

KINURENIN ÚTVONAL ÉS MITOKONDRIÁLIS DISZFUNKCIÓ VIZSGÁLATA KINURENIN AMINOTRANSZFERÁZ II GÉNKIÜTÖTT EGEREK KÖZPONTI IDEGRENDSZERÉBEN

37. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Bánáti Tibor

Biológus MSc, 2. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezetők:

Spisák Krisztina

doktorandusz

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani
Intézet

Dr. Juhász László PhD.

tudományos munkatárs

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani
Intézet

2024

Tartalom

Rövidítésjegyzék	2
Bevezetés.....	4
Célkitűzés	12
Anyagok és módszerek.....	13
Állatok tartása.....	13
Agyszöveti minták preparálása.....	13
A mitokondriális respiráció vizsgálata	13
Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata.....	16
Extramitokondriális H_2O_2 termelődés vizsgálata	17
Statisztikai analízis	18
Eredmények.....	19
Mitokondriális O_2 fogyasztás a cerebellumban	19
Változások a cerebellum mitokondriális membránpotenciálban.....	20
Extramitokondriális H_2O_2 termelődés	21
Összefoglalás.....	22
Köszönetnyilvánítás	26
Irodalomjegyzék.....	27
Tételes szerzői hozzájárulás	32

Rövidítésjegyzék

ADP – adenzin-difoszfát

AHR - aril-hidrokarbon receptor

AmA – antimicin A

ATP – adenzin-trifoszfát

CCCP - karbonil-cianid m-klórfenil-hidrazon

CI – Komplex I

CII – Komplex II

ETL – elektrontranszportlánc

GPR35 - G-protein kapcsolt receptor 35

H₂O₂ – hidrogén-peroxid

HRP – tormá-peroxidáz

IDO_s – idolamin-2,3-deoxigénázok

JC1 - 5,5',6,6'-tetrachlór-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-karbocianin-jodid

KAT – kinurenin-aminotranszferáz

KFA - kinurenin-formamidáz

KIR – központi idegrendszer

KMO – kinurenin-3-antranilát-oxidáz

KYNA – kinurénsv

L-KYN - L-kinurenin

m-MPI - mitokondriális membránpotenciál indikátor

mtPTP - mitokondriális permeabilitási pórus

NaN₃ - nátrium-azid

N-f-KYN - N-formil-kinurenin

NMDA-R - N-metil-D-aszparaginsav receptor

OXPHOS – oxidatív foszforiláció

QRT – kinolin-foszforibozil-transzferáz

ROS – reaktív oxigéngyök

Rot – rotenon

S - szukcinát

Saf – safranin

TDO - triptofán-2,3-deoxigenáz

TMRM - tetrametil-rodamin-metil-észter.

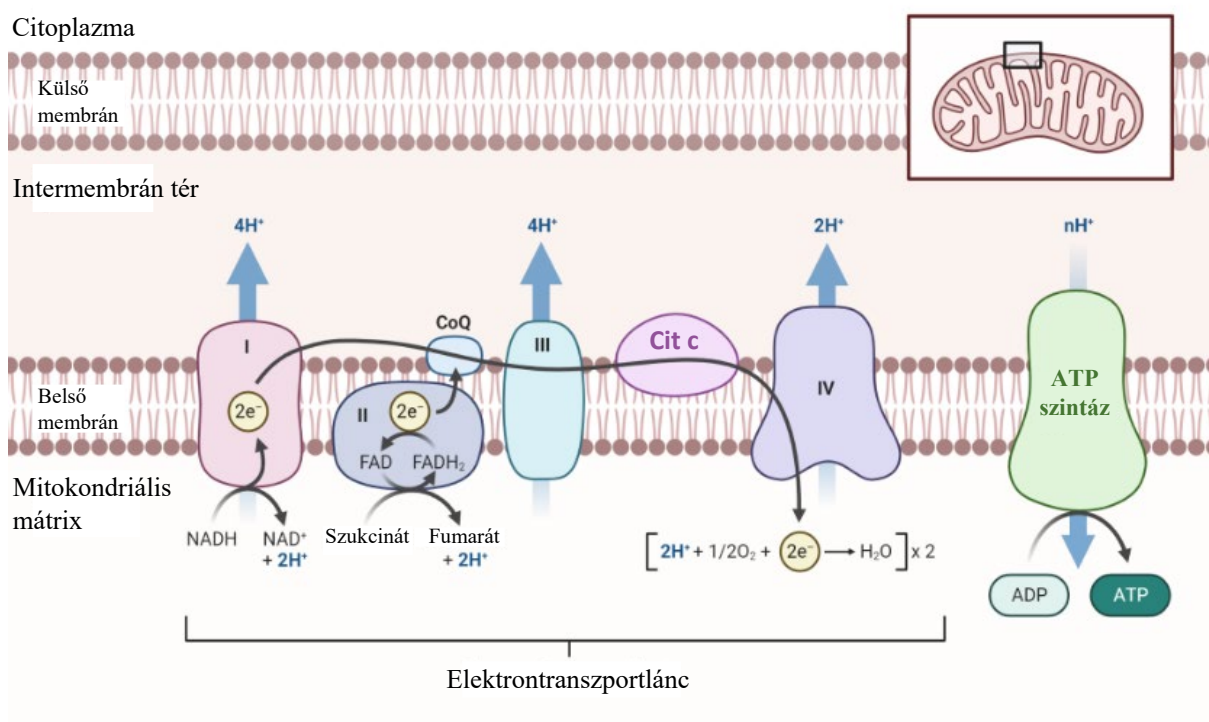
Trp – triptofán

wt – vad típusú

$\Delta\Psi_{mt}$ – mitokondriális membránpotenciál

Bevezetés

A mitokondriumok kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtlélegzésben és a szervezet fő energia termelő organelumai (1. ábra). Az elektrontranszportlánc (ETL) a belső mitokondriális membránba ágyazott fehérjekomplexek sorozatát foglalja magában. Ezek közé tartozik a NADH-koenzim Q-reduktáz (I. komplex), koenzim Q, szukcinát-dehidrogenáz (II. komplex), citokróm bc1-komplex (III. komplex), citokróm c-oxidáz (IV. komplex) és az ATP szintáz (V. komplex). Az ETL-on a korábbi anyagcsere-reakciókból származó, nagy energiájú elektronok ($2e^-$) haladnak végig, energiát szabadítva fel, amely elősegíti az adenozin-trifoszfát (ATP) szintézisét. Ez a folyamat elengedhetetlen a sejtek hatékony energiatermeléséhez ATP formájában.



1. ábra Elektrontranszportlánc felépítése (forrás: BioRender)

<i>Komlex</i>	<i>Gátlószer</i>	<i>Szubsztrát</i>
<i>NADH-koenzim Q-reduktáz (Komplex I)</i>	<i>Rotenon, amytal</i>	<i>Glutamát, malát, piruvát</i>
<i>Szukcinát-dehidrogenáz (Komplex II)</i>	<i>Malonát</i>	<i>Szukcinát</i>
<i>Citokróm bc1-komplex (Komplex III)</i>	<i>Antimicin A, mixotiazol</i>	<i>Duroquinol</i>
<i>Citokróm c-oxidáz (Komplex IV)</i>	<i>Nátrium-azid, Kálium-cianid</i>	<i>Aszkorbát/TMPD</i>
<i>ATP szintáz (Komplex V)</i>	<i>Oligomicin</i>	<i>ADP</i>

1. táblázat ETL specifikus szubsztrátjai és gátlószerei.

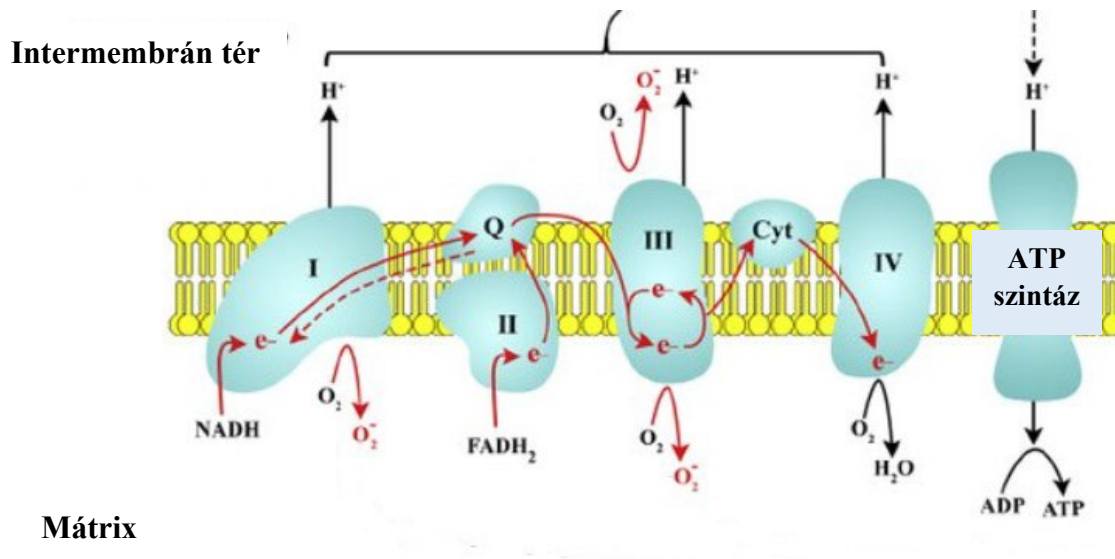
A redukált koenzimek oxidációja elektronokat biztosít az I. komplexnek és a II. komplexnek. Szekvenciális redoxreakciók során az elektronok ezeken a komplexeken végső soron molekuláris oxigénre kerülnek, energiát biztosítva a protonok pumpálásához az I., III. és IV. komplexeknek, a mátrix felőli oldalról a belső membrán térbe. Ez egy protongradiens kialakulását eredményezi, amely szerepet játszik a mitokondriális membránpotenciál kialakulásában. Ennélfogva az energia egy elektrokémiai gradiensben tárolódik, amelyet a molekuláris oxigén vízzé redukálása hajt. A folyamat végén, az V. komplexben, a protonok visszaáramlása megy végbe, amely az adenzin-difoszfát (ADP) enzimátikus foszforilációjával jár együtt, és ATP termeléséhez vezet. Ezt a folyamatot oxidatív foszforilációnak nevezzük.

