

36. OTDK Biológia Szekció

AZ ELEKTRONTRANSPORTLÁNC MŰKÖDÉSI ZAVARAI KINURENIN AMINOTRANSZFERÁZ ENZIMHIÁNYOS EGEREKBEN

Készítette:

Szolnoki Zsuzsa Boglárka

Biomérnök BSc, 3. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Juhász László PhD.

tudományos munkatárs

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

Intézet

2022

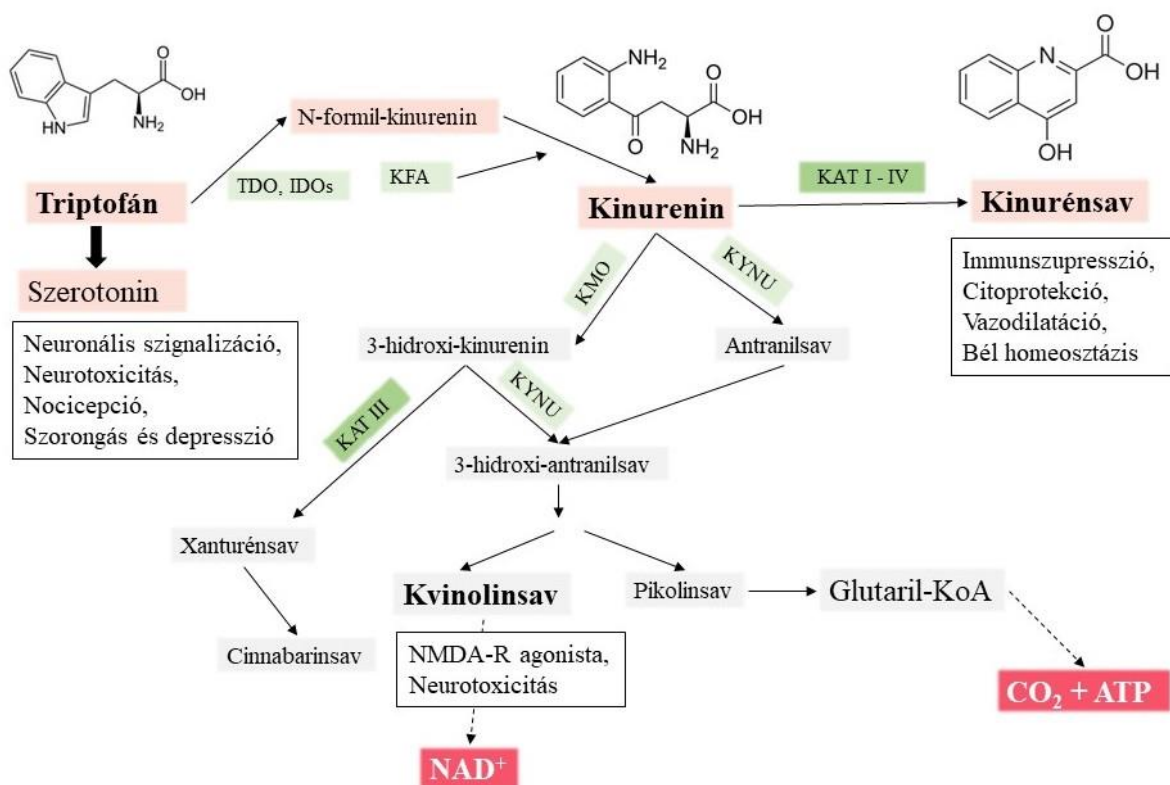
Tartalomjegyzék

Bevezető.....	1
Célkitűzés	6
Anyagok és módszerek.....	7
Agyszöveti minták preparálása.....	7
A mitokondriális oxigénfogyasztás vizsgálata	10
Fluorespirometria protokoll.....	11
Eredmények és értékelésük	13
Statisztikai analízis	13
Eredmények.....	14
I. Mitokondriális O ₂ fogyasztás a cerebellumban.....	14
II. Mitokondriális O ₂ fogyasztás a hippocampusban.....	15
III. Mitokondriális O ₂ fogyasztás a striatumban.....	16
III. Mitokondriális O ₂ fogyasztás a májban.....	17
Összefoglalás.....	18
Köszönetnyilvánítás.....	21
Irodalomjegyzék	22
Függelék	27
Rövidítésjegyzék	27

Bevezető

A triptofán (Trp) – kinurenin (KYN) anyagcsere útvonal befolyásolása az alap kutatások, valamint kísérletes terápiaik középpontjában áll, mivel zavara számos kórállapotban/neurológiai kórképben játszik meghatározó szerepet (Stone és mtsai. 2013; Vécsei és mtsai. 2013). Ezen kórképekhez tartoznak különböző neurodegeneratív megbetegedések (pl. Alzheimer-kór, Huntington-kór, Parkinson-kór) és hangulati zavarokkal társuló pszichiátriai betegségek, mint például a bipoláris depresszió és skizofrénia (Daniels és mtsai. 2020), illetve a migrén (Curto és mtsai. 2016.; Szok 2010).

A KYN-útvonalat (KP; 1. ábra) tekintjük a Trp aminosav metabolizmus elsődleges útjának (Vécsei és mtsai. 2013.). Jól ismert, hogy a Trp egyike az emberek számára esszenciális aminosavaknak, részt vesz a fehérjék szintézisében és más számunkra fontos, biológiailag aktív anyagok, neurotranszmitterek (melatonin és szerotonin) bioszintézisének prekursora (Canli és Lesch, 2007; Silber és Schmitt 2010). A Trp mintegy 95%-a a KP-n alakul át, ahol főként nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) anabolizmusra fordítódik, így több ponton beépülve a Szent-Györgyi – Krebs-ciklusba (TCA) (Bender 1983; Tanaka és Vécsei 2020, 2021). A reakciósor kezdetén a Trp N-formil-kinureninné oxidálódik, amelyet a triptofán-2,3-deoxigenáz (TDO), vagy a kevésbé specifikus idolamin-2,3-deoxigenázok (IDOs) katalizálnak (a folyamat KP első sebességhatározó lépése). Ezt követően a metabolit kinurenin-formamidáz (KFA) hatására L-kinureninné (L-KYN) hidrolizál. A kialakuló L-KYN/Trp koncentráció arány a Trp további lebontásának, így a KYN termelődésének szabályzója (Schrocksnadel és mtsai. 2006). Az L-KYN létrejöttével az útvonal többfelé ágazik, amelyeken fontos neuroaktív anyagok keletkeznek, 3-hidroxi-kinurenin (3-HK), antranilsav (AA), kvinolinsav (QUIN) és a számunkra kiemelt fontosságú kinurénsav (KYNA).



1. ábra Triptofán-kinurenin (Trp-KYN) útvonal

A KYNA a kinurenin-aminotranszferáz I. és III. (KAT I; KAT III) enzimek közreműködésével keletkezik a citoplazmában. A kutatók sokáig úgy gondolták, hogy a KYNA inert anyagcseretermék, amely kizárólag a periférián található. A későbbi állatkísérletekben kiderült, hogy görcsrohamok előidézésére és megakadályozására is alkalmas (Perkins és Stone 1982), illetve gátolja a glutamát receptorok működését, az N-metil-D-aszpartát receptorok (NMDA-R) endogén antagonistája (Joó és Horváth 2001).

Az NMDA-R-ok négy különböző alegységből álló ioncsatornák, amelynek aktivációjakor a csatorna megnyitásával (glutamát és a ko-agonista glicin kötődését követően) nátrium- és kalciumionok áramlanak a sejtbe, depolarizációt előidézve. Az NMDAR-t Nesterova és munkatársai azonosították a mitokondriumokban is, amelyek feltehetően szerepet játszanak a kalcium felvételben, illetve kalcium homeosztázis kialakításában (Nesterov és mtsai. 2018). Az NMDA-R-ok fizikai kapcsolatban állhatnak az elektrontranszportlánc (ETS) egyes fehérjéivel (Src és ND2 fehérjéken keresztül). Feltételezhető, hogy a KYNA, mint endogén NMDA-R antagonistája csökkenti a mitokondriális kalcium felvételt és az ETS működését valamilyen módon (gátolja/serkenti) befolyásolja. (Gingrich és mtsai. 2004) Az NMDA-R-on kívül a KYNA endogén ligandja lehet az aril-hidrokarbon receptornak (AhR)

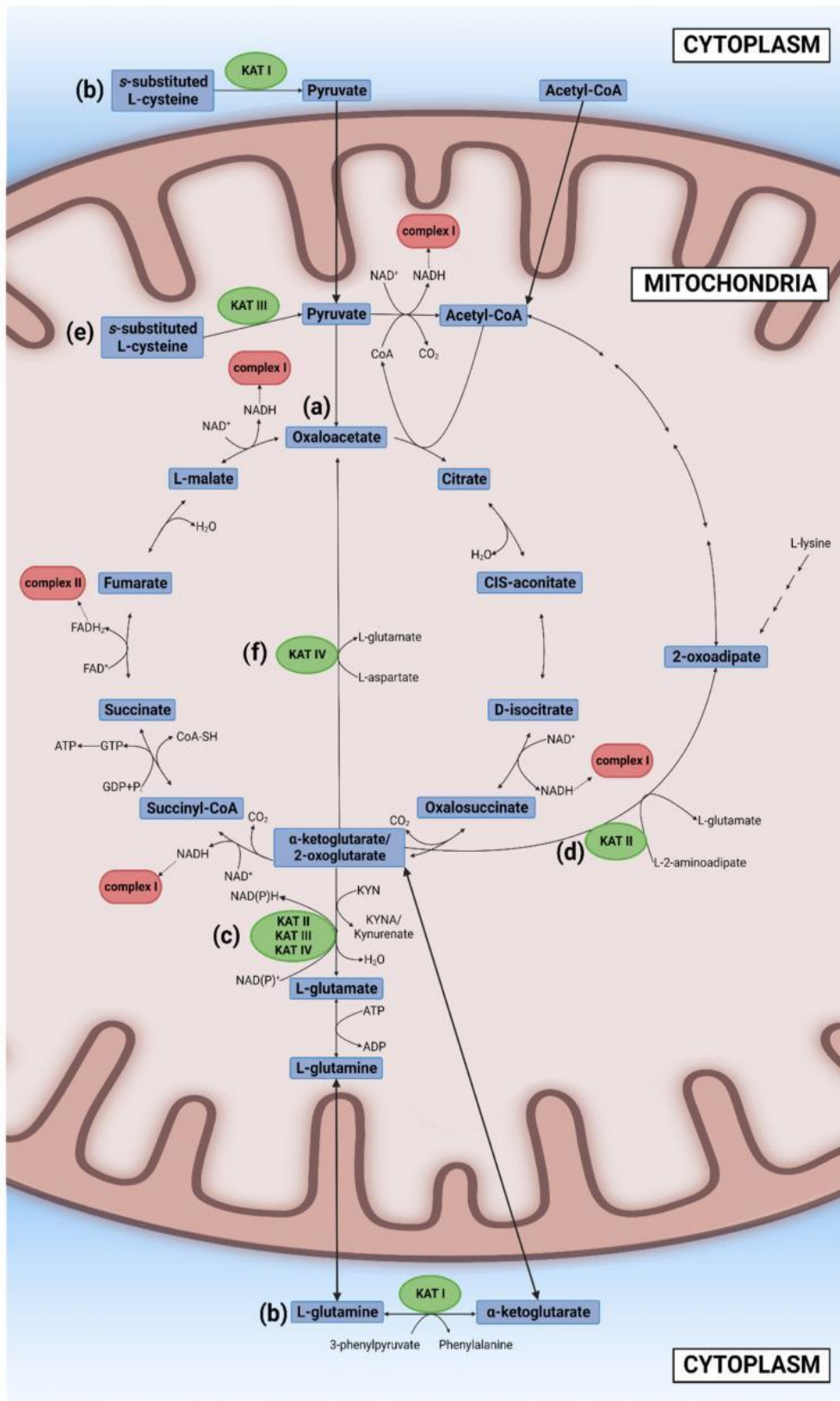
(Moroni és mtsai. 2012). Az AhR szerepet játszik toxikus válaszkreációk kialakításában - ide tartozik többek között a hepatotoxicitás és a csökkent termékenység - (Pascussi és mtsai. 2008), továbbá immunomodulátor hatásokat is közvetítenek (Tanaka és mtsai. 2020).

Az elmúlt évtizedben fény derült arra is, hogy a KYNA endogén ligandja az idegsejteken jelenlevő G-fehérje asszociált receptor 35-nek (gpr35) (Alkondon és mtsai. 2015), amelyen keresztül csökkenteni képes serkentő posztszinaptikus potenciálok amplitúdóját az agy bizonyos területein (Berlinguer-Palmini és mtsai. 2013), valamint antiinflammatorikus hatású más szövetekben (Tanaka és mtsai. 2020).

A KP a receptoriális hatások mellett enzimeken és az anyagcsere termékeken keresztül közvetlen kapcsolatban áll a Szent-Györgyi – Krebs-ciklussal. A biokémiai folyamatokat és a TCA ciklus enzimeit összekötő organelum a mitokondrium, amely nagy számban előforduló, kettős membránrendszerrel rendelkező, bakteriális mérettartományba (néhány μm hosszú) eső sejtszervecske az eukarióták citoplazmájában. Legismertebb feladata az energiatermelés, melynek során a terminális oxidáción keresztül (O_2 felhasználás), az oxidatív foszforiláció (OXPHOS, 3. ábra) mechanizmusával létrehozza adenzin-difoszfátból (ADP) az adenzin-trifoszfátot (ATP), a magasabb rendű élőlények elemi energiahordozó vegyületét (Fiske és Subbarow 1929; Lohmann 1929; Maruyama 1991). Az említett mechanizmus mellett a mitokondrium az energiatermelés megvalósításához felhasznál egyéb metabolikus utakat is, mint például ketogenezis, ketolízis és zsírsav oxidáció (Krebs és mtsai. 1937; Gano és mtsai. 2014; Klingman és mtsai. 1958). Az anyagcseretermékek egymással komplex hálózatot alkotnak, így képesek dinamikus egyensúlyban tartani a szervezetet, és folyamatosan a sejtek szükségleteinek megfelelő mennyiségű energiát szolgáltatják az alkalmas helyen és időben. A nem megfelelő mitokondriális működés más sejtes mechanizmusok diszfunkcióját okozza (Holt és mtsai. 1988; Wallace 1988; Bourgeron és mtsai. 1995), hiszen az organelumok meghatározó szerepet játszanak a kalcium felvételben és leadásban, apoptózis és autofágia mechanizmusában is (Carafoli 2012; Diogo 2018).

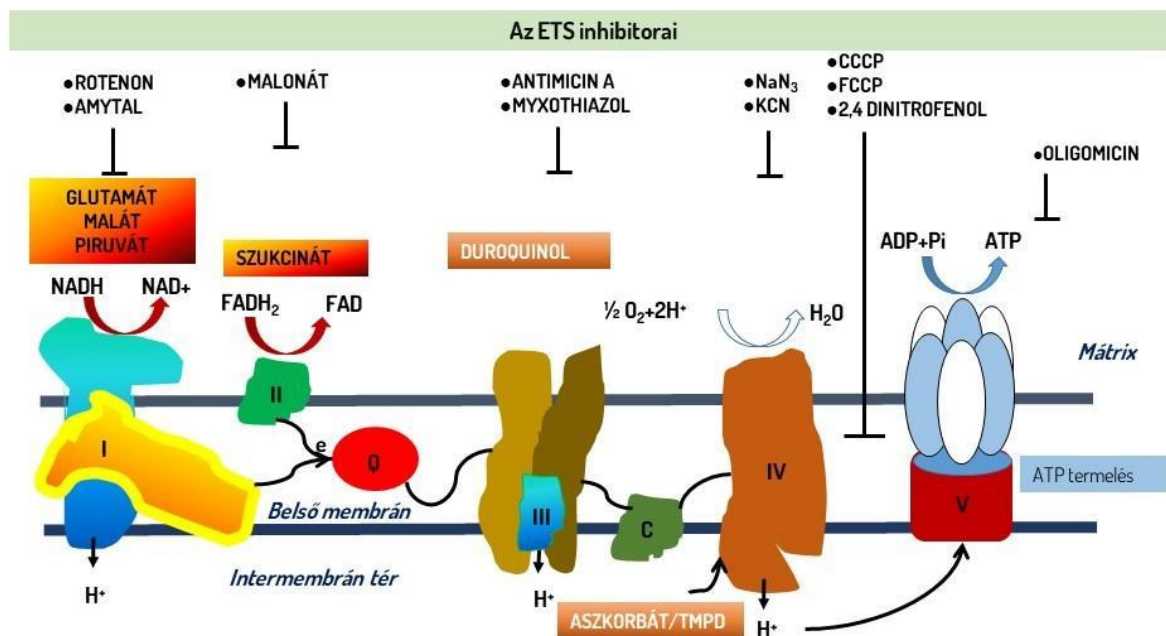
A mitokondriumban végbemenő TCA ciklus több ponton összeköttetésben áll a Trp – KYN útvonallal, részben a KAT enzimeken keresztül. A kinurenin aminotranszferáz I (KAT I) katalizálja a citoplazmában az L-cisztein (L-Cys) piruváttá alakulását és az L-glutamát α -ketoglutarát reakciót a TCA ciklusban, míg a Trp – KYN rendszerben a L-kinurenin (KYN) – kinurénsav (KYNA) transzaminációt (emberi és patkány agyban $\sim 30\%$) (Guidetti és mtsai. 1997). A KAT II a TCA ciklusban felelős (a KAT III, KAT IV mellett) az α -ketoglutarát – L-glutamát és α -ketoglutarát – 2-oxoadipát (amiből végül acetyl-koenzimA képződik) reakciókért

és szintén a mitokondriumban végzi a KYN – KYNA átalakítást is (a humán és patkány agyban a szintézis több, mint 70%-a így történik).



2. ábra A TCA és a Trp - KYN rendszer kapcsolata (Tanka és mtsai, 2022)

A KAT III a mitokondrium mátrixában végzi az L-Cys – piruvát, a KYN – KYNA és 3-hidroxi-L-kinurenin (3-HK) – xanturénsav (XA) átalakulásokat. A KAT IV az extracelluláris KYN – KYNA reakcióért felelős.



3. ábra Az elektrontranszportlánc felépítése

Emellett nem elhanyagolandó, hogy a keletkezett Trp több, mint 95%-a NADH anabolizmusra fordítódik, ezzel több ponton beépülve a TCA ciklusba. (Tanaka és mtsai. 2020, 2021). A Trp – KYN rendszer enzimeit, amelyek gyulladásos folyamatokra, oxidatív stresszre és más káros hatásokra aktiválódnak, nagy befolyással vannak a mitokondrium metabolizmusára és hozzájárulhatnak a mitokondriális megbetegedések kialakulásához (Tanaka és mtsai. 2020, 2021).

Az endogén KYNA mitokondriális hatásairól és szintetizáló KAT enzimek szerepéről kevés információval rendelkezünk. Mivel a KAT II enzim felelős az endogén KYNA keletkezésének túlnyomó részéért, feltételezhető, hogy az enzim *in vivo* manipulációjával (KO) felderíthető az endogén KYNA szabályozó funkciója (Vécsei 2013).

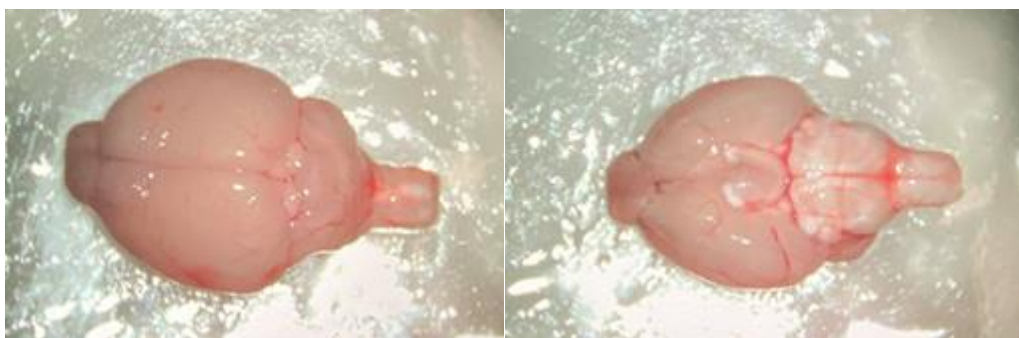
Célkitűzés

Jelen munkánkban az endogén KYNA szintézisért felelős KAT enzimek mitokondriális hatásainak vizsgálatát tűztük ki célul. Kérdéseink megválaszolására újonnan létrehozott kinurenin aminotranszferáz I és II enzimhiányos (KAT I KO és KAT II KO) egértörzseket használtunk.

Anyagok és módszerek

Agyszöveti minták preparálása

Kísérleteinket 8-10 hetes korú, 25 ± 2 g súlyú hím C57BL/6N vad típusú (WT), KAT I KO, KAT II KO egereken végeztük (n=6 /csoport; MTA-SZTE Idegtudományi Kutatócsoport). Az állatokat intraperitoneális ketamin-xilazin keverékkel elaltattuk (80 mg/kg ketamin; 24 mg/kg xilazin 0,9% NaCl oldatban). A mély-fájdalomérzet megszűnését követően az egereket nagy sebészeti ollóval dekapitáltuk, a fejet azonnal jégen hűtött Petri-csészére helyeztük. A preparáció első lépéseként felszabadítottuk a koponyát úgy, hogy a fejtetőn lévő bőrt iris (szemészeti) olló segítségével anteroposterior tengely mentén kettévágtuk, ezt követően lefordítottuk a koponya körül. Az olló széléit a szemüregbe illesztve elvágtuk a közöttük elhelyezkedő koponyacsontot, majd eltávolítottuk a nyaki izmokat. A nyaki csigolyák megmaradt részét a gerincsatorna jobb és bal oldalán bevágtuk a gerincvelő megsértése nélkül, a csigolya felső részét fogászati csipesszel, egy határozott mozdulattal lehúztuk a koponyáról. A csipesz összezárt végét a koponya középső része alá helyeztük és áttörtük a nyakszirtcsontot, majd lebontottuk a koponyát az agy megsértése nélkül. A ventrális idegek megszakításával, kranio-kaudális irányban a gerincvelő-agytörzs komplexszel együtt az agyat kifordítottuk a koponya megmaradt részéből és jégen hűtött Petri-csészére helyeztük (4. ábra).



4. ábra Az agy felül- és alulnézeti képe

Az első minta részlet, a cerebellum preparálása a lándzsatű kisagy és gerincoszlop/agytörzs közé helyezésével, majd határozott mozdulattal mindkét oldalon mediolaterális irányban, a pedunculusok elvágásával történt (5. ábra).



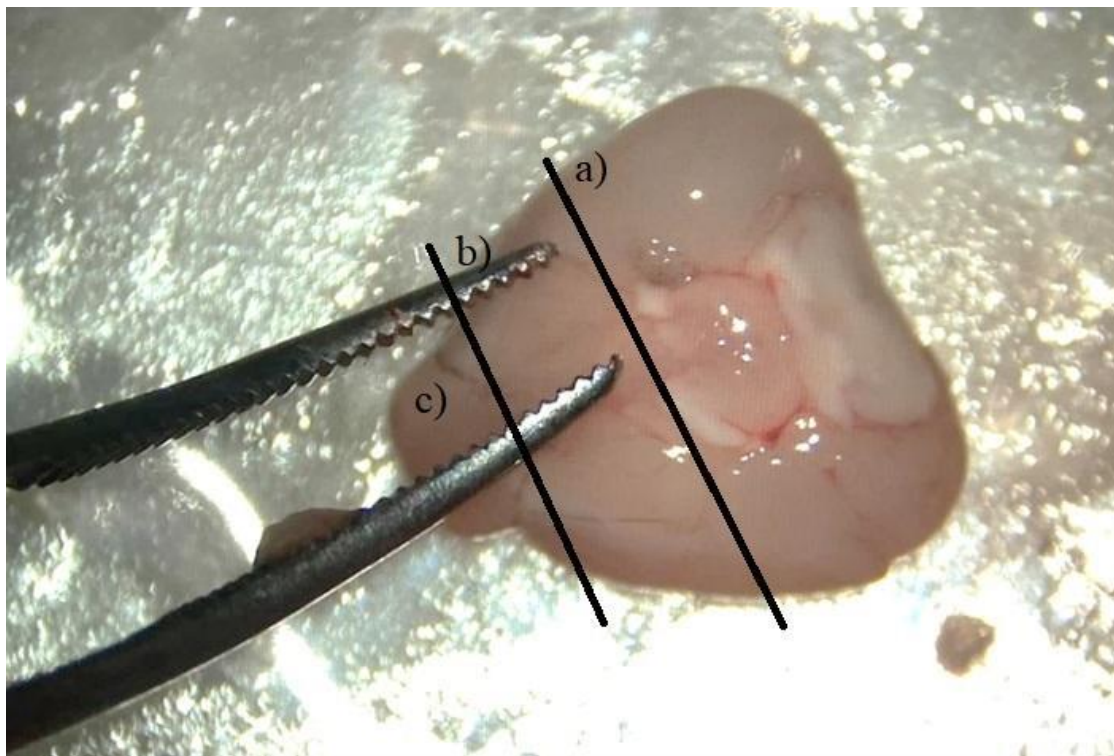
5. ábra Cerebellum eltávolítása

A gerincvelő-agytörzs komplexet levágtuk majd a megmaradt agyat dorzális oldalával felfelé fordítottuk és 3 részre vágtuk a szaglógümő alatti és feletti metszésekkel (6-7. ábra).



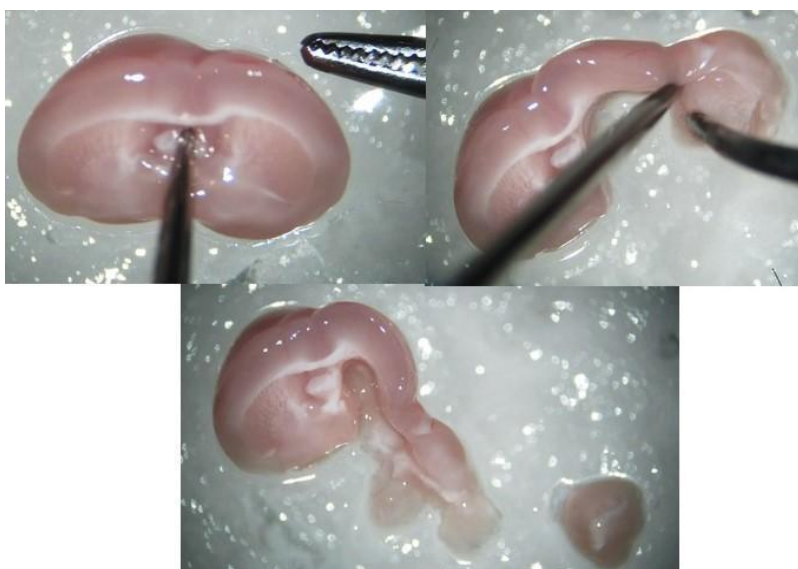
6. ábra Gerincvelő-agytörzs leválasztása

A második agyi régió, a striatum preparálásához az előkészített középső résszel kezdtünk (7. ábra; b) rész), amelyet kaudális felületére fordítottunk.



