flavinadeninindinukleotid (FADH<sub>2</sub>), aby byl následně v přítomnosti O<sub>2</sub> reoxidován zpět na FAD za současné redukce O<sub>2</sub> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tuto reakci zobrazuje obrázek č. 12 (D'Aniello *et al.*, 1993; Todone *et al.*, 1997).



**Obrázek č. 12: Mechanismus degradace D-AMK včetně D-serinu** (upraveno podle Molla *et al.*, 2006).

Na homodimer enzymu DAAO s kofaktorem FAD se váže D-AMK, která je v průběhu reakce přeměňována na odpovídající iminokyselinu (IMK) za současné redukce FAD na FADH<sub>2</sub>. Následně je FADH<sub>2</sub> v přítomnosti O<sub>2</sub> spontánně reoxidován na FAD společně s redukcí O<sub>2</sub> na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tímto procesem se z enzymu uvolní IMK, která se poté neenzymaticky rozkládá na odpovídající  $\alpha$ -ketokyselinu a amoniak.

Přítomnost kofaktoru FAD je pro funkci DAAO nezbytná. V nepřítomnosti ligandu má však afinita FAD k apoenzymu DAAO velmi slabý charakter, a to v důsledku změny konformace tohoto enzymu (Todone *et al.*, 1997). Při navázání ligandu se afinita FAD k DAAO naopak výrazně zvyšuje (Molla *et al.*, 2006). Velmi slabá afinita FAD k DAAO v nepřítomnosti ligandu pravděpodobně zabraňuje takové aktivitě DAAO, která by vedla k nadměrnému snížení koncentrace D-serinu (Caldinelli *et al.*, 2009).

### 5.1.2. Distribuce oxidasy D-aminokyselin v CNS

Nejsilnější aktivita DAAO je u savců detekována v zadní části mozku, tedy v míše, mozkovém kmeni a obzvláště v mozečku. Naopak nejslabších hodnot dosahuje její aktivita v mozkové kůře a v hipokampu (Moreno *et al.*, 1999; Morikawa *et al.*, 2001). Lokalizace DAAO je tak téměř přesně opačná vůči lokalizaci D-serinu (Schell *et al.*, 1995; 1997a; Morikawa *et al.*, 2001). Experimenty u myší s inaktivovaným genem pro DAAO ukazují nezměněnou hladinu D-serinu v přední a temenní části mozku (Morikawa *et al.*, 2001), v těchto oblastech se tudíž předpokládá přítomnost ještě jiných mechanismů pro degradaci D-serinu (Shleper *et al.*, 2005). Nejpravděpodobnější se jeví degradace pomocí  $\beta$ -eliminace katalyzované SR (Foltyn *et al.*, 2005). Tým Foltyn *et al.* totiž vytvořil bodovou mutaci SR se selektivním poškozením  $\beta$ -eliminální aktivity SR. Následně došlo k výraznému zvýšení hladiny D-serinu, která byla částečně kompenzována zpětnou racemizací na L-serin – racemizační aktivita SR tedy zůstala zachována. Toto zjištění podporuje teorii, podle které  $\beta$ -eliminální aktivita SR limituje koncentraci D-serinu v předním mozku, kde chybí DAAO aktivita (Foltyn *et al.*, 2005).

Společná přítomnost DAAO s D-serinem ve tkáních způsobuje snížení koncentrace D-serinu. Při podání aktivního DAAO do hipokampu potkana dochází k poklesu hladiny D-serinu o  $19 \pm 4$  % a ke snížení NMDAR zprostředkovaného EPSC průměrně o  $45 \pm 8$  %. Po podání D-serinu se EPSC vrací k normálním hodnotám (Mothet *et al.*, 2000). Při experimentu *in vitro* DAAO způsobuje přibližně 30% potlačení amplitudy EPSC zprostředkovaného NMDAR, čímž výrazně snižuje indukci LTP (Yang *et al.*, 2003).

Naopak inaktivace genu pro DAAO u myši zvyšuje hladinu D-serinu v zadní části mozku a současně také EPSC zprostředkovaného NMDAR (Wake *et al.*, 2001). Tato zjištění poukazují na metabolické propojení DAAO s NMDAR.

Na buněčné úrovni se DAAO nachází jak v neuronech, tak v gliích. Její hladiny se v jednotlivých oblastech mozku liší. Obecně jsou nejvyšší koncentrace DAAO přítomny v astrocytech (Moreno *et al.*, 1999).

## 5.2. Oxidasa D-aspartátu

### 5.2.1. Úloha a distribuce oxidasy D-aspartátu v CNS

Flavoenzym DAspO společně s kofaktorem FAD zodpovídají za degradaci kyselých dikarboxylových D-AMK oxidativní deaminací na odpovídající  $\alpha$ -ketokyseliny a amoniak (D'Aniello *et al.*, 1993; Setoyama *et Miura*, 1997). Tento enzym vykazuje větší specifitu k D-aspartátu a NMDA, zatímco D-glutamát degraduje s nižší aktivitou (Katane *et al.*, 2015; Setoyama *et Miura*, 1997). Inaktivace genu DAspO u myši vede k nárůstu tvorby D-aspartátu, což pravděpodobně vede ke zvýšení aktivity NMDAR ve všech tkáních (Errico *et al.*, 2006).

U potkanů se DAspO vyskytuje v hipokampu, mozkové kůře, čichovém epitelu, chloroidálním plexu a ependymu, zatímco úplně chybí v hypothalamu a epifýze – její lokalizace je tedy opačná k lokalizaci D-aspartátu (Schell *et al.*, 1997b). V rámci lidského a myšního mozku byla zjištěna podobná lokalizace DAspO jako u potkana (Zaar *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006). Vedle astrocytů ji nalezneme především v neuronech. Není však detekována ve významnějších koncentracích v nervových zakončeních ani v synaptických váčcích, kde se právě D-aspartát hojně nachází (Zaar *et al.*, 2002; D'Aniello *et al.*, 2011).

Inaktivace genu pro DAspO vede až k  $13\times$  vyšší koncentraci D-aspartátu v porovnání s nemutovanými myšmi s normální funkcí DAspO (Errico *et al.*, 2008). Inaktivací DAspO u myši se v intermediálním laloku hypofýzy v důsledku nárůstu D-aspartátu zvýšilo také množství melanocyty stimulujícího hormonu, což následně vedlo ke změně v sexuálním chování a ke zvýšení tělesné hmotnosti experimentálních zvířat (Huang *et al.*, 2006). V mozečku způsobuje zvýšené množství D-aspartátu poškození v některých oblastech motoriky (Weil *et al.*, 2006).

### 5.3. Inhibitory oxidasy D-aminokyselin a oxidasy D-aspartátu

Inhibice aktivity DAAO/DAspO by mohla vést k bezpečnému zvýšení hladiny D-serinu/D-aspartátu a tím přispět k zvýšení aktivity NMDAR při jeho hypofunkci (viz kapitola 6). Známým experimentálním inhibitorem DAAO je benzoát sodný (Lin *et al.*, 2014), zatímco u DAspO je to kyselina mesovinná a malonát (Katane *et al.*, 2010).

Byly identifikovány další potenciální inhibitory DAAO, zejména karboxylové kyseliny s relativně malou molekulovou hmotností a aromatickým jádrem (např. chinolin), které navyšují koncentraci D-serinu v krevní plasmě, ale zároveň neinhibují DAspO nebo SR (Sparey *et al.*, 2009; Katane *et al.*, 2013). Vysoce selektivní a silně kompetitivní inhibitor lidské DAAO 3-hydroxyquinolin-2(1H)-one (Duplantier *et al.*, 2009) byl testován *in vivo* i *in vitro* a byla pozorována inhibice DAAO aktivity, která vedla k akumulaci D-serinu v mozečku. V předním mozku myši a potkanů nebylo po aplikaci tohoto inhibitoru pozorováno měřitelné zvýšení D-serinu, přesto v hipokampu a v mozkové kůře došlo ke zvýšení neuronální aktivity zprostředkované NMDAR (Strick *et al.*, 2011).