Az oxidatív foszforiláció és mitokondriális membránpotenciál változása egymással szorosan összefüggő folyamatok. A mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) mérésére több módszer is rendelkezésünkre áll. Ezek közé a módszerek közé tartozik a mitokondriális membránpotenciál indikátor (m-MPI). Egészséges sejtekben az m-MPI a mitokondriumokban vörös fluoreszcens aggregátumok formájában halmozódik fel (emisszió 590 nm-en). Amikor a $\Delta\Psi_m$ depolarizálódik, az m-MPI aggregátumok zöld fluoreszcens monomerekké alakulnak (emisszió 535 nm-en), és a citoplazmában maradnak. Ezért a vörös/zöld fluoreszcencia arány felhasználható a sejtek mitokondriális működésének meghatározására (Sakamuru és mtsai., 2016). A másik elterjedt módszer a $\Delta\Psi_m$ meghatározására a nagyfelbontású fluorespirometria, ami Safranin O fluoreszcencia detektálásával történik. Ezeken kívül van még két gyakran

alkalmazott festék a JC1 (5,5',6,6'-tetrachlór-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-karbociáninjodid) és a TMRM (tetrametil-rodamin-metil-észter). A ciánin JC1 festék hasonlóan működik, mint a m-MPI, lehetővé teszi az energetizált és deenergetizált mitokondriumok megkülönböztetését, mivel a zöld fluoreszcens festék energetizált mitokondriumokban vörös fluoreszcens aggregátumokat képez a magasabb membránpotenciál hatására (Perelman és mtsai., 2012). A TMRM egy lipofil kation, ami a $\Delta\Psi_{mt}$ -vel arányosan halmozódik fel a mátrixban és eltolódás figyelhető meg az abszorpciós és fluoreszcencia-emissziós spektrumában vörös irányba. A mitokondriális membránban való felhalmozódás hatására a fluoreszcencia intenzitása csökken (Ehrenberg és mtsai., 1988).

Érdekes módon a mitokondriális aktivitás kettős élű kardként is felfogható: egyrészt a mitokondriumok által felhasznált oxigén (O_2) nagy része teljesen redukálódik vízzé a IV. komplexben, másrészt egy kisebb rész (1–2%) részlegesen redukálódik szuperoxid-anionná (O_2^-), amelynek túlermelése potenciális veszélyt jelent. Ha egy vagy több komplex működése károsodik, a szabadgyökök fokozott termelődése tovább rontja a mitokondriális funkciókat. Ez oxidatív károsodáshoz vezet, és a mitokondriális permeabilitási pórusok (mtPTP-k) megnyitásával ez a folyamat apoptózist indukál. Napjainkig összesen 11 reaktív oxigén gyök (ROS) képző helyet különböztetünk meg a mitokondriumban, ezek közé tartozik például a piruvát dehidrogenáz, akonitáz, citokróm b5 reduktáz és a monoamin oxidáz. Szakirodalmi adatok az ETL I. és III. komplexét feltételezik a legjelentősebb mitokondriális szabadgyök termelő helyeknek (Holzerová és mtsai., 2015).

A reverz elektron transzport (RET; 2. ábra) során a szukcinát vagy más elektron donor által átadott elektronok visszafelé áramlanak a láncon a komplex I-be és szuperoxidot hoznak létre. Az RET létfontosságú szerepet játszik a sejtekben, mivel segíthet a reakcióképesség megőrzésében stresszes körülmények között, de közben magas ROS termeléséhez is vezethet, ami káros lehet a sejtekre, ha a termelés túlzott mértékű (Scialó és mtsai., 2017; Vitaly és mtsai., 2011).



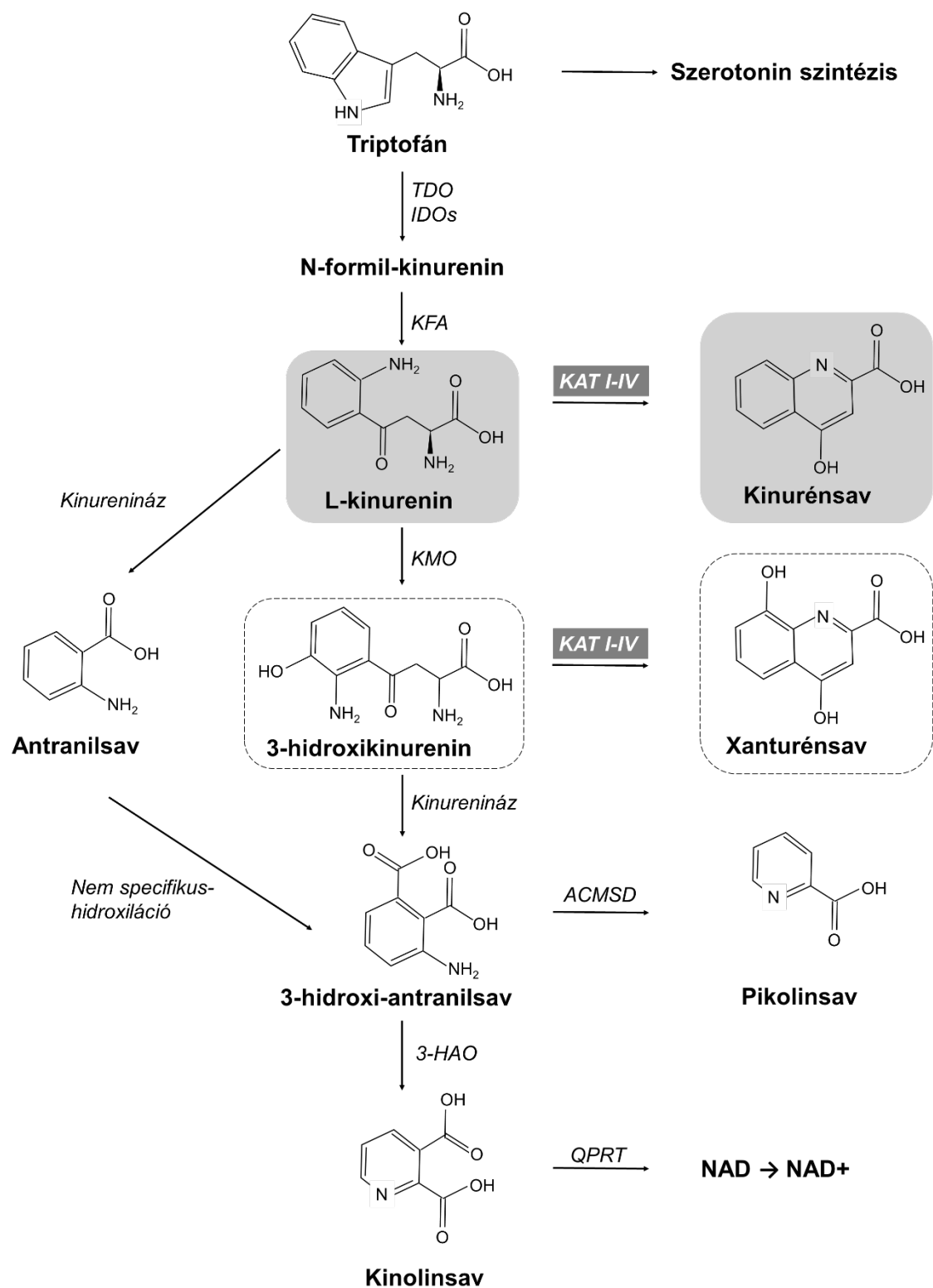
2. ábra A reverz elektron transzport folyamata (forrás: <https://fireinabottle.net/the-mitochondrial-bottleneck-as-the-carburetor-screw-how-seed-oils-cause-reductive-stress-part-ii/>)

A mitokondriális diszfunkció kulcsfontosságú szerepet tölt be különböző neurológiai és pszichiátriai rendellenességek kialakulásában. A mitokondriumok alapvető fontosságúak az energiatermelés, a sejtek anyagcseréje és az apoptotikus folyamatok szabályozása szempontjából (Martin 2010, Bustamante-Barrientos és mtsai., 2023). A mitokondrium funkcionális zavarai a sejtszintű energia homeosztázis egyensúlyának felborulásához vezethetnek, amely olyan betegségek patogeneziséhez járulhat hozzá, mint az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór és a skizofrénia (Golpich és mtsai., 2017; Norat és mtsai., 2020). Továbbá, a mitokondriális aktivitás és az oxidatív stressz közötti összetett kapcsolat rávilágít arra, hogy a mitokondriális működésnek fenntartása alapvető az idegrendszer egészséges működéséhez (Carri és mtsai., 2015; Song és mtsai., 2021). A mitokondriális működést befolyásoló alapvető mechanizmusok megismerése elengedhetetlen ahhoz, hogy hatékony terápiás módszereket lehessen kifejleszteni ezen súlyos betegségek ellen.

A triptofán (Trp)-kinurenin (KYN) anyagcsere útvonal jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezi, mivel számos neurológiai betegségben betöltött szerepe miatt potenciális új kezelési lehetőségeket nyithat meg neurológiai és pszichiátriai kórképek kezelésében (Fujigaki és mtsai., 2017; Mithaiwala és mtsai., 2021). Ez az anyagcsereútvonal kulcsfontosságú szerepet játszik mind az alap kutatásokban, mind a terápiákban, mivel jelentős hatással van neurodegeneratív és pszichiátriai betegségek kialakulására. A Trp-KYN útvonalat a triptofán

anyagcseréjének elsődleges útvonalaként tartjuk számon, a triptofán körülbelül 95%-a ezen az úton alakul át (Tanaka és mtsai., 2021; Savitz és mtsai., 2020).

A reakciósorozat kezdetén (3. ábra) a Trp oxidálódik N-formil-kinurénné (N-f-KYN), amelyet triptofán-2,3-deoxigenáz (TDO) vagy a kevésbé specifikus indolamin-2,3-deoxigenázok (IDOs) katalizálnak. Az N-f-KYN ezután kinurenin-formamidáz (KFA) segítségével hidrolizálódik L-kinureninné (L-KYN). Az L-KYN tartós átalakulását kinurénsavvá (KYNA) a piridoxál-5'-foszfát-függő enzimek közé tartozó kinurenin-aminotranszferáz izoenzimek (KAT-ok vagy KAT I-IV) katalizálják.



3. ábra A triptofán-kinurenin anyagcsereútvonal.

A Trp anyagcsereútvonal két mellékterméke az L-KYN és a KYNA eltérő hatással bír a központi idegrendszerre (KIR) és a nem neuronális szövetekre. Az L-KYN egy N-metil-D-aszparaginsav receptor (NMDA-R) agonista, és neurotoxicitásban, mitokondriális

diszfunkcióban, neurodegeneratív betegségekben és pszichiátriai zavarokban játszik szerepet. A KYNA egy endogén NMDA-R antagonist, amely fontos szerepet tölt be az immunosuppresszióban, a sejtvédelemben, az értágításban, valamint a mitokondriális és bélhomeosztázis fenntartásában (Wirthgen és mtsai., 2018; Seo és mtsai., 2023). Ezért az L-KYN/KYNA arány és az endogén KYNA koncentráció fenntartása terápiás potenciállal rendelkezhet bizonyos betegségek esetén (Johansson és mtsai., 2013; Liu és mtsai., 2018).

