

Bakalářská práce

# **Studium exprese serinracemasy v CNS pacientů postižených epilepsií**

Bachelor thesis

## **Analysis of serine racemase expression in the CNS of epileptic patients**

Barbora Vorlová

Vedoucí práce (Thesis supervisor): Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.



Katedra biochemie  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze



Výzkumné centrum Gilead Sciences & IOCB  
Ústav organické chemie a biochemie  
Akademie věd České republiky

**Praha 2010**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konalinky, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 3. 6. 2010

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za přijetí do své laboratorní skupiny a konzultace spojené nejen s vypracováním této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Jiráskové za všestrannou pomoc, podporu a trpělivost, kterou mě provázela po celou dobu mého působení v laboratoři.

Děkuji také Bc. Hillary Hoffman. PhD., Janě Starkové a Radkovi Součkovi za pomoc s některými experimenty, doc. Petrovi Marusičovi, Ph.D., doc. Pavlovi Krškovi, Ph.D. a doc. Josefovi Zámečnickovi, Ph.D. za spolupráci a celému kolektivu naší laboratoře za velmi příjemnou přátelskou atmosféru.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým přátelům a rodině za podporu při psaní této práce.

## **ABSTRAKT**

Serinracemasa je enzym, který za pomoci kofaktoru pyridoxal-5'-fosfátu přeměňuje L-serin na D-serin. D-serin se podílí na aktivaci *N*-methyl-D-aspartátových receptorů pro glutamát – klíčových receptorů zajišťujících přenos nervového vzruchu v savčím mozku. Dysfunkce zmíněných receptorů může vést k různým neuropatologiím, jako je schizofrenie, mozková ischemie, neurodegenerativní onemocnění či epilepsie. Serinracemasa se proto stává slibným farmaceutickým cílem pro léčení těchto chorob. V této práci byly charakterizovány tři monoklonální protilátky proti lidské serinracemase a nejlepší z nich byla využita pro detekci tohoto enzymu v resekovaných vzorcích lidských epileptických tkáních metodou Western blot. Pro správnou interpretaci výsledků byla následně ověřena přesnost zpracování a analýzy jednotlivých vzorků. Nakonec byla měřena aktivita lidské serinracemasy pomocí L-serin-*O*-sulfátu, substrátu s doposud nejvyšší známou afinitou.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** serinracemasa, D-serin, epilepsie

## **ABSTRACT**

Serine racemase is a pyridoxal-5'-phosphate dependent enzyme that converts L-serine to D-serine. D-serine is a recognized physiological co-agonist of *N*-methyl-D-aspartate type of glutamate receptors – key receptors that participate in the neurotransmission in the mammalian brain. Dysfunction of these receptors has been implicated in several neuropathologies, including schizophrenia, brain ischemia, neurodegenerative disorders and epilepsy. Serine racemase is thus a promising pharmaceutical target in these diseases. In this study, three anti-human serine racemase monoclonal antibodies were characterized and the best one was used for the Western blot detection of the enzyme in resected human epileptic tissues. For better interpretation of the results, accuracy of the tissue processing, the protein concentration determination and the Western blot quantification were verified. Finally, the activity of human serine racemase was determined with the L-serine-*O*-sulfate, the substrate with the highest-affinity to this enzyme. (Thesis in Czech)

**KEY WORDS:** serine racemase, D-serine, epilepsy

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. ÚVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1. SERINRACEMASA .....  | 2         |
| 2.1.1. <i>Objev serinracemasy</i> .....   | 2         |
| 2.1.2. <i>Enzymové vlastnosti serinracemasy</i> .....   | 2         |
| 2.1.2.1. Enzymová aktivita .....  | 3         |
| 2.1.2.2. Kofaktory a aktivátory.....  | 5         |
| 2.1.2.3. Inhibitory .....   | 6         |
| 2.1.3. <i>Lidská serinracemasa (hSR)</i> .....  | 7         |
| 2.1.3.1. Obecný úvod.....   | 7         |
| 2.1.3.2. Distribuce v lidském těle .....  | 8         |
| 2.1.3.3. Lokalizace v buňkách centrální nervové soustavy.....                                   | 9         |
| 2.1.3.4. Srovnání lidské serinracemasy s myším a krysím orthologem .....                        | 9         |
| 2.2. D-SERIN .....  | 10        |
| 2.2.1. <i>Obecné vlastnosti serinu</i> .....  | 10        |
| 2.2.2. <i>Výskyt a funkce D-serinu v savčím organismu</i> .....                                 | 10        |
| 2.2.3. <i>Metabolismus D-serinu</i> .....   | 11        |
| 2.2.3.1. Biosyntéza D-serinu .....  | 11        |
| 2.2.3.2. Degradace D-serinu .....   | 12        |
| 2.2.4. <i>N-methyl-D-aspartátové receptory</i> .....  | 13        |
| 2.2.4.1. Obecný úvod.....   | 13        |
| 2.2.4.2. Struktura NMDA receptorů .....   | 14        |
| 2.2.4.3. Funkce NMDA receptorů .....  | 14        |
| 2.2.4.4. Neuropatologie způsobená dysfunkcí NMDA receptorů .....                                | 16        |
| 2.2.5. <i>D-serin v neuropatologii</i> .....  | 17        |
| 2.3. EPILEPSIE .....  | 18        |
| 2.3.1. <i>Definice epilepsie a její epidemiologie</i> .....                                     | 18        |
| 2.3.2. <i>Molekulární podstata epilepsie</i> .....  | 18        |
| 2.3.2.1. D-serin v epilepsii.....   | 20        |
| 2.3.3. <i>Současná léčba epilepsie</i> .....  | 20        |
| <b>3. CÍL PRÁCE</b> .....   | <b>22</b> |
| <b>4. MATERIÁLY A METODY</b> .....  | <b>23</b> |
| 4.1. MATERIÁLY .....  | 23        |
| 4.1.1. <i>Chemikálie</i> .....  | 23        |
| 4.1.2. <i>Přístroje</i> .....   | 24        |
| 4.1.3. <i>Programy</i> .....  | 25        |
| 4.1.4. <i>Ostatní</i> .....   | 25        |
| 4.2. METODY .....   | 26        |
| 4.2.1. <i>Homogenizace tkáně</i> .....  | 26        |
| 4.2.1.1. Homogenizace pomocí homogenizátoru Disperser T10 basic a sonikátoru.....               | 26        |
| 4.2.1.2. Homogenizace pomocí homogenizátoru TissueLyser II.....                                 | 26        |
| 4.2.2. <i>Příprava tkáňových lyzátů pro měření koncentrace D-serinu</i> .....                   | 27        |
| 4.2.2.1. Srážení proteinů z roztoku .....   | 27        |
| 4.2.2.2. Ultrafiltrace .....  | 27        |
| 4.2.3. <i>Zpracování buněk HEK293</i> .....   | 27        |
| 4.2.4. <i>Stanovení celkové koncentrace proteinů</i> .....                                      | 28        |
| 4.2.5. <i>Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)</i> .....  | 29        |
| 4.2.6. <i>Metoda elektropřenosu proteinů na nitroceluloseovou membránu (Western Blot)</i> ..... | 31        |
| 4.2.7. <i>Měření aktivity SR</i> .....  | 32        |
| 4.2.7.1. Aktivita hSR ve tkáňovém lyzátu (L-serin-O-sulfát jako substrát).....                  | 32        |
| 4.2.7.2. Aktivita mSR v buněčném lyzátu (L-serin jako substrát).....                            | 34        |
| 4.2.7.3. Aktivita mSR v živých buňkách HEK293 .....   | 35        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. VÝSLEDKY</b> .....  | <b>37</b> |
| 5.1. CHARAKTERIZACE PRIMÁRNÍCH PROTILÁTEK .....   | 37        |
| 5.1.1. <i>Citlivost protilátek</i> .....  | 37        |
| 5.1.2. <i>Přibližná lokalizace epitopu protilátky 2C2.1</i> .....   | 38        |
| 5.1.3. <i>Specifita protilátek</i> .....  | 39        |
| 5.2. ZPRACOVÁNÍ A ANALÝZA VZORKŮ TKÁNÍ – PŘESNOST POUŽITÝCH METOD.....  | 42        |
| 5.2.1. <i>Porovnání jednotlivých způsobů homogenizace tkáně</i> .....   | 44        |
| 5.2.2. <i>Přesnost stanovení celkové koncentrace proteinů</i> .....   | 45        |
| 5.2.3. <i>Přesnost elektropřenosu proteinů (Western Blotu) a následné kvantifikace v programu Image Quant</i> ..... | 45        |
| 5.3. AKTIVITA SERINRACEMASY .....   | 47        |
| 5.3.1. <i>Aktivita lidské serinracemasy</i> .....   | 48        |
| 5.3.2. <i>Aktivita myší serinracemasy</i> .....   | 48        |
| 5.4. ANALÝZA RESEKOVANÝCH VZORKŮ MOZKOVÝCH TKÁNÍ JEDNOTLIVÝCH PACIENTŮ .....  | 49        |
| <b>6. DISKUZE</b> .....   | <b>50</b> |
| 6.1. CHARAKTERIZACE PRIMÁRNÍCH PROTILÁTEK .....   | 50        |
| 6.2. PŘESNOST POUŽITÝCH METOD .....   | 50        |
| 6.3. AKTIVITA SERINRACEMASY .....   | 52        |
| 6.4. ANALÝZA RESEKOVANÝCH VZORKŮ MOZKOVÝCH TKÁNÍ JEDNOTLIVÝCH PACIENTŮ .....  | 52        |
| <b>7. ZÁVĚR</b> .....   | <b>54</b> |
| <b>8. SEZNAM ZKRATEK</b> .....  | <b>55</b> |
| <b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....   | <b>57</b> |

# 1. ÚVOD

Serinracemasa (SR) (EC 5.1.1.18) je cytosolární enzym, který za pomoci kofaktoru pyridoxal-5'-fosfátu přeměňuje L-serin na racemát. Její aktivitu zvyšují bivalentní kationty ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) a ATP. Objevení serinracemasy u savců je poměrně novou záležitostí. Dlouhou dobu se totiž předpokládalo, že se D-aminokyseliny ve vyšších organismech vůbec nevyskytují a k hledání enzymu syntetizujícího tyto sloučeniny proto nebyl důvod. Studie provedené za posledních třicet let zmíněnou hypotézu nejen vyvrátily, ale zároveň přišly se zajímavým zjištěním, že některé D-aminokyseliny jsou pro savčí tělo nepostradatelné.

Mezi důležité D-enantiomery aminokyselin patří i D-serin, který spolu s dalším neurotransmiterem glutamátem aktivuje *N*-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory a podílí se tak na přenosu nervového vzruchu. Uvedené receptory mají v centrální nervové soustavě celou řadu funkcí, přičemž klíčová je jejich úloha při formování paměti a učení. Nadměrná stimulace těchto receptorů může vést až k buněčné smrti, což je často spojeno s neurodegenerativními nebo neuropsychickými onemocněními. Z tohoto důvodu se hledají způsoby, kterými by šlo hyperaktivitu *N*-methyl-D-aspartátových receptorů ovlivňovat. Jednou z možností může být právě využití serinracemasy jako cíle terapeutického zásahu. Účinné a specifické inhibitory tohoto enzymu by totiž způsobily snížení produkce D-serinu, což by mohlo vést ke snížení stimulace zmíněných receptorů.

O dysfunkci NMDA receptorů se hovoří i v případě epilepsie. Tímto onemocněním trpí asi 1 – 5 % populace. Existuje mnoho různých druhů epilepsií, jejichž společným znakem je, že epileptické záchvaty vznikají opakovaně a bez zjevné příčiny. V současné době je k dispozici celá řada léčiv, díky kterým se pacienti při dodržování předepsaných zásad mohou zapojit do běžného života. Někdy ovšem léčba těmito antiepileptiky nezabírá. Jediným možným řešením je poté chirurgické odstranění epileptogenního ložiska. Tento zákrok ale nemůže podstoupit každý, čímž vzniká určité procento nemocných, jejichž epileptické záchvaty nelze žádným způsobem zmírnit. Aby bylo možné pomoci i těmto pacientům, musí být nejprve zcela objasněna molekulární podstata zmíněné nemoci. Jedním z dílčích kroků v tomto zkoumání je také studium exprese serinracemasy.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Serinracemasa

#### 2.1.1. Objev serinracemasy

Ještě v nedávné minulosti bylo obecně uznáváno, že zatímco pro bakterie jsou D-aminokyseliny nepostradatelné [1], vyšší organismy tyto sloučeniny vůbec nepotřebují. Bylo tedy velkým překvapením, když se koncem osmdesátých let 20. století podařilo zmíněné D-enantiomery aminokyselin detekovat v savčím těle [2]. Nepředpokládalo se ale, že by v něm mohly vznikat *de novo* a plnit nějakou významnou fyziologickou funkci. Naopak se přítomnost D-aminokyselin ve vyšším organismu vysvětlovala jejich příjmem z potravy a endogenní mikroflory [3].

V roce 1992 přišli Hashimoto a kol. se studií, v níž upozorňovali na nečekaně velké množství D-serinu v centrálné nervové soustavě (CNS) myši [4]. Podle experimentů provedených již dříve Oldendorfem však tato aminokyselina nemohla pocházet ze zmíněných vnějších zdrojů [5]. Autor totiž zjistil, že pro neutrální aminokyseliny, jako je právě serin, není hematoencefalická bariéra propustná. Původ D-serinu byl tedy značně nejasný. Jeho zjištění se ale zdálo být důležité, protože už v roce 1988 Kleckner a Dingle naznačili, že by tento D-enantiomer serinu mohl hrát důležitou roli při nervovém přenosu v CNS savců [6]. V roce 1997 Dunlop a kol. publikovali práci, v níž za zdroj D-serinu v mozku označili L-serin. Vyslovili zároveň hypotézu, že konverzi L-serinu na D-serin by, po vzoru řady bakteriálních racemas přeměňujících L-aminokyselin na jejich enantiomery, mohla katalyzovat nějaká specifická racemasa [7]. Tento předpoklad záhy potvrdili Wolosker a kol., kterým se po zpracování šedesáti krysích mozků a několikanásobné purifikaci podařilo identifikovat a charakterizovat enzym, jenž skutečně L-serin na D-serin přeměňoval, serinracemasu [8].

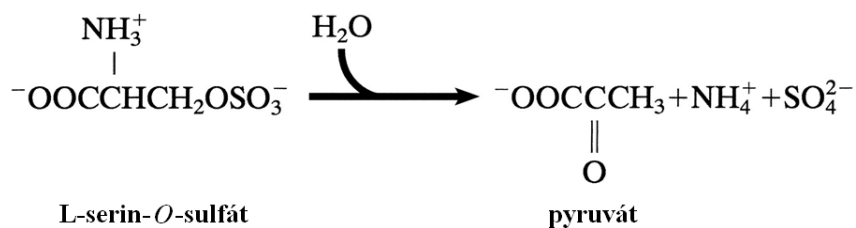
#### 2.1.2. Enzymové vlastnosti serinracemasy

Zatímco prvotní důkaz o existenci serinracemasy v savčím těle byl proveden na krysách [8], které se dále používají především na *in vivo* experimenty, většina současných *in vitro* pokusů je zaměřena na myši a lidskou serinracemasu. Vzhledem k tomu, že aminokyselinové sekvence jednotlivých orthologů se příliš neliší (sekvenční identita okolo





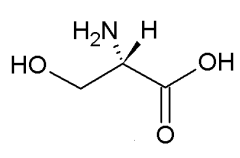
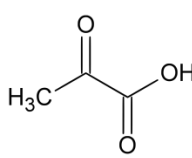
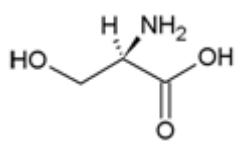
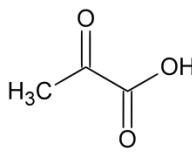
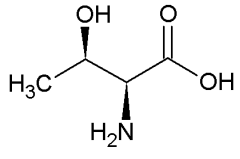
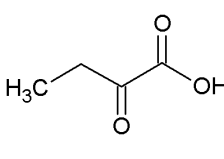
degradován na pyruvát, sulfát a amoniak (viz obr. 2), přičemž tato reakce je 500× rychlejší než racemizace L-serinu na D-serin.

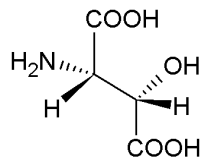
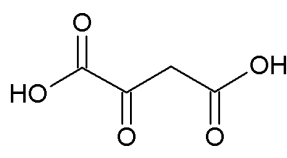
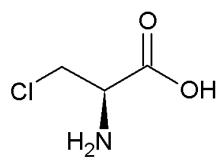
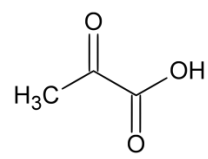


**Obr. 2: Eliminace L-serin-*O*-sulfátu katalyzovaná serinracemasou.** Převzato a upraveno z [13].

Později bylo různými skupinami zjištěno, že tímto způsobem přeměňuje SR několik dalších aminosloučenin a jejich derivátů (viz Tab. 2), z nichž některé se na rozdíl od L-serin-*O*-sulfátu přirozeně vyskytují v živých organismech [10, 12, 14].

**Tab.2: Přehled sloučenin, které jsou SR eliminovány na příslušné produkty.** Vedlejší produkty těchto reakcí (tzn. amoniak, chlor atp.) nejsou uvedeny. Pozn.: za fyziologických podmínek je převážná většina karboxylových skupin ve své deprotonizované podobě. V živém organismu se tedy nevyskytují kyseliny, ale vyskytují se zde jen jejich soli.

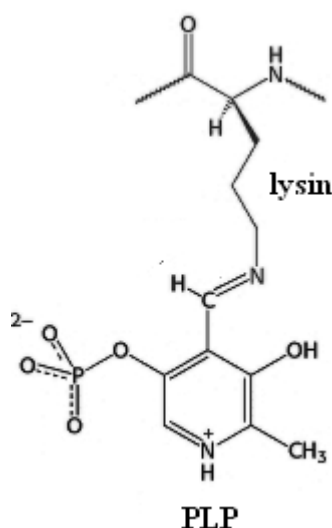
| SUBSTRÁT  | PRODUKT  |
|---|--|
|  <p>L-serin</p>    |  <p>kyselina pyrohroznová</p>  |
|  <p>D-serin</p>    |  <p>kyselina pyrohroznová</p>  |
|  <p>L-threonin</p> |  <p>kyselina 2-oxobutanová</p> |

| SUBSTRÁT   | PRODUKT   |
|--|---|
|  <p>kyselina<br/><i>L-threo</i>-3-hydroxyasparagová</p> |  <p>kyselina oxaloctová</p>   |
|  <p><math>\beta</math>-chlor-L-alanin</p>               |  <p>kyselina pyrohroznová</p> |

Z Tab. 2 (str. 4 a 5) je zřejmé, že SR katalyzuje též reakce, při kterých vzniká pyruvát z L-serinu či D-serinu. O fyziologickém významu této skutečnosti se však spekuluje. Je velmi nepravděpodobné, že by produkce pyruvátu serinracemasou hrála roli v energetickém metabolismu. Množství pyruvátu, které vznikne touto cestou, totiž představuje méně než 0,1 % množství, jež je za stejný čas syntetizováno během glykolýzy [15]. Jako jediné vysvětlení duální aktivity SR se tak zatím jeví práce Foltynové a kol., která poukazuje na možnou regulaci intracelulární koncentrace D-serinu souhrou racemizační a eliminační reakce [16]. Nelze však ani vyloučit, že je eliminační aktivita SR pouze pozůstatkem evoluce [17].

### 2.1.2.2. Kofaktory a aktivátory

Nezbytným kofaktorem pro katalytickou aktivitu SR je pyridoxal-5'-fosfát (PLP). V jeho nepřítomnosti ztrácí SR schopnost přeměňovat jak L-serin na D-serin tak L-serin na pyruvát [8, 13]. Ověření, že SR skutečně patří do skupiny enzymů vázajících PLP, poskytla aminokyselinová sekvence tohoto enzymu, kterou na základě sekvence mRNA určili Wolosker a kol. [18]. Pro všechny enzymy vázající PLP je totiž charakteristická vysoce konzervovaná oblast v jejich aktivním místě, jež slouží k vazbě PLP. Stěžejní je přítomnost lysinu, jehož  $\epsilon$ -aminoskupina tvoří s pyridoxal-5'-fosfátem Schiffovu bázi (viz obr. 3, str. 6) [19].



**Obr. 3: Schiffova báze mezi PLP a lysinem vázaným v aktivním centru PLP-enzymu.** Převzato a upraveno z [20].

*In vitro* experimenty na rekombinantní SR navíc poukázaly na celou řadu dalších kofaktorů a aktivátorů tohoto enzymu. Katalytickou schopnost SR výrazně zvyšují bivalentní kationty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  a řada nukleotidů (ATP, ADP, GTP, UTP, CTP a další) [12, 14, 21, 22], z nichž nejúčinnější je ATP. Při aktivaci SR touto sloučeninou však nedochází k její hydrolyze na ADP a fosfát. Jedná se tedy pouze o alosterickou regulaci zmíněného enzymu.

### 2.1.2.3. Inhibitory

V souvislosti s možným využitím serinracemasy jako potenciálního terapeutického cíle (více viz kap. 2.2.4.4.) se mnoho vědeckých skupin snaží najít látky, které by efektivně inhibovaly racemizační aktivitu SR. Do současné doby bylo testováno velké množství různých sloučenin, z nichž většina jsou deriváty a analogy substrátů [10, 13, 15, 21, 23].

**Tab.3: Nejúčinnější kompetitivní inhibitory SR.** Data převzata z [10, 23].

| NÁZEV             | VZOREC | $K_i$ [ $\mu\text{M}$ ] |
|-------------------|--------|-------------------------|
| kyselina malonová |        | $71 \pm 16$             |

| NÁZEV   | VZOREC | K <sub>i</sub> [μM] |
|---|--------|---------------------|
| kyselina<br>L-erythro-3-<br>hydroxyasparagová |        | 43 ± 7              |
| β-hydroxamát kyseliny<br>L-asparagové         |        | 100 ± 25            |

Jako inhibitory se chovají i malé peptidy, jejichž strukturní podobnost s přirozeným substrátem SR L-serinem je minimální [24]. Zatím nejúčinnější kompetitivní inhibitory mají inhibiční konstanty v řádech μM (viz Tab.3, str. 6 a 7).

Výrazná inhibice SR byla pozorována u látek interagujících s PLP, jako jsou např. hydroxylamin, hydrazin a jejich deriváty [23]. Tyto sloučeniny ovšem stejně dobře inhibují i ostatní PLP-enzymy. Kdyby se ale jejich vhodnou modifikací podařilo dokázat, aby k reakci s PLP docházelo až v aktivním místě enzymu, mohla by se jejich specifita výrazně zvýšit. Zároveň by tyto inhibitory mohly být i značně efektivní.

Prozatím je ale vývoj specifických a vysoce účinných inhibitorů SR málo úspěšný. Nové možnosti v tomto směru nabízí vyřešená 3D struktura savčí SR (konkrétně lidské a krysí). Ta byla po mnohaletém úsilí řady vědeckých skupin publikována v lednu letošního roku Smithem a kol. [25]. Na základě znalosti 3D struktury SR bude možné navrhovat látky, které budou komplementární k aktivnímu centru tohoto enzymu a budou tak s velkou efektivitou bránit přístupu substrátu. Doufejme, že tento tzv. rational drug design povede k zisku takového inhibitoru SR, který bude v budoucnu v případě potřeby medicíně využitelný.

### 2.1.3. Lidská serinracemasa (hSR)

#### 2.1.3.1. Obecný úvod

Gen pro hSR je lokalizován na 17. chromozomu v oblasti 17q13.3 a obsahuje 8 exonů, z nichž jeden není po transkripci překládán do aminokyselinové sekvence [26, 27]. Kompletní cDNA má 1020 nukleotidů, které kódují protein s 340 aminokyselinami o celkové molekulové hmotnosti 36 566 Da. Byla však již identifikována i hSR s molekulovými hmotnostmi 42 kDa, 62 kDa a 80 kDa. Tato

skutečnost se vysvětluje existencí několika sestříhových variant hnRNA a možnými post-translačními úpravami hSR [28].

### 2.1.3.2. Distribuce v lidském těle

Distribuce hSR v organismu byla určena pomocí mapování exprese jejího genu na úrovni mRNA a proteinu. Přítomnost daného proteinu ve tkáni se určuje zejména dvěma imunochemickými metodami – Western blotem a imunohistochemií. Naopak pro zjišťování výskytu mRNA existuje celá řada způsobů. I přesto byly pro lidskou serinracemasu doposud využity jen dva – Northern blot a sekvenace ESTs (z angl. expressed sequence tags), krátkých sekvencí (přibližně 300-600 nukleotidů) cDNA, které lze získat reversní transkripcí mRNA.

EST profil hSR dostupný v databázi UniGene na webových stránkách NCBI [29] poukazuje na přítomnost mRNA pro lidskou serinracemasu v brzlíku, cévní stěně, děloze, hltanu, hrtanu, játrech, krvi, kostech, ledvinách, lymfatických uzlinách, očích, močovém měchýři, mozku, nadledvinkách, plicích, prostatě, prsní žláze, srdci, slinivce, střevech, svalech, štítné žláze, ústech, varlatech a žaludku. (aktuální ke dni 20.4.2010)

Northern blot, který provedli Xia a kol., prokázal výskyt 2,6 kb velké mRNA kódující hSR v mozku. Játra, ledviny, svaly a srdce obsahovaly transkripty o třech velikostech – 1,6 kb, 2,6 kb a 4,5 kb. Žádný signál nebyl patrný v brzlíku, plicích, slezině a střevech [28].

Metodou Western blot našli autoři hSR v ledvinách, mozku a srdci [28]. Ledviny a srdce poskytovaly signály o velikostech 62 a 80 kDa. Mozek zase obsahoval hSR o molekulových hmotnostech 42 a 62 kDa [28].

Vzhledem k tomu, že se distribucí hSR v lidském těle doposud zabývaly jen zmíněné dvě práce, není nesoulad v jejich výsledcích zarážející. Poněkud překvapivá je ovšem neshoda analýz metodami Northern blot a Western blot. Každá mRNA by totiž zpravidla měla mít v dané tkáni jí odpovídající protein. Analýza vzorků mozku, ve kterém se vyskytoval transkript pouze o jedné velikosti, však pomocí Western blotu prokázala přítomnost dvou hSR o různých molekulových hmotnostech. Vzorky ledvin a srdce naopak obsahovaly proteiny o dvou velikostech namísto předpokládaných tří. Pro vysvětlení těchto nesrovnalostí a upřesnění lokalizace hSR tak bude nutno provést ještě řadu dalších studií.

### **2.1.3.3. Lokalizace v buňkách centrální nervové soustavy**

Přítomnost SR v lidském mozku je již prokázána jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu (kap. 2.1.3.2.). Práce řešící distribuci SR v jednotlivých typech buněk CNS byly zatím uskutečněny pouze na myších a krysách. Výsledky však nejsou zcela jednoznačné. Zatímco některé publikace mluví o expresi SR pouze v gliových buňkách [30], jiné nevyklučují přítomnost tohoto enzymu ani v neuronech [31]. Objevily se již dokonce i zprávy, že právě neurony jsou hlavním zdrojem SR v mozku [32]. Na informace o přesné lokalizaci SR v buňkách CNS savců si tak budeme muset ještě počkat.

### **2.1.3.4. Srovnání lidské serinracemasy s myším a krysím orthologem**

Vývoj a testování nových léčiv či *in vivo* pokusy jsou na lidech nepřipustné. Z tohoto důvodu je potřeba hledat vhodnou zvířecí alternativu a krysí i myší modely se v případě zkoumání SR zdají být ideální. Lidská serinracemasa má 89% aminokyselinovou identitu s myší a 92% identitu s krysí serinracemasou. Přímé srovnání enzymových vlastností bylo zatím provedeno pouze u myší a lidské serinracemasy [11] (viz kap. 2.1.2.). Jejich rekombinantní formy byly exprimovány v bakteriích *E.coli* a následně porovnávány z různých katalytických hledisek, přičemž pozorovány byly jen dva výraznější rozdíly.

Za prvé, na rozdíl od hSR nebyla myší SR (mSR) schopná eliminovat D-serin na pyruvát. Za druhé, inhibitory testované na obou enzymech byly ve všech případech účinnější při racemizačních reakcích katalyzovaných hSR. Celkově však z této studie vyplynulo, že využití mSR pro testování potenciálních inhibitorů a další účely je možné [11].

## 2.2. D-serin

### 2.2.1. Obecné vlastnosti serinu

Serin, systematickým názvem kyselina 2-amino-3-hydroxypropanová, je hydrofilní aminokyselina o sumárním vzorci  $C_3H_7NO_3$  a relativní molekulové hmotnosti 105,09. V buňce se při fyziologickém pH 7,3 vyskytuje v podobě amfiontu. Jeho izoelektrický bod má hodnotu 5,68.

Serin obsahuje jedno stereogenní centrum (atom uhlíku v  $\alpha$ -poloze), existuje tedy ve dvou enantiomerních formách: L- a D-. Jednotlivé stereoizomery se neliší svými fyzikálními ani chemickými vlastnostmi, každý však plní jinou biologickou funkci.

### 2.2.2. Výskyt a funkce D-serinu v savčím organismu

D-serin se v lidském těle vyskytuje převážně v mozku, kde tvoří asi jednu čtvrtinu koncentrace celkového serinu [33]. V malých množstvích byl též identifikován ve slinách, krevním séru a moči [34].

Od okamžiku, kdy byl D-serin poprvé detekován v savčím těle (viz kap. 2.1.), se začalo spekulovat, jakou funkci by tato aminokyselina mohla v organismu mít. Díky studii Klecknera a Dingledina (viz kap. 2.1.) byl D-serin označován jako možný koagonista *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů, které se v mozku podílí na vzniku a posilování nervových spojů (více viz kap. 2.2.4.). Do té doby byl však v této souvislosti často uváděn glycin [6]. Řada vědeckých skupin se proto zaměřila na porovnávání těchto dvou potenciálních koagonistů NMDA receptorů.

Schell a kol. studovali imunohistochemickou lokalizaci D-serinu, glycinu a NMDA receptorů v krysím mozku [35]. Zatímco distribuce D-serinu korespondovala s výskytem NMDA receptorů téměř perfektně, distribuce glycinu s ním korelovala jen částečně. V některých oblastech bohatých na NMDA receptory však D-serin naopak vůbec detekován nebyl. V těchto místech byl ale hojně zastoupen právě glycin [35]. Výsledky zmíněných experimentů tedy vedly k závěru, že v jednotlivých částech mozku se na potenciaci NMDA receptorů podílí odlišní koagonisté.

Matsiu a kol. porovnávali schopnost D-serinu a glycinu aktivovat rekombinantní NMDA receptory. K buňkám expresního systému oocytů africké žáby *Xenopus laevis* přidávali vždy stejné množství potenciálních koagonistů a pozorovali odezvy NMDA



receptorů. Zjistili, že afinita D-serinu k těmto receptorům je až třikrát větší než je tomu tak u glycinu [36]. Jiní autoři pracující s odlišnými experimentálními podmínkami naopak poukazují na vyšší afinitu glycinu [37].

Mothet a kol. sledovali funkčnost NMDA receptorů po enzymovém odstranění veškerého endogenního D-serinu z krysích mozkových řezů a buněčných kultur [38]. I přesto, že hladina glycinu zůstala nezměněna, schopnost NMDA receptorů přenášet nervový vzruch se výrazně snížila. Podíl D-serinu na nervovém přenosu zprostředkovaném NMDA receptory potvrzuje i zatím poslední práce řešící toto téma. V ní se Basu a kol. zaměřili na pozorování chování geneticky modifikovaných myší, které se díky neschopnosti produkovat serinracemasu vyznačovaly sníženými koncentracemi D-serinu v mozku [39]. I v tomto případě zůstalo množství glycinu beze změny. Navzdory tomu byly zmíněné myši mírně hyperaktivní, což je typická vlastnost jedinců trpících sníženou funkcí NMDA receptorů [39].

Zatím tedy nelze jednoznačně říci, zda se při aktivaci NMDA receptorů mohou uplatňovat oba dva zmínění koagonisté, nebo je pro správnou funkci těchto receptorů důležitý jen jeden z nich.

## **2.2.3. Metabolismus D-serinu**

### **2.2.3.1. Biosyntéza D-serinu**

Současné studie jasně dokazují, že D-serin vzniká v savčím organismu majoritně z L-serinu reakcí katalyzovanou serinracemasou [40]. Koncentrace D-serinu v mozku je však u myší postrádajících schopnost produkovat zmíněný enzym (tzv. knock-out myši) snížena pouze z 90 %. Zbylých 10 % tedy musí mít jiný původ.

V této souvislosti se spekuluje o zisku D-serinu z potravy (viz kap. 2.1.1.). Prvotní pozorování provedené Oldedorfem sice ukázaly, že permeabilita hematoencefalické bariéry pro D-serin je velmi malá [5], tuto skutečnost ale v roce 2005 přesvědčivě vyvrátila práce Bauera a kol. [41]. Využití exogenního D-serinu centrální nervovou soustavou se tak zdá být vysoce pravděpodobné.

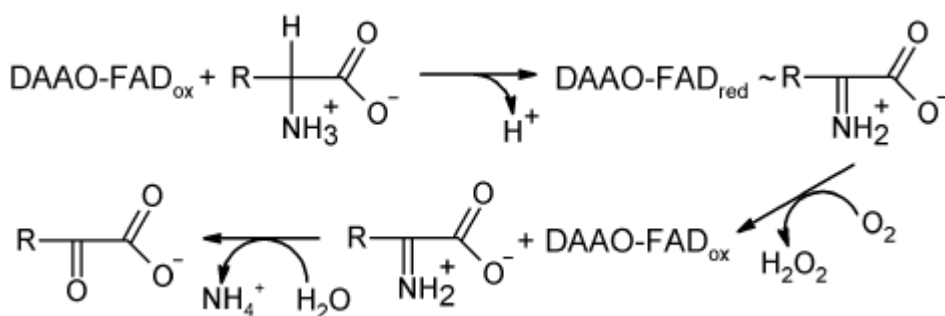
Nelze však ani vyloučit, že je určitý podíl D-serinu v mozku syntetizován alternativními metabolickými dráhami. Doposud byly testovány dvě možnosti – tvorba D-serinu z fosfoserinu pomocí fosfoserinfosfatasy a vznik D-serinu během degradace glycinu glycinsynthasou.

Využití fosfoserinfosfatasy (EC 3.1.3.3) bylo studováno Woodem a kol. [42]. Bylo zjištěno, že tento enzym sice umí syntetizovat D-serin, jako substrát ale potřebuje D-fosfoserin. Ten se ovšem v savčím těle s největší pravděpodobností nevyskytuje [43].

Nadějnějším doplňkovým zdrojem D-serinu se proto zdá být glycin. Glycinsynthasa neboli tzv. glycin štěpící systém (z angl. glycine cleavage system = GCS) je multiproteinový komplex, jehož primární funkcí je degradovat glycin na oxid uhličitý a amoniak [44]. Detailnějším zkoumáním tohoto enzymového systému Iwamou a kol. se ukázalo, že v přítomnosti GCS se může glycin přeměňovat též na D-serin [45]. Nebylo však zcela objasněno, zda syntézu D-serinu katalyzuje GCS sám či ve spojení s dalším enzymem (např. serinhydroxymethyltransferasou, EC 2.1.2.1) [45]. Samozřejmě nelze ani vyloučit, že D-serin vzniká jinou, dosud neobjevenou cestou.

### 2.2.3.2. Degradace D-serinu

Stejně tak jako biosyntéza, i degradace D-serinu je stále otázkou vědeckého výzkumu. Předpokládá se ale, že katabolismus D-serinu zajišťuje enzym zvaný D-aminokyselina:O<sub>2</sub>-oxidoreduktasa (deaminující) (DAAO z angl. D-amino acid oxidase, EC 1.4.3.3) [46]. Tento biokatalyzátor vyžaduje pro svou aktivitu FAD a není specifický pouze pro D-enantiomer serinu, nýbrž deaminuje všechny neutrální D-aminokyseliny za vzniku α-oxokyselin. Obecné schéma reakce katalyzované DAAO je zobrazeno na obr.4.

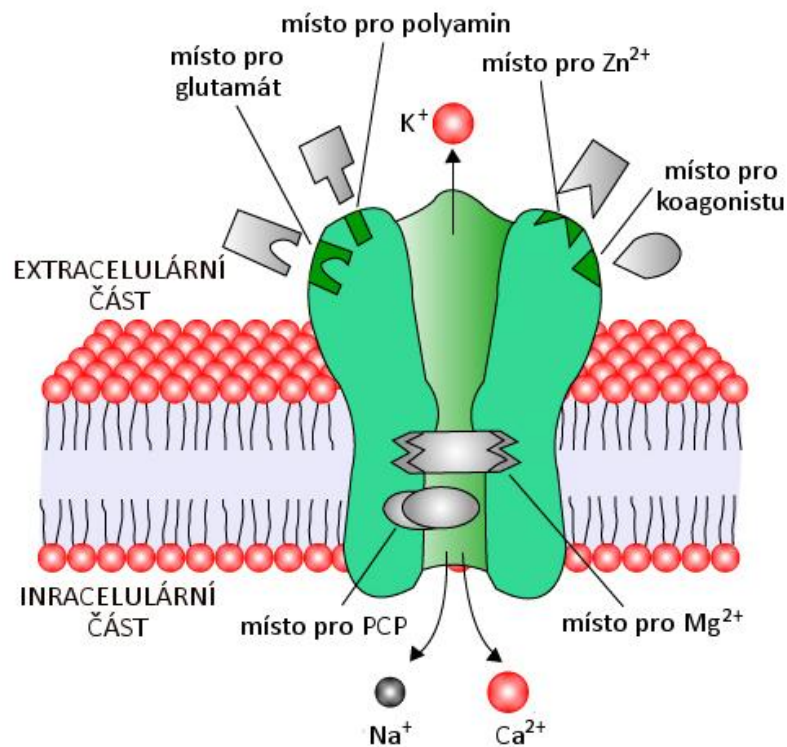


**Obr.4: Obecné schéma reakce katalyzované D-aminokyselina:O<sub>2</sub>-oxidoreduktasou (deaminující).** Převzato z [47].

## 2.2.4. N-methyl-D-aspartátové receptory

### 2.2.4.1. Obecný úvod

N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou transmembránové ionotropní receptory pro hlavní excitační neurotransmitter v CNS kyselinu glutamovou. Svě jméno získaly podle uměle syntetizovaného analogu této kyseliny, ke kterému jsou velmi citlivé [48]. Z obr. 5 je patrné, že NMDA receptory fungují jako iontové kanály a jsou propustné nejen pro draselné a sodné, ale i vápenaté kationty. Tato permeabilita je zároveň regulována celou řadou chemických sloučenin, které působí na různých vazebných místech receptoru.



**Obr. 5: Schematické znázornění NMDA receptoru.** NMDA receptor je iontový kanál propouštějící sodíkové a vápenaté kationty dovnitř buňky a draselné kationty ven z buňky. Aby byl zmíněný receptor pro tyto ionty permeabilní, musí na něm být navázán glutamát (sůl kyseliny glutamové) a jeden z koagonistů (D-serin nebo glycin). Zároveň musí dojít k uvolnění hořečnatého kationtu, který v klidovém stavu kanál blokuje. Funkci NMDA receptoru stimuluje specifické polyaminy a inhibují zinečnaté ionty a fencyklidiny (PCP) [49, 50]. Převzato a upraveno z [51].

Prvotním předpokladem pro aktivaci NMDA receptoru je přítomnost hlavního agonisty (kyseliny glutamové) a koagonisty (D-serinu či glycinu, viz kap. 2.2.2.), bez

něhož nemůže dojít k otevření iontového kanálu. Splnění těchto podmínek však ještě stále nemusí vést k přenosu signálu. Kanál je totiž za normálního membránového potenciálu blokován hořčnatým iontem a odblokovává se pouze tehdy, když dojde k částečné depolarizaci neuronu [48]. Tu musí zařídit jiný kanál prostřednictvím jiných synaptických okruhů.

#### **2.2.4.2. Struktura NMDA receptorů**

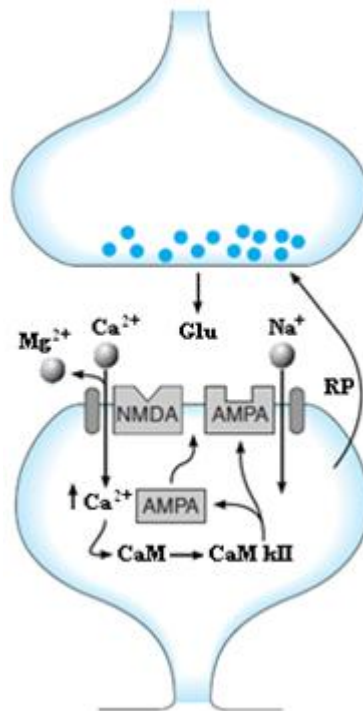
NMDA receptory jsou heterotetramery, které se skládají ze dvou NR1 podjednotek a dvou NR2 podjednotek. NR1 podjednotky existují v osmi isoformách a obsahují vazebné místo pro koagonistu (D-serin či glycin, viz kap. 2.2.2.). Naopak podrodina NR2 sestává ze čtyř strukturně odlišných podjednotek označených NR2A-NR2D a je zodpovědná za navázání kyseliny glutamové. Různé kombinace zmíněných podjednotek vedou k různým heteromerním NMDA receptorům, které se liší svou prostupností, citlivostí na hořčnatý ion či farmakologickým profilem [37].

Současné studie uvádějí existenci též NR3 podjednotek, které mohou v některých oblastech mozku nahradit NR2 podjednotky. Substituce jedné NR3 za jednu NR2 pak způsobí výrazné snížení permeability receptoru pro  $Ca^{2+}$  ionty [52]. Velmi překvapující vlastnosti ale mají především receptory ve složení NR1/NR3. Ty totiž ztrácí afinitu ke kyselině glutamové i k NMDA a jako excitační neurotransmitter využívají glycin, přičemž D-serinem jsou inhibovány [53].

#### **2.2.4.3. Funkce NMDA receptorů**

Hlavní funkcí NMDA receptorů je jejich zapojení do tzv. dlouhodobé potenciace (z angl. long-term potentiation, LTP), která je jednou z molekulárních podstat učení a paměti. LTP je dlouhodobé zvýšení postsynaptické odpovědi na krátkou vysokofrekvenční presynaptickou stimulaci [48]. Mechanismus vzniku LTP je znázorněn na obr. 6 (str. 15).

Na dlouhodobé potenciaci se kromě NMDA receptorů podílí též AMPA receptory (jméno podle  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionové kyseliny, která AMPA receptor dokáže aktivovat), další ionotropní receptory pro kyselinu glutamovou (více viz kap. 2.3.2.). Vylití tohoto neurotransmiteru z presynaptické buňky do synaptické štěrbině odstartuje signální kaskádu, jíž výsledkem je zvýšení počtu AMPA receptorů v postsynaptické membráně a zvětšení jejich citlivosti pro kyselinu glutamovou, což vede k posílení nervového spoje mezi participujícími neurony [50].



**Obr. 6: Mechanismus vzniku dlouhodobé potenciace.** Kyselina glutamová (Glu) uvolněná z presynaptického neuronu se váže na NMDA (zkratka z angl. *N*-methyl-D-aspartate) a AMPA (zkratka z angl.  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptory postsynaptického dendritu. Díky aktivaci AMPA receptorů dochází k depolarizaci membrány dendritu a uvolnění  $Mg^{2+}$  iontu z NMDA kanálu. To umožní  $Ca^{2+}$  iontům protékat skrz NMDA receptor a navázat se na kalmodulin (CaM). Tento komplex následně aktivuje  $Ca^{2+}$ -kalmodulinkinasu II (CaM kII), která ovlivňuje AMPA receptory, a to dvěma různými způsoby. Buď fosforyluje receptor již přítomný v postsynaptické membráně, čímž zvýší jeho vodivost pro  $Na^+$  ionty, nebo podpoří pohyb nově nasyntetizovaného AMPA receptoru do synaptické membrány. Zvýšená koncentrace  $Ca^{2+}$  zároveň umožní uvolnění retrográdních posílů (RP), kteří způsobí dlouhodobé uvolňování kvant glutamátu z presynaptického neuronu. Převzato a upraveno z [48].

LTP se projevuje v různých částech nervového systému. Za posledních třicet let byla podrobně studována na širokém spektru zvířecích modelů, myši a opic nevyjímaje. Až současné studie využívající neinvazivní techniky umožňují alespoň omezené zkoumání i na lidech. Ukazuje se ale, že se molekulární mechanismy LTP mezi jednotlivými savci příliš neliší [54].

#### **2.2.4.4. Neuropatologie způsobená dysfunkcí NMDA receptorů**

Bylo popsáno mnoho nemocí spojených s dysfunkcí NMDA receptorů. Snížená aktivita těchto receptorů byla pozorována u schizofrenie. Naopak zvýšená aktivita NMDA receptorů hraje roli v neuropatologii při mozkové ischemii, epilepsii, polyneuropatii, amyotropní laterální skleróze, roztroušené skleróze, Alzheimerově chorobě, Parkinsonově nemoci, Huntingtonově chorobě a dalších [37, 55].

Navzdory tomu, že se jednotlivé nemoci spojené s hyperfunkcí NMDA receptorů svými příznaky výrazně liší, jejich molekulární podstata je alespoň částečně shodná. Důsledkem nadměrné stimulace NMDA receptorů je totiž zvýšení jejich permeability, což vede k masivnímu toku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky. Vysoká intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů poté způsobí aktivaci proteas, nukleas a fosfolipas, které začnou štěpit různé buněčné struktury. To má za následek buď nevratné poškození buňky, nebo dokonce její smrt [50].

Vývoj látek snižujících hyperaktivitu NMDA receptorů je proto velmi důležitý. Současný vědecký výzkum je zaměřen především na takové sloučeniny, které působí přímo na NMDA receptory. Rozlišují se tři druhy těchto antagonistů – kompetitivní antagonisté nasedající na vazebné místo agonisty či koagonisty, nekompetitivní alosterické inhibitory ovlivňující kterékoli jiné extracelulární místo NMDA receptorů a blokátory NMDA receptorů vázající se do iontového kanálu. Účinky celé řady zmíněných sloučenin byly studovány na zvířecích modelech a díky pozitivním výsledkům se začaly provádět i klinické testy. Ty však nebyly ve většině případů úspěšné. Použité léky totiž buď příznaky dané choroby skoro vůbec nezmírňovaly, nebo naopak snižovaly aktivitu NMDA receptorů téměř úplně a způsobovaly tak nežádoucí vedlejší účinky [55].

Využití NMDA receptorů jako cílů terapeutického zásahu je tedy doposud spíše neúspěšné. Proto je potřeba hledat alternativní cesty, kterými by se stimulace zmíněných receptorů dařila ovlivňovat. V tomto ohledu se právě serinracemasa zdá být nadějí. Její selektivní inhibicí by totiž mohlo dojít k úbytku D-serinu v CNS, což by mohlo vést ke snížení permeability NMDA receptorů.

### **2.2.5. D-serin v neuropatologii**

Vzhledem k tomu, že se D-serin podílí na přenosu nervového vzruchu zprostředkovaného NMDA receptory, předpokládá se jeho role i v neuropatologiích způsobených dysfunkcí těchto receptorů. Zmíněná domněnka byla zatím potvrzena v případech schizofrenie, Alzheimerovy choroby, amyotropní laterální sklerózy, mozkové ischemie a epilepsie [33, 34, 56]. Velmi prostudovaná je především schizofrenie.

V roce 1998 přišli Tsai a kol. s poznatkem, že přidáním D-serinu do antipsychotik sloužících pro léčbu schizofrenie se příznaky typické pro tuto chorobu výrazně zmírní [57]. Roli D-serinu ve zmíněném onemocnění poté na počátku 21. století potvrdilo hned několik publikací. Autoři v nich sledovali koncentraci D-serinu v cerebrospinální tekutině a krevním séru u pacientů postižených schizofrenií a u zdravých jedinců, přičemž ve všech případech byla hladina D-serinu u nemocných výrazně nižší [58, 59]. Zda je tento trend způsoben sníženou aktivitou SR jako syntetického enzymu D-serinu, zvýšenou aktivitou DAAO jako enzymu degradujícího D-serin, či něčím úplně jiným, je otázkou dalšího vědeckého výzkumu. Na toto téma již sice existuje několik prací, výsledky v nich dosažené jsou ale často nejednoznačné a leckdy si i odporují [56].

## 2.3. Epilepsie

### 2.3.1. Definice epilepsie a její epidemiologie

Epilepsie je onemocnění projevující se opakovaným výskytem záchvatů, které se objevují bez zjevné příčiny [60, 61]. Epileptický záchvat je nespecifická reakce na dráždění centrálního nervového systému, charakterizovaný poruchami vědomí, křečemi, mimovolnými pohyby, vegetativními projevy a poruchou paměti [61, 62]. Vznik epileptického záchvatu ovlivňuje celá řada faktorů. Mezi nejdůležitější patří dědičnost, věk, nadměrná konzumace alkoholu, nedostatek spánku, fyzická vyčerpanost, užívání některých léků (např. antidepresiv, antipsychotik a jiných), mechanické poškození mozku, atd. [60].

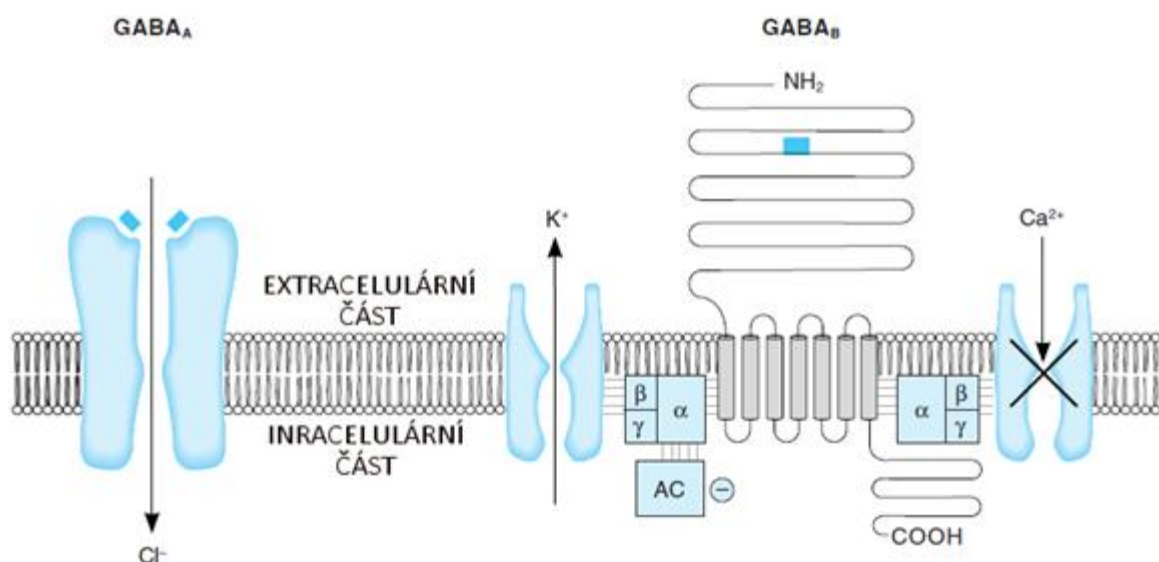
Pravděpodobnost, že se během 80 let života objeví alespoň jeden epileptický záchvat, je téměř 10 % [61]. Jak již vyplývá z definice epilepsie, výskyt takového záchvatu zdaleka nemusí vést k rozvoji tohoto onemocnění. I přesto epilepsií trpí až 5 % populace, přičemž nejčastěji jsou postiženi muži a děti. U více než poloviny případů dětských epilepsií však dojde během dospívání k úplnému vymizení záchvatů. Naopak některé epilepsie mohou vzniknout až v průběhu puberty a ty poté přetrvávají až do dospělosti. Zvýšený výskyt epileptických záchvatů je též pozorován u osob starších šedesáti let [60].

### 2.3.2. Molekulární podstata epilepsie

Molekulární podstata epileptických záchvatů ještě není zcela objasněna. Předpokládá se ale, že zvýšenou dráždivost centrální nervové soustavy způsobuje nerovnováha mezi inhibicí a excitací na synaptické úrovni [61]. Přenos nervového vzruchu pomocí excitačních neurotransmiterů totiž musí být regulován, což zajišťují právě inhibiční neurotransmitery.

Hlavním inhibičním neurotransmiterem v CNS je kyselina  $\gamma$ -aminomáselná, která aktivuje GABA (zkratka z angl.  $\gamma$ -amino butyric acid) receptory [48]. Tyto receptory jsou dvojího typu – iontové kanály (tzv. GABA<sub>A</sub> receptory) a receptory spojené s G-proteiny (tzv. GABA<sub>B</sub> receptory) [48] (viz obr. 7, str. 19).





**Obr. 7: Schéma obou typů GABA receptorů.** GABA<sub>A</sub> receptory jsou iontové kanály propustné pro Cl<sup>-</sup> ionty. Naopak GABA<sub>B</sub> receptory jsou metabotropní a přes heterodimerní (2 × αβγ) protein G způsobují zvýšení vodivosti K<sup>+</sup> kanálů a inhibici adenylátcyklasy (AC), což znemožňuje syntézu cAMP, které by aktivovalo signální kaskádu vedoucí k otevření Ca<sup>2+</sup> kanálu. Převzato z [48].

Zatímco stimulací GABA<sub>A</sub> receptorů dochází ke zvýšenému toku Cl<sup>-</sup> iontů do buňky, aktivace GABA<sub>B</sub> receptorů způsobuje zvýšený tok K<sup>+</sup> iontů z buňky za současného omezení vstupu Ca<sup>2+</sup> iontů do buňky. Výsledkem těchto pochodů je poté přerušení přenosu nervového vzruchu [48].

Hlavním excitačním neurotransmiterem v CNS je kyselina glutamová, která kromě NMDA receptorů (viz kap. 2.2.4.) aktivuje i AMPA receptory. AMPA receptory jsou jednoduché kationové kanály, které umožňují tok K<sup>+</sup> iontů z buňky a Na<sup>+</sup> iontů do buňky [48]. Spolu s NMDA receptory se podílejí na dlouhodobé potenciaci, což je nejspíše i jejich hlavní funkce v CNS (viz kap. 2.2.4.).

Epileptický záchvat pravděpodobně zapříčiňují jednak nedostatečná funkce GABA receptorů, jednak zvýšená funkce NMDA a AMPA receptorů. Zkoumání molekulární podstaty epilepsie ovšem zdaleka není u konce. I přesto se již nyní zdají být zmíněné receptory vhodnými cíli terapeutického zásahu (více viz kap. 2.3.3.).

### **2.3.2.1. D-serin v epilepsii**

Doposud byly publikovány čtyři práce, které připouští možnou úlohu D-serinu v epilepsii. Löscher a kol. i Singh a kol. podávali D-serin injekčně do CNS myši, přičemž zjistili, že zvýšená koncentrace této aminokyseliny v mozku způsobuje epileptické záchvaty [63, 64]. Xie a kol. zase pracovali s myšmi postrádajícími schopnost syntetizovat přenašeč malých neutrálních aminokyselin, což vedlo k akumulaci D-serinu v extracelulárním prostoru a opět epileptickým záchvatům [65]. Zatím poslední experiment dokazující souvislost mezi D-serinem a epilepsií provedli Liu a kol., kteří při zkoumání histochemických řezů mozků myši s indukovanou epilepsií pozorovali zvýšenou koncentraci D-serinu vedoucí k hyperaktivaci NMDA receptorů [66].

### **2.3.3. Současná léčba epilepsie**

Většina současných léků na epilepsii (tzv. antiepileptik) byla objevena náhodou a jejich mechanismus účinku byl tak dlouhou dobu neznámý. Až díky pokroku molekulárně-biologických metod se nyní daří cíle terapeutického zásahu identifikovat (viz kap. 2.3.2.). Přitom se zjišťuje, že některá antiepileptika působí hned na dva cíle najednou [67]. Například felbamát a topiramát, léky využívané při rezistentních formách epilepsie, jsou známy svou schopností stimulovat GABA receptory. Oba navíc inhibují aktivity glutamátových receptorů – felbamát inhibuje NMDA receptory a topiramát AMPA receptory [67].

Při léčbě epilepsie se k jednotlivým pacientům přistupuje individuálně. Je na uvážení lékaře, jaký z řady dostupných léků vybere. Hlavním vodítkem jsou v tomto případě pozorované příznaky a nález na EEG. Většinou se ale volí mezi kyselinou valproovou (či jejími deriváty) a karbamazepinem. Kromě cíleného, pravidelného a dlouhodobého užívání antiepileptika je nutné dodržovat správnou životosprávu. Ta zahrnuje především pravidelný rytmus spánku a zákaz jakéhokoli alkoholu. Pokud není dosaženo dostatečného terapeutického účinku, je nutno použít jiný lék – zpravidla fenytoin nebo primadon. Tato antiepileptika jsou však již poměrně toxická a při dlouhodobém užívání mohou způsobit nežádoucí vedlejší účinky [60, 68].

Selže-li i druhý lék, musí lékař přistoupit k indikaci více medikamentů najednou. Pokud se ani tak nedaří záchvaty farmakologicky kompenzovat, začíná se přemýšlet o chirurgickém odstranění epileptogenního ložiska. Farmakorezistentní epilepsií trpí až 25 %

nemocných. Pouze 1/5 z nich ale splňuje veškeré předpoklady pro epileptochirurgický zákrok [69]. Ostatním neumí současná medicína pomoci. Doufejme proto, že zmíněný rychlý rozvoj molekulárně-biologických metod bude pokračovat i nadále a brzy se tak dočkáme takových léků, které zkvalitní život i pacientům s doposud neléčitelnou formou epilepsie.

### 3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

1. Ověřit citlivost a specifitu dostupných monoklonálních protilátek proti lidské serinracemase a na základě získaných výsledků vybrat tu nejvhodnější pro imunochemickou detekci hSR ve tkáních epileptických pacientů.
2. Ověřit metodiku zpracování a analýzy vzorků mozkových tkání získaných z operací ve Fakultní nemocnici Motol a Vojenské nemocnici ve Střešovicích a přispět tak k lepší interpretaci výsledků při porovnávání obsahu serinracemasy v epileptických a zdravých tkáních.
3. Pokusit se změřit aktivitu hSR ve tkáňových lyzátech s doposud nejlepším substrátem L-serin-*O*-sulfátem. V případě neúspěchu poté provést pokusy, které by neměřitelnost aktivity hSR vysvětlily.

## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1. Materiály

#### 4.1.1. Chemikálie

|  |   |
|--|---|
| aceton .....   | Lachema (Brno, CZ)                      |
| acetonitril .....  | Penta (Praha, CZ)                       |
| akrylamid .....  | Sigma (St. Louis, USA)                  |
| ATP .....  | Sigma (St. Louis, USA)                  |
| azid sodný .....   | Penta (Praha, CZ)                       |
| dihydrogenfosforečnan draselný .....                                     | Lachema (Brno, CZ)                      |
| DNPH (dinitrofenylhydrazin) .....  | Fluka (Buchs, Švýcarsko)                |
| dodecylsulfát sodný .....  | Sigma (St. Louis, USA)                  |
| DTT (dithiotreitol) .....  | Sigma (St. Louis, USA)                  |
| ethanol.....   | Penta (Praha, CZ)                       |
| FDAA (1-fluoro-2-4-dinitrofenyl-5-L-alanin amid), Marfeyho činidlo ..... | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| glycerol .....   | Penta (Praha, CZ)                       |
| glycin .....   | Duchefa (Haarlem, Nizozemsko)           |
| HEPES (kyselina N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová]).....  | Sigma (St. Louis, USA)                  |
| hydrogenfosforečnan sodný .....  | Lachema (Brno, CZ)                      |
| hydrogenuhličitan draselný .....   | Lachema (Brno, CZ)                      |
| hydroxid draselný .....  | Penta (Praha, CZ)                       |
| hydroxid sodný .....   | Penta (Praha, CZ)                       |
| L-erythro-hydroxyaspartát.....   | Wako(Osaka, Japonsko)                   |
| chlorid hořečnatý .....  | Lachema (Brno, CZ)                      |
| chlorid sodný.....   | Lachema (Brno, CZ)                      |
| isobutyl-L-cystein .....   | Fluka (Buchs, Švýcarsko)                |
| kyselina boritá.....   | USB (Cleveland, USA)                    |
| kyselina chloristá .....   | Penta (Praha, CZ)                       |
| kyselina chlorovodíková .....  | Penta (Praha, CZ)                       |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| kyselina octová .....                       | Penta (Praha, CZ)             |
| kyselina sírová .....                       | Penta (Praha, CZ)             |
| 2-merkapt ethanol .....                     | Sigma (St. Louis, USA)        |
| methanol.....                               | Penta (Praha, CZ)             |
| N,N'-methylen-bis(akrylamid).....           | USB (Cleveland, USA)          |
| octan sodný, trihydrát .....                | Penta (Praha, CZ)             |
| OPA (ortho-ftaldialdehyd).....              | Sigma (St. Louis, USA)        |
| peroxodisíran amonný.....                   | Serva (Heidelberg, SRN)       |
| PLP (pyridoxal-5'-fosfát) .....             | Sigma (St. Louis, USA)        |
| L-serin, D-serin.....                       | Sigma (St. Louis, USA)        |
| L-serin-O-sulfát .....                      | Bachem (Bubendorf, Švýcarsko) |
| TBA (hydroxid tetrabutylamonný) .....       | Sigma (St. Louis, USA)        |
| TEA (triethanolamin).....                   | Sigma (St. Louis, USA)        |
| TEMED (tetramethylethylendiamin) .....      | Fluka (Buchs, Švýcarsko)      |
| Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) ..... | USB (Cleveland, USA)          |
| Tween 20.....                               | USB (Cleveland, USA)          |
| triton X-100.....                           | Serva (Heidelberg, SRN)       |

#### 4.1.2. Přístroje

|                     |   |
|---------------------|---|
| blotovací přístroj: | Trans-Blot SD, Bio-Rad (Hercules, USA)  |
| CCD kamera:         | LAS-3000 CCD Camera, Fujifilm (Tokyo, Japonsko)   |
| centrifugy:         | Biofuge Pico, Heraeus Instruments (Hanau, SRN)<br>Centifuge 5415R, Eppendorf (Hamburg, SRN)                                 |
| homogenizátory:     | Disperser T10 basic, IKA (Staufen, SRN)<br>TissueLyser II, QIAGEN (Düsseldorf, SRN)   |
| HPLC:               |   |
| – přístroje:        | Alliance HPLC High Throughput, Waters (Milford, USA)<br>Rapid Resolution LC Series 1200, Agilent (Santa Clara, USA)         |
| – detektory:        | Dual Wavelength Absorbance Detector, Waters (Milford, USA)<br>1200 Series Fluorescence Detector, Agilent (Santa Clara, USA) |
| laboratorní váhy:   | AE 163, Mettler (Greifensee, Švýcarsko)<br>EK-400H, A&D Engineering, Inc. (San Jose, USA)                                   |

pH-metr: 9450 pH meter, Unicam (Cambridge, UK)  
 sonikátor: Soniprep 150, Sanyo (Tokyo, Japonsko)  
 spektrofotometr: GENios, Tecan (Männedorf, Švýcarsko)  
 termostaty: Grant Instruments Ltd. (Shepreth, UK)  
 Thermomix BU, B.Braun (Melsungen, SRN)  
 vertikální polyakrylamidová elektroforéza: Sigma (St. Louis, USA)

### 4.1.3. Programy

BLAST: National Center of Biotechnology Information  
 Image Quant: TotalLab Ltd (Newcastle, UK)  
 Microsoft Office Excel 2007: Microsoft (Redmond, USA)

### 4.1.4. Ostatní

Blocker Casein..... Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)  
 bromfenolová modř..... Sigma (St. Louis, USA)  
 BSA (hovězí sérový albumin)..... Imuna (Šarišské Michaľany, SK)  
 centrifugační nádoby s filtrem ..... Amicon, Millipore Corporation (Billerica, USA)  
 Coomassie Brilliant Blue G-250..... Serva (Heidelberg, SRN)  
 Complete Mini, EDTA free, Protease inhibitor cocktail tablets.....  
 ..... Roche (Basilej, Švýcarsko)  
 chemoluminiscenční substrát WestFemto ..... Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)  
 kolony HPLC:  
 – ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (2,1×100 mm), částičky náplně 1,7 µm.....  
 ..... Agilent (Santa Clara, USA)  
 – Symmetry C<sub>18</sub> (4,6×250 mm), částičky náplně 5 µm..... Waters (Milford, USA)  
 mikrotitrační destička, 96 jamek..... Koh-i-noor (České Budějovice, CZ)  
 monoklonální protilátka proti β-aktinu..... Sigma (St. Louis, USA)  
 nerezová ocelová kulička..... QIAGEN (Düsseldorf, SRN)  
 sekundární protilátka (kozí protilátka proti myšímú séru konjugovaná s křenovou  
 peroxidasou)..... Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)  
 SDS marker..... Serva (Heidelberg, SRN)

## 4.2. Metody

### 4.2.1. Homogenizace tkáně

#### *Roztoky:*

pufir A:                   50mM TEA pH 7,4  
                              5mM NaCl  
                              1% Triton X-100  
                              Complete Mini, EDTA free, Protease inhibitor cocktail tablets  
                              (1 tableta na 10ml pufiru)

#### *Postup:*

Ze zmraženého vzorku tkáně byl uříznut přiměřený kousek, který byl převeden do 1,5ml či 2ml plastové mikrozkušavky. Byl přidán 1 ml pufiru A a tkáň byla homogenizována buď homogenizérem Disperser T10 a sonikátorem, nebo použitím pouze homogenizátoru TissueLyser II (více viz. kap. 4.2.1.1. a 4.2.1.2.). Homogenát byl centrifugován (16100×g, 60 min, 4°C) a supernatant přenesen do nové mikrozkušavky. Dříve bylo zjištěno, že D-serin i serinracemasa jsou tímto postupem beze zbytku převedeny do roztoku, dále se tedy pracovalo jen se supernatantem (tzv. tkáňovým lyzátem). Peleta byla dvakrát promyta 0,5 ml 50mM TEA, centrifugována a zamražena pro případnou analýzu pomocí SDS-PAGE (více viz kap. 4.2.5.).

#### **4.2.1.1. Homogenizace pomocí homogenizátoru Disperser T10 basic a sonikátoru**

Nůž homogenizátoru byl umístěn do mikrozkušavky s tkání a pufrem A. Přístroj byl nastaven na nejnižší rychlost 1 (8000 otáček za minutu), která byla postupně zvyšována až k nejvyšší rychlosti 6 (30000 otáček za minutu). Při této rychlosti byla tkáň ponechána homogenizovat asi 5 s. Směs byla následně umístěna na led. Poté byly vzorky sonikovány 30 s a opět umístěny na led. Homogenát byl dále zpracováván dle postupu uvedeného v kap. 4.2.1.

#### **4.2.1.2. Homogenizace pomocí homogenizátoru TissueLyser II**

Do 2ml mikrozkušavky obsahující tkáň a pufir A byla vložena nerezová ocelová kulička, mikrozkušavka byla uzavřena a vložena do homogenizátoru TissueLyser II.



Vzorek byl homogenizován 2-5 minut při frekvenci 30 Hz. Homogenát byl dále zpracováván dle postupu uvedeného v kap. 4.2.1.

## **4.2.2. Příprava tkáňových lyzátů pro měření koncentrace D-serinu**

Pro měření koncentrace D-serinu ve tkáňových lyzátech pomocí RP-HPLC byla nežádoucí přítomnost rozpustných proteinů. Pro jejich odstranění z roztoku byly využívány dva postupy – srážení proteinů z roztoku nebo ultrafiltrace. Následná RP-HPLC analýza byla prováděna Radkem Součkem z ÚOCHB AV ČR.

### **4.2.2.1. Srážení proteinů z roztoku**

K 50  $\mu$ l tkáňového lyzátu bylo přidáno 50  $\mu$ l 1,875M HClO<sub>4</sub> a směs byla důkladně promíchána automatickou pipetou. Poté bylo přidáno 50  $\mu$ l 1,875M KOH (pro zneutralizování kyseliny). Roztok byl centrifugován (16100 $\times$ g, 20 min, 4°C), supernatant přenesen do nové mikrokumavky a zamražen pro pozdější RP-HPLC analýzu.

### **4.2.2.2. Ultrafiltrace**

Do ultrafiltrační centrifugační nádoby s filtrem tvořeným celulosou a s limitem propustnosti 3 kDa (Amicon, Millipore Corporation, USA) bylo pipetou přeneseno 500  $\mu$ l tkáňového lyzátu. Nádobka byla umístěna do mikrokumavky a centrifugována (13000 $\times$ g, 20 min, 4°C). Retenát o objemu přibližně 100  $\mu$ l byl následně přenesen do nové mikrokumavky a zamražen pro pozdější RP-HPLC analýzu.

## **4.2.3. Zpracování buněk HEK293**

Pro pokusy byly používány dva druhy buněk HEK293 (buněčná linie odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk) – buňky exprimující mSR (HEK+) a buňky postrádající schopnost exprimovat mSR (HEK-). Transfekce buněk vektorem obsahujícím DNA kódující mSR byla již dříve provedena v naší laboratoři Cyrilem Bařinkou a Kvídem Stříšovským. Nárůst, sklizení a promytí buněk HEK+ i HEK- obstarala Jana Starková.

Ke zmraženému sedimentu buněk byl přidán 1 ml pufru A (viz kap. 4.2.1.) a buňky byly homogenizovány pomocí homogenizátoru TissueLyser II (viz kap. 4.2.1.2.). Následně byl homogenát centrifugován (16100 $\times$ g, 2 hod., 4°C) a supernatant (tzv. buněčný lyzát) přenesen do nové mikrokumavky.

#### 4.2.4. Stanovení celkové koncentrace proteinů

Koncentrace proteinu byla stanovena metodou podle Bradfordové. Pro kalibraci byla použita kalibrační řada standardu hovězího seralbuminu (bovine serum albumine, BSA).

Do 96 jamek mikrotitrační destičky Koh-i-noor (České Budějovice, CZ) bylo pipetováno 160  $\mu$ l vody. Do jamek A1 a A2 bylo přidáno 160  $\mu$ l roztoku BSA o koncentraci 50  $\mu$ g/ml a vzniklé směsi byly důkladně promíchány multikanálovou pipetou. Tím vznikl roztok BSA o koncentraci 25  $\mu$ g/ml, z něhož bylo multikanálovou pipetou odebráno 160  $\mu$ l do jamek B1 a B2. Následně byly vzniklé směsi opět promíchány. Tímto způsobem bylo ředěno do té doby, než byly získány roztoky standardu o koncentracích 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,57 a 0,78  $\mu$ g/ml (přesné rozmístění vzorků na destičce viz Tab. 4).

**Tab. 4: Rozložení vzorků na 96-ti jamkové destičce Koh-i-noor.** Jednotlivé vzorky jsou označeny zkratkami VZ1 – VZ8. Čísla uvedená pod zkratkami znázorňují relativní koncentrace proteinů v daném roztoku. Původní roztok vzorku měl vždy relativní koncentraci rovnou 100. Kromě standardu je tedy možné na jedné destičce měřit až 8 různých vzorků, přičemž od každého lze v rámci kalibrační křivky získat až šest hodnot koncentrací proteinů.

|   |                           |                           |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|   | 1                         | 2                         | 3             | 4             | 5             | 6             | 7             | 8             | 9             | 10            | 11            | 12            |
| A | BSA<br>25<br>$\mu$ g/ml   | BSA<br>25<br>$\mu$ g/ml   | VZ 1<br>20    | VZ 1<br>20    | VZ 2<br>20    | VZ 2<br>20    | VZ 3<br>20    | VZ 3<br>20    | VZ 4<br>20    | VZ 4<br>20    | VZ 5<br>20    | VZ 5<br>20    |
| B | BSA<br>12,5<br>$\mu$ g/ml | BSA<br>12,5<br>$\mu$ g/ml | VZ 1<br>4     | VZ 1<br>4     | VZ 2<br>4     | VZ 2<br>4     | VZ 3<br>4     | VZ 3<br>4     | VZ 4<br>4     | VZ 4<br>4     | VZ 5<br>4     | VZ 5<br>4     |
| C | BSA<br>6,25<br>$\mu$ g/ml | BSA<br>6,25<br>$\mu$ g/ml | VZ 1<br>0,8   | VZ 1<br>0,8   | VZ 2<br>0,8   | VZ 2<br>0,8   | VZ 3<br>0,8   | VZ 3<br>0,8   | VZ 4<br>0,8   | VZ 4<br>0,8   | VZ 5<br>0,8   | VZ 5<br>0,8   |
| D | BSA<br>3,13<br>$\mu$ g/ml | BSA<br>3,13<br>$\mu$ g/ml | VZ 1<br>0,16  | VZ 1<br>0,16  | VZ 2<br>0,16  | VZ 2<br>0,16  | VZ 3<br>0,16  | VZ 3<br>0,16  | VZ 4<br>0,16  | VZ 4<br>0,16  | VZ 5<br>0,16  | VZ 5<br>0,16  |
| E | BSA<br>1,57<br>$\mu$ g/ml | BSA<br>1,57<br>$\mu$ g/ml | VZ 1<br>0,032 | VZ 1<br>0,032 | VZ 2<br>0,032 | VZ 2<br>0,032 | VZ 3<br>0,032 | VZ 3<br>0,032 | VZ 4<br>0,032 | VZ 4<br>0,032 | VZ 5<br>0,032 | VZ 5<br>0,032 |
| F | BSA<br>0,78<br>$\mu$ g/ml | BSA<br>0,78<br>$\mu$ g/ml | VZ 6<br>0,032 | VZ 6<br>0,16  | VZ 6<br>0,8   | VZ 6<br>4     | VZ 6<br>20    | VZ 7<br>0,032 | VZ 7<br>0,16  | VZ 7<br>0,8   | VZ 7<br>4     | VZ 7<br>20    |
| G | voda                      | voda                      | VZ 6<br>0,032 | VZ 6<br>0,16  | VZ 6<br>0,8   | VZ 6<br>4     | VZ 6<br>20    | VZ 7<br>0,032 | VZ 7<br>0,16  | VZ 7<br>0,8   | VZ 7<br>4     | VZ 7<br>20    |
| H | voda                      | voda                      | VZ 8<br>0,032 | VZ 8<br>0,16  | VZ 8<br>0,8   | VZ 8<br>4     | VZ 8<br>20    | VZ 8<br>0,032 | VZ 8<br>0,16  | VZ 8<br>0,8   | VZ 8<br>4     | VZ 8<br>20    |

Do jamek A3-A12 a dále F6,G6,F12,G12 a H6,H12 bylo pipetováno 40  $\mu$ l vzorků a vzniklé směsi byly důkladně promíchány multikanálovou pipetou. 40  $\mu$ l těchto roztoků bylo poté stejnou pipetou přeneseno do následujících jamek (přesné rozmístění vzorků na destičce viz Tab. 4, str. 28). Vzniklé směsi byly opět promíchány a v řadě bylo pokračováno do té doby, než bylo získáno 5 různých koncentrací každého vzorku.

Poté bylo do všech jamek přidáno 40  $\mu$ l Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) a roztoky byly důkladně promíchány multikanálovou pipetou. Následně byly změřeny absorbance vzniklých směsí při 595 nm na spektrofotometrické čtečce GENios (Tecan) a koncentrace příslušející jednotlivým hodnotám těchto absorbcí byly vyhodnoceny v programu Magellan (Tecan).

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

*Roztoky:*

separační gel (12%): 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8)

2,73 ml 44% akrylamidové směsi: 42,8 g akrylamid  
1,2 g N',N'-bisakrylamid  
56 ml destilované vody

100  $\mu$ l 10% (w/v) SDS

doplněno destilovanou vodou do 10 ml

10  $\mu$ l TEMED

100  $\mu$ l 10% (w/v) APS

zaostřovací gel (5%): 1,25 ml 1M Tris (pH 6,8)

0,75 ml 44% akrylamidové směsi: 42,8 g akrylamid  
1,2 g N',N'-bisakrylamid  
56 ml destilované vody

50  $\mu$ l 10% (w/v) SDS

doplněno destilovanou vodou do 5 ml

10  $\mu$ l TEMED

50  $\mu$ l 10% (w/v) APS

vzorkový pufr (6×): 10,5 ml 1M Tris (pH 6,8)  
9 g glycerol  
3 g SDS  
4,8 ml 2-merkapt ethanol  
3,6 mg bromfenolová modř  
doplněno destilovanou vodou do 10ml

elektrodový pufr (5×): 15,1 g Tris  
94 g glycin  
5 g SDS  
900 ml destilovaná voda (výsledné pH 8,8 nebylo upravováno)

*Postup:*

Mezi sestavená skla pro vertikální elektroforézu (Sigma) bylo nalito přibližně 3,6 ml roztoku pro separační gel a převrstveno etanolem. Po ztuhnutí gelu byl zbylý etanol vylit, volný prostor vypláchnut destilovanou vodou a vysušen kouskem filtračního papíru. Následně byl až po okraj skel nalit zaostřovací gel, do kterého byl vnořen hřeben pro vzorkové jamky. Po ztuhnutí tohoto gelu byl hřeben vyjmut a skla přemístěna do přístroje pro vertikální elektroforézu (Sigma), jehož horní i dolní komora byla naplněna elektrodovým pufrem (zředěným v poměru 1:4 s destilovanou vodou). Vzduchové bubliny, které se vytvořily mezi skly obsahující gel, byly odstraněny injekční stříkačkou.

Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 5:1, denaturovány asi pětiminutovými varem na vodní lázni a nanесeny na gel. Po zapnutí aparatury se proteiny v nich obsažené rozdělily podle svých relativních molekulových hmotností. Separace proteinů probíhala přibližně 90 min při konstantním napětí 130 V v zaostřovacím gelu a 150 V v separačním gelu. Detekce proteinů byla provedena buď barvením Commassie Brilliant Blue a následným odbarvováním 10% kyselinou octovou, nebo přenosem na nitrocelulosovou membránu a následnou imunodetekcí.

#### 4.2.6. Metoda elektropřenosu proteinů na nitroceluloseovou membránu (Western Blot)

##### *Roztoky:*

blotovací pufr:           192 mM glycin  
                                  25 mM Tris-HCl  
                                  10% (v/v) metanol  
                                  0,1% (w/v) SDS

PBS:                        137 mM NaCl  
                                  2,7 mM KCl  
                                  10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                  1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                  upraveno na pH 7,4

vyvolávací směs:        chemiluminiscenční substrát pro křenovou peroxidasu (horseradish peroxidase, HRP) WestFemto, Thermo Fisher Scientific

##### *Postup:*

Gel z ukončené elektroforézy byl spolu s nitroceluloseovou membránou a čtyřmi filtračními papíry ekvilibrován ve 100 ml blotovacího pufru po dobu asi 5 min. Na anodu blotovacího přístroje (Bio-Rad) byly poté umístěny dva filtrační papíry, následovaly nitroceluloseová membrána, gel a opět dva filtrační papíry. Případné vzduchové bubliny byly odstraněny válcováním zkumavkou s rovnými okraji a blotovací přístroj byl uzavřen. Přenos proteinů probíhal 15 min při konstantním napětí 15 V.

Po ukončení přenosu byla nitroceluloseová membrána přemístěna do lázně se 4 ml roztoku čistého mléčného kaseinu (Casein Blocker, Thermo Fisher Scientific), kde byla ponechána po dobu 0,5 – 3 hodin. Následně byla přidána primární protilátka – 2C2.1 (supernatant, celková koncentrace proteinů 110 mg/ml) a 3B7.1 (supernatant, celková koncentrace proteinů 140 mg/ml) v poměru 1:20, BD (250 µg/ml) a anti β-aktin (koncentrace nebyla výrobcem uvedena) v poměru 1:100 (více o jednotlivých primárních protilátkách viz kap. 5.1.). S touto protilátkou byla membrána inkubována při laboratorní teplotě přes noc. Druhý den byla membrána promývána v PBS + 0,05% Tween-20

3×10 min. Poté byly opět přidány 4 ml Casein Blockeru a 2 µl 10× zředěné sekundární protilátky (kozí protilátka proti myšímú séru konjugovaná s křenovou peroxidasou, Thermo Fisher Scientific). Inkubace probíhala při laboratorní teplotě přibližně 2 hodiny. Následně byla membrána znovu promyta v PBS + 0,05% Tween-20 3×10 min. Nakonec byla membrána 5 min inkubována v 750 µl vyvolávací směsi, osušena filtračním papírem a vložena do průhledné fólie. Chemiluminiscence byla měřena na přístroji LAS-3000 CCD Camera (Fujifilm, Japonsko).

