

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Neurológiai Klinika

**A triptofán-kinurenin metabolizmus átrendeződése és komplementer
útvonalai kinurenin-aminotranszferáz II génkiütött egerekben,
neuropszichiátriai fenotípusok szempontjából releváns
összefüggésekben**

A Ph.D. értekezés tézisei

Szabó Ágnes



Témavezető(k): Prof. Dr. Vécsei László és Dr. Tanaka Masaru

Szeged

2026

A Ph.D. értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények:

- I. Szabó Á.,** Galla Zs., Spekker E., Szűcs M., Martos D., Takeda K., Ozaki K., Inoue H., Yamamoto S., Toldi J., Ono E., Vécsei L., Tanaka M. *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** 2025, 30(1): 25706. doi: 10.31083/FBL25706 (**original paper, Q2, IF: 3.100 (2025)**)
- II. Szabó Á.,** Galla Zs., Spekker E., Martos D., Szűcs M., Fejes-Szabó A., Fehér Á., Takeda K., Ozaki K., Inoue H., Yamamoto S., Monostori P., Toldi J., Ono E., Vécsei L., Tanaka M. *Behavioral Balance in Tryptophan Turmoil: Regional Metabolic Rewiring in Kynurenine Aminotransferase II Knockout Mice.* **Cells** 2025, 14, 1711. doi: 10.3390/cells14211711 (**original paper, Q1, IF: 5.200 (2025)**)

Kapcsolódó közlemények összesített kvartilis minősítése: 1 Q1 + 1 Q2

Kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 8.300

A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

- I. Tanaka M., Szabó Á.,** Lőrinczi B., Szatmári I., Fülöp F., Vécsei L. Antidepressant-like Effects of Kynurenic Acid Analogues. **Proceedings of 1st International Electronic Conference on Biomedicine** 2021, 10301, 8 p. doi: 10.3390/ECB2021-10301
- II. Tanaka M., Tóth F., Polyák H., Szabó Á.,** Mándi Y., Vécsei L. Immune Influencers in Action: Metabolites and Enzymes of the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. **Biomedicines** 2021, 9, 734. doi: 10.3390/biomedicines9070734 (**Q1, IF: 4.757 (2021)**)
- III. Tanaka M., Török N., Tóth F., Szabó Á.,** Vécsei L. Co-Players in Chronic Pain: Neuroinflammation and the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. **Biomedicines** 2021, 9, 897. doi: 10.3390/biomedicines9080897 (**Q1, IF: 4.757 (2021)**)

- IV. Spekker E., Tanaka M., **Szabó Á.**, Vécsei L. *Neurogenic Inflammation: The Participant in Migraine and Recent Advancements in Translational Research*. **Biomedicines** 2021, 10, 76. doi: 10.3390/biomedicines10010076 (**Q1, IF: 4.757 (2021)**)
- V. Tanaka M., Spekker E., **Szabó Á.**, Polyák H., Vécsei L. *Modelling the neurodevelopmental pathogenesis in neuropsychiatric disorders. Bioactive kynurenines and their analogues as neuroprotective agents—in celebration of 80th birthday of Professor Peter Riederer*. **Journal of Neural Transmission** 2022. doi: 10.1007/s00702-022-02513-5 (**Q2, IF: 3.300 (2022)**)
- VI. Tanaka M., **Szabó Á.**, Spekker E., Polyák H., Tóth F., Vécsei L. *Mitochondrial Impairment: A Common Motif in Neuropsychiatric Presentation? The Link to the Tryptophan–Kynurenine Metabolic System*. **Cells** 2022, 11, 2607. doi: 10.3390/cells11162607 (**Q1, IF: 6.000 (2022)**)
- VII. Tanaka M., **Szabó Á.**, Vécsei L. *Integrating Armchair, Bench, and Bedside Research for Behavioral Neurology and Neuropsychiatry: Editorial*. **Biomedicines** 2022, 10, 2999. doi: 10.3390/biomedicines10122999 (**Q1, IF: 4.700 (2022)**)
- VIII. Tajti J., Szok D., Csáti A., **Szabó Á.**, Tanaka M., Vécsei L. *Exploring Novel Therapeutic Targets in the Common Pathogenic Factors in Migraine and Neuropathic Pain*. **International Journal of Molecular Sciences** 2023, 24, 4114. doi: 10.3390/ijms24044114 (**Q1, IF: 4.900 (2023)**)
- IX. Polyák H., Galla Zs., Nánási N., Cseh E.K., Rajda C., Veres G., Spekker E., **Szabó Á.**, Klivényi P., Tanaka M., Vécsei L. *The Tryptophan-Kynurenine Metabolic System Is Suppressed in Cuprizone-Induced Model of Demyelination Simulating Progressive Multiple Sclerosis*. **Biomedicines** 2023, 11, 945. doi: 10.3390/biomedicines11030945 (**Q1, IF: 3.900 (2023)**)
- X. Tanaka M., **Szabó Á.**, Vécsei L. *Preclinical modeling in depression and anxiety: Current challenges and future research directions*. **Advances in Clinical and Experimental Medicine** 2023, 32(5). doi: 10.17219/acem/165944 (**Q2, IF: 2.100 (2023)**)

- XI.** Tanaka M., **Szabó Á.**, Körtési T., Szok D., Tajti J., Vécsei L. *From CGRP to PACAP, VIP, and Beyond: Unraveling the Next Chapters in Migraine Treatment.* **Cells** 2023, 12, 2649. doi: 10.3390/cells12222649 (**Q1, IF: 5.100 (2023)**)
- XII.** Tanaka M., **Szabó Á.**, Vécsei L., Giménez-Llort L. *Emerging Translational Research in Neurological and Psychiatric Diseases: From In Vitro to In Vivo Models.* **International Journal of Molecular Sciences** 2023, 24, 15739. doi: 10.3390/ijms242115739 (**Q1, IF: 4.900 (2023)**)
- XIII.** Tanaka M., **Szabó Á.**, Vécsei L. *Redefining Roles: A Paradigm Shift in Tryptophan–Kynurenine Metabolism for Innovative Clinical Applications.* **International Journal of Molecular Sciences** 2024, 25, 12767. doi: 10.3390/ijms252312767 (**Q1, IF: 4.900 (2024)**)
- XIV.** Juhász L., Spisák K., Szolnoki B.Zs., Nászai A., **Szabó Á.**, Rutai A., Tallósy Sz.P., Szabó A., Toldi J., Tanaka M., Takeda K., Ozaki K., Inoue H., Yamamoto S., Ono E., Boros M., Kaszaki J., Vécsei L. *The Power Struggle: Kynurenine Pathway Enzyme Knockouts and Brain Mitochondrial Respiration.* **Journal of Neurochemistry** 2025, 169:e70075. doi: 10.1111/jnc.70075 (**Q1, IF: 3.700 (2024)**)

A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények kvartilis minősítése: 11 Q1 + 2 Q2

A Ph.D. értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 57.771

Összesített kvartilis minősítés: 12 Q1 + 3 Q2

Összesített impakt faktor: 66.071

Rövidítés jegyzék

3CT	háromkamrás szociális teszt	OFT	nyílt tér teszt
3-HAA	3-hidroxi-antranilsav	OSI	oxidatív stressz index
3-HK	3-hidroxi-kinurenin	PAT	passzív elkerülés teszt
5-HT	szerootonin/5-hidroxi-triptamin	SD	szórás
AA	antranilsav	STEM	agytörzs
AADC	aromás L-aminosav-dekarboxiláz	STR	striátum
ALDH	aldehid-dehidrogenáz	TMO	triptofán-2-monooxygenáz
ANOVA	varianciaanalízis	Trp	triptofán
CER	kisagy	TST	farokfelfüggesztési teszt
CTX	agykéreg	Tyr	tirozin
DA	dopamin	UHPLC-MS/MS	ultranagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria
DOPAC	3,4-dihidroxifenil-ecetsav	WT	vad típus
EI	excitotoxicitás index	XA	xantúrénsav
EPM	emelt keresztlabirintus teszt		
FST	forszírozott úszás teszt		
HIPP	hippokampusz		
IAA	indol-3-ecetsav		
KAT II	kinurenin aminotranszferáz II		
<i>kat2^{-/-}</i>	kinurenin-aminotranszferáz II génkiütött törzs		
KATs	kinurenin-aminotranszferázok		
KMO	kinurenin-3-monooxygenáz		
KYN	kinurenin		
KYNA	kinurénsav		
KYNU	kinurenináz		
LDB	világos-sötét doboz teszt		
MAOs	monoamin-oxidázok		
NORT	új tárgy felismerési teszt		
OBAT	tárgyalapú figyelem teszt		

Bevezetés

A triptofán (Trp) egy esszenciális aminosav, amely a fehérjeszintézisen túl több, egymással összefonódó anyagcsereút központi kiindulópontja. A Trp túlnyomó része a kinurenin (KYN) útvonalon keresztül metabolizálódik, mely során energiahordozó nikotinamid-adenin-dinukleotid és számos biológiailag aktív intermediér keletkezik. A KYN több, eltérő funkciójú metabolikus irányba terelődhet, melyek közül a kinurénsav (KYNA) képződése kiemelt jelentőségű. A KYNA a KYN transzaminációja révén keletkezik kinurenin-aminotranszferáz (KATs) enzimek közreműködésével. A KYNA négy féle izomere közül fiziológias körülmények között az agyban a kinurenin-aminotranszferáz II (KAT II) izoforma tekinthető a legmeghatározóbbnak.

A Trp anyagcsereje más útvonalakon is zajlik. A szerotonin (5-HT) útvonal kis mennyiségi aránya ellenére alapvető szerepet játszik a hangulatszabályozásban és a kognitív folyamatokban. Az indol-piruvát útvonal a bél–agy tengelyhez kapcsolódva mikrobiota-eredetű indolszármazékokon keresztül immunológiai folyamatokat befolyásol. Emellett a Trp anyagcsere közös kofaktorokon és redoxfolyamatokon keresztül kapcsolatban áll a tirozin (Tyr)–dopamin (DA) rendszerrel is.

A KYN útvonal metabolitjai neuroprotektív és neurotoxikus, pro- és antioxidáns, valamint immunmodulátor hatásokkal rendelkezhetnek, melyek kifejezetten kontextus- és koncentrációfüggők. A Trp anyagcsere egyensúlyának felborulását számos humán neurológiai és pszichiátriai betegség hátterében leírták, azonban mindeddig nem egyértelmű, hogy ezek az eltérések a betegségek következményei, vagy azok kialakulásában is szerepet játszanak.

Ezen mechanizmusok vizsgálatát jelentősen segítik a genetikai módosításon alapuló állatmodellek. A jelen munka alapját képező, CRISPR/Cas9 technológiával az *aadat* gén deléciójával létrehozott KAT II génkiütött egérmodell (*kat2^{-/-}*) lehetőséget biztosít annak vizsgálatára, hogy a KAT II hiánya miként befolyásolja a Trp-hoz kapcsolódó anyagcsereútvonalak egyensúlyát, valamint ezek viselkedéses és anyagcsere-szintű következményeit.

Célkitűzések

- I. A *kat2^{-/-}* egérmodell létrehozását követően célunk volt az állatkolónia genetikai hátterének ellenőrzése minden kísérleti sorozat előtt, a génkiütés jelenlétének és a genetikai integritásnak igazolása érdekében.
- II. Célul tűztük ki a csökkent KAT II aktivitás hatásának átfogó vizsgálatát a Trp és ahhoz kapcsolódó lebontási útvonalak anyagcsere-egyensúlyára.

- III. További célunk volt a *kat2^{-/-}* egerek alap fenotípusos jellemzése standardizált módszerekkel, az esetleges általános, neurológiai vagy szenzomotoros eltérések azonosítására.
- IV. Végül célunk volt a *kat2^{-/-}* egerek magatartásának jellemzése annak feltárására, hogy a Trp-anyagcserét érintő génkiütés miként befolyásolja az egyes viselkedési doméneket.

Anyagok és módszerek

Állatok

A C57BL/6N vad típusú (WT) egerek beszerzése a Charles River Laboratories (Németország)-ból történt, míg a *kat2^{-/-}* egérvonalat kollaborációs partnereink (Kyushu University, Fukuoka, Japán) biztosították számunkra. Az állatokat a Szegedi Tudományegyetem Neurológiai Klinikájának állatházában, specifikus patogénmentes körülmények között tartottuk, polikarbonát ketrecekben (530 cm² alapterület, 4-5 állat/ketrec), szabályozott környezeti körülmények között (24 ± 1 °C, 45-55% relatív páratartalom, 12-12 órás világos-sötét ciklus). Az állatok ad libitum hozzáfértek standard laboratóriumi rágcsálótáphoz és ivóvízhez, illetve biztosítottunk számukra környezetgazdagítást. A genetikailag módosított állatok behozatalát az Agrárminisztérium Biodiverzitás és Génmegőrzési Főosztálya engedélyezte (BGMF/37-5/2020). A kísérletek megfeleltek az Állatkísérletek Etikai Kódexének, és a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága, valamint a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal jóváhagyásával zajlottak (XI./84/2025; X./1008/2025). A kísérleti protokollt az Európai Közöség Tanácsnak 2010/63/EU irányelve, illetve a Magyar Egészségügyi Bizottság 40/2013. (II.14.) rendelete hagyta jóvá. Az állatok egészségi állapotát a kísérletek során rendszeresen monitoroztuk, az előre meghatározott humánus végpont elérése esetén kiveztük őket a kísérletből.

I. A *kat2^{-/-}* genetikai hátterének ellenőrzése

Minden állatot genotipizáltunk a kísérletek megkezdése előtt. Farokbiopsziát vettünk 2%-os izoflurán anesztézia mellett, lokális lidokain alkalmazásával. A kb. 3 mm hosszú farokmintákat -80 °C-on tároltuk további feldolgozásig. A genomi DNS izolálását a HotSHOT módszer módosított, lúgos lízisen alapuló protokolljával végeztük. Az extraktált DNS mennyiségét és tisztaságát spektrofotometriával ellenőriztük, majd a mintákat -20 °C-on tároltuk. A genotípus meghatározása fluoreszcenciaalapú TaqMan allélikus diszkriminációval történt valós idejű PCR rendszerben. Minden mérés tartalmazott negatív kontrollokat, valamint validált WT és *kat2^{-/-}* referencia mintákat. Az egyértelműen nem besorolható mintákat ismételten mértük.

II. A triptofán lebontási útvonalak metabolikus profilozása

Nyolc hetes hím *kat2^{-/-}* és WT állatokat (n = 10/csoport) vontunk be a metabolomikai vizsgálatokba. A vizeletmintákat az anesztézia előtt gyűjtöttük. A plazmamintákhoz az állatokat 2%-os izoflurán alkalmazásával altattuk, majd a bal szívkamrából vett vért nátrium-etiléndiamin-tetraacetát-dihidráttal tartalmazó csövekbe gyűjtöttük. A plazmát centrifugálással választottuk el. A központi idegrendszeri metabolitszintek meghatározásához az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk, ezt követően az agyat eltávolítottuk és öt különböző régióra bontottuk: striátumra (STR), agykéregre (CTX), hippokampuszra (HIPPO), kisagyra (CER) és agytörzsre (STEM). Minden mintát -80 °C-on tároltunk további felhasználásig. Az agyszöveteket jeges vízben homogenizáltuk ultrahangos szonikáló módszerrel. A Trp-KYN, szerotonerg, indol-piruvát és katekolaminerg metabolitok, valamint kiválasztott kofaktorok célzott meghatározását ultra-nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriával (UHPLC-MS/MS) végeztük validált multiplex protokollok alapján, stabil izotóppal jelölt belső standardok alkalmazásával. Az enzimaktivitások relatív becslésére termék/szubsztrát arányokat számoltunk. A metabolikus egyensúly funkcionális eltolódásainak jellemzésére oxidatív stressz indexet (OSI) és excitotoxicitás indexet (EI) határoztunk meg, melyek integrált módon tükrözik a KYN útvonal működésének változásait.

III. A kat2^{-/-} egerek alap fenotípusos jellemzése

Nyolc hetes hím *kat2^{-/-}* és WT egereken (n = 10/csoport) standardizált alap fenotípusos vizsgálatot végeztünk a RIKEN által validált, módosított SHIRPA protokoll alkalmazásával. A mérések minden esetben 08:00 és 12:00 óra között zajlottak, az állatokat a vizsgálatot megelőzően egy órával a teszhelyiségbe szállítottuk akklimatizáció céljából. A SHIRPA protokoll átfogó képet nyújt az általános egészségi állapotról, a neurológiai státuszról és a szenzomotoros funkciókról, lehetővé téve a későbbi viselkedési vizsgálatokat befolyásoló alap eltérések azonosítását. Az értékelés neuromuszkuláris, autonóm, reflexes és szenzomotoros paraméterekre terjedt ki.

IV. A kat2^{-/-} egerek magatartásának jellemzése

A viselkedés vizsgálatokba nyolchetes hím *kat2^{-/-}* és WT egereket vontunk be (n = 10-13/csoport). A mérések minden esetben 08:00 és 12:00 óra között zajlottak, az állatokat a vizsgálatok előtt egy órával áthelyeztük a kísérleti helyiségbe akklimatizáció céljából. Az egyes állatok mérése között a berendezéseket 70%-os etanollal tisztítottuk az olfaktoros zavaró tényezők minimalizálása érdekében. A spontán lokomotoros és explorációs aktivitást, valamint a centropreferenciát nyílt tér teszttel (OFT), a motoros koordinációt és egyensúlyt rotarod teszttel vizsgáltuk. A szorongásszerű viselkedés vizsgálatához emelt keresztlabirintus tesztet

(EPM), és világos-sötét doboz tesztet (LDB) alkalmaztunk. A depresszió-szerű viselkedést módosított forszirozott úszás tesztet (FST) és farokfelfüggesztési tesztet (TST) térképeztük fel. A kognitív képességek vizsgálatához passzív elkerülés (PAT), új tárgy felismerési (NORT), tárgyalapú figyelem (OBAT) és Y-alakú labirintus teszteket alkalmaztunk. Az ismétlődő magatartást a szorongásszerű viselkedés és kogníció vonatkozásában márványeladási tesztet értékeltük. Továbbá a szociabilitást és szociális újdonság iránti preferenciát háromkamrás szociális tesztet (3CT) vizsgáltuk.

Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS Statistics 28.0 szoftverrel végeztük. Az adatok eloszlását az alkalmazott statisztikai próbákat megelőzően Shapiro–Wilk-próbával, valamint Q–Q diagramok vizuális ellenőrzésével értékeltük. A varianciák homogenitását szükség szerint vizsgáltuk, az esetleges kiugró értékeket standard statisztikai módszerekkel azonosítottuk. A *kat2^{-/-}* és WT csoportok közötti összehasonlításokat normáeloszlás esetén független mintás t-próbával végeztük, nem normális eloszlás esetén nemparaméteres Mann–Whitney U-próbát alkalmaztunk. A SHIRPA alap fenotípusos adatok értékelésére egyutas varianciaanalízist (ANOVA) használtunk, szükség esetén Tamhane post hoc tesztet. Többváltozós vagy ismételt méréseket viselkedési paradigmák esetén vegyes elrendezésű ANOVA-t alkalmaztunk. Minden statisztikai próba kétoldali volt, a szignifikanciahatárt $p < 0,05$ értékben határoztuk meg. Az adatokat minden esetben átlag $\pm$ szórás (SD) formájában adjuk meg.

Eredmények

I. A *kat2^{-/-}* genetikai hátterének ellenőrzése

A lúgos DNS-extrakción és TaqMan allélikus diszkrimináción alapuló genotipizálási eljárás megbízhatóan működött, és a vizsgálatok teljes időtartama alatt következetesen alkalmazásra került. Valamennyi tenyésztésbe és kísérletbe bevont *kat2^{-/-}* állat hordozta a célzott génkiütést, amelyet minden kísérleti sorozat előtt igazoltunk. Az eredmények megerősítik, hogy a CRISPR/Cas9 technológiával létrehozott delécia stabilan, homozigóta formában fennmaradt a kolóniában, genetikai visszaalakulás jelei nélkül.

II. A triptofán lebontási útvonalak metabolikus profilozása

A célzott UHPLC–MS/MS vizsgálatok kiterjedt változásokat tártak fel a Trp-hoz kapcsolódó metabolit profilokban *kat2^{-/-}* egerekben a WT kontrollkhoz képest, mind perifériás mintákban, mind az agy különböző régióiban. A plazmában a KYN (** $p < 0,01$), KYNA (*** $p < 0,001$), antranilsav (AA; ** $p < 0,01$), xantúrénsav (XA; *** $p < 0,001$), 5-hidroxi-indol-ecetsav (** $p < 0,01$) és indol-3-ecetsav (IAA; *** $p < 0,001$) koncentrációja csökkent, míg a 3-

hidroxikinurenin (3-HK; $**p < 0,01$) szintje jelentősen emelkedett. A vizeletmintákban ettől részben eltérő mintázat volt megfigyelhető, ugyanis csökkent KYNA ($***p < 0,001$), XA ($***p < 0,001$) és IAA ($**p < 0,01$) szinteket, valamint emelkedett KYN ($***p < 0,001$), 3-HK ($***p < 0,001$) és 5-HT ($*p < 0,05$) koncentrációkat tapasztaltunk.

Az agyszövetek elemzése markáns, régiófüggő metabolikus átrendeződést mutatott. Valamennyi vizsgált agyterületen egységesen emelkedett a 3-HK szintje (STR $*p < 0,05$; CTX $*p < 0,05$; HIPP $**p < 0,01$; CER $*p < 0,05$; STEM $**p < 0,01$), míg a STR-t leszámítva globálisan csökkent az XA (CTX $*p < 0,05$; HIPP $*p < 0,05$; CER $*p < 0,05$; STEM $***p < 0,001$) koncentrációja. A KYNA változásai régióspecifikusak voltak: a CTX-ben és a HIPP-ban csökkenést, míg a STR-ban emelkedést mutattak (STR $*p < 0,05$; CTX $*p < 0,05$; HIPP $*p < 0,05$). Továbbá csökkenést tapasztaltunk a Trp (CTX $**p < 0,01$; HIPP $*p < 0,05$) és a kináldinsav (CER $*p < 0,05$; STEM $*p < 0,05$) koncentrációiban. Ezzel szemben az AA (CTX $*p < 0,05$) és a 3-hidroxi-antranilsav (3-HAA; CTX $*p < 0,05$) szintje növekedett egyes agyrégiókban.

A szerotonerg útvonalon az 5-hidroxi-triptofán (STR $*p < 0,05$; CTX $***p < 0,001$; CER $**p < 0,01$) szintjében csökkenést és régiófüggő 5-HT-emelkedést (CTX $**p < 0,01$) észleltünk. Az indol-piruvát útvonalon egyes agyterületeken csökkent az IAA (HIPP $**p < 0,01$), az indol-3-tejsav (STEM $***p < 0,001$) és az indoxil-szulfát (STEM $*p < 0,05$), míg növekedett indol-3-karboxaldehid (CTX $***p < 0,001$) szintje. A Tyr-DA útvonalon egyaránt csökkenést tapasztalhattunk a Tyr (CTX $*p < 0,05$), a 3,4-dihidroxifenil-ecetsav (DOPAC; CER $*p < 0,05$), a biopterin (CER $***p < 0,001$) és a dihidrobiopterin (CER $***p < 0,001$) szintjében.

Az enzimaktivitás-bebecslések perifériás mintákban csökkent KAT- (plazma $***p < 0,001$; vizelet $***p < 0,001$), kinurenináz- (KYNU; AA/KYN: vizelet $***p < 0,001$; 3-HAA/3-HK: plazma $***p < 0,001$ és vizelet $***p < 0,001$), monoamin-oxidázok (MAOs) és aldehid-dehidrogenáz (ALDH)- (plazma $*p < 0,05$; vizelet $***p < 0,001$) és triptofán-2-monooxygenáz (TMO; plazma $**p < 0,01$; vizelet $***p < 0,001$)-aktivitást, valamint fokozott kinurenin-3-monooxygenáz (KMO; plazma $**p < 0,01$; vizelet $***p < 0,001$), triptofán-2,3-dioxigenáz és indolamin-2,3-dioxigenáz (vizelet $***p < 0,001$), valamint az aromás L-aminosav-dekarboxiláz (AADC)-aktivitást (vizelet $**p < 0,01$) jeleztek. Az agyban a KMO-aktivitás (STR $**p < 0,01$; CTX $**p < 0,01$; HIPP $***p < 0,001$; CER $***p < 0,001$; STEM $***p < 0,001$) minden régióban emelkedett. Emellett még a KAT (STR $*p < 0,05$), az AADC (STR $*p < 0,05$; CTX $**p < 0,01$; CER $**p < 0,01$) és a katekol-O-metiltranszferáz (CER $*p < 0,05$) aktivitása egyes agyrégiókban emelkedett, addig a KYNU (3-HAA/3-HK: HIPP $*p < 0,05$), a kinurenin-aminotranszferáz III (CTX $**p < 0,01$; HIPP $**p < 0,01$; CER $**p < 0,01$; STEM

*** $p < 0,001$), a triptofán-hidroxilázok (CTX ** $p < 0,01$; CER ** $p < 0,01$), a MAOs és ALDH (CTX * $p < 0,05$) és a DA útvonalban DOPAC átalakulás katalizálásában résztvevő MAOs (CER * $p < 0,05$) aktivitása csökkent. A TMO aktivitása nem egységesen változási irányt mutatott az egyes agyrégiókban: míg a HIPB-ban csökkent (* $p < 0,05$), addig a CER-ban (* $p < 0,05$) nőtt az aktivitása.

Az OSI és EI perifériás mintákban egyaránt szignifikánsan emelkedtek *kat2^{-/-}* egerekben (OSI: plazma *** $p < 0,001$; vizelet *** $p < 0,001$; EI: plazma *** $p < 0,001$; vizelet *** $p < 0,001$). Központi idegrendszeri szinten az OSI több agyterületen növekedett (CTX ** $p < 0,01$; HIPB *** $p < 0,01$; CER ** $p < 0,01$; STEM * $p < 0,05$), míg az excitotoxicitás emelkedése elsősorban a HIPB-ra korlátozódott (* $p < 0,05$).

III. A *kat2^{-/-}* egerek alap fenotípusos jellemzése

A módosított SHIRPA protokoll alkalmazásával végzett alap fenotípusos vizsgálatok nem mutattak szignifikáns eltérést a *kat2^{-/-}* egerek és a WT kontrollállatok között az értékelt paraméterek egyikében sem.

IV. A *kat2^{-/-}* egerek magatartásának jellemzése

Az OFT-ben a *kat2^{-/-}* egerek csökkent spontán mozgásaktivitást mutattak, amit az összes megtett távolság szignifikáns csökkenése jelzett a 10 perces vizsgálat során (** $p < 0,01$). Emellett kevesebb ugrást hajtottak végre (* $p < 0,05$), valamint mérsékeltebb explorációs viselkedést mutattak, amit a központi és sarokzónákba történő belépések alacsonyabb száma tükrözött (központi zónák: * $p < 0,05$; sarokzónák: *** $p < 0,001$). Ezzel szemben a rotarod tesztben nem volt kimutatható különbség a genotípusok között, ami arra utal, hogy a motoros koordináció és egyensúly megtartott maradt. A szorongásszerű viselkedések elemzésére alkalmazott EPM, LDB és MBT egyikében sem mutatkozott szignifikáns eltérés a *kat2^{-/-}* és a WT egerek között. A depressziószerű viselkedés elemzéséhez alkalmazott módosított FST-ben a *kat2^{-/-}* egerek hosszabb immobilitási időt (* $p < 0,05$) és csökkent úszási aktivitást (* $p < 0,05$) mutattak, míg a TST-ben nem észleltünk genotípusfüggő különbségeket. A kognitív és figyelmi funkciók vizsgálata során sem a felismerési memória (NORT), sem az averzív tanulás (PAT), sem a figyelmi teljesítmény (OBAT), illetve a munkamemória (Y-labirintus teszt) esetében nem mutatkoztak szignifikáns eltérések a genotípusok között. A 3CT során mindkét csoport hasonló viselkedést mutatott, és egyik vizsgált szociális paraméterben sem volt kimutatható genotípusfüggő különbség.

Megbeszélés

A genetikai validáció és a modell integritása

A metabolikus és viselkedési eredmények megbízható értelmezésének alapfeltétele a kísérleti modell genetikai stabilitása. A jelen vizsgálatban a szisztematikus genotipizálás igazolta, hogy az *aadat* gén deléciója valamennyi *kat2^{-/-}* állatban következetesen jelen volt a különböző kísérleti kohorszokban. A heterozigóta genotípusok hiánya, valamint a *kat2^{-/-}* és WT allélok egyértelmű elkülönülése arra utal, hogy a CRISPR/Cas9 technológiával létrehozott génkiütés stabilan, homozigóta formában öröklődött, allél-visszaalakulás vagy mozaicizmus jelei nélkül. Az alkalmazott genotipizálási stratégia magas specificitása és reprodukálhatósága kizárta a részleges vagy bizonytalan genotípusú állatok bevonását, ezáltal minimalizálta a genetikai háttérből eredő variabilitást. Ennek megfelelően a megfigyelt metabolikus átrendeződések és funkcionális eltérések nagy valószínűséggel a KAT II hiány közvetlen következményeinek tekinthetők. A modell genetikai integritásának megerősítése így szilárd alapot teremt annak értelmezéséhez, hogy egyetlen kulcsenzim célzott zavara miként terjed tovább az egymással összekapcsolt Trp-anyagcsereútvonalakon.

Metabolikus átrendeződés és útvonal-dominancia a KAT II deléciót követően

Az *aadat* genetikai deléciója kiterjedt, ugyanakkor térben heterogén átrendeződést idézett elő a Trp-anyagcserében mind perifériás, mind központi kompartmentekben. Plazmában és vizeletben a metabolikus profil következetesen az emelkedett 3-HK, valamint a csökkent KYNA és XA irányába tolódott el, ami a KYN útvonal antioxidáns ágainak háttérbe szorulását és a pro-oxidáns irányok dominanciáját jelzi. Ezeket a perifériás változásokat szerotonerg és indol-eredetű metaboliteltérések is kísérték, ami arra utal, hogy a KAT II hiánya nem izoláltan, hanem több, egymással összekapcsolt Trp-eredetű útvonalat érint. Az agyban a metabolikus átrendeződés kifejezett régiófüggést mutatott. A 3-HK egységes emelkedése és a XA globális csökkenése általános oxidatív irányultságra utal, míg a KYNA régióként eltérő változásai – csökkenés a CTX-ben és HIPP-ban, emelkedés a STR-ban – lokális kompenzációs mechanizmusok aktiválódását valószínűsítik. Az enzimaktivitási arányok elemzése megerősítette a KMO által vezérelt oxidatív ág dominanciáját, miközben a KAT-mediált védő útvonalak több régióban beszűkültek. Eredményeink azt is jelzik, hogy a KAT II célzott gátlása nem marad a KYN útvonalon belül. A 5-HT, indol-piruvát és Tyr–DA rendszerekben megfigyelt párhuzamos eltérések arra utalnak, hogy a Trp-anyagcsere integrált hálózatként működik, ahol egyetlen enzimatis csomópont zavara rendszerszintű metabolikus újra szerveződést indukál. A KAT II hiány ezért nem útvonalspecifikus, hanem hálózati szintű anyagcsere-egyensúlyzavarként értelmezhető.

Rejtett oxidatív és excitotoxikus sérülékenység

A KAT II enzimhiány olyan metabolikus környezetet hoz létre, amelyet fokozott oxidatív terhelés és kontextusfüggő excitotoxikus sérülékenység jellemez mind perifériás, mind központi kompartmentekben. A KYN metabolitokból számított összetett indexek következetes pro-oxidáns eltolódást jeleztek *kat2^{-/-}* egerekben. Az OSI emelkedése nemcsak több agyterületen, hanem a plazmában és a vizeletben is megfigyelhető volt, ami arra utal, hogy a redox-egyensúly zavara szisztémás következménye a csökkent KYNA-szintnek. Az EI perifériás mintákban szintén emelkedett, míg az agyban kifejezett régiófüggést mutatott: szignifikáns növekedés kizárólag a HIPp-ban volt kimutatható. Ez az eltérés arra utal, hogy míg a perifériás területeken az indexek általános sérülékenységi állapotot tükröznek, a központi excitotoxikus kockázatot lokális szabályozó és puffervechanizmusok határozzák meg. Fontos megállapítás, hogy az oxidatív stressz és excitotoxicitás együttes fokozódása nem eredményezett nyilvánvaló neurotoxicitást vagy alapvető viselkedési károsodást. Ehelyett a KAT II hiány egy rejtett sérülékenységi állapotot definiál, amely csökkenti a funkcionális egyensúly toleranciáját, de önmagában nem vált ki patológiát. Ez az állapot különösen stresszérzékeny agyterületeket – elsősorban a HIPp-t – tehet fogékonyabbá másodlagos terhelések, például stressz, öregedés vagy gyulladás hatásaira.

Viselkedési reziliencia neurokémiai egyensúlyzavar mellett

A Trp-anyagcsere útvonalakban kimutatott kifejezett és régiófüggő neurokémiai átrendeződés ellenére a *kat2^{-/-}* egerek alap fenotípusa és viselkedési működése nagyrészt megőrzött maradt. A módosított SHIRPA protokollal végzett szűrővizsgálatok nem mutattak genotípusfüggő eltéréseket az alapvető neurológiai, autonóm vagy szenzomotoros funkciók terén, ami hatékony kompenzációs mechanizmusokra utal fiatal felnőtt korban. A viselkedési eltérések elsősorban a spontán explorációt és a stresszhez való alkalmazkodást érintették, míg a szorongásszerű viselkedés, a kognitív teljesítmény, a szociális interakció és az averzív memória megőrzött maradt. Az OFT-ben csökkent explorációs aktivitás volt megfigyelhető motoros károsodás nélkül, míg a módosított FST-ben fokozott immobilitás és csökkent úszási idő jelent meg. Ezzel szemben a farokfelfüggesztési teszt nem mutatott eltérést, ami a stresszparadigmák közötti funkcionális különbségekre utal. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a KAT II hiány egy rejtett, stresszérzékeny viselkedési állapotot hoz létre, amelyben a neurokémiai egyensúlyzavar elsősorban a megküzdési stratégiákat befolyásolja, anélkül hogy általános viselkedési károsodást eredményezne. Ez a fenotípus preklinikai modellként szolgálhat a neuropszichiátriai sérülékenység és reziliencia mechanizmusainak vizsgálatához.

Korlátok és jövőbeli tervek

A jelen eredmények értelmezése során több korlátozó tényezőt is figyelembe kell venni. A vizsgálatok fiatal felnőtt, hím egereken, alapállapotban történtek, ami korlátozza a fejlődési, öregedési és nemi különbségek levonható következtetéseit. Tekintettel a Trp-anyagcsere és a stresszválasz ismert nemi dimorfizmusára, a nőstény állatok bevonása és longitudinális vizsgálatok elengedhetetlenek a KAT II hiány hosszú távú hatásainak feltárásához. A metabolomikai elemzések regionális szöveti homogenátumokon alapultak, amelyek elfedhetik a sejttípus-specifikus eltéréseket. Jövőbeli, sejtszintű vagy térbeli felbontású megközelítések szükségesek a metabolikus átrendeződés pontos lokalizálásához. Az enzimaktivitások becslése termék/szubsztrát arányokon alapult, ami rendszerszintű információt nyújt, de nem helyettesíti a közvetlen kinetikai vizsgálatokat. Emellett a bélmikrobiom közvetlen jellemzése nem történt meg, ami korlátozza a mikrobiális hozzájárulás értelmezését. Végül, a viselkedéses vizsgálatok nem tartalmaztak célzott stressz- vagy kognitív terhelést. A jövőben olyan paradigmák alkalmazása indokolt, amelyek képesek feltárni a kimutatott rejtett metabolikus sérülékenységek funkcionális következményeit.

Következtetések

A jelen munka átfogó módon jellemezte a KAT II enzimet kódoló *aadat* gén genetikai deléciójának neurokémiai és viselkedéses következményeit fiatal felnőtt *kat2^{-/-}* egerekben, régióspecifikus metabolomikai elemzések, becsült enzimaktivitások, OSI és EI, valamint többdimenziós viselkedéses vizsgálatok integrálásával. Eredményeink szerint a KAT II hiánya kifejezett, ugyanakkor térben heterogén módon alakítja át a Trp-anyagcserét mind perifériás, mind központi kompartmentekben, miközben a viselkedéses eltérések szelektívek, mérsékelték és kontextusfüggők maradnak. Biokémiai szinten az *aadat* deléció a Trp lebontását pro-oxidáns és potenciálisan excitotoxikus irányba tolta el, amelyet a 3-HK általános emelkedése, a XA csökkenése, a KYNA régióspecifikus módosulása, valamint a 5-HT, indol-piruvát és Tyr-DA útvonalak átrendeződése jellemezett. Ezeket a változásokat emelkedett OSI és EI kísérték, különösen a kortiko-hippokampális régiókban, ami rejtett metabolikus sérülékenységre, nem pedig manifest neurodegenerációra utal. A perifériás mintákban megfigyelt, a központi eltérésekkel összhangban álló változások alátámasztják a perifériás biomarkerek transzlációs relevanciáját. A jelentős neurokémiai egyensúlyzavar ellenére a viselkedéses teljesítmény a legtöbb kognitív, szociális és szorongással kapcsolatos doménben megőrzött maradt, ami a központi idegrendszer kompenzációs kapacitását jelzi alapállapotban. Ugyanakkor a spontán aktivitást és a stresszre adott viselkedési válaszokat mérő paradigmákban szelektív eltérések

voltak kimutathatók, elsősorban az explorációs aktivitás csökkenése és az immobilitási válasz fokozódása formájában. Összességében az eredmények alátámasztják, hogy a KAT II hiánya nem önálló pszichopatológiát, hanem egy metabolikus és affektív sérