

STAVBA A FUNKCE NMDA RECEPTORU U SCHIZOFRENIE: OD ANIMÁLNÍCH MODELŮ K PACIENTOVI

COMPOSITION AND FUNCTION OF NMDA RECEPTOR IN SCHIZOPHRENIA: FROM ANIMAL MODELS TO A PATIENT

FRANTIŠEK ŠTASTNÝ^{1,2}, MONIKA VRAJOVÁ^{1,2}, HANA TEJKALOVÁ^{1,2},
SOŇA PEKOVÁ^{4,6}, VLADISLAV MAREŠ^{3,7}, IRYNA KOZMIKOVÁ⁴, JANA JIRÁSKOVÁ^{5,8},
CYRIL HÖSCHL^{1,2}, VLADIMÍR J. BALCAR⁹

¹Centrum neuropsychiatrických studií, Praha,

²Psychiatrické centrum Praha – 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy,

³Fyziologický ústav, ⁴Ústav molekulární genetiky a ⁵Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha

⁶Laboratoř DNA diagnostiky, Nemocnice Na Homolce, Praha,

⁷Přírodovědecká fakulta J. E. Purkyně, Ústí nad Labem,

⁸Přírodovědecká fakulta UK, Praha, Česká republika;

⁹Anatomy and Histology, Institute of Biomedical Research and School of Medicine,
The University of Sydney, NSW 2006, Australia

SOUHRN

NMDA receptory jsou široce rozšířené, ligandy otevírané a napěťově závislé iontové kanály, citlivé současně na L-glutamát a glycin. Tyto receptory jsou nezbytné pro normální funkci excitační glutamatergní neurotransmise. Komplexy receptor/iontový kanál jsou vysoce propustné pro Ca²⁺ a podléhají regulaci prostřednictvím řady faktorů. NMDA receptory charakterizuje tetramerní podjednotková stavba, na které se podílejí 3 skupiny podjednotek označované NR1, NR2 a NR3. Všechny funkční receptorové komplexy musí obsahovat dvojnásobné zastoupení NR1 podjednotky. Současná přítomnost NR2 a NR3 podjednotek nebo jejich sestřížených forem zásadním způsobem ovlivňuje funkční charakteristiky NMDA receptoru, jeho vazebné afinity pro oba agonisty (L-glutamát a glycin) a další modulátory. Změněná funkce NMDA receptorů je dávana do souvislosti s etiologií některých duševních nemocí, především jako součást „glutamatergní hypotézy schizofrenie“. Změny ve funkčních vlastnostech NMDA receptorů jsou alespoň částečně podmíněny abnormální expresí genů pro jednotlivé proteinové podjednotky. Navíc se NMDA receptory významně podílejí na perinatálním neurotoxickém poškození mozku, které je integrální součástí „neurovývojové hypotézy schizofrenie“. Přitom nedávné nálezy ukázaly, že D-serin jako další endogenní koagonista NMDA receptorů se v případě narušení své homeostázy významně spolupodílí na patofyziologii schizofrenie.

Předpokládaná úloha NMDA receptorů v etiopatogenezi schizofrenie, vycházející z jejich zásadního významu pro vývoj mozku a rozvoj jeho funkcí, činí z těchto receptorů cílovou strukturu pro působení farmak. Proto pokračování studií za použití animálních modelů a kombinace genetických studií a zobrazovacích metod u pacientů trpících schizofrenií může významně přispět při vyhledávání a ověřování nových skupin neuroleptik.

Klíčová slova: glutamát, glycin, D-serin, NMDA receptor, podjednotky NR1/NR2/NR3, animální model, schizofrenie

SUMMARY

NMDA receptors are widely distributed, rapidly responding ligand-gated and voltage-dependent cationic channels sensitive to L-glutamate and glycine. The NMDA receptors are essential for the normal function of the excitatory glutamatergic neurotransmission. The receptor/channel complexes are highly permeable to Ca²⁺ and are subject to regulation by a variety of factors. Usually present as tetramers of protein subunits, NMDA receptors are formed by NR1, NR2 and/or NR3 subunits; however, all functional complexes must include NR1 subunits. The presence of NR2 and NR3 subunits and/or the nature of their splice variants may influence a range of NMDA receptor characteristics such as binding affinities for glutamate and glycine. Altered function of NMDA receptors has been linked to the etiology of mental disease, particularly as a part of the “glutamatergic hypothesis of schizophrenia”. The functional changes in NMDA receptors could result from genetically determined variations in individual protein subunits or from their abnormal expression. In addition, NMDA receptors can mediate perinatal neurotoxic insults such as those postulated in the “developmental hypothesis of schizophrenia”. D-Serine is another endogenous co-agonist at NMDA receptors and recent evidence suggests that disturbances in D-serine homeostasis may also contribute to mechanisms of schizophrenia.

Putative involvement of NMDA receptors in schizophrenia, their crucial role in the normal brain function and the complex but extensively studied nature of their regulation makes NMDA receptors promising targets for drugs. Additional investigations using either animal models or combination of genetic studies and imaging techniques in human patients in vivo would greatly aid the development of novel classes of neuroleptics.

Key words: glutamate, glycine, D-serine, NMDA receptor, NR1/NR2/NR3 subunits, animal model, schizophrenia

Štastný F, Vrajová M, Tejkalová H, Peková S, Mareš V, Kozmiková I, Jirásková J, Höschl C, Balcar V. Stavba a funkce NMDA receptoru u schizofrenie: od animálních modelů k pacientovi. Psychiatrie 2006; 10 (Supl. 2): 7–14

Úvod

Glutamátová hypotéza schizofrenie si od doby svého vzniku před více než 25 lety (Kim et al., 1980) získávala stále větší pozornost, a to jak v základním, tak i v preklinicky orientovaném výzkumu (pro přehled viz Šťastný et al., 2002 a 2004; Bubeníková, 2005; Šťastný a Peková, 2005). Přitom již o 25 let dříve byl prokázán excitační účinek glutamátu (Hayashi, 1954), ale teprve v r. 1981 byl zařazen mezi tzv. rychlé mediátory synaptického přenosu (Watkins a Evans, 1981). Ukázalo se, že kvantitativně řízený výdej glutamátu jedním neuronem a jeho receptorem zprostředkovaný průkaz druhým neuronem tvoří základ synaptického přenosu na většinu z odhadovaných 10^{14} synapsí přítomných v lidském mozku. Glutamátové synaptické signalizaci propůjčuje specifická skupina genů kódujících jednotlivé typy a podtypy glutamátových receptorů. Pozdější klonování genů glutamátových receptorů a analýza proteinů kódujících těmito geny usnadnila zařazení *N*-metyl-D-aspartátového receptoru (NMDA-R) do podskupiny glutamátových receptorů, jejichž aktivace je spojena s napěťově závislou vodivostí povrchové membrány. NMDA-R, jako ligandem otevíraný iontový kanál, je vedle monovalentních kationtů (Na^+ a K^+) vysoce propustný i pro ionty vápníku (Ca^{2+}). Jeho propustnost je asi 50krát větší než propustnost acetylcholinového receptoru a podílí se proto i na membránové polaritě nervové buňky. NMDA-R je dále neobvyklý tím, že ke své aktivaci potřebuje vazbu dvou různých ligandů (agonistů), a to glutamátu (GLU) a glycinu (GLY). Napěťová závislost funkční aktivity tohoto receptorem řízeného iontového kanálu je dána uvolněním Mg^{2+} z vazebného místa uvnitř iontového kanálu do zevního prostředí, což v roce 1984 nezávisle na sobě popsaly dvě skupiny pracovníků (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Uvolnění Mg^{2+} umožňuje iniciální částečná depolarizace povrchové membrány zajišťovaná aktivací non-NMDA receptoru AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazol propionová kyselina)-typu, který je s NMDA-R společně přítomen v post-synaptické membráně (blíže viz Bubeníková, 2005).

Kromě napěťově závislé blokády iontového kanálu ionty Mg^{2+} charakterizuje NMDA-R především jeho vysoká propustnost pro Ca^{2+} . Aktivace tohoto receptoru přispívá ke zvýšení nitrobuňkové koncentrace Ca^{2+} , která zajišťuje dvě další na NMDA-R závislé funkce, jakými jsou:

- 1) na jeho aktivitě závislá synaptická plasticita, a
- 2) jeho akumulací podmíněná neuronální smrt.

Fyziologicky zvýšená hladina Ca^{2+}_i (do 150 nM) úzce souvisí s fenoménem dlouhodobé potenciace (LTP - „long-term potentiation“). LTP se považuje za základ procesu učení a paměti (Collingridge a Bliss, 1987). Akumulace Ca^{2+} v cytoplazmě neuronů, která nepřevyšuje 300 nM, se významně spolupodílí na vývoji centrálního nervového systému (CNS), neboť se účastní morfogenetických procesů, jakými jsou migrace neuronů, jejich cytodiferenciace, tvorba dendritů a synaptických spojení vedoucích ke vzniku neuronální sítě. Přetrvává-li však hladina Ca^{2+}_i na úrovni 500 nM nebo i vyšší koncentrace, nastává funkční přetížení neuronu, provázené aktivací Ca^{2+} -dependentních kináz, proteáz a lipáz a nadprodukcí volných O_2 radikálů. Tyto procesy hrají klíčovou úlohu v poškození a zániku nervové buňky (Choi, 1988). Proces, který přednostně poškozuje neurony, byl poprvé popsán Olney-em (1969). Poškození jím bylo označeno za „excitotoxické“. Pozdější studie ukázaly, že tento proces probíhá na pozadí řady chronických neuropsychiatrických nemocí, počínaje demencí u AIDS, přes demenci Alzheimerova typu až po Kraepelinovu „dementia praecox“, kterou dnes nazýváme schizofrenií (Kraepelin, 1904).

Stavba a funkce NMDA receptoru

Funkční diverzita NMDA-R má základ v podjednotkovém uspořádání tohoto jinak tetraheteromeru tvořeného obligatorní glycin-vážíci NR1 podjednotkou (existuje v 8 sestřižených formách),

glutamát-vážíci NR2A-D podjednotkami a glycin-vážíci podjednotkami NR3A-B. Přitom NMDA-R vyžaduje přítomnost dvou NR1 podjednotek a dalších dvou NR2 podjednotek anebo kombinaci NR2/NR3 podjednotky. NR3 podjednotky samy nevytvářejí funkční NMDA-R, ale tvoří komplexy s NR1/NR2 podjednotkami (Yamakura a Shimoji, 1999; Cull-Candy et al., 2001; Furukawa et al., 2005). Vzniklý komplex NMDA receptor/iontový kanál může být aktivován uvolněným GLU asi na 10 milisekund a jeho následné otevírání a zavírání pokračuje po dobu dalších stovek ms, dokud není GLU uvolněn z receptoru. Přitom časová dynamika excitačního post-synaptického proudu (EPSC) a afinita receptoru pro GLU je do značné míry ovlivněna zastoupením různých typů NR2 podjednotek. Dokládá to skutečnost, že aplikace GLU na NR1/NR2A receptorový heteromer způsobí EPSC s deaktivacím časem desítek milisekund (ms), zatímco u NMDA-R tvořeného NR1/NR2D podjednotkami jeho deaktivace trvá po dobu několika sekund (s) (Wyllie et al., 1998).

Tato skutečnost vedla k tomu, že NMDA-R obsahující NR2A nebo NR2B podjednotku tvoří kanály s vysokou vodivostí a vysokou citlivostí vůči Mg^{2+} , zatímco receptory obsahující NR2C a NR2D představují nízkovodivostní kanály s nízkou účinností Mg^{2+} blokovat jejich propustnost. Předpokládá se proto, že značné rozdíly v citlivosti NMDA-R vůči Mg^{2+} mohou mít významný vliv na úroveň vstupu Ca^{2+} do buňky během synaptické aktivace. Také přítomnost NR3 podjednotek podmiňuje nižší vodivostní charakteristiky receptorem řízeného iontového kanálu. Dokládá to skutečnost, že uspořádání NR1/NR2A/NR3A propůjčuje iontovému kanálu 5krát nižší propustnost pro Ca^{2+} , než je tomu v případě iontového kanálu, který tvoří NR1/NR2A podjednotky (Das et al., 1998; Peres-Otano et al., 2001).

Genetické klonování umožnilo odhalit molekulární stavbu NMDA-R a poukázalo na velkou molekulární diverzitu komplexu NMDA receptor/iontový kanál (Monyer et al., 1992; Watanabe, 1995; Yamakura a Shimoji, 1999). Bylo tak zjištěno, že NR1 podjednotka je sice menší než NR2 podjednotky, ale jejich stavba vykazuje vzájemnou podobnost. Tvorba dvojic výše uvedených NR1/NR2 dimerů je podmíněna interakcí mezi doménami každé z podjednotek (Furukawa et al., 2005). Každá podjednotka má svou koncovou N-doménu, ligand (GLY/GLU)-vážíci doménu (S1-S2), transmembránovou doménu skládající se ze 3 segmentů a P-klíčky tvořící vnitřek iontového kanálu a C-terminální doménu, která představuje modulační místo uvnitř buňky (blíže viz Šťastný et al., 2002; Šťastný a Peková, 2005). Furukawa se spolupracovníky (2005) prokázali, že je to S1-S2 doména NR1/NR2A heteromeru, kterou ligand uzavírá, čímž se oddělí proximální (receptorová) část komplexu, která umožňuje propustnost iontového kanálu.

NR1 podjednotka

Ubikviterní NR1 podjednotka má genovou lokalizaci na chromozomu 9q34.3 (tabulka 1), který obsahuje 22 exonů, přičemž exony 5, 21 a 22 mohou být alternativně „sestřiženy“. Její proteinová podoba (řetězec tvoří 920 aminokyselin s celkovou molekulární hmotností 103 kDa) proto existuje v osmi formách, které propůjčují NMDA-R různé vlastnosti. Dokládá to skutečnost, že varianty NR1 podjednotky obsahující exon 5 jsou při fyziologickém pH plně funkčně aktivní, ale nejsou ani potencovány polyamidy, ani inhibovány Zn^{2+} . Naopak NR1 podjednotky, které neobsahují exon 5, jsou částečně „blokovány“, což znamená, že po dimerizaci s NR2 podjednotkami je komplex méně citlivý na H^+ a Zn^{2+} (Traynelis et al., 1997; Traynelis et al., 1998).