A KYNA nemcsak az NMDA-R antagonistaként működik, hanem az aril-hidrokarbon receptor (AHR) és a G-protein kapcsolt receptor 35 (GPR35) endogén ligandja is lehet (Moroni és mtsai., 2012; Alkondon és mtsai., 2015). Az AHR szerepe kiemelkedő a toxikus válaszreakciók kialakításában, például a hepatotoxicitásban és a termékenység csökkenésében (Pascussi és mtsai., 2008), valamint immunmodulációs hatásai is lehetnek (Tanaka és mtsai., 2020). A GPR35 receptor aktivációja révén a KYNA képes csökkenteni a serkentő poszt-szinaptikus potenciálok amplitúdóját az agy bizonyos területeiben (Berlinguer-Palmini és mtsai., 2013) és antiinflammatorikus hatást fejt ki más szövetekben (Tanaka M. és mtsai., 2020). Ezenkívül a GPR35 szabályozza az energiateljesítést (Agudelo és mtsai., 2018), míg az AHR szerepet játszik a mitokondriális homeosztázis fenntartásában a mitofágiát szabályozó BNIP3 fehérje révén (Heo és mtsai., 2023).

A KAT enzimek a glutamát, lizin és aszpartát anyagcserében is szerepet játszanak (Tanaka és mtsai., 2022). A KAT II enzim az α -ketoglutarátot 2-oxoadipáttá alakítja, amely az acetyl-CoA előanyaga. Feltételezhetjük, hogy a KAT II enzim hiánya az oka, hogy az α -ketoglutarát-2-oxoadipát-acetyl-CoA átalakulás gátolt a KAT II KO egerekben. Az acetyl-CoA elengedhetetlen a Szent-Györgyi-Krebs-ciklus első lépéséhez, ahol az oxálacetát citráttá alakul. Ennek hiányában csökken a NADH és FADH₂ szintje, ami az oxidatív foszforiláció (OXPHOS) kapacitásának csökkenéséhez vezet.

Eddig négy KAT enzim került azonosításra az emlősök agyában. Ezek közé tartozik a glutamin transzamináz K (KAT I), az aminoadipát-aminotranszferáz (KAT II), a glutamin-transzamináz L (KAT III), valamint az aszparaginsav-aminotranszferáz (KAT IV) (Han és mtsai., 2010; Tanaka és mtsai., 2021). Ezek közül az enzimek közül a KAT II tekinthető a kulcsenzimnek, amely a KYNA termeléséért felelős az emlősök agyában (Tanaka és mtsai., 2021), ezért ezen tanulmányunkban ezzel foglalkoztunk részletesebben.

A KAT-ok az L-KYN-KYNA átalakítás mellett széles szubsztrátspecifitással és funkcióval rendelkeznek, mind a négy izoenzim részt vesz a mitokondriumban zajló Szent-Györgyi-Krebs

ciklushoz kapcsolódó reakciókban (Tanaka és mtsai., 2022). Például a citoszolikus KAT I katalizálja az L-cisztein piruváttá való átalakulását, valamint elősegíti az L-glutamin α -ketoglutarát átalakulást. A KAT II és KAT III katalizálják az α -ketoglutarát L-glutamáttá történő átalakulását. Emellett a KAT II katalizálja az α -ketoglutarát 2-oxoadipáttá történő átalakulását, amely végül acetyl-CoA-ra bomlik le. A KAT III szintén katalizálja az L-cisztein piruváttá történő átalakulást.

Bár az exogén KYNA és szintetikus analógjai (SZR-72 és SZ-104) által közvetített mitoprotektív hatás jól ismert neuronális és nem neuronális szövetekben gyulladásos, valamint ischaemiás-hipoxiás körülmények között (Juhász és mtsai., 2020; Poles és mtsai., 2021; Balla és mtsai., 2021), kevés információ van az endogén KYNA mitokondriális hatásairól és a KAT enzimek szerepéről a mitokondriális anyagcserében. Mivel a KYNA szintézisének jelentős részét a KIR-ben a mitokondriális KAT II katalizálja (amelyet az aadat gén kódol), feltételezhető, hogy az endogén KYNA szabályozó funkciója *in vivo* kimutatható az izoenzim manipulációjával. Hipotézisünk szerint az endogén KYNA a mitokondriális elektrontranszport és az ATP szintézis szabályozójaként működik és a KAT enzimek modulációja preklinikai kutatások során terápiás célpontként szolgálhat.

Célkitűzés

Jelen munkánk célja az endogén kinurénsav szintézisért felelős kinurenin-aminotranszferáz II enzim mitokondriális hatásainak vizsgálata cerebellumban. Kísérleteinkben megvizsgáltuk az oxigénfogyasztást, a membránpotenciált és a CI, illetve CIII függő reaktív oxigéngyökök képzését. A kérdéseink megválaszolására kinurenin aminotranszferáz II génkiütött egértörzseket alkalmaztunk.

Anyagok és módszerek

Állatok tartása

Az állatokat műanyag ketrecben (21-23 °C), 12/12 órás sötét/világos ciklus mellett tartottuk, továbbá standard rágcsáló eledelhez és vízhez ad libitum hozzáférhettek. A kísérleteket az Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézeteinek (NIH) állatkísérletekre vonatkozó irányelvei és az EU 2010/63/EK irányelve, a tudományos célra felhasznált állatok védelméről szóló szabályozás alapján végeztük (engedélyszám: V/175/2018). A kísérleteink során a 3R-elv (reduction, refinement, replacement) alapján jártunk el. A kísérleti állatok tartását és felhasználását szigorú szabályozás alatt végeztük és kísérletekre kizárólag olyan állatokat alkalmaztunk, amelyeket kifejezetten erre a célra tenyésztettek.

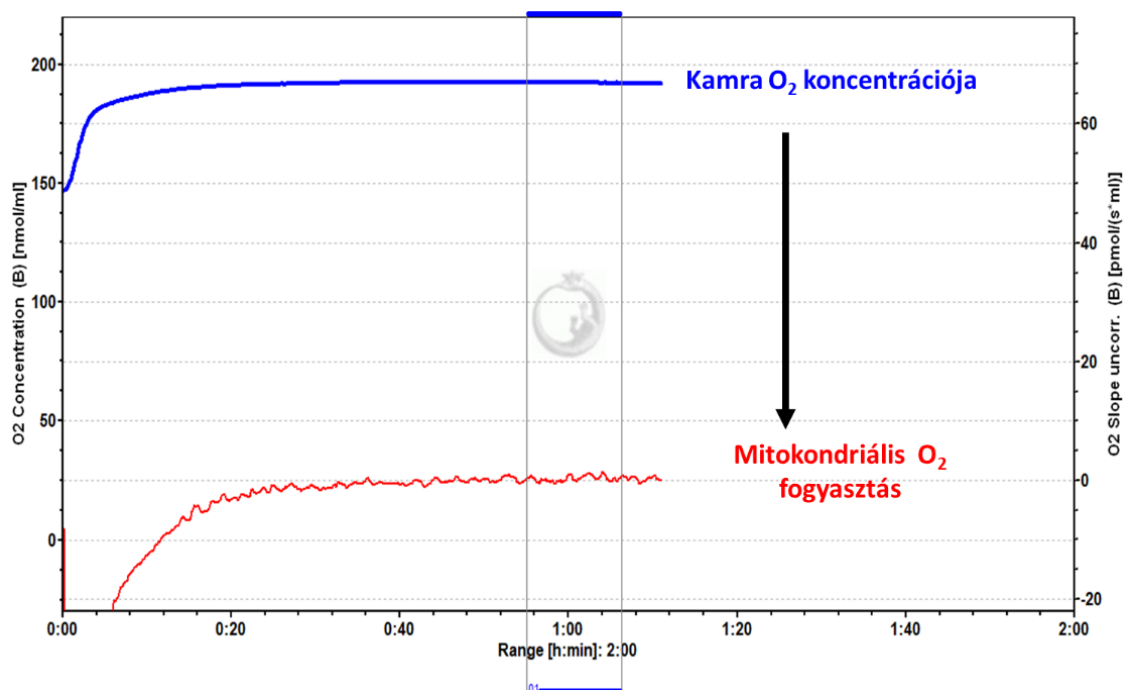
Agyszöveti minták preparálása

A kísérletek 8-10 hetes 25 ± 2 g súlyú, hím C57BL/6N vad típusú (wt) és KAT II KO egerekben végeztük (n=20/csoport; CRISPR/Cas9 módszer). Az állatok altatása ketamin-xilazin keverékkel történt (80 mg/kg ketamin és 24 mg/kg xilazin 0,9% NaCl oldat), az állatokat sebészeti ollóval dekapitáltuk. A dekapitalás után a fejét jégen hűtött Petri-csészén helyeztük el. A preparáció első lépése a koponya felszabadítása volt, ezt úgy végeztük el, hogy sebészeti ollóval a fejen lévő bőrt az anteroposterior tengely mentén kettévágtuk. Az olló széléit a szemüregbe helyezve elvágtuk a közöttük elhelyezkedő koponyacsontot, ezután eltávolítottuk a nyaki izmokat. Ezután a csipesz összezárt végét a koponya középső része alá helyeztük, és áttörtük a nyakszirt csontot, majd a koponyát lebontottuk anélkül, hogy megsértettük volna az agyat. A ventrális idegek megszakításával, kranio-kaudális irányban kifordítottuk az agyat a koponya megmaradt részéből, majd egy jégen hűtött Petri-csészére helyeztük. A cerebellum preparálását úgy végeztük, hogy a lándzsatűt a kisagy és gerincoszlop/agytörzs közé helyeztük, ezután határozott mozdulattal mediolaterális irányban mindkét oldalon elvágjuk a penduculusokat. Végül eltávolítottuk a cerebellumot az agy többi részéről. Az egérkolóniák fenntartását együttműködő partnerünk végezte (Idegtudományi Kutatócsoport, Magyar Tudományos Akadémia (MTA)-Szegedi Tudományegyetem (SZTE)) (Szabó és mtsai., 2024; Állatkísérletes engedélyszám: XI./95/2020).

