

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2543.

VINCZE ISTVÁN

Experimentális és klinikai farmakológia
című program

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

A D-szerin szintet szabályozó mechanizmusok vizsgálata – lehetséges gyógyszerátadáspontok

Doktori értekezés

Dr. Vincze István

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Gáspár Róbert, PhD, egyetemi docens
Dr. Zelles Tibor, PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ducza Eszter, PhD., egyetemi docens
Dr. Völgyi Gergely, PhD., egyetemi docens

Budapest
2021

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	6
1.1 D-aminosavak az élő szervezetben.....	6
1.2 A D-szerin homeosztázisa	7
1.2.1 A szerin racemáz (SR) működése	7
1.2.2 A DAAO enzim szerepe a D-szerin metabolizmusában	8
1.2.3 A D-szerin homeosztázist szabályozó transzporterek az agyban.....	10
1.2.3.1 Az alanin-szerin-cisztein-1 (asc-1) transzporter működése	10
1.2.3.2 Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek működése.....	11
1.3 Az NMDA receptor működése és szerepe a központi idegrendszerben	16
1.4 A D-szerin, illetve homeosztázisának szerepe a központi idegrendszeri betegségekben	19
1.4.1 ALS	20
1.4.2 Alzheimer-kór	21
1.4.3 Szkizofrénia.....	22
1.4.4 Parkinson-kór	25
1.4.5 Depresszió	26
1.4.6 Epilepszia	26
1.4.7 A D-szerin transzport, mint lehetséges gyógyszertámadáspont.....	27
2. Célkitűzések.....	29
3. Módszerek	30
3.1 Anyagok	30
3.2 Egerek kezelése 6-fluoro-1H-indazol-3-ol DAAO enzim gátló vegyülettel.....	31
3.3 A D-szerin kvantitatív meghatározása különböző biológiai mintákból kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcencia (CE-LIF) módszerrel	31
3.4 Sejtkultúrák és sejtenyésztés	32
3.5 Western blot analízis	32

3.6 A sejtek D-szerin felvételének vizsgálata	33
3.6.1 A D-szerin felvétel idő-, és koncentrációfüggése az SH-SY5Y sejteknél	33
3.6.2 A D-szerin felvétel idő-, és Na ⁺ -függése.....	33
3.6.3 A D-szerin transzport kinetika karakterizálása	33
3.6.4 A D-szerin felvétel gátlása neutrális aminosavakkal	33
3.6.5 Az L-szerin kezelés hatása a D-szerinnel preinkubált SH-SY5Y sejteken.....	34
3.6.6 A D-szerin felvétel vizsgálata akut S-ketamin kezelés mellett	34
3.6.7 A hosszan tartó S-ketamin előkezelés hatása a D-szerin felvételre	34
3.7 Reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálat.....	34
3.8 Statisztikai elemzés	35
4. Eredmények.....	36
4.1 A 6-fluoro-1H-indazol-3-ol, DAAO enzim gátló vegyület <i>in vivo</i> vizsgálata.....	36
4.2 A D-szerin transzport vizsgálata.....	38
4.2.1 Az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek D-szerin felvételének karakterizálása és összehasonlítása	38
4.2.1.1 Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének Na ⁺ -függése.....	39
4.2.1.2 Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének kinetikai jellemzése	42
4.2.1.3 A D-szerin felvételért felelős transzporterek Western blot analízise SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon.....	43
4.2.1.4 A D-szerin felvétel gátlhatósága különböző aminosavakkal az SH-SY5Y és asztrocita sejteken.....	44
4.2.2 A SH-SY5Y asztrocita modell sejtek D-szerin transzportjának további karakterizálása	48
4.3 A asztrocita jellegű D-szerin transzport befolyásolása SH-SY5Y sejteken	50
4.3.1 Az S-ketamin akut hatása a D-szerin felvételre	50
4.3.2 A hosszan tartó S-ketamin előkezelés hatása a D-szerin felvételre	51
5. Megbeszélés	54
5.1 DAAO enzimgátló fejlesztése	54

5.1.1	A 6-fluoro-1H-indazol-3-ol, második generációs DAAO enzimgátló vegyület <i>in vitro</i> tesztelt tulajdonságai	54
5.1.2	A 6-fluoro-1H-indazol-3-ol, DAAO enzimgátló vegyület <i>in vivo</i> vizsgálata...	55
5.2	A D-szerin transzport vizsgálata	56
5.2.1	Az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek D-szerin felvételének karakterizálása.....	56
5.2.1.1	Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének Na ⁺ -függése.....	56
5.2.1.2	Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének kinetikai jellemzése és összehasonlítása.....	57
5.2.1.3	A D-szerin felvételért felelős transzporterek Western blot analízise SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon.....	58
5.2.1.4	A D-szerin felvétel gátlása különböző aminosavakkal az SH-SY5Y és asztrocita sejteken	58
5.2.2	A SH-SY5Y asztrocita modell sejtek D-szerin transzportjának további karakterizálása	60
5.3	Az S-ketamin akut és a vegyülettel történő hosszan tartó előkezelés hatásának vizsgálata a D-szerin felvételre az SH-SY5Y sejteken	62
6.	Következtetések.....	64
7.	Összefoglalás	66
8.	Summary	67
9.	Irodalomjegyzék.....	68
10.	Saját publikációk jegyzéke.....	86
11.	Köszönetnyilvánítás	89

Rövidítések jegyzéke

3-PGDH: 3-foszfoglicerát-dehidrogenáz

ALS: amiotrófiás laterálszklerózis

AMPA: 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav

ANOVA: egyszempontos varianciaanalízis

ASCT: alanin-szerin-cisztein-treonin

asc-1: alanin-szerin-cisztein-1

CBIO: 6-klorobenzo[d]izoxazol-3-ol

CE-LIF: kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcencia

CSDS: szociális interakción alapuló krónikus stressz modell

DAAO: D-aminosav-oxidáz

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

DMSO: dimetil-szulfoxid

EPSC: excitátoros posztzinaptikus áram

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

FBS: főtális borjú szérum

GRIP: glutamát receptorral kölcsönható fehérje

HPA- β -CD: 6-monodeoxi-6-mono(3-hidroxil)propilamino- β -ciklodextrin

ITC: izotermális titrációs kalorimetria

L-4FPG: L-4-fluoro-fenil-glicin

LTP: hosszú távú potenciáció

NBD-F: 4-fluor-7-nitrobenzofurazán

NMDA: N-metil-D-aszpartát

NOS: nitrogén-monoxid-szintáz

PAMPA: Parallel Mesterséges Membrán

PBS: foszfát-pufferelt sóoldat

PPI: előingerléses gátlás

PVDF: polivinilidén-fluorid

RIPA: radioimmunprecipitációs vizsgálati puffer

SEM: átlag standard hibája

SOD-1: szuperoxid-dizmutáz 1

SLC: solute carrier

SR: szerin racemáz

TBST: Tween 20-at tartalmazó TRIS-szel pufferelt sóoldat

THB: TRIS-szel beállított HEPES puffer

t-Pro: transz-4-hidroxi-L-prolin

TRIS: trisz-(hidroximetil)-amino-metán

1. Bevezetés

1.1 D-aminosavak az élő szervezetben

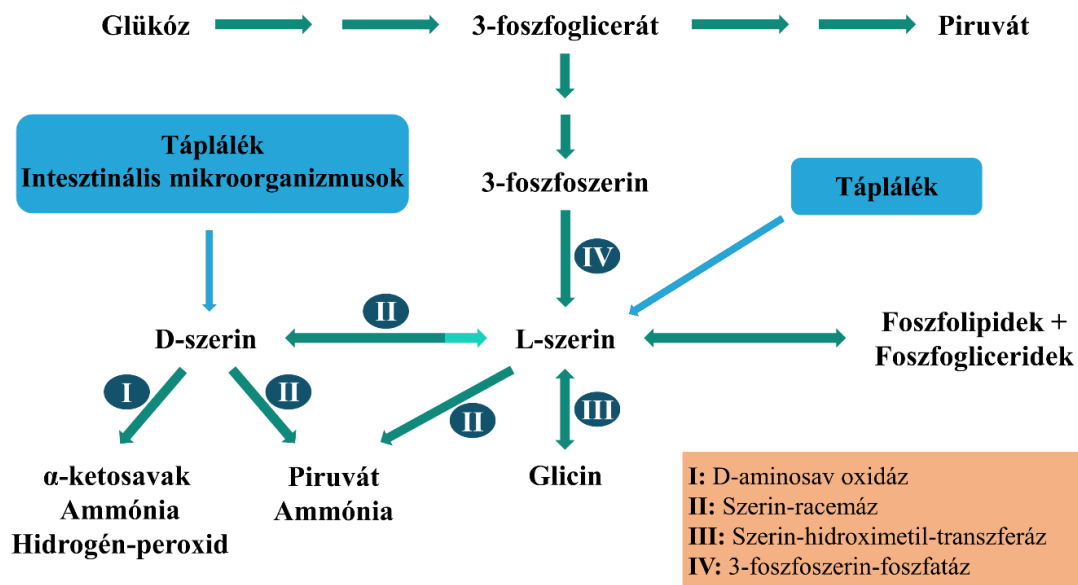
A glicin kivételével, a szervezetben található aminosavak királisak. Az α -szénatom körüli négy különböző szubsztituens két térbeli konformációt vehet fel, melyek nem hozhatóak fedésbe egymással. Ezt a két formát enantiomereknek nevezzük. Megkülönböztetjük az L-enantiomert (a latin „laevus”, bal szóból eredően), illetve ennek tükörképi párját a D-enantiomert (a latin „dexter”, jobb szóból eredően). Az enantiomerek fizikai és kémia tulajdonságai teljesen megegyeznek, azzal a kivétellel, hogy a síkban polarizált fényt az ellentétes irányba forgatják (1).

Az aminosavak fontos összetevői a peptideknek, fehérjéknek és szabad formában transzmitterként is szerepet játszhatnak. Korábban úgy gondolták, az emberi szervezetben kizárólagosan az L-enantiomer tölti be a fent említett funkciókat, a D-formát, mint nem természetes aminosavakat tartottak számon, amelyek az ételből származóan, illetve a bélflóra baktériumainak metabolizmusából, esetleg spontán racemizáció eredményeként kerülnek be az élőlények szervezetébe (2, 3). Habár a semleges és savas karakterű D-aminosavak bontását végző specifikus enzimet, a D-aminosav-oxidázt (DAAO) már korábban kimutatták emlősök szervezetében (4), szerepét nem vizsgálták részletesen, hiszen nem tulajdonítottak a D-aminosavaknak valós fiziológiai funkciókat. Az analitikai módszerek érzékenységének fejlődésével pontosabb mérések váltak elérhetővé egyes aminosavak D-enantiomerjének mennyiségével kapcsolatban mind a periférián, mind a központi idegrendszerben. Detektálható mennyiséget mutattak ki például a D-aszpartát (5, 6), a D-alanin (7) és a D-szerin (8) vonatkozásában. További vizsgálatok során kiderült, hogy egyes D-aminosavak meglepően magas koncentrációban vannak jelen az emlősök központi idegrendszerében és a perifériás szövetekben, bizonyos esetekben meghaladva az L-enantiomer mennyiségét (9). A D-szerin, a D-aminosavak fontos képviselője, illetve a kísérletes munka során is a D-szerinnel foglalkoztunk átfogóbban, így a továbbiakban ezt a molekulát tárgyalom részletesebben. A D-szerint humán és patkány központi idegrendszerben magas koncentrációban mutatták ki. Regionális lebontásban a cerebrális kortextben, a hippokampuszban és a striátumban nagy mennyiségben volt jelen a molekula, de mérhető koncentrációt találtak a köztiagyban, a cerebellumban és gerincvelőben is (9-11). Az egyes szövetekben mért magas koncentrációk, illetve a szervezetben megtalálható DAAO bontó enzim azt a feltételezést erősítették, hogy a D-szerin specifikus biológiai funkciókat láthat el. A későbbiekben igazolták, hogy a D-szerin

– a glicin mellett – ko-agonista tulajdonsággal rendelkezik az N-metil-D-aszpartát (NMDA) molekulára nyíló ionotróp glutamát receptoron, így fontos szerepet játszik a neurotranszmisszióban (12). Ennek a folyamatnak a részletes kifejtése a későbbiekben történik.

1.2 A D-szerin homeosztázisa

A D-szerin homeosztázisban közvetve, illetve közvetlenül résztvevő enzimek és biokémiai folyamatok összefoglalását mutatja be az 1. ábra.



1. ábra: A D- és L-szerin homeosztáziséért felelős folyamatok és enzimek kapcsolata. A D-szerin elsődleges forrása a központi idegrendszerben az L-szerinből kiinduló, szerin-racemáz enzim által katalizált folyamat. A D-szerin metabolizmusáért elsősorban a DAAO és a szerin-racemáz enzimen zajló folyamatok a felelősek. A D-szerin prekursoraként tekinthető L-szerin származhat a táplálékból, illetve különböző endogén molekulák biokémiai folyamatokban történő átalakításából. Az ábra Fuchs és mtsai (2005) munkája alapján készült (13).

1.2.1 A szerin racemáz (SR) működése

Ahogy az korábban említésre került, az emlősök agyában kimutatott D-szerinről korábban azt feltételezték, hogy az elfogyasztott ételből, a bélflóra baktériumainak metabolizmusából, vagy spontán racemizáció eredményeként kerül a perifériás szövetekbe, majd innen a központi idegrendszerbe (2). Később patkány agyból a D-szerin L-szerinből történő szintézisét bizonyították (14), majd Wolosker és mtsai. a SR enzimet azonosították egérből, amely közvetlen módon katalizálta a D-szerin szintézisét L-szerinből. A SR enzimről kimutatták, hogy

nagy szelektivitást mutat az L-szerinre más L-aminosavakkal összehasonlítva. A fordított reakció – D-szerinből L-szerin – katalízise is végbemegy az enzim közreműködésével, azonban ennek a folyamatnak hatékonyságát jóval kisebbnek találták, így fiziológias körülmények között a D-szerin képződése valószínűsíthető (15). A későbbiekben a SR kettős funkcióját igazolták, miszerint a racemizáció mellett egy α,β -eliminációs folyamatért is felelős az enzim. Ennek a reakciónak szubsztrátja az L-szerin (16-18), illetve a D-szerin is, mely utóbbival a fiziológias körülmények közötti D-szerin lebontást is magyarázták (18). Az enzim lebontásban játszott pontos szerepe vita tárgya. Stříšovský és mtsai. által végzett kísérletek alapján, a D-szerin lebontása akkor játszódhat le, ha a D-szerin szintje meghaladja az adott sejt kompartmentben az L-szerin szintjét, figyelembe véve affinitásukat az enzim katalizálta α,β -elimináció iránt (19). A SR működésének szabályozása a központi idegrendszerben egy komplex folyamat végeredménye. A glicin, az intracelluláris koncentráció tartományát vizsgálva, az enzim kompetitív gátlószerének bizonyult (19, 20). Korábban említésre került, hogy a D-szerin – a glicin mellett – az NMDA receptor ko-agonista molekulája a központi idegrendszerben (12). Ehhez kapcsolódó fontos felfedezés, hogy glutamát receptorral kölcsönható fehérje (GRIP) a SR enzimnek is kötő partnere, annak aktivitását növeli, így közvetett módon megnöveli a D-szerin mennyiségét is (21).

A SR enzimet expresszáló központi idegrendszeri sejtek típusa egy vitatott kérdés. A kezdeti kutatások a SR asztrocitákban való lokalizációját mutatták ki (15, 22-24). Későbbi vizsgálatok már a neuronok elsődleges szerepét azonosították, a SR enzim általi D-szerin szintézisben. Wolosker és mtsai. egy új antitest alkalmazásával, elsősorban a neuronokban detektálták a SR enzimet (25-27). Asztrocitákon gyenge immunoreaktivitás volt tapasztalható (26, 28). Az elsődlegesen neuronális SR lokalizációt in situ hibridizációval is alátámasztották (25, 29). Mori és mtsai. egy újszerű kísérleti elrendezéssel bizonyították, hogy a SR leginkább idegsejteken expresszálódik, asztrocita sejteken nem volt mérhető a SR immunoreaktivitása. Negatív kontrollként SR génkiütött egereket alkalmaztak (30). Az előzőeket figyelembe véve kijelenthető, hogy a D-szerin fő szintézis helyének a neuronok tekinthetőek a központi idegrendszerben.

1.2.2 A DAAO enzim szerepe a D-szerin metabolizmusában

Habár a DAAO enzim jelenlétét már korábban kimutatták rágcsálók szervezetében (Krebs és mtsai, 1935) (4), valós biológiai funkciót nem társítottak hozzá, hiszen szubsztrátjaikat, a D-szerint és a D-alanint is csak melléktermékként tartották számon a magasabb rendű élőlények

szervezetében. Az agy egyes régióiban mért magas D-szerin koncentrációk (9, 10), illetve a felfedezés, hogy az agyi D-szerin és DAAO eloszlás fordított arányban állnak egymással (31), erősítette meg a feltevést, miszerint a DAAO enzim biológiai funkciót tölt be az emlősök agyában. Számos további tanulmány támasztja alá ezt az elméletet. Ilyen például a Morikowa és mtsai. által végzett kutatás, amelyben ddY/DAAO⁻ mutáns, alacsony DAAO enzim aktivitású egereket használtak. A DAAO funkció hiánya emelkedett szubsztrát szinteket eredményezett a legtöbb agyi területen. A növekedés mértéke azonban különbözőnek bizonyult az egyes D-aminosavak tekintetében. A D-alanine koncentrációja minden vizsgált agyi régióban megemelkedett. A D-szerin közel 10-szeres emelkedést mutatott a cerebellumban, de mennyisége nem változott meg az előagyban a vad típusú állatokhoz viszonyítva (32). Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a DAAO enzim működése az emlősökben egy komplex folyamat, amely regionális különbségeket mutat az enzim aktivitása szempontjából. Kijelenthető, hogy a lecsökkent DAAO aktivitás hatással van egyes D-aminosavak szintjére az agyban. A Morikowa és mtsai által elvégzett kísérletek nem adnak egyértelmű választ, hogy a megemelkedett D-aminosav koncentrációk az agyi DAAO enzim alulműködése következtében, vagy a periférián nagy mennyiségben jelen lévő DAAO csökkent működéséből fakadóan alakulhattak ki. Egy későbbi vizsgálatban, ahol Lentivírus közvetített RNS-kölcsönhatás révén, célzottan a cerebellumban történt a DAAO génkiütés az állatokban, a D-szerin szint 77%-os emelkedését tapasztalták (33), ezzel igazolva az agyi DAAO enzim közvetlen szabályozó szerepét.

Az első regionális eloszlást vizsgáló tanulmányok a DAAO enzimet az alsó agytörzsi szakaszon és a cerebellum területén azonosították (34). Később, mind a DAAO enzimhez tartozó mRNS-t, mind magát a fehérjét kimutatták az előagyban és a közepagyti területeken is (35, 36), azonban aktivitásuk nagy mértékben elmaradt a cerebellumban mért értéktől (37). Western blot analízissel detektálható mennyiségű DAAO enzimet mutattak ki kortikális homogenátumból (35, 38, 39), míg immunohisztokémiai módszerrel a frontális kéregből és a hippokampuszból detektálták az enzim kis mennyiségét (35, 36, 40). A DAAO enzimhez tartozó mRNS és fehérje detektálhatósága nem feltétlenül kapcsolódik az enzim mérhető aktivitásához, ahogy ezt egy nyúl vesén végzett kísérletből származó eredmények mutatják (41). A DAAO enzim kofaktora a flavin-adenin-dinukleotid (FAD) molekula (42). Az inaktív emberi DAAO forma, összefüggésben állhat a korábban tapasztalt gyengébb FAD kötő képességével (43). A DAAO enzim bizonyított expressziója és ehhez társuló minimális aktivitása az előagyban felveti a kérdést, hogyan szabályozódik a D-szerin mennyisége ezen a területen. Egy lehetséges

magyarázat a transzport folyamatok szabályozó szerepe a sejtek és a szinapszisok között, illetve az agy és periféria közötti megoszlásban (44).

A DAAO enzimről elfogadott nézet volt, hogy elsősorban a gliasejtekben található meg a központi idegrendszerben. Hisztokémiai vizsgálattal azonosították cerebelláris asztrocitákban és Bergmann gliasejtekben (34, 45, 46). A DAAO enzimet detektálták hippokampusz és cerebrális kortex gliasejtjeiben is (36, 40, 47). Az utóbbi időben egyre több kutatás erősítette meg, hogy a DAAO enzim nem kizárólagosan a gliasejtekben található meg. Moreno és mtsai kimutatták a DAAO enzimet patkány Golgi és Purkinje sejtekben (40). Hippokampusz és cerebrális kortex piramissejtjei ugyancsak DAAO immunoreaktivitást mutattak (36, 40). Az enzim jelenlétét azonosították a középagy dopaminerg magvainak neuronjaiban (36). A fentebb említett eredményekkel ellentétben, Sacchi és mtsai. egy jól felépített kísérletben, egy újonnan alkalmazott antitestet használva, nem mutattak ki neuronális DAAO immunreaktivitást human kortikális és középagy szövetekben (47). A gliasejtek mellett valószínűsíthető a DAAO neuronális lokalizációja is, azonban további vizsgálatok szükségesek ennek megerősítésére.

Szubcelluláris szinten a DAAO enzimet peroxiszómákból mutatták ki a cerebellum Bergmann gliasejtjeinek és asztrocitáinak vizsgálatakor (46). A későbbiekben egy részletes kolokalizációs immunfluoreszcens jelölést alkalmazó kutatás azonban arra az eredményre jutott, hogy human asztrocita kultúrán a DAAO enzim nagyobb mennyisége volt megtalálható peroxiszómákon kívül (47).

A DAAO enzim regionális és sejtszintű eloszlása nagy mértékben összetett kérdés. Az eredeti nézet, miszerint a DAAO egy hátsóagyi, gliális, peroxiszómákban megtalálható enzim, nem ad pontos leírást a való lokalizációról. A DAAO jelenléte nem feltétlenül jár együtt az enzim valós, D-szerin bontást eredményező aktivitásával az adott területen. További kutatás szükséges a DAAO enzim pontos működésének megértéséhez.

1.2.3 A D-szerin homeosztázist szabályozó transzporterek az agyban

1.2.3.1 Az alanin-szerin-cisztein-1 (asc-1) transzporter működése

Az asc-1 transzporter (SLC7A10 gén terméke), az SLC7 (solute carrier) transzporter család tagja (összefoglaló: (48)). Az asc-1 transzporter, egy Na⁺-független antiporter, amely a következő szubsztrátokkal rendelkezik: glicin, alanin, szerin, treonin és cisztein (49, 50). Ez a transzporter nem rendelkezik sztereospecifitással, részt vesz a D-aminosavak szállításában, így a D-szerin transzportban is. A D-szerin viszonylagosan magas affinitással kötődik ehhez a

transzporterhez (K_m érték $\sim 50 \mu\text{M}$) (49). A központi idegrendszeri D-szerin szállításban szerepet játszanak még a Na^+ -függő ASCT-1 és ASCT-2 (alanin-szerin-cisztein-treonin) transzporterek. Megemlítendő azonban, hogy ezek affinitása elmarad az asc-1 transzporternél leírtaktól. Több kutatás kimutatta, hogy a D-izoleucin szelektív kölcsönhatást mutat az asc-1 transzporterrel (51, 52). Ezek közül az egyik a Rosenberg és mtsai által végzett kísérlet, amelyben különböző transzporterekkel transzfektált HEK293 sejteken, nem tapasztaltak a D-izoleucin által okozott gátlást az ASCT-1 és ASCT-2 transzportereken történő glicin felvételben, szemben az asc-1 transzporterrel kifejtett hatásával (51). Az asc-1 transzporter szelektív szubsztrátja még az S-metil-L-cisztein (53). Az asc-1 transzporter működéséhez nélkülözhetetlen a 4F2 (SLC3A2 gén terméke) nehéz lánccal történő kölcsönhatás kialakulása is (50).

Az asc-1 transzporter antiporter tulajdonsággal rendelkezik. Ez azt jelenti, hogy az asc-1 közreműködésével kicserélődési folyamat játszódik le az aminosavak között, az egyik aminosav felvétele, ezzel párhuzamosan a másik felszabadítása történik (49, 51). Az agy legtöbb részén megtalálható a transzporter, amely kizárólagosan neuronálisnak tekinthető (54-56). Az agyi működésben betöltött fontos szerepét jól reprezentálja Rutter és mtsai által végzett kísérlet, ahol asc-1 génkiütött egerek előagyában 35%-kal, cerebellumában 25%-kal csökkent a D-szerin neuronális felvétele a vad típushoz képest (57). Központi idegrendszeri funkciója függ a neuronális kapcsolaton belüli elhelyezkedésétől. Preszinaptikus elhelyezkedés esetén a D-szerin felszabadításában játszik fontos szerepet, hozzájárulva a szinapszisok NMDA receptor aktivitásának szabályozásához (27, 51). Posztzinaptikusan elhelyezkedve a D-szerin felvételében játszik fontos szerepet a neuronokban (58). Szubsztrátjai között megtalálható a glicin is, azonban ennek szabályozását csak részben kötik az asc-1 transzporter működéséhez (58), hiszen a központi idegrendszerben számos specifikusabb glicin transzporter található (59).

1.2.3.2 Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek működése

Az ASCT-1 (jelölik még SATT-ként, az SLC1A4 gén terméke) és az ASCT-2 (jelölik még AAAT-ként, az SLC1A5 gén terméke) transzporterek Na^+ -függő módon antiporterként funkcionálnak (összefoglalva: (60)). Ezek a transzporterek nagy affinitással rendelkeznek az L-alanin, L-szerin, L-cisztein és L-threonin aminosavakhoz és sztereoszelektivitást mutatnak az L-aminosavak szállítása során (61, 62). Megemlítendő, hogy az ASCT-2 transzporterhez nagy affinitást mutat még az L-glutamin, illetve az L-aszparagin is (62-64). Az S-ketamint (az R-ketamin enantiomer párját), szelektív ASCT-2 gátlószerként írták le, amely rendelkezik egy

kompetitív és egy nagy affinitású nem-kompetitív gátló karakterrel a transzporterén (65). Ezt bizonyította, hogy az S-ketamin hasonló hatást ért el, mint amit az ASCT-2 génkiütés okozott PC-12 sejteken. Mindkettő kezelés – közel azonos mértékben – megnövelte az intracelluláris D-szerin mennyiséget, illetve ezzel párhuzamosan lecsökkentette az extracelluláris D-szerin szintet a PC-12 sejtekben. A vegyület ugyancsak hasonló változást okozott, mint a szelektív ASCT-2 transzporter gátlószer (66), a benzil-D-szerin (65). Bár szelektivitásukat még nem bizonyították, egyes aminosav származékok néhány μM -os potenciállal gátolták az ASCT-2 transzportert (67). Az L-proline és a transz-4-hidroxi-L-prolin (t-Pro) az ASCT-1 transzporter szubsztrátjai (68). Ennek megfelelően a t-Pro szelektíven és kompetitíven gátolta a D-szerin ASCT-1 transzporter-függő felvételét, szemben az ASCT-2-függő transzportjával (64). A t-Pro kezelés vad típusú egereken, azonos mértékben csökkent az agyi D-szerin mennyiséget, mint az ASCT-1 génkiütés, ami ugyancsak a t-Pro szelektív karakterét mutatja (69). Egy érdekes teória található Weis és mtsai által közölt munkában, miszerint az ischémiára jellemző csökkent pH-val rendelkező mikrokörnyezetben az ASCT-1 transzporter affinitása megnövekedhet az L-glutamát iránt. Fiziológias viszonyok között az L-glutamát gyenge szubsztrátja az ASCT-1 transzporternek (70). A kifejezetten gyógyszerfejlesztés céljából tesztelt fenilglicin származékok közül, például L-4-kloro-fenilglicin potens és szelektív ASCT-1 és ASCT-2 gátlószernek bizonyult, amely a két típus között nem mutat különbséget (71).

Működésüket tekintve, az ASCT transzporterek a különböző neutrális aminosavak kicserélődésében játszanak fontos szerepet. ASCT-1 és ASCT-2 transzportereket expresszáló dél-afrikai karmosbéka petesejtjén, az ismert szubsztrátok (L-alanin és D-szerin) az előkezelés során felvételre kerülő, izotóppal jelzett D-szerin felszabadulását eredményeztek mindkét transzporter esetében (64). ASCT-2 transzportert expresszáló asztrogliákultúrán az L-glutamin (ASCT-2 transzporter szelektív szubsztrát), illetve az L-cisztein (ASCT-1 és ASCT-2 transzporter szubsztrát) kezelés D-szerin kibocsátást indukáltak, amely a kicserélődésre enged következtetni (72).

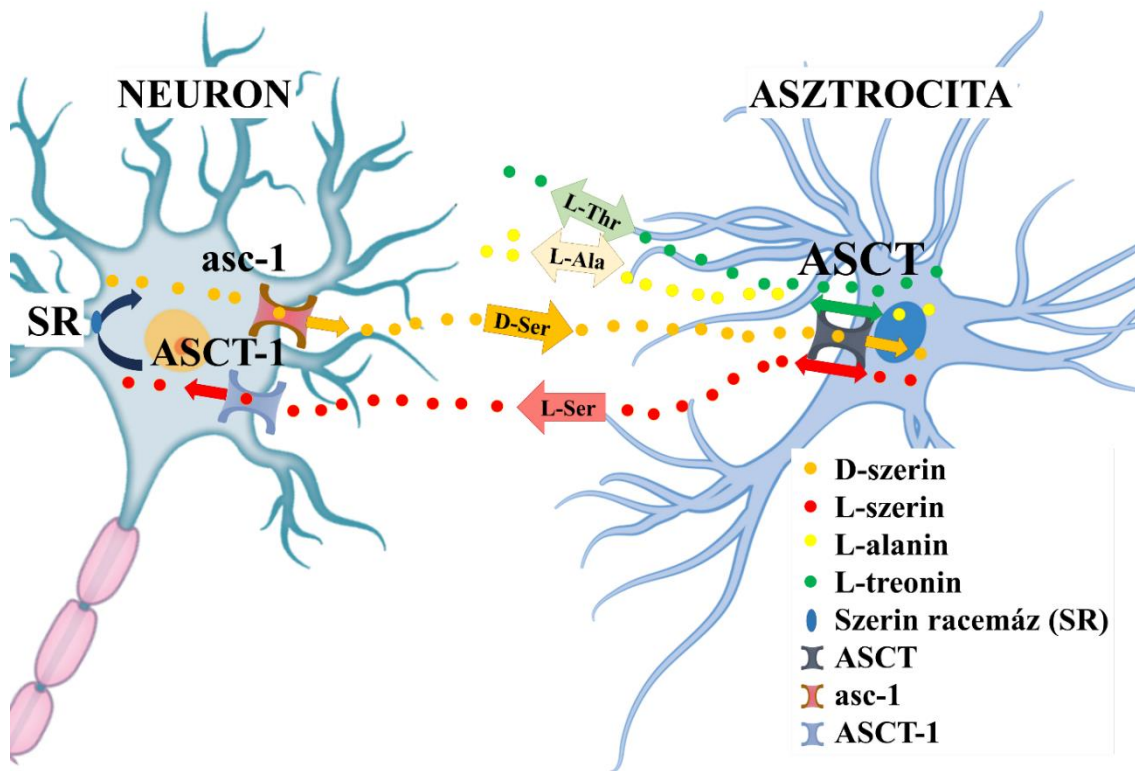
Az ASCT-1 transzporter nagy mértékben expresszálódik az agyban (61, 73), az ASCT-2 transzporter központi idegrendszeri kifejeződése viszont máig vitatott (58). Korábban gyengén mérhető, vagy teljesen mérhetetlen ASCT-2 transzporter kifejeződésről számoltak be a központi idegrendszerben (62, 74). A D-szerin felvétel mértéke változatlan ASCT-2 génkiütött egerek asztrocitáiban, míg az ASCT-1 génkiütött állatokban szignifikánsan csökkent. Ezek az eredmények az ASCT-2 transzporter elhanyagolható működését támasztják alá (69). Ezzel ellentétes eredmény, hogy asztrocitákultúrákban megtalálható a működőképes ASCT-2

transzporter (64, 72). Bröer és Brookes az *in vivo* és *in vitro* kísérletek során tapasztalt különbségekre azzal a lehetséges magyarázattal szolgáltak, hogy az asztrocita kultúra inkább egy reaktív, patológiás karakterű fenotípusnak tekinthető, szemben az *in vivo* körülmények között, fiziológias környezetben funkcionáló asztrocitákkal (75). Erre mutathat az is, hogy egér hippocampusban kimutatták az ASCT-2 transzporter jelenlétét mind mRNS, mind fehérje szinten, melyek mennyisége megnövekedett a szociális interakción alapuló krónikus stressz modell (CSDS) hatására. Ezzel egyidejűleg az extracelluláris D-szerin csökkent mennyisége volt megfigyelhető a CSDS egerekben (76).

Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporter sejttípus szerinti megoszlása a központi idegrendszerben jelenleg is vitatott. Egyes kutatócsoportok eredményei alapján, a transzporterek kifejeződnek mind neuronokon, mind asztrocitákon (70, 72, 77, 78). Ezt támasztja alá, hogy neuron és asztrocita kultúrán (56, 79), illetve patkányokon végzett kísérletben (53) a D-szerin felvétel karaktere megegyezett a ASCT transzportereknél ismert tulajdonságokkal. Ezekben a kísérletekben az ASCT-2 transzportert kapcsolták össze a D-szerin felvétellel, mivel egy korábbi kutatás eredményei arra utaltak, hogy a D-szerin nem szubsztrátja az ASCT-1 transzporternek (80). Rosenberg és mtsai ezzel ellenkező eredményre jutottak kísérletükben, amikor ASCT-1 vagy ASCT-2 transzportereket túlexpresszázó HEK293 sejteken, hasonló mértékű D-szerin felvételt tapasztaltak (51). Egyes kutatócsoportok az ASCT-2 transzporter működését kizárólagosan asztrocita sejtekhez kapcsolják. Egér intakt retinán az ASCT-2 transzporter immunhisztokémiai mérése, a Müller sejteken azonosította a fehérjét. Ezt a sejttípust egy speciális asztrocita karakterű sejtnek jellemzik (63). Az ASCT-1 transzporter lokalizációjáról kevesebb kérdés merül fel az egyes kutatásokban. Különböző betegségekben szenvedők postmortem agyi szeparátumaiban, az ASCT-1 transzporter immunhisztokémia vizsgálata pozitív eredményt adott mind neuronokban, mind asztrocitákban (81).

Herman Wolosker elmélete, amelyet szerin-kicszerélődési (serine-shuttle) modellnek nevezett el, egy remek magyarázatot ad a neuronok és asztrociták között lejátszódó metabolikus kommunikációra, amelynek fontos elemei a D-szerin szállításában résztvevő transzporterek. Az elmélet lényege röviden a következő: a D-szerin szintézis elsődlegesen a neuronokban történik, ehhez azonban L-szerinre van szükségük, hiszen a neuronok nem képesek glükózból L-szerint készíteni. Az L-szerin szintézisét az asztrociták végzik és innen szabadul fel az aminosav az ASCT transzportereken keresztül, majd jut be a neuronokba, így közvetve befolyásolva a D-szerin mennyiségét. A SR enzim közreműködésével racemizáció révén keletkezett D-szerin az asc-1 transzporter közreműködésével szabadul fel a szinapszisokba. Ezt követően

feltételezhetően mind az asc-1, mind az ASCT transzporterek részt vesznek az extracelluláris visszavételben, a D-szerin szint szabályozásában (69, 82). A modell működését az 2. ábra mutatja be.

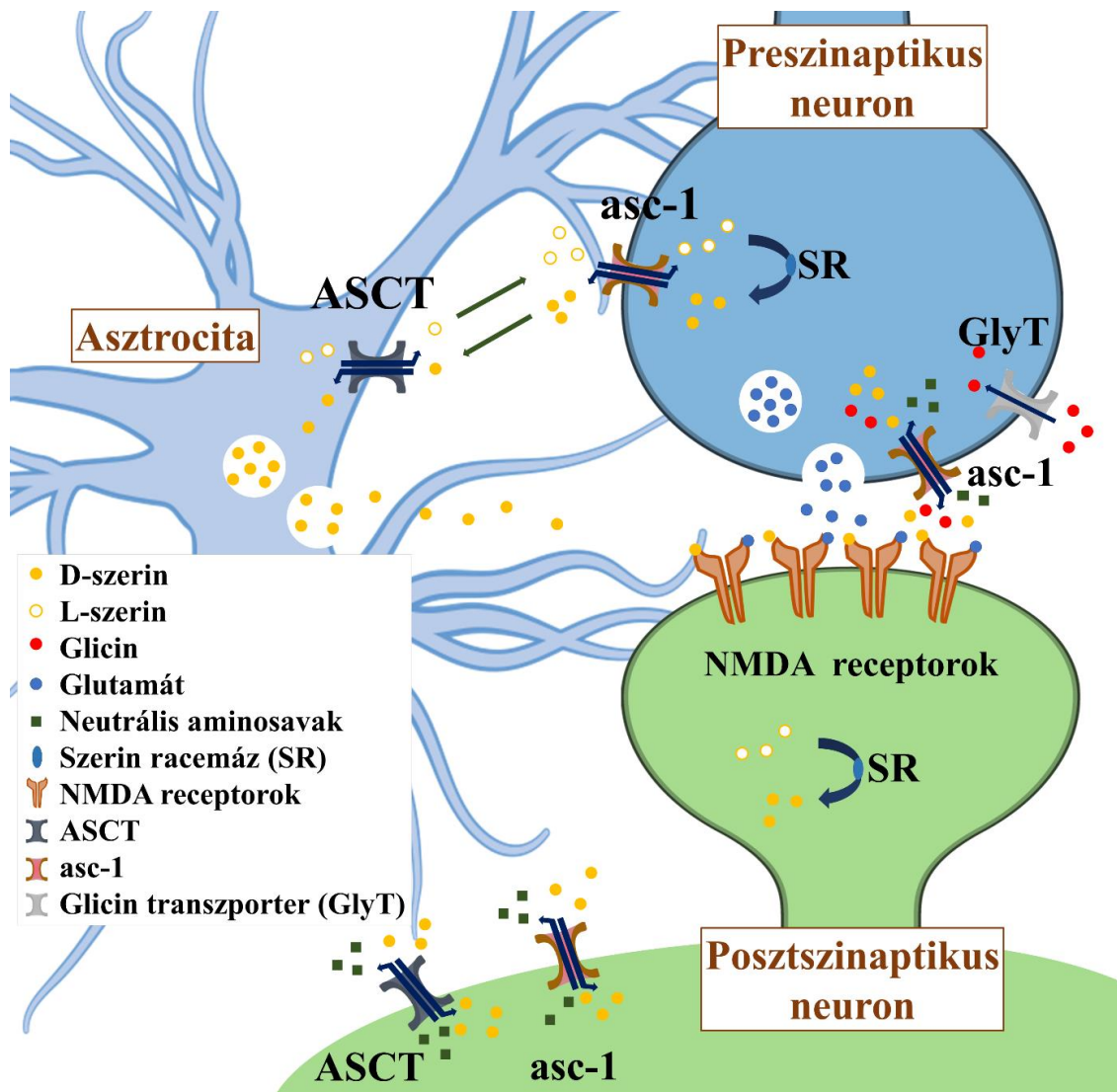


2. ábra: A neuronok és asztrociták között zajló biokémia kommunikációt bemutató szerin-kicserélődési modell. A D-szerin elsődlegesen a neuronokban képződik a SR enzim közreműködésével, L-szerin aminosavból kiindulva, majd felszabadul az asc-1 transzporteren keresztül. Az döntően asztrocita sejtekre jellemző ASCT transzporterek felveszik a D-szerint, ami raktározódik, illetve metabolizálódik. A felvétellel párhuzamosan az asztrocita sejtek felszabadítják az L-szerint, amelyet a neuronok az ASCT-1 transzporteren keresztül vesznek fel. A felvett L-szerin újra beléphet a D-szerin szintézis folyamatába, így biztosítva az NMDA receptor ko-agonista vegyületének megfelelő mennyiségét. Az ábra Kaplan és mtsai (2018) munkája alapján készült (69).

Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek egyik fontos központi idegrendszeri szerepe az LTP folyamatok szabályozása. A fenilglicin analógok a két transzporter szelektív gátlószerei, amelyek patkány vizuális kortexen LTP növekedést okoztak. Habár számos hatás befolyásolhatja a kialakuló LTP számát, a fenilglicin analógok transzportert gátló hatásának

mértéke kiváló egyezést mutatott az LTP növekedésének mértékével, ami az ASCT-1 és -2 transzporterek szerepére utal. Ezt a feltevést erősíti, hogy a kialakuló növekedés DAAO enzim hozzáadásának hatására megszűnt (71). Következtetesként elmondható, hogy a Na⁺-függő transzporterek fontos funkciója a szinapszisok környezetében megtalálható D-szerin felvétel elősegítése. A neuronokban történő D-szerin szintézishez szükséges van az L-szerinre, melynek transzportjában ugyancsak fontos szerepet tulajdonítanak az ASCT-1 transzporternek (83). Ezen felül az L-alanin felszabadulása a gliasejtekből, illetve felvétele a neuronokba is ASCT-1 transzporter közvetítéssel történik (70, 73). Jól megalapozott feltevés, hogy az L-glutamin felszabadulása asztrocita sejtekből, az ASCT-2 transzporterrel keresztül játszódik le (81).

A két transzporter típus, azaz az asc-1, illetve az ASCT-1 és az ASCT-2 transzporterek közös, együttes működése még nem tisztázott teljes mértékben, szerepük az extracelluláris D-szerin diffúziójának szabályozásában további kutatásokat igénylő feladat. A szinaptikus és extraszinaptikus térben lejátszódó D-szerin transzport folyamatokat, illetve a neuronok és asztrocita sejtek közötti kapcsolatot a 3. *ábra* mutatja be.



3. ábra: A D-szerin transzport folyamatai a szinaptikus és extraszinaptikus térben. Az asztrocita sejtben termelődött L-szerin felszabadul az ASCT transzporterekén keresztül, majd felvételre kerül az asc-1 transzporter segítségével a preszinaptikus neuron sejtekbe. Itt a SR enzim lejátszódo reakció révén az L-szerinből D-szerin képződik. A képződött D-szerin felszabadulhat a szinaptikus részbe, vagy visszazállításra kerülhet az asztrocita sejtekbe (így kialakítva a szerin-kicserélődési modell útvonalaát). A D-szerin, mint gliotranszmitter felszabadulhat vezikuláris módon az asztrocitákból is. A fentebb említett folyamatok mellett a D-szerin transzportja megvalósulhat az extraszinaptikus térben a posztszinaptikus neuronon található asc-1 és ASCT transzporterekén keresztül is. Az ábra Martineau és mtsai (2014) munkája alapján készült (58).

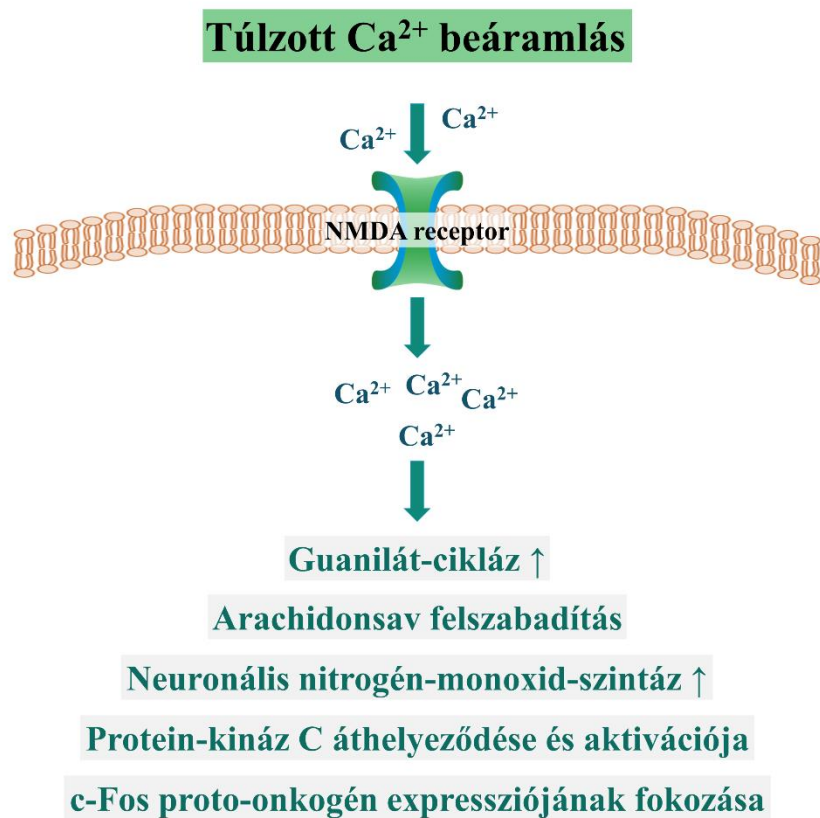
1.3 Az NMDA receptor működése és szerepe a központi idegrendszerben

Az NMDA receptor egy ionotróp glutamát receptor, amely gyors excitátoros neurotranszmissziót eredményez az emlősök központi idegrendszerében. Az NMDA receptorok biofizikai tulajdonságai lehetővé teszik az aktiválást követő nagy mértékű töltés

továbbítást. Ennek háttérében a magasnak tekinthető csúcs csatorna konduktancia és a lassú deaktivációs folyamatok állnak (84). Heteromer szerkezetű receptor, amely egy GluN1 alegységből áll, amelyhez legalább egy GluN2 (A-D) alegység kapcsolódik (85). Egyes esetekben a GluN1-GluN2 komplexhez kapcsolódhat egy GluN3 alegység is (86). A korai funkcionális elemzések azt mutatták, hogy a receptor aktiválásához az excitátoros glutamát mellett szükség van az úgynevezett sztrichnin inszenzitív glicin-kötőhely telítésére is (87, 88). Ahogy a kötődési hely elnevezése is mutatja, a glicint tekintették elsődleges ko-agonista vegyületnek (87), később azonban a D-szerinről is bebizonyosodott, hogy rendelkezik ilyen funkcióval (89). Habár a DAAO enzim már régóta ismert volt az emlősök központi idegrendszerében (4), a D-aminosavak endogén jelenlétét a gerincesek szervezetében nem feltételezték (2, 3). Hashimoto és mtsai kimutatták a D-szerin jelenlétét emlős előagy mikrodialízis mintáiban gázkromatográfiás vizsgálattal. A D-szerin mennyisége körülbelül egyharmada volt az L-szerin mennyiségének, amely túlmutatott az esetleges bélflórából, vagy spontán racemizációból származó eredeten (10, 11). A D-szerin háromszor potensebb ko-agonistának mutatkozott, összehasonlítva a glicin affinitásával (89). A D-szerin ko-agonista funkcióját további kutatási eredmények támasztották alá. A D-szerin és az NMDA receptor azonos megjelenési mintázatát azonosították patkány előagyban, amely a funkcionális kapcsolat lehetőségét erősítette meg (31). Az egyezés még közelebbi volt a GluN2B alegységet tartalmazó NMDA receptorok tekintetében (31). A D-szerin NMDA receptoron betöltött szerepét számos funkcionális vizsgálatok is alátámasztják. A D-szerin szelektív bontása DAAO enzimmel, vagy D-szerin deaminázzal, csökkentette az NMDA receptor-mediált depolarizációt hippokampusz szeletekben, hippokampusz kultúrán, hipotalamikus supraoptikus magvakban, retina ganglionsejteketben (23, 51, 90-94). DAAO enzimre nézve null mutációval rendelkező egereken megnövekedett NMDA receptor-függő excitátoros poszt-szinaptikus áramokat (EPSC) muattak ki a gerincvelő hátsó szarvi részén (95), illetve CA3-CA1 hippokampális szinapszisokban (96). Ezek az adatok a D-szerin elsődleges ko-agonista szerepét valószínűsítik, azonban vannak agyi területek, ahol a glicint találták preferált ligandnak, ilyen például az agytörzs (97), a gerincvelő (98) és a cerebellum (90, 97). Az agonista glutamát kötődése, illetve a glicin-kötőhely telítése mellett a receptor aktiválásához elengedhetetlen, egy megfelelő mértékű neuron depolarizáció, amely a Mg^{2+} blokkot távolítja el az NMDA receptor pórusából. Az előbb említett folyamatok együtt eredményezik az NMDA receptor aktivációját és a Ca^{2+} beáramlását a sejtbe. Fiziológiai körülmények között ez a folyamat számos intracelluláris metabotróp útvonal szabályozását végzi, ilyenek például a guanilát-cikláz (99) és a neuronális nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) (90) aktivációja, arachidonsav felszabadítás

(100), a protein-kináz C áthelyeződése és aktivációja (101), illetve a c-Fos proto-onkogén expressziójának fokozása (102). Ha azonban túl nagy mértékű Ca^{2+} beáramlás történik az NMDA receptoron keresztül, az excitotoxicitáshoz vezethet, ami apoptotikus sejthalált eredményezhet (103). Az NMDA receptor közvetítette excitotoxicitáshoz kapcsolódó folyamatokat az 4. ábra mutatja be részletesen.

4. ábra: Az NMDA receptor túlzott működéséhez kapcsolódó, excitotoxicitást eredményező folyamatok.



Az intracelluláris biokémiai folyamatok fiziológias körülmények között, hosszútávú idegrendszeri változásokat (pl. LTP) eredményeznek. Az LTP kitüntetett szereppel rendelkezik a központi idegrendszerben, hiszen ezt a folyamatot tételezik fel a memória és a tanulás molekuláris hátterének (104-107). Ezek alapján az NMDA receptor a következő folyamatok szabályozásában vesz részt: memória kialakulása, tanulás, agyi fejlődés és szinaptikus plaszticitás. Megemlítendő még, hogy egyes krónikus fájdalmakban is azonosították a receptor közreműködését (108). Az NMDA receptor pontos funkciójában a szinapszishoz viszonyított elhelyezkedése is fontos szerepet játszik. A szinaptikus NMDA receptor aktiváció a

neuroprotektív folyamatokért lehet felelős, míg az extraszinaptikus NMDA receptorok a toxicitást eredményező jelátviteli utak aktiválásában vehetnek részt (109). Ehhez társul a feltételezés, hogy a D-szerin inkább szinaptikus ko-agonistaként, a glicin inkább extraszinaptikus ko-agonistaként funkcionál a szervezetben (94). Az NMDA receptor alul-, és túlműködése patológiás folyamatokban játszhat szerepet (összefoglalva: (110)). Ennek tükrében az NMDA receptort befolyásoló folyamatok megismerése, illetve a receptor aktivitásának szabályozása, hatalmas lehetőséget rejt az egyes betegségek kezelése szempontjából.

1.4 A D-szerin, illetve homeosztázisának szerepe a központi idegrendszeri betegségekben

A D-szerin szerepet játszik az NMDA receptor közvetítette neurotranszmisszióban, így az NMDA receptor-függő neuroplaszticitásban, illetve az agyi fejlődésben is. Ezek alapján elmondható, hogy a D-szerin homeosztázisban előforduló szabályozási problémák különböző patológiás folyamatokban játszhatnak fontos szerepet. Az NMDA receptor megváltozott aktivitását számos betegségben mutatták ki: amiotrófiás laterálszklerózisban (ALS), Alzheimer-kórban, szkizofréniában, Parkinson-kórban, depresszióban és epilepszia betegségben is. Az 1. táblázat mutatja be az egyes betegségekben feltételezett D-szerin szint változásokat a központi idegrendszerben.

1. táblázat A D-szerin koncentrációkban talált eltérések különböző központi idegrendszeri betegségekben.

Betegség	A D-szerin központi idegrendszeri mennyiségében feltételezett változások	Referencia
ALS	↑	(24)
Alzheimer-kór	↑	(111-113)
Szkizofrénia	↓	(114, 115)
Parkinson-kór	↓	(116)
Epilepszia	↕	(117-119)

1.4.1 ALS

Az ALS egy jelenleg gyógyíthatatlan, gyorsan progresszív betegség, amelyet izomgyengeség, atrófia és paralízis tünetei jellemzik. A betegség végső stádiumában a légzőrendszer leállása eredményezi a betegek halálát. Az ALS prevalenciája körülbelül 1:500 000 (120). ALS állatmodellekben, elsősorban a szuperoxid-dizmutáz 1 (SOD-1) enzimet kódoló gén mutációjával váltják ki az állatokban a betegségre jellemző tüneteket (121). Az előbb említett mutációval rendelkező transzgenikus egerek gerincvelőjében emelkedett mennyiségű D-szerin és SR szintet mutattak ki, amely növekedés a betegség előrehaladtával fokozódott (24). A glutamát koncentráció ugyanakkor nem változott a betegség előrehaladtával (122). A transzgenikus egerek gerincvelőjéből származó neuronok fokozottan érzékenyek voltak az NMDA receptor okozta neurotoxicitásra, összehasonlítva a kontroll egerekben mért értékekkel. D-szerin-mediált folyamat eredményezte a neurotoxicitást, hiszen az endogén D-szerin eltávolítása csökkentette az NMDA receptor kiváltotta motoneuron pusztulást (24). Ezen sejtek glicinnel történő kezelése szignifikánsan csökkentette az NMDA receptor közvetítette káros hatásokat, melynek hátterében a glicin kompetitív gátló hatását feltételezik a SR enzimen (20).

A D-szerin és a SR enzim ALS megbetegedésben bekövetkező mennyiségi változásairól humán adatok is rendelkezésre állnak az irodalomban. Familiáris ALS betegséggel rendelkező betegek gerincvelőjében mind a SR szint, mind pedig a D-szerin mennyisége nagy mértékben emelkedett (24). Ugyanakkor nem találtak különbséget az ALS betegek és egészségesek

cerebrospinális folyadékában mért D-szerin, glicin és L-szerin koncentrációjában (123). Az eredmény háttérében a felhasznált analitikai módszer nem megfelelő érzékenységét feltételezték (123).

A D-szerin metabolizmusában fontos szerepet játszó DAAO enzim mutációja is feltételezett az ALS megbetegedésben. *In vitro* kísérletben igazolták, hogy mutáns DAAO enzimet expresszáló neuronális sejtvonalon csökkent az életképesség és megnövekedett a fehérje aggregátum mennyisége, összehasonlítva a vad típusú csoporttal (124). DAAO enzim mutációval rendelkező motoneuron kultúrán, illetve motoneuron és asztrocita ko-kultúrán, megnövekedett apoptotikus idegsejt pusztulást azonosítottak (125). Mutációval rendelkező, ddY/DAAO⁻ enzimet expresszáló egerek, melyeknél a DAAO enzim aktivitás drasztikusan csökkent, megemelkedett D-szerin szintet mutattak ki. Ezen felül fokozott NMDA receptor-mediálta poszt-szinaptikus gerjesztő feszültség volt mérhető a gerincvelő hátsó szarvának neuronjaiban (95).

A DAAO enzim megváltozott funkcióját humán genetikai vizsgálatok is alátámasztják. Familiáris ALS kórképpel rendelkezőknél nagy gyakorisággal fordult elő a DAAO enzim mutációja a gerincvelő motoneuronjaiban (124).

Összességében elmondható, hogy az emelkedett D-szerin koncentráció megnövekedett glutamát neurotoxicitáshoz vezet a gerincvelőben. Ezek alapján a D-szerin bioszintézisében és metabolizmusában szerepet játszó faktorok összefüggésbe hozhatóak az ALS betegség háttérében zajló patológiás folyamatokkal. A gerincvelőben tapasztalt emelkedett D-szerin koncentráció befolyásolása lehetőséget biztosíthat új neuroprotektív kezelések kidolgozására.

1.4.2 Alzheimer-kór

Az Alzheimer-kór súlyos és jelenleg kezelhetetlen neurodegeneratív betegség. Az Alzheimer-kórra jellemző a szinapszisok számának csökkenése specifikus agyi régiókban, amely folyamat a magasabbrendű kognitív funkciók csökkenését eredményezi (126). A β -amiloid fehérjéből felépülő amiloid plakkok nagy mennyiségben megtalálhatóak az Alzheimer-kóros betegek különböző agyi területein. Az amiloid plakk tekinthető az elsődleges patológiás faktornak az Alzheimer-kór tekintetében. A β -amiloid fehérje okozta túlzott Ca^{2+} beáramlás neurotoxicitáshoz vezet, mely folyamat az NMDA receptor közreműködésével játszódik le (127). A β -amiloid fehérje és az amiloid plakk egyéb prekursora növelte a D-szerin és a glutamát koncentrációját, ezen felül a SR átíródását is fokozta mikroglia sejteken és

hippokampális neuronokon (111-113). Mikroglia sejteket kezeltek amiloid prekursor fehérjével vagy β -amiloid fehérjével, majd az így kapott médiummal, amelyben emelkedett D-szerin mennyiség volt mérhető, további kezelést végeztek hippokampális neuron sejteken, melynek megnövekedett az NMDA receptor aktivitása. Ez a hatás visszafordíthatónak bizonyult GluN1 antagonistá, vagy DAAO enzim kezelés hatására (111-113). Egy további kísérletben azt találták, hogy mérséklődött a β -amiloid fehérje által kiváltott neurotoxicitás mértéke SR génkiütött egerekben, melyek 90%-kal kevesebb D-szerin mennyiséggel rendelkeztek (128).

Ehhez kapcsolódó humán *post mortem* eredmény, hogy a SR enzim mRNS szintjének emelkedését mutatták ki Alzheimer-kórban szenvedő betegek hippokampuszából, összehasonlítva életkorban megegyező egészséges emberekkel (112). A szabad formában jelen lévő D-szerin szintet is vizsgálták Alzheimer-kórban szenvedőknél, azonban a várttól eltérően, a D-szerin mennyisége nem változott a frontális (129), a prefrontális, a parietális (130) és a temporális kéregben (131). A kamrai cerebrospinális folyadékban mért szabad D-szerin mennyisége azonban szignifikánsan magasabbnak adódott Alzheimer-kórban szenvedőknél (117). Az *in vitro* kísérletek eredményei alapján az Alzheimer-kór kezelésében ígéretes támadáspontot jelenthet az NMDA receptor gátlása. Alzheimer-kórban szenvedő betegeket kezeltek memantinnal, egy gyenge NMDA receptor antagonistával. A klinikai vizsgálat során mérsékelt javulást tapasztaltak enyhe- és közép súlyos állapotú betegekben (132). A D-szerin, illetve a D-szerin metabolizmusában szerepet játszó enzimek és transzporterek patológiás változása az Alzheimer-kórban jelentős lehet.

1.4.3 Szkizofrénia

A szkizofrénia egy súlyos mentális betegség, amely a népesség kb. 1%-át érinti. A betegség pozitív és negatív tünetei mellett gyakori a kognitív működés romlása, így memóriazavarok és figyelemzavarok jelentkezhetnek a betegség során. Hangulati zavarok is társulhatnak a betegséghez, amelyek a pontos diagnózis felállítását nehezíthetik. Számos kutatást végeztek a szkizofrénia pontos neurobiológiai alapjainak felderítésére. Összeségében elmondható, hogy a szkizofrénia patofiziológias folyamataiban több, egymást kölcsönösen szabályozó neurotranszmitter rendszer zavara feltételezhető, leginkább a kérgi és kéreg alatti területeken (133). A glutamáterg transzmisszió érintettségére utal, hogy a nonkompetitív NMDA receptor antagonistá vegyületek, mint a fenciklidin és a ketamin szkizofrénia-szerű tüneteket váltottak ki egészségesekben (134, 135), és rontották a szkizofrén betegek állapotát (133, 136-138).

Szkizofrén betegekben csökkent D-szerin mennyiség, illetve D-szerin, L-szerin arány volt kimutatható a cerebrospinális folyadékban (39, 114) és szérumban (115). Ezek alapján az feltételezhető, hogy a csökkent D-szerin szint hozzájárulhat az NMDA receptor szkizofrén betegekben tapasztalt alulműködéséhez. Az előzőekben ismertetett eredményekkel teljesen összhangban, 84 szkizofrén beteg plazma mintájának vizsgálata során, a plazma D-szerin koncentrációk, illetve a D-szerin, L-szerin arány is szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult (139). Eltérő eredmény, hogy nem találtak különbséget a D-szerin koncentrációk között a betegek *post mortem* parietális és prefrontális kérgi vizsgálata során (39).

A csökkent D-szerin koncentráció háttérében az aminosav metabolizmusáért felelős DAAO enzim megváltozott működése is szerepet játszhat. Preklinikai vizsgálatokban alulműködést eredményező DAAO enzim mutációval rendelkező egerek csökkent MK-801 generálta sztereotip mozgást és ataxiát produkáltak (140). Ugyancsak mutáns DAAO enzimmel rendelkező egerek jobb eredményeket értek el térbeli tanulási és Morris-féle vízi labirintus tesztben, illetve ezeknél az állatoknál, megnövekedett a hippokampális LTP mértéke (96). Ezek alapján kognitív serkentő hatás is feltételezhető a DAAO gátlás eredményeképpen, amely előnyös lehet a szkizofrénia kezelése során.

A DAAO enzim működését szkizofrénia betegségben számos humán vizsgálatban tanulmányozták. Klinikai vizsgálatokban, szkizofrén betegekben megnövekedett DAAO enzim mennyiséget és aktivitást tapasztaltak (37, 141). A szkizofrénia lehetséges genetikai kapcsolatait számos metaanalízisben vizsgálták, melyek eredménye alapján, a DAAO enzimhez kapcsolódó gének összefüggést mutattak a betegséggel (142-144). A genetikai kapcsolatot támasztja alá, hogy emelkedett DAAO enzim kifejeződés (35, 36, 145) és aktivitás (145) volt mérhető szkizofrén betegek cerebellumában, parietális kérgi területén (37) és hippokampusában *post-mortem* mintákban (141). Habár találtak genetikai összefüggést a SR egyes mutációja és a szkizofrénia között (146), funkcionális vizsgálatok során nem mutattak ki különbséget a SR enzim parietális kéregbeli (35), illetve cerebellumban vagy prefrontális kéregben (36) tapasztalt kifejeződésében.

Állatkísérletek során ellentmondó eredmények születtek. SR génkiütött egereken – ahol 90%-os D-szerin szint csökkenés volt mérhető – mérsékelt viselkedési zavarokat azonosítottak. Ezek a zavarok a következők voltak: hiperaktivitás, csökkent térbeli memória és megemelkedett nyugtalanság, a szkizofrénia jellemző tünetek (147).

A D-szerin szkizofréniában betöltött szerepére enged következtetni, hogy a normál antipszichotikus terápia D-szerinrel kombinálva, javította a negatív és kognitív tüneteket a klinikai vizsgálatokban (148-150). Figyelembe véve, hogy a jelenleg alkalmazott antipszichotikus gyógyszerek ezeket a tüneteket nem, vagy csak kis mértékben javítják, a D-szerin ígéretes jelölt kiegészítő terápiaként. Hozzá kell azonban tenni, hogy az eredményes kezeléshez nagy dózisú D-szerin szükséges, amely nefrotoxicitást okozhat (151, 152). A D-szerin szkizofréniában megváltozott homeosztázisának korrigálására alkalmazott közvetlen D-szerin terápia mellékhatásai miatt a DAAO enzim gátlása került a figyelem előtérbe.

Számos DAAO enzim gátló vegyületet fejlesztettek és teszteltek preklinikai vizsgálatokban, melyekből vegyesen születtek pozitív és negatív eredmények is. Adage és mtsai egy új DAAO gátló vegyület hatásait vizsgálták fenciklidin kezelt, szkizofréniá modell patkányokon. Mind a pozitív, mind a kognitív jellegű tünetek javultak a DAAO gátló egyszeri, illetve hosszan tartó orális adagolását követően (153). Ezzel ellentmondó eredmény, hogy egy ugyancsak újonnan tesztelt DAAO gátlószer ugyan szignifikánsan megemelte a plazmában és cerebrospinális folyadékban a D-szerin mennyiségét, de nem javította a különböző ágensek (amfetamin és MK-801) által indukált szkizofréniá-szerű tüneteket patkányokban (154). A pozitív eredmények mellett, hatástalanságról is beszámoltak az irodalomban a DAAO gátlószerekkel végzett kísérletek esetén. Egerekben a D-szerin dózisa csökkenthető volt az egyidejű DAAO gátló kezelés mellett, azonban kutyákban és majmokban ez a hatás már elmaradt (155), melynek hátterében a fajok közötti metabolikus különbség állhat. A nátrium-benzoát gyenge DAAO gátlószer, *in vitro* adatok alapján körülbelül 10 μ M-os koncentráció tartományban hatásos (156). Állatkísérlet során a nátrium-benzoát nem emelte meg a D-alanin (DAAO szubsztrát vegyület) mennyiségét kutyákban (157).

A vegyes preklinikai eredmények következtében klinikai vizsgálatot eddig csak a nátrium-benzoáttal végeztek. A választás hátterében az állhat, hogy a nátrium-benzoát egy gyakran használt tartósítószer, így biztonságos vegyületnek tekinthető (158) és megfelelő központi idegrendszeri biohasznosulással rendelkezik (159). Klinikai vizsgálatokban szkizofréniá betegek kiegészítő terápiájaként végeztek vele kutatásokat. Lin és mtsai számos szkizofréniá tünetet mérő tesztben (például: Pozitív és Negatív Tünetek Skála, Életminőségi Teszt) javulást tapasztaltak a klopazint kiegészítő nátrium-benzoát kezelés hatására (160). Risperidon és haloperidol mellé adott nátrium-benzoát ugyancsak javította a tüneteket krónikus szkizofréniában (161). A kísérletben a nátrium-benzoát jól tolerálhatónak bizonyult, nem okozott komolyabb mellékhatást viszonylagosan magas, 1-2 g/nap dózisban sem (160, 161).

A kérdéses eredmények ellenére a legtöbb vizsgálat megerősíti a DAAO gátlók potenciális jelentőségét a szkizofrénia kezelésében. A DAAO gátlók szerkezeti követelményire vonatkozó tudás, illetve az *in vitro* és *in vivo* kísérletek adatai segítséget nyújthatnak új gátlók fejlesztése során. A jövőben lehetőség nyílt optimalizált potenciállal, megfelelő szelektivitással és farmakokinetikai profillal rendelkező DAAO gátlók fejlesztésére.

1.4.4 Parkinson-kór

A Parkinson-kór az egyik leggyakoribb központi idegrendszeri, neurodegeneratív megbetegedés. A betegségben leginkább az extrapiramidális agyi régió érintett. A dopaminerg neuronok folyamatos pusztulása a szubsztancia nigra területén csökkenő dopaminerg beidegződéshez vezet a bazális ganglionokban és a limbikus rendszerben (116, 162). Az NMDA receptor megtalálható a bazális ganglionokban és a limbikus rendszerben is, ezért a Parkinson-kórban betöltött esetleges szerepét intenzíven kutatták a közelmúltban. Az egyik ilyen vizsgálatból kiderült, hogy a dopamin megváltoztatja az NMDA receptor szerkezetét, működését és még a mennyiségét is befolyásolja (116). Hozzá kell azonban tenni, hogy a glutamát a mozgás szabályozásának finomhangolásában játszik fontos szerepet, így a különböző testrészek apró mozgásait befolyásolja, ellentétben a dopaminnal, amely a betanult, „durvább” mozgásokat szabályozza (163, 164). A Parkinson-kórban jelentkező dopaminerg transzmisszió csökkenése, glutamát túlsúlyt eredményez. Ez alapján kezdték el a glutamát antagonisták vizsgálatát, mint lehetséges Parkinson-kór elleni gyógyszerjelölteket (163). A feltételezett glutamáterg túlműködés ellenére az amantadinnal, dextrometorfánnal, dextrofánnal (NMDA receptor antagonistá vegyületek) végzett klinikai vizsgálatban, a Parkinson-kór tüneteinek súlyosbodását tapasztalták (163). Ezzel ellentétes eredményt kaptak, amikor ezeket a vegyületeket kiegészítő kezelésként alkalmazták az L-DOPA mellett. Ebben a vizsgálatban javuló diszkinéziáról számoltak be (165-167). A D-szerin és a Parkinson-kór esetleges kapcsolata kevésbé kutatott terület. Egy klinikai vizsgálat azonban biztató eredményekkel zárult. A D-szerin adjuváns terápiaként való adagolása idiopátiás Parkinson-kórban szenvedő betegek esetében csökkentette a betegségre jellemző különböző tüneteket. A vizsgálat során a betegek által kitöltött, a Parkinson-kór tüneteit értékelő tesztet alkalmazták (116). Összességében elmondható, hogy jelenleg kevés a rendelkezésre álló adat a D-szerin pontos szerepéről a Parkinson-kór patológiás folyamataiban.

1.4.5 Depresszió

A depresszió egy heterogén betegség, melynek hátterében nem ismert a pontos mechanizmus. A betegséget leginkább hangulatingadozások jellemzik (168). Számos különböző elmélet létezik a depresszió patológia folyamatait illetően. Habár a monoamin-teória az elsődlegesen elfogadott modell a depressziót leíró mechanizmusok közül, egyre több kutatás eredménye bizonyítja a glutamáterg jelátvitel jelentőségét a folyamatban (169). A glutamáterg jelátvitel zavara vezethet a szinaptikus plaszticitásban bekövetkező patológiás változásokhoz, amelyek végső soron a depresszió kialakulását eredményezhetik (170). A témával kapcsolatban végzett állatkísérletben a GluN1 alegység génkiütött egerekben, depresszió-szerű tüneteket tapasztaltak, melyeket a D-szerin nem tudott csökkenteni (170). Ugyanakkor egyszeri D-szerin adagolás csökkentette a depresszió tüneteit, amely hatás egy összetett glutamáterg jelátviteli károsodást feltételez a depresszió esetében (170).

Humán vizsgálatokban jelentős csökkenést tapasztaltak a GluN1 alegység (a D-szerin kötődési helye) kifejeződésében számos hangulatzavarban, így depresszióban is (171, 172).

Jelenleg kevés kísérleti eredménnyel rendelkezünk a D-szerin és a depresszió patofiziológias folyamatának kapcsolatáról.

1.4.6 Epilepszia

Az epilepszia súlyos neurológiai megbetegedés, melynek jellemzői a spontán visszatérő rohamok és a neuronvesztés. Habár az NMDA receptor szerepe erősen valószínűsített az epilepszia patológiás folyamataiban, illetve progressziójában, a pontos biokémiai kapcsolatot még nem tudták azonosítani.

Preklinikai vizsgálatok eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a D-szerin okozta NMDA receptor aktiváció szerepet játszhat a görcsök kialakulásában, amelyet NMDA receptor antagonistákkal csökkenteni lehetett (173, 174). Egy másik állatkísérletben a D-szerin szint növekedés hatására, a GABA-erg neuronok excitotoxicitás okozta pusztulását tapasztalták. Az eredmények alapján feltételezhető a D-szerin szerepe a krónikus, visszatérő epilepszia görcsök patogenezisében (118). A status epilepticus egy folyamatos görcsrel járó epilepsziás állapot, amely gyakran hipoxiához, majd encephalopathiához vezet. Patkányokon végzett kísérletben a status epilepticus állapotot követően vizsgálták a D-szerin/SR rendszerben lejátszódó változásokat, a meziális temporális régióban (175). A görcsrohamot követően megnövekedett D-szerin és SR immunoreaktivitást tapasztaltak az asztrocitákban és az NMDA receptor

foszforilált GluN1 alegysége is fokozott immumoreaktivitást mutatott a hippokampusban (175). Ezek az eredmények együttesen arra engednek következtetni, hogy az asztrocitákban található D-szerin/SR rendszer részt vehet a neuronok hiperexcitabilitásának szabályozásában, az NMDA receptor aktiválásán keresztül (175). Az előzőekben felsorolt eredményekkel ellentétben a D-szerin potenciózta a görcsgátló gyógyszerek hatását, és növelte a görcs kiváltásához szükséges küszöbpotenciált különböző állatkísérletekben (117, 119), amely eredmény az aminosav epilepsziában kifejtett pozitív hatását támasztja alá.

Az előző megfigyeléshez kapcsolódik egy humán vizsgálati eredmény, ahol a 3-PGDH enzim hiányban szenvedő betegek cerebrospinális folyadékában erősen csökkent D-szerin koncentráció volt mérhető. Ezen betegeknél súlyos epilepsziás tüneteket tapasztaltak, melyek javultak L-szerin adagolást követően. Az L-szerin szerepet játszik a D-szerin bioszintézisében, így mennyiségének visszaállításában is fontos elem (176). Tehát a D-szerin hiány görcsöket eredményezhet az emberi szervezetben.

Az előbb felsorolt betegségekben a D-szerin, illetve a D-szerin homeosztázisban szerepet játszó enzimek és transzporterek szerepéről kevés ismerettel rendelkezünk. További vizsgálatok szükségesek a pontos patofiziológiai folyamatok megismeréséhez.

1.4.7 A D-szerin transzport, mint lehetséges gyógyszerterápiás pont

Kevés kutatási eredmény áll rendelkezésünkre a D-szerin szállításában résztvevő transzporterek központi idegrendszeri betegségekben betöltött szerepéről. A D-szerin szabályozásában a SR és a DAAO enzim mellett a transzporterek tekinthetőek fontos szereplőknek, így a D-szerin szint megváltozásával járó patológiás folyamatokban ígéretes támadáspontot jelenthetnek. Egy ALS motoneuron modell sejtvonalon végzett vizsgálat csökkent D-szerin, illetve megnövekedett L-szerin felvételt mutatott ki. Az eredményt magyarázhatja, hogy a D-szerin felvételéért felelős asc-1 transzporter mRNS szintje csökkent, míg az ASCT-1 transzporter kifejeződése megnövekedett. Ez utóbbi transzporter nagyobb affinitással rendelkezik az L-aminosavak, így az L-szerin iránt. Összegezve elmondható, hogy a D- és L-szerin transzport aktivitása fontos szerepet játszhat a D-szerin szint szabályozásában a gerincvelő motoros idegsejtjeiben ALS megbetegedésben (177). A depresszió pontos patológiás folyamata még nem ismert, azonban egyre több adat támasztja alá a D-szerin esetleges szerepét. A CSDS módszer alkalmazása egy elfogadott depresszió modellt eredményez állatokban. Az eljárás lényege, hogy egy normális viselkedési mintájú állatot hosszabb időn keresztül egy agresszor

állattal tartják együtt, amely depresszió-szerű tüneteket eredményez (178). CSDS módszerrel kezelt, ASCT-2 génkiütött egerekben a D-szerin adagolás javította a depresszió-szerű tüneteket, a szociális elkerülést és a mozdulatlanságot (76). Egy másik preklinikai kísérletben a fenilglicin származékok hatását vizsgálták szkizofrénia modell, illetve indukált látási zavarral rendelkező rágsálókban. A fenilglicin származékok szelektív ASCT-1 és ASCT-2 transzporter gátlószerke (71). A vizsgálat során a megfelelő agyi penetrációval rendelkező L-4-fluoro-fenil-glicin (L-4FPG) kezelés hatását tanulmányozták intenzívebben. A vegyület szisztémás adagolása nagy mértékben csökkentette az amfetamin-indukálta túlmozgást egerekben. Akut szisztémás L-4FPG adagolás szignifikánsan javította a kontrasztérzékenység hiányát a retina degenerációval rendelkező patkányokban (179).

A központ idegrendszeri D-szerin szállításában résztvevő transzportereket különböző humán vizsgálatokban tanulmányozták. Bennett és mtsai az ASCT-1 transzporter polimorfizmus vizsgálatát végezték el mikronéziai szkizofrén betegekben, illetve kontroll egészséges egyedeken. A legtöbb polimorfizmus nem fejeződött ki, vagy általánosnak mutatkozott. Mivel egyik szekvenciális polimorfizmus sem volt kifejezetten csak a szkizofrén betegekre jellemző, így az ASCT-1 vizsgált szakaszának polimorfizmusát nem társították a szkizofrénia betegséghez (180). Eltérő eredményeket kaptak, amikor depresszióban és szkizofréniaiban szenvedő betegek különböző agyi területeit vizsgálták *post mortem*. Szignifikáns csökkenés mutatkozott a neuronális ASCT-1 transzporter immunreaktivitásában a cinguláris kéreg és a hippokampusz területén szkizofréniaiban és depresszióban. Az asztrocitákban ugyancsak csökkent a transzporter kifejeződése szkizofréniaiban, azonban nem változott depresszióban. Ezek az eredmények a korábban figyelmen kívül hagyott asztrociták betegség-specifikus szerepére engednek következtetni (81). Összességében kijelenthető, hogy a D-szerin szállításért felelős transzporterek megváltozott működése szerepet játszhat a fentebb említett betegségek patológiás változásaiban, így gyógyszeres befolyásolásuk terápiás értékkel rendelkezhet.

A transzportereket célzó molekulák fejlesztése előrelépést jelenthet az NMDA receptor megváltozott működéséhez társuló betegségek kezelésében.

2. Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki a szervezet, a sejtek D-szerin koncentrációjának befolyásolási lehetőségeinek vizsgálatát, hiszen a D-szerin csökkent és emelkedett mennyisége egyaránt szerepet játszik különböző patológiás folyamatokban. Célom volt még potenciális gyógyszertámadáspontok megismerése és gyógyszerjelölt molekulák tesztelésére alkalmas modell kidolgozása.

- Az újonnan fejlesztett D-aminosav-oxidáz (DAAO) enzimgátló, a 6-fluoro-1H-indazol-3-ol hatásának vizsgálata a D-szerin mennyiségének változására *in vivo*
- Az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal karakterizálása, mint lehetséges D-szerin transzport modell
- Az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal és patkány asztrocita sejt kultúra D-szerin transzportjának összehasonlítása
- Az S-ketamin D-szerin transzportra gyakorolt hatásának vizsgálata az SH SY5Y sejtvonalon

3. Módszerek

3.1 Anyagok

A D-szerin, az L-alanin, az L-treonin, az L-glutamin, a t-Pro, a puffer komponensek, a tripszin, a tripánkék, az acetonitril, az L-ciszteinsav, az akrilamid és a dimetil-szulfoxid (DMSO) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől kerültek megvásárlásra. A kolin-klorid az Alfa Aesar (Haverhill, MS, USA) cégtől származott. Az S-ketamin a Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet nagylelkű felajánlása volt. A fluoreszcens reagenst, a 4-fluor-7-nitrobenzofurazánt (NBD-F) a TCI (Tokyo, Japan), a 6-monodeoxi-6-mono(3-hidroxil)propilamino- β -ciklodextrint (HPA- β -CD) a Cyclolab (Budapest, Magyarország) szállította. Az összes kísérletet a MilliQ Direct 8 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) víztisztító berendezésből nyert ultratisztaságú víz felhasználásával végeztük.

A sejtkultúra tápoldatát Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, (DMEM/F12) a Corning (Tewksbury, MA, USA), a főtális borjú szérumot (FBS) a Biosera (Nuaille, France) cégek szállították. A stabilizált glutamint és nem esszenciális aminosav oldatokat a Pan Biotech (Aidenbach, Németország) cégtől vásároltuk.

A Western blot reagenseket és a puffer komponenseket a trisz-(hidroximetil)-amino-metánt (TRIS), a glicint és a tricint a Sigma-Aldrich, a Novex 4-12%-os poliakrilamid gélt a ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) biztosította. Az ASCT-1 és ASCT-2 primer antitestek a Sigma-Aldrich és a Cell Signaling (Danvers, MA, USA) cégektől származtak. A Pierce ECL Western blot szubsztrátot és a nyúl antigén elleni szekunder antitestet a ThermoFisher Scientific biztosította.

A Western blot technikához használt polivinilidén-fluorid (PVDF) transzfer membránt és a röntgenfilmeket a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) szállította.

A sejtek életképesség vizsgálatához a reszazurin kitet (TOX8) a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk.

3.2 Egerek kezelése 6-fluoro-1H-indazol-3-ol DAAO enzim gátló vegyülettel

A hím NMRI egereket a Toxi-Coop Kft. (Budapest, Magyarország) biztosította. Az állatokat légkondicionált szobákban (22 ± 2 °C) tartottuk 12 órás fény-sötétség ciklusban. Szabad hozzáférésük volt a standard laboratóriumi rágeszáló táphoz és vízhez. Csoportonként 5 állatot 30 mg/kg D-szerin mellett, 30 mg/kg 6-fluoro-1H-indazol-3-ol oldattal vagy vegyületet nem tartalmazó fiziológiás sóoldattal kezeltünk intraperitoneálisan. A vegyületet nátriumot tartalmazó 5% DMSO-ban oldottuk. Tíz, 60 és 120 perc elteltével az állatok anesztéziáját széndioxidral váltottuk ki, majd dekapitáltuk és a vért EDTA tartalmú csövekbe gyűjtöttük. A teljes vért tartalmazó csöveket centrifugáltuk (630 g, 4 °C, 5 perc), majd a plazma frakciót eppendorf csőbe pipetáztuk. Ezt követően a plazmához 3-szoros térfogatú hűtött acetonitrilt adtunk, majd az így kicsapott fehérjét centrifugálással (3000 g, 4 °C, 20 perc) távolítottuk el a felülúszótól. A felülúszót a mintaelőkészítésig -80 °C-on tároltuk.

Az állatokat a Semmelweis Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának jóváhagyásával (22.1/606/001/2010, 2010. február 5.) és az Európai Tanács kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó rendelkezésének megfelelően kezeltük (86/609/EEC).

3.3 A D-szerin kvantitatív meghatározása különböző biológiai mintákból kapilláris elektroforézis lézer indukált fluoreszcencia (CE-LIF) módszerrel

A D-szerin biológiai mintából történő kvantitatív meghatározását az intézetünkben korábban kifejlesztett és validált CE-LIF módszerrel végeztük (181). A mintaelőkészítés során az egerek plazmájából nyert felülúszó, illetve a későbbiekben részletezett intra- és extracelluláris minta feldolgozása során kapott felülúszó 5 μ L mennyiségével végeztük a származékképzést. Ezen részlethez 5 μ L etanolos NBD-F oldatot (3mg/ml) és 5 μ L borát puffert (pH 8,5, 20 mM) pipetáztunk, mely utóbbi tartalmazta a belső standardként felhasznált L-ciszteinsavat (2 μ M) is. A mintákat 20 percig melegítettük 65 °C-on a származékképzési reakcióhoz, majd lehűtöttük. A mérésekig a mintákat -20 °C-on tároltuk. A méréseket a 32 Karat 5.0 verziójú szoftverrel vezérelt, P/ACE MDQ CE berendezéssel végeztük. A műszerhez Ar-ion lézer forrással rendelkező LIF detektort kapcsolunk. Az alkalmazott excitációs hullámhossz 488 nm, míg az emissziós hullámhossz 520 nm volt. Az elválasztás 75 μ m belső átmérőjű és 365 μ m külső átmérőjű ömlesztett szilika kapillárisban (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) történt. A kapilláris felhasználása előtt lineáris poliakrilamid borítást alakítottunk ki a belső felületén. Az eljárás során a Hjertén és mtasi által leírt módszert alkalmaztuk (182).

3.4 Sejtkultúrák és sejtenyésztés

A primer asztrocita sejtkultúra készítéséhez az 1-3 napos Wistar-patkány kölyköket a Toxi Coop Kft. szállította. Az asztrocita sejtek izolálását és tenyésztését Mecha és mtsai által kidolgozott protokoll alapján végeztük (183). Az állatok kezelését a Semmelweis Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága által jóváhagyott etikai engedély (22.1/606/001/2010, 2010. február 5.) alapján végeztük. A kísérletek során minden tekintetben betartottuk az Európai Tanács kísérleti és egyéb tudományos célokra felhasznált állatok védelmére vonatkozó rendelkezését (86/609/EEC). A konfluens állapot elérését követően az asztrocita sejteket feldolgoztuk.

További kísérleteinkhez SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonalat használtunk, melyet a European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) cégtől szereztünk be.

A sejteket 1% stabilizált glutamin, 1% nem esszenciális aminosav oldattal és antibiotikummal kiegészített, 10%-os FBS tartalmú DMEM/F12 tápoldatban tenyésztettük 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett.

3.5 Western blot analízis

Az SH-SY5Y sejtekben az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek expressziójának vizsgálatához Western blot analízist végeztünk. Körülbelül 5 millió sejtet 200 µL radioimmunprecipitációs vizsgálati pufferben (RIPA) (Thermo Fisher Scientific) lizáltunk, az így kapott mintákhoz Laemmli puffert (0,1% 2-merkaptóetanol, 0,0005% brómfenolkék, 10% glicerin, 2% SDS, 63 mM Tris-HCl (pH 6,8) adtunk és a mintákat denaturáltuk 5 percig 97°C-on. A mintákat 4-12% grádiens gélen választottuk el. Az elektorforézist követően a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk át. A membránt 0,1% Tween 20-at tartalmazó TRIS-szel puffereelt sóoldatban (TBST) oldott 5% sovány tejjel blokkoltuk 1 órán keresztül. A membránokat 1 µg/ml anti-ASCT-1, illetve 4 µg/ml anti-ASCT-2 primer antitestet tartalmazó 5%-os sovány tejpor oldatban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. Másnap a membránokat TBST-vel háromszor 10 percig mostuk, ezt követően 1:1000-hez hígításban alkalmazott nyúl antigén elleni szekunder antitesttel konjugált torma-peroxidázzal inkubáltuk szobahőmérsékleten egy órán át. A transzporter fehérjéket TBST-vel történő, háromszor 10 percig tartó mosást követően

kemilumineszcens technikával, röntgenfilmen tettük láthatóvá Pierce ECL Western blot reagens alkalmazásával.

3.6 A sejtek D-szerin felvételének vizsgálata

3.6.1 A D-szerin felvétel idő-, és koncentrációfüggése az SH-SY5Y sejteknél

A kísérlet napján a sejteket a tripszines felvétel után Tris-szel beállított HEPES puffer (THB) szuszpendáltuk úgy, hogy a sejtek koncentrációja 1 millió sejt/500 μ L oldat legyen. A sejtuszuspenziót 0, 25, 50 és 200 μ M D-szerinnel inkubáltuk 0, 15, 30, 60 és 120 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubáció után a szuszpenziót jeges vízfürdőbe helyeztük, majd hűtve centrifugáltuk (630 g, 4 °C, 5 perc) és kétszer mostuk jéghideg THB-vel. A sejt pelleteteket végül 35 μ L acetonitril:víz (2:1 V/V) elegyében re-suszpendáltuk és a kicsapódott fehérjét centrifugálással (3000 g, 4 °C, 20 min) távolítottuk el. A felülúszót összegyűjtöttük és felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.6.2 A D-szerin felvétel idő-, és Na⁺-függése

A Na⁺-független transzport vizsgálatához a puffer oldat NaCl tartalmát kolin-kloriddal helyettesítettük. Az 1 millió sejt/500 μ L oldat koncentrációjú sejtuszuspenziót 50 μ M D-szerinnel inkubáltuk 0, 15, 30, 60 és 120 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6.1 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.6.3 A D-szerin transzport kinetika karakterizálása

A D-szerin transzport kinetikájának tanulmányozásához az 1 millió sejt/500 μ L oldat koncentrációjú sejtuszuspenziót különböző koncentrációjú D-szerinnel kezeltük (0-10000 μ M) és 15 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6.1 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.6.4 A D-szerin felvétel gátlása neutrális aminosavakkal

A sejteket 25 μ M D-szerinnel inkubáltuk különböző koncentrációban alkalmazott L-alanin, L-treonin, L-glutamin, t-Pro vagy L-szerin aminosavakkal együtt a D-szerin felvételét gátló hatásuk vizsgálatára, 15 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6.1 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.6.5 Az L-szerin kezelés hatása a D-szerinnel preinkubált SH-SY5Y sejteken

A letapadt SH-SY5Y sejteket 24 órán keresztül kezeltük 100 μM D-szerin tartalmú tápoldattal. A tápoldat eltávolítását követően, tripszines felvételt alkalmaztunk, majd THB-ben szuszpendáltuk a sejteket úgy, hogy végül 1 millió sejt/500 μL oldat koncentrációt kapjunk. A sejteket 300 μM L-szerinnel kezeltük 0, 5, 15 és 30 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6.1 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.6.6 A D-szerin felvétel vizsgálata akut S-ketamin kezelés mellett

A sejteket 25 μM D-szerinnel inkubáltuk különböző koncentrációban alkalmazott S-ketaminnal (0, 2, 4, 10, 20, 50, 75 és 100 μM) együtt 15 percen keresztül 37 °C-on. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6.1 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.6.7 A hosszan tartó S-ketamin előkezelés hatása a D-szerin felvételre

A letapadt SH-SY5Y sejteket 0, 25 és 50 μM S-ketaminnal inkubáltuk 72 órán keresztül. Az inkubáció után az S-ketamint eltávolítottuk, majd THB oldatban szuszpendáltuk a sejteket úgy, hogy végül 1 millió sejt/500 μL oldat összetételt kapjunk. Ezt követően különböző D-szerin koncentrációt alkalmazva (300 és 1000 μM), 15 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Az inkubációs idő lejárta után a mintákat a 3.6.1 fejezetben leírtak szerint dolgoztuk fel.

3.7 Reszazurin-redukción alapuló életképesség vizsgálat

Az életképesség teszthez egy nappal a kezelés előtt a sejteket 24 lyukú sejtenyészítő lemezekre raktuk ki (10^4 sejt/lyuk), majd 24 óra elteltével a sejteket 0, 25 μM vagy 50 μM S-ketaminnal kezeltük 72 órán keresztül 37 °C-on. A rezazurin redukció mértékét a gyártó utasításai alapján határoztuk meg. Röviden, 72 óra után a sejtek tápoldatát új, 10% rezazurin oldatot (0,15 mg/mL PBS-ben) tartalmazó médiumra cseréltük és 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a keletkezett fluoreszcens rezorufin koncentrációját Fluoroskan Ascent FL Microplate fluoriméterrel mértük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) 530/590 nm-en.

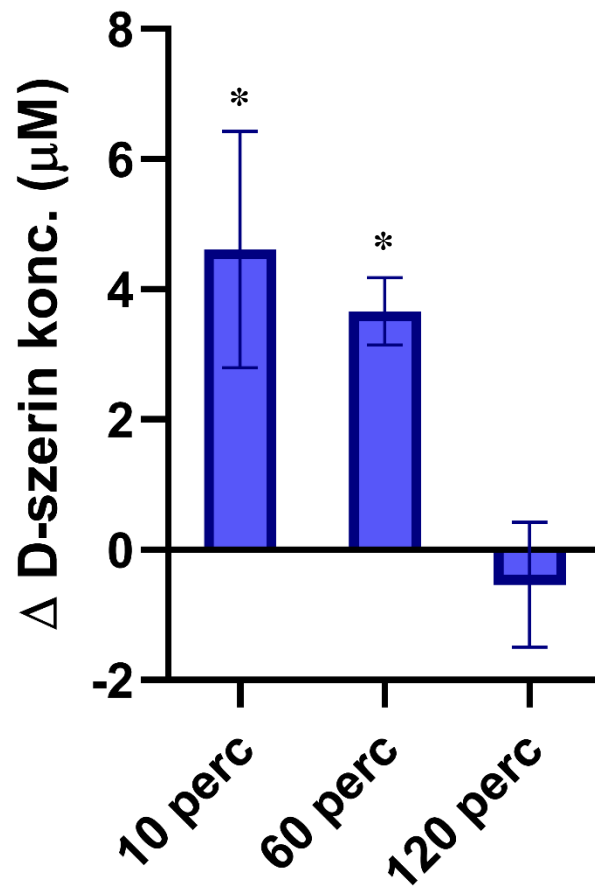
3.8 Statisztikai elemzés

A statisztikai analízist és a görbeillesztést a Prism 8.0 szoftver (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. Az Exponential plateau illesztést alkalmaztuk a D-szerin felvétel idő- és Na⁺-függésének vizsgálatakor, illetve az L-szerin okozta D-szerin felszabadulás mérésénél. A D-szerin felvétel gátlásánál egylépcsős és kétlépcsős fit logIC50 illesztési sémákat használtunk. Michaelis-Menten görbét illesztettünk a kinetikai paraméterek vizsgálatánál. A D-szerin intracelluláris koncentrációjának meghatározásához az SH-SY5Y sejteket 6 µm és az asztrocita sejteket 3,5 µm sugarúnak tekintettük (184). Az eredményeinket átlag ± átlag standard hibája (SEM) formában adtuk meg minimum három párhuzamos mérés értékei alapján. A statisztikai különbségek elemzésére kétmintás t-próbát, vagy egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, majd a különböző adatok összehasonlítására Dunnett post-hoc tesztet használtunk. A különböző görbeillesztések, illetve az illesztések alapján számolt paraméterek összehasonlítására F-próbát alkalmaztunk, amelyből meghatároztuk a p értéket. Az értékeléseknél a különbséget akkor tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ értéknek adódott.

4. Eredmények

4.1 A 6-fluoro-1H-indazol-3-ol, DAAO enzim gátló vegyület *in vivo* vizsgálata

A Természettudományi Kutatóközpont Szerves Kémia Intézete kutatásokat folytatott DAAO gátló vegyületekkel. Előzetes tesztelések eredményeként a 1H-indazol-3-ol szerkezet fejlesztése és optimalizálása kezdődött meg. Különböző vizsgálatok történtek számos 1H-indazol-3-ol alapszerkezettel rendelkező vegyületen. A 6-fluoro-1H-indazol-3-ol az *in vitro* eredmények alapján megfelelő DAAO gátló potenciállal, ideális becsült felszívódással és metabolikus stabilitással rendelkezett, így ennek a vegyületnek a hatását vizsgáltuk *in vivo* kísérlet során. A vizsgálatban az egerek plazmájának D-szerin koncentrációját határoztuk meg CE-LIF módszerrel. A D-szerin és a vizsgált DAAO gátló vegyület együttes adagolása szignifikáns emelkedést ($p < 0,05$) eredményezett az egerek plazma D-szerin szintjében, összehasonlítva a csak D-szerinnel kezelt csoporttal. A beadást követő 10. percben a csak D-szerin kezelésben részesülő csoportban $13,81 \pm 1,20 \mu\text{M}$ D-szerin volt mérhető. A D-szerin DAAO gátló vegyülettel együtt történő alkalmazása 33%-os, szignifikáns emelkedést okozott a D-szerin koncentrációban. A kezelés után egy órával a D-szerin plazmakoncentrációja $11,11 \pm 1,69 \mu\text{M}$ volt a D-szerin kezelést önmagában kapó egerekben, melyet szignifikánsan, 27%-kal, növelt a kezelés DAAO gátlószerrel történő kiegészítése. Két óra elteltével a D-szerin szint visszatért a kontroll értékre (5. ábra).

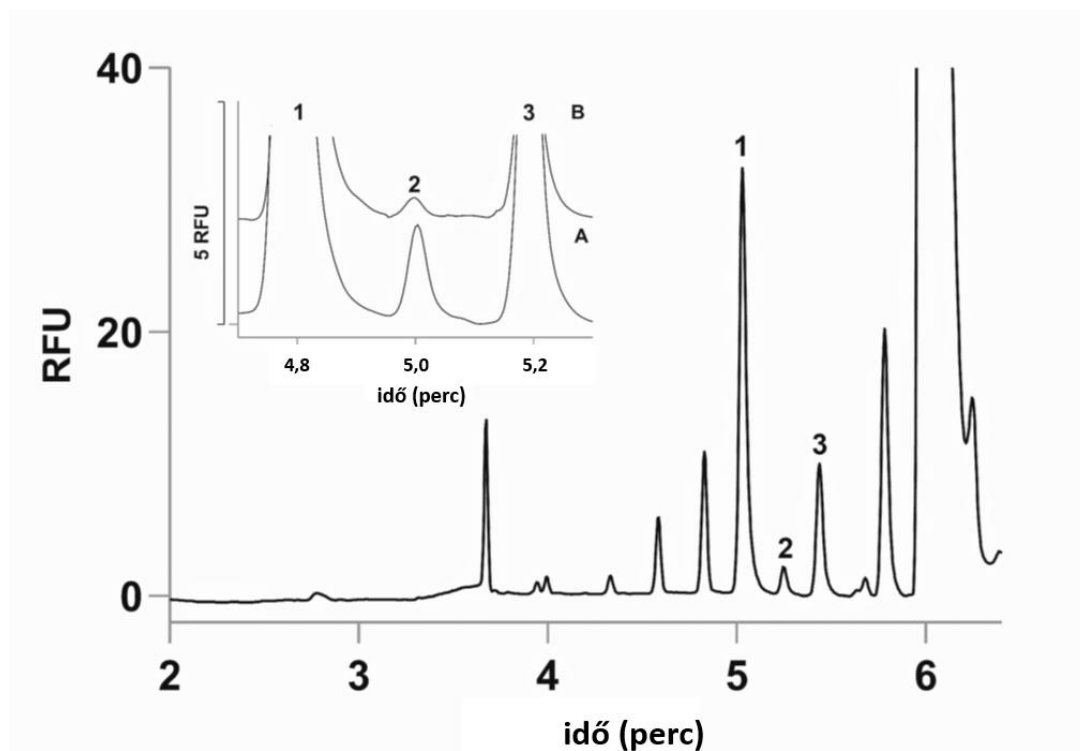


5. ábra: A D-szerin koncentrációban mért különbség a 6-fluoro-1H-indazol-3-ol vegyülettel történő kezelés hatására egerek plazmájában. Az egerek 30 mg/kg dózisú D-szerin mellett izotóniás sóoldatot, vagy 30 mg/kg 6-fluoro-1H-indazol-3-ol oldatot kaptak intraperitoneálisan. A plazma D-szerin koncentrációjának meghatározása a beadást követő 10, 60, 120 percekben történt. A D-szerin koncentráció különbséget úgy kaptuk, hogy a 6-fluoro-1H-indazol-3-ol és D-szerin együttes kezelés esetén mért D-szerin koncentrációból kivontuk a D-szerin és sóoldat kezelés esetében mért értékeket. Statisztikai összehasonlításra kétmintás *t*-próbát alkalmaztunk, ahol a D-szerin és sóoldat kezelés eredményeit hasonlítottuk össze a D-szerin és a 6-fluoro-1H-indazol-3-ol együttes adagolása esetén kapott értékekkel. Az elemzést $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az eredmények átlag \pm SEM értéként kerültek megadásra (10 perc, $n=5$; 60 perc, $n=4$, 120 perc, $n=5$).

4.2 A D-szerin transzport vizsgálata

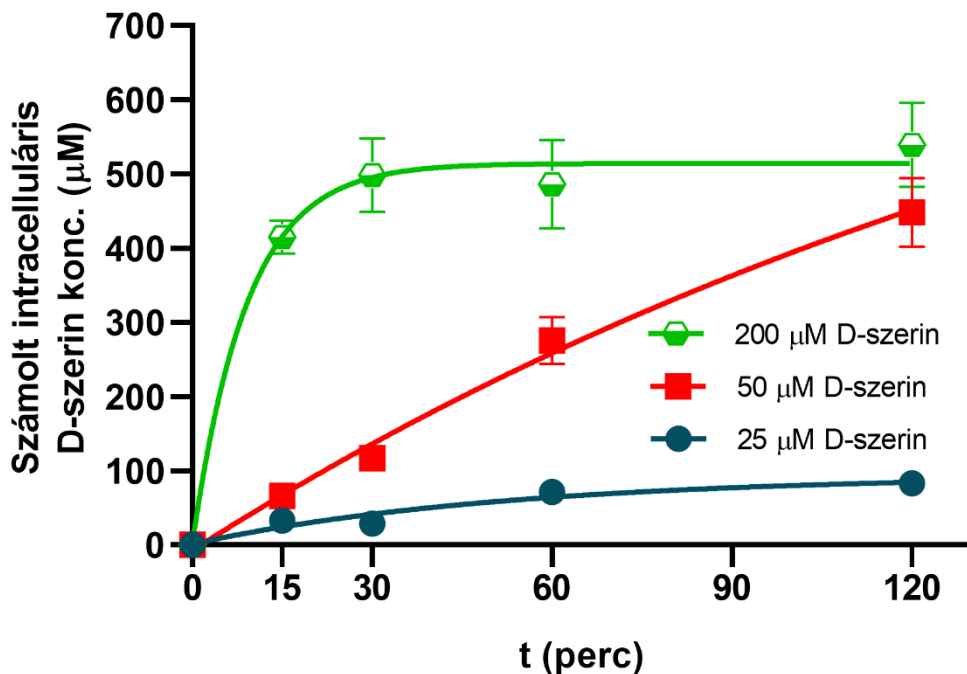
4.2.1 Az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek D-szerin felvételének karakterizálása és összehasonlítása

A DAAO enzimgátló vegyület hatásának *in vivo* vizsgálatát követően egy másik lehetséges és kevésbé kutatott támadásponttal kezdtünk foglalkozni, a D-szerin szállításában résztvevő transzporterekkel, *in vitro* körülmények között. A D-szerin mennyiségének meghatározására CE-LIF módszert alkalmaztunk. A 6. ábrán jól látható, hogy az aminosavak tekintetében komplex elektroferogram származik az intracelluláris mátrix vizsgálatából még a szelektivebb fluoreszcens detektálás alkalmazásával is (6. ábra). A reprezentatív elektroferogramok kinagyított részlete az L-alanin jelenlétében és anélkül végzett D-szerin felvétel vizsgálatok során mért intracelluláris D-szerin mennyiség különbségét mutatja (6. ábra, kinagyított).



6. ábra: Elektroferogramok a humán SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek intracelluláris D-szerin szintjének meghatározásáról. A számozott csúcsok az NBD-F-vel jelölt glicin (1), D-szerin (2) és L-szerin (3). A kinagyított ábrán a következő kísérleti elrendezés elektroferogramjainak részlete látható: a sejteket (A) 25 μM D-szerinnel, vagy (B) 25 μM D-szerinnel és 3 mM L-alaninnal inkubáltuk 15 percig. Elválasztási körülmények: 50 mM pH 7 HEPES puffer, amely 6 mM HPA- β -CD-t tartalmazott; 30/40 cm x 75 μm belső átmérőjű, belső felületén poliakrilammiddal bevont kvarc kapilláris, -24 kV. Minta injektálás: 3474 Pa nyomáson 5 másodpercig.

Vizsgáltuk az SH-SY5Y neuroblasztóma sejt vonal D-szerin felvételét különböző koncentrációjú D-szerin, illetve inkubációs idő alkalmazása esetén. A növekvő D-szerin mennyiség nagyobb intracelluláris D-szerin koncentrációt eredményezett. Ezzel párhuzamosan a növekvő inkubációs idő is megnövekedett intracelluláris D-szerin szintekkel társult, tehát egy koncentráció-, és időfüggő transzportról beszélhetünk. A D-szerin felvétel a legnagyobb koncentrációjú, 200 μM D-szerin kezelés során már 30 perc elteltével telítést mutatott. A másik két koncentrációnál (25 és 50 μM esetén) 120 perc inkubációt követően látható némi telítési tendencia (7. ábra). A 15 perces inkubációs idő mind a három alkalmazott koncentráció esetén a dinamikus szakaszba esett, így a gátlószerek és a kinetikai paraméterek vizsgálatokor ezt az inkubációs időt alkalmaztuk.

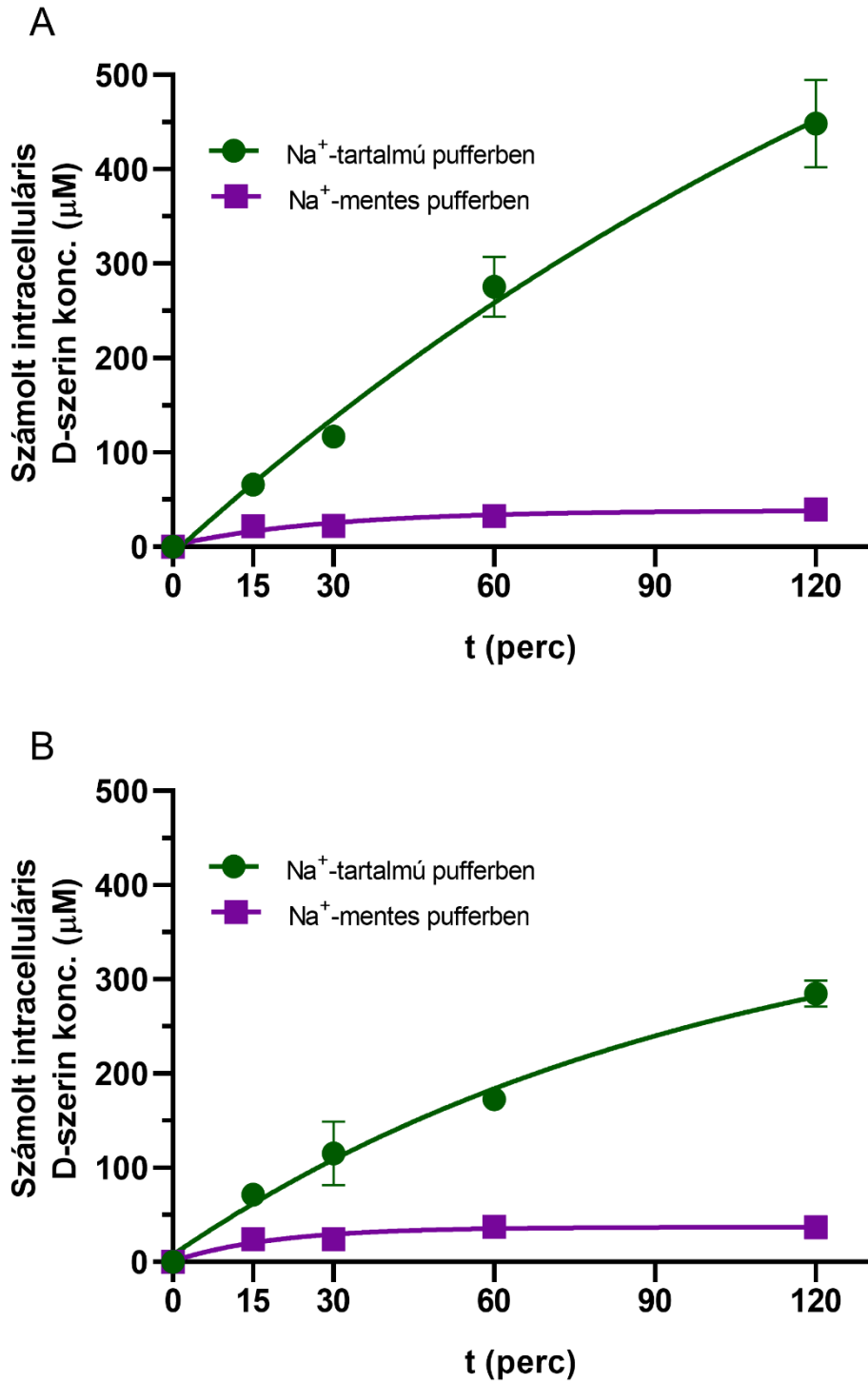


7. ábra: Az SH-SY5Y sejtek koncentrációfüggő D-szerin felvétele. Meghatároztuk az SH-SY5Y sejtek intracelluláris D-szerin mennyiségét különböző koncentrációjú (25, 50 és 200 μM) és inkubációs idejű (0, 15, 30, 60, 120 perc) D-szerin kezelést követően. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n = 3$).

4.2.1.1 Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének Na^+ -függése

A D-szerin szállításban résztvevő transzporterek fontos jellemzője, hogy működésük függ-e a Na^+ jelenlététől, ezért ezzel kapcsolatban végeztünk kísérletet az SH-SY5Y és az asztrocita sejteken. Mind Na^+ -tartalmú, mind Na^+ -mentes pufferben az inkubációs idő növekedésével az intracelluláris D-szerin szint is emelkedett mindkét sejt típus esetében. A Na^+ -tartalmú puffer alkalmazásakor mért D-szerin felvételi görbe telítési jellegű mindkét sejt típus esetében,

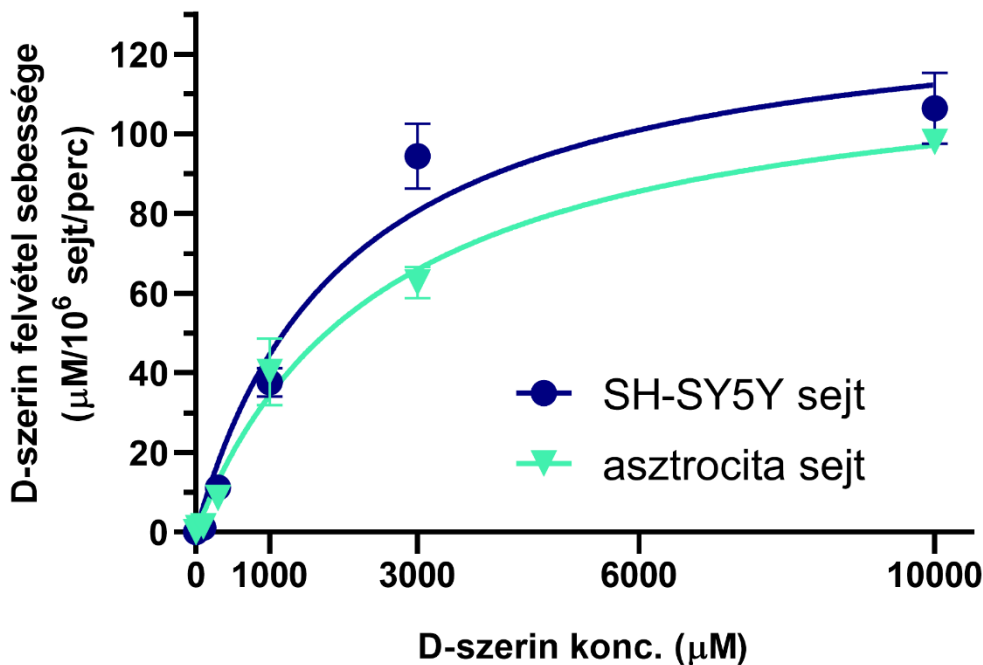
azonban az asztrocita kultúrán ez a profil kifejezettebb a vizsgált inkubációs periódusban. A Na^+ -mentes puffer használatakor mért D-szerin felvétel is preferáltan telítési görbével volt jellemezhető, összehasonlítva a lineáris illesztési sémával (eredmények nem kerülnek bemutatásra) mind az SH-SY5Y sejteken (8. A ábra), mind az asztrocita kultúrán (8. B ábra). A nátrium ionok kolin ionokkal történő helyettesítése jelentősen, az egyes időpontokban 66-91%-kal kisebb D-szerin felvételt eredményezett mindkét sejttypusnál. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy döntően Na^+ -függő D-szerin felvétel jellemzi az SH-SY5Y sejt vonalat és az asztrocita kultúrát egyaránt. Ezek alapján az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek működése valószínűsíthető az SH-SY5Y sejt vonalon.



8. ábra: A D-serin felvétel Na⁺-függése az SH-SY5Y és asztrocita sejtekben. Nátriumot tartalmazó vagy nátriummentes pufferben vizsgáltuk a D-serin felvételt (A) SH-SY5Y sejtekben és (B) kortikális asztrocita sejtekben 120 perc inkubációs idő alatt. A D-serin alkalmazott koncentrációja 50 µM volt. Az adatokat átlag ± SEM formában mutatjuk be (n = 3).

4.2.1.2 Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének kinetikai jellemzése

Elvégeztük az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek D-szerin felvételének kinetikai összehasonlítását. Mindkét sejtípust különböző koncentrációjú D-szerinnel inkubáltuk (0, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 μM) 15 percig, majd mértük az intracelluláris D-szerin koncentrációt. A növekvő D-szerin koncentráció emelkedő intracelluláris D-szerin koncentrációt eredményezett mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. A felvételi görbék a Michaelis-Menten kinetikát követték (9. ábra). A számolt kinetikai paraméterek, a K_m és a V_{max} értékek nem mutattak szignifikáns különbséget a két sejtípus összehasonlításakor (1. táblázat), amely eredmény alapján hasonló affinitás és kapacitás feltételezhető az SH-SY5Y és az asztrocita sejteknél.



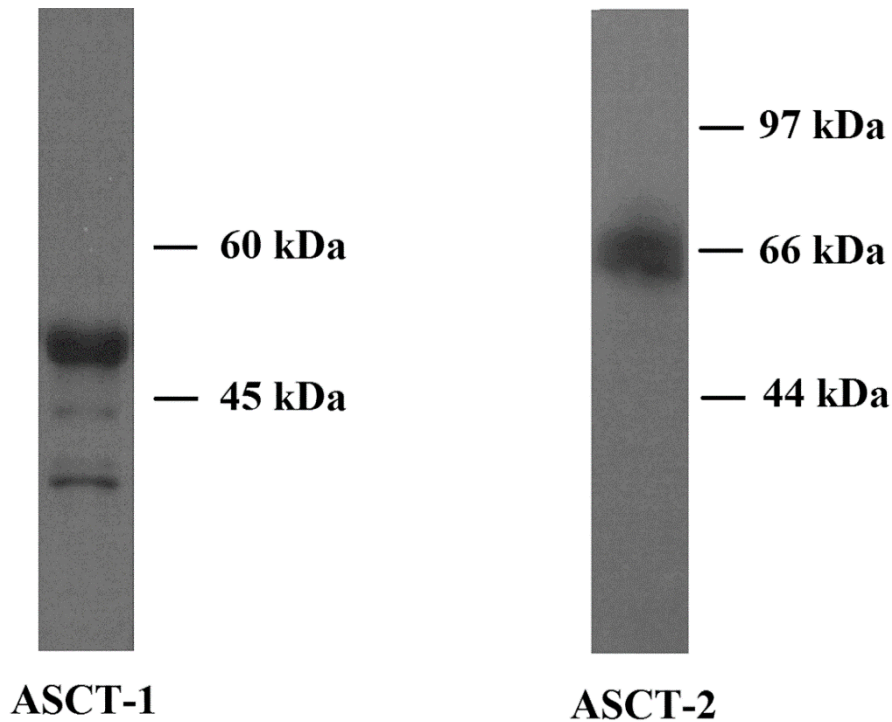
9. ábra: A D-szerin felvétel kinetikai jellemzése az SH-SY5Y és asztrocita sejtekben. Az ábrán a D-szerin felvétel sebessége látható SH-SY5Y sejtekben és patkány kortikális asztrocita sejtekben. Különböző koncentrációban alkalmaztunk D-szerint (0-10 000 μM) Na^+ -tartalmú pufferben. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$). Az illesztés során Michaelis-Menten görbét használtunk.

2. táblázat: A D-szerin felvétel kinetikai paramétereit az SH-SY5Y és az asztrocita sejtekben.

	SH-SY5Y		asztrocita		p
	átlag	95% CI	átlag	95% CI	
K_m (μM)	2025	1081-3884	2545	1714-3847	0,5131
V_{max} (μM/10⁶ sejt/perc)	135,0	108,4-172,0	121,9	105,8-142,8	0,4339

4.2.1.3 A D-szerin felvételért felelős transzporterek Western blot analízise SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon

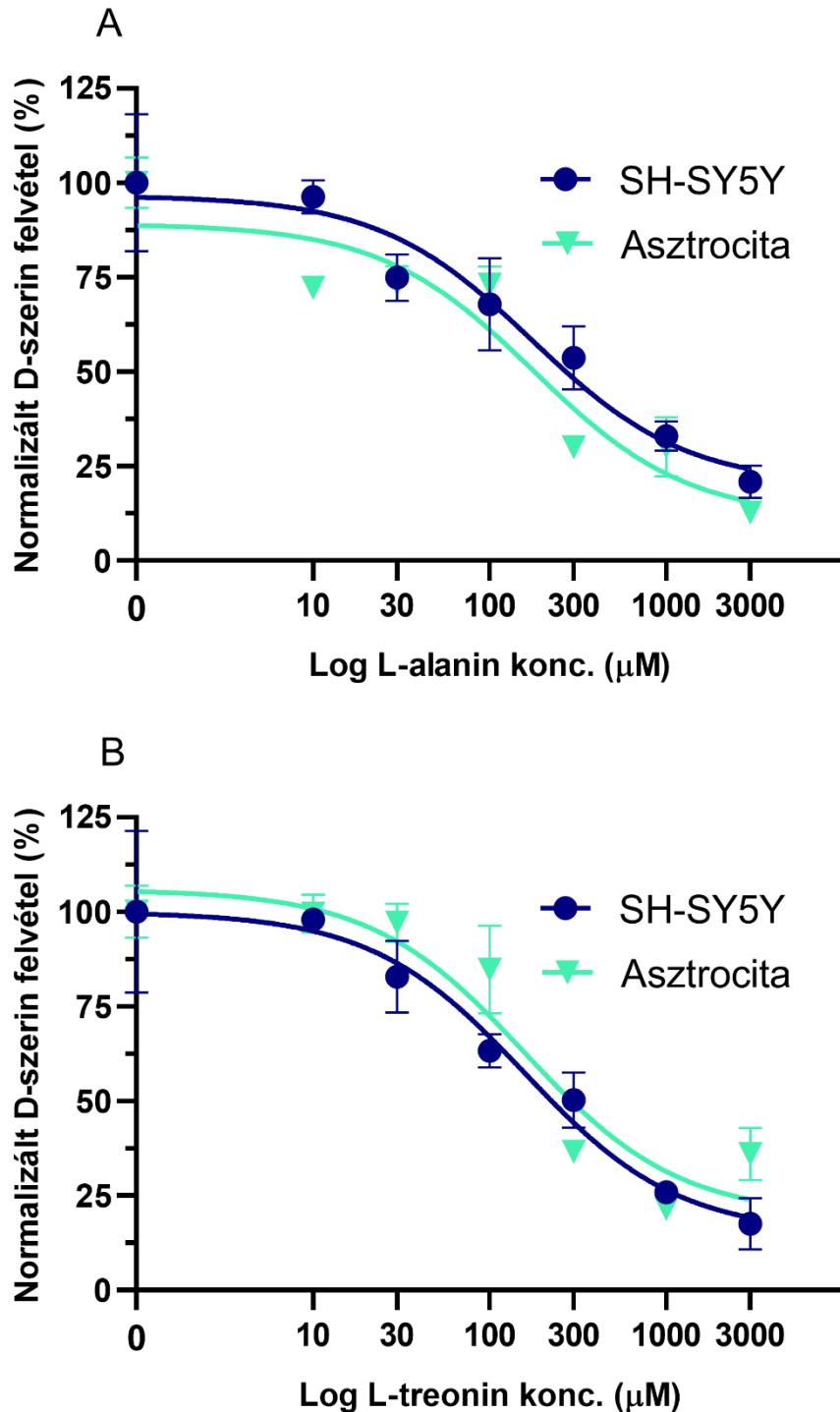
Az irodalmi adatok alapján leginkább az asztrocita sejtekre jellemző Na⁺-függő ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek jelenlétét Western blot analízissel vizsgáltuk az SH-SY5Y sejtvonalon. Az anti-humán ASCT-1 antitesttel végzett kísérlet során a legintenzívebb sáv 52 kDa molekulatömegnél jelent meg (10. ábra), amely kitűnő egyezést mutat a 55 kDa-os molekulatömeggel, amelyet cinguláris kortex vizsgálatok tapasztaltak (81). Az anti-humán ASCT-2 antitest alkalmazásakor egy immunoreaktív sáv jelent meg 66 kDa-nál (10. ábra), amely megfelel a glikolizált transzportfehérje korábban közölt molekulatömegének (78).



10. ábra: Az ASCT-1 és az ASCT-2 transzporterek Western blot vizsgálata SH-SY5Y sejtekben. A lizált SH-SY5Y sejtek (40 μ g fehérje) Western blot analíziséhez 4-12%-os gradiens gélt alkalmaztunk, a membránokat nyúl anti-humán ASCT-1 és nyúl anti-humán ASCT-2 antitestekkel inkubáltuk. Az ASCT-1 transzportert kb. 52 kDa-nál, az ASCT-2 transzportert kb. 66 kDa molekulatömegnél detektáltuk.

4.2.1.4 A D-szerin felvétel gátolhatósága különböző aminosavakkal az SH-SY5Y és asztrocita sejteken

A szervezetben található kisméretű semleges aminosavak, pl. az L-alanin és az L-treonin szubsztrátjai az ASCT-1 és ASCT-2 transzportereknek, így kompetitív gátlói a D-szerin felvételnek. Ezen aminosavak hatását vizsgáltuk meg az SH-SY5Y és az asztrocita sejteken. D-Szerinnel együtt alkalmazott növekvő koncentrációjú L-alanin és L-treonin kezelés az inkubációs közegben csökkenő intracelluláris D-szerin felvétellel társult. Koncentrációfüggő és a legmagasabb alkalmazott mennyiség esetén a D-szerin felvétel közel teljes gátlását tapasztaltunk mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken, mindkét aminosav esetében (11. ábra, A, B). Mivel két transzporter is szerepet játszhat a szerin felvételben, az egy és kétlépcsős gátlási görbe lehetőségét is megvizsgáltuk és a statisztikai összehasonlítása során minden vizsgált esetben az egylépcsős illesztés mutatkozott preferált modellnek (adatok nem kerülnek bemutatásra). Az SH-SY5Y sejteken, illetve az asztrocita kultúrán mért gátlási eredményekből származó IC50 értékek ugyancsak nem mutattak statisztikai különbséget az L-alanin és az L-treonin tekintetében (3. táblázat).

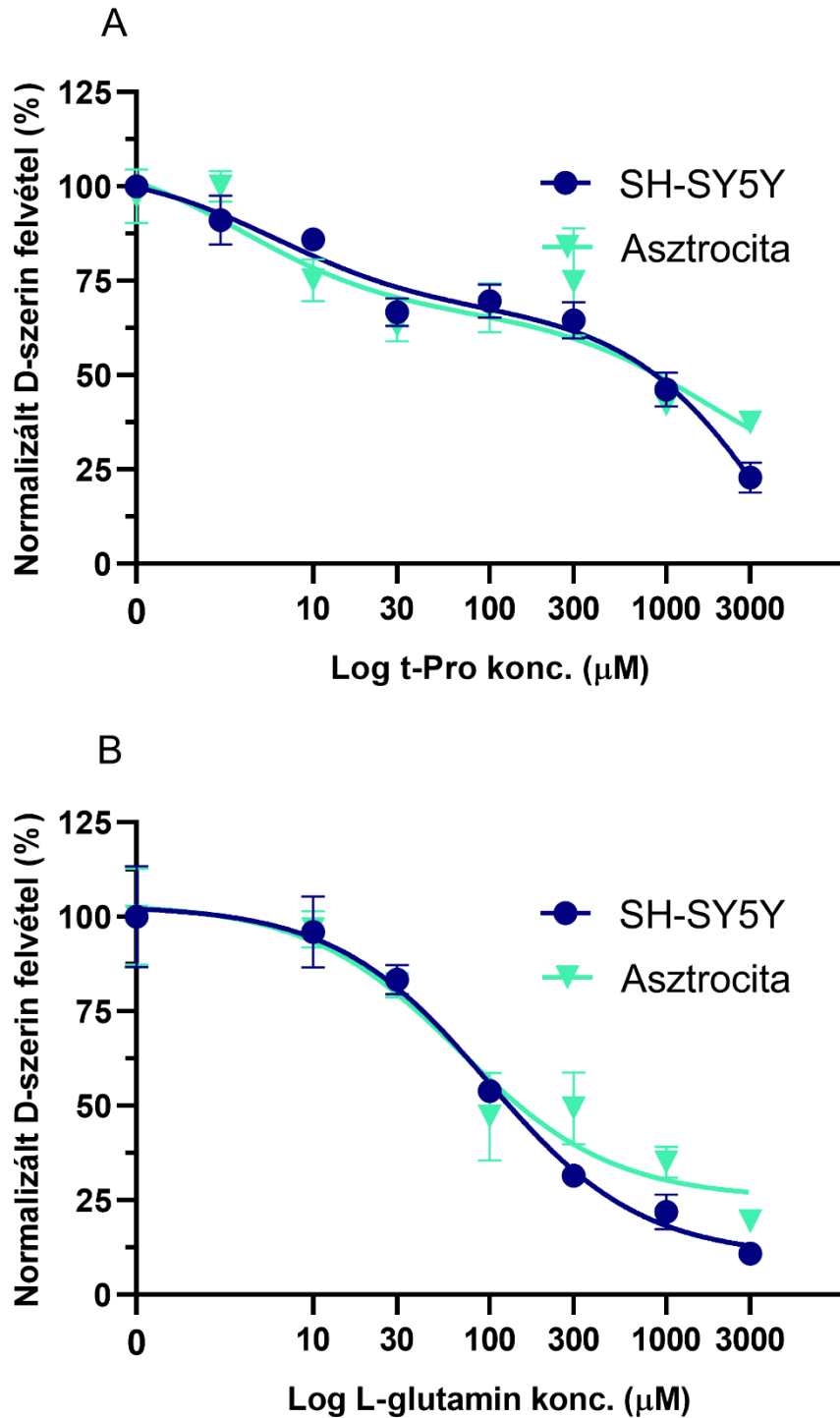


11. ábra: Az SH-SY5Y és patkány kortikális asztrocita sejtekbe történő D-szerin transzport gátlása L-alaninnal és L-treoninnal. Az (A) L-alanin és az (B) L-treonin koncentrációfüggő módon gátolta a D-szerin felvételt. Mindkét sejtípus esetében egylépcsős gátlási görbét figyeltünk meg. A kísérletek során 25 μM D-szerin felvételét vizsgáltuk 15 perc inkubációs időt

követően. A gátlószer hiányában mért intracelluláris D-szerin koncentrációt tekintettük 100%-os felvételnak. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n = 3$).

Az irodalmi adatok alapján, a t-Pro az ASCT-1 szelektív szubsztrátjának tekinthető (68). Kísérleteinkben koncentrációfüggően gátolta a D-szerin felvételét mindkét sejttípus esetében (12. A ábra). A gátlási görbére a kétlépcsős modell megfelelőbb illesztésnek bizonyult mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. A relatív D-szerin felvételen körülbelül 30%-os csökkenés mutatkozott a nagyobb affinitású gátlási szakaszon, amely az ASCT-1 transzporter közreműködését reprezentálhatja a D-szerin szállításában. A nagyobb affinitású gátlási szakaszhoz tartozó IC_{50} értékek statisztikailag nem különböztek az SH-SY5Y és asztrocita sejteken (3. táblázat). Magasabb koncentrációban alkalmazva a t-Pro már gátolja az ASCT-2 transzportert is, ezt mutatja a gátlási görbe második szakasza. A kísérleteinkben alkalmazott legnagyobb t-Pro koncentráció sem okozott teljes gátlást a D-szerin felvételében. A második lépcső eredményei alapján számolt IC_{50} értékek azonban nagy mértékű hibával terheltek, így nem volt lehetséges az összehasonlításuk a két sejttípusban.

Az L-glutamin koncentrációfüggő, közel teljes gátlását eredményezte a D-szerin transzportban mindkét sejttípusban (12. B ábra). Az L-glutamin az ASCT-2 transzporter preferált szubsztrátja az irodalomban leírtak szerint (64, 185). Ezzel ellentmondóan, kísérletünkben az egylépcsős modell jellemezte jobban a gátlás karakterisztikáját az SH-SY5Y és asztrocita sejteken egyaránt, ami az L-glutamin mérsékelt affinitásbeli különbségére enged következtetni az ASCT-1 és ASCT-2 transzportereket illetően. A számított IC_{50} értékek nem különböztek szignifikánsan egymástól az SH-SY5Y és asztrocita sejtek összehasonlítása során (2. táblázat).



12. ábra: Az SH-SY5Y és a patkány kortikális asztrocita sejtekbe történő D-szerin transzport gátlása t-Pro és L-glutamin alkalmazásával. A t-Pro kétlépcsős gátlási görbét eredményezett mindkét sejttypusban (A). Egylépcsős gátlási görbét figyeltünk meg L-glutamin esetében az SH-SY5Y és az asztrocita sejteknél is (B). A gátlószer hiányában mért intracelluláris D-szerin koncentrációt tekintettük 100%-os felvételnak. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$).

3. táblázat: A különböző D-szerin felvételt gátló neutrális aminosavak becsült IC₅₀ értékei SH-SY5Y és asztrocita sejtekben

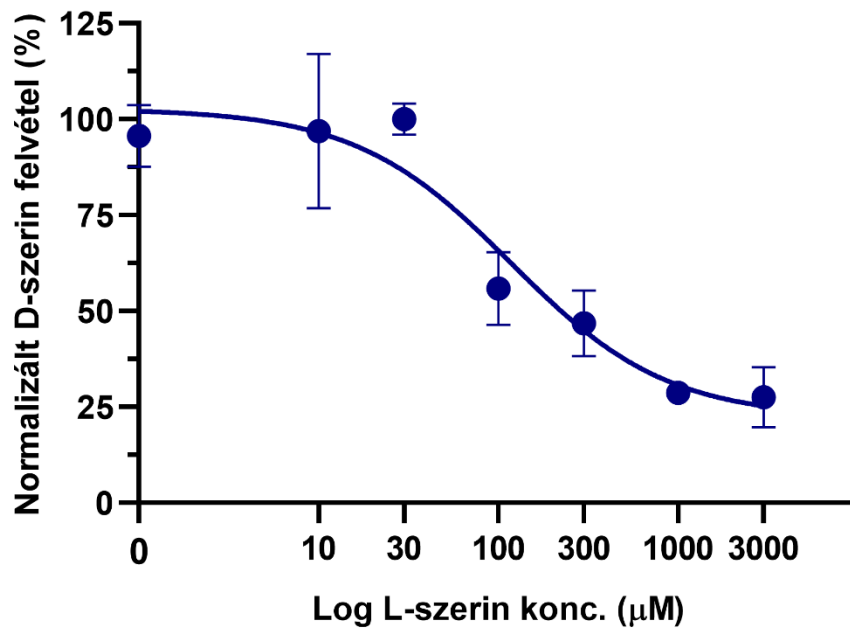
	SH-SY5Y		asztrocita		p
	átlag	95% CI	átlag	95% CI	
L-szerin IC ₅₀ (μM)	117,9	41,64-373,2			0,659*
L-alanin IC ₅₀ (μM)	174,4	40,21-772,4	177,7	66,21-470,4	0,982
L-treonin IC ₅₀ (μM)	157,9	50,52-521,8	158,1	74,47-335,5	0,998
L-glutamin IC ₅₀ (μM)	97,47	53,12-182,5	67,95	26,12-206,3	0,515
t-Pro IC ₅₀ (μM)**	8,218	1,98-26,5	3,975	0,16-19,7	0,522

*L-szerin IC₅₀ értéke összehasonlítva az L-alanin IC₅₀ értékével SH-SY5Y sejtvonalon

**ASCT-1 transzporter

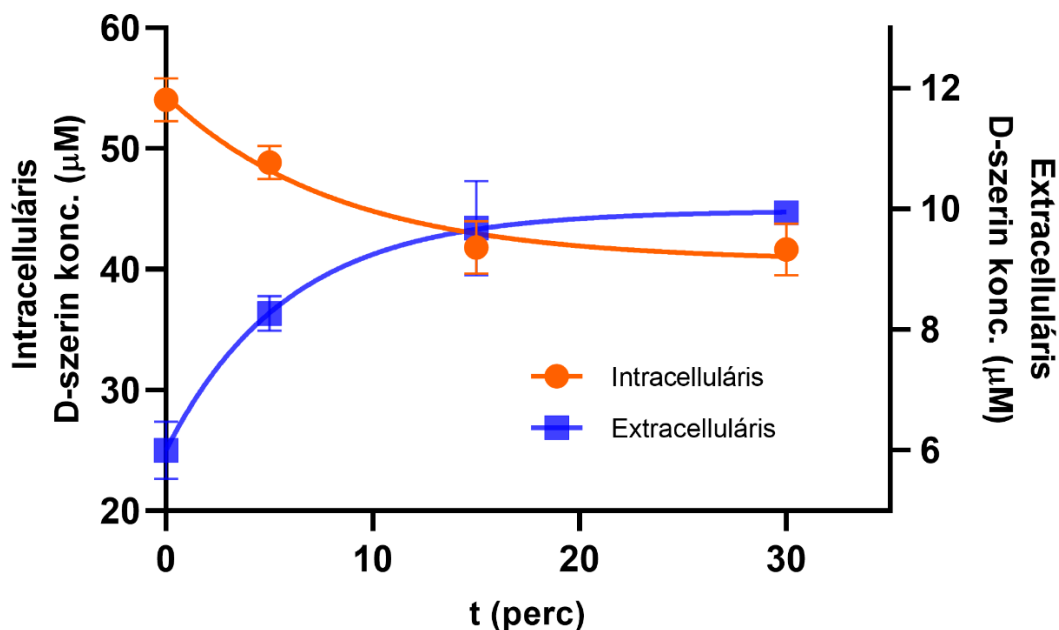
4.2.2 A SH-SY5Y asztrocita modell sejtek D-szerin transzportjának további karakterizálása

Az előzőekben ismertetett eredmények alapján az SH-SY5Y sejtvonal alkalmas lehet az asztrocitákban megfigyelhető D-szerin transzport modelljeként való alkalmazásra. Az SH-SY5Y sejtvonal D-szerin felvételének további karakterizálására L-szerinnel történő kezelést végeztünk. A növekvő L-szerin mennyiség koncentrációfüggő módon csökkentette a D-szerin felvételt. A 3000 μM-os kezelés 28%-ra mérsékelte a felvételre kerülő D-szerin mennyiségét (13. ábra). A gátlás egylépcsős szigmoidális görbével volt leginkább jellemezhető, összehasonlítva az egylépcsős és kétlépcsős illesztési sémát. Az L-szerin gátló hatásának IC₅₀ értéke nem különbözött szignifikánsan az L-alanin SH-SY5Y sejtvonalon tapasztalt IC₅₀ értékeitől (3. táblázat), amely az irodalomban leírt hasonló affintást erősíti meg a két aminosav tekintetében.



13. ábra: Az SH-SY5Y sejtekbe történő D-serin felvétel gátlása L-serin aminosavval. Az L-serin koncentrációfüggő módon gátolta a D-serin felvételt. A gátlás leginkább egylépcsős görbével volt jellemezhető. A kísérletek során 25 μM D-serin felvételét vizsgáltuk 15 perc inkubációs idő után. A gátlószer hiányában mért intracelluláris D-serin koncentrációt tekintettük 100%-os felvételnak. Az adatokat átlag ± SEM formában mutatjuk be (n = 3).

Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek antiporter tulajdonsággal rendelkeznek, tehát egy aminosav felvételekor egy másik leadása is megtörténik párhuzamosan. A D-serinnel előzetesen inkubált (feltöltött) SH-SY5Y sejteken L-serin hatására időfüggő D-serin felszabadulás volt mérhető. Ezt az eredményt mind az extracelluláris D-serin mennyiségének növekedése, mind az intracelluláris D-serin csökkenése alátámasztotta (14. ábra).

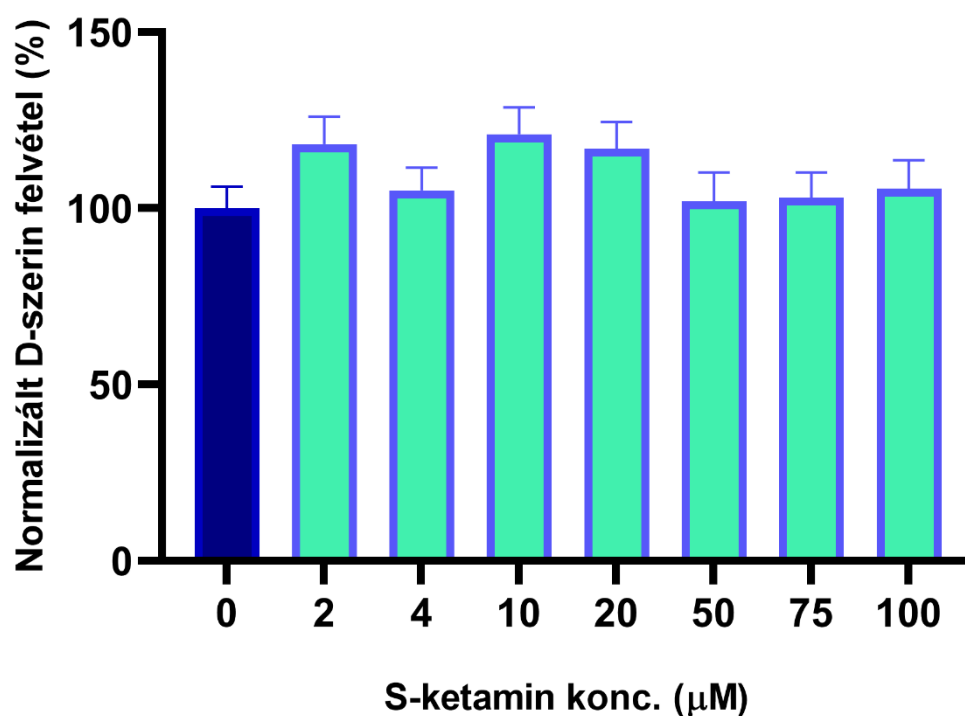


14. ábra: A D-szerin felszabadulása SH-SY5Y asztrocita modell sejteken L-szerin hatására. A D-szerin koncentrációt mind intra, mind extracellulárisan meghatároztuk. A letapadt SH-SY5Y sejteket 24 órán keresztül kezeltük 100 µM D-szerint tartalmazó tápoldattal. A sejtek mosását és szuszpendálását követően 300 µM L-szerint alkalmaztunk 30 percen keresztül. Az adatokat átlag ± SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$).

4.3 A asztrocita jellegű D-szerin transzport befolyásolása SH-SY5Y sejteken

4.3.1 Az S-ketamin akut hatása a D-szerin felvételre

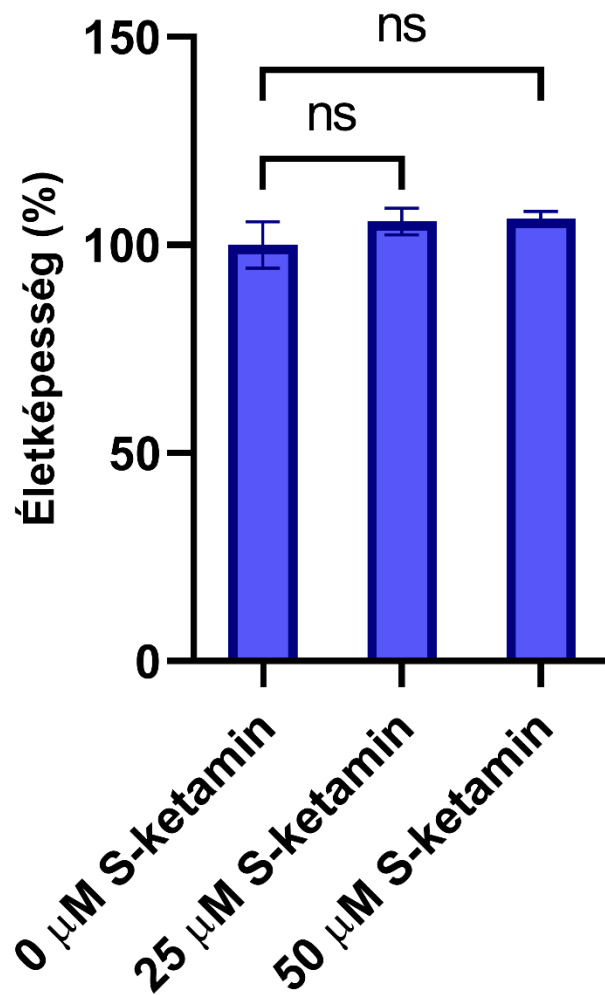
A továbbiakban olyan molekula tesztelését végeztük el, amely irodalmi adatok alapján befolyásolhatja az asztrocita sejtekre jellemző D-szerin transzportot. A ketamin rendelkezik egy királis szénatommal, így racém elegyében megtalálható az R- és S-ketamin enantiomer is. Korábban *in vitro* kísérletek alapján az S-ketaminnal történő akut kezelés D-szerin transzportot gátló hatásáról számoltak be, és a gátlást az ASCT-2 transzporterhez kötötték (65). Az általunk végzett kísérletben a 25 µM D-szerin mellett növekvő koncentrációban alkalmazott S-ketamin azonban nem okozott szignifikáns változást a D-szerin felvételben az SH-SY5Y sejteken (15. ábra).



