SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

A kinurénsav termelődés anatómiai és funkcionális vizsgálata egér agyszövetben

PhD értekezés

Herédi Judit

Témavezetők:

Dr. Gellért Levente
egyetemi adjunktus

Dr. Kis Zsolt
egyetemi adjunktus

2018

Szeged

1 Tartalomjegyzék

1 Tartalomjegyzék ... 2
2 Rövidítések jegyzéke ... 4
3 Bevezetés ... 6
3.1 A kinurenin útvonal ... 6
3.2 A KYNA neuromodulátoros hatásai ... 9
3.3 A KYNA neurodegeneratív és neuropszichiátriai kórképekben ... 10
3.4 A KYNA szintézise és a folyamat lokalizációja emlős agyszövetben ... 12
3.5 A KYNA termelődés genetikai és farmakológiai modulálása ... 13
3.5.1 A KYNA termelődés genetikai manipulációja ... 13
3.5.2 A KYNA termelődés farmakológiai manipulációja a KYNA előanyagával, az L-KYN-nel ... 14
3.5.3 A KYNA termelődés farmakológiai manipulációja specifikus KP enzim gátlással ... 15
3.6 A kinurenin rendszer különbségei emlős fajokban ... 15
4 Célkitűzések ... 17
5 Anyagok és Módszerek ... 18
5.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata ... 18
5.1.1 Szövet preparálás a hisztológiai vizsgálatokhoz ... 18
5.1.2 RNS próba szintézis ... 18
5.1.3 RNS *in situ* hibridizáció ... 19
5.1.4 Fluoreszcens immunhisztokémia ... 19
5.1.5 Sejt transzfekció és immuncitokémia ... 20
5.1.6 SDS gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot ... 20
5.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata ... 21
5.2.1 Szövet preparálás az *in vitro* kísérletekhez ... 21
5.2.2 Az *in vitro* kísérletsorozat csoportjai ... 22
5.2.3 SDS-PAGE és Western blot ... 22
5.2.4 HPLC ... 23
5.2.5 A túlélő agyszeletek újrametszése ... 24
5.2.6 Krezil ibolya festés ... 24
5.2.7 Fluoreszcens immunhisztokémia ... 24

5.2.8 *In vitro* elektrofiziológia ... 24
5.2.9 Laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése ... 26
5.2.10 Hexokináz (HK) aktivitás mérése ... 27
5.2.11 Alkalmazott statisztikai módszerek ... 27
6 A kísérletekben való részvétel ... 28
7 Eredmények ... 29
7.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata ... 29
7.1.1 *kat-2* mRNS expresszió egér agyszövetben ... 29
7.1.2 KAT-2 fehérje expresszió egér agyszövetben ... 30
7.1.3 Antitest validálás ... 35
7.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata ... 37
7.2.1 Az agyszeletek glükóz fogyasztása ... 37
7.2.2 Az agyszeletek életképessége ... 38
7.2.3 Az agyszövet strukturális integritása ... 39
7.2.4 Az agyszövet szinaptikus működése ... 41
7.2.5 A neuronok és asztrociták működése az agyszeletekben ... 42
7.2.6 A bazális és L-KYN indukált KYNA termelődés egér agyszeletekben ... 45
7.2.7 Specifikus KAT-2 gátlás hatása az L-KYN indukálta KYNA termelődésre ... 47
8 Diszkusszió ... 48
8.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata ... 48
8.1.1 A KAT-2 enzim expressziós profilja egér agyszövetben ... 48
8.1.2 A gliális és interneuronális KYNA felszabadulás lehetséges hatása a GABAerg működésre ... 50
8.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata ... 51
8.2.1 Az agyszeletek életképessége, működése az *in vitro* modellben ... 51
8.2.2 Az egér agyszeletek bazális és indukált KYNA termelése a modellben ... 54
8.2.3 A KYNA termelés modulálása specifikus KAT-2 gátlószerrel egér agyszövetben ... 56
9 Következtetések ... 57
10 Köszönetnyilvánítás ... 59
11 Irodalomjegyzék ... 60
12 Összefoglaló ... 69
13 Summary ... 72

2 Rövidítések jegyzéke

α7nAChR: α-7 nikotinos acetilkolin receptor

3-HANA: 3-hidroxi-antranil sav

3-HK: 3-hidroxi-kinurenin

3-NLT: 3-nitro-L-tirozint

ACh: acetil-kolin

ACSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)

AMPA: α-amino-3-hiroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav

ANA: antranilsav

AhR: aril-hidrokarbon receptor

BBB: vér-agy gát (blood brain barrier)

CA1: az Ammon szarv 1-es régiója

CA3: az Ammon szarv 3-as régiója

CSF: cerebrospinális folyadék (cerebrospinal fluid)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEPC: dietil-pirokarbonát

DG: gyrus dentatus

DIG: digoxigenin

EPSP: serkentő poszt szinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potential)

GABA: gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)

GPR35: G_i-fehérje asszociált receptor 35 (G_i protein-coupled receptor 35)

HK: hexokináz

HRP: tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)

I/O: bemenet/kimenet (input/output)

IDO1: indolamin-2,3-deoxigenáz

KAT: kinurenin aminotranszferáz

KAT-2: kinurenin aminotranszferáz-2

KAT-4: kinurenin aminotranszferáz-4

KMO: kinurenin-monooxigenáz

KP: kinurenin útvonal (kynurenine pathway)

KT: kis térfogat

KYNA: kinurénsav (kynurenic acid)

LDH: laktát dehidrogenáz

L-KYN: L-kinurenin

LOD: kimutatási határ (limit of detection)

LOQ: meghatározási határ (limit of quantification)

MLA: metil-akonitin

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NBT-BCIP: nitroblue-tetrazólium-5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát

NDS: normál szamár szérum (normal donkey serum)

NMDA: N-metil-D-aszpartát

NPAS4: neuronal Per-Arnt-Sim domain protein 4

NT: nagy térfogat

PB: foszfát-puffer (phosphate buffer)

PFA: paraformaldehid

PPP: páros pulzus paradigma

PPR: páros pulzus arány (paired pulse ratio)

S-ESBA: (S)-4-(etil-szulfonil)benzoil-alanin (KAT-2 enzim gátló)

SNc: substantia nigra pars compacta

SNr: substantia nigra pars reticulata

SS: szomatoszenzoros

SSC: nátrium citrát puffer (saline sodium citrate)

TDO: triptofán-2,3-deoxigenáz

TRP: triptofán

Tx100: Triton X-100

QUIN: kvinolénsav

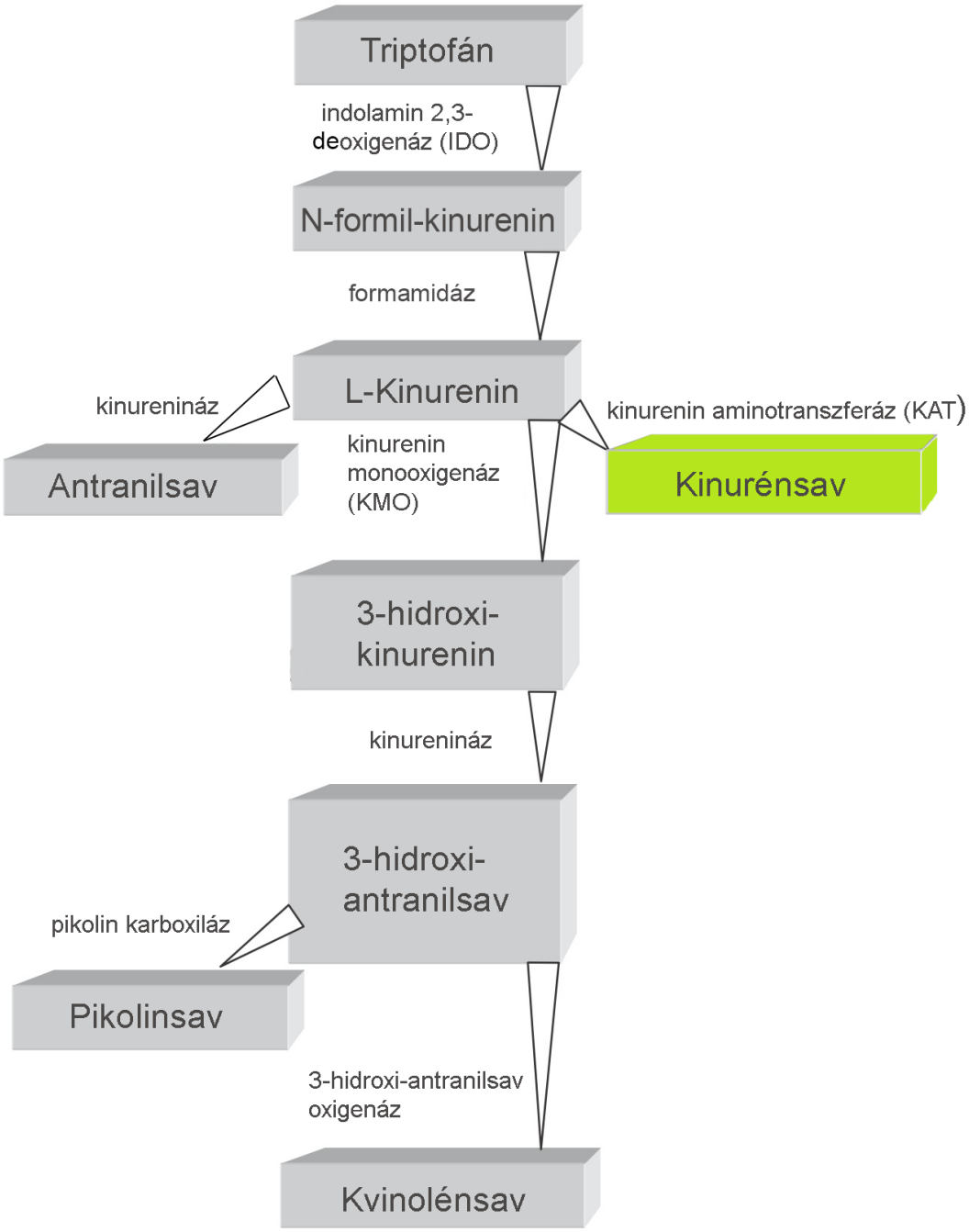
3 Bevezetés

3.1 A kinurenin útvonal

A triptofán (TRP) egyike a tíz esszenciális aminosavnak. Részt vesz a fehérjék szintézisében, és számos biológiailag aktív anyag prekurzora. A TRP több útvonalon keresztül is metabolizálódhat. Lebontása során keletkezik a szerotonin neurotranszmitter, amelynek fontos szerepe van többek között a hangulat, az étvágy, az alvás, illetve a kognitív funkciók szabályozásában (Canli és Lesch, 2007). Ugyanezen a metabolikus útvonalon keletkezik a melatonin hormon is az agyszövetben, amely főként a cirkadián ritmus szabályzásában vesz részt (Yates és Herbert, 1976). Azonban ismert, hogy emlős agyszövetben a TRP 95%-a az úgynevezett kinurenin útvonalon (KP) alakul át (Bender 1983) **(1.ábra)**. A KP metabolitjait közösen kinurenineknek nevezzük, amelyekről kimutatták, hogy számos fiziológiás és patológiás folyamatban részt vesznek, főként az ideg- illetve az immunrendszert érintve (Stone és mtsai., 2013; Vecsei és mtsai., 2013).

Az útvonal kezdetén a TRP az indolamin-2,3-deoxigenáz (IDO), vagy a májban is jelenlévő specifikusabb triptofán-2,3-deoxigenáz (TDO) által N-formil-kinureninné konvertálódik, ami a továbbiakban formamidáz által L-kinureninné (L-KYN) alakul. Az így létrejövő L-KYN/TRP koncentráció arány szabályzó faktora a TRP további lebontásának (Schrocksnadel és mtsai., 2006).

Az L-KYN az útvonal központi molekulájaként az összes többi kinurenin metabolit forrásaként szolgál. Megtalálható az agyban, a vérben és a perifériás szövetekben is mikromólos koncentrációban. Az agyszövet az L-KYN 60%-át a perifériáról veszi fel. A molekula neutrális aminosav karriereken keresztül könnyen képes átjutni a vér-agy gáton (BBB) (Fukui és mtsai., 1991). A metabolit további 40%-a lokálisan az agyszövetben szintetizálódik. Az L-KYN endogén ligandja az aril-hidrokarbon receptornak (AhR) (Opitz és mtsai., 2011), amelyen keresztül a gyulladásos és immunválaszok, illetve a tumor képződés szabályozásában is részt vehet (Bessede és mtsai., 2014; Chen és mtsai., 2014). Az L-KYN-ből keletkező négy legfontosabb neuroaktív komponens a következő: (1) 3-hidroxi-kinurenin (3-HK), (2) antranilsav (ANA), (3) kvinolénsav (QUIN) és (4) kinurénsav (KYNA).

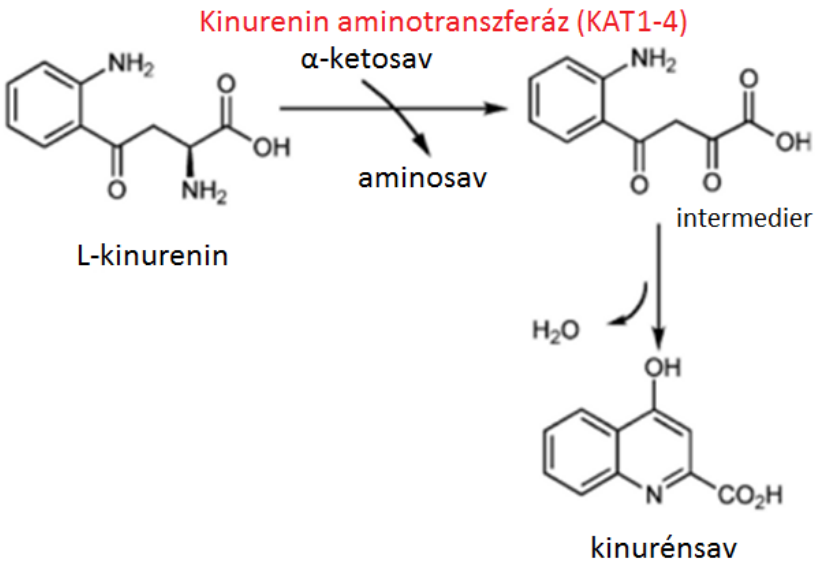


1. ábra: A TRP metabolizmusa a kinurenin útvonalon keresztül. Az útvonal metabolitjai és enzimei (Stone és mtsai., 2013 nyomán módosítva).

A 3-HK és az ANA közvetlenül az L-KYN-ből alakul ki. Míg az előbbi kialakulását, a kizárólag mikrogliákban jelenlévő, kinurenin-monooxigenáz (KMO) katalizálja, addig az ANA a kinurenináz enzim működése során keletkezik. Mindkettőnek idegkárosító hatása van a szabadgyök generálás, és így az oxidatív stressz növelése révén (Nemeth és mtsai., 2005). Koncentrációjuk patológiás körülmények között (pl.: Parkinson-kór, Huntington-kór) emelkedik (Pearson és Reynolds, 1992).

A 3-HK a kinurenináz segítségével tovább alakul 3-hidroxi-antranil savvá (3-HANA), majd ez konvertálódik a 3-hidroxi-antranilsav oxigenáz által QUIN-né. A QUIN az agyszövetben felhalmozódva neurotoxikus hatású lehet. Neurotoxicitását legalább négy mechanizmuson keresztül képes kifejteni. Guillemin és mtsai. értekezése alapján ezek a következőek: 1. a kvinolénsav patológiás koncentrációban képes aktiválni az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptort, 2. képes gátolni a glutamát visszavételét a szinaptikus vezikulákba, ezzel erős neurotoxicitást okozva a mikrokörnyezetben (Tavares és mtsai., 2002), 3. lipidperoxidációt okoz (Rios és Santamaria, 1991; Behan és Stone, 2002) és 4. képes a saját és más excitotoxinok (pl. NMDA, glutamát) toxicitását fokozni (Schurr és Rigor, 1993; Bordelon és mtsai., 1997) (Guillemin és mtsai., 2005). A QUIN végül nikotinamid-adenin-dinukleotiddá (NAD) alakul, amely nélkülözhetetlen vegyület a sejtek működése során (pl.: glikolízis, DNS javító mechanizmusok, transzkripció ellenőrzés stb.) (Ying 2006).

A neuroprotekciós stratégiák szempontjából a kinurenin útvonal legfontosabb metabolitja és egyben egyik végterméke a KYNA, ami közvetlenül L-KYN-ből szintetizálódik irreverzibilis transzamináció során. A folyamatot a kinurenin aminotranszferáz (KAT) enzimek katalizálják (részleteiben ld 3.4 fejezet) **(2. ábra)**.



2. ábra: Az L-KYN-KYNA átalakulás mechanizmusa (Han és mtsai., 2010 nyomán módosítva).

3.2 A KYNA neuromodulátoros hatásai

A KYNA számos ionotróp és metabotróp receptor működését modulálja a központi idegrendszerben.

Mikromólos koncentrációban (IC50: 15-240 μM) egyetlen ismert endogén kompetitív antagonistája az NMDA receptornak, annak sztrichin-inszenzitív glicin kötőhelyén fejtve ki hatását (Birch és mtsai., 1988).

Koncentráció-függő módon antagonista és agonista hatást is kifejthet az α-amino-3-hiroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav (AMPA) receptorokon (Prescott és mtsai., 2006; Rozsa és mtsai., 2008). Alacsony koncentrációban (10 μM) facilitálja az AMPA receptor működést, míg magas koncentrációban (1000 μM) kompetitív módon gátolja azt.

Kérdéses a KYNA α7 nikotinos acetilkolin receptoron (α7nAChR) való hatása. Hilmas és mtsai. szerint alacsony mikromólos (EC50:~7 μM) koncentrációban nem-kompetitív antagonistája a receptornak (Hilmas és mtsai., 2001). Bizonyos tanulmányokban azonban nem volt kimutatható hatása az acetil-kolin (Ach) kiváltotta metil-akonitin (MLA) szenzitív áramokra, sem primer hippokampális sejtkultúrákban, sem patkány vagy egér akut agyszeletekben (Mok és mtsai., 2009; Dobelis és mtsai., 2012).

Az elmúlt években leírták, hogy a KYNA endogén ligandja az asztrocitákon (Berlinguer-Palmini és mtsai., 2013) és idegsejteken (Alkondon és mtsai., 2015) egyaránt expresszálódó G_i-fehérje asszociált receptor 35-nek (GPR35) is (EC50: 0,1-30μM) (Wang és mtsai., 2006). A GPR35 receptorokon keresztül a KYNA jelentősen csökkentette a kiváltott serkentő posztszinaptikus potenciálok (EPSP) amplitúdóját a hippokampusz CA1-es régiójában, illetve a Ca^{2+} tranzienseket asztrocita sejtkultúrákban (Berlinguer-Palmini és mtsai., 2013).

Mindezen receptormoduláló hatásain keresztül a KYNA képes szabályozni a glutamáterg (Carpenedo és mtsai., 2001), a kolinerg (Koshy Cherian és mtsai., 2014), a GABAerg (Beggiato és mtsai., 2014) és a dopaminerg (Wu és mtsai., 2007) neurotranszmissziót egyaránt az agyszövetben.

A KYNA glutamát rendszert moduláló hatását számos tanulmány bizonyítja. Szisztémás L-KYN kezelés jelentősen növelte a KYNA szintet, ezzel párhuzamosan 30%-kal csökkentette a glutamát szintet a prefrontális kéreg területén patkányokban (Alexander és mtsai., 2012). A KYNA direkt, lokális adagolása a striátum (Carpenedo és mtsai., 2001) és a hippokampusz (Pocivavsek és mtsai., 2011) területén szintén jelentős glutamát szint csökkenést eredményezett. Az α7nACh receptor agonista galantamin azonban visszaállította a csökkent

glutamát szintet a bazális értékre, így az α7nACh receptor hozzájárulhat a KYNA glutamáterg rendszert szupresszáló hatásához.

Zmarowski és mtsai. által végzett kísérletekben, mind a lokális KYNA, mind a szisztémás L-KYN kezelés csökkentette a bazális és amfetamin kiváltotta ACh felszabadulást a prefrontális kéreg területén. Ezt a hatást egy KAT enzim gátlóval képesek voltak kivédeni. Az (S)-4-(etil-szulfonil)benzoil-alanin (S-ESBA) csökkentette a KYNA szintet, és 2-3-szoros ACh szint növekedést eredményezett, bizonyítva a metabolit befolyását a kolinerg rendszerre (Zmarowski és mtsai., 2009).

A KYNA adagolása reverz mikrodialízis segítségével, reverzibilis módon csökkentette a gamma-amino-vajsav (GABA) szintet is a prefrontális kéregben. Az endogén KYNA termelődés gátlásával a GABA szint azonban helyreállt (Beggiato és mtsai., 2014). A hatásmechanizmus vizsgálata során a galantamin kivédte a KYNA indukálta GABA szint csökkenést a kéregben, ezért az α7nACh receptornak fontos szerepe lehet a KYNA és GABA közötti interakcióban is (Beggiato és mtsai., 2013).

Továbbá, a KYNA vagy az L-KYN intrastriatális infúziója éber patkányokban csökkentette a dopamin szintet. Az α7nACh receptor agonista kolin, illetve galantamin helyreállította a dopamin szintet, míg az NMDA receptor agonista D-szerinnel ez nem sikerült. Ez alapján a KYNA dopamin rendszert moduláló hatása szintén az α7nACh receptorokon keresztül valósul meg (Rassoulpour és mtsai., 2005; Wu és mtsai., 2007).

A KYNA neuromodulátoros hatása a központi idegrendszerben szerteágazó és komplex; számos receptort és neurotranszmitter rendszert érint. Éppen ezért a KYNA szint abnormális csökkenése vagy növekedése a neurotranszmitter rendszerek felborult működéséhez is vezethet.

3.3 A KYNA neurodegeneratív és neuropszichiátriai kórképekben

A KYNA metabolizmus egyensúlya számos neurodegeneratív és neuropszichiátriai betegségben felborulhat, így a megváltozott KYNA termelődés érintettsége a különféle központi idegrendszeri megbetegedésekben, illetve annak terápiás célú szabályozása széles körben vizsgált (Dounay és mtsai., 2015; Maddison és Giorgini 2015).

Csökkent KYNA szint figyelhető meg Parkinson-kór esetén a substantia nigra, a prefrontális kéreg és a putamen területén (Ogawa és mtsai., 1992). Állatkísérletek igazolják, hogy a KAT aktivitás is csökken ezeken a területeken egér, illetve patkány modellekben egyaránt

(Luchowski és mtsai., 2002; Knyihar-Csillik és mtsai., 2004). A KYNA szint növelése csökkentette a QUIN okozta nigrostriatális dopaminerg neuronok pusztulását patkány agyszövetben (Miranda és mtsai., 1997), illetve a 6-hidroxidopamin okozta neurodegenerációt a striátum területén (Silva-Adaya és mtsai., 2011).

Ugyancsak alacsonyabb a KYNA szint Huntington betegek agykérgi területein (Beal és mtsai., 1992), striátumában, illetve cerebrospinális folyadékában (CSF) (Beal és mtsai., 1990). Ezt a megfigyelést támogatják az *in vitro* patkány Huntington modellek is. A 3-nitropropionsav kezelés csökkentette a KAT aktivitást, és így a KYNA szintézist kérgi (Luchowski és mtsai., 2002) és striatális patkány szeletekben (Csillik és mtsai., 2002). A KMO genetikai és farmakológiai gátlása növelte a KYNA szintet és csökkentette a neurodegenerációt *Drosophila* Huntington modellben (Campesan és mtsai., 2011). Egy KYNA analóg szintén csökkentette a betegség tüneteit transzgenikus egér modellben (Zadori és mtsai., 2011).

Bizonyos betegségekben a KYNA szint azonban abnormálisan magas. Növekszik a metabolit szintje skizofrén betegek különböző agykérgi területein (Schwarcz és mtsai., 2001), illetve CSF-jében (Erhardt és mtsai., 2001; Linderholm és mtsai., 2012). Down szindrómás betegek frontális és temporális kérgi területein is emelkedett KYNA szint figyelhető meg (Baran és mtsai., 1996). Állatkísérletekben a prenatális L-KYN kezelés a KYNA koncentráció növelése révén a figyelmi képesség károsodásához (Hahn és mtsai., 2018), illetve a térbeli navigáció és referencia memória sérüléséhez vezetett felnőtt korban patkányokban (Pocivavsek és mtsai., 2014). *Caenorhabditis elegans*-on végzett friss tanulmány szerint, a KYNA felhalmozódás hozzájárul az öregedés során megfigyelhető tanulási és memória folyamatok károsodásához is (Vohra és mtsai., 2018). Mindezen kísérletek a megnövekedett KYNA szint káros hatását bizonyítják, főként a kognitív funkciókra hatva.

A központi idegrendszert érintő megbetegedésekben kimutatott csökkent vagy megnövekedett KYNA szint alapján a KYNA termelődés mindkét irányú regulációja terápiás eszközként szolgálhat a különböző neurodegeneratív és neuropszichiátriai kórképek esetén.

3.4 A KYNA szintézise és a folyamat lokalizációja emlős agyszövetben

Az L-KYN-KYNA transzaminációt katalizáló KAT enzimeknek négy izoformája ismert (KAT-1-KAT-4).

A KAT-1 és KAT-3 pH optimuma pH 9-10 között van (Han és mtsai., 2010), így a fiziológiás KYNA termelésben nem tulajdonítanak jelentős szerepet ezeknek az izoformáknak (Guidetti és mtsai., 1997). A KAT-2 és KAT-4 izoformák ezzel szemben fiziológiás pH-n (pH 7-8) mutatják a legnagyobb aktivitást. Mivel ember agyszövet esetén a KYNA termelődésben legnagyobb szerepe a KAT-2-nek van (Guidetti és mtsai., 2007a), a folyamat manipulációja során a KAT-2 izoforma a vizsgálatok fő célpontja.

Patkány agyszöveten végzett kísérletek alapján elmondható, hogy a KAT-2 főként asztrocita sejtekben van jelen. Jelentős gliális kat-2 mRNS expressziót detektáltak patkány agyszövet számos területén (pl. hippokampusz, corpus callosum, szubventrikuláris zóna stb.) (Song és mtsai., 2018). A KAT-2 fehérjét szintén asztrocitákban, illetve az ereket körül vevő asztrocita végtalpakban detektálták számos agyterületen patkányban. Az enzim neuronális expressziója nem volt megfigyelhető ezekben a kísérletekben (Guidetti és mtsai., 2007b). Mindezen eredmények alapján az elfogadott nézet az, hogy az asztrociták a felelősek a KYNA termeléséért az emlős agyszövetben (Guillemin és mtsai., 2001).

Ennek a nézetnek ellentmondanak azok a vizsgálatok, amelyekben asztrociták mellett idegsejtekben is detektálták az enzimet. Patkány agykérgi (Rzeski és mtsai., 2005) és emberi idegsejt kultúrákban (Guillemin és mtsai., 2007) is kimutatták a KAT-2 neuronális jelenlétét. Szórványos neuronális KAT-2 lokalizációt tapasztaltak patkány hippokampuszban, piriform kérgében és a diagonális köteg területén is (Okuno és mtsai., 1990; Du és mtsai., 1992). A substantia nigra dopaminerg neuronjaiban a KAT-1 izoformát és annak csökkent expresszióját detektálták egér Parkinson-kór modellben (Knyihar-Csillik és mtsai., 2004). Továbbá az agyszöveten kívül, patkány gerincvelő és nyúltvelő (Kapoor és mtsai., 1997), illetve patkány retina ganglionális sejtrétegében is bizonyított az enzim neuronális jelenléte (Rejdak és mtsai., 2001).

3.5 A KYNA termelődés genetikai és farmakológiai modulálása

A KYNA termelődés terápiás célú szabályozása genetikai, illetve farmakológiai eszközökkel egyaránt vizsgált.

3.5.1 A KYNA termelődés genetikai manipulációja

A KYNA produkció genetikai modulálása során leggyakrabban alkalmazott modell állat az egér. A kat-2 null mutáns egerek agyszöveti KYNA szintje jelentősen lecsökken. Emellett a glutamát tónus növekszik a hippokampusz területén, valamint az állatok jobb teljesítményt mutatnak több kognitív magatartás tesztben is (Potter és mtsai., 2010). Ugyanakkor más kísérletek során az enzim genetikai delétiója a KYNA szint csökkenése mellett, hiperaktivitást és abnormális motoros koordinációt is eredményezett (Yu és mtsai., 2004).

A kat-2 null mutáns állatok előnye, hogy lehetőséget adnak az enzim funkciójának specifikus vizsgálatára fiziológiás, illetve patológiás körülmények között egyaránt. A genetikai manipulációnak azonban számos hátránya is van. A kat-2 null mutáns egerekben a KAT aktivitás és KYNA szint csökkenés minden esetben átmeneti volt. A változások a transzgenikus állatok posztnatális első hónapjában voltak megfigyelhetőek, míg két hónapos korukra nem mutatták a fentiekben leírt fenotípusokat (Alkondon és Albuquerque 2004). A KYNA szint és a viselkedés normalizálódásáért feltehetően kompenzáló mechanizmusok a felelősek. Ilyen mechanizmus lehet más KAT izoformák (pl.: KAT-1, KAT-3) expressziójának növekedése a fejlődés során (Yu és mtsai., 2006). Emellett az eddig vizsgált kat-2 transzgenikus állatok null mutációja az egész szervezetet, így a perifériás KYNA funkciót is érintette, ami ilyen módon nem ad lehetőséget a KYNA termelődés szövet specifikus, kizárólag a központi idegrendszert érintő hatásának vizsgálatára.

A KAT-2 szövet vagy akár sejt specifikus működésének és terápiás szabályozásának transzgenikus egereken való vizsgálatához elengedhetetlen az enzim expressziós profiljának ismerete a vadtípusú állatokban. Annak ellenére, hogy a KAT-2 genetikai manipulációja főként egerekben vizsgált (Yu és mtsai., 2004; Potter és mtsai., 2010), a KYNA termelődés lokalizációja, illetve folyamata nem tisztázott egerekben. Nincs adat a KAT-2 expressziójáról, sem annak pontos funkciójáról egér agyszövetben.

3.5.2 A KYNA termelődés farmakológiai manipulációja a KYNA előanyagával, az L-KYN-nel

A farmakológiai vizsgálatok során a perifériás KYNA adminisztráció nem eredményez jelentős agyi KYNA szint növekedést, mivel a metabolit nehezen jut át a BBB-n (Fukui és mtsai., 1991).

A KYNA termelődés fokozásának legegyszerűbb és hatékony farmakológiai módja annak előanyagának alkalmazása. Az L-KYN, BBB-n való jó penetrációs képessége révén, szisztémásan is alkalmazható. Az L-KYN szisztémás adminisztrációja szignifikáns KYNA szint emelkedést eredményez patkány prefrontális kéregben (Konradsson-Geuken és mtsai., 2010) és striátumban (Swartz és mtsai., 1990), illetve egér előagyi és kiagyi területeken is (Wang és mtsai., 2012). A szisztémás L-KYN kezelés terápiás hatása számos központi idegrendszert érintő megbetegedésben vizsgált, többek között agyi iszkémia (Gigler és mtsai., 2007; Gellert és mtsai., 2013), migrén (Chauvel és mtsai., 2012) és Parkinson-kór modellekben is (Silva-Adaya és mtsai., 2011). A KYNA termelődés fokozható az agyszövetben az L-KYN lokális alkalmazásával is. Növekedett a KYNA szint az L-KYN reverz mikrodialízissel történő adagolásával patkány kisagy, prefrontális kéreg és striátum területén (Wu és mtsai., 2007; Wu és mtsai., 2010; Blanco Ayala és mtsai., 2015).

Az L-KYN indukálta KYNA produkció *in vitro* rendszerekben is vizsgált. Az akut agyszelet preparátumok lehetőséget nyújtanak a KYNA termelődés folyamatának -például az azt moduláló faktorok- szélesebb spektrumú farmakológiai vizsgálatára, illetve annak szövet specifikus terápiás szabályozására is. Patkány akut kortikális agyszeletek esetén jelentősen megnövekszik a KYNA mennyisége az inkubációs médiumban L-KYN kezelés hatására (Hodgkins és mtsai., 1999). Patkány túlélő agyszeletekben mutatták ki, hogy a KYNA termelődés függ bizonyos ionok (pl. Cl^-, Na^+) kocentrációjától (Turski és mtsai., 1989), illetve a glükóz ellátottságtól is (Gramsbergen és mtsai., 1997). Ugyancsak növelhető a KYNA szint L-KYN-nel patkány akut hippokampális agyszeletekben, ahol az endogén termelődött KYNA csökkentette az epileptiform aktivitás előfordulásának gyakoriságát (Scharfman és mtsai., 1999), illetve gátolta az NMDA és α7 nACh receptorokat (Alkondon és mtsai., 2011).

A KYNA termelődés folymatának karakterizálására, illetve a folyamat szövet specifikus terápiás célú szabályozására az *in vitro* akut agyszelet preparátumok jó alapot biztosítanak és kiegészítik az *in vivo* kísérletek eredményeit. Egér akut agyszelet preparátumokban a KYNA termelődés azonban eddig nem vizsgált; nincs adat sem a bazális, sem az L-KYN indukálta KYNA produkcióról.

3.5.3 A KYNA termelődés farmakológiai manipulációja specifikus KP enzim gátlással

A KYNA szint szabályozásának másik módja lehet a KP bizonyos enzimeinek gátlása, amely révén a KP metabolizmus a KYNA termelődés irányába vagy ellenébe billenthető.

A KMO enzim gátlása révén csökken a 3-HK és QUIN termelődés, míg a KYNA szint növekszik az agyban (Wu és mtsai., 2000). A JM6 gátlószer krónikus adagolása a KYNA szint növelése mellett, csökkentette a glutamát szintet az agyszövetben, megakadályozta a térbeli tájékozódás károsodását és a szorongás kialakulását Alzheimer-kór modellben. Emellett mérsékelte a szinapszisok számának csökkenését és a mikroglia aktivációt Huntington-kór modelljében (Zwilling és mtsai., 2011). Egy másik KMO gátló csökkentette a nikotin függőséget és a visszaesést patkány és majom modellekben (Secci és mtsai., 2017).

Terápiás stratégia lehet a KP metabolizmus másik irányba való eltolása is a KAT-2 enzim farmakológiai gátlásával (Nematollahi és mtsai., 2016). Az (S)-ESBA-val, egy specifikus KAT-2 enzim gátlóval csökkenthető az agy KYNA szintje, illetve növelhető az extracelluláris dopamin szint patkány striátum területén (Amori és mtsai., 2009). Ugyanez az enzim gátló növelte az ACh (Zmarowski és mtsai., 2009) és a glutamát (Konradsson-Geuken és mtsai., 2010) szintet is a KYNA szint csökkentése mellett a prefrontális kéreg területén, patkányokban. A legújabb szelektív és irreverzibilis KAT-2 gátlószer, a PF-0485998, könnyen átjut a BBB-n, így már szisztémásan is alkalmazható (Dounay és mtsai., 2012). A gátlószer patkány prefrontális kéregben csökkentette a KYNA szintet és helyreállította a nikotin kiváltotta glutamáterg tranzienseket (Koshy Cherian és mtsai. 2014). Továbbá patkányokon és majmokon végzett kísérletekben a KYNA szint csökkentése mellett kivédte a ketamin indukálta munkamemória károsodását is (Kozak és mtsai., 2014).

Egér agyszövet esetén nincs adat a KAT-2 farmakológiai gátlásának hatásáról, az enzim KYNA termelődésben feltételezett kis szerepe miatt (részleteiben ld. 3.6 fejezet)**.**

3.6 A kinurenin rendszer különbségei emlős fajokban

A terápiás kísérletek hatékonyágát, illetve azok későbbi klinikai alkalmazását megnehezíti, hogy a kinurenin rendszerben jelentős eltérések vannak a különböző emlős fajok esetén.

A KYNA fiziológiás koncentrációja az agyszövetben jelentősen eltér a különböző modell állatokban, illetve emberben. A legnagyobb mennyiségben az emberi agyban van jelen. Koncentrációja 10-szer magasabb az emberi agykéreg területén, mint patkány vagy

tengerimalac esetén. A gyakran használt laboratóriumi állatok közül a nyúl agyszövetében mérték a legmagasabb KYNA szintet, míg a legkevesebbet az egér agyszövetben (Moroni és mtsai., 1988).

Az L-KYN szérum, illetve CSF szintje is jelentősen különbözik az emlős fajokban. Mind a szérum, mind a CSF esetén a legmagasabb L-KYN szintet nyulakban mutatták ki, míg a legalacsonyabb a patkány, tengerimalac és az egér mintákban volt (Fujigaki és mtsai., 1998).

A KYNA szintéziséért felelős KAT izoformák szerepe szintén eltérő a különböző fajokban. Az ember és patkány agyszövetben a fő KYNA szintetizáló enzim a KAT-2. A teljes KAT aktivitás több mint 50%-áért ez az izoforma felel (Guidetti és mtsai., 1997, Guidetti és mtsai., 2007a). Egér esetén a KAT izoformák funkciója kevéssé vizsgált és tisztázott. Egy *in vitro* tanulmány szerint a KAT-4-nek van a legnagyobb szerepe a KYNA szintézisben felnőtt egér agyszövet esetén (Guidetti és mtsai., 2007a), míg a KAT-2 aktivitás csak a posztnatális élet első hónapjában fontos és felnőtt korban csak kis hányadát (~10-12%) adja a teljes KAT aktivitásnak (Alkondon és mtsai., 2004).

A KAT-2 gátlás során is eltérő hatás tapasztalható patkány, majom és ember esetén. Ketamin indukálta munkamemória károsodás helyreállításában egy KAT-2 gátlószer 10-szer magasabb dózisban (32 mg/ttkg) volt hatásos patkány kísérletekben, mint majmokon (3.2 mg/ttkg) végzett hasonló vizsgálatokban (Kozak és mtsai., 2014). Ezzel szemben egy másik specifikus KAT-2 gátlószer, az S-ESBA jelentősen nagyobb (10x-20x) gátlási potenciállal rendelkezett patkány KAT-2 esetén, mint humán KAT-2 esetén (Dounay és mtsai., 2012). A különbség lehetséges magyarázata a KAT-2 fehérje aminosav szekvencia eltérései a különböző fajokban (Pellicciari és mtsai., 2008).

Mindezek alapján a kinurenin rendszer karakterizálása és a különbségek tisztázása a modell állatokban szükséges és elengedhetetlen a hatékony terápiás célú kinurenerg manipulációkhoz.

4 Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kísérletes munka fő célja a kinurenin rendszer karakterizálása volt C57Bl/6 egér törzsben. Az útvonalon belül, a neuroprotekciós stratégiák egyik fő célpontjának, a KYNA termelődésének anatómiai és funkcionális vizsgálatát végeztük egér agyszövetben.

Célkitűzés 1:

A KYNA szintéziséért felelős enzim, a KAT-2 lokalizációjának vizsgálata egér agyszövetben mRNS és fehérje szinten, szövettani, citokémiai és biokémiai módszerekkel.

Célkitűzés 2:

A KYNA termelődés *in vitro*, egér akut túlélő agyszeleteken történő vizsgálatára alkalmas inkubációs rendszer kialakítása és az agyszeletek állapotának karakterizálása több órás inkubációt követően.

- Az agyszeletek glükóz felhasználásának vizsgálata
- Az agyszeletek strukturális integritásának vizsgálata biokémiai és szövettani módszerekkel (LDH assay, NeuN immunjelölés, krezil ibolya festés)
- Az agyszeletek működőképességének tesztelése a szinaptikus funkció vizsgálatával (páros pulzus paradigma (PPP), input-output (I/O) görbe)
- A neuronok és asztrociták működésének indirekt vizsgálata biokémiai és szövettani módszerekkel (c-Fos immunjelölés, S100 és NPAS4 Western Blot)

Mindezen vizsgálatok célja, annak bizonyítása, hogy az rendszerünk alkalmas hosszabb idejű farmakológiai vizsgálatok elvégzésére akut agyszeleteken és a több órás inkubáció során detektált KYNA felszabadulás nem pusztán a sejtek károsodásának eredménye.

Célkitűzés 3:

A bazális és L-KYN indukált KYNA termelődés vizsgálata egér akut túlélő agyszeletekben. A termelődött KYNA szövetben és ACSF-ben való megoszlásának meghatározása.

Célkitűzés 4:

A KAT-2 gátlás KYNA termelődésre gyakorolt hatásának vizsgálata egy KAT-2 szelektív enzim inhibitorral egér akut túlélő agyszeletekben.

5 Anyagok és Módszerek

Állatok

Kísérleteinkben 8-12 hetes hím C57BL/6 egereket (n=49) használtunk fel. Az állatok számára szabad hozzáférést biztosítottunk mind a vízhez mind az élelemhez, a számukra kialakított szabványos műanyag ketrecekben. Az állatházban a napi ciklusuknak megfelelően 12:12 órás sötét-világos periódust és 23ºC hőmérsékletet biztosítottunk. Kísérleteinket, a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH Publikáció No. 85-23), a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), és az Európai Közösségek Tanácsának 2010. évi rendeletét (2010/63/EU) betartva végeztük. A kísérletek elvégzéséhez szükséges etikai engedély számunk: I-74-16/2015.

5.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata

5.1.1 Szövet preparálás a hisztológiai vizsgálatokhoz

Az állatokat intraperitoneális (i.p.) uretán injekcióval (1.6 g/ttkg) altattuk és transzkardiálisan perfundáltuk 0,1 M jéghideg foszfát-pufferrel (PB, pH 7.4), majd 4%-os paraformaldehiddel (PFA, pH 7.4). Az RNS *in situ* hibridizációs kísérletekhez az oldatokat dietil-pirokarbonáttal kezeltük (DEPC) az RNáz szennyeződés megelőzése céljából. A perfundálást követően az agyszöveteket egy éjszakán át 4% PFA-ban posztfixáltuk. A fixált agyszövetekből másnap vibratómmal (Leica VT1000 S) 20 µm vastag metszeteket készítettünk.
A Western blot analízishez az állatokat jéghideg PB-vel perfundáltuk, majd az agyszöveteket folyékony nitrogénbe helyeztük, és felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

5.1.2 RNS próba szintézis

A *kat-2* cDNS-t (Aadat NM 011834 Mouse cDNS clone, OriGene Technologies) KpuI és HindIII restrikciós emésztéssel távolítottuk el a hordozó vektorból. A kapott 1600 bp hosszúságú fragmentet *kat-2* specifikus, T7 vagy SP6 RNS polimeráz promoter szekvenciákat hordozó primerekkel felamplifikáltuk. A primerek szekvenciái a következőek voltak: 5'-GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA CCA GAG GGA TTC CAT A-3' (KAT-2 forward) és 5'-GGA TCC ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG AGG AAA GCT ATT TGG CAA TGT G-3' (KAT-2 reverz). A szensz és antiszensz próbák szintetizálását *in vitro* transzkripcióval végeztük. A folyamat során a felamplifikált DNS templátokat, T7 vagy SP6

RNS polimerázt (Sigma Aldrich) és digoxigenin (DIG) jelölt nukleotidokat használtunk (DIG RNS Labeling mix, Sigma-Aldrich).

5.1.3 RNS *in situ* hibridizáció

A *kat-2* mRNS expresszió vizsgálatára RNS *in situ* hibridizációt végeztünk. Posztfixációt követően a szeleteket DEPC kezelt, 0,2 % Tween-20-t tartalmazó PB-ben (PBT, pH 7.4) mostuk, proteináz K segítségével 5 percig emésztettük (2 µg/ml, Sigma-Aldrich), majd 20 percig 4%-os PFA-ban ismét posztfixáltuk. Alapos mosást követően a szeleteket 1 órán keresztül 65 °C-on hibridizációs pufferben prehibridizáltuk. A hibridizációs puffer 50% formamidot, 5X nátrium citrát puffert (SSC), 0.1 mg/ml szonikált csirke DNS-t és 0,1% Tween-20-t (pH 4.5) tartalmazott. A hibridizációt egy éjszakán, át 65 °C-on ugyanebben az oldatban végeztük kiegészítve a DIG-jelölt szensz és antiszensz kat-2 RNS próbákkal (300 ng/ml). Másnap a szeleteket hibridizációs oldat leszálló koncentrációjú sorozatában mostuk, 1%-os normál szamár szérumban (NDS) blokkoltuk, majd alkalikus-foszfatáz konjugált anti-DIG antitestben (juh anti-DIG-AP, 1:1000, Sigma-Aldrich) egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. A következő napon a mintákat nitroblue-tetrazólium-5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát szubsztrátot (NBT-BCIP, 1:50, pH 9.5, Sigma-Aldrich) tartalmazó oldatba helyeztük. Az enzimreakciót PB-vel leállítottuk, majd a metszeteket vizes alapú fedőanyaggal (ProLong Gold, Life Technologies) lefedtük.

5.1.4 Fluoreszcens immunhisztokémia

A KAT-2 fehérje expresszió vizsgálatára indirekt immunhisztokémiai festéseket végeztünk. Posztfixációt követően a szabadon úszó metszeteket 0,4% Triton X-100 (Tx100) detergenst tartalmazó PB-ben mostuk, majd 1 órán át 1%-os NDS-ben blokkoltuk. A KAT-2 fehérje jelölésére, illetve a KAT-2-t tartalmazó sejtek azonosítására a metszeteket a megfelelő elsődleges antitestekben inkubáltuk (nyúl anti-KAT-2, 1:1000, Proteintech; patkány anti-GFAP, 1:4000, Sigma-Aldrich; egér anti-NeuN, 1:4000, Millipore; egér anti-GAD67, 1:1000, Millipore) egy éjszakán át, 4 °C-on. Másnap a fluorofórral kapcsolt másodlagos antitestekben (1:500, Jackson ImmunoResearch) a szeletek 2 órát inkubálódtak. Az elsődleges és másodlagos antitesteket is 0,1 M-os PB-ben hígítottuk ki, amely 0,4% Tx100 detergenst és 1% NDS-t tartalmazott. A sejtmagokat a protokoll végén 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festékkel jelöltük. A szeleteket tárgylemezre húztuk, majd vizes alapú fedőanyaggal

(ProLongGold, Life Technologies) lefedtük. A megfestett metszeteket fluoreszcens mikroszkóp (Olympus BX51) alatt, a megfelelő szűrő használatával vizsgáltuk.

5.1.5 Sejt transzfekció és immuncitokémia

Az immunhisztokémiai kísérleteink során, a KAT-2 jelölésére használt elsődleges antitestünk specificitását kat-2 cDNS-sel transzfektált HeLa sejtkultúrán (HeLa ATCC® CCL2™) teszteltük.

A fagyasztott sejteket 37 °C-os vízfürdőben felolvasztottuk, majd 10% fötális marha szérum (FBS), 4 mM glutamin és 100 egység/ml penicillin/streptomicin tartalmú Dulbecco's Modified Eagle médiumban (DMEM, WAKO) reszuszpendáltuk. A sejteket ezután poli-lizinált felületen (Thermo Fisher Scientific) szélesztettük, majd 37 °C-on és 5% CO_2 koncentráció mellett, 80%-os konfluencia szint eléréséig növesztettük. A sejtekbe ezután 2 µg *kat-2* cDNS vektort jutattunk transzfekciós reagens segítségével (FuGENE® HD Transfection Reagent). 48 órás inkubáció (37°C, 5% CO_2) után a sejteket PBS-sel mostuk, 4%-os PFA-val 15 percig fixáltuk, majd 0,1% Tx100-zal 15 percig permeabilizáltuk. A nem specifikus antitestkötődést 3%-os marha szérum albuminnal (BSA) blokkoltuk. Ezt követően a sejteket az elsődleges antitestben (nyúl anti-KAT-2, 4 µg/ml) egy éjszakán át 4 °C-on, majd másnap a másodlagos antitestben 2 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az elsődleges és másodlagos antitesteket is a blokkoló oldatban hígítottuk ki. A megfestett sejteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk (BZ-X700, Keyenc Corp.).

5.1.6 SDS gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot

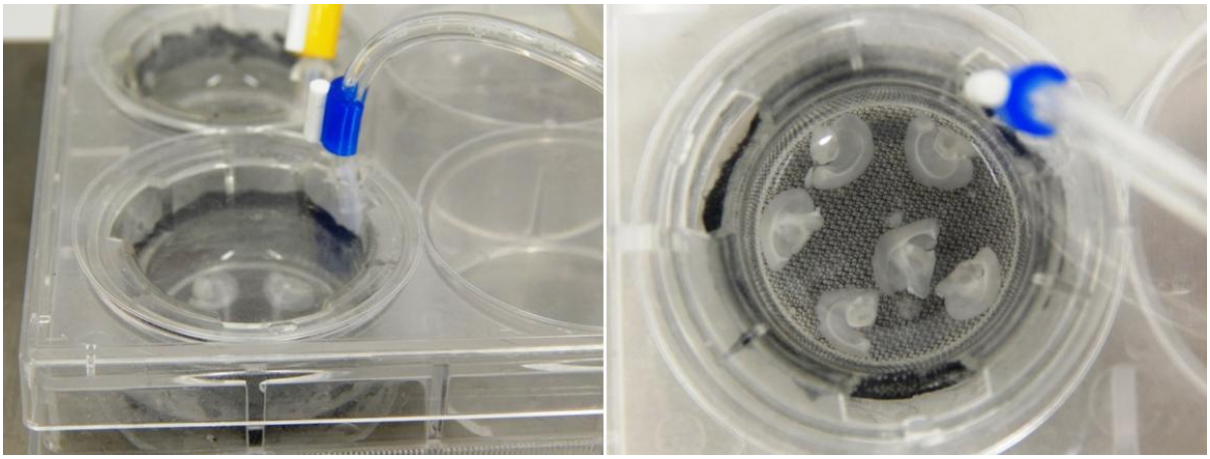
Az anti-KAT-2 elsődleges antitestünk specificitásának további vizsgálatához SDS-PAGE és Western blot analízist végeztünk HeLa sejtkultúra, illetve egér agyszövet homogenizátumon. A HeLa sejtkultúrát és az egér agyszövetet proteáz inhibitor koktélt (Sigma-Aldrich) tartalmazó extrakciós pufferben (T-PER®, Thermo Scientific) homogenizáltuk, majd szonikáltuk. A homogenizátumokat magas fordulatszámon (12000 rpm, 10 perc, 4 °C) centrifugáltuk. A felülúszókat felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A mintáink összfehérje mennyiségét a HeLa sejtkultúra esetében bicinkoninsav (BCA) fehérje assay (Pierce) segítségével, az agyszövet esetében Bradford-féle fehérje assay segítségével határoztuk meg. Ezt követően a fehérje mintákat 8%-os gélen elválasztottuk (50 µg, 100V, 1 óra), majd a szétválasztott fehérjéket polivinilidén-fluorid (PVDF, Millipore Immobilon®- P) membránra blottoltuk (20V, 90 perc). A blottoláshoz minden esetben 20% metanol, 25 mM Tris bázis és

192 mM glicin tartalmú transzfer puffert használtunk. A blottolást követően a membránt 0,05% Tween-20-t tartalmazó 1X PBS-ben (PBST) mostuk, 5%-os zsírmentes tejport tartalmazó (Bio-Rad) oldatban 30 percig blokkoltuk, majd egy éjszakán át az elsődleges antitestben inkubáltuk (nyúl anti-KAT-2, 1:200, 4 ˚C). Másnap a membránt tormaperoxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestben (HRP-konjugált kecske anti-nyúl, 1:10000, Jackson ImmunoResearch) inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. Az elsődleges és másodlagos antitesteket is a blokkoló oldatban hígítottuk ki. Az immunreaktív band-eket kemilumineszcens kit (Immobilon Western, Millipore) segítségével detektáltuk. A membránokat Li-Cor C-DIGIT Blot szkennerrel digitalizáltuk.

5.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata

5.2.1 Szövet preparálás az *in vitro* kísérletekhez

Az állatokat izoflurránnal (3%) altattuk, majd dekapitáltuk. A koponyacsont felnyitását követően a bulbusok mögött, illetve a kisagy előtt egy-egy metszést ejtve a hippokampuszt tartalmazó agyi régiót eltávolítottuk és abból vibratóm (Leica VT1200S, Németország) segítségével 350 µm vastagságú túlélő hippokampális agyszeleteket készítettünk. A metszést 4 °C-os mesterséges agy-gerincvelői folyadékban végeztük (arteficial cerebrospinal fluid, ACSF), melynek összetétele a következő volt: 234 mM szukróz, 3.5 mM KCl, 1 mM NaH_2PO_4, 24 mM $NaHCO_3$, 1 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgSO_4$ és 10 mM D-glükóz. A szeleteket ezután fél órát pihentettük alacsony Ca^{2+} tartalmú ACSF-ben, melynek összetétele a következőekben tért el a metsző ACSF-től: 1.5 mM $CaCl_2$ és szukróz helyett 130 mM NaCl. Irodalmi adatok alapján a termelődő KYNA koncentrációja az alacsony nanomoláris tartományba esik (Schwieler és mtsai., 2006), így annak érdekében, hogy a KYNA koncentráció nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (HPLC) detektálható legyen, a pihentetést követően a szeleteket kis térfogatú ACSF-et tartalmazó inkubációs kamrákba helyeztük (6ml ACSF/6szelet/lyuk). A 6 szelet nedves tömege a kísérletek során átlagosan 98,45 mg volt. A szeleteket a KAT-2 optimális működéséhez 30 °C-on (Banerjee és mtsai., 2012), folyamatos oxigenáltatás (95% O_2, 5% CO_2) mellett, de perfúzió nélkül inkubáltuk. **(3. ábra)**.



3. ábra: Az inkubációs rendszer felépítése. Az agyszeletek kis térfogatú ACSF-ben (6ml ACSF/6 szelet) inkubálódtak szabályozott hőmérsékleten (30 °C), folyamatos oxigenáltatás mellett, az ACSF perfúziója nélkül.

5.2.2 Az *in vitro* kísérletsorozat csoportjai

Az *in vitro* rendszerünkben inkubálódó agyszeletek anatómiai és funkcionális karakterizálása során két csoportot vizsgáltunk: normál térfogatú ACSF-ben (~200 ml) inkubálódó agyszeleteket (**NT kondíció**) és a kinurenin rendszer vizsgálatára szolgáló, kis térfogatú ACSF-ben (6ml/6 szelet) inkubálódó agyszeleteket (**KT kondíció)**. Az NT kondíció kontroll csoportként szolgált a KT kondíció karakterizálása során. Az összehasonlító vizsgálatokat mindkét kondíció esetén **4 óra** inkubációt követően végeztük. A glükóz és LDH szintet csak a KT kondícióban vizsgáltuk, és a 4 órás inkubáció mellett **30 perces** inkubációt is végeztünk.
Ezt követően, a KT kondícióban a bazális **(kontroll csoport)** és L-KYN indukálta **(L-KYN csoport)** KYNA termelődést, illetve a KYNA megoszlását vizsgáltuk. Az indukált KYNA termelődés vizsgálatához a szeleteket 10 µM L-KYN-ben inkubáltuk. A KYNA mennyiségét 4 órás inkubációt követően mértük.
A KAT-2 gátlás hatásának vizsgálatára egy specifikus KAT-2 gátlószert (PF-04859989, Sigma-Aldrich) alkalmaztunk 4 órás inkubáció során, szintén a KT kondícióban. A gátlószert 10 µM L-KYN mellett 5 µM-os koncentrációban használtuk.

5.2.3 SDS-PAGE és Western blot

Az NT és KT kondíciók közötti különbségek vizsgálatára SDS-PAGE és Western blot analízist végeztünk a kondíciókból származó agyszeleteken. Vizsgáltuk egy neuronális korai gén termékét, az NPAS4 expresszióját, illetve a gliális S100 fehérje szintjét.

A mintákat a korábbi alfejezetben (ld. 5.1.6.) leírt módon preparáltuk, futtattuk, majd blottoltuk. A blottolást követően a membránt 1X PBST-ben mostuk és 5%-os zsírmentes tejport tartalmazó (Bio-Rad) oldatban 30 percig blokkoltuk. Ezután a membránt egy éjszakán át az elsődleges antitestben (nyúl anti-S100, 1:1000; nyúl anti-NPAS4 1:1000), majd másnap 1 órán át HRP konjugált, másodlagos antitestben (HRP-konjugált kecske anti-nyúl, 1:10000, Jackson ImmunoResearch) inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az elsődleges és másodlagos antitesteket is a blokkoló oldatban hígítottuk ki. Az immunreaktív band-eket a korábban leírt módon detektáltuk.

5.2.4 HPLC

Az inkubáció során termelődő KYNA szintjének meghatározásához HPLC méréseket végeztünk az ACSF és szöveti mintákon egyaránt. Az inkubáció végén, minden KT csoport esetén, az ACSF-et és 3 agyszeletet (~40 mg) folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, majd a mérésekig -80 °C-on tároltunk.

A mérés napján az agyszeleteket 30 másodpercig homogenizáltuk jéghideg, trifluorecetsavat (0,01%) és 2 µM 3-nitro-L-tirozint (3-NLT, belső standard) tartalmazó oldatban. A homogenizátumot 12000 rpm-en, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszókat a további analízisig -80 °C-on tároltuk. Az ACSF mintákat ugyan ezen a módon dolgoztuk fel.

A méréseket fluoreszcens és UV detektorral kombinált Agilent 1100 HPLC rendszer segítségével végeztük (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). A KYNA koncentráció meghatározásához a fluoreszcens detektort 344 nm excitációs és 398 nm emissziós hullámhosszra, míg a belső standard mérésére az UV detektort 365 nm-re állítottuk. A kromatográfiai elválasztást Kinetex C18 oszlopon végeztük (150 x 4.6 mm belső átmérő., 5 µm szemcse méret, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA), egy Security Guard C18-as előtét oszloppal (4 x 3.0 mm belső átmérő., 5 µm szemcse méret, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). Az áramlási sebesség 1.2 ml/perc, míg az injektált térfogat 50 µl volt. A kimutatási határ (LOD) és meghatározási határ (LOQ) a szövetben és az ACSF-ben is 1 és 3.75 nM, míg az ismételt injektálások relatív standard deviáció értéke ≤ 2.2% volt. A visszanyerés értékei a szövet és ACSF minták esetén 103-108% és 81-91% között voltak

5.2.5 A túlélő agyszeletek újrametszése

A szövettani vizsgálatokhoz minden kísérlet során csoportonként 1-1 szeletet fixáltunk (4% PFA). Másnap a szeleteken 15%-os, majd 30%-os szukróz oldattal krioprotekciót végeztünk. Az újraszeletelésig a szeleteket -20 °C-on, 30 %-os szukróz oldatban tároltuk. Az újraszeletelést fagyasztó mikrotómmal (Reichert-Jung 1206) végeztük, amellyel 30 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteken további szövettani festéseket végeztünk.

5.2.6 Krezil ibolya festés

A hippokampusz CA1 és CA3-as sejtjeinek morfológiai változásait krezil ibolya festéssel vizsgáltuk. A festék bázikus jellegű, így savas komplexekhez köt a sejtek citoplazmájában, főleg az RNS gazdag riboszómákhoz, a sejtmaghoz és sejtmagvacskához.
A metszeteket leszálló alkohol sorban rehidratáltuk, majd 0,001%-os krezil ibolya festőoldatban 5 percig inkubáltuk. Mosást és szárítást követően a metszeteket xilol alapú fedőanyaggal fedtük, majd fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.

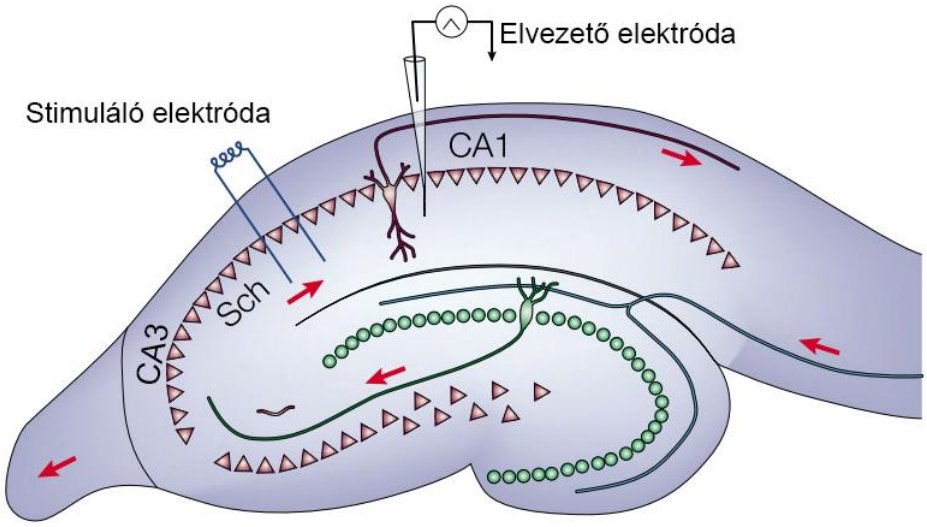
5.2.7 Fluoreszcens immunhisztokémia

A c-Fos fehérje expressziós mintázatának, illetve a hippokampusz CA1 és CA3-as régió strukturális integritásának vizsgálatához immunhisztokémiai festéseket is végeztünk az NT és KT szeletekből készült metszeteken. A metszeteket 0,4 % Tx100-at tartalmazó PBS-ben mostuk, majd 1 órán át 2%-os NDS-ben blokkoltuk. A metszeteket a megfelelő elsődleges antitestekben inkubáltuk (nyúl anti-c-Fos, 1:2000, Santa Cruz; patkány anti-GFAP, 1:4000, Sigma-Aldrich; egér anti-NeuN,1:4000, Abcam) egy éjszakán át, 4 °C-on. Másnap a fluorofórral kapcsolt másodlagos antitestekben (1:500, Jackson ImmunoResearch) 2 órát inkubálódtak a szeletek. Az elsődleges és másodlagos antitesteket is 0,1 M-os PB-ben hígítottuk ki, amely 0,4% Tx100 detergenst és 1% NDS-t tartalmazott. A protokoll végén a szeleteket tárgylemezre húztuk, majd vizes alapú fedőanyaggal (ProLongGold, Life Technologies) lefedtük. A megfestett metszeteket fluoreszcens mikroszkóp (Olympus BX51) alatt, a megfelelő szűrő használatával vizsgáltuk.

5.2.8 *In vitro* elektrofiziológia

A szinaptikus funkció vizsgálatára az NT és KT szeleteken input/output (I/O) görbe felvételeket és páros pulzus elvezetéseket végeztünk 4 órás inkubációt követően. A szeleteket Haas típusú regisztráló kamrába helyeztük. A regisztráció során használt ACSF összetétele a

következőkben tért el az alacsony Ca^{2+} tartalmú ACSF-től: 3 mM $CaCl_2$. Az oldat áramlási sebessége 2 ml/perc, hőmérséklete 32 °C volt. A szeleteket a regisztráció során karbogénnel folyamatosan oxigenáltattuk. Az ingerléshez egy rozsdamentes, titánium-irídium ötvözetből készült koncentrikus bipoláris fém elektródot (Neuronelektród Kft.), míg az elvezetéshez 1,5-3 M Ω ellenállású üvegelektródot használtunk. Az ingerlő elektródot a hippokampusz CA3-CA1-es régiója között, a stratum radiatum rétegbe helyeztük, ahol a Schaffer kollaterálisok futnak, míg az elvezető elektródot a CA1-es régió stratum radiatum rétegébe pozícionáltuk, ahol a Schaffer kollaterálisok a CA1-es piramis sejtek apikális dendritjeivel szinapszist képeznek **(4. ábra)**. Az elvezetett serkentő posztszinaptikus mezőpotenciálokat (fEPSP) erősítettük és szűrtük (WPI AMP-04). Az adatokat digitalizáltuk (10 KHz, Axon Digidata 1320A), majd Axon pCLAMP 10 szoftver (Molecular Device) segítségével regisztráltuk.



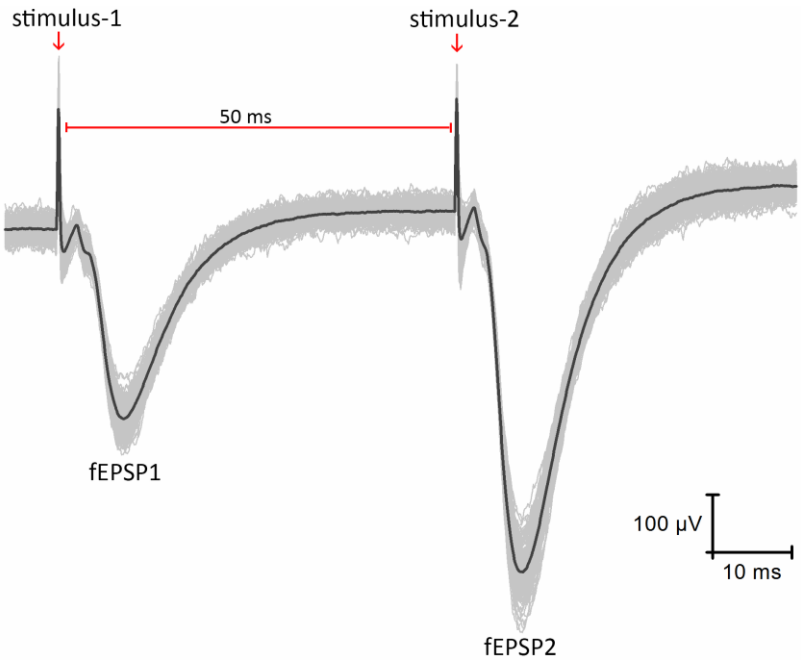
4. ábra: A hippokampusz anatómiai felépítésének, illetve az elektródák pozíciójának sematikus ábrázolása. Rövidítések: Sch: Schaffer kollaterálisok, CA1: az Ammon szarv 1-es régiója, CA3: az Ammon szarv 3-as régiója (Kim és Diamond, 2002 nyomán módosítva).

I/O görbék: Az alapvető szinaptikus transzmisszió vizsgálatára I/O görbéket regisztráltunk az NT és KT szeletekben. Az ingerküszöb és a minimális válasz meghatározása után a stimulus erősségét fokozatosan emeltük. Az ingerlő áramlépcső 5 µA volt. Minden áramlépcső esetén 5 választ regisztráltunk és azok értékét átlagoltuk. A stimulus 0,05 Hz frekvenciájú, 0,3 ms ingerszélességű volt. A fEPSP-k meredekség értékeit a stimulus intenzitások függvényében ábrázoltuk.

Páros pulzus paradigma (PPP): A rövidtávú szinaptikus plaszticitás vizsgálata során a PPP-nek megfelelően két, egymást rövid időn belül követő stimulust alkalmaztunk 0,05 Hz-es frekvenciával és 0,3 ms ingerszélességgel. A két stimulus között eltelt idő 50 ms (inter

stimulus intervallum) volt **(5. ábra)**. A kísérletek során az ún. páros pulzus arányt (PPR) vizsgáltuk, amely a második fEPSP (fEPSP2) és első fEPSP (fEPSP1) meredekségének hányadosa (fEPSP2/fEPSP1).

A kiértékelést mindkét paradigma esetén Clampfit 10 (Molecular Devices) és OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation) programokkal végeztük.



5. ábra: A páros pulzus ingerlési paradigma. A paradigma során két, egymást rövid időn belül (50 ms) követő stimulust alkalmaztunk. A második stimulus után egy facilitált válasz (fEPSP2) detektálható (reprezentatív regisztrátum, saját).

5.2.9 Laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése

A sejtmembrán integritás és permeabilitás sérülésének kimutatására, így a szövetek életképességének vizsgálatára szolgál a sejtekből kiszabaduló LDH enzim aktivitásának mérése. Az LDH aktivitást 30 perc és 4 óra inkubáció elteltével vizsgáltuk az ACSF-ben az enzim aktivitásának meghatározására szolgáló reagens készlet segítségével (Diagnosticum Ltd, Hungary, 46461). A gyártó előírásainak megfelelően 1 ml reakcióelegyet adtunk a mintáinkhoz, majd 1 perc inkubációt követően Biolis 24i Premium System készülék (Siemens) segítségével meghatároztuk a minták abszorbanciáját 340 nm-en, 37 °C-on. A maximális LDH felszabadulás meghatározására a 4 órás inkubációt követen 1%-os Tx100-zal kezeltük a szeleteket.

5.2.10 Hexokináz (HK) aktivitás mérése

A szövetek számára elérhető glükóz mennyiség, illetve a glükóz fogyás meghatározására glükóz HK aktivitás vizsgálatot végeztünk. A HK aktivitást 30 perc és 4 óra inkubációt követően vizsgáltuk az ACSF-ben az enzim aktivitásának meghatározására szolgáló, kétlépéses reagens készlet segítségével (Diagnosticum Ltd, Hungary, 47361). A gyártó előírásainak megfelelően 800 µl reakcióelegyet adtunk a mintáinkhoz az első lépés során, és 5 percig inkubáltuk. Ezt követően 200 µl reakcióelegyet adtunk a mintáinkhoz és 1 perc inkubációt követően Biolis 24i Premium System készülék (Siemens) segítségével meghatároztuk a minták abszorbanciáját 340 nm-en, 37 °C-on.

5.2.11 Alkalmazott statisztikai módszerek

Az ACSF minták esetén a glükóz mennyiség, LDH felszabadulás és KYNA mennyiség értékeit a párolgással korrigáltuk, illetve 100 mg tömegű agyszövetre normalizáltuk. A szöveti mintáknál a KYNA mennyiséget szintén 100 mg agyszövetre normalizáltuk.

Az adatok eloszlásának normalitását Shapiro-Wilk próbával, a szórások homogenitását Levene teszttel vizsgáltuk. A szignifikanciát normális eloszlású és egyenlő szórású minták esetén két mintás t-próbával teszteltük. Amennyiben a normalitás és/vagy a varianciák homogenitása nem teljesül, a többszörös összehasonlítást Kruskal-Wallis, két független minta összehasonlítását pedig Mann-Whitney nem parametrikus próbákkal végeztük.

A statisztikai analíziseket IBM SPSS szoftverrel (IBM SPSS 20.0), az adatok ábrázolását OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation) programmal végeztük.

6 A kísérletekben való részvétel

A kísérletes munka során a következő vizsgálatokat végeztem:

- Szövet preparálás a szövettani vizsgálatokhoz
- RNS in situ hibridizáció
- Fluoreszcens immunhisztokémia
- SDS-PAGE és Western blot analízis
- Akut agyszelet preparálás az *in vitro* kísérletekhez
- Krezil ibolya festés
- In vitro elektrofiziológia
- Adatelemzés

Az RNS *in situ* hibridizációhoz szükséges RNS próbákat Dr. Jankovics Ferenc készítette. Az LDH és glükóz szint méréseket Magyariné Berkó Anikó, a HPLC méréseket Dr. Veres Gábor és Cseh Edina Katalin, illetve a KAT-2 elleni antitest validálása során a HeLa sejtkultúrán végzett Western blot analízist és immuncitokémiai vizsgálatokat Dr. Gellért Levente végezte.

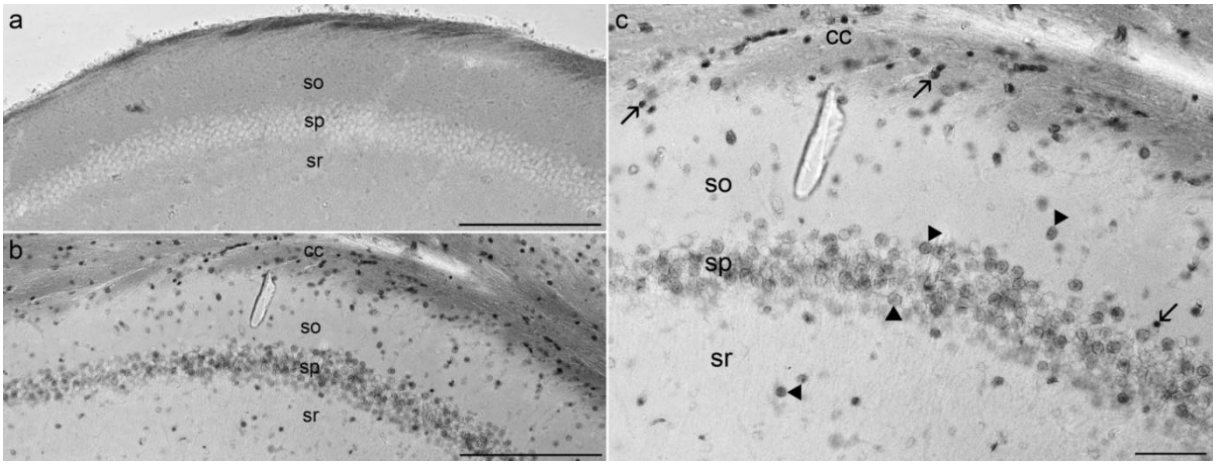
7 Eredmények

7.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata

7.1.1 *kat-2* mRNS expresszió egér agyszövetben

Jelentős *kat-2* mRNS expressziót detektáltunk az egér agyszövet fehér-, illetve szürkeállományában egyaránt. Számos agyterületen két, eltérő jelölődési sajátságokkal és sejtmagi morfológiával rendelkező csoportot figyeltünk meg. Dolgozatomban a dorzális hippokampusz területén kapott eredményeket részletezem.

A jelölődött sejtek egy része kis átmérőjű, denz, asztrocitákra jellemző sejtmaggal rendelkezett a hippokampusz teljes területén, és a fehérállományi corpus callosumban. A detektált sejtek másik csoportjának nagyobb, gyengébben jelölődött sejtmagja volt, amelyek főként a hippokampusz piramidális sejtsorában voltak láthatóak. Lokalizációjuk és sejtmagi méretük alapján ezek a sejtek vélhetően neuronok. A negatív kontrollként alkalmazott szensz RNS próbákkal nem látható jelölődés az agyszövetben, így az RNS próbák nem specifikus kötődését kizárhatjuk **(6. ábra)**.

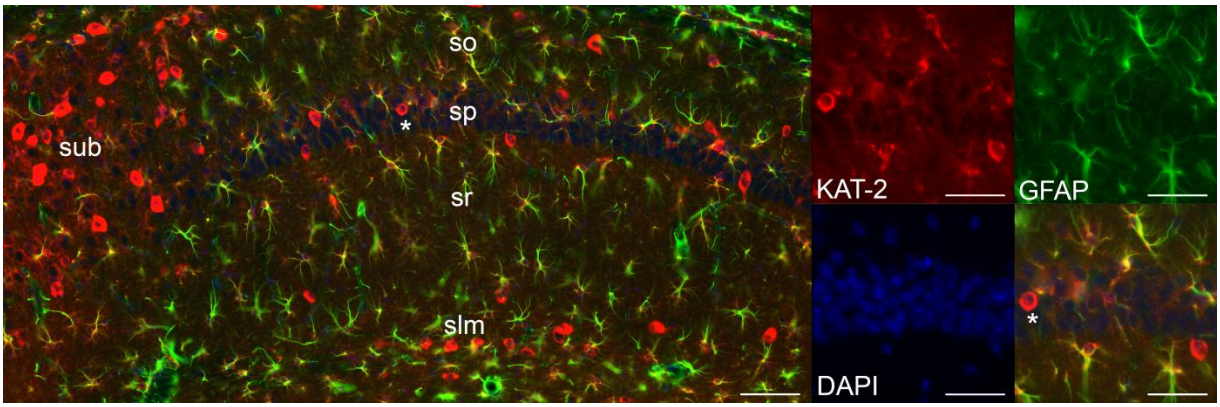


6. ábra: *kat-2* mRNS expresszió a hippokampusz CA1-es régiójában. **a:** *in situ* hibridizáció szensz RNS próbákkal (negatív kontroll), **b-c:** *in situ* hibridizáció antiszensz RNS próbákkal, nyíl (↗): denz asztrocita szerű sejtmaggal rendelkező sejtek, nyílhegy (▶): nagyobb átmérőjű és halványabb, neuronokra jellemző maggal rendelkező sejtek, skála: 200 µm (a, b) és 50 µm (c). Rövidítések: *so: stratum oriens, sp: stratum pyramidale, sr: stratum radiatum, cc: corpus callosum*

7.1.2 KAT-2 fehérje expresszió egér agyszövetben

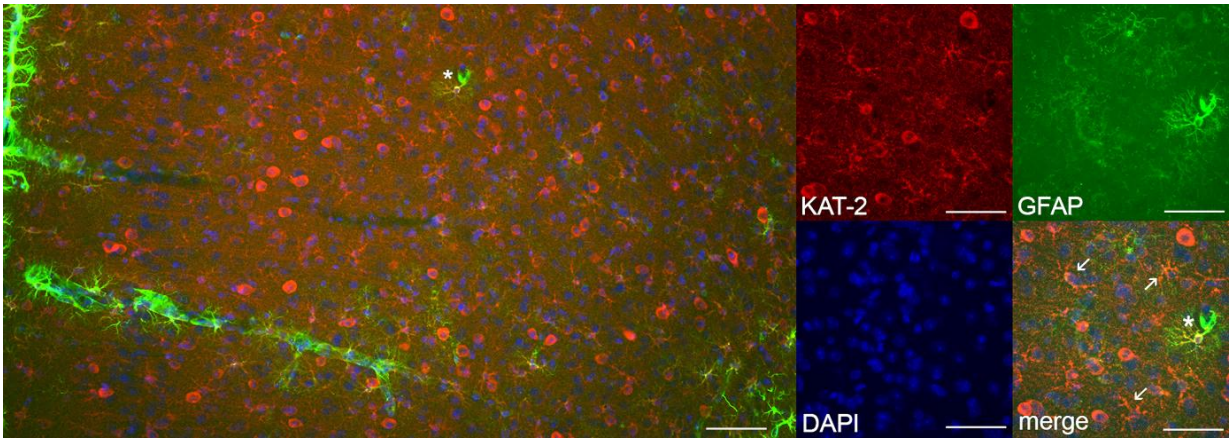
A KAT-2 enzim lokalizációját immunhisztokémiai festésekkel vizsgáltuk. A fehérje expressziója az egér agyszövet teljes területén kifejezett volt. Dolgozatomban a dorzális hippokampusz, a dorzális striátum, a substantia nigra és a mediális prefrontális kéreg területén kapott eredményeinket mutatom be, ugyanis a KYNA termelődés, illetve KAT aktivitás ezeken a területeken bizonyítottan változik bizonyos agyi megbetegedések során (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór, skizofrénia stb.)

Korábbi megfigyelésekkel megegyezően (Guidetti és mtsai., 2007b) jelentős számú KAT-2^{+} asztrocita sejtet detektáltunk számos agyi struktúrában. Nagyszámú KAT-2^{+}/GFAP^{+} sejt látható a hippokampusz teljes területén, így annak CA1-es régiójában is. Az enzim az asztrociták szómájában, illetve nyúlványaiban lokalizálódott **(7. ábra).**



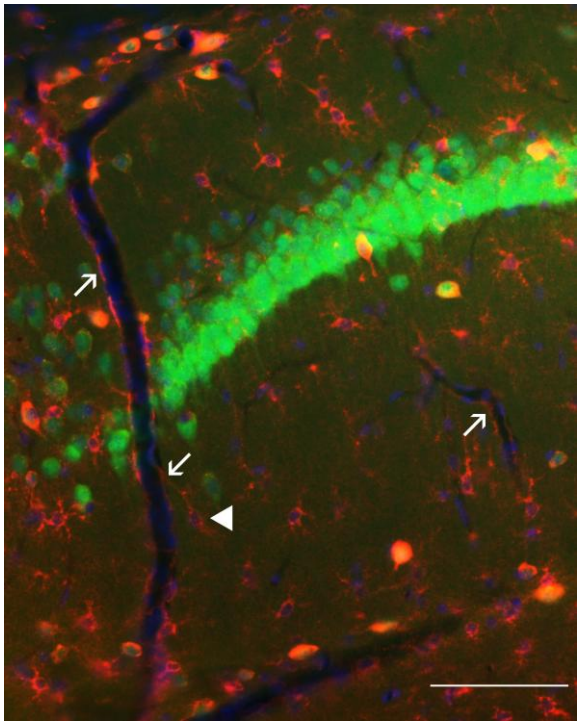
7. ábra: A KAT-2 enzim asztrocita sejtekben való expressziója a hippokampusz CA1-es régiójában. csillag (*): KAT-2^{+}, asztrocita jellegeket nem mutató sejt, skála: 80 µm (bal panel) és 40 µm (jobb panelek). Rövidítések: *sub: subiculum, so: stratum oriens, sp: stratum pyramidale, sr: stratum radiatum, slm: stratum lacunosum moleculare;* piros: KAT-2, zöld: GFAP, kék: DAPI

A striátum és prefrontális kéreg területén nagyszámú csillag alakú, gazdagon elágazó nyúlványokkal rendelkező, de KAT-2^{+}/GFAP^{-} sejtet detektáltunk. Ezek a sejtek feltehetően asztrocita sejtek, amelyekben a GFAP expressziós szintje alacsony **(8. ábra)**.



8. ábra: A KAT-2 enzim asztrocita sejtekben való expressziója a mediális prefrontális kéreg területén. csillag (*): KAT-2/GFAP kolokalizáció, nyíl (↙): KAT-2^{+}, de GFAP^{-}, asztrocita jellegeket mutató sejt, skála: 80 µm (bal panelek) és 40 µm (jobb panelek). piros: KAT-2, zöld: GFAP, kék: DAPI

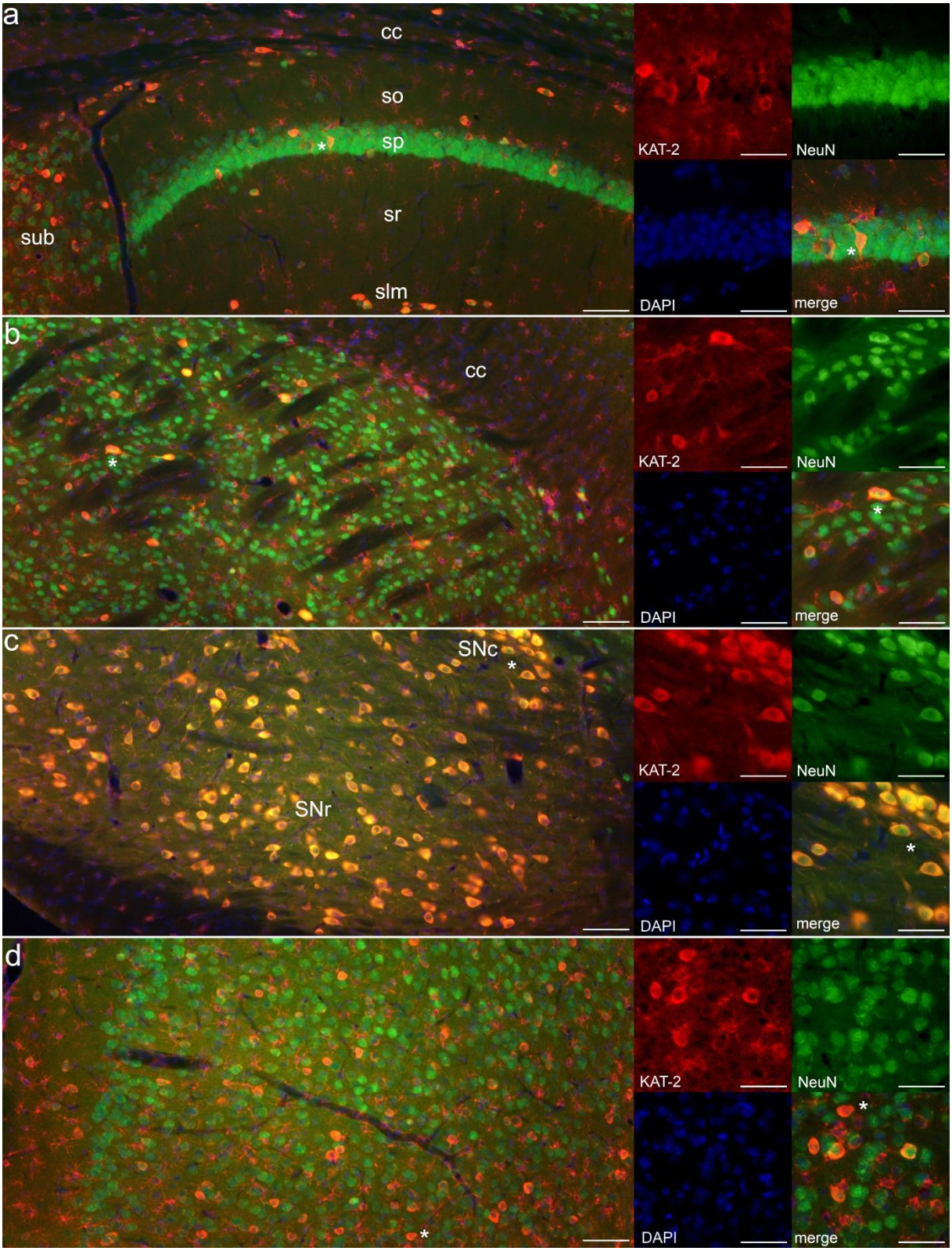
A KAT-2 jelen volt az ereket körülvevő asztrocita végtalpakban is, ami tovább erősíti az enzim asztrocitákban való jelenlétét **(9. ábra)**. A szürkeállományi struktúrák mellett a KAT-2^{+} asztrociták a fehérállományban (pl. corpus callosum) is megfigyelhetőek voltak, amit támogat az *in situ* hibridizáció eredménye is **(6. ábra)**.



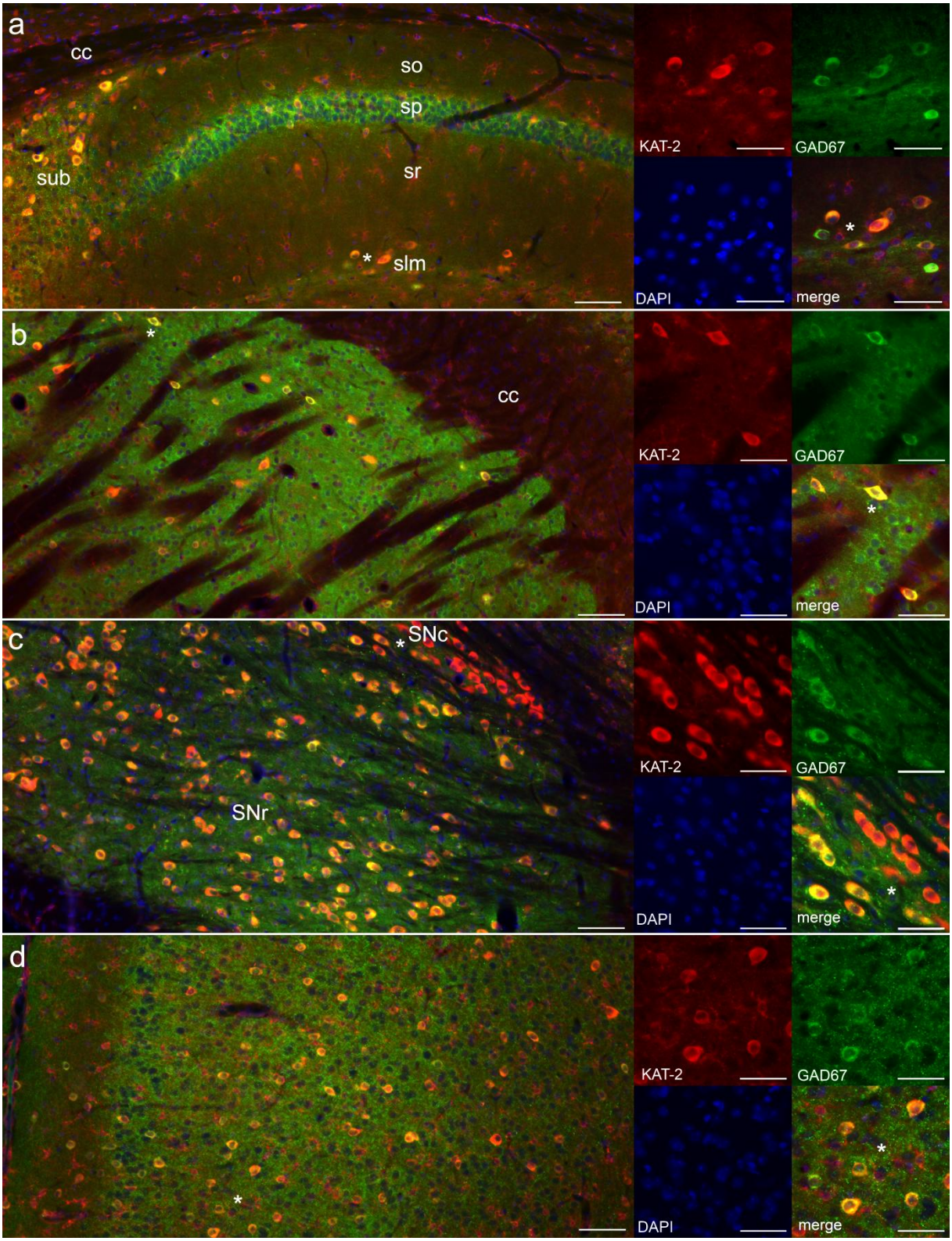
9. ábra: KAT-2 expresszió az agyi erek körül a hippokampusz CA1-es területén. Jól láthatóak az eret körbehálózó, KAT-2^{+} asztrocita sejtekből (nyílhegy) kiinduló asztrocita végtalpak (nyilak). Skála: 100 µm. piros: KAT-2, zöld: NeuN, kék: DAPI

Az asztrociták mellett jelentős számú KAT-2^{+}, asztrocita jellegeket nem mutató sejtet is detektáltunk a vizsgált agyterületeken. A neuronális jelenlétet KAT-2/NeuN kettős festéssel bizonyítottuk. Mind a négy agyi struktúrában megfigyelhető a KAT-2 és a NeuN ko-lokalizációja. A KAT-2-t tartalmazó neuronok eloszlása sporadikus volt a hippokampusz, a dorzális striátum és a mediális prefrontális kéreg területén, míg nagyszámú neuron jelölődött a substantia nigra pars compacta és pars reticulata területén. Az enzim főként a neuronok szómájában lokalizálódott **(10. ábra)**.

Az enzimet tartalmazó neuronok azonosítására KAT-2/GAD67 kettős jelölést végeztünk. A neuronális KAT-2 pozitivitás, illetve GAD67 pozitivitás teljes mértékben átfedett a hippokampusz, a dorzális striátum, a mediális prefrontális kéreg és a substantia nigra pars reticulata területén. Egyetlen KAT-2^{+} neuron sem volt GAD67^{+} a substantia nigra pars compacta régiójában, amelynek fő sejttípusa a dopaminerg idegsejt. Mindezek alapján a KAT-2^{+} idegsejtek nagy része GABAerg gátló idegsejt az egér agyszövetben **(11. ábra)**.

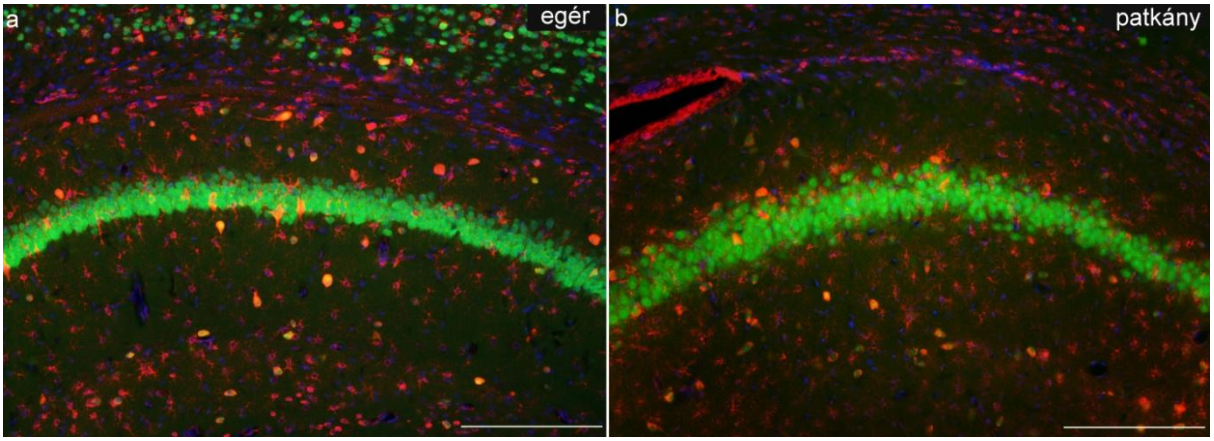


10. ábra: A KAT-2 neuronális lokalizációja egér hippokampusz **(a)**, dorzális striátum **(b)**, substantia nigra **(c)** és mediális prefrontális kéreg **(d)** területén. **(d)**. Skála: 80 µm (bal panelek) és 40 µm (jobb panelek). Rövidítések: *so: stratum oriens, sp: stratum pyramidale, sr: stratum radiatum, slm: stratum lacunosum moleculare, cc: corpus callosum, SNc: substantia nigra pars compacta, SNr: substantia nigra pars reticulata, sub: subiculum;* piros: KAT-2, zöld: NeuN, kék: DAPI



11. ábra: KAT-2 lokalizáció a hippokampusz **(a)**, dorzális striátum **(b)**, substantia nigra **(c)** és mediális prefrontális kéreg **(d)** GABAerg gátló neuronjaiban. A KAT-2^{+} neuronok nagy része GAD67^{+} gátló idegsejt mind a négy vizsgált agyterületen **(a-d)**. Skála: 80 µm (bal panelek) és 40 µm (jobb panelek). Rövidítések: *so: stratum oriens, sp: stratum pyramidale, sr: stratum radiatum, slm: stratum lacunosum moleculare, cc: corpus callosum;* piros: KAT-2, zöld: GAD67, kék: DAPI

Annak vizsgálatára, hogy a megfigyelt KAT-2 expressziós mintázat specifikusan egér agyszövetre jellemző vagy filogenetikailag konzervált rágcsálókban, elvégeztük az enzim immunjelölését patkány agyszövetben is (Wistar, Charles-River). Az egér agyszövetben megfigyelt gliális és neuronális expressziós mintázatot találtuk patkány agyszövet esetén is minden vizsgált agyterületen, így a dorzális hippokampusz területén is **(12. ábra)**. Mindezek alapján az enzim expressziós mintázata megegyezik a két fajban.



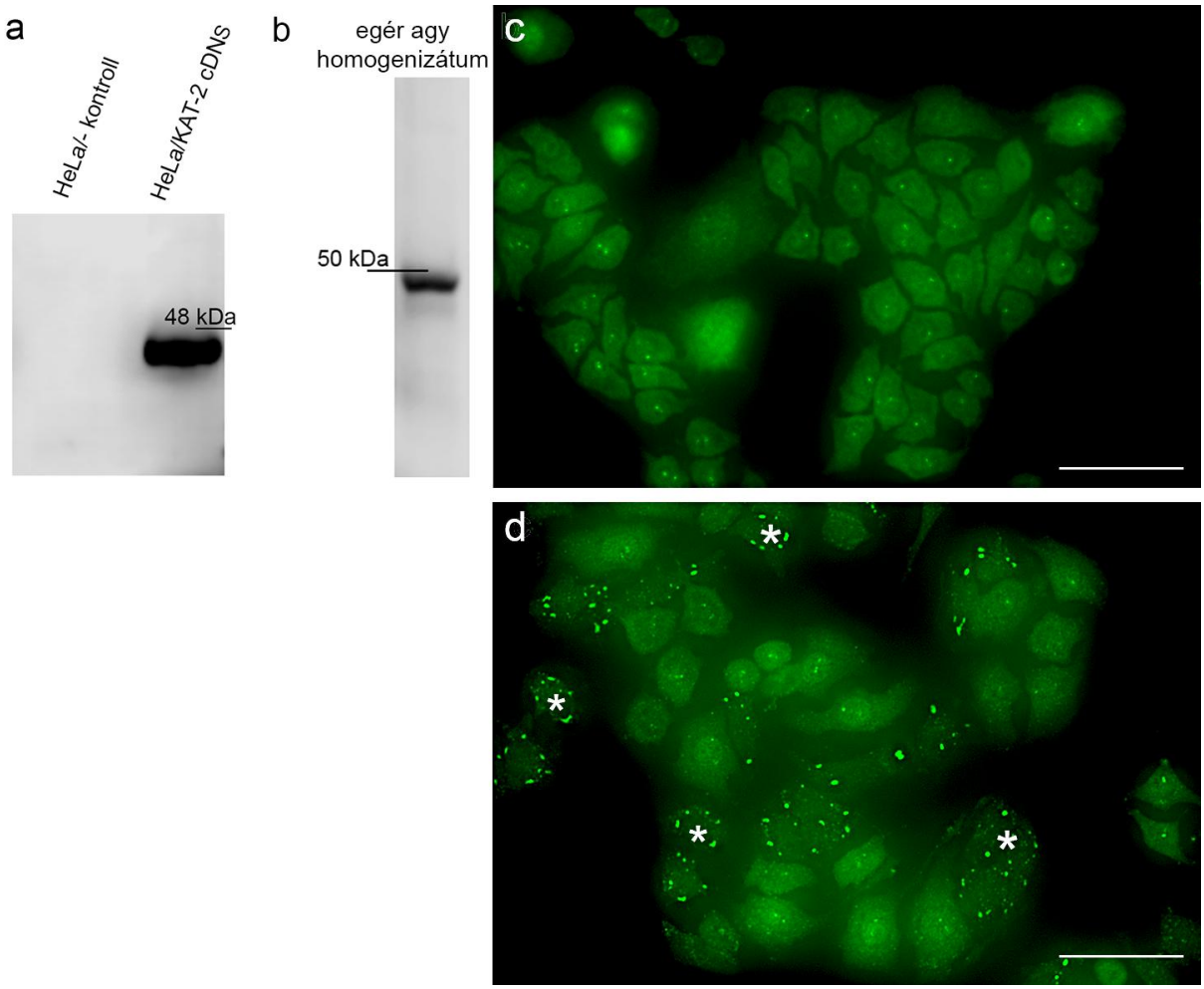
12. ábra: A KAT-2 neuronális lokalizációja egér **(a)** és patkány **(b)** agyszövetben. Jelentős számú KAT-2 és NeuN kettős pozitív sejt (narancssárga) látható egér és patkány hippokampuszban egyaránt. Skála: 200 µm. piros: KAT-2, zöld: NeuN, kék: DAPI

7.1.3 Antitest validálás

Az immunhisztokémiai festések során a negatív kontrollként szolgáló mintáinkon a festési protokollból az elsődleges antitestben való inkubációs lépést kihagytuk. A metszeteken a festést követően nem látható jelölődés, így a másodlagos antitestünk nem specifikus kötődése kizárható.

A KAT-2 ellen használt elsődleges antitestünk specificitásának vizsgálatára Western blot analízist és immuncitokémiai festést végeztünk **(13. ábra)**. A Western blot kísérleteket egér kat-2 cDNS-sel transzfektált HeLa sejtkultúrákon, illetve egér agy homogenizátumokon végeztük. Az antitestünk egyetlen fehérje band-et ismert fel 47 kDa-nál mindkét minta esetén, ami megegyezik a KAT-2 fehérje várt méretével.

Az antitest specifikusságának további vizsgálatára immuncitokémiai festést is végeztünk a transzfektált HeLa sejteken. Jelenős számú KAT-2^{+} sejt látható a kat-2 cDNS-sel transzfektált kultúrában, míg a nem transzfektált kultúrában nem látható jelölődött sejt. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az antitestünk specifikusan a KAT-2 fehérjét ismerte fel az immunhisztokémiai festések során az egér agyszövetben.



13. ábra: A KAT-2 elleni elsődleges antitest validálása Western blot **(a-b)** és immuncitokémiai **(c-d)** vizsgálatokkal. **a:** Western blot HeLa sejtkultúrából származó mintán, **b:** Western blot egér agy homogenizátumon, **c:** KAT-2 immuncitokémiai jelölés nem transzfektált sejtkultúrában (negatív kontroll), **d:** KAT-2 immuncitokémiai jelölés egér kat-2 cDNS-sel transzfektált kultúrában, csillag(*) KAT-2^{+} HeLa sejtek, skála: 50 µm

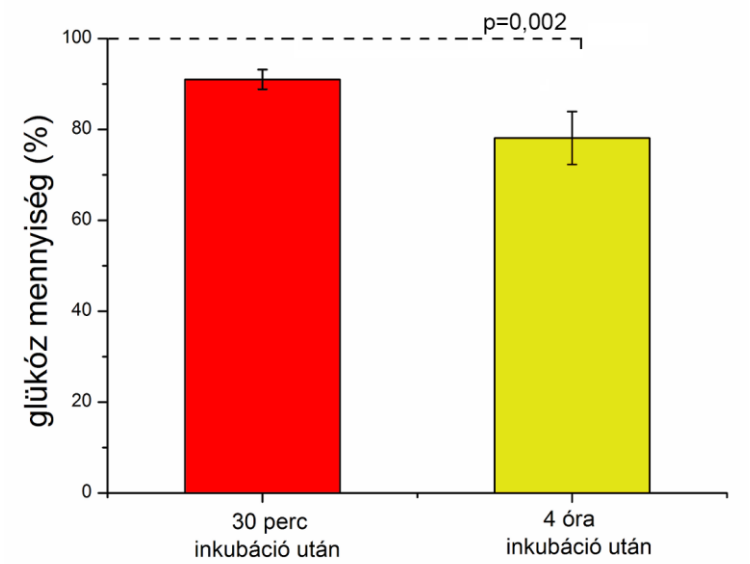
7.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata

Annak vizsgálatára, hogy az *in vitro* rendszerünkben az agyszeletek az inkubáció során megőrzik-e anatómiai és funkcionális integritásukat, és a kísérletek során megfigyelt KYNA felszabadítás nem csupán a sejtek degradációjának eredménye –azaz a kistérfogatú kamrák alkalmasak hosszabb idejű *in vitro* farmakológiai kísérletek kivitelezésére- elsőként a szeletek életképességét és működőképességét vizsgáltuk biokémiai, szövettani és elektrofiziológiai módszerekkel.

7.2.1 Az agyszeletek glükóz fogyasztása

Elsőként az agyszeletek glükóz fogyasztását vizsgáltuk a KT kondícióban. A kísérletek kezdetén az ACSF kiindulási glükóz koncentrációja 10 mM volt, ami fokozatosan csökkent az inkubáció során. A glükóz szint már 30 perc elteltével a kiindulási glükóz mennyiség 90%-ára csökkent a felülúszóban (90,98±2,19; p=0,072). 4 óra elteltével további, már szignifikáns csökkenést detektálunk; a glükóz kezdeti mennyiségének 78%-a hozzáférhető a szövetek számára (78,11±5,8; p=0,002) **(14. ábra)**. A glükóz kis mértékben, de tovább csökken 6 órás inkubáció során is (nem ábrázolt megfigyelés).

A glükóz fogyása alapján elmondható, hogy az agyszeletek metabolikusan aktívak, a glükóz szint fokozatosan csökken a rendszerben, azonban a szövetek működéséhez szükséges glükóz mennyiség hozzáférhető a számukra az ACSF-ben 4 óra elteltével is.

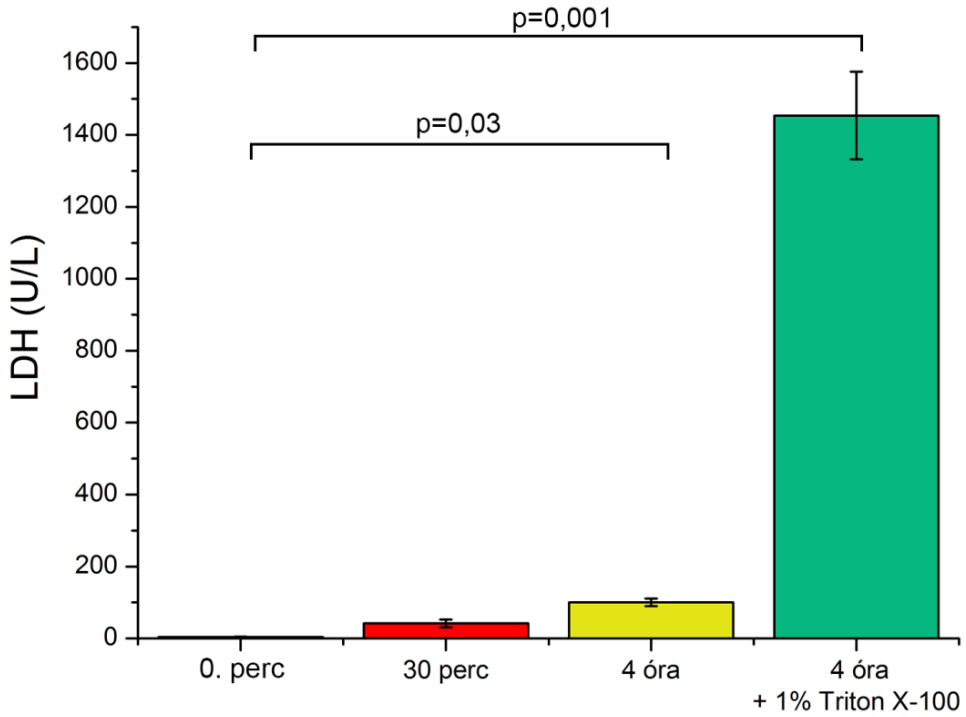


14. ábra: Az agyszeletek glükóz fogyasztása a KT kondícióban 30 perc (piros) és 4 óra (sárga) elteltével. Az adatokat a kiindulási glükóz mennyiséghez (100%) viszonyított százalékos értékekként ábrázoltuk; az adatok átlagát és szórását tüntettük fel (átlag±SD; n=5 állat).

7.2.2 Az agyszeletek életképessége

A szeletek életképességét a KT kondícióban a citoszolikus LDH felszabadulásának vizsgálatával mértük. Az LDH szint fokozatosan növekszik az inkubáció alatt az ACSF-ben. A kísérlet kezdetén, a 0. percben az ACSF nem tartalmaz LDH-t (gyakorlatilag a mérési hiba mutatható ki 3,6±1,14). Már 30 percet követően megjelenik a fehérje a felülúszóban (41,79±11,21; p=0,959), amelynek szintje tovább emelkedik 4 órás inkubációt követően (100,59±10,57; p=0,030) **(15. ábra).** Az LDH szint kismértékben, de tovább emelkedik 6 órás inkubáció során is (nem ábrázolt megfigyelés).

A maximális LDH felszabadulás meghatározásához a szeleteket 1%-os Tx100-zal kezeltük a 4 órás inkubációt követően. A detergenssel kezelt csoportban 14-szeres LDH szint növekedést detektáltunk (1453,88±121,42; p=0,001) **(15. ábra)**. Mindezek alapján a sejtmembránok integritása fokozatosan sérül, permeabilitásuk fokozódik az inkubáció alatt a KT kondícióban, azonban ez a sérülés még 4 óra elteltével is kismértékű figyelembe véve a maximális LDH felszabadulást.

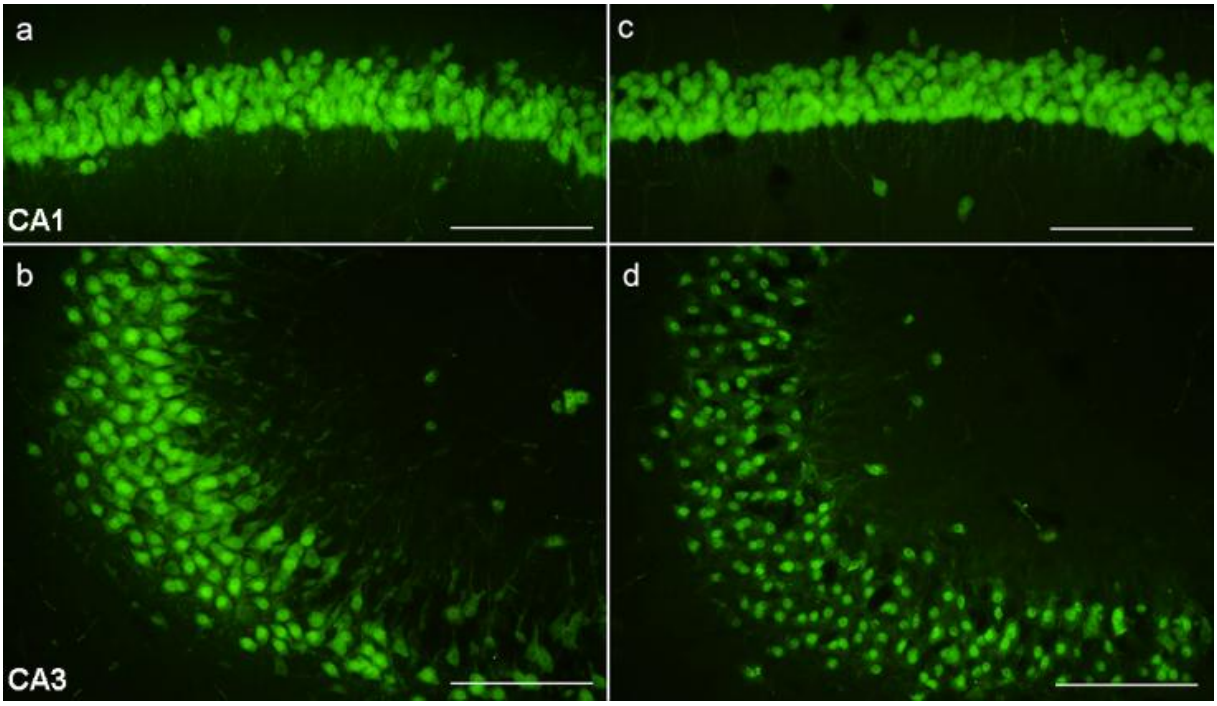


15. ábra: LDH felszabadulás a KT kondícióban 30 perc (piros) és 4 óra (sárga) inkubációt követően. A maximális LDH felszabadulás meghatározásához 1%-os Tx-100-at használtunk (zöld). Az ábrán az adatok átlagát és szórását tüntettük fel (átlag±SD; n=9 állat).

7.2.3 Az agyszövet strukturális integritása

A hippokampusz CA1-es és CA3-as régió anatómiai integritásának vizsgálatára NeuN immunjelölést és krezil ibolya festést végeztünk az NT és KT szeleteken, 4 órás inkubációt követően.

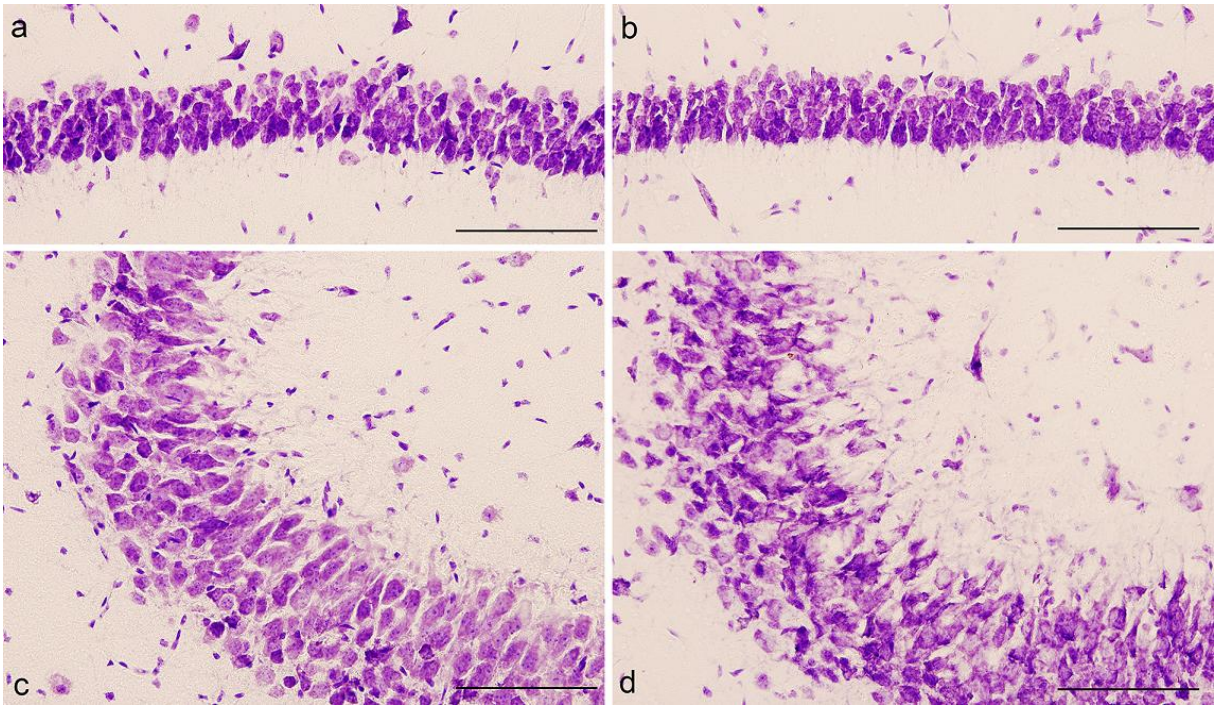
NeuN immunhisztokémia: A CA1-es régióban nem látható jelentős morfológiai különbség az NT és KT csoportok között. A piramissejtekre jellemző sejtalak megfigyelhető 4 óra inkubációt követően a KT szeletek esetén is.
Ezzel szemben a CA3-as régió szöveti integritása láthatóan sérült a KT szeletekben; a NeuN citoplazmában való expressziója lecsökkent a 4 órás inkubáció során **(16. ábra)**.



16. ábra NeuN immunjelölés a hippokampusz CA1-es és CA3-as régiójában 4 órás inkubációt követően NT **(a-b)** és KT **(c-d)** agyszeleteken. skála: 100 µm

Krezil ibolya festés: A NeuN immunjelöléssel, a fehérje csökkent expressziója miatt, a sejtmorfológiai változásokat a CA3-as régióban kevésbé tudtuk vizsgálni. Ezért krezil ibolya festést is végeztünk, amellyel az idegszövet sejtjeinek morfológiai változásai jól detektálhatóak. A NeuN festéshez hasonlóan, nem látható jelentős morfológiai különbség a hippokampusz CA1-es régiójában az NT és KT szeletek között. A régió piramissejtjei megtartották jellegzetes sejtformájukat és méretüket.

A CA3-as régió sejtjei is ép morfológiát mutatnak az NT szeletekben, míg a KT szeletek esetén a sejtek láthatóan zsugorodtak és deformálódtak 4 óra inkubációt követően **(17. ábra)**.



17. ábra: Krezil ibolya festés a hippokampusz CA1-es és CA3-as régiójában 4 órás inkubációt követően NT **(a-c)** és KT **(b-d)** agyszeleteken. skála: 100 µm

7.2.4 Az agyszövet szinaptikus működése

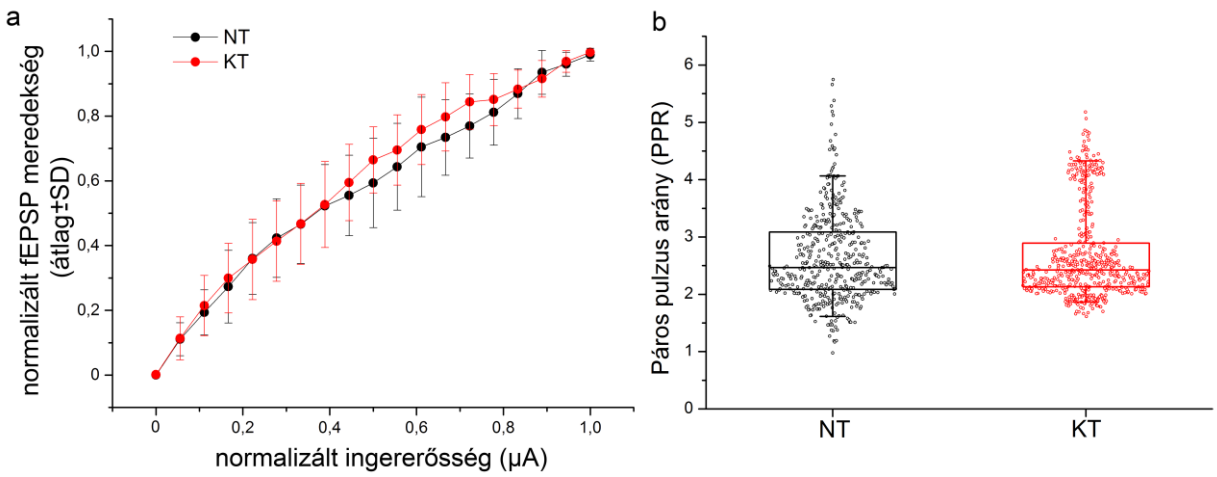
I/O görbe: Annak vizsgálatára, hogy az inkubációs rendszerünkben az agyszövet általános szinaptikus funkciója károsodik-e a Schaffer kollaterális-CA1 piramissejt szinapszisok esetén, I/O görbéket készítettünk az NT és KT csoportban 4 óra inkubáció elteltével.

Mindkét csoport a lépcsőzetesen emelt ingeráramokra fokozatosan növekvő fEPSP meredekség értékekkel válaszolt. Az NT csoport fEPSP meredekség értékei nem tértek el szignifikánsan a KT csoport értékeitől **(18. ábra)**.

Páros pulzus arány: Az agyszeletek rövidtávú plasztikus sajátságait páros pulzus paradigmával vizsgáltuk szintén a Schaffer kollaterális-CA1 piramissejt szinapszisokon mind az NT, mind a KT szeleteken.

A rövidtávú plasztikus folyamatok vizsgálhatóak voltak mindkét csoportban. A páros pulzus facilitáció (PPF) kiváltható volt és nem volt jelentős különbség a PPR-ben a két csoport között (p=0,230) **(18. ábra).**

Mindezek alapján a KT agyszeletekben a CA3-CA1 szinapszisok, az általános szinaptikus transzmissziót és a rövidtávú plasztikus folyamatokat tekintve, megőrizték funkcionális integritásukat 4 órás inkubációt követően is.

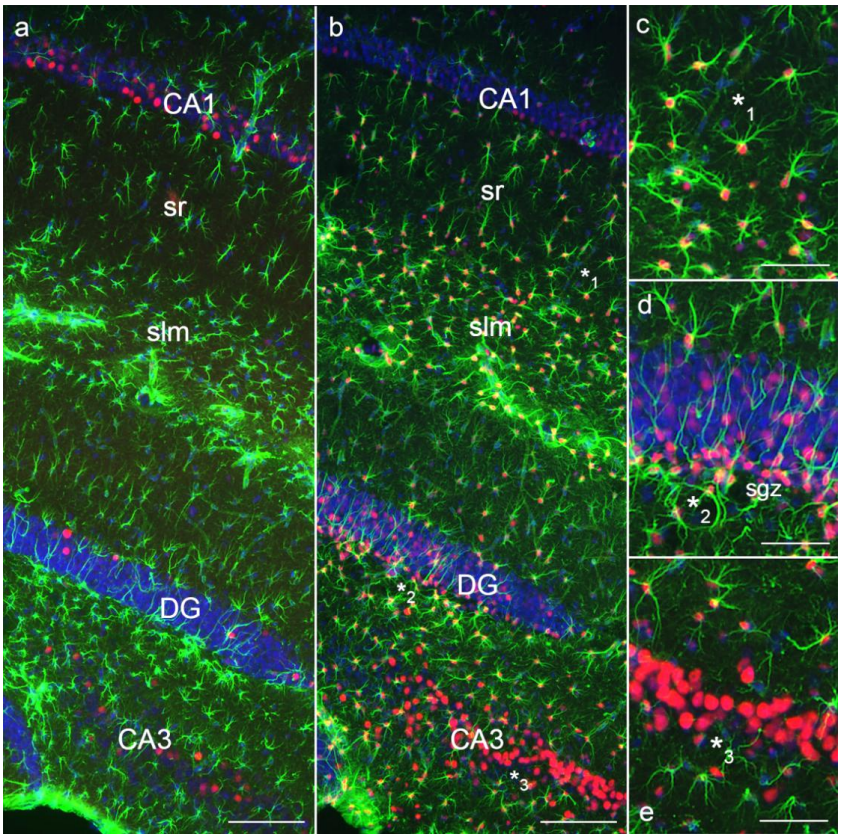


18. ábra: Az agyszövet szinaptikus működése. I/O görbe **(a)** és páros pulzus arány **(b)** az NT (fekete) és KT (piros) csoportban. A **b** ábrán a pontok az egyedi PPR értékeket jelölik. Box: medián, 25 % és 75%-os percentilisek; bajuszok: 5%-95%-os konfidencia intervallum, n=16 állat (a), n=12 állat (b)

7.2.5 A neuronok és asztrociták működése az agyszeletekben

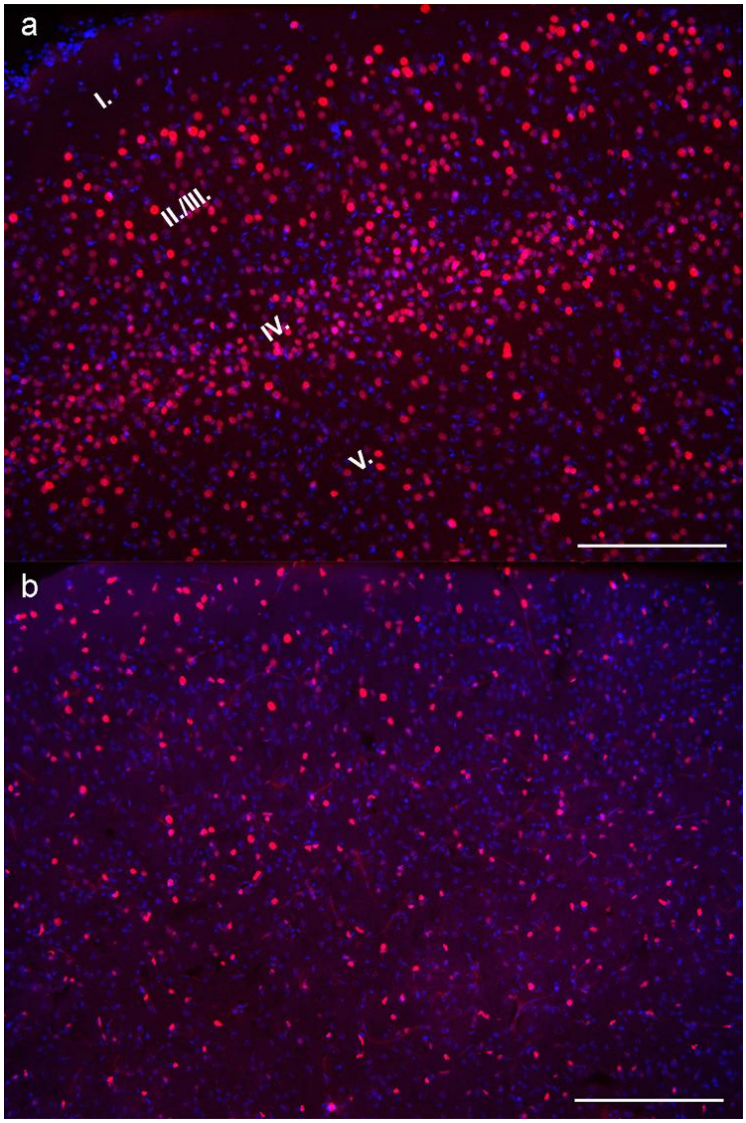
A c-Fos expressziós mintázata: Korábbi tanulmányok alapján a neuronális és gliális c-Fos expresszió megemelkedhet, a sejtek működése megváltozhat szöveti sérülés hatására (Liu és Chen 1994; Zamanian és mtsai., 2012). Annak vizsgálatára, hogy a neuronok és asztrociták -a KYNA fő forrásainak- működése eltér-e az inkubációs rendszerünkben először c-Fos immunjelölést végeztünk az NT és KT szeleteken.

A c-Fos expressziós mintázata jelentősen eltért a hippokampusz területén az NT és KT szeletek között. Szórványos, de intenzív neuronális pozitivitás látható az NT szeletek CA1-es piramissejt rétegében. A KT kondícióban ez a neuronális pozitivitás eltűnik a CA1-es régióból, azonban jelentősen megnövekszik a CA3-as sejtsorban. Nem láthatóak c-Fos^{+} asztrociták az NT szeleteken, míg jelentős a c-Fos gliális expressziója a KT kondícióban a CA1-es régióban, illetve a gyrus dentatus-ban (DG). Nagyszámú c-Fos^{+}/GFAP^{+} asztrocita sejt látható például a CA1-es régió str. radiatum és str. lacunosum-moleculare területén, illetve a DG szubgranuláris zónájában **(19. ábra)**.



19. ábra: A c-Fos expressziós mintázata a hippokampusz területén az NT **(a)** és KT **(b-e)** kondícióban. Skála: 200 µm (a-b) és 100 µm (c-e). Rövidítések: *DG:* dentate gyrus, *sr: stratum radiatum, slm: stratum lacunosum moleculare, sgz subgranuar zone*; zöld: GFAP, piros: c-Fos, kék: DAPI

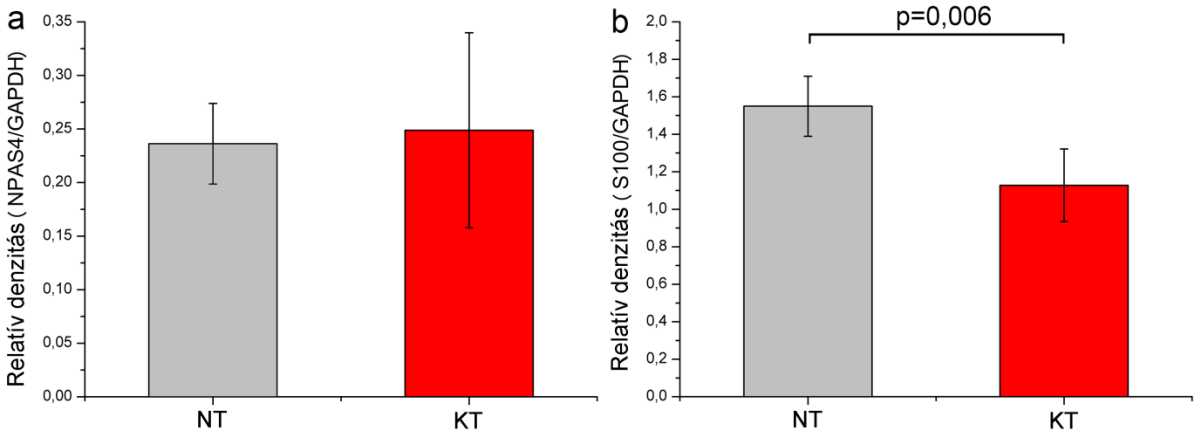
Hasonló mintázat figyelhető meg más agyterületeken is. A szomatoszenzoros (SS) kéreg területén az NT kondícióban intenzív neuronális c-Fos expresszió látható főként a 2-3. és 4. rétegben. A KT szeletek esetén a neuronális expresszió nagymértékben lecsökken, míg a fehérje expressziója jelentősen megnövekszik asztrocita sejtekben **(20. ábra)**. A c-Fos gliális expresszióját a kéreg területén a GFAP alacsony expressziója miatt nem tudtuk megerősíteni. Irodalmi adatok alapján azonban a neuron és asztrocita sejtmagok méretei jelentősen eltérnek (Lundgaard és mtsai., 2015). Így a nagyobb sejtmaggal rendelkező c-Fos^{+} neuronok és a kisebb sejtmagvú asztrocita sejtek jól megkülönböztethetőek.



20. ábra: A c-Fos expresszió mintázata az SS kéreg területén NT **(a)** és KT **(b)** kondícióban. piros: c-Fos, kék: DAPI, Skála 200 µm.

Az NPAS4 és S100 fehérje expressziója: A neuronok és asztrocita sejtek működését indirekt módon Western blot technikával is vizsgáltuk. A neuronális NPAS4 egy aktivitás függő korai gén terméke, míg az S100 egy Ca^{2+}-kötő fehérje az asztrocitákban. Mindkét fehérje expressziós szintjét 4 óra inkubációt követően mértük az NT és KT kondíciókban.

Az NPAS4 expressziója nem különbözött a két kondícióban (0,23±0,03 és 0,24±0,09; p=0,782), míg az S100 szintje szignifikánsan lecsökkent a KT szeletekben a 4 órás inkubáció alatt (1,54±0,16 és 1,12±0,19; p=0,006) **(21. ábra)**.



21. ábra: Az NPAS4 **(a)** és S100 **(b)** fehérje expressziója az NT (szürke) és KT (piros) szeletekben 4 óra inkubációt követően. Az ábrán az adatok átlagát és szórását tüntettük fel (átlag±SD; n=5 állat).

Mindezek alapján a neuronok és asztrociták működése változik a KT kondícióban, azonban az agyszövet metabolikusan aktív, anatómiai és funkcionális integritása nagymértékben megőrzött 4 óra elteltével is. A glükóz szint kis mértékben ugyan, de tovább csökken, illetve az LDH felszabadulás tovább növekszik a 6 órás inkubáció alatt. Emellett a hisztológiai vizsgálatok alapján a szöveti struktúra is jelentősen sérül 6 óra elteltével (nem ábrázolt megfigyelések). Ezért a KYNA termelődés és megoszlás vizsgálatára a 4 órás inkubációs időt választottuk.

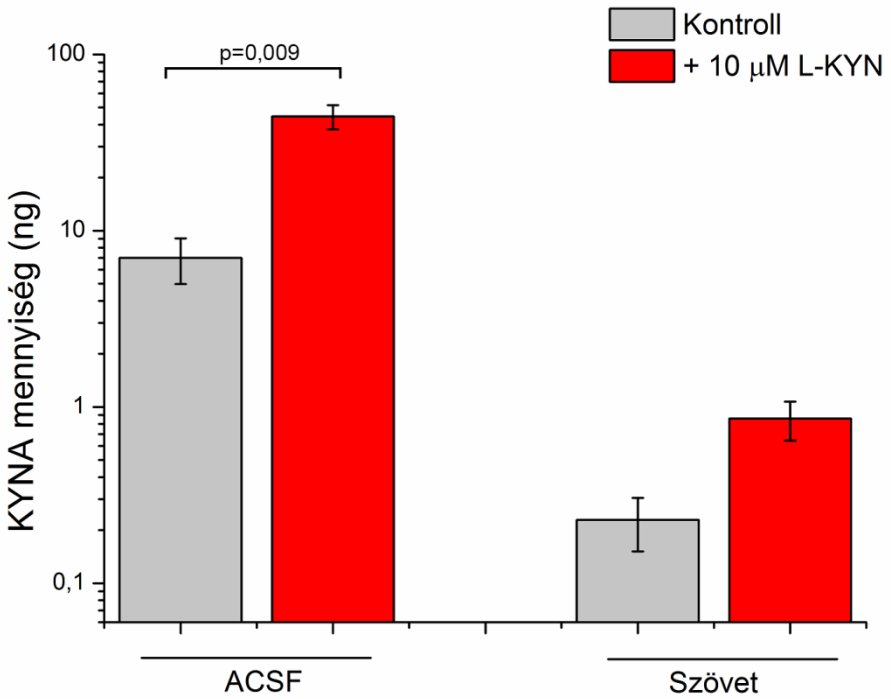
7.2.6 A bazális és L-KYN indukált KYNA termelődés egér agyszeletekben

Annak vizsgálatára, hogy az egér agyszeletek képesek-e KYNA-t termelni, és azt felszabadítani a rendszerünkben, valamint hogy lehetséges-e a KYNA termelés fokozása L-KYN adminisztrációval, HPLC méréseket végeztünk a felülúszóból és az agyszövetből egyaránt.

A kontroll csoporthoz képest, az ACSF és a szövet KYNA tartalma is szignifikánsan megemelkedett az L-KYN-nel kezelt csoportban, 4 órás inkubációt követően.

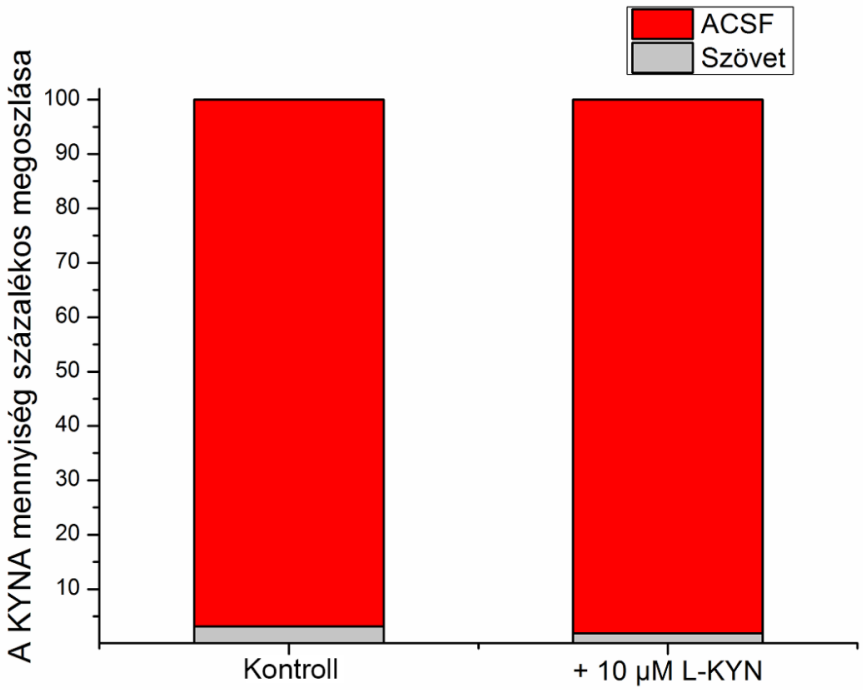
Az ACSF bazális KYNA tartalma 7,01±2,03 ng volt, míg az L-KYN kezelt csoport KYNA mennyisége 44,56±6,99 ng-ra emelkedett (p=0,009), ami átlagosan ~6-szoros KYNA növekedést jelent az ACSF esetén.

A szövet KYNA tartalma nagyságrendekkel alacsonyabb volt. A kontroll csoport KYNA tartalma bizonyos mintáknál a kimutatási értékhatár alatt volt. Így a szövet esetén az alacsony minta elemszám miatt statisztikai szignifikancia értéket nem számoltunk. Ennek ellenére, hasonlóan jelentős növekedést detektáltunk a szövet KYNA tartalmában is L-KYN kezelés hatására. A kontroll csoporthoz képest (0,22±0,07 ng), az L-KYN-ben inkubált szeletek KYNA szintje ~4-szeres növekedést mutatott (0,85±0,21 ng) **(22. ábra)**.



22. ábra: Bazális (szürke) és L-KYN-nel indukált (piros) KYNA termelődés egér agyszeletekben, 4 órás inkubáció során. A termelődött KYNA mennyisége az ACSF-ben és a szövetben. Az ábrán az adatok átlagát és szórását tüntettük fel logaritmikus skálán (átlag±SD; n=5 állat).

A KYNA megoszlása az ACSF és szövet között nem változott jelentősen az L-KYN adminisztráció hatására. Az KYNA mennyiség túlnyomó hányada a felülúszóba került a kontroll csoport (~97%) és L-KYN kezelt csoport (~98%) esetén is 4 órás inkubációt követően. Az teljes KYNA mennyiség csupán 2-3%-a maradt a szövetben mindkét csoport esetén **(23. ábra)**.

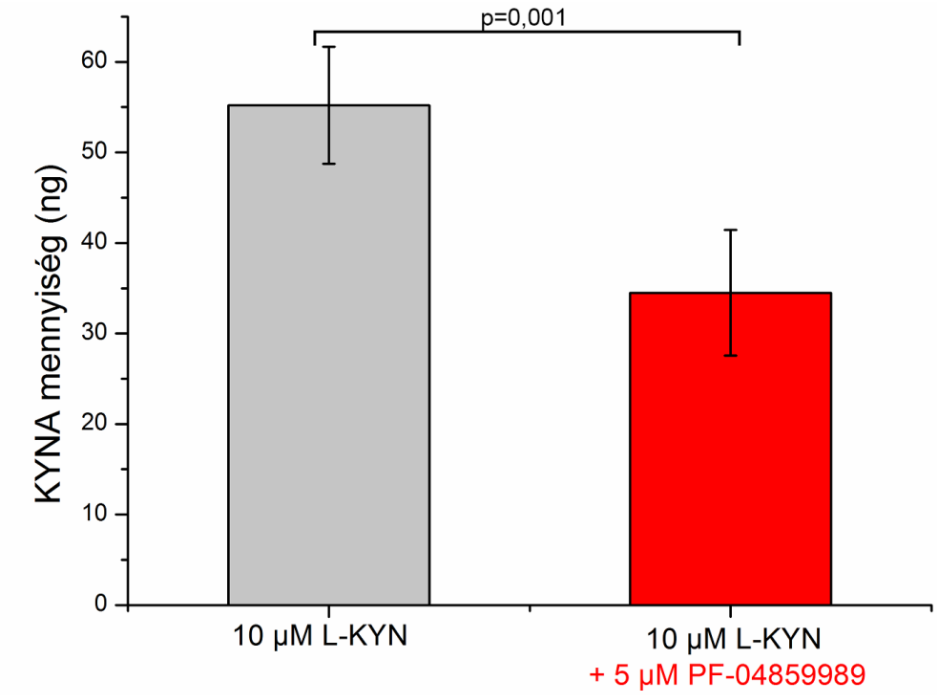


23. ábra: A KYNA megoszlása a kontroll és L-KYN kezelt csoportban. Az ábrán a szövet (szürke) és ACSF (piros) közötti átlagos KYNA megoszlást tüntettük fel (n=5 állat)

Mind az ACSF, mind a szövet KYNA tartalma tovább növekszik 6 órás inkubáció során az L-KYN kezelt csoportban (nem ábrázolt megfigyelés). Ez a növekedés azonban már nem szignifikáns a 4 órás csoporthoz képest, így a KAT-2 gátlás vizsgálatára szintén a 4 órás inkubációt választottuk, ahol a jelentős KYNA termelés mellett a szövetek integritása is nagymértékben megőrzött.

7.2.7 Specifikus KAT-2 gátlás hatása az L-KYN indukálta KYNA termelődésre

A KAT-2 gátlás hatásának vizsgálatára egy specifikus, irreverzibilis gátlószert alkalmaztunk. A PF-04859989 5 µM-os koncentrációban szignifikánsan csökkentette az ACSF KYNA tartalmát 4 órás inkubáció alatt. Az L-KYN-t tartalmazó ACSF KYNA szintje 55,19±6,45 ng volt, míg az L-KYN mellett a gátlószert is tartalmazó ACSF KYNA szintje 34,5±6,93 ng-ra csökkent (p=0,001) **(24. ábra)**. Az L-KYN csoporthoz képest, a PF-04859989 csoport KYNA szintje ~37%-kal csökkent a KAT-2 gátlás hatására.



24. ábra: KAT-2 gátlás hatása az L-KYN indukált KYNA termelődésre egér agyszövetben. Az ábrán az adatok átlagát és szórását tüntettük fel (átlag±SD; n=5 állat).

8 Diszkusszió

A kinurenin útvonal metabolitjai, így a KYNA is számos neurodegeneratív és mentális betegség (pl. Alzheimer-kór, Huntington-kór, agyi iszkémia, skizofrénia, major depresszió) kialakulásában érintett (Maddison és Giorgini 2015; Meier és mtsai., 2016). Éppen ezért a KYNA termelődésének regulálása potenciális terápiás stratégiaként vizsgált rágcsálókban (Dounay és mtsai., 2015). A KYNA szint manipulációja során az egér gyakori modell állat, ám a KYNA termelődés folyamatáról keveset tudunk egér központi idegrendszerben. A dolgozatban bemutatott munkánk során az agyszöveti KYNA produkció anatómiai és funkcionális vizsgálatát végeztük C57Bl/6 egér törzsben.

8.1 A kinurenin rendszer anatómiai vizsgálata

8.1.1 A KAT-2 enzim expressziós profilja egér agyszövetben

A KAT-2 genetikai (Alkondon és Albuquerque 2004; Potter és mtsai., 2010) manipulációja főként egér központi idegrendszerben vizsgált. Az enzim expressziós profilja azonban nem ismert egér agyszövetben. A KAT-2 lokalizációját eddig főként patkányban vizsgálták, így elsődleges célunk volt a KYNA szintézisét végző enzim agyszöveti lokalizációjának meghatározása egér esetén is. Anatómiai vizsgálataink során elsőként írtuk le a KAT-2 asztrocita sejtekben való expressziója mellett, annak neuronális jelentét egér agyszövetben (Heredi és mtsai., 2017).

A kat-2 mRNS vizsgálata során két eltérő sejtmagi sajátságokkal rendelkező sejtcsoportban detektáltuk az mRNS-t. Egy kisebb átmérőjű és denz sejtmaggal rendelkező sejtpopulációban, ami korábbi megfigyelések alapján asztrocita sejtekre jellemző magi sajátság (Lundgaard és mtsai., 2015). Song és mtsai. eredményeihez hasonlóan az agyszövet teljes területén jelentős volt a kat-2 mRNS gliális lokalizációja (pl. corpus callosum, kéreg, hippokampusz stb.) (Song és mtsai., 2017). Emellett azonban, a korábbiaktól eltérően, szintén jelentős volt a *kat-2* mRNS expresszió egy nagyobb átmérőjű, gyengébben jelölődött sejtmaggal rendelkező csoportban is az agyszövet számos területén. Ezek a sejtek az elhelyezkedésük (pl. a hippokampusz piramidális sejtsora) és méretük alapján idegsejtek lehetnek (Lungaard és mtsai., 2015).

Az enzim fehérje jelenlétének vizsgálata során, a patkányokon végzett immunhisztokémiai kísérletekkel megegyezően (Guidetti és mtsai. 2007b) jelentős számú KAT-2^{+} asztrocitát detektáltunk a hippokampusz, a striátum és a prefrontális kéreg területén. A GFAP és KAT-2 ko-lokalizácója azonban csak a hippokampusz területén volt jelentős. A striátum és kéreg

területén nagyszámú KAT-2$^{+,}$ ugyanakkor GFAP^{-}, de asztrocita morfológiai jellegekkel rendelkező sejt látható. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy egér agyszövet kérgi és striatális területein a GFAP expressziós szintje alacsony (Kindy és mtsai., 1992; Ben-Gigi és mtsai., 2015), így feltételezhető hogy az általunk detektált KAT-2^{+}/GFAP^{-} sejtek is asztrociták, amelyekben a GFAP szintje nem éri el az immunhisztokémiával detektálható szintet. Ennek igazolására egy másik asztrocita markerrel is elvégeztük a kíséreteket. Az S100/KAT-2 kettősfestés során nagyszámú S100^{+}/KAT-2^{+} sejt jelölődött mind a striátum, mind a prefrontális kéreg területén (nem ábrázolt megfigyelés). A KAT-2 asztrocita sejtekben való expresszióját tovább támogatja az enzim asztrocita végtalpakban való jelenléte is, amit korábban már patkány agyszövet esetén is leírtak (Guidetti és mtsai., 2007b).

Az enzim gliális jelenléte mellett jelentős volt annak neuronális lokalizációja is az egér agyszövetben. A korábbi patkány kísérletekben megfigyeltekhez hasonlóan, sporadikus KAT-2 expressziót detektálunk neuronokban a hippokampusz, a striátum (Du és mtsai., 1992; Roberts és mtsai., 1992) és a prefrontális kéreg területén. Más agyterületeken a KAT-2 neuronális expressziója kifejezettebb volt. A substantia nigra pars compacta és reticulata területén a teljes neuron populáció erős KAT-2 expressziót mutatott. A neuronok többsége GAD67^{+} idegsejt mind a négy vizsgált agyterületen. Így elmondható, hogy a KAT-2^{+} idegsejtek nagy része GABAerg gátló idegsejt. Kivételt képez a substantia nigra pars compacta, ahol a KAT-2 –hasonlóan a KAT-1 izoformához (Knyihar-Csillik és mtsai., 2004)- a dopaminerg neuronokban expresszálódott. Kísérleteink során a dolgozatban be nem mutatott, más agyi struktúrákban is nagyszámú KAT-2^{+} neuron látható (pl. kisagy, talamusz). Figyelembe véve egy patkány kérgi sejtkultúrákon végzett tanulmányt, amely szerint a neuronok 2.3-szer nagyobb rátával termelik a KYNA-t, mint az asztrociták (Rzeski és mtsai., 2005), a KAT-2^{+} neuron populációnak is jelentős szerepe lehet a KYNA termelésben a központi idegrendszerben.

A substantia nigra területén főként GABAerg és dopaminerg neuronokban detektáltuk a KAT-2-t, míg az asztrocitákban gyenge jelölődést tapasztaltunk. Elképzelhető, hogy ezen a területen a fiziológiás KYNA termelődésért főként a neuronok felelnek? Lehetséges, hogy például Parkinson-kór esetén megfigyelt csökkent KYNA koncentráció ezen a területen (Ogawa és mtsai., 1992) inkább a neuronális KAT-2 diszfunkció eredménye? Az asztrocitáknak és neuronoknak a különböző agyterületeken eltérő szerepük lehet akár a fiziológiás, akár az abnormális KYNA szint kialakításában. Ezért az enzim expressziós mintázatának és aktivitásának tisztázása intakt agyszövetben, illetve neurodegeneratív kórképek modelljeiben szükséges a további terápiás stratégiák kidolgozásához.

8.1.2 A gliális és interneuronális KYNA felszabadulás lehetséges hatása a GABAerg működésre

Korábbi kísérletek patkány kérgi szeleteken (Turski és mtsai. 1989), neuron és asztrocita sejtkultúrákon (Rzeski és mtsai. 2005), illetve saját eredményeink egér hippokampális szeleteken is bizonyítják, hogy a KYNA szintézisét követően kijut a sejtekből. A felszabadulás folyamata, illetve a felszabaduló KYNA pontos hatásmechanizmusa azonban nem ismert.

Az, hogy kísérleteink során az asztrocitákban és a főként helyi kapcsolatokat létesítő GABAerg sejtekben erős KAT-2 expressziót detektáltunk, illetve hogy a projekciós piramissejtekben nem mutatható ki az enzim, a KYNA lokális felszabadulását és hatását feltételezi bizonyos agyterületeken (pl. hippokampusz, prefrontális kéreg).

A KYNA fő ionotróp receptor célpontjai az NMDA és az α7nAch receptorok (Birch és mtsai., 1988; Albuquerque és Schwarcz 2013). Érdekes módon az NMDA receptor antagonisták akut adminisztrációjakkor azoknak paradox hatását figyelték meg rágcsáló kérgi piramissejteken. Az MK-801 hatására a piramis sejtek aktivitása növekedett, míg az interneuronok aktivitása ezzel párhuzamosan csökkent a prefrontális kéregben. A hatás feltehetően az MK-801 interneuron preferált gátlásának és a következetes piramissejteken való diszinhibíciónak az eredménye (Homayoun és Moghaddam 2007). Riebe és mtsai. tanulmányában, a szintén NMDA receptor antagonista memantin az interneuronokon lévő tónusosan aktív NMDA receptorokon hatott, míg nem volt kimutatható hatása a piramissejteken lévő NMDA receptorok mediálta válaszokon (Riebe és mtsai., 2016). Nemrégiben a KYNA esetén is kimutatták, hogy annak *in vivo* prefrontális kérgi perfúziója szelektíven a helyi mező potenciálok gátló komponensét csökkenti. Emellett patch clamp vizsgálatok kimutatták, hogy sejtek szintjén a KYNA jelentősebben gátolja a helyi GABAerg szinapszisokat, mint a glutamáterg transzmissziót szintén a prefrontális kéreg területén (Flores-Barrera és mtsai., 2017). Továbbá egy *in vitro* kísérletben a KYNA -NMDA receptor gátlás révén- jelentősen csökkentette a radiális glia sejtek GABAerg sejtekké való differenciálódását is, míg azok glutamáterg sejtekké való alakulását kis mértékben befolyásolta (Bagasrawala és mtsai., 2016). Mindezek alapján az interneuronok különösen érzékenyek az NMDA receptor gátlásra. A folyamat patológiás körülmények között a gátló kontroll megszűnését, így a gátló-serkentő egyensúly felborulását eredményezheti az agyszövetben. A GABAerg neurotransszmisszió ilyen módon számos neuropszichiátriai kórképben sérülhet. Skizofréniában az NMDA receptorok alulműködése főként a GABAerg interneuronokat érinti mind a hippokampusz

(Grunze és mtsai., 1996), mind a prefrontális kéreg területén (Bitanihirwe és mtsai., 2009), emellett a KYNA szint bizonyítottan megnövekszik a betegek CSF-jében és a prefrontális kéregben (Schwarcz és mtsai., 2001; Linderholm és mtsai., 2012; Kegel és mtsai., 2014). Lehetséges, hogy az asztrociták és interneuronok által lokálisan felszabadított KYNA skizofrénia esetén főként az interneuronok működését gátolja? A folyamattal a KYNA pedig ilyen módon hozzájárul a GABAerg transzmisszió depressziójához, a kognitív funkciók károsodáshoz és így a kórkép kialakulásához?

A kérdések megválaszolásához, tisztázni kell a KYNA asztrocitákból és interneuronokból való felszabadulásának és neuromodulátoros hatásának pontos mechanizmusát a modell állatokban, fiziológiás és patológiás körülmények között egyaránt.

8.2 A kinurenin rendszer funkcionális vizsgálata

8.2.1 Az agyszeletek életképessége, működése az *in vitro* modellben

Az akut agyszelet preparátumok előnye, hogy segítségükkel a kinurenin rendszer szövet specifikusan, a perifériás kinurenin funkció befolyásolása nélkül vizsgálható. Emellett az agyszeletek nagymértékben megtartják az agyszövet jellegzetes felépítését (szinaptikus kapcsolatok, sejt variabilitás stb.), az extracelluláris környezet pontosan szabályozható, illetve a különböző farmakológiai kezelések szélesebb skálán tesztelhetőek (Cho és mtsai., 2007; Lein és mtsai., 2011).

Az akut agyszeletekkel való munkának azonban limitáló tényezői is vannak. A legfontosabb a szövetek életképessége, ami átlagosan 6-8 óra (Buskila és mtsai., 2014). Vannak olyan agyterületek (pl. dorzális hippokampusz), illetve sejt populációk ahol ez az időablak még rövidebb (Fukuda és mtsai., 1995). Emellett fontos tényező, hogy az agyszeleteket kis térfogatú ACSF-ben inkubáltuk perfúzió nélkül -a termelődő KYNA mennyiség detektálhatósága érdekében-, így az inkubáció alatt termelődő káros anyagcsere végtermékek (pl. laktát) könnyebben felhalmozódhatnak a rendszerünkben, ami káros lehet a szövetek számára. Ezért annak kizárására, hogy a detektált KYNA felszabadulás nem egyszerűen a sejtek degradációjának következménye, azaz az általunk kialakított *in vitro* rendszer alkalmas az akut agyszeletekkel való inkubációs kísérletek elvégzésére, vizsgáltuk az agyszeletek életképességét, illetve a neuronok és asztrociták – a KYNA fő forrásainak- működését több órás inkubációt követően. 4 órás inkubációs idő után kismértékű változásokat detektálunk a szövetek anatómiai és funkcionális integritásában.

A sejtmembrán integritásának változását az LDH felszabadulás mérésével vizsgáltuk. Az LDH az ép szövetben, minden élő sejtben megtalálható. A sejtmembrán sérülésekkor az enzim kijut a sejtekből és stabilitásának köszönhetően extracelluláris szintjének változása több napon keresztül követhető, így jó indikátora a szövetkárosodásnak, a sejtek sérülésének (Noraberg és mtsai., 1999; Mozes és mtsai., 2012). Az LDH mérhető volt a rendszerünkben és fokozatosan növekedett az ACSF-ben az inkubációs idő előrehaladtával, ami alátámasztja az akut agyszeletekkel való munka limitált időablakát. Azonban a maximális LDH szinthez képest 4 óra elteltével rendkívül kismértékű az LDH felszabadulás. Ezek alapján az idegszövet sejtjeinek membránja minimálisan sérül, és integritásuk nagymértékben megőrzött 4 órás inkubációt követően.

Az agyszeletek glükóz fogyasztását HK aktivitás méréssel vizsgáltuk. A kiindulási glükóz szinthez képest fokozatosan csökken az ACSF glükóz tartalma a 4 órás inkubáció folyamán, ami 6 órás inkubáció alatt tovább csökken (nem ábrázolt adat). Habár az LDH növekedés a membrán integritás enyhe, de fokozatos sérülését jelzi, a glükóz szint csökkenés a 4 és 6 órás inkubációs idők alatt csak akkor lehetséges, ha az agyszövet glükóz metabolizmusa aktív. Az idegszövetben a neuronális és asztrociták általi glükóz felvétel is facilitált membrán glükóz transzportereken keresztül lehetséges (Chuquet és mtsai., 2010; Lundgaard és mtsai., 2015). Ezért feltételezhetjük a glükóz membránhoz kötött felvételét és felhasználását végző rendszerek épségét, és az agyszövet működőképességét a 4 órás inkubáció alatt is.

Habár a hippokampusz CA1-es régiójának szelektív érzékenysége számos inzultus (pl. excitotoxicitás, agyi iszkémia) esetén ismert (Davolio és Greenamyre 1995; Kovalenko és mtsai., 2006), nem detektáltunk látható sérülést a CA1-es területen. A különböző sérülésekre sokkal rezisztensebb CA3-as régió ezzel szemben nagyobb érzékenységet mutatott az *in vitro* rendszerünkben. Kreisman és mtsai. vizsgálataik során kimutatták, hogy az ion összetétel megváltoztatása révén okozott depolarizáció vagy a metabolikus sérülést eredményező ágensek, a későbbi hipoxiában az addig rezisztens CA3-as régió érzékenységét eredményezték (Kreisman és mtsai., 2000). A szelet preparátumok készítése során a vágás -a passzív Na^+ influx és az azt követő víz beáramlás révén- elkerülhetetlenül a sejtek egy részének depolarizálódásához és megduzzadásához vezet. (Ting és mtsai., 2014). Mindez szerepet játszhat az inkubálást követően detektált CA3-as régió strukturális változásaiban. A CA3-as piramis sejtek citoplazmájában a NeuN jelölődés intenzitása láthatóan lecsökkent, a sejtek morfológiája sérült. A sejtmagok intenzív jelölődése alapján, a NeuN jelölődés csökkenése azonban nem a neuron pusztulás jele. A csökkent intenzitást a fehérje szintézisének vagy antigenicitásának csökkenése is okozhatta, ami megfigyelhető volt sérült,

de még élő sejtekben enyhe iszkémia okozta metabolikus zavar esetén is (Hossmann 1993; Unal-Cevik és mtsai., 2004).

A CA3-as sejtsor integritásának enyhe sérülése ellenére az általános szinaptikus transzmisszió és a rövid távú plaszticitás nem sérült a CA3-CA1-es piramissejtek szinapszisain. Nem találtunk szignifikáns különbséget sem az I/O görbe fEPSP értékeiben, sem a PPR-ben az NT és KT csoportok között. Így a szinaptikus jelátvitelt és a rövid távú plaszticitást tekintve, a Schaffer kollaterális és CA1-es sejtek közötti szinapszisok funkcionálisan intaktak, és plasztikus jellege a hippokampusz ezen régiójának nem sérül az *in vitro* modellünkben, 4 órás inkubáció alatt.

A legjelentősebb változást a c-Fos fehérje expressziós mintázatában detektáltuk. A c-Fos pozitivitás jelentősen lecsökkent a neuronokban a hippokampusz CA1-es régiójában, míg erőteljesen megnövekedett asztrocita sejtekben a hippokampusz teljes területén a KT kondícióban. Hasonló változást detektálunk más agyterületeken is (pl. SS kéreg). Mindez a sejtek működésének változását tükrözheti. Korábbi tanulmányokban a gliális c-Fos expresszió indukálható volt fokális agyi sérülés által (Dragunow és mtsai., 1990), interferon gamma (Rubio 1997) és glutamát (Edling és mtsai., 2007) kezelés révén. Kísérletünkben a jelentős asztrocita aktivációt okozhatta egyfajta metabolikus stressz, amit a kis térfogatban könnyebben koncentrálódó káros metabolitok felhalmozódása is eredményezhet (pl. laktát, reaktív oxigén gyökök stb.). A neuronális c-Fos expresszió csökkenés nem általános a hippokampusz teljes területén, ugyanis jelentősen megnövekedett a CA3-as régióban az NT kondícióhoz képest. A c-Fos fehérje féléletideje rövid (Kruijer és mtsai., 1984), annak *de novo* szintéziséhez szükség van a teljes fehérje szintetizáló apparátusra a sejtekben. Ez a rendszer csak életképes sejtekben működik megfelelően, így feltételezhető, hogy a jelölődött neuronok funkcionáló sejtek az agyszövetben.