U většiny *in vivo* experimentálně zkoumaných inhibitorů DAAO/DAspO se pro hodnocení jejich účinků používají potkani nebo myši. Potkani a myši DAAO/DAspO však vykazují významné rozdíly oproti lidské DAAO, případně DAspO, a to konkrétně v substrátové specifitě a katalytické účinnosti (Katane *et al.*, 2015; Katane *et al.*, 2010; Duplantier *et al.*, 2009). Existují proto pochybnosti ohledně použití potkaních a myších modelů pro testování nových léčiv v oblasti hypofunkce NMDAR u lidí (Molla *et al.*, 2006; Sparey *et al.*, 2009).

## 6. Onemocnění spojená se změnou hladin D-aminokyselin v mozku

D-AMK jsou přirozenými koagonisty NMDAR buňkách CNS savců. Přítomnost D-AMK ve specifické koncentraci proto hraje klíčovou roli ve fyziologické funkci NMDARs a v jimi zprostředkované neurotransmisí. Poruchy metabolismu D-AMK v kombinaci s dalšími rizikovými faktory mohou vést ke vzniku a rozvoji různých neurodegenerativních nebo neuropsychiatrických onemocnění spojovaných s poruchami funkce NMDAR (Ma *et al.*, 2012). NMDAR je totiž hlavním receptorem zprostředkovávajícím glutamátovou neurotoxicitu (Choi *et al.*, 1988), což souvisí s jeho vysokou propustností pro  $\text{Ca}^{2+}$ . Při vysoké koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  se v buňce aktivují endonukleasy, proteasy a fosfolipasy, které štěpí různé buněčné struktury, což může vést až k hromadné smrti buněk. Tak dochází k neurodegeneraci při mozkové ischemii a dalších onemocněních jako je epilepsie, ALS, HD a AD (Shleper *et al.*, 2005). Naopak hypofunkce NMDAR vede k útlumu excitační glutamátové neurotransmise, což způsobuje poškození kognitivních funkcí mozku, projevující se jako symptomy u schizofrenie (Tsai *et al.*, 1999).

Inaktivaci genů pro metabolické enzymy D-AMK lze u zvířecích modelů používat pro navození hypofunkce a hyperfunkce NMDAR a vyvolat tak stavy podobné onemocněním u lidí.

## 6.1. Schizofrenie

Schizofrenie je vážné duševní onemocnění, které stojí za kognitivním, emočním a behaviorálním deficitem. Charakteristika schizofrenie spočívá mimo jiné ve výskytu halucinací, apatií, bludů, depresí a poruchy motoriky. Postihuje asi 1 % celosvětové populace (Tsai *et al.*, 1998).

Zásadní význam NMDAR v patofyziologii schizofrenie byl pozorován v řadě studií *in vivo*, a to za použití antagonistů tohoto receptoru – ketaminu, fencyklidinu (PCP, z angl. *phencyclidine*) a dizocilpinu (MK-801) (Javitt *et al.*, 1991). U pacientů se schizofrenií způsobilo intravenózní podávání antagonistů NMDAR významné zhoršení jejich příznaků. V případě zdravých jedinců byl v reakci na tyto látky pozorován rozvoj symptomů typických pro schizofrenii, konkrétně ataxie, stereotypního chování, lokomoční hyperaktivity, kognitivního deficitu a narušení sociální interakce (Javitt *et al.*, 1991; Lahti *et al.*, 2000). Rovněž u myši (Mohn *et al.*, 1999) a potkanů (Becker *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2010) dochází při intraperitonální aplikaci ketaminu, PCP či MK-801 k nárůstu motorické aktivity a současně ke vzniku stereotypního chování. Antagonisté NMDAR proto často slouží jako prostředek pro animální modelování stavů podobných schizofrenií a jiných neurodegenerativních onemocnění (Mohn *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2010).

Příznaky podobné schizofrenií byly zaznamenány u myši s mutací glycinového místa NMDAR (Kew *et al.*, 2000), přičemž podání D-serinu nebo glycinu u nich tyto symptomy zmírňovalo (Ballard *et al.*, 2002). Transgenní myši s homozygotní delecí exonu 1 genu SR vykazovaly vedle neurochemických změn i neuroanatomické abnormality, které se shodují s neuroanatomickými nálezy u lidí se schizofrenií – větší objem mozkové komory a atrofie mozkové kůry (DeLisi *et al.*, 2006; Puhl *et al.*, 2015).

U pacientů se schizofrenií byla v několika studiích sledována hladina agonistů NMDAR, zejména D-serinu a D-aspartátu. Došlo u nich k vytvoření deficitu D-serinu a D-aspartátu v mozkové tkáni, konkrétně v prefrontální kůře a striatu (Errico *et al.*, 2013; Errico *et al.*, 2015). Detekována byla rovněž snížená SR aktivita ve frontální kůře (Bendikov *et al.*, 2007; Verrall *et al.*, 2007) a v hipokampu (Bendikov *et al.*, 2007), doprovázená nižší koncentrací D-serinu v krevním séru a v mozkomíšním moku (Hashimoto *et al.*, 2003; Bendikov *et al.*, 2007). Detekce hladiny D-serinu by tak mohla být používána jako biologický marker tohoto onemocnění (Hashimoto *et al.*, 2003).

V rámci klinické studie se u pacientů se schizofrenií po suplementaci D-serinu v dávkách 30 mg/kg/den (*per os*) výrazně zlepšovaly různé symptomy doprovázející toto onemocnění (Tsai *et al.*, 1998). Perorální podávání D-alaninu v dávce 100 mg/kg/den mělo podobně pozitivní vliv, a to zejména na kognitivní projevy (Tsai *et al.*, 2006). U zdravých jedinců navíc jednorázové perorální podání 2,1 g D-serinu podporovalo kognitivní funkce a tlumilo subjektivní pocity úzkosti a smutku, což jsou reakce

opačné příznakům sledovaným při blokaci NMDAR jeho antagonisty (Levin *et al.*, 2015). V rámci obou těchto studií nebyly u pacientů pozorovány žádné výrazné vedlejší účinky (Tsai *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2006). U myši navíc potlačovalo druhotné efekty provázející léčbu antagonistou NMDAR – PCP perorální podávání D-aspartátu (Errico *et al.*, 2015).

Při zkoumání příčin nedostatku D-serinu a D-aspartátu v organismu byla pozornost zaměřena především na enzymy zapojené do biosyntézy (SR, DR) a degradace (DAAO, DAspO) obou těchto agonistů NMDAR. Myši se ztrátou schopnosti produkovat SR vykazovaly chování podobné schizofrenii, které bylo dále provázeno dramatickým poklesem hladiny D-serinu (Labrie *et al.*, 2009). Také některé mutace genu pro SR zapříčiňují sníženou expresi receptoru NMDAR a představují tak rizikový faktor vzniku schizofrenie v průběhu života jejího nositele (Morita *et al.*, 2007). Mutace proteinů interagujících se SR, konkrétně PICK1 a DISC1 (viz kapitola 4.1.2.), vedou k inhibici aktivity SR a způsobují tak rozvoj abnormálního chování blízkého schizofrenii (Fujii *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2012).

Z enzymů degradujících agonisty NMDAR byly v souvislosti se schizofrenií studovány DAAO a DAspO. Rozdíly v distribuci aktivního DAAO v přední části mozku u člověka mohou být součástí patofyziologie schizofrenie (Verall *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2008). U pacientů s tímto onemocněním byla detekována zvýšená aktivita DAAO (Bendikov *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2008) a rovněž DAspO v prefrontální kůře (Errico *et al.*, 2015). U myši s projevy podobnými schizofrenii, které jsou vyvolány aplikací antagonistů NMDAR, následovalo zlepšení patologických projevů po inhibici či blokaci aktivity DAAO i DAspO (Hashimoto *et al.*, 2005; Errico *et al.*, 2015).