Metoda *in situ* hybridizace odhalila přítomnost mRNA NR1 podjednotky prakticky ve všech typech neuronů CNS s tím, že nejintenzivnější signál byl nalezen v mozkové kůře, gyrus dentatus hipokampu, v subikulu, v talamických jádrech, jádře mozkového kmene, v kůře mozečku a v páteřní míše (Watanabe, 1995). NR1 podjednotka byla prokázána i v některých neuronech periferního nervstva, ve dřeni nadledvin a v enterické nervové pleteni potkana. Proteinová

Tabulka 1: Molekulární diverzita komplexu NMDA receptor/iontový kanál

Podjednotka	Počet AA	Mol. hm. (kDa)	Distribuce v dosp. mozku	Chromozomální lokalizace
NR1	920	103	celý mozek	9q34.3
NR2A	1442	163	celý mozek	16p13.2
NR2B	1456	163	přední mozek	12p12
NR2C	1220	134	mozeček	17q24-q25
NR2D	1300	141	mezimozek, kmen	19q13.1

Tabulka upravena dle Mori a Mishina, 1995.

exprese NR1 podjednotky je téměř paralelní s expresí její mRNA, přičemž v hipokampu potkana byla zjištěna lateralita její exprese (Kozmiková, nepublikovaný náleží). Vývojově je ale exprese NR1 proteinu prokazatelná v temporální oblasti mozkové kůry a v hipokampu potkana již před narozením (Takai et al., 2003). V lidském mozku je možné prokázat mRNA pro NR1 podjednotku již kolem 90. dne gestace (Ritter et al., 2001). V průběhu prvního roku života pak následuje rychlý vzestup její hladiny v různých oblastech mozku (Law et al., 2003).

Tato lateralita její proteinové exprese však mizí v animálním modelu *schizofrenie*, který je založen na neurovývojové a neuroinfekční hypotéze (Šťastný et al., 2005). Poněkud odlišná je situace v případech rozdílu v expresi mRNA NR1 podjednotky v autoptických hipokampech pacientů trpících schizofrenií (Peková et al., 2006). Relativní kvantifikace pan-formy mRNA NR1 podjednotky neprokázala významné rozdíly její exprese mezi pravým a levým hipokampem *post mortem* u pacientů se schizofrenií a u osob bez psychiatrické anamnézy. Statistická významnost absolutních levo-pravostranných rozdílu však byla zjištěna u skupiny schizofreniků. Srovnání mužů (*schizofrenie vs kontrola*) potvrdilo statisticky významnou lateralitu v hladinách mRNA NR1. Ta se dále zvýšila vyražením mužů s antipsychotickou léčbou. U žen bylo toto srovnání bez statistické významnosti. Výsledky dokládají významnost faktoru pohlaví a antipsychotické léčby ve vztahu ke změnám v expresi NR1 podjednotky NMDA receptoru (Peková et al., 2006).

Přestože se nám nepodařilo prokázat u našeho souboru pacientů přítomnost mutace D481N/K483Q ve vazebném místě pro glycin (Peková et al., 2006), nedávná společná publikace amerických a japonských pracovníků (Fujii et al., 2006) ukázala, že D-serin jako koagonista NMDA-R hraje pravděpodobně významnou roli v patofyziologii schizofrenie. Tím se zájem o úlohu NR1 podjednotky rozšířil do dalších oblastí výzkumu. Několik studií ukázalo, že podávání D-serinu a glycinu, agonistů glycinového vazebného místa, zmírňuje negativní příznaky a kognitivní deficit u pacientů se schizofrenií (Snyder a Ferrit, 2000). Současně se ukázalo, že tyto pacienti mají snížené hladiny D-serinu v plazmě a v mozkomíšní tekutině.

Na základě těchto nálezů se do centra zájmu dostaly enzymy serin racemáza (SR) a oxidáza D-aminokyseliny (DAAO), které syntézují, respektive degradují D-serin. Nedávné studie ukázaly, že:

1) enzym SR interaguje s proteinem PICK, který může mít vztah ke schizofrenii, a

2) protein G72, který se váže s DAAO, může být defektní u některých pacientů se schizofrenií.

Práce zabývající se SR současně ukázaly, že v gliových buňkách je přítomen protein interagující s C-kinázou (PICK1), jehož jedna doména se váže s C-koncem SR. Je-li tato vazba narušena, vážne syntéza D-serinu. Gen pro *PICK1* je přitom lokalizován na chromozómu 22q13 a jeho dva jednonukleotidové polymorfizmy (rs7113729 a rs2076369) se objevují s vysokou frekvencí v populaci japonských pacientů trpících disorganizovanou formou schizofrenie (Fujii et al., 2006).

Funkční důsledky snížené exprese NR1 podjednotky lze pozorovat u myši. V popředí příznaků je hyperlokomoce a stereotypie (Mohn

et al., 1999) a výrazný deficit pohlavně specifického agresivního chování (Duncan et al., 2004) zjištěný u jedinců s „knock-down“ NR1 podjednotkou. Další studie ukázala, že snížená exprese NR1 podjednotky nebo inaktivace genu *STOP* pro polypeptid zajišťující stabilitu mikrotubulů uvnitř neuronů provází deficit prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (Fradley et al., 2005). Ten je měřítkem deficitu ve zpracování informací (Bubeníková et al., 2002).

NR2A podjednotka (obr. 2)

Tato podjednotka má genovou lokalizaci na chromozomu 16p13 a její řetězec tvoří 1442 aminokyselin s molekulární hmotností 163 kDa (tabulka 1). Tato v dospělém CNS nejčastěji exprimovaná NR2 podjednotka se vyznačuje dlouhou C-doménou (627 aminokyselin), zatím s ne zcela pochopenou funkcí. Jednou z funkcí této C-domény NR2A podjednotky je defosforylace provázející zvýšenou desenzitizací NMDA-R. Přitom iontový kanál má dvě vodivostní úrovně (50 a 38 pS) a váže pevněji Mg^{2+} než jiné typy NMDA kanálů. Prostřednictvím NR2A podjednotky je kanál přednostně zakotven v post-synaptických denzitách zralých synapsí, a to vzhledem ke spojení NR2A s PDS-95 (obr. 1). Toto spojení zmíněnou podjednotku chrání před štěpením zprostředkovaným kalpainem (Dong et al., 2004).

Expresí mRNA pro NR2A podjednotku je přítomna ve většině oblastí dospělého mozku, především pak v hipokampu a mozkové kůře (Watanabe, 1995). V mozku novorozeného potkana je exprese NR2A proteinu velmi nízká, ale již 21. postnatální den (21. PND) její exprese dosahuje vrcholu a dále se již nemění nebo mírně poklesne v dospělém mozku (Wenzel et al., 1997).

U mladého dospělého potkana byla pozorována lateralita exprese NR2A proteinu, přičemž v levém hipokampu byla vyšší než v pravém. V animálním modelu schizofrenie byla její exprese snížena téměř o 30 % za současného zmenšení rozdílu v její lateralitě (Skuba et al., 2004). Ani „knock-out“ NR2A podjednotky však nezpůsobil deficit v prepulzní inhibici akustického úleku u myši (Spooren et al., 2004).

U člověka jsou hladiny transkriptů NR2A podjednotky nízké v prenatálním období vývoje (Ritter et al., 2001), ale nejvyšší hladiny mRNA pro NR2A v lidském hipokampu byly nalezeny u dětí ve věku 1-3 let (Law et al., 2003). Analýza polymorfismu genu *GRIN2A* nevykazuje změny mající vztah ke schizofrenii v rodinách mluvících jazykem Bantů (Riley et al., 1997) nebo v souboru japonských pacientů (Iwayama et al., 2006), přestože funkční (GT)_n polymorfismus v promotorové oblasti tohoto genu predispozici vůči schizofrenii u japonských pacientů zcela nevylučuje (Iwayama-Shigeno et al., 2005).

NR2B podjednotka (obr. 2)

Tato podjednotka, v mnohém podobná NR2A podjednotce, má genovou lokalizaci na chromozomu 12p12. Její řetězec je nejdělsí a tvoří ho 1456 aminokyselin o celkové molekulární hmotnosti 163 kDa (tabulka 1). Také heteromerní NMDA-R obsahující NR2B podjednotku se vyznačuje vysokou vodivostí i vysokou citlivostí vůči blokování iontového kanálu Mg^{2+} . Na rozdíl od heteromerů s NR2A podjednotkou, chelace Zn^{2+} neovlivní receptorovou odpověď. Přítomnost polyaminového místa na NR2B podjednotce podmiňuje asi

400krát nižší hodnotu IC_{50} pro inhibici ifenprodilem než v případě NR2A-, NR2C a NR2D-obsahujících receptorů.

Expresí mRNA pro NR2B podjednotku je vysoká v některých oblastech předního mozku potkana, jakými jsou neokortex, hipokampus, talamus (Watanabe, 1995). U novorozeného potkana je hladina transkriptů NR2B podjednotky vysoká. Od 5. PND stoupá i exprese NR2B proteinu, která kulminuje 10. PND, aby se do dospělosti významně snížila. Postupně přitom mizí především transkripty NR2B z nižších oblastí mozku a mozkového kmene (Wenzel et al., 1997). Výjimku představuje hipokampus, ve kterém zůstává exprese proteinu relativně vysoká i v dospělosti (Charton et al., 1999). Proteinová exprese této podjednotky vykazuje v hipokampu dospělého jedince významnou lateralitu, která je opačná v porovnání s expresí NR2A proteinu. V animálním modelu její exprese poklesne až o 60 % při klesajícím významu vyjádřené lateralitě (Skuba et al., 2004).

Tyto změny v expresi NR2A/NR2B podjednotek, které provází celkový pokles receptorově specifických vazebných míst pro $[^3H]GLU$, jsou spojeny s deficitem v prepulzní inhibici (PPI) akustického úleku u laboratorního potkana (Šťastný et al., 2005). Naše zjištění je v souladu s nedávným pozorováním, že k deficitu PPI je třeba selektivně inhibovat jak NR2A, tak i NR2B podjednotku (Spooren et al., 2004). Takeuchi se spolupracovníky (2001) však ukázali, že samotný deficit v expresi podjednotky NR2B sice významně neovlivní PPI, ale postačí ke zvýšení úrovně akustické úlekové reakce. V našem animálním modelu schizofrenie jsme získali podobný výsledek (Tejkalová et al., 2003).

U člověka je exprese mRNA pro NR2B podjednotku vysoká již před 90. dnem gestace, ale nejvyšších hladin je dosaženo mezi 1. a 2. rokem věku dítěte (Ritter et al., 2001). Také v hipokampu novorozence byly hladiny mRNA této podjednotky nejvyšší. U dospívajícího dítěte rychle klesaly a nejnižší hladiny byly zjištěny v pozdní adolescenci (Law et al., 2003). Vztah NR2B podjednotky k psychopatologii schizofrenie dokládají nedávné studie svědčící pro kauzální vztah

změn v promotorové části genu *GRIN2B* ke schizofrenii (Miyatake et al., 2002; Di Maria et al., 2004). Významná genetická interakce mezi polymorfizmy G1001C genu *GRIN1* a T4197C a T5988C v genu *GRIN2B* ukazuje na jejich kombinovaný účinek, který může zvyšovat riziko vzniku schizofrenie, což bylo prokázáno u čínské populace (Qin et al., 2005). Podíl genu *GRIN2B* na predispozici ke schizofrenii nevyloučila však ani dřívější studie provedená na kohortě pacientů z Jihoafrické republiky (Riley et al., 1997).

NR2C podjednotka

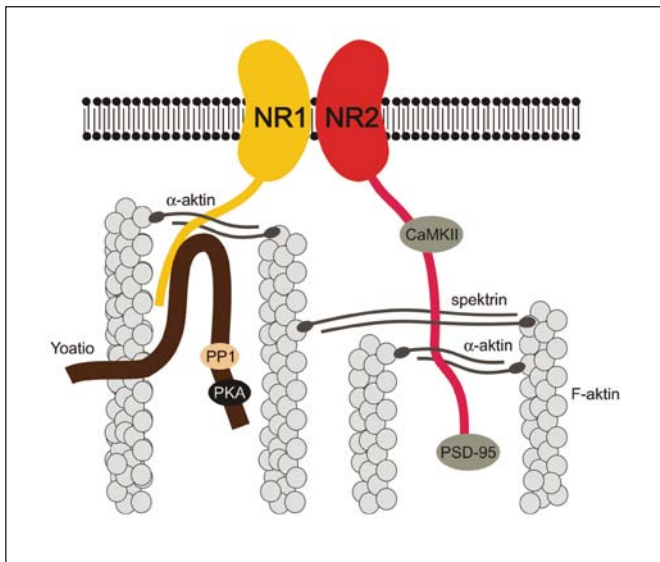
NMDA-R obsahující NR2C podjednotku je zastoupen především v granulárních neuronech mozečku, s jejichž buněčnou maturací postupuje i náhrada trimerních NR1/NR2A/NR2C receptorů za diheteromerní NR1/NR2C synaptické receptory (Cathala et al., 2000). NR2C podjednotka, s genovou lokalizací na chromozomu 17q25, je nejkřatší z NR2 podjednotek, neboť ji tvoří jen 1220 zbytků aminokyselin a její molekulární hmotnost odpovídá 134 kDa (tabulka 1).

Tato podjednotka je přítomna téměř výhradně v mozečku, i když imunoblody odhalily její přítomnost v nekvantifikovatelných množstvích i v hipokampu potkana (Skuba, nepublikované výsledky). Zatímco v mozečku novorozeného potkana je tato podjednotka prakticky neprokazatelná, za 10 dnů po narození lze detekovat její mRNA a 21. PND je dobře prokazatelná i její proteinová exprese (Wenzel et al., 1997). Tento vývoj svědčí pro postupnou náhradu NR2B podjednotky v granulárních buňkách mozečku za podjednotky NR2A a NR2C. Pro toto zjištění získaná na potkanech nám většinou chybí odpovídající nálezy na lidském materiálu. Je to pouze práce Akbariana a spolupracovníků (1997), která uvádí, že v prefrontální a parieto-temporální oblasti mozkové kůry lze prokázat jen nízké hladiny mRNA pro NR2C podjednotku. Naopak v mozečku, a to jak u schizofreniků, tak i u odpovídajících kontrol, byly nalezeny velmi vysoké hladiny této podjednotky. V porovnání s kontrolami však byla hladina transkriptů v jednotlivých vrstvách prefrontální kůry schizofrenních nemocných snížena o 22–41 %. Naopak v oblasti temporo-parietální mozkové kůry měli tyto pacienti hladiny mRNA pro NR2C podjednotku vyšší o 10–21 % (Akbarian et al., 1997).

NR2D podjednotka (obr. 2)

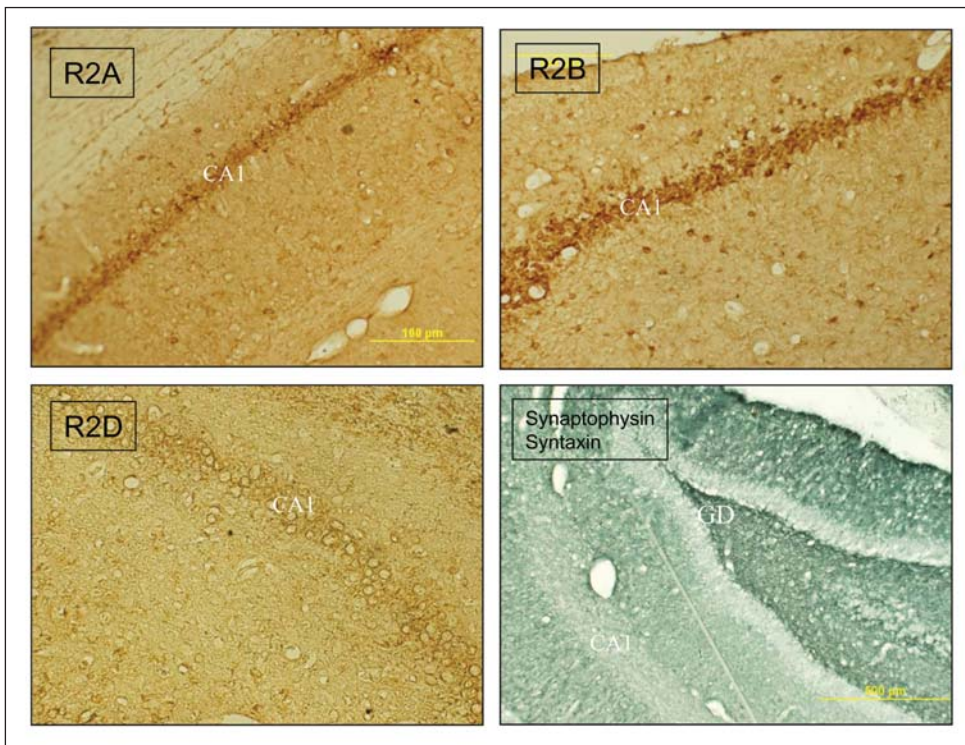
Poslední z NR2 podjednotek se v některých charakteristikách podobá NR2B podjednotce. Přednostně je NR2D podjednotka exprimována v podkorových strukturách mozku (diencefalón, mozkový kmen) během perinatálního a časně postnatálního vývoje. Její řetězec tvoří 1300 aminokyselin o celkové hmotnosti 141 kDa (tabulka 1). Některé nálezy svědčí pro existenci jejich dvou sestřížených forem. NMDA-R obsahující NR2D podjednotku vykazuje omezenou senzitivitu vůči blokaci kanálu Mg^{2+} , nízkou vodivost při aktivaci, ale jejich pomalou deaktivaci. Heteromery NR1/NR2D byly prokázány pouze v extrasynaptické lokalizaci, takže v současnosti neexistuje důkaz pro jejich účast na synaptické neurotransmisí, což může souviset právě s jejich pomalou deaktivací. Téměř čistá populace NR1/NR2D heteromerů je v membránách Purkyňových buněk mozečku (Misra et al., 2000). Jejich přítomnost byla prokázána i v membránách mozkového kapilárního endotelu (Pliss et al., 2002). Předpokládá se, že NR2D podjednotka může tvořit triheteromery typu NR1/NR2A/NR2D, které nevykazují tak pomalou deaktivaci jako receptory obsahující pouze NR2D podjednotku. Receptory s touto podjednotkou se vyznačují vysokou afinitou pro GLU, což může být ve vztahu k jejich extrasynaptické funkci, kterou však bude třeba ještě přesněji definovat.

Expresí genu pro NR2D podjednotku je přechodně zvýšená během fetálního a neonatálního vývoje potkana (Watanabe, 1995). Transkripty této podjednotky proto nacházíme v průběhu vývoje struktury diencefala, mozkového kmene a páteřní míchy. „Knock-down“ myši s potlačenou expresí této podjednotky mají normální histomorfologii mozku, ale jejich chování se vyznačuje sníženou lokomoční aktivitou. Lateralitu proteinové exprese NR2D podjednot-



Obrázek 1: Schéma zakotvení NR1/NR2 heteromeru na cytoskelet buňky v postsynaptické části membrány. (Modifikováno dle Wyszyński a Sheng, 2000).

Heterodimer NR1/NR2 je v NMDA receptoru zastoupen 2krát. Zatímco nezbytná NR1 podjednotka se svou C-doménou váže na několik cytoplazmatických proteinů, jakými jsou Yoatio a α -aktin, NR2 podjednotka se svým dlouhým C-koncem váže s PSD-95. Protein Yoatio byl identifikován jako „kotvící“ protein (AKAP – A-kinázu kotvící protein), který se váže jak na protein kinázu A (PKA), tak i na protein fosfatázy 1 (PP1).



Obrázek 2: Imunocytochemická lokalizace podjednotek R2A, R2B a R2D v hipokampu mladého dospělého laboratorního potkana

Proteinové podjednotky NR2 jsou exprimovány přednostně na perikaryích pyramidových buněk v area CA1 hipokampu. Vazba primárních protilátek vůči vybraným determinantám jednotlivých podjednotek byla detekována nepřímou imunocytochemickou metodou zakončenou diaminobenzidinovou reakcí. Pro srovnání je uvedena i převážně neuropilová distribuce většiny synapsí zobrazených koktejlem protilátek proti synaptofyzinu a syntaxinu. Perikarya CA1 i gyrus dentatus (GD) se proto vyznačují přítomností nenabarvených somat neuronů. (Axiophot Zeiss, zvětšení 200x).

ky, která je stejná jako lateralita NR2B podjednotky, jsme prokázali v hipokampech 50denních potkanů (Skuba et al., 2004). Nejzajímavější však bylo zjištění, že v animálním modelu schizofrenie se její lateralita obrací a podobá se lateralitě NR2A podjednotky (Skuba et al., 2005). O možné kompenzační příčině zvýšené exprese NR2D podjednotky jsme hovořili již dříve (Šťastný a Peková, 2005).

Expres mRNA pro NR2D podjednotku je vysoká v mozku kůře lidského plodu již kolem 90. dne gestace (Ritter et al., 2001), aniž je znám funkční význam jejího přechodně zvýšeného zastoupení v NMDA receptorech. Na její 53% zvýšení exprese v prefrontální kůře schizofreniků upozornil jako první Akbarian se spolupracovníky (1997). V současnosti byla v porovnání s kontrolními osobami prokázána existence jednonukleotidových polymorfizmů v genu *GRIN2D* v kohortě pacientů a současně bylo konstatováno, že genový lokus může představovat susceptibilitu pro schizofrenii pro celou japonskou populaci (Makino et al., 2005).

Také bylo popsáno zvýšení exprese mRNA NR3A podjednotky NMDA receptoru v dorzolaterální oblasti prefrontální kůry u pacientů trpících schizofrenií (Mueller a Meador-Woodruff, 2004), ale vzhledem k její stále ještě nejasné funkci, je interpretace tohoto nálezu na úrovni hypotézy.

Lokalizace NMDA receptoru v různých typech nervových buněk

Stavba, a tím i funkce NMDA-R v povrchové membráně neuronu, se liší podle toho, zda se jedná o její synaptickou nebo extrasynaptickou část (Li et al., 2002). NMDA receptory v oblasti postsynaptické denzity, kterou tvoří proteiny s různorodou funkcí (Kennedy, 1997), jsou do ní zakotveny prostřednictvím proteinu-95 (PSD-95),

který patří do skupiny proteinů zastoupených v postsynaptické denzitě, které se vyznačují přítomností PZD domén, tj. C-koncových peptidů vyznačujících se specifickou sekvencí aminokyselin. Druhá membránová doména PSD-95 se váže na skupinu -COOH podjednotek NR2-typu NMDA-R, které se vyznačují dlouhým C-koncem nacházejícím se uvnitř buňky (obrázek 1). U pacientů trpících schizofrenií (a bipolární poruchou) bývá exprese PSD-95 významně snížena, a to především v gyrus dentatus hipokampu a v orbitofrontální oblasti mozkové kůry (Toro a Deakin, 2005). To zvyšuje mobilitu a vulnerabilitu vlastních NMDA receptorů. Takto změněné receptorové vlastnosti mohou být součástí dysfunkce NMDA-R u uvedených skupin psychiatrických pacientů. Výsledná „down“ regulace PSD-95 zvyšuje jinak omezený laterální pohyb NMDA-R mezi synaptickým a extrasynaptickým „kompartmentem“. Tím se v časovém rozmezí několika minut významně mění efektivita („strength“) synaptického spojení (Tovar and Westbrook, 2002). Protože kouření u pacientů trpících schizofrenií ovlivňuje expresi některých genů důležitých pro „zakotvení“ NMDA-R v postsynaptické denzitě (ve své podstatě

ji kouření „normalizuje“), může to být považováno za projev určité formy automedikace (Mexal et al., 2005).

