

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

A kinurenin-aminotranszferáz-2 enzim neuroanatómiai vizsgálata egér agyszövetben, fizioiógiás és patológiás állapotban

Doktori (PhD) értekezés

Jenei Gyula

Témavezető:

Dr. Kis Zsolt

egyetemi adjunktus

2026

Szeged

1 Tartalomjegyzék

1 Tartalomjegyzék.....	2
2 Rövidítések jegyzéke	4
3 Bevezetés	6
3.1 A kinurenin útvonal.....	6
3.2 A KYNA receptormoduláló hatásai	8
3.3 A KYNA szerepe patológias folyamatokban	10
3.4 A KAT izoenzimek.....	12
3.5 A KAT-2 terápiás jelentősége.....	14
3.6 A KAT-2 expressziója emlős agyszövetben	18
3.7 Parkinson-kór toxinmodell	19
4 Célkitűzések	22
5 Anyagok és módszerek.....	23
5.1 Állatok	23
5.2 <i>In vitro</i> kísérletsorozat	23
5.2.1 Primer sejtenyészetek előállítása.....	23
5.2.2 Fluoreszcens immuncitokémia	24
5.2.3 Képrögzítés és mintavétel	25
5.2.4 Képanalízis és kolokalizációs paraméterek	25
5.2.5 Statisztikai analízis	26
5.3 <i>In situ</i> és <i>in vivo</i> kísérletsorozat	26
5.3.1 Agyszövet preparálás.....	26
5.3.2 Fluoreszcens immunhisztokémia.....	27
5.3.3 Képrögzítés.....	27
5.3.4 MPTP kezelés.....	27
5.3.5 Képrögzítés és mintavétel az SNc területén	28
5.3.6 Kvantitatív képanalízis	28
5.3.7 Statisztikai analízis	28
6 A kísérletekben való részvétel.....	29
7 Eredmények	30
7.1 KAT-2 fehérje expresszió primer sejtenyészetekben	30
7.1.1 KAT-2 expresszió primer asztrocita tenyészetben	30
7.1.2 KAT-2 expresszió primer mikroglia tenyészetben.....	31
7.1.3 KAT-2 expresszió primer neuron tenyészetben	32

7.1.4 Kvantitatív kolokalizációs analízis.....	33
7.1.5 KAT-2 immunreaktivitás sejtszintű eloszlása.....	36
7.2 KAT-2 fehérje expresszió az előagy területén.....	37
7.2.1 A KAT-2 expresszió regionális eloszlása az előagyban.....	37
7.2.2 A KAT-2 sejtípus-specifikus expressziója az előagyban	38
7.3 KAT-2 fehérje expresszió a kisagy területén.....	41
7.3.1 A KAT-2 expresszió rétegspecifikus eloszlása a kisagyban	41
7.3.2 KAT-2 expresszió neuronokban.....	43
7.3.3 KAT-2 expresszió gliasejtekben	44
7.4 KAT-2 pozitív neuronpopulációk azonosítása	46
7.4.1 GABAerg neuronok	46
7.4.2 Kolinerg interneuronok	49
7.4.3 Dopaminerg neuronok.....	50
7.5 KAT-2 expresszió vizsgálata Parkinson-kór egérmodellben.....	51
7.5.1 A TH és KAT-2 immunreaktivitás változásai az SNc területén	51
7.5.2 A dopaminerg neuronvesztés kvantitatív analízise	53
7.5.3 A KAT-2 expresszió változásai dopaminerg neuronvesztés során.....	54
7.5.4 A TH és KAT-2 immunreaktivitás kvantitatív összehasonlítása	56
8 Diskusszió	58
8.1 A KAT-2 expresszió <i>in vitro</i> vizsgálata.....	58
8.2 A KAT-2 expresszió <i>in situ</i> vizsgálata.....	60
8.2.1 A KAT-2 regionális és sejtípus-specifikus eloszlása egér előagyban	60
8.2.2 A KAT-2 regionális és sejtípus-specifikus eloszlása egér kisagyban.....	62
8.3 KAT-2 pozitív neuronpopulációk azonosítása	64
8.3.1 GABAerg neuronok	64
8.3.2 Kolinerg neuronok.....	67
8.3.3 Dopaminerg neuronok.....	68
8.4 A KAT-2 expressziója Parkinson-kór egérmodellben	69
9 Következtetések	71
10 Köszönetnyilvánítás	73
11 Irodalomjegyzék.....	74
12 Összefoglaló.....	90
13 Summary	94
14 Tudományos közlemények listája	98
15 Függelék.....	100

2 Rövidítések jegyzéke

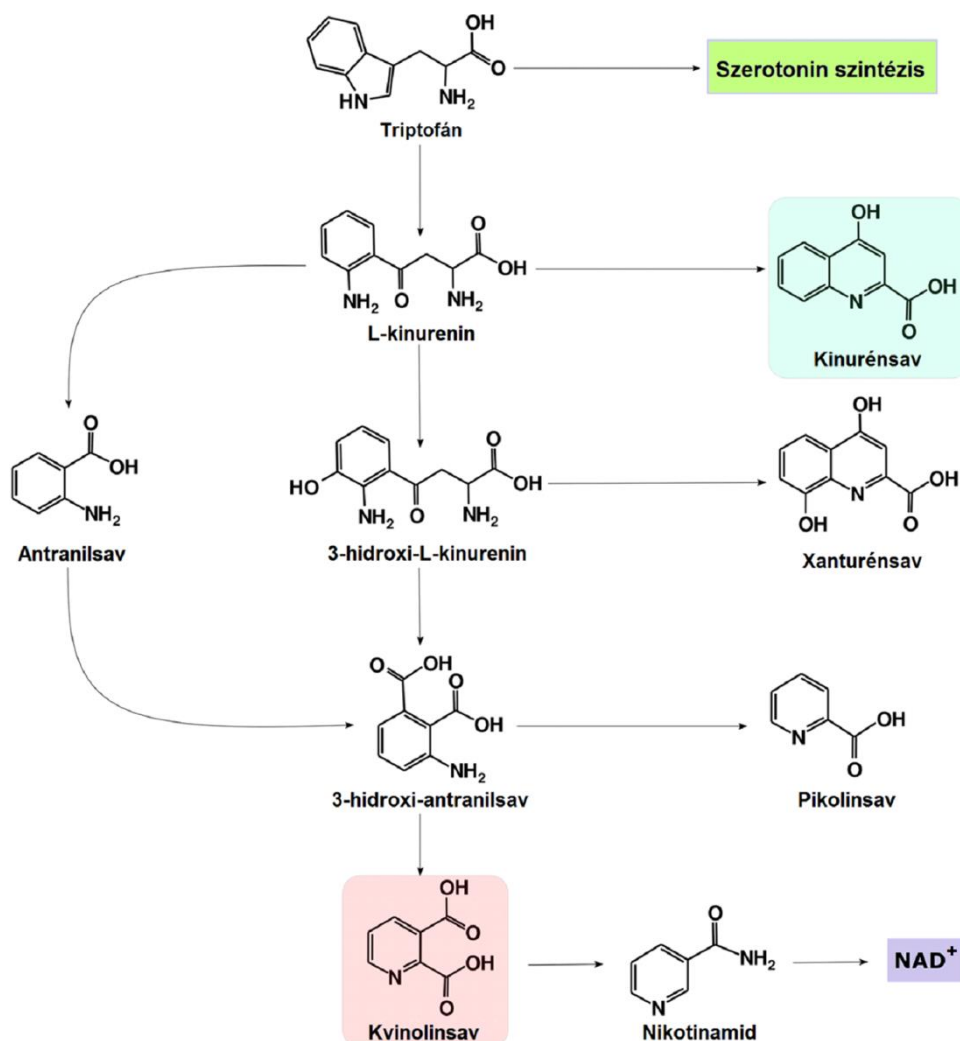
3-HANA:	3-hidroxi-antranilsav
3-HK:	3-hidroxi-L-kinurenin
6-OHDA:	6-hidroxidopamin
AhR:	aril-hidrokarbon receptor
AMPA:	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav
ANA:	antranilsav
ATP:	adenozin-5'-trifoszfát
BSA:	szarvasmarha szérumalbumin
DAAO:	D-aminosav-oxidáz
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAT:	dopamin-transzporter
DMEM:	Dulbecco módosított Eagle médiuma
FBS:	magzati marhaszérum
GABA:	gamma-aminovajsav
GAD67:	glutamát-dekarboxiláz (67 kDa)
GLUT-R:	glutamát receptor
GPR35:	G-protein-kapcsolt receptor 35
IDO:	indolamin-2,3-dioxigenáz
KAR:	kainát receptor
KAT:	kinurenin-aminotranszferáz
KAT-2:	kinurenin-aminotranszferáz-2
KMO:	kinurenin-3-monooxygenáz
KYNA:	kinurénsav
L-KYN:	L-kinurenin
MAO-B:	monoamin-oxidáz-B
MPDP ⁺ :	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridínium-ion
MPP ⁺ :	1-metil-4-fenilpiridínium-ion
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

NAD ⁺ :	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NDS:	normál számárszérum
NMDA:	N-metil-D-aszpartát
NMDAR:	N-metil-D-aszpartát receptor
PB:	foszfátpuffer
PBT:	Triton X-100 tartalmú foszfátpuffer
PFA:	paraformaldehid
PLP:	piridoxál-5'-foszfát
PMP:	piridoxamin-5'-foszfát
QUIN:	kvinolinsav
ROI:	region of interest
ROS:	reaktív oxigén származékok
SDH:	szukcinát-dehidrogenáz
SNC:	substantia nigra pars compacta
SNr:	substantia nigra pars reticulata
TDO:	triptofán-2,3-dioxigenáz
TH:	tirozin-hidroxiláz
Trp:	triptofán
TX100:	Triton X-100
α7nAChR:	alfa-7 nikotinos acetilkolin receptor

3 Bevezetés

3.1 A kinurenin útvonal

A triptofán (Trp) a húsféle proteinogén aminosav egyike, amely nemcsak a fehérjeszintézishez nélkülözhetetlen, hanem számos biológiailag aktív molekula prekursoraként is kiemelt szerepet tölt be. A Trp sorsa az emlősökben két anyagcsereirány között dől el: a szerotonin és a kinurenin útvonal között (Li és mtsai. 2017). Bár a jól ismert szerotonin útvonal felelős a szerotonin neurotranszmitter és a melatonin hormon képződéséért, egészséges szervezetben a Trp-anyagcsere mindössze ~5%-át teszi ki. Ezzel szemben az emlős agyban a Trp oxidatív lebontásának túlnyomó többsége, mintegy 95%-a a kinurenin útvonalon zajlik (Badawy 2017; Bender 1983), amelynek metabolitjait összefoglalóan kinurenineknek nevezzük (1. ábra).



1. ábra: A triptofán metabolizmusának kinurenin útvonala, a keletkező főbb kinurenin metabolitok feltüntetésével. (Savitz 2020 nyomán módosítva)

Az útvonal első lépéseként a Trp indolgyűrűje felnyílik, és létrejön az N-formil-kinurenin. Ezt a reakciót agyszövetben az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO), perifériás szövetekben pedig elsősorban a triptofán-2,3-dioxigenáz (TDO) enzim katalizálja. A keletkező N-formil-kinurenin a formamidáz enzim által L-kinureninné (L-KYN) alakul át. Az L-KYN az útvonal központi elágazási pontja, mivel három különböző enzim szubsztrátjaként szolgál a további kinureninek képződéséhez. Az L-KYN mikromólos koncentrációban megtalálható az agyszövetben, a perifériás szervekben és a vérben is. Szintézise elsősorban a májban és a vesékben történik; az agyszövetbe jutó L-KYN mennyiség mintegy 60%-a perifériás eredetű, csupán 40%-a szintetizálódik lokálisan (Gál és Sherman 1978). Az L1-típusú semleges aminosav transzporterek révén hatékonyan lépi át a vér-agy gátat (Smith és mtsai. 1987; Speciale és mtsai. 1989), míg a többi kinurenin esetében az átjutás meglehetősen korlátozott, és többnyire csak alacsony hatékonyságú passzív diffúzióval valósulhat meg (Fukui és mtsai. 1991).

Az L-KYN metabolizmusának három fő ága különíthető el (Robotka és mtsai. 2008). Az első ágon antranilsav (ANA), 3-hidroxi-antranilsav (3-HANA), végül kvinolinsav (QUIN) képződik. A QUIN az agyszövetben patológiás koncentrációban felhalmozódva az N-metil-D-aszpartát receptorok (NMDAR) túlzott aktivációján keresztül neurotoxikus hatást fejt ki (Garthwaite és Garthwaite 1987; Lugo-Huitrón és mtsai. 2013). A QUIN tovább alakulhat nikotinamid-mononukleotiddá, amelyből az elektronszállításban kulcsfontosságú nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) kofaktor képződik. A második ágon 3-hidroxi-L-kinurenin (3-HK), majd xanturénsav keletkezik. A 3-HK szintén neurotoxikus hatású lehet a reaktív oxigén származékok (ROS) képzése és az oxidatív stressz növelése által (Okuda és mtsai. 1998). A harmadik ágon a kinurenin-aminotranszferáz (KAT) enzimek irreverzibilis transzaminációval kinurénsavat (KYNA) állítanak elő **(részleteiben lásd 3.4 fejezet)**. Az L-KYN metabolizmusának elágazása, amely egyszerre vezet neurotoxikus (pl. QUIN, 3-HK) és neuroprotektív (KYNA) metabolitok képződéséhez, meghatározó szerepet játszik a központi idegrendszeri működések finomhangolásában és az ingerületátvitel modulációjában.

A kinurenin útvonal a Trp domináns lebontási útvonalként egyre nagyobb figyelmet kap a neurodegeneratív betegségek, a neuropszichiátriai kórképek és a gyulladásos folyamatok patomechanizmusában betöltött szerepe miatt. Mivel a kinureninek egy része neurotoxikus, más metabolitok kifejezetten neuroprotektív hatással bírnak, az útvonalon belüli egyensúly megőrzése alapvető a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában.

3.2 A KYNA receptormoduláló hatásai

A KYNA elsőként 1853-ban került izolálásra kutya vizeletből (Liebig 1853). Ezt követően több mint egy évszázadon át úgy vélték, hogy kizárólag a periférián van jelen; a központi idegrendszerben csak az 1980-as években mutatták ki. Posztmortem humán agyszövet nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás analízise során több agyterületen is meghatározták a KYNA mennyiségét: a legnagyobb koncentrációt a nucleus caudatusban mérték, de jelen volt a hippokampusz, a talamusz, a globus pallidus és a nagyagykéreg területén is, továbbá alacsonyabb koncentrációban a kisagyban is (Turski és mtsai. 1988).

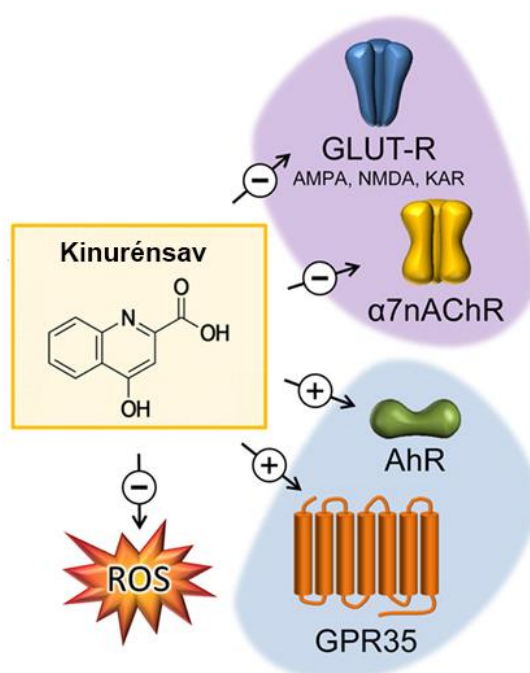
A humán agyszövetben történő kimutatását követően rövidesen leírták, hogy a KYNA az egyetlen endogén antagonistája az NMDAR-oknak (Birch és mtsai. 1988). Hamarosan ismertté vált, hogy az excitotoxicitás által kiváltott neurodegenerációban az NMDAR-ok kulcsfontosságú szerepet töltenek be (Olney 1989). A KYNA az NMDAR-ok sztrichnin-inszenzitív glicin kötőhelyéhez kötődve képes gátolni ezek működését (Kessler és mtsai. 1989). A KYNA receptormoduláló hatása miatt egyedülálló a központi idegrendszerben, mivel máig ez az egyetlen ismert endogén metabolit, amely képes az NMDAR-ok funkcionális gátlása által az excitotoxicitás megelőzésére. Ennek következtében a KYNA a glutamáterg neurotranszmisszió természetes, belső szabályozójaként tekinthető, amely fiziológias körülmények között is hozzájárulhat a neuronális túlaktiválás elleni védelemhez. Egyedülálló hatásmechanizmusa miatt a KYNA azóta is kiemelt figyelmet kap a neurodegeneratív betegségek kutatásában, mint potenciális endogén neuroprotektív metabolit (Shepard és mtsai. 2003; Bagasrawala és mtsai. 2016; Jorratt és mtsai. 2021).

Számos vizsgálat igazolta, hogy a KYNA az NMDAR-ok mellett egyéb ionotróp és metabotróp receptorokat is képes modulálni a központi idegrendszerben. Az α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav (AMPA) receptorokra gyakorolt hatása koncentrációfüggő: a lokális KYNA alacsony (nanomólos) koncentrációban agonista, míg magasabb (mikromólos) koncentrációban antagonistá hatást fejt ki (Prescott és mtsai. 2006; Rózsa és mtsai. 2008). A kainát receptorokon (KAR) magasabb koncentrációban kompetitív antagonistaként hat (Bertolino és mtsai. 1989). Endogén ligandja a G-protein-kapcsolt receptor 35-nek (GPR35) is, amely asztrocitákban és neuronokban egyaránt expresszálódik (Alkondon és mtsai. 2015; Berlinguer-Palmini és mtsai. 2013; Wang és mtsai. 2006).

Leírták, hogy a KYNA alfa-7 nikotinos acetilkolin receptorokon ($\alpha 7$ nAChR) antagonistista hatást fejt ki (Hilmas és mtsai. 2001), egyes újabb tanulmányok azonban a közvetett moduláció lehetőségét vetik fel, vitatva ennek jelentőségét (Stone 2020).

A KYNA képes aktiválni az aril-hidrokarbon receptort (AhR) is. Ez a ligand-aktivált transzkripció faktor a sejtvédelem, a gyulladás és a sejt differenciáció szabályozásában vesz részt (Gutiérrez-Vázquez és Quintana 2018). *In vitro* kísérletekben a KYNA már nanomoláris koncentrációban is aktiválta a humán AhR-t (DiNatale és mtsai. 2010). AhR-nullmutáns egerekben emelkedett KYNA-szintet mértek a striátumban és a nagyagykéregben, amelyet a KAT-2 expresszió fokozódása kísért (García-Lara és mtsai. 2015). Az AhR hiánya így közvetve növeli az endogén KYNA-termelődést, ami fokozott neuroprotektív hatással jár. QUIN intrastriatális adagolása a nullmutáns egerekben kisebb excitotoxikus szöveti károsodást és oxidatív stresszt, valamint jobb motoros teljesítményt eredményezett a vad típusú állatokhoz képest. A KYNA és az AhR közötti kapcsolat tehát kétirányú, hiszen a KYNA közvetlenül aktiválja az AhR-t, az AhR hiánya pedig fokozhatja a KYNA-szintézist.

A KYNA tehát számos módon képes hatást kifejteni (**2. ábra**), ezáltal modulálja a glutamáterg, GABAerg, kolinerg és dopaminerg neurotranszmissziót, valamint a szinaptikus plaszticitást és a kognitív folyamatokat is (Schwarcz és Erhardt 2020).



2. ábra: A KYNA jelentősebb központi idegrendszeri hatásmechanizmusainak sematikus összefoglalása. Nem-kompetitív antagonistista az ionotróp glutamát receptorokon (GLUT-R) és az $\alpha 7$ nAChR-okon, agonistaként hat a GPR35-re és az AhR-ra, valamint képes semlegesíteni a ROS-t. (Wirthgen és mtsai. 2017 nyomán módosítva)

3.3 A KYNA szerepe patológiás folyamatokban

A központi idegrendszerben a KYNA szintjének drasztikus megváltozása – akár csökkenés, akár emelkedés irányába – számos neurodegeneratív és neuropszichiátriai kórkép patomechanizmusában szerepet játszhat. A KYNA bioszintézisét szabályozó enzimek aktivitásának megváltozása közvetlenül befolyásolja a KYNA koncentrációját. A kinurenin útvonal finomhangolása ezért kritikus szabályozási pontként szolgálhat azokban a neurokémiai folyamatokban, amelyek kóros KYNA-szintek kialakulásához vezetnek a központi idegrendszerben.

Több neurodegeneratív kórképben is igazolták a KYNA-szint kóros mértékű csökkenését. A Parkinson-kór kiemelt jelentőségű e tekintetben, mivel számos tanulmány következetesen igazolja a kinurenin útvonal több szintjét érintő, komplex metabolikus átrendeződést. Egy korai posztmortem humán vizsgálatban szignifikánsan csökkent KYNA-szintet mutattak ki a prefrontális kéreg, a putamen és a substantia nigra pars compacta (SNc) területén (Ogawa és mtsai. 1992). Egy újabb klinikai vizsgálat alapján Parkinson-kórban a KYNA koncentrációja jelentősen lecsökken a cerebrospinalis folyadékban, miközben az agyi L-KYN-felvétel változatlan marad (Sorgdrager és mtsai. 2019). Ez arra utal, hogy a KYNA-hiány nem a prekursor agyi bejutásának elégtelenségéből, hanem a KYNA-szintézis enzimátikus folyamatainak károsodásából ered. A jelenséget preklinikai állatmodellekben is megfigyelték: patkányokban és egerekben a KYNA-szint csökkenése a KAT enzimek aktivitásának mérséklődésével párhuzamosan jelentkezett (Luchowski és mtsai. 2002; Knyihár-Csillik és mtsai. 2004).

Huntington-kórban a KYNA koncentrációja szintén alacsonyabb cerebrospinalis folyadékban (Beal és mtsai. 1990; Heyes és mtsai. 1992), valamint az agykéregben és a striátumban is (Beal és mtsai. 1992). A putamenben kimutatott csökkent KAT-1 és KAT-2 aktivitás tovább erősíti a KYNA-hiány patobiológiai jelentőségét ebben a betegségben (Jauch és mtsai. 1995). Alzheimer-kórban és sclerosis multiplexben szintén alacsonyabb KYNA-szinteket írtak le az agy-gerincvelői folyadékban (Heyes és mtsai. 1992; Rejdak és mtsai. 2002).

Kísérletes adatok igazolják, hogy a KYNA-szint célzott emelése hatékonyan képes ellensúlyozni különböző neurotoxikus folyamatokat. Patkány Parkinson-kór modellben az endogén KYNA-szint emelése jelentős neuroprotektív hatást fejtett ki: csökkent a dopaminerg neurodegeneráció, megőrződtek a striatális dopaminszintek, és mérséklődött a motoros működés zavarainak súlyossága (Silva-Adaya és mtsai. 2011).

Egy másik patkány Parkinson-kór modellben a KYNA-szint növelése megelőzte a QUIN vagy NMDA által kiváltott excitotoxikus károsodást a nigrostriális rendszerben. A neuroprotektív hatás a substantia nigra dopaminerg sejtpusztulásának csökkenésével volt igazolható, amely a KYNA-szint emelkedésével párhuzamosan jelentkezett, és annak csökkenésével megszűnt (Miranda és mtsai. 1997).

Genetikai és farmakológiai beavatkozásokkal a KYNA-szint emelése *Drosophila melanogaster* Huntington-kór modellben szintén jelentősen csökkentette a neurodegenerációt (Campesan és mtsai. 2011). KYNA-analógok alkalmazása transzgenikus egérmodellben ugyancsak neuroprotektív hatással járt: a krónikus kezelés mérsékelte a mozgászavarokat, az oxidatív stresszt és a mikroglia-aktivációt, valamint javította a striális neuronok integritását (Zádori és mtsai. 2011).

Ezzel szemben több kórképben éppen a KYNA-szint kóros emelkedése volt kimutatható, amely főként az NMDAR-ok túlzott gátlásán keresztül kognitív deficithez vezethet (Kozak és mtsai. 2014). Emelkedett KYNA-szintet mutattak ki skizofréniás betegek cerebroszpinális folyadékában (Nilsson és mtsai. 2005; Erhardt és mtsai. 2001), valamint a prefrontális kéregben is (Schwarcz és mtsai. 2001), ami összefüggésbe hozható a glutamaterg neurotranszmisszió zavarával és a cerebelláris KAT-1 aktivitás fokozódásával (Kapoor és mtsai. 2006). Patkány krónikus epilepsziamodellben megnövekedett extracelluláris KYNA-szint és fokozott KYNA neoszintézis volt kimutatható a hippocampusban és az entorhinális kéregben (Wu és mtsai. 2005). Patkány vizsgálatokban a prenatális L-KYN adagolás felnőttkori figyelmi és memóriazavarokat eredményezett (Hahn és mtsai. 2018; Pocivavsek és mtsai. 2014). Emellett kimutatták, hogy *Caenorhabditis elegans*-ban az öregedéssel járó tanulási és memóriazavarok jelentős részét a KYNA felhalmozódása idézi elő, és a metabolit szintjének csökkentése idős egyedekben is számottevően javítja a kognitív teljesítményt (Vohra és mtsai. 2018).

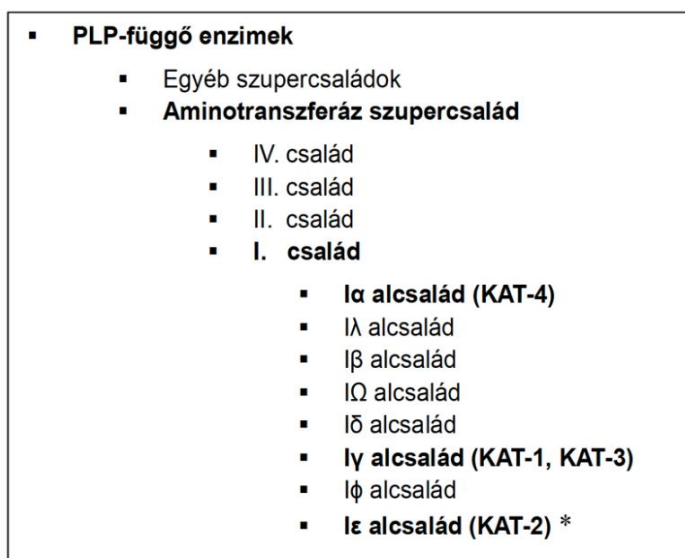
Összességében az endogén KYNA koncentrációjának finom egyensúlya alapvető fontosságú az excitotoxicitás elleni protekcióban és általánosságban az idegrendszeri homeosztázis fenntartásában. Mind a csökkent, mind a fokozott KYNA-szint patológiás következményekkel járhat, ezért a KYNA-szintézis kétirányú szabályozása terápiás potenciált jelenthet bizonyos neurodegeneratív és neuropszichiátriai kórképekben.

3.4 A KAT izoenzimek

A KYNA endogén bioszintézise az L-KYN irreverzibilis transzaminációja révén történik, amely reakciót a KAT enzimek katalizálják. A humán és rágcsáló genom négy KAT-izofórmát kódol (KAT-1–4), amelyek primer szekvenciája erősen konzervált (Yu és mtsai. 2006).

A KAT enzimek működésük során piridoxál-5'-foszfátot (PLP) használnak koenzimként (Han, Cai, Danilo A. Tagle, és mtsai. 2010). A PLP-függő enzimek több szupercsaládba sorolhatók, ezek egyike az aminosztransferáz szupercsalád, amely négy fő családra tagolható (I-IV) (Mehta és mtsai. 1993). A KAT izoenzimeket átfogó vizsgálatuk során egységesen az I. családba, azonban eltérő alcsaládokba sorolták. A besoroláskor ismert hét alcsalád a következők voltak: I α , I λ , I β , I Ω , I δ , I γ és I ϕ . A primer szekvencia- és kristályszerkezeti elemzések alapján a KAT-1 és KAT-3 az I γ alcsaládba, míg a KAT-4 az I α alcsaládba sorolható (Han, Cai, Danilo A. Tagle, és mtsai. 2010).

A KAT-2 katalitikus működése azonban egyedülállónak bizonyult: reakciója során egy speciális terciér szerkezetet vesz fel, emiatt nem volt besorolható egyik korábban leírt alcsaládhhoz sem. A KAT-2 különleges szerkezeti és funkcionális sajátossága miatt az I-es típusú aminosztransferázok közé egy új, nyolcadik alcsalád bevezetése vált szükségessé, amely az I ϵ alcsalád nevet kapta (**3. ábra**).

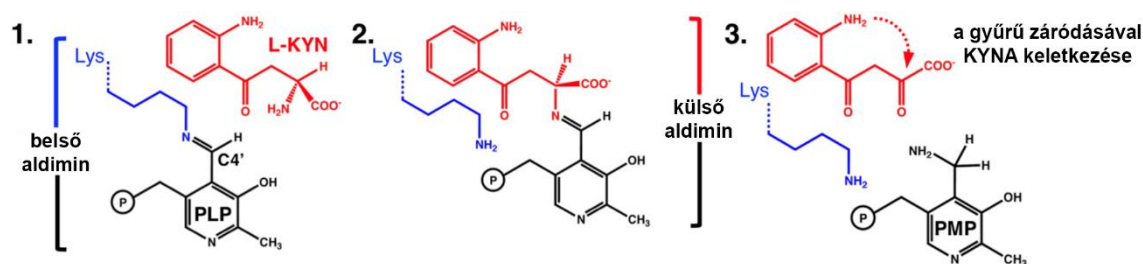


3. ábra: A PLP-függő enzimek aminosztransferáz szupercsaládjának hierarchiája és a KAT izoenzimek rendszertani besorolása, a KAT-2-t magába foglaló, legújabban definiált I ϵ alcsoport (*) feltüntetésével.

A KAT-izoenzimek szerkezeti különbségei, köztük a KAT-2 sajátos konformációs jellemzői, eltérő katalitikus viselkedést eredményezhetnek. Viszont mivel mindegyik KAT-izofорма azonos koenzimfüggőség (PLP) mellett működik, a transzaminációs reakció alaplépései megegyeznek. Ezért a KYNA-képződés és a KAT-enzimek működésének megértéséhez elengedhetetlen a PLP-függő transzaminációs reakció mechanizmusának rövid áttekintése.

A KAT enzimek homodimerek, amelyek mindkét alegysége egy nagy és egy kis doménból áll (Han, Cai, Danilo A. Tagle, és mtsai. 2010). A nagy domén tartalmazza a PLP-kötőhelyet, míg a kis domén a C-terminális és N-terminális karokat hordozza. E két domén térbeli elrendeződése alakítja ki az aktív helyet, amely a PLP-kötő régió közvetlen közelében helyezkedik el.

A PLP elsőként kovalens módon kapcsolódik az enzimhez egy aldimin kötés révén, amely a PLP aldehidcsoportja és a KAT aktív helyén található lizin oldallánca között alakul ki. Ezt a konformációt belső aldimin intermediérnek nevezzük (Cerqueira és mtsai. 2011). Amikor az L-KYN belép az aktív helyre, a PLP-lizin közötti aldimin kötés megszűnik, és egy új aldimin kötés alakul ki a PLP és az L-KYN α -aminocsoportja között, létrehozva a külső aldimin intermediert. Az α -aminocsoport ezután áthelyeződik a PLP-re, piridoxamin-5'-foszfát (PMP) keletkezik, míg a szubsztrát maradékából spontán gyűrűzáródással KYNA képződik (**4. ábra**).



4. ábra: A KYNA keletkezése a KAT-enzim által katalizált transzaminációs reakció során. **1:** a KAT aktív helyén lévő lizin az aldehidcsoporton keresztül a PLP-hez kötött (belső aldimin intermediér). **2:** az L-KYN belép az aktív helyre, és α -aminocsoportja a PLP-hez kötődik (külső aldimin intermediér). **3:** a keletkező α -ketosav intramolekuláris kondenzációs reakción megy keresztül, melynek eredményeként KYNA és a koenzim PMP formája keletkezik. (Rossi és mtsai. 2019 nyomán módosítva)

A transzaminációs reakció végén a PMP az α -aminocsoportját egy α -ketosav-típusú kosubsztrátnak adja át, aminek eredményeként a koenzim visszanyeri eredeti PLP formáját (Rossi és mtsai. 2019). Így a KAT-enzim ismét készen áll egy következő katalitikus ciklusra.

Az emlősökben található KAT izoformák közül a KAT-1 és a KAT-3 mutatja a legnagyobb fokú hasonlóságot mind genomi szerkezetük, mind aminosav-szekvenciájuk tekintetében (Yu és mtsai. 2006). E két izoforma optimális pH-tartománya a pH 9,5–10 közé esik, és ezek alapján feltételezhető, hogy átfedő biológiai funkciókkal rendelkeznek. Fiziológias pH-n aktivitásuk alacsony, legnagyobb katalitikus teljesítményüket jóval magasabb pH értéken érik el. A KAT-4 izoforma ezzel szemben már fiziológias pH-n is számottevő aktivitást mutat, optimális működése azonban a pH 8–9 tartományba esik (Han, Cai, Danilo A Tagle, és mtsai. 2010).

A KAT-2 optimális pH-tartománya a fiziológias értékekhez áll közelebb, maximális aktivitását pH 7–8 között éri el. Szubsztrátspecifitása elsősorban az L-KYN-re irányul, és a többi KAT-izoformával összehasonlítva kevésbé érzékeny inhibitor aminosavak hatásaira. E tulajdonságai alapján a KAT-2 tekinthető az emlős agyszövetben zajló fiziológias KYNA-termelés elsődleges katalizátorának.

3.5 A KAT-2 terápiás jelentősége

A KAT-2 endogén KYNA bioszintézisében betöltött meghatározó szerepe miatt a kinurenin útvonal egyik legfontosabb szabályozási pontját képviseli. Humán és rágcsálómódelben végzett kísérletes vizsgálatok egyaránt igazolták, hogy a KYNA-termelés több mint feléért ez az izoforma felelős (Guidetti és mtsai. 1997; Milosavljevic és mtsai. 2023).

A KYNA szintjének módosítása terápiás szempontból különösen ígéretes megközelítésnek tekinthető olyan kórképekben, amelyekben a kinurenin útvonal zavara hozzájárul a neurotranszmisszió és a neuroprotekciónak egyensúlyának felborulásához. Mivel a KYNA szintje döntően a KAT-2 aktivitás függvénye, az enzim célzott modulálása kínálja a legkézenfekvőbb, egyben racionális és potenciálisan klinikailag alkalmazható stratégiát a KYNA-szint optimális tartományban tartására.

Tekintve, hogy számos neuropatológiai állapotban a KYNA koncentrációjának emelkedése járul hozzá a szinaptikus jelátvitel módosulásához, a KAT-2 aktivitás célzott csökkentése potenciális beavatkozási pontként merül fel. A KAT-2 funkcionális szerepének és terápiás potenciáljának pontosabb megítéléséhez ezért elengedhetetlen a farmakológiai gátlószerek és a genetikai modellek párhuzamos értékelése, amelyek komplementer módon teszik vizsgálhatóvá az enzim működésének következményeit.

A KAT-2 egy PLP koenzim-függő transzamináz, ezért gátlásának első megközelítése a PLP-kötőhely célzásán alapult. Ennek megfelelően több olyan irreverzibilis inhibitorot fejlesztettek, amelyek a PLP kofaktorhoz kötődve hatékonyan mérséklék a KYNA termelődését, mint például a PF-04859989 és a BFF-122 (Rossi és mtsai. 2010; Dounay és mtsai. 2012; Kozak és mtsai. 2014). A PF-04859989 szisztémás alkalmazása jelentősen csökkentette az agyi KYNA-szintet és mind rágsálókban, mind főemlősökben képes volt normalizálni a ketamin által kiváltott munkamemória-deficitet (Kozak és mtsai. 2014). Patkány prefrontális kéregben ugyanez a gátlószer mérsékelte az L-KYN által indukált KYNA-szint emelkedést, és helyreállította a nikotin hatására kialakuló glutamáterg tranzienseket (Koshy Cherian és mtsai. 2014).

Az irreverzibilis, PLP-kötő inhibitorok terápiás alkalmazását azonban jelentősen korlátozza, hogy az agyban több száz PLP-dependens enzim működik, így a nem szelektív gátlás kiterjedt metabolikus és neurológiai mellékhatások kialakulásához vezethet (Yoshida és mtsai. 2019). Emiatt vált szükségessé olyan reverzibilis és nagyobb szelektivitást biztosító KAT-2 inhibitorok fejlesztése, mint az S-ESBA vagy az NS-1502 (Nematollahi és mtsai. 2016). Az S-ESBA mérsékelt KAT-2 gátlása patkány striátumban csökkentette a KYNA mennyiségét és ezzel párhuzamosan növelte az extracelluláris dopaminszintet (Amori és mtsai. 2009). A prefrontális kéregben ugyanez az inhibitor a KYNA-szint mérséklésével együtt az acetilkolin- és glutamátszint növekedését is kiváltotta (Zmarowski és mtsai. 2009; Konradsson-Geuken és mtsai. 2010).

A modernebb KAT-2 gátlószerek egyik legfőbb előnye a nagy szelektivitás, ugyanakkor erős hatásuk gyakran túlzott enzimblokádhhoz vezet, így a KYNA-szint a fiziológiás tartomány alá csökkenhet (Nematollahi és mtsai. 2016). A biztonságos terápiás alkalmazáshoz ezért elengedhetetlen a megfelelő szelektivitás és a dózis pontos beállítása.

A hatékonyságot tovább bonyolítja, hogy a KAT-2 inhibitorok fajonként eltérő módon működnek, ami feltételezhetően az enzim aminosav-szekvenciájának különbségeiből adódik (Pellicciari és mtsai. 2008). Jó példa erre, hogy a PF-04859989 patkányban hozzávetőleg tízszer nagyobb dózist igényel, mint főemlősökben, míg az S-ESBA hatékonyabban gátolja a rágsáló, mint a humán KAT-2 izoformát (Dounay és mtsai. 2012; Kozak és mtsai. 2014). Ezek a megfigyelések egyértelműen jelzik, hogy a KAT-2-re irányuló terápiás stratégiák fejlesztéséhez nélkülözhetetlen a fajspecifikus farmakológiai jellemzés és annak transzlációs validálása.

A KAT-2 szerepének tisztázásához genetikai megközelítéseket is alkalmaztak. *Kat-2* nullmutáns (*Kat-2*^{-/-}) egerekben az agyi KYNA-szint drasztikusan lecsökken, ami a glutamáterg tónus fokozódását és a kognitív teljesítmény javulását eredményezi, ugyanakkor hiperaktivitás és motoros koordinációs zavar is kialakulhat (Yu és mtsai. 2004; Potter és mtsai. 2010). Ezek a változások csak átmenetiek, mivel a *Kat-2*^{-/-} egerek agyszövetében felnőttkorra a *Kat-1* és *Kat-3* mRNS-expressziója szignifikánsan megnövekedett a vad típusú állatokhoz képest, ami részben kompenzálhatja a KAT-2 funkcióvesztését és hozzájárulhat a KYNA-szint homeosztatisz fenntartásához (Yu és mtsai. 2006). Mindez jól szemlélteti, hogy a KAT-2 a KYNA-szintézis meghatározó enzime: hiánya olyan kompenzációs mechanizmusokat indít be, amelyek az egyébként alacsony aktivitású KAT-1 és KAT-3 enzimek ontogenetikus upregulációján keresztül igyekeznek fenntartani a KYNA-termelést. A teljes szervezetre kiterjedő génkiütés ugyanakkor nem alkalmas az enzim központi idegrendszeri szerepének pontos értékelésére, mivel a perifériás KYNA-metabolizmust is befolyásolja.