Expresi proteinu interagujícího s DAAO kóduje u primátů a lidí gen G72 (Chumakov *et al.*, 2002; Sacchi *et al.*, 2008). Vložení lidského G72 do myšního genomu má za následek abnormální enzymatickou aktivitu DAAO u transgenních jedinců doprovázenou kompulzivním chováním, poruchami koordinace a deficitem v senzomotorickém gatingu (Otte *et al.*, 2009). G72 tak může hrát roli ve vzniku chování typického pro schizofrenii u myši. V lidském mozku je G72 exprimován na velmi nízké úrovni (Chumakov *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2014) a obecně se jedná o kandidátní gen zodpovědný za vznik schizofrenie a bipolární poruchy (Muller *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2014).

Pochopením metabolismu D-serinu, D-aspartátu a D-alaninu a vhodnou modulací inhibitorů DAAO a DAspO, případně aktivátorů SR a DR, by mohlo být v budoucnu dosaženo bezpečné stimulace aktivity NMDAR u pacientů se schizofrenií (Hashimoto *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2006; Labrie *et al.*, 2009) a tím také zlepšení jejich symptomů bez výrazných nežádoucích účinků (Tsai *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2006). Nejnadějnější se jeví kombinace D-serinu společně s inhibitorem DAAO. Po aplikaci na myším animálním modelu schizofrenie vykazuje vyšší úspěšnost v pozitivní modulaci chování ve srovnání s použitím pouze jedné z těchto sloučenin (Hashimoto *et al.*, 2009). Tímto směrem se také ubírá současný výzkum (Lin *et al.*, 2014).

## 6.2. Alzheimerova choroba

AD představuje jedno z neurodegenerativních onemocnění vedoucí k postupné demenci, projevující se ztrátou paměti, dezorientací, poruchou řeči a změnou osobnosti. Dochází při něm totiž k atrofii mozku, k poškození neuronů a k jejich spojením způsobenému ukládání patologických proteinů  $\beta$ -amyloidových plaků (Rogers *et al.*, 1992).

AD může být způsobena hyperfunkcí NMDAR a zároveň rovněž hypofunkcí NMDAR, a to zejména v počátcích onemocnění. Za příčinu nedostatečné aktivity NMDAR u AD se považuje nízká hladina D-serinu v krevním séru (Hashimoto *et al.*, 2004), popřípadě D-aspartátu v předním mozku, v hipokampu a amygdale, což má za následek zhoršení paměti u pacientů (D'Aniello *et al.*, 1998). V pozdní fázi této nemoci, kdy dochází k progresivnímu zhoršování mentálních funkcí (učení a paměť), byla naopak detekována vyšší aktivita NMDAR a SR v hipokampu a zároveň zvýšená hladina D-serinu i D-aspartátu v mozkomíšním moku pocházejícím z mozkových komor (Fisher *et al.*, 1998).

V případě animálního modelu AD u myši postrádajících schopnost produkce SR, která vede k 90 % snížení hladiny D-serinu v mozku, byla zaznamenána nižší neurotoxicita v porovnání s kontrolní skupinou (Ionue *et al.*, 2008). Perorální podávání inhibitoru DAAO (benzoát sodný) pacientům s AD jedenkrát denně po dobu 24 týdnů vedlo ke zvýšení hladiny D-serinu a rovněž ke zlepšení kognitivních funkcí (Lin *et al.*, 2014).

## 6.3. Amyotrofická laterální skleróza

Dalším neurodegenerativním onemocněním je i ALS. Mezi její charakteristické příznaky patří dramatická selektivní ztráta míšních motorických neuronů vedoucí až k atrofii svalů a tím k fatální paralýze (včetně poruchy dýchání, polykání) (Sasabe *et al.*, 2012). U pacientů s ALS byla v míše detekována zvýšená hladina D-serinu (Sasabe *et al.*, 2007; Sasabe *et al.*, 2012) vznikající v důsledku nadměrné aktivity SR (Sasabe *et al.*, 2007). Koncentrace D-serinu u pacientů navíc narůstá se zvyšující se progresí tohoto onemocnění (Sasabe *et al.*, 2007).

Na myším modelu ALS bylo při inhibici SR (Sasabe *et al.*, 2007) nebo při perorální suplementaci D-serinu (Thompson *et al.*, 2012) pozorováno snížení hladiny D-serinu v míše. Zároveň u sledovaných myši došlo k poklesu neurotoxicity zprostředkované NMDAR. Tento rozpor u podání D-serinu lze vysvětlit zvýšenou expresí Asc-1, tedy transportéru zajišťujícího přesun D-serinu do neuronů, ve kterých je zvýšené množství D-serinu pravděpodobně nakonec degradováno  $\beta$ -eliminací katalyzovanou SR (Thompson *et al.*, 2012). Existuje genetické propojení jednobodové mutace lidské DAAO s nemocí ALS v rámci jedné rodiny (Mitchell *et al.*, 2000), přičemž tato mutace snižuje biologický poločas DAAO a tím zvyšuje rozsah apoptózy u motorických neuronů (Paul *et al.*, 2012). U myšího modelu ALS došlo po inaktivaci genu kódujícího DAAO ke snížení exprese DAAO a k nárůstu hladiny D-serinu v míše. To vedlo k navýšení aktivity NMDAR a následně k rozsáhlejší apoptóze motoneuronů (Sasabe *et al.*, 2012).

## 6.4. Epilepsie

Epilepsie představuje onemocnění mozku charakterizované opakovanými spontánními záchvaty vzniklými v důsledku nerovnováhy mezi inhibiční a excitační synaptickou neurotransmisí. NMDAR aktivitu u tohoto onemocnění by mohl podporovat D-serin (Liu *et al.*, 2009; Harai *et al.*, 2012). Myši s vyřazeným genem pro SR použité ve zvířecím modelu epilepsie vykazovaly útlum i zkrácení doby indukovaných záchvatů (Harai *et al.*, 2012). U potkanů s vyvolanou chronickou epilepsií v temporálním laloku byla zaznamenána snížená hladina D-serinu a inhibice exprese SR v hipokampu, což vedlo k narušení LTP. Podávání D-serinu perorálně naopak zlepšilo synaptickou plasticitu, kognitivní funkce i schopnost prostorového učení u těchto potkanů (Klatte *et al.*, 2013).

## 6.5. Další onemocnění

Změny v metabolických drahách D-serinu a v jeho koncentraci souvisí s řadou dalších onemocnění, konkrétně s HD, mrtvicí, depresí a také s ischemií. U těchto onemocnění byla pozorována hyperaktivace NMDAR, za kterou stojí zvýšená hladina D-serinu související s nárůstem SR aktivity nebo také snížením DAAO aktivity (Katsuki *et al.*, 2007).



## 7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnutí současných poznatků o fyziologické úloze D-aminokyselin (D-AMK), konkrétně D-serinu, D-aspartátu a D-alaninu, a o enzimech klíčových pro jejich metabolismus.

D-serin, D-aspartát a D-alanin se ve významném množství vyskytují v centrální nervové soustavě savců, kde se váží na NMDA receptory. Díky tomu mohou modulovat jejich funkci a ovlivňovat tak řadu dalších dějů, zejména synaptickou transmisí a plasticitu, učení, paměť, neuronální migraci a vývoj neuronů i celého mozku. Hladina těchto D-AMK v jednotlivých buňkách je důležitá pro diferenciaci orgánů, jejich maturaci a rovněž pro sekreci hormonů endokrinními tkáněmi v centrální nervové soustavě. Řada detailních informací o přesné fyziologické biosyntéze a degradaci D-serinu, D-aspartátu a D-alaninu v konkrétních částech mozku během jednotlivých fází ontogenetického vývoje savců však dosud zůstává neobjasněna.