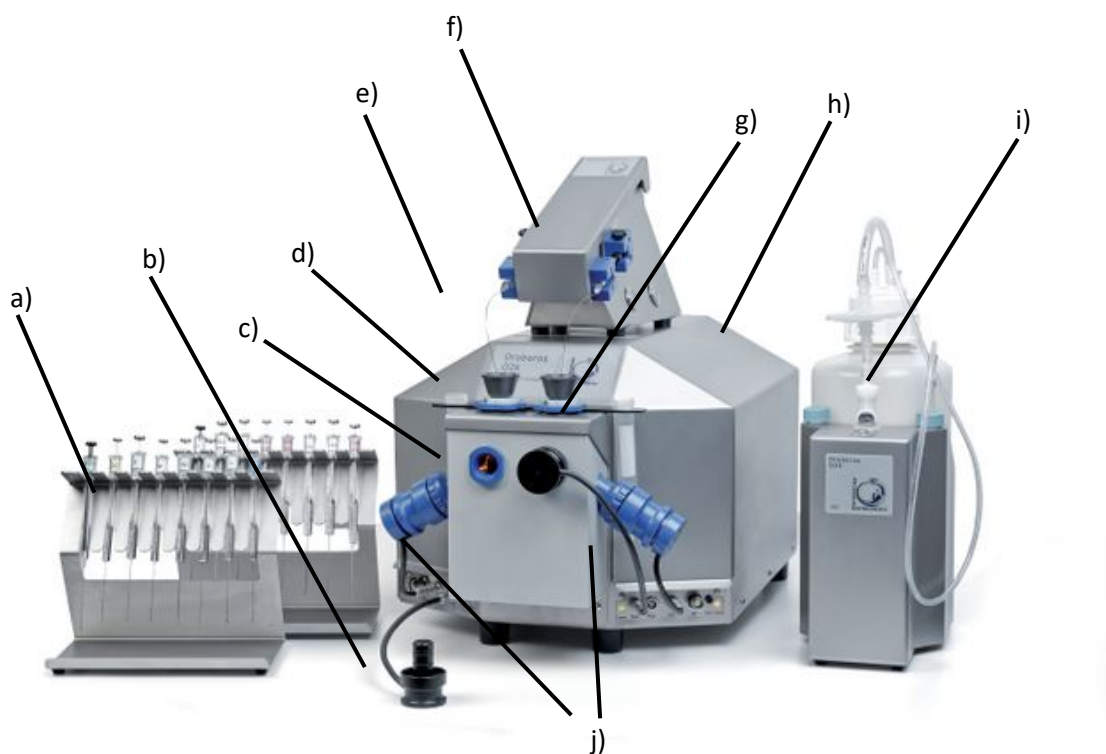
A mitokondriális respiráció vizsgálata

A mitokondriális oxigén fogyasztást cerebellumban vizsgáltuk két kamrából álló (2-2 mL térfogat), nagy felbontású Oroboros FluoRespirometria (5. ábra) segítségével. A műszer valós idejű O₂-fogyasztás mérésére alkalmas, a kamrákat stopperrel történő lezárását követően.

(Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria; Juhász és mtsai., 2020; Poles és mtsai. 2021). A kamrák lezárását követően a kamrák O_2 koncentrációjának csökkenése egyenesen arányos az O_2 -fogyasztással.



4. ábra Respirométer kalibrációja



5. ábra Nagyfelbontású fluoresziométer felépítése (Oroboros Instruments)

A fluorespirométer részei:

- a) Hamilton fecskendők b) fluoreszcens szenzor c) kamraablak d) kamrához tartozó stopper e) kamrához tartozó fecskendő f) mikroinjektor g) Peltier modul ($\pm 0,001$ °C) h) gépház i) folyadékelszívó j) A és B kamrához tartozó O₂ szenzorok

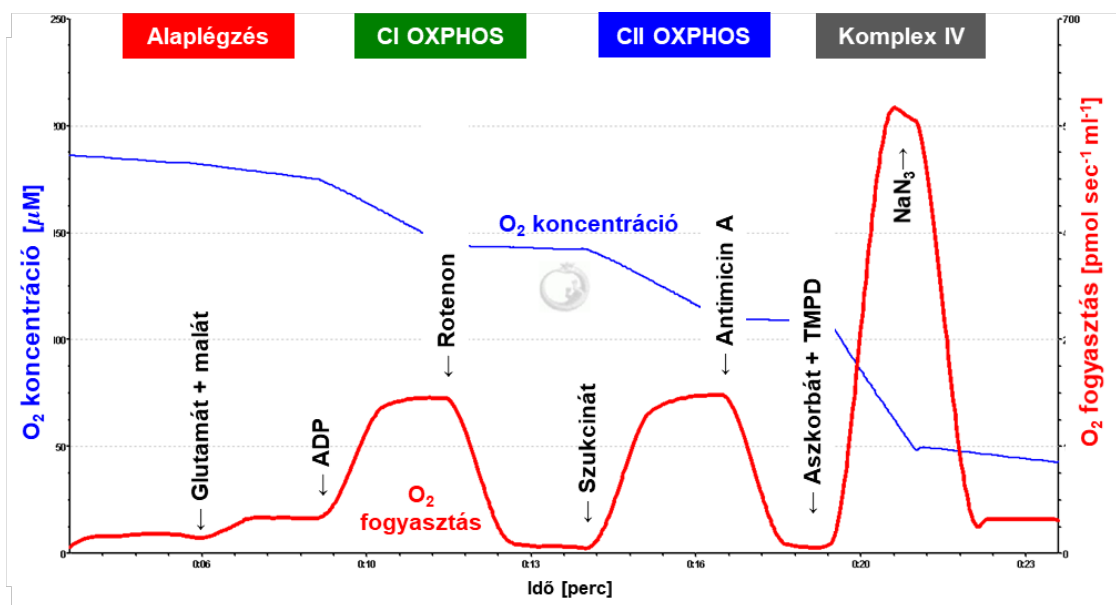
A cerebellum mintákat nedves tömeghez mérten 5x-es mennyiségű Mir05 médiumban (2. táblázat) (pH 7,1) homogenizáltuk (2 cm³ Potter-Elvehjem-mel).

Mir05 alkotóelemei	Végző koncentráció	FW	1 L végtérfogathoz adott mennyiség	Forrás, tárolási hőmérséklet
EGTA	0,5 mM	380,4	0,190 g	Sigma E 4378 (25 g); RT
MgCl₂·6 H₂O	3 mM	203,3	0,610 g	Scharlau MA 0036 (250 g); RT
Laktobionsav	60 mM	358,3 savmentes	120 ml 0,5 M K-laktobionát törzsoldat	Aldrich 153516 (100 g); RT
Taurin	20 mM	125,1	2,502 g	Sigma T 0625 (25 g); RT
KH₂PO₄	10 mM	136,1	1,361 g	Merck 104873 (1 kg); RT
HEPES	20 mM	238,3	4,77 g	Sigma H 7523 (250 mg); RT
D-szacharóz	110 mM	342,3	37,65 g	Roth 4821.1 vagy Sigma H 84097** (1 kg); RT
BSA, zsírsavmentes	1 g/l		1 g	Sigma A 6003 fraction V (25 g); 4 °C

2. táblázat Mitokondriális respirációs médium Mir05 összetevői.

Az I-es komplexhez kötött oxidatív foszforilációt (CI OXPHOS) az I-es komplexet aktiváló szubsztrátok (10 mM glutamát és 2 mM malát) és ADP (2,5 mM) jelenlétében mértük. Ezután rotenonnal (0,5 µM) gátoltuk az I-komplexet és a II-es komplexhez kötődő oxidatív foszforilációt (CII OXPHOS) szukcinát (10 mM) és adenilát jelenlétében értékeltük. Miután gátoltuk a komplex III-at antimicin A-val (2,5 µM), megmértük a Komplex IV respirációs aktivitását TMPD-vel, ami egy mesterséges szubsztrát. Az aszorbátot (2 mM) a TMPD előtt adtuk a mintához, hogy elkerüljük az elektron donor autooxidációját. Végül nátrium-aziddal

(NaN_3 ; 100mM) blokkoltuk a Komplex IV mitokondriális O_2 fogyasztását (6. ábra). Az összes mérést Mir05 respirációs médiumban végeztük 37°C-on folyamatos mágneses keverés (750 rpm) mellett. DatLab szoftvert (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria) használtunk a respirometria adatok gyűjtéséhez és elemzéséhez.

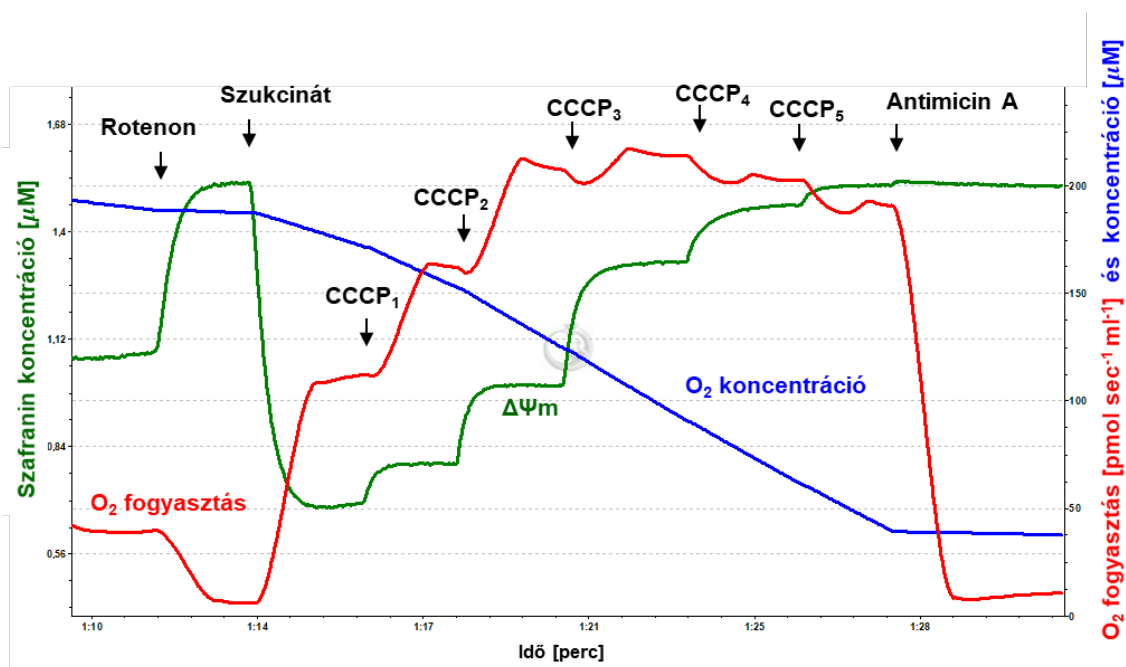


6. ábra A mitokondriális légzés mérésének protokollja. A diagram vonalai a mitokondriális O_2 fogyasztást (O_2 -flux; piros) és a kamrai O_2 koncentrációt (kék) szemléltetik.