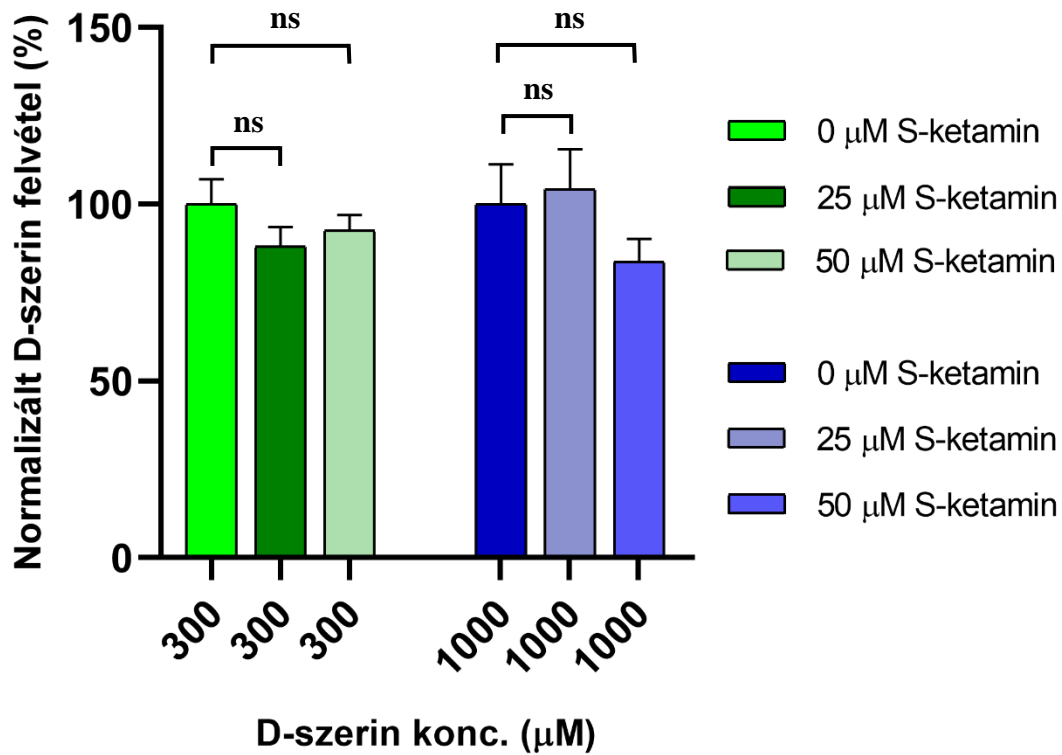
15. ábra: Az S-ketamin közvetlen hatása az SH-SY5Y asztrocita modell sejtek D-szerin felvételére. A SH-SY5Y sejteket 25 μM D-szerinnel kezeltük 15 percig, különböző koncentrációjú S-ketamin (0, 2, 4, 10, 20, 50, 75 és 100 μM) jelenlétében, majd meghatároztuk az intracelluláris D-szerin mennyiséget. Az S-ketamin hiányában mért D-szerin koncentrációt tekintettük 100%-nak a kalkuláció során. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$).

4.3.2 A hosszan tartó S-ketamin előkezelés hatása a D-szerin felvételre

A kompetitív gátlás lehetősége mellett vizsgáltuk a 72 órás S-ketamin előkezelés D-szerin felvételt befolyásoló hatását is. Az SH-SY5Y sejteket 72 óráig inkubáltuk 25, vagy 50 μM S-ketaminnal, illetve S-ketamin nélkül, majd az inkubációs médium eltávolítása után 300 és 1000 μM D-szerint alkalmaztunk 15 percig és az intracelluláris D-szerin szinteket határoztuk meg. A hosszútávú S-ketamin kezelés egyik koncentráció esetén sem csökkentette az életképességet a kezelésben nem részesülő kontroll csoporthoz képest (16. ábra). A S-ketaminnal nem kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva sem a 25 sem az 50 μM -os S-ketamin kezelés nem okozott szignifikáns változást függetlenül az alkalmazott D-szerin koncentrációtól (17. ábra).



16. ábra: S-ketamin kezelés hatása az életképességre az SH-SY5Y asztrocita modell sejteken. A letapadt SH-SY5Y sejteket különböző koncentrációjú (0, 25 és 50 μM) S-ketamint tartalmazó tápoldattal kezeltük 72 órán keresztül. Ezt követően végeztük el az SH-SY5Y sejtek reszazurin-redukción alapuló életképességi tesztjét. Az S-ketamin hiányában mért életképességi értéket tekintettük 100%-nak a kalkuláció során. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n = 3$).



17. ábra: A krónikus S-ketamin kezelés hatása az SH-SY5Y sejtek D-szerin transzportjára. A letapadt SH-SY5Y sejteket 25 vagy 50 μM S-ketaminnal, illetve S-ketamin nélkül tartottuk 72 órán át. A sejteket mostuk és szuszpendáltuk, majd különböző koncentrációjú (300 és 1000 μM) D-szerint tartalmazó pufferben, 15 percig inkubáltuk. Statisztikai összehasonlításra kétmintás *t*-próbát alkalmaztunk. Az elemzést $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az adatokat átlag \pm SEM formában mutatjuk be ($n \geq 3$).

5. Megbeszélés

5.1 DAAO enzimgátló fejlesztése

5.1.1 A 6-fluoro-1H-indazol-3-ol, második generációs DAAO enzimgátló vegyület *in vitro* tesztelt tulajdonságai

A Természettudományi Kutatóközpont Szerves Kémia Intézet 1H-indazol-3-ol alapszerkezetű potenciális DAAO gátlószer fejlesztése kutatási projektjébe kapcsolódtunk be. Ez a szerkezet a DAAO enzim gátlószereinek második generációjába sorolható. A második generációban a karboxilcsoportot, amely az első generációban jelen van, egy bioszterikus csoporttal helyettesítik, miközben a kondenzált kettős gyűrű szerkezet megmarad. A második generáció képviselőiről elmondható, hogy DAAO enzim iránti affinitásuk jobb, összehasonlítva a karboxilcsoportot tartalmazó vegyületekkel. Az alapváz megfelelő pozícióban történő szubsztituálása további növekedést eredményez a vegyületek gátló hatásában. A megfelelő pozíció mellett a szubsztituens megfelelő méretét is számításba kell venni, hiszen az alapváz valamely kis molekulával (F, Cl) történő szubsztituálása megnöveli a gátló hatást, míg egy nagyobb csoport szubsztitúciója lecsökkenti a gátlószer affinitását. Ezzel összefüggésben, többek között a fluoro-szubsztituált 1-es vegyület (6-fluoro-1H-indazol-3-ol) került kiválasztásra további tesztelés céljából (186). A vegyület deprotonálhatónak mutatkozott, nagyságrendileg 50%-os töltött mikrorészecske aránnyal pH = 8,0 esetén. Ez a tulajdonság általánosnak tekinthető a második generációs gátlószer körében (összefoglalva: (187)), amelynek oka, hogy a DAAO enzim kötőhelyére jellemző, hogy enyhén bázikus körülmények között a molekulán megjelenő töltés segíti a molekula-enzim kölcsönhatás kialakulását. A DAAO enzim gátlási képességet vizsgáló D-kinurenin tesztben az *in vivo* vizsgálatra kiválasztott 1-es vegyület esetében 123 nM IC₅₀ érték volt mérhető. Egy hasonló kutatásban a benzo[d]izoxazol-3-ol alapváz fejlesztését végezték el, melynek során a 6-kloro-szubsztituált származék (6-klorobenzo[d]izoxazol-3-ol, CBIO) bizonyult a leghatékonyabbnak. Az ugyancsak második generációs vegyület IC₅₀ értéke 188 nM-nak adódott (188). Az utóbbi időben a CBIO molekulát referencia DAAO enzim gátló vegyületként tartják számon. Az abszorpciós képesség vizsgálatára alkalmazott Parallel Mesterséges Membrán (PAMPA) teszten a 1-es vegyület megfelelőnek mondható közepes permeabilitást mutatott. Összehasonlításként a CBIO vegyület magas permeabilitással rendelkező Caco-2 és MDR-1/MDCK sejteken végzett vizsgálatokban (188). Az 1-es vegyület metabolikus szempontból stabilnak tekinthető az egér, illetve emberi mikroszómán és hepatocitán végzett kísérletek

alapján. A metabolikus stabilitás nagyon fontos tulajdonság a felhasználhatóság és az élő szervezetben kialakuló végső hatás szempontjából.

4. táblázat: A Megbeszélés részben említett DAAO gátló vegyületek megnevezése

Név	Elnevezés
6-fluoro-1H-indazol-3-ol	1-es vegyület
4,6-difluoro-1-hidroxi-1,3-dihidro-2H-benzol[d]imidazol-2-on	2-es vegyület
5-kloro-6-fluoro-3-hidroxi-1,8-naftiridin-2(1H)-on	3-as vegyület
6-klorobenzol[d]izoxazol-3-ol	CBIO

5.1.2 A 6-fluoro-1H-indazol-3-ol, DAAO enzimgátló vegyület *in vivo* vizsgálata

Az intézetünkben végzett *in vivo* kísérlethez az 1-es vegyület (6-fluoro-1H-indazol-3-ol) került kiválasztásra megfelelő gátló potenciálja, ideális becsült biohasznosulása és metabolikus stabilitása alapján. Az 1-es vegyület egyszeri, D-szerinrel történő együttes adagolása szignifikáns D-szerin szint emelkedést okozott az egerek plazmájában. A különbség 10 perc elteltével 33%-nak, 60 perc után 27%-nak adódott, majd 120 percnél már nem mutatkozott szignifikáns különbség. Korábban egy újonnan fejlesztett, ugyancsak 2. generációs DAAO gátló vegyületet, a 4,6-difluoro-1-hidroxi-1,3-dihidro-2H-benzol[d]imidazol-2-on (2-es vegyület) vizsgáltak Berry és mtsai *in vivo* körülmények között. A kísérlet során a gátlószert D-szerinrel együtt orálisan adagolták egereknek 30 mg/kg dózisban, mindkét komponens tekintetében. A DAAO gátlószert kezelés csak enyhe és rövid ideig tartó D-szerin szint emelkedést okozott, összehasonlítva a gátlószerttel nem kezelt csoporttal (189). Elvégezték a 2-es vegyület metabolikus stabilitását vizsgáló kísérletet egér plazmában és máj mikroszómán, amelyből kiderült, hogy ez a vegyület a fázis II. során glükuronidálódik a májban, és a kialakuló metabolit nem rendelkezik farmakológiai aktivitással (189). Egereken végeztek kísérleteket a 5-kloro-6-fluoro-3-hidroxi-1,8-naftiridin-2(1H)-on (3-as vegyület) 2. generációs gátlószerttel, amelyet subcután, 10 mg/kg dózisban adagoltak az állatoknak. A cerebelláris D-szerin szint szignifikánsan megemelkedett, mellyel együtt a gátlószert szabad agyi szintje is nőtt és a DAAO enzim gátlás IC_{50} értékéhez képest háromszor nagyobb koncentrációt ért el (190). A CBIO vegyülettel patkányokon végeztek *in vivo* vizsgálatot. Orális együtt adagolása D-szerinrel, emelkedett plazma D-szerin koncentrációt eredményezett (188). Ezzel egyidejűleg az

extracelluláris D-serin szint is megemelkedett egerek frontális kortexében, illetve a dizocilpin-indukálta előingerléses gátlás (PPI) hiánya is csökkent a CBIO kezelés hatására (191). Ellentmondásos eredmény, hogy az intravénásan adagolt CBIO és orális D-serin bevitel nem változtatta meg a plazma D-serin koncentrációját majmokban, annak ellenére, hogy a CBIO folyamatosan, állandó koncentrációban volt megtalálható az állatok vérében (155). Az általunk vizsgált 1-es vegyület a korábban leírt második generációs DAAO gátlókhöz hasonló, megfelelő D-serin koncentráció emelkedést okozott egerek plazmájában. Terápiás hatásának vizsgálatához további preklinikai kísérletek elvégzése szükséges, amelyekben az agyi D-serin szint változása mellett skizofrénia modellen a tünetekre gyakorolt hatása is vizsgálatra kerül.

5.2 A D-serin transzport vizsgálata

5.2.1 Az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek D-serin felvételének karakterizálása

Az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek képesek a D-serin felvételére. A növekvő inkubációs idő és a növekvő D-serin koncentráció alkalmazása során kapott eredmények alapján, egy idő- és koncentrációfüggő D-serin felvétel figyelhető meg az SH-SY5Y sejtvonalon. A sejtek mind a három koncentrációjú D-serinnel (25, 50 és 200 μM) való inkubációja telítési jellegű felvételi görbét eredményezett. A 200 μM extracellulárisan alkalmazott D-serin már 30 perc elteltével az intracelluláris D-serin koncentráció telítését eredményezte, míg a 25 és 50 μM -os kezelés során csak 120 perc inkubációt követően értük el a plató fázis kezdetét. Az SH-SY5Y sejtvonalon megvalósuló D-serin felvétel tulajdonságai egy specifikus, karrier-mediált transzportra engednek következtetni.

5.2.1.1 Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-serin felvételének Na^+ -függése

A nátrium-ionok kolin-ionokkal történő helyettesítése a vizsgálati pufferben nagymértékű csökkenést eredményezett a D-serin felvételben mind a SH-SY5Y sejtvonalon, mind az asztrocita kultúrán. Ezek alapján kijelenthető, hogy a D-serin felvétel mindkét sejttypusban döntően Na^+ -függőnek tekinthető. Az SH-SY5Y és asztrocita sejteken tehát az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek működése valószínűsíthető, amely transzportereket már korábban kimutattak glia sejteken. Asztrocita, illetve asztrocita tulajdonságokkal rendelkező sejteken végzett korábbi vizsgálatokból hasonló eredmények származnak. Riberio és mtsai patkány asztrocita kultúrán vizsgálták a D-serin felvételt. A folyamat nagymértékben Na^+ -függőnek bizonyult (79). Patkány hippokampális asztrocita kultúrán mind a D-serin, mind az L-serin

felvétele kifejezettebb volt Na^+ jelenlétében (64). A Müller sejtek a gerincesek retinájában találhatóak és a glia sejtek egy speciális típusát képezik. Müller sejtvonal és eger Müller sejtek D-szerin felvétele ugyancsak Na^+ -függőnek bizonyult 1:1 Na^+ :D-szerin sztöchiometriával (63). A patkány asztrocitóma eredetű, C6 glióma sejteken korábban az L-glutamin felvételéről mutatták ki, hogy Na^+ -függő (192). Az SH-SY5Y sejtvonal az SK-N-SH sejtvonal harmadik szubklónozásának eredménye. Ez utóbbi "szülői" neuroblasztóma sejtvonalon korábban döntően Na^+ -függő L-glutamin felvételt azonosítottak, melynek háttérében az ASCT-1 és ASCT-2 transzportereket valószínűsítették (193). A Na^+ -ot nem tartalmazó vizsgálati pufferben erősen csökkent, de mérhető maradt a D-szerin felvétel. A folyamat telítési görbével volt jellemezhető, összehasonlítva a lineáris illesztési sémával. A fentebb említett asztrocita kultúrán (64, 79) és a Müller sejteken (63) végzett kísérletek hasonló eredményekkel zárultak. A folyamat háttérében különböző nem specifikus transzport folyamatok, a Na^+ -függő ASCT-1 és ASCT-2-mediálta "maradék" transzport feltételezhető. Az asc-1 transzporter elsősorban a neuronokon fordul elő a központi idegrendszerben, funkcionális vizsgálatokat pedig szinaptoszómákban végeztek (54, 56). Az *ex vivo* vizsgálati módszerre azért van szükség a transzporter működésének tanulmányozása során, mert *in vitro* körülmények között csökken a 4F2 nehéz lánc mennyisége, amely szükséges az asc-1 transzporter működéséhez (49, 54). Ezek alapján a Na^+ -független asc-1 transzporter szerepét kizárhatjuk az SH-SY5Y sejteken, a Na^+ -mentes közegben tapasztalt D-szerin felvétel folyamatából.

5.2.1.2 Az SH-SY5Y és asztrocita sejtek D-szerin felvételének kinetikai jellemzése és összehasonlítása

A D-szerin felvétel, mindkét sejtípus esetében jól jellemezhetőnek bizonyult Michaelis-Menten kinetikával. A számított kinetikai paraméterek, a K_m és a v_{max} értékek nem mutattak szignifikáns különbséget az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek között. Az SH-SY5Y sejtek esetében a K_m érték 2025 μM , az asztrocita sejteknél 2545 μM volt. Asztrocita kultúrán végzett korábbi kísérletek során a következő K_m értékeket határozták meg: 2480 μM (194), 2200 μM (64), amelyek jó egyezést mutatnak az általunk mért paraméterekkel, ugyanakkor alacsonyabb (K_m : 650 μM) érték is fellelhető az irodalomban (79). Érdekes, hogy Shao és mtsai asztrocita sejteken végzett kísérletük során egy kétfázisú kinetikai görbét kaptak, K_{m1} : 1600 μM és K_{m2} : 4500 μM értékkel. A két fázis kialakulása alapján két szaturálható, alacsony specificitással rendelkező transzporter működését valószínűsítették (56). Összességében ezek az eredmények megerősítik, hogy az asztrocitákra és az SH-SY5Y sejtvonalra jellemző D-

szerin transzport kinetikája nem tér el szignifikánsan, így az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon alkalmas lehet az asztrociták D-szerin transzportja befolyásolási lehetőségének vizsgálatára.

5.2.1.3 A D-szerin felvételért felelős transzporterek Western blot analízise SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon

A Western-blot analízis mind az ASCT-1, mind az ASCT-2 transzporter jelenlétét kimutatta az SH-SY5Y sejtvonalon. Az anti-humán ASCT-1 antitest 52 kDa molekulatömegnél mutatott immunreaktív sávot az SH-SY5Y sejtek vizsgálatakor, ami jó egyezést mutat az asztrocitáknál leírt 55 kDa molekulatömeggel (77). A Western blot eredmények mellett az ASCT-1 transzporter asztrocita sejteken való jelenlétét RT-PCR meghatározások támasztják alá (63, 77). Az SH-SY5Y sejteken az anti-humán ASCT-2 antitest 66 kDa-nál mutatott immunreaktív sávot. Kortikális asztrocita vizsgálatánál 53 kDa molekulatömegnél jelentkezett az ASCT-2 immunreaktív sávja (56). Dun és mtsai a Müller sejtek mellett számos szövettípuson; tüdön, agyszöveten, vesén és retinán is elvégezték az immunoblottolást, melynek során az immunreaktív sávok 38-45 kDa tartományba estek (63). A különböző szövet- és sejtípusok közötti különbségek hátterében az eltérő mértékű glikoziláltsági és foszforiláltsági fok állhat (195). Ezek mellett számos RT-PCR eredmény erősíti meg az ASCT-2 transzporter asztrocita lokalizációját (63, 77, 79). Összességében tehát elmondható, hogy az SH-SY5Y sejtvonalon megtalálhatóak az asztrocitára jellemző ASCT-1 és ASCT-2 transzportfehérjék. Ezt erősíti meg az is, hogy a már korábban említett SK-N-SH neuroblasztóma sejtvonalon mind az ASCT-1, mind az ASCT-2 transzporter RNS-ét kimutatták RT-PCR vizsgálattal (193).

5.2.1.4 A D-szerin felvétel gátlása különböző aminosavakkal az SH-SY5Y és asztrocita sejteken

Az L-alanin és L-treonin aminosavak az ASCT-1 és ASCT-2 transzporter szubsztrátjai, így a D-szerin felvétel kompetitív gátlószerei. Koncentrációfüggő, a legmagasabb alkalmazott koncentráció esetén közel teljes D-szerin felvétel gátlást eredményeztek mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. Számos kutatócsoport gátolta az ASCT transzporter(ek) által mediált D-szerin felvételt L-alanin és L-treonin alkalmazásával különböző sejtípusokon (5. táblázat). A táblázatból kiderül, hogy az asztrocita sejtek D-szerin felvételében az ASCT-2 transzportert tartották a leginkább meghatározónak (56, 79). Ennek a feltételezésnek az alapja

egy korábbi vizsgálat eredménye, amelyben ASCT-1 transzportert expresszázó HeLa sejteken nem tapasztaltak D-szerin okozta gátlást az L-szerin felvételben, így a D-szerint nem tekintették a transzporter szubsztrátjának (80). Foster és mtsai mutatták ki, hogy az ASCT-2 transzporter mellett az ASCT-1 transzporter is részt vesz a D-szerin felvételben asztrocita kultúrán, megcáfolva a korábbi felvetést (64). Az általunk végzett vizsgálatban egylépcsős görbe jellemezte leginkább a gátlás karakterét mindkét aminosav esetében. Korábbi vizsgálatok során, az L-alanin és az L-treonin nem mutatott szelektivitást a két transzporter tekintetében, így ezek az aminosavak nem alkalmasak annak megállapítására, hogy melyik vagy mindkét transzporter részt vesz-e a D-szerin felvételben (64). A gátlási görbe alapján számolt IC_{50} értékek nem különböztek az SH-SY5Y és asztrocita sejtek összehasonlításakor egyik aminosav esetében sem. Ezek az eredmények alátámasztják a hasonló D-szerin transzport jelenlétét a két sejttypusban, így az SH-SY5Y sejt vonal asztrocita modellként való alkalmazhatóságát.

Az asztrociták és az SH-SY5Y sejtek esetében is az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek együttesen vesznek részt a D-szerin transzportjában. A két transzporter megkülönböztetéséhez, illetve a D-szerin felvételben betöltött szerepük meghatározásához nagy szelektivitású gátlószer alkalmazása szükség. A t-Pro szelektívebben gátolja az ASCT-1 transzportert. Ennek megfelelően a t-Pro a D-szerin felvételének kétlépcsős gátlási görbét eredményezte mind az SH-SY5Y sejteken, mind az asztrocita kultúrán. Az első lépcső a szelektíven gátolt ASCT-1 transzporternek feleltethető meg, alátámasztva hozzájárulását a D-szerin felvételhez mindkét sejttypusban (68). A gátlás nagyobb affinitással rendelkező szakasza, amely az ASCT-1 transzporter működéséhez köthető, nagyságrendileg 30%-át adta a teljes gátlásnak az SH-SY5Y és az asztrocita sejtekben egyaránt. Korábbi vizsgálatokban asztrocita kultúrán ugyancsak kétlépcsős gátlást eredményezett a t-Pro, azonban a nagyobb affinitású, az ASCT-1 transzporter működéséhez kapcsolt szakasz a D-szerin felvétel 60%-áért volt felelős (64). Kísérleteinkben a t-Pro gátlás első lépcsőjéből számolt IC_{50} értékek nem különböztek szignifikánsan a két sejttypus összehasonlításakor, ami ugyancsak alátámasztja az SH-SY5Y sejt vonal asztrocita jellegét. Ezt tovább erősíti, hogy a korábban publikált asztrocita kultúrán mért, az első lépcsőhöz tartozó IC_{50} érték (t-Pro IC_{50-1} : 23,9 μ M, (64)) jó egyezést mutat az általunk kalkulált paraméterekkel (3. táblázat). A magasabb koncentrációtartományban a t-Pro az ASCT-2 transzportert is gátolta, tehát csak részleges szelektivitással rendelkezik az ASCT-1 transzporterrel, amely tulajdonságot asztrocita sejteken végzett kísérletből származó irodalmi adatok is alátámasztanak. Ugyanezen kutatócsoport ASCT-2 transzportert expresszázó HEK

sejteken is teljes gátlást ért el az L-szerin felvételben magas koncentrációban alkalmazott t-Pro esetén (64).

Vizsgálatunkban az L-glutamin a D-szerin felvételének egylépcsős, koncentrációfüggő gátlását eredményezte az SH-SY5Y és az asztrocita sejteken egyaránt. A legmagasabb alkalmazott koncentrációban közel teljes gátlás mutatkozott mindkét sejtípus esetében. Eredményeink eltérnek egyes irodalmi adatokhoz képest. Foster és mtsai patkány asztrocita kultúrán végzett kísérletükben, a kétlépcsős gátlási modellt találták preferáltnak az egylépcsős illesztéssel szemben, amikor L-glutaminnal kezelték a sejteket (64). Az L-glutamin kismértékű szelektivitást mutatott az ASCT-2 transzporteren, magasabb koncentrációban az ASCT-1 transzportert is teljesen gátolta. Ezt erősíti meg, hogy ASCT-1 transzportert expresszálo karmosbéka petesejten, magas koncentrációban alkalmazott L-glutamin (5mM) ugyancsak szignifikánsan csökkentette szubsztrátjának, az L-alaninnak a felvételét (68). A korábbi, teljes ASCT-2 szelektivitásról beszámoló eredményekkel (61, 185) ellentétben tehát csak relatív és kismértékű szelektivitás állhat fenn. Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek együttes működése esetén az L-glutamin egyes transzporterekhez kapcsolódó gátlási paramétereinek meghatározása nehézségeket rejtő feladat, hiszen átfedő görbék pontos karakterizálását igényli. Az általunk végzett kísérlet limitációja, hogy a dinamikus szakaszon kevés mérési pont található, azonban az SH-SY5Y és az asztrocita sejtek nagymértékben hasonló működését ezen kísérlet is igazolja.

5.2.2 A SH-SY5Y asztrocita modell sejtek D-szerin transzportjának további karakterizálása

Az eddigiekben összegzett eredmények alapján, az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonalon alkalmas asztrocita modellként való felhasználásra. A sejtvonalon L-szerinnel történő kezelést végeztünk, hogy tovább jellemezzük az SH-SY5Y sejtek D-szerin felvételét. Az L-szerin koncentrációfüggő módon gátolta a D-szerin felvételt. A számolt IC_{50} érték nem különbözik szignifikánsan az SH-SY5Y sejteken mért, L-alanin okozta gátlásból kalkulált IC_{50} értéktől (3. táblázat). Az általunk alkalmazott, a D-szerin transzportot gátló aminosavakkal végzett vizsgálatokról megjelent publikációkat a 4. táblázat mutatja be.

5. táblázat: A kísérleteink során alkalmazott, D-szerin transzportot gátló aminosavak szakirodalomban történő megjelenése, és a vizsgálat részletei.

	L-szerin	L-alanin	L-treonin	L-glutamin	t-Pro	Sejttípus	Feltételezett transzporter
Riberio és mtsai (79)	●	●	●	●	-	asztrocita	ASCT-2
Shao és mtsai (56)	●	●	●	●	-	asztrocita	ASCT-2
Foster és mtsai (64)	●	●	●	●	●	asztrocita	ASCT-1 és ASCT-2
Dun és mtsai (63)	●	●	-	●	-	Müller sejt	ASCT-2
Lee és mtsai (177)	●	●	-	●	-	ALS sejtmodell	asc-1 és ASCT-2

● – alkalmazták az adott aminosavat a D-szerin transzport befolyásolására

- – nem alkalmazták az adott aminosavat a D-szerin transzport befolyásolására

Az ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek antiporter tulajdonsággal rendelkeznek, tehát egy aminosav felvételével párhuzamosan, egy aminosav leadása is megtörténik. A folyamat fontos szerepet tölthet be egyes aminosavak intra- és extracelluláris koncentrációjának szabályozásában a központi idegrendszerben. Vizsgáltuk az SH-SY5Y sejtek antiporter működését D-szerin preinkubációt és L-szerin kezelést alkalmazva. A D-szerinnel feltöltött sejtek L-szerin kezelése időfüggő D-szerin felszabadulást eredményezett, koncentrációváltozása intracellulárisan és extracellulárisan is követésre került. Ezen eredmény alátámasztja az ASCT-1 és ASCT-2 transzporter antiporter tulajdonságát az SH-SY5Y sejteken. Ide kapcsolódik, hogy ASCT-1 transzportert expresszáló karmosbéka petesejten, az izotóppal jelzett D-szerin időfüggő felszabadulását érték el L-alanin, illetve D-szerin

kezeléssel. Az ASCT-2 transzportert expresszázó sejteken az L-alanin, a D-szerin és az L-glutamin is izotóppal jelzett D-szerin effluxot eredményezett (64). Patkány hippokampális asztrocitán az L-szerin és a t-Pro kezelés is izotóppal jelzett L-szerin felszabadulással társult. Ezen a sejttípuson az ASCT-1 és az ASCT-2 transzporterek párhuzamos működését a kutatócsoport már korábban bizonyította (64).

A bevezetésben kifejtett szerin-kicserélődési modell alapján az emberi szervezetben fiziológiás körülmények között az asztrocita felveszi a szinaptikus aktivitást követően "megmaradt" D-szerint és ezzel párhuzamosan L-szerint szabadít fel. A folyamat eredményeként az extracelluláris térben megjelenő L-szerint a neuronok veszik fel, majd tovább alakítják (69, 82). Riberio és mtsai a D-szerin okozta felszabadulást vizsgálták asztrocita sejteken és az L-szerint találták preferált szubsztrátnak. Figyelembe kell venni, hogy az intracelluláris L-szerin mennyisége magasabb, mint más aminosavaké, azonban a felszabaduló frakció mértéke is a legnagyobbak adódott, összehasonlítva a többi aminosavval (79). Összeségében az asztrocita sejteken megvalósuló aminosav kicserélődés egy fontos szabályozó folyamat, amellyel kevés kutatás foglalkozik részletesen. Kísérletünk alapján az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonal alkalmas lehet az asztrocita sejtekre jellemző aminosav felszabadulás tanulmányozására.

5.3 Az S-ketamin akut és a vegyülettel történő hosszan tartó előkezelés hatásának vizsgálata a D-szerin felvételre az SH-SY5Y sejteken

Placebokontrollált klinikai vizsgálat bizonyította a ketamin gyorsan kialakuló és tartós antidepresszáns hatását terápia-rezisztens betegeknél egyszeri, szub-anesztetikus dózisu intravénás kezelést követően (196). A ketamin egy racém vegyület, amely azonos arányban tartalmazza az (R)-ketamin és az (S)-ketamin enantiomerpárt. Az utóbbi időben végzett, az enantiomereket külön-külön vizsgáló kísérletek bebizonyították, hogy az (R)- és (S)-ketamin, illetve ezen vegyületek metabolitjai eltérő hatással (is) rendelkeznek (197). Az (S)-ketamin enantiomerhez kapcsolják a pszichotomimetikus hatást, a disszociatív hatást és a deperszonalizációt, amely hatások a ketamin kezelés során tapasztalt legfontosabb mellékhatások (198). A disszociatív hatás hátterében számos folyamat feltételezett, ilyen például a közvetlen NMDA receptor gátlás. Az (S)-ketamin nagyságrendileg négyszeres affinitással rendelkezik az NMDA receptoron, összehasonlítva az (R)-ketaminnal (199). A disszociatív hatáshoz járulhat hozzá az (S)-ketamin feltételezett, ASCT-2 transzportert gátló hatása (65). PC-12 pheochromocytoma sejteken, 1312N1 asztrocitoma sejteken és neuron kultúrán végzett (S)-ketamin kezelés növelte az intracelluláris D-szerin mennyiséget, míg az

extracelluláris koncentrációt csökkentette. Ettől részben eltérően az R-ketamin mind intra-, mind extracellulárisan csökkentette a D-szerin mennyiségét. Az ASCT-2 transzporter (S)-ketamin által okozott gátlását támasztja alá, hogy az ASCT-2 szelektív gátlószere, a benzil-D-szerin, illetve az ASCT-2 transzporter génjének elnémítása teljesen megegyező eredményt mutatott az (S)-ketamin kezeléssel. Emellett az (S)-ketamin és a benzil-D-szerin együttes adagolása additív emelkedést eredményezett az intracelluláris D-szerin koncentrációban (65). Az (S)-ketamin kezelés ASCT-2 transzporter kompetitív, nem-kompetitív gátló hatását írták le, azonban a szerzők hangsúlyozzák, hogy a megnövekedett intracelluláris D-szerin szint kialakulásában szerepet játszhat a sejtekben nagyobb mennyiségben jelen lévő SR enzim is (65). Az általunk végzett kísérlet során vizsgáltuk az (S)-ketamin akut hatását az SH-SY5Y sejtvonal D-szerin felvételére. A legmagasabb alkalmazott (S)-ketamin koncentráció (100 μM) sem okozott szignifikáns csökkenést a D-szerin felvételben, kizárva a kompetitív gátlás lehetőségét. A 72 órás, 25 és 50 μM -os (S)-ketamin előkezelést követő 300 és 1000 μM -os D-szerin kezelésből származó eredmények között sem mutatkozott különbség, összehasonlítva a kontroll csoport eredményeivel. Az eltérő megfigyelés háttérében a kísérleti elrendezésekben tapasztalható különbségek állhatnak. Singh és mtsai a PC-12 sejteket RPMI-1640 tápoldatban (nagyságrendileg 300 μM L-szerint tartalmaz, D-szerint nem tartalmaz), a 1312N1 sejteket DMEM tápoldatban (nagyságrendileg 400 μM L-szerint tartalmaz, D-szerint nem tartalmaz), a primer neuron kultúrát B-27 tápoldatban (a tápoldat L- és D-szerin mennyisége nem ismert) tartották 70%-os konfluenciaszintig, majd (S)-ketaminnal, illetve a fentebb említett vegyületekkel kezelték 36 órán keresztül, D-szerin alkalmazása nélkül (65). Ez a kísérleti elrendezés a fiziológias miliőben megvalósuló szabályozást hivatott vizsgálni, mely során a hosszútávú hatások befolyásoló szerepe is megjelenik az eredményekben. Ezzel szemben az általunk végzett akut kísérletben az (S)-ketamin közvetlen befolyásoló hatását vizsgáltuk a hozzáadott D-szerin felvételi folyamatára SH-SY5Y sejtvonalon, amely inkább a szinaptikus rés, asztrocita sejtek általi D-szerin "klírenszt" jelenségét modellezi. Vizsgálatunkban az (S)-ketamin nem gátolta az ASCT-2 transzporter D-szerin felvételét sem kompetitív, sem nem-kompetitív módon. Az általunk végzett 72 órás előkezelés, az (S)-ketamin hosszútávú hatását vizsgálta a D-szerin felvételére. A vegyület az SH-SY5Y asztrocita sejtmodellel a D-szerin transzportot nem befolyásolta, így elmondható, hogy az ASCT-2 transzporter gátlása feltételezhetően nem járul hozzá a (S)-ketaminhoz társított disszociatív mellékhatás kialakulásához. Ezt egészíti ki, hogy az (S)-ketamin aktív metabolitja, az (2S, 6S)-hidroxinorketamin sem befolyásolta az ASCT-2 transzporterrel játszó D-szerin szállítást (200).

6. Következtetések

A jelen munka során célul tűztük ki a D-serin mennyiségének *in vivo* és *in vitro* körülmények között történő vizsgálatát, illetve annak befolyásolási lehetőségeinek tanulmányozását. Elsőként egy újonnan fejlesztett DAAO gátló vegyület egereken történő tesztelését végeztük el. Ezt követően célunk volt az SH-SY5Y sejtvonal D-serin transzportjának részletes karakterizálása, illetve az asztrocita sejtekkel való összehasonlítása annak megállapítására, hogy a sejtvonal alkalmas-e az asztrociták D-serin transzportjának modellezésére. Végül az S-ketamin D-serin transzportot befolyásoló farmakológiai hatását vizsgáltuk meg.

- Az előzetes vizsgálatok alapján a 6-fluoro-1H-indazol-3-ol vegyület került kiválasztásra, hogy *in vivo* körülmények között teszteljük. Célunk volt az egerek plazma D-serin szintjében bekövetkező változás vizsgálata a DAAO gátló vegyület és D-serin együttes kezelés hatására. A kísérletünk eredménye alapján a 6-fluoro-1H-indazol-3-ol hatására szignifikánsan megemelkedett az állatok plazma D-serin koncentrációja. A hatás a kezelést követően már a 10. percben kialakult és a 60. percben is megtartott volt. Eredményeink a 6-fluoro-1H-indazol-3-ol *in vivo* DAAO gátló hatását igazolják.

Kísérleteinkben igazoltuk, hogy az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal alkalmas a D-serin transzport vizsgálatára. A folyamatot az asztrocita sejteken tapasztalható D-serin transzporttal hasonlítottuk össze és megállapítottuk, hogy:

- az SH-SY5Y sejtvonalon döntően Na^+ -függő D-serin transzport játszódik le, hasonlóan az asztrocita sejteknél tapasztaltakhoz. Az asztrocita sejtekre jellemző, Na^+ -függő, D-serin szállításban résztvevő transzporterek az ASCT-1 és az ASCT-2. Ezek működését igazolta a D-serin felvétel kinetikai vizsgálata mind az SH-SY5Y sejtvonalon, mind az asztrocita sejteken, amelyet a fehérjék Western blot módszerrel történő kimutatása is megerősített az SH-SY5Y sejtvonalon.
- A D-serin felvétel t-Pro által okozott kétlépcsős gátlása mind a két sejtípusban arra utal, hogy az ASCT-1 és ASCT-2 is részt vesz a D-serin szállításában.
- Kísérleteinkben az L-glutamin nem bizonyult az ASCT-2 transzporter preferált szubsztrátjának sem az SH-SY5Y, sem az asztrocita sejteken.
- Az általunk vizsgált valamennyi ASCT szubsztrát aminosav (L-alanin, L-treonin, t-Pro, L-glutamin) azonos karakterű gátlást eredményezett mind az SH-SY5Y, mind az asztrocita sejteken. A kísérletek során számolt IC_{50} értékek nem különböztek egymástól

a két sejttípus összehasonlításakor. Ezek az eredmények az SH-SY5Y sejtvonal asztrocita modellként való felhasználhatóságát támasztják alá.

Az SH-SY5Y asztrocita sejtmódellet további karakterizálást L-szerinnel végzett kísérletekkel végeztük el.

- Az L-szerin az L-alaninnal azonos, koncentrációfüggő, közel teljes gátlást eredményezett az SH-SY5Y sejtvonalon. A L-szerin kezelés hatására felszabaduló D-szerin megerősíti, hogy az SH-SY5Y sejtvonalon funkcionáló ASCT-1 és ASCT-2 cseretranszporterek, melyek szerepet játszanak az aminosavak felvétele mellett az aminosavak felszabadításában is.

Az S-ketamin D-szerin felvételre gyakorolt hatását az SH-SY5Y asztrocita sejtmódellet teszteltük.

- Az S-ketamin nem befolyásolja az asztrocita jellegű D-szerin transzportot az SH-SY5Y sejtvonalon sem akutan, sem hosszan tartó előkezelést követően.

A D-szerin extracelluláris mennyiségének befolyásolása ígéretes lehet számos központi idegrendszeri megbetegedés kapcsán. A téma leginkább vizsgált területe a DAAO enzim gátló vegyületek, azonban az igazi klinikai áttörésük még várat magára.

A másik támadási pont a D-szerin transzport lehet, melyben fontos szerepet játszanak az asztrocita sejtek a központi idegrendszerben. Eredményeink alapján az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonal alkalmas asztrocita módellet, amely egy egyszerűen alkalmazható, gyors és robusztus munkafolyamatot biztosít az asztrocita jellegű D-szerin transzport befolyásolhatóságának tanulmányozására, állatok feláldozása nélkül.

7. Összefoglalás

A D-szerin az NMDA receptoron ko-agonista tulajdonsággal rendelkezik. A megváltozott D-szerin koncentrációt számos központi idegrendszeri megbetegedésben leírták. A központi idegrendszeri D-szerin homeosztázis befolyásolási lehetőségei közül a legintenzívebben a DAAO enzim gátlását kutatták, azonban az utóbbi időben a D-szerin transzport esetleges befolyásolása is előtérbe került. A központi idegrendszerben a D-szerin transzportjában jelentős szerepet játszanak az asztrocita sejtek.

Kísérleteink során bizonyítottuk az újonnan fejlesztett 6-fluoro-1H-indazol-3-ol vegyület DAAO enzim gátló hatását *in vivo*. A D-szerinnel együtt adagolt vegyület szignifikánsan megemelte az egerek plazma D-szerin koncentrációját, összehasonlítva a DAAO gátlószerrel nem kapó csoporttal. Az előzetes eredmények biztatónak tekinthetők, további vizsgálatok szükségesek.

Az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal és asztrocita sejtek döntően Na⁺-függő D-szerin transzporttal rendelkeznek. A D-szerin felvétel kinetikai paraméterei jó egyezést mutatnak a két sejt típuson. Az asztrocita sejtekre jellemző, Na⁺-függő ASCT-1 és ASCT-2 transzporterek megtalálhatóak az SH-SY5Y sejteken az általunk végzett Western blot analízis alapján. A transzporterek preferált szubsztrátjaival végzett kísérleteink alapján az ASCT-1 és ASCT-2 is hozzájárul a D-szerin transzportjához. A transzporter szubsztrát aminosavak azonos karakterű gátlást eredményeztek a D-szerin felvételben a két sejt típus esetében. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az SH SY5Y neuroblasztóma sejtvonal alkalmas asztrocita modellnek tekinthető a D-szerin transzport vizsgálatára.

Az SH-SY5Y sejteken az L-szerin kezelés D-szerin felszabadulást eredményezett, ezzel igazolva a transzporterek csere-transzporterként való működését.

Az S-ketamin a D-szerin felvételét rövid és hosszútávú kezelés során sem befolyásolta az SH-SY5Y sejteken, így a korábban feltételezett disszociatív mellékhatása háttérben egyéb folyamatok feltételezhetőek.

Összességében elmondható, hogy az SH-SY5Y neuroblasztóma sejtvonal egy könnyen alkalmazható, egyszerű munkafolyamatot biztosító asztrocita modellnek tekinthető, amely megfelelő eszköze lehet vegyületek D-szerin transzportot befolyásoló hatásának gyors vizsgálatára.

8. Summary

D-serine acts as a co-agonist on the NMDA receptor. Altered D-serine concentrations have been observed in numerous central nervous system diseases. There are some alternative ways to regulate the D-serine homeostasis in the central nervous system. Supposedly the inhibition of the DAAO enzyme is most intensively investigated, however, alteration of D serine transport has also gained importance recently. In the central nervous system astrocytes play a relevant role in the transport of D-serine.

In our experiments, we demonstrated the DAAO enzyme inhibitory activity of the recently developed 6-fluoro-1H-indazol-3-ol molecule *in vivo*. The compound co-administered with D-serine significantly increased the plasma D-serine concentration in mice compared to the group not receiving the DAAO inhibitor. Preliminary results are encouraging, although further studies are needed.

The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line and astrocyte cells have predominantly Na⁺-dependent D-serine transport. The kinetic parameters of D-serine uptake are comparable in the two cell types. Na⁺-dependent ASCT-1 and ASCT-2 transporters characteristic of astrocytes are found on SH-SY5Y cells according to our Western blot analysis. Based on our experiments with the known amino acid substrates of these transporters, both ASCT-1 and ASCT-2 contribute to D-serine transport. The transporter substrate amino acids resulted in inhibition of D-serine uptake of the same character in the two cell types. According to the results we can assume that the SH-SY5Y neuroblastoma cell line can be considered as a suitable astrocyte model to study D-serine transport.

On SH-SY5Y cells, L-serine treatment resulted in D-serine release, also confirming the exchange function of the transporters.

S-ketamine did not affect D-serine uptake on SH-SY5Y cells during either short- or long-term treatment, suggesting other underlying mechanisms to be responsible for its previously suspected dissociative side effect.

Overall, the SH-SY5Y neuroblastoma cell line can be considered as an easy-to-use, simple astrocyte model that may be a suitable tool for the rapid screening of the effect of drugs on D-serine transport.

9. Irodalomjegyzék

1. Genchi G. (2017) An overview on D-amino acids. *Amino Acids*, 49: 1521-1533.
2. Corrigan JJ. (1969) D-amino acids in animals. *Science*, 164: 142-149.
3. Man EH, Bada JL. (1987) Dietary D-amino acids. *Annu Rev Nutr*, 7: 209-225.
4. Krebs HA. (1935) Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids. *Biochem J*, 29: 1620-1644.
5. Dunlop DS, Neidle A, McHale D, Dunlop DM, Lajtha A. (1986) The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem Biophys Res Commun*, 141: 27-32.
6. Nagata Y, Akino T, Ohno K, Kataoka Y, Ueda T, Sakurai T, Shiroshita K, Yasuda T. (1987) Free D-amino acids in human plasma in relation to senescence and renal diseases. *Clin Sci (Lond)*, 73: 105-108.
7. Fisher GH, D'Aniello A, Vetere A, Padula L, Cusano GP, Man EH. (1991) Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res Bull*, 26: 983-985.
8. Nagata Y, Masui R, Akino T. (1992) The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma. *Experientia*, 48: 986-988.
9. Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T, et al. (1993) Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J Neurochem*, 61: 348-351.
10. Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K. (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett*, 296: 33-36.
11. Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. (1995) Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery. *Eur J Neurosci*, 7: 1657-1663.
12. Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K. (1993) Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem*, 60: 783-786.
13. Fuchs SA, Berger R, Klomp LW, de Koning TJ. (2005) D-amino acids in the central nervous system in health and disease. *Mol Genet Metab*, 85: 168-180.
14. Dunlop DS, Neidle A. (1997) The origin and turnover of D-serine in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 235: 26-30.

15. Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 13409-13414.
16. Panizzutti R, De Miranda J, Ribeiro CS, Engelender S, Wolosker H. (2001) A new strategy to decrease N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coactivation: inhibition of D-serine synthesis by converting serine racemase into an eliminase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 5294-5299.
17. De Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H. (2002) Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 14542-14547.
18. Foltyn VN, Bendikov I, De Miranda J, Panizzutti R, Dumin E, Shleper M, Li P, Toney MD, Kartvelishvily E, Wolosker H. (2005) Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an alpha,beta-elimination activity. *J Biol Chem*, 280: 1754-1763.
19. Strísovský K, Jirásková J, Mikulová A, Rulíšek L, Konvalinka J. (2005) Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity dicarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the beta-eliminase activity. *Biochemistry*, 44: 13091-13100.
20. Dunlop DS, Neidle A. (2005) Regulation of serine racemase activity by amino acids. *Brain Res Mol Brain Res*, 133: 208-214.
21. Kim PM, Aizawa H, Kim PS, Huang AS, Wickramasinghe SR, Kashani AH, Barrow RK, Haganir RL, Ghosh A, Snyder SH. (2005) Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 2105-2110.
22. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH. (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*, 125: 775-784.
23. Stevens ER, Esguerra M, Kim PM, Newman EA, Snyder SH, Zahs KR, Miller RF. (2003) D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 6789-6794.
24. Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S. (2007) D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Embo j*, 26: 4149-4159.

25. Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN. (2008) D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *Febs j*, 275: 3514-3526.
26. Kartvelishvily E, Shleper M, Balan L, Dumin E, Wolosker H. (2006) Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 281: 14151-14162.
27. Rosenberg D, Kartvelishvily E, Shleper M, Klinker CM, Bowser MT, Wolosker H. (2010) Neuronal release of D-serine: a physiological pathway controlling extracellular D-serine concentration. *Faseb j*, 24: 2951-2961.
28. Ding X, Ma N, Nagahama M, Yamada K, Semba R. (2011) Localization of D-serine and serine racemase in neurons and neuroglia in mouse brain. *Neurol Sci*, 32: 263-267.
29. Yoshikawa M, Takayasu N, Hashimoto A, Sato Y, Tamaki R, Tsukamoto H, Kobayashi H, Noda S. (2007) The serine racemase mRNA is predominantly expressed in rat brain neurons. *Arch Histol Cytol*, 70: 127-134.
30. Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H. (2008) Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. *J Comp Neurol*, 510: 641-654.
31. Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 3948-3952.
32. Morikawa A, Hamase K, Inoue T, Konno R, Niwa A, Zaito K. (2001) Determination of free D-aspartic acid, D-serine and D-alanine in the brain of mutant mice lacking D-amino acid oxidase activity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 757: 119-125.
33. Burnet PW, Anderson PN, Chen L, Nikiforova N, Harrison PJ, Wood MJ. (2011) D-amino acid oxidase knockdown in the mouse cerebellum reduces NR2A mRNA. *Mol Cell Neurosci*, 46: 167-175.
34. Horiike K, Tojo H, Arai R, Nozaki M, Maeda T. (1994) D-amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: regional differentiation of astrocytes. *Brain Res*, 652: 297-303.
35. Kapoor R, Lim KS, Cheng A, Garrick T, Kapoor V. (2006) Preliminary evidence for a link between schizophrenia and NMDA-glycine site receptor ligand metabolic enzymes, d-amino acid oxidase (DAAO) and kynurenine aminotransferase-1 (KAT-1). *Brain Res*, 1106: 205-210.

36. Verrall L, Walker M, Rawlings N, Benzel I, Kew JN, Harrison PJ, Burnet PW. (2007) d-Amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *Eur J Neurosci*, 26: 1657-1669.
37. Madeira C, Freitas ME, Vargas-Lopes C, Wolosker H, Panizzutti R. (2008) Increased brain D-amino acid oxidase (DAAO) activity in schizophrenia. *Schizophr Res*, 101: 76-83.
38. Almond SL, Fradley RL, Armstrong EJ, Heavens RB, Rutter AR, Newman RJ, Chiu CS, Konno R, Hutson PH, Brandon NJ. (2006) Behavioral and biochemical characterization of a mutant mouse strain lacking D-amino acid oxidase activity and its implications for schizophrenia. *Mol Cell Neurosci*, 32: 324-334.
39. Bendikov I, Nadri C, Amar S, Panizzutti R, De Miranda J, Wolosker H, Agam G. (2007) A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophr Res*, 90: 41-51.
40. Moreno S, Nardacci R, Cimini A, Cerù MP. (1999) Immunocytochemical localization of D-amino acid oxidase in rat brain. *J Neurocytol*, 28: 169-185.
41. Momoi K, Fukui K, Tada M, Miyake Y. (1990) Gene expression of D-amino acid oxidase in rabbit kidney. *J Biochem*, 108: 406-413.
42. Pollegioni L, Sacchi S, Murtas G. (2018) Human D-Amino Acid Oxidase: Structure, Function, and Regulation. *Front Mol Biosci*, 5: 107.
43. Caldinelli L, Molla G, Sacchi S, Pilone MS, Pollegioni L. (2009) Relevance of weak flavin binding in human D-amino acid oxidase. *Protein Sci*, 18: 801-810.
44. Verrall L, Burnet PW, Betts JF, Harrison PJ. (2010) The neurobiology of D-amino acid oxidase and its involvement in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 15: 122-137.
45. Arnold G, Liscum L, Holtzman E. (1979) Ultrastructural localization of D-amino acid oxidase in microperoxisomes of the rat nervous system. *J Histochem Cytochem*, 27: 735-745.
46. Horiike K, Tojo H, Arai R, Yamano T, Nozaki M, Maeda T. (1987) Localization of D-amino acid oxidase in Bergmann glial cells and astrocytes of rat cerebellum. *Brain Res Bull*, 19: 587-596.
47. Sacchi S, Bernasconi M, Martineau M, Mothet JP, Ruzzene M, Pilone MS, Pollegioni L, Molla G. (2008) pLG72 modulates intracellular D-serine levels through its interaction with D-amino acid oxidase: effect on schizophrenia susceptibility. *J Biol Chem*, 283: 22244-22256.

48. Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M. (2013) The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, 34: 139-158.
49. Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, Cha SH, Endou H, Kanai Y. (2000) Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem*, 275: 9690-9698.
50. Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, Inatomi J, Shiokawa Y, Yamaguchi K, Saito I, Endou H, Kanai Y. (2000) Cloning and characterization of a human brain Na(+)-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett*, 287: 231-235.
51. Rosenberg D, Artoul S, Segal AC, Kolodney G, Radzishevsky I, Dikopoltsev E, Foltyn VN, Inoue R, Mori H, Billard JM, Wolosker H. (2013) Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J Neurosci*, 33: 3533-3544.
52. Billard JM, Freret T. (2018) Asc-1 transporter activation: an alternative to rescue age-related alterations in functional plasticity at rat hippocampal CA3/CA1 synapses. *J Neurochem*, 147: 514-525.
53. Maucler C, Pernot P, Vasylieva N, Pollegioni L, Marinesco S. (2013) In vivo D-serine hetero-exchange through alanine-serine-cysteine (ASC) transporters detected by microelectrode biosensors. *ACS Chem Neurosci*, 4: 772-781.
54. Helboe L, Egebjerg J, Møller M, Thomsen C. (2003) Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. *Eur J Neurosci*, 18: 2227-2238.
55. Matsuo H, Kanai Y, Tokunaga M, Nakata T, Chairoungdua A, Ishimine H, Tsukada S, Ooigawa H, Nawashiro H, Kobayashi Y, Fukuda J, Endou H. (2004) High affinity D- and L-serine transporter Asc-1: cloning and dendritic localization in the rat cerebral and cerebellar cortices. *Neurosci Lett*, 358: 123-126.
56. Shao Z, Kamboj A, Anderson CM. (2009) Functional and immunocytochemical characterization of D-serine transporters in cortical neuron and astrocyte cultures. *J Neurosci Res*, 87: 2520-2530.
57. Rutter AR, Fradley RL, Garrett EM, Chapman KL, Lawrence JM, Rosahl TW, Patel S. (2007) Evidence from gene knockout studies implicates Asc-1 as the primary transporter mediating d-serine reuptake in the mouse CNS. *Eur J Neurosci*, 25: 1757-1766.

58. Martineau M, Parpura V, Mothet JP. (2014) Cell-type specific mechanisms of D-serine uptake and release in the brain. *Front Synaptic Neurosci*, 6: 12.
59. Eulenburg V, Armsen W, Betz H, Gomeza J. (2005) Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci*, 30: 325-333.
60. Kanai Y, Cl  men  on B, Simonin A, Leuenberger M, Lochner M, Weisstanner M, Hediger MA. (2013) The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med*, 34: 108-120.
61. Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG. (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem*, 268: 15329-15332.
62. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem*, 271: 14883-14890.
63. Dun Y, Mysona B, Itagaki S, Martin-Studdard A, Ganapathy V, Smith SB. (2007) Functional and molecular analysis of D-serine transport in retinal M  ller cells. *Exp Eye Res*, 84: 191-199.
64. Foster AC, Farnsworth J, Lind GE, Li YX, Yang JY, Dang V, Penjwini M, Viswanath V, Staubli U, Kavanaugh MP. (2016) D-Serine Is a Substrate for Neutral Amino Acid Transporters ASCT1/SLC1A4 and ASCT2/SLC1A5, and Is Transported by Both Subtypes in Rat Hippocampal Astrocyte Cultures. *PLoS One*, 11: e0156551.
65. Singh NS, Bernier M, Camandola S, Khadeer MA, Moaddel R, Mattson MP, Wainer IW. (2015) Enantioselective inhibition of d-serine transport by (S)-ketamine. *Br J Pharmacol*, 172: 4546-4559.
66. Grewer C, Grabsch E. (2004) New inhibitors for the neutral amino acid transporter ASCT2 reveal its Na⁺-dependent anion leak. *J Physiol*, 557: 747-759.
67. Schulte ML, Khodadadi AB, Cuthbertson ML, Smith JA, Manning HC. (2016) 2-Amino-4-bis(aryloxybenzyl)aminobutanoic acids: A novel scaffold for inhibition of ASCT2-mediated glutamine transport. *Bioorg Med Chem Lett*, 26: 1044-1047.
68. Pinilla-Tenas J, Barber A, Lostao MP. (2003) Transport of proline and hydroxyproline by the neutral amino-acid exchanger ASCT1. *J Membr Biol*, 195: 27-32.
69. Kaplan E, Zubedat S, Radzishevsky I, Valenta AC, Rechnitz O, Sason H, Sajrawi C, Bodner O, Konno K, Esaki K, Derdikman D, Yoshikawa T, Watanabe M, Kennedy RT, Billard JM, Avital A, Wolosker H. (2018) ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic

- regulator of brain d-serine and neurodevelopment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: 9628-9633.
70. Weiss MD, Derazi S, Kilberg MS, Anderson KJ. (2001) Ontogeny and localization of the neutral amino acid transporter ASCT1 in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 130: 183-190.
 71. Foster AC, Rangel-Diaz N, Staubli U, Yang JY, Penjwini M, Viswanath V, Li YX. (2017) Phenylglycine analogs are inhibitors of the neutral amino acid transporters ASCT1 and ASCT2 and enhance NMDA receptor-mediated LTP in rat visual cortex slices. *Neuropharmacology*, 126: 70-83.
 72. Bröer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Bröer S. (1999) The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem*, 73: 2184-2194.
 73. Sakai K, Shimizu H, Koike T, Furuya S, Watanabe M. (2003) Neutral amino acid transporter ASCT1 is preferentially expressed in L-Ser-synthetic/storing glial cells in the mouse brain with transient expression in developing capillaries. *J Neurosci*, 23: 550-560.
 74. Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Torres-Zamorano V, Sinha S, Yang-Feng TL, Leibach FH, Ganapathy V. (1996) Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem*, 271: 18657-18661.
 75. Bröer S, Brookes N. (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem*, 77: 705-719.
 76. Wang J, Zhang K, Chen X, Liu X, Teng H, Zhao M, Sun Z. (2017) Epigenetic Activation of ASCT2 in the Hippocampus Contributes to Depression-Like Behavior by Regulating D-Serine in Mice. *Front Mol Neurosci*, 10: 139.
 77. Yamamoto T, Nishizaki I, Furuya S, Hirabayashi Y, Takahashi K, Okuyama S, Yamamoto H. (2003) Characterization of rapid and high-affinity uptake of L-serine in neurons and astrocytes in primary culture. *FEBS Lett*, 548: 69-73.
 78. Gliddon CM, Shao Z, LeMaistre JL, Anderson CM. (2009) Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *J Neurochem*, 108: 372-383.
 79. Ribeiro CS, Reis M, Panizzutti R, de Miranda J, Wolosker H. (2002) Glial transport of the neuromodulator D-serine. *Brain Res*, 929: 202-209.