Vedle zmíněné fyziologické role mají D-serin, D-aspartát a D-alanin značný význam rovněž v patofyziologii. Změny v jejich koncentracích totiž mohou vést až ke vzniku epilepsie, deprese, schizofrenie či neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova choroba, amyotrofni laterální skleróza a Huntingtonova choroba.

Na základě řady studií lze říci, že prostřednictvím regulace hladin těchto D-AMK nebo jejich metabolických enzymů by mohlo být v budoucnu možné zmírnit nebo i zcela zvrátit průběh těchto onemocnění. Tato zjištění však dosud nejsou nijak využívána v klinické praxi. Současný výzkum v tomto směru se zaměřuje na různé možnosti potenciální aplikace D-AMK cílovým pacientům a omezení jejich případných vedlejších účinků.

Nutné je rovněž získání dalších detailních znalostí ohledně struktur, nativních konformací, přesných lokalizací a funkcí metabolických enzymů klíčových pro funkci D-serinu, D-aspartátu a D-alaninu. Nalezení účinnějších regulátorů aktivity těchto enzymů se tak může stát dalším slibným krokem v biochemickém a farmakologickém výzkumu.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Balan, L., Foltyn, V. N., Zehl, M., Dumin, E., Dikopoltsev, E., Knoh, D., Ohno, Y., Kihara, A., Jensen, O. N., Radzishevsky, I. S., Wolosker, H. (2009): Feedback inactivation of D-serine synthesis by NMDA receptor-elicited translocation of serine racemase to the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 7589–7594.
- Ballard, T. M., Pauly-Evers, M., Higgins, G. A., Ouagazzal, A.-M., Mutel, V., Borroni, E., Kemp, J. A., Bluethmann, H., Kew, J. N. C. (2002): Severe impairment of NMDA receptor function in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site results in drug-resistant nonhabituating hyperactivity. *The Journal of Neuroscience* **22**, 6713–6723.
- Basu, A. C., Tsai, G. E., Ma, C-L., Ehmsen, J. T., Mustafa, A. K., Han, L. (2009): Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Molecular Psychiatry* **14**, 719–727.
- Becker, A., Grecksch, G. (2004): Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **28**, 1267–1277.
- Bendikov, I., Nadri, C., Amar, S., Panizzutti, R., De Miranda, J., Wolosker, H., Agam, G. A (2007): CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophrenia Research* **90**, 41–51.
- Berger, A. J., Dieudonné, S., Ascher, P. (1998): Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *The Journal of Neurophysiology* **80**, 3336–3340.
- Bliss, T. V., Collingridge, G. L. (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39.
- Brückner, H., Schieber, A. (2001): Determination of amino acid enantiomers in human urine and blood serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* **15**, 166–172.
- Brückner, H., Haasmann, S., Friedrich, A. (1994): Quantification of D-amino acids in human urine using GC-MS and HPLC. *Amino Acids* **6**, 205–211.
- Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., D'Onofrio, M., Di Iorio, P., De Blasi, A., Melchiorri, D., Flor, P. J., Nicoletti, F. (2001): Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *The Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **21**, 1013–1033.
- Caldinelli, L., Molla, G., Sacchi, S., Pilone, M. S., Pollegioni, L. (2009): Relevance of weak flavin binding in human D-amino acid oxidase. *Protein Science* **18**, 801–810.
- Carasatorre, M., Ramírez-Amaya, V. (2013): Network, cellular, and molecular mechanisms underlying long-term memory formation. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* **15**, 73–115.
- Citri, A., Malenka, R. C. (2008): Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 18–41.
- Corrigan, J. J. (1969): D-amino acids in animals. *Science* **164**, 142–149.
- D'Aniello, A. D., Di Cosmo, A., Di Cristo, C., Annunziato, L., Petrucelli, L., Fisher, G. (1996): Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sciences* **59**, 97–104.

- D'Aniello, G., Ronsini, S., Guida, F., Spinelli, P., D'Aniello, A. (2005): Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: possible role in reproduction. *Fertility and Sterility* **84**, 1444–1449.
- D'Aniello, G., Tolino, A., D'Aniello, A., Errico, F., Fisher, G. H., Di Fiore, M. M. (2000b): The role of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in the regulation of prolactin release. *Endocrinology* **141**, 3862–3870.
- D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M., D'Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L., Fisher, G. H. (1993): Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase: effects of D-amino acids. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 26941–26949.
- D'Aniello, A., Di Fiore, M. M., Fisher, G. H., Milone, A., Seleni, A., D'Aniello, S., Perna, A., F. Ingrosso, D. (2000a): Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**, 699–714.
- D'Aniello, D., Lee, J. M., Petrucelli, L., Maddalena Di Fiore, M. (1998): Regional decreases of free D-aspartate levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* **250**, 131–134.
- D'Aniello, S., Somorjai, I., Garcia-Fernández, J., Topo, E., D'Aniello, A. (2011): D-aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 1014–1027.
- DeLisi, L. E., Szulc, K. U., Bertisch, H. C., Majcher, M., Brown, K. (2006): Understanding structural brain changes in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **8**, 71–78.
- De Miranda, J., Panizzutti, R., Foltyn, V. N., Wolosker, H. (2002): Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14542–14547.
- Derkach, V., Barria, A., Soderling, T. R. (1999): Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3269–3274.
- Dumin, E., Bendikov, I., Foltyn, V. N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Kartvelishvily, E., Wolosker, H. (2006): Modulation of D-serine levels via ubiquitin-dependent proteasomal degradation of serine racemase. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 20291–20302.
- Dunlop, D. S., Neidle, A. (2005): Regulation of serine racemase activity by amino acids. *Molecular Brain Research* **133**, 208–214.
- Dunlop, D. S., Neidle, A. (1997): The origin and turnover of D-serine in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235**, 26–30.
- Duplantier, A. J., Becker, S. L., Bohanon, M. J., Borzilleri, K. A., Chrnyk, B. A., Downs, J. T., Hu, L.-Y., El-Kattan, A., James, L. C., Liu, S., Lu, J., Maklad, N., Mansour, M. N., Mente, S., Piotrowski, M. A., Sakya, S. M., Sheehan, S., Steyn, S. J., Strick, Ch. A., Williams, V. A., Zhang, L. (2009): Discovery, SAR, and pharmacokinetics of a novel 3-hydroxyquinolin-2(1H)-one series of potent D-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors. *The Journal of Medicinal Chemistry* **52**, 3576–3585.
- Errico, F., D'Argenio, V., Sforazzini, F., Iasevoli, F., Squillace, M., Guerri, G., Napolitano, F., Angrisano, T., Di Maio, A., Keller, S., Vitucci, D., Galbusera, A., Chiariotti, L., Bertolino, A., de Bartolomeis, A., Salvatore, F., Gozzi, A., Usiello, A. (2015): A role for D-aspartate oxidase in schizophrenia and in schizophrenia-related symptoms induced by phencyclidine in mice. *Translational Psychiatry* **5**, e512.

- Errico, F., Napolitano, F., Squillace, M., Vitucci, D., Blasi, G., de Bartolomeis, A., Bertolino, A., D'Aniello, A., Usiello, A. (2013): Decreased levels of D-aspartate and NMDA in the prefrontal cortex and striatum of patients with schizophrenia. *The Journal of Psychiatric Research* **47**, 1432–1437.
- Errico, F., Pirro, M. T., Affuso, A., Spinelli, P., De Felice, M., D'Aniello, A., Di Lauro, R. (2006): A physiological mechanism to regulate D-aspartic acid and NMDA levels in mammals revealed by D-aspartate oxidase deficient mice. *Gene* **374**, 50–57.
- Errico, F., Nisticò, R., Di Giorgio, A., Squillace, M., Vitucci, D., Galbusera, A., Piccinin, S., Mango, D., Fazio, L., Middei, S., Trizio, S., Mercuri, N. B., Teule, M. A., Centonze, D., Gozzi, A., Blasi, G., Bertolino, A., Usiello, A. (2014): Free D-aspartate regulates neuronal dendritic morphology, synaptic plasticity, gray matter volume and brain activity in mammals. *Translational Psychiatry* **4**, e417.
- Errico, F., Nisticò, R., Palma, G., Federici, M., Affuso, A., Brilli, E., Topo, E., Centonze, D., Bernardi, G., Bozzi, Y., D'Aniello, A., Di Lauro, R., Mercuri, N. B., Usiello, A. (2008): Increased levels of D-aspartate in the hippocampus enhance LTP but do not facilitate cognitive flexibility. *Molecular and Cellular Neuroscience* **37**, 236–246.
- Etoh, S., Hamase, K., Morikawa, A., Ohgusu, T., Zaitzu, K. (2009): Enantioselective visualization of D-alanine in rat anterior pituitary gland: localization to ACTH-secreting cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 217–223.
- Fagg, G. E., Matus, A. (1984): Selective association of N-methyl aspartate and quisqualate types of L-glutamate receptor with brain postsynaptic densities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 6876–6880.
- Fisher, G. Lorenzo, N., Abe, H., Fujita, E., Frey, W. H., Emory, C., Di Fiore, M. M., D'Aniello, A. (1998): Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. *Amino Acids* **15**, 263–269.
- Foltyn, V. N., Bendikov, I., De Miranda, J., Panizzutti, R., Dumin, E., Shleper, M., Li, P., Toney, M. D., Kartvelishvily, E., Wolosker, H. (2005): Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an  $\alpha,\beta$ -elimination activity. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 1754–1763.
- Forsythe, I. D., Westbrook, G. L. (1988): Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central neurones. *The Journal of Physiology* **396**, 515–533.
- Fujii N., Satoh K., Harada. K., Ishibashi Y. (1994): Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in  $\alpha$ -A-crystallin from human lens. *The Journal of Biochemistry* **669**, 663–669.
- Fujii, K., Maeda, K., Hikida, T., Mustafa, A. K., Balkissoon, R., Xia, J., Yamada, T., Ozeki, Y., Kawahara, R., Okawa, M., Haganir, R. L., Ujike, H., Snyder, S. H., Sawa, A. (2006): Serine racemase binds to PICK1: potential relevance to schizophrenia. *Molecular Psychiatry* **11**, 150–157.
- Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J. Y., Chairoungdua, A., Kim, D. K., Matsuo, H., Cha, S. H., Endou, H., Kanai, Y. (2000): Identification and characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 9690–9698.
- Furukawa, H., Gouaux, E., Module, H. (2003): Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *The European Molecular Biology Organization* **22**, 2873–2885.

- Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., Gouaux, E. (2005): Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**, 185–192.
- Ganong, W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd. Praha: Galén, 2005. 890 s. ISBN 80-726-2311-7.
- Hamase, K., Homma, H., Takigawa, Y., Fukushima, T., Santa, T., Imai, K. (1997): Regional distribution and postnatal changes of D-amino acids in rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1334**, 214–222.
- Hamase, K., Inoue, T., Morikawa, A., Konno, R., Zaitso, K. (2001): Determination of free D-proline and D-leucine in the brains of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity. *Analytical Biochemistry* **298**, 253–258.
- Harai, T., Inoue, R., Fujita, Y., Tanaka, A., Horio, M., Hashimoto, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. (2012): Decreased susceptibility to seizures induced by pentylenetetrazole in serine racemase knockout mice. *Epilepsy Research* **102**, 180–187.
- 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 Letters* **296**, 33–36.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., Hayashi, T., Takahashi, K. (1993): Widespread distribution of free D-aspartate in rat periphery. *FEBS Letters* **331**, 4–8.
- Hashimoto, A., Oka, T., Nishikawa, T. (1995): Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by *in vivo* microdialysis. *Neuroscience* **66**, 635–643.
- Hashimoto, A., Yoshikawa, M., Niwa, A., Konno, R. (2005): Mice lacking D-amino acid oxidase activity display marked attenuation of stereotypy and ataxia induced by MK-801. *Brain Research* **1033**, 210–215.
- Hashimoto, K., Fujita, Y., Horio, M., Kunitachi, S., Iyo, M., Ferraris, D., Tsukamoto, T. (2009): Co-administration of a D-amino acid oxidase inhibitor potentiates the efficacy of D-serine in attenuating prepulse inhibition deficits after administration of dizocilpine. *Biological Psychiatry* **65**, 1103–1106.
- Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Shinoda, N., Nakazato, M., Kumakiri, Ch., Okada, S.-I., Hasegawa, H., Imai, K., Iyo, M. (2003): Decreased serum levels of complement. *Archives of General Psychiatry* **60**, 572–576.
- Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Okada, S. I., Komatsu, N., Okamura, N., Koike, K., Koizumi, H., Kumakiri, Ch., Imai, K., Iyo, M. (2004): Possible role of D-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **28**, 385–388.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H. R., Rusakov, D. A. (2010): Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* **463**, 232–236.
- Hikida, T., Mustafa, A. K., Maeda, K., Fujii, K., Barrow, R. K., Saleh, M., Haganir, R. L., Snyder, S. H., Hashimoto, K., Sawa, A. (2008): Modulation of D-Serine Levels in Brains of Mice Lacking PICK1. *Biological Psychiatry* **63**, 997–1000.
- Hoffman, H. E., Jirásková, J., Cígler, P., Šanda, M., Schraml, J., Konvalinka, J. (2009): Hydroxamic acids as a novel family of serine racemase inhibitors: mechanistic analysis reveals different modes of interaction with the pyridoxal-5'-phosphate cofactor. *The Journal of Medicinal Chemistry* **52**, 6032–6041.

- Huang, A. S., Beigneux, A., Weil, Z. M., Kim, P. M., Molliver, M. E., Blackshaw, S., Nelson, R. J., Young, S. G., Snyder, S. H. (2006): D-aspartate regulates melanocortin formation and function: behavioral alterations in D-aspartate oxidase-deficient mice. *The Journal of Neuroscience* **26**, 2814–2819.
- Cheng, L., Hattori, E., Nakajima, A., Woehrle, N. S., Opal, M. D., Zhang, C., Grennan, K., Dulawa, S. C., Tang, Y. P., Gershon, E. S., Liu, C. (2014): Expression of the G72/G30 gene in transgenic mice induces behavioral changes. *Molecular Psychiatry* **19**, 175–183.
- Choi, D. W., Koh, J. Y., Peters, S. (1988): Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *The Journal of Neuroscience* **8**, 185–196.
- Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guerassimenko, O., Cavarec, L., Palicio, M., Abderrahim, H., Bougueleret, L., Barry, C., Tanaka, H., Rosa, P. L., Puech, A., Tahri, N., Cohen-Akenine, A., Delabrosse, S., Lissarrague, S., Picard, F.-P., Maurice, K., Essioux, L., Millasseau, P., Grel, P., Debailleul, V., Simon, A.-M., Caterina, D., Dufaure, I., Malekzadeh, K., Belova, M., Luan, J.-J., Bouillot, M., Sambucy, J.-L., Primas, G., Saumier, M., Boubkiri, N., Martin-Saumier, S., Nasroune, M., Peixoto, H., Delaye, A., Pinchot, V., Bastucci, M., Guillou, S., Chevillon, M., Sainz-Fuertes, R., Meguenni, S., Aurich-Costa, J., Cherif, D., Gimalac, A., Van Duijn, C., Gauvreau, D., Ouellette, G., Fortier, I., Raelson, J., Sherbatich, T., Riazanskaia, N., Rogaev, E., Raeymaekers, P., Aerssens, J., Konings, F., Luyten, W., Macciardi, F., Sham, P. C., Straub, R. E., Weinberger, D. R., Cohen, N., Cohen, D. (2002): Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13675–13680.
- Ilisz, I., Berkecz, R., Péter, A. (2008): Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: a review. *The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **47**, 1–15.
- Inoue, R., Hashimoto, K., Harai, T., Mori, H. (2008): NMDA- and  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub>-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. *The Journal of Neuroscience* **28**, 14486–14491.
- Inoue, T., Hamase, K., Morikawa, A., Zaitso, K. (2000): Determination of minute amounts of D-leucine in various brain regions of rat and mouse using column-switching high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **744**, 213–219.
- Ishida, A. T., Fain, G. L. (1981): D-aspartate potentiates the effects of L-glutamate on horizontal cells in goldfish retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 5890–5894.
- Ishio, S., Yamada, H., Hayashi, M., Yatsushiro, S., Noumi, T., Yamaguchi, A., Moriyama, Y. (1998): D-aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Neuroscience letters* **249**, 143–146.
- Iwama, H., Takahashi, K., Kure, S., Hayashi, F., Narisawa, K., Tada, K., Mizoguchi, M., Takashima, S., Tomita, U., Nishikawa, T. (1997): Depletion of cerebral D-serine in non-ketotic hyperglycinemia: possible involvement of glycine cleavage system in control of endogenous D-serine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **231**, 793–796.
- Javitt, D. C., Zukin, S. R. (1991): Recent advances in the phenciclidine model of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* **148**, 1301–1308.
- Jirásková-Vaničková, J., Ettrich, R., Vorlová, B., Hoffman, H. E., Lepšík, M., Jansa, P., Konvalinka, J. (2011): Inhibition of human serine racemase, an emerging target for medicinal chemistry. *Current Drug Targets* **12**, 1037–1055.
- Johnson, J. W., Ascher, P. (1990): Voltage-dependent block by intracellular  $Mg^{2+}$  of N-methyl-D-aspartate-activated channels. *Biophysical Journal* **57**, 1085–1090.