7. ábra Nagyagy alulnézeti képe

Az alsó részt bevágtuk a fehér vonalig, ezután apró metszésekkel követtük a striatum körüli fehér vonalat. Az asszisztáló kezünkkel a fogászati szondát használtuk a striatum kihúzásához.



8. ábra Striatum preparálása

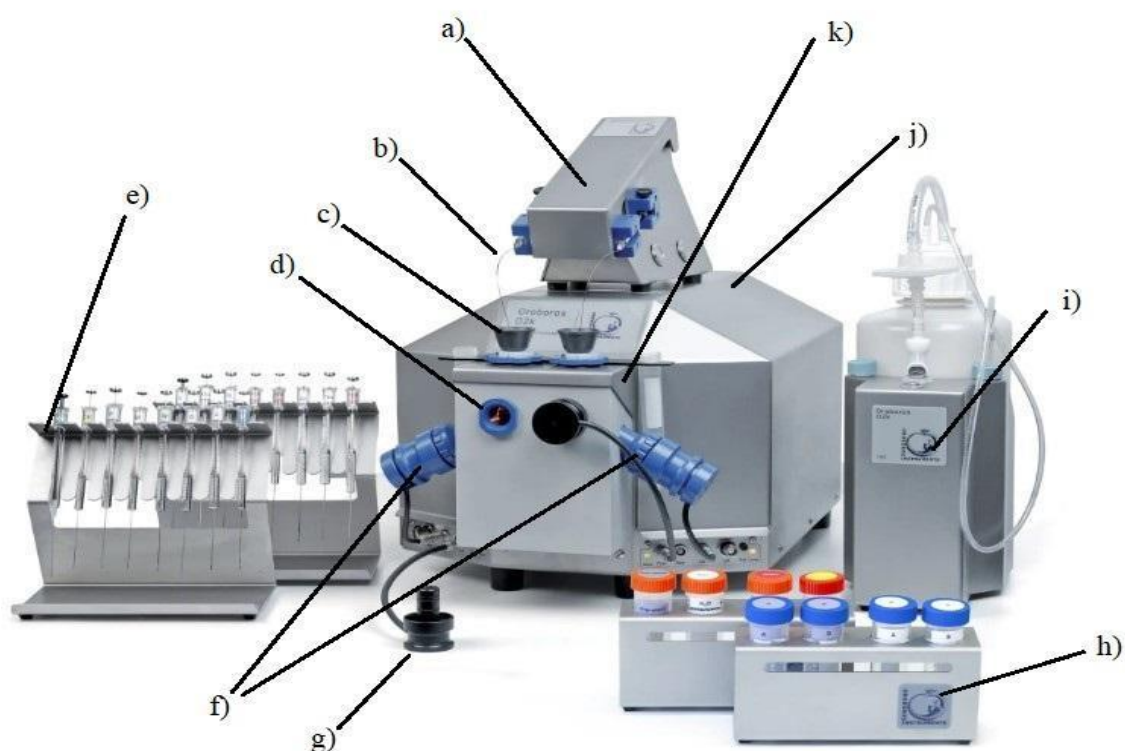
Végül a hippocampus preparálásához az előkészített felső harmadot (7. ábra; a rész) használtuk, kérgi felülettel magunk felé fordítva. Az agykérget a középvonalban elvágtuk, óvatosan elválasztottuk mindkét oldalon mediolaterális irányban a lándzsátű és a szonda segítségével, a hippocampust pedig lassú, óvatos mozdulatokkal eltávolítottuk az agy többi részétől.



9. ábra Hippocampus preparálás lépései

A mitokondriális oxigénfogyasztás vizsgálata

A minták mitokondriális oxigénfogyasztását nagyfelbontású fluoresziometriával határoztuk meg. Az ehhez felhasznált O2k-FluoRespirometer (10. ábra) egy két kamrából álló (2-2 mL térfogat), valós idejű O₂-fogyasztás megfigyelésére alkalmas, stopperekkel zárható rendszer (Oroboros Instruments, Innsbruck, Ausztria). A respirációs kamrák lezárását követően a minta O₂ fogyasztásával arányosan csökken a mérhető O₂ koncentráció.



10. ábra Nagyfelbontású FluoRespirométer részei

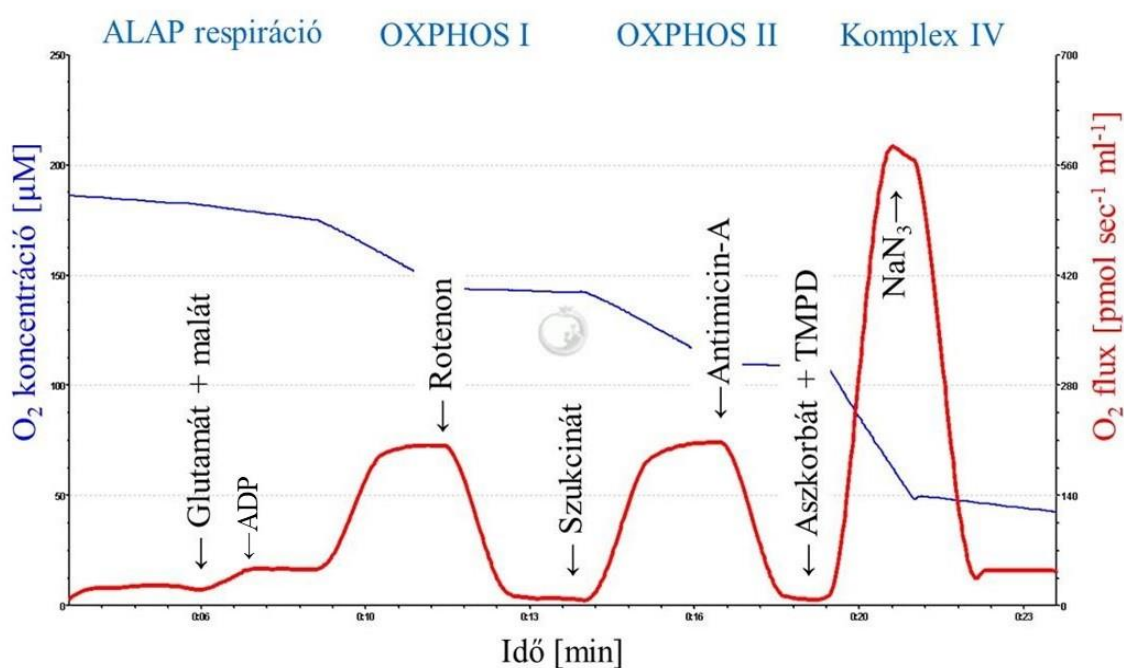
Fluorespirométer részei:

- | | |
|---|--|
| a) mikroinjektor | g) fluoreszcens szenzor |
| b) 'A' kamrához tartozó fecskendő | h) gyűjtőkonténer |
| c) 'A' kamrához tartozó stopper | i) folyadékelszívó |
| d) 'A' kamraablak | j) gépház |
| e) Hamilton fecskendők | k) Peltier modul ($\pm 0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$) |
| f) 'A' és 'B' kamrához tartozó O_2 szenzorok | |

Fluorespirometria protokoll

A máj- és agyszöveti mintákat nedves tömeghez mérten 10x-es mennyiségű Mir05 médiumban (szukróz 110 mM, HEPES 20 mM, taurin 20 mM, K-laktobionát 60 mM, MgCl_2 3 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0.5 mM and BSA 1 g/L (pH 7,1) homogenizáltuk 2 cm³ potter-

Elvehjem segítségével. A mitokondriális komplex I-függő oxidatív foszforilációs kapacitás (OXPHOS I) meghatározásához komplex I specifikus szubsztrátokat (10mM glutamát, 2mM malát) és ADP-t (2,5 mM) juttatunk a kamrába Hamilton fecskednők segítségével. A steady-state respiráció elérését követően a komplex I működését rotenonnal (0,5 μ M) gátoltuk, majd szukcinát adásával (10 mM) a komplex II-függő oxidatív foszforilációt (OXPHOS II) stimuláltuk. Antimicin-A-val (2,5 μ M) gátoltuk a komplex III-at, a komplex IV. (CIV) respirációs aktivitását aszkorbáttal (2 mM) és a mesterséges TMPD (0,5 mM N,N,N',N'-tetrametil-p-pheniledamin dihidroklorid) szubsztrát jelenlétében mértük. A TMPD autooxidációjának megelőzése érdekében az aszkorbátot a TMPD adás előtt juttattuk a respirációs médiumba. Utolsó lépésként nátrium-azidot (NaN_3 ; 100mM) adtunk a kamrákba a komplex IV-hez kapcsolódó mitokondriális oxigénfogyasztás gátlásának céljából. Minden mérést állandó mágneses keverés (750 rpm) mellett, 37 °C-on végzünk Mir05 médiumban.



11. ábra Fluorespirometria protokoll

Eredmények és értékelésük

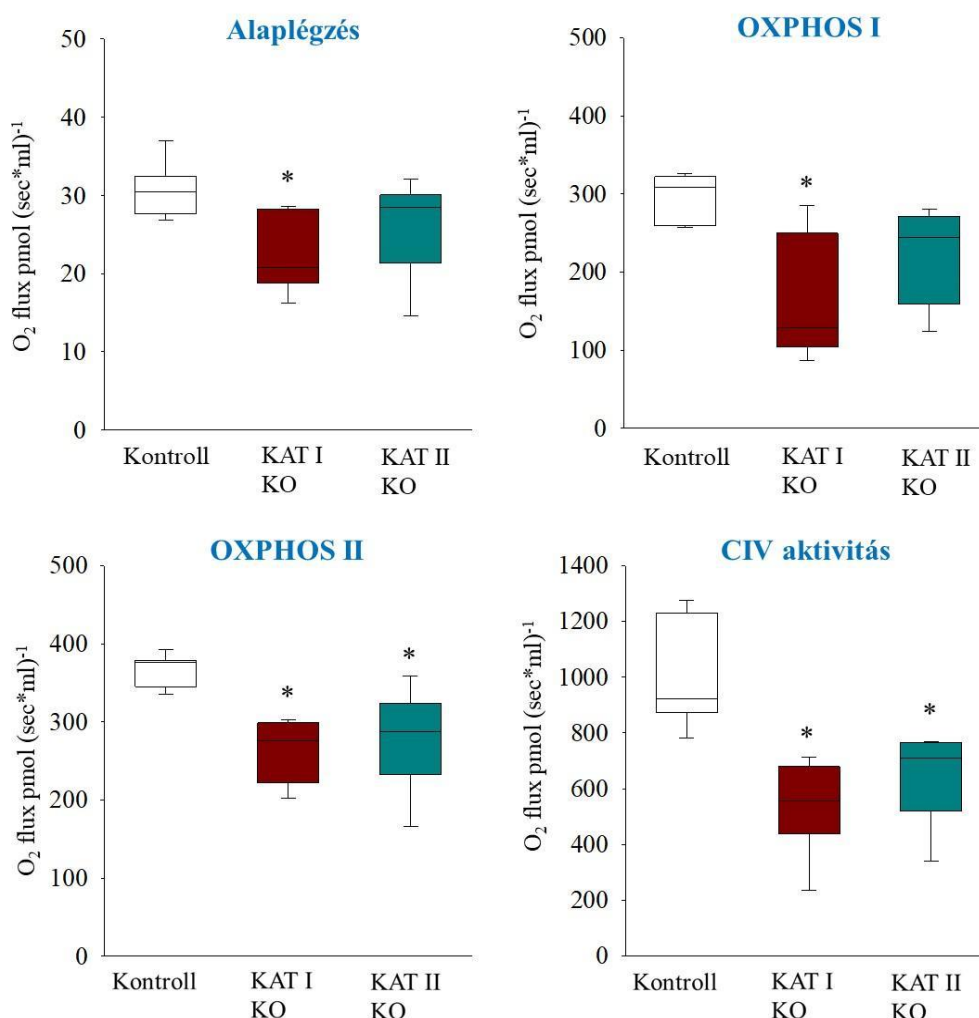
Statisztikai analízis

A mérési eredményeinket medián, 25 és 75% percentilisben tüntettük fel, a csoportok közötti különbségeket normál eloszlás esetén egyszempontos ANOVA-val (post hoc teszt: Holm-Sidak teszt), nem normál eloszlás esetén Kruskal-Wallis teszt (post hoc teszt: Dunn teszt) hasonlítottuk össze. Az adatelemzés és ábrakészítés SigmaPlot programmal történt (SigmaStat, Jandel Scientific, Erkrath, Németország). Szignifikáns különbséget $P < 0,05$ érték esetén állapítottunk meg.

Eredmények

I. Mitokondriális O₂ fogyasztás a cerebellumban

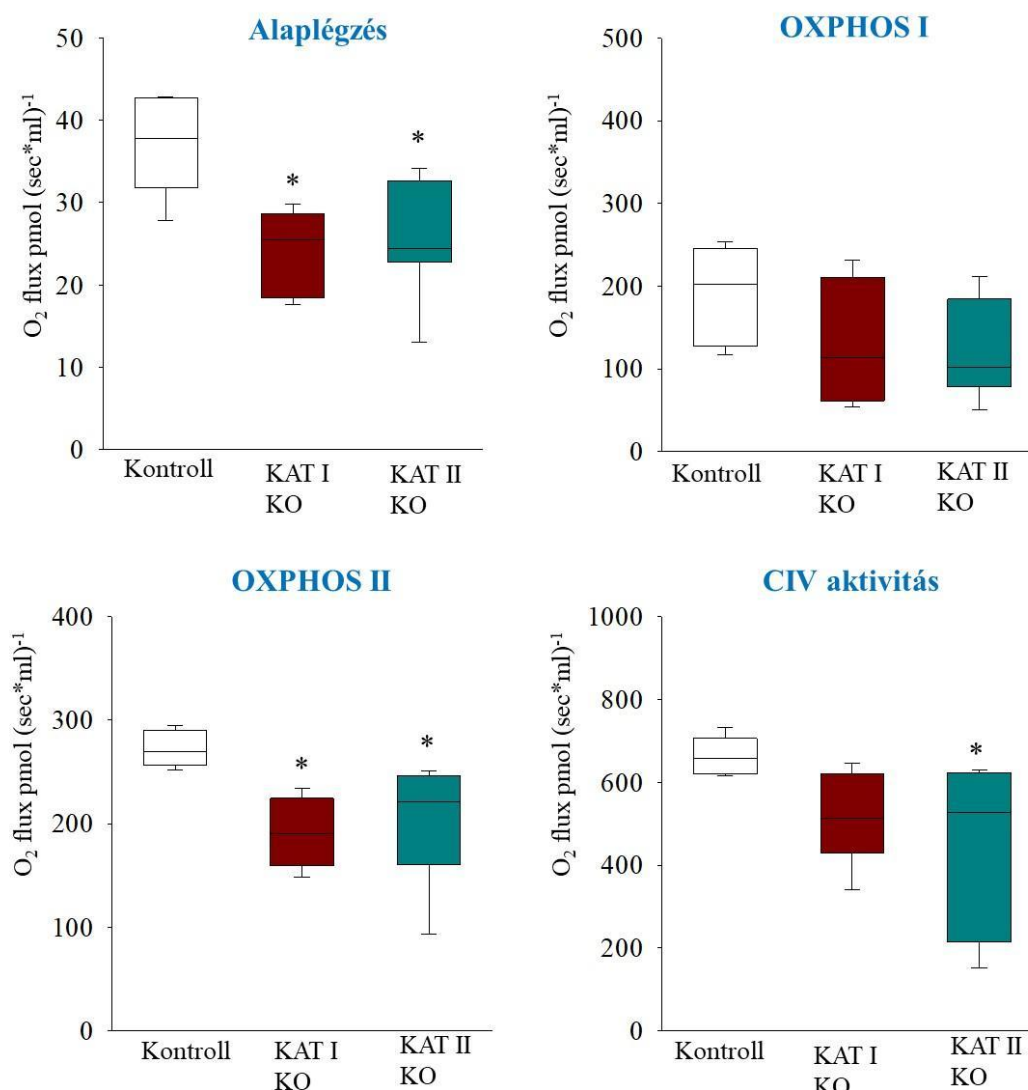
Exogén CI-, CII-, és CIV szubsztrátok (CI.: G,M,D; CII.: S; CIV.: Asc/TMPD) adása valamennyi kísérleti csoportban fokozta a cerebelláris mitokondriális oxigénfogyasztást, melyet a légzési lánc gátlószerei (CI.: Rot, CIII.: AmA, CIV.: NaN₃) a 0 pmol x sec⁻¹ x ml⁻¹ közeli értékre csökkentették (11. ábra). A kontroll csoporthoz képest szignifikánsan csökkentek a mitokondriális alaplégzés és a komplex I-függő oxidatív foszforilációs kapacitás (CI és CII OXPHOS) értékei a KAT I KO egerekben. Ezenkívül mindkét KAT enzimhiányos csoportban jelentősen alacsonyabb CII OXPHOS és CIV aktivitást mértünk a cerebellumban a vad típusú egerekhez képest.



12. ábra Kontroll és KAT enzimhiányos egerek mitokondriális oxigénfogyasztása a cerebellumban. A mérési eredményeinket medián, 25. és 75. percentilisben tüntettük fel. *P<0,05 vs kontroll

II. Mitokondriális O₂ fogyasztás a hippocampusban

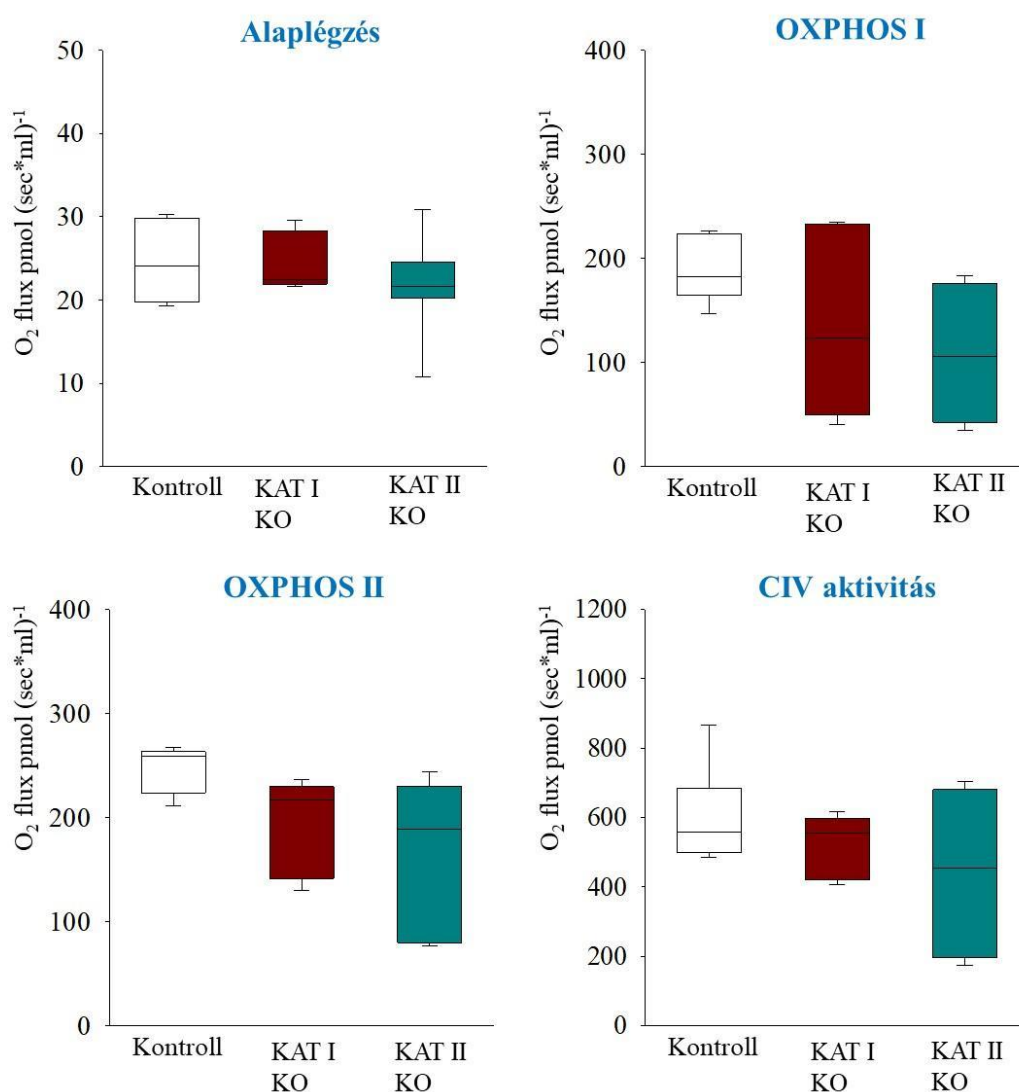
A kontroll csoporthoz képest, mind KAT I, mind a KAT II enzimhiányos egerekben szignifikánsan alacsonyabb mitokondriális alaplégzést és CII OXPHOS-t mértünk a hippocampalis mintákban, valamint számottevően csökkent a CIV aktivitása a KAT II KO egerekben. A három csoport között nem találtunk jelentős eltérést a CI OXPHOS értékekben.



13. ábra Kontroll és KAT enzimhiányos egerek mitokondriális oxigénfogyasztása a hippocampusban. A mérési eredményeinket medián, 25. és 75. percentilisben tüntettük fel. *P<0,05 vs kontroll

III. Mitokondriális O₂ fogyasztás a striatumban

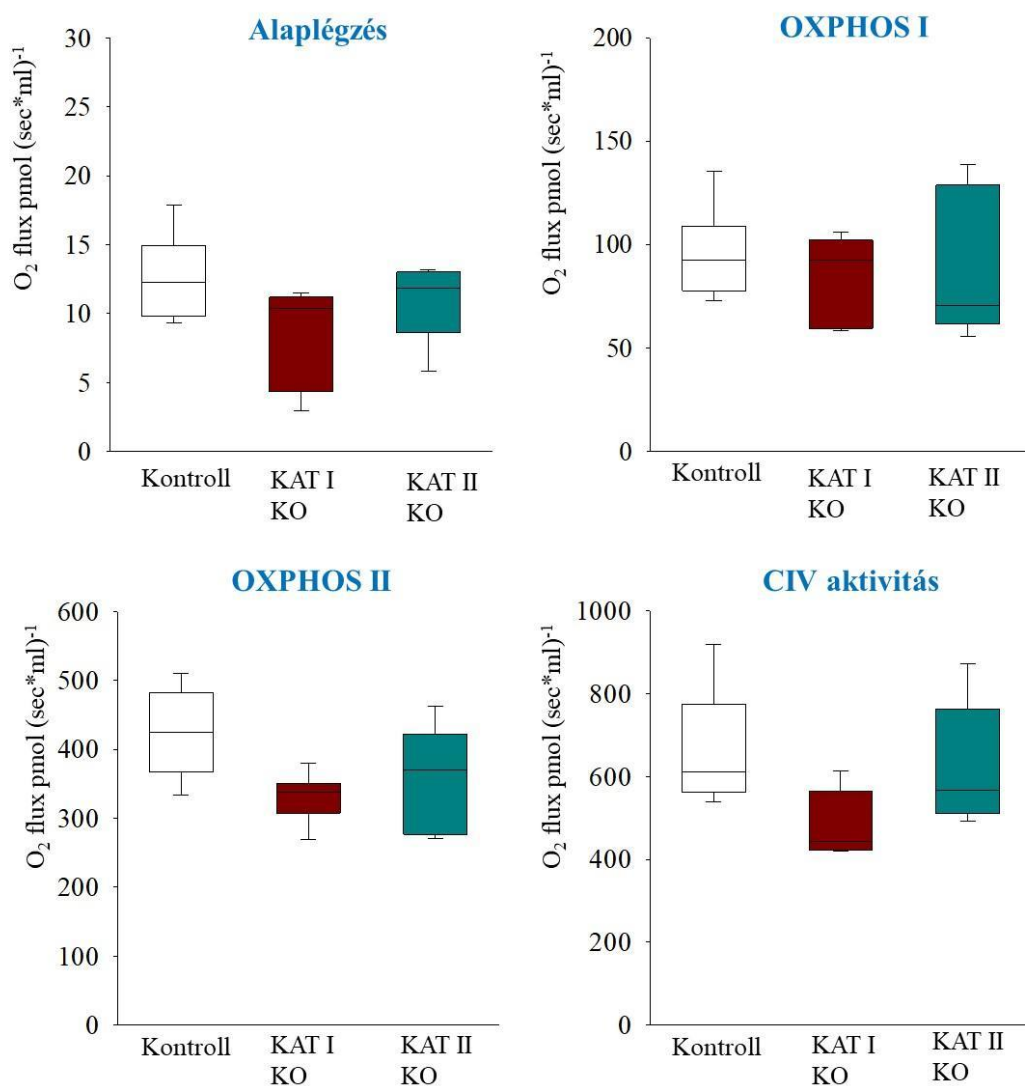
A 14. ábra a striatalis mitokondrium funkció változásait szemlélteti a vad és KAT KO csoportokban. Habár közel az állatok felében alacsonyabb CII OXPHOS kapacitást mértünk, ennek értéke nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet ($P=0,059$). Számottevő különbség nem mutatkozott a kiindulási oxigénfogyasztás (alaplégzés), CI OXPHOS és CIV aktivitás tekintetében sem.



14. ábra Kontroll és KAT enzimhiányos egerek mitokondriális oxigénfogyasztása a striatumban. A mérési eredményeinket medián, 25. és 75. percentilisben tüntettük fel.

III. Mitokondriális O₂ fogyasztás a májban

A nem neuronális szövetek közül a májban vizsgáltuk az elektrontranszportlánc egyes légzési komplexeinek működését. A kontroll egerekhez képest nem volt szignifikáns eltérés a KAT I KO és KAT II KO törzsek mitokondriális O₂ fogyasztásában sem szubsztrátok adását megelőzően sem pedig azt követően.



15. ábra Kontroll és KAT enzimhiányos egerek mitokondriális oxigénfogyasztása a májban. A mérési eredményeinket medián, 25. és 75. percentilisben tüntettük fel.

Összefoglalás

Jelen munkánkban először vizsgáltuk a mitokondriális funkció változását KAT I és KAT II enzimhiányos egerek agyi- (cerebellum, hippocampus, striatum) és májszöveti mintáiban. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a vad típusú egerekhez viszonyítva szignifikánsan csökkent az exogén szubsztrátok nélkül regisztrált mitokondriális alaplégzés a cerebellumban (KAT I KO) és a hippocampusban (KAT I-, és II KO). Alacsonyabb oxidatív foszforilációs kapacitást (OXPHOS) mutattunk ki a komplex I (KAT I KO) és a komplex II működésével (KAT I-, II KO) összefüggésben is a cerebelláris mintákban. Hasonlóan, a mitokondriális elektrontranszportlánc terminális oxidáza, a IV-es légzési komplex (citokróm c oxidáz) jelentősen csökkent KAT I és II enzimhiányos egerekben. Míg a striatumban egyes respirációs értékek (OXPHOS II) csökkenő tendenciát mutattak, a májban nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest.

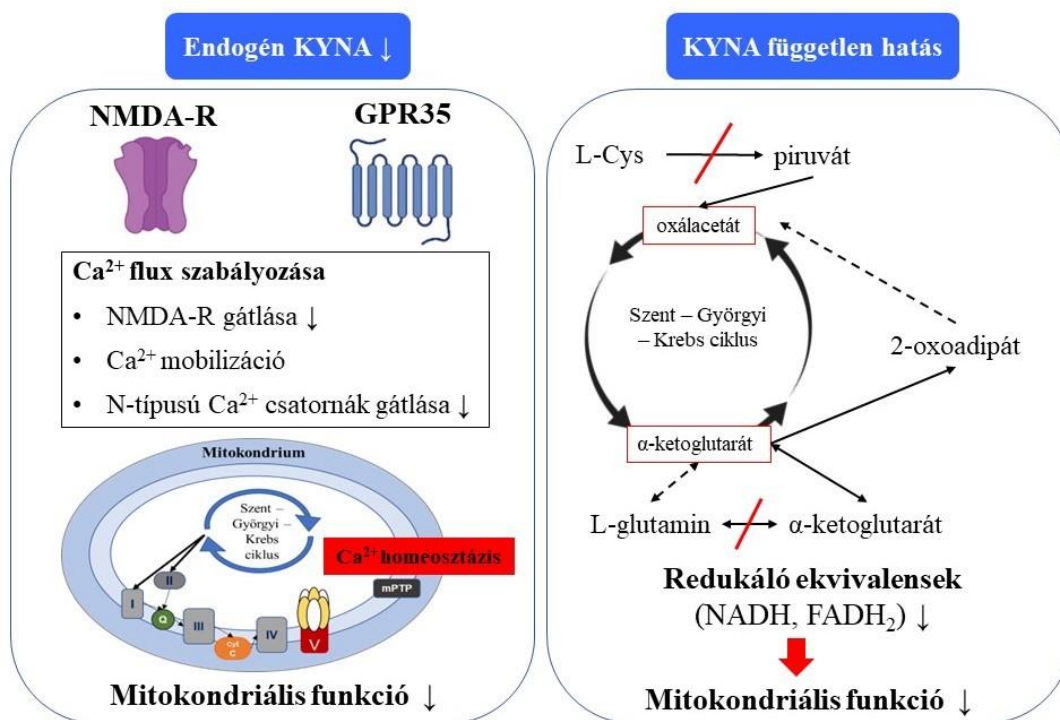
Feltételezzük, hogy ezen mitokondriális hatások háttérében az I.) endogén kinurénsav képződés csökkenéséből eredő és attól II.) független mechanizmusok egyaránt állhatnak (16. ábra)

A KAT enzimek fő funkciója a kinurénsav szintézise L-kinurenin (L-KYN) irreverzibilis transzaminációja során. Valószínűsíthető, hogy a KAT KO egerekben az alacsony KAT enzimaktivitás eredményeként csökken az endogén KYNA termelődése, amely számos celluláris és szubcelluláris folyamatot befolyásolhat fiziológias körülmények között is. Az endogén KYNA szerepet játszik az NMDA-R-ok működésének finomhangolásában, csökkent szintje például befolyásolhatja az NMDA-R közvetítette jelátviteli utakat. Ebből eredően megnövekedhet Ca^{2+} beáramlása a sejtbe és mitokondriumba a csökkent receptorális gátló hatások miatt, mely befolyásolhatja az elektrontranszportlánc működését és ATP termelést. Az NMDA-R-ok az Src és ND2 fehérjéken keresztül fizikai kapcsolatban állnak az ETS-el (Gingrich és mtsai. 2004), jelenleg azonban nem ismert a KYNA modulátor szerepe ezen interakció vonatkozásában.

Az NMDA-R-ok az idegsejteken kívül számos szövettípusban megtalálhatóak (Korde és Maragos 2012; Lobysheva és mtsai. 2013; Selin és mtsai. 2016), illetve Nesterova és mtsai. patkány mitokondriumokon is azonosították őket (Nesterova és mtsai. 2018). Habár májban nem sikerült jelentős eltérést kimutatnunk, nem zárható ki, hogy a KAT KO egerek más szerveiben (pl. szív és gasztrointesztinális traktus) is alacsonyabb mitokondriális légzés mérhető.

A KAT KO mitokondriális hatásainak hátterében KYNA/NMDA-R útvonaltól független mechanizmusok egyaránt állhatnak, hiszen a KAT-ok kapcsolatban állnak a TCA ciklussal. Ismert, hogy a piruvát a glikolitikus útvonal mellett képződhet például az aminosavak metabolizmusa során L-ciszteinekből is, amelyet a citoplazmában a KAT I, míg a mitokondrium mátrixában a KAT III enzim katalizál (2. ábra). A piruvát amennyiben nem lép be a TCA-ba, acetyl-KoA-vá alakul és NADH képződik. A keletkező NADH a komplex I (NADH-ubikinon-oxidoreduktáz) szubsztátja (3. ábra), átalakítását (oxidációját) az enzimkomplex összekapcsolja az ubikinon redukálásával és a protongradiens létrehozásával, amely gradiens végül ATP termelésre fordítódik (ATP szintáz). Így nem zárható ki, hogy KAT enzimhiányos egerekben az OXPHOS csökkenése a szubsztátok alacsonyabb mennyisége miatt alakul ki. A fentiekén túl a KAT enzimek közvetítenek a glutamát-, lizin- és aszpartát metabolizmusban is (2. ábra).

A KAT II enzim katalizálja a α -ketoglutarát - 2-oxoadipát átalakulást is, amely az acetyl-KoA képződés egyik előanyaga. Feltételezhető, hogy a KAT II enzim hiánya miatt gátlódik α -ketoglutarát $\rightarrow$ 2-oxoadipát $\rightarrow$ acetyl-KoA konverzió. Az acetyl-KoA szükséges a TCA ciklus első sebességhatározó lépéséhez az oxalacetát - citrát átalakuláshoz, hiányában csökken a redukáló ekvivalensek mennyisége (NADH és FADH_2), amely a komplex I- és II csökkent OXPHOS kapacitását eredményezi.



16. ábra A mitokondriális funkciót befolyásoló mechanizmusok KAT KO egerekben

Kísérleteink fő limitációja, hogy vad típusú egerekben KAT inhibitorokat nem alkalmaztunk és nem vizsgáltuk ezen gátlószerek mitokondriális hatásait, illetve nem mértük az endogén KYNA lokális szintjeit. Jelen munkánkhoz kapcsolódóan, további vizsgálatokat tervezünk A KAT enzimhiányos egerek csökkent mitokondriális működésének hátterében álló okok (KYNA csökkent mennyisége, egyéb KAT által katalizált reakciók) felderítése céljából.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a SZTE SZAOK Sebészeti Műtéttani Intézet minden dolgozójának a technikai segítség és háttér biztosításáért, valamint az egyes részfeladatok elvégzésének betanításáért, különös tekintettel Dr Nászai Annának.

Hálás köszönet témavezetőmnek Dr Juhász Lászlónak a végtelen türelméért és segítségért, amellyel munkám során mindvégig támogatott.

Köszönettel tartozom Vécsei László Professzor Úrnak, aki lehetővé tette a kooperációt, valamint Masaru Tanaka és a MTA-SZTE Idegtudományi Kutatócsoport munkatársainak a KAT KO egerek szaporításáért és fenntartásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr Kaszaki József Tanár Úrnak, akinek segítségével talán sosem kezdtem volna bele tudományos diákköri munkámba.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom minden szerettemnek és barátomnak, akik támogatásukkal és bátorításukkal egyengették az utamat.

Irodalomjegyzék

- Abramov AY, Duchen MR. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1777(7-8):953-64. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.04.017. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18471431.
- Alkondon M, Pereira EF, Todd SW, Randall WR, Lane MV, Albuquerque EX. Functional G-protein-coupled receptor 35 is expressed by neurons in the CA1 field of the hippocampus. *Biochem Pharmacol*. 2015 Feb 15;93(4):506-18. doi: 10.1016/j.bcp.2014.12.009. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25542997.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005 Mar 31;434(7033):658-62. doi: 10.1038/nature03434. PMID: 15800627.
- Bender DA. Biochemistry of tryptophan in health and disease. *Mol Aspects Med*. 1983;6(2):101-97. doi: 10.1016/0098-2997(83)90005-5. PMID: 6371429.
- Berlinguer-Palmini R, Masi A, Narducci R, Cavone L, Maratea D, Cozzi A, Sili M, Moroni F, Mannaioni G. GPR35 activation reduces Ca²⁺ transients and contributes to the kynurenic acid-dependent reduction of synaptic activity at CA3-CA1 synapses. *PLoS One*. 2013 Nov 29;8(11):e82180. doi: 10.1371/journal.pone.0082180. PMID: 24312407; PMCID: PMC3843712.
- Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, Munnich A, Rötig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet*. 1995 Oct;11(2):144-9. doi: 10.1038/ng1095-144. PMID: 7550341.
- Canli T, Lesch KP. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci*. 2007 Sep;10(9):1103-9. doi: 10.1038/nn1964. PMID: 17726476.
- Carafoli E. The interplay of mitochondria with calcium: an historical appraisal. *Cell Calcium*. 2012 Jul;52(1):1-8. doi: 10.1016/j.ceca.2012.02.007. Epub 2012 May 15. PMID: 22591641.