Míg a farmakológiai és genetikai gátlással végzett vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a KAT-2 aktivitás csökkentése hatékony stratégia lehet a KYNA-túlprodukción mérséklésében, több olyan kórkép is ismert, ahol éppen a KYNA hiánya járul hozzá a neuropatológiai állapotok kialakulásához (Thevandavakkam és mtsai. 2010). Ilyen esetekben a terápiás cél a KYNA-szintézis elősegítése, ami funkcionálisan a KAT enzimek, köztük a KAT-2 aktivitásának növekedésével egyenértékű.

A KAT-2 közvetlen farmakológiai aktiválása jelenleg nem megoldott, azonban a metabolikus útvonal megbontása olyan módon is fokozhatja a KYNA-képződést, hogy az enzim több szubsztráthoz jut, illetve a versengő útvonalak aktivitása csökken. A kinurenin metabolizmus felépítése ugyanis magában hordozza azt a lehetőséget, hogy a KAT-2 funkciója közvetetten fokozható legyen. Az L-KYN sorsa két nagy irányba ágazhat el: a KAT-enzimek katalizálta KYNA képződés, illetve a KMO és a kinurenináz által vezérelt, 3-HK és ANA felé (Vécsei és mtsai. 2013). A két útvonal egymással szubsztrát-szinten verseng, így a „rivális” ágat blokkolva az L-KYN nagyobb része válik a KAT-2 számára elérhetővé.

Ezt a stratégiai pontot több modell is megerősítette: genetikai és farmakológiai vizsgálatok egyaránt bizonyítják, hogy a KMO vagy a TDO aktivitásának gátlása az L-KYN anyagcserét tartósan a KYNA-szintézis irányába tolja el. *Drosophila melanogaster* Huntington-modellben mindkét enzim genetikai gátlása a KYNA és a 3-HK közötti arány kedvező irányú változását eredményezte, amely jól mérhető

neuroprotektív hatással járt és enyhítette a neurodegenerációt. A közvetlen metabolit-pótlási kísérletek tovább erősítették ezt az összefüggést, mivel a KYNA adagolása csökkentette, míg a 3-HK adagolása fokozta a degeneráció súlyosságát, alátámasztva a két metabolit okozati szerepét a betegség progressziójában (Campesan és mtsai. 2011).

Hasonlóképpen, *Kmo*^{-/-} egerek agyában az extracelluláris KYNA-koncentráció szignifikáns növekedést mutat, ami alátámasztja, hogy a KMO enzim gátlása az L-KYN metabolizmusát a KAT-mediált útvonal felé tolja el (Giorgini és mtsai. 2013). Ez az átrendeződés arra utal, hogy a KMO hiánya nem csupán a 3-HK/QUIN képződést csökkenti, hanem a neuroprotektív KYNA termelését is fokozza az agyszövetben.

A KMO krónikus farmakológiai gátlása tartós anyagcsere-átrendeződést eredményez a kinurenin útvonalon belül (Röver és mtsai. 1997; Speciale és mtsai. 1996). A metabolikus eltolódás kezdetben az L-KYN felhalmozódásában jelenik meg, amelyet a KAT-mediált KYNA neoszintézis fokozódása követ. A JM6 nevű KMO-inhibitor krónikus adagolása tartósan emelte az agyi KYNA-szintet, és csökkentette az extracelluláris glutamát mennyiségét (Zwilling és mtsai. 2011). Alzheimer-kór transzgenikus egérmodellben a JM6 kezelés megelőzte a memóriazavarok, a szorongás, valamint a szinaptikus veszteség kialakulását. Huntington-kór egérmodellben meghosszabbította az állatok élettartamát, csökkentette a mikroglia-aktivációt és megakadályozta a szinaptikus veszteséget. Egy másik, új generációs KMO-inhibitor, az Ro 61-8048 csökkentette a nikotinfüggőséget és megakadályozta a visszaesést rágszáló és főemlős modellekben (Secci és mtsai. 2017), ami arra utal, hogy a KYNA-szint modulációja szélesebb neuropszichiátriai kontextusban is terápiás relevanciával bír.

Metabolikus szempontból tehát a KAT-2 közvetett „aktiválása” a versengő enzimrendszerek szelektív gátlásával érhető el. Ezáltal a KAT-2 több szubsztrátot hasznosíthat, ami funkcionálisan a KYNA-szintézis jelentős fokozódását eredményezi az enzim struktúrájának vagy katalitikus működésének közvetlen manipulálása nélkül.

Mivel a KYNA rendkívül korlátozott mértékben képes átmenni a vér-agy gáton (Fukui és mtsai. 1991), a központi idegrendszeri KYNA-termelődés növelésének leggyakrabban alkalmazott módszere a prekursora, az L-KYN szisztémás adagolása. Az L-KYN jól penetrál a vér-agy gáton, és dózisfüggő KYNA-szint-emelkedést idéz elő több agyterületen, például a prefrontális kéregben, a striátumban vagy a hippocampusban (Swartz és mtsai. 1990; Konradsson-Geuken és mtsai. 2010). Az L-KYN kezelés kedvező hatásait kimutatták iszkémia, migrén és Parkinson-kór modellekben is (Gigler és mtsai. 2007; Chauvel és mtsai. 2012; Silva-Adaya és mtsai. 2011).

Összességében a KAT-2 egy fontos enzimatis szabályozópont a kinurenin útvonalban, amelyen keresztül a KYNA-szintézis és ezáltal a neurotranszmitter-egyensúly hatékonyan befolyásolható. A KAT-2 aktivitás csökkentése alkalmas lehet a KYNA-túlprodukcióval járó neuropszichiátriai és kognitív zavarok mérséklésére, míg a KYNA-szint növelése az L-KYN-útvonalon keresztül neuroprotektív hatásokat idézhet elő. A jövő kihívása olyan reverzibilis, szelektív és agyszövetre specifikus modulátorok fejlesztése, amelyek képesek helyreállítani a kinurenin útvonal felborult egyensúlyát.

3.6 A KAT-2 expressziója emlős agyszövetben

A szakirodalmi adatok alapján a KAT-2 enzim magas expressziót mutat asztrocitákban. Patkány agyszövet vizsgálata során kimutatták a *KAT-2* mRNS jelenlétét asztrocitákban különböző agyterületeken, többek között a hippocampusban, a corpus callosumban és a szubventrikuláris zónában (Song és mtsai. 2018). Emellett számos vizsgálat a KAT-2 fehérje expresszióját is igazolta, elsősorban asztrocitákban, valamint az agyi erekkel szoros kapcsolatban álló asztrocita-végtalpokban (Guidetti és mtsai. 2007). Ezekben a kísérletekben az enzim jelenlétét más sejttípusokban nem dokumentálták. Eredményeik hozzájárultak ahhoz a széles körben elterjedt nézethez, miszerint az emlős agyban a KYNA bioszintézise elsősorban asztrocita eredetű.

Számos kutatás eredménye azonban arra utal, hogy a KAT-2 expressziója nem kizárólag gliasejtekre korlátozódik. A fehérje neuronális expresszióját több patkány agyterületen is leírták, köztük a piriform kéregben, az előagyban és a substantia nigra régiójában (Okuno és mtsai. 1990). Ezen kívül KAT-2 immunreaktivitást írtak le patkány hippocampális neuronokban is (Du és mtsai. 1992). Patkány agykéregből származó primer neuronkultúrákban nemcsak a KAT-2 jelenlétét, hanem funkcionális aktivitását is dokumentálták: az idegsejtek a KYNA-t körülbelül 2,3-szor nagyobb mértékben szintetizálták, mint az asztrociták (Rzeski és mtsai. 2005).

Patkányban a KAT-2 jelenlétét egyéb központi idegrendszeri struktúrákban is kimutatták, például a gerincvelőben, az agytörzsben és a retinában (Kapoor és mtsai. 1997; Rejdak és mtsai. 2001). Emellett a fehérje humán magzati és felnőtt agyszövetből származó neuronokban is azonosításra került (Guillemin és mtsai. 2007).

Kutatócsoportunk elsőként igazolta a KAT-2 enzim jelenlétét egér agyszövetben, asztrocitákban és neuronokban egyaránt, mind mRNS-, mind fehérjeszinten, több előagyi és középagyi régióban (Herédi és mtsai. 2017).

A kinurenin rendszer genetikai manipulációját leggyakrabban egereken végezték (Yu és mtsai. 2004; Giorgini és mtsai. 2013; Szabó és mtsai. 2025). A szakirodalomban mégis túlsúlyban vannak a humán és patkány vizsgálatok, és az enzim agyszöveti feltérképezése egérben továbbra is hiányos. A vad típusú egerek vizsgálata ezáltal hiánypótló a szakirodalomban és hozzájárulhat a KAT-2 működésének és szabályozási lehetőségeinek alaposabb megértéséhez.

3.7 Parkinson-kór toxinmodell

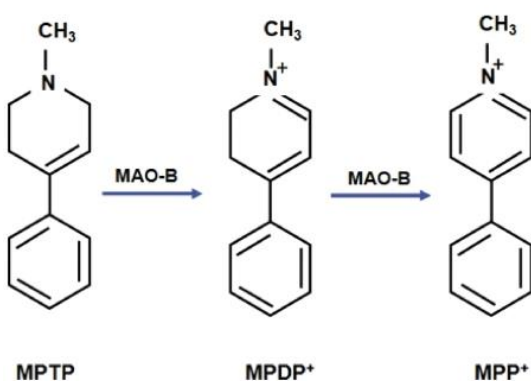
A Parkinson-kór a központi idegrendszer progresszív neurodegeneratív betegsége, amely az orvostudomány jelenlegi állása szerint gyógyíthatatlan. Fő neuropatológiai jellegzetessége a dopaminerg neuronok szelektív és fokozatos pusztulása az SNc területén, valamint az érintett idegsejtekben az α -szinuklein fibrillumokból álló intracitoplazmatikus zárványok, azaz a Lewy-testek kóros felhalmozódása (Braak és mtsai. 2003; Behl és mtsai. 2021). A dopaminszint ezt követő, elsősorban a striátumban bekövetkező csökkenése miatt az agy már nem képes a motoros funkciók megfelelő szabályozására (Rodriguez-Oroz és mtsai. 2009).

Számos vizsgálat leírta, hogy a kórképet kísérő neuroinflammáció következtében a kinurenin útvonal egyensúlya több ponton is felborul, a perifériás és centrális metabolitprofilok átrendeződésével (Lim és mtsai. 2017; Venkatesan és mtsai. 2020). Az aktivált mikroglia által termelt gyulladásos mediátorok az excitotoxikus ágak fokozott aktivációja felé terelik a metabolizmust, amely a neuroprotektív KYNA szintjének csökkenéséhez és a neurotoxikus QUIN szintjének emelkedéséhez vezet (Chen és Geng 2023). A KYNA/QUIN arány ilyen irányú eltolódása fokozza az excitotoxicitást, erősíti a gyulladásos folyamatokat, és szoros kapcsolatban áll a betegség kialakulásával és progressziójával. Több tanulmány is felveti, hogy a kinurenin útvonal komponensei nemcsak a betegséghez társuló biokémiai változások potenciális diagnosztikai indikátorai lehetnek, hanem terápiás célpontok is (Behl és mtsai. 2021).

A kísérleti Parkinson-kór állatmodellek két fő típusa a genetikai és a toxinmodellek (Hisahara és Shimohama 2010). A transzgenikus modellek a humán kórkép familiáris formájához kapcsolódó mechanizmusokat modellezik, de nem reprodukálják teljes mértékben a neuropatológiai elváltozásait (Fernagut és Chesselet 2004). Így például nem minden esetben alakulnak ki Lewy-testek vagy kifejezett dopaminerg sejtpusztulás.

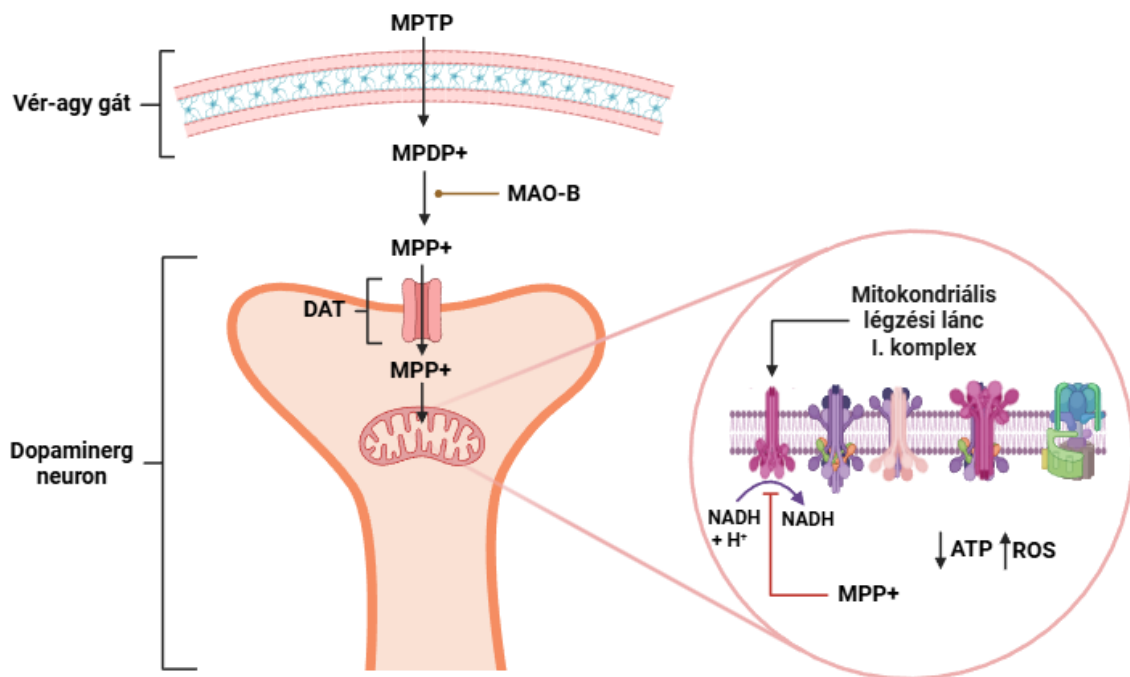
A sporadikus Parkinson-kór patogenezisének feltárásában továbbra is a toxinmodellek állnak az élen. A neurotoxikus ágensek alkalmazásán alapuló kísérletes rendszerek közé tartozik az 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) szisztémás adagolása, amelyet főként egerekben és főemlősökben alkalmaznak, valamint a 6-hidroxidopamin (6-OHDA) intracerebrális adagolása patkányokban, célzott dopaminerg léziók kiváltására (Bové és mtsai. 2005). Az MPTP-modell a legszélesebb körben használt és legjobban jellemzett toxinmodell (Przedborski és Vila 2003). A neurotoxin a humán Parkinson-kórhoz hasonló, maradandó motoros és neuropatológiai tünetegyüttest vált ki azáltal, hogy szelektíven károsítja a nigrostriális útvonal dopaminerg neuronjait (Meredith és Rademacher 2011).

Az MPTP nem toxikus, azonban lipofil szerkezete miatt könnyen átjut a vér-agy gáton, ahol erősen neurotoxikus aktív metabolittá alakul át (Di MONTE és mtsai. 1992). Az agyszövetbe jutott MPTP-t az asztrociták veszik fel, és a bennük expresszáldó monoamin-oxidáz-B (MAO-B) enzim katalizálja az átalakulást (Schildknecht és mtsai. 2017). A folyamat kétlépcsős: először 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridínium-ion (MPDP⁺), majd 1-metil-4-fenilpiridínium-ion (MPP⁺) keletkezik (**5. ábra**).



5. ábra: Az MPTP kétlépcsős oxidációja a MAO-B enzim katalízise révén. A folyamat első lépésében MPDP⁺ intermedier, majd ebből neurotoxikus MPP⁺ keletkezik. (He és Nakayama 2009 nyomán módosítva)

Az MPP⁺ kémiai szerkezete nagymértékben hasonlít a dopaminéhoz, ezért a dopamin-transzporter (DAT) közvetítésével szelektíven felvételre kerül a dopaminerg neuronokba, elsősorban az SNc területén (Storch és mtsai. 2004). Az idegsejtekbe jutva az MPP⁺ felhalmozódik a mitokondriumokban, ahol gátolja a NADH-dehidrogenázt az elektrontranszport-lánc I-es komplexében, ezáltal csökkentve az adenosin-5'-trifoszfát (ATP) termelését és fokozva a ROS képződését (Desai és mtsai. 1996). Az oxidatív stressz további sejtkárosodást indukál, ami végső soron a dopaminerg neuronok szelektív pusztulásához vezet (**6. ábra**).



6. ábra: Az MPTP metabolikus átalakulása és neurotoxikus hatásmechanizmusa a dopaminerg neuronokban. Az MPTP-ből a vér-agy gáton átjutva az asztrociták a MAO-B enzim révén MPDP⁺-t képeznek. Az MPDP⁺ a DAT közvetítésével jut be a dopaminerg neuronokba, ahol a mitokondriumokban felhalmozódva gátolja a NADH-dehidrogenázt a légzési lánc I-es komplexében. Ez csökkenti az ATP-termelést, fokozza a ROS-képződést, ami sejtpusztuláshoz vezet. (Az ábra a BioRender.com segítségével készült.)

Az MPTP neurotoxicitását dokumentálták humán, főemlős, rágcsáló és zebraahal modellekben is (Mustapha és Mat Taib 2021). A toxin elsősorban a főemlősökben vált ki Parkinson-szindrómát, míg a rágcsálók eltérő érzékenységet mutatnak (Kopin 1992). A patkányok rezisztensek a szisztémás MPTP-adagolással szemben (Riachi és mtsai. 1990), ezért esetükben jellemzően a 6-OHDA modellt alkalmazzák (Ferro és mtsai. 2005).

Egér törzsek között jelentős különbségeket figyeltek meg, ahol a legérzékenyebbnek a C57BL/6 törzs bizonyult (Sedelis és mtsai. 2000). Az MPTP-érzékenység elsősorban a MAO-B enzim aktivitásától függ, így a neurotoxicitás eltérő mértéke az enzim agyi szintjeinek faji és törzsi különbségeivel magyarázható (Meredith és Rademacher 2011). A patkányok MPTP toxicitásával szembeni rezisztenciája mögött az alacsonyabb MAO-B aktivitás állhat, hiszen az MPTP biotranszformációja a toxikus MPP⁺ metabolittá kevésbé hatékonyan működik. A C57BL/6 egértörzs esetében az agyban magasabb a MAO-B aktivitása, mint a májban, ezáltal a vegyület korlátozott szisztémás detoxifikációja fokozhatja az agyi MPTP-akkumulációt és a dopaminerg sejtkárosodást (Inoue és mtsai. 1999).

A rendelkezésre álló adatok alapján a C57BL/6 egértörzs neurotoxicitási profilja révén kifejezetten alkalmas az MPTP-alapú Parkinson-kór modell létrehozására.

4 Célkitűzések

Az értekezés alapját képező kísérletes munka fő célja a KYNA-szintézisben meghatározó enzim, a KAT-2 részletes neuroanatómiai jellemzése volt C57BL/6 egér törzsben, fiziológias és patológiás körülmények között.

Célkitűzés 1:

A KAT-2 expressziójának *in vitro* vizsgálata egér agy eredetű primer sejtenyészeten fluoreszcens immuncitokémia alkalmazásával, kolokalizációs metrikák kvantitatív analízisének bevonásával.

Célkitűzés 2:

A KAT-2 regionális eloszlásának átfogó feltérképezése egér agyszövetben fluoreszcens immunhisztokémia módszerével, különös tekintettel az előagy és a kisagy területeire.

Célkitűzés 3:

A KAT-2 sejttípus-specifikus expressziójának meghatározása, neuronális és gliális populációk azonosításával az előagy és a kisagy meghatározott régióiban.

Célkitűzés 4:

A KAT-2-pozitív sejtpopulációk neurotranszmitter-rendszerek szerinti azonosítása olyan agyterületeken, amelyekben igazolt a kinurenin anyagcsere zavara patológiás központi idegrendszeri folyamatok során.

Célkitűzés 5:

A Parkinson-kór MPTP-alapú egérmodelljének létrehozása és validálása, valamint a kialakult dopaminerg neuronvesztés szövettani jellemzése a substantia nigra pars compacta területén. Továbbá célul tűztük ki, hogy meghatározzuk a KAT-2 enzim érintettségét a neurotoxin által kiváltott neurodegenerációban.

5 Anyagok és módszerek

5.1 Állatok

Kísérleteinkhez vad típusú C57BL/6 egereket használtunk ($n = 106$); az *in vitro* vizsgálatokhoz embriókat (E17) és újszülötteket (P0–P3) mindkét nemből, míg az *in situ* és *in vivo* vizsgálatokhoz 8–16 hetes hím egyedeket. Az állatok standard laboratóriumi körülmények között kerültek tartásra (24 °C, relatív páratartalom 45–55 %, 12 órás világos–sötét ciklus), korlátlan hozzáféréssel vízhez és táplálékhoz. Minden erőfeszítést megtettünk az állatok számának minimalizálása és szenvedésük csökkentése érdekében.

A kísérletek megfeleltek az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelvében (a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről), az Országgyűlés által elfogadott 1998. évi XXVIII. törvényben (az állatok védelméről és kíméletéről), valamint a Kormány által kiadott 40/2013. (II. 14.) Korm. rendeletben (az állatkísérletekről) foglalt előírásoknak.

Kísérleteinket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács által jóváhagyott engedélyek birtokában végeztük (engedélyszámok: I-74-16/2015, XX./495/2024).

5.2 *In vitro* kísérletsorozat

5.2.1 Primer sejtenyészetek előállítása

A primer asztrociták izolálását Prof. Dr. Krizbai István kutatócsoportja végezte újszülött (P1–P3) egerekből. A begyűjtött teljes agyakra eltávolították az agyhártyákat. Az agyszövetet mechanikusan disszociálták, ötszöri triturálással, 21G tűvel (Sterican, B. Braun) alacsony glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle médiumban (DMEM; Thermo Fisher Scientific), majd egy 40 μ m pórusméretű sejtszűrőn (Corning) szűrték át. A sejteket poli-L-lizinnel bevont üveg fedőlapokra szélesztették 10% magzati marha szérummal (FBS; Merck-Sigma) kiegészített DMEM-ben. A szennyező mikrogliákat a hetente kétszer végzett táptalajcsere során alapos mosással távolították el. A sejt kultúrákat az izolálást követő 2–3 héten belül használtuk fel.

A mikroglia izolálását Prof. Dr. Farkas Eszter kutatócsoportja végezte újszülött (P0) egerekből. Az eltávolított és feldarabolt agykérgeket 0,25%-os tripszinben 10 percig 37 °C-on disszociálták, majd a tripszint alacsony glükóztartalmú DMEM-mel semlegesítették. A pelletet reszuszpendálták, DMEM-ben mosták, centrifugálták,

majd 100 μm pórusméretű steril sejtszűrőn (Greiner Bio-One) szűrték át. A sejteket reszuszpendálták, majd poli-L-lizinnel bevont tenyésztőflaskákba szélesztették. A táptalajt másnap, majd 3 naponta cserélték. A primer kultúrákban lévő mikroglia sejteket 7 napos tenyésztés után 37 °C-on, platformrázó segítségével (120 rpm, 20 perc) rázták fel, a felülúszóból centrifugálással gyűjtötték össze, reszuszpendálták, és poli-L-lizinnel bevont fedőlemezekre szélesztették (2×10^5 sejt/fedőlemez). A táptalajt másnap, majd a szubklónozás 3. és 6. napján (subDIV6) cserélték.

A primer neuronok izolálását Prof. Dr. Sántha Miklós kutatócsoportja végezte Pacifici és Peruzzi leírása alapján, némi módosítással (Pacifici és Peruzzi 2012). Az elsődleges kérgi neuronok izolálásához az egér embriókat (E17) hideg disszekciós médiumban mosták, majd az eltávolított agyakat jéghideg Hibernate E médiumba helyezték (BrainBits). Az agykérgeket elkülönítették és az agyhártyákat eltávolították. A kérgi szöveteket TrypLE-vel (Thermo Fisher Scientific) 10 percig 37 °C-on enzimatikusan emésztették, majd Hibernate E-vel mosták. Az agykérgeket 200 mM Glutamax-ot (Thermo Fisher Scientific) tartalmazó Neurobasal/B27 médiumban (Thermo Fisher Scientific) homogenizálták 18G tűvel (B. Braun), végül a szuszpenziót médiummal hígították. A sejteket poli-D-ornitinnel/lamininnel bevont fedőlemezekre szélesztették (1×10^5 sejt/fedőlemez). A primer neuronokat 5 napig tenyésztették.

5.2.2 Fluoreszcens immuncitokémia

A 4%-os paraformaldehiddel (PFA; pH 7,4; Merck-Sigma) fixált sejteket foszfátpufferben (PB; 0,1 M; pH 7,4) mostuk. A membrán permeabilizálását és a nem specifikus antitest kötődés blokkolását egyidejűleg, 45 perces inkubálással végeztük 0,05% Triton X-100 (TX100; Biolab Zrt.), 1% marha szérum albumin (BSA; Merck-Sigma) és 5% normál szamár szérum (NDS; Biosera) tartalmú PB-ben.

A sejteket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a vizsgálni kívánt fehérjék ellen termeltetett elsődleges antitestekkel (**F1. táblázat**). Másnap a sejteket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a fluorofórral kapcsolt másodlagos antitestekkel (KAT-2: Cy3; sejt típus-markerek: Alexa Fluor™ 488; 1:500; Jackson ImmunoResearch) 2% NDS-t tartalmazó PB-ben. A sejtmagfestést 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI; 5 $\mu\text{g/mL}$; Serva Electrophoresis GmbH) 5 percig végeztük. Desztillált vizes öblítés után a fedőlemezeket tárgylemezekre helyeztük ProLong® Gold vízbázisú fedőanyaggal (Thermo Fisher Scientific).

5.2.3 Képrögzítés és mintavétel

A többcsatornás felvételeket Axiocam 506 digitális kamerával felszerelt Axio Imager.Z2 fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss) készítettük ZEN Pro szoftver (v2.3; Zeiss) segítségével. A felvételi paramétereket minden kísérlet során egységesen alkalmaztuk a minták közötti összehasonlíthatóság biztosítása érdekében. A KAT-2 sejtípus-specifikus markerekkel való kolokalizációjának vizsgálatához a fluoreszcens jeleket három csatornán rögzítettük: a vörös csatornán a KAT-2 (Cy3; Ex: 548 nm, Em: 570–640 nm), a zöld csatornán a sejtípus-markerek (GFAP, ALDH1L1, CD68, IBA1, MAP2 vagy TUBB3; Alexa Fluor™ 488; Ex: 493 nm, Em: 500–550 nm), míg a kék csatornán a sejtmagok (DAPI, vizualizáció céljából; Ex: 353 nm, Em: 420–470 nm) jelentek meg.

Minden sejtípus esetében három független izolálásból származó biológiai replikátumot használtunk. A biológiai replikátumokból mintánként öt, egymást nem átfedő mikroszkópos mezőt rögzítettünk technikai replikátumként. Összesen 15 kép készült markerenként, így a teljes adatállomány 90 képből állt. A statisztikai elemzéseket biológiai replikátumokra alapozva végeztük ($n = 3$ markerenként és sejtípusonként).

5.2.4 Képanalízis és kolokalizációs paraméterek

A kvantitatív kolokalizációs analízist egyedi Python szkriptek felhasználásával végeztük (Python v3.12; könyvtárak: NumPy, SciPy, OpenCV, Matplotlib, tifffile). A vörös és zöld csatornákat különválasztottuk a többcsatornás képekből, és az elemzést normalizálás nélküli, nyers fluoreszcenciaintenzitás-értékek alapján végeztük. A KAT-2 lokalizációjának meghatározásához az elemzést a marker-pozitív pixelekre korlátoztuk. A marker-pozitivitás automatikusan került meghatározásra Otsu-küszöböléssel. A KAT-2 jel értékelése így kizárólag az adott sejtípushoz tartozó területeken történt, kizárva a háttérjelölést és a nem jelölt régiókat.

A kolokalizáció mértékét Pearson-féle korrelációs együtthatóval (r), valamint Manders-féle kolokalizációs együtthatókkal ($M1$ és $M2$) jellemeztük. A Pearson-féle r a vörös és zöld pixelintenzitások lineáris korrelációját méri -1 (inverz kapcsolat) és $+1$ (tökéletes kapcsolat) közötti tartományban. A Manders-együtthatókat küszöbölés után számítottuk ki, ahol az $M1$ a vörös jel zölddel átfedő, az $M2$ a zöld jel vörössel átfedő hányadát fejezi ki, 0 (nincs átfedés) és 1 (teljes átfedés) értéktartományban. A véletlenszerű pixelátfedés lehetőségét Costes-féle randomizációs teszttel vizsgáltuk (1 000 permutáció/kép).

A teljes képfeldolgozási folyamat egy reprezentatív példán keresztül bemutatva a Függelékben (**F1. ábra**) található, amely tartalmazza a csatornasztérválasztás, az Otsu-küszöbölés, az intenzitáshisztogram, a pontdiagram és a Manders-együtthatók számításának lépéseit.

5.2.5 Statisztikai analízis

A statisztikai összehasonlítások során a biológiai replikátumok szolgáltattak az elemzés egységeként ($n = 3$ markerenként és sejttípusonként). Minden biológiai replikátum esetében az öt technikai replikátumból származó értékeket számtani átlaggal egyesítettük; az adatállomány megtalálható a Függelékben (**F2. táblázat**). A technikai replikátumokat nem kezeltük független megfigyelésekként.

A Manders M1 értékek esetében az adott sejttípushoz tartozó két marker (asztrociták: GFAP és ALDH1L1; mikroglia: CD68 és IBA1; neuronok: MAP2 és TUBB3) eredményeit átlagoltuk, így sejttípusonként egyetlen összehasonlítható értéket kaptunk. A Pearson r és az M2 értékek elemzése kizárólag marker szinten történt, mivel az egyik markerpár esetében szignifikáns különbségek jelentkeztek.

A statisztikai elemzéseket és az adatok ábrázolását a GraphPad Prism szoftverrel végeztük (v10.6.1; GraphPad Software). A kvantitatív méréseket (Pearson r , M1, M2) egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc tesztekkel értékeltük, mind sejttípuson belül, mind sejttípusok között. Az adatokat átlag $\pm$ szórás (SD) formájában adtuk meg, és a $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak. A vizsgálatból egyetlen biológiai vagy technikai replikátum sem került kizárássra.

5.3 *In situ* és *in vivo* kísérletsorozat

5.3.1 Agyszövet preparálás

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz az egereket 25%-os uretánoldat (1,6 g/ttkg) intraperitoneális adagolásával altattuk. Az állatokat ezután perfúziós pumpa segítségével transzkardiálisan perfundáltuk 4 °C-os PB-vel, majd 4 °C-os, 4%-os PFA-val. A koponya felnyitását követően a perfúziósan fixált agyakat eltávolítottuk és egy éjszakán át immerziós technikával utófixáltuk 4%-os PFA-ban. A fixált agyszöveteket 1 órán át PB-ben mostuk, majd vibratóm (Leica VT1000 S; Leica Microsystems) segítségével 20 μ m vastag koronális és szagittális metszeteket készítettünk.

5.3.2 Fluoreszcens immunhisztokémia

A metszeteket 0,4% TX100 detergens tartalmú foszfát pufferben (PBT) mostuk. Az endogén Fc receptorok blokkolásához az agyszeleteket 1 órán át inkubáltuk 2% NDS-t tartalmazó PBT-ben. A blokkolás után egy éjszakán át tartó inkubáció következett 4 °C-on a vizsgálni kívánt fehérjék ellen termeltetett elsődleges antitestekkel **(F1. táblázat)**. Másnap az agyszeleteket mosást követően, szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk a fluorofórral kapcsolt, az elsődleges antitestek gazdafajának megfelelő másodlagos antitestekkel (KAT-2: Cy3; sejtípus markerek: Alexa Fluor™ 488; 1:500). A sejtmagfestést DAPI-val (5 µg/mL) 10 percig végeztük. A metszeteket ezután tárgylemezre húztuk, majd lefedtük ProLong® Gold vízbázisú fedőanyaggal.

5.3.3 Képrögzítés

Az immunjelölt metszetekről készült felvételeket BX51 (Olympus) és Axio Imager.Z2 (Zeiss) fluoreszcens mikroszkópokkal végeztük, DP Controller (v3.2.1.276; Olympus) és ZEN Pro (v2.3; Zeiss) szoftverek segítségével. A fluoreszcens jeleket három csatornán rögzítettük: a vörös csatornán a KAT-2 (Cy3; Ex: 548 nm, Em: 570–640 nm), a zöld csatornán a sejtípus-markerek (Alexa Fluor™ 488; Ex: 493 nm, Em: 500–550 nm), a kék csatornán a sejtmagok (DAPI; Ex: 353 nm, Em: 420–470 nm) jelentek meg.

5.3.4 MPTP kezelés

A Parkinson-kór toxinmodelljének beállításához 14-16 hetes vad típusú hím C57BL/6 egereket kezeltünk intraperitoneálisan adott MPTP-hidrokloriddal (Sigma-Aldrich). A toxint 0,9%-os nátrium-klorid tartalmú fiziológiás sóoldatban oldottuk, és az állatok testtömegéhez igazított anyagmennyiséget adtuk be 20 ml/ttkg beadási térfogatban. A beadott oldat végső pH-értéke a fiziológiás tartományon belül volt. Az állatokat akut MPTP-kezelési protokoll szerint kezeltük, amely során három különböző dózist alkalmaztunk: 1×20 mg/ttkg, 2×20 mg/ttkg és 3×20 mg/ttkg, 2 órás injekciós intervallumokkal. A kontrollcsoport három alkalommal, azonos időpontokban és azonos beadási térfogatban fiziológiás sóoldatot kapott. Az első injekciótól számított 7. napon végeztük az agyszövet preparálását **(lásd 5.3.1 fejezet)**. A kezeléseket ideje alatt az állatok 12 óránkénti megfigyelése az állatjóléti pontrendszer alapján történt, amely során dokumentáltuk egészségi állapotukat, motoros aktivitásukat és koordinációjukat.

5.3.5 Képrögzítés és mintavétel az SNc területén

Az SNc területén többcsatornás felvételeket rögzítettünk, egységesen alkalmazott paraméterekkel. A fluoreszcens jeleket három csatornán rögzítettük: vörös (KAT-2; Cy3; Ex: 548 nm, Em: 570–640 nm), zöld (TH; Alexa Fluor™ 488; Ex: 493 nm, Em: 500–550 nm) és kék (DAPI; Ex: 353 nm, Em: 420–470 nm). Minden csoportban három biológiai replikátumból öt nem átfedő mikroszkópos mezőt rögzítettünk technikai replikátumként.

5.3.6 Kvantitatív képanalízis

A kvantitatív képelemzést FIJI/ImageJ környezetben (v2.14.0/1.54p) végeztük. A többcsatornás képekből a vörös (KAT-2) és zöld (TH) csatornákat különválasztottuk, majd az elemzést az SNc területét körülhatároló régió (region of interest, ROI) belül végeztük egységes eljárással. A jelintenzitást a ROI teljes integrált denzitása alapján határoztuk meg. A pozitív területek meghatározásához csatornánként automatikus Otsu-küszöbölést alkalmaztunk, és a bináris maszkokon számítottuk a TH-pozitív és KAT-2-pozitív területek nagyságát.

5.3.7 Statisztikai analízis

A statisztikai elemzés egységét a biológiai replikátumok képezték ($n = 3$ állat csoportonként). Minden állat esetében az öt technikai replikátumból származó értékeket számtani átlaggal egyesítettük; az adatállomány megtalálható a Függelékben **(F3–F4. táblázatok)**. A technikai replikátumokat nem kezeltük független adatpontokként. A különböző kezelési csoportok közötti eltéréseket GraphPad Prism szoftverrel (v10.6.1; GraphPad Software) vizsgáltuk egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc tesztek alkalmazásával. Az eredményeket átlag $\pm$ szórás (SD) formájában adtuk meg, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak; a vizsgálatból egyetlen technikai vagy biológiai replikátum sem került kizárásra.

A TH és KAT-2 expressziójának változásai közötti összefüggések vizsgálatához a biológiai replikátumok átlagolt értékein egyszerű lineáris regressziót alkalmaztunk. A jelintenzitási és jelterületi paraméterek között egyetlen regressziós modellt illesztettünk a teljes adatállományra, meghatározva az illesztett egyenes meredekségét, a modell determinációs együtthatóját (R^2), és a regresszió szignifikanciáját (p -érték). A regresszió grafikus megjelenítés során az adatpontokat szórásdiagramként jelenítettük meg, a teljes adatállományra illesztett regressziós egyenessel és annak konfidenciaintervallumával.

6 A kísérletekben való részvétel

A kísérletes munka során az alábbi vizsgálatokat és feladatokat végeztem:

- *in vivo* kezelések és az állatok monitorozása,
- agyszövet-preparálás,
- fluoreszcens immuncitokémiai és immunhisztokémiai eljárások kivitelezése,
- mikroszkópos felvételek készítése és feldolgozása,
- képi adatok kvantitatív kiértékelése,
- adatfeldolgozás és statisztikai elemzés,
- eredmények vizualizálása, ábrák és táblázatok szerkesztése.

A primer sejtenyészetek izolálását együttműködő kutatócsoportok végezték: az asztrociták izolálását Prof. Dr. Krizbai István kutatócsoportja, a mikroglia izolálását Prof. Dr. Farkas Eszter kutatócsoportja, a neuronok izolálását pedig Prof. Dr. Sántha Miklós kutatócsoportja végezte.

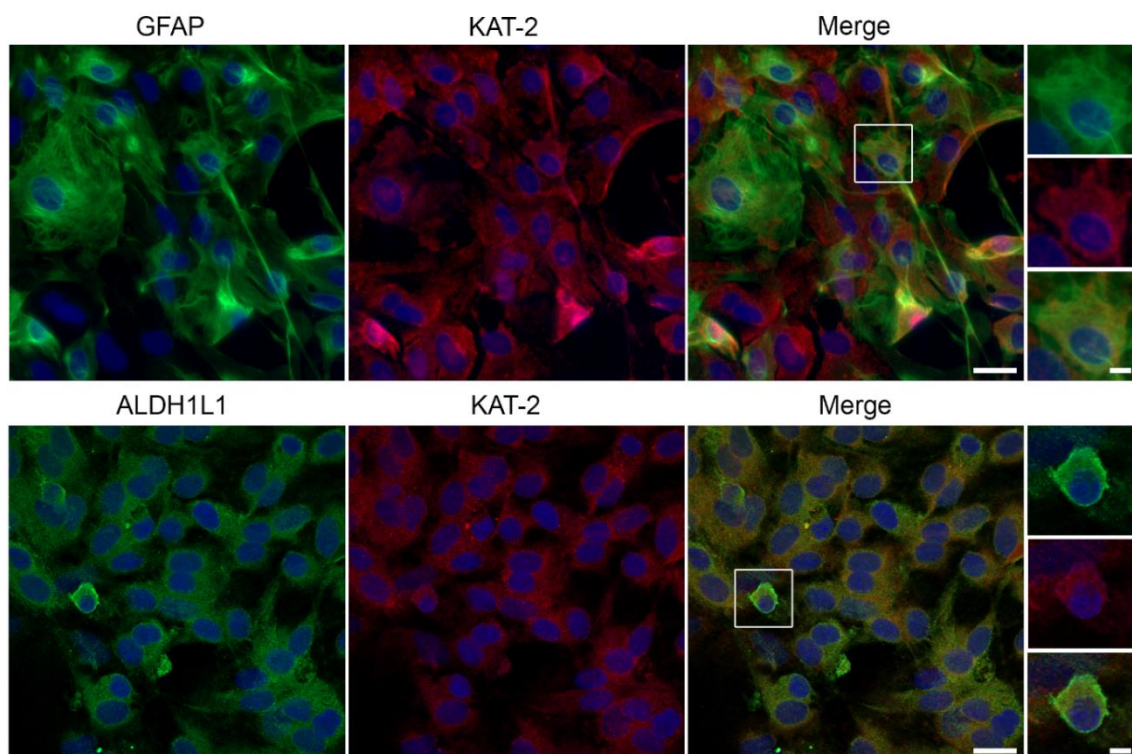
7 Eredmények

7.1 KAT-2 fehérje expresszió primer sejtenyészetekben

In vitro kísérleteinkben egéragy-eredetű primer sejtenyészeteken fluoreszcens immuncitokémia alkalmazásával azonosítottuk a KYNA-termelésben részt vevő, KAT-2 enzimet expresszáló sejteket. Vizsgálataink lehetővé tették az enzim sejtípus-specifikus expressziójának részletes feltérképezését az agy három fő sejtípusában: asztrocitákban, mikrogliaokban és neuronokban. A kettős immunjelölések alapján meghatároztuk, hogy a KAT-2 milyen mértékben társul az egyes sejtpopulációk markereivel.

7.1.1 KAT-2 expresszió primer asztrocita tenyészetben

Az asztrocita-markerek, a citoszkeleton részét képező GFAP és a jellegzetes enzimaktivitása révén asztrocita-specifikus ALDH1L1, együttesen megbízhatóan azonosították az asztrocitákat a primer tenyészetekben. A markerek KAT-2 jellel mutatott kolokalizációja egyértelműen igazolta az enzim jelenlétét az asztrocitákban (**7. ábra**).



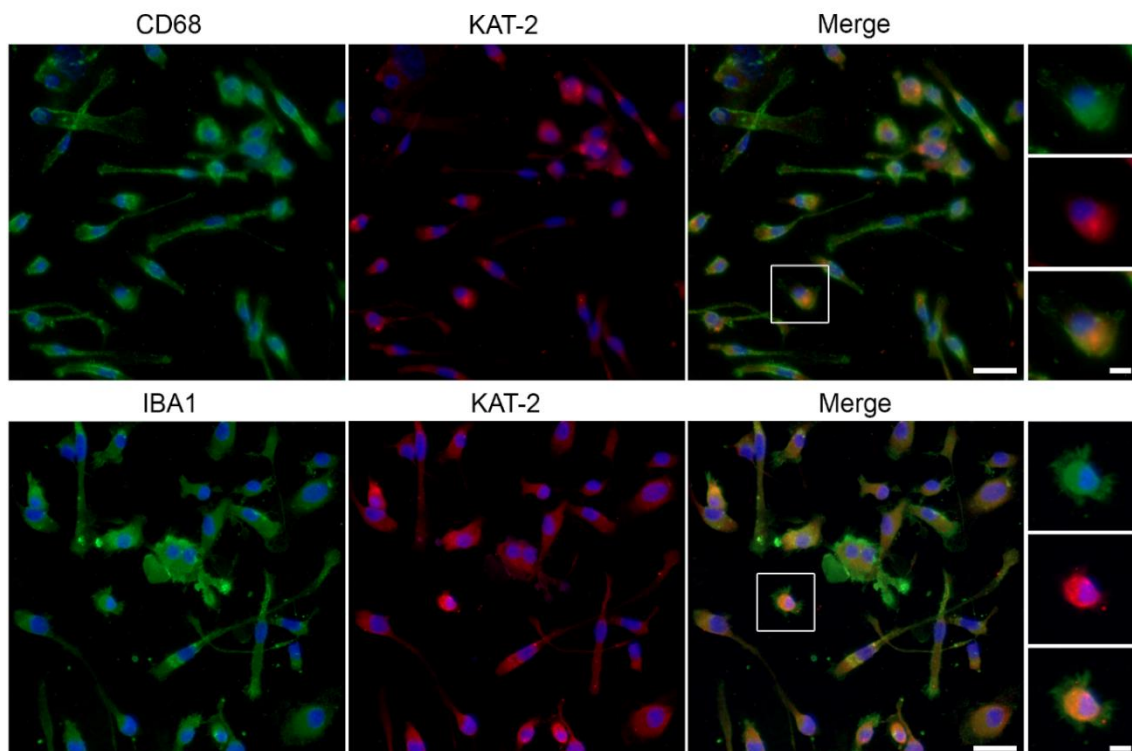
7. ábra: A KAT-2 expressziója primer asztrocita tenyészetekben. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunjelölését mutatják az asztrocita markerekkel (GFAP vagy ALDH1L1). A fehér négyzettel jelölt területek kétszeres nagyításban láthatók a jobb paneleken. Vörös: KAT-2; zöld: GFAP, ALDH1L1; kék: DAPI. Skála: 20 μ m (fő panelek), 5 μ m (jobb panelek).

Bár a KAT-2 fluoreszcencia-intenzitása sejtenként változó volt, a legtöbb asztrocitában kimutatható volt, elsősorban a szómában, ahol a jel gyakran perinukleáris mintázatot mutatott, míg a nyúlványokban csak gyenge jelölés volt megfigyelhető.

Megfigyeltünk olyan KAT-2⁺/GFAP⁻ sejteket is, amelyek morfológiájuk alapján egyértelműen asztrocitáknak felelnek meg. Ezekben a sejtekben feltehetően alacsony a GFAP-expresszió szintje, ami összhangban áll a korábban primer asztrocitákban leírt heterogén GFAP-expressziós mintázattal (Puschmann és mtsai. 2010). Az ALDH1L1-jelölés esetében ez a jelenség nem volt prominens, mivel ez a fehérje stabilabban és magasabb szinten fejeződik ki az asztrocitákban.

7.1.2 KAT-2 expresszió primer mikroglia tenyészetben

A mikroglia-markerek, a fagocitáló sejtekre jellemző CD68, valamint a fajlagosabb IBA1, megbízhatóan azonosították a mikroglia sejteket a primer tenyészetekben. A markerek jelentős mértékű kolokalizációja a KAT-2 jellel valamennyi mikroglia sejten igazolta az enzim jelenlétét a vizsgált sejttypusban (**8. ábra**).



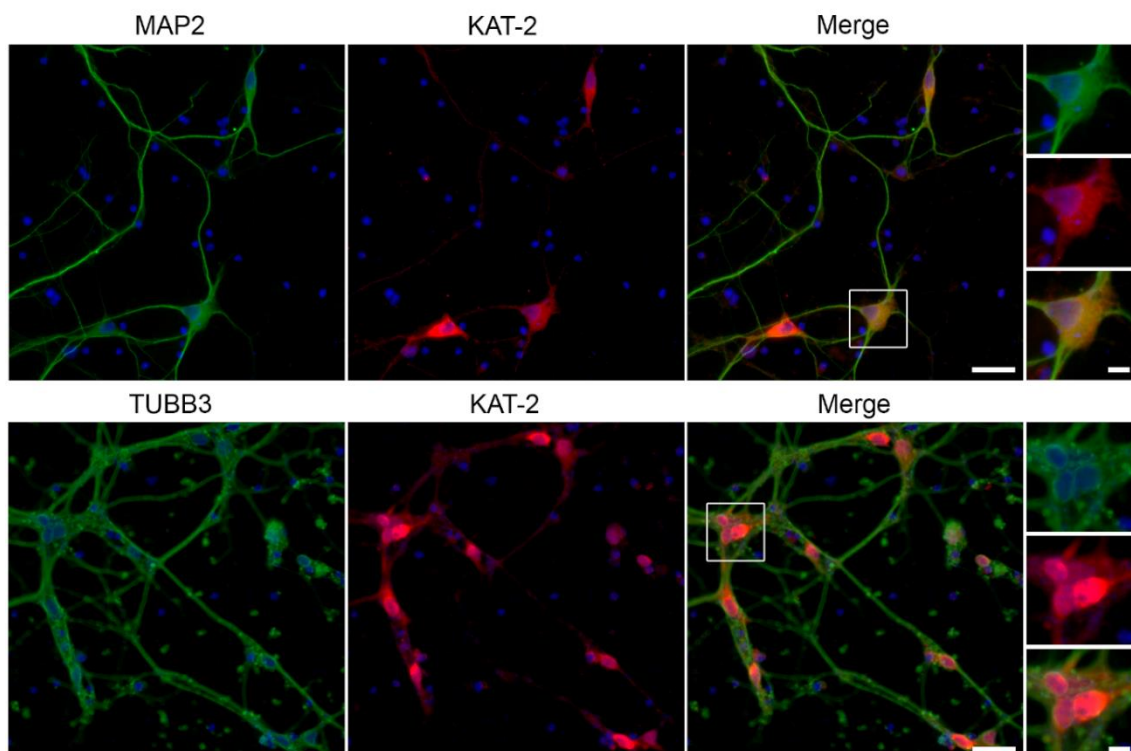
8. ábra: A KAT-2 expressziója primer mikroglia tenyészetekben. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunjelölését mutatják a mikroglia markerekkel (CD68 vagy IBA1). A fehér négyzettel jelölt területek kétszeres nagyításban láthatók a jobb paneleken. Vörös: KAT-2; zöld: CD68, IBA1; kék: DAPI. Skála: 20 μ m (fő panelek), 5 μ m (jobb panelek).

A KAT-2 immunjelölési mintázata hasonló volt az asztrocitákban megfigyelthez: a fluoreszcencia főként a sejttestekre koncentrálódott, a nyúlványokban többnyire gyenge vagy hiányzó, néhány sejtben azonban valamivel erősebb jelölés volt látható.

In vivo a mikroglia sejtek jellemzően erősen elágazó, ramifikált morfológiát mutatnak, míg *in vitro* körülmények között gyorsan amőboid, fagocitáló formát vesznek fel (Suzumura és mtsai. 1991). Primer tenyészeinkben amőboid és pálcika morfológiájú mikrogliaák egyaránt megfigyelhetők voltak, ami összhangban áll az *in vitro* környezet által kiváltott fenotípusos variabilitással.

7.1.3 KAT-2 expresszió primer neuron tenyészetben

A neuronális markerek, a dendritekhez és sejttestek mikrotubulusaihoz kötődő MAP2, valamint a neuronális citoszkeleton meghatározó komponensét képező TUBB3, együttesen megbízhatóan megerősítették a sejtek neuronális eredetét a primer tenyészetekben. A markerek KAT-2 jellel mutatott kollokalizációja egyértelműen igazolta az enzim jelentős expresszióját az idegsejtekben (9. ábra).



9. ábra: A KAT-2 expressziója primer neuron-tenyészetekben. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunjelölését mutatják a neuronális markerekkel (MAP2 vagy TUBB3). A fehér négyzettel jelölt területek kétszeres nagyításban láthatók a jobb paneleken. Vörös: KAT-2; zöld: MAP2, TUBB3; kék: DAPI. Skála: 20 μm (fő panelek), 5 μm (jobb panelek).

Összességében megfigyeléseink alapján a KAT-2 jelölés elsősorban a sejttestekben koncentrálódott, ahol túlnyomórészt perinukleáris eloszlást mutatott. Ugyanakkor gyengébb, de egyértelmű jelölés a dendritek proximális szakaszain is megfigyelhető volt, ami az idegsejtek esetében bizonyult a legkifejezettebbnek.

A KAT-2 és sejtípus-specifikus markerek (GFAP, ALDH1L1, CD68, IBA1, MAP2, TUBB3) kettős immunjelölése kvalitatív módon igazolta, hogy az enzim expressziója asztrocitákban, mikroglia sejtekben és neuronokban egyaránt detektálható. Ez a KAT-2 széles sejtípus-spektrumú jelenlétét támasztja alá a vizsgált primer tenyészetekben.

A kettős jelölések élesen elkülönülő és technikailag jól értékelhető fluoreszcens mintázatot adtak, amely megfelelő alapot biztosított a kvantitatív elemzésekhez. A negatív kontrollmintákban, ahol az elsődleges antitestek alkalmazását elhagytuk, nem jelentkezett jelölés, az autofluoreszcencia mértéke pedig elhanyagolhatónak bizonyult.

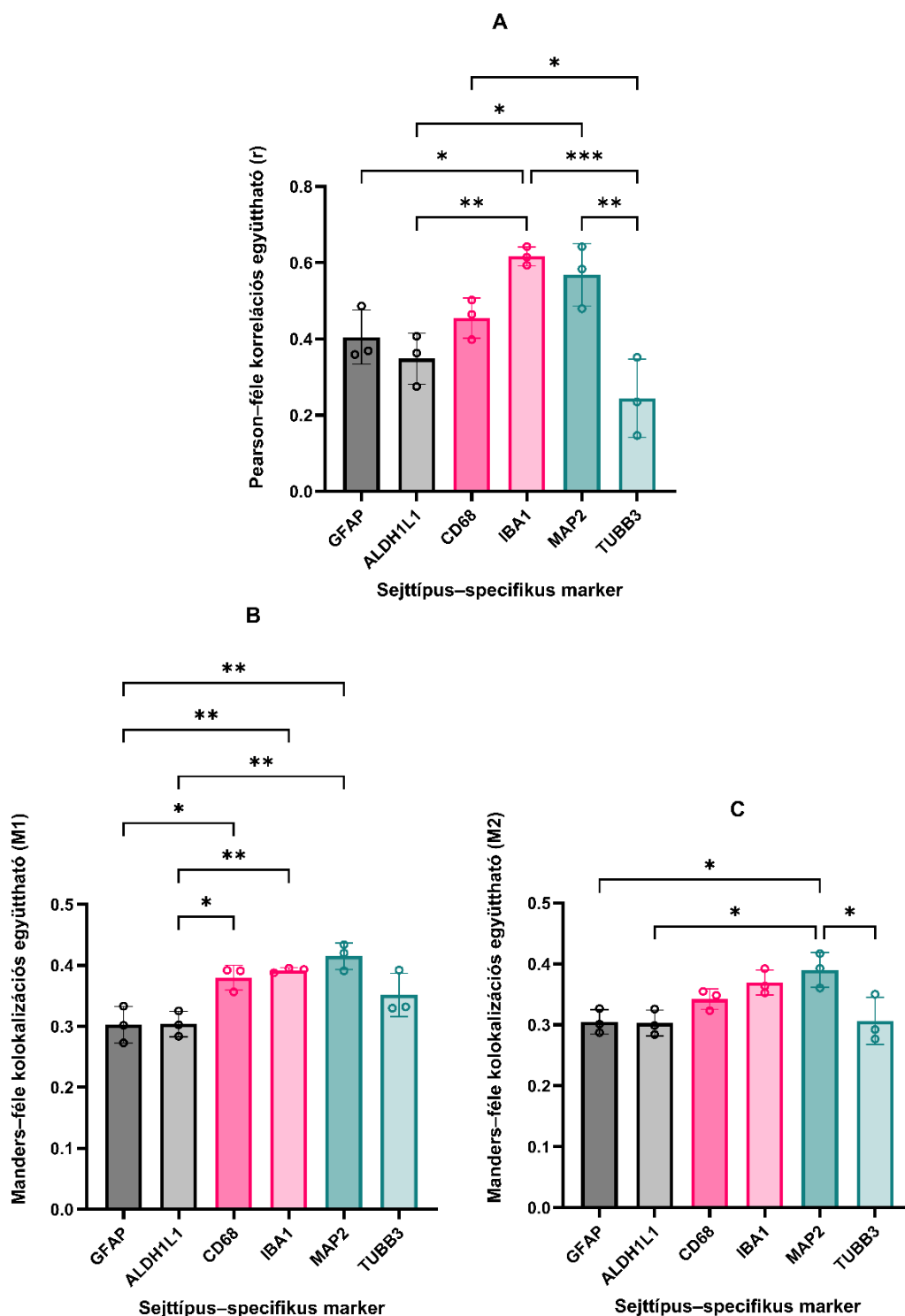
7.1.4 Kvantitatív kolokalizációs analízis

A KAT-2 és az agy fő sejtípusai közötti kapcsolat számszerű jellemzésére kvantitatív kolokalizációs elemzést végeztünk mind a hat alkalmazott sejtípus-specifikus marker (GFAP, ALDH1L1, CD68, IBA1, MAP2 és TUBB3) esetében. A vizsgálat célja a korábbi kvalitatív megfigyelések objektív numerikus paraméterekkel való alátámasztása, valamint a KAT-2 jel sejtípusonkénti társulásának összehasonlíthatóvá tétele volt.

A kvantitatív elemzés során a fluoreszcens jelek közötti térbeli együttjárást standard kolokalizációs metrikák, köztük a Pearson-féle korrelációs együttható (r érték), valamint a Manders-féle kolokalizációs együtthatók ($M1$ és $M2$ értékek) alkalmazása alapján értékeltük. Ezek lehetővé teszik a jelintenzitások közötti kapcsolat és a jelátfedés mértékének objektív számszerűsítését.

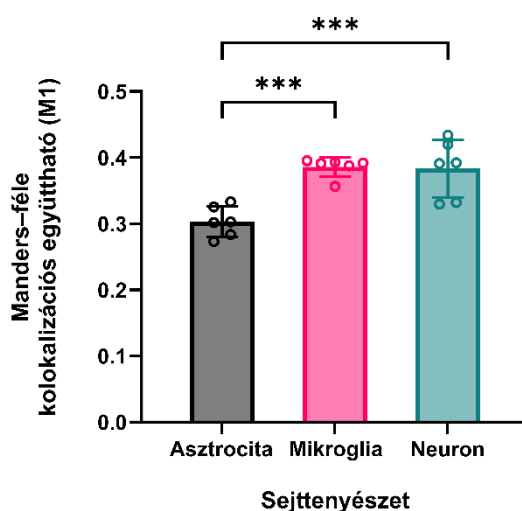
Az elemzések során a Pearson-féle korrelációs együtthatók ($r = 0,24–0,62$), valamint a Manders-féle kolokalizációs együtthatók ($M1 = 0,30–0,42$; $M2 = 0,30–0,39$) minden vizsgált adathalmazban a pozitív tartományban helyezkedtek el (**10. ábra**).

Ezek az értékek következetesen igazolták, hogy a KAT-2 és a sejtípus-specifikus markerek között fennáll a térbeli társulás. A Costes-féle randomizációs teszt minden vizsgált esetben statisztikailag szignifikáns kolokalizációt igazolt ($p < 0,001$ minden ismétlésben), ami megerősítette, hogy a detektált együttjárás nem tulajdonítható véletlenszerű pixelátfedésnek.



10. ábra: A KAT-2 és a sejttípus-specifikus markerek kolokalizációjának kvantitatív értékelése primer asztrocita-, mikroglia- és neuronális kultúrákban. A kolokalizációt három különböző metrikával vizsgáltuk: Pearson-féle korrelációs együttható (A panel), valamint Manders-féle M1 (B panel) és M2 (C panel) koefficiens. Az eredmények markerenként kerültek ábrázolásra: asztrociták esetében GFAP és ALDH1L1, mikroglia-k esetében CD68 és IBA1, neuronoknál MAP2 és TUBB3. Az oszlopok az átlag $\pm$ szórás (SD) értékeit mutatják ($n = 3$ markerenként). A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc tesztek alapján határoztuk meg (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Összességében eredmények igazolják a KAT-2 stabil, sejttípus-specifikus markerekhez való társulását. A paraméterek közül a Manders-féle M1 értéket tekintettük a leginkább informatívnak, mivel ez tükrözi legjobban a KAT-2 jel marker-pozitív területeken belüli arányát. Az M1 értékek nagyfokú egyezést mutattak az azonos sejtvonalhoz tartozó markerek között (asztrocita: GFAP vs. ALDH1L1 = $0,30 \pm 0,02$ vs. $0,30 \pm 0,02$; mikroglia: CD68 vs. IBA1 = $0,38 \pm 0,02$ vs. $0,39 \pm 0,00$; neuron: MAP2 vs. TUBB3 = $0,42 \pm 0,02$ vs. $0,35 \pm 0,04$; egyutas ANOVA, $p > 0,05$). Ezáltal lehetővé vált a KAT-2 eloszlás általános mintázatának összesített ábrán való szemléltetése (**11. ábra**).

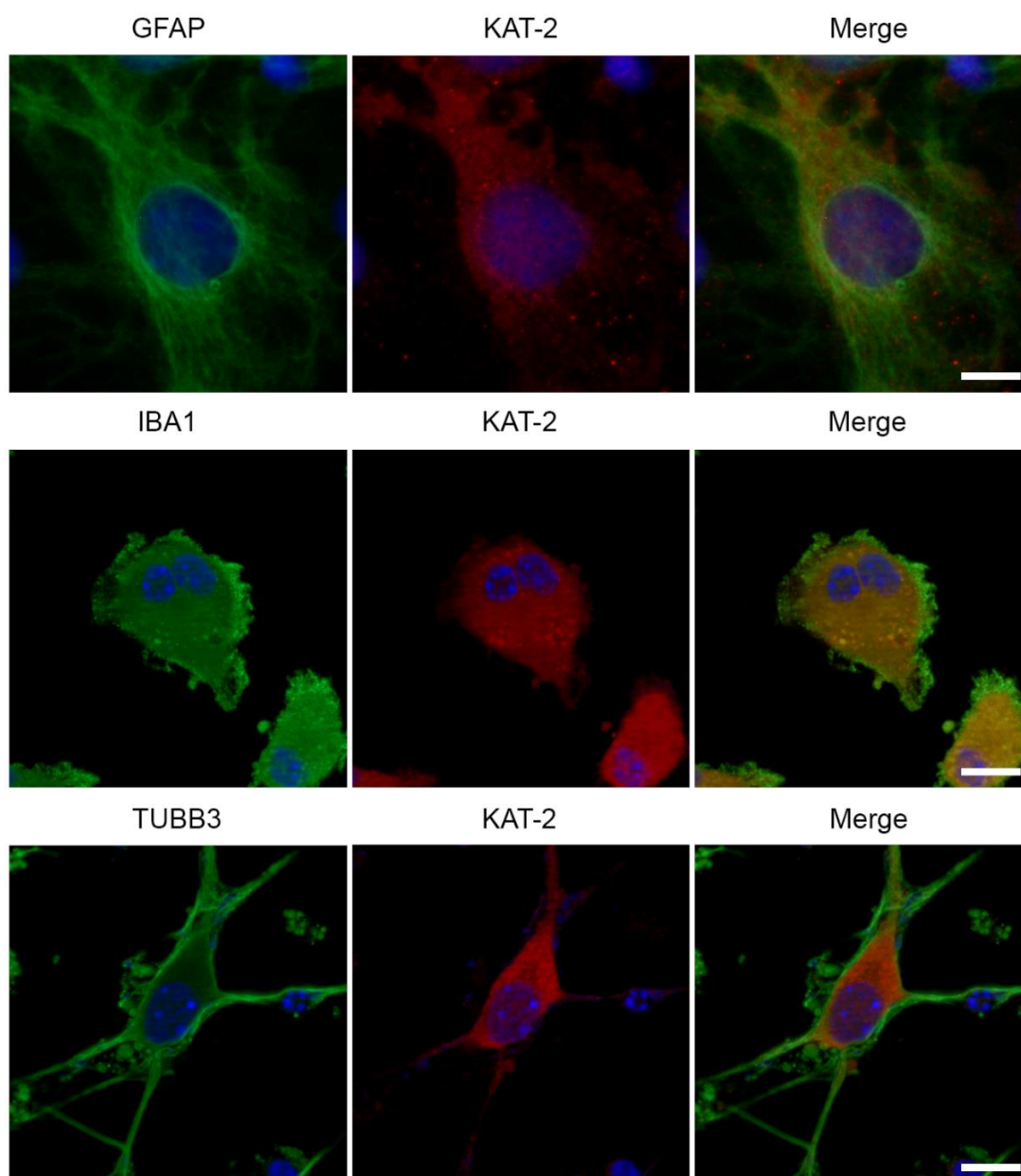


11. ábra: A KAT-2 kolokalizáció kvantitatív elemzése primer asztrocita-, mikroglia- és neuronális kultúrákban. A Manders-féle M1 együtthatókat sejttípusonként átlagoltuk, két marker kombinálásával (GFAP + ALDH1L1 az asztrocitákhoz; CD68 + IBA1 a mikrogliákhoz; MAP2 + TUBB3 a neuronokhoz). Az oszlopok az átlag ± szórás (SD) értékeit mutatják ($n = 6$ sejttípusonként). Az egyedi adatpontok (csoportonként hat érték) a biológiai variabilitást szemléltetik. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc tesztek alapján határoztuk meg ($***p < 0,001$).

Az összesített eredmények szignifikáns különbségeket mutattak az asztrociták, mikrogliák és neuronok között (egyirányú ANOVA, $F(2,15) = 14,91$, $p = 0,0003$). Az átlagos M1 értékek az asztrociták esetében $0,30 \pm 0,02$, a mikrogliák esetében $0,39 \pm 0,02$, míg a neuronok esetében $0,38 \pm 0,02$ voltak. A Tukey-féle post hoc teszt alapján a KAT-2 kolokalizációja szignifikánsan magasabbnak bizonyult a mikrogliákban és a neuronokban az asztrocitákhoz képest ($p < 0,001$), míg a mikrogliák és neuronok között nem mutatkozott különbség ($p = 0,99$). A Pearson-féle korrelációs együtthatók ($r \approx 0,24-0,62$) és a Manders-féle M2 értékek ($\approx 0,30-0,39$) hasonló tendenciát mutattak, alátámasztva a kolokalizációs eredmények megbízhatóságát.

7.1.5 KAT-2 immunreaktivitás sejtszintű eloszlása

A nagy nagyítású felvételek lehetővé tették a KAT-2 eloszlásának sejtszintű vizsgálatát (**12. ábra**). A jelölés elsősorban az asztrociták, mikroglia és neuronok szómájában koncentrált, túlnyomórészt perinukleáris mintázatot mutatva. Ezek a kvalitatív megfigyelések összhangban állnak a kvantitatív elemzésekkel, és megerősítik a KAT-2 jellegzetes, sejtesthez kötött lokalizációját valamennyi vizsgált sejtípusban.



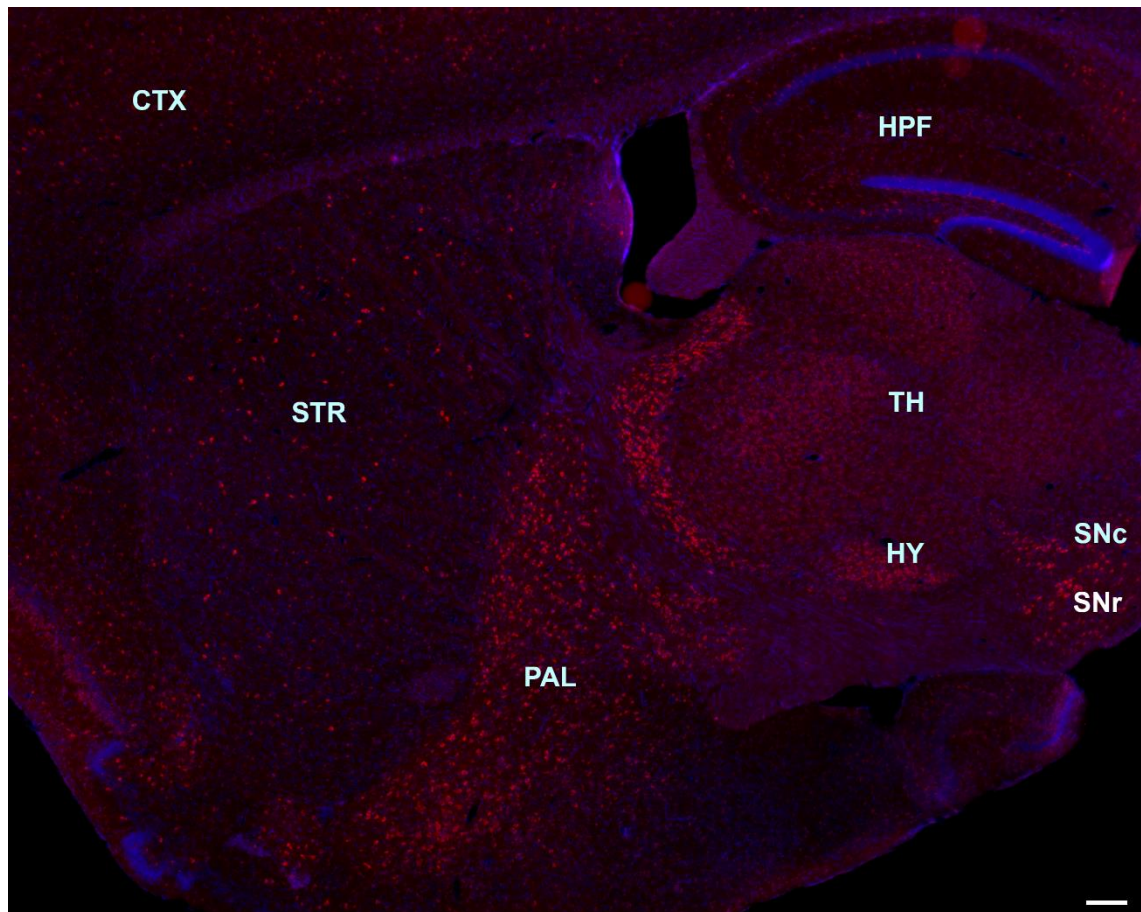
12. ábra: A KAT-2 immunreaktivitás nagy nagyítású felvételei primer asztrocita-, mikroglia- és neuronális sejtenyészetekben. A reprezentatív felvételek egy GFAP⁺ asztrocitát, egy IBA1⁺ mikroglia és egy TUBB3⁺ neuront ábrázolnak, amelyek KAT-2 expressziót mutatnak. Mindhárom sejtípus esetében a KAT-2 immunreaktivitás elsősorban a sejtestben lokalizálódott, a jel minimális mértékben terjedt ki a neuronális nyúlványokra. Vörös: KAT-2; zöld: GFAP, IBA1, TUBB3; kék: DAPI. Skála: 10 μm.

7.2 KAT-2 fehérje expresszió az előagy területén

Az előagy területén végzett *in situ* kísérletsorozat célja a KAT-2 fehérje expressziójának átfogó feltérképezése volt a szöveti környezetben. A vizsgálat az *in vitro* tenyészeteken kapott eredmények kiterjesztését és validálását szolgálta, lehetővé téve az enzim természetes szöveti szintű morfológiai és térbeli mintázatának, valamint annak neuroanatómiai és sejttípus-specifikus eloszlásának értékelését.

7.2.1 A KAT-2 expresszió regionális eloszlása az előagyban

A KAT-2 fehérje széles körű, régióként eltérő intenzitású immunreaktivitást mutatott az előagyban, ami az enzim neuroanatómiailag heterogén eloszlását igazolja (13. ábra).



13. ábra: A KAT-2 fehérje regionális eloszlása egér előagyban. A szagittális metszetről készült reprezentatív felvétel a KAT-2 immunreaktivitás kiterjedt, de régióként eltérő intenzitású expressziós mintázatát szemlélteti. Rövidítések: CTX: cerebrális kéreg, HPF: hippokampális formáció, STR: striátum, PAL: pallidum, TH: talamusz, HY: hipotalamusz, SNe: substantia nigra pars compacta, SNr: substantia nigra pars reticulata. Vörös: KAT-2; kék: DAPI. Skála: 200 µm.

A kortikális és limbikus struktúrákban a jelölődés kiterjedt volt, különösen a cerebrális kéreg és a hippocampális formáció területén. A neocortex teljes kiterjedésében kimutatható volt a KAT-2 expresszió, a kéreg valamennyi rétegében. A hippocampális és parahippocampális régiókban szintén intenzív jelölődés volt megfigyelhető. A talamuszban, különösen a retikuláris magban, magas KAT-2 expresszió volt jellemző. A hipotalamuszban, a szubtalamikus mag területén szintén egy sűrűn elhelyezkedő, erőteljesen pozitív sejtcsoport volt azonosítható.

A bazális ganglion-rendszerhez tartozó magcsoportokban a KAT-2 szintén kifejezett immunreaktivitást mutatott. A striátumban, különösen a caudoputamen régióban, kiterjedt, közepes intenzitású jelölődés volt látható, amelyet szórványosan előforduló, nagyobb méretű, erősen festődő sejtek kísérték. A nucleus accumbensben ezzel szemben mérsékeltebb jelintenzitás volt jellemző, az amygdala területén pedig csak elszórtan voltak KAT-2⁺ sejtek azonosíthatók. A pallidum struktúrái, köztük a globus pallidus externa és interna, valamint a substantia innominata, nagyszámú, intenzíven jelölt sejtet tartalmaztak. A középagyban elhelyezkedő, de a bazális ganglionok rendszerének funkcionális részét képező substantia nigra pars compacta (SNc) és substantia nigra pars reticulata (SNr) területén egyaránt erős KAT-2 immunreaktivitás volt kimutatható.

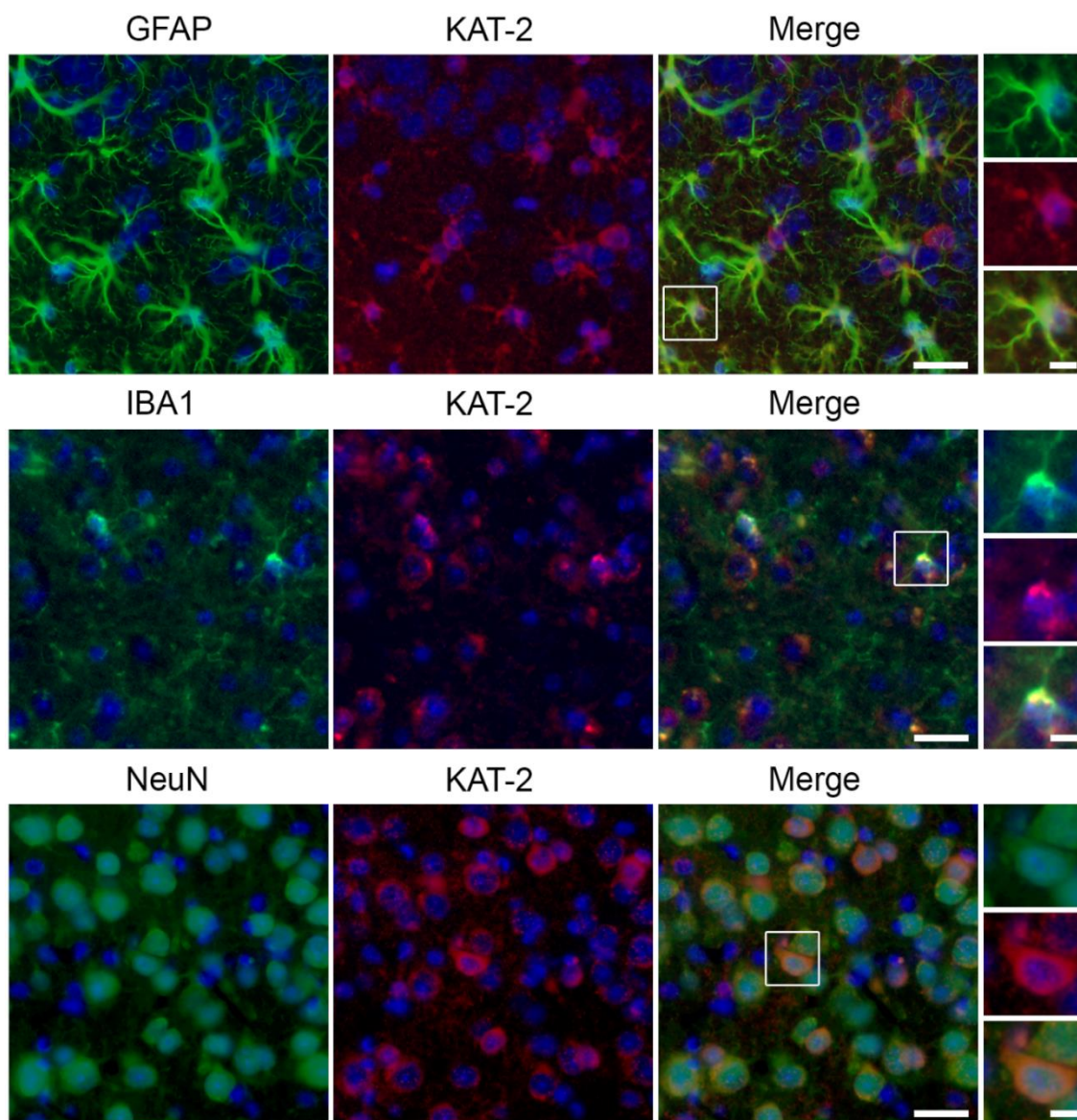
Összességében megállapítható, hogy a KAT-2 expresszió kiterjed mind a kognitív és szinaptikus integrációban érintett kortikális és limbikus struktúrákra, mind a motoros és motivációs szabályozásban szerepet játszó szubkortikális magcsoportokra.

Számos agyterületen jellegzetes, régióspecifikus mintázatot mutató KAT-2⁺ neuronpopulációk voltak azonosíthatók, amelyek morfológiai és neurokémiai jellemzése a **7.4. fejezetben** kerül részletesen bemutatásra.

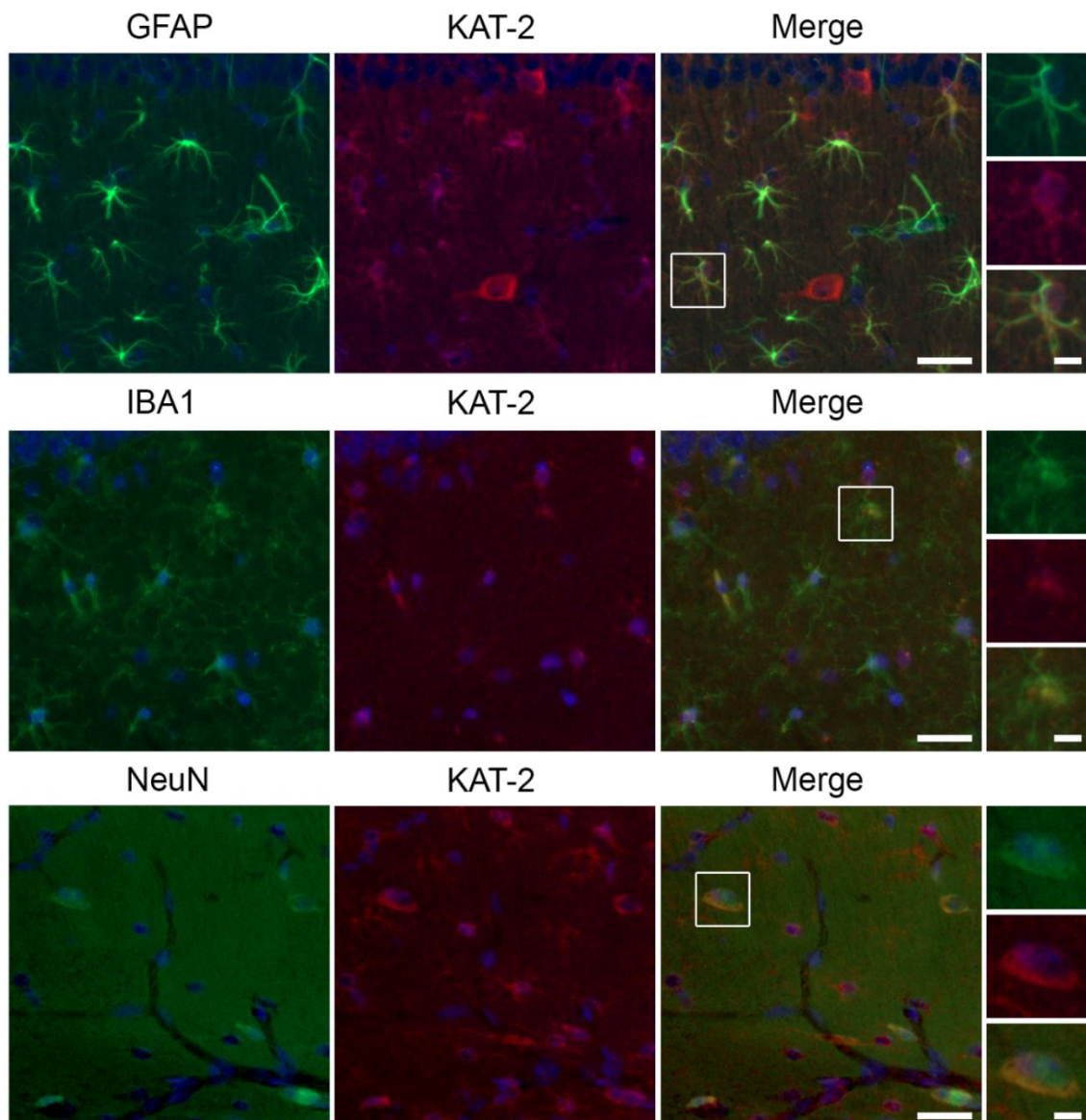
7.2.2 A KAT-2 sejttípus-specifikus expressziója az előagyban

Az *in vitro* kísérletek igazolták, hogy a KAT-2 enzim mindhárom fő agyi sejttípusban, így asztrocitákban, mikrogliaokban és neuronokban is kifejeződik. A sejtenyészeteken kapott adatok ugyanakkor csak korlátozottan tükrözik a sejtek természetes, szöveti környezetben megjelenő morfológiáját és interakcióit. A vizsgálat célja az volt, hogy feltérképezzük a KAT-2 sejttípus-specifikus eloszlását, és meghatározzuk, hogy az *in vitro* rendszerekben megfigyelt expressziós mintázat mennyiben tükröződik *in situ* agyszöveti környezetben.