Mitokondriális membránpotenciál vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_{\text{mt}}$) mérésére KAT II KO egér törzset alkalmaztunk, mivel az endogén KYNA-t elsősorban a KAT II termeli az agyszövetben és a KAT II kizárólag a mitokondriumban található meg. A $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ változásait kisagyi homogenátumban (5% w/v) értékeltük kationos fluoreszcens festék, safranin (Saf; Sigma Aldrich), St. Louis, Mo., USA) segítségével. A festék az energetizált mitokondriumban halmozódik fel a belső negatív potenciálnak megfelelően, miközben egyidejűleg megváltozik az abszorpció és a fluoreszcencia (Krumshabel és mtsai., 2014). Korábbi vizsgálataink alapján a Komplex II respirációját a 2 μM Saf koncentráció nem befolyásolja és a fluoreszcencia spektrális változás egyenesen arányosak a $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ -val a 0,5-2 μM koncentrációs tartományban (Juhász és mtsai., 2020). A kék fluoreszcens szenzort (Oroboros Instruments, Ausztria), amelyet safranin mérésére szolgáló szűrővel láttak el (gerjesztési hullámhossz: 465 nm; erősítés: 1000; polarizációs feszültség: 500 mV), a fluoreszcencia vezérlőegységéhez csatlakoztattuk a mérőkamrák üveglapjain keresztül (Saf fluoreszcencia mérés). A respirációs médium, a

keverés sebessége és a kamrák hőmérséklete megegyezett a mitokondriális respiráció vizsgálatánál leírtakkal. Fekete fedőkel takartuk le a stoppereket, hogy megakadályozzuk a fény bejutását és elkerüljük a fluoreszcens elvesztést. A Komplex I-et rotenonnal (0,5 μM) gátoltuk, majd a cerebellum mintát szukcináttal (10 mM) energetizáltuk. Miután a respiráció és a fluoreszcencia stabilizálódott, egy szétkapcsolószert, a karbonil-cianid m-klórfenil-hidrazont (CCCP) titráltunk be a kamrákba 4-5 lépésben (0,05 μM lépésenként), ezzel idéztük elő a $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ fokozatos depolarizációját. Amikor az optimális CCCP koncentráció után a $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ megszűnt, a szétkapcsolt respirációt antimicin A-val (2,5 μM) gátoltuk (7. ábra). A Saf fluoreszcenciában bekövetkező változásokat, amelyek indikátorai a $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ -nak, a standard kalibrációs görbe alapján μM -ban fejeztük ki.



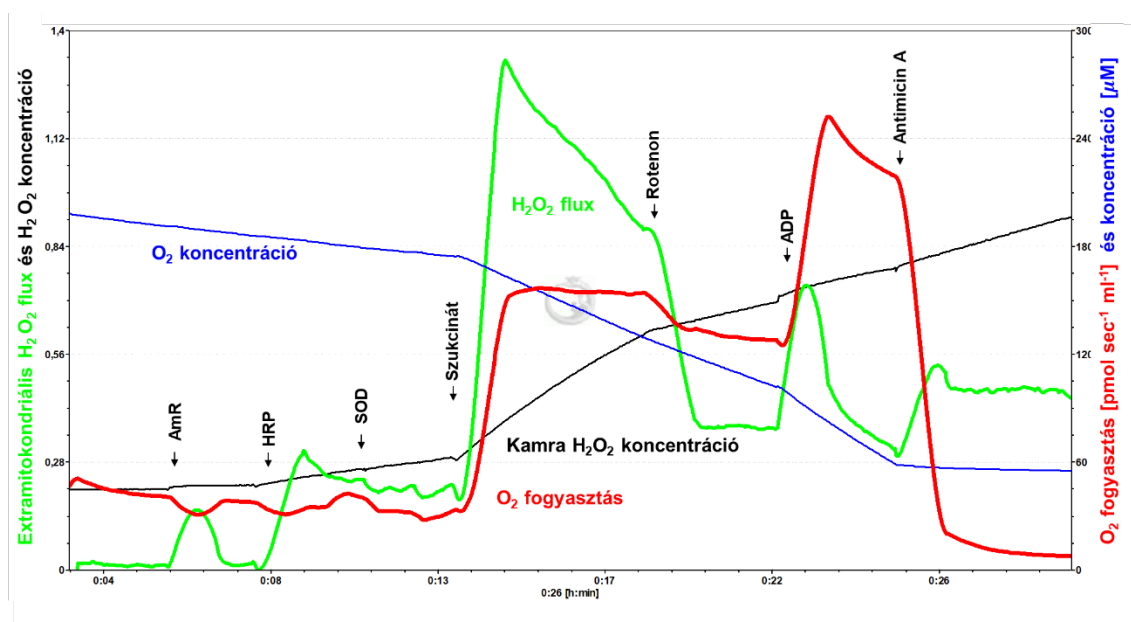
7. ábra Membránpotenciál mérésének protokollja. A diagram vonalai a $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ -t (zöld), a mitokondriális O_2 fogyasztást (O_2 flux; piros) és az O_2 koncentrációt (kék) szemléltetik.

Extramitokondriális H_2O_2 termelődés vizsgálata

A reverz elektrontranszport indukált (RET; komplex I függő) és komplex III-függő reaktív oxigén gyökök képződését cerebellum homogenizátumból határoztuk meg. A szukcináttal indukált (10 mM) extramitokondriális H_2O_2 termelést (RET-hez köthető), zöld fluoreszcencia szenzorral mértük. A szenzor az üvegekamrák ablakaihoz és a respirométerhez van csatlakoztatva. Amikor a mitokondriumokat szukcináttal indukáljuk (CI gátló rotenon nélkül) a magas mitokondriális membránpotenciál mellett a Komplex II-ből (CII) a Komplex I-be (CI)

irányuló reverz elektrontranszport (RET) reaktív oxigén gyökök (ROS) képződését idézi elő. A módszer Mir05 respirációs médiumban történő hidrogén-peroxid (H_2O_2) mérésen alapul (Komlódi és mtsai., 2018). Az AmplexUltraRed (AmR) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass., USA) H_2O_2 -vel torna-peroxidáz (HRP; 1:1 sztöchiometria) jelenlétében reagál, ennek a reakciónak az eredményeként fluoescens termék, rezorufin keletkezik. A CI-hez kapcsolódó ROS termelés a szukcinát beadását követően rotenonnal ($0,5 \mu\text{M}$) gátolható. A kísérlet végén a RET-től független, komplex III-hoz köthető mitokondriális ROS képződést antimicin A-val stimuláltuk ($2,5 \mu\text{M}$) (8. ábra).

A RET és komplex III-függő ROS felszabadulást az extramitokondriális H_2O_2 termelés tükrözi. A DatLab szoftvert használtuk a respirometria adatok rögzítéséhez és a mitokondriumokban végbemenő H_2O_2 felszabadulás méréséhez.



8. ábra Extramitokondriális H_2O_2 termelés protokoll. A diagram vonalai a H_2O_2 fluxt (zöld), a mitokondriális O_2 fogyasztást (O_2 flux; piros), kamra H_2O_2 koncentrációt (fekete) és a kamra O_2 koncentrációt (kék) szemléltetik.

Statisztikai analízis

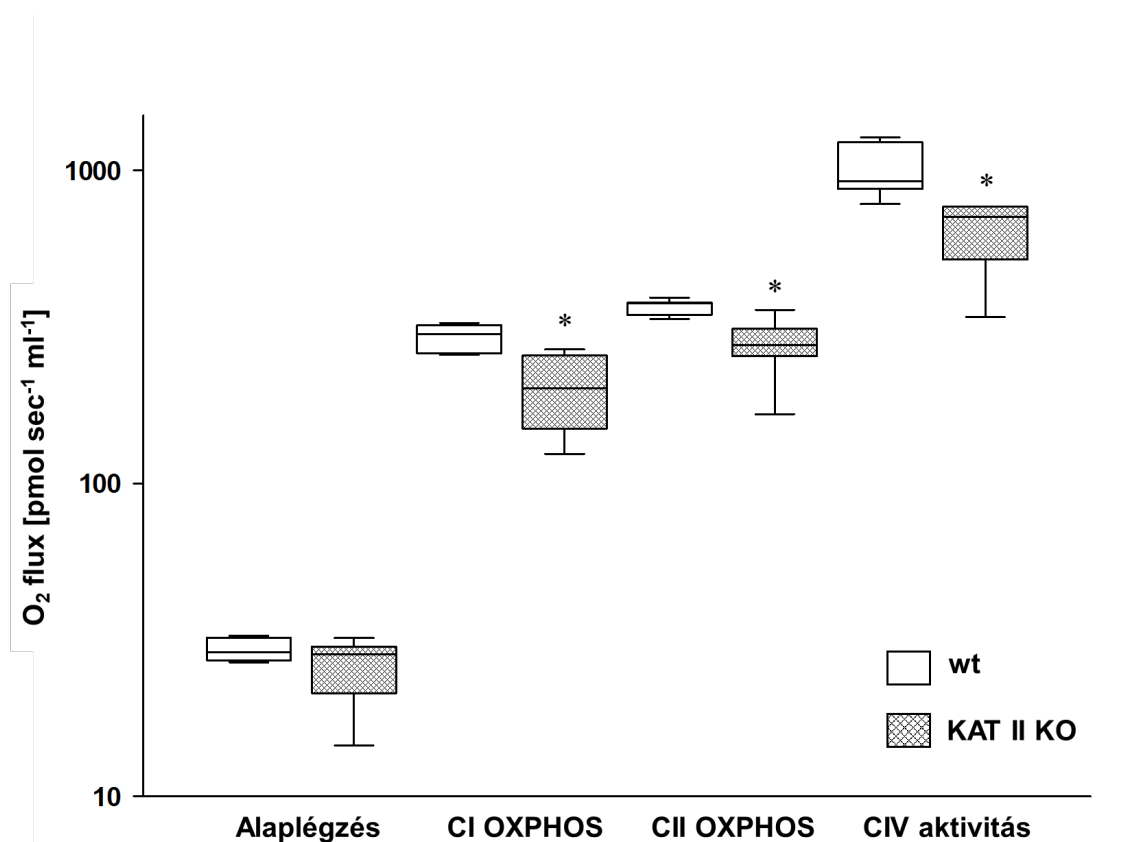
Az adatelemzést és az ábrák elkészítését a SigmaPlot statisztikai szoftvercsomaggal végeztük el (SigmaStat for Windows; Jandel Scientific, Erkrath, Németország). Az adatok normál eloszlását Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk. Az O_2 -fogyasztás közötti különbségek kiértékelését, $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ értékek eltéréseit és a H_2O_2 flux változásokat Student-féle t-próbával

hasonlítottuk össze a wt és KAT II KO csoportok között. Az ábrákon szerepelnek a medián értékek és a 75., valamint 25. percentilisek. A $P < 0,05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

Eredmények

Mitokondriális O_2 fogyasztás a cerebellumban

A kamrák lezárása után az exogén szubsztrát nélküli alaplégzés nem mutatott jelentős eltérést a wt és KAT II KO cerebellum minták között. A komplex specifikus szubsztrátok hozzáadása az oxigráf kamrákhoz növelte a mitokondriális oxigénfogyasztást, amelyeket hatékonyan blokkoltak az ETL inhibitorok, a Komplex I-nél és III-nál, egy közel $0 \text{ pmol} \times \text{sec}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ értékre. A wt csoporthoz képest a KAT II KO állatok minden kulcsfontosságú mitokondriális légzési paraméterben alacsonyabb O_2 fogyasztás értéket mutattak. Így mind a CI OXPHOS, mind a CII OXPHOS, valamint a CIV aktivitási értékek jelentősen csökkentek a KO törzsben (9.ábra).

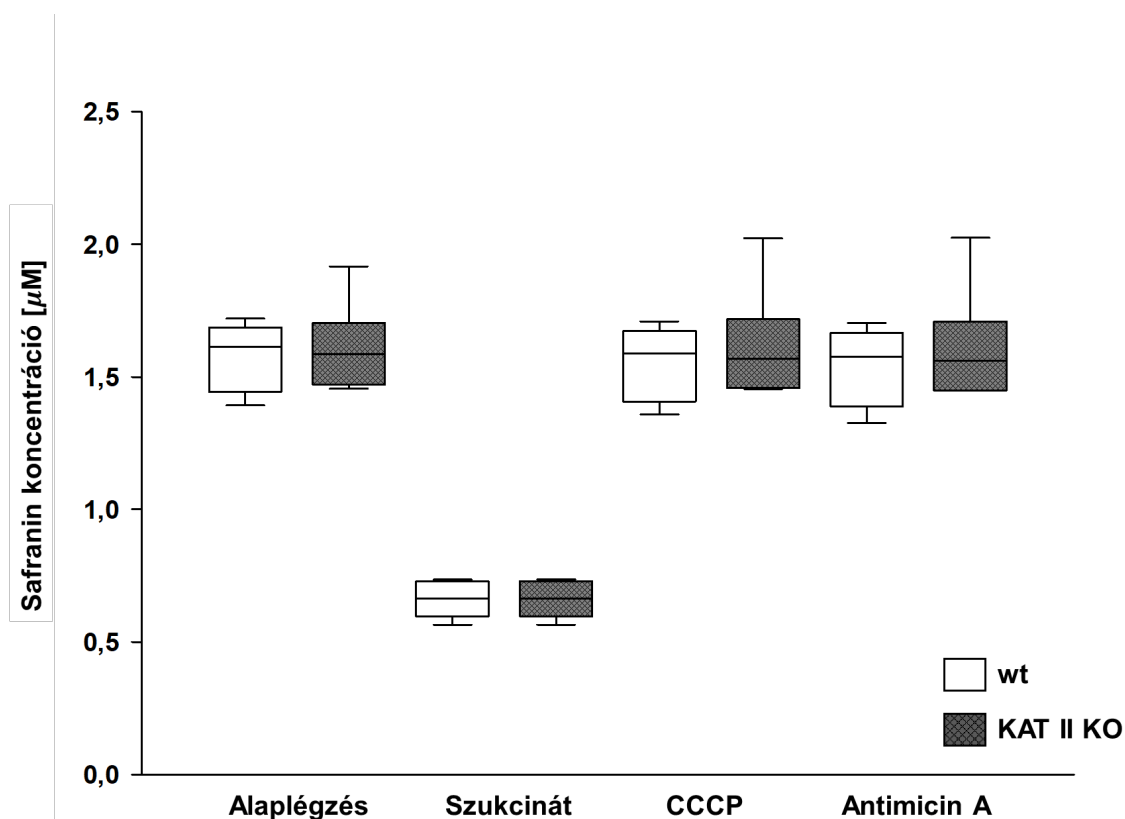


9. ábra Alaprespiráció, a Komplex I-hez és II-höz kapcsolódó maximális oxidatív foszforilációs kapacitás, valamint a Komplex IV aktivitások a vad típusú (üres doboz) és KAT

II KO (szürke doboz) egér cerebellumban. A grafikon a mediánt (vízszintes vonal a dobozban), valamint a 25. (alsó bajusz) és a 75. (felső bajusz) percentilist mutatják. $P < 0,05$ a wt csoporttal szemben.

Változások a cerebellum mitokondriális membránpotenciálban

A Komplex I gátlása és a fluoreszcencia stabilizálása után a Saf alapkonzentrációi hasonlóak voltak a wt és a KAT II KO egerekben, amint azt a 10. ábra illusztrálja. A szukcinát hozzáadása azonnali fluoreszcencia jel csökkenést eredményezett, amely 120 másodpercen belül stabilizálódott. Ez a szubsztrát által kiváltott csökkenés (a szukcinát indukált hiperpolarizáció) szinte azonos volt a wt és KAT II KO csoportok között. A mitokondrium fokozott stimulációja CCCP-vel depolarizációt eredményezett (safranin fluoreszcencia növekedés) és a $\Delta\Psi_{mt}$ megszűnését (a fluoreszcencia jel stabilizálódását) egy kritikus CCCP koncentrációnál. Nem találtunk jelentős különbségeket a CCCP által előidézett $\Delta\Psi_{mt}$ megszűnésében a csoportok között.

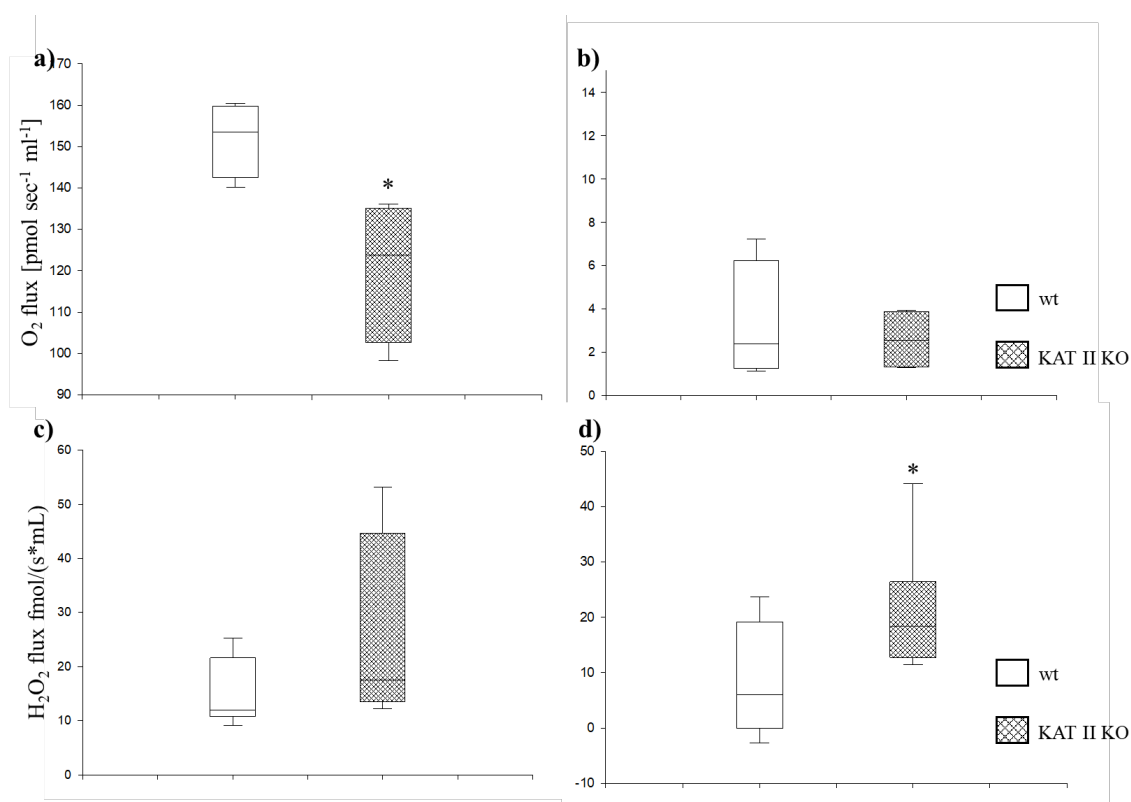


10. ábra Változások a $\Delta\Psi_{mt}$ -ben. A Saf alapkonzentrációja, a szukcinát által kiváltott hiperpolarizációt és a CCCP által indukált depolarizációt ($\Delta\Psi_{mt}$ elvesztést) a wt (üres doboz) és a KAT II KO (szürke doboz) egerek cerebellumában értékeltük. A grafikonon a mediánt

(vízszintes vonal a dobozban), valamint a 25. (alsó bajusz) és 75. (felső bajusz) percentilist mutatják.

Extramitokondriális H_2O_2 termelődés

Méréseink alapján a legjelentősebb H_2O_2 termelés a CI és CIII-hoz köthető. A KAT II KO egerekben a S által indukált O_2 fogyasztás szignifikánsan lecsökkent a wt egerekhez képest, míg a H_2O_2 mennyisége mindkét csoportban emelkedett, bár ez statisztikailag nem volt szignifikáns. AmA jelenlétében az O_2 fogyasztás közel 0 nullára esett a légzési lánc blokkolása miatt. Az AmA-val kiváltott H_2O_2 termelés fokozódása jelentősen magasabb értéket mutatott a KAT II KO egerekben a vad típushoz viszonyítva (11. ábra).



11. ábra Az O_2 és H_2O_2 flux változások S és AmA hatására KAT II KO (szürke doboz) és wt (üres doboz) egerekben. Az a) ábrán a S jelenlétében mért oxigén fogyasztás, a b) ábrán az AmA jelenlétében mért oxigén fogyasztás, a c) ábrán a S jelenlétében mért H_2O_2 termelés és a d) ábrán az AmA jelenlétében mért H_2O_2 kibocsátás látható. A grafikonon a mediánt (vízszintes vonal a dobozban), valamint a 25. (alsó bajusz) és 75. (felső bajusz) percentilist mutatják.

Összefoglalás

Jelen munkánk célja a kinurenin-aminotranszferáz II enzim cerebellumban betöltött mitokondriális szerepének vizsgálata, amely az endogén kinurénsav szintéziséért felelős. Kísérleteink során meghatároztuk a mitokondriális légzést, a membránpotenciált, valamint a reaktív oxigéngyökök termelődését KAT II KO génkiütött egértörzseken.

Szabó és munkatársai (2024) egy nemrégiben készült tanulmányban komplex változásokat mutattak ki a triptofán anyagcserében újonnan létrehozott KAT II KO transzgenikus állatokban. A nyolchetes knock out egerek alacsony plazma KYN, 5-hidroxiindolecetsav és indol-3-ecetsav koncentrációkat mutattak. A KAT enzimek, a kinurenináz és a monoamin-oxidáz/aldehid-dehidrogenáz enzimaktivitása csökkent, míg a kinurenin-3-monooxygenáz aktivitása emelkedett. Ezenkívül az oxidatív stressz és az excitotoxicitás markerei jelentős növekedést mutattak és depressziószerű viselkedés jelent meg a KAT II KO törzsben. Ezzel szemben, Potter csoportja három hetes, fiatal KAT KO egereken kimutatta az extracelluláris glutamátszint növekedését, valamint a kognitív képességek és a szinaptikus plaszticitás fokozódását az alacsonyabb KYNA szint következtében (Potter et al., 2010). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a KAT enzimek alapvető szerepet játszanak a KIR élettani funkcióinak szabályozásában az endogén KYNA bioszintézis révén.

A vad típusú egerekhez képest a KAT II KO egerek cerebellumában szignifikánsan alacsonyabb oxigénfogyasztási értékeket regisztráltunk a komplex-specifikus méréseknél. Így a KAT II kiütésével csökkent a Komplex I- és II-függő oxidatív foszforiláció és Komplex IV aktivitás, amely arra utalhat, hogy az enzim alapvető szerepet játszik a mitokondrium energiatermelésében; ennek hiánya hozzájárulhat a csökkent ATP-szintézishez és sejtfunkcióhoz.

Két fő mechanizmust feltételezünk a KAT II KO által kiváltott a mitokondriális légzés csökkenés és az alacsonyabb OXPHOS kapacitás hátterében. Az egyik a KYNA közvetlen hatásainak tulajdonítható, míg a másik a KYNA mitoprotektív hatásaitól független és más enzimatis folyamatokkal áll összefüggésben. A KAT izoenzimnek alapvető feladata a KYNA szintézise az L-KYN irreverzibilis transzaminációja során. Valószínű, hogy az enzimaktivitás csökkenésének következtében minden KAT II KO egérben csökken az endogén KYNA termelés.

A KYNA az NMDA-R endogén antagonistája és ezáltal hozzájárul az NMDA-R működésének finomhangolásához. Nem zárható ki, hogy a KYNA más, receptorok által közvetített mechanizmusokat is befolyásol, mivel agonistaként hat az AHR és GPR35 receptorokra is (Wirthgen és mtsai., 2018). A GPR35 szabályozza az energiafelhasználást (megnövekedett lipidmetabolizmus és mitokondriális légzés) (Agudelo és mtsai., 2018), míg a mitokondriális homeosztázis fenntartásában (a mitofágia receptor BLC2 interakciós fehérje 3, azaz BNIP3 szabályozása) az AHR játszik szerepet (Heo és mtsai., 2023).

A KAT enzimek részt vesznek a glutamát, lizin és aszpartát anyagcserében is (Tanaka és mtsai., 2022). A KAT II enzim katalizálja az α -ketoglutarát 2-oxoadipáttá történő átalakulást, amely az acetil-CoA képződésének prekursora. Feltételezhető, hogy a KAT II enzim hiánya miatt az α -ketoglutarát-2-oxoadipát-acetil-CoA átalakulás gátolt a KO egerekben. Az acetil-CoA szükséges a Szent-Györgyi-Krebs ciklus első lépéséhez, amely az oxálacetát citráttá alakítását végzi. Ennek hiányában csökkenhet a NADH és FADH₂ mennyisége, ami az OXPHOS kapacitás csökkenését eredményezi.

A mitokondriális membránpotenciál fenntartása elengedhetetlen a proton grádiens és az ATP szintézis fenntartásához. A $\Delta\Psi_{mt}$ kulcsfontosságú indikátora a sejtek életképességének, csökkenése celluláris stresszel és apoptózissal áll összefüggésben, és megszűnése elősegítheti az mPTP-mediált sejthalált. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az ETL és az OXPHOS szabályozása i) $\Delta\Psi_{mt}$ és/vagy ii) ATP függő. Az ATP közvetlenül gátolja a citokróm c oxidáz (IV-es komplex) működését a $\Delta\Psi_{mt}$ -tól függetlenül eukarióta szervezetekben (Kadenbach és mtsai., 2021; Ramzan és mtsai., 2010, 2022). Safranin fluoreszcenciamérések során nem találtunk különbséget a szukcinát-indukált hiperpolarizáció vagy a CCCP által stimulált depolarizáció között a wt és a KAT II KO csoportok között, ami arra utalhat, hogy a mitokondriális ATP-szintézis szabályozása függetlenül történik a $\Delta\Psi_{mt}$ -tól.

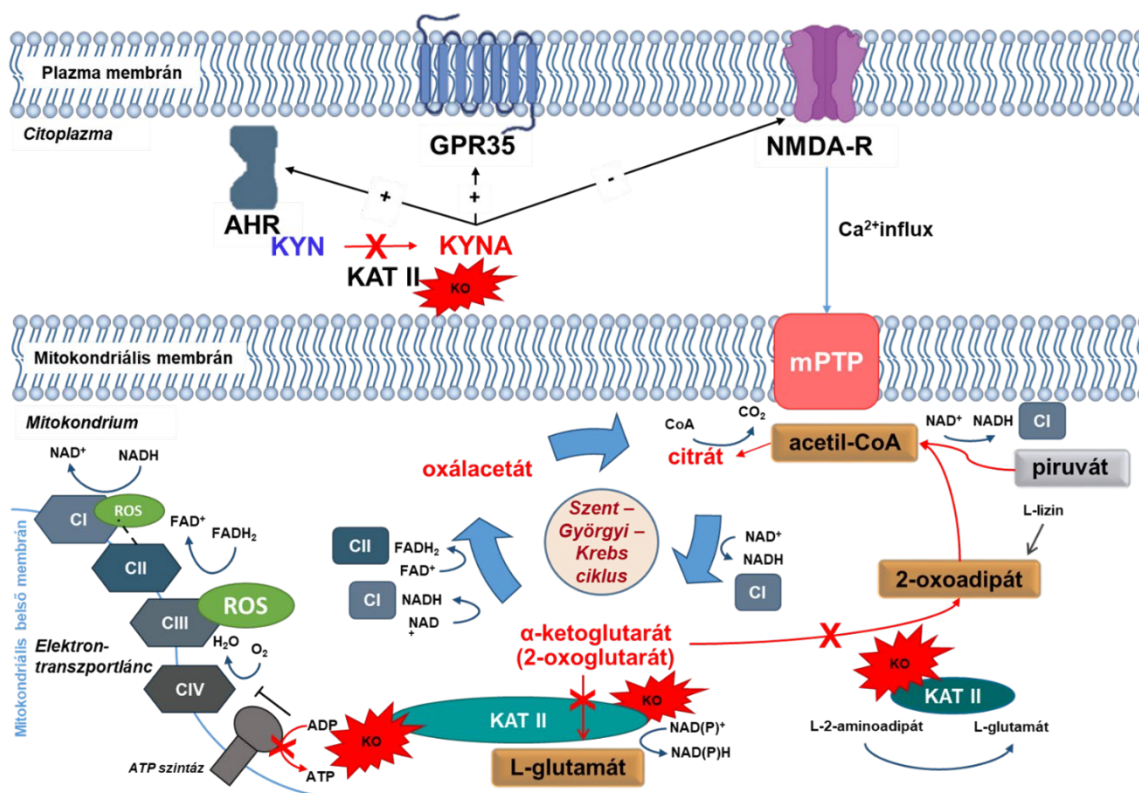
A mitokondriális komplexek károsodása a szabadgyökök túltermeléséhez vezethet, amelyek tovább ronthatja a mitokondriális funkciót, oxidatív károsodást és az mtPTP-k megnyitásával apoptózist előidézve. 11 különböző ROS képző helyet azonosítottak a mitokondriumban, melyek közül kiemelkedően fontos szereppel bír a CI és CIII, így kutatásunk során főként ezekre fókuszáltunk. Kimutattuk, hogy a CIII függő H₂O₂ termelés jelentősen növekedett KAT II KO egerekben, illetve nem szignifikáns emelkedést detektáltunk a CI függő H₂O₂ kibocsátásban. Feltételezzük, hogy a megemelkedett ROS képződés kiemelkedő szerepet játszik a csökkent mitokondriális légzés és OXPHOS-s kapacitásban.

A tanulmány egyik kiemelkedő erőssége a szöveti homogenizátum alkalmazása a mitokondriális mérések során. A szöveti homogenizátum több előnnyel rendelkezik az izolált mitokondriumokkal szemben: i) gyorsabb az előkészítési folyamat, ii) jobban megőrzi a szövet heterogenitását, iii) kis mennyiségű szövet szükséges a funkcionális mitokondriális vizsgálatokhoz (Nászai és mtsai., 2019). Jelenlegi ismereteink szerint mitokondriumokat izolálni csak teljes agyból lehetséges, a túlságosan kis mintamennyiség miatt más agyterületekről ez nem kivitelezhető.

A vizsgálat felépítésének vannak bizonyos korlátai, mivel kizárólag a nagy felbontású fluorespirometriára támaszkodik, és hiányzik az összehasonlítás a KAT II KO által közvetített mitokondriális változások és a KAT II enzim inhibitor kezelés között.

Vizsgálataink alapján a kinurenin anyagcsereút fontos szerepet játszik a mitokondriális működés szabályozásában. További kutatások szükségesek a KAT II és kinurénsav specifikus hatásainak feltárásában a mitokondrium különböző funkcióinak részletesebb megismerése érdekében, amely hozzájárulhat a neurodegeneratív betegségek megelőzéséhez és kezeléséhez. Jelen munkánkhoz kapcsolódóan további vizsgálatokat tervezünk, amelyek során kinurénsav analóg kezelés hatásait vizsgáljuk a mitokondriális légzésre KAT KO egerekben.

Eredményeink szerint KAT II enzim deléciója jelentős mértékben rontja a mitokondriális légzést és az ATP szintézist, a $\Delta\Psi_{mt}$ nagymértékű megváltozása nélkül. Hipotézisünk szerint ez a diszfunkció lehet az endogén KYNA termelésének gátlása, vagy a KAT II gén kiütése miatt kialakuló metabolikus zavar (zsírsav oxidáció, Szent-Györgyi-Krebs-ciklus) következménye is.