- Curto M, Lionetto L, Negro A, Capi M, Fazio F, Giamberardino MA, Simmaco M, Nicoletti F, Martelletti P. Altered kynurenine pathway metabolites in serum of chronic migraine patients. *J Headache Pain*. 2015;17:47. doi: 10.1186/s10194-016-0638-5. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27130315; PMCID: PMC4851673.
- Daniels TE, Olsen EM, Tyrka AR. Stress and Psychiatric Disorders: The Role of Mitochondria. *Annu Rev Clin Psychol*. 2020 May 7;16:165-186. doi: 10.1146/annurev-clinpsy-082719-104030. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32092280; PMCID: PMC8007172.
- Diogo CV, Yambire KF, Fernández Mosquera L, Branco F T, Raimundo N. Mitochondrial adventures at the organelle society. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 May 27;500(1):87-93. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.124. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28456629; PMCID: PMC5930832.
- Fiske CH, Subbarow Y. PHOSPHORUS COMPOUNDS OF MUSCLE AND LIVER. *Science*. 1929 Oct 18;70(1816):381-2. doi: 10.1126/science.70.1816.381-a. PMID: 17756191.
- Gano LB, Patel M, Rho JM. Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. *J Lipid Res*. 2014 Nov;55(11):2211-28. doi: 10.1194/jlr.R048975. Epub 2014 May 20. PMID: 24847102; PMCID: PMC4617125.
- Gingrich JR, Pelkey KA, Fam SR, Huang Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Salter MW. Unique domain anchoring of Src to synaptic NMDA receptors via the mitochondrial protein NADH dehydrogenase subunit 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101(16):6237-42. doi: 10.1073/pnas.0401413101. Epub 2004 Apr 6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 20;103(25):9744. PMID: 15069201; PMCID: PMC395953.
- Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res*. 1997 Nov 1;50(3):457-65. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19971101)50:3<457::AID-JNR12>3.0.CO;2-3. PMID: 9364331.
- Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*. 1979 Jul;195(2):460-7. doi: 10.1016/0003-9861(79)90372-2. PMID: 38751.

- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988 Feb 25;331(6158):717-9. doi: 10.1038/331717a0. PMID: 2830540.
- Joó G, Horváth G. A ketamin és izomerjeinek szerepe a fájdalomcsillapításban. *Aneszteziol Int Ter* 2001;31(1):9-20.
- KLINGMAN JD, HANDLER P. Partial purification and properties of renal glutaminase. *J Biol Chem*. 1958 May;232(1):369-80. PMID: 13549426.
- Korde AS, Maragos WF. Identification of an N-methyl-D-aspartate receptor in isolated nervous system mitochondria. *J Biol Chem*. 2012 Oct 12;287(42):35192-35200. doi: 10.1074/jbc.M111.322032. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22918829; PMCID: PMC3471715.
- Krebs HA, Johnson WA. Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem J*. 1937 Apr;31(4):645-60. doi: 10.1042/bj0310645. PMID: 16746382; PMCID: PMC1266984.
- Lobysheva NV, Selin AA, Vangeli IM, Byvshev IM, Yaguzhinsky LS, Nartsissov YR. Glutamate induces H₂O₂ synthesis in nonsynaptic brain mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:428-435. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.030. Epub 2013 Jul 24. PMID: 23892051.
- Lohmann K. Über die Pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften*. 1929;17:624–625. doi: 10.1007/BF01506215.
- Maruyama K. The Discovery of Adenosine Triphosphate and the Establishment of its Structure. *J. Hist. Biol*. 1991;24:145–154. doi: 10.1007/BF00130477.
- Moroni F, Cozzi A, Sili M, Mannaioni G. Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J Neural Transm (Vienna)*. 2012 Feb;119(2):133-9. doi: 10.1007/s00702-011-0763-x. Epub 2012 Jan 4. PMID: 22215208.
- Nesterov SV, Skorobogatova YA, Panteleeva AA, Pavlik LL, Mikheeva IB, Yaguzhinsky LS, Nartsissov YR. NMDA and GABA receptor presence in rat heart mitochondria. *Chem Biol Interact*. 2018 Aug 1;291:40-46. doi: 10.1016/j.cbi.2018.06.004. Epub 2018 Jun 6. PMID: 29883723.

- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ, Maurel P. The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:1-32. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105349. PMID: 17608617.
- Perkins MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res*. 1982 Sep 9;247(1):184-7. doi: 10.1016/0006-8993(82)91048-4. PMID: 6215086.
- Schröcksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta*. 2006 Feb;364(1-2):82-90. doi: 10.1016/j.cca.2005.06.013. Epub 2005 Sep 1. PMID: 16139256.
- Selin AA, Lobysheva NV, Nesterov SV, Skorobogatova YA, Byvshev IM, Pavlik LL, Mikheeva IB, Moshkov DA, Yaguzhinsky LS, Nartsissov YR. On the regulative role of the glutamate receptor in mitochondria. *Biol Chem*. 2016 May;397(5):445-58. doi: 10.1515/hsz-2015-0289. PMID: 26812870.
- Silber BY, Schmitt JA. Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Mar;34(3):387-407. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.08.005. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19715722.
- Stone TW, Stoy N, Darlington LG. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Feb;34(2):136-43. doi: 10.1016/j.tips.2012.09.006. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23123095.
- Szok D, Tajti J, Nyári A, Vécsei L. Therapeutic Approaches for Peripheral and Central Neuropathic Pain. *Behav Neurol*. 2019 Nov 21;2019:8685954. doi: 10.1155/2019/8685954. PMID: 31871494; PMCID: PMC6906810.
- Tanaka M, Bohár Z, Vécsei L. Are Kynurenines Accomplices or Principal Villains in Dementia? Maintenance of Kynurenine Metabolism. *Molecules*. 2020 Jan 28;25(3):564. doi: 10.3390/molecules25030564. PMID: 32012948; PMCID: PMC7036975.

- Tanaka M, Szabó Á, Spekker E, Polyák H, Tóth F, Vécsei L. Mitochondrial Impairment: A Common Motif in Neuropsychiatric Presentation? The Link to the Tryptophan-Kynurenine Metabolic System. *Cells*. 2022 Aug 21;11(16):2607. doi: 10.3390/cells11162607. PMID: 36010683; PMCID: PMC9406499.
- Tanaka M, Toldi J, Vécsei L. Exploring the Etiological Links behind Neurodegenerative Diseases: Inflammatory Cytokines and Bioactive Kynurenines. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 31;21(7):2431. doi: 10.3390/ijms21072431. PMID: 32244523; PMCID: PMC7177899.
- Tanaka M, Tóth F, Polyák H, Szabó Á, Mándi Y, Vécsei L. Immune Influencers in Action: Metabolites and Enzymes of the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Biomedicines*. 2021 Jun 25;9(7):734. doi: 10.3390/biomedicines9070734. PMID: 34202246; PMCID: PMC8301407.
- Tanaka M, Vécsei L. Monitoring the kynurenine system: Concentrations, ratios or what else? *Adv Clin Exp Med*. 2021 Aug;30(8):775-778. doi: 10.17219/acem/139572. PMID: 34418336.
- Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, Toldi J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Jan;12(1):64-82. doi: 10.1038/nrd3793. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23237916.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988 Dec 9;242(4884):1427-30. doi: 10.1126/science.3201231. PMID: 3201231.

Függelék

Rövidítésjegyzék

3-HK - 3-hidroxi-kinurenin

AA – antranilsav

ADP - adenzin-difoszfát

AhR - aril-hidrokarbon receptor

AmA - antimicin A

Asc - aszkorbát

ATP - adenzin-trifoszfát

BSA - bovine serum albumin

Cys - cisztein

D - adenzin-difoszfát

EGTA - bisz-aminoetil-glikoléter-tetraecetsav

ETS - elektrontranszportlánc

G -glutamát

gpr35 - G-fehérje asszociált receptor 35

HEPES - 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav

IDO - idolamin-2,3-deoxigenáz

KAT - kinurenin-aminotranszferáz

KFA - kinurenin-formamidáz

KoA - koenzim A

KP - kinurenin-útvonal

KYNA - kinurénsav

KYN – kinurenin

M – malát

mtDNA - mitokondriális DNS

NADH - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NaN₃ - nátrium-azid

ND2 - NADH dehidrogenáz alegység 2

NMDA - N-metil-D-aszpartát

NMDA-R - N-metil-D-aszpartát receptorok

OXPHOS - oxidatív foszforiláció

PTP - permeabilitási tranzíciós pórus

QUIN – kvinolinsav

Rot - rotenon

S - szukcinát

TCA - citromsavciklus

TDO - triptofán-2,3-deoxigenáz

TMPD - N,N,N',N'-tetrametil-p-pheniledamin dihidroklorid

Trp - triptofán

XA – xanturénsav