Neurony

Membránové receptory současně podléhají internalizaci, která má však odlišnou vývojovou regulaci. Ta souvisí se zmíněnou afinitou NMDA-R vůči PSD-95. Ta zapříčiňuje, že ve funkčně nezralých axo-dendritických synapsích převažují receptory s podjednotkovou stavbou NR1/NR2B (Babb et al., 2005), kdežto NR1/NR2A komplexy jsou typické pro synapse v dospělém mozku (Carroll a Zukin, 2002). Protože NMDA receptory obsahující podjednotku NR2A mají rychlejší kinetiku laterálního pohybu, jsou zakotveny především do synaptického úseku membrány, zatímco pomalejší kinetika podjednotky NR2B podmiňuje jejich extrasynaptickou lokalizaci (obrázek 1). Odlišné funkční vlastnosti NR2A podjednotky pak propůjčují synaptickým NMDA receptorům možnost rychlé deaktivace, kterou potřebují pro GLU zprostředkovaný přenos chemické informace na synapsi. Naopak extrasynaptické NMDA heteromery, které obsahují přednostně NR2B podjednotku, podléhají pomalejší internalizaci. Reagují až na zvyšující se hladinu GLU, který „přetéká“ z intersynaptických štěrbin do intersticiálního prostoru mozku při nadměrné stimulaci nervových buněk. NMDA receptory v této lokalizaci proto odpovídají nikoliv za synaptický přenos, ale za neuronální poškození a excitotoxický typ buněčné smrti.

Astrocyty

Přítomnost NMDA-R je však možné prokázat nejen v membránách neuronů, ale i astrocytů, dále v Müllerových buňkách sítnice a v Bergmannově glii mozečku (Conti et al., 1996; Gallo a Ghiani, 2000). Nedávné práce ukázaly na význam NMDA-R s exprimovanou NR2B podjednotkou při aktivaci astrocytů GLU (Kato et al., 2006). Následně zmnožení astrocytů v prefrontální kůře a v hipokam-

pech schizofreniků může zvýšit zpětné vychytávání („reuptake“) GLU do těchto neurogliových buněk a snížit tak jeho koncentraci v bezprostředním okolí glutamátových receptorů. Tím se astrocyty významně spolupodílejí na hypofunkci celého glutamátergního systému mozku (Nanitsos et al., 2005). Jeho snížená funkční aktivita může být dále prohloubena tím, že snížené hladiny GLU nezajistí dostatečné uvolňování D-serinu z astrocytů typu-1 (Urai et al., 2002; Yang et al., 2003). Tím se dále prohloubí hypofunkce celého systému, a především NMDA receptorů. Nedávné nálezy ukázaly, že D-serin je v astrocytech a v buňkách radiální glie lokalizován do struktur, které se podobají váčkům, a je prokazatelný i v mikrogliových buňkách (Williams et al., 2006). Naopak nadbytek D-serinu, a to za spoluúčasti oxidázy D-aminokyseliny (DAAO), může způsobit poškození gliových buněk, kterému lze zabránit inhibicí aktivity uvedeného enzymu Na-benzoátem nebo chlorpromazinem (Park et al., 2006). Vzhledem k nižší aktivitě DAAO v prenatalním období vývoje byly nalezeny vyšší hladiny D-serinu (a D-aspartátu) v prefrontální mozkové kůře lidského plodu, což svědčí ve prospěch předpokládané účasti D-aminokyseliny ve vývoji funkční aktivity NMDA-R v buňkách mozkové kůry člověka (Hashimoto et al., 1993).

Mikroglie

Kromě D-serinu uvolňují mikrogliové buňky také glycin a L-serin (Hayashi et al., 2006). Uvedené aminokyseliny se pak spolupodílejí na aktivaci korových receptorů prostřednictvím synaptických NMDA receptorů. Přitom je však třeba mít na paměti, že kooperativní aktivace NMDA receptorů s D-serinem a L-glutamátem může být příčinou poškození neuronů při zánětech mozku a míchy (Wu et al., 2004). Přitom je známo, že proliferace mikrogliových buněk závisí na aktivaci glutamátových receptorů v jejich vlastní povrchové membráně (Nair a Bonneau, 2006).

Oligodendrocyty

V nedávné době byly prokázány NMDA receptory také v oligodendrocytech (Salter a Fern, 2005). Na rozdíl od neuronů a astrocytů jsou však tyto receptory přítomny téměř výhradně ve výběžcích oligodendrocytů, kde jsou jen slabě blokovány Mg^{2+} (Káradóttir et al., 2005). Tuto vlastnost podmiňuje podjednotková stavba charakterizovaná přítomností NR1/NR2C a NR3A podjednotek. Ta pak odpovídá nejen za jejich snazší aktivaci, ale i za primární poškození výběžků oligodendroglie (Micu et al., 2006). Výsledné odtržení oligodendrocytů od osových axonů je příčinou poruchy myelinizace, která byla popsána také v bílé hmotě mozku u pacientů trpících schizofrenií (Kumra et al., 2005; Hao et al., 2006).

Endotel mozkových kapilár

Také endotelové buňky mozkové kapilární bariéry exprimují ve

svých povrchových membránách NMDA heteromery s imunocytochemicky dobře prokazatelným zastoupením NR2D podjednotky (Pliss et al., 2002). I když pozdější práce prokázaly přítomnost mRNA pro NR2A a NR2B podjednotku (Parfenova et al., 2003), předpokládá se, že podobně jako oligodendrocyty, tak i endotelové buňky mozkových kapilár mohou mít NMDA receptory s méně obvyklou podjednotkovou stavbou než vlastní neurony. Pomalá deaktivace heteromerů NMDA-R s NR2D podjednotkou se pak může podílet na dysfunkci hematoencefalické bariéry, kterou lze prokázat až u 1/3 pacientů se schizofrenií (Kirch et al., 1985).

NMDA receptor jako cílová struktura pro léčbu antipsychotiky

Antipsychotika v závislosti na dávce a délce podávání ovlivňují funkční aktivitu NMDA-R, přičemž zvláštní pozornost je v současnosti přednostně věnována vazebnému místu pro glycin/D-serin na NR1 podjednotce (Tarazi et al., 1996; Millan, 2005). O možnostech terapeutického využití vysokých dávek glycinu nebo D-serinu jsme již referovali v jiném přehledném článku (Šťastný a Peková, 2005).

V souvislosti s dlouhodobými účinky cis- a trans-flupenthixolu na expresi transkriptů pro jednotlivé podjednotky NMDA-R si však uvědomíme, jak v časoprostorové stupnici může rozdílně působit chronické podávání látky, která účinně inhibuje D_1/D_2 -receptory (Chen et al., 1998). To ukazuje na rozdílné účinky antipsychotik při jejich akutním a chronickém podávání (Tarazi et al., 1996; Millan, 2005). Vedle svého vlivu na expresi genů antipsychotika také moduluje funkci NMDA-R mechanismem intraneuronální signální transdukce (Leveque et al., 2000). A především, všechny nálezy získané na animálních modelech psychózy je třeba ověřit pomocí neinvazivních zobrazovacích metod na vybraných skupinách pacientů a odpovídajících skupinách kontrolních osob (Bressan et al., 2005). Pro složitost této otázky se k ní proto vrátíme v samostatném sdělení.

Autoři tohoto článku děkují za finanční podporu MŠMT – výzkumný projekt CNS:1M0517 (NR1 podjednotka v animálním modelu schizofrenie), MZ ČR – výzkumný záměr MZ0PCP2005 (NR1 podjednotka v lidském autoptickém materiálu) a IGA MZ ČR – grantový projekt NF7626-3 (NR2 podjednotky v animálním modelu schizofrenie). Autoři dále děkují za finanční pomoc firmě Eli Lilly.

*Doc. MUDr. František Šťastný, CSc.
Psychiatrické centrum Praha – 3. lékařská fakulta UK
a Centrum neuropsychiatrických studií,
Ústavní 91, 181 03 Praha 8 – Bohnice
e-mail: stastny@pcp.lf3.cuni.cz*

LITERATURA

Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman C.A, Bunney WE, Jr., Jones, EG. Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenia. *J Neurosci* 1995;16:19–30.

Babb TL, Mikuni N, Najm I, Wylie C, Olive M, Dollar C, Mac Lennan H. Pre- and postnatal expressions of NMDA receptor 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy Res* 2005;64:23–30.

Bressan RA, Erlandsson K, Stone JM, Mulligan RS, Krystal JH, Ell PJ, Pilowsky LS. Impact of schizophrenia and chronic antipsychotic treatment on $[^{125}I]$ CNS-1261 binding to N-methyl-D-aspartate receptors in vivo. *Biol Psychiatry* 2005;58:41–46.

Bubeníková V. Schizofrenie jako porucha glutamátergní neurotransmise. *Psychiatrie* 2005;9:105–112.

Bubeníková V, Horáček J, Šťastný F. Prepulzní inhibice úlekové reakce jako ukazatel deficitu zpracování informací. *Psychiatrie* 2002;6:31–34.

Carroll RC, Zukin SR. NMDA-receptor trafficking and targeting: implication for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 2002;25: 571–577.

Carton JP, Herkert M, Becker C-M, Schröder H. Cellular and subcellular localization of the 2B-subunit of the NMDA receptor in the adult rat telencephalon. *Brain Res* 1999;816:609–617.

Cathala L, Misra C, Cull-Candy S. Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci* 2000;20:5899–5905.

Chen AC-H, McDonald B, Moss SJ, Curling HMD. Gene expression studies of mRNAs encoding the NMDA receptor subunit NMDAR1, NMDAR2A, NMDAR2B, NMDAR2C, and NMDAR2D following long-term treatment with cis- and trans-flupenthixol as a model for understanding the mode of action of schizophrenia drug treatment. *Molec Brain Res* 1998;54:92–100.

- Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988;1:623–634.
- Collingridge GL, Bliss TV. NMDA receptors: their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 1987;10:288–293.
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Melone M. Expression of NR1 and NR2A/2B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 1996;17:254–258.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:327–335.
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 1998;393:377–381.
- Di Maria E, Gulli R, Begni S, De Luca A, Bignotti S, Pasini A. Variations in the NMDA receptor subunit 2B gene (GRIN2B) and schizophrenia: a case control-study. *Am J Med Genetics* 2004;128B:27–29.
- Dong YN, Axman EA, Lurch DR. Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. *J Neurosci* 2004;24:11035–11045.
- Duncan GE, Moy SS, Perez A, Eddy DM, Zinzow WM, Lieberman JA, Snouwaert JN, Koller BH. Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behav Brain Res* 2004;153:507–519.
- Fradley RL, O'Meara GF, Newman RJ, Andrieux A, Job D, Reynolds DS. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav Brain Res* 2005;163:257–264.
- Fujii K, Maeda K, Hikida T, Mustafa AK, Balkissoon R, Xia J, Yamada T, Ozeki Y, Kawahara R, Okawa M, Haganir RL, Ujike H, Snyder SH, Sawa A. Serine racemase binds to PICK 1: potential relevance to schizophrenia. *Molec Psychiatry* 2006;11:150–157.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 2005;438:185–192.
- Gallo V, Ghiani CA. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new function. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:252–258.
- Hao Y, Liu Z, Jiang T, Gong G, Liu H, Tan L, Kuang F, Xu L, Yi Y, Zhang Z. White matter integrity of the whole brain is disrupted in first-episode schizophrenia. *NeuroReport* 2006;17:23–26.
- Hashimoto A, Kumashiro S, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K, Mito T, Takashima S, Doi N, Mizutani Y, Yamazaki T. Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex. *J Neurochem* 1993;61:348–351.
- Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med* 1954;3:183–192.
- Hayashi Y, Ishibashi H, Hashimoto K, Nakanishi H. Potentiation of the NMDA receptor-mediated response through the activation of the glycine site microglia secreting soluble factors. *Glia* 2006 (v tisku).
- Iwayama Y, Hashimoto K, Nakajima M, Toyota T, Yamada K, Shimizu E, Itokawa M, Hoshika A, Iyo M, Yoshikawa T. Analysis of correlation between serum D-serine levels and functional promoter polymorphisms of GRIN2A and GRIN2B genes. *Neurosci Lett* 2006;394:101–104.
- Iwayama-Shigeno Y, Yamada K, Itokawa M, Toyota T, Meerabux JMAS, Minabe Y, Mori N, Inada T, Yoshikawa T. Extended analyses support the association of a functional (GT)_n polymorphism in the GRIN2A promoter with Japanese schizophrenia. *Neurosci Lett* 2005;378:102–105.
- Káradóttir R, Cavalier P, Bergerem LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischemia. *Nature* 2005;438:162–166.
- Kato H, Narita M, Miyatake M, Yajima Y, Suzuki T. Role of neuronal NR2B subunit-containing NMDA receptor-mediated Ca²⁺ influx and astrocytic activation in cultured mouse cortical neurons and astrocytes. *Synapse* 2006;59:10–17.
- Kennedy MB. The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* 1997;20:264–268.
- Kim JS, Kornhuber HH, Schmidt-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis of schizophrenia. *Neurosci Lett* 1980;20:379–382.
- Kirch DG, Kaufmann CA, Papadopoulos NM, Martin B, Weinberger DR. Abnormal cerebrospinal fluid protein indices in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1985;20:1039–1046.
- Kraepelin E. 1904 In: *Psychiatrie*. 6. Aufl. Barth JA, ed. Leipzig, Germany.
- Kumra S, Ashtari M, Cervellione KL, Henderson I, Kester H, Roofeh D, Wu J, Clarke T, Thaden E, Kane JM, Rhinewine J, Lencz T, Diamond A, Ardekani BA, Szeszko PR. White matter abnormalities in early-onset schizophrenia: a voxel-based diffusion tensor imaging study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2005;44:934–941.
- Law AJ, Weickert CS, Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Harrison PJ. Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *Eur J Neurosci* 2003;18:1197–1205.
- Leveque J-C, Macías W, Rajadhyaksha A, Carlson RR, Barczak A, Kang S, Li X-M, Coyle JT, Haganir RL, Heckers S, Konradi C. Intracellular modulation of NMDA receptor function by antipsychotic drugs. *J Neurosci* 2000;20:4011–4020.
- Li B, Chen N, Luo T, Otsu Y, Murphy TH, Raymond LA. Differential regulation of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *Nature Neurosci* 2002;5:833–834.
- Makino C, Shibata H, Ninomiya H, Tashiro N, Fukumaki Y. Identification of single-nucleotide polymorphisms in the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2D gene, GRID2D, and association study with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2005;15:215–221.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA receptors in spinal cord neurons. *Nature* 1984;309:760–763.
- Mexal S, Frank M, Berger R, Adams CE, Ross RG, Freedman R, Leonard S. Differential modulation of gene expression in the NMDA postsynaptic density of schizophrenic and control smokers. *Molec Brain Res* 2005;139:317–332.
- Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W, Stys PK. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during ischemia. *Nature* 2006;439:988–992.
- Millan MJ. N-methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacol* 2005;179:30–53.
- Misra C, Brickley SG, Wyllie DJ, Cull-Candy S. Slow deactivation kinetics of NMDA receptors containing NR1 and NR2D subunits in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol (Lond)* 2000;525:299–305.
- Miyatake R, Furukawa A, Suwaki H. Identification of a novel variant of the human NR2B gene promoter region and its possible association with schizophrenia. *Molec Psychiatry* 2002;7:1101–1106.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Carron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviours related to schizophrenia. *Cell* 1999;98:427–436.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992;256:1217–1221.
- Mori H, Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacol* 1995;34:1219–1237.
- Mueller HT, Meador-Woodruff JH. NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res* 2004;71:361–370.
- Nair A, Bonneau RH. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J Neuroimmunol* 2006;171:72–85.
- Nanitsos EK, Nguyen KTD, Šťastný F, Balcar VJ. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na⁺/K⁺-dependent glutamate transport. *J Biomed Sci* 2005;12:975–984.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 1984;307:462–465.
- Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 1969;166:386–388.
- Parfenova H, Fedinec A, Leffler CW. Ionotropic glutamate receptors on cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:190–197.
- Park HK, Shishido Y, Ichise-Shishido S, Kawazoe T, Ono K, Iwana S, Tomita Y, Yorita K, Sakai T, Fukui K. Potential role for astroglial D-amino acid oxidase in extracellular D-serine metabolism and cytotoxicity. *J Biochem (Tokyo)* 2006;139:295–304.

- Peková S, Majer E, Klaschka J, Šťastný F. Lateralita NR1 podjednotky NMDA receptoru a D481N/K483Q mutace jejího vazebného místa pro glycin v hipokampech schizofreniků. *Psychiatrie* 2006;10(Suppl.1):66.
- Peres-Otano I, Schulties CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF. Assembly with NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptor. *J Neurosci* 2001;21:175–218.
- Pliss L, Ježová D, Mareš V, Balcar VJ, Šťastný F. N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate changes functional and structural properties of rat blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 2002;317:85–88.
- Qin S, Zhao X, Pan Y, Liu J, Feng G, Fu J, Bao J, Zhang Z, He L. An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) and NR2B subunit gene (GRIN2B) in schizophrenia with universal DNA microarray. *Eur J Human Genetics* 2005;13:807–814.
- Riley BP, Tahir E, Rajagopalan S, Magudi-Carter M, Fauré S, Weissenbach J, Jenkins T, Williamson R. A linkage study of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene loci and schizophrenia in southern African Bantu-speaking families. *Psychiatric Genetics* 1997;7:57–74.
- Ritter LM, Unis AS, Meadow-Woodruff JH. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor in human fetal brain. *Devel Brain Res* 2001;127:123–133.
- Salter MG, Fern R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature* 2005;438:1167–1171.
- Skuba I, Tejkalová H, Šťastný F. Changes in subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptor in animal model of schizophrenia: effect of subunit selective antagonist. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14(Suppl.1):S73–S74.
- Skuba I, Lisý V, Šťastný F. Glutamatergic aspects of psychosis in animal models: what can they teach us about schizophrenia? *Physiol Res* 2005;54:43P.
- Snyder SH, Ferris CD. Novel neurotransmitters and their neuro-psychiatric relevance. *Am J Psychiatry* 2000;157:1738–1751.
- Spooren W, Mombereau C, Maco M, Gill R, Kemp JA, Ozmen L, Nakaniishi S, Higgins GA. Pharmacological and genetic evidence indicates that combined inhibition of NR2A and NR2B subunit containing NMDA receptors is required to disrupt prepulse inhibition. *Psychopharmacol* 2004;175:99–105.
- Šťastný F, Bubeníková V, Tejkalová H. N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamát, G-proteinová signalizace a psychotické chování v animálním modelu. *Psychiatrie* 2002;6(Suppl.4):20–24.
- Šťastný F, Peková S. Úloha NR1 podjednotky NMDA receptoru v etiopatogenezi schizofrenie: její dysfunkce, PET detekce a farmakologické ovlivnění. *Psychiatrie* 2005;9(Suppl.3):12–20.
- Šťastný F, Tejkalová H., Skuba I, Páleníček T, Pliss L, Mareš V, Křištofiková Z, Kaiser M, Höschl C, Bubeníková V, Balcar VJ. Interakce dopaminového D1/D2 receptoru s glutamátovým receptorem NMDA typu: od molekul k animálním modelům schizofrenie. *Psychiatrie* 2004;8(Suppl.3):32–41.
- Šťastný F, Tejkalová H, Skuba I, Balcar VJ, Kaiser M, Yoneda Y. Quinolinic acid, N-methyl-D-aspartate receptor and schizophrenia: Testing an integrative theory. In: *Amino Acid Signaling 04*, Yoneda Y., ed., Research Signpost, Trivandrum, Kerala, 2005. Pp.67–83.
- Takai H, Katayama K-i, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp Molec Pathol* 2003;75:89–94.
- Takeuchi T, Kiyama Y, Nakamura K, Tsujita M, Matsuda I, Mori H, Munemoto Y, Kuriyama H, Natsume R, Sakimura K, Mishina M. Roles of the glutamate receptor $\epsilon 2$ and $\delta 2$ subunits in the potentiation and prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *Eur J Neurosci* 2001;14:153–160.
- Tarazi FI, Florijn WJ, Cereze I. Regulation of ionotropic glutamate receptors following subchronic and chronic treatment with typical and atypical antipsychotics. *Psychopharmacol* 1996;128:371–379.
- Tejkalová H, Bubeníková V, Formánek J, Balcar VJ, Klaschka J, Šťastný F. Quinolinic lesion of developing hippocampus disrupts prepulse inhibition of acoustic startle in adult rats. *Physiol Res* 2003;52:42P.
- Toro C, Deakin JFW. NMDA receptor subunit NR1 and postsynaptic protein PSD-95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder. *Schizophrenia Res* 2005;80:323–330.
- Tovar, KR, Westbrook GL. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapse. *Neuron* 2002;34:255–264.
- Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL. Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* 1998;18:6163–6175.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. Control of proton sensitivity of the NMDA by RNA splicing and polyamines. *Science* 1997;268:873–876.
- Urai Y, Jinnouchi O, Klak KT, Suzue A, Nagahiro S, Fukui K. Gene expression of D-amino acid oxidation: regional and cell type specific expression. *Neurosci Lett* 2002;324:101–104.
- Watanabe M. Developmental dynamics of gene expression for NMDA receptor channel. In: Monaghan DT and Wenthold RJ, eds. *Ionotropic Glutamate Receptors*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1995:189–218.
- Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981;21:165–204.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 1997;68:469–478.
- Williams SM, Diaz CM, Macnab LT, Sullivan RK, Pow DV. Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain levels novel anatomical compartmentalization in glia and neurons. *Glia* 2006;53:401–411.
- Wu S-Z, Bodles AM, Porter MM, Griffin WST, Basile AS, Barger SW. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid β -peptide. *J Neuroinflammation* 2004;1:2–12.
- Wyllie DJ, Behe P, Colquhoun D. Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *J Physiol (Lond)* 1998;510:1–18.
- Wyszynski M, Sheng M. Targeting and anchoring of glutamate receptors and associated signaling molecules. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 18, Glutamate, OP Ottersen and J Storm-Mathisen, eds. Elsevier/Amsterdam, 2000. Pp. 183–201.
- Yamakura T, Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progr Neurobiol* 1999;59:279–298.
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15194–15199.