Megfigyeléseink során a KAT-2 expressziója több előagyú struktúrában is kimutatható volt mindhárom fő sejttípusban. A továbbiakban a prefrontális kéreg (14. ábra) és a hippocampusz (15. ábra) vizsgálati eredményeit ismertetjük. Ezen régiók patkány- és humán agyszövetben is a KAT-2 expresszió kiemelt területeinek bizonyultak, ahol a KYNA-szint és a KAT-aktivitás változásait is igazolták korábbi vizsgálatokban, több központi idegrendszert érintő kórkép patomechanizmusával összefüggésben.



14. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér prefrontális kéregben. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunfluoreszcens jelölését mutatják az asztrocita (GFAP), a mikroglia (IBA1) és a neuronális (NeuN) markerekkel. A koronális metszetek a mediális prefrontális kéregből származnak (Bregma +2,0 mm). A fehér négyzettel jelölt területek kétszeres nagyításban láthatók a jobb paneleken. Vörös: KAT-2; zöld: GFAP, IBA1, NeuN; kék: DAPI. Skála: 20 μ m (fő panelek), 5 μ m (jobb panelek).



15. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér hippocampusban. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunfluoreszcens jelölését mutatják az asztrocita (GFAP), a mikroglia (IBA1) és a neuronális (NeuN) markerekkel. A koronális metszetek a dorzális hippocampus CA1 régiójából származnak (Bregma $-2,0$ mm). A fehér négyzettel jelölt területek kétszeres nagyításban láthatók a jobb paneleken. Vörös: KAT-2; zöld: GFAP, IBA1, NeuN; kék: DAPI. Skála: $20\ \mu\text{m}$ (fő panelek), $5\ \mu\text{m}$ (jobb panelek).

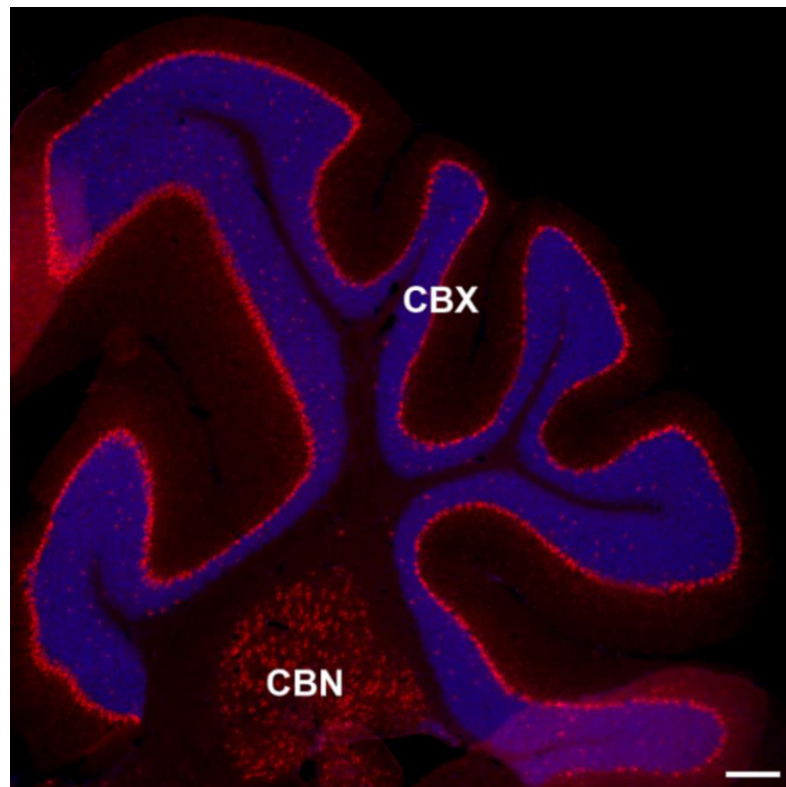
Mind a prefrontális kéregben, mind a hippocampusban kimutatható volt a KAT-2 expresszió mindhárom fő agyi sejtípusban. Az asztrocitákban és a neuronokban a fehérje eloszlása nagymértékben megfelelt az *in vitro* megfigyelteknek, elsősorban a sejttestben lokalizálódva és diffúz mintázatot mutatva. A mikroglia sejtek esetében ezzel szemben eltérések voltak megfigyelhetők: a KAT-2 pozitivitást mutató sejtek száma alacsonyabb volt, az immunjel pedig gyengébb és sejten belül pontszerű mintázatot mutatott, a szóma egészére kiterjedő eloszlás helyett, az *in vitro* megfigyelésekkel ellentétben.

7.3 KAT-2 fehérje expresszió a kisagy területén

A kisagy területén végzett fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok célja a KAT-2 enzim szöveti eloszlásának részletes feltérképezése volt a cerebelláris kéreg és a cerebelláris magvak területén. A nagyagyú kísérletekhez hasonlóan itt is arra törekedtünk, hogy kiterjesszük az *in vitro* tenyészeteken kapott sejttípus-specifikus eredményeket *in situ* szöveti környezetben, és meghatározzuk, hogy a KAT-2 neuroanatómiai és sejttípus-specifikus eloszlása miként jelenik meg a kisagy eltérő funkcionális régióiban.

7.3.1 A KAT-2 expresszió rétegspecifikus eloszlása a kisagyban

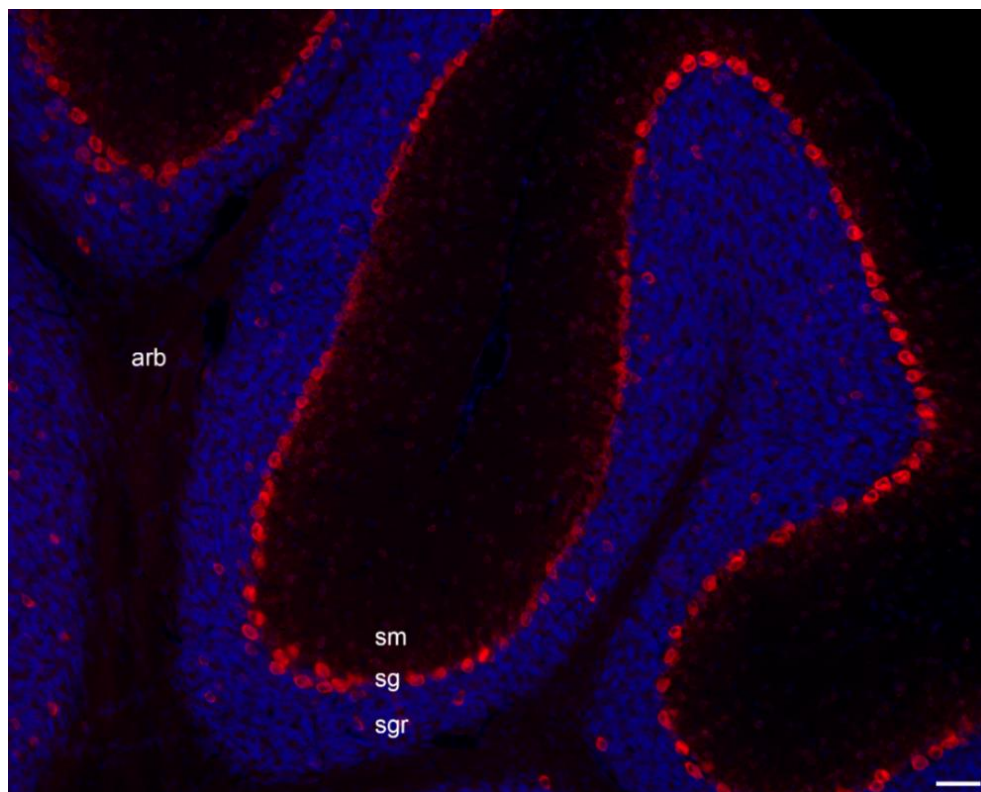
A kisagy területén a KAT-2 immunreaktivitás jól megfigyelhető volt mind a cerebelláris kéregben, mind a cerebelláris magvakban (**16. ábra**).



16. ábra: A KAT-2 fehérje regionális eloszlása egér kisagyban. A szagittális metszetről készült reprezentatív felvétel a KAT-2 immunreaktivitás kiterjedt, de régióként eltérő intenzitású expressziós mintázatát szemlélteti. Rövidítések: CBX: cerebelláris kéreg, CBN: cerebelláris magvak. Vörös: KAT-2; kék: DAPI. Skála: 200 μ m.

A kisagykéregben a KAT-2 jelölés a szürkeállomány teljes kiterjedésében megjelent, míg a fehérállományban csak szórványosan volt kimutatható. A kisagyi magvakban nagyszámú, erős immunreaktivitást mutató KAT-2⁺ sejt volt jelen, amelyek jellegzetes, kompakt sejtcsoportokba rendeződtek.

A kisagykéreg rétegzett szerveződése egyértelműen tükröződött a KAT-2 eloszlásában is: mindhárom réteg jellegzetes KAT-2 mintázatot mutatott (**17. ábra**).



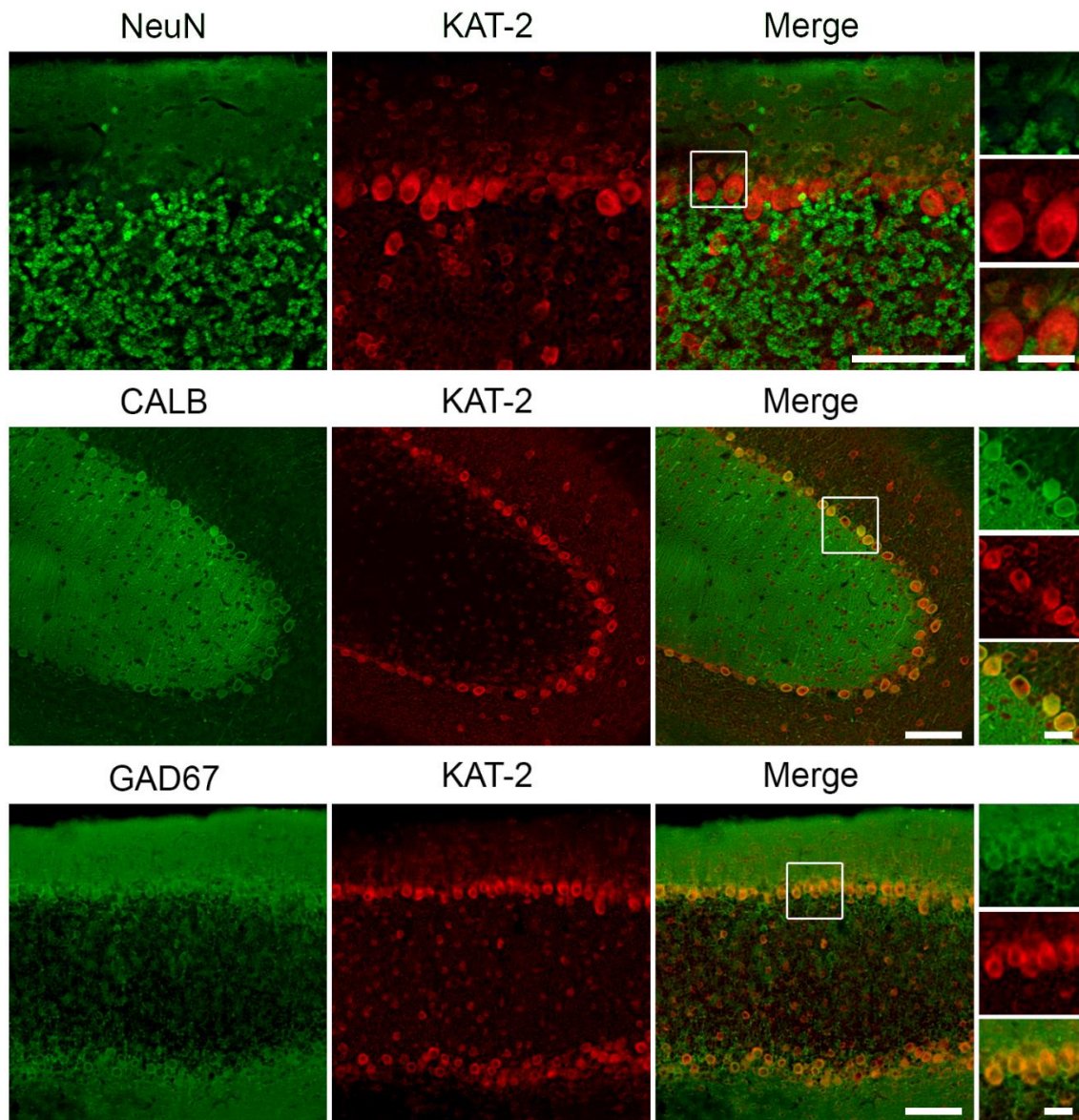
17. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér kisagy fehér- és szürkeállományában. A reprezentatív felvétel a kisagyfélteke ansiform lebenyének területéről származik. Rövidítések: sm: stratum moleculare, sg: stratum ganglionare, sgr: stratum granulosum, arb: arbor vitae. Vörös: KAT-2; kék: DAPI. Skála: 50 μ m.

A molekuláris rétegben (stratum moleculare) nagyszámú, szórtan elhelyezkedő, alacsonyabb jelintenzitást mutató sejt volt látható, amelyek eloszlása a réteg teljes vastagságában egyenletesnek bizonyult. A Purkinje-sejtek rétegében (stratum ganglionare) egysoros elrendeződésben jelentek meg a nagy számaméretű, erős immunreaktivitást mutató sejtek, amelyek a kisagykéreg legmarkánsabb KAT-2⁺ populációját alkották. Ezen sejtek esetében a jelölés nemcsak a számára korlátozódott, hanem gyakran a dendritfa proximális szakaszait is követte. A szemcsesejt rétegben (stratum granulosum) a molekuláris réteghez képest kisebb számú, de intenzív jelölést mutató sejt fordult elő.

Összességében megállapítható, hogy a KAT-2 expresszió a kisagykéregben jól követi a lamináris szerveződés funkcionális és sejtmorfológiai sajátosságait. A kisagykéregben jellegzetes, rétegspecifikus mintázatot mutató, egyértelműen neuronális KAT-2⁺ sejtpopulációk voltak azonosíthatók.

7.3.2 KAT-2 expresszió neuronokban

A szürkeállományban detektált KAT-2 pozitivitást mutató sejtek többsége morfológiai jellemzőik és rétegbeli elhelyezkedésük alapján neuronális eredetűnek bizonyult. Ennek igazolására KAT-2 és neuronális markerek (NeuN, CALB, GAD67) kettős fluoreszcens immunjelölését alkalmaztuk (**18. ábra**).



18. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér kisagy területén. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunjelölését mutatják a neuronális markerrel (NeuN, CALB, GAD67). A koronális metszet a dorzális neocerebellum területéről származnak (Bregma $-6,0$ mm). A fehér négyzettel jelölt területek kétszeres nagyításban láthatók a jobb paneleken. Vörös: KAT-2; zöld: NeuN, CALB, GAD67. Skála: $120\ \mu\text{m}$ (fő panelek), $30\ \mu\text{m}$ (jobb panelek).

A NeuN marker alkalmazásával a molekuláris és a szemcsesejt rétegben eltérő méretű és morfológiájú KAT-2⁺ neuronok voltak megfigyelhetők. A Purkinje-sejtek rétegében megjelenő, nagy szómaméretű és erősen KAT-2⁺ sejtek NeuN negativitása összhangban áll azzal, hogy ezek a sejtek nem expresszálják a NeuN fehérjét (Mullen és mtsai. 1992). A Purkinje-sejtek pontos azonosításához további neuronális markereket alkalmaztunk: a CALB és a GAD67 jelölések egyaránt detektálhatók voltak a sejtestekben és a dendritikus arborizációban.

Mivel a GAD67 a gátló idegsejtekben általánosan expresszált enzim, jelölése a kisagykéreg több rétegének GABAerg neuronjaiban is detektálható volt. A molekuláris rétegben kisebb sejtestű, szórtan elhelyezkedő KAT-2⁺/GAD67⁺ sejtek jelentek meg, amelyek morfológiai jellemzőik alapján feltehetően kosár- és csillagsejtek. A szemcsesejt rétegben nagy sejtestű KAT-2⁺/GAD67⁺ sejtek is láthatók voltak, amelyek méretük és elhelyezkedésük alapján Golgi-sejtekként azonosíthatók.

A szemcsesejt rétegben KAT-2⁺/NeuN⁺, ugyanakkor KAT-2⁺/GAD67⁻ sejtek is jelen voltak. Ezek kis méretű, sűrűn elhelyezkedő sejtek, amelyek morfológiájuk és rétegen belüli eloszlásuk alapján a kisagykéreg glutamáterg szemcsesejtjeinek felelnek meg.

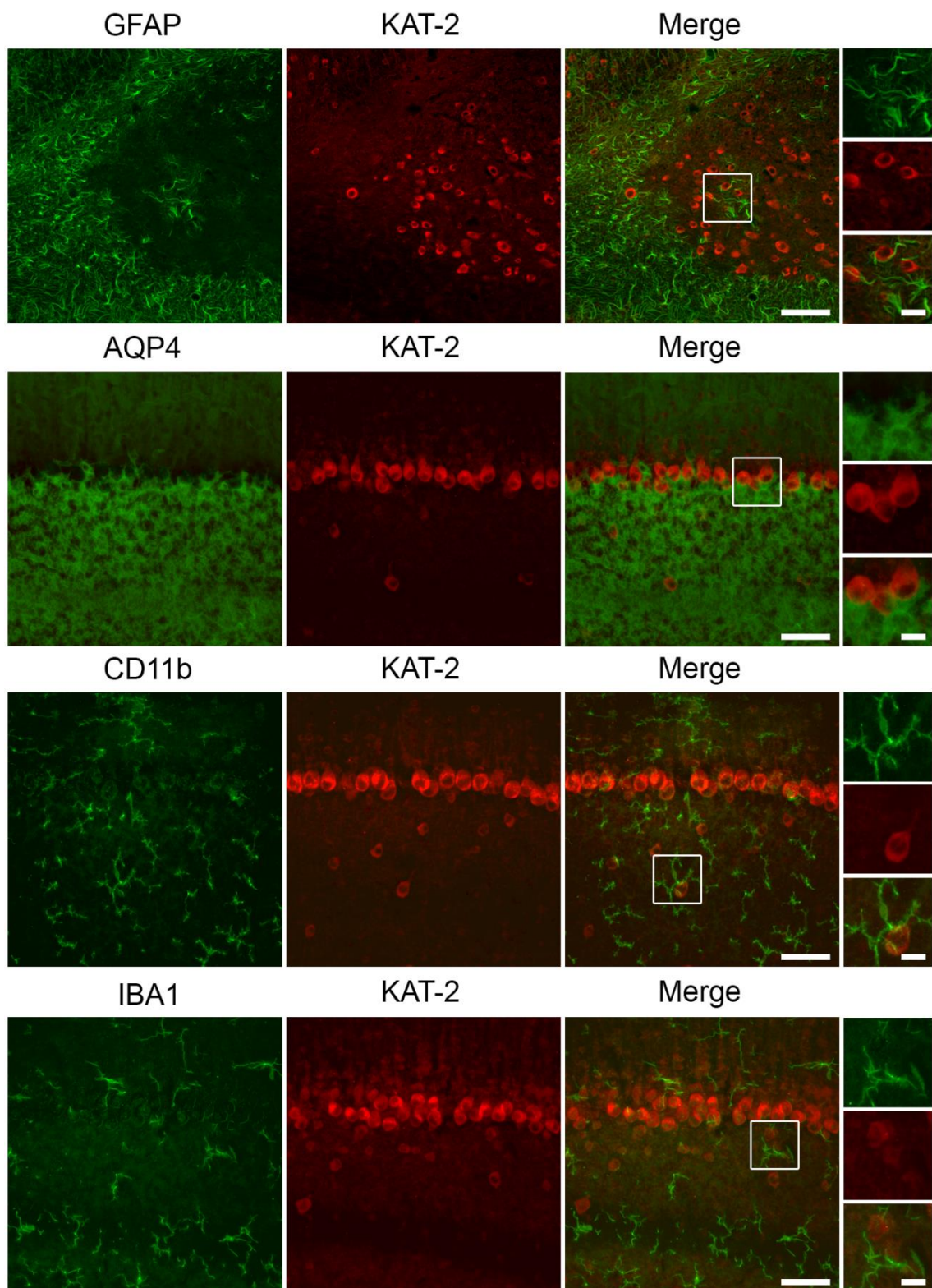
A kisagyi magvak területén szintén azonosítottunk KAT-2⁺/NeuN⁺ neuronokat. Ezen sejtek egy kisebb hányada GAD67-pozitivitást mutatott, azonban a populáció túlnyomó része GAD67⁻ volt. Tekintettel arra, hogy a kisagyi magvak fő sejttypusát glutamáterg idegsejtek alkotják, a GAD67⁻ sejtek nagy valószínűséggel a glutamáterg neuronpopulációhoz tartoznak.

Eredményeink így egyértelműen igazolják, hogy a kisagy KAT-2⁺ sejtpopulációját döntően a GABAerg és glutamáterg neuronok alkotják.

7.3.3 KAT-2 expresszió gliasejtekben

A primer sejtenyészetekben *in vitro*, valamint a nagyagy területén *in situ* megfigyelt KAT-2 gliaredetű jelölés alapján megvizsgáltuk, hogy a kisagy területén kimutatható-e az enzim gliasejtekben is. Az asztrociták azonosításához GFAP és AQP4, míg a mikroglia sejtek jelöléséhez CD11b és IBA1 markereket alkalmaztunk (**19. ábra**).

Meglepő módon a kisagyban a KAT-2 expressziója teljes mértékben hiányzott a gliasejtekből. Egyik marker sem mutatott kolokalizációt a KAT-2 immunjellel, noha a gliasejtek és a KAT-2⁺ neuronok térbeli közelsége megfigyelhető volt. Eredményeink alapján a kisagy területén a KAT-2 kizárólag neuronokban expresszálódik.



19. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér kisagy területén. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunjelölését mutatják az asztrocita (GFAP, AQP4) és mikrogliia (CD11b, IBA1) markerekkel. A koronális metszetek a dorzális neocerebellum területéről származnak (Bregma $-6,0$ mm). A fehér négyzettel jelölt területek kétszeres nagyításban láthatók a jobb paneleken. Vörös: KAT-2; zöld: GFAP, AQP4, CD11b, IBA1. Skála: $80\ \mu\text{m}$ (fő panelek), $20\ \mu\text{m}$ (jobb panelek).

7.4 KAT-2 pozitív neuronpopulációk azonosítása

A KAT-2 neuronális előfordulásának feltérképezéséhez a főbb idegsejt-populációkat azok jellegzetes markerei alapján azonosítottuk. Célunk az volt, hogy meghatározzuk, mely neuron altípusokkal mutat stabil társulást a KAT-2 az egér agy meghatározott területein. A vizsgálatok során három, funkcionálisan meghatározó neurotranszmitter rendszerhez (GABAerg, kolinerg és dopaminerg) tartozó neuronpopulációt elemeztünk, és ezek KAT-2 immunreaktivitását kettős fluoreszcens immunhisztokémiai megközelítéssel detektáltuk.

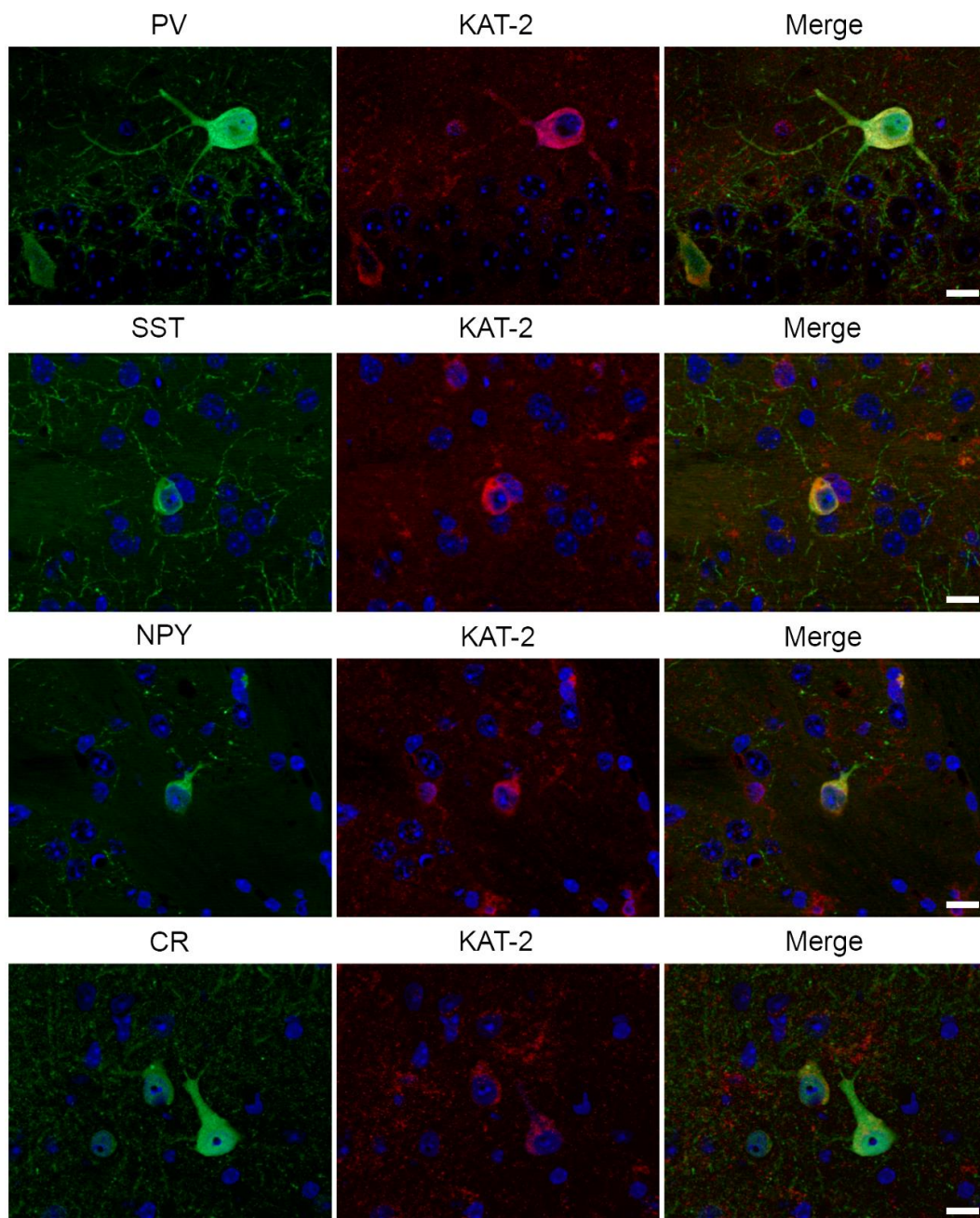
7.4.1 GABAerg neuronok

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban több agyterületen (prefrontális kéreg, hippocampus, SNr, striátum) igazolta a KAT-2 expresszióját gátló idegsejtekben, glutamát-dekarboxiláz (GAD67) általános GABAerg marker alkalmazásával (Herédi és mtsai. 2017). Ezen vizsgálatok leírták az immunopozitív neuronpopulációk GABAerg jellegét, ugyanakkor nem tértek ki az alapvetően morfológiailag és funkcionálisan is diverz gátló neuronállomány alcsoportjainak meghatározására. Jelen munka célja annak vizsgálata volt, hogy a KAT-2 expresszió a gátló idegsejtek egyes, markerek alapján elkülöníthető alcsoportjaiban miként jelenik meg az egér előagy egyes régióiban.

A KAT-2⁺/GAD67⁺ neuronok kiterjedt, régióspecifikusan eltérő mintázatot mutattak. A nagyagykéreg és hippocampus területén minden GAD67⁺ interneuron egyúttal KAT-2-t is expresszált. Az SNr területén a gátló idegsejtek teljes állománya intenzív KAT-2 jelölést mutatott, ezzel szemben a striátumban heterogén eloszlást figyeztünk meg: bár nagyszámú neuron KAT-2⁺/GAD67⁺ volt, ez nem a teljes populációra volt jellemző (nem ábrázolt eredmények).

A KAT-2⁺ interneuronpopuláció további jellemzésére egy interneuron markerekből álló panelt alkalmaztunk, amely a következőkből állt: parvalbumin (PV), szomatosztatin (SST), neuropeptid Y (NPY) és calretinin (CR). A PV⁺ gyors-tüzelésű, az SST⁺ dendritikus, valamint a PV⁻ és SST⁻ kategóriába tartozó, NPY- és CR-expresszálo interneuronok együttesen lefedik a GABAerg rendszer fő molekuláris klasztereit. Bár a striátum, a hippocampus és a neocortex interneuron-architektúrája eltér, e markerek által jelölt sejtek következetesen elkülöníthető populációkat alkotnak, így a markerpanel megfelelő és kellően informatív keretet biztosított a vizsgálatokhoz.

Az egyes interneuron-alcsoportok (PV, SST, NPY, CR) jelölése alapján mind a négy vizsgált klaszterben kimutatható volt a KAT-2 jelenléte (**20. ábra**).

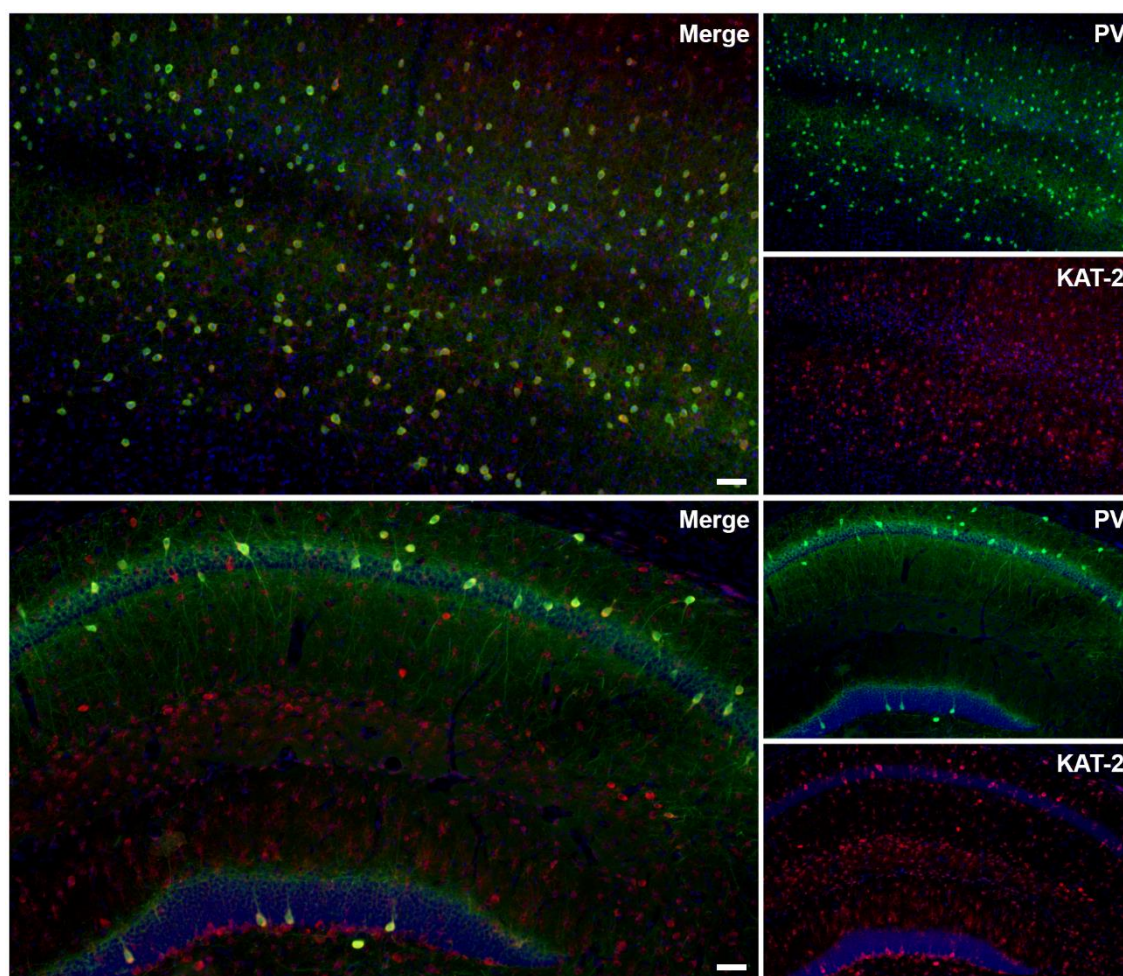


20. ábra: A KAT-2 jelenléte különböző GABAerg interneuron-altípusokban. A reprezentatív nagy nagyítású mikroszkópos felvételek alapján a KAT-2 immunjelölés elsősorban a sejtestekben volt megfigyelhető, kisebb mértékben pedig a nyúlványokra is kiterjedt. Vörös: KAT-2; zöld: PV, SST, NPY, CR; kék: DAPI. Skála: 10 μ m.

Bár a markerpozitív sejtek eloszlása agyrégióként eltért, valamennyi területen megfigyelhetők voltak kettős immunopozitivitást mutató idegsejtek. Ez azt jelzi, hogy a KAT-2 aktivitás nem egyetlen interneuron-típus specializált jellemzője, hanem szélesebb funkcionális szerepet tölthet be a GABAerg hálózat működésében.

A négy vizsgált interneuron-marker mindegyike azonosított KAT-2⁺ neuronokat, közülük azonban a PV-jelöléshez társult a legnagyobb számú sejtpopuláció. Ennek megfelelően ezen populáció részletesebb régióspecifikus elemzése indokoltnak bizonyult, amelynek bemutatása jelen fejezet tárgyát képezi.

A prefrontális kéregben az agykérgi oszlop sejtrétegeiben megjelenő valamennyi PV-pozitív interneuron markáns KAT-2-expressziót mutatott. Ezzel párhuzamosan a hippocampusz fő struktúráiban is – a CA1-es és CA3-as régiókban, valamint a gyrus dentatusban – minden gátló idegsejt kettős pozitivitást mutatott (**21. ábra**).



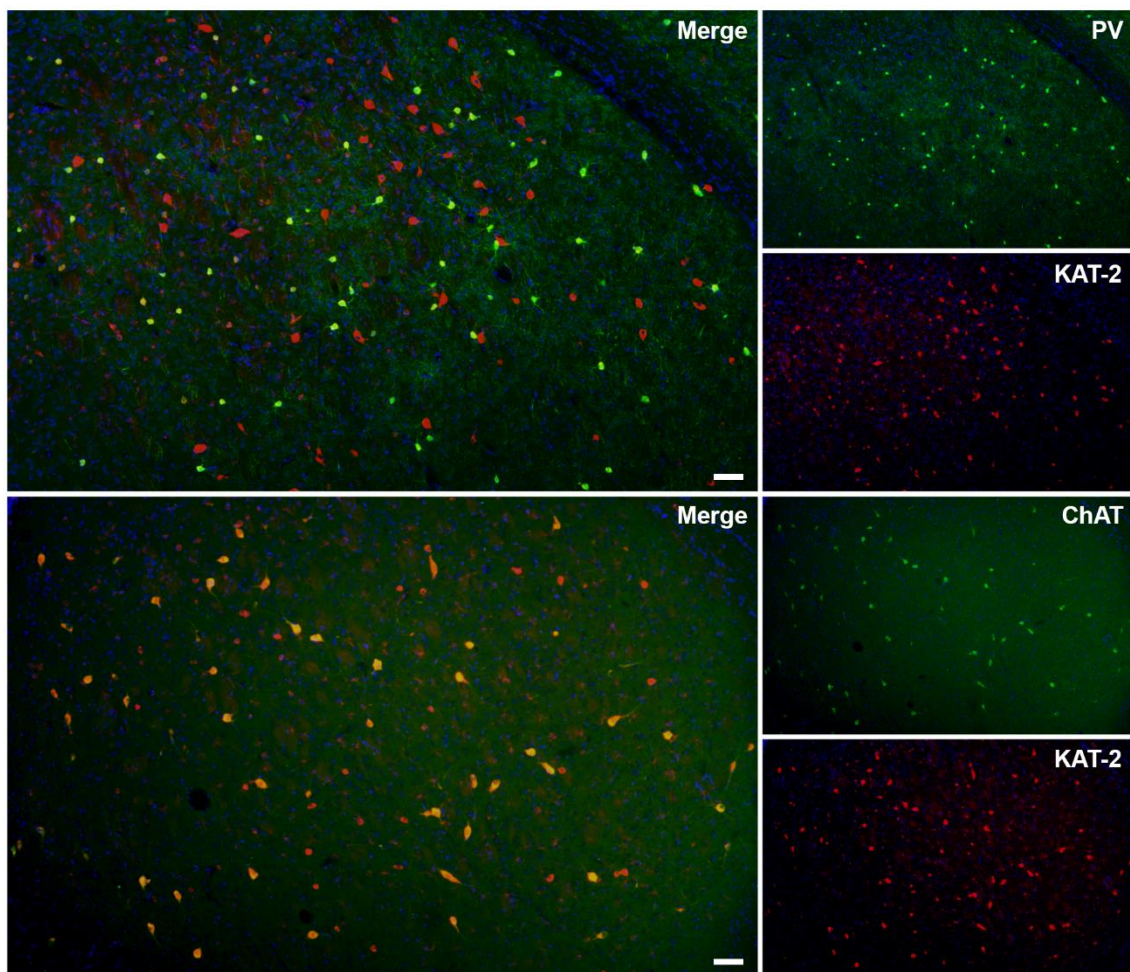
21. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér prefrontális kéregben és hippocampuszban. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunfluoreszcens jelölését mutatják a GABAerg (PV⁺) idegsejtekben. A koronális metszetek a prefrontális kéreg (Bregma +2,0 mm) és dorzális hippocampusz (Bregma -2,0 mm) területéről származnak. Vörös: KAT-2; zöld: PV; kék: DAPI. Skála: 50 μ m.

Eredményeink tehát azt jelzik, hogy az előagy több meghatározó régiójában, így a prefrontális kéregben és a hippocampuszban is, a KAT-2 expressziót mutató gátló GABAerg idegsejtek döntően PV⁺ interneuronok.

7.4.2 Kolinerg interneuronok

A dorzális striátumban a PV⁺ interneuronok esetében a prefrontális kéregben és a hippocampusban megfigyelt mintázathoz hasonló eloszlást találtunk: valamennyi PV⁺ idegsejt következetesen KAT-2-expressziót mutatott.