## 4.2.7. Měření aktivity SR

### 4.2.7.1. Aktivita hSR ve tkáňovém lyzátu (L-serin-O-sulfát jako substrát)

#### *Roztoky:*

reakční pufr:                    250 mM HEPES, pH 8  
    25 µM PLP  
    2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
    12,5 mM DTT  
    2,5 mM ATP

derivatizační činidlo: 0,3 g DNPH  
    1,5 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
    7,5 ml etanolu  
    2,2 ml vody

mobilní fáze A:                50 mM TBA  
    upraveno na pH 4,3 nasyceným roztokem CH<sub>3</sub>COOH

mobilní fáze B:                metanol

promývací roztok pro nástřikovou jehlu:        50% metanol

#### *Aktivitní reakce:*

Do každé 1,5ml mikrozkušavky bylo pipetováno 40 µl reakčního pufru a 50 µl tkáňového lyzátu. Do víčka mikrozkušavky bylo pipetováno buď 5 µl 100 mM

L-serin-*O*-sulfátu (LSOS) a 5 µl HPLC vody, nebo 5 µl 100 mM LSOS a 5 µl 20 mM L-erythro-3-hydroxyaspartátu (inhibitor), nebo 10 µl vody. Celkový objem reakční směsi činil vždy 100 µl. Reakce byly zahájeny centrifugací (0×g – 8000×g, 10 s, laboratorní teplota), inkubovány ve vodní lázni při 37°C 15 hodin, zastaveny 20 µl 2M HClO<sub>4</sub> a poté opět centrifugovány (16100×g, 5 min, laboratorní teplota). Pro zneutralizování kyseliny bylo přidáno 20 µl 2M KOH a směs byla zamražena pro pozdější analýzu. Jako kontroly sloužily stejně připravené roztoky, u nichž byla místo 50 µl tkáňového lyzátu přidána voda.

#### *Prekolonová derivatizace:*

Směs byla vyjmuta z mrazícího boxu a centrifugována (16500×g, 5 min, laboratorní teplota). Mezi tím bylo derivatizační činidlo 10× zředěno 50% (v/v) MeOH ve vodě a pipetováno po 25 µl do nových 1,5ml mikrozkušavek. Následně bylo přidáno 25 µl vzorku a 450 µl 50% (v/v) MeOH ve vodě. Směs byla důkladně promíchána a ponechána 5 minut stát při laboratorní teplotě. Před aplikací na RP-HPLC byly vzorky centrifugovány (16100×g, 10 min, 4°C) a 400 µl supernatantu bylo poté přeneseno do nových mikrozkušavek bez víček. Z důvodu rychlého rozkladu produktů bylo vždy derivatizováno max. 30 vzorků.

#### *Analýza reakčních směsí pomocí HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC):*

Vzorky byly analyzovány pomocí přístroje Alliance HPLC (Waters) a detektoru Dual Wavelength Absorbance Detector (Waters). Před vlastním měřením byla kolona (Symmetry C<sub>18</sub>, 4,6×250 mm, rozměr částecek náplně 5 µm, Waters) ekvilibrována při průtoku 1 ml/min startovní směsí (60% mobilní fáze A, 40% mobilní fáze B). V programu Alliance (Waters) byly nastaveny všechny potřebné parametry analýzy. Při typickém měření bylo 50 µl vzorku analyzováno při průtoku 1 ml/min a gradientu 65 – 85 % mobilní fáze B (1 % za minutu). Délka eluce jednoho vzorku trvala 32 min. Produkty dělení byly detekovány absorpcí při 366 nm.

#### 4.2.7.2. Aktivita mSR v buněčném lyzátu (L-serin jako substrát)

##### *Roztoky:*

reakční pufr: 250 mM HEPES, pH 8

25  $\mu$ M PLP

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

12,5 mM DTT

2,5 mM ATP

derivatizační činidlo: 10 mg Marfeyho činidla (1-fluoro-2-4-dinitrofenyl-5-L-alanin amid, FDAA, Thermo Fisher Scientific) v 1 ml acetonu

mobilní fáze A: 50 mM kyselina octová  
upraveno na pH 4,4 nasyceným roztokem NaOH

mobilní fáze B: metanol

promývací roztok pro nástřikovou jehlu: 50% (v/v) metanol ve vodě

##### *Aktivitní reakce:*

Postupovalo se analogicky podle postupů popsaných v kap. 4.2.7.1. Místo 50  $\mu$ l tkáňového lyzátu se do reakční směsi přidávalo 50  $\mu$ l buněčného lyzátu a místo 100 mM LSOS se jako substrát používal 100 mM L-serin.

##### *Prekolonová derivatizace:*

Směs byla vyjmuta z mrazícího boxu a centrifugována (16500 $\times$ g, 5 min, laboratorní teplota). Mezi tím bylo do nových 1,5ml mikrozkušavek pipetováno 5  $\mu$ l 1 M KHCO<sub>3</sub>. Následně bylo přidáno 10  $\mu$ l vzorku a 25  $\mu$ l roztoku Marfeyho činidla, čímž vznikl žlutě zbarvený roztok. Reakce byly inkubovány ve 45°C 45 min. Během této doby došlo k barevné změně směsi na oranžovou. Zastavením reakce 5  $\mu$ l 2M HCl se roztok opět zbarvil do žluta. Nakonec bylo přidáno 405  $\mu$ l 50% (v/v) MeOH ve vodě. Před aplikací na RP-HPLC byly vzorky centrifugovány (16100 $\times$ g, 10 min, 4°C) a 300  $\mu$ l supernatantu bylo poté přeneseno do nových mikrozkušavek bez víček.



#### *Analyza reakčních směsí pomocí HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC):*

Byl použit stejný přístroj a detektor jako je uveden v kap. 4.2.7.1. Kolona (Symmetry C<sub>18</sub> Column, 4,6 x 250 mm, rozměr částecek náplně 5 μm, Waters) byla ekvilibrována při průtoku 1 ml/min startovní směsí (65 % mobilní fáze A, 35 % mobilní fáze B). V programu Alliance (Waters) byly nastaveny všechny potřebné parametry analýzy. Při typickém měření bylo 50 μl vzorku analyzováno při průtoku 1 ml/min a stálém složení mobilní fáze (65 % mobilní fáze A, 35 % mobilní fáze B). Délka eluce jednoho vzorku trvala 20 min. Produkty dělení byly detekovány absorpcí při 340 nm.

#### **4.2.7.3. Aktivita mSR v živých buňkách HEK293**

##### *Roztoky:*

- borátový pufr: 0,4M kyselina boritá  
upraveno na pH 9,0 nasyceným roztokem NaOH
- derivatizační činidlo: 10mg/ml OPA  
10mg/ml isobutyl-L-cystein  
50% (v/v) acetonitril ve vodě
- mobilní fáze A: 9,66 g octan sodný, trihydrát  
0,24 ml kyselina octová  
několik kapek azidu sodného  
doplněno vodou na 1 l  
upraveno na pH 6,0 nasyceným roztokem NaOH nebo CH<sub>3</sub>COOH
- mobilní fáze B: 100% acetonitril

##### *Práce s buňkami*

Experimenty byly prováděny v naší laboratoři Janou Jiráskovou. Buňky HEK+ i HEK- byly nechány růst v 6-ti jamkové destičce (Koh-i-noor, České Budějovice, CZ) do 75% konfluence (medium mělo objem asi 1 ml). Následně bylo vždy do dvou jamek přidáno buď 20 μl 100mM L-serinu a 20 μl vody, nebo 20 μl 100mM L-serinu a 20 μl 100mM L-erythro-3-hydroxyaspartátu. Buňky v posledních dvou jamkách sloužily jako kontrolní, protože k nim bylo přidáno pouze 40 μl vody. Po třech dnech bylo medium

odsáto a pomocí ultrafiltrace byly odstraněny nežádoucí vysokomolekulární látky (viz kap. 4.2.2.2).

*Analýza reakčních směsí pomocí HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC):*

Analýza byla provedena Radkem Součkem z ÚOCHB AV ČR pomocí přístroje Rapid Resolution LC Series 1200 (Agilent) a detektoru 1200 Series Fluorescence Detector, (Agilent). Pro separaci byla využita kolona ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> (2,1×100 mm, rozměr částecek náplně 1,7 μm, Agilent), která byla ekvilibrována při průtoku 0,5 ml/min startovní směsí (94 % mobilní fáze A, 6 % mobilní fáze B). V přístroji probíhala též prekolonová derivatizace, kdy bylo smícháno 0,7 μl borátového pufru, 0,1 μl vzorku a 0,2 μl derivatizačního činidla a před vlastní nástřikem bylo 2 minuty vyčkáno. Typická analýza byla prováděna při průtoku 0,5 ml/min a gradientu 6 – 13 % mobilní fáze B (2 % za minutu). Délka eluce jednoho vzorku trvala 10 min. Produkty dělení byly detekovány fluorescencí (excitace při 334 nm, emise při 443 nm).

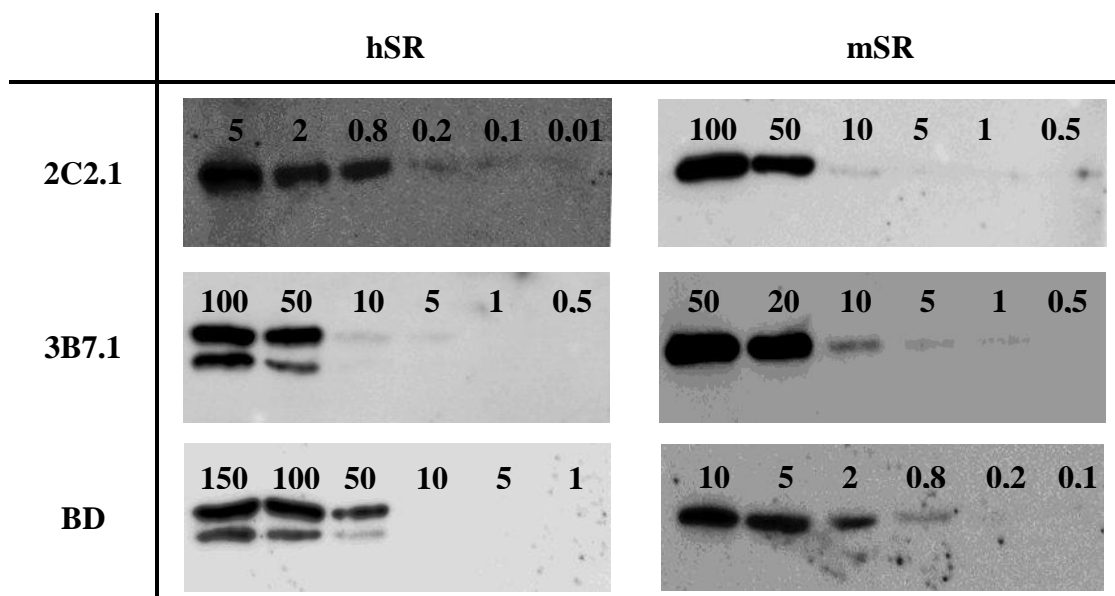
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Charakterizace primárních protilátek

K dispozici byly tři monoklonální protilátky proti serinracemase – dvě s označením 2C2.1 a 3B7.1 vyrobené v Laboratoři molekulární imunologie ÚMG AV ČR a jedna komerčně dostupná od firmy BD Biosciences (v dalším textu označována jako BD). Zatímco protilátky 2C2.1 a 3B7.1 byly připraveny proti denaturované lidské serinracemase (hSR), protilátka BD je určena pro imunodetekci myší serinracemasy (mSR). Podle údaje výrobce je ale její epitop v oblasti mezi 127. a 248. aminokyselinou mSR. Vzhledem k tomu, že má tato sekvence s hSR 90% identitu (zjištěno v programu BLAST), rozhodli jsme se vyzkoušet i tuto protilátku.

#### 5.1.1. Citlivost protilátek

Pro určení detekčního limitu jednotlivých protilátek byly použity rekombinantní proteiny hSR a mSR, které byly připraveny v naší laboratoři v bakteriích *E.coli*.

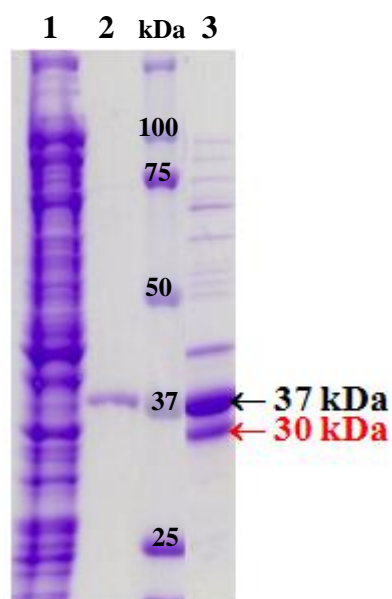


**Obr. 8: Porovnání citlivostí jednotlivých protilátek vůči rekombinantní hSR a mSR.** Vzorky (mSR nebo hSR) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.), přeneseny na nitrocelulosovou membránu a detekovány příslušnou protilátkou (2C2.1, 3B7.1 nebo BD) (kap. 4.2.6.). Čísla znázorňují množství proteinu (v ng), která byla nanášena do jednotlivých drah.

Z obr. 8 (str. 37) je patrné, že největší citlivost vůči hSR má protilátka 2C2.1, jejíž detekční limit je 0,1 – 0,2 ng. Vůči mSR je nejcitlivější protilátka BD s detekčním limitem 0,8 ng. Stanovení mSR protilátkou 2C2.1 a hSR protilátkou BD naopak není příliš vhodné, v těchto případech jsou totiž detekční limity velmi vysoké. Protilátka 3B7.1 má přibližně stejnou citlivost pro oba studované proteiny. Její detekční limity jsou pro hSR 5 ng a pro mSR 1 ng.

### 5.1.2. Přibližná lokalizace epitopu protilátky 2C2.1

Doposud neznáme přesný epitop ani jedné ze studovaných monoklonálních protilátek proti serinracemase. Provedené pokusy ovšem poukázaly na přibližnou lokalizaci epitopu protilátky 2C2.1. Jak již bylo uvedeno v kap. 5.1.1., rekombinantní hSR byla připravena v bakteriích *E.coli* Kateřinou Purchartovou a Terezou Emmerovou v průběhu pokročilých praktik z biochemie. Během purifikace zmíněného proteinu se nepodařilo odstranit degradační produkt o velikosti přibližně 30 kDa (viz obr. 9).

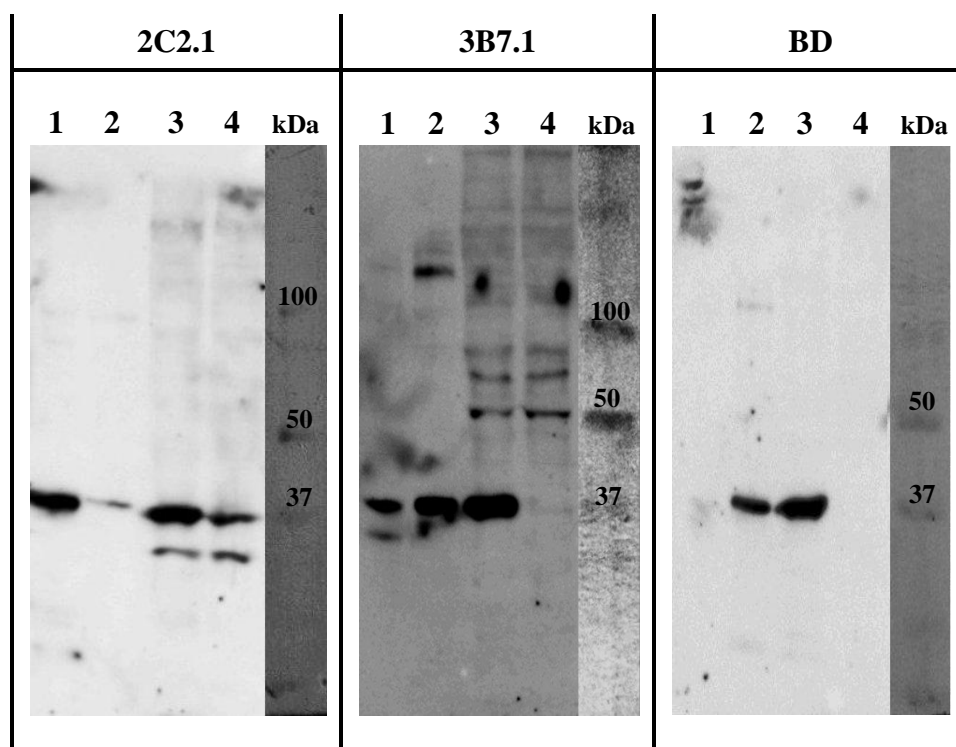


**Obr. 9: Výsledek purifikace hSR provedené Kateřinou Purchartovou a Terezou Emmerovou.** Vzorčky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a detekovány barvením Commasie Brilliant Blue (kap. 4.2.5.). Dráhy: 1 – buněčný lyzát před purifikací (max. množství na dráhu); 2 – standard hSR (2 µg); 3 – výsledný roztok hSR po purifikaci (max. množství na dráhu). Během purifikace se nepodařilo získat čistý protein, kromě hSR o molekulové hmotnosti 37 kDa obsahoval finální roztok i degradační produkt o přibližné molekulové hmotnosti 30 kDa (viz dráha 3).

Analýzou tohoto produktu N-koncovou proteinovou sekvenací a hmotnostní spektrometrií se zjistilo, že se jedná o protein s aminokyselinovou sekvencí hSR bez C-terminálního konce (chybí 24 aminokyselin). Zatímco protilátky BD a 3B7.1 tento degradační produkt rozpoznávají, protilátka 2C2.1 nikoli (viz obr. 8, str. 37). Domníváme se tedy, že epitop protilátky 2C2.1 je lokalizován právě na C-terminálním konci hSR.

### 5.1.3. Specifita protilátek

Specifita jednotlivých protilátek byla ověřena pomocí lyzátů buněk exprimujících (HEK+) a neexprimujících (HEK-) myší serinracemasu (kap. 4.2.3.) metodou elektropřenosu proteinů (kap. 4.2.5. a 4.2.6.). Na gel bylo vždy naneseno tolik vzorku, aby celkové množství proteinů na jednu dráhu činilo 70  $\mu$ g.