12. ábra A KYNA és receptorok közötti kölcsönhatások, és ezek hatása a mitokondriális működésre és energiatermelésre, a Szent-Györgyi-Krebs ciklusra és az oxidatív foszforilációra. (AHR - aril-hidrokarbon receptor, GPR35 - G-protein kapcsolt receptor 35, NMDA-R - N-metil-D-aszparginsav receptor, KYN – kinurenin, KYNA – kinurénsav, KAT II – kinurenin-aminotranszferáz II, mtPTP - mitokondriális permeabilitási pórus, CI-IV – Komplex I-IV, KO – knockout, ROS – reaktív oxigéngyök)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Spisák Krisztinának és Dr. Juhász Lászlónak, akik szakértelmükkel, türelmükkel és tanácsaikkal végig kísérték a kutatás minden szakaszán. Iránymutatásuk nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Külön köszönettel tartozom Dr. Szabó Andreának a Sebészeti Műtéttani Intézet vezetőjének, aki megteremtette a kutatómunkához szükséges feltételeket.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak és barátaimnak, akik támogatásukkal lehetővé tették ennek a tanulmánynak a létrejöttét.

Támogatás: Szent-Györgyi Albert Pályázat, SZTE SZAOK-KKASZGYA2023/5S775.

Irodalomjegyzék

- Alkondon, M., Pereira, E. F., Todd, S. W., Randall, W. R., Lane, M. V., & Albuquerque, E. X. (2015). Functional G-protein-coupled receptor 35 is expressed by neurons in the CA1 field of the hippocampus. *Biochemical pharmacology*, 93(4), 506-518.
- Balla, Z., Kormányos, E. S., Kui, B., Bálint, E. R., Fűr, G., Orján, E. M., Iványi, B., Vécsei, L., Fülöp, F., Varga, G., Harazin, A., Tubak, V., Deli, M. A., Papp, C., Gácsér, A., Madácsy, T., Venglovecz, V., Maléth, J., Hegyi, P., ... Rakonczay, Z., Jr (2021). Kynurenic Acid and Its Analogue SZR-72 Ameliorate the Severity of Experimental Acute Necrotizing Pancreatitis. *Frontiers in immunology*, 12, 702764.
- Berlinguer-Palmini, R., Masi, A., Narducci, R., Cavone, L., Maratea, D., Cozzi, A., ... & Mannaioni, G. (2013). GPR35 activation reduces Ca²⁺ transients and contributes to the kynurenic acid-dependent reduction of synaptic activity at CA3-CA1 synapses. *PloS one*, 8(11), e82180.
- Bustamante-Barrientos, F. A., Luque-Campos, N., Araya, M. J., Lara-Barba, E., de Solminihaç, J., Pradenas, C., Molina, L., Herrera-Luna, Y., Utreras-Mendoza, Y., Elizondo-Vega, R., Vega-Letter, A. M., & Luz-Crawford, P. (2023). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders: Potential therapeutic application of mitochondrial transfer to central nervous system-residing cells. *Journal of translational medicine*, 21(1), 613.
- Carri, M. T., Valle, C., Bozzo, F., & Cozzolino, M. (2015). Oxidative stress and mitochondrial damage: importance in non-SOD1 ALS. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 41.
- Ehrenberg, B., Montana, V. A. L. E. R. I. E., Wei, M. D., Wuskell, J. P., & Loew, L. M. (1988). Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophysical journal*, 53(5), 785-794.
- Fujigaki, H., Yamamoto, Y., & Saito, K. (2017). L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology*, 112(Pt B), 264-274.
- Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(1), 5-22.

Han, Q., Cai, T., Tagle, D. A., & Li, J. (2010). Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(3), 353–368.

Han, Q., Cai, T., Tagle, D. A., & Li, J. (2010). Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(3), 353–368.

Heo, M. J., Suh, J. H., Lee, S. H., Poulsen, K. L., An, Y. A., Moorthy, B., ... & Kim, K. H. (2023). Aryl hydrocarbon receptor maintains hepatic mitochondrial homeostasis in mice. *Molecular Metabolism*, 72, 101717.

Holzerová, E., & Prokisch, H. (2015). Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 63, 16-20.

Johansson, A. S., Owe-Larsson, B., Asp, L., Kocki, T., Adler, M., Hetta, J., Gardner, R., Lundkvist, G. B., Urbanska, E. M., & Karlsson, H. (2013). Activation of kynurenine pathway in ex vivo fibroblasts from patients with bipolar disorder or schizophrenia: cytokine challenge increases production of 3-hydroxykynurenine. *Journal of psychiatric research*, 47(11), 1815–1823.

Juhász, L., Rutai, A., Fejes, R., et al. (2020). Divergent Effects of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid and the Synthetic Analog SZR-72 on Microcirculatory and Mitochondrial Dysfunction in Experimental Sepsis. *Front Med (Lausanne)*. 7, 566582.

Kadenbach, B. (2021). Complex IV—the regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion*, 58, 296-302.

Komlodi T, Sobotka O, Krumschnabel G, Bezuidenhout N, Hiller E, Doerrier C, Gnaiger E (2018) Comparison of mitochondrial incubation media for measurement of respiration and hydrogen peroxide production. *Methods Mol Biol* 1782:137-55.

Krumschnabel, G., Eigentler, A., Fasching, M., et al. (2014). Use of safranin for the assessment of mitochondrial membrane potential by high-resolution respirometry and fluorometry. *Methods Enzymol*. 542, 163-181.

- Liu, H., Ding, L., Zhang, H., Mellor, D., Wu, H., Zhao, D., Wu, C., Lin, Z., Yuan, J., & Peng, D. (2018). The Metabolic Factor Kynurenic Acid of Kynurenine Pathway Predicts Major Depressive Disorder. *Frontiers in psychiatry*, 9, 552.
- Martin L. J. (2010). Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(4), 839–915.
- Mithaiwala, M. N., Santana-Coelho, D., Porter, G. A., & O'Connor, J. C. (2021). Neuroinflammation and the Kynurenine Pathway in CNS Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*, 10(6), 1548.
- Moroni, F., Cozzi, A., Sili, M., & Mannaioni, G. (2012). Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *Journal of neural transmission*, 119, 133-139.
- Nászai, A., Terhes, E., Kaszaki, J., Boros, M., & Juhász, L. (2019). Ca (2+) N it be measured? Detection of extramitochondrial calcium movement with high-resolution fluorespirometry. *Scientific Reports*, 9(1), 19229.
- Norat, P., Soldozy, S., Sokolowski, J. D., Gorick, C. M., Kumar, J. S., Chae, Y., Yağmurlu, K., Prada, F., Walker, M., Levitt, M. R., Price, R. J., Tvrdik, P., & Kalani, M. Y. S. (2020). Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial transplantation. *NPJ Regenerative medicine*, 5(1), 22.
- Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M. J., & Maurel, P. (2008). The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 48(1), 1-32.
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell death & disease*, 3(11), e430-e430.
- Poles, M.Z., Nászai, A., Gulácsi, L., et al. (2021). Kynurenic Acid and Its Synthetic Derivatives Protect Against Sepsis-Associated Neutrophil Activation and Brain Mitochondrial Dysfunction in Rats. *Front Immunol.* 12, 717157.
- Sakamuru, S., Attene-Ramos, M. S., & Xia, M. (2016). Mitochondrial membrane potential assay. *High-throughput screening assays in toxicology*, 17-22.

Savitz J. (2020). The kynurenine pathway: a finger in every pie. *Molecular psychiatry*, 25(1), 131–147.

Scialò, F., Fernández-Ayala, D. J., & Sanz, A. (2017). Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease. *Frontiers in physiology*, 8, 428.

Selivanov, V. A., Votyakova, T. V., Pivtoraiko, V. N., Zeak, J., Sukhomlin, T., Trucco, M., ... & Cascante, M. (2011). Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. *PLoS computational biology*, 7(3), e1001115.

Seo, S. K., & Kwon, B. (2023). Immune regulation through tryptophan metabolism. *Experimental & molecular medicine*, 55(7), 1371–1379.

Song, T., Song, X., Zhu, C., Patrick, R., Skurla, M., Santangelo, I., Green, M., Harper, D., Ren, B., Forester, B. P., Öngür, D., & Du, F. (2021). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer's disease: A meta-analysis of in vivo magnetic resonance spectroscopy studies. *Ageing research reviews*, 72, 101503.

Szabó, Á., Galla, Z., Spekker, E., Szűcs, M., Takeda, K., Ozaki, K., Inoue, H., Yamamoto, S., Toldi, J., Ono, E., Vécsei, L., & Tanaka, M. (2024). Oxidative and Excitatory Neurotoxic Stresses in CRISPR/Cas9-Induced Kynurenine Aminotransferase Knock-Out Mice: A Novel Model for Experience-Based Depression and Post-traumatic Stress Disorder. *Metabolism: Insights From Novel Kynurenine Aminotransferase*. Preprints. 2023 May 7: 2023080094.

Tanaka, M., Bohár, Z., Martos, D., Telegdy, G., & Vécsei, L. (2020). Antidepressant-like effects of kynurenic acid in a modified forced swim test. *Pharmacological reports : PR*, 72(2), 449–455.

Tanaka, M., Szabó, Á., Spekker, E., Polyák, H., Tóth, F., & Vécsei, L. (2022). Mitochondrial Impairment: A Common Motif in Neuropsychiatric Presentation? The Link to the Tryptophan-Kynurenine Metabolic System. *Cells*, 11(16), 2607.

Tanaka, M., Tóth, F., Polyák, H., Szabó, Á., Mándi, Y., & Vécsei, L. (2021). Immune Influencers in Action: Metabolites and Enzymes of the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Biomedicines*, 9(7), 734.

Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., & Toldi, J. (2013). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(1), 64–82

Wirthgen, E., Hoeflich, A., Rebl, A., & Günther, J. (2018). Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions. *Frontiers in immunology*, 8, 1957.

Tételes szerzői hozzájárulás

A 37. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK 2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Bánáti Tibor** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **Kinurenin útvonal és mitokondriális diszfunkció vizsgálata kinurenin aminosztransferáz II génkiütött egerek központi idegrendszerében** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

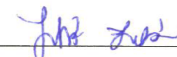
Részfeladat	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán jellemezve)
A kísérleti állatok altatása, szövetmintavétel és preparálás	4
Szöveti homogenizálás	5
Mitokondriális oxigénfogyasztás mérése	5
Mitokondriális membránpotenciál mérése	5
Mitokondriális ROS képződés mérése	5
Az adatok értékelése és statisztikai feldolgozása	3

Kelt: Szeged 2024. 11. 11.



Pályamunkát benyújtó hallgató (Bánáti Tibor)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Dr. Juhász László, SZTE SZAOK
Sebészeti Műtéttani Intézet)
aláírása



Témavezető (Spisák Krisztina, SZTE SZAOK
Sebészeti Műtéttani Intézet)
aláírása