

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



## **Role D-serinu ve schizofrenii**

*Bakalářská práce*

*Biochemie*

**Alena Randáková**

Školitel: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

*Praha 2006*

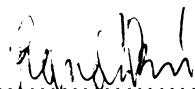
## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za podporu, ochotu a motivaci k práci. Za odborné vedení, trpělivost a přínosné rady děkuji Mgr. Janě Jiráskové. Děkuji také MUDr. Janě Peichlové za cenné připomínky z oblasti psychiatrie a Doc. MUDr. Františku Šťastnému, CSc. za umožnění spolupráce na projektu.

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Jana Konvalinky, Csc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 5. 6. 2006

  
.....

# Obsah

A. Úvod.....	3
B. Cíl práce.....	4
C. Teoretická část.....	5
1. Schizofrenie.....	5
1.1 Charakteristiky onemocnění.....	5
1.2 Léčba schizofrenie.....	7
1.3 Neurochemické hypotézy.....	9
1.3.1 Dopamin, serotonin a jejich receptory.....	10
2. NMDA receptory (NMDAr).....	11
2.1 Definice.....	11
2.2 Rozdělení.....	11
2.3 Charakteristika receptorů.....	12
2.4 Aktivace.....	15
3. D-serin.....	16
3.1 Biologická funkce .....	16
3.2 Biosyntéza.....	16
3.3 Biodegradace .....	19
3.4 Lokalizace.....	20
3.4.1 Distribuce v mozku .....	21
3.4.2 Distribuce D-serinu v krysím mozku během postnatálního vývoje.....	22
3.4.3 Metody použité ke stanovení distribuce D-serinu.....	23
3.5 Uvolňování a absorpce.....	23
3.6 Toxicita.....	24
3.7 Srovnání D-serinu s glycinem.....	25

4.	D-serin a Schizofrenie.....	26
4.1	Hypofunkce NMDA receptorů.....	26
4.2	Hladiny D-serinu při schizofrenii.....	27
4.3	Terapie prostřednictvím ovlivnění glycinového místa.....	28
4.4	Genetické souvislosti SR a DAAO se schizofrenií.....	29
D.	Praktická část .....	30
5.	Materiály a přístroje.....	30
5.1	Chemikálie.....	30
5.2	Přístroje.....	31
5.3	Vzorky.....	31
6.	Metody .....	32
6.1	Homogenizace tkáně.....	32
6.2	Stanovení koncentrace proteinů.....	32
6.3	Měření aktivity serin racemasy.....	32
6.4	Dialýza.....	33
6.5	Vertikální elektroforéza (SDS-PAGE ).....	34
6.6	Přenos proteinů na membránu (Western blot).....	35
7.	Výsledky a diskuse.....	36
7.1	Homogenizace a lyze buněk.....	36
7.1.1	Stanovení koncentrace proteinů.....	36
7.2	Stanovení aktivity serin racemasy.....	36
7.3	Potvrzení přítomnosti serin racemasy technikou western blot.....	42
8.	Závěr praktické části.....	45
E.	Shrnutí.....	47
F.	Literatura .....	48

## Úvod

Schizofrenie má navzdory dlouholetému výzkumu stále nejasný původ a patofyziologii /8/. Jedná se o komplexní chorobu nebo dokonce skupinu příbuzných onemocnění /10/ a je nepravděpodobné, že by mohla být přičítána pouze jednomu původci nebo genetické mutaci /3/.

S patofyziologií schizofrenie bývá spojována hypofunkce NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptorů pro glutamát. Tato hypotéza byla formulována na základě pozorování, že látky jako PCP (fencyklidin) či ketamin, blokující NMDA receptory, navozují stavy odpovídající symptomům schizofrenie, a že aktivací těchto receptorů skrze glycinové místo dochází k potlačení příznaků /28/.

Jako agonista glycinového místa působí také D-serin /7/. Studie zabývající se možným vlivem D-serinu ve schizofrenii prokázaly u pacientů dysregulaci metabolismu D-serinu. Zdá se, že tyto změny mohou být alespoň z části základem patofyziologie schizofrenie (Hashimoto a spol. 2004) /2,16/. Propojení D-serinu a schizofrenie naznačuje například pokles jeho hladiny v krevním séru a mozkomíšním moku u schizofrenních pacientů /2,43/. Byla publikována studie ukazující pokles hladiny D-serinu také v mozkové tkáni /37/.

Prokazatelný genetický základ schizofrenie vedl ke studiu případného genetického propojení enzymů syntézy (serin racemasa, SR) a degradace (oxidasa D-aminokyselin, DAAO) D-serinu s touto chorobou. Ukázalo se, že SR interaguje s proteinem PICK1 (protein interagující s kinasou C), a změny v genu pro PICK1 pravděpodobně souvisejí se schizofrenií /43/. Spojení schizofrenie a DAAO bylo prokázáno po identifikaci bodových mutací v genu pro protein označený G72, který, jak se ukázalo, aktivuje DAAO /3/.

D-serin byl jako modulátor NMDA receptorů identifikován teprve nedávno. Také proto jsou výsledky studií zabývající se rolí D-serinu a jeho metabolismu ve schizofrenii nové (od roku 2004) a přinášejí mnoho otázek.

Tato kompilační práce shrnuje dosavadní výsledky studií, se snahou zaplnit prázdná místa mezi novými a již známými fakty.

## **Cíl práce**

Cílem této práce je shrnout poznatky týkající se role D-serinu a jeho metabolismu ve schizofrenii. Praktická část je zaměřena na optimalizaci metodik potvrzení přítomnosti a stanovení aktivity serin racemasy, enzymu syntézy D-serinu, v autoptické tkáni lidského hipokampu.

# Teoretická část

## 1. Schizofrenie

### 1.1 Charakteristiky onemocnění

Název schizofrenie pochází z řeckého schizein, znamenající rozštěpit nebo rozdělit a frén, což znamená mysl /40/. Schizofrenie je psychická porucha, dosud nejasného původu /35/ a patofyziologie /8/, která se projevuje poruchami myšlení, jednání, vnímání, emocí a vůle /35/. Jedná se v podstatě o soubor příznaků, neboli syndrom /24/. Hovoří se také o skupině schizofrenií /35/.

Schizofrenie je onemocnění postihující asi 1 % celosvětové populace /24,35,8/. Objevuje se obvykle mezi 16. a 25. rokem života /35,38/, a to o něco dříve u mužů než u žen /38/. Nástup je buď plíživý nebo akutní /44/. Průběh schizofrenie může být navzdory medikaci chronický, bez přechodného zlepšení /8/, nebo probíhá nárazově, a to s narůstajícím nebo stabilním defektem, popřípadě s částečnou či úplnou remisí /35/.

Symptomy schizofrenie lze rozdělit do tří skupin, které se obvykle vyskytují společně, přičemž jedna může převládat /8/.

- **Pozitivní symptomy** (např. halucinace, bludy)
- **Kognitivní poruchy** (např. poruchy pozornosti, pracovní paměti, motivace)
- **Negativní symptomy** (např. sociální stažení, nezáměr, emoční oploštělost)

/38,35/

Přestože přesný původ schizofrenie není znám, předpokládá se její multifaktoriální základ /35,8/. Nejsilnějším faktorem se zdá být genetická predispozice /8/, jelikož riziko výskytu schizofrenie je výrazně zvýšeno u příbuzných osob /35,8/.

### Pravděpodobnost rozvoje schizofrenie

cca **13 %** - děti pacienta se schizofrenií

**10 %** - osoby se schizofrenním sourozencem

**48 %** - děti dvou schizofrenních rodičů

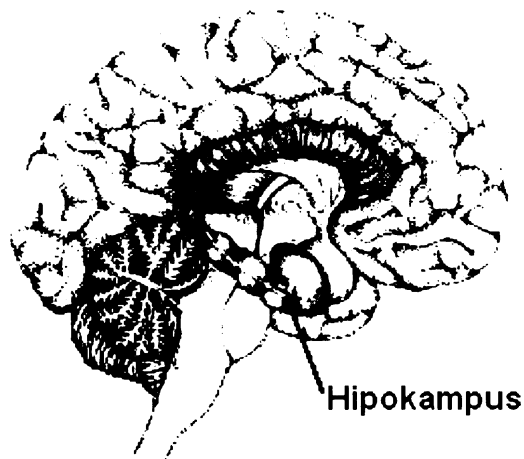
**35 - 58 %** - monozygotní dvojčata

**9 - 27 %** - heterozygotní dvojčata /35/



Jako další významný rizikový faktor bývá považována porucha nitroděložního vývoje mozku, popřípadě jeho poškození při porodu /24,8/, pravděpodobně v důsledku porodní hypoxie ( McNeil, 1988; Cannon, 1998) /44/. Zajímavá jsou pozorování, že výskyt schizofrenie bývá častější u lidí narozených v zimním období /24,8/. Dále je diskutován vliv infekčních faktorů, toxinů a psychosociální zátěže /40/.

Bylo zjištěno, že schizofrenii doprovázejí anatomické i funkční změny mozku, postihující jak mozkovou kůru, tak vnitřní oblasti mozku /24/. V řadě studií byly potvrzeny anatomické abnormality zahrnující komorové (ventrikulární) zvětšení a pokles mozkového ( korového a hipokampálního obr. 1) objemu /36/.



Obrázek 1: Hipokampus – obloučkový závit ve spodní části mozku, součást limbického systému /9/.

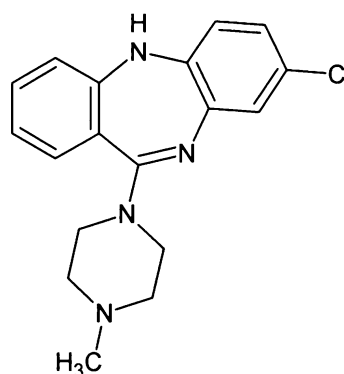
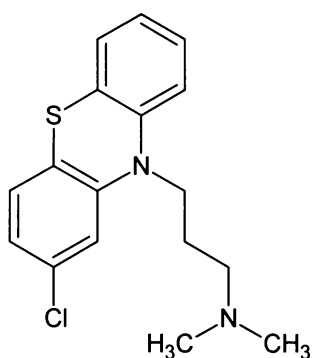
([www.memorylossonline.com/.../hippocampus.html](http://www.memorylossonline.com/.../hippocampus.html))

Pokles mozkového objemu je vysvětlován zmenšením neuronů a neuronálních sítí /38/. Obě tyto abnormality byly zastoupeny i v případech tzv. prvních epizod schizofrenie, což by mohlo vylučovat jejich přítomnost jako následků chronické choroby nebo léčby /38/. Navíc zvětšené komory a menší temporální lalok byly pozorovány u dospívajících a mladých dospělých jedinců s vysokou genetickou predispozicí ke schizofrenii, což naznačuje, že mozková patologie předchází nástupu nemoci /38/. Na druhou stranu nedávné studie poukazují na zvětšení komor a korovou redukci jako důsledek léčby haloperidolem (neuroleptikum – tabulka 1; str. 12) /8/.

Diagnostika schizofrenie je založena na podrobném klinickém vyšetření a získání anamnestických údajů a může být často velmi komplikovaná. Kritéria pro schizofrenii vycházejí z klasifikačního systému („International Classification of Disease“, **ICD 10**, podle Světové zdravotnické organizace) nebo **DSM-IV** („Diagnostic and Statistical Manual“, podle Americké psychiatrické asociace) /35/.

## 1.2 Léčba schizofrenie

Léčba schizofrenie je v dnešní době založena především na farmakoterapii pomocí antipsychotik (neuroleptik) a případně na podpůrné psychoterapii /35,27/. Ještě na počátku třicátých let dvacátého století byla léčba schizofrenie založena pouze na spekulativních procedurách jako umělé vyvolávání horečky, odnímání nadledvin či vasektomie (chirurgické přetětí a podvázání chámovodů) /9/. V padesátých letech bylo objeveno první efektivní, selektivní, orální antipsychotikum, chlorpromazin (obr. 2a), a to bez známého mechanismu působení. Jeho pozdější určení, tedy blokáda dopaminergních receptorů, umožnila rozvoj dalších efektivních antidopaminergních látek /8/, tzv. klasických antipsychotik /10/ (tab. 1, str. 12). Tento typ antipsychotik je široce používán proti pozitivním příznakům schizofrenie, nicméně proti negativním příznakům a kognitivním poruchám je neúčinný /10/. Také bylo zjištěno, že vyvolávají efekty podobné parkinsonizmu, tzv. extrapyramidové příznaky (svalová ztuhlost, neklid, třes) /35,10/.



Obrázek 2: Strukturní vzorce

a) chlorpromazin

b) klozapin

(<http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/neuroleptics.htm>)

Od počátku 90. let se používají tzv. atypická antipsychotika, neboli antipsychotika 2. generace, které již nepůsobí polékovou ztuhlost (viz. extrapyramidové příznaky) /35/. Jedním z představitelů této skupiny je klozapin (obr. 2b, str. 11), který byl objeven již v 70. letech, ale po zjištění, že indukuje agranulocytózu (pokles počtu až vymizení granulocytů v krvi /9/) se od něj na čas ustoupilo /10/. Díky svému unikátnímu působení byl však znovu uveden za podmínek přísného krevního monitorování/10/.

Klozapin působí nejen proti pozitivním příznakům schizofrenie mechanismem blokády dopaminergních receptorů, charakteristickým pro klasická antipsychotika, ale je účinný i na některé negativní příznaky /10/. Je vhodný pro pacienty rezistentní na léčbu klasickými antipsychotiky. Působení klozapinu na negativní symptomy není ještě zcela objasněno. Ví se však, že funguje jako blokátor 5-HT<sub>2</sub> (5-hydroxytryptamin 2) podtypu serotoninergních receptorů, a to s podstatně větší afinitou než k dopaminovým receptorům. Také funguje jako blokátor  $\alpha$ -adrenergních, muscarinových, cholinergních a histaminových H-1 receptorů /10/. Uvažován je i jeho vliv na NMDA receptory pro glutamát /25/ (viz. kapitola 4.2).

Látky vytvořené na základě znalostí o funkčním profilu klozapinu patří do 2. generace antipsychotik (tab. 1) a jsou dnes používány v převaze /10/. Mezi nejpoužívanější patří risperidon, ziprasidon a olanzapin, které nepoškozují krve tvorbu jako klozapin /24/.

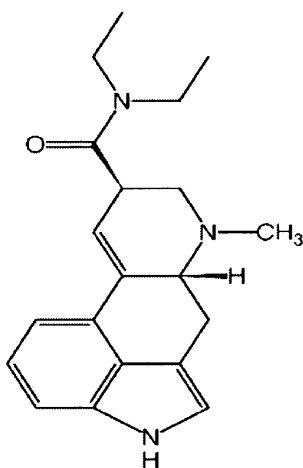
<b>Klasická antipsychotika</b>	chlorpromazin, chlorprotixen, levopromazin, periciazin, thioridazin, droperidol, flupentixol, fluphenazin, fluspirilen, haloperidol, melperon, oxyprothepin, penfluridol, perphenazin, pimozid, prochlorperazin, trifluoperazin
<b>Atypická antipsychotika</b>	klozapin, amisulprid, sulpirid, olanzapin, quetiapin, risperidon, ziprasidon, sertindol, zotepin

Tabulka 1: Přehled antipsychotik 1. a 2. generace

### 1.3 Neurochemické hypotézy

Účinky působení psychofarmak naznačují neurochemický základ schizofrenie /35/. Dominantní je **dopaminová** hypotéza /26/, podle které souvisí některé příznaky schizofrenie s dopaminergní hyperaktivitou v mozku /35,38,8/, zahrnující nadměrnou tvorbou dopaminu nebo zvýšenou citlivost /24/, případně počet dopaminergních D2 receptorů /35,38/ (viz. 1.4). Tato hypotéza se opírá hlavně o to, že látkami uvolňujícími dopamin, jako je například amfetamin nebo meskalin, lze aktivovat paranoidní psychózy /35,38,8/ a dále o příznivý účinek klasických neuroleptik jako blokátorů D2 dopaminergních receptorů /26,38,8/. Tato hypotéza ovšem nevysvětluje skutečnost, že příznaky spadající do oblasti negativních symptomů a kognitivních poruch nereagují na vliv antidopaminergních léků /24,26/.

V důsledku objevení antipsychotik 2. generace ovlivňujících kromě dopaminergního i serotoninergní systém, a zjištění, že agonista 5-HT<sub>2</sub> (5-hydroxytryptamin 2) receptoru LSD (diethylamid kyseliny lysergové) (obr. 3), vyvolává příznaky psychóz, vyvstala nová **serotoninová** neurochemická hypotéza schizofrenie /8,24,38/. I látky mající afinitu jen k 5-HT<sub>2</sub> receptorům a chovající se jako jejich antagonisté působí antipsychoticky /8/. Mozkové studie post mortem však nenašly patologické změny serotoninergního systému ve schizofrenii /8/.



Obrázek 3: Strukturální vzorec LSD (<http://www.badtekk.wz.cz/halucinogeny.html#21>)

Novou alternativní neurochemickou hypotézou příčin schizofrenie je **glutamátová** hypotéza vycházející z hypofunkce NMDA receptorů pro glutamát. Tato hypotéza vede k novému směru v léčbě schizofrenních příznaků prostřednictvím aktivace těchto receptorů skrze koagonistické glycinové místo, nazývané také GlyB místo. Agonistou tohoto místa je kromě glycinu podle nedávných zjištění také D-serin /10,17/ (podrobněji kapitola 4.1).

### 1.3.1 Dopamin, serotonin a jejich receptory

Dopamin a serotonin zastávají v organismu funkci neurotransmiterů. Dopaminergní receptory jsou zastoupeny v celé nervové soustavě /49/. Jsou děleny do 5 podtypů (D1-5). Dopamin vzniká v mozku přirozeně. Jeho prekurzorem je aminokyselina tyrosin /50/. Dopamin hraje důležitou roli zejména v motivačním chování.

Serotonin se v centrálním nervovém systému vyskytuje v menší míře. Ovlivňuje serotoninergní systém, který tvoří neurony v prodloužené míše, mostu, středním mozku a mezimozku /24/. Tento systém udržuje optimální hladinu serotoninu syntézou z L-tryptofanu /50/. Neurony se serotoninergními receptory se vyskytují také v limbickém systému a v některých částech mozkové kůry /24/. V centrálním nervovém systému se serotonin účastní především procesů souvisejících se vznikem nálad. Jeho nedostatek způsobuje snížení přenosu nervových vzruchů, způsobuje tak změny nálady, depresi, případně poruchy spánku, podrážděnost až agresivitu /34/. Velký počet různých druhů serotoninových receptorů (5-HT<sub>1A-F</sub>, 5-HT<sub>2A-C</sub>, 5-HT<sub>3,4</sub>, 5-HT<sub>5A-B</sub>, 5-HT<sub>6,7</sub>) /50/ ukazuje, že účinek serotoninu může být různý podle toho, ve kterém místě a jaký receptor obsadí /24/.

## **2. NMDA receptory (NMDAr)**

### **2.1 Definice**

NMDA receptory jsou jedny z nejdůležitějších excitačních synaptických receptorů v CNS. Patří mezi ionotropní receptory (receptory spojené s iontovými kanály) pro glutamát /42/.

### **2.2 Rozdělení**

Ionotropní glutamátové receptory bývají klasifikovány do 3 hlavních podtypů podle specifických selektivních agonistů /7,9,6/

#### **▫ AMPA receptory**

*agonista:*  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát

*podjednotkové složení:* GluR1-GluR4

#### **▫ KA receptory**

*agonista:* kainát (2-karboxy-4-(5-karboxy-1-methyl-1,3-hexadienyl)-3-pyrrolidin-  
octová kyselina)

*podjednotkové složení:* GluR5-GluR7, KA1,KA2

#### **▫ NMDA receptory**

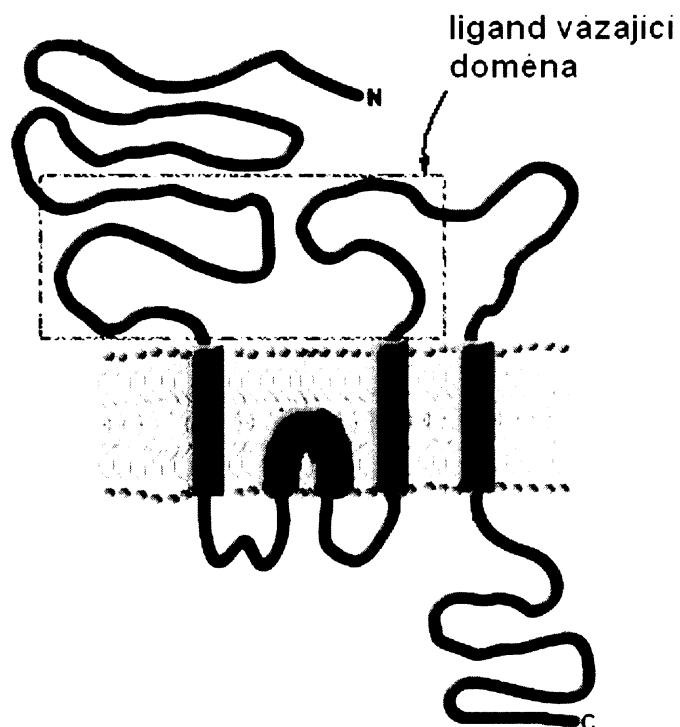
*agonista:* N-metyl-D-aspartát

*podjednotkové složení:* NR1, NR2A-NR2D, NR3A

AMPA a KA receptory se také někdy nazývají non-NMDA receptory /42,28/.

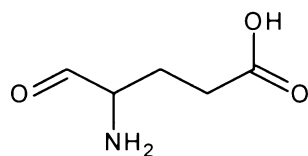
### 2.3 Charakteristika NMDA receptorů (NMDAr)

NMDAr jsou heteromerní tetramery (heterotetramery), sestavené ze dvou NR1 podjednotek (obr. 4), dvou NR2 A-D podjednotek /34/, případně třetího typu podjednotky NR3A /6/.

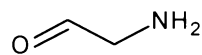


Obrázek 4: Struktura NR1 podjednotky NMDA receptoru (TMI-IV =trans membránové domény)  
([www.bris.ac.uk/depts/synaptic/info/glutamate.html#top](http://www.bris.ac.uk/depts/synaptic/info/glutamate.html#top))

NR1 podjednotka NMDAr obsahuje vazebné místo (GlyB) pro koagonistu, kterým je glycinát (obr. 4 a 6; str. 17) a NR2 podjednotka nese vazebné místo pro endogenního agonistu glutamát (obr. 5a) nebo pro specifického agonistu NMDA /6,42/.



a) Glutamát



b) Glycin

Obrázek 5: Strukturální vzorce ligandů NMDA receptorů

NMDAr jsou přísně regulované iontové kanály, které požadují pro svou aktivaci ligandy (obr. 5, str. 12), navázané do obou vazebných míst (glutamátového + glycinového) /7/. Na synaptických membránách krysího mozku bylo pozorováno, že koagonistické působení zvyšuje vázání glutamátu změnou afinity glutamátového místa /7/. Nutnost stimulace NMDA dvěma endogenními neurotransmitery by mohla sloužit jako určitý ochranný mechanismus proti neurotoxicitě spojené s nadměrnou stimulací NMDAr glutamátem /6/.

Do agonistického vazebného místa pro glutamát se váže s velkou afinitou i D-aspartát a do glycinového místa také D-serin /7/ nebo D-alanin /28/.

Byla studována schopnost aktivace NMDA receptorů přes GlyB místo různými agonisty a jejich analogy.

Podle klesající afinity byly agonisté seřazeny takto:

ACPC (1-aminocyklopropankarboxylová kys) >**glycin = D-serin >D-alanin** >  $\beta$ -fluoro-D-alanin > D-cykloserin > L-serin > L-alanin.

D-serin je zde srovnatelný s glycinem /7/. V některých studiích autoři došli k odlišným výsledkům, kdy dosahoval D-serin třikrát vyšší účinnosti v aktivaci GlyB místa než glycin. Předpokládá se, že záleží na kombinaci podjednotek NMDAr /41/.

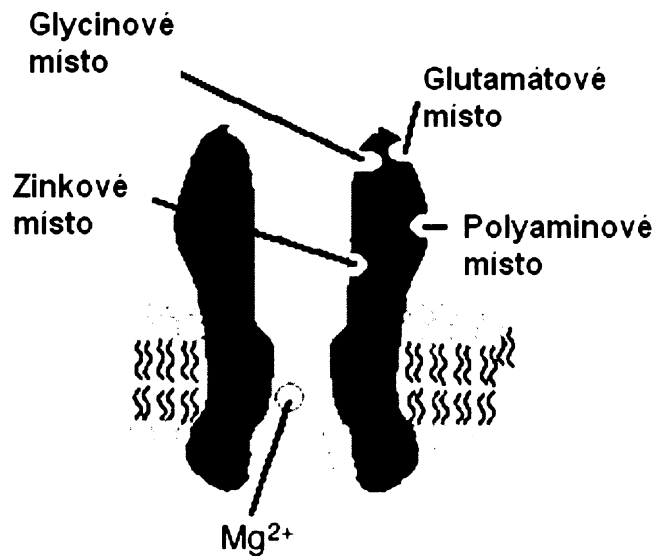
Důkazem o regulaci aktivity NMDAr endogenním D-serinem je pokles jejich aktivity v krysích hipokampech (hipokampální řez) a v kulturách hipokampálních buněk po odstranění D-serinu pomocí DAAO (oxidasa D-aminokyselin) (viz kapitola 3.3), a opětovné zvýšení aktivity po přidání exogenního D-serinu /6/.

NMDA receptory obsahují řadu dalších regulačních míst (obr. 6, str. 14) jako:

- místo pro  $Mg^{2+}$ , které blokuje iontový kanál NMDAr při klidovém membránovém potenciálu
- místo pro  $Zn^{2+}$ , který působí inhibičně
- místo pro polyamidy

/7/





Obrázek 6 : Vazebná místa NMDA receptoru

(upraveno z : <http://bioscience.mirror.ac.cn/1998/v3/e/magnusso/e70-80.htm>)

Aktivita NMDA receptorů je také modulována změnami pH. Pod fyziologickým pH je aktivita inhibována /34/.

Vlastnosti NMDA receptorů se mění v závislosti na kompozici podjednotek /6/. Je to patrné zejména v deaktivační kinetice ( např. u komplexu NR1/NR2A je čas deaktivace otázkou milisekund, zatímco v uspořádání NR1/NR2D to trvá až několik sekund /42/.

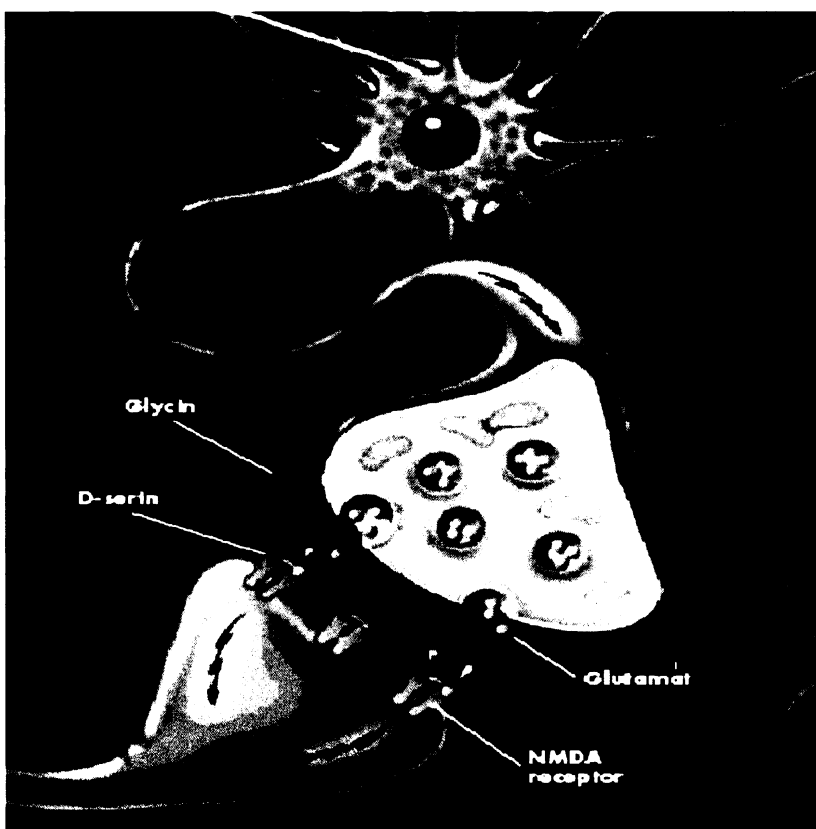
Třetí podjednotka NMDAr (NR3A) může asociovat s komplexy NR1/NR2 /6/. Pokud se NR3A zkombinuje s NR1 podjednotkou, vzniká unikátní receptor, který je excitován glycinem a inhibován D-serinem /42/, aniž by byl ovlivňován glutamátem nebo NMDA /6/.

Řada imunohistochemických studií ukazuje, že podjednotka NR1 je exprimována téměř ve všech neuronálních buňkách CNS, zatímco NR2A-D podjednotky vykazují různou expresi v závislosti na stádiu vývoje a oblasti CNS. Předpokládá se, že je to důvod funkční heterogenity NMDA receptorů /7/.

NMDA receptory se podílejí na řadě fyziologických procesů, například umožňují dlouhodobou indukci potenciace, což vede k dlouhodobé synaptické plasticitě, která může sloužit jako buněčný mechanismus spojený s učením a pamětí /6/. NMDAr jsou spjaty také s patologickými fenomény jako je např. neurotoxicita nebo neurodegenerace /6/.

## 2.4 Aktivace

Glutamát je uvolňován z presynaptických neuronů. Studie ukazují, že uvolnění D-serinu do synapse může být regulováno glutamátem přes non-NMDA receptory na astrocytech (podrobněji kapitola 3.5) /6/. D-serin je uvolňován do synaptického prostoru, kde interaguje s NMDAr, navázáním se do GlyB místa a dovoluje tak glutamátu, vázajícímu se do glutamátového místa NMDAr, otevřít kanál pro ionty /6/ (obr. 7). Dojde tak k depolarizaci membrány a vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky, což vede k několika možným intracelulárním odpovědím.  $\text{Ca}^{2+}$  je totiž klíčovým druhým poslem, který spouští v buňce řadu kaskádovitých dějů, například aktivaci guanylát cyklázy /7/ s následnou produkcí cGMP /28/.



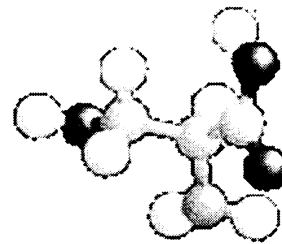
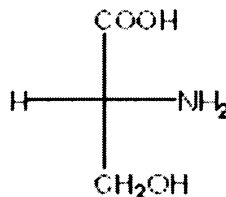
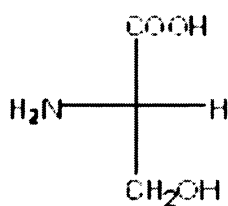
Obrázek 7: Aktivace NMDA receptorů

([http://web.sfn.org/content/Publications/BrainBriefings/sch\\_cog.html](http://web.sfn.org/content/Publications/BrainBriefings/sch_cog.html))

### 3. D-serin

#### 3.1 Biologická funkce

Fyziologická funkce D-serinu spočívá v tom, že se podílí na aktivaci NMDA receptorů na glycinovém místě GlyB. V aktivaci je působení D-serinu výrazně účinnější oproti L-formě (obr. 8). Téměř výhradně působí jako aktivátor, ale v určité podjednotkové kombinaci NMDAR má D-serin také inhibiční účinky (podrobněji kapitola 2.3). Funkční spojení s NMDA receptory potvrzuje i shodná distribuce D-serinu a NMDAR v mozku ( podrobněji kapitola 3.4) /28/. D-serin by se tak prostřednictvím NMDA receptorů mohl podílet na tvorbě neurálních drah v určité růstové fázi nebo během oprav nervových spojení. Tento předpoklad je založen na pozorování, že D-serin zvyšuje migraci granulárních buněk /28/.



Obrázek 8: a) L-serin;

b) D-serin

c) D-serin (3D)

#### 3.2 Biosyntéza

Nedávné zjištění, že D-serin působí jako ligand glycinového místa NMDA receptorů pro glutamát /3/ (viz. kapitola 2.3), vedlo k hledání způsobu jeho vzniku v mozku.

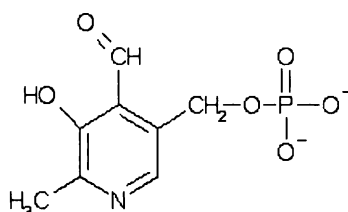
Bylo zjištěno, že podíl D-serinu ze stravy je minimální /31/. Vyvrácena byla i teorie o vlivu gastrointestinálních bakterií /7/. Další diskutovanou možností bylo uvolňování D-serinu z metabolicky stabilních proteinů po jejich racemizaci. K racemizaci zde však dochází až s časem, tudíž je tato možnost v rozporu s faktem, že vysoké hladiny D-serinu byly stanoveny již v časném stádiu vývoje.

Z důvodu omezeného průniku hematoencefalickou bariérou mozku a nedostačnou hladinou D-serinu v séru je vyvrácen jeho původ z vnějšího prostředí /6,7/.

Původ D-serinu byl objasněn až po objevení specifického enzymu serin racemasy. D-serin vzniká racemizací L-serinu, katalyzovanou serin racemasou /1,30/.

### Serin racemasa:

Serin racemasa (SR) je exprimována hlavně v mozku (v cytoplasmě astrocytů /6/ a podle nedávných pozorování i v neuronech /15/), méně pak v játrech a jiných periferních orgánech /6/. Katalyzuje přímou přeměnu substrátu L-serinu na D-serin a naopak (racemizační aktivita). Přeměna D-serinu na L-serin je charakterizována vyššími hodnotami kinetických parametrů  $K_M$  (Michaelisova konstanta) a  $k_{cat}$  (konstanta katalýzy). Důkazem této fyziologické syntézy D-serinu je korelace lokalizace D-serinu a serin racemasy /6/. Serin racemasa je pyridoxal-5'-fosfát (PLP) (obr. 9) dependentní enzym.



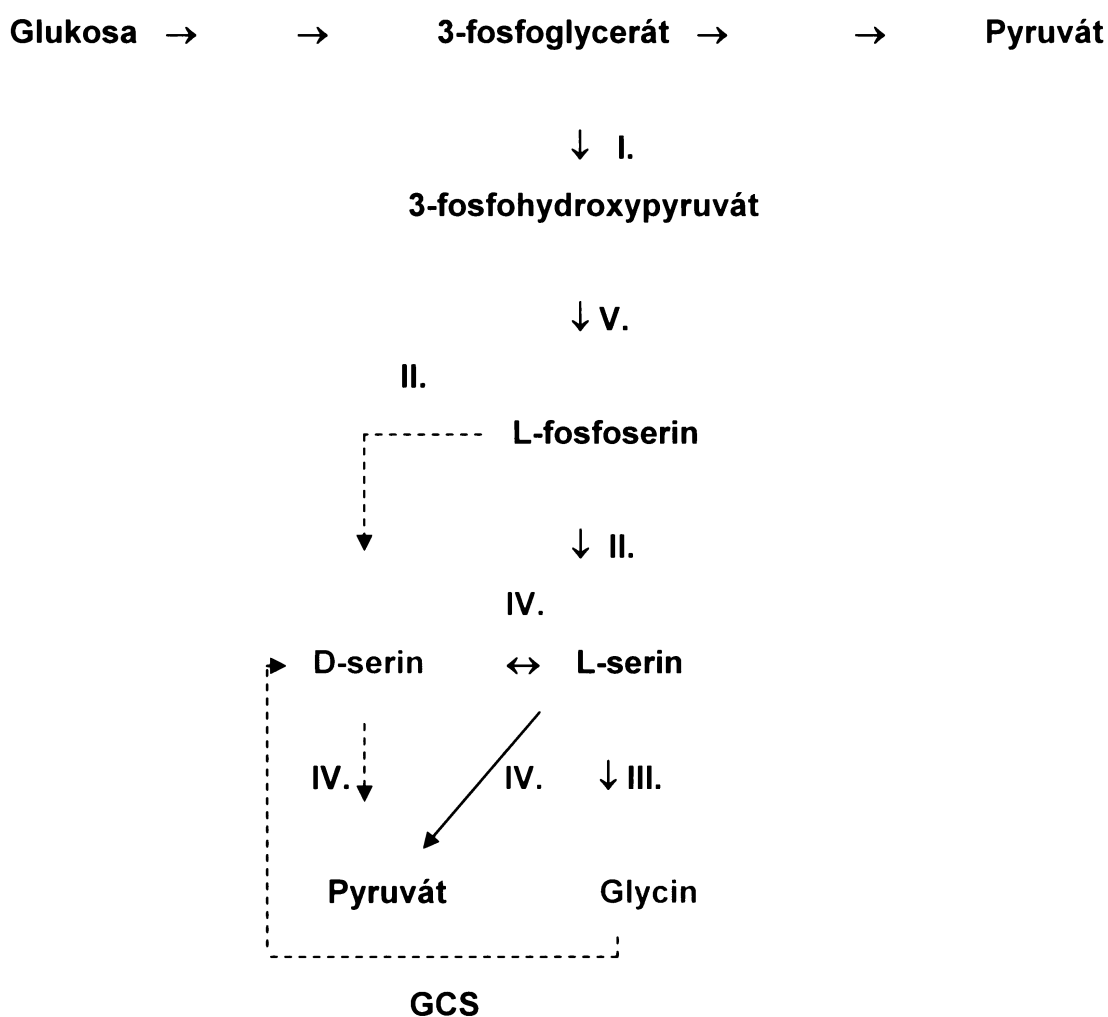
Obrázek 9: Strukturální vzorec PLP

SR je tvořena 340 aminokyselinami a v roztoku tvoří nekovalentní homodimery a tetramery, přičemž velikost monomeru odpovídá 37 kDa. Pro aktivaci potřebuje mít SR k dispozici dvojjazvé kationty ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  nebo  $Mn^{2+}$ ). Jako allosterické aktivátory SR působí ATP, v menší míře také ADP, GTP a další NTP /1,5/. (informace z výzkumu *in vitro*)

Serin racemasa je podle nedávných zjištění bifunkční enzym, který kromě racemizace L-serinu katalyzuje ještě jeho přeměnu na pyruvát. V druhém případě se jedná o tzv.  $\beta$ -eliminaci aktivitu. D-serin je eliminován s mnohem menší účinností. Obě aktivity SR jsou srovnatelné, co se týče kinetických parametrů  $k_{cat}$  a  $K_M$  /1,5/. Obě vykazují alkalické pH optimum, což je typické pro racemasy aminokyselin závislé na pyridoxalfosfátu. Pod pH 6,5 jsou enzymové aktivity SR

zanedbatelné, jelikož dochází k precipitaci enzymu. Maximálních aktivit in vitro dosahuje serin racemasa v rozmezí pH 8-9 /1,5/. Racemizační aktivita je specifická pro serin, kdežto  $\beta$ -eliminační aktivita má širší specifitu pro L-aminokyseliny s vhodnou (elektronegativní) odstupující skupinou na  $\beta$ -uhlíku a vzájemnou orientací  $\alpha$ -karboxylu a odstupující skupiny, např. L-serin-O-sulfát nebo L-threo-3-hydroxy-aspartát /5/. Z inhibičních analýz bylo zjištěno, že racemizační i  $\beta$ -eliminační aktivita SR sídlí v témž aktivním centru.

Metabolismus D-serinu je spojen s metabolismem glycinu /6/.



Prekurzorem pro syntézu serinu a následně pak glycinu je 3-fosfoglycerát, což je intermediát glykolýzy. Katalýzou I. (3-fosfoglycerát dehydrogenasa) a V. (fosfoserin transaminasa), vzniká L-fosfoserin a z něj katalýzou II. (3-fosfoserin-fosfatasa) vzniká L-serin.

L-serin může být převeden :

- Pomocí III. (serin hydroxymethyltransferasa SHMT) na glycin
- $\beta$ -eliminován IV. (serin racemasa, SR) na pyruvát a amoniak
- racemizován IV. (serin racemasa, SR) na D-serin

Zatím nevyvrácenou možností je biosyntéza D-serinu z L-fosfoserinu enzymem II. (3-fosfoserin-fosfatasa) v mozkových synaptosomech, nebo jeho tvorba z glycinu pomocí GCS (glycin štěpící systém) /6,46/. Teoretickou možností vzniku D-serinu by mohla být i přeměna L-serinu, katalyzována III. SHMT (serin hydroxymethyl-transferasa).

### 3.3 Biodegradace

Savčí D-aminokyseliny mohou být v těle metabolizovány pomocí flavoproteinu DAAO (EC 1.4.3.3, oxidasa D-aminokyselin) /6/. DAAO je FAD-dependentní oxidoreduktasa peroxizomálního původu. Lumen peroxizómů má alkalické pH, které je optimální pro enzymatickou aktivitu DAAO /3/

*průběh reakce:*



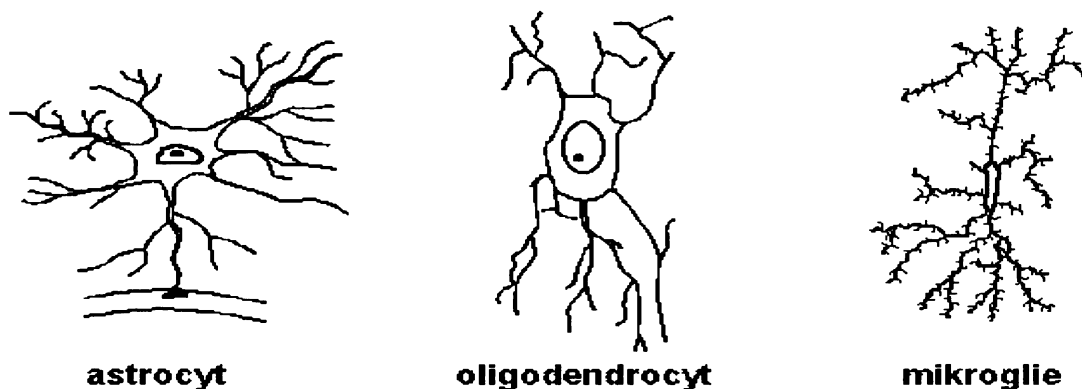
Účinek DAAO je in vivo omezen na metabolismus neutrálních D-aminokyselin, s vysokou afinitou k D-serinu, D-alaninu, D-prolinu, D-leucinu a D-methioninu. Exprese DAAO je nejvyšší v ledvinách, pak v játrech (výjimku tvoří myší játra, kde její exprese nebyla detekována) a v CNS /3/. V CNS je DAAO koncentrována v astrocytech zadního mozku, mozečku a v míše, kde udržuje hladinu D-serinu v nízkých hodnotách. Předpoklad o degradaci D-serinu prostřednictvím DAAO podporuje jejich inverzní kolokalizace v CNS /3/. V oblastech bohatých na D-serin, jako je oblast mozkové kůry, je hladina DAAO velice nízká. A naopak množství D-

serinu v předním a zadním mozku je v poměru asi 30 : 1. Naskytá se zde tedy otázka, jak je D-serin regulován právě v těchto oblastech /42/?

Při pokusech prováděných na mutantních knock-out myších (bez genu pro DAAO), byla pozorována dramaticky zvýšená hladina D-serinu v oblasti zadního mozku, zatímco hladina v předním mozku zůstala nezměněna /3/. Někteří autoři navrhují, že D-serin by mohl být přímo regulován serin racemasou, a to přeměnou na pyruvát /6/. Jiní autoři naopak ukazují, že ne D-serin ale pouze L-serin je serin racemasou deaminován /Stříšovský a spol. 2005/.

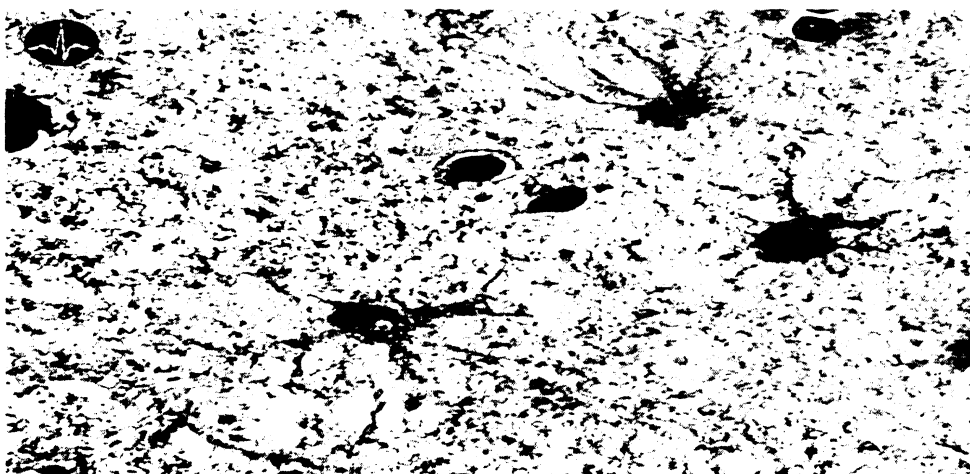
### **3.4 Lokalizace**

D-serin je téměř selektivně lokalizován v protoplazmatických astrocytech (obr. 11), podtypu gliových buněk (obr. 10), které opouzdřují nervová zakončení /6,30/. Podle některých studií založených na protilátkách rozpoznávajících specificky D-serin, byl D-serin detekován nejen v astrocytech, ale i v oligodendrocytech a buněčných tělech, dendritech a axonech neuronů /28,15/. Podle jiných studií se D-serin vyskytuje exkluzivně pouze v gliových buňkách /42/. Byla totiž zjištěna jeho kolokalizace s gliovým fibrilárním kyselým proteinem GFAP /42/.



Obrázek. 10: Typy gliových buněk

(<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/bp/1.4.htm>)



Obrázek 11: Protoplazmatické astrocyty v mozku; mozková kůra; zvětšení 400X; (protílátka proti S-proteinu; Imunohistochemie ABC)

lf3.cuni.cz/histoch/atlas

D-serin je distribuován hlavně v mozku. Nízká koncentrace byla zjištěna také v míše, periferních tkáních, krevním séru, slinách a v nedávné době také v sítnici různých obratlovců /6,28/. Obsah D-serinu byl zaznamenán také v moči. Jeho koncentrace se zde však rozchází podle různých studií /28,6/.

#### 3.4.1 Distribuce v krysím mozku

D-serin je v mozku, již v krátké době po narození (viz. níže), lokalizován nestejně. V nejvyšší míře byl detekován v předním mozku, v oblastech mozkové kůry, hipokampu, sluchovém centru a striatu (žíhané jádro, část bazálních ganglií). Poněkud nižší hladina byla zjištěna v limbické oblasti předního mozku, mezimozku a středního mozku. V prodloužené míše a mozečku bylo detekováno jen stopové množství D-serinu /28,6,7/. Obecně je přítomnost D-serinu hojná v regionech vysoké exprese NMDA receptorů, jako je například korová oblast předního mozku, zatímco méně nebo žádný D-serin se nachází v oblastech obsahujících DAAO (oxidasa D-aminokyselin), jako je například mozeček /42/. Distribuce D-serinu v předním mozku je úzce spjata speciálně s NR2 A/B podjednotkou NMDA receptorů (viz. kapitola 2) /7,6,41/. Kolokalizace zde byla také pozorována s distribucí glutamátu, PCP (fencyklidin), a zčásti i s mRNA pro R2B podjednotku NMDAr /28/. I v oblasti hipokampu CA1, kde je neurotransmise prostřednictvím NMDA receptorů prominentní, jsou astrocyty oboha-



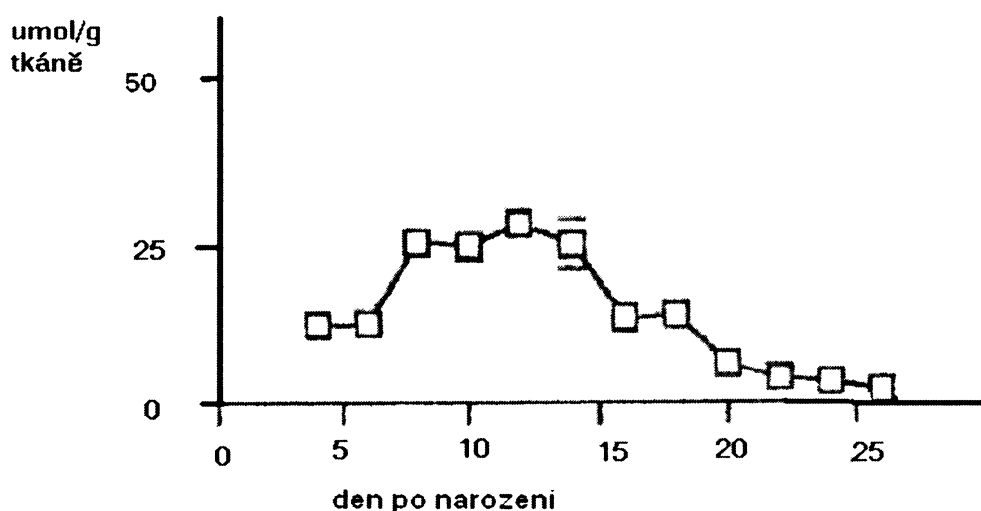
cené D-serinem v těsné blízkosti dendritů pyramidálních buněk, ve kterých jsou lokalizovány NR2 A/B podjednotky /41/. D-serin je také hojně zastoupen v síti vláken, kde protoplazmatické astrocyty obklopují krevní žíly /42/.

### 3.4.2 Distribuce D-serinu v krysím mozku během postnatálního vývoje

Distribuce D-serinu v mozku i periferních orgánech se výrazně mění během postnatálního vývoje. Zatímco těsně po narození (1. den) je hladina D-serinu ve všech oblastech mozku srovnatelná, později je nejvyšší v oblasti předního mozku. K rozvržení do vzoru dospělého mozku dojde u kryš zhruba za 3 týdny. Rozvojové změny se podobají distribuci mRNA pro R2B podjednotku NMDA receptoru /28/.

Zajímavé změny v distribuci D-serinu se odehrávají v mozečku (obr.12).

1. týden – dochází k vysokému nárůstu hladiny D-serinu
2. týden – dosažení maxima
3. týden – dramatický pokles až na stopovou hladinu



Obrázek 12: Distribuce D-serinu v mozečku v časném postnatálním období  
převzato a upraveno z /41/

Toto pozorování odpovídá rovněž dramatickému nárůstu aktivity DAAO (oxidasa D-aminokyselin) v mozečku /6,7/. Přejídný nárůst hladiny D-serinu v mozečku během časného postnatálního rozvoje vede k předpokladu, že by D-

serin v mozečku mohl hrát roli v rozšíření, diferenciaci a migraci tamních buněk. Řada studií tento předpoklad potvrzuje /7/. Co se týče poměru jednotlivých hladin, jako příklad může sloužit pozorování, že během 2. týdne postnatálního vývoje, je hladina D-serinu v mozečku (viz. obr. 12) srovnatelná s jeho hladinou v korové oblasti předního mozku u dospělého jedince /41/.

Distribuce D-serinu v periferních orgánech se v průběhu postnatálního vývoje také mění. Bylo pozorováno, že v prvních dnech po narození vykazují všechny periferní orgány poměrně značnou hladinu D-serinu, zatímco v pozdějším období klesnou na hladiny stopové až nulové /6/.

V klinických studiích bylo zjištěno, že již ve 14. týdnu prenatalního vývoje, je dosaženo vysoké koncentrace D-serinu v korové oblasti předního mozku, která zůstává téměř konstantní během dalšího embryonálního a časného post-embryonálního vývoje. Později poklesne asi na polovinu /6/.

### **3.4.3 Metody používané ke stanovení distribuce D-serin**

Účast volného D-serinu v CNS savců byla poprvé pozorována pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie /Hashimoto a spol. 1992/. Používá se hlavně imunohistochemických stanovení s použitím specifické protilátky pro D-serin /7,6,28/.

### **3.5 Uvolňování a absorpce**

U studií astrocytů in vitro bylo pozorováno zvýšené uvolňování D-serinu do extracelulárního prostoru po stimulaci AMPA a kainátem, agonisty tzv. non-NMDA receptorů pro glutamát (viz. kapitola 2.2). Naznačuje to tedy možnost glutamátem řízeného uvolňování D-serinu /42,28/.

Mikrodialyzační experimenty in vivo v krysím striatu (žíhané jádro, část bazálních ganglií) ukázaly naopak snížení extracelulárního D-serinu působením agonistů glutamátových receptorů KA a NMDA a působením veratridinu (depolarizační stimul). Tento fakt demonstruje glutamát dependentní vychytávání D-serinu po aktivaci NMDA, KA receptorů, nebo při depolarizaci membrány. AMPA receptory nebyly do studie zahrnuty /3/.

Pro neurotransmitery je stejně tak důležitý jejich přísně regulovaný přísun do synapse jako jejich pohotové odstraňování. To se děje dvěma základními

způsoby, buď přímým enzymatickým odbouráváním v synapsi, nebo zpětným vychytáváním do buněk. V Buňce bývá osud těchto molekul odlišný. Mohou se dále odbourávat nebo recyklovat. Jediný enzym, který prokazatelně odbourává D-serin je DAAO (oxidasa D-aminokyselin) a ta se v synapsi nenachází. Nabízí se tedy druhý způsob, zpětné vychytávání (reuptake). Na toto téma nebylo zatím publikováno mnoho prací, nicméně u gliových buněk typu C6 byla pozorována absorpční aktivita pro D-serin, nezávislá na sodíku /39/. To ukazuje na transportní systém neutrálních aminokyselin **asc1** (L-alanin, L-serin a L-cystein), ke kterému má afinitu i D-serin. Někteří autoři ale spekulují, že pro svoji širokou substrátovou specifitu se nejspíš nejedná o klíčový reuptake systém, a domnívají se, že existuje jiný, zatím neznámý, specifický pro D-serin /39/.

Studie na rekombinantně připravených ASCT1 a 2 (závislých na sodíku) ukazuje, že D-serin má afinitu k transportnímu systému ASCT2, který se ale nevyskytuje v mozku, a naopak žádnou afinitu k ASCT1 zastoupeném právě v mozku /39/.

Javitt a spol. popsali ještě další, na sodíku závislý transportní systém, který nepatří do rodiny ASCT systémů, protože nevykazuje afinitu k alaninu /39/.

### 3.6 Toxicita

Při pokusném podávání vysokých dávek D-serinu krysám bylo pozorováno jeho nefrotoxické působení. Po intravenózním podání <sup>14</sup>C-D-serinu byla zaznamenána jeho akumulace v ledvinách. Zjištěna byla i jeho reabsorpce v renální části recta /4,7/. Byla pozorována cytomegalie (nadměrné zvětšení) krysích nefronů. Dále je D-serin spojován s akutní nekrózou terminálních částí proximálních tubulů. Pozorované příznaky toxicity D-serinu jsou ztráta váhy, zvýšená produkce moči, a dále její kyselost (snížení pH) a přítomnost glukosy a bílkovin. Nefrotoxický účinek D-serinu má rychlý nástup a je reverzibilní /7/.

Jak bylo uvedeno výše, D-serin je degradován oxidázou D-aminokyselin DAAO, která odštěpuje z D-aminokyselin aminoskupinu za vzniku odpovídající oxokyseliny. Jako vedlejší produkt vzniká H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který může být příčinou poškození nefronů po podání D-serinu /4/.

### **3.7 Srovnání D-serinu s glycinem**

▫ *jako endogenních ligandů glycinového místa NMDA receptorů v savčím mozku*

**Vazebná selektivita:** Oba ligandy mají vysokou afinitu ke glycinovému místu NMDAR GlyB (glycinové vazebné místo necitlivé ke strychninu) a působí zde jako koaktivační mediátory /28/. Glycin má v CNS i další funkci. Funguje také jako inhibiční neurotransmitter /18/. Glycin působí jako inhibiční neurotransmitter přes tzv. GlyA (glycinové místo citlivé ke strychninu) jeho inhibičních receptorů /7/. D-serin afinitu ke GlyA nevykazuje /28/.

**Distribuce:** Glycin se nachází v celém CNS a periférii, ve velké množství v místech výskytu jeho inhibičních receptorů (oblast mozkového kmene, míchy a mozečku), kde může být řídicím ligandem /7/. Souvislost s distribucí glycinu a NMDA receptorů nebyla prokázána. D-serin je v mozku distribuován selektivně, a to především v předním mozku. Pozorována byla jeho kodistribuce s NR2A /7,6,41/ a NR2B podjednotkou NMDA receptorů /28,7,6,41/. D-serin byl pomocí imunohistochemických metod ve větší míře detekován v gliových buňkách než neuronech. U glycinu tomu bylo naopak /28/.

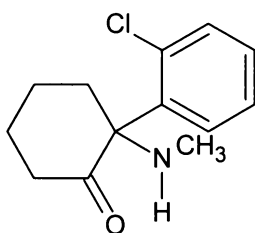
**Zpětný transport ze synapse:** Pro glycin existují dva typy transportérů GLYT1 a GLYT2 /28/. Pro D-serin byl nalezen specifický transporter (asc1), ale jeho účinnost je nízká (podrobněji kapitola 3.5) /28/.

**Terapeutická účinnost v kombinaci s typickými antipsychotiky na symptomy schizofrenie:** Účinná dávka D-serinu se pohybuje v oblasti 30 mg/kg/den (tato dávka je dobře snášena). Glycin nabývá účinnosti v dávkách v oblasti 0,4-0,8 g/kg/den /26/. Rozdíl může být dán odlišnou průchodností hematoencefalitickou bariérou.

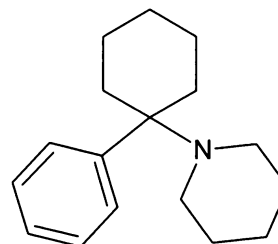
## 4. D-serin a schizofrenie

### 4.1 Hypofunkce NMDA receptorů

Na základě nedávných zjištění jsou s patofyziologií schizofrenie spojovány NMDA receptory pro glutamát, konkrétně jejich hypofunkce /26,37/. Základem této glutamátové hypotézy jsou studie, prokazující, že disociativní anestetika jako PCP (fencyklidin) nebo ketamin (obr. 13), tedy jejich subanestetické dávky, navozují u zdravých subjektů symptomy schizofrenie a u chronických schizofreniků tyto symptomy zhoršují /37,2,28,3/. Týká se to jak negativních symptomů a kognitivních poruch /26/, tak podle některých studií i pozitivních symptomů /6,28,2,33/. Disociativní anestetika se vážají do místa uvnitř iontového kanálu NMDA receptorů a fungují jako jejich nekompetitivní antagonisté /26,37/. Syndrom nastává nejen blokadou NMDA receptorů, ale také snížením jejich četnosti /6/.



Obrázek 13: a) ketamin



b) PCP (fencyklidin)

(<http://www.rect.muni.cz/drogy/POKUS/casti/haluc.htm>)

Některé studie indikují že disociativní anestetika také zvyšují uvolňování dopaminu v čelní kůře a ventrálním striatu, což by mohlo naznačovat, že pozitivní symptomy mohou být sekundární k primárnímu defektu NMDA receptorové hypofunkce /26/.

Bylo zjištěno, že látky aktivující NMDA receptory skrze glycinové místo GlyB, jako jsou jeho agonisté D-serin, glycin, popřípadě D-alanin, nebo částečný agonista D-cykloserin dokáží redukovat psychotické symptomy /23/. Stejným způsobem reagují také blokátory GlyT1, glycinového transportního systému, který zajišťuje zpětné vychytávání glycinu ze synapse např. methyl-glycin (sarkosin) /28,26,6,22,13/.

Studie in vitro na krysím striatu ukazují, že plní agonisté GlyB místa NMDA receptorů mohou také kontrolovat uvolňování endogenního dopaminu /33/.

Glycinové místo NMDA receptorů GlyB se tedy stává novým možným terapeutickým přístupem při léčbě schizofrenie /26/.

V hypofunkci NMDA receptorů může hrát roli řada faktorů, které jsou s těmito receptory funkčně propojeny. Důležité je zmínit například úlohu glycinového transportního systému GlyT1. Zajímavým zjištěním v souvislosti schizofrenie a hypofunkce NMDAr je pokles exprese enzymu GCPII ( glutamát karboxypeptidáza II) v prefrontální a temporální kůře mozku u schizofreních jedinců. Tento enzym degraduje NAAG (N-acetyl aspartyl glutamát), který působí jako agonista NMDAr /26/.

#### **4. 2 Hladiny D-serinu při schizofrenii**

Byly prováděny studie s cílem zjistit odlišnosti hladin D, L-serinu (DS,LS) a celkového serinu u schizofreniků ve srovnání s kontrolními skupinami.

Bylo zjištěno, že hladiny DS v krevním séru jsou u schizofreniků nižší než u zdravých jedinců /2,3,37,6/, naopak hladiny LS jsou oproti zdravým jedincům zvýšené /37/, což se výrazně projeví v nižší hodnotě poměru DS/LS nebo DS/(LS+DS). Sérová hladina D a L-serinu by tedy mohla poskytovat biologický ukazatel pro schizofrenii /37/.

Nedávné studie poukazují také na redukci poměru D-serinu ku celkovému serinu v mozkomíšní tekutině u neléčených schizofreniků /2/.

Byla publikována studie, že hladina D-serinu je u schizofrenie nižší i v prefrontální mozkové kůře /6,37/. Avšak z nedostatku vzorků mozkových tkání nebyly provedeny žádné rozsáhlejší studie na podporu tohoto zjištění /37/. Je však pravděpodobné, že D-serin v krvi by mohl pocházet z mozku a potvrzená redukovaná hladina sérového D-serinu u schizofrenních pacientů může odrážet pokles D-serinu i v mozku /37,2/.

Nabízí se teorie, že snížený poměr D-serinu ku celkovému serinu v krevním séru schizofreniků by mohl odrážet redukci enzymatické aktivity SR při schizofrenii /37/.

Další studie důležitých metabolických drah zahrnujících (DAAO, SHMT, 3-fosfo-glycerát dehydrogenázu) a také uvolňování a absorpci D-serinu jsou nezbytné k určení možné patofyziologické role jeho poklesu ve schizofrenii /37/.

### 4.3 Terapie prostřednictvím ovlivnění glycinového místa

Klinické pokusy indikují, že agonisté glycinového místa GlyB (glycin a D-serin) NMDA receptorů a v menší míře (60% oproti glycinu /26/ ) i částečný agonista D-cykloserin výrazně zvyšují terapeutické účinky klasických antipsychotik na symptomy schizofrenie /3,12,11,33,19/. Pozorované zlepšení schizofrenního syndromu prostřednictvím působení aktivátorů GlyB místa se týká především skupiny negativních symptomů, popřípadě kognitivních poruch, které neodpovídají na léčbu typickými antipsychotiky /28,20/. Bylo publikováno, že terapeuticky účinná dávka D-serinu v kombinaci s typickými antipsychotiky byla 15-30 krát nižší než u glycinu /26/ (viz. kapitola 3.7). V případě D-serinu byl pozorován příznivý efekt i na pozitivní symptomy schizofrenie /26,6/.

Oproti tomu řada studií potvrzuje, že kombinace D-serinu nebo glycinu, tedy úplných agonistů GlyB s klozapinem (atypické antipsychotikum viz. kapitola 1.2) nevedla ke zlepšení syndromu /37,3,21,25/, přestože hladina D-serinu příznačně vzrostla. V případě kombinace klozapinu s částečným agonistou GlyB D-cykloserinem došlo dokonce ke zhoršení /25/.

Neúčinnost kombinace plných agonistů GlyB místa s klozapinem může být vysvětlena tím, že by klozapin sám mohl fungovat jako plný nebo částečný agonista GlyB místa. Přidáním D-serinu by pak již nedošlo k dalšímu zvýšení neurotransmise /25/.

Jiným vysvětlením neúčinnosti výše zmíněné kombinace, by mohlo být to, že klozapinem léčení pacienti jsou často starší s delším průběhem nemoci, horší patologií a dřívějším antipsychotickým vystavením. Mohli by tedy být rezistentní k ostatním lékům včetně D-serinu a glycinu /25/.

Bylo zjištěno, že inhibitor glycinového transportéru sarkosin může být terapeuticky účinnější terapeutikum než agonisté glycinového místa NMDA receptorů alespoň během akutní fáze./14/

#### 4.4 Genetické souvislosti SR a DAAO se schizofrenií

Schizofrenie je onemocnění s jasnou genetickou predispozicí /35/. Mnohé studie se proto ubírají směrem k hledání genů způsobujících toto onemocnění.

Na základě výše uvedených zjištění spojujících D-serin s patofyziologií schizofrenie se do centra zájmu dostávají enzymy serin racemasa (SR), která D-serin syntetizuje, a enzym oxidasa D-aminokyselin (DAAO), který D-serin degraduje /43/.

Yamada a spol. provedli výzkum role genů kódujících tyto enzymy ve vztahu ke schizofrenii. Studie sledovala výskyt SNP (single nucleotide polymorfisms, bodové mutace) u japonské populace schizofrenních pacientů, u jedinců s rodinným zatížením na tuto chorobu a u zdravých jedinců. Nebyly však zjištěny žádné významné genetické rozdíly v genech pro DAAO a SR schizofrenických pacientů a zdravých jedinců. Studie zároveň nevysvětluje ani změněné hladiny D-serinu v krvi pacientů. Jedinou výjimkou je těžko interpretovatelné spojení schizofrenie a SNP DAAO-O6, ležící ve velké vzdálenosti od posledního exonu DAAO genu /2/.

Ve spojení se schizofrenií byly zkoumány také vlastnosti samotných proteinů SR a DAAO. Studie provedená Fujiim a spol. /29/ ukazuje, že protein PICK1 (protein interagující s kinasou C) interaguje s koncem SR. Narušením vazby SR a PICK1 vážne syntéza D-serinu /43/. Gen kódující protein PICK1 je lokalizován na chromozomu 22q13, oblasti spojované se schizofrenií. Dva SNP v této oblasti se s vysokou frekvencí objevují v japonské populaci trpící tzv. disorganizovanou formou schizofrenie /43/.

Možnou souvislost mezi metabolismem D-serinu a schizofrenií potvrzuje Chumakov a spol. identifikací mutací v genu lokalizovaném na chromozomu 13q34, při studiu francouzsko-kanadské populace trpící schizofrenií /3/. Tento gen kóduje 153-aminokyselin dlouhý protein G72, který interakcí protein-protein aktivuje DAAO /3/.



## Praktická část

Při studiu schizofrenie byla prokázána souvislost tohoto onemocnění s poruchou metabolismu D-serinu /2,16/. Tato práce je součástí projektu, který vznikl ve spolupráci s PCP (PSYCHIATRICKÉ CENTRUM PRAHA). Cílem projektu je doplnit znalosti o roli D-serinu a jeho metabolismu ve schizofrenii. Součástí studie je potvrdit přítomnost a porovnat aktivitu serin racemasy v autoptických hipokampech pacientů a zdravých kontrol. K tomu je však nejprve nutné optimalizovat vhodnou metodiku.

Náplní praktické části této práce je proto pokus o optimalizaci postupu izolace a detekce serin racemasy a stanovení racemizační aktivity na příkladě autoptického hipokampu. Pracovní postup zahrnuje homogenizaci tkáně a izolaci cytosolické buněčné frakce, stanovení racemizační aktivity pomocí HPLC a stanovení přítomnosti serin racemasy metodou Western blot.

### 1. Materiály a přístroje

#### 5.1 Chemikálie

akrylamid - (USB/USA)

ATP (adenosintrifosfát) - (Sigma-Aldrich/USA)

azid sodný - (Penta /CZ)

bromfenolová modř – (Serva/Německo)

Casein blocker – (Pierce/USA)

Complete, EDTA free, protease inhibitor cocktail tablets (Roche/Švýcarsko)

Coomassie Brilliant Blue – (Bio Rad Laboratories/USA)

dodecylsulfát sodný – (Merk/USA)

DTT (dithiotreitol) – (Sigma-Aldrich/USA)

ethanol – (Lachema /CZ)

FDAA ( Marfeyho činidlo) – (Pierce/USA)

glycerol – (Fluka/USA)

glycin – ( INC Biomedicals /USA/)

HEPES ( kyselina N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová]) - (MP/USA/)

hydrogenuhličitan draselný – (Lachema /CZ)

hydroxid draselný – (Lachema /CZ)  
chlorid hořečnatý – (Lachema /CZ)  
chlorid sodný – (Lachema /CZ)  
kyselina chlorovodíková – (Sigma-Aldrich/USA)  
kyselina chloristá – (Sigma-Aldrich/USA)  
L-erythro-3-hydroxyaspartát – (Wako ind./Japonsko)  
methanol - (Lachema /CZ)  
2-merkaptoethanol – (Sigma-Aldrich/USA)  
N, N'-metylenbisakrylamid - (USB /USA)  
PBS + Tween - (USB /USA)  
peroxidisíran amonný (APS) – (Sigma-Aldrich/USA)  
PLP (pyridoxal-5'-fosfát) – (Sigma-Aldrich/USA)  
Ponceau S – (Sigma-Aldrich/USA)  
L-serin – (Fluka/USA)  
Super Signal West dura extended duration substrate – (Pierce/USA)  
Super Signal West femto maximum sensitivity substrate – (Pierce/USA)  
TEMED ( N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin) – (Fluka/USA)  
Triton X 100 – (Serva/Německo)  
Tris ( tris(hydroxymethyl)aminomethan) - (USB /USA/)

## **5.2 Přístroje**

- homogenizátor: IKA WERKE, T10 basic, 34 20000 ULTRA TURRAX (Německo)
- termostaty: BBA1, Grant-Boekel (UK)  
Grant-vodní lázeň (VB)
- centrifugy: Biofuge pico, Heraeus Instrument (Německo)
- spektrofotometr: Philips PU 8800 UV/VIS, Philips (Nizozemí)
- vertikální polyakrylamidová elektroforéza SIGMA (USA)
- blotovací přístroj SEMI-PHOR (USA)
- pH metr Unicam 9450 (USA)
- HPLC Agilent Eclipse (kolona s reverzní fází C18) (USA)

## **5.3 Vzorky**

- lidský hipokampus

## **6. Metody**

### **6.1 Homogenizace tkáně**

Vzorek hipokampu byl na suchém ledu skalpelem rozřezán na plátky, které byly posléze rozděleny na 3 části pracovně nazvané F (front: 0,24g), M (medium: 0,31g), B (back: 0,22g) a umístěny do mikrozkušavek. Ke každé části vzorku bylo přidáno 700  $\mu$ l homogenizačního pufru. Poté následovalo zpracování homogénizátorem (30s). Homogenizovaná tkáň byla následně centrifugována po dobu 10 minut, při 4°C a 20 000 g. Peleta a supernatant byly dále zpracovávány zvlášť.

#### **homogenizační pufr**

50 mM HEPES pH 7,5; 13,7 mM NaCl; 100  $\mu$ M PLP; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 5 mM Triton X-100; NaN<sub>3</sub> 1000x

### **6.2 Stanovení koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla stanovena ze supernatantů homogenizované tkáně hipokampu podle Bradfordové. Tato metoda spočívá v měření absorbance komplexu proteinů s Coomassie Brilliant Blue G-250 (vznikajících v kyselém prostředí) při vlnové délce 595 nm /47/. K odečtení koncentrace proteinů byla použita kalibrační křivka, kde jako standard sloužil hovězí sérový albumin (BSA).

### **6.3 Měření aktivity serin racemasy**

Aktivita serin racemasy byla sledována jako celkové množství vzniklého produktu D-serinu ze substrátu L-serinu v čase. Stanovení isomerů serinu bylo umožněno prekolonovou derivatizací Marfeyho činidlem (FDAA, 1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid). Vzniklé diastereoisomery byly rozděleny pomocí HPLC na koloně s reverzní fází C18, Agilent Eclipse, 1,8  $\mu$ m, 4,6 x 50 mm v isokratické směsi 35 % methanol v 50 mM octanu sodném, pH 4,4. Detekce probíhala při 340 nm. Racemizační aktivita SR byla měřena v supernatantu homogenizované tkáně autoptického hipokampu, který byl přidán k reakčnímu pufru o pH 8 (20  $\mu$ l supernatantu, 80  $\mu$ l reakčního pufru A). K reakční směsi bylo přidáno 5  $\mu$ l 100 mM roztoku inhibitoru L-erythro-3-hydroxyaspartátu nebo 5  $\mu$ l vody. Reakce probíhala po dobu 1-3 hodin při 37°C a byla zastavena přidávkem 20  $\mu$ l 1,875 M HClO<sub>4</sub>. Precipitát byl oddělen centrifugací (5 min. při 16 000 g).

Reakční směs byla neutralizována přidavkem 20  $\mu$ l 1,875 M KOH. Vznikla nerozpustná sůl, která byla oddělena centrifugací. Jako vnitřní standard byl poté přidán glycin (5  $\mu$ l 20 mM roztoku).

Ze směsi bylo odebráno 20  $\mu$ l a derivatizováno 50  $\mu$ l roztoku Marfeyho činidla v přítomnosti 10  $\mu$ l 1 M  $\text{KHCO}_3$ . Po inkubaci při 45°C, po dobu 45 minut, byla reakce zastavena přidavkem 10  $\mu$ l 2 M HCl a zředěna 1 ml 50 % methanolu. Tato směs byla analyzována pomocí HPLC (Agilent 1200 Series). Plochy pod vrcholy, příslušející glycinu, L- a D-serinu sloužily ke kvantifikaci aktivity serin racemasy.

**Reakční pufr (finální):** 100 mM HEPES pH 8; 10  $\mu$ M PLP; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 5 mM DTT; 1 mM ATP; 5 mM L-serin

**Reakční pufr A:** 125 mM HEPES pH 8; 12,5  $\mu$ M PLP; 1,25 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 6,25 mM DTT; 1,25 mM ATP; 6,25 mM L-serin

**Roztok Marfeyho činidla:** 10 mg/ml acetonu (37 mM)

#### 6.4. Dialýza

Část supernatantu homogenizované tkáně hipokampu byla dialyzována při 4°C za stálého míchání. Byly použity mikrodialyzační cely s propustností max. 7 kDa (Slide-A-Lyzer, Pierce). Průběžně (po 0, 1, 2, 6, 7, 14 dnech) byly odebírány vzorky a prováděno stanovení aktivity.

*Kontrolní vzorky:* Do stejné dialyzační nádoby byly vedle supernatantů homogenizované tkáně hipokampu umístěny 2 vzorky rekombinantní purifikované myší serin racemasy, ve kterých byly paralelně stanovovány aktivity. Pro potvrzení specifity reakce byl použit 5 mM L-*erythro*-3-hydroxyaspartát, kompetitivní inhibitor myší serin racemasy.

**Dialyzační pufr:** 20 mM TEA, pH 7,4, 20  $\mu$ M PLP, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu$ M DTT, 0,02%  $\text{NaN}_3$

### **6.5 Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)**

Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE podle molekulových hmotností na přístroji pro vertikální polyakrylamidovou elektroforézu Sigma.

Vzorky (supernatanty a resuspendované pelety) homogenizované tkáně hipokampu a standard (purifikovaná myší serin racemasa) o koncentracích 1 ng/μl; 100 pg/μl; 10 pg/μl byly smíseny se vzorkovým pufrům a před nanesením na gel denaturovány několikaminutovým varem na vodní lázni.

Elektroforetická separace proteinů probíhala 1 hodinu při konstantním napětí 155V.

**12 % (separační) gel:** 2.5 ml 1.5 M Tris pH 8.8; 2.7 ml 44% akrylamidové směsi (42,8 g akrylamid + 1,2 g N',N'-bisakrylamid); 100 μl 10 % SDS; 100 μl 10 % APS; 10 μl TEMED; doplněno vodou do 10ml

**6.6 % (zaostřovací) gel:** 1.25 ml 1 M Tris pH 6.8; 750 μl 44 % akrylamidové směsi; 50 μl 10 % SDS; 50 μl 10 % APS; 5 μl TEMED; doplněno vodou do 5 ml

**Vzorkový pufr (6x):** 3,5 ml 1 M Tris pH 6.8; 3.0 ml Glycerol; 1 g SDS; 0.93 g DTT nebo 600 μl 2-merkaptoethanol; 1.2 mg bromfenolová modř; doplněno vodou do 10ml

**Standard molekulových hmotností:** Cytochrom c 12500; Inhibitor trypsinu (hovězí) 6500; Inhibitor trypsinu (sojové boby) 20100; Karbonát anhydráza (erythrocyty) 29000; Ovalbumin 45000; BSA 66000; Fosforyláza b (králík, sval) 97000;

**Elektrodový pufr (5x):** 15.1 g Tris base; 94 g Glycine; 5 g SDS; 900 ml voda výsledné pH 8.8 nebylo upravováno

### 6.6 Přenos proteinů na membránu (Western blot)

Po provedení vertikální elektroforézy v SDS PAGE byl gel, spolu s nitrocelulózovou membránou (Pierce), a filtračními papíry (velikosti gelu) ponořen do transferového pufru a umístěn do blotovacího přístroje. Elektrotransfer probíhal po dobu 1 hodiny při konstantním proudu 60 mA/gel.

Po ukončení procesu byla membrána přelita roztokem Ponceau S, následně opláchnuta vodou a byly na ní vyznačeny tužkou markery molekulových hmotností. Zbytky Ponceau S byly odmyty PBS + 0,5 % Tween 20. Po promytí membrány následovalo blokování prázdných míst na membráně v roztoku kaseinu (Casein Blocker, Pierce) přes noc. Poté byla membrána inkubována s polyklonální králičí protilátkou proti myší serin racemase (IgG purifikované přes proteinA –Sepharosu) o koncentraci 1,25 mg/ml, finální ředění 1 : 1000 v kaseinu po dobu minimálně 2 hodin.

Po inkubaci následovalo promývání PBS + 0,5 % Tween 20 po 20 minut. Po promytí byla membrána opět převrstvena roztokem kaseinu a byla k ní přidána sekundární kozí protilátka proti králičímu séru, konjugovaná s křenovou peroxidázou, (ImmunoPure Antibody, 0,8 mg/ml, Pierce, ředění 1:50000), se kterou byla membrána inkubována 2 hodiny.

Po inkubaci byla membrána promývána PBS + 0,5 % Tween 20 po 1 hodinu. Po promytí byla membrána inkubována s komerční směsí substrátu West Dura (SuperSignal West Dura substrate, Pierce) 1 : 1, 5 minut. Membrána byla poté vysušena pomocí filtračního papíru a umístěna do plastové folie. V temné komoře byl k blotu přiložen na několik minut fotografický film (Medical X-ray film, 13 x 18, Foma), který by posléze vyvolán.

**Transferový puf:** 0,02 M Tris, 0,15 M glycin; 10 % methanol; 0,1 % SDS;

**10X Ponceau S** (zásobní roztok) : 2 g ponceau v 1 % CH<sub>3</sub>COOH

## **7. Výsledky a diskuse**

### **7.1 Homogenizace a lyze buněk**

Homogenizace tkáně byla provedena v homogenizačním pufru (viz. 6.1), příznivém pro serin racemasu (SR) /1/. Pufr obsahoval HEPES, malé množství NaCl, k přiblížení k fyziologickým podmínkám, pyridoxal-5'-fosfát jako kofaktor SR, Mg<sup>2+</sup> (v podobě MgCl<sub>2</sub>), fungující jako aktivátor SR, dithiothreitol (DTT), sloužící jako redukční činidlo udržující thiolové skupiny enzymu v redukovaném (-SH) stavu, Triton X-100 jako neiontový detergent k rozrušení lipidových dvojvrstev a nakonec azid sodný proti biologickému znehodnocení pufru. Homogenizační pufr měl fyziologické pH 7,5.

#### **7.1.1 Stanovení koncentrace proteinů**

Autoptická tkáň hipokampu byla rozdělena na 3 části (F: 0,24g; M: 0,31g; B: 0,22g), které byly homogenizovány a v jejich supernatantech byla stanovena koncentrace proteinů (tab. 2).

<b>Vzorek*</b>	<b>Absorbance při <math>\lambda=595\text{nm}</math></b>	<b>Koncentrace [<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>]</b>
<b>F</b>	<b>0,224</b>	<b>2,8 ± 0,2</b>
<b>M</b>	<b>0,449</b>	<b>5,9 ± 0,4</b>
<b>B</b>	<b>0,353</b>	<b>4,6 ± 0,4</b>

Poznámka: \* jedná se o duplikáty

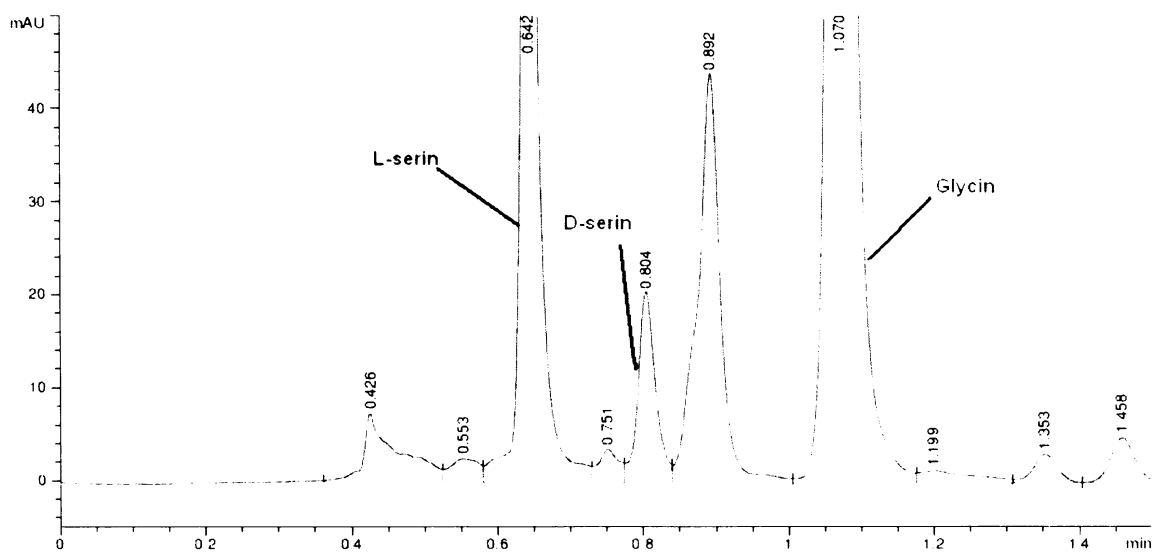
Tabulka 2: Koncentrace proteinů v lyzátu homogenizované tkáně hipokampu.

#### **7.2 Stanovení aktivity serin racemasy (SR)**

Aktivita SR byla stanovována z lyzátní tkáně hipokampu před a v průběhu dialýzy (po 0, 1, 2, 6, 7, 14 dnech) v dialyzačním pufru (viz. 6.4) (obr. 16, str. 40). Ke kvantifikaci sledované aktivity byly použity plochy pod vrcholy pro FDAA deriváty L-, a D-serinu. Jako pozitivní kontrola (obr. 14, str. 37-38) sloužila reakční směs tvořená z 5 mM L-serinu a 95  $\mu\text{l}$  reakčního pufru B o finálním složení: 100 mM HEPES pH 8; 10  $\mu\text{M}$  PLP; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 1 mM ATP a 2  $\mu\text{M}$  myší serin racemasy. Negativní kontrolou stanovení aktivity serin

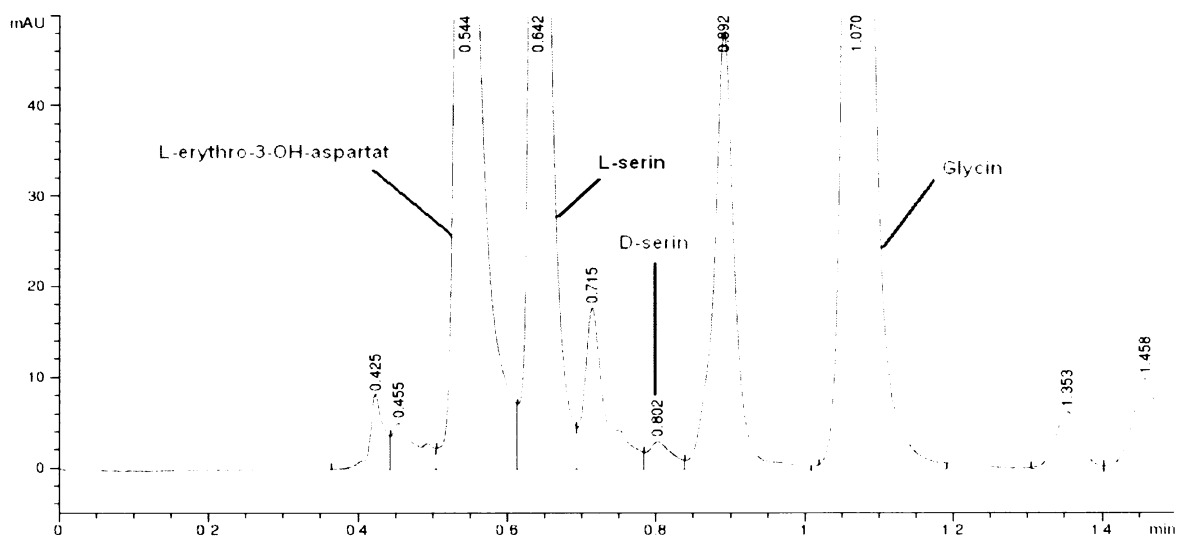
racemasy (obr. 15, str. 38) byla směs 80  $\mu$ l reakčního pufru A (viz. 6.3) a 20  $\mu$ l vody (dialyzačního pufru).

### A



název	Retenční čas [min]	Plocha [mAU*s]	Relativní hodnota plocha/Gly
L-serin	0.642	183.565	0,315
D-serin	0.804	34.474	0,059
Glycin	1.070	582.475	1

### B

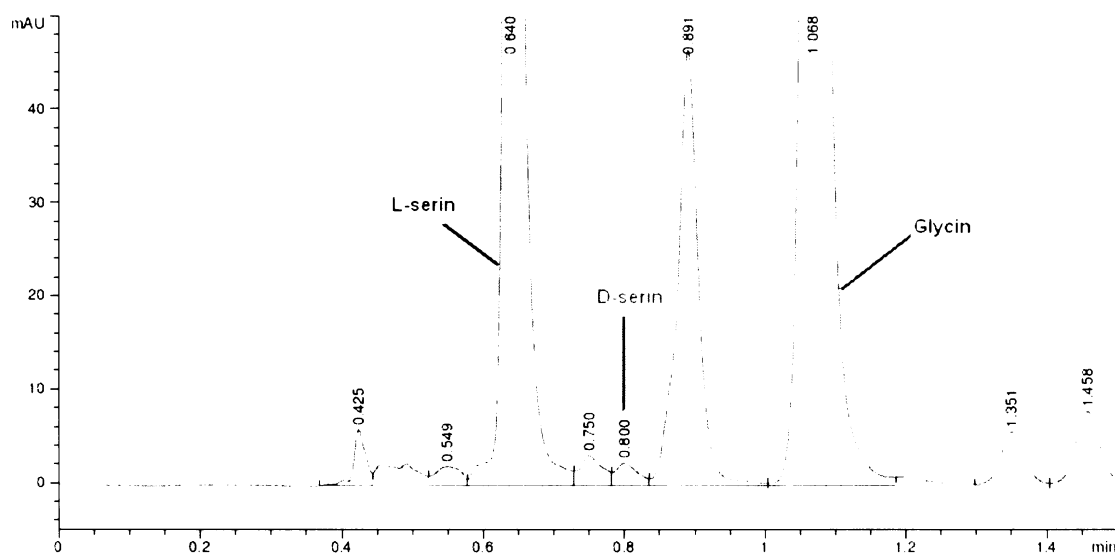




název	Retenční čas [min]	Plocha [mAU*s]	Relativní hodnota plocha/Gly
L-erythro- 3-hydroxyaspartát	0,544	269,744	<b>0,546</b>
L-serin	0,642	316,189	<b>0,640</b>
D-serin	0,802	6,835	<b>0,014</b>
Glycin	1,070	494,053	<b>1</b>

Obrázek 14: HPLC analýza aktivity serin racemasy (SR) sledovaná jako celkové množství vzniklého produktu D-serinu ze substrátu L-serinu v čase, kde glycin slouží jako vnitřní standard.

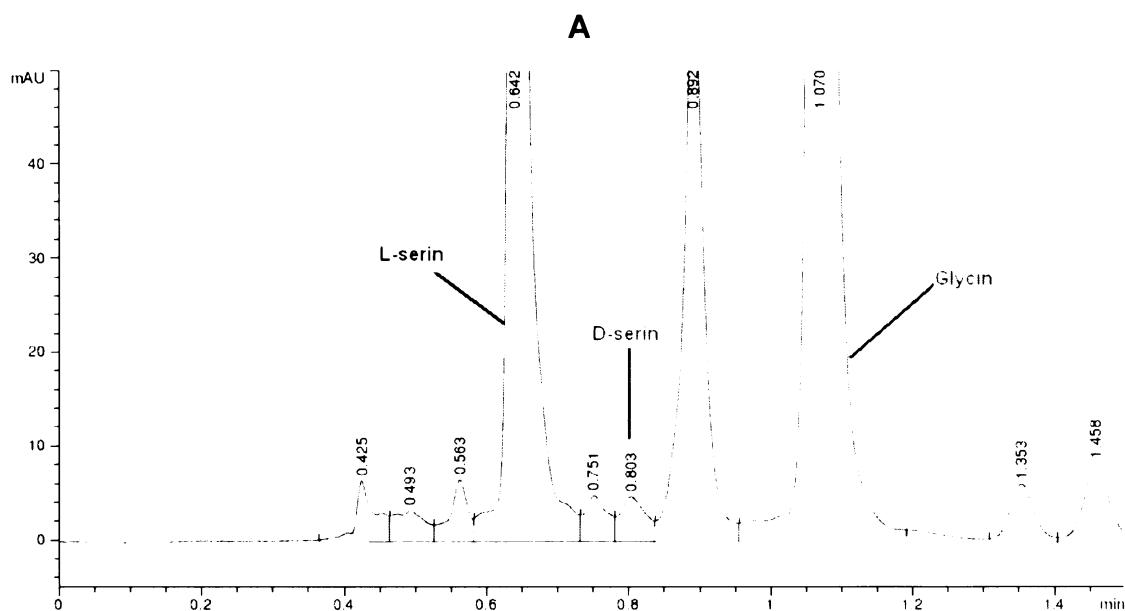
- A:** pozitivní kontrola: směs substrátu L-serinu a reakčního pufru B (viz. str. 36, 7.2) obsahujícího purifikovanou myší SR
- B:** pozitivní kontrola (směs substrátu L-serinu a reakčního pufru B (viz. str. 36, 7.2) obsahujícího purifikovanou myší SR) s inhibitorem (L-erythro-3-hydroxyaspartát).



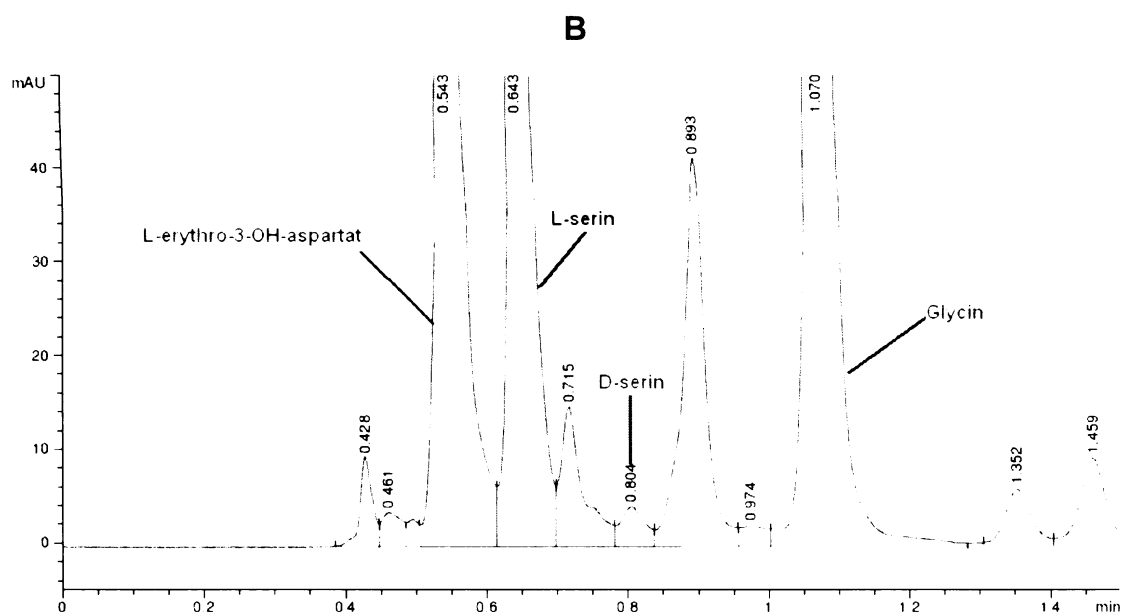
název	Retenční čas [min]	Plocha [mAU*s]	Relativní hodnota plocha/Gly
L-serin	0,640	313,472	<b>0,591</b>
D-serin	0,800	5,200	<b>0,0098</b>
Glycin	1,068	530,522	<b>1</b>

Obrázek 15: HPLC analýza aktivity serin racemasy (SR) sledovaná jako celkové množství vzniklého produktu D-serinu ze substrátu L-serinu v čase, kde glycin slouží jako vnitřní standard.

Negativní kontrola stanovení: směs reakčního pufru A (viz. str. 36, 7.2) obsahujícího substrát L-serin a dialyzačního pufru.



název	Retenční čas [min]	Plocha [mAU*s]	Relativní hodnota plocha/Gly
L-serin	0,642	327,083	<b>0,565</b>
D-serin	0,803	11,705	<b>0,020</b>
Glycin	1,070	578,457	<b>1</b>



<b>název</b>	<b>Retenční čas [min]</b>	<b>Plocha [mAU*s]</b>	<b>Relativní hodnota plocha/Gly</b>
L-erythro- 3-hydroxyaspartát	0,543	239,158	<b>0,535</b>
L-serin	0,643	311,052	<b>0,696</b>
D-serin	0,804	10,221	<b>0,023</b>
Glycin	1,070	447,034	<b>1</b>

**Obrázek 16:** Ukázka výsledků HPLC analýzy aktivity serin racemasy z tkáně lidského hipokampu (po 24 hodinové dialýze) sledovaná jako celkové množství vzniklého produktu D-serinu ze substrátu L-serinu v čase, kde glycin sloužil jako vnitřní standard.

A: bez inhibitoru

B: s inhibitorem (L-erythro-3-hydroxyaspartát)

Na výsledných chromatogramech stanovení aktivity SR z lyzátů homogenizované tkáně hipokampu bylo detekováno jen velice malé množství D-serinu. Toto množství odpovídá hladině D-serinu v negativní kontrole a jedná se o kontaminaci vzorku L-serinu D-serinem (optická čistota odpovídá ~ 99.8 %). To potvrzují i chromatogramy vzorků s účastí inhibitoru SR (L-erythro-3-hydroxyaspartátu). Výsledky stanovení aktivity SR tedy byly negativní.

Nepotvrzená aktivita by mohla být vysvětlena velmi malým množstvím SR ve zkoumané tkáni a současně nízkou katalytickou účinností enzymu ( $k_{\text{cat}} = 45\text{min}^{-1}$ ). Hodnota  $k_{\text{cat}}$  vychází z naměřené maximální rychlosti přeměny, která odpovídá  $70\ \mu\text{mol/mg/hod}$ ; tzn.  $70\ \mu\text{mol}$  L-serinu je přeměněno  $1\text{mg}$  enzymu (purifikovaná rekombinantní myší serin racemasa) za 1 hodinu, jinými slovy přemění 1 molekula enzymu 1 molekulu substrátu za  $0,7\text{s}$ .

Dále je tu možnost inhibice serin racemasy různými nízkomolekulárními látkami přítomnými v tkáni. Příkladem by mohl být glycin, který se v mozku vyskytuje a bylo prokázáno, že inhibuje SR /5/. Hodnota  $K_i$  pro glycin je ale velmi vysoká ( $1,6\ \text{mM}$ ), což je jen o málo nižší, než hodnota  $K_M$  pro serin ( $5\ \text{mM}$ ), a tudíž jeho afinita k aktivnímu místu serin racemasy není dostatečně vysoká, aby případnou inhibici vysvětlovala /48/.

Lyzáty homogenizované tkáně hipokampu byly spolu s kontrolními vzorky rekombinantní purifikované myší serin racemasy dialyzovány pro odstranění možných nízkomolekulárních inhibitorů. V průběhu dialýzy po 1, 2, 6, 7 a 14 dnech byly odebírány dialyzované vzorky, včetně kontrolních vzorků, a prováděny aktivní reakce. Všechny výsledky stanovení aktivity SR u vzorků lyzátů hipokampální tkáně byly negativní. Zarážející je však skutečnost, že negativní výsledky stanovení aktivity byly zjištěny i u kontrolních vzorků rekombinantní purifikované myší serin racemasy. Byl také pozorován vznik precipitátu u vzorků z hipokampální tkáně i kontrolních vzorků myší SR.

Příčina vysrážení enzymu není jasná. V úvahu přichází možnost nevhodnosti dialyzačního pufru. Pro ověření této domněnky byl proveden pokus, kdy byly dialyzovány, ve stejném dialyzačním pufru, pouze vzorky rekombinantní purifikované myší SR, aby se vyvrátila možnost vlivu případného viníka z hipokampální tkáně. Ve vzorcích rekombinantní myší SR opět vznikl precipitát a nebyla u nich zjištěna aktivita. Pozorování tedy ukazuje na možnou příčinu v dialyzačním pufru. Není však znám důvod. Nelze ani vyloučit roli jiných neznámých faktorů, které mohou být příčinou negativních výsledků. Je tedy nutné pro další práci tento problém objasnit.

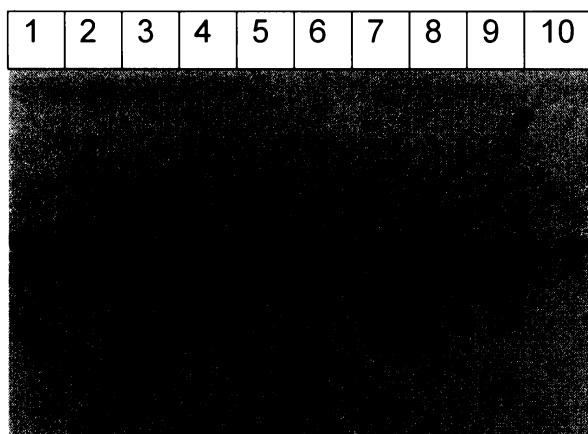
### 7.3 Potvrzení přítomnosti serin racemasy (SR) technikou Western blot

Již na začátku je třeba zmínit, že potvrzení přítomnosti lidské serin racemasy (hSR) v autoptické tkáni hipokampu může být komplikováno skutečností, že byly k dispozici pouze protilátky proti myší serin racemase (mSR), což může mít vliv na výsledky pokusu. Nicméně myší a lidská serin racemasa jsou proteiny o vysoké sekvenční homologii (identita 89 %, homologie 95 %) /49/, a tudíž lze předpokládat, že polyklonální protilátka proti myší serin racemase bude reagovat také s lidskou serin racemasou.

Byla provedena vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).

Vzorky částí hipokampu F, M a B byly nanášeny na gel v podobě supernatantu a pelety. Dále byl nanášen standard molekulových hmotností a standard myší SR o různé koncentraci (viz. 6.5), (tab. 3).

Po provedení elektroforetického rozdělení proteinů, byly vzorky analyzovány technikou Western blot (obr. 17).



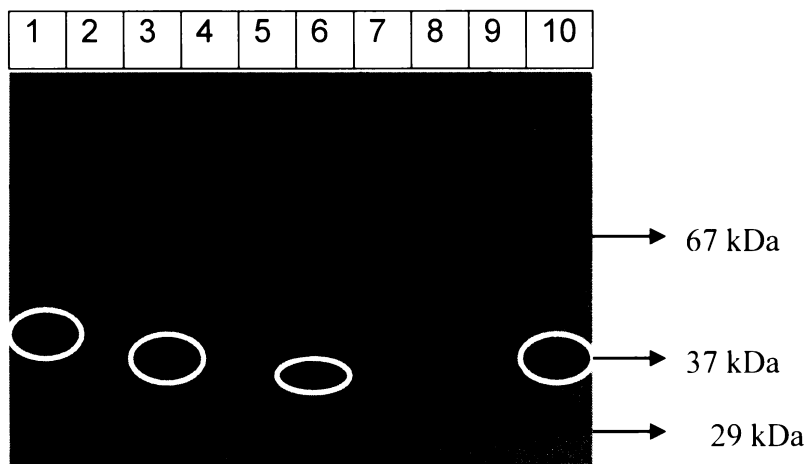
Obrázek 17: Western blot analýza přítomnosti serin racemasy v tkáni lidského hipokampu, kde jako pozitivní kontrola sloužil standard purifikované myší serin racemasy. (ředění protilátek: primární- 1 : 2000; sekundární-1 : 100000) (popis drah 1-10 viz tab. 3, str. 43)

dráha	vzorek	množství proteinu v dráze
1	supernatant (vzorek F)	40 $\mu$ g
2	peleta (vzorek F)	*
3	supernatant (vzorek M)	80 $\mu$ g
4	peleta (vzorek M)	*
5	standard molekulových hmotností	nespecifikováno
6	supernatant (vzorek B)	60 $\mu$ g
7	peleta (vzorek M)	*
8	standard myší serin racemasy	50 pg
9	standard myší serin racemasy	500 pg
10	standard myší serin racemasy	5 ng

Poznámka: \* pelety byly resuspendovány v homogenizačním pufru (viz. kapitola 6.1);  
koncentrace proteinu nebyla stanovována

Tabulka 3: Schéma nanesení vzorků na gel při elektroforéze v SDS-PAGE

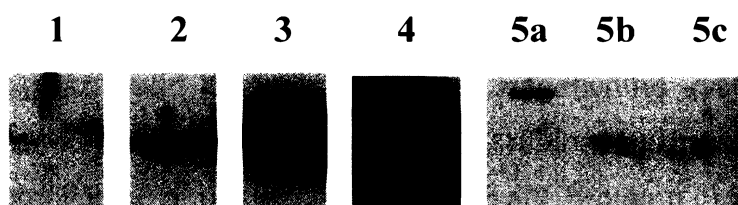
Bylo pozorováno pouze nespecifické zbarvení blotu a to i u pozitivní kontroly. Membrána byla proto přenesena na 30 minut do odmyvacího roztoku (Restore Western Blot Stripping Buffer, Pierce) a inkubována s dvojnásobným množstvím obou protilátek ( údaj viz. 6.6) pro zvýšení citlivosti experimentu.



Obrázek 18: Western blot analýza přítomnosti serin racemasy v tkáni lidského hipokampu, kde jako pozitivní kontrola sloužil standard myší serin racemasy.  
(ředění protilátek: primární-1 : 1000; sekundární- 1 : 50000)  
(popis drah 1-10 viz tab. 3)

V poloze 1, 3, 6 a 10 je možno vidět velice slabé signály odpovídající 37 kDa serin racemasy. Ze standardů SR je možno vidět pouze velice slabý signál v dráze 10 odpovídající 5 ng. Polohy 1, 3, 6 náleží supernatantům vzorků hipokampu. Signál je spíše patrný v rozpustné frakci než ve frakci nerozpustné, v peletách (dráhy 2, 4, 7). To odpovídá předpokladu, protože se jedná o protein cytoplazmatický. Z důvodu velice slabě viditelné SR ve vzorcích, ale i standardech, bylo celé stanovení provedeno znovu, tentokrát za použití vzorků po čtrnáctidenní dialýze a jiné koncentraci standardů (viz. níže; schéma vzorků) myší SR (obr. 19). Při přípravě vzorků byly centrifugací odděleny precipitáty od supernatantů. Precipitáty byly opatrně opláchnuty vodou, aby byla vyloučena kontaminace rozpustnou frakcí.

▫ *fotografická expozice (5 min)*



▫ *fotografická expozice (10 min)*



*Obrázek 19:* Vybrané výseky z Western blot analýzy přítomnosti serin racemasy v tkáni lidského hipokampu po čtrnáctidenní dialýze. Pozitivní kontrolou je purifikovaná myší SR. (ředění protilátek: primární-1 : 1000; sekundární- 1 : 50000)

**Výsek 1:** standard myší serin racemasy (0,1 ng)

**Výsek 2:** standard myší serin racemasy (1 ng)

**Výsek 3:** standard myší serin racemasy (10 ng)

**Výsek 4:** standard myší serin racemasy (100 ng)

**Výsek 5:** a) standard molekulových hmotností

b) precipitát vzorku M

c) supernatant (vzorek M); přibližné množství proteinu 80µg

U pokusu, za použití vzorků z dialýzy, kde bylo použito i větší množství standardu myší SR jsou signály v oblasti 37 kDa výraznější než v předchozím případě. I přesto jsou pro lidskou serin racemazu z hipokampální tkáně velice slabé, téměř na hranici nescifického pozadí. Vzhledem ke kalibrační řadě by množství serin racemasy odpovídalo množství zhruba 1ng (tzn. koncentraci 100 ng/ml).

## **8. Závěr praktické části**

V lyzátu z autoptických vzorků lidského hipokampu nebyla pozorována žádná aktivita serin racemasy a to ani po několikadenní dialýze vzorků. Navíc ve vzorcích během dialýzy vznikl precipitát. Precipitát vznikl i u kontrolních vzorků purifikované myší serin racemasy, které byly dialyzovány spolu se vzorky hipokampálních lyzátů. U těchto kontrolních vzorků nebyla rovněž zjištěna žádná aktivita serin racemasy. Příčina negativního výsledku může být v řadě faktorů nebo jejich kombinací. Je zde reálná možnost viny dialyzačního pufru na precipitaci a následné ztrátě aktivity proteinu, kterou je nutné pro další práci potvrdit nebo vyvrátit.

Přítomnost serin racemasy se metodou Western blot přesvědčivě potvrdit nepodařilo. Signál patrný na blotu se ztrácí na pozadí a lze ho jen těžko interpretovat. Příčina může být jednak v důsledku jejího velmi malého množství ve vzorku, jednak v nízké specifitě protilátek. Ani kalibrační řada vzorku čisté rekombinantní myší serin racemasy neukazuje na velkou citlivost protilátky. Proti lidské serin racemase byly použity protilátky proti myší serin racemase, což může hrát důležitou roli. Důležitý experiment, který je třeba doplnit, je paralelní stanovení lidských a myších vzorků.

Z výsledků získaných metodou Western blot o přítomnosti serin racemasy (SR) v autoptické tkáni lidského hipokampu vyplývá, že do reakce pro stanovení aktivity SR byly dodávány řádově nanogramy tohoto enzymu, což by s rychlostí přeměny 70  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{hod}$  odpovídalo vzniku asi 0,07 nmol produktu za hodinu. Celková koncentrace D-serinu v reakci by v takovém případě byla zhruba 0,7  $\mu\text{M}$ , což je hluboko pod detekčním limitem stanovení (přibližně 50 $\mu\text{M}$ ). Jedná se ale o velmi hrubý odhad, který nezahrnuje možnou rozdílnou specifitu protilátek.



Optimalizace metodik stanovení aktivity serin racemasy a potvrzení její přítomnosti není zdaleka u konce a bude nutné na ní dále pracovat. Vhodným řešením problému malé katalytické účinnosti enzymu by mohlo být použití vhodnějšího substrátu, jakým je L-serin-O-sulfát nebo L-*threo*-3-hydroxyaspartát jejichž rychlosti přeměn jsou oproti D-serinu až padesátinásobné (3200  $\mu\text{mol/mg/hod}$  a 3500  $\mu\text{mol/mg/hod}$ ) /48/. Pro potvrzení přítomnosti serin racemasy by bylo vhodné použít specifičtější protilátku proti lidské serin racemase, popřípadě zvážit možnost použití jiné metody, například imunoprecipitace.

## Shrnutí

- Z literárních zdrojů byly shrnuty poznatky o možné souvislosti D-serinu a jeho metabolismu ve schizofrenii.
- Byla provedena detekce a stanovení aktivity serin racemasy z autoptické tkáně lidského hipokampu, experimenty, navržené ke studiu této problematiky.
- Bylo zpracováno shrnutí praktické části a zároveň byly na základě výsledků navrženy další postupy, které by mohly zlepšit metodiku další práce.

## Literatura

- /1/** Stříšovský, K., Jirásková, J., Bařinka, C., Majer, P., Rojas, C., Slusher, B.S., Konvalinka, J. : FEBS Letters 535, 44-48 (2003)
- /2/** Yamada, K., Ohnishi, T., Hashimoto, K., Ohba, H., Iwayama-Shigeno, Y., Toyoshima, M., Okuno, A., Takao, H., Toyota, T., Minabe, Y., Nakamura, K., Shimizu, E., Itokawa, M., Mori, N., Iyo, M., Yoshikawa, T.:Biol. Psychiatry. 57,1493-1503(2005)
- /3/** Schell, M.J.: Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 359,943-64 (2004 )
- /4/** Friedman, M.:J Agric Food Chem.;47,3457-3479 (1999)
- /5/** Stříšovský, K.,Jirásková, J., Mikulová, A., Rulíšek, L., Konvalinka, J.: Biochemistry; 44(39),13091-100 (2005)
- /6/** Fuchs, S.A., Berger, R., Klomp,L.W.J., de Koning,T.J. : molecular Genetics and Metabolism. 85,168-180 (2005)
- /7/** Hashimoto A, Oka T.: Prog Neurobiol.52,325-353(1997)
- /8/** Tamminga, CA., Holcomb, HH.: Mol Psychiatry.10, 27-39 (2005)
- /9/** Velký lékařský slovník ( [www.maxdorf.cz/maxdorf/vls/index.php?ctest=1](http://www.maxdorf.cz/maxdorf/vls/index.php?ctest=1))
- /10/** Sawa, A., Snyder, SH. :Mol Med. 9, 3-9 (2003)
- /11/** Javitt, DC.: Curr. Psychiatry Rep. 3, 413-7 (2001)
- /12/** Millan, MJ.: Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 1, 191-213 (2002)
- /13/** Tsai, GE., Yang, .P, Chang, YC., Chong, MY.: Biol Psychiatry. 59, 230-4. (2006)
- /14/** Lane, HY., Chang, YC., Liu, YC., Chiu, CC., Tsai, GE.:Arch Gen Psychiatry. 62, 1196-204 (2005)
- /15/** Kartvelishvily, E., Shleper, M., Balan, L., Dumin, E., Wolosker, H.: J Biol Chem. (2006)
- /16/** Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, LH., Iyo, M.: Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 29, 767-9 (2005)
- /17/** Hashimoto, A., Chiba, S. :Eur J Pharmacol. 495,153-8 (2004)
- /18/** Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter: Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky; Espero Publishing Ústí nad Labem 1998
- /19/** Heresco-Levy, U., Javitt, DC.: Schizophr Res. 66,89-96 (2004)

- /20/** Tuominen, HJ., Tiihonen, J., Wahlbeck, K.: Schizophr Res. 72, 225-234 (2005)
- /21/** Goff, DC., Freudenreich, O., Evins, AE.: CNS Spectr. 6, 904, 907-11 (2001)
- /22/** Javitt, DC.: Curr Opin Investig Drugs. 3, 1067-72 (2002)
- /23/** Heresco-Levy, U.: Int J Neuropsychopharmacol. 3, 243-258 (2000)
- /24/** Motlová, L.: Vesmír 76, 549-550 (1997)
- /25/** Tsai, GE., Yang, P., Chung, LC., Tsai, IC., Tsai, CW., Coyle, JT.:  
Am J Psychiatry. 156, 1822-5 (1999)
- /26/** Coyle, JT., Tsai, G.: Psychopharm. 174, 32-38 (2004)
- /27/** <http://mujweb.cz/zdravi/psychiatrie/index.html>
- /28/** Nishikawa, T.: Biol Pharm Bull. 28, 1561-5 (2005)
- /29/** Fujii, K., Maeda, K., Hikida, T., Mustafa, AK., Balkissoon, R., Xia, J., Yamada, T., Ozeki, Y., Kawahara, R., Okawa, M., Haganir, R.L., Ujike, H., Snyder, SH., Sawa, A.: Mol Psychiatry. 11, 150-7 (2006)
- /30/** Snyder, SH., Ferris, CD.: Am J Psychiatry. 157, 1738-51 (2000)
- /31/** Dunlop, DS., Neidle, A.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 235, 26-30 (1997)
- /32/** Kumashiro, S., Hashimoto, A., Nishikawa, T.: Brain Res. 681(1-2): 117-25 (1995)
- /33/** Bennett, S., Gronier, B.: Eur J Pharmacol. 527, 52-9. (2005)
- /34/** <http://www.en.wikipedia.org>
- /35/** Zvolský, P.: osobní sdělení
- /36/** Davatzikos, C., Shen, D., Gur, RC., Wu, X., Liu, D., Fan, Y., Huggert, P., Turetsky, BI., Gur, RE.: Arch Gen Psychiatry. 62, 1218-27 (2005)
- /37/** Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Shinoda, N., Nakazato, M., Kumakiri, C., Okada, S., Hasegawa, H., Imai, K., Iyo, M.: Arch Gen Psychiatry. 60, 572-6 (2003)
- /38/** Harrison, P.J.: Brain. 122, 593-624 (1999)
- /39/** Javitt, DC., Balla, A., Sershen, H.: Brain Res. 941, 146-9 (2002)
- /40/** Nové univerzum. Univerzum všeobecná encyklopedie. Praha 2003
- /41/** Schell, MJ., Brady, RO. Jr, Molliver, ME., Snyder, SH.: J Neurosci. 17, 1604-1615 (1997)
- /42/** Miller, RF.: Glia. 47, 275-83 (2004)
- /43/** Šťastný, F., Vrajová, M., Tejkalová, H., Peková, S., Mareš, V., Kozmíková, I., Jirásková, J., Höschl, C., Balcar, V. J.: (v tisku) Psychiatrie (2006)

- /44/** <http://www.stopstigmapsychiatrie.cz/schizofrenie/index.html>
- /46/** Wood, P.L., Hawkinson, J.E., Goodnough, D.B.:J. Neurochem. 67, 1485-1490 (1996)
- /47/** Pierce Chemical Technical Library (<http://www.piercenet.com>)
- /48/** Jirásková, J.: osobní sdělení
- /49/** Jirásková, J.: Charakterizace serin racemasy z myších astrogliových buněk: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2003)
- /50/** [www.psych.lf1.cuni.cz/bp/45.htm](http://www.psych.lf1.cuni.cz/bp/45.htm)

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

<b>Jméno a příjmení s adresou</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>