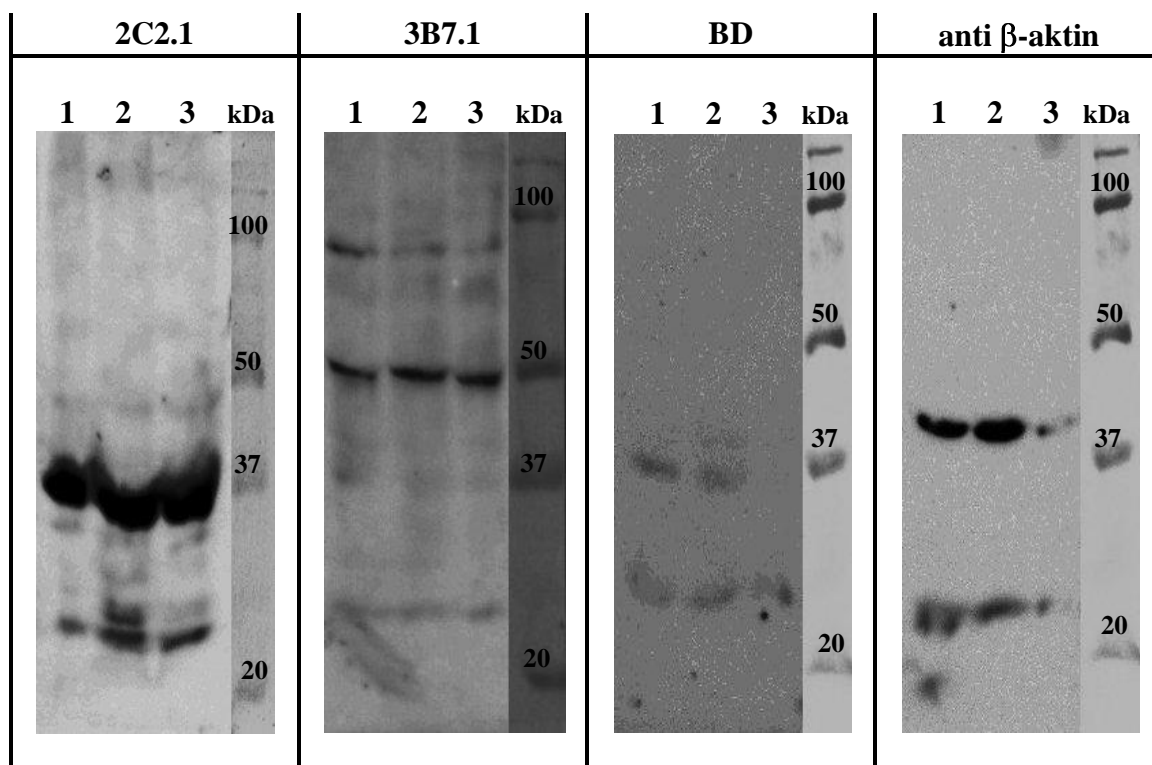


**Obr. 10: Porovnání specifity jednotlivých protilátek proti serinracemase.** Vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.), přeneseny na nitrocelulosovou membránu a detekovány příslušnou protilátkou (2C2.1, 3B7.1 nebo BD) (kap. 4.2.6.). Dráhy: 1 – rekombinantní hSR (10 ng); 2 – rekombinantní mSR (10 ng), 3 – lyzáty buněk HEK293 exprimující mSR (celkové množství proteinu v dráze 70 $\mu$ g); 4 – lyzáty buněk HEK293 neexprimujících mSR (celkové množství proteinu v dráze 70 $\mu$ g).

Z obr. 10 (str. 39) je patrné, že protilátka 3B7.1 rozpoznává kromě mSR (37 kDa) též neznámé proteiny o přibližných molekulových hmotnostech 50 kDa, 75 kDa a 90 kDa. Aplikací protilátky BD je viditelný pouze signál v oblasti molekulové hmotnosti 37 kDa, který náleží mSR. Protilátka 2C2.1 poté rozpoznává mSR (37 kDa) a protein o přibližné molekulové hmotnosti 30 kDa. Zajímavý výsledek poskytuje tato protilátka v případě lyzátu buněk HEK–, protože zde detekuje protein o molekulové hmotnosti 37 kDa. Vzhledem k tomu, že buňky HEK– postrádají schopnost exprimovat myší SR, přítomnost mSR lze vyloučit. Může se ovšem jednat o lidskou SR. Bylo totiž prokázáno, že se v ledvinách (a tedy i v embryonálních buňkách ledvin) hSR vyskytuje [28].

Předpoklad, že protilátka 2C2.1 rozpoznává skutečně hSR a nikoli nějaký jiný protein o stejné molekulové hmotnosti, podporuje několik dalších skutečností. Za prvé, protilátka 2C2.1 je vůči hSR vysoce citlivá (kap. 5.1.1.), je proto schopna detekovat i velmi malá množství proteinu. Za druhé, aminokyselinová sekvence oblasti hSR obsahující epitop protilátky 2C2.1 (viz kap. 5.1.2.) byla vložena do programu BLAST. Nebyl však nalezen jediný protein s molekulovou hmotností 37 kDa, který by měl s touto sekvencí alespoň částečnou identitu. Za třetí, během měření aktivit mSR (více viz kap. 5.3.2.) u buněk HEK293 se zjistilo, že i buňky HEK– produkují určité množství D-serinu. Ten by ale nemohl vznikat, kdyby nebyla přítomna serinracemasa. Za čtvrté, na gel bylo naneseno takového množství lyzátu buněk HEK–, aby byla protilátka 3B7.1 schopna hSR detekovat (její citlivost vůči hSR je totiž nižší než je tomu tak u protilátky 2C2.1, viz kap. 5.1.1.). Po elektropřenosu proteinů byl poté skutečně viditelný signál v oblasti molekulové hmotnosti 37 kDa.

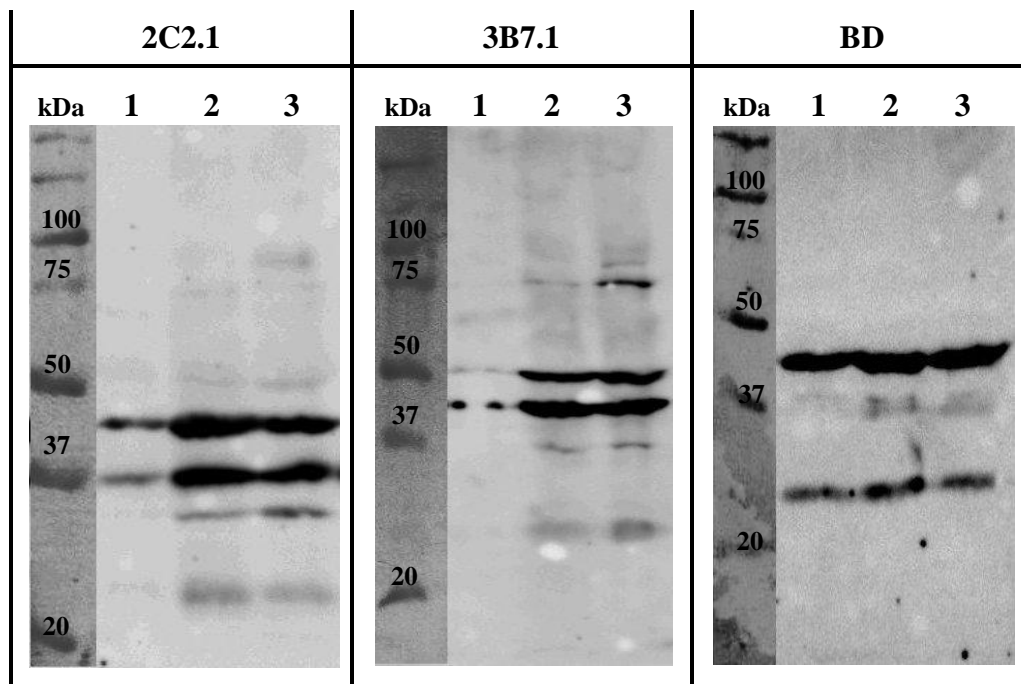
Po provedených experimentech byly protilátky vyzkoušeny též na vzorcích resekované mozkové tkáně pacienta s farmakorezistentní epilepsií, který byl operován na spolupracujícím pracovišti Fakultní nemocnice Motol, oddělení dětské neurologie (odběr vzorků z pacientů byl schválen Etickou komisí FN Motol). Výsledky pokusu jsou znázorněny na obr. 11 (str. 41). Protilátky BD a 3B7.1 rozpoznávaly hSR o molekulové hmotnosti 37 kDa jen velmi slabě. Po aplikaci protilátky 3B7.1 byly opět patrné signály v oblastech molekulových hmotností 50 kDa, 75 kDa a 90 kDa. Stejně tak, jako v případě pokusů s buňkami HEK293, rozpoznávala protilátka 2C2.1 hSR (37 kDa) a protein o molekulové hmotnosti asi 30 kDa. Všechny tři protilátky navíc detekovaly protein o přibližné molekulové hmotnosti 25 kDa.



**Obr. 11: Imunochemická analýza vzorků resekované mozkové tkáně pacienta s farmakorezistentní epilepsií.** Vzorky byly naneseny na 12% polyakrylamidový gel (celkové množství proteinů na jednu dráhu činilo vždy 70  $\mu$ g), rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.), přeneseny na nitroceluloseovou membránu a detekovány příslušnou protilátkou (2C2.1, 3B7.1, BD nebo anti  $\beta$ -aktin) (kap. 4.2.6.). Jednotlivé dráhy obsahují vzorky pacienta pod kódovým označením: dráha 1 – ANKO2, dráha 2 – ANKO3, dráha 3 – ANKO4.

Pro kvantifikaci serinracemasy v jednotlivých vzorcích je potřeba vztáhnout její množství k určitému vnitřnímu standardu. Tím byl zvolen  $\beta$ -aktin. Bylo proto potřeba ověřit též specifitu protilátky proti  $\beta$ -aktinu (v textu označována jako anti  $\beta$ -aktin). Z obr. 11 je zřejmé, že tato protilátka rozpoznává kromě  $\beta$ -aktinu (43 kDa) i protein o přibližné molekulové hmotnosti 25 kDa.

Obr. 12 (str. 42) znázorňuje výsledky po aplikaci protilátek proti hSR i  $\beta$ -aktinu zároveň. Pokud porovnáme obr. 11 a obr. 12, dojdeme k závěru, že všechny zmíněné protilátky rozpoznávají kromě svých antigenů i stejný 25 kDa protein. Jedná se tedy pravděpodobně o nějakou nespecifickou interakci s jiným buněčným proteinem.



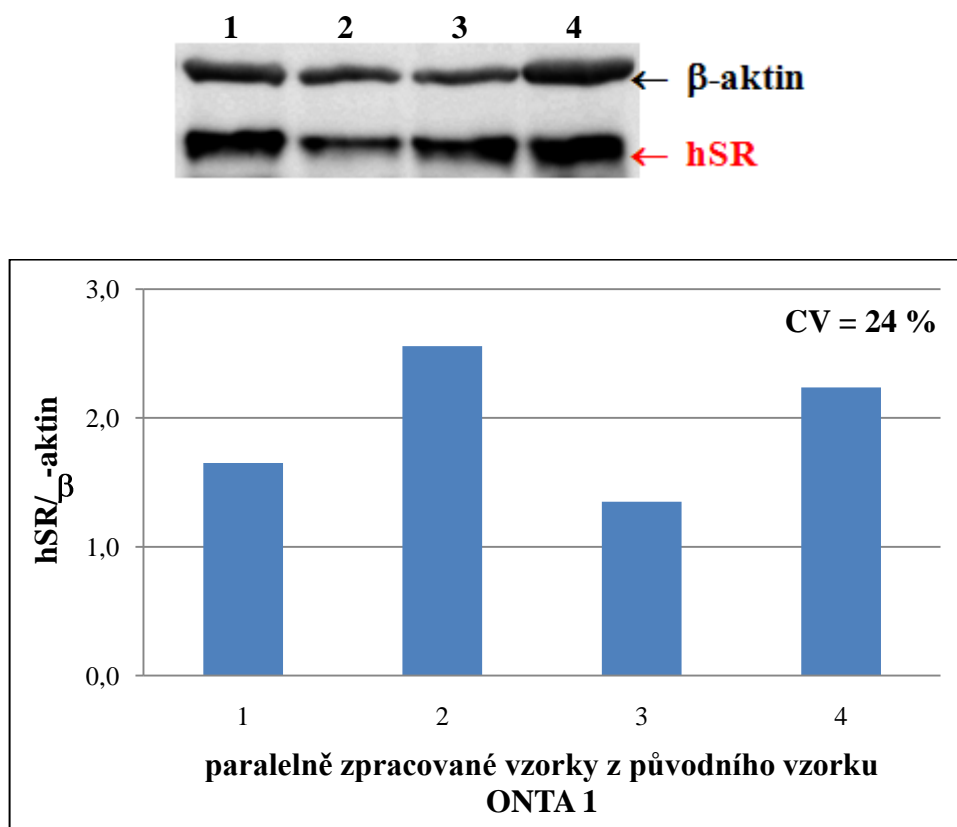
**Obr. 12: Imunochemická analýza vzorků resekované mozkové tkáně pacienta s farmakorezistentní epilepsií s využitím  $\beta$ -aktinu jako vnitřního standardu.** Vzorky byly naneseny na 12% polyakrylamidový gel (celkové množství proteinů na jednu dráhu činilo vždy 70  $\mu$ g), rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.), přeneseny na nitrocelulosovou membránu a detekovány protilátkou proti hSR i  $\beta$ -aktinu zároveň (2C2.1 a anti  $\beta$ -aktin nebo 3B7.1 a anti  $\beta$ -aktin nebo BD a anti  $\beta$ -aktin) (kap. 4.2.6.). Jednotlivé dráhy obsahují vzorky pacienta pod kódovým označením: dráha 1 – ANKO2, dráha 2 – ANKO3, dráha 3 – ANKO4.

## 5.2. Zpracování a analýza vzorků tkání – přesnost použitých metod

Vzorky byly získány z operací provedených ve Fakultní nemocnici Motol a Vojenské nemocnici ve Střešovicích. Pacienti byli operováni z důvodu neúspěchu farmakologické léčby. Operace spočívala v odstranění epileptogenního ložiska, přičemž okrajové části této tkáně většinou epilepsií zasaženy nebyly (rozlišení epileptické tkáně od tkáně zdravé bylo provedeno bezprostředně po každé operaci patologem doc. MUDr. Josefem Zámečnickem, Ph.D.). Aby bylo možné posoudit, zda se v obsahu serinracemasy liší epileptická tkáň od tkáně epilepsií nezasažené, bylo nutné ověřit přesnost používaných metod. Za tímto účelem byl jeden ze vzorků pacienta pod kódovým označením ONTA zpracován paralelně čtyřikrát (původní vzorek byl rozdělen na čtyři dílčí vzorky, které byly



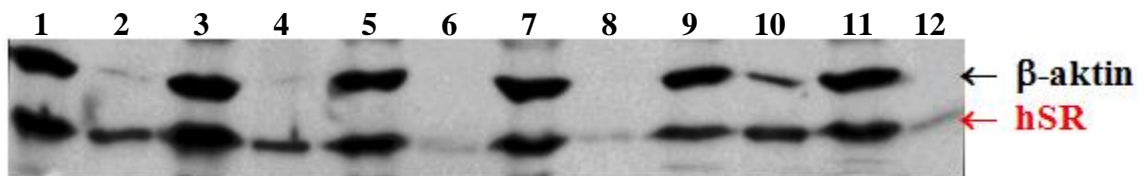
zpracovány a analyzovány popsáním způsobem – kap. 4.2.1., 4.2.4., 4.2.5., 4.2.6.). Po elektropřenosu proteinů na nitrocelulosovou membránu, imunodetekci protilátkami proti  $\beta$ -aktinu a hSR (protilátkou 2C2.1) a následné kvantifikaci signálů v programu Image Quant by měl být poměr množství hSR/ $\beta$ -aktin v jednotlivých paralelně zpracovaných vzorcích konstantní. Z obr. 13 je ovšem zřejmé, že tomu tak není. Proto jsme se rozhodli zjistit, v jakém kroku zpracování a analýzy vzorků tato chyba vzniká.



**Obr. 13: Imunochemická analýza paralelně zpracovaných vzorků mozkové tkáně pacienta pod kódovým označením ONTA1.** Vzorek ONTA1 byl rozdělen na čtyři dílčí vzorky s označením 1, 2, 3 a 4, které byly homogenizovány homogenizátorem Disperser T10 a sonikovány (kap. 4.2.1.1.). Po centrifugaci byla v jednotlivých supernatantech změřena celková koncentrace proteinů (kap. 4.2.4). Následně byly vzorky smíseny se vzorkovým pufrem a na 12% polyakrylamidový gel bylo nanášeno takové množství vzniklých roztoků, aby celkové množství proteinů na jednu dráhu činilo 50  $\mu$ g. Vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.), přeneseny na nitrocelulosovou membránu a detekovány protilátkou proti hSR i  $\beta$ -aktinu zároveň (2C2.1 a anti  $\beta$ -aktin) (kap. 4.2.6.). Signály hSR a  $\beta$ -aktinu byly poté analyzovány v programu Image Quant a získané hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007.

### 5.2.1. Porovnání jednotlivých způsobů homogenizace tkáně

Pro zjištění účinnosti jednotlivých způsobů homogenizace tkáně (kap. 4.2.1.) byl využit vzorek pacienta pod kódovým označením TEFÉ, který byl rozdělen na několik dílčích vzorků. Ty byly poté homogenizovány buď homogenizátorem Disperser T10 a sonikátorem, nebo pouze homogenizátorem TissueLyser II (2 minuty nebo 5 minut). Po centrifugaci byly pelety propláchnuty, rozsuspendovány v 1 ml pufru A (kap. 4.2.1.) a následně analyzovány pomocí elektropřenosu proteinů (kap. 4.2.5.). Bylo zjištěno, že k nejučinnější homogenizaci tkáně dochází při použití homogenizátoru TissueLyser II, ve kterém se vzorky homogenizují 5 minut (obr. 14). Naopak během ostatních způsobů homogenizace zůstává často velké množství serinracemasy i  $\beta$ -aktinu v nerozpustné části, čímž dochází k neúplnému převedení proteinů do roztoku.



**Obr. 14: Porovnání jednotlivých způsobů homogenizace tkáně.** Vzorek pacienta pod kódovým označením TEFÉ byl rozdělen na šest dílčích vzorků, které byly homogenizovány buď homogenizátorem Disperser T10 a sonikátorem (kap. 4.2.1.1.), nebo homogenizátorem TissueLyser II 2 nebo 5 minut (kap. 4.2.1.2.). Po centrifugaci bylo 30  $\mu$ l supernatantů smíseno se vzorkovým pufrům. Pelety byly promyty 2 $\times$  0,5 ml 50mM TEA a rozpuštěny ve vzorkovém pufru. Všechny vzorky (tzn. supernatanty i rozpuštěné pelety) byly nanášeny na 12% polyakrylamidový gel v maximálním možném množství, rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.), přeneseny na nitroceluloseovou membránu a detekovány protilátkou proti hSR i  $\beta$ -aktinu zároveň (2C2.1 a anti  $\beta$ -aktin) (kap. 4.2.6.). Dráhy: 1,3 – supernatanty vzniklé zpracováním dvou vzorků homogenizátorem Disperser T10 a sonikátorem; 2,4 – pelety příslušející supernatantům 1 a 3; 5,7 – supernatanty vzniklé zpracováním dvou vzorků homogenizátorem TissueLyser II po dobu 5ti minut; 6,8 – pelety příslušející supernatantům 5 a 7; 9,11 – supernatanty vzniklé zpracováním dvou vzorků homogenizátorem TissueLyser II po dobu dvou minut; 10,12 – pelety příslušející supernatantům 9 a 11.

## 5.2.2. Přesnost stanovení celkové koncentrace proteinů

Postup stanovení celkové koncentrace proteinů ve vzorku je uveden v kap. 4.2.4. Tento krok je důležitý pro nanášení vzorků na SDS gel. Aby se totiž obsah serinracemasy v jednotlivých vzorcích dal porovnávat, musí být v každé dráze stejné celkové množství proteinů. Opakovaným měřením supernatantu vzniklého zpracováním vzorku (kap. 4.2.1.) mozkové tkáně pacienta pod kódovým označením MAKY bylo získáno 10 hodnot. Z Tab. 5 je zřejmé, že tyto hodnoty se v některých případech výrazně liší. I koeficient variability 17 % svědčí o značné nepřesnosti zvolené metody.

**Tab. 5: Hodnoty celkové koncentrace proteinů naměřené v supernatantu vzniklého zpracováním vzorku mozkové tkáně pacienta pod kódovým označením MAKY.**

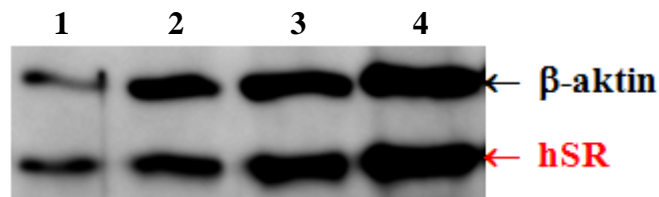
| koncentrace proteinů [mg/ml] |       | aritmetický průměr [mg/ml] | směrodatná odchylka [mg/ml] | CV [%] |
|------------------------------|-------|----------------------------|-----------------------------|--------|
| 14,65                        | 10,61 | 11,5                       | 1,9                         | 17,0   |
| 9,16                         | 9,52  |                            |                             |        |
| 15,51                        | 10,89 |                            |                             |        |
| 10,90                        | 11,52 |                            |                             |        |
| 10,49                        | 11,24 |                            |                             |        |

## 5.2.3. Přesnost elektropřenosu proteinů (Western Blotu) a následné kvantifikace v programu Image Quant

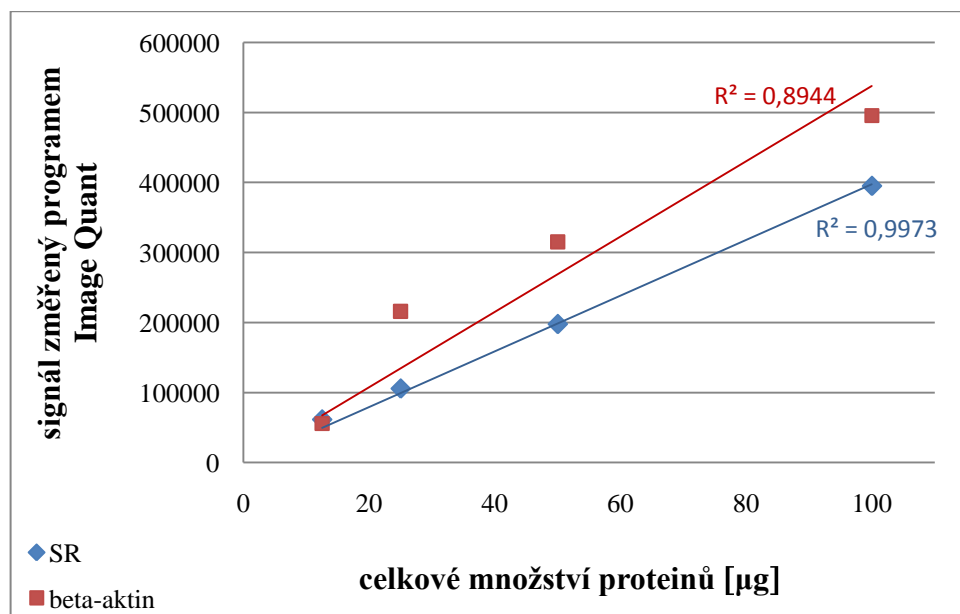
Pro určení přesnosti elektropřenosu proteinů (Western Blotu) a následné kvantifikace v programu Image Quant byla nejprve do jednotlivých drah v SDS gelu nanášena čtyři různá množství rekombinantní hSR (2,5 ng, 5 ng, 7,5 ng, 10 ng). Po vynesení závislosti síly signálu změřeného programem Image Quant na množství tohoto proteinu byla pozorována linearita jen s minimálními odchylkami.

Následně byl analyzován vzorek pacienta pod kódovým označením MAKY. Do jednotlivých drah v SDS gelu byla tentokrát nanášena čtyři různá množství celkových proteinů (12,5 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg). Výsledky tohoto pokusu jsou znázorněny na obr. 15 – 17 (str. 46 a 47). Z obr. 16 (str. 46) je patrné, že pokud se vynese závislost síly signálu hSR nebo β-aktinu změřeného v programu Image Quant na celkovém množství

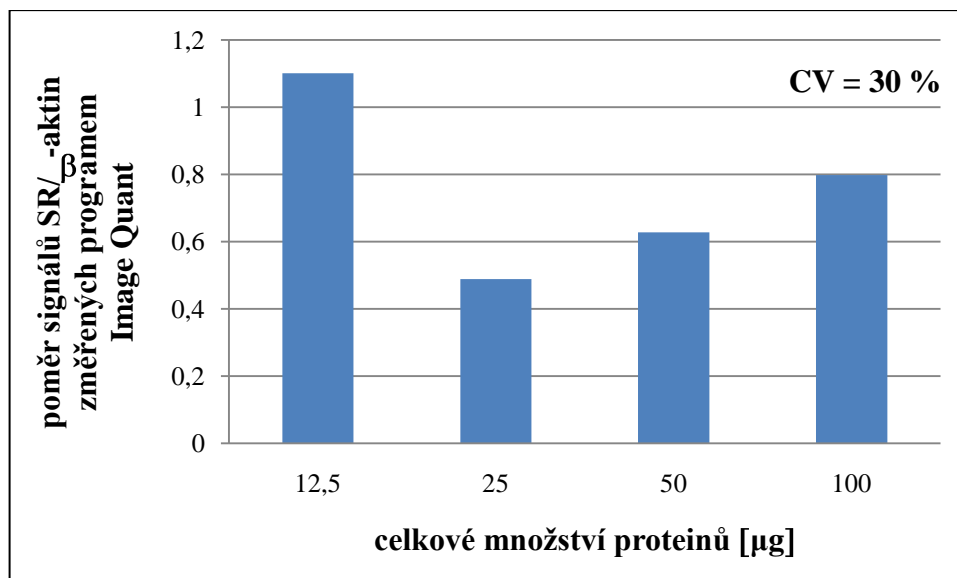
proteinů, je tato závislost přibližně lineární. Poměr množství hSR/β-aktin v jednotlivých drahách by ovšem měl být konstantní, což obr. 17 (str. 47) nepotvrzuje.



**Obr. 15: Imunochemická analýza vzorku pacienta pod kódovým označením MAKY nanášeného ve čtyřech různých množstvích.** Vzorek byl nanesen na 12% polyakrylamidový gel v takovém množství, aby celkové množství proteinů v dráze bylo 12,5 μg (dráha 1), 25 μg (dráha 2), 50 μg (dráha 3) a 100 μg (dráha 4). Proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.), přeneseny na nitroceluloseovou membránu a detekovány protilátkou proti hSR i β-aktinu zároveň (2C2.1 a anti β-aktin) (kap. 4.2.6.).



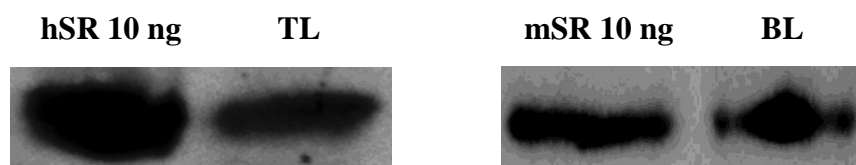
**Obr. 16: Závislost síly signálu hSR (β-aktinu) na celkovém množství proteinů.** Signály hSR a β-aktinu z obr. 15 byly analyzovány v programu Image Quant a získané hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007.



**Obr. 17:** Poměr signálů hSR/β-aktin získaných imunochemickou analýzou vzorku pacienta pod kódovým označením MAKY nanášeného ve čtyřech různých množstvích. Signály z obr. 15 byly analyzovány v programu Image Quant a získané hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007.

### 5.3. Aktivita serinracemasy

Pomocí elektropřenosu proteinů (kap. 4.2.5. a 4.2.6.) jsme nejprve porovnali množství serinracemasy v jednotlivých lyzátech – tkáňovém (lyzát vzniklý zpracováním vzorku mozkové tkáně pacienta) a buněčném HEK+ (lyzát vzniklý homogenizací buněk tkáňové kultury HEK293 exprimujících mSR).



**Obr. 18:** Porovnání množství hSR v lyzátu vzniklého zpracováním vzorku mozkové tkáně pacienta (tzv. tkáňovém lyzátu) a mSR v lyzátu vzniklého homogenizací buněk tkáňové kultury HEK293 exprimujících mSR (tzv. buněčném HEK+ lyzátu). Na 12% polyakrylamidový gel bylo nanášeno 10 ng rekombinantní hSR (hSR 10 ng), 3 μl tkáňového lyzátu (TL), 10 ng rekombinantní mSR (mSR 10 ng) a 3 μl buněčného lyzátu (BL). Po rozdělení pomocí SDS-PAGE (kap. 4.2.5.) byly vzorky přeneseny na membránu a detekovány příslušnou monoklonální protilátkou – rekombinantní hSR spolu s TL protilátkou 2C2.1 a rekombinantní mSR spolu s BL protilátkou 3B7.1 (kap. 4.2.6.).

Na gel byl vždy nanášen stejný objem tkáňového lyzátu (zahuštěného 5× pomocí ultrafiltrace s membránami s limitem propustnosti 30 kDa, kap. 4.2.2.2.) i buněčného HEK+ lyzátu a dále 10 ng rekombinantní hSR a mSR. Proteiny ve tkáňovém lyzátu a rekombinantní hSR byly následně detekovány pomocí protilátky 2C2.1, zatímco proteiny v buněčném HEK+ lyzátu a rekombinantní mSR pomocí protilátky 3B7.1. Z obr. 18 (str. 47) je zřejmé, že se SR vyskytuje v obou lyzátech v přibližně stejném množství.

### 5.3.1. Aktivita lidské serinracemasy

Již dříve se v naší laboratoři pomocí dostupných metod nepodařilo změřit aktivitu hSR ve tkáňových lyzátech s L-serinem, přirozeným substrátem SR. Proto jsme se rozhodli vyzkoušet zatím nejlepší substrát serinracemasy, L-serin-*O*-sulfát. Vždy byly prováděny tři druhy reakcí – negativní kontrola, kdy byl inkubován pouze samotný lyzát (5× zahuštěný), aktivní reakce, kdy byl inkubován lyzát (5× zahuštěný) s L-serin-*O*-sulfátem, a inhibovaná reakce, kdy byl inkubován lyzát (5× zahuštěný) s L-serin-*O*-sulfátem a zatím nejúčinnějším inhibitorem SR, L-*erythro*-3-hydroxyaspartátem (kap. 4.2.7.1.). Následně byla pomocí RP-HPLC měřena koncentrace pyruvátu ve vzorcích. Pro důkaz, že během inkubace nemůže docházet k samovolnému rozpadu L-serin-*O*-sulfátu, jsme tuto sloučeninu nechali inkubovat také pouze v reakčním pufru (bez přidaného enzymu či tkáňového lyzátu).

Porovnáním chromatogramů negativní kontroly se vzorky z aktivní a inhibované reakce bylo zjištěno, že během inkubace tkáňového lyzátu s L-serin-*O*-sulfátem (popřípadě s L-serin-*O*-sulfátem a L-*erythro*-3-hydroxyaspartátem) vzniklo poměrně velké množství pyruvátu. Detekovaná koncentrace této látky se ovšem v případě inhibované a neinhibované reakce příliš nelišila. Přeměnu L-serin-*O*-sulfátu na pyruvát tak pravděpodobně katalyzoval jiný enzym než serinracemasa (nejspíše serindehydratasa, EC 4.3.1.17). Ani pomocí L-serin-*O*-sulfátu se tedy aktivitu hSR změřit nepodařilo.

### 5.3.2. Aktivita myší serinracemasy

Aktivitu mSR jsme měřili dvěma různými způsoby – v médiu tkáňové kultury buněk HEK293 exprimujících (HEK+) i neexprimujících (HEK-) mSR a lyzátu vzniklého homogenizací těchto buněk (tzv. buněčném lyzátu).

K živým buňkám (HEK+ i HEK-) byl přidáván L-serin a po několika dnech bylo odebráno medium, ve kterém byla pomocí RP-HPLC měřena koncentrace D-serinu (kap. 4.2.7.3.). Bylo zjištěno, že produkce D-serinu je u buněk HEK+ výrazně vyšší než u buněk HEK-. Vysvětlení schopnosti buněk HEK- D-serin syntetizovat je uvedeno v kap. 5.1.3. Pro kontrolu byly provedeny též inkubace buněk HEK+ s L-serinem a inhibítorem SR L-erythro-3-hydroxyaspartátem. Hladina D-serinu v mediu obsahujícím inhibitor byla pak skutečně nižší než v případě neinhibované inkubace.

Stanovení aktivity mSR v buněčném lyzátu bylo prováděno stejným způsobem jako měření aktivity hSR v tkáňovém lyzátu (viz kap. 4.2.7.2.). Místo L-serin-O-sulfátu byl ovšem používán L-serin. Pomocí RP-HPLC byla tedy následně stanovována koncentrace D-serinu, přičemž rozdíl v množství této sloučeniny ve vzorcích negativní kontroly a aktivní reakce nebyl pozorován.

## **5.4. Analýza resekovaných vzorků mozkových tkání jednotlivých pacientů**

Vzorky byly získány z operací za asistence doc. Pavla Krška, Ph.D. ve Fakultní nemocnici Motol a doc. Petra Marusiče, Ph.D. ve Vojenské nemocnici ve Střešovicích. Jak již bylo uvedeno, pacienti byli operováni z důvodu neúspěchu farmakologické léčby. Operace spočívala v odstranění epileptogenního ložiska, přičemž okrajové části této tkáně většinou epilepsií zasaženy nebyly (rozlišení epileptické tkáně od tkáně zdravé bylo provedeno bezprostředně po každé operaci patologem doc. MUDr. Josefem Zámečnickem, Ph.D.).

Doposud bylo zpracováno a analyzováno 56 vzorků od 20ti dětských pacientů a 91 vzorků od 18ti dospělých pacientů. Výrazný rozdíl v množství D-serinu či v expresi serinracemasy (zjišťované metodou elektropřenosu proteinů, kap. 4.2.5. a 4.2.6.) mezi mozkovou tkání postiženou epilepsií a mozkou tkání epilepsií nezasazenou však zatím pozorován nebyl.

## 6. DISKUZE

### 6.1. Charakterizace primárních protilátek

Pro detekci serinracemasy (SR) pomocí elektropřenosu proteinů byly k dispozici tři protilátky – dvě s označením 2C2.1 a 3B7.1 vyrobené v Laboratoři molekulární imunologie ÚMG AV ČR a jedna komerčně dostupná od firmy BD Biosciences. Jejich citlivost jsme ověřili na rekombinantních formách myší SR (mSR) a lidské SR (hSR), přičemž jsme zjistili, že nejcitlivější vůči hSR je protilátka 2C2.1 a nejcitlivější vůči mSR je podle očekávání komerčně dostupná protilátka od firmy BD Biosciences (viz obr. 8, str. 37).

Díky provedeným experimentům se zároveň podařilo přibližně lokalizovat epitop protilátky 2C2.1 a to na C-konci hSR. Ve frakci, která byla po expresi a purifikaci rekombinantní hSR používána pro zmíněné pokusy, se totiž kromě hSR o molekulové hmotnosti 37 kDa vyskytoval i její degradační produkt o molekulové hmotnosti 30 kDa. Ten byl protilátkami 3B7.1 a BD rozpoznáván, protilátkou 2C2.1 ovšem nikoli (viz kap. 5.1.2.).

Kromě citlivosti byly protilátky testovány i z hlediska specifity. K tomuto účelu jsme použili nejprve lyzáty buněk HEK293 (exprimujících i neexprimujících myší serinracemasy) a následně i resekované vzorky mozkových tkání pacientů. Zjistili jsme, že protilátka BD je vůči mSR vysoce specifická. Protilátky 2C2.1 a 3B7.1 však rozpoznávají kromě hSR a mSR o molekulové hmotnosti 37 kDa i proteiny jiných velikostí (viz obr. 10, str. 39 a obr. 11, str. 41). Zda se jedná o sestřihové varianty serinracemasy, či jde o úplně jiné proteiny, zatím není možno rozhodnout. Pro jejich identifikaci bude zapotřebí buď provést imunoprecipitaci s následnou analýzou vysrážených proteinů N-koncovou sekvenací a hmotnostní spektrometrií, nebo zmapovat epitopy jednotlivých protilátek a porovnat jejich sekvence s proteinovými databázemi.

### 6.2. Přesnost použitých metod

Jedním ze způsobů zkoumání exprese určitého proteinu je zjišťování jeho množství v dané tkáni. Pro tento účel lze využít metodu elektropřenosu proteinů. Aby byly dosažené výsledky interpretovatelné, musí být zkoumaný protein při homogenizaci tkáně zcela převeden do roztoku a na polyakrylamidový gel musí být následně nanášeno vždy stejné



celkové množství proteinů. Nedodržení těchto dvou skutečností může vést k velké experimentální chybě. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli jednotlivé kroky zpracování a analýzy vzorků ověřit.

Bylo zjištěno, že dříve používaný způsob homogenizace tkáně (pomocí homogenizátoru Disperser T10 a sonikátoru) není vždy stoprocentně účinný, což může být jeden ze zdrojů chyb při porovnání obsahu serinracemasy v paralelně zpracovaných vzorcích (viz kap. 5.2.). Použitím homogenizátoru TissueLyser II lze dosáhnout téměř dokonalého převodu proteinu do roztoku (viz obr. 14, str. 44). Pro úplnou homogenizaci by bylo zapotřebí homogenizovat vzorek ještě delší dobu (například 10 minut).

Opakované měření koncentrace proteinů v jednom vzorku ukázalo, že metoda dle Bradfordové je velmi nepřesná (viz tab. 5, str. 45). Vzniklé chyby lze však eliminovat vhodně zavedeným vnitřním standardem. Tím musí být protein, který je ve všech buňkách zastoupen v přibližně stejném množství. Vztáhneme-li poté k takovému proteinu množství serinracemasy ve vzorku, získáme její relativní zastoupení v jedné buňce. V našem případě byl zvolen  $\beta$ -aktin, protože je pro tyto účely běžně používán [70]. Právě zde lze ovšem hledat zdroj chyb. Vzorky byly totiž značně heterogenní a nebylo tak možné zajistit konstantní zastoupení neuronů a glií. V kap. 2.1.3.3. bylo uvedeno, že distribuce serinracemasy v jednotlivých buňkách CNS ještě není zcela známa. Pokud by tedy například bylo množství tohoto enzymu v neuronech vyšší než v gliích, byl by poměr hSR/ $\beta$ -aktin tím vyšší, čím více neuronů by se ve vzorku vyskytovalo.

Největší chyby v měření vznikají pravděpodobně při samotném elektropřenosu proteinů a jejich následné kvantifikaci v programu Image Quant. Z dosažených výsledků vyplývá, že pouze řádový rozdíl mezi množstvími serinracemasy v mozkové tkáni postižené epilepsií a mozkové tkáni epilepsií nezasazené je signifikantní (viz obr. 17, str. 47).

Pro měření množství daného proteinu ve vzorku existují i jiné metody, např. ELISA či imunohistochemie. Tyto metody jsou sice přesnější než metoda Western blot, na naše experimenty se však aplikovat nemohou. Protilátka 2C2.1 totiž není dostatečně specifická (minimálně s jedním buněčným proteinem o molekulové hmotnosti asi 25 kDa interaguje nespecificky, viz obr. 11, str. 41 a obr. 12, str. 42). Jejím použitím by tudíž nebylo měřeno zastoupení pouze hSR, ale i jiných proteinů. Pro sledování menších než řádových rozdílů by tudíž bylo zapotřebí vyrobit protilátku jinou, rozpoznávající výhradně hSR.

### 6.3. Aktivita serinracemasy

Protože se v naší laboratoři v minulosti nepodařilo změřit aktivitu hSR v lyzátu vzniklém homogenizací vzorku mozkové tkáně pacientů (tzv. tkáňovém lyzátu) pomocí přirozeného substrátu L-serinu (Jana Jirásková, nepublikovaná data), rozhodli jsme se vyzkoušet substrát s nejvyšší známou afinitou L-serin-*O*-sulfát. Ani v tomto případě však nebyla aktivita hSR pozorována. Požadovaný produkt pyruvát sice vznikal, tuto reakci ale katalyzoval jiný enzym – nejspíše serindehydratasa (viz kap. 5.3.1.).

Otázkou tedy bylo, proč se aktivita hSR v tkáňovém lyzátu nedaří změřit. Jednou z příčin by mohla být ztráta katalytické účinnosti během zpracování tkáně. Tato možnost však není příliš pravděpodobná. Kdyby totiž docházelo během homogenizace k denuraci proteinů, nemohla by být ve vzorcích pozorována aktivita enzymu přeměňujícího L-serin-*O*-sulfát na pyruvát. Pravděpodobnější se proto zdá být skutečnost, že je hSR ve vzorku přítomna v příliš nízké koncentraci a produkuje tak jen velmi malé množství D-serinu nebo pyruvátu (dle použitého substrátu), které není možné pomocí zvolené analytické metody změřit. Správnost této domněnky potvrzují experimenty provedené na buňkách tkáňové kultury HEK293 exprimujících mSR. Stejný objem buněčného lyzátu připraveného z těchto buněk obsahoval srovnatelné množství mSR, jako obsahoval tkáňový lyzát hSR (viz obr. 18, str. 47). Ovšem ani v případě buněčného lyzátu se po patnáctihodinové inkubaci s L-serinem nepodařilo D-serin detekovat. V mediu těchto buněk před homogenizací byla ale po aplikaci L-serinu pozorována zvýšená hladina D-serinu, čímž byla aktivita mSR prokázána (viz kap. 5.3.2.). Nepřítomnost zmíněné aktivity v lyzátu tak musí být způsobena nedostatečnou koncentrací serinracemasy v reakční směsi.

### 6.4. Analýza resekovaných vzorků mozkových tkání jednotlivých pacientů

Na základě již publikovaných výsledků několika skupin pracujících s myšími modely, které připouštěly možnou úlohu D-serinu v epilepsii (viz kap. 2.3.2.1.), jsme se rozhodli ověřit tuto skutečnost na vzorcích resekovaných mozkových tkání pacientů s farmakorezistentní epilepsií, kteří byli operováni buď ve Fakultní nemocnici Motol,

oddělení dětské neurologie, nebo ve Vojenské nemocnici ve Střešovicích (odběr vzorků z pacientů byl schválen Etickou komisí FN Motol).

Ukázali jsme, že vzhledem k chybě stanovení by rozdíly mezi epileptickou a zdravou tkání (rozlišení epileptické tkáně od tkáně zdravé bylo provedeno bezprostředně po každé operaci patologem doc. MUDr. Josefem Zámečником, Ph.D.) musely být alespoň řádové, abychom je mohli považovat za signifikantní (viz kap. 5.2. a 6.2.). Takové rozdíly jsme ale nepozorovali. Vstupní hypotéza, že se v obsahu serinracemasy bude epileptická tkáň od tkáně epilepsií nezasazené lišit, se tedy zatím nepotvrdila.

Nelze vyloučit, že molekulární podstata farmakorezistentní epilepsie je odlišná od molekulární podstaty farmakologicky léčitelné epilepsie. V takovém případě by totiž skutečně nemusel být žádný rozdíl v množství serinracemasy pozorován.

## 7. ZÁVĚR

1. Byly shrnuty dostupné informace o savčí serinracemase, přičemž pozornost byla věnována především lidskému orthologu zmíněného enzymu.
2. Byla popsána funkce přirozeného produktu lidské serinracemasy D-serinu v organismu.
3. Stručně bylo pojednáno o epilepsii s důrazem na její molekulární podstatu.
4. Byla ověřena citlivost a specifita dostupných monoklonálních protilátek proti lidské serinracemase. Pro analýzu tkání byla vybrána protilátka s označením 2C2.1.
5. Byly prověřeny jednotlivé kroky zpracování a analýzy vzorků mozkových tkání pacientů s farmakorezistentní epilepsií, přičemž bylo zjištěno, že chyba stanovení může být až desítky procent.
6. Aktivitu hSR se ve tkáňových lyzátech změřit nepodařilo. Důvodem je pravděpodobně příliš nízká koncentrace a katalytická účinnost tohoto enzymu ve vzorcích.
7. Zvolenou analytickou metodou nebylo prokázáno, že by se mozková tkáň postižená epilepsií od mozkové tkáně epilepsií nezasazené v množství serinracemasy či D-serinu významně lišila.

## 8. SEZNAM ZKRATEK

|               |  |
|---------------|--|
| ADP, ATP      | adenosindifosfát, adenosintrifosfát  |
| AMPA          | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina                               |
| APS           | peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)   |
| BLAST         | z angl. Basic Local Alignment Search Tool  |
| BSA           | hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)   |
| CaM           | kalmodulin (z angl. calmodulin)  |
| CaM kII       | kalmodulinkinasa II  |
| CCD           | z angl. charge-coupled device  |
| cDNA          | kódující DNA (z angl. coding DNA)  |
| CNS           | centrální nervová soustava   |
| CTP           | cytidintrifosfát   |
| Da            | daltony  |
| DAAO          | D-aminokyselina:O <sub>2</sub> -oxidoreduktasa (deaminující)<br>(z angl. D-amino acid oxidase) |
| DNA           | deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)                                     |
| DNPB          | dinitrofenylhydrazin   |
| DTT           | dithiotreitol  |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EC            | z angl. Enzyme Commission  |
| EDTA          | ethylendiamintetraoctová kyselina  |
| ESTs          | z angl. expressed sequence tags  |
| FAD           | flavinadenindinukleotid  |
| FDAA          | 1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alanin amid (Marfeyho činidlo)                                   |
| GABA          | kyselina $\gamma$ -aminomáselná (z angl. $\gamma$ -aminobutyric acid)                          |
| GCS           | glycin štěpící systém (z angl. glycine cleavage system)  |
| Glu           | kyselina glutamová   |
| GTP           | guanosintrifosfát  |
| HEK           | lidské embryonální buňky (z angl. human embryonic kidney cells)                                |
| HEK+          | lidské embryonální buňky exprimující mSR   |
| HEK-          | lidské embryonální buňky neexprimující mSR   |
| HEPES         | kyselina N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová]                                     |

|             |   |
|-------------|---|
| hnRNA       | heteronukleární RNA (z angl. heterogeneous nuclear RNA)   |
| hSR         | lidská serinracemasa (z angl. human serine racemase)  |
| kDa         | 1000 Daltonů (z angl. kilo Daltons)   |
| $K_i$       | Inhibiční konstanta   |
| $K_M$       | Michaelisova konstanta  |
| LSOS        | L-serin-O-sulfát  |
| LTP         | dlouhodobá potenciace (z angl. long-term potentiation)  |
| mRNA        | mediátorová RNA   |
| mSR         | myší serinracemasa  |
| NCBI        | z angl. National Center of Biotechnology Information  |
| NMDA        | N-methyl-D-aspartát   |
| OPA         | ortho-ftaldialdehyd   |
| PAGE        | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)                                     |
| PLP         | pyridoxal-5'-fosfát   |
| RNA         | ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)  |
| RP          | retrográdní posel   |
| RP-HPLC     | vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází<br>(z angl. reverse phase high performance liquid chromatography) |
| SDS         | dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulphate)  |
| SR          | serinracemasa   |
| TBA         | hydroxid tetrabutylamonný   |
| TEA         | triethanolamin  |
| TEMED       | N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin  |
| Tris        | tris(hydroxymethyl)aminomethan  |
| UTP         | uridintrifosfát   |
| ÚOCHB AV ČR | Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky   |
| ÚMG AV ČR   | Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky   |
| v/v         | objem kapalné látky v konečném objemu roztoku (z angl. volume for volume)   |
| w/v         | hmotnost rozpuštěné látky v konečném objemu roztoku<br>(z angl. weight for volume)                                      |

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Corrigan J.J.: **D-amino acids in animals.** *Science* **164**, 142-149 (1969)
2. Dunlop D.S., Neidle A., McHale D., Dunlop D.M., Lajtha A.: **The presence of free D-aspartic acid in rodents and man.** *Biochem Biophys Res Commun* **141**, 27-32 (1986)
3. Friedman M.: **Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids.** *J Agric Food Chem* **47**, 3457-3479 (1999)
4. Hashimoto A., Nishikawa T., Hayashi T., Fujii N., Harada K., Oka T., Takahashi K.: **The presence of free D-serine in rat brain.** *FEBS Lett* **296**, 33-36 (1992)
5. Oldendorf W.H.: **Stereospecificity of blood-brain barrier permeability to amino acids.** *Am J Physiol* **224**, 967-969 (1973) cit dle 4.
6. Kleckner N.W., Dingledine R.: **Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes.** *Science* **241**, 835-837 (1988)
7. Dunlop D.S., Neidle A.: **The origin and turnover of D-serine in brain.** *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 26-30 (1997)
8. Wolosker H., Sheth K.N., Takahashi M., Mothet J.P., Brady R.O. Jr, Ferris C.D., Snyder S.H.: **Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine.** *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 721-725 (1999)
9. Krug A.W., Völker K., Dantzer W.H., Silbernagl S.: **Why is D-serine nephrotoxic and alpha-aminoisobutyric acid protective?** *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, 382-390 (2007)
10. Stríšovský K., Jirásková J., Mikulová A., Rulišek L., Konvalinka J.: **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 (2005)
11. Hoffman H.E., Jirásková J., Ingr M., Zvelebil M., Konvalinka J.: **Recombinant human serine racemase: enzymologic characterization and comparison with its mouse ortholog.** *Protein Expr Purif* **63**, 62-67 (2009)
12. Stríšovský K., Jirásková J., Bařinka C., Majer P., Rojas C., Slusher B.S., Konvalinka J.: **Mouse brain serine racemase catalyzes specific elimination of L-serine to pyruvate.** *FEBS Lett* **535**, 44-48 (2003)
13. Panizzutti R., De Miranda J., Ribeiro C.S., Engelender S., Wolosker H.: **A new strategy to decrease N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coactivation: inhibition of D-serine synthesis by converting serine racemase into an eliminase.** *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5294-5299 (2001)

14. De Miranda J., Panizzutti R., Foltyn V.N., Wolosker H.: **Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine.** *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 14542-14547 (2002)
15. Dunlop D.S., Neidle A.: **Regulation of serine racemase activity by amino acids.** *Mol Brain Res* **133**, 208-214 (2005)
16. Foltyn V.N., Bendikov I., De Miranda J., Panizzutti R., Dumin E., Shleper M., Li P., Toney M.D., Kartvelishvily E., Wolosker H.: **Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an alpha,beta-elimination activity.** *J Biol Chem* **280**, 1754-1763 (2005)
17. Jirásková J.: **Mammalian Serine Racemase as a Pharmaceutical Target:** Dissertation thesis PřF UK Praha, katedra biochemie (2010)
18. Wolosker H., Blackshaw S., Snyder S.H.: **Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission.** *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13409-13414 (1999)
19. Marková M., Králová B.: **Pyridoxalfosfát – katalyzátor přeměn aminokyselin.** *Chemické Listy* **98**, 102-107 (2004)
20. Freeman W.H.: **21.1 Glycogen Breakdown Requires the Interplay of Several Enzymes** [online], 2002-- [cit. 2010-04-12]. Dostupné na <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A2926&render\\_type=figure&id=A2926](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A2926&render_type=figure&id=A2926)>
21. Cook S.P., Galve-Roperh I., Martínez del Pozo A., Rodríguez-Crespo I.: **Direct calcium binding results in activation of brain serine racemase.** *J Biol Chem* **277**, 27782-27792 (2002)
22. Neidle A., Dunlop D.S.: **Allosteric regulation of mouse brain serine racemase.** *Neurochem Res* **27**, 1719-1724 (2002)
23. Hoffman H.E., Jirásková J., Cígler P., Sanda M., Schraml J., Konvalinka J.: **Hydroxamic acids as a novel family of serine racemase inhibitors: mechanistic analysis reveals different modes of interaction with the pyridoxal-5'-phosphate cofactor.** *J Med Chem* **52**, 6032-6041 (2009)
24. Dixon S.M., Li P., Liu R., Wolosker H., Lam K.S., Kurth M.J., Toney M.D.: **Slow-binding human serine racemase inhibitors from high-throughput screening of combinatorial libraries.** *J Med Chem* **49**, 2388-2397 (2006)
25. Smith M.A., Mack V., Ebneth A., Moraes I., Felicetti B., Wood M., Schonfeld D., Mather O., Cesura A., Barker J.: **The structure of mamalian serine racemase: Evidence for conformational changes upon inhibitor binding.** *J Biol Chem* **285**, 12873-12881 (2010)



26. De Miranda J., Santoro A., Engelender S., Wolosker H.: **Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis.** *Gene* **256**, 183-188 (2000)
27. 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.: **Identification of Multiple Serine Racemase (SRR) mRNA Isoforms and Genetic Analyses of SRR and DAO in Schizophrenia and D-Serine Levels.** *Biol Psychiatry* **57**, 1493-1503 (2005)
28. Xia M., Liu Y., Figueroa D.J., Chiu C.S., Wei N., Lawlor A.M., Lu P., Sur C., Koblan K.S., Connolly T.M.: **Characterization and localization of a human serine racemase.** *Mol Brain Res* **125**, 96-104 (2004)
29. **EST Profile – Hs.461954**, --- [cit. 2010-04-20]. Dostupné na <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.461954>>
30. Wu S., Barger S.W., Sims T.J.: **Schwann cell and epineural fibroblast expression of serine racemase.** *Brain Res* **1020**, 161-166 (2004)
31. Takayasu N., Yoshikawa M., Watanabe M., Tsukamoto H., Suzuki T., Kobayashi H., Noda S.: **The serine racemase mRNA is expressed in both neurons and glial cells of the rat retina.** *Arch Histol Cytol* **71**, 123-129 (2008)
32. Miya K., Inoue R., Takata Y., Abe M., Natsume R., Sakimura K., Hongou K., Miyawaki T., Mori H.: **Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain.** *J Comp Neurol* **510**, 641-654 (2008)
33. Wolosker H., Dumin E., Balan L., Foltyn V.N.: **D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration.** *FEBS J* **275**, 3514-35126 (2008)
34. Fuchs S.A., Berger R., Klomp L.W., de Koning T.J.: **D-amino acids in the central nervous system in health and disease.** *Mol Genet Metab* **85**, 168-180 (2005)
35. Schell M.J., Brady R.O. Jr, Molliver M.E., Snyder S.H.: **D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors.** *J Neurosci* **17**, 1604-1615 (1997)
36. Matsui T., Sekiguchi M., Hashimoto A., Tomita U., Nishikawa T., Wada K.: **Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration.** *J Neurochem* **65**, 454-458 (1995)
37. Danysz W., Parsons C.G.: **Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications.** *Pharmacol Rev* **50**, 597-664 (1998)

38. Mothet J.P., Parent A.T., Wolosker H., Brady R.O. Jr, Linden D.J., Ferris C.D., Rogawski M.A., Snyder SH.: **D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor.** *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4926-4931 (2000)
39. Basu A.C., Tsai G.E., Ma C.L., Ehmsen J.T., Mustafa A.K., Han L., Jiang Z.I., Benneyworth M.A., Froimowitz M.P., Lange N., Snyder S.H., Bergeron R., Coyle J.T.: **Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior.** *Mol Psychiatry* **14**, 719-727 (2009)
40. Inoue R., Hashimoto K., Harai T., Mori H.: **NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice.** *J Neurosci* **28**, 14486-14491 (2008)
41. Bauer D., Hamacher K., Bröer S., Pauleit D., Palm C., Zilles K., Coenen H.H., Langen K.J.: **Preferred stereoselective brain uptake of d-serine--a modulator of glutamatergic neurotransmission.** *Nucl Med Biol* **32**, 793-797 (2005)
42. Wood P.L., Hawkinson J.E., Goodnough D.B.: **Formation of D-serine from L-phosphoserine in brain synaptosomes.** *J Neurochem* **67**, 1485-1490 (1996)
43. Goodnough D.B., Lutz M.P., Wood P.L.: **Separation and quantification of D- and L-phosphoserine in rat brain using N alpha-(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide (Marfey's reagent) by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.** *J Chromatogr B Biomed Appl* **672**, 290-294 (1995)
44. Kikuchi G., Motokawa Y., Yoshida T., Hiraga K.: **Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **84**, 246-263 (2008)
45. Iwama H., Takahashi K., Kure S., Hayashi F., Narisawa K., Tada K., Mizoguchi M., Takashima S., Tomita U., Nishikawa T.: **Depletion of cerebral D-serine in non-ketotic hyperglycinemia: possible involvement of glycine cleavage system in control of endogenous D-serine.** *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 793-796 (1997)
46. Park H.K., Shishido Y., Ichise-Shishido S., Kawazoe T., Ono K., Iwana S., Tomita Y., Yorita K., Sakai T., Fukui K.: **Potential role for astroglial D-amino acid oxidase in extracellular D-serine metabolism and cytotoxicity.** *J Biochem* **139**, 295-304 (2006)
47. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I.: **D-amino acid oxidase: physiological role and applications.** *Biochemistry (Mosc)* **73**, 1511-1518 (2008)
48. Ganong, W.F.: **Přehled lékařské fyziologie**, Galén, Praha (2005)

49. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F.: **The glutamate receptor ion channels.** *Pharmacol Rev* **51**, 7-61 (1999)
50. Kandel E.R., Schwartz J.H. Jessel T.M.: **Principles of neural science**, McGraw-Hill Companies, New York (2000)
51. Koupparis L.: **Anaesthesia UK: NMDA receptor** [online], 2005-09-07, 2009-01-12 [cit. 2010-04-12]. Dostupné na <<http://www.frca.co.uk/images/NMDA.jpg>>
52. Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M.: **NMDA receptor subunits: diversity, development and disease.** *Curr Opin Neurobiol* **11**, 327-335 (2001)
53. Chatterton J.E., Awobuluyi M., Premkumar L.S., Takahashi H., Talantova M., Shin Y., Cui J., Tu S., Sevarino K.A., Nakanishi N., Tong G., Lipton S.A., Zhang D.: **Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits.** *Nature* **415**, 793-798 (2002)
54. Cooke S.F., Bliss T.V.: **Plasticity in the human central nervous system.** *Brain* **129**, 1659-1673 (2006)
55. Kalia L.V., Kalia S.K., Salter M.W.: **NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead.** *Lancet Neurol* **7**, 742-755 (2008)
56. Hoffman H.E.: **Charakterization of recombinant human serine racemase:** Dissertation thesis PřF UK Praha, katedra biochemie (2010)
57. Tsai G., Yang P., Chung L.C., Lange N., Coyle J.T.: **D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia.** *Biol Psychiatry* **44**, 1081-1089 (1998)
58. Hashimoto K., Fukushima T., Shimizu E., Komatsu N., Watanabe H., Shinoda N., Nakazato M., Kumakiri C., Okada S., Hasegawa H., Imai K., Iyo M.: **Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia.** *Arch Gen Psychiatry* **60**, 572-576 (2003)
59. Bendikov I., Nadri C., Amar S., Panizzutti R., De Miranda J., Wolosker H., Agam G.: **A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia.** *Schizophr Res* **90**, 41-51 (2007)
60. Nevšimalová S., Růžička E., Tichý J. a kol.: **Neurologie**, Galén, Praha (2002)
61. Fölsch U.R., Kochsiek K., Schmidt R.F.: **Patologická fyziologie**, Grada, Praha (2006)
62. Nečas E., Šulc K., Vokurka M.: **Patologická fyziologie orgánových systémů**, Nakladatelství Karolinum, Univezita Karlova v Praze, Praha (2006)

63. Löscher W., Wlaź P., Rundfeldt C., Baran H., Hönack D.: **Anticonvulsant effects of the glycine/NMDA receptor ligands D-cycloserine and D-serine but not R-(+)-HA-966 in amygdala-kindled rats.** *Br J Pharmacol* **112**, 97-106 (1994)
64. Singh L., Oles R.J., Tricklebank M.D.: **Modulation of seizure susceptibility in the mouse by the strychnine-insensitive glycine recognition site of the NMDA receptor/ion channel complex.** *Br J Pharmacol* **99**, 285-288 (1990)
65. Xie X., Dumas T., Tang L., Brennan T., Reeder T., Thomas W., Klein R.D., Flores J., O'Hara B.F., Heller H.C., Franken P.: **Lack of the alanine-serine-cysteine transporter 1 causes tremors, seizures, and early postnatal death in mice.** *Brain Res* **1052**, 212-221 (2005)
66. Liu Y.H., Wang L., Wei L.C., Huang Y.G., Chen L.W.: **Up-regulation of D-serine might induce GABAergic neuronal degeneration in the cerebral cortex and hippocampus in the mouse pilocarpine model of epilepsy.** *Neurochem Res* **34**, 1209-1218 (2009)
67. White H.S., Smith M.D., Wilcox K.S.: **Mechanisms of action of antiepileptic drugs.** *Int Rev Neurobiol* **81**, 85-110 (2007)
68. Ambler Z.: **Základy neurologie**, Galén, Praha (2006)
69. Náhlovský J. a kol.: **Neurochirurgie**, Galén, Praha (2006)
70. Ferguson R.E., Carroll H.P., Harris A., Maher E.R., Selby P.J., Banks R.E.: **Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies.** *Proteomics* **5**, 566-571 (2005)

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

| Jméno a příjmení s adresou | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|----------------------------|----------|-----------------|----------|
|                            |          |                 |          |