80. Shafqat S, Tamarappoo BK, Kilberg MS, Puranam RS, McNamara JO, Guadaño-Ferraz A, Fremeau RT, Jr. (1993) Cloning and expression of a novel Na(+)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na⁺/glutamate cotransporters. *J Biol Chem*, 268: 15351-15355.
81. Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Verma N, Sabunciyar S, Yolken RH. (2007) Changes in region- and cell type-specific expression patterns of neutral amino acid transporter 1 (ASCT-1) in the anterior cingulate cortex and hippocampus in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *J Neural Transm (Vienna)*, 114: 261-271.
82. Wolosker H. (2011) Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1814: 1558-1566.
83. Ehmsen JT, Ma TM, Sason H, Rosenberg D, Ogo T, Furuya S, Snyder SH, Wolosker H. (2013) D-serine in glia and neurons derives from 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *J Neurosci*, 33: 12464-12469.
84. Howe JR, Colquhoun D, Cull-Candy SG. (1988) On the kinetics of large-conductance glutamate-receptor ion channels in rat cerebellar granule neurons. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 233: 407-422.
85. Paoletti P. (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*, 33: 1351-1365.
86. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415: 793-798.
87. Johnson JW, Ascher P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325: 529-531.
88. Kleckner NW, Dingledine R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241: 835-837.
89. Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K. (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem*, 65: 454-458.
90. Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 4926-4931.

91. Chen L, Muhlhauser M, Yang CR. (2003) Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J Neurophysiol*, 89: 691-703.
92. Diamond JS. (2006) Astrocytes put down the broom and pick up the baton. *Cell*, 125: 639-641.
93. Gustafson EC, Stevens ER, Wolosker H, Miller RF. (2007) Endogenous D-serine contributes to NMDA-receptor-mediated light-evoked responses in the vertebrate retina. *J Neurophysiol*, 98: 122-130.
94. Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH. (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, 150: 633-646.
95. Wake K, Yamazaki H, Hanzawa S, Konno R, Sakio H, Niwa A, Hori Y. (2001) Exaggerated responses to chronic nociceptive stimuli and enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *Neurosci Lett*, 297: 25-28.
96. Maekawa M, Watanabe M, Yamaguchi S, Konno R, Hori Y. (2005) Spatial learning and long-term potentiation of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase. *Neurosci Res*, 53: 34-38.
97. Schell MJ, Brady RO, Jr., Molliver ME, Snyder SH. (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci*, 17: 1604-1615.
98. Ahmadi S, Muth-Selbach U, Lauterbach A, Lipfert P, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. (2003) Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science*, 300: 2094-2097.
99. Wroblewski JT, Fadda E, Mazzetta J, Lazarewicz JW, Costa E. (1989) Glycine and D-serine act as positive modulators of signal transduction at N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, 28: 447-452.
100. Lazarewicz JW, Wroblewski JT, Palmer ME, Costa E. (1988) Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, 27: 765-769.
101. Vaccarino F, Guidotti A, Costa E. (1987) Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 8707-8711.

102. Szekely AM, Barbaccia ML, Costa E. (1987) Activation of specific glutamate receptor subtypes increases C-fos proto-oncogene expression in primary cultures of neonatal rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology*, 26: 1779-1782.
103. Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E. (1989) Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol*, 36: 106-112.
104. Bliss TV, Collingridge GL. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39.
105. Malenka RC, Nicoll RA. (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci*, 16: 521-527.
106. Kandel ER. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294: 1030-1038.
107. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*, 62: 405-496.
108. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 29: 365-402.
109. Hardingham GE, Bading H. (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 11: 682-696.
110. Paoletti P, Neyton J. (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7: 39-47.
111. Brito-Moreira J, Paula-Lima AC, Bomfim TR, Oliveira FB, Sepúlveda FJ, De Mello FG, Aguayo LG, Panizzutti R, Ferreira ST. (2011) A β oligomers induce glutamate release from hippocampal neurons. *Curr Alzheimer Res*, 8: 552-562.
112. Wu SZ, Bodles AM, Porter MM, Griffin WS, Basile AS, Barger SW. (2004) Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *J Neuroinflammation*, 1: 2.
113. Wu S, Basile AS, Barger SW. (2007) Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by secreted amyloid precursor protein (sAPP). *Curr Alzheimer Res*, 4: 243-251.
114. Hashimoto K, Engberg G, Shimizu E, Nordin C, Lindström LH, Iyo M. (2005) Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29: 767-769.

115. Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Hasegawa H, Imai K, Iyo M. (2003) 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.
116. Gelfin E, Kaufman Y, Korn-Lubetzki I, Bloch B, Kremer I, Javitt DC, Heresco-Levy U. (2012) D-serine adjuvant treatment alleviates behavioural and motor symptoms in Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15: 543-549.
117. Löscher W, Wlaź P, Rundfeldt C, Baran H, Hönack D. (1994) 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.
118. Liu YH, Wang L, Wei LC, Huang YG, Chen LW. (2009) 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.
119. Peterson SL. (1991) Anticonvulsant drug potentiation by glycine in maximal electroshock seizures is mimicked by D-serine and antagonized by 7-chlorokynurenic acid. *Eur J Pharmacol*, 199: 341-348.
120. Bardaweel SK, Alzweiri M, Ishaqat AA. (2014) D-Serine in neurobiology: CNS neurotransmission and neuromodulation. *Can J Neurol Sci*, 41: 164-176.
121. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264: 1772-1775.
122. Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT. (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 28: 18-25.
123. Fuchs SA, Berger R, de Koning TJ. (2011) D-serine: the right or wrong isoform? *Brain Res*, 1401: 104-117.
124. Mitchell J, Paul P, Chen HJ, Morris A, Payling M, Falchi M, Habgood J, Panoutsou S, Winkler S, Tisato V, Hajitou A, Smith B, Vance C, Shaw C, Mazarakis ND, de Belleruche J. (2010) Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 7556-7561.

125. Kondori NR, Paul P, Robbins JP, Liu K, Hildyard JCW, Wells DJ, de Belleruche JS. (2018) Focus on the Role of D-serine and D-amino Acid Oxidase in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease (ALS). *Front Mol Biosci*, 5: 8.
126. Olney JW, Wozniak DF, Farber NB. (1997) Excitotoxic neurodegeneration in Alzheimer disease. New hypothesis and new therapeutic strategies. *Arch Neurol*, 54: 1234-1240.
127. Suh YH, Checler F. (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev*, 54: 469-525.
128. Inoue R, Hashimoto K, Harai T, Mori H. (2008) NMDA- and beta-amyloid1-42-induced neurotoxicity is attenuated in serine racemase knock-out mice. *J Neurosci*, 28: 14486-14491.
129. Nagata Y, Borghi M, Fisher GH, D'Aniello A. (1995) Free D-serine concentration in normal and Alzheimer human brain. *Brain Res Bull*, 38: 181-183.
130. Kumashiro S, Hashimoto A, Nishikawa T. (1995) Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases. *Brain Res*, 681: 117-125.
131. Chouinard ML, Gaitan D, Wood PL. (1993) Presence of the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor agonist, D-serine, in human temporal cortex: comparison of normal, Parkinson, and Alzheimer tissues. *J Neurochem*, 61: 1561-1564.
132. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ. (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 348: 1333-1341.
133. Lipina T, Labrie V, Weiner I, Roder J. (2005) Modulators of the glycine site on NMDA receptors, D-serine and ALX 5407, display similar beneficial effects to clozapine in mouse models of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 179: 54-67.
134. Javitt DC, Zukin SR. (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 148: 1301-1308.
135. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS. (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*, 51: 199-214.
136. Yee BK, Chang DL, Feldon J. (2004) The Effects of dizocilpine and phencyclidine on prepulse inhibition of the acoustic startle reflex and on prepulse-elicited reactivity in C57BL6 mice. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1865-1877.

137. Mandillo S, Rinaldi A, Oliverio A, Mele A. (2003) Repeated administration of phencyclidine, amphetamine and MK-801 selectively impairs spatial learning in mice: a possible model of psychotomimetic drug-induced cognitive deficits. *Behav Pharmacol*, 14: 533-544.
138. Bubeníková-Valesová V, Horáček J, Vrajová M, Höschl C. (2008) Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, 32: 1014-1023.
139. Calcia MA, Madeira C, Alheira FV, Silva TC, Tannos FM, Vargas-Lopes C, Goldenstein N, Brasil MA, Ferreira ST, Panizzutti R. (2012) Plasma levels of D-serine in Brazilian individuals with schizophrenia. *Schizophr Res*, 142: 83-87.
140. Hashimoto A, Yoshikawa M, Niwa A, Konno R. (2005) Mice lacking D-amino acid oxidase activity display marked attenuation of stereotypy and ataxia induced by MK-801. *Brain Res*, 1033: 210-215.
141. Habl G, Zink M, Petroianu G, Bauer M, Schneider-Axmann T, von Wilmsdorff M, Falkai P, Henn FA, Schmitt A. (2009) Increased D-amino acid oxidase expression in the bilateral hippocampal CA4 of schizophrenic patients: a post-mortem study. *J Neural Transm (Vienna)*, 116: 1657-1665.
142. Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JP, Kavvoura FK, Khoury MJ, Tanzi RE, Bertram L. (2008) Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet*, 40: 827-834.
143. Shi J, Gershon ES, Liu C. (2008) Genetic associations with schizophrenia: meta-analyses of 12 candidate genes. *Schizophr Res*, 104: 96-107.
144. Sun J, Kuo PH, Riley BP, Kendler KS, Zhao Z. (2008) Candidate genes for schizophrenia: a survey of association studies and gene ranking. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147b: 1173-1181.
145. Burnet PW, Eastwood SL, Bristow GC, Godlewska BR, Sikka P, Walker M, Harrison PJ. (2008) D-amino acid oxidase activity and expression are increased in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 13: 658-660.
146. Labrie V, Fukumura R, Rastogi A, Fick LJ, Wang W, Boutros PC, Kennedy JL, Semeralul MO, Lee FH, Baker GB, Belsham DD, Barger SW, Gondo Y, Wong AH, Roder JC. (2009) Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. *Hum Mol Genet*, 18: 3227-3243.
147. Basu AC, Tsai GE, Ma CL, Ehmsen JT, Mustafa AK, Han L, Jiang ZI, Benneyworth MA, Froimowitz MP, Lange N, Snyder SH, Bergeron R, Coyle JT. (2009) Targeted

- disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Mol Psychiatry*, 14: 719-727.
148. Coyle JT, Tsai G, Goff DC. (2002) Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets in schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 1: 183-189.
 149. Javitt DC. (2006) Is the glycine site half saturated or half unsaturated? Effects of glutamatergic drugs in schizophrenia patients. *Curr Opin Psychiatry*, 19: 151-157.
 150. Kantrowitz JT, Malhotra AK, Cornblatt B, Silipo G, Balla A, Suckow RF, D'Souza C, Saksa J, Woods SW, Javitt DC. (2010) High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res*, 121: 125-130.
 151. Ganote CE, Peterson DR, Carone FA. (1974) The nature of D-serine--induced nephrotoxicity. *Am J Pathol*, 77: 269-282.
 152. Krug AW, Völker K, Dantzler WH, Silbernagl S. (2007) Why is D-serine nephrotoxic and alpha-aminoisobutyric acid protective? *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: F382-390.
 153. Adage T, Trillat AC, Quattropiani A, Perrin D, Cavarec L, Shaw J, Guerassimenko O, Giachetti C, Gréco B, Chumakov I, Halazy S, Roach A, Zaratin P. (2008) In vitro and in vivo pharmacological profile of AS057278, a selective d-amino acid oxidase inhibitor with potential anti-psychotic properties. *Eur Neuropsychopharmacol*, 18: 200-214.
 154. Smith SM, Uslaner JM, Yao L, Mullins CM, Surlles NO, Huszar SL, McNaughton CH, Pascarella DM, Kandebo M, Hinchliffe RM, Sparey T, Brandon NJ, Jones B, Venkatraman S, Young MB, Sachs N, Jacobson MA, Hutson PH. (2009) The behavioral and neurochemical effects of a novel D-amino acid oxidase inhibitor compound 8 [4H-thieno [3,2-b]pyrrole-5-carboxylic acid] and D-serine. *J Pharmacol Exp Ther*, 328: 921-930.
 155. Rojas C, Alt J, Ator NA, Thomas AG, Wu Y, Hin N, Wozniak K, Ferraris D, Rais R, Tsukamoto T, Slusher BS. (2016) D-Amino-Acid Oxidase Inhibition Increases D-Serine Plasma Levels in Mouse But not in Monkey or Dog. *Neuropsychopharmacology*, 41: 1610-1619.
 156. Vanoni MA, Cosma A, Mazzeo D, Mattevi A, Todone F, Curti B. (1997) Limited proteolysis and X-ray crystallography reveal the origin of substrate specificity and of the rate-limiting product release during oxidation of D-amino acids catalyzed by mammalian D-amino acid oxidase. *Biochemistry*, 36: 5624-5632.

157. Popiolek M, Tierney B, Steyn SJ, DeVivo M. (2018) Lack of Effect of Sodium Benzoate at Reported Clinical Therapeutic Concentration on d-Alanine Metabolism in Dogs. *ACS Chem Neurosci*, 9: 2832-2837.
158. Misel ML, Gish RG, Patton H, Mendler M. (2013) Sodium benzoate for treatment of hepatic encephalopathy. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 9: 219-227.
159. Batshaw ML, Hyman SL, Coyle JT, Robinson MB, Qureshi IA, Mellits ED, Quaskey S. (1988) Effect of sodium benzoate and sodium phenylacetate on brain serotonin turnover in the ornithine transcarbamylase-deficient sparse-fur mouse. *Pediatr Res*, 23: 368-374.
160. Lin CH, Lin CH, Chang YC, Huang YJ, Chen PW, Yang HT, Lane HY. (2018) Sodium Benzoate, a D-Amino Acid Oxidase Inhibitor, Added to Clozapine for the Treatment of Schizophrenia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Biol Psychiatry*, 84: 422-432.
161. Lane HY, Lin CH, Green MF, Hellemann G, Huang CC, Chen PW, Tun R, Chang YC, Tsai GE. (2013) Add-on treatment of benzoate for schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of D-amino acid oxidase inhibitor. *JAMA Psychiatry*, 70: 1267-1275.
162. Braak H, Braak E. (2000) Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol*, 247 Suppl 2: Ii3-10.
163. Starr MS. (1998) Antagonists of glutamate in the treatment of Parkinson's disease: from laboratory to the clinic. *Amino Acids*, 14: 41-42.
164. Hallett PJ, Standaert DG. (2004) Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther*, 102: 155-174.
165. Crosby NJ, Deane KH, Clarke CE. (2003) Amantadine for dyskinesia in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev*: Cd003467.
166. Del Dotto P, Pavese N, Gambaccini G, Bernardini S, Metman LV, Chase TN, Bonuccelli U. (2001) Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. *Mov Disord*, 16: 515-520.
167. Verhagen Metman L, Blanchet PJ, van den Munckhof P, Del Dotto P, Natté R, Chase TN. (1998) A trial of dextromethorphan in parkinsonian patients with motor response complications. *Mov Disord*, 13: 414-417.
168. Belmaker RH, Agam G. (2008) Major depressive disorder. *N Engl J Med*, 358: 55-68.
169. Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, Tomita H, Li JZ, Vawter MP, Myers RM, Bunney WE, Jr., Akil H, Watson SJ, Jones EG. (2005) Altered cortical glutamatergic and

- GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15653-15658.
170. Malkesman O, Austin DR, Tragon T, Wang G, Rompala G, Hamidi AB, Cui Z, Young WS, Nakazawa K, Zarate CA, Manji HK, Chen G. (2012) Acute D-serine treatment produces antidepressant-like effects in rodents. *Int J Neuropsychopharmacol*, 15: 1135-1148.
 171. McCullumsmith RE, Kristiansen LV, Beneyto M, Scarr E, Dean B, Meador-Woodruff JH. (2007) Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res*, 1127: 108-118.
 172. Nudmamud-Thanoi S, Reynolds GP. (2004) The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. *Neurosci Lett*, 372: 173-177.
 173. De Sarro G, Trimarchi GR, Sinopoli S, Masuda Y, De Sarro A. (1993) Anticonvulsant effects of U-54494A and U-50488H in genetically epilepsy-prone rats and DBA/2 mice: a possible involvement of glycine/NMDA receptor complex. *Gen Pharmacol*, 24: 439-447.
 174. Peterson SL. (1995) Infusion of NMDA antagonists into the nucleus reticularis pontis oralis inhibits the maximal electroshock seizure response. *Brain Res*, 702: 101-109.
 175. Ryu HJ, Kim JE, Yeo SI, Kim DS, Kwon OS, Choi SY, Kang TC. (2010) Potential roles of D-serine and serine racemase in experimental temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res*, 88: 2469-2482.
 176. Fuchs SA, Dorland L, de Sain-van der Velden MG, Hendriks M, Klomp LW, Berger R, de Koning TJ. (2006) D-serine in the developing human central nervous system. *Ann Neurol*, 60: 476-480.
 177. Lee NY, Kim Y, Ryu H, Kang YS. (2017) The alteration of serine transporter activity in a cell line model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochem Biophys Res Commun*, 483: 135-141.
 178. Kudryavtseva NN, Bakshtanovskaya IV, Koryakina LA. (1991) Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol Biochem Behav*, 38: 315-320.
 179. Li YX, Yang JY, Alcantara M, Abelian G, Kulkarni A, Staubli U, Foster AC. (2018) Inhibitors of the Neutral Amino Acid Transporters ASCT1 and ASCT2 Are Effective in In Vivo Models of Schizophrenia and Visual Dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, 367: 292-301.

180. Bennett PJ, Hoff M, Rosenthal J, Zhao M, Coon H, Myles-Worsley M, Byerley WF. (2000) Mutation screening of a neutral amino acid transporter, ASCT1, and its potential role in schizophrenia. *Psychiatr Genet*, 10: 79-82.
181. Jakó T, Szabó E, Tábi T, Zachar G, Csillag A, Szökő E. (2014) Chiral analysis of amino acid neurotransmitters and neuromodulators in mouse brain by CE-LIF. *Electrophoresis*, 35: 2870-2876.
182. Hjertén S, Kiessling-Johansson M. (1991) High-performance displacement electrophoresis in 0.025- to 0.050-mm capillaries coated with a polymer to suppress adsorption and electroendosmosis. *Journal of Chromatography A*, 550: 811-822.
183. Mecha M. (2011) An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protocol Exchange*.
184. Bionumber. Size of SH-SY5Y cell line and primary astrocytes. 2020.
185. Zerangue N, Kavanaugh MP. (1996) ASCT-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity. *J Biol Chem*, 271: 27991-27994.
186. Szilagyi B, Kovacs P, Ferenczy GG, Racz A, Nemeth K, Visy J, Szabo P, Ilas J, Balogh GT, Monostory K, Vincze I, Tabi T, Szoko E, Keseru GM. (2018) Discovery of isatin and 1H-indazol-3-ol derivatives as d-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 26: 1579-1587.
187. Szilagyi B, Ferenczy GG, Keseru GM. (2018) Drug discovery strategies and the preclinical development of D-amino-acid oxidase inhibitors as antipsychotic therapies. *Expert Opin Drug Discov*, 13: 973-982.
188. Ferraris D, Duvall B, Ko YS, Thomas AG, Rojas C, Majer P, Hashimoto K, Tsukamoto T. (2008) Synthesis and biological evaluation of D-amino acid oxidase inhibitors. *J Med Chem*, 51: 3357-3359.
189. Berry JF, Ferraris DV, Duvall B, Hin N, Rais R, Alt J, Thomas AG, Rojas C, Hashimoto K, Slusher BS, Tsukamoto T. (2012) Synthesis and SAR of 1-hydroxy-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-ones as Inhibitors of D-Amino Acid Oxidase. *ACS Med Chem Lett*, 3: 839-843.
190. Duplantier AJ, Becker SL, Bohanon MJ, Borzilleri KA, Chrnyk BA, Downs JT, Hu LY, El-Kattan A, James LC, Liu S, Lu J, Maklad N, Mansour MN, Mente S, Piotrowski MA, Sakya SM, Sheehan S, Steyn SJ, Strick CA, Williams VA, Zhang L. (2009) Discovery, SAR, and pharmacokinetics of a novel 3-hydroxyquinolin-2(1H)-one series of potent D-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors. *J Med Chem*, 52: 3576-3585.

191. Hashimoto K, Fujita Y, Horio M, Kunitachi S, Iyo M, Ferraris D, Tsukamoto T. (2009) Co-administration of a D-amino acid oxidase inhibitor potentiates the efficacy of D-serine in attenuating prepulse inhibition deficits after administration of dizocilpine. *Biol Psychiatry*, 65: 1103-1106.
192. Dolińska M, Dybel A, Zabłocka B, Albrecht J. (2003) Glutamine transport in C6 glioma cells shows ASCT2 system characteristics. *Neurochem Int*, 43: 501-507.
193. Wasa M, Wang HS, Okada A. (2002) Characterization of L-glutamine transport by a human neuroblastoma cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282: C1246-1253.
194. Hayashi F, Takahashi K, Nishikawa T. (1997) Uptake of D- and L-serine in C6 glioma cells. *Neurosci Lett*, 239: 85-88.
195. Avissar NE, Ryan CK, Ganapathy V, Sax HC. (2001) Na(+)-dependent neutral amino acid transporter ATB(0) is a rabbit epithelial cell brush-border protein. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281: C963-971.
196. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, 47: 351-354.
197. Yang C, Yang J, Luo A, Hashimoto K. (2019) Molecular and cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine enantiomers and its metabolites. *Translational Psychiatry*, 9.
198. Hashimoto K, Kakiuchi T, Ohba H, Nishiyama S, Tsukada H. (2017) Reduction of dopamine D2/3 receptor binding in the striatum after a single administration of esketamine, but not R-ketamine: a PET study in conscious monkeys. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 267: 173-176.
199. Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate CA, Jr., Gould TD. (2016) NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, 533: 481-486.
200. Singh NS, Rutkowska E, Plazinska A, Khadeer M, Moaddel R, Jozwiak K, Bernier M, Wainer IW. (2016) Ketamine Metabolites Enantioselectively Decrease Intracellular D-Serine Concentrations in PC-12 Cells. *PLoS One*, 11: e0149499.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Vincze I**, Lakatos PP, Bagaméry F, Tábi T, Szökő É
Characterization of a Cell Line Model for d-Serine Uptake.
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS
Kötet: 187, oldalak: 113360, 2020, doi:10.1016/j.jpba.2020.113360
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 3,209 (2019)
2. Lakatos PP, **Vincze I**, Nyariki N, Bagaméry F, Tábi T, Szökő É
The effect of L-theanine and S-ketamine on D-serine cellular uptake
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS
Kötet: 1868, oldalak: 140473, 2020, doi:10.1016/j.bbapap.2020.140473
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 2,371 (2019)
3. Szilagyi B, Kovacs P, Ferenczy GG, Racz A, Nemeth K, Visy J, Szabo P, Ilas J, Balogh GT, Monostory K, **Vincze I**, Tábi T, Szökő É, Keserű MGY
Discovery of isatin and 1H-indazol-3-ol derivatives as d-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors
BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY
Kötet: 26, oldal: 1579-1587., 2018, doi:10.1016/j.bmc.2018.02.004
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 2,802

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

1. Bagaméry F, Varga K, Kecsmár K, **Vincze I**, Szökő É, Tábi T
The Impact of Differentiation on Cytotoxicity and Insulin Sensitivity in Streptozotocin Treated SH-SY5Y Cells
NEUROCHEMICAL RESEARCH
Kötet: 46, oldal: 1350-1358., 2021, doi:10.1007/s11064-021-03269-2
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 3,038 (2019)
2. **Vincze I**, Rudge J, Vasarhelyi B, Karvaly GB
Analysis of 14 drugs in dried blood microsamples in a single workflow using whole blood and serum calibrators
BIOANALYSIS
Kötet: 12, oldal:1243-1261., 2020, doi:10.4155/bio-2020-0179
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 2,371 (2019)
3. Karvaly, GB, Neely M, Kovács K, **Vincze I**, Vásárhelyi B, Jelliffe RW
Development of a methodology to make individual estimates of the precision of liquid chromatography-tandem mass spectrometry drug assay results for use in population pharmacokinetic modeling and the optimization of dosage regimens
PLOS ONE
Kötet: 15, oldalak: e0229873, 2020, doi:10.1371/journal.pone.0229873
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 2,740
4. Bagaméry F, Varga K, Kecsmár K, **Vincze I**, Szökő É, Tábi T
Lack of insulin resistance in response to streptozotocin treatment in neuronal SHSY5Y cell line
JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION
Kötet: 127, oldal: 71-80., 2020, doi:10.1007/s00702-019-02118-5
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 3,505 (2019)

5. Zachar G, Jakó T, **Vincze I**, Wagner Zs, Tábi T, Bálint E, Mezey Sz, Szökő É, Csillag A
Age-related and function-dependent regional alterations of free L- and D-aspartate in postembryonic chick brain
ACTA BIOLOGICA HUNGARICA
Kötet: 69, oldal: 1-15., 2018, doi:10.1556/018.68.2018.1.1
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 0,679

6. Szökő É, **Vincze I**, Tábi T
Chiral separations for d-amino acid analysis in biological samples
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS
Kötet: 130, oldal: 100-109., 2016, doi:10.1016/j.jpba.2016.06.054
Folyóiratcikk/Összefoglaló cikk/Tudományos
IF: 3,255

8. Ulakcsai Zs, Bagamery F, **Vincze I**, Szökő É, Tábi T
Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts.
CROATIAN MEDICAL JOURNAL
Kötet: 56, oldal: 78-84., 2015, doi:10.3325/cmj.2015.56.78
Folyóiratcikk/Szakcikk/Tudományos
IF: 1,483

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Szökő Éva** professzor asszonynak, aki rengeteg segítséget nyújtott a kísérletek tervezésében, az eredmények értékelésében, a publikáció során és a disszertáció megírásánál egyaránt. Külön köszönöm a **Tanárnó** támogatását és bátorítását a mindennapos közös munka megszűnését követően is.

Köszönettel tartozom még **Dr. Tábi Tamás** egyetemi docens úrnak, a Gyógyszerhatástani Intézet igazgatójának, aki gyakorlati tanácsaival nagyban segített a megfelelő tudományos szemléletmód kialakításában.

Továbbá köszönettel tartozom **Dr. Bagdy György** professzor úrnak, a Gyógyszerhatástani Intézet korábbi igazgatójának, hogy az intézetben végzett kutatómunkámat lehetővé tette.

Nagyon köszönöm **Dr. Bagaméry Fruzsina** feleségemnek és kolléganőmnek a sok segítséget, amelyet az *in vitro* kísérletekben kaptam tőle, illetve a hatalmas lelki támogatást a disszertáció megírása során. Köszönettel tartozom **Dr. Lakatos Péter** kollégámnak a tudományos munka során nyújtott gyakorlati segítségért, együttműködésért.

Szeretnék köszönetet mondani a **Gyógyszerhatástani Intézet** további munkatársainak a segítségükért és a folyamatos támogatásukért. Köszönöm, hogy munkámat színvonalas környezetben és remek légkörben végezhettem.

Természetesen köszönettel tartozom még a családomnak, barátaimnak, akik végig támogattak és bátorítottak a tudományos munkám során.