A Western blot eredmények szintén egy megváltozott asztrocita működést, ugyanakkor egy általánosan változatlan neuronális funkciót támasztanak alá. Az NPAS4 egy neuronális aktivitásfüggő transzkripciós faktor, melynek expressziós szintje a c-Fos fehérjéhez hasonlóan rövid időn belül változik (Choy és mtsai., 2015). Expresszióját az idegsejtek aktivitása mellett különböző agyi inzultusok is indukálhatják. Emelkedett NPAS4 szintet mutattak ki fokális iszkémiát, illetve kainát indukálta hippokampális sérülést követően is (Zhang és mtsai., 2009; Leong és mtsai., 2013). A fehérjének neuroprotektív szerepet tulajdonítanak a neurodegenerációs és gyulladásos folyamatok mérséklése révén (Choy és mtsai., 2015). Feltételeztük, hogy amennyiben a 4 órás KT inkubáció neuronális károsodáshoz vezet, az

NPAS4 expressziós szintje megemelkedik az agyszeletekben. A fehérje szintje azonban nem változik a KT kondícióban, ami a szeletek megőrzött neuronális funkcióját támogatja.
Ezzel szemben csökkent S100 szintet detektáltunk a KT csoportban az NT csoporthoz képest. Az S100 fehérjének számos funkciója van az asztrocita sejtekben (Heizmann és mtsai., 2002; Donato és mtsai., 2013). Korábban leírták, hogy a metabolikus stressz fokozza az asztrociták által mediált S100 szekréciót, így feltételeztük, hogy ha a KT kondíció az agyszövet metabolikus károsodásához vezet, akkor a szöveti S100 szint is megváltozik. Korábbi immunhisztokémiai kísérleteink során az S100 antitest asztrocita specificitását megerősítettük (Gellert és mtsai., 2013). Így feltételezhetjük, hogy a csökkent szöveti S100 fehérje szint, illetve az erőteljes c-Fos expresszió a KT csoportban a megváltozott asztrocita működés (pl. fokozott puffer funkció) jelei. Az asztrociták (Guillemin és mtsai., 2001; Guidetti és mtsai., 2007b) és neuronok (Heredi és mtsai., 2017) egyaránt forrásai a KYNA-nak az agyszövetben, így a sejtek megváltozott működése okozta, a fiziológiástól eltérő KYNA termelődés nem zárható ki a kísérleteinkben. Habár a szeletek KAT-2 expressziós szintje nem változott a KT kondíció alatt (nem ábrázolt megfigyelés), az enzim aktivitásának változásáról nincs információnk.

8.2.2 Az egér agyszeletek bazális és indukált KYNA termelése a modellben

A kinurenin rendszer vizsgálatakor elsőként azt teszteltük, hogy alkalmasak-e az egér akut agyszeletek a KYNA termelésre, illetve annak felszabadítására az *in vitro* rendszerünkben. A KYNA szint növelésére L-KYN-t alkalmaztunk 10 µM-os koncentrációban, amit korábbi tanulmányok alapján választottunk ki (Urbanska és mtsai., 2000; Okuno és mtsai., 2011). Patkány akut agyszeletekhez hasonlóan (Turski és mtsai., 1989, Alkondon és mtsai., 2011), az egér agyszeletek is intenzív KYNA termelésre és annak felszabadítására képesek *in vitro*. L-KYN hatására pedig a KYNA termelődés jelentősen fokozható volt.
A szöveti minta esetén csak mennyiségi adatok állnak rendelkezésünkre a termelődött KYNA szintjét illetően. Dolgozatomban ezért csak a KYNA mennyiségét ábrázoltam az ACSF esetén is, a két kompartment KYNA szintjének összevethetőségéhez. Az ACSF mintáink esetén azonban a KYNA koncentrációja is ismert (nem ábrázolt adatok), ami mind a bazális (6±1,79 nM), mind az L-KYN-nel kezelt csoport (39±6,16 nM) estén az alacsony nanomoláris tartományba esett, ami megegyezik korábbi patkány agyszöveten végzett mérési eredményekkel (Schwieler és mtsai., 2006).

A 4 órás inkubáció végére a felszabadult KYNA mennyisége az ACSF-ben több mint 30-szorosa volt a szöveti KYNA mennyiségnek **(23. ábra)**, ami jelentős termelődési és felszabadulási ráta eredménye. Fontos megjegyezni azonban, hogy a kísérleteinkben megfigyelt KYNA termelődés és felszabadulás eltérhet az *in vivo* körülmények között zajló mechanizmusoktól.

Befolyásolhatja a KYNA produkciót, hogy az ACSF összetétele eltér bizonyos elemeiben az *in vivo* fiziológiás extracelluláris milieu-től. Nem tartalmaz például aminosavakat (pl. aszpartát, triptofán), amelyekről kimutatták, hogy negatív szabályozói a KAT izoenzimeknek (Han és mtsai., 2010). Az aminosavak hiánya befolyásolhatja a KAT aktivitást, így módosíthatja a KYNA termelődést az agyszeletekben.

A rendszerünkben az intracelluláris és extracelluláris tér aránya is eltér. Az ACSF-fel a szövetek „extracelluláris tere" kiterjedtebb, így az arány jelentősen kisebb kísérletünkben (kb. 100 mg agyszövet/6ml ACSF) az intakt egér agyban megfigyelhető aránynál (kb. 500 mg agyszövet/0,04 ml CSF) (Artru 1993). A nagyobb extracelluláris tér jelentős koncentráció grádienst eredményezhet bármilyen felszabadított molekula esetén, így az általunk megfigyelt intenzív KYNA felszabadulás is eltérhet *in vivo*.

Ha azonban a megfigyelt KYNA termelődési és felszabadulási ráta hasonló az *in vivo* körülményekhez, ahol az extracelluláris tér jelentősen kisebb, akkor egy jóval magasabb KYNA koncentráció érhető el L-KYN adagolással a KYNA felszabadulásának helyein *in vivo*.

A kis szövet mennyiség ellenére, az L-KYN kezelés hatására bekövetkező 6-szoros KYNA mennyiség emelkedés az ACSF-ben nagy KAT enzim kapacitást feltételez az egér agyszövetben. Májból származó KAT enzim preparáción végzett kísérlet alapján a KAT-ok L-KYN szubsztrát kapacitása és Km értéke valóban magas (~ 1 mM) (Bender és McCreanor 1985). Ezt támogatják patkány agyszeleteken végzett kísérletek is, ahol a KYNA termelődés csak magas L-KYN koncentrációval volt telíthető (~1 mM) (Turski et al., 1989).

Összegezve elmondható, hogy az egér agyszövet intenzív KYNA termelődésre és annak felszabadítására képes L-KYN kezelés hatására *in vitro*. A termelődő KYNA nagy része (~98%) kijut az extracelluláris térbe, míg a szövetben maradt KYNA mennyiség elhanyagolható (~2-3%). A KYNA termelődés és felszabadulás mechanizmusának tisztázására azonban további vizsgálatok szükségesek *in vitro* és *in vivo* egyaránt. A felszabadulás pontos folyamata nem ismert sem asztrociták, sem neuronok esetén. Nem tudni például, van-e specifikus területe (pl. szinaptikus vagy extraszinaptikus) a KYNA sejtekből való kijutásának. A folyamat reguláláról sincs információnk egér agyban. Mindezek

vizsgálata szükséges a jövőben, hiszen ezek a folyamatok is célpontjai lehetnek a KYNA szint terápiás szabályozásának.

8.2.3 A KYNA termelés modulálása specifikus KAT-2 gátlószerrel egér agyszövetben

A legújabb nagy specificitást mutató, BBB penetráns KAT-2 enzim gátlók új lehetőséget nyújtanak a kinurenin rendszer működésének, a KYNA termelődés folyamatának vizsgálatára és szabályozására rágcsálókban (Dounay és mtsai., 2012; Linderholm és mtsai., 2016). Az eddigi tanulmányokban a gátlószerek hatását kizárólag patkányokon tesztelték. Egyetlen farmakológiai kísérlet sem vizsgálta a KAT-2 enzim gátlók hatását egér agyszövetben, az enzim egerekben feltételezett irreleváns szerepe miatt (Guidetti és mtsai., 2007a). Az anatómiai vizsgálataink során jelentős KAT-2 immunpozitivitást találtunk asztrocita sejtekben, illetve GABAerg gátló neuronokban egyaránt felnőtt egér agyszövetben (Heredi és mtsai., 2017). Így jelentős szerepet feltételeztünk a KYNA termelésben a KAT-2-es izoformának egér esetén is.

A szövet és az ACSF alacsony bazális KYNA koncentrációi miatt a KAT-2 gátlószer hatását az L-KYN indukálta KYNA termelődésen teszteltük. A PF-04859989-t a korábbiakban i.p. 10 mg/ttkg-os dózisú kezelést követően, a patkány CSF-ben megfigyelt koncentrációban alkalmaztuk (Dounay és mtsai., 2012). A gátlószer 5 µM-os koncentrációban közel 40%-kal csökkentette az L-KYN indukálta KYNA termelődést az ACSF-ben. A PF-04859989 KAT-2 specifikusságát csak patkány és ember KAT-ok esetén vizsgálták és bizonyították (Kozak és mtsai., 2014). Nincs adat a gátlószer specificitásáról egér KAT-ok estén, ezért a jövőben mindenképp szükséges ennek ellenőrzése. Amennyiben azonban a specificitást egér agyszövetben is feltételezzük, akkor korábbi kísérleteknek ellentmondva (Guidetti és mtsai. 2007a), a KAT-2-nek jelentős szerepe lehet a KYNA termelésben felnőtt egér központi idegrendszerében is.

A KAT-2 gátlás hatását főként skizofrénia és más kognitív károsodások kapcsán vizsgálják rágcsáló és főemlős állatmodellekben (Wu és mtsai., 2014). Amennyiben a KAT-2 jelentős szerepe bebizonyosodik egér agyszövetben is, a KAT-2 farmakológiai gátlás terápiás hatásának tesztelése kiterjeszthető egér modellekre is. Mindez tovább segítheti a klinikai tesztelésre alkalmas farmakonok preklinikai azonosítását.

9 Következtetések

Eredmények összefoglalása és a belőlük levonható következtetések

Kísérleteink során a KYNA termelődés folyamatának anatómiai és funkcionális vizsgálatát végeztük egér agyszövetben. Az eredményeink tükrében a célkitűzésekben feltett kérdéseinkre az alábbi válaszokat adhatjuk, illetve az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1) Elsőként vizsgáltuk és írtuk le a KYNA termelésében fontos enzim, a KAT-2 lokalizációját mRNS és fehérje szinten egér agyszövetben. A hisztológiai vizsgálatok alapján a KAT-2 asztrocita sejtekben és neuronokban is jelen van, utóbbi sejtpopuláció esetén a KAT-2$^+$ sejtek nagy része GABAerg gátló idegsejt. A KAT-2$^+$ neuronok GABAerg jellegét elsőként bizonyítottuk. Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a KYNA termelésében az asztrociták mellett, a neuronoknak is jelentős szerepük lehet rágcsálókban. A két sejtpopuláció fiziológiás és patológiás KYNA termelésben betöltött funkciójának tisztázása fontos a jövőben.

2) Teszteltük az *in vitro* inkubációs rendszerükben az agyszelet preparátumok anatómiai és funkcionális integritását. Habár az agyszövetben egy jelentősen megváltozott asztrocita funkciót detektáltunk, az agyszeletek metabolikusan aktívak, strukturális és funkcionális integritásuk nagymértékben megőrzött 4 órás inkubációt követően is, így az inkubációs rendszerünk alkalmas további farmakológiai vizsgálatok elvégzésére.

3) Elsőként vizsgáltuk a bazális és L-KYN indukálta KYNA termelődést egér akut agyszelet preparátumokon. Az agyszeletek intenzív KYNA termelésre és felszabadításra képesek és ez jelentősen fokozható a KYNA előanyagával, az L-KYN-nel. A termelődött KYNA nagy része kijut a felülúszóba és csak kis hányada marad a szövetben. Mindezek alapján az egér akut agyszelet preparátumok alkalmasak a KYNA termelődés folyamatának és annak terápiás célú manipulációjának vizsgálatára *in vitro*.

4) Végül kimutattuk, hogy egy specifikus KAT-2 gátlószer jelentősen csökkenti a KYNA termelődését egér agyszövetben is. A gátlás hatására a KYNA szint 37%-kal csökkent. Az eddigi tanulmányok alapján a KAT-2-nek kis szerepet feltételeztek a KYNA termelésben, egér idegszövetben. A kísérletünkben tapasztalt nagymértékű KYNA szint csökkenés azonban

ellentmond a korábbi megfigyeléseknek, így a KAT-2 egér agyszövetben betöltött szerepének további vizsgálata és tisztázása fontos a jövőben.

Összességében elmondható, hogy az általunk végzett anatómiai és funkcionális vizsgálatok, illetve azok eredményei a KYNA termelődés folyamatáról egér agyszövet esetén hiánypótolóak a szakirodalomban, és nagyban segíthetik a jövőbeni kinurenerg manipulációs kísérleteket.

10 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Toldi József Professzor Úrnak, hogy már szakdolgozó éveimben bizalmat szavazott és lehetőséget biztosított arra, hogy a kutatócsoportjához csatlakozzak.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Gellért Leventének az évek során nyújtott rengeteg segítséget. Szakmai észrevételei, tudományos útmutatása és támogatása nélkülözhetetlenek voltak az értekezés elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Kis Zsoltnak is, aki elméleti és gyakorlati tudásával, hasznos meglátásaival segítette munkámat.

Köszönöm Vécsei László Professzornak, hogy mindig támogatta munkacsoportunk kísérleteit.

Továbbá köszönöm Dr. Zádori Dénesnek és Dr. Veres Gábornak a Neurológiai Klinika munkatársainak, Dr. Jankovics Ferencnek az SZBK Genetikai Intézet munkatársának, valamint Magyariné Berkó Anikó tanszéki munkatársnak, hogy munkájukkal segítették kísérleteinket.

Köszönöm valamennyi tanszéki munkatársnak a barátságos légkört. Külön köszönettel tartozom Veketyné Váradi Margitnak a hosszú évek során nyújtott technikai segítségekért.

Külön köszönöm Oláh Gáspárnak a rengeteg szakmai segítséget, támogatást, bátorítást és ösztönzést.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, testvéreimnek és barátaimnak, hogy mindig számíthatok rájuk, és mellettem állnak.

11 Irodalomjegyzék

Artru A.A. (1993) "Cerebrospinal Fluid: Physiology and Pharmacology."Anesthesia and the Central Nervous System. Dev in Critical Care Medicine and Anesthesiology, vol 28. Springer, Dordrecht

Albuquerque, E. X. and R. Schwarcz (2013). "Kynurenic acid as an antagonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges." Biochem Pharmacol **85**(8): 1027-1032.

Alexander, K. S., H. Q. Wu, et al. (2012). "Acute elevations of brain kynurenic acid impair cognitive flexibility: normalization by the alpha7 positive modulator galantamine." Psychopharmacology (Berl) **220**(3): 627-637.

Alkondon, M. and E. X. Albuquerque (2004). "The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex." Prog Brain Res **145**: 109-120.

Alkondon, M., E. F. Pereira, et al. (2011). "Age dependency of inhibition of alpha7 nicotinic receptors and tonically active N-methyl-D-aspartate receptors by endogenously produced kynurenic acid in the brain." J Pharmacol Exp Ther **337**(3): 572-582.

Alkondon, M., E. F. Pereira, et al. (2015). "Functional G-protein-coupled receptor 35 is expressed by neurons in the CA1 field of the hippocampus." Biochem Pharmacol **93**(4): 506-518.

Bagasrawala, I., N. Zecevic, et al. (2016). "N-Methyl D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid Affects Human Cortical Development." Front Neurosci **10**: 435.

Banerjee, J., M. Alkondon, et al. (2012). "Regulation of GABAergic inputs to CA1 pyramidal neurons by nicotinic receptors and kynurenic acid." J Pharmacol Exp Ther **341**(2): 500-509.

Baran, H., N. Cairns, et al. (1996). "Increased kynurenic acid levels and decreased brain kynurenine aminotransferase I in patients with Down syndrome." Life Sci **58**(21): 1891-1899.

Beal, M. F., W. R. Matson, et al. (1992). "Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex." J Neurol Sci **108**(1): 80-87.

Beal, M. F., W. R. Matson, et al. (1990). "Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid." J Neurochem **55**(4): 1327-1339.

Beggiato, S., T. Antonelli, et al. (2013). "Kynurenic acid, by targeting alpha7 nicotinic acetylcholine receptors, modulates extracellular GABA levels in the rat striatum in vivo." Eur J Neurosci **37**(9): 1470-1477.

Beggiato, S., S. Tanganelli, et al. (2014). "Endogenous kynurenic acid regulates extracellular GABA levels in the rat prefrontal cortex." Neuropharmacology **82**: 11-18.

Behan, W. M. and T. W. Stone (2002). "Enhanced neuronal damage by co-administration of quinolinic acid and free radicals, and protection by adenosine A2A receptor antagonists." Br J Pharmacol **135**(6): 1435-1442.

Ben-Gigi, L., S. Sweetat, et al. (2015). "Astrogliosis Induced by Brain Injury Is Regulated by Sema4B Phosphorylation." eNeuro **2**(3).

Bender, D. A. (1983). "Biochemistry of tryptophan in health and disease." Mol Aspects Med **6**(2): 101-197.

Bender, D. A. and G. M. McCreanor (1985). "Kynurenine hydroxylase: a potential rate-limiting enzyme in tryptophan metabolism." Biochem Soc Trans **13**(2): 441-443.

Berlinguer-Palmini, R., A. Masi, et al. (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.

Bessede, A., M. Gargaro, et al. (2014). "Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway." Nature **511**(7508): 184-190.

Birch, P. J., C. J. Grossman, et al. (1988). "Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor." Eur J Pharmacol **154**(1): 85-87.

Bitanihirwe, B. K., M. P. Lim, et al. (2009). "Glutamatergic deficits and parvalbumin-containing inhibitory neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia." BMC Psychiatry **9**: 71.

Blanco Ayala, T., R. Lugo Huitron, et al. (2015). "Alternative kynurenic acid synthesis routes studied in the rat cerebellum." Front Cell Neurosci **9**: 178.

Bordelon, Y. M., M. F. Chesselet, et al. (1997). "Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum." J Neurochem **69**(4): 1629-1639.

Buskila, Y., P. P. Breen, et al. (2014). "Extending the viability of acute brain slices." Sci Rep **4**: 5309.

Campesan, S., E. W. Green, et al. (2011). "The kynurenine pathway modulates neurodegeneration in a Drosophila model of Huntington's disease." Curr Biol **21**(11): 961-966.

Canli, T. and K. P. Lesch (2007). "Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition." Nat Neurosci **10**(9): 1103-1109.

Carpenedo, R., A. Pittaluga, et al. (2001). "Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release." Eur J Neurosci **13**(11): 2141-2147.

Chauvel, V., E. Vamos, et al. (2012). "Effect of systemic kynurenine on cortical spreading depression and its modulation by sex hormones in rat." Exp Neurol **236**(2): 207-214.

Chen, J. Y., C. F. Li, et al. (2014). "Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression." Breast Cancer Res **16**(4): 410.

Cho, S., A. Wood, et al. (2007). "Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics." Current Neuropharmacology **5**(1): 19-33.

Choy, F. C., T. S. Klaric, et al. (2015). "The Role of the Neuroprotective Factor Npas4 in Cerebral Ischemia." Int J Mol Sci **16**(12): 29011-29028.

Chuquet, J., P. Quilichini, et al. (2010). "Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex." J Neurosci **30**(45): 15298-15303.

Csillik, A., E. Knyihar, et al. (2002). "Effect of 3-nitropropionic acid on kynurenine aminotransferase in the rat brain." Exp Neurol **177**(1): 233-241.

Davolio, C. and J. T. Greenamyre (1995). "Selective vulnerability of the CA1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid." Neurosci Lett **192**(1): 29-32.

Dobelis, P., K. J. Staley, et al. (2012). "Lack of modulation of nicotinic acetylcholine alpha-7 receptor currents by kynurenic acid in adult hippocampal interneurons." PLoS One **7**(7): e41108.

Donato, R., B. R. Cannon, et al. (2013). "Functions of S100 proteins." Curr Mol Med **13**(1): 24-57.

Dounay, A. B., M. Anderson, et al. (2012). "Discovery of Brain-Penetrant, Irreversible Kynurenine Aminotransferase II Inhibitors for Schizophrenia." ACS Med Chem Lett **3**(3): 187-192.

Dounay, A. B., J. B. Tuttle, et al. (2015). "Challenges and Opportunities in the Discovery of New Therapeutics Targeting the Kynurenine Pathway." J Med Chem **58**(22): 8762-8782.

Dragunow, M., M. Goulding, et al. (1990). "Induction of c-fos mRNA and protein in neurons and glia after traumatic brain injury: pharmacological characterization." Exp Neurol **107**(3): 236-248.

Du, F., W. Schmidt, et al. (1992). "Localization of kynurenine aminotransferase immunoreactivity in the rat hippocampus." J Comp Neurol **321**(3): 477-487.

Edling, Y., M. Ingelman-Sundberg, et al. (2007). "Glutamate activates c-fos in glial cells via a novel mechanism involving the glutamate receptor subtype mGlu5 and the transcriptional repressor DREAM." Glia **55**(3): 328-340.

Erhardt, S., K. Blennow, et al. (2001). "Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia." Neurosci Lett **313**(1-2): 96-98.

Flores-Barrera, E., D. R. Thomases, et al. (2017). "Preferential Disruption of Prefrontal GABAergic Function by Nanomolar Concentrations of the alpha7nACh Negative Modulator Kynurenic Acid." J Neurosci **37**(33): 7921-7929.

Fujigaki, S., K. Saito, et al. (1998). "Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes." Arch Biochem Biophys **358**(2): 329-335.

Fukuda, A., A. Czurko, et al. (1995). "Appearance of deteriorated neurons on regionally different time tables in rat brain thin slices maintained in physiological condition." Neurosci Lett **184**(1): 13-16.

Fukui, S., R. Schwarcz, et al. (1991). "Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism." J Neurochem **56**(6): 2007-2017.

Gellert, L., L. Knapp, et al. (2013). "Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion." Neuroscience **247**: 95-101.

Gigler, G., G. Szenasi, et al. (2007). "Neuroprotective effect of L-kynurenine sulfate administered before focal cerebral ischemia in mice and global cerebral ischemia in gerbils." Eur J Pharmacol **564**(1-3): 116-122.

Gramsbergen, J. B., P. S. Hodgkins, et al. (1997). "Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat." J Neurochem **69**(1): 290-298.

Grunze, H. C., D. G. Rainnie, et al. (1996). "NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition." J Neurosci **16**(6): 2034-2043.

Guidetti, P., L. Amori, et al. (2007a). "Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing enzyme in the mammalian brain." J Neurochem **102**(1): 103-111.

Guidetti, P., G. E. Hoffman, et al. (2007b). "Astrocytic localization of kynurenine aminotransferase II in the rat brain visualized by immunocytochemistry." Glia **55**(1): 78-92.

Guidetti, P., E. Okuno, et al. (1997). "Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II." J Neurosci Res **50**(3): 457-465.

Guillemin, G. J., K. M. Cullen, et al. (2007). "Characterization of the kynurenine pathway in human neurons." J Neurosci **27**(47): 12884-12892.

Guillemin, G. J., S. J. Kerr, et al. (2005). "Involvement of quinolinic acid in AIDS dementia complex." Neurotox Res **7**(1-2): 103-123.

Guillemin, G. J., S. J. Kerr, et al. (2001). "Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection." J Neurochem **78**(4): 842-853.

Hahn, B., C. H. Reneski, et al. (2018). "Prenatal kynurenine treatment in rats causes schizophrenia-like broad monitoring deficits in adulthood." Psychopharmacology (Berl) **235**(3): 651-661.

Han, Q., T. Cai, et al. (2010). "Thermal stability, pH dependence and inhibition of four murine kynurenine aminotransferases." BMC Biochem **11**: 19.

Heizmann, C. W., G. Fritz, et al. (2002). "S100 proteins: structure, functions and pathology." Front Biosci **7**: d1356-1368.

Heredi, J., A. M. Berko, et al. (2017). "Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain." Brain Struct Funct **222**(4): 1663-1672.

Hilmas, C., E. F. Pereira, et al. (2001). "The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications." J Neurosci **21**(19): 7463-7473.

Hodgkins, P. S., H. Q. Wu, et al. (1999). "2-Oxoacids regulate kynurenic acid production in the rat brain: studies in vitro and in vivo." J Neurochem **72**(2): 643-651.

Homayoun, H. and B. Moghaddam (2007). "NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons." J Neurosci **27**(43): 11496-11500.

Hossmann, K. A. (1993). "Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death." Prog Brain Res **96**: 161-177.

Kapoor, R., E. Okuno, et al. (1997). "Immuno-localization of kynurenine aminotransferase (KAT) in the rat medulla and spinal cord." Neuroreport **8**(16): 3619-3623.

Kegel, M. E., M. Bhat, et al. (2014). "Imbalanced kynurenine pathway in schizophrenia." Int J Tryptophan Res **7**: 15-22.

Kim, J. J. and D. M. Diamond (2002). "The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories." Nat Rev Neurosci **3**(6): 453-462.

Kindy, M. S., A. N. Bhat, et al. (1992). "Transient ischemia stimulates glial fibrillary acid protein and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus." Brain Res Mol Brain Res **13**(3): 199-206.

Knyihar-Csillik, E., B. Csillik, et al. (2004). "Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment." Neuroscience **126**(4): 899-914.

Konradsson-Geuken, A., H. Q. Wu, et al. (2010). "Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry." Neuroscience **169**(4): 1848-1859.

Koshy Cherian, A., H. Gritton, et al. (2014). "A systemically-available kynurenine aminotransferase II (KAT II) inhibitor restores nicotine-evoked glutamatergic activity in the cortex of rats." Neuropharmacology **82**: 41-48.

Kovalenko, T., I. Osadchenko, et al. (2006). "Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses." Hippocampus **16**(10): 814-825.

Kozak, R., B. M. Campbell, et al. (2014). "Reduction of brain kynurenic acid improves cognitive function." J Neurosci **34**(32): 10592-10602.

Kreisman, N. R., S. Soliman, et al. (2000). "Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices." J Neurophysiol **83**(2): 1031-1038.

Kruijer, W., J. A. Cooper, et al. (1984). "Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein." Nature **312**(5996): 711-716.

Lein, P. J., C. D. Barnhart, et al. (2011). "Acute hippocampal slice preparation and hippocampal slice cultures." Methods Mol Biol **758**: 115-134.

Leong, W. K., T. S. Klaric, et al. (2013). "Upregulation of the neuronal Per-Arnt-Sim domain protein 4 (Npas4) in the rat corticolimbic system following focal cerebral ischemia." Eur J Neurosci **37**(11): 1875-1884.

Linderholm, K. R., M. T. Alm, et al. (2016). "Inhibition of kynurenine aminotransferase II reduces activity of midbrain dopamine neurons." Neuropharmacology **102**: 42-47.

Linderholm, K. R., E. Skogh, et al. (2012). "Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia." Schizophr Bull **38**(3): 426-432.

Liu, H. M. and H. H. Chen (1994). "c-fos protein expression and ischemic changes in neurons vulnerable to ischemia/hypoxia, correlated with basic fibroblast growth factor immunoreactivity." J Neuropathol Exp Neurol **53**(6): 598-605.

Luchowski, P., E. Luchowska, et al. (2002). "1-Methyl-4-phenylpyridinium and 3-nitropropionic acid diminish cortical synthesis of kynurenic acid via interference with kynurenine aminotransferases in rats." Neurosci Lett **330**(1): 49-52.

Lundgaard, I., B. Li, et al. (2015). "Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism." Nat Commun **6**: 6807.

Maddison, D. C. and F. Giorgini (2015). "The kynurenine pathway and neurodegenerative disease." Semin Cell Dev Biol **40**: 134-141.

Meier, T. B., W. C. Drevets, et al. (2016). "Relationship between neurotoxic kynurenine metabolites and reductions in right medial prefrontal cortical thickness in major depressive disorder." Brain Behav Immun **53**: 39-48.

Miranda, A. F., R. J. Boegman, et al. (1997). "Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid." Neuroscience **78**(4): 967-975.

Mok, M. H., A. C. Fricker, et al. (2009). "Electrophysiological characterisation of the actions of kynurenic acid at ligand-gated ion channels." Neuropharmacology **57**(3): 242-249.

Moroni, F., P. Russi, et al. (1988). "Presence of kynurenic acid in the mammalian brain." J Neurochem **51**(1): 177-180.

Mozes, E., A. Hunya, et al. (2012). "A novel method for the rapid determination of beta-amyloid toxicity on acute hippocampal slices using MTT and LDH assays." Brain Res Bull **87**(6): 521-525.

Nematollahi, A., G. Sun, et al. (2016). "Kynurenine Aminotransferase Isozyme Inhibitors: A Review." Int J Mol Sci **17**(6).

Nemeth, H., J. Toldi, et al. (2005). "Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems." Curr Neurovasc Res **2**(3): 249-260.

Noraberg, J., B. W. Kristensen, et al. (1999). "Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures." Brain Res Brain Res Protoc **3**(3): 278-290.

Ogawa, T., W. R. Matson, et al. (1992). "Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease." Neurology **42**(9): 1702-1706.

Okuno, A., T. Fukuwatari, et al. (2011). "High tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum." J Neurochem **118**(5): 796-805.

Okuno, E., F. Du, et al. (1990). "Purification and characterization of kynurenine-pyruvate aminotransferase from rat kidney and brain." Brain Res **534**(1-2): 37-44.

Opitz, C. A., U. M. Litzenburger, et al. (2011). "An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor." Nature **478**(7368): 197-203.

Pearson, S. J. and G. P. Reynolds (1992). "Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease." Neurosci Lett **144**(1-2): 199-201.

Pellicciari, R., F. Venturoni, et al. (2008). "Sequence variants in kynurenine aminotransferase II (KAT II) orthologs determine different potencies of the inhibitor S-ESBA." ChemMedChem **3**(8): 1199-1202.

Pocivavsek, A., M. A. Thomas, et al. (2014). "Continuous kynurenine administration during the prenatal period, but not during adolescence, causes learning and memory deficits in adult rats." Psychopharmacology (Berl) **231**(14): 2799-2809.

Pocivavsek, A., H. Q. Wu, et al. (2011). "Fluctuations in endogenous kynurenic acid control hippocampal glutamate and memory." Neuropsychopharmacology **36**(11): 2357-2367.

Potter, M. C., G. I. Elmer, et al. (2010). "Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior." Neuropsychopharmacology **35**(8): 1734-1742.

Prescott, C., A. M. Weeks, et al. (2006). "Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses." Neurosci Lett **402**(1-2): 108-112.

Rassoulpour, A., H. Q. Wu, et al. (2005). "Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum." J Neurochem **93**(3): 762-765.

Rejdak, R., T. Zarnowski, et al. (2001). "Presence of kynurenic acid and kynurenine aminotransferases in the inner retina." Neuroreport **12**(17): 3675-3678.

Riebe, I., H. Seth, et al. (2016). "Tonically active NMDA receptors--a signalling mechanism critical for interneuronal excitability in the CA1 stratum radiatum." Eur J Neurosci **43**(2): 169-178.

Rios, C. and A. Santamaria (1991). "Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates." Neurochem Res **16**(10): 1139-1143.

Roberts, R. C., F. Du, et al. (1992). "Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: a light and electron microscopic study." J Comp Neurol **326**(1): 82-90.

Rozsa, E., H. Robotka, et al. (2008). "The Janus-face kynurenic acid." J Neural Transm (Vienna) **115**(8): 1087-1091.

Rubio, N. (1997). "Interferon-gamma induces the expression of immediate early genes c-fos and c-jun in astrocytes." Immunology **91**(4): 560-564.

Rzeski, W., T. Kocki, et al. (2005). "Demonstration of kynurenine aminotransferases I and II and characterization of kynurenic acid synthesis in cultured cerebral cortical neurons." J Neurosci Res **80**(5): 677-682.

Scharfman, H. E., P. S. Hodgkins, et al. (1999). "Quantitative differences in the effects of de novo produced and exogenous kynurenic acid in rat brain slices." Neurosci Lett **274**(2): 111-114.

Schrocksnadel, K., B. Wirleitner, et al. (2006). "Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation." Clin Chim Acta **364**(1-2): 82-90.

Schurr, A. and B. M. Rigor (1993). "Quinolinate potentiates the neurotoxicity of excitatory amino acids in hypoxic neuronal tissue in vitro." Brain Res **617**(1): 76-80.

Schwarcz, R., A. Rassoulpour, et al. (2001). "Increased cortical kynurenate content in schizophrenia." Biol Psychiatry **50**(7): 521-530.

Schwieler, L., S. Erhardt, et al. (2006). "Effects of COX-1 and COX-2 inhibitors on the firing of rat midbrain dopaminergic neurons--possible involvement of endogenous kynurenic acid." Synapse **59**(5): 290-298.

Secci, M. E., A. Auber, et al. (2017). "Attenuating Nicotine Reinforcement and Relapse by Enhancing Endogenous Brain Levels of Kynurenic Acid in Rats and Squirrel Monkeys." Neuropsychopharmacology **42**(8): 1619-1629.

Silva-Adaya, D., V. Perez-De La Cruz, et al. (2011). "Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurenate as a protective strategy." Neurotoxicol Teratol **33**(2): 303-312.

Song, C., S. M. Clark, et al. (2018). "Quantitative Analysis of Kynurenine Aminotransferase II in the Adult Rat Brain Reveals High Expression in Proliferative Zones and Corpus Callosum." Neuroscience **369**: 1-14.

Stone, T. W., N. Stoy, et al. (2013). "An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan." Trends Pharmacol Sci **34**(2): 136-143.

Swartz, K. J., M. J. During, et al. (1990). "Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors." J Neurosci **10**(9): 2965-2973.

Tavares, R. G., C. I. Tasca, et al. (2002). "Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes." Neurochem Int **40**(7): 621-627.

Ting, J. T., T. L. Daigle, et al. (2014). "Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics." Methods Mol Biol **1183**: 221-242.

Turski, W. A., J. B. Gramsbergen, et al. (1989). "Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine." J Neurochem **52**(5): 1629-1636.

Unal-Cevik, I., M. Kilinc, et al. (2004). "Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note." Brain Res **1015**(1-2): 169-174.

Urbanska, E. M., M. Chmielewski, et al. (2000). "Formation of endogenous glutamatergic receptors antagonist kynurenic acid--differences between cortical and spinal cord slices." Brain Res **878**(1-2): 210-212.

Vecsei, L., L. Szalardy, et al. (2013). "Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions." Nat Rev Drug Discov **12**(1): 64-82.

Vohra, M., G. A. Lemieux, et al. (2018). "Kynurenic acid accumulation underlies learning and memory impairment associated with aging." Genes Dev **32**(1): 14-19.

Wang, J., N. Simonavicius, et al. (2006). "Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35." J Biol Chem **281**(31): 22021-22028.

Wang, X. D., F. M. Notarangelo, et al. (2012). "Kynurenic acid and 3-hydroxykynurenine production from D-kynurenine in mice." Brain Res **1455**: 1-9.

Wu, H. Q., P. Guidetti, et al. (2000). "Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus in vivo." Neuroscience **97**(2): 243-251.

Wu, H. Q., M. Okuyama, et al. (2014). "Targeting kynurenine aminotransferase II in psychiatric diseases: promising effects of an orally active enzyme inhibitor." Schizophr Bull **40 Suppl 2**: S152-158.

Wu, H. Q., E. F. Pereira, et al. (2010). "The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex." J Mol Neurosci **40**(1-2): 204-210.

Wu, H. Q., A. Rassoulpour, et al. (2007). "Kynurenic acid leads, dopamine follows: a new case of volume transmission in the brain?" J Neural Transm (Vienna) **114**(1): 33-41.

Yates, C. A. and J. Herbert (1976). "Differential circadian rhythms in pineal and hypothalamic 5-HT induced by artificial photoperiods or melatonin." Nature **262**(5565): 219-220.

Ying, W. (2006). "NAD+ and NADH in cellular functions and cell death." Front Biosci **11**: 3129-3148.

Yu, P., N. A. Di Prospero, et al. (2004). "Biochemical and phenotypic abnormalities in kynurenine aminotransferase II-deficient mice." Mol Cell Biol **24**(16): 6919-6930.

Yu, P., Z. Li, et al. (2006). "Characterization of kynurenine aminotransferase III, a novel member of a phylogenetically conserved KAT family." Gene **365**: 111-118.

Zadori, D., G. Nyiri, et al. (2011). "Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a transgenic mouse model of Huntington's disease." J Neural Transm (Vienna) **118**(6): 865-875.

Zamanian, J. L., L. Xu, et al. (2012). "Genomic analysis of reactive astrogliosis." J Neurosci **32**(18): 6391-6410.

Zhang, S. J., M. Zou, et al. (2009). "Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity." PLoS Genet **5**(8): e1000604.

Zmarowski, A., H. Q. Wu, et al. (2009). "Astrocyte-derived kynurenic acid modulates basal and evoked cortical acetylcholine release." Eur J Neurosci **29**(3): 529-538.

Zwilling, D., S. Y. Huang, et al. (2011). "Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration." Cell **145**(6): 863-874.

12 Összefoglaló

A triptofán (TRP) lebontásának fő metabolikus útvonala az agyszövetben az ún. kinurenin útvonal (KP), amely során számos neuroaktív metabolit képződik, amelyeket közösen kinurenineknek nevezünk. A neuroprotekív stratégiák szempontjából az egyik legfontosabb és leginkább vizsgált KP végtermék a kinurénsav (KYNA).

A KYNA széles spektrumú receptormoduláló hatása ismert. Fő receptor targetjei az agyszövetben az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor és az α7-nikotinos acetilkolin (α7nACh) receptor, melyeken keresztül képes szabályozni az agy glutamát, acetilkolin, GABA, és dopamin szintjét is.

Más KP metabolitokkal együtt, a KYNA abnormális szintjét több neurodegeneratív és neuropszichiátriai megbetegedésben leírták, így a terápiás célú kinurenerg manipuláció intenzíven vizsgált rágcsálókban. A KYNA szintje bizonyos kórképekben csökken (pl. Alzheimer-kór, Huntington-kór), míg más betegségek esetén kórosan megemelkedik (pl. skizofrénia, Down-szindróma), éppen ezért a KYNA termelődés mindkét irányú modulálása potenciális terápiás stratégia lehet.

A KYNA L-kinurenin-ből (L-KYN) keletkezik irreverzibilis transzamináció során. A folyamatot a kinurenin aminotranszferázok (KAT) katalizálják, amelyeknek négy izoformája ismert (KAT-1-4). Az ember agyszövetében a KAT-2 a fő KYNA szintetizáló enzim, így a KYNA termelődés kísérletes modulálása során a KAT-2-es izoforma a vizsgálatok fő célpontja. A KYNA szintézise, patkányokon végzett szövettani kísérletek alapján, asztrocita sejtekben zajlik, a KAT-2 neuronális jelenlétét csak szórványosan detektálták bizonyos agyterületeken.

A KYNA termelődés genetikai és farmakológiai manipulációja széles körben vizsgált. A KAT-2 funkció genetikai módosítását leggyakrabban egerekben végzik. A kat-2 transzgenikus állatok limitációja azonban, hogy a kat-2 deléció az egész szervezetet érinti, így a vizsgálatok során a perifériás KYNA funkció is érintett. **A folyamat idegszövet vagy akár sejttípus specifikus vizsgálata ilyen módon csak akkor lehetséges, ha a KAT-2 expressziós mintázata ismert az egér agyszövetben is**. **Az enzim expressziós profilja, illetve pontos funkciója azonban nem tisztázott egér központi idegrendszerben**.

Az L-KYN könnyen átjut a vér-agy gáton (BBB), míg a KYNA penetrációja gyenge, így a KYNA szint növelésének egyik legegyszerűbb farmakológiai módja az L-KYN alkalmazása, ami korábbi tanulmányok alapján jelentős KYNA szint növekedést eredményez az agyszövetben *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Az *in vitro*, akut agyszelet preparátumok előnye,

hogy segítségükkel a kinurenerg manipuláció szövet specifikusan, a perifériás KYNA funkció befolyásolása nélkül vizsgálható. **Míg patkány akut agyszeletekben igazolt, hogy a szeletek intenzív KYNA termelésre és annak felszabadítására képesek, egér akut agyszeletek esetén nincs adat sem a bazális, sem az L-KYN indukálta KYNA termelésről.**

A KYNA termelődés csökkentésének vagy növelésének további lehetséges farmakológiai módja a KP enzimeinek gátlása. A KYNA szint növelhető a kinurenin monooxigenáz (KMO) gátlása révén, ami főként Alzheimer-kór és Huntington-kór modellekben vizsgált. Ezzel szemben jelentős KYNA szint csökkenés érhető el KAT-2 specifikus gátlószerekkel, amelyek a kognitív károsodások terápiás kezelése céljából vizsgáltak. **A KAT-2 enzim gátlás hatása egerekben nem vizsgált, a KAT-2 egér agyszövetben feltételezett kis szerepe miatt.**

A terápiás stratégiák hatékonyságát nehezítik a kinurenin rendszerbeli eltérések a különböző laboratóriumi fajok között. A KYNA szintézisében résztvevő KAT izoformáknak például eltérő szerepük lehet a fajokban. Az ember és patkány agyban a KAT-2 a fő KYNA szintetizáló enzim, míg egér esetén kérdéses a KAT-2 funkciója. **Éppen ezért célszerű a kinurenin rendszer karakterizálása és a különbségek tisztázása a különböző modell állatokban a hatékony terápiás kinurenerg manipulációkhoz.**

Kísérleteink során, a KAT-2 expressziójának és funkciójának tisztázása céljából a KYNA termelődés anatómiai és funkcionális karakterizálását végeztük felnőtt egér agyszövetben.

Elsőként a *kat-2* mRNS és KAT-2 enzim lokalizációját vizsgáltuk különböző egér agyi struktúrákban RNS *in situ* hibridizációval és immunhisztokémiai festésekkel. Korábbi patkányokon végzett kísérletekkel megegyezően, mRNS és fehérje szinten is jelentős volt a KAT-2 gliális lokalizációja az egér agy egész területén. Az asztrociták mellett azonban kifejezett volt az enzim neuronális jelenléte is. A neuronok nagy része GABAerg gátló idegsejt volt, a substantia nigra pars compactát kivéve, minden vizsgált agyterületen.

A KAT-2 gliális és neuronális jelenlétét elsőként írtuk le egér agyszövetben, továbbá elsőként azonosítottuk a KAT-2^{+} neuronok GABAerg jellegét rágcsálókban. A két sejtpopuláció fiziológiás és patológiás KYNA termelésben betöltött szerepe eltérhet, ennek vizsgálata fontos a jövőben.

A funkcionális vizsgálatok során egy általunk kifejlesztett *in vitro* inkubációs rendszert használtunk, ahol az agyszeletek kis térfogatú mesterséges agy-gerincvelői folyadékban (ACSF) inkubálódtak. Ezért először a rendszerben inkubálódó akut agyszelet preparátumok strukturális és funkcionális integritását teszteltük 4 órás inkubációt követően anatómiai, biokémiai és elektrofiziológia módszerekkel. Habár az agyszövetben egy megváltozott asztrocita és neuron funkciót detektáltunk, az agyszeletek metabolikusan aktívak voltak,

illetve anatómiai és funkcionális integritásuk nagymértékben megőrzött volt 4 órás inkubációt követően is. Mindezek alapján a rendszerünk alkalmasnak bizonyult további farmakológia vizsgálatok elvégzésére.

Az akut agyszelet preparátumok életképességének vizsgálatát követően, a bazális és L-KYN indukálta KYNA termelődést és megoszlást vizsgáltuk. Az egér agyszeletek intenzív KYNA termelésre és annak felszabadítására képesek. A termelődött KYNA nagy része kijut az extracelluláris térbe és csak kis hányada marad a szövetben bazális körülmények között és L-KYN adminisztráció által meghajtott szeletekben egyaránt.

Végül egy specifikus KAT-2 gátlószer KYNA termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A gátlószer közel 40%-kal csökkentette az L-KYN indukálta KYNA termelődést az egér agyszövetben.

A funkcionális vizsgálatokat összegezve elmondható, hogy az *in vitro* inkubációs rendszerünkben az akut agyszelet preparátumok integritása nagymértékben megtartott több órás inkubáció után is, így kísérleteink során az ACSF-ben mért KYNA mennyiség nem egyszerűen a szöveti degradáció eredménye. Továbbá, elsőként vizsgáltuk a KYNA termelődést egér akut agyszeletekben, amelyek eredményeink alapján jelentős KYNA termelésre és annak felszabadítására képesek. A folyamat nagymértékben gátolható egy szelektív KAT-2 enzim gátlóval, így a KAT-2 izoformának jelentős szerepe lehet a KYNA szintézisében egér agyszövetben esetén is. A KAT-2 pontos szerepének, illetve a KYNA termelődés és felszabadulás mechanizmusának tisztázására azonban további vizsgálatok szükségesek *in vitro* és *in vivo* egyaránt.

Összességében elmondható, hogy az általunk végzett anatómiai és funkcionális vizsgálatok, illetve azok eredményei a KYNA termelődés folyamatáról egér agyszövet esetén hiánypótolóak a szakirodalomban, és nagyban segíthetik a jövőbeni kinurenerg manipulációs kísérleteket.

13 Summary

Kynurenine pathway (KP) is the main metabolic route of tryptophan (TRP) degradation in the mammalian brain which leading to the production of several neuroactive metabolites. One of the KP end products, kynurenic acid (KYNA) is widely studied as a neuromodulator and neuroprotective agent in the central nervous system (CNS).

KYNA has a broad-spectrum receptor modulatory effect both on ionotropic and metabotropic receptors. The main targets of KYNA in the brain are the N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the α7 nicotinic acetylcholine (α7nACh) receptors, through which KYNA can modulate the level of glutamate, acetylcholine, GABA and also dopamine in the CNS.

Along with other metabolites, KYNA has been implicated in several brain disorders, so manipulation of the KP has high therapeutic potential. Decreased KYNA level has been observed in neurodegenerative disorders such as Huntington's and Parkinson's disease, while in disorders where cognitive functions are impaired -e.g. schizophrenia- KYNA is abnormally increased. Therefore both up and down regulation of KYNA production could serve as a potential therapeutical strategy.

KYNA is produced from L-kynurenine (L-KYN) by the action of kynurenine aminotransferases (KAT). So far, four KAT isoforms (KAT-1-4) have been identified from which KAT-2 is considered to be the major biosynthetic enzyme of KYNA in the human brain. Therefore studies investigating KYNA production are focusing on KAT-2 in rodents. The prevailing view about KAT-2 presence and KYNA production based on immunohistochemical studies carried out on rats that it is localized in astrocytes and KYNA is released mainly by this cell type in the brain. Neuronal expression of the enzyme was only sporadic through the rat brain.

The pharmacological and genetic manipulation of KYNA production has been widely studied in rodents. Although the effect of genetic manipulations of the KYN pathway has been described in mice, the kat-2 knock-out model suffers from the general limitations of the null-mutant models in which peripheral KYNA function is also influenced. **To investigate tissue- and cell-type-specific function of KAT-2, one needs spatio-temporally selective kynurenergic manipulation, which is possible only if the expression profile of KAT-2 is well described in the wild-type animal. However, we have little information regarding the expression and function of KAT-2 in mice.**

While L-KYN readily pass through the blood brain barrier (BBB) kynurenic acid has a very limited ability to penetrate the BBB. So the easiest pharmacological tool to increase brain

KYNA level is the administration of L-KYN, which resulted in a significant elevation of KYNA both *in vitro* and *in vivo.* The advantage of using acute brain slice preparations is that kynurenergic manipulation can be studied in a tissue specific manner without affecting the peripheral KYNA function. **Previously KYNA production and release to the extracellular compartment upon L-KYN exposure was described in acute rat brain slices. However, there is no data about the basal and L-KYN induced KYNA production of acute mouse brain slice preparations.**

Inhibiting KP enzymes is another promising tool to decrease or increase KYNA production with the aim of therapy. Shifting the KP toward KYNA synthesis with kynurenine 3-monooxygenase (KMO) inhibition studied in brain disease models like Alzheimer's or Huntington's disease, while lowering KYNA level with selective KAT-2 inhibitors improves cognitive function under conditions considered relevant for schizophrenia. **No pharmacological experiment has yet targeted the mouse KAT-2 function, probably because of its proposed irrelevance in the mouse species.**

Complicating therapeutical KP manipulation that there are prominent differences among mammalian species regarding the kynurenine system. For example, the KYNA synthesizing enzyme isoforms have a different role in different species. In the human and rat brain KAT-2 plays the major role in KYNA production, whereas in mice KAT-2 function is questionable. **Therefore comparative characterization of the kynurenine catabolism in different model species is essential before assigning therapeutical kynurenergic manipulation strategies in humans.**

During our experiments we performed the anatomical and functional characterization of KYNA production with the aim of clarifying KAT-2 enzyme expression and function in the mouse brain.

First we examined the kat-2 mRNA and KAT-2 protein localization in the mouse brain tissue with RNA *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Similar to previous observations achieved in rats, glial presence of KAT-2 was significant both at the mRNA and protein level in several brain areas. However, neuronal expression of KAT-2 was also pronounced throughout the mouse brain. The vast majority of these neurons were identified as GABAergic cells in the examined brain areas.

We demonstrated for the first time that KAT-2 is localized both in astrocytes and neurons in the adult mouse brain. Furthermore we identified the GABAerg nature of KAT-2 containing neurons. Astrocytes and neurons may have a distinctive role in KYNA production in health and disease, which should be investigated in the future.

During the functional studies we used a custom made *in vitro* incubation system, where the brain slices were incubated in a small volume of artificial cerebrospinal fluid (ACSF). Therefore we first tested the structural and functional integrity of brain slices in our system after 4 hour incubation time. We performed anatomical, biochemical and electrophysiological experiments. Although, we detected mild alteration in glial and neuronal function, brain slices remained metabolically active and brain tissue integrity were mainly preserved for further pharmacological experiments.

Following the characterization of the after-incubation state of the brain slices, we investigated the basal and L-KYN induced KYNA production and distribution of KYNA between the ACSF and the tissue. Mouse brain slices intensively produce and liberate KYNA to the extracellular compartment, while only a small proportion retained in the tissue both in the basal and L-KYN supplemented state.

Finally, we evaluated the effect of specific KAT-2 inhibition with the irreversible inhibitor PF-04859989. The inhibitor reduced extracellular KYNA content by almost 40% in the ACSF.

Summarize the functional experiments, brain tissue integrity remained sufficient to exclude that the observed KYNA release is a simple consequence of general cell degradation in our incubation system. For the first time in the literature we proved that the mouse brain tissue intensively produces and liberates KYNA into the extracellular milieu. Furthermore, KAT-2 inhibition significantly attenuates KYNA production, which indicates an important role of KAT-2 isoform in the mouse brain tissue as well. Further *in vivo* and *in vitro* experiments are needed to clarify the precise role of KAT-2 and the mechanism of KYNA production and release in the mouse brain.

Taken together we can conclude that our anatomical and functional results regarding the KYNA production in the mouse brain are filling a research gap in the literature and support future pharmacological and genetic kynurenergic manipulation studies in mice.

Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10040635

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain
Heredi J, Berko AM, Jankovics F, Iwamori T, Iwamori N, Ono E, Horvath S, Kis Z, Toldi J, Vecsei L, Gellert L
BRAIN STRUCTURE & FUNCTION 222:(4) pp. 1663-1672. (2017) DOI: 10.1007/s00429-016-1299-5
IF: 5,811

Kynurenine aminotransferase-2 inhibition attenuates kynurenine evoked kynurenic acid production of acute mouse brain slices
Herédi J, Cseh E, Berko AM, Veres G, Zádori D, Toldi J, Kis Z, Vecsei L, Ono E, Gellért L
(közlés alatt)

Egyéb közlemények:

Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia
J. Fuzik, L. Gellért, G. Oláh, **J. Herédi**, K. Kocsis, L. Knapp, D. Nagy, T. Kincses, Z. Kis, T. Farkas, J. Toldi, Neuroscience2013 Jan 3;228:371-81, **IF: 3,327**

Post-ischemic treatment with L-kynurenine sulfate exacerbates neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion
L. Gellért; L. Knapp; K. Németh; **J. Herédi**; D. Varga; G. Oláh; K. Kocsis; Á. Menyhárt; T. Farkas; Zs. Kis; L. Vécsei; J. Toldi, Neuroscience2013 Sep 5;247:95-101., **IF: 3,327**

Unexpected effects of peripherally administered kynurenic acid on cortical spreading depression and related blood-brain barrier permeability.
G. Oláh; **J. Herédi**; Á. Menyhárt; Zs. Czinege; D. Nagy; J. Fuzik; K. Kocsis; L. Knapp; E. Krucsó; L. Gellért; Zs. Kis; T. Farkas; F. Fülöp; Á. Párdutz; J. Tajti; L. Vécsei; J. Toldi
Drug Design, Development and Therapy 2013 Sep 16;7:981-7., **IF:3,026**

A simple novel technique to induce short-lasting local brain ischemia in the rat
Knapp L., Gellért L. , **Herédi J.**, Kocsis K., Oláh G., Fuzik J., Kis Zs. , Vécsei L. and Toldi J. Farkas T.
Neuropathology and Applied Neurobiology 2013 Jun 24., DOI: 10.1111/nan.12069, **IF.: 4,970**

Systemic L-Kynurenine sulphate administration disrupts object recognition memory, alters openfield behavior and decreases c-Fos immunopositivity in C57Bl/6 mice
D. Varga, **J. Herédi**, Z. Kánvási, M. Ruszka, Zs. Kis, E. Ono, N. Iwamori, T. Iwamori, H. Takakuwa, L.Vécsei, J. Toldi, L. Gellért
Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2015 Jun 16;9:157. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00157. eCollection 2015. **IF.:3,104**