- Kampa, B. M., Clements, J., Jonas, P., Stuart, G. J. (2004): Kinetics of  $Mg^{2+}$  unblock of NMDA receptors: implications for spike-timing dependent synaptic plasticity. *The Journal of Biological Chemistry* **556**, 337–345.
- Kartvelishvily, E., Shleper, M., Balan, L., Dumin, E., Wolosker, H. (2006): Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 14151–14162.
- Katane, M., Osaka, N., Matsuda, S., Maeda, K., Kawata, T., Saitoh, Y., Sekine, M., Furuchi, T., Doi, I., Hirono, S., Homma, H. (2013): Identification of novel D-amino oxidase inhibitors by *in silico* screening and their functional characterization *in vitro*. *The Journal of Medicinal Chemistry* **56**, 1894–1907.
- Katane, M., Saitoh, Y., Hanai, T., Sekine, M., Furuchi, T., Koyama, N., Nakagome, I., Tomoda, H., Hirono, S., Homma, H. (2010): Thiolactomycin inhibits D-aspartate oxidase: a novel approach to probing the active site environment. *Biochimie* **92**, 1371–1378.
- Katane, M., Kawata, T., Nakayama, K., Saitoh, Y., Kaneko, Y., Matsuda, S., Saitoh, Y., Miyamoto, T., Sekine, M., Homma, H. (2015): Characterization of the enzymatic and structural properties of human D-aspartate oxidase and comparison with those of the rat and mouse enzymes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **38**, 298–305.
- Katsuki, H., Watanabe, Y., Fujimoto, S., Kume, T., Akaike, A. (2007): Contribution of endogenous glycine and D-serine to excitotoxic and ischemic cell death in rat cerebrocortical slice cultures. *Life Sciences* **81**, 740–749.
- Katz, B., Miledi, R. (1968): The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of Physiology* **195**, 481–492.
- Kawazoe, T., Tsuge, H., Pilone, M. S., Fukui, K. (2006): Crystal structure of human D-amino acid oxidase: context-dependent variability of the backbone conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the si-face of the flavin ring. *Protein Science* **15**, 2708–2717.
- Kew, J. N., Koester, A., Moreau, J. L., Jenck, F., Ouagazzal, A. M., Mutel, V., Richards, J. G., Trube, G., Fischer, G., Montkowski, A., Hundt, W., Reinscheid, R. K., Pauly-Evers, M., Kemp, J. A., Bluethmann, H. (2000): Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site. *The Journal of Neuroscience* **20**, 4037–4049.
- Kim, P. M., Aizawa, H., Kim, P. S., Huang, A. S., Wickramasinghe, S. R., Kashani, A. H., Barrow, R. K., Haganir, R. L., Ghosh, A., Snyder, S. H. (2005): Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2105–2110.
- Kim, P. M., Duan, X., Huang, A. S., Liu, C. Y., Ming, G.-L., Song, H., Snyder, S. H. (2010): Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3175–3179.
- Klatte, K., Kirschstein, T., Otte, D., Pothmann, L., Muller, L., Tokay, T., Kober, M., Uebachs, M., Zimmer, A., Beck, H. (2013): Impaired D-serine-mediated cotransmission mediates cognitive dysfunction in epilepsy. *The Journal of Neuroscience* **33**, 13066–13080.
- Kole, M. H. P., Ilschner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C., Stuart, G. J. (2008): Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature Neuroscience* **11**, 178–186.

- Konno, R., Niwa, A., Yasumura, Y. (1990): Intestinal bacterial origin of D-alanine in urine of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *The Biochemical Journal* **268**, 263–265.
- Koupparis, L. NMDA receptor. *AnaesthesiaUK* [online]. 2005-09-07, 2009-01-12 [cit. 2015-05-11]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=100515>>.
- Krebs, H. A. (1935): Metabolism of amino-acids: deamination of amino-acids. *The Biochemical Journal* **29**, 1620–1644.
- Kumashiro, S., Hashimoto, A., Nishikawa, T. (1995): Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases. *Brain research* **681**, 117–125.
- Labrie, V., Fukumura, R., Rastogi, A., Fick, L. J., Wang, W., Boutros, P. C., Kennedy, J. L., Semeralul, M. O., Lee, F. H., Baker, G. B., Belsham, D. D., Barger, S. W., Gondo, Y., Wong, A. H. C., Roder, J. C. (2009): Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. *Human Molecular Genetics* **18**, 3227–3243.
- Lahti, A. C., Weiler, M. A., Michaelidis, T., Parwani, A., Tamminga, C. A. (2001): Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* **25**, 455–467.
- Laurido, C., Hernández, A., Pelissier, T., Constandil, L. (2012): Antinociceptive effect of rat D-serine racemase inhibitors, L-serine-O-sulfate, and L-erythro-3-hydroxyaspartate in an arthritic pain model. *The Scientific World Journal* **2012**, 1–5.
- Lee, J. A., Homma, H., Tashiro, K., Iwatsubo, T., Imai, K. (1999): D-aspartate localization in the rat pituitary gland and retina. *Brain Research* **838**, 193–199.
- Levin, R. Dor-Abarbanel, A. E., Edelman, S., Durrant, A. R., Hashimoto, K., Javitt, D. C., Heresco-Levy, U. (2015): Behavioral and cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist D-serine in healthy humans: initial findings. *The Journal of Psychiatric Research* **61**, 188–195.
- Lin, C.-H., Chen, P.-K., Chang, Y.-C., Chuo, L.-J., Chen, Y.-S., Tsai, G. E., Lane, H.-Y. (2014): Benzoate, a D-amino acid oxidase inhibitor, for the treatment of early-phase Alzheimer disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biological Psychiatry* **75**, 678–685.
- Liu, Y. H., Wang, L., Wei, L. C., Huang, Y. G., Chen, L. W. (2009): Up-regulation of D-serine might induce GABAergic neuronal degeneration in the cerebral cortex and hippocampus in the mouse pilocarpine model of epilepsy. *Neurochemical Research* **34**, 1209–1218.
- Long, Z., Homma, H., Lee, J. A., Fukushima, T., Santa, T., Iwatsubo, T., Yamada, R. H., Imai, K. (1998): Biosynthesis of D-aspartate in mammalian cells. *FEBS Letters* **434**, 231–235.
- Ma, T. M., Abazyan, S., Abazyan, B., Nomura, J., Yang, C., Seshadri, S., Sawa, A., Snyder, S. H., Pletnikov, M. V. (2012): Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion. *Molecular Psychiatry* **18**, 557–567.
- Madeira, C., Freitas, M. E., Vargas-Lopes, C., Wolosker, H., Panizzutti, R. (2008): Increased brain D-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia. *Schizophrenia Research* **101**, 76–83.
- Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1999): Long-term potentiation – a decade of progress? *Science* **285**, 1870–1874.
- Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1993): NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in Neuroscience* **16**, 521–527.
- McNaughton, L., Morris, R. G. M. (1987): Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends in Neurosciences* **10**, 408–415.



- McFadden, P. N., Clarke, S. (1982): Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: possible step in the repair of aged membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 2460–2464.
- Meeks, J. P., Mennerick, S. (2007): Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *The Journal of Neuroscience* **97**, 3460–3472.
- Mitchell, J., Paul, P., Chen, H.-J., Morris, A., Payling, M., Falchi, M., Habgood, J., Panoutsou, S., Winkler, S., Tisato, V., Hajitou, A., Smith, B., Vance, C., Shaw, Ch., Mazarakis, N. D., de Bellerocche, J. (2010): Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7556–7561.
- 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. *The Journal of Comparative Neurology* **510**, 641–654.
- Miyoshi, Y., Hamase, K., Tojo, Y., Mita, M., Konno, R., Zaitzu, K. (2009): Determination of D-serine and D-alanine in the tissues and physiological fluids of mice with various D-amino-acid oxidase activities using two-dimensional high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *The Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **877**, 2506–2512.
- Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., Koller, B. H. (1999): Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* **98**, 427–436.
- Molla, G., Sacchi, S., Bernasconi, M., Pilone, M. S., Fukui, K., Pollegioni, L. (2006): Characterization of human D-amino acid oxidase. *FEBS Letters* **580**, 2358–2364.
- Moreno, S., Nardacci, R., Cimini, A., Cerù, M. P. (1999): Immunocytochemical localization of D-amino acid oxidase in rat brain. *The Journal of Neurocytology* **28**, 169–185.
- Morikawa, A., Hamase, K., Zaitzu, K. (2003): Determination of D-alanine in the rat central nervous system and periphery using column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **312**, 66–72.
- Morikawa, A., Hamase, K., Inoue, T., Konno, R., Zaitzu, K. (2007): Alterations in D-amino acid levels in the brains of mice and rats after the administration of D-amino acids. *Amino Acids* **32**, 13–20.
- Morikawa, A., Hamase, K., Inoue, T., Konno, R., Niwa, A., Zaitzu, K. (2001): Determination of free D-aspartic acid, D-serine and D-alanine in the brain of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase activity. *The Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **757**, 119–125.
- Morita, Y., Ujike, H., Tanaka, Y., Otani, K., Kishimoto, M., Morio, A., Kotaka, T., Okahisa, Y., Matsushita, M., Morikawa, A., Hamase, K., Zaitzu, K., Kuroda, S. (2007): A genetic variant of the serine racemase gene is associated with schizophrenia. *Biological Psychiatry* **61**, 1200–1203.
- Mothet, J. P., Parent, A. T., Wolosker, H., Brady, R. O., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4926–4931.
- Müller, D. J., Zai, C. C., Shinkai, T., Strauss, J., Kennedy, J. L. (2011): Association between the DAOA/G72 gene and bipolar disorder and meta-analyses in bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disorders* **13**, 198–207.

- Mustafa, A. K., Kumar, M., Selvakumar, B., Ho, G. P. H., Ehmsen, J. T., Barrow, R. K., Amzel, L. M., Snyder, S. H. (2007): Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2950–2955.
- Mustafa, A. K., van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Maag, D., Ehmsen, J. T., Gazi, S. K., Chakraborty, A., Barrow, R. K., Amzel, L. M., Snyder, S. H. (2009): Glutamatergic regulation of serine racemase via reversal of PIP2 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2921–2926.
- Nagata, Y., Borghi, M., Fisher, G. H., D’Aniello, A. (1995): Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. *Brain research bulletin* **38**, 181–183.
- Ohide, H., Miyoshi, Y., Maruyama, R., Hamase, K., Konno, R. (2011): D-amino acid metabolism in mammals: biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *The Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **879**, 3162–3168.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C. M., Frouin, A., Wiseman, P. W., De Koninck, P., Choquet, D. (2010): CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* **67**, 239–252.
- Otte, D. M., Bilkei-Gorzó, A., Filiou, M. D., Turck, Ch. W., Yilmaz, Ö., Holst, M. I., Schilling, K., Abou-Jamra, R., Schumacher, J., Benzel, I., Kunz, W. S., Beck, H., Zimmer, A. (2009): Behavioral changes in G72/G30 transgenic mice. *European Neuropsychopharmacology* **19**, 339–348.
- Panatier, A., Theodosis, D. T., Mothet, J. P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D. A., Oliet, S. H. R. (2006): Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* **125**, 775–784.
- Panizzutti, R., De Miranda, J., Ribeiro, C. S., Engelender, S., Wolosker, H. (2001): A new strategy to decrease N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coactivation: inhibition of D-serine synthesis by converting serine racemase into an eliminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5294–5299.
- Paul, P., Murphy, T., Oseni, Z., Sivalokanathan, S., De Bellerocche, J. S. (2014): Pathogenic effects of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutation in D-amino acid oxidase are mediated by D-serine. *Neurobiology of Aging* **35**, 876–885.
- Pollegioni, L., Sacchi, S. (2010): Metabolism of the neuromodulator D-serine. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 2387–2404.
- Puhl, M. D., Mintzopoulos, D., Jensen, J. E., Gillis, T. E., Konopaske, G. T., Kaufman, M. J., Coyle, J. T. (2015): *In vivo* magnetic resonance studies reveal neuroanatomical and neurochemical abnormalities in the serine racemase knockout mouse model of schizophrenia. *Neurobiology of Disease* **73**, 269–274.
- Ribeiro, C. S., Reis, M., Panizzutti, R., De Miranda, J., Wolosker, H. (2002): Glial transport of the neuromodulator D-serine. *Brain Research* **929**, 202–209.
- Rogers, J., Cooper, N. R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P. L., Styren, S. D., Civin, W. H., Brachova, L., Bradt, B., Ward, P. (1992): Complement activation by  $\beta$ -amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10016–10020.
- Sacchi, S., Bernasconi, M., Martineau, M., Mothet, J. P., Ruzzene, M., Pilone, M. S., Pollegioni, L., Molla, G. (2008): pLG72 modulates intracellular D-serine levels through its interaction with D-amino acid oxidase: effect on schizophrenia susceptibility. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 22244–22256.

- Sakai, K., Homma, H., Lee, J., Fukushima, T., Santa, T., Tashiro, K., Iwatsubo, T. (1997): D-aspartic acid localization during postnatal development of rat adrenal gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235**, 433–436.
- Sakmann, B. (1992): Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Neuron* **8**, 613–629.
- Sasabe, J., Miyoshi, Y., Suzuki, M., Mita, M., Konno, R., Matsuoka, M., Hamase, K., Aiso, S. (2012): D-amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 627–632.
- Sasabe, J., Chiba, T., Yamada, M., Okamoto, K., Nishimoto, I., Matsuoka, M., Aiso, S. (2007): D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *The European Molecular Biology Organization* **26**, 4149–4159.
- Setoyama, C., Miura, R. (1997): Structural and functional characterization of the human brain D-aspartate oxidase. *The Journal of Biochemistry* **121**, 798–803.
- Shi, S. H., Hayashi, Y., Petralia, R. S., Zaman, S. H., Wenthold, R. J., Svoboda, K., Malinow, R. (1999): Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* **284**, 1811–1816.
- Shleper, M., Kartvelishvily, E., Wolosker, H. (2005): D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience* **25**, 9413–9417.
- Shoji, K., Mariotto, S., Ciampa, A. R., Suzuki, H. (2006): Mutual regulation between serine and nitric oxide metabolism in human glioblastoma cells. *Neuroscience Letters* **394**, 163–167.
- Schell, M. J., Brady, R. O., Molliver, M. E., Snyder, S. H. (1997a): D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience* **17**, 1604–1615.
- Schell, M. J., Cooper, O. B., Snyder, S. H. (1997b): D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2013–2018.
- Schell, M. J., Molliver, M. E., Snyder, S. H. (1995): D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**, 3948–3952.
- Smith, S. W. (2009): Chiral toxicology: it's the same thing only different. *The Journal of Toxicological Sciences* **110**, 4–30.
- Smith, M. A., Mack, V., Ebneith, A., Moraes, I., Felicetti, B., Wood, M., Schonfeld, D., Mather, O., Cesura, A., Barker, J. (2010): The structure of mammalian serine racemase: evidence for conformational changes upon inhibitor binding. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 12873–12881.
- Sparey, T., Abeywickrema, P., Almond, S., Brandon, N., Byrne, N., Campbell, A., Hutson, P. H., Jacobson, M., Jones, B., Munshi, S., Pascarella, D., Pike, A., Prasad, G. S., Sachs, N., Sakatis, M., Sardana, V., Venkatraman, S., Young, M. B. (2008): The discovery of fused pyrrole carboxylic acids as novel, potent D-amino acid oxidase (DAO) inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **18**, 3386–3391.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6789–6794.

- Strick, C. A., Li, Ch., Scott, L., Harvey, B., Hajós, M., Steyn, S. J., Piotrowski, M. A., James, L. C., Downs, J. T., Rago, B., Becker, S. L., El-Kattan, A., Xu, Y., Ganong, A. H., Tingley, F. D., Ramirez, A. D., Seymour, P. A., Guanowsky, V., Majchrzak, M. J., Fox, C. B., Schmidt, Ch. J., Duplantier, A. J. (2011): Modulation of NMDA receptor function by inhibition of D-amino acid oxidase in rodent brain. *Neuropharmacology* **61**, 1001–1015.
- Stříšovský, K., Jirásková, J., Bařinka, C., Majer, P., Rojas, C., Slusher, B. S., Konvalinka, J., Wieland, F. (2003): Mouse brain serine racemase catalyzes specific elimination of L-serine to pyruvate. *FEBS Letters* **535**, 44–48.
- Stříšovský, K., Jirásková, J., Mikulová, A., Rulišek, L., Konvalinka, J. (2005): Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity dicarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the  $\beta$ -eliminase activity. *Biochemistry* **44**, 13091–13100.
- Takahashi, T., Momiyama, A. (1993): Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* **366**, 156–158.
- Thompson, M., Marecki, J. C., Marinesco, S., Labrie, V., Roder, J. C., Barger, S. W., Crow, J. P. (2012): Paradoxical roles of serine racemase and D-serine in the G93A mSOD1 mouse model of ALS. *Journal of Neurochemistry* **120**, 598–610.
- Todone, F., Vanoni, M. A., Mozzarelli, A., Bolognesi, M., Coda, A., Curti, B., Mattevi, A. (1997): Active site plasticity in D-amino acid oxidase: a crystallographic analysis. *Biochemistry* **36**, 5853–5860.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K. (2010): Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* **62**, 405–496.
- Tsai, G. E., Yang, P., Chang, Y. C., Chong, M. Y. (2006): D-alanine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry* **59**, 230–234.
- Tsai, G. E., Yang, P., Chung, L. C., Tsai, I. C., Tsai, C. W., Coyle, J. T. (1999): Added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* **156**, 1822–1825.
- Tsai, G., Yang, P., Chung, L. C., Lange, N., Coyle, J. T. (1998): D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biological Psychiatry* **44**, 1081–1089.
- Verrall, L., Walker, M., Rawlings, N., Benzel, I., Kew, J. N. C., Harrison, P. J., Burnet, P. W. J. (2007): D-amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *The European Journal of Neuroscience* **26**, 1657–1669.
- Vorlová, B., Nachtigallová, D., Jirásková-Vaničková, J., Ajani, H., Jansa, P., Řezáč, J., Fanfrlík, J., Otyepka, M., Hobza, P., Konvalinka, J., Lepšík, M. (2015): Malonate-based inhibitors of mammalian serine racemase: kinetic characterization and structure-based computational study. *European Journal of Medicinal Chemistry* **89**, 189–197.
- Wake, K., Yamazaki, H., Hanzawa, S., Konno, R., Sakio, H., Niwa, A., Hori, Y. (2001): Exaggerated responses to chronic nociceptive stimuli and enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *Neuroscience Letters* **297**, 25–28.
- Wang, H., Wolosker, H., Pevsner, J., Snyder, S. H. (2000): Regulation of rat magnocellular neurosecretory system by D-aspartate: evidence for biological role(s) of a naturally occurring free D-amino acid in mammals. *The Journal of Endocrinology* **167**, 247–252.

- Wang, H., Wolosker, H., Morris, J. F., Pevsner, J., Snyder, S. H., Selkoe, D. J. (2002): Naturally occurring free D-aspartate is a nuclear component of cells in the mammalian hypothalamo-neurohypophyseal system. *Neuroscience* **109**, 1–4.
- Watanabe, M., Yoshikawa, M., Takeyama, K., Hashimoto, A., Kobayashi, H., Suzuki, T. (2010): Subchronic administration of ketamine decreases the mRNA expression of serine racemase in rat brain. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* **35**, 137–143.
- Weil, Z. M., Huang, A. S., Beigneux, A., Kim, P. M., Molliver, M. E., Blackshaw, S. (2006): Behavioural alterations in male mice lacking the gene for D-aspartate oxidase. *Behavioural Brain Research* **171**, 295–302.
- Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S. H. (1999b): Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13409–13414.
- Wolosker, H., D'Aniello, A., Snyder, S. H. (2000): D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: Ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience* **100**, 183–189.
- Wolosker, H. (2011): Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1814**, 1558–1566.
- Wolosker, H., Sheth, K. N., Takahashi, M., Mothet, J. P., Brady, R. O., Ferris, C. D., Snyder, S. H. (1999a): Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 721–725.
- Yamasaki, M., Yamada, K., Furuya, S., Mitoma, J., Hirabayashi, Y., Watanabe, M. (2001): 3-phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *The Journal of Neuroscience* **21**, 7691–7704.
- Yang, J. H., Wada, A., Yoshida, K., Miyoshi, Y., Sayano, T., Esaki, K., Kinoshita, M. O., Tomonaga, S., Azuma, N., Watanabe, M., Hamase, K., Zaitso, K., MacHida, T., Messing, A., Itohara, S., Hirabayashi, Y., Furuya, S. (2010): Brain-specific Phgdh deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 41380–41390.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, Ch., Poo, M., Duan, S. (2003): Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15194–15199.
- Yasuda, E., Ma, N., Semba, R. (2001): Immunohistochemical evidences for localization and production of D-serine in some neurons in the rat brain. *Neurosciences Letters* **299**, 162–164.
- Yoshikawa, M., Takayasu, N., Hashimoto, A., Sato, Y., Tamaki, R., Tsukamoto, H., Kobayashi, H., Noda, S. (2007): The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons. *Archives of Histology and Cytology* **70**, 127–134.
- Zaar, K. Köst, H.-P., Schad, A., Völkl, A., Baumgart, E., Fahimi, H. D. (2002): Cellular and subcellular distribution of D-aspartate oxidase in human and rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* **450**, 272–282.