Ugyanakkor a KAT-2 jelölés intenzitása több PV⁻ sejtben meghaladta a PV-expresszálo interneuronokban megfigyelt szintet. Morfológiai jellemzőik, valamint a striátum jól ismert kolinerg óriásneuronjainak jelenléte alapján ezen sejtek azonosítását kolin-acetiltranszferáz (ChAT) markerrel végeztük (**22. ábra**).



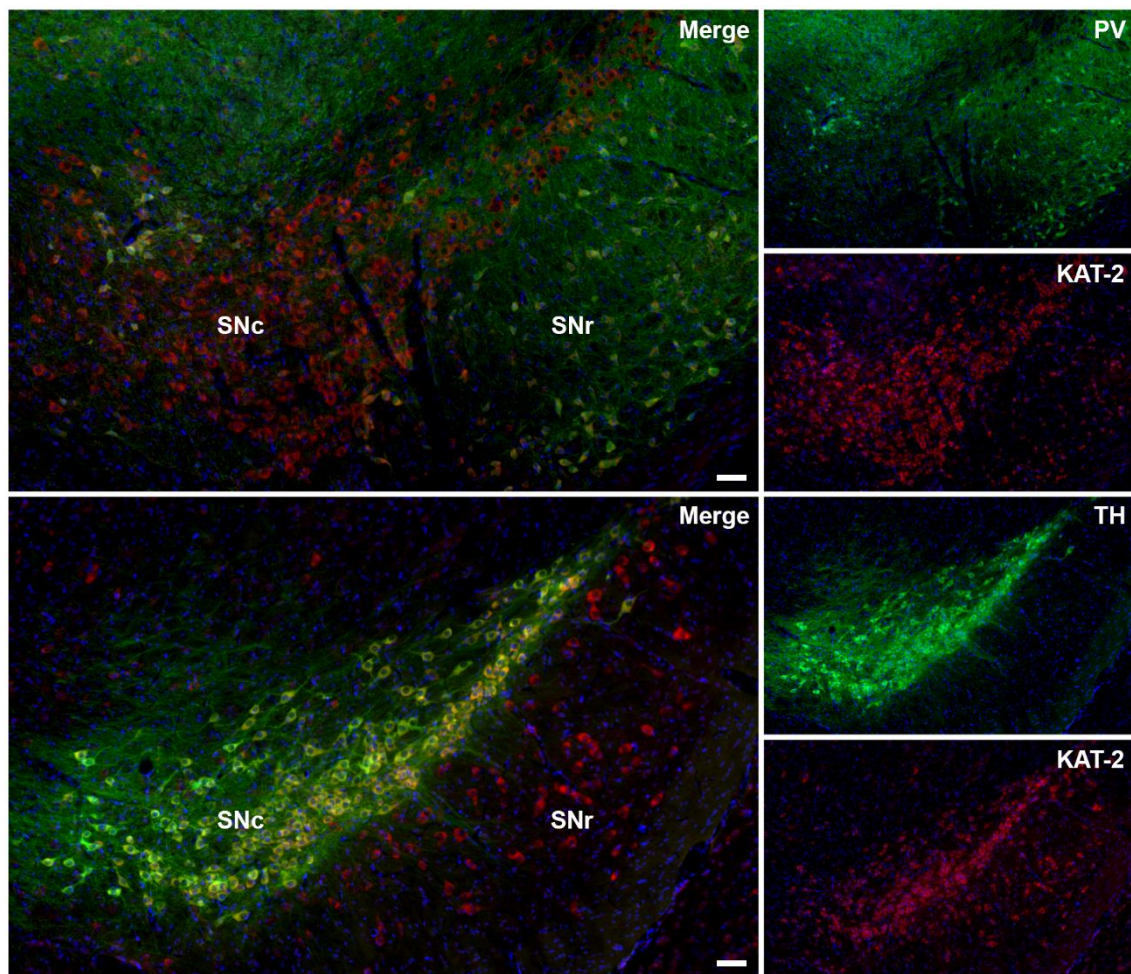
22. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér striátumban. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunfluoreszcens jelölését mutatják a GABAerg (PV⁺) és a kolinerg (ChAT⁺) idegsejtekben. A koronális metszetek a dorzális striátum területéről származnak (Bregma +2,0 mm). Vörös: KAT-2; zöld: PV, ChAT; kék: DAPI. Skála: 50 μ m.

A dorzális striátum területén minden ChAT⁺ idegsejt következetesen KAT-2 pozitivitást mutatott, ami arra utal, hogy a striatális kolinerg interneuronok egy egységes, homogén KAT-2-expresszálo populációt alkotnak.

7.4.3 Dopaminerg neuronok

A substantia nigra teljes kiterjedésében nagyszámú KAT-2⁺ neuront azonosítottunk. Az SNr területén valamennyi PV⁺ interneuron következetesen KAT-2-expressziót mutatott.

Az SNc régióban, ahol a neuronális állomány túlnyomó részét a dopaminerg sejtek alkotják, a TH jelöléssel azonosított idegsejtek mindegyike szintén KAT-2 pozitivitást mutatott. Eredményeink alapján mindkét régióban teljes átfedés volt megfigyelhető a KAT-2 és a sejtípusra jellemző markerek között (**23. ábra**).



23. ábra: A KAT-2 fehérje expressziója egér substantia nigrában. A reprezentatív felvételek a KAT-2 kettős immunfluoreszcens jelölését mutatják a GABAerg (PV⁺) és a dopaminerg (TH⁺) idegsejtekben. A koronális metszetek a substantia nigra területéről származnak (Bregma −3,0 mm). Rövidítések: SNc: substantia nigra pars compacta; SNr: substantia nigra pars reticulata. Vörös: KAT-2; zöld: PV, TH; kék: DAPI. Skála: 50 μm.

7.5 KAT-2 expresszió vizsgálata Parkinson-kór egérmodellben

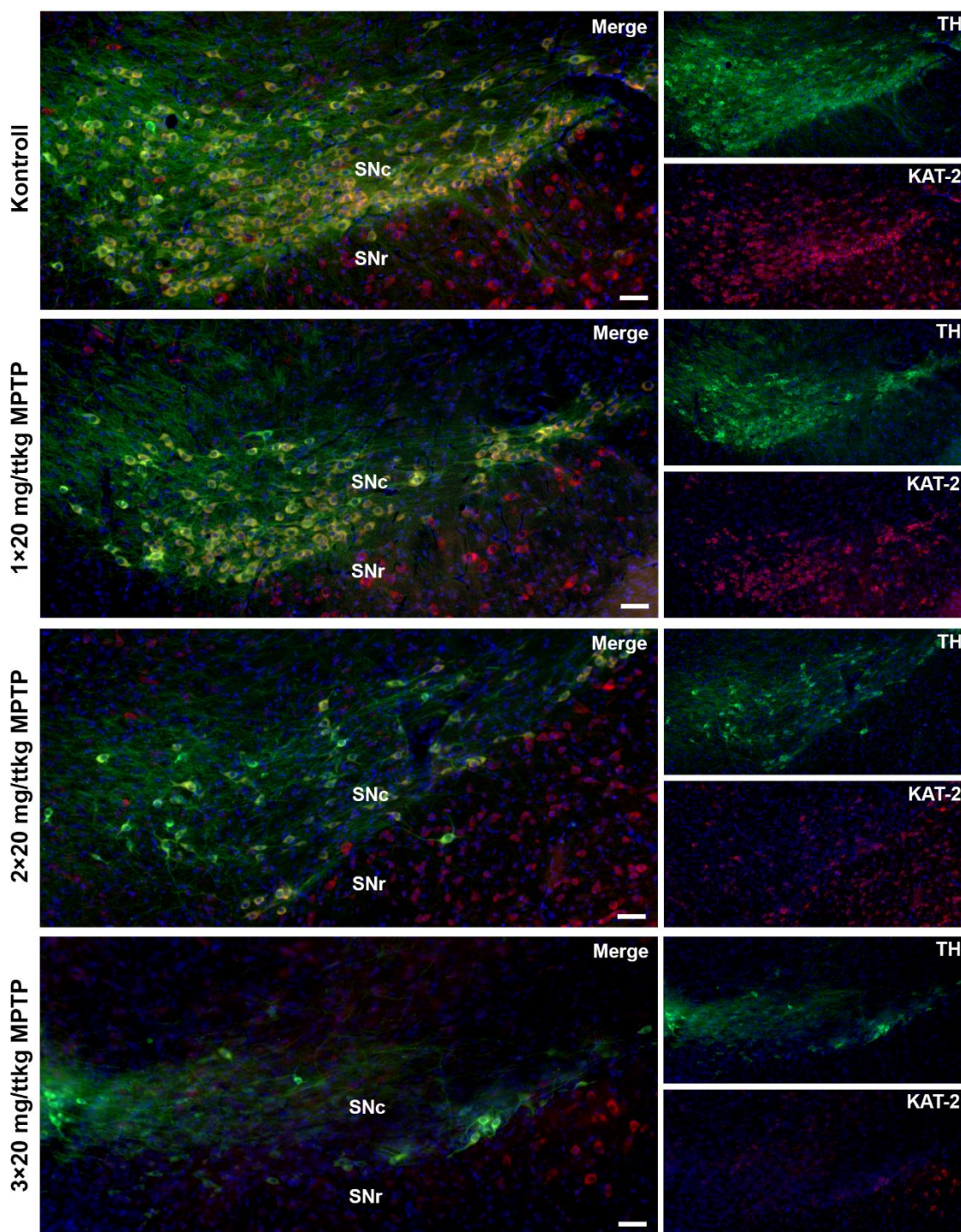
A Parkinson-kór egyik legmarkánsabb neuropatológiai jellemzője a SNc dopaminerg neuronjainak szelektív és progresszív pusztulása. Ennek modellezésére akut MPTP-kezelést alkalmaztunk három különböző dózissal (1×20 mg/ttkg, 2×20 mg/ttkg vagy 3×20 mg/ttkg; i.p.), 2 órás injekciós intervallumokkal, míg a kontrollcsoport három alkalommal fiziológias sóoldatot kapott azonos protokoll szerint.

Az MPTP-kezelést követően az állatok folyamatos megfigyelés alatt álltak az állatjóléti előírásoknak megfelelően. Az MPTP neurotoxicitása gyorsan manifesztálódott, dózisfüggő, szemmel is jól értékelhető motoros tünetek formájában, mint hipomotilitás, bradikinézia és a spontán exploráció csökkenése. Emellett általános rossz állapotra utaló külső jegyek is megfigyelhetők voltak, úgymint görnyedt testtartás, borzolt szőrzet és csökkent önápolási viselkedés. A Parkinson-kórra jellemző nyugalmi tremor csak korlátozottan jelentkezett, ami összhangban áll a szakirodalmi adatokkal, melyek szerint egérben ez a tünet nem következetesen figyelhető meg (Jackson-Lewis és Przedborski 2007). A legsúlyosabb tünetek a legmagasabb dózis (3×20 mg/ttkg) alkalmazása mellett jelentkeztek: ebben a csoportban az első kezelési sorozatban három állat szerepelt, melyek közül kettő az első 24 órán belül elhullott, feltehetően akut toxicitás következtében. A csoportlétszám egységességének ($n = 3$) biztosítása érdekében további két állat bevonására került sor, amelyeknél már nem fordult elő elhullás. Az összes MPTP-kezelt állatot figyelembe véve a mortalitás 18,2% (2/11) volt.

A makroszkópos tünetek alapján megfigyelhető volt az MPTP neurotoxicitása, melynek jellemzésére az SNc szövettani vizsgálatát végeztük el. Az MPTP-indukált dopaminerg neuronvesztést és a KAT-2 expresszió változásait fluoreszcens immunjelöléssel, majd a jelintenzitások kvantitatív és statisztikai elemzésével értékeltük.

7.5.1 A TH és KAT-2 immunreaktivitás változásai az SNc területén

Az SNc dopaminerg neuronjainak károsodását TH immunjelöléssel követtük nyomon. Korábbi vizsgálataink alapján az SNc területén a KAT-2 elsősorban dopaminerg idegsejtekben lokalizálódik, ezért a neurodegeneráció előrehaladtával a KAT-2 immunreaktivitás változásait is elemeztük. A kezelési csoportok reprezentatív felvételei jól szemléltetik, hogy az MPTP-kezelés dózisfüggő jelvesztést eredményez mind a dopaminerg struktúrákban, mind a KAT-2⁺ neuronpopulációban (24. ábra).



24. ábra: A TH és KAT-2 immunreaktivitás reprezentatív felvételei a substantia nigra területéről (Bregma $-3,0$ mm) a különböző MPTP-kezelési protokollokat követően. A bal oldali paneleken kezelési csoportonként a kombinált fluoreszcens jelölés, a jobb oldali paneleken pedig az egyedi fluoreszcens csatornák láthatók. Az MPTP-kezelés a kontrollcsoportéhoz képest progresszív, dóziszfüggő jelvesztést eredményez a TH⁺ dopaminerg struktúrákban és a KAT-2⁺ neuronpopulációban. Vörös: KAT-2; zöld: TH; kék: DAPI. Skála: 50 μ m.

Az eredmények a TH- és KAT-2-immunreaktivitás csökkenését kvalitatív módon igazolják, és megfelelő alapot teremtenek a kvantitatív elemzéseinkhez.

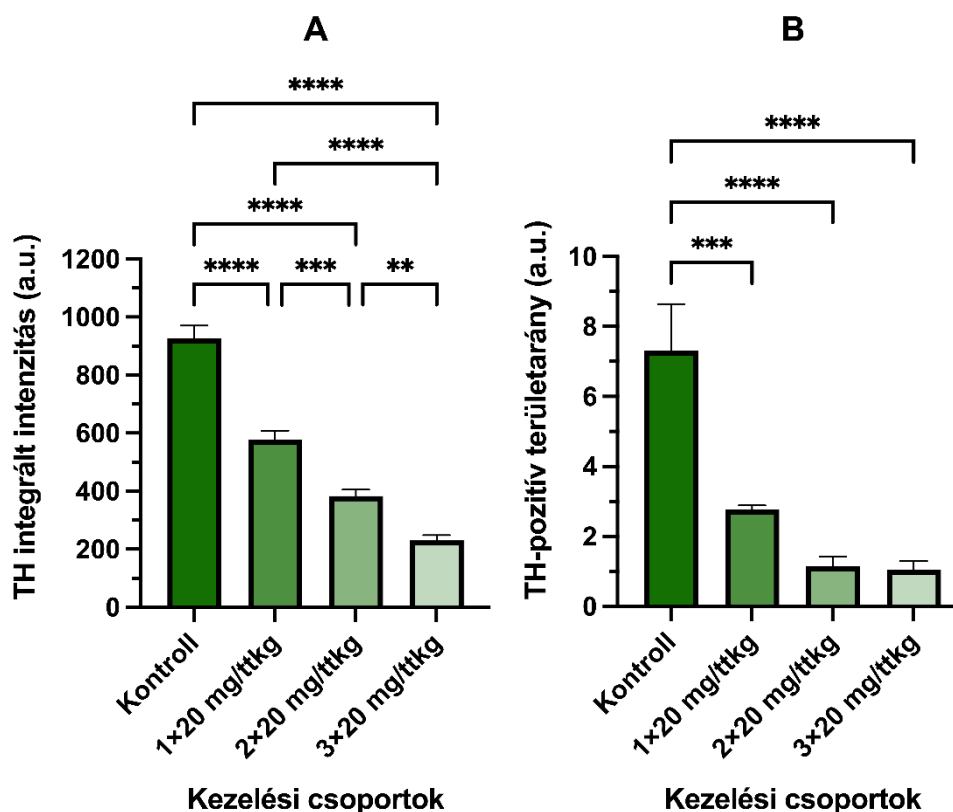
7.5.2 A dopaminerg neuronvesztés kvantitatív analízise

Az SNc dopaminerg neuronjainak károsodását kvantitatív módon is értékeltük a TH immunreaktivitás mérése alapján. Az integrált denzitás a TH-immunreaktív struktúrák teljes fluoreszcenciaintenzitását reprezentálja egy adott ROI-n belül, így a dopaminerg jel mennyiségi változásainak érzékeny indikátora. Ezzel szemben a TH⁺ jelterület a küszöböléssel detektált immunjel kiterjedését tükrözi, amely a fennmaradó dopaminerg sejtek és nyúlványok térbeli jelenlétére és populációméretére utal. Ezen paraméterek objektív és összehasonlítható jellemzőket szolgáltatnak a dopaminerg neuronvesztés mértékének meghatározásához.

A TH immunreaktivitás integrált intenzitása szignifikáns, dózisfüggő csökkenést mutatott az MPTP-kezelés hatására (**25. A ábra**). Az egyutas ANOVA rendkívül erős kezeléshatást igazolt ($F(3,8) = 281,8$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9906$), és a Tukey post-hoc teszt alapján minden MPTP-dózis szignifikánsan csökkentette a TH jelintenzitást a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0,0001$ minden esetben). A dózisok egymással történő összevetése szintén szignifikáns különbségeket mutatott (1×20 mg/ttkg vs 2×20 mg/ttkg: $p = 0,0003$; 1×20 mg/ttkg vs 3×20 mg/ttkg: $p < 0,0001$; 2×20 mg/ttkg vs 3×20 mg/ttkg: $p = 0,0013$), amely egyértelmű dózisfüggő dopaminerg neuronvesztésre utal.

A küszöböléssel meghatározott TH⁺ jelterület mennyisége szintén szignifikáns mértékben csökkent az MPTP-kezelés hatására ($F(3,8) = 52,79$; $p < 0,0001$; **25. B ábra**). A kontrollhoz viszonyítva már az 1×20 mg/ttkg dózis is kimutatható csökkenést eredményezett ($p = 0,0002$), míg a 2×20 mg/ttkg és 3×20 mg/ttkg dózisok esetén a elvesztés mértéke tovább fokozódott ($p < 0,0001$ mindkét összehasonlításban). A két magasabb dózis egymással való összevetése ugyanakkor nem mutatott szignifikáns különbséget ($p > 0,05$), ami arra utal, hogy a dopaminerg neuronpopuláció csökkenése egy bizonyos károsodási szint után telítődik. Ez alapján a TH⁺ jelterület elsősorban a dopaminerg struktúrák fennmaradását jelzi, de a neuronvesztés előrehaladtával kevésbé érzékeny a további szerkezeti degradáció detektálására, mint az integrált intenzitás.

Eredményeink összességében igazolják, hogy az alkalmazott MPTP-protokoll megbízhatóan és reprodukálhatóan váltja ki a Parkinson-kórra jellemző dopaminerg degenerációt az SNc területén, és megfelelő modellt szolgáltat a KAT-2 expresszió patológiai változásainak további vizsgálatához.



25. ábra: A TH immunreaktivitás kvantitatív elemzése az integrált intenzitás (A panel) és a pozitív jelterület (B panel) ábrázolásával a különböző kezelési csoportokban. Az értékek önkényes egységben (a.u.) szerepelnek, az oszlopok az átlag $\pm$ szórás (SD) értékeit mutatják ($n = 3$ csoportonként). A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc tesztek alapján határoztuk meg (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

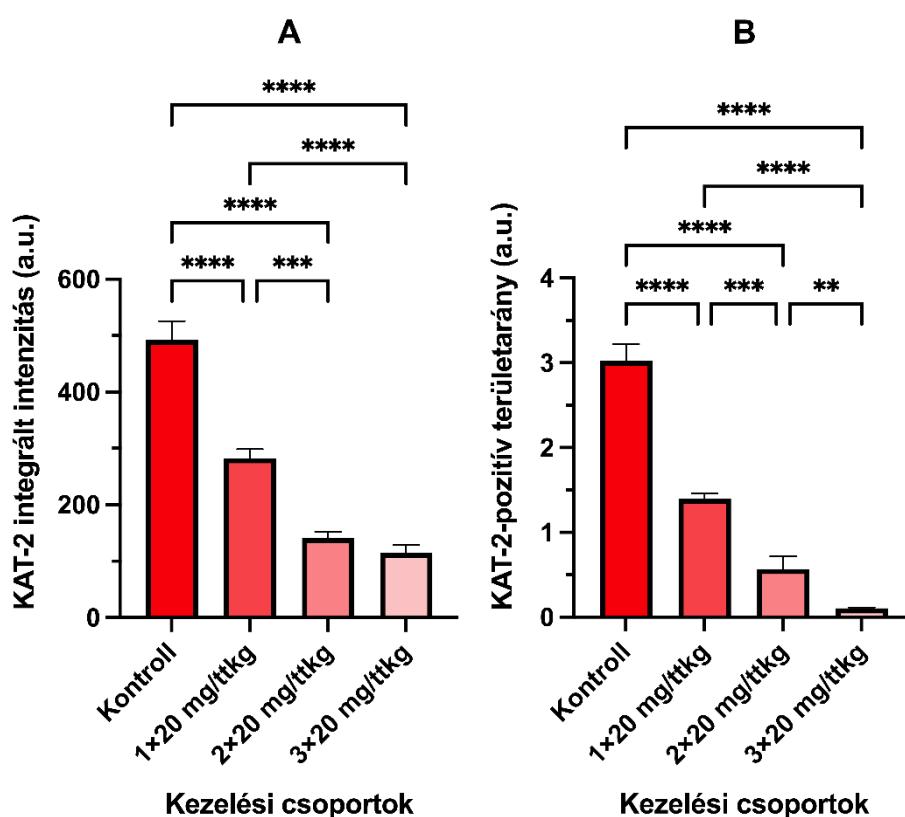
7.5.3 A KAT-2 expresszió változásai dopaminerg neuronvesztés során

A KAT-2 immunjel kvantitatív elemzése két paraméter alapján történt. Az integrált denzitás a megmaradt KAT-2⁺ struktúrák teljes fluoreszcenciaintenzitását jellemzi, míg a KAT-2⁺ jelterület a küszöböléssel detektált immunjel kiterjedését mutatja, amely a fennmaradó KAT-2 expresszió térbeli eloszlását és mértékét tükrözi.

A KAT-2 integrált intenzitása szignifikáns kezeléshatást mutatott ($F(3,8) = 210,1$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9875$; **26. A ábra**). A kontrollcsoportéhoz viszonyítva valamennyi MPTP-dózis jelentős jelcsökkenést okozott ($p < 0,0001$), és az 1×20 mg/ttkg kezeléshez képest a magasabb dózisok további szignifikáns csökkenéssel jártak ($p = 0,0001$, illetve $p < 0,0001$). A két legmagasabb dózis között nem mutatkozott különbség ($p = 0,4420$), ami arra utal, hogy a KAT-2 expresszió csökkenése egy bizonyos károsodási szint után telítődik, és a további dopaminerg neuronvesztés már nem jár további mérhető jelintenzitás-csökkenéssel.

A KAT-2⁺ jelterület aránya szintén kifejezett dózisfüggő visszaesést mutatott ($F(3,8) = 302.6$; $p < 0,0001$; **26. B ábra**), és minden dóziscsoport összevetése szignifikáns különbséget jelzett ($p \leq 0,0091$). A területi csökkenés mértéke meghaladta a TH⁺ struktúrák esetében tapasztaltat, ami a KAT-2-t expresszáló sejtek fokozott érzékenységére utal a neurotoxikus hatással szemben.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a KAT-2 expresszió csökkenése dózisfüggő az MPTP-kezelés során, de az intenzitás korán telítődik, míg a jelterület drasztikus visszaesése a KAT-2⁺ sejtek fokozott sérülékenységét és korai elvesztését tükrözi a dopaminerg degeneráció során.



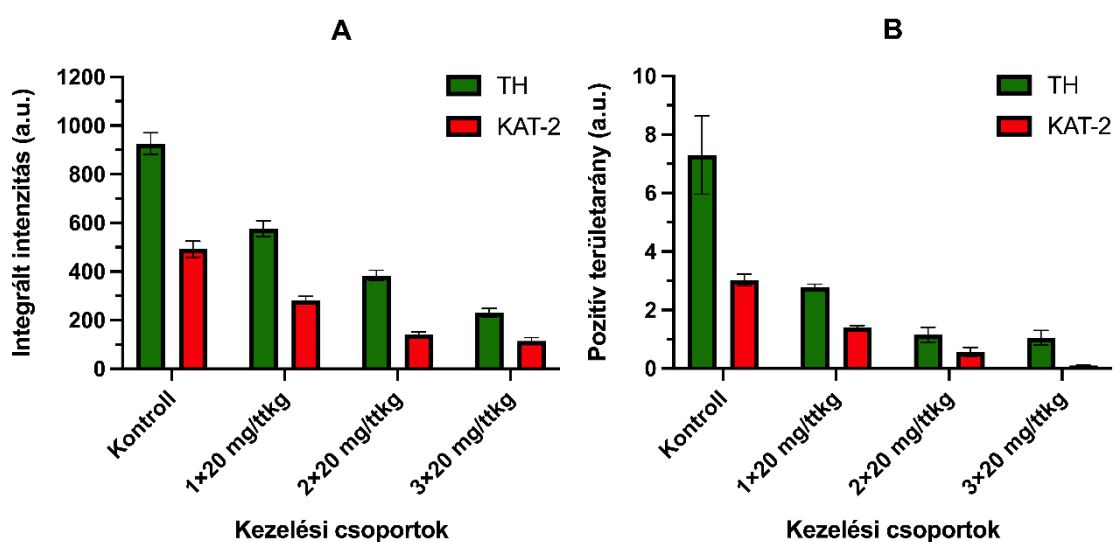
26. ábra: A KAT-2 immunreaktivitás kvantitatív elemzése az integrált intenzitás (A panel) és pozitív jelterület (B panel) ábrázolásával a különböző kezelési csoportokban. Az értékek önkényes egységben (a.u.) szerepelnek, az oszlopok az átlag $\pm$ szórás (SD) értékeit mutatják ($n = 3$ csoportonként). A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc tesztek alapján határoztuk meg (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

7.5.4 A TH és KAT-2 immunreaktivitás kvantitatív összehasonlítása

A dopaminerg károsodással járó TH-jelvesztés és a KAT-2 expresszió csökkenése közötti kapcsolat feltárásához kvantitatív összehasonlítást végeztünk. A vizsgálat célja annak meghatározása volt, hogy a KAT-2 jelintenzitás- és jelterület-változásai milyen mértékben követik a dopaminerg struktúrák degenerációját, illetve a két marker közötti kapcsolat mennyire tekinthető arányosnak. Emellett azt is értékeltük, hogy a KAT-2 expresszió csökkenése kizárólag a dopaminerg sejtek pusztulásának következménye-e, vagy a degenerációt megelőző, önálló regulációs folyamatként is értelmezhető.

A TH és a KAT-2 integrált intenzitása egyaránt dózisfüggő módon csökkent (27. A ábra). Ugyanakkor a két fehérje dinamikája eltért: míg a TH integrált intenzitása a 2×20 mg/ttkg és a 3×20 mg/ttkg MPTP-dózisok között is tovább csökkent ($p < 0,05$), addig a KAT-2 intenzitásértékei ezen a tartományon már nem mutattak további szignifikáns változást ($p > 0,4$), ami a KAT-2 expresszió korai telítődésére utal.

Ezzel szemben a KAT-2⁺ jelterület a magasabb dózisok között is tovább csökkent ($p < 0,01$), és a 3×20 mg/ttkg dózis esetén gyakorlatilag a kimutathatóság határára esett vissza, míg a TH⁺ jelterület hasonló összevetésben nem mutatott szignifikáns különbséget (27. B ábra). Mindez arra utal, hogy a KAT-2 pozitivitás területi kiterjedése gyorsabban csökken, mint a dopaminerg markeré, vagyis a KAT-2 expresszió visszaesése megelőzheti a TH-immunreaktivitás morfológiai eltűnését.

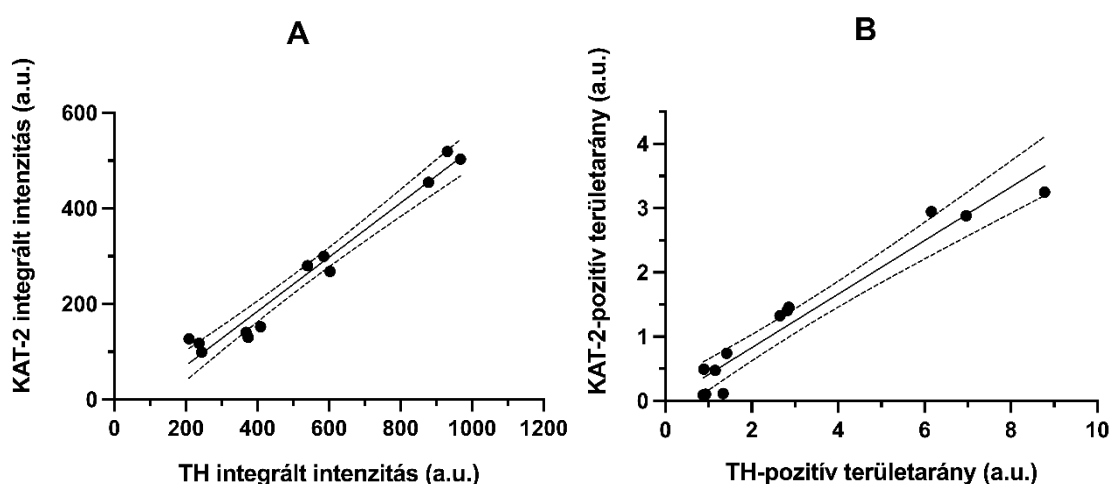


27. ábra: A TH és KAT-2 immunreaktivitás kvantitatív elemzése az integrált intenzitás (A panel) és a pozitív jelterület (B panel) ábrázolásával a kezelési csoportokban. A zöld oszlopok a TH-, a piros oszlopok a KAT-2-jelölést reprezentálják. Az értékek önkényes egységben (a.u.) szerepelnek, az oszlopok az átlag $\pm$ szórás (SD) értékeit mutatják ($n = 3$ csoportonként).

A korrelációs elemzés szerint a két marker közötti kapcsolat szoros és pozitív volt mind az integrált intenzitások (Pearson $r = 0,9827$; $p < 0,0001$; **28. A ábra**), mind a jelterület-arányok esetében (Pearson $r = 0,9705$; $p < 0,0001$; **28. B ábra**).

A lineáris regresszió alapján az intenzitások közötti összefüggés lineáris maradt a teljes dózistartományban, ami arra utal, hogy a KAT-2 expresszió mértéke általában arányosan csökken a dopaminerg elvesztéssel.

Ezzel szemben a jelterületek korrelációjánál a legmagasabb dóziscsoportban (3×20 mg/ttkg) a linearitás részben megbomlott, mivel a KAT-2 pozitivitás területi kiterjedése gyorsabban csökkent, mint a TH pozitivitása. Ez a jelenség a KAT-2⁺ jel korai, nem lineáris leépülését tükrözi, amely a dopaminerg neuronvesztésnél hamarabb következik be.



28. ábra: A KAT-2 és TH immunreaktivitás közötti korreláció. Az integrált intenzitások (A panel), valamint a pozitív területarányok (B panel) kapcsolata lineáris regresszióval került ábrázolásra. Az értékek önkényes egységben (a.u.) szerepelnek.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a KAT-2 expresszió csökkenése nem magyarázható pusztán a dopaminerg idegsejtek elvesztésével. Ezt támasztja alá az integrált intenzitásvesztés korai telítődése, a pozitív jelterület arányának drasztikus visszaesése, valamint a korrelációs összefüggés linearitásának megbomlása is.

8 Diszkusszió

A jelen értekezés célja a KAT-2 enzim részletes, sejttípus- és régióspecifikus neuroanatómiai jellemzése volt egérmodellben, több kísérletes megközelítés integrálásával. A KYNA-bioszintézis kulcsenzimének eloszlásáról korábban elsősorban humán és patkány vizsgálatokból álltak rendelkezésre adatok. Ezen tanulmányok módszertanilag jelentősen eltértek egymástól, ami megnehezíti az eredmények összehasonlító értelmezését. A szakirodalom hiányosságainak pótlása érdekében vizsgálataink során párhuzamosan értékeltük a KAT-2 expresszióját *in vitro* primer sejtenyészetekben, *in situ* előagy és kisagy szövetmintákban, valamint *in vivo* MPTP-indukált Parkinson-kór modellben. Ez a több szinten végzett megközelítés lehetővé tette, hogy egységes rendszerben értelmezzük a KAT-2 eloszlásának sajátosságait egérben, amely a kinurenin-rendszer szakirodalmában a leginkább alulreprezentált fajnak számít.

8.1 A KAT-2 expresszió *in vitro* vizsgálata

A KAT-2 agyszövetben történő expressziója hosszú ideje vizsgált, a sejtspecifikus eloszlásával kapcsolatos adatok pedig a szakirodalomban jelentős heterogenitást mutatnak. Korai tanulmányok a KAT-2-t elsősorban asztrocita-eredetű enzimként írták le (Guillemin és mtsai. 2001), ugyanakkor további vizsgálatok alapján a neuronok és a mikroglia is hozzájárulhatnak a KYNA-szintézishez (Rzeski és mtsai. 2005; Guillemin és mtsai. 2007). A vizsgálatok azonban eltérő fajokban és nem összehasonlítható módszerekkel zajlottak, ami jelentősen megnehezíti az eredmények közvetlen összehasonlítását. Ennek megfelelően fontosnak láttuk egy olyan modell alkalmazását, amelyben a három fő agyi sejttípus párhuzamosan vizsgálható ugyanazon fajban. Erre a célra a primer sejtenyészetek ideális modellt biztosítottak.

In vitro primer sejtenyészeteken végzett vizsgálataink alapján a KAT-2 asztrocitákban, mikrogliaiban és neuronokban is stabil expressziót mutatott. A jelölés mindhárom sejtvonal esetében elsősorban a sejtestekben jelent meg, perinukleáris dominanciával, ami megfelel a KAT-2 ismert intracelluláris lokalizációjának (Roberts és mtsai. 1992). Az egyik legkorábbi megfigyelés alapján az enzim főként mitokondriális és citoplazmatikus folyamatokhoz kapcsolódik, a KAT immunreaktivitás pedig elsősorban a citoplazmában, a perinukleáris régióban és a vezikuláris kompartmentekben jelenik meg.

A KAT-2 asztrocitákban való jelenléte összhangban áll azzal a nézettel, amely szerint ezek a sejtek a kinurenin útvonal centrális szereplői (Schwarcz és Pellicciari 2002). Eredményeink ugyanakkor ellentmondásban állnak a korábbi szakirodalom egy részével, amely a KYNA-szintézist kizárólag asztrocitákhoz kötött folyamatként értelmezte (Guillemin és mtsai. 2001; Guidetti és mtsai. 2007).

Mikrogliaákban a KAT-2 expresszió hasonlóan robusztusnak bizonyult, ugyanakkor a primer tenyészetekben megfigyelhető amőboid és pálcika morfológia miatt a jelintenzitás és az eloszlás értelmezése óvatosságot igényel. A primer mikrogliaák *in vitro* aktivált morfológiát mutatnak, amely fenotípus nem tükrözi az *in vivo* jellemző, ramifikált formájukat (Eggen és mtsai. 2013; Suzumura és mtsai. 1991), ezért nem zárható ki, hogy a KAT-2 expressziója állapotfüggően, különösen gyulladásos aktiváció során módosul. A neuronok esetében a KAT-2 expresszió a sejtestek mellett a nyúlványok kezdeti szakaszain is megfigyelhető volt, ami funkcionális kérdéseket vet fel. Ez a megfigyelés új megközelítést kínál arra, hogy a KYNA milyen módon járulhat hozzá a hálózati aktivitás és az excitabilitás finomhangolásához. A mikroglialis és neuronális KAT-2 expresszió arra utal, hogy hozzájárulásuk a KYNA-szintézishez nagyobb lehet, mint amit a korábbi, főként *in vivo* vizsgálatok alapján feltételeztek.

A kvantitatív kolokalizációs elemzések eredményei alátámasztották a kvalitatív megfigyeléseinket. Az egyes sejtípus-markerek és a KAT-2 közötti valódi társulást a Pearson- és Manders-paraméterek pozitív értékei, valamint a Costes-féle randomizációs teszt eredményei egyaránt igazolták. Fontos megemlíteni, hogy mivel ezen paraméterek kizárólag a fluoreszcens jelek átfedésének mértékét tükrözik, az expresszió mértékének és az enzim aktivitásának meghatározására közvetlenül nem alkalmasak.

Összességében a sejttenyészetek vizsgálata azt mutatja, hogy mindhárom fő agyi sejtípus képes a KAT-2 expressziójára *in vitro* körülmények között. Eredményeink egyedi hozzájárulása abban áll, hogy a szakirodalomban szórványosan megjelenő, különböző fajokból és eltérő módszertani feltételek mellett született megfigyeléseket sikerült egy fajból származó mintákon, egységes kísérleti keretek között, összehasonlítható módon reprodukálnunk. Továbbá, elsőként mutattuk ki egér agy eredetű primer mikrogliaákban a KAT-2 expresszióját, amelyről eddig kizárólag humán és patkány adatok álltak rendelkezésre. Az enzim eloszlási mintázata új keretet kínál a KYNA-szintézist érintő jövőbeni funkcionális vizsgálatok tervezéséhez. Az *in vitro* vizsgálatok egy olyan koherens referenciakeretet biztosítottak, amely elengedhetetlen volt az *in situ* kapott eredmények értelmezéséhez és biológiai kontextusba helyezéséhez.

8.2 A KAT-2 expresszió *in situ* vizsgálata

8.2.1 A KAT-2 regionális és sejttípus-specifikus eloszlása egér előagyban

A KAT-2 agyi eloszlásának jellemzésére irányuló *in situ* humán és állatkísérletek alapján az enzim régióspecifikus módon, különböző intenzitással jelenik meg az előagy heterogén területein. Mivel a korábbi vizsgálatok különböző fajokban többnyire egyes agyrégiókra vagy sejttípusokra fókuszáltak, valamint eltérő metodikákat alkalmaztak, szükség volt az előagy KAT-2-eloszlásának egységes megközelítésben történő, átfogó feltérképezésére. Az agyszeletek lehetőséget adtak arra, hogy a primer sejtenyészetekben kapott *in vitro* eredményeket kiterjesztve az enzimet természetes morfológiai kontextusban, *in situ* is vizsgáljuk.

Eredményeink azt mutatják, hogy a KAT-2 az előagyban széles körű, ugyanakkor régióspecifikusan változó intenzitással jelenik meg, ami az enzim neuroanatómiai heterogenitását szemlélteti. A nagyagykéreg rétegeiben, a hippocampális formációban és a parahippocampális régiókban egyaránt kiterjedt KAT-2 expressziót figyeltük meg, ami arra utal, hogy az enzim a kortikális és limbikus területek stabil komponense. Mivel e régiók modulálják a szinaptikus integrációt, a plaszticitást és a kognitív feldolgozást, nem zárható ki, hogy egyben a kinurenin útvonal kiemelt jelentőségű integrációs központjai.

A köztiagy több magcsoportjában, köztük a talamusz retikuláris magjában és a hipotalamusz szubtalamikus magjában szintén megfigyeltünk expressziót. A KAT-2 olyan területeken is jelen van, amelyek alapvető szenzoros és motoros folyamatokat szerveznek.

A bazális ganglion-rendszer struktúrái, így a striátum, a pallidum és a substantia innominata, ugyancsak kifejezett KAT-2 expressziót mutattak. A caudoputamen homogén jelölése és a szórványosan megjelenő, erősen pozitív sejtek arra utalnak, hogy az enzimnek jelentős szerepe lehet ezekben a motoros és motivációs funkciókhoz kapcsolódó magterületekben is. A nucleus accumbens mérsékeltebb jelintenzitása differenciáltabb, funkcióspecifikusabb eloszlási mintázatot sugall. A substantia nigrában mind a pars compacta, mind a pars reticulata erős immunreaktivitást mutatott. A KAT-2 jelenléte a bazális ganglionkör teljes funkcionális ívéen végigkövethetővé, ami arra utal, hogy a kinurenin útvonal működése a kéreg alatti területeket is befolyásolhatja.

Eredményeink alapján a KAT-2 a kognitív, limbikus és motoros hálózatok több szintjén is stabilan jelen van. Ez a jelenlét arra utal, hogy a KAT-2 előagyi eloszlása nem csupán anatómiai, hanem funkcionális diverzitást is tükröz, és a kinurenerg moduláció több, egymástól jelentősen eltérő agyi áramkörben is releváns lehet.

A sejttípus-specifikus eloszlás vizsgálata alapján a prefrontális kéregben és a hippocampusban egyaránt kimutatható volt a KAT-2 mindhárom fő agyi sejttípusban. Az asztrocitákban megfigyelt, a nyúlványok teljes hosszára kiterjedő kifejezett KAT-2-jelölés jól illeszkedik ahhoz a jelenleg elfogadott nézethez, mely szerint a KYNA elsődleges forrását az asztrociták jelentik, és az általuk termelt KYNA közvetlenül képes modulálni a neuronális szinaptikus működést (Kiss és mtsai. 2003). A nyúlványokra is kiterjedő enzimeloszlás alapján a KYNA keletkezése nem kizárólag a szomatikus régióban történhet, hanem a disztális asztrocita-nyúlványokban is – abban a mikrotérben, ahol a szinaptikus jelátvitel finomhangolása zajlik. Mindez morfológiailag is támogatja az asztrocita-nyúlványok szerepét a KYNA lokális szabályozásában, összhangban azzal a korábbi megfigyeléssel is, amely szerint a KAT-pozitív asztrocita-nyúlványok gyakran a szinapszisok közvetlen közelében helyezkednek el (Roberts és mtsai. 1992).

In situ vizsgálataink során a KAT-2 expresszióját mind az asztrociták, mind a neuronok esetében megfigyeltük a sejtestekben, ugyanakkor a nyúlványok eloszlásában markáns különbségeket tapasztaltunk. Míg az asztrocitákban az enzim jól kirajzolódott a nyúlványok teljes hosszában, addig a neuronokban a lokalizációja elsősorban szómához kötött volt, és a dendritekben csak gyengén, a proximális szakaszokon volt detektálható, ami összhangban áll a korábbi ultrastrukturális megfigyelésekkel (Roberts és mtsai. 1992). Ezen mintázat alapján nem kizárható, hogy a két sejttípus eltérő módon járulhat hozzá a KAT-2-mediált folyamatokhoz, ugyanakkor a funkcionális különbségek pontos megítéléséhez további célzott vizsgálatok szükségesek.

A mikroglia sejtekben a jelölés lényegesen gyengébbnek bizonyult, mint a tenyészetekben. Pontszerű, fragmentált immunreaktivitást figyeltünk meg, és aKAT-2⁺ mikroglia sejtek száma is alacsonyabb volt. Ez összhangban áll azzal, hogy *in situ* a mikrogliaák nyugalmi, ramifikált morfológiája egészen más szerveződésű, mint az *in vitro* aktivált fenotípus (Eggen és mtsai. 2013; Suzumura és mtsai. 1991). Ugyanakkor ez a különbség felveti annak lehetőségét, hogy a KAT-2 mikroglia expressziója alapvetően állapotfüggő folyamat: aktiváció során, amikor a sejt anyagcseréje átrendeződik és gyulladásra specializált programok lépnek életbe, a KAT-2 szintje és a KYNA-termelő kapacitás is jelentősen megnövekedhet. Ennek megfelelően a mikroglia nem csupán passzív résztvevője, hanem aktív modulátora is lehet a helyi kinurenerg tónusnak, amely gyulladásos környezetben akár gyors, dinamikus változásokat is közvetíthet. A mikroglia KAT-2 expressziójának állapotfüggő változása, valamint a KYNA-bioszintézishez való hozzájárulása ezért a jövőbeni vizsgálatok egyik kiemelten fontos iránya lehet.

Számos vizsgálat igazolta, hogy a mikroglia gyulladásos aktivációja jelentős enzimatisz változásokat idéz elő a kinurenin útvonalban. Interferon-gamma hatására humán és eger mikroglia egyaránt fokozott IDO-expressziót mutat, és több downstream enzim szabályozása is módosul (Guillemin és mtsai. 2005; Alberati-Giani és mtsai. 1996). A lipopoliszacharid stimuláció szintén növeli a kinurenin útvonal kulcsenzimeinek expresszióját, és primer eger mikroglia esetében interferon-független IDO-aktiváció is megfigyelhető (Garrison és mtsai. 2018; Wang és mtsai. 2010).

A gyulladásos jelátvitel gliasejtekben a kinurenin útvonal több pontját érintő tartós átrendeződést okozhat (Salminen 2022). A mikroglia aktiváció során a kinurenin útvonal több enzimének expressziója megváltozik, ami a KYNA-termelő kapacitás növekedésének irányába mutat. Bár a KAT-2 szabályozásáról a mikrogliaiban kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre, eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy az aktivált fenotípus a KAT-2-mediált folyamatokra is hatással lehet.

Összegzésként elmondható, hogy a KAT-2 expressziója a nagyagyban széleskörű, régióspecifikus és több sejttípusra kiterjed. Az agyszöveti környezetben kapott eredmények szorosan illeszkednek az *in vitro* megfigyelésekhez, ugyanakkor új mintázatok is feltárnak. Említésre méltó az asztrocita-nyúlványok kifejezett immunreaktivitása és a mikroglia sajátos, sejtenyészettől eltérő expressziós mintázata. Ezek a megfigyelések fontos alapot adnak a KAT-2 jövőbeni funkcionális vizsgálataihoz.

8.2.2 A KAT-2 regionális és sejttípus-specifikus eloszlása eger kisagyban

A korábbi, elsősorban nagyagyi struktúrákra fókuszáló tanulmányokhoz képest a kisagy területén végzett *in situ* vizsgálatok jelentősen kevesebb adatot szolgáltatnak a KAT-2 eloszlásával kapcsolatban. Ennek megfelelően kiemelten fontos volt a kisagy regionális és sejttípus-alapú vizsgálata.

Eredményeink alapján a KAT-2 expressziója a cerebelláris kéreg mindhárom rétegében kimutatható volt, eltérő intenzitással és eloszlási mintázattal. A molekuláris rétegben gyengébb és szórtabb KAT-2 jelintenzitás volt megfigyelhető. A Purkinje-sejtek rétegében nagy számaméretű, erősen pozitív sejtek jelentek meg, amelyek a kisagy legmarkánsabb KAT-2-expresszázó populációját alkották. A szemcsesejt rétegben szintén jelen voltak KAT-2⁺ sejtek, amelyek expressziós mintázata elkülönült a felszíni rétegek mintázatától. A KAT-2 jelenléte elsősorban a kisagykéreg szürkeállományára korlátozódott, a fehérállományt csak elszórt, gyengébb jelölést jellemezte.

A rétegspecifikus eloszlás azt mutatta, hogy a KAT-2 expressziója szorosan követi a cerebelláris kéreg sejt morfológiai szerveződését. A kettős immunjelölések alapján a kisagy KAT-2 pozitivitást mutató sejtjei döntően neuronális eredetűek: a NeuN-jelölés a molekuláris és a szemcsesejt réteg több KAT-2⁺ neuronját is azonosította, míg a Purkinje-sejtek intenzív KAT-2 jelölése NeuN-negativitással párosult, ami összhangban áll a Purkinje-sejtek ismert NeuN-negativitásával (Mullen és mtsai. 1992). A molekuláris réteg kisebb, szórtan elhelyezkedő GAD67⁺ sejtjei kosár- és csillagsejteknek feleltek meg, míg a szemcsesejt réteg nagyobb neuronjai Golgi-sejtek lehetnek. A NeuN⁺/GAD67⁻ kis méretű sejtek pedig a glutamáterg szemcsesejteknek feleltek meg.

A kisgyi magvakban nagyszámban jelentek meg KAT-2⁺/NeuN⁺ sejtek. A populáció jelentős része GAD67⁻ volt, hiszen e magcsoportokat elsősorban glutamáterg és glicinerg premotoros output neuronok alkotják (Bagnall és mtsai. 2009). A kisebb GAD67⁻ hányad lokális GABAerg interneuronoknak felelhet meg.

Míg a primer sejttenyészetekben és a nagyagy több területén a KAT-2 asztrocitákban és mikrogliákban is jelen volt, a kisgyi szövetmintákban meglepő módon egyetlen gliális marker sem mutatott kollokalizációt a KAT-2 immunjellel. Bár a gliasejtek és a KAT-2⁺ neuronok térbeli közelsége jól látható volt, a jelölődések nem fedték egymást. A kisagy tehát sajátos kivételt képez a KAT-2 sejt típus-specifikus eloszlásában, expressziója kizárólag neuronális eredetű.

A neuronális dominancia éles kontrasztban áll a nagygyi területekkel. Az irodalmi adatok alapján a régióspecifikus különbség legvalószínűbb magyarázata a D-aminosav-oxidáz (DAAO) cerebelláris szerepében keresendő. A kisgyban a DAAO magas expressziót mutat, kizárólag asztrocitákban (Arnold és mtsai. 1979; Horiike és mtsai. 1987). Az előagyban ezzel szemben a DAAO csupán funkcionálisan inaktív, rövid transzkriptként detektálható, érdemi enzimaktivitás nélkül (Burnet és mtsai. 2008; Pollegioni és mtsai. 2018). A kisgy asztrocitáinak jelentős DAAO aktivitása lehetővé teszi a KYNA-szintézis alternatív útvonalát, amely által D-kinurenin prekursorból is képződhet KYNA (Sasabe és mtsai. 2014; Pérez de la Cruz és mtsai. 2025). Mindez arra utal, hogy a cerebelláris glia a KYNA bioszintézisét eltérő enzimmésszellettel szervezheti, mint az előagy asztrociták, ahol a KYNA kizárólag KAT-mediált módon, L-KYN prekursorból képződik. A cerebellumban ezen felül hatékony, reaktív oxigéngyökök által közvetített, nem-enzimatis KYNA-szintézis is kimutatható, amely tovább növeli az alternatív KYNA-termelési kapacitást ebben a régióban (Blanco Ayala és mtsai. 2015).

Az irodalmi adatok és saját eredményeink összhangja egy koherens magyarázatot ad a kisagyban megfigyelt gliális KAT-2 hiányára. A cerebelláris glia a KYNA bioszintézisét elsősorban nem KAT-2, hanem DAAO-függő mechanizmussal biztosítja. Ebből következik, hogy a kisagy sajátos neurokémiai környezetében a glia alternatív mechanizmusokon keresztül járulhat hozzá a kinurenerg tónus alakításához, amelyek alapvetően eltérhetnek a kortikális és limbikus hálózatokétól. A KAT-2 a kisagyban elsősorban a helyi neuronális áramkörök folyamataiban tölthet be szerepet.

8.3 KAT-2 pozitív neuronpopulációk azonosítása

A KAT-2 neuronális eloszlásáról szóló korábbi szakirodalom nem tartalmaz arra vonatkozó információt, hogy az enzim milyen mértékben kötődik az agy neurotranszmitter-rendszereihez. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai számoltak be elsőként arról, hogy a KAT-2 az egér agy több területén GABAerg idegsejtekben expresszálódik (Herédi és mtsai. 2017).

Ennek megfelelően vizsgálataink egyik célja annak meghatározása volt, hogy a KAT-2 három neurotranszmitter-rendszer (GABAerg, kolinerg, dopaminerg) integráns komponensének tekinthető-e. Eredményeink alapján az enzim mindhárom vizsgált rendszerben széleskörű neuronális jelenlétet mutatott és régióspecifikus különbségeket is megfigyeltünk.

8.3.1 GABAerg neuronok

Az előagy két meghatározó régiójában, a prefrontális kéregben és a hippocampusban, valamennyi GAD67⁺ interneuron KAT-2 expressziót mutatott. Az enzim a vizsgált interneuron-klaszterek (PV, SST, NPY, CR) mindegyikében kimutatható volt, ami által a KAT-2 nem egyetlen markeralcsoportozáshoz kötődik, hanem a GABAerg rendszer széles funkcionális spektrumában jelen van.

A PV⁺, gyors-tüzelésű interneuronokban megfigyelt markáns KAT-2 expresszió különösen jelentős. Ezek a sejtek az elsődleges irányítói a kortikális és hippocampális egyensúly szabályozásának. Károsodásuk a hálózati szinkronizáció összeomlását eredményezi, ezáltal működésük zavara több neurológiai folyamatban központi tényező (Hijazi és mtsai. 2023). Így a KYNA-mediált moduláció ezen sejteken keresztül potenciálisan közvetlen módon befolyásolhatja a helyi mikrohálózatok dinamikáját.

A KAT-2 GABAerg neuronokban való jelenléte érdemben megkérdőjelezi azt a klasszikus szemléletet, miszerint az endogén képződő KYNA elsősorban, vagy akár kizárólag, asztrocita-eredetű (Guidetti és mtsai. 2007). Eredményeink azt mutatják, hogy az egér agy több területén, így a hippocampusban, a striátumban, a prefrontális kéregben és az SNr régióban, a KAT-2⁺ neuronok döntő többsége gátló idegsejt. Ezáltal az interneuronok aktív és releváns forrásai lehetnek a KYNA-termelésnek, amely így nem csupán gliális, hanem interneuronális eredetű neuromodulátorként is értelmezhető.

Az interneuronális KAT-2 expresszió kiemelt jelentőségű lehet a skizofrénia tekintetében. Az NMDAR-ok funkcionális alulműködése a skizofrénia egyik legmeghatározóbb patofiziológiai folyamata, amely a kortikolimbikus hálózatok serkentő-gátló egyensúlyának tartós zavarához vezet (Cohen és mtsai. 2015). Különösen sérülékenyek a gyors tüzelésű, PV⁺ GABAerg interneuronok, amelyekben az NMDAR-jelátvitel csökkenése a γ -oszcillációk összeomlásán keresztül közvetlenül hozzájárul a kognitív diszfunkciók kialakulásához (Gonzalez-Burgos és mtsai. 2010). Mivel eredményeink szerint mind a hippocampusban, mind a prefrontális kéregben valamennyi PV-pozitív interneuron KAT-2-expressziót mutat, az adatok közvetlen funkcionális kapcsolatot sugallnak.

A GABAerg idegsejtekben termelődő KYNA közvetlenül képes lehet befolyásolni a lokális hálózati dinamikát, mivel az interneuronok szomato-dendritikus régióiban nagy sűrűségben vannak jelen NMDAR-ok (Perez-Rando és mtsai. 2017; Povysheva és Johnson 2012) és $\alpha 7$ nAChR-ok (Zarei és mtsai. 1999; Fabian-Fine és mtsai. 2001), amelyek a KYNA érzékeny célpontjai. A KAT-2 szomatikus lokalizációja alapján az interneuronokból felszabaduló KYNA elsősorban extraszinaptikus módon fejtheti ki hatását, ami autokrin és parakrin mechanizmusokon keresztül egyaránt befolyásolhatja magukat az interneuronokat, illetve az általuk gátolt piramissejtek aktivitását is.

Számos preklinikai vizsgálat igazolta, hogy az NMDAR gátlás – legyen annak eredete farmakológiai (MK-801, memantin) vagy endogén (KYNA) – szelektíven és aránytalanul nagyobb mértékben érinti a GABAerg interneuronokat, mint a piramissejteket (Homayoun és Moghaddam 2007; Riebe és mtsai. 2016; Flores-Barrera és mtsai. 2017). A KYNA blokkolja az NMDAR-okat a prefrontális GABAerg interneuronokon, ami csökkenti a gamma-aminovajsav (GABA) felszabadulását. A GABAerg gátló kontroll gyengülése a piramissejtek diszinhibíciója által azok túlzott aktiválódását idézi elő, amely a skizofrénia kognitív tüneteit meghatározó kortikális hálózati zavar egyik alapja (Erhardt és mtsai. 2017).

A fokozott agyi KYNA-szint a ventralis tegmentális területen is dopaminerg túlműködéshez vezet a GABAerg interneuronok gátlása által, hozzájárulva a pozitív tünetek kialakulásához (Grace 2017; Erhardt és mtsai. 2017). A KYNA $\alpha 7$ nAChR-okon kifejtett preszinaptikus antagonist hatása közvetlenül csökkenti a GABA felszabadulást a prefrontális kéregben, tovább erősítve a diszinhibíciót (Flores-Barrera és mtsai. 2017).

A folyamatban a neuroinflammáció kulcsszerepet játszik: kimutatták, hogy gyulladásos mediátorok, különösen az interleukin-1 β és -6, az asztrocitákban fokozzák a KYNA szintézisét (Urata és mtsai. 2014; Schwieler és mtsai. 2015; Sellgren és mtsai. 2016). A prefrontális kéregben (Schwarcz és mtsai. 2001; Plitman és mtsai. 2017) és a cerebrospinális folyadékban (Nilsson és mtsai. 2005; Erhardt és mtsai. 2001; Wang és Miller 2018) emelkedett KYNA- és L-KYN-szinteket írtak le skizofréniában, párhuzamosan az interleukin-1 β , -6 és -8 növekedésével (Gallego és mtsai. 2018; Orlovska-Waast és mtsai. 2019). Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a skizofrénia patofiziológiájának egyik meghatározó komponense a tartós gyulladásos aktivitás (Müller és mtsai. 2015). A neuroinflammációhoz társuló emelkedett KYNA-szint közvetlenül hozzájárul az NMDAR-hipofunkcióhoz, mivel a KYNA endogén antagonist az NMDAR-okon és az $\alpha 7$ nAChR-okon (Erhardt és mtsai. 2017; Schwarcz és mtsai. 2012). A kettős receptorblokád az interneuronokon súlyos gátlást eredményez, és a diszinhibíció révén a piramis sejtek hiperaktivitását váltja ki. Állatkísérletek igazolják, hogy a KYNA-szint növelése önmagában is skizofrénia-szerű eltéréseket vált ki, beleértve a prepulzus-gátlás csökkenését, a munkamemória és a végrehajtó funkciók romlását, valamint több szociális és motivációs zavar kialakulását (Erhardt és mtsai. 2004; Chess és mtsai. 2007; Trecartin és Bucci 2011; Alexander és mtsai. 2012).

A KYNA-szint emelkedése NMDAR-hipofunkciót és GABAerg diszfunkciót idéz elő, ami közvetlenül hozzájárul a skizofrénia kognitív és pszichotikus tüneteinek. Mivel eredményeink szerint a KAT-2 széleskörűen expresszálódik a prefrontális kéreg és a hippocampus GABAerg interneuronjaiban, ezek a sejtek érdemi lokális KYNA-forrást jelenthetnek. A KAT-2 által mediált KYNA-képződés így új, sejt típus-specifikus mechanisztikus kapcsolatot kínál a GABAerg interneuronok sérülékenységére, az NMDAR-hipofunkció és a skizofrénia hálózati eltérései között.

További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a skizofrénia patofiziológiájában milyen arányban játszik szerepet a diffúz, gliális eredetű KYNA, illetve az interneuronok saját, célzott KYNA-termelése, és hogy a két forrás eltérő módon járul-e hozzá az NMDAR-hipofunkció és a GABAerg diszfunkció kialakulásához.

8.3.2 Kolinerg neuronok

A striátumban a GABAerg markerekkel jelölt interneuronok esetében heterogénebb expressziós mintázat volt megfigyelhető, amely összhangban áll a régió komplex interneuron-architektúrájával. Ezzel szemben a kolinerg óriásinterneuronok minden esetben intenzív KAT-2 immunreaktivitást mutattak. A ChAT⁺ sejtekben tapasztalt homogén expresszió arra utal, hogy a striatális kolinerg moduláció és a kinurenin útvonal között szorosabb kapcsolat állhat fenn, mint azt korábban feltételezték.

A KYNA-t korábban az $\alpha 7$ nAChR-ok endogén non-kompetitív antagonistájaként írták le (Hilmas és mtsai. 2001). Ezek a receptorok nagy sűrűségben vannak jelen a kolinerg interneuronok szomatikus és dendritikus régióiban (Azam és mtsai. 2003; Pidoplichko és mtsai. 2013), továbbá kimutathatók a dopaminerg terminálisokon is, ahol szerepet játszanak a dopaminfelszabadítás preszinaptikus szabályozásában (Exley és Cragg 2008).

A kolinerg interneuronokban jelen lévő KAT-2 hozzájárulhat a helyi KYNA-szint alakulásához, amely képes lehet visszacsatolt módon modulálni az $\alpha 7$ nAChR-mediált jelátvitelt és az acetilkolinerg tónust. A kolinerg interneuronok a striátum csupán néhány százalékát teszik ki, ugyanakkor tónusos aktivitásukkal diffúz módon szabályozzák a teljes striatális mikrohálózat működését (Zhou és mtsai. 2002).

Továbbá a striátum kolinerg interneuronjai hatékony modulátorai a dopaminfelszabadításnak is, mivel aktivitásuk meghatározza a nigrostriatális dopaminjel időzítését és amplitúdóját. Szinkronizált tüzelésük nikotinos receptorokon keresztül jelentős dopaminkiráramlást képes indukálni, ami által a striatális dopaminfelszabadítás nem kizárólag a dopaminerg axonok közepagi aktivitásától függ (Threlfell és mtsai. 2012). Mindez különösen releváns olyan patológiás kórképekben, mint a Parkinson-kór, ahol a kolinerg-dopaminerg szabályozás felborulása meghatározó patofiziológiai tényező (Perez-Lloret és Barrantes 2016; Rizzi és Tan 2017).

Összességében a KAT-2 kolinerg interneuronokban való expressziója olyan sejttípus-specifikus kapcsolatot jelez a kinurenin útvonal és a striatális moduláció között, amely új szempontokkal egészítheti ki a striatális hálózatok működéséről alkotott jelenlegi képet, és potenciálisan hozzájárulhat a striatális diszfunkcióval járó kórképek jobb megértéséhez.

8.3.3 Dopaminerg neuronok

A substantia nigra két fő alrégiójában eltérő sejttípusok vesznek részt a nigrostriatalis hálózat működésében: a pars reticulata gyors tüzelésű, PV⁺ GABAerg interneuronjai alkotják a kimeneti állomást, míg a pars compacta fő komponensét a dopaminerg sejtek képezik. Eredményeink alapján mindkét sejttípus egységes KAT-2 expressziót mutatott.

Az SNr interneuronjaiban megfigyelt KAT-2 expresszió jelentős lehet, hiszen ezek a sejtek szabják meg a bazális ganglionok kimeneti tónusát és időzítését (Deniau és mtsai. 2007); így a KAT-2 enzim jelenléte ebben a populációban potenciálisan befolyásolhatja a gátló kontroll finomhangolását.

Az SNc dopaminerg neuronjai minden esetben kettős pozitivitást mutattak a TH- és KAT-2-jelölésre, jelezve a KAT-2 teljes populációra kiterjedő jelenlétét. Ezek a sejtek autonóm pacemaker-aktivitást folytatnak, amelyet döntően L-típusú feszültségfüggő Ca²⁺-csatornák nyitása során létrejövő tartós Ca²⁺-beáramlás kísér (Surmeier és mtsai. 2011). A folyamatos Ca²⁺-terhelés a mitokondriális respiráció tónusos fokozásán keresztül jelentős bioenergetikai igénybevételt és krónikus oxidatív stresszt eredményez (Zampese és Surmeier 2020). Ez a sajátos elektrofiziológiai és bioenergetikai háttér a dopaminerg neuronok kiemelt sérülékenységének egyik legfontosabb tényezője, és jól magyarázza a Parkinson-kórban megfigyelhető szelektív neuronvesztést (Philippart és mtsai. 2016). Mivel a KYNA az NMDAR-ok endogén antagonistája, a dopaminerg neuronok KAT-2 expressziója befolyásolhatja a glutamaterg hatások sejtszintű integrációját, amely mérsékelheti a Ca²⁺-túlterheléshez és oxidatív stresszhez hozzájáruló excitotoxikus hatásokat és ezáltal hozzájárulhat a dopaminerg neuronok excitabilitásának finomhangolásához.

A dopaminerg neuronok működését az $\alpha 7$ nAChR-ok is finoman szabályozzák (Wu és mtsai. 2004; Mameli-Engvall és mtsai. 2006; Melis és mtsai. 2013). Tekintettel arra, hogy a KYNA ezen receptorokon is hatékony endogén antagonista, a dopaminerg neuronok KYNA-termelése közvetlenül befolyásolhatja a dopaminfelszabadítás dinamikáját és így a striatális jelátvitelt. Az SNc idegsejtjei rendkívül széles axonális arborizációval rendelkeznek: egyetlen sejttest több százezer szinapszist képez striatális és extrastriatális területeken (Prensa és Parent 2001; Matsuda és mtsai. 2009; Pissadaki és Bolam 2013), így a KYNA nemcsak lokális, hanem rendszerszintű modulációt is eredményezhet.

A KAT-2 dopaminerg neuronokban való jelenléte fontos tényező lehet a Parkinson-kór patológiai vonatkozásában. A kinurenin útvonal egyensúlyának felborulása ugyanis szerepet játszhat a dopaminerg rendszer sérülékenységében, a KYNA-szint relatív csökkenése és a neurotoxikus metabolitok felé történő eltolódás által (Venkatesan és mtsai. 2020; Chen és Geng 2023). Az SNc teljes dopaminerg populációjában kimutatott KAT-2 expresszió olyan endogén KYNA-termelő kapacitást jelez, amely befolyásolhatja a nigrostriatalis hálózat stresszérzékenységét és működését.

8.4 A KAT-2 expressziója Parkinson-kór egérmodellben

A Parkinson-kór egyik meghatározó neuropatológiai sajátossága az SNc dopaminerg neuronjainak szelektív pusztulása, amely MPTP-kezeléssel kísérletesen is előidézhető (Schmidt és Ferger 2001). A modell validálása során az akut MPTP-terhelés dózisfüggő dopaminerg károsodását a TH immunreaktivitás csökkenésével igazoltuk, ami kvalitatív és kvantitatív módon is tükrözte a neurodegeneráció előrehaladását.

A dopaminerg károsodással párhuzamosan a KAT-2 immunreaktivitás is csökkent, ami nem meglepő, tekintve, hogy az enzim döntően magukban a degenerálódó dopaminerg sejtekben lokalizálódik. Ugyanakkor a KAT-2 elvesztés üteme nem minden tekintetben követte a TH-pozitivitás csökkenését. Míg a TH-intenzitás a neuronvesztéssel arányosan csökkent, addig a KAT-2 elvesztése már mérsékeltebb dopaminerg károsodás mellett is telítődést mutatott, és a jelterület visszaesése korábban és kifejezettebben jelentkezett. Ez arra utal, hogy a KAT-2 downregulációja nem pusztán a dopaminerg sejtek eltűnésének passzív következménye, hanem a degenerációt kísérő korai molekuláris változás lehet.

Ez a jelenség több tényezővel is magyarázható. A dopaminerg neuronok magas metabolikus terhelésűek és fokozott érzékenységet mutatnak az oxidatív stresszre, ami számos enzim és transzkripció útján stresszfüggő szabályozását eredményezi (Ni és Ernst 2022; Flores-Ponce és Velasco 2024). Az MPTP-terhelés korai szakaszában bekövetkező mitokondriális diszfunkció és Ca^{2+} -homeosztázis-zavarok olyan sejtszintű stresszválaszokat aktiválhatnak, amelyek a KAT-2 expresszió visszaesését váltják ki, még mielőtt a dopaminerg neuronok strukturális károsodása bekövetkezne.

Parkinson-kórban a kinurenin útvonal egyensúlyának felborulását több vizsgálat is leírta, ahol a dopaminerg degeneráció egyik lehetséges modulátoraként értelmezhető a KYNA-szint relatív csökkenése (Venkatesan és mtsai. 2020; Chen és Geng 2023).

Bár számos tanulmány leírta a KYNA-szint csökkenését humán posztmortem agyszövetben és cerebrospinális folyadékban (Ogawa és mtsai. 1992; Sorgdrager és mtsai. 2019), a jelenség pontos oka továbbra sem tisztázott. Egy klasszikus hipotézis szerint a neuroinflammáció hatására a kinurenin metabolizmus egyensúlya borul fel. Az aktivált mikroglia és asztrociták által termelt gyulladásos mediátorok elősegíthetik a KYNA/QUIN arány neurotoxikus irányú eltolódását, ami fokozott excitotoxicitáshoz és oxidatív stresszhez vezethet.

Ugyanakkor ez az elmélet önmagában nem magyarázza, hogy a KYNA-szint csökkenése miért olyan nagymértékű, illetve miért mutat ennyire következetes regionális mintázatot az SNc területén. A kérdést tovább árnyalja, hogy több kísérletes munka épp a KYNA-szintézis fokozódását figyelte meg gyulladás hatására asztrocitákban (Urata és mtsai. 2014; Schwieler és mtsai. 2015; Sellgren és mtsai. 2016), ami ellentmond annak az egyszerű modellnek, amely szerint a KYNA-depléción pusztán a gyulladásos anyagcsere-eltolódás következménye lenne. Ez a bizonytalanság rámutat arra, hogy a KYNA-szint változását további, a jelenleginél kevésbé feltárt régió- és sejttípus-specifikus mechanizmusok is befolyásolhatják.

Eredményeink új megközelítést kínálnak a kérdés megválaszolásához. A KAT-2 az SNc dopaminerg neuronjainak konstitutív eleme, ezáltal a Parkinson-kórban megfigyelt KYNA-csökkenés egyik közvetlen oka maga a dopaminerg idegsejtek progresszív pusztulása lehet. Azáltal, hogy a neuronok elhalnak, a helyi KYNA-forrás kvantitatívan is kimerül. A KAT-2 downregulációja tovább csökkentheti a KYNA-termelő kapacitást, és ezzel mérsékelheti a sejtek excitotoxicitás és oxidatív stressz elleni endogén védelmét.

A folyamat tehát egy kétlépcsős, önmagát erősítő körként értelmezhető: a kinurenin útvonal neurotoxikus metabolitok irányába való eltolódása indíthatja be magát a dopaminerg sejtkárosodást, míg a KAT-2-t expresszáló neuronok elvesztése miatt kialakuló relatív vagy abszolút KYNA-hiány tovább fokozhatja a sérülékenységet, ezáltal a neurodegenerációt. Ez a megközelítés lehetővé teszi, hogy a kinurenin útvonalról alkotott, elsősorban biokémiai szintű modelleket összhangba hozzuk a régió- és sejtspecifikus degeneratív mintázatokkal.

9 Következtetések

Kísérleteink során a KAT-2 enzim sejttípus-specifikus és regionális expresszióját vizsgáltuk egérben fiziológiás és patológias állapotban, *in vitro* sejtenyészetek és *in situ* agyszöveti vizsgálatok integrált alkalmazásával.

Az alábbiakban foglaljuk össze, hogy kutatásunk miként válaszolta meg a célkitűzésekben megfogalmazott kérdéseket, és milyen következtetések vonhatók le:

1. *In vitro* kísérleteinkben elsőként vizsgáltuk és írtuk le a KAT-2 sejttípus-specifikus expresszióját egér agy eredetű primer sejtenyészetekben. Immuncitokémiai vizsgálataink kvalitatív és kvantitív kolokalizációs elemzések alapján igazolták, hogy az enzim asztrocitákban, mikroglia-kban és neuronokban egyaránt kifejeződik. Eredményeink arra utalnak, hogy a KYNA-szintézis celluláris forrása jóval szélesebb, mint ahogyan azt a klasszikus glia-centrikus modell feltételezi; a sejttípusok funkcionális hozzájárulásának feltárása a jövőben kiemelt jelentőségű.

2. *In situ* agyszövetben végzett regionális vizsgálataink alapján a KAT-2 expressziója az előagyban és a kisagyban egyaránt kiterjedt, ugyanakkor eltérő mintázatot mutatott. Míg az előagy kortikális, limbikus és szubkortikális hálózataiban a KAT-2 széleskörű eloszlását figyeltük meg, addig a kisagyban jól definiálható, rétegspecifikus szerveződést detektáltunk. Ezek a különbségek arra utalnak, hogy a KAT-2 által mediált KYNA-bioszintézis mechanisztikus háttere nem egységes, hanem kifejezetten agyrégió-függő.

3. Elsőként írtuk le, hogy a kisagyban a KAT-2 expressziója kizárólag neuronális eredetű, amely alapvetően eltér az előagy több sejttípusra kiterjedő mintázatától. A gliális expresszió hiánya alapján a KAT-2 sejttípus-specifikus szerepe, és így a KYNA-bioszintézis sejteredete markánsan régiófüggő, és a kisagy sajátos kivételt képez a kinurenin útvonal szerveződésében.

4. A neurotranszmitter-rendszerek vizsgálata során elsőként azonosítottunk KAT-2 expressziót mutató neuronaltípusokat a GABAerg, kolinerg és dopaminerg hálózatokban, és feltérképeztük a KAT-2-pozitív GABAerg interneuronok fő alcsoportjait is. Eredményeink alapján a KAT-2 a neuronpopulációk széles körének integráns komponense, ami a KYNA-termelődés jelentős neuronális szerepére utal.

5. Validáltuk az akut, MPTP-alapú *in vivo* Parkinson-kór toxinmodellt, és posztmortem szövettani vizsgálatokkal igazoltuk a substantia nigra pars compacta dózisfüggő dopaminerg neuronvesztését. Elsőként vizsgáltuk a KAT-2 expresszióját Parkinson-kór egér modellben, és kimutattuk, hogy az enzim jelintenzitása dózisfüggően csökkent, ugyanakkor a jelvesztés kinetikája több ponton eltért a dopaminerg neuronpopuláció károsodásának dinamikájától. Eredményeink arra utalnak, hogy a KAT-2 downregulációja nem pusztán a sejtpusztulás passzív következménye, hanem a dopaminerg degeneráció korai fázisában megjelenő, önálló sejtszintű folyamat lehet, amely új magyarázatot kínálhat a Parkinson-kórban leírt KYNA-deplécio patogenezisére.

10 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet **Prof. Dr. Toldi Józsefnek**, hogy pályám kezdetén, már szakdolgozóként bizalmat szavazott nekem, és lehetőséget biztosított, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak. Szakmai alázata, kivételes embersége és önzetlen segítőkészsége mind szakmai, mind emberi értelemben példakép számomra.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Kis Zsoltnak**, témavezetőmnek, aki kutatói pályám során éveken át kísért utamon. Értékes tanácsaival, szakmai meglátásaival és támogatásával mindig a helyes irányba terelt, elméleti és gyakorlati iránymutatása pedig lehetővé tette publikációim és értekezésem elkészítését.

Köszönöm **Prof. Dr. Vécsei Lászlónak**, hogy támogatta kutatócsoportunk munkáját, és mindig biztató, ösztönző szavakkal segítette kutatásaimat.

Hálás vagyok **Dr. Varga Csabának**, az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított kutatásaim folytatására a tanszéken és támogatásával segítette munkám előrehaladását. Emellett hálás vagyok a tanszék valamennyi jelenlegi és korábbi munkatársának, akik bármilyen formában hozzájárultak kutatásaim megvalósításához és a kísérletek sikeréhez.

Köszönettel tartozom **Dr. Pesti Istvánnak**, **Dr. Wilhelm Imolának**, **Dr. Tóth E. Melindának** és **Dr. Dukay Brigitta Dórának**, akik nélkül az *in vitro* kísérletek nem valósulhattak volna meg.

Köszönet illeti **Dr. Gellért Leventét** és **Dr. Herédi Juditot**, korábbi témavezetőimet, akik bevezettek az elektrofiziológia és immunhisztokémia világába, valamint szakmai tudásukkal meghatározó alapot biztosítottak kutatói fejlődésemhez.

Köszönöm **Huszár Lászlóné Dr. Fehér Evelinnek** és **Dr. Farkas Tamásnak** a közös munkát, valamint a laboratóriumban nyújtott segítséget és támogatást.

Külön szeretném megköszönni **Dr. Balog Emmának**, hogy nemcsak kollégaként, hanem barátként is végigkísért egyetemi és kutatói pályámon. Meghatározó társam volt ezen az úton: támogatásával és őszinte barátságával segített továbblendülni a nehéz időszakokon, és mindig új erőt adott a folytatáshoz.

Végül, de nem utolsósorban, szívből köszönöm **családomnak és barátaimnak** a szeretetet, támogatást és hitet, amellyel mindvégig kitartóan mellettem álltak.

11 Irodalomjegyzék

- Alberati-Giani, D., P. Ricciardi-Castagnoli, C. Köhler, és A. M. Cesura. 1996. „Regulation of the Kynurenine Metabolic Pathway by Interferon-Gamma in Murine Cloned Macrophages and Microglial Cells”. *Journal of Neurochemistry* 66 (3): 996–1004. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66030996.x>.
- Alexander, Kathleen S., Hui-Qiu Wu, Robert Schwarcz, és John P. Bruno. 2012. „Acute Elevations of Brain Kynurenic Acid Impair Cognitive Flexibility: Normalization by the Alpha7 Positive Modulator Galantamine”. *Psychopharmacology* 220 (3): 627–37. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2539-2>.
- Alkondon, Manickavasagom, Edna F. R. Pereira, Spencer W. Todd, William R. Randall, Malcolm V. Lane, és Edson X. Albuquerque. 2015. „Functional G-Protein-Coupled Receptor 35 Is Expressed by Neurons in the CA1 Field of the Hippocampus”. *Biochemical Pharmacology* 93 (4): 506–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.009>.
- Amori, L, H.-Q. Wu, M Marinozzi, R Pellicciari, P Guidetti, és R Schwarcz. 2009. „Specific inhibition of kynurenate synthesis enhances extracellular dopamine levels in the rodent striatum”. *Neuroscience* 159 (1): 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.11.055>.
- Arnold, G., L. Liscum, és E. Holtzman. 1979. „Ultrastructural Localization of D-Amino Acid Oxidase in Microperoxisomes of the Rat Nervous System”. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 27 (3): 735–45. <https://doi.org/10.1177/27.3.39097>.
- Azam, L., U. Winzer-Serhan, és F. M. Leslie. 2003. „Co-Expression of Alpha7 and Beta2 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit mRNAs within Rat Brain Cholinergic Neurons”. *Neuroscience* 119 (4): 965–77. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00220-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00220-3).
- Badawy, Abdulla A.-B. 2017. „Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects”. *International Journal of Tryptophan Research: IJTR* 10: 1178646917691938. <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>.
- Bagasrawala, Inseyah, Nada Zecevic, és Nevena V. Radonjić. 2016. „N-Methyl D-Aspartate Receptor Antagonist Kynurenic Acid Affects Human Cortical Development”. *Frontiers in Neuroscience* 10 (szeptember): 435. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00435>.
- Bagnall, Martha W., Brian Zingg, Alexandra Sakatos, Setareh H. Moghadam, Hanns Ulrich Zeilhofer, és Sascha du Lac. 2009. „Glycinergic Projection Neurons of the Cerebellum”. *The Journal of Neuroscience* 29 (32): 10104–10. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2087-09.2009>.
- Beal, M. F., W. R. Matson, E. Storey, és mtsai. 1992. „Kynurenic Acid Concentrations Are Reduced in Huntington’s Disease Cerebral Cortex”. *Journal of the Neurological Sciences* 108 (1): 80–87. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(92\)90191-m](https://doi.org/10.1016/0022-510x(92)90191-m).
- Beal, M. F., W. R. Matson, K. J. Swartz, P. H. Gamache, és E. D. Bird. 1990. „Kynurenine Pathway Measurements in Huntington’s Disease Striatum: Evidence for Reduced Formation of Kynurenic Acid”. *Journal of Neurochemistry* 55 (4): 1327–39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb03143.x>.

- Behl, Tapan, Ishnoor Kaur, Aayush Sehgal, és mtsai. 2021. „The Footprint of Kynurenine Pathway in Neurodegeneration: Janus-Faced Role in Parkinson's Disorder and Therapeutic Implications”. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (13): 6737. <https://doi.org/10.3390/ijms22136737>.
- Bender, D. A. 1983. „Biochemistry of Tryptophan in Health and Disease”. *Molecular Aspects of Medicine* 6 (2): 101–97. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(83\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0098-2997(83)90005-5).
- Berlinguer-Palmini, Rolando, Alessio Masi, Roberto Narducci, és mtsai. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082180>.
- Bertolino, M., S. Vicini, és E. Costa. 1989. „Kynurenic Acid Inhibits the Activation of Kainic and N-Methyl-D-Aspartic Acid-Sensitive Ionotropic Receptors by a Different Mechanism”. *Neuropharmacology* 28 (5): 453–57. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(89\)90078-6](https://doi.org/10.1016/0028-3908(89)90078-6).
- Birch, P. J., C. J. Grossman, és A. G. Hayes. 1988. „Kynurenic Acid Antagonises Responses to NMDA via an Action at the Strychnine-Insensitive Glycine Receptor”. *European Journal of Pharmacology* 154 (1): 85–87. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90367-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90367-6).
- Blanco Ayala, Tonali, Rafael Lugo Huitrón, Liliana Carmona Aparicio, és mtsai. 2015. „Alternative Kynurenic Acid Synthesis Routes Studied in the Rat Cerebellum”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 178. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00178>.
- Bové, Jordi, Delphine Prou, Céline Perier, és Serge Przedborski. 2005. „Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease”. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2 (3): 484–94. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.484>.
- Braak, Heiko, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A. I. de Vos, Ernst N. H. Jansen Steur, és Eva Braak. 2003. „Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease”. *Neurobiology of Aging* 24 (2): 197–211. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00065-9).
- Burnet, P. W. J., S. L. Eastwood, G. C. Bristow, és mtsai. 2008. „D-Amino Acid Oxidase Activity and Expression Are Increased in Schizophrenia”. *Molecular Psychiatry* 13 (7): 658–60. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.47>.
- Campesan, Susanna, Edward W. Green, Carlo Breda, és mtsai. 2011. „The Kynurenine Pathway Modulates Neurodegeneration in a Drosophila Model of Huntington's Disease”. *Current Biology: CB* 21 (11): 961–66. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.028>.
- Cerqueira, N. M. F. S. A., P. A. Fernandes, és M. J. Ramos. 2011. „Computational Mechanistic Studies Addressed to the Transamination Reaction Present in All Pyridoxal 5'-Phosphate-Requiring Enzymes”. *Journal of Chemical Theory and Computation* 7 (5): 1356–68. <https://doi.org/10.1021/ct1002219>.
- Chauvel, Virginie, Eniko Vamos, Arpad Pardutz, Laszlo Vecsei, Jean Schoenen, és Sylvie Multon. 2012. „Effect of Systemic Kynurenine on Cortical Spreading Depression and Its Modulation by Sex Hormones in Rat”. *Experimental Neurology* 236 (2): 207–14. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.05.002>.

- Chen, Ping, és Xiaofei Geng. 2023. „Research Progress on the Kynurenine Pathway in the Prevention and Treatment of Parkinson’s Disease”. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 38 (1): 2225800. <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2225800>.
- Chess, Amy C., Michael K. Simoni, Torey E. Alling, és David J. Bucci. 2007. „Elevations of Endogenous Kynurenic Acid Produce Spatial Working Memory Deficits”. *Schizophrenia Bulletin* 33 (3): 797–804. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbl033>.
- Cohen, Samuel M., Richard W. Tsien, Donald C. Goff, és Michael M. Halassa. 2015. „The Impact of NMDA Receptor Hypofunction on GABAergic Neurons in the Pathophysiology of Schizophrenia”. *Schizophrenia Research* 167 (1–3): 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.12.026>.
- Deniau, J. M., P. Mailly, N. Maurice, és S. Charpier. 2007. „The Pars Reticulata of the Substantia Nigra: A Window to Basal Ganglia Output”. *Progress in Brain Research* 160: 151–72. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60009-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60009-5).
- Desai, V. G., R. J. Feuers, R. W. Hart, és S. F. Ali. 1996. „MPP(+)-Induced Neurotoxicity in Mouse Is Age-Dependent: Evidenced by the Selective Inhibition of Complexes of Electron Transport”. *Brain Research* 715 (1–2): 1–8. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01255-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01255-9).
- Di MONTE, Donato A., Ellen Y. Wu, és J. William Langston. 1992. „Role of Astrocytes in MPTP Metabolism and Toxicity”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 648 (1): 219–28. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb24541.x>.
- DiNatale, Brett C., Iain A. Murray, Jennifer C. Schroeder, és mtsai. 2010. „Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand That Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling”. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 115 (1): 89–97. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq024>.
- Dounay, Amy B., Marie Anderson, Bruce M. Bechle, és mtsai. 2012. „Discovery of Brain-Penetrant, Irreversible Kynurenine Aminotransferase II Inhibitors for Schizophrenia”. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 3 (3): 187–92. <https://doi.org/10.1021/ml200204m>.
- Du, F., W. Schmidt, E. Okuno, R. Kido, C. Köhler, és R. Schwarcz. 1992. „Localization of Kynurenine Aminotransferase Immunoreactivity in the Rat Hippocampus”. *The Journal of Comparative Neurology* 321 (3): 477–87. <https://doi.org/10.1002/cne.903210313>.
- Eggen, B. J. L., D. Raj, U.-K. Hanisch, és H. W. G. M. Boddeke. 2013. „Microglial Phenotype and Adaptation”. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 8 (4): 807–23. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9490-4>.
- Erhardt, S., K. Blennow, C. Nordin, E. Skogh, L. H. Lindström, és G. Engberg. 2001. „Kynurenic Acid Levels Are Elevated in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Schizophrenia”. *Neuroscience Letters* 313 (1–2): 96–98. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)02242-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)02242-x).
- Erhardt, Sophie, Lilly Schwieler, Carolina Emanuelsson, és Mark Geyer. 2004. „Endogenous Kynurenic Acid Disrupts Prepulse Inhibition”. *Biological Psychiatry* 56 (4): 255–60. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.06.006>.

- Erhardt, Sophie, Lilly Schwieler, Sophie Imbeault, és Göran Engberg. 2017. „The Kynurenine Pathway in Schizophrenia and Bipolar Disorder”. *Neuropharmacology* 112 (Pt B): 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.020>.
- Exley, R., és S. J. Cragg. 2008. „Presynaptic Nicotinic Receptors: A Dynamic and Diverse Cholinergic Filter of Striatal Dopamine Neurotransmission”. *British Journal of Pharmacology* 153 Suppl 1 (Suppl 1): S283-297. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707510>.
- Fabian-Fine, Ruth, Paul Skehel, Mick L. Errington, és mtsai. 2001. „Ultrastructural Distribution of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit in Rat Hippocampus”. *The Journal of Neuroscience* 21 (20): 7993–8003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-07993.2001>.
- Fernagut, Pierre-Olivier, és Marie-Françoise Chesselet. 2004. „Alpha-Synuclein and Transgenic Mouse Models”. *Neurobiology of Disease* 17 (2): 123–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.001>.
- Ferro, Marcelo Machado, Maria Ines Bellissimo, Janete Aparecida Anselmo-Franci, Miriam Elizabeth Mendes Angellucci, Newton Sabino Canteras, és Claudio Da Cunha. 2005. „Comparison of Bilaterally 6-OHDA- and MPTP-Lesioned Rats as Models of the Early Phase of Parkinson’s Disease: Histological, Neurochemical, Motor and Memory Alterations”. *Journal of Neuroscience Methods* 148 (1): 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.04.005>.
- Flores-Barrera, Eden, Daniel R. Thomases, Daryn K. Cass, és mtsai. 2017. „Preferential Disruption of Prefrontal GABAergic Function by Nanomolar Concentrations of the $\alpha 7$ nACh Negative Modulator Kynurenic Acid”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (33): 7921–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0932-17.2017>.
- Flores-Ponce, Xóchitl, és Iván Velasco. 2024. „Dopaminergic Neuron Metabolism: Relevance for Understanding Parkinson’s Disease”. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society* 20 (6): 116. <https://doi.org/10.1007/s11306-024-02181-4>.
- Fukui, S., R. Schwarcz, S. I. Rapoport, Y. Takada, és Q. R. Smith. 1991. „Blood-Brain Barrier Transport of Kynurenines: Implications for Brain Synthesis and Metabolism”. *Journal of Neurochemistry* 56 (6): 2007–17. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x>.
- Gál, E. M., és A. D. Sherman. 1978. „Synthesis and Metabolism of L-Kynurenine in Rat Brain”. *Journal of Neurochemistry* 30 (3): 607–13. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1978.tb07815.x>.
- Gallego, Juan A., Emily A. Blanco, Sehba Husain-Krautter, és mtsai. 2018. „Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Patients with Schizophrenia Spectrum Disorders: New Data and an Updated Meta-Analysis”. *Schizophrenia Research* 202: 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.07.019>.
- García-Lara, Lucia, Francisca Pérez-Severiano, Dinora González-Esquivel, Guillermo Elizondo, és José Segovia. 2015. „Absence of Aryl Hydrocarbon Receptors Increases Endogenous Kynurenic Acid Levels and Protects Mouse Brain against Excitotoxic Insult and Oxidative Stress”. *Journal of Neuroscience Research* 93 (9): 1423–33. <https://doi.org/10.1002/jnr.23595>.

- Garrison, Allison M., Jennifer M. Parrott, Arnulfo Tuñon, Jennifer Delgado, Laney Redus, és Jason C. O'Connor. 2018. „Kynurenine Pathway Metabolic Balance Influences Microglia Activity: Targeting Kynurenine Monooxygenase to Dampen Neuroinflammation”. *Psychoneuroendocrinology* 94: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.04.019>.
- Garthwaite, G., és J. Garthwaite. 1987. „Quinolate Mimics Neurotoxic Actions of N-Methyl-D-Aspartate in Rat Cerebellar Slices”. *Neuroscience Letters* 79 (1–2): 35–39. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90668-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90668-9).
- Gigler, Gábor, Gábor Szénási, Annamária Simó, és mtsai. 2007. „Neuroprotective Effect of L-Kynurenine Sulfate Administered before Focal Cerebral Ischemia in Mice and Global Cerebral Ischemia in Gerbils”. *European Journal of Pharmacology* 564 (1–3): 116–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.029>.
- Giorgini, Flaviano, Shao-Yi Huang, Korrapati V. Sathyaikumar, és mtsai. 2013. „Targeted Deletion of Kynurenine 3-Monooxygenase in Mice: A New Tool for Studying Kynurenine Pathway Metabolism in Periphery and Brain”. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (51): 36554–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503813>.
- Gonzalez-Burgos, Guillermo, Takanori Hashimoto, és David A. Lewis. 2010. „Alterations of Cortical GABA Neurons and Network Oscillations in Schizophrenia”. *Current Psychiatry Reports* 12 (4): 335–44. <https://doi.org/10.1007/s11920-010-0124-8>.
- Grace, Anthony A. 2017. „Dopamine System Dysregulation and the Pathophysiology of Schizophrenia: Insights From the Methylazoxymethanol Acetate Model”. *Biological Psychiatry* 81 (1): 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.11.007>.
- Guidetti, P., E. Okuno, és R. Schwarcz. 1997. „Characterization of Rat Brain Kynurenine Aminotransferases I and II”. *Journal of Neuroscience Research* 50 (3): 457–65. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19971101\)50:3%253C457::AID-JNR12%253E3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19971101)50:3%253C457::AID-JNR12%253E3.0.CO;2-3).
- Guidetti, Paolo, Gloria E. Hoffman, Miguel Melendez-Ferro, Edson X. Albuquerque, és Robert Schwarcz. 2007. „Astrocytic Localization of Kynurenine Aminotransferase II in the Rat Brain Visualized by Immunocytochemistry”. *Glia* 55 (1): 78–92. <https://doi.org/10.1002/glia.20432>.
- Guillemin, G. J., S. J. Kerr, G. A. Smythe, és mtsai. 2001. „Kynurenine Pathway Metabolism in Human Astrocytes: A Paradox for Neuronal Protection”. *Journal of Neurochemistry* 78 (4): 842–53. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00498.x>.
- Guillemin, Gilles J., Karen M. Cullen, Chai K. Lim, és mtsai. 2007. „Characterization of the Kynurenine Pathway in Human Neurons”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (47): 12884–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4101-07.2007>.
- Guillemin, Gilles J., George Smythe, Osamu Takikawa, és Bruce J. Brew. 2005. „Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Production of Quinolinic Acid by Human Microglia, Astrocytes, and Neurons”. *Glia* 49 (1): 15–23. <https://doi.org/10.1002/glia.20090>.
- Gutiérrez-Vázquez, Cristina, és Francisco J. Quintana. 2018. „Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor”. *Immunity* 48 (1): 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.012>.

- Hahn, Britta, Carolyn H. Reneski, Ana Pocivavsek, és Robert Schwarcz. 2018. „Prenatal Kynurenine Treatment in Rats Causes Schizophrenia-like Broad Monitoring Deficits in Adulthood”. *Psychopharmacology* 235 (3): 651–61. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4780-9>.
- Han, Qian, Tao Cai, Danilo A. Tagle, és Jianyong Li. 2010. „Structure, Expression, and Function of Kynurenine Aminotransferases in Human and Rodent Brains”. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (3): 353–68. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0166-4>.
- Han, Qian, Tao Cai, Danilo A Tagle, és Jianyong Li. 2010. „Thermal stability, pH dependence and inhibition of four murine kynurenine aminotransferases”. *BMC Biochemistry* 11 (május): 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-11-19>.
- He, Xi Jun, és Hiroyuki Nakayama. 2009. „Neurogenesis in Neurotoxin-Induced Animal Models for Parkinson’s Disease-A Review of the Current Status”. *Journal of Toxicologic Pathology* 22 (2): 101–8. <https://doi.org/10.1293/tox.22.101>.
- Herédi, Judit, Anikó Magyariné Berkó, Ferenc Jankovics, és mtsai. 2017. „Astrocytic and Neuronal Localization of Kynurenine Aminotransferase-2 in the Adult Mouse Brain”. *Brain Structure & Function* 222 (4): 1663–72. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1299-5>.
- Heyes, M. P., K. Saito, J. S. Crowley, és mtsai. 1992. „Quinolinic Acid and Kynurenine Pathway Metabolism in Inflammatory and Non-Inflammatory Neurological Disease”. *Brain: A Journal of Neurology* 115 (Pt 5) (október): 1249–73. <https://doi.org/10.1093/brain/115.5.1249>.
- Hijazi, Sara, August B. Smit, és Ronald E. van Kesteren. 2023. „Fast-Spiking Parvalbumin-Positive Interneurons in Brain Physiology and Alzheimer’s Disease”. *Molecular Psychiatry* 28 (12): 4954–67. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02168-y>.
- Hilmas, C., E. F. Pereira, M. Alkondon, A. Rassoulpour, R. Schwarcz, és E. X. Albuquerque. 2001. „The Brain Metabolite Kynurenic Acid Inhibits Alpha7 Nicotinic Receptor Activity and Increases Non-Alpha7 Nicotinic Receptor Expression: Physiopathological Implications”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (19): 7463–73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-19-07463.2001>.
- Homayoun, Houman, és Bitá Moghaddam. 2007. „NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (43): 11496–500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2213-07.2007>.
- Horiike, K., H. Tojo, R. Arai, T. Yamano, M. Nozaki, és T. Maeda. 1987. „Localization of D-Amino Acid Oxidase in Bergmann Glial Cells and Astrocytes of Rat Cerebellum”. *Brain Research Bulletin* 19 (5): 587–96. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90076-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90076-1).
- Inoue, H., K. Castagnoli, C. Van Der Schyf, S. Mabic, K. Igarashi, és N. Castagnoli. 1999. „Species-Dependent Differences in Monoamine Oxidase A and B-Catalyzed Oxidation of Various C4 Substituted 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3, 6-Tetrahydropyridinyl Derivatives”. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 291 (2): 856–64.

Jackson-Lewis, Vernice, és Serge Przedborski. 2007. „Protocol for the MPTP Mouse Model of Parkinson’s Disease”. *Nature Protocols* 2 (1): 141–51. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.342>.

Jauch, D., E. M. Urbńska, P. Guidetti, és mtsai. 1995. „Dysfunction of Brain Kynurenic Acid Metabolism in Huntington’s Disease: Focus on Kynurenine Aminotransferases”. *Journal of the Neurological Sciences* 130 (1): 39–47. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(94\)00280-2](https://doi.org/10.1016/0022-510x(94)00280-2).

Jorratt, Pascal, Cyril Hoschl, és Saak V. Ovsepian. 2021. „Endogenous Antagonists of N-Methyl-d-Aspartate Receptor in Schizophrenia”. *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 17 (5): 888–905. <https://doi.org/10.1002/alz.12244>.

Kapoor, R., E. Okuno, R. Kido, és V. Kapoor. 1997. „Immuno-Localization of Kynurenine Aminotransferase (KAT) in the Rat Medulla and Spinal Cord”. *Neuroreport* 8 (16): 3619–23. <https://doi.org/10.1097/00001756-199711100-00039>.

Kapoor, Ranjna, Kelly Sy Lim, Alice Cheng, Therese Garrick, és Vimal Kapoor. 2006. „Preliminary Evidence for a Link between Schizophrenia and NMDA-Glycine Site Receptor Ligand Metabolic Enzymes, d-Amino Acid Oxidase (DAAO) and Kynurenine Aminotransferase-1 (KAT-1)”. *Brain Research* 1106 (1): 205–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.082>.

Kessler, M., T. Terramani, G. Lynch, és M. Baudry. 1989. „A Glycine Site Associated with N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptors: Characterization and Identification of a New Class of Antagonists”. *Journal of Neurochemistry* 52 (4): 1319–28. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb01881.x>.

Kiss, C., G. Ceresoli-Borroni, P. Guidetti, C. L. Zielke, H. R. Zielke, és R. Schwarcz. 2003. „Kynurenate Production by Cultured Human Astrocytes”. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 110 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0770-z>.

Knyihár-Csillik, E., B. Csillik, M. Pákási, és mtsai. 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.043>.

Konradsson-Geuken, A., H. Q. Wu, C. R. Gash, és mtsai. 2010. „Cortical Kynurenic Acid Bi-Directionally Modulates Prefrontal Glutamate Levels as Assessed by Microdialysis and Rapid Electrochemistry”. *Neuroscience* 169 (4): 1848–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.052>.

Kopin, I. J. 1992. „Features of the Dopaminergic Neurotoxin MPTP”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 648 (május): 96–104. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb24527.x>.

Koshy Cherian, Ajeesh, Howard Gritton, David E. Johnson, Damon Young, Rouba Kozak, és Martin Sarter. 2014. „A Systemically-Available Kynurenine Aminotransferase II (KAT II) Inhibitor Restores Nicotine-Evoked Glutamatergic Activity in the Cortex of Rats”. *Neuropharmacology* 82 (július): 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.03.004>.

- Kozak, Rouba, Brian M. Campbell, Christine A. Strick, és mtsai. 2014. „Reduction of Brain Kynurenic Acid Improves Cognitive Function”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (32): 10592–602. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1107-14.2014>.
- Li, Yang, Nan Hu, Dan Yang, Gregory Oxenkrug, és Qing Yang. 2017. „Regulating the Balance between the Kynurenine and Serotonin Pathways of Tryptophan Metabolism”. *The FEBS Journal* 284 (6): 948–66. <https://doi.org/10.1111/febs.14026>.
- Liebig, J. 1853. „Ueber Kynurensäure”. *Justus Liebigs Annalen Der Chemie* 86 (1): 125–26. <https://doi.org/10.1002/jlac.18530860115>.
- Lim, Chai K., Francisco J. Fernández-Gomez, Nady Braidy, és mtsai. 2017. „Involvement of the Kynurenine Pathway in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease”. *Progress in Neurobiology* 155: 76–95. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.009>.
- Luchowski, Piotr, Elzbieta Luchowska, Waldemar A. Turski, és Ewa M. Urbanska. 2002. „1-Methyl-4-Phenylpyridinium and 3-Nitropropionic Acid Diminish Cortical Synthesis of Kynurenic Acid via Interference with Kynurenine Aminotransferases in Rats”. *Neuroscience Letters* 330 (1): 49–52. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00735-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00735-8).
- Lugo-Huitrón, Rafael, Perla Ugalde Muñiz, Benjamin Pineda, José Pedraza-Chaverri, Camilo Ríos, és Verónica Pérez-de la Cruz. 2013. „Quinolinic Acid: An Endogenous Neurotoxin with Multiple Targets”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013: 104024. <https://doi.org/10.1155/2013/104024>.
- Mameli-Engvall, Monica, Alexis Evrard, Stéphanie Pons, és mtsai. 2006. „Hierarchical Control of Dopamine Neuron-Firing Patterns by Nicotinic Receptors”. *Neuron* 50 (6): 911–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.007>.
- Matsuda, Wakoto, Takahiro Furuta, Kouichi C. Nakamura, és mtsai. 2009. „Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (2): 444–53. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>.
- Mehta, P. K., T. I. Hale, és P. Christen. 1993. „Aminotransferases: Demonstration of Homology and Division into Evolutionary Subgroups”. *European Journal of Biochemistry* 214 (2): 549–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17953.x>.
- Melis, Miriam, Simona Scheggi, Gianfranca Carta, és mtsai. 2013. „PPAR α Regulates Cholinergic-Driven Activity of Midbrain Dopamine Neurons via a Novel Mechanism Involving A7 Nicotinic Acetylcholine Receptors”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (14): 6203–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4647-12.2013>.
- Meredith, Gloria E., és David J. Rademacher. 2011. „MPTP Mouse Models of Parkinson’s Disease: An Update”. *Journal of Parkinson’s Disease* 1 (1): 19–33. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11023>.
- Milosavljevic, Snezana, Andrew K. Smith, Courtney J. Wright, Homayoun Valafar, és Ana Pocivavsek. 2023. „Kynurenine Aminotransferase II Inhibition Promotes Sleep and Rescues Impairments Induced by Neurodevelopmental Insult”. *Translational Psychiatry* 13 (1): 106. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02399-1>.

- Miranda, A. F., R. J. Boegman, R. J. Beninger, és K. Jhamandas. 1997. „Protection against Quinolinic Acid-Mediated Excitotoxicity in Nigrostriatal Dopaminergic Neurons by Endogenous Kynurenic Acid”. *Neuroscience* 78 (4): 967–75. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00655-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00655-0).
- Mullen, R. J., C. R. Buck, és A. M. Smith. 1992. „NeuN, a Neuronal Specific Nuclear Protein in Vertebrates”. *Development (Cambridge, England)* 116 (1): 201–11. <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>.
- Mustapha, Musa, és Che Norma Mat Taib. 2021. „MPTP-Induced Mouse Model of Parkinson’s Disease: A Promising Direction of Therapeutic Strategies”. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 21 (4): 422–33. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.5181>.
- Müller, Norbert, Elif Weidinger, Bianka Leitner, és Markus J. Schwarz. 2015. „The Role of Inflammation in Schizophrenia”. *Frontiers in Neuroscience* 9: 372. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00372>.
- Nematollahi, Alireza, Guanchen Sun, Gayan S. Jayawickrama, Jane R. Hanrahan, és W. Bret Church. 2016. „Study of the Activity and Possible Mechanism of Action of a Reversible Inhibitor of Recombinant Human KAT-2: A Promising Lead in Neurodegenerative and Cognitive Disorders”. *Molecules (Basel, Switzerland)* 21 (7): 856. <https://doi.org/10.3390/molecules21070856>.
- Ni, Anjie, és Carl Ernst. 2022. „Evidence That Substantia Nigra Pars Compacta Dopaminergic Neurons Are Selectively Vulnerable to Oxidative Stress Because They Are Highly Metabolically Active”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16: 826193. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.826193>.
- Nilsson, L. K., K. R. Linderholm, G. Engberg, és mtsai. 2005. „Elevated Levels of Kynurenic Acid in the Cerebrospinal Fluid of Male Patients with Schizophrenia”. *Schizophrenia Research* 80 (2–3): 315–22. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2005.07.013>.
- Ogawa, T., W. R. Matson, M. F. Beal, és mtsai. 1992. „Kynurenine Pathway Abnormalities in Parkinson’s Disease”. *Neurology* 42 (9): 1702–6. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.9.1702>.
- Okuda, S., N. Nishiyama, H. Saito, és H. Katsuki. 1998. „3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity”. *Journal of Neurochemistry* 70 (1): 299–307. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70010299.x>.
- Okuno, E., F. Du, T. Ishikawa, és mtsai. 1990. „Purification and Characterization of Kynurenine-Pyruvate Aminotransferase from Rat Kidney and Brain”. *Brain Research* 534 (1–2): 37–44. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90109-o](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90109-o).
- Olney, John W. 1989. „Excitotoxicity and N-Methyl-D-Aspartate Receptors”. *Drug Development Research* 17 (4): 299–319. <https://doi.org/10.1002/ddr.430170406>.
- Orlovska-Waast, Sonja, Ole Köhler-Forsberg, Sophie Wiben Brix, és mtsai. 2019. „Cerebrospinal Fluid Markers of Inflammation and Infections in Schizophrenia and Affective Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Molecular Psychiatry* 24 (6): 869–87. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0220-4>.

- Pacifici, Marco, és Francesca Peruzzi. 2012. „Isolation and Culture of Rat Embryonic Neural Cells: A Quick Protocol”. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, sz. 63 (május): e3965. <https://doi.org/10.3791/3965>.
- Pellicciari, Roberto, Francesco Venturoni, Daniele Bellocchi, és mtsai. 2008. „Sequence Variants in Kynurenine Aminotransferase II (KAT II) Orthologs Determine Different Potencies of the Inhibitor S-ESBA”. *ChemMedChem* 3 (8): 1199–202. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800109>.
- Pérez de la Cruz, Verónica, Korrapati V. Sathyaikumar, Xiao-Dan Wang, és mtsai. 2025. „Kynurenic Acid Synthesis from D-Kynurenine in the Cerebellum: A Distinct Role of D-Amino Acid Oxidase”. *Cells* 14 (13): 1030. <https://doi.org/10.3390/cells14131030>.
- Perez-Lloret, Santiago, és Francisco J. Barrantes. 2016. „Deficits in Cholinergic Neurotransmission and Their Clinical Correlates in Parkinson’s Disease”. *NPJ Parkinson’s Disease* 2: 16001. <https://doi.org/10.1038/npjparkd.2016.1>.
- Perez-Rando, Marta, Esther Castillo-Gómez, Ramon Guirado, és mtsai. 2017. „NMDA Receptors Regulate the Structural Plasticity of Spines and Axonal Boutons in Hippocampal Interneurons”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 166. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00166>.
- Philippart, Fabian, Geoffrey Destreel, Paulina Merino-Sepúlveda, Pablo Henny, Dominique Engel, és Vincent Seutin. 2016. „Differential Somatic Ca²⁺ Channel Profile in Midbrain Dopaminergic Neurons”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (27): 7234–45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0459-16.2016>.
- Pidoplichko, Volodymyr I., Eric M. Prager, Vassiliki Aroniadou-Anderjaska, és Maria F. M. Braga. 2013. „A7-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors on Interneurons of the Basolateral Amygdala and Their Role in the Regulation of the Network Excitability”. *Journal of Neurophysiology* 110 (10): 2358–69. <https://doi.org/10.1152/jn.01030.2012>.
- Pissadaki, Eleftheria K., és J. Paul Bolam. 2013. „The Energy Cost of Action Potential Propagation in Dopamine Neurons: Clues to Susceptibility in Parkinson’s Disease”. *Frontiers in Computational Neuroscience* 7: 13. <https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00013>.
- Plitman, Eric, Yusuke Iwata, Fernando Caravaggio, és mtsai. 2017. „Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis”. *Schizophrenia Bulletin* 43 (4): 764–77. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbw221>.
- Pocivavsek, Ana, Marian A. R. Thomas, Greg I. Elmer, John P. Bruno, és Robert Schwarcz. 2014. „Continuous Kynurenine Administration during the Prenatal Period, but Not during Adolescence, Causes Learning and Memory Deficits in Adult Rats”. *Psychopharmacology* 231 (14): 2799–809. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3452-2>.
- Pollegioni, Loredano, Silvia Sacchi, és Giulia Murtas. 2018. „Human D-Amino Acid Oxidase: Structure, Function, and Regulation”. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5: 107. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00107>.

- Potter, Michelle C., Greg I. Elmer, Richard Bergeron, és mtsai. 2010. „Reduction of Endogenous Kynurenic Acid Formation Enhances Extracellular Glutamate, Hippocampal Plasticity, and Cognitive Behavior”. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35 (8): 1734–42. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.39>.
- Povysheva, Nadezhda V., és Jon W. Johnson. 2012. „Tonic NMDA Receptor-Mediated Current in Prefrontal Cortical Pyramidal Cells and Fast-Spiking Interneurons”. *Journal of Neurophysiology* 107 (8): 2232–43. <https://doi.org/10.1152/jn.01017.2011>.
- Prensa, Lucía, és André Parent. 2001. „The Nigrostriatal Pathway in the Rat: A Single-Axon Study of the Relationship between Dorsal and Ventral Tier Nigral Neurons and the Striosome/Matrix Striatal Compartments”. *The Journal of Neuroscience* 21 (18): 7247–60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07247.2001>.
- Prescott, Christina, Autumn M. Weeks, Kevin J. Staley, és Kathryn M. Partin. 2006. „Kynurenic Acid Has a Dual Action on AMPA Receptor Responses”. *Neuroscience Letters* 402 (1–2): 108–12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.03.051>.
- Przedborski, Serge, és Miquel Vila. 2003. „The 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model: A Tool to Explore the Pathogenesis of Parkinson’s Disease”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 991 (június): 189–98.
- Puschmann, Till B., Kirsty J. Dixon, és Ann M. Turnley. 2010. „Species Differences in Reactivity of Mouse and Rat Astrocytes in Vitro”. *Neuro-Signals* 18 (3): 152–63. <https://doi.org/10.1159/000321494>.
- Rejdak, Konrad, Halina Bartosik-Psujek, Beata Dobosz, és mtsai. 2002. „Decreased Level of Kynurenic Acid in Cerebrospinal Fluid of Relapsing-Onset Multiple Sclerosis Patients”. *Neuroscience Letters* 331 (1): 63–65. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00710-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00710-3).
- Rejdak, R., T. Zarnowski, W. A. Turski, és mtsai. 2001. „Presence of Kynurenic Acid and Kynurenine Aminotransferases in the Inner Retina”. *Neuroreport* 12 (17): 3675–78. <https://doi.org/10.1097/00001756-200112040-00014>.
- Riachi, N. J., W. D. Dietrich, és S. I. Harik. 1990. „Effects of Internal Carotid Administration of MPTP on Rat Brain and Blood-Brain Barrier”. *Brain Research* 533 (1): 6–14. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91788-i](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91788-i).
- Riebe, Ilse, Henrik Seth, Georgia Culley, és mtsai. 2016. „Tonically Active NMDA Receptors--a Signalling Mechanism Critical for Interneuronal Excitability in the CA1 Stratum Radiatum”. *The European Journal of Neuroscience* 43 (2): 169–78. <https://doi.org/10.1111/ejn.13128>.
- Rizzi, Giorgio, és Kelly R. Tan. 2017. „Dopamine and Acetylcholine, a Circuit Point of View in Parkinson’s Disease”. *Frontiers in Neural Circuits* 11 (december): 110. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00110>.
- Roberts, R. C., F. Du, K. E. McCarthy, E. Okuno, és R. Schwarcz. 1992. „Immunocytochemical Localization of Kynurenine Aminotransferase in the Rat Striatum: A Light and Electron Microscopic Study”. *The Journal of Comparative Neurology* 326 (1): 82–90. <https://doi.org/10.1002/cne.903260107>.

- Robotka, Hermína, Toldi, József, és László and Vécsei. 2008. „L-kynurenine: metabolism and mechanism of neuroprotection”. *Future Neurology* 3 (2): 169–88. <https://doi.org/10.2217/14796708.3.2.169>.
- Rodriguez-Oroz, Maria C., Marjan Jahanshahi, Paul Krack, és mtsai. 2009. „Initial Clinical Manifestations of Parkinson’s Disease: Features and Pathophysiological Mechanisms”. *The Lancet. Neurology* 8 (12): 1128–39. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70293-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70293-5).
- Rossi, Franca, Riccardo Miggiano, Davide M. Ferraris, és Menico Rizzi. 2019. „The Synthesis of Kynurenic Acid in Mammals: An Updated Kynurenine Aminotransferase Structural KATalogue”. *Frontiers in Molecular Biosciences* 6: 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00007>.
- Rossi, Franca, Casazza Valentina, Silvia Garavaglia, és mtsai. 2010. „Crystal Structure-Based Selective Targeting of the Pyridoxal 5’-Phosphate Dependent Enzyme Kynurenine Aminotransferase II for Cognitive Enhancement”. *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (15): 5684–89. <https://doi.org/10.1021/jm100464k>.
- Rózsa, Eva, Hermína Robotka, László Vécsei, és József Toldi. 2008. „The Janus-Face Kynurenic Acid”. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 115 (8): 1087–91. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0052-5>.
- Röver, S., A. M. Cesura, P. Huguenin, R. Kettler, és A. Szenté. 1997. „Synthesis and Biochemical Evaluation of N-(4-Phenylthiazol-2-Yl)Benzenesulfonamides as High-Affinity Inhibitors of Kynurenine 3-Hydroxylase”. *Journal of Medicinal Chemistry* 40 (26): 4378–85. <https://doi.org/10.1021/jm970467t>.
- Rzeski, Wojciech, Tomasz Kocki, Anna Dybel, és mtsai. 2005. „Demonstration of Kynurenine Aminotransferases I and II and Characterization of Kynurenic Acid Synthesis in Cultured Cerebral Cortical Neurons”. *Journal of Neuroscience Research* 80 (5): 677–82. <https://doi.org/10.1002/jnr.20505>.
- Salminen, Antero. 2022. „Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) and Kynurenine Pathway in the Regulation of the Aging Process”. *Ageing Research Reviews* 75 (március): 101573. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101573>.
- Sasabe, Jumpei, Masataka Suzuki, Nobuaki Imanishi, és Sadakazu Aiso. 2014. „Activity of D-Amino Acid Oxidase Is Widespread in the Human Central Nervous System”. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 6: 14. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00014>.
- Savitz, Jonathan. 2020. „The Kynurenine Pathway: A Finger in Every Pie”. *Molecular Psychiatry* 25 (1): 131–47. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0414-4>.
- Schildknecht, Stefan, Donato A. Di Monte, Regina Pape, Kim Tieu, és Marcel Leist. 2017. „Tipping Points and Endogenous Determinants of Nigrostriatal Degeneration by MPTP”. *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (6): 541–55. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.03.010>.
- Schmidt, N., és B. Ferger. 2001. „Neurochemical Findings in the MPTP Model of Parkinson’s Disease”. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 108 (11): 1263–82. <https://doi.org/10.1007/s007020100004>.

Schwarcz, R., A. Rassoulpour, H. Q. Wu, D. Medoff, C. A. Tamminga, és R. C. Roberts. 2001. „Increased Cortical Kynurenate Content in Schizophrenia”. *Biological Psychiatry* 50 (7): 521–30. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01078-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01078-2).

Schwarcz, Robert, John P. Bruno, Paul J. Muchowski, és Hui-Qiu Wu. 2012. „Kynurenines in the Mammalian Brain: When Physiology Meets Pathology”. *Nature Reviews. Neuroscience* 13 (7): 465–77. <https://doi.org/10.1038/nrn3257>.

Schwarcz, Robert, és Sophie Erhardt. 2020. „C36Kynurenic acid in brain function and dysfunction: Focus on the pathophysiology and treatment of schizophrenia”. In *Psychotic Disorders: Comprehensive Conceptualization and Treatments*, szerkesztette Michael A. P. Bloomfield, Oliver D. Howes, Carol A. Tamminga, Jim van Os, Ulrich Reininghaus, és Elena Ivleva. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/med/9780190653279.003.0036>.

Schwarcz, Robert, és Roberto Pellicciari. 2002. „Manipulation of Brain Kynurenines: Glial Targets, Neuronal Effects, and Clinical Opportunities”. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.034439>.

Schwieler, Lilly, Markus K. Larsson, Elisabeth Skogh, és mtsai. 2015. „Increased Levels of IL-6 in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Chronic Schizophrenia--Significance for Activation of the Kynurenine Pathway”. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 40 (2): 126–33. <https://doi.org/10.1503/jpn.140126>.

Secci, Maria E., Alessia Auber, Leigh V. Panlilio, és mtsai. 2017. „Attenuating Nicotine Reinforcement and Relapse by Enhancing Endogenous Brain Levels of Kynurenic Acid in Rats and Squirrel Monkeys”. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 42 (8): 1619–29. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.21>.

Sedelis, M., K. Hofele, G. W. Auburger, S. Morgan, J. P. Huston, és R. K. Schwarting. 2000. „MPTP Susceptibility in the Mouse: Behavioral, Neurochemical, and Histological Analysis of Gender and Strain Differences”. *Behavior Genetics* 30 (3): 171–82. <https://doi.org/10.1023/a:1001958023096>.

Sellgren, C. M., M. E. Kegel, S. E. Bergen, és mtsai. 2016. „A Genome-Wide Association Study of Kynurenic Acid in Cerebrospinal Fluid: Implications for Psychosis and Cognitive Impairment in Bipolar Disorder”. *Molecular Psychiatry* 21 (10): 1342–50. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.186>.

Shepard, Paul D., Brian Joy, Lucy Clerkin, és Robert Schwarcz. 2003. „Micromolar Brain Levels of Kynurenic Acid Are Associated with a Disruption of Auditory Sensory Gating in the Rat”. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28 (8): 1454–62. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300188>.

Silva-Adaya, Daniela, Verónica Pérez-De La Cruz, Juana Villeda-Hernández, és mtsai. 2011. „Protective Effect of L-Kynurenine and Probenecid on 6-Hydroxydopamine-Induced Striatal Toxicity in Rats: Implications of Modulating Kynurenate as a Protective Strategy”. *Neurotoxicology and Teratology* 33 (2): 303–12. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.10.002>.

- Smith, Q. R., S. Momma, M. Aoyagi, és S. I. Rapoport. 1987. „Kinetics of Neutral Amino Acid Transport across the Blood-Brain Barrier”. *Journal of Neurochemistry* 49 (5): 1651–58. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb01039.x>.
- Song, Chang, Sarah M. Clark, Chloe N. Vaughn, és mtsai. 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.001>.
- Sorgdrager, Freek J. H., Yannick Vermeiren, Martijn Van Faassen, és mtsai. 2019. „Age- and Disease-Specific Changes of the Kynurenine Pathway in Parkinson’s and Alzheimer’s Disease”. *Journal of Neurochemistry* 151 (5): 656–68. <https://doi.org/10.1111/jnc.14843>.
- Speciale, C., K. Hares, R. Schwarcz, és N. Brookes. 1989. „High-Affinity Uptake of L-Kynurenine by a Na⁺-Independent Transporter of Neutral Amino Acids in Astrocytes”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 9 (6): 2066–72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-06-02066.1989>.
- Speciale, C., H. Q. Wu, M. Cini, M. Marconi, M. Varasi, és R. Schwarcz. 1996. „(R,S)-3,4-Dichlorobenzoylalanine (FCE 28833A) Causes a Large and Persistent Increase in Brain Kynurenic Acid Levels in Rats”. *European Journal of Pharmacology* 315 (3): 263–67. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(96\)00613-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(96)00613-9).
- Stone, Trevor W. 2020. „Does Kynurenic Acid Act on Nicotinic Receptors? An Assessment of the Evidence”. *Journal of Neurochemistry* 152 (6): 627–49. <https://doi.org/10.1111/jnc.14907>.
- Storch, A., A. C. Ludolph, és J. Schwarz. 2004. „Dopamine Transporter: Involvement in Selective Dopaminergic Neurotoxicity and Degeneration”. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 111 (10–11): 1267–86. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0203-2>.
- Surmeier, D. J., J. N. Guzman, J. Sanchez-Padilla, és P. T. Schumacker. 2011. „The Role of Calcium and Mitochondrial Oxidant Stress in the Loss of Substantia Nigra Pars Compacta Dopaminergic Neurons in Parkinson’s Disease”. *Neuroscience* 198: 221–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.045>.
- Suzumura, A., T. Marunouchi, és H. Yamamoto. 1991. „Morphological Transformation of Microglia in Vitro”. *Brain Research* 545 (1–2): 301–6. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91302-h](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91302-h).
- Swartz, K. J., M. J. During, A. Freese, és M. F. Beal. 1990. „Cerebral Synthesis and Release of Kynurenic Acid: An Endogenous Antagonist of Excitatory Amino Acid Receptors”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 10 (9): 2965–73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-09-02965.1990>.
- Szabó, Ágnes, Zsolt Galla, Eleonóra Spekker, és mtsai. 2025. „Oxidative and Excitatory Neurotoxic Stresses in CRISPR/Cas9-Induced Kynurenine Aminotransferase Knockout Mice: A Novel Model for Despair-Based Depression and Post-Traumatic Stress Disorder”. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 30 (1): 25706. <https://doi.org/10.31083/FBL25706>.

- Thevandavakkam, Mathuravani A., Robert Schwarcz, Paul J. Muchowski, és Flaviano Giorgini. 2010. „Targeting Kynurenine 3-Monooxygenase (KMO): Implications for Therapy in Huntington’s Disease”. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* 9 (6): 791–800. <https://doi.org/10.2174/187152710793237430>.
- Threlfell, Sarah, Tatjana Lalic, Nicola J. Platt, Katie A. Jennings, Karl Deisseroth, és Stephanie J. Cragg. 2012. „Striatal Dopamine Release Is Triggered by Synchronized Activity in Cholinergic Interneurons”. *Neuron* 75 (1): 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.038>.
- Trecartin, Katelyn V., és David J. Bucci. 2011. „Administration of Kynurenine during Adolescence, but Not during Adulthood, Impairs Social Behavior in Rats”. *Schizophrenia Research* 133 (1–3): 156–58. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2011.08.014>.
- Turski, W. A., M. Nakamura, W. P. Todd, B. K. Carpenter, W. O. Whetsell, és R. Schwarcz. 1988. „Identification and Quantification of Kynurenic Acid in Human Brain Tissue”. *Brain Research* 454 (1–2): 164–69. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90815-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90815-3).
- Urata, Yoko, Kaori Koga, Yasushi Hirota, és mtsai. 2014. „IL-1 β Increases Expression of Tryptophan 2,3-Dioxygenase and Stimulates Tryptophan Catabolism in Endometrioma Stromal Cells”. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 72 (5): 496–503. <https://doi.org/10.1111/aji.12282>.
- Vécsei, László, Levente Szalárdy, Ferenc Fülöp, és József Toldi. 2013. „Kynurenines in the CNS: Recent Advances and New Questions”. *Nature Reviews. Drug Discovery* 12 (1): 64–82. <https://doi.org/10.1038/nrd3793>.
- Venkatesan, Dhivya, Mahalaxmi Iyer, Arul Narayanasamy, Kamalakannan Siva, és Balachandar Vellingiri. 2020. „Kynurenine Pathway in Parkinson’s Disease-An Update”. *eNeurologicalSci* 21: 100270. <https://doi.org/10.1016/j.ensci.2020.100270>.
- Vohra, Mihir, George A. Lemieux, Lin Lin, és Kaveh Ashrafi. 2018. „Kynurenic Acid Accumulation Underlies Learning and Memory Impairment Associated with Aging”. *Genes & Development* 32 (1): 14–19. <https://doi.org/10.1101/gad.307918.117>.
- Wang, Alexandre K., és Brian J. Miller. 2018. „Meta-Analysis of Cerebrospinal Fluid Cytokine and Tryptophan Catabolite Alterations in Psychiatric Patients: Comparisons Between Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Depression”. *Schizophrenia Bulletin* 44 (1): 75–83. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx035>.
- Wang, Jinghong, Nicole Simonavicius, Xiaosu Wu, és mtsai. 2006. „Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35”. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (31): 22021–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200>.
- Wang, Yunxia, Marcus A. Lawson, Robert Dantzer, és Keith W. Kelley. 2010. „LPS-Induced Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Regulated in an Interferon-Gamma-Independent Manner by a JNK Signaling Pathway in Primary Murine Microglia”. *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (2): 201–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.06.152>.
- Wirthgen, Elisa, Andreas Hoeflich, Alexander Rebl, és Juliane Günther. 2017. „Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions”. *Frontiers in Immunology* 8: 1957. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01957>.

- Wu, Hui-Qiu, Arash Rassoulpour, Jeffrey H. Goodman, Helen E. Scharfman, Edward H. Bertram, és Robert Schwarcz. 2005. „Kynurenate and 7-Chlorokynurenate Formation in Chronically Epileptic Rats”. *Epilepsia* 46 (7): 1010–16. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.67404.x>.
- Wu, Jie, Andrew A. George, Katherine M. Schroeder, és mtsai. 2004. „Electrophysiological, Pharmacological, and Molecular Evidence for Alpha7-Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat Midbrain Dopamine Neurons”. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311 (1): 80–91. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.070417>.
- Yoshida, Yukihiro, Hidetsugu Fujigaki, Koichi Kato, és mtsai. 2019. „Selective and Competitive Inhibition of Kynurenine Aminotransferase 2 by Glycyrrhizic Acid and Its Analogues”. *Scientific Reports* 9 (1): 10243. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46666-y>.
- Yu, Ping, Nicholas A. Di Prospero, Michael T. Sapko, és mtsai. 2004. „Biochemical and Phenotypic Abnormalities in Kynurenine Aminotransferase II-Deficient Mice”. *Molecular and Cellular Biology* 24 (16): 6919–30. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.6919-6930.2004>.
- Yu, Ping, Zhengsheng Li, Ling Zhang, Danilo A. Tagle, és Tao Cai. 2006. „Characterization of Kynurenine Aminotransferase III, a Novel Member of a Phylogenetically Conserved KAT Family”. *Gene* 365: 111–18. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.034>.
- Zádori, Dénes, Gábor Nyiri, András Szonyi, és mtsai. 2011. „Neuroprotective Effects of a Novel Kynurenic Acid Analogue in a Transgenic Mouse Model of Huntington’s Disease”. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 118 (6): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0573-6>.
- Zampese, Enrico, és D. James Surmeier. 2020. „Calcium, Bioenergetics, and Parkinson’s Disease”. *Cells* 9 (9): 2045. <https://doi.org/10.3390/cells9092045>.
- Zarei, M. M., K. A. Radcliffe, D. Chen, J. W. Patrick, és J. A. Dani. 1999. „Distributions of Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha7 and Beta2 Subunits on Cultured Hippocampal Neurons”. *Neuroscience* 88 (3): 755–64. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00246-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00246-2).
- Zhou, Fu-Ming, Charles J. Wilson, és John A. Dani. 2002. „Cholinergic Interneuron Characteristics and Nicotinic Properties in the Striatum”. *Journal of Neurobiology* 53 (4): 590–605. <https://doi.org/10.1002/neu.10150>.
- Zmarowski, A., H.-Q. Wu, J. M. Brooks, és mtsai. 2009. „Astrocyte-Derived Kynurenic Acid Modulates Basal and Evoked Cortical Acetylcholine Release”. *The European Journal of Neuroscience* 29 (3): 529–38. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06594.x>.
- Zwilling, Daniel, Shao-Yi Huang, Korrapati V. Sathyaikumar, és mtsai. 2011. „Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration”. *Cell* 145 (6): 863–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.020>.

12 Összefoglaló

A triptofán a hús proteinogén aminosav egyike, amely nemcsak a fehérjeszintézishez nélkülözhetetlen, hanem számos biológiailag aktív metabolit prekursoraként is kiemelt szerepet tölt be. Emlősökben a triptofán metabolizmusa két fő útvonalon zajlik: a szerotonin és a kinurenin útvonalon. Egészséges szervezetben a szerotonin útvonal a triptofán oxidatív lebontásának mindössze csekély hányadát teszi ki. A triptofán döntő része, az agyban és a periférián egyaránt, a kinurenin útvonalon keresztül bomlik le, amelynek fő intermediere az L-kinurenin (L-KYN).

Az L-KYN központi elágazási pontként szolgál: olyan metabolitok képződnek belőle, amelyek neurotoxikus és neuroprotektív hatásokat fejtenek ki. Metabolizmusának három fő ága közül az egyik a kvinolinsav (QUIN) képződéséhez vezet, amely patológiás koncentrációban az N-metil-D-aszpartát receptorok (NMDAR) túlzott aktivációján és az oxidatív stressz fokozásán keresztül neurotoxikus. Egy másik ágán a 3-hidroxi-L-kinurenin (3-HK) keletkezik, amely metabolit szabadgyök-képző hatása révén szintén sejtkárosító. A harmadik fő ág eredményeként kinurénsav (KYNA) képződik, amely számos receptoron keresztül neuroprotektív és neuromoduláló hatást fejt ki. Az, hogy az anyagcsere mennyiben tolódik el a neurotoxikus (3-HK, QUIN) vagy a neuroprotektív (KYNA) irányba, meghatározza az excitotoxicitással szembeni védekezőképességet.

A KYNA sokáig csak perifériás metabolitként volt ismert, központi idegrendszeri jelenlétét csak az 1980-as években igazolták. Ezt követően vált nyilvánvalóvá, hogy a KYNA az NMDAR-ok endogén antagonistájaként kulcsszerepet játszik az excitotoxicitás modulációjában. A receptor gátlása révén képes mérsékelni a túlzott glutamáterg aktivációt, ezáltal csökkenti az NMDAR-mediált sejtkárosodás kockázatát és hozzájárul egy endogén neuroprotektív mechanizmushoz. A KYNA, több más receptorcsalád mellett, az $\alpha 7$ -nikotinos acetilkolin receptorok ($\alpha 7$ nAChR) működését is befolyásolja. Ez a receptor-repertoár jól szemlélteti, hogy a KYNA összetett neuromodulátor, amely egyaránt befolyásolja a neurotranszmissziót, továbbá a szinaptikus plaszticitást és a kogníciót.

A KYNA koncentrációjának mindkét irányú kóros eltolódása jelentős patofiziológiai következményekkel járhat. Számos neurodegeneratív betegségben, így Parkinson-, Huntington- és Alzheimer-kórban alacsonyabb KYNA-szinteket írtak le agyszövetben és az agy-gerincvelői folyadékban. Mivel az agyi L-KYN-felvétel ilyen esetekben változatlan marad, a KYNA-hiány hátterében az enzimatisz szintézis zavara állhat.

Ezzel szemben több neuropszichiátriai kórképben, például skizofréniában a KYNA-szint emelkedése figyelhető meg, A megfelelő KYNA-szint fenntartása tehát kritikus a központi idegrendszer homeosztázisa számára.

A KYNA endogén bioszintézisét az L-KYN irreverzibilis transzaminációján keresztül a kinurenin-aminotranszferáz (KAT) izoenzimek végzik. Humán és rágcsáló agyszövetben négy KAT-izoformát azonosítottak (KAT-1–4). Farmakológiai és genetikai vizsgálatok alapján a KAT-2 felelős az emlős agyi KYNA-termelés döntő hányadáért. Aktivitásának változásai közvetlenül és jelentős mértékben befolyásolják a KYNA-szintet, és ezen keresztül az excitabilitást és a neuroprotektív kapacitást.

A KAT-2 terápiás jelentőségét az adja, hogy olyan kórképekben, amelyek esetében KYNA-túlprodukció figyelhető meg, az enzim szelektív gátlása ígéretes stratégiának tűnik, míg azokban az állapotokban, amelyekben a KYNA hiánya lép fel, a KAT-2 funkcionális „aktiválása”, vagyis a metabolizmus KYNA felé történő eltolása lehet kedvező. Külön kihívást jelent a KAT-2 gátlószerek fajonként eltérő hatékonysága, ami rámutat a fajok közötti összehasonlító vizsgálatok fontosságára.

A KAT-2 agyi expressziójáról rendelkezésre álló adatok jelentős része humán és patkány vizsgálatokból származik, melyek az enzim magas expresszióját írták le asztrocitákban, ami hozzájárult ahhoz a széles körben elterjedt nézethez, hogy a KYNA elsősorban asztrocita eredetű metabolit. Ugyanakkor több tanulmány leírta a KAT-2 jelenlétét különböző neuronpopulációkban is, sőt primer neuronkultúrákban a neuronok jelentős KYNA-termelési kapacitását is kimutatták. Egérben azonban a KAT-2 regionális és sejttípus-specifikus eloszlásának feltérképezése hiányos.

Bár Parkinson-kórban számos tanulmány alacsonyabb KYNA-szinteket írt le, a csökkenés pontos oka továbbra sem tisztázott. Az eddigi adatok döntően a gyulladásos állapotban lévő glia működésére fókuszálnak, miközben a KAT-2 expressziójának agyi eloszlása csak részben feltárt. A KYNA-depléciónak hátterében a gyulladásos anyagcsere-eltolódáson túl további, jelenleg kevésbé ismert tényezők is szerepet játszhatnak.

A KAT-2 expresszió mintázatának részletes feltérképezése ezért alapvető jelentőségű annak megértéséhez, hogy a Parkinson-kórban megfigyelt KYNA-csökkenés milyen mechanizmusok eredője lehet. A kinurenin útvonal komponensei így nemcsak potenciális biomarkerek, hanem lehetséges terápiás célpontok is lehetnek. A Parkinson-kór mechanizmusainak kísérletes vizsgálatára az egyik leggyakrabban alkalmazott rendszer az 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) szisztémás adagolásával kiváltott dopaminerg neurodegeneráció egérben.

Ez a modell különösen alkalmas arra, hogy a dopaminerg károsodáshoz társuló metabolikus folyamatok – így a kinurenin útvonal és a KAT-2 – változásait vizsgáljuk, és megértsük, hogy a KYNA-depléción milyen módon kapcsolódhat a patogenezishez.

Mindezek alapján célunk az volt, hogy átfogó képet adjunk a KAT-2 agyi eloszlásáról egérben, külön hangsúlyt fektetve a primer sejttényészetek sejtípus-specifikus mintázataira, az előagy és kisagy neuroanatómiai szerveződésére, a főbb neuronpopulációk részvételére, valamint az akut MPTP-indukált Parkinson-kór modellben megfigyelhető expresszió esetleges változásaira. Elsődleges szempontunk az volt, hogy olyan adatokat szolgáltatassunk, amelyek a korábbi szakirodalomban tapasztalható hiányosságokat és következtetlenségeket pótolják, különösen az egérmodellre vonatkozóan.

A primer sejttényészetek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a KAT-2 mindhárom fő agyi sejtípusban – asztrocitákban, mikrogliaokban és neuronokban – kimutatható. Ez összhangban áll azokkal a szakirodalmi adatokkal, amelyek megkérdőjelezik a KAT-2 hagyományosan asztrocita-specifikusnak tartott eredetét. Eredményeink hozzájárulnak ahhoz az egyre inkább körvonalazódó szemléletváltáshoz, mely szerint a KYNA-termelés sejtípusonként eltérő mértékben, de mindenképpen több forrásból származik. Külön említést érdemelnek a mikroglia sejtek: eredményeink szerint a KAT-2 a mikroglia populációban is kimutatható, azonban irodalmi adatokkal egybevetve valószínűsíthető, hogy az expresszió mértéke aktivációs állapotuktól függ. Az agyszövetben tapasztalt alacsony mértékű immunreaktivitás arra utal, hogy a nyugalmi mikroglia nem mutat számottevő KAT-2 aktivitást, ugyanakkor az aktivált állapotban bekövetkező expressziónövekedés lehetősége nem zárható ki, amelyet további célzott vizsgálatok tisztázhatnak a jövőben.

Az előagy és kisagy összehasonlítása során markáns különbségek rajzolódtak ki. Az előagyban a KAT-2 expresszió széles körben jelen volt a neuronokban, az asztrocitákban és – alacsonyabb szinten – a mikrogliaokban is. Ezzel szemben a kisagy egyértelműen neuronális expressziós mintázatot mutatott, a KAT-2 gliális eredetű jelölése gyakorlatilag hiányzott. Ez a megfigyelés összhangban áll azzal a ténnyel, hogy a kisagy KYNA-anyagcseréjét jelentős mértékben az alternatív D-aminosav-oxidáz által mediált útvonal biztosítja. Eredményeink olyan régióspecifikus különbséget rajzolnak ki, amely szerint az előagyban a KAT-2 függő KYNA-termelés több sejtípus integrált hozzájárulását tükrözi, míg a kisagyban a folyamat elsősorban neuronális eredetű.

A neuronpopulációk vizsgálata során igazoltuk a KAT-2 jelenlétét a GABAerg interneuronok fő alcsoportjaiban, a striatális kolinerg interneuronokban, valamint a substantia nigra dopaminerg neuronjainak teljes populációjában. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a KAT-2 ellátottság nem csupán a KYNA-termelés sejtszintű diverzitását, hanem a különböző neurotranszmitter-rendszerek működésének finom neuromodulációját is szolgálhatja. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a KAT-2 által mediált KYNA-termelés a GABAerg, a kolinerg és a dopaminerg neuronpopulációk szintjén egyaránt jelentős neuromodulációs szerepet tölthet be, mivel mindhárom rendszerben olyan sejtípusokban expresszálódik, amelyek a hálózati gátlás, az acetilkolinerg-dopaminerg szabályozás és a nigrostriatalis jelátvitel kulcsfontosságú elemei.

A Parkinson-kór MPTP-modelljében a tirozin-hidroxiláz immunreaktivitás dóziszfüggő csökkenése igazolta a dopaminerg neuronok degenerációját. Ezzel párhuzamosan a KAT-2 expresszió is mérséklődött, azonban a két folyamat dinamikája nem mutatott teljes korrelációt: részben eltérő kinetikát figyeltünk meg, amikor a neurodegeneráció már előrehaladottabb állapotot ért el. Ez arra utal, hogy a KAT-2 expresszióváltozásai nem kizárólag a dopaminerg sejtpusztulás passzív következményei, hanem ettől részben független mechanisztikus folyamatok is befolyásolhatják őket.

Ez a jelenség új magyarázati keretet adhat a Parkinson-kórban dokumentált KYNA-depléciónak: elképzelhető, hogy a KAT-2 downregulációja hozzájárul a dopaminerg sérülékenység fokozódásához, és ezzel gyorsítja a neurodegeneráció lefolyását.

Összességében eredményeink olyan átfogó neuroanatómiai képet rajzolnak ki a KAT-2 eloszlásáról, amely jelentősen bővíti az eddig rendelkezésre álló, egérmodellben különösen szűk irodalmi adatbázist. A jövőben elengedhetetlen annak funkcionális vizsgálata, hogy az egyes sejtípusok milyen mértékben járulnak hozzá a KYNA-termeléshez, és ezen folyamatok milyen régióspecifikus szerveződést mutatnak.

13 Summary

Tryptophan is one of the twenty proteinogenic amino acids, which is not only essential for protein synthesis, but also plays a key role as a precursor for numerous biologically active molecules. In mammals, tryptophan metabolism occurs via two main pathways: the serotonin and kynurenine pathways. In healthy organisms, the serotonin pathway accounts for only a small proportion of the oxidative degradation of tryptophan; most tryptophan, both in the brain and in the periphery, is degraded via the kynurenine pathway, whose main intermediate is L-kynurenine (L-KYN).

L-KYN serves as a central branching point: it is converted into metabolites that exert neurotoxic and neuroprotective effects. One of the three main branches of its metabolism leads to the formation of quinolinic acid (QUIN), which, at pathological concentrations, is neurotoxic through excessive activation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) and increased oxidative stress. Another branch produces 3-hydroxy-L-kynurenine (3-HK), which also contributes to cell damage through its free radical-forming effect. The third main branch results in the formation of kynurenic acid (KYNA), which exerts neuroprotective and neuromodulatory effects via a number of receptors. The extent to which metabolism shifts toward neurotoxicity (3-HK, QUIN) or neuroprotection (KYNA) determines the ability to defend against excitotoxicity.

For a long time, KYNA was known only as a peripheral metabolite, and its presence in the central nervous system was only confirmed in the 1980s. It subsequently became clear that KYNA, as an endogenous antagonist of NMDARs, plays a key role in the modulation of excitotoxicity. By inhibiting the the receptor, it is able to moderate excessive glutamatergic activation, thereby reducing the risk of NMDAR-mediated cell damage and contributing to an endogenous neuroprotective mechanism. KYNA influences the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ nAChR), among several other receptor families. This receptor repertoire clearly illustrates that KYNA is a complex neuromodulator that influences neurotransmission, as well as synaptic plasticity and cognition.

Abnormal shifts in KYNA levels in either direction can have significant pathophysiological consequences. Lower KYNA levels have been reported in brain tissue and cerebrospinal fluid in a number of neurodegenerative diseases, including Parkinson's, Huntington's, and Alzheimer's. Since cerebral L-KYN uptake remains unchanged in such cases, KYNA deficiency is thought to be due to an impaired enzymatic synthesis.

In contrast, elevated KYNA levels have been observed in several neuropsychiatric conditions, such as schizophrenia. Sustaining proper KYNA levels is therefore critical for the central nervous system homeostasis.

The endogenous biosynthesis of KYNA is carried out by kynurenine aminotransferase (KAT) isoenzymes through the irreversible transamination of L-KYN. Four KAT isoforms (KAT-1–4) have been identified in human and rodent brain tissue. Based on pharmacological and genetic studies, KAT-2 is responsible for the majority of KYNA production in the mammalian brain. Changes in its activity directly influence KYNA levels and, through this, excitability, and neuroprotective capacity.

The therapeutic significance of KAT-2 lies in the fact that in conditions where KYNA overproduction is observed, selective inhibition of the enzyme appears to be a promising strategy, while in conditions where KYNA deficiency occurs, functional "activation" of KAT-2, i.e., shifting metabolism toward KYNA, may be beneficial. A particular challenge is the species-specific efficacy of KAT-2 inhibitors, which shows the importance of comparative studies between species.

The majority of the information on brain KAT-2 expression that is currently available comes from studies conducted on humans and rats, which consistently show high expression in astrocytes. This led to the general perception that KYNA is primarily a metabolite derived from astrocytes. Nonetheless, a number of studies have also reported KAT-2 expression in different neuronal populations, and primary neuronal cultures have shown that neurons have a significant capacity to produce KYNA. However, there is a lack of information and insufficient mapping of the KAT-2 enzyme's regional and cell-type-specific distribution in mice.

Although many studies have reported decreased KYNA levels in Parkinson's disease, the exact cause of this decrease remains unclear. The data available to date have focused primarily on the function of glia in inflammatory states, while the distribution of KAT-2 expression in the brain has only been partially explored. In addition to inflammatory metabolic shifts, other factors that are currently poorly understood may also play a role in KYNA depletion.

Detailed mapping of KAT-2 expression patterns is therefore essential to understand the mechanisms underlying the KYNA depletion observed in Parkinson's disease. The components of the kynurenine pathway may therefore be not only potential biomarkers but also possible therapeutic targets.

One of the most commonly used systems for the experimental study of the mechanisms of Parkinson's disease is dopaminergic neurodegeneration in mice induced by systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). This model is particularly suitable for investigating changes in metabolic processes associated with dopaminergic damage, such as the kynurenine pathway and KAT-2, and for understanding how KYNA depletion may be linked to pathogenesis.

Based on this, our goal was to provide a comprehensive picture of KAT-2 distribution in the mouse brain, with a particular focus on cell type-specific patterns in primary cell cultures, the neuroanatomical organization of the forebrain and cerebellum, the involvement of major neuron populations, and possible changes in expression observed in an acute MPTP-induced Parkinson's disease model. Our primary focus was to provide data that would fill gaps and inconsistencies found in the previous literature, particularly with regard to the mouse model.

During the examination of primary cell cultures, we found that KAT-2 is detectable in all three major brain cell types: astrocytes, microglia, and neurons. This is consistent with data in the literature that question the traditionally astrocyte-specific origin of the enzyme. Our results contribute to the emerging paradigm shift that KYNA production originates from multiple sources, albeit to varying degrees depending on cell type. Microglia cells deserve special mention: according to our results, KAT-2 is also detectable in the microglia population, but in line with data in the literature, it is likely that the degree of expression depends on their activation status. The low level of immunoreactivity observed in brain tissue suggests that resting microglia do not show significant KAT-2 activity, but the possibility of increased expression in the activated state cannot be ruled out, which may be clarified by further targeted studies in the future.

A comparison of the forebrain and cerebellum revealed marked differences. In the forebrain, KAT-2 expression was widespread in neurons, astrocytes, and, to a lesser extent, microglia. In contrast, the cerebellum showed a clear neuronal expression pattern, with virtually no KAT-2 labeling of glial origin.

This observation is consistent with the fact that KYNA metabolism in the cerebellum is largely mediated by the alternative D-amino acid oxidase pathway. Our results reveal a region-specific difference, whereby KAT-2-dependent KYNA production in the forebrain reflects the integrated contribution of multiple cell types, whereas in the cerebellum, the process is primarily of neuronal origin.

In our examination of neuronal populations, we confirmed the presence of KAT-2 in the main subgroups of GABAergic interneurons, striatal cholinergic interneurons, and the entire population of dopaminergic neurons in the substantia nigra. These observations suggest that KAT-2 expression may serve not only to mediate the cellular diversity of KYNA production, but also to finely neuromodulate the functioning of different neurotransmitter systems.

Taken together, our results suggest that KAT-2-mediated KYNA production may play a significant neuromodulatory role at the level of GABAergic, cholinergic and dopaminergic neuron populations. This is supported by its expressed in cell types that are key components of network inhibition, acetylcholinergic-dopaminergic regulation, and nigrostriatal signaling across all three systems.

In the MPTP model of Parkinson's disease, a dose-dependent decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity confirmed the degeneration of dopaminergic neurons. In parallel with this, KAT-2 expression was also reduced, but the dynamics of the two processes did not show complete correlation: we observed partially different kinetics when neurodegeneration had reached a more advanced stage. This suggests that changes in KAT-2 expression are not solely passive consequences of dopaminergic cell death, but may also be influenced by mechanistic processes that are partially independent of it.

This phenomenon may provide a new explanatory framework for the background of KYNA depletion documented in Parkinson's disease: it is conceivable that KAT-2 downregulation contributes to increased dopaminergic vulnerability, thereby accelerating the course of neurodegeneration.

Overall, our results paint a comprehensive neuroanatomical picture of KAT-2 distribution, which significantly expands the currently available, particularly limited literature database in mouse models. In the future, it will be essential to functionally examine the extent to which individual cell types contribute to KYNA production and the region-specific organization of these processes.

14 Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10078913

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Expression of kynurenine aminotransferase-2 in different mouse brain-derived cells: A comprehensive study in cell cultures

Gyula Jenei, Emma Balog, István Pesti, József Toldi, László Vécsei, Zsolt Kis

Tissue & Cell, 2026 Feb;98:103230. doi: 10.1016/j.tice.2025.103230.

IF: 2,5

Species-specific neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the mouse cerebellum

Emma Balog*, **Gyula Jenei***, Levente Gellért, Etsuro Ono, László Vécsei, József Toldi, Zsolt Kis

* a szerzők azonos mértékben járultak hozzá a publikációhoz

Neurochemistry International, 2021 Jan;142:104920. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104920.

IF: 4,297

Egyéb közlemény:

Age-dependent changes in NMDA-induced excitotoxicity and neuromodulatory effects of kynurenic acid and its analogue in mouse brain slices

Emma Balog, **Gyula Jenei**, Anikó Magyariné Berkó, Bálint Lőrinczi, István Szatmári, László Vécsei, József Toldi, Zsolt Kis

Neuroscience Letters, 2025 Apr 1;854:138220. doi: 10.1016/j.neulet.2025.138220.

IF: 2,0

Az értekezéshez kapcsolódó konferencia-közlemények:

Investigating the expression of kynurenine aminotransferase-2 in primary cell cultures

Gyula Jenei, Emma Balog, József Toldi, Zsolt Kis

MITT-ANA 2023, Budapest, 2023. február 01-03., poszter szekció

Relations between the kynurenergic and GABAergic systems in the mouse brain – A neuroanatomical study

Gyula Jenei, Zsolt Kis, József Toldi

IBRO 2022, Budapest, 2022. január 27-28., poszter szekció

Cell-type-specific localization of kynurenine aminotransferase-2 in the mouse brain

Gyula Jenei, Emma Balog, Zsolt Kis, József Toldi, László Vécsei

FENS 2021, online, 2021. augusztus 25-27., poszter szekció

Egyéb konferencia-közlemények:

Age-dependent changes in NMDA-induced excitotoxicity and neuromodulatory effects of kynurenic acid and its analogues in mouse brain slice

Emma Balog, **Gyula Jenei**, Anikó Magyariné Berkó, József Toldi, Zsolt Kis

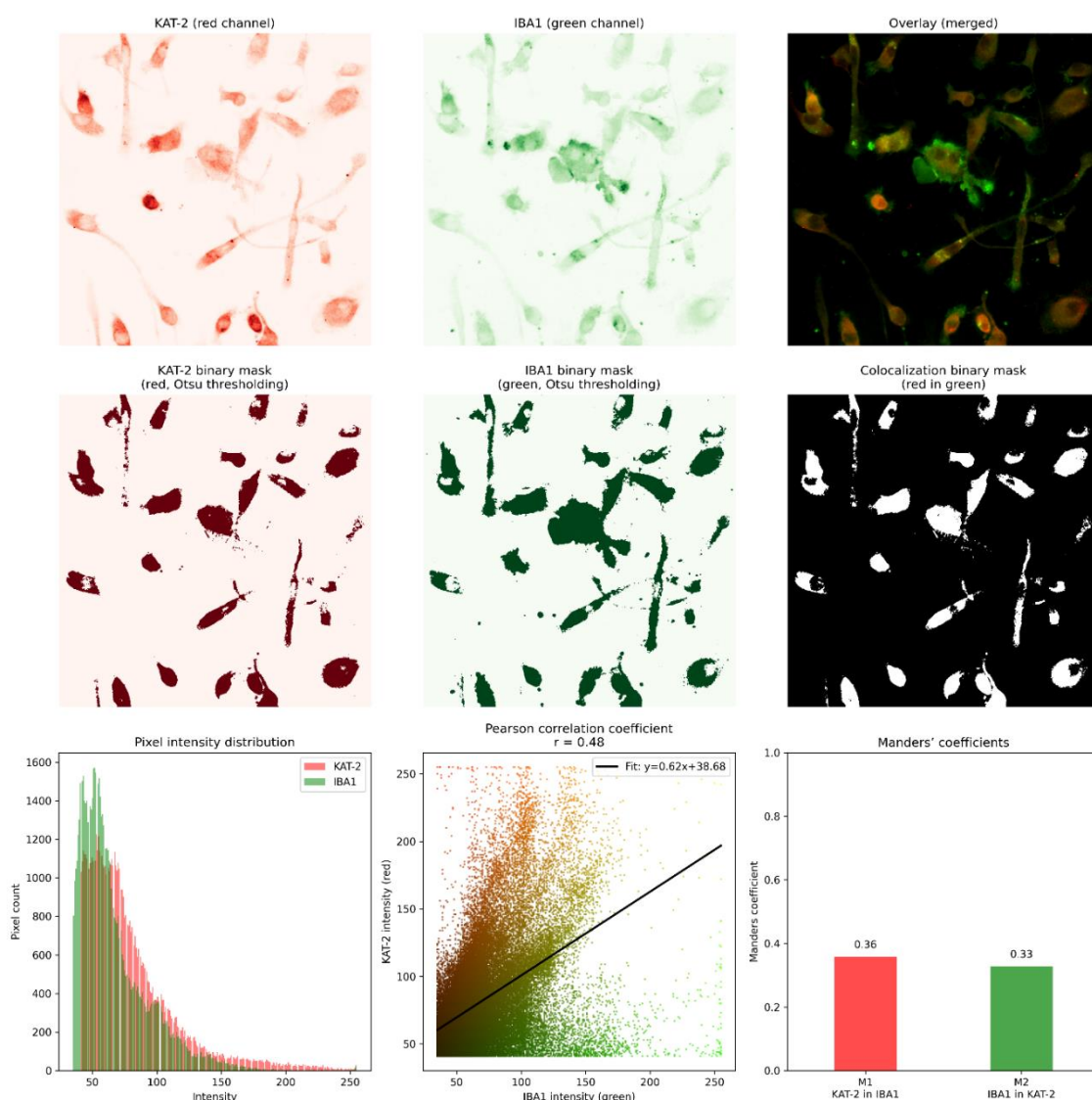
INC 2024, Pécs, 2024. január 25-26., poszter szekció

Age-dependent changes in NMDA-induced excitotoxicity and neuroprotective effect of kynurenic acid in mouse brain tissue

Emma Balog, **Gyula Jenei**, Anikó Magyariné Berkó, József Toldi, Zsolt Kis

MITT-ANA 2023, Budapest, 2023. február 01-03., poszter szekció

15 Függelék



F1. ábra: A kvantitatív kolokalizációs elemzés munkafolyamata. Reprezentatív példa a KAT-2 és sejtípus-specifikus markerek kolokalizációjának értékelésére alkalmazott képelemzési folyamat bemutatására. A felső paneleken a KAT-2 (vörös csatorna) és a megfelelő marker (zöld csatorna) feldolgozott fluoreszcens képei, valamint azok összeolvasztott képe látható. A középső panelek az Otsu-küszöböléssel előállított bináris maszkokat és az átfedési maszkot mutatják, utóbbiban az átfedő vörös és zöld pixelék fehérrel jelennek meg. Az alsó paneleken a pixelintenzitás-eloszlás hisztogramjai, a Pearson-féle korrelációs pontdiagram (r érték), valamint a Manders-féle kolokalizációs együtthatók (M1 és M2 értékek) oszlopdiagramjai láthatók.

F1. táblázat: Az indirekt fluoreszcens immuncitokémiai és immunhisztokémiai eljárások során alkalmazott elsődleges ellenanyagok listája és paraméterei.

Elsődleges ellenanyagok				
Ellenanyag	Célfehérje	Gazda	Hígítás	Gyártó
ALDH1L1	aldehid-dehidrogenáz 1 család L1 tagja	egér	1:1000	Sigma-Aldrich
AQP4	aquaporin-4	egér	1:500	Sigma-Aldrich
CALB	calbindin	egér	1:1500	Swant
CD11b	alfa-M integrin	patkány	1:500	Bio-Rad
CD68	differentiációs klaszter-68	patkány	1:1000	Bio-Rad
ChAT	kolin-acetiltransferáz	kecske	1:1000	Chemicon
CR	calretinin	egér	1:500	Abcam
GAD67	glutamát-dekarboxiláz (67 kDa)	egér	1:1000	Millipore
GFAP	gliális fibrilláris savas protein	patkány	1:2000	Invitrogen
IBA1	ionizált kalcium-kötő adaptor molekula-1	kecske	1:500	Abcam
KAT-2	kinurenin-aminotranszferáz-2	nyúl	1:1000	Proteintech
MAP2	mikrotubulus-asszociált fehérje-2	egér	1:1000	Abcam
NeuN	neuronális nukleáris antigén	egér	1:2000	Millipore
NPY	neuropeptid Y	egér	1:500	Abcam
PV	parvalbumin	egér	1:1000	Swant
SST	szomatosztatin	egér	1:1000	GeneTex
TH	tirozin-hidroxiláz	egér	1:1000	Immunostar
TUBB3	β III-tubulin	egér	1:1000	Abcam

F2. táblázat: A KAT-2 és a sejttípus-specifikus markerek (GFAP, ALDH1L1, CD68, IBA1, MAP2, TUBB3) kolokalizációs kvantifikációja, a Pearson r, valamint a Manders M1 és M2 értékek biológiai replikátumonkénti átlagai és csoportszintű összesített átlagai ($\pm$ SD) feltüntetésével (n = 3 biológiai replikátum/csoport).

		Pearson r		Manders M1		Manders M2	
Marker	Biológiai replikátum	Átlag	Össz. átlag $\pm$ SD	Átlag	Össz. átlag $\pm$ SD	Átlag	Össz. átlag $\pm$ SD
GFAP	#1	0,487	0,405 $\pm$ 0,071	0,333	0,303 $\pm$ 0,030	0,327	0,305 $\pm$ 0,020
	#2	0,359		0,302		0,301	
	#3	0,369		0,273		0,287	
ALDH1L1	#4	0,407	0,348 $\pm$ 0,067	0,303	0,304 $\pm$ 0,021	0,299	0,303 $\pm$ 0,021
	#5	0,363		0,325		0,326	
	#6	0,275		0,284		0,284	
CD68	#7	0,464	0,455 $\pm$ 0,052	0,391	0,380 $\pm$ 0,020	0,348	0,342 $\pm$ 0,017
	#8	0,398		0,356		0,323	
	#9	0,502		0,392		0,355	
IBA1	#10	0,642	0,617 $\pm$ 0,025	0,388	0,392 $\pm$ 0,004	0,353	0,370 $\pm$ 0,020
	#11	0,614		0,393		0,364	
	#12	0,593		0,395		0,392	
MAP2	#13	0,479	0,568 $\pm$ 0,082	0,420	0,415 $\pm$ 0,022	0,360	0,390 $\pm$ 0,028
	#14	0,583		0,391		0,393	
	#15	0,642		0,434		0,417	
TUBB3	#16	0,147	0,244 $\pm$ 0,103	0,330	0,351 $\pm$ 0,035	0,292	0,306 $\pm$ 0,039
	#17	0,235		0,332		0,277	
	#18	0,352		0,392		0,350	

F3. táblázat: A TH- és KAT-2-immunjelölés integrált intenzitásának csoportonkénti kvantifikációja, a biológiai replikátumok egyedi átlagai és a csoportszintű összesített átlagok ($\pm$ SD) feltüntetésével (n = 3 biológiai replikátum/csoport).

Csoport	Biológiai replikátum	TH integrált intenzitás		KAT-2 integrált intenzitás	
		Átlag	Össz. átlag $\pm$ SD	Átlag	Össz. átlag $\pm$ SD
Kontroll	#1	967,370	925,782 $\pm$ 44,618	503,076	492,265 $\pm$ 33,612
	#2	878,652		454,578	
	#3	931,325		519,142	
1×20 mg/ttkg MPTP-kezelt	#4	585,411	576,275 $\pm$ 32,107	299,779	282,820 $\pm$ 15,911
	#5	540,590		280,461	
	#6	602,823		268,221	
2×20 mg/ttkg MPTP-kezelt	#7	368,608	383,921 $\pm$ 21,755	140,923	141,203 $\pm$ 11,011
	#8	408,823		152,351	
	#9	374,331		130,334	
3×20 mg/ttkg MPTP-kezelt	#10	236,967	230,139 $\pm$ 18,374	117,500	114,624 $\pm$ 14,273
	#11	209,329		127,241	
	#12	244,122		99,132	

F4. táblázat: A TH- és KAT-2-pozitív jelterületek csoportonkénti kvantifikációja, a biológiai replikátumok egyedi átlagai és a csoportszintű összesített átlagok ($\pm$ SD) feltüntetésével (n = 3 biológiai replikátum/csoport).

Csoport	Biológiai replikátum	TH-pozitív jelterület		KAT-2-pozitív jelterület	
		Átlag	Össz. átlag $\pm$ SD	Átlag	Össz. átlag $\pm$ SD
Kontroll	#1	6,158	7,301 $\pm$ 1,344	2,944	3,025 $\pm$ 0,196
	#2	8,782		3,249	
	#3	6,962		2,882	
1×20 mg/ttkg MPTP-kezelt	#4	2,857	2,775 $\pm$ 0,109	1,457	1,396 $\pm$ 0,067
	#5	2,817		1,406	
	#6	2,651		1,324	
2×20 mg/ttkg MPTP-kezelt	#7	1,418	1,154 $\pm$ 0,264	0,741	0,569 $\pm$ 0,149
	#8	0,891		0,492	
	#9	1,153		0,475	
3×20 mg/ttkg MPTP-kezelt	#10	1,334	1,046 $\pm$ 0,250	0,116	0,104 $\pm$ 0,012
	#11	0,877		0,093	
	#12	0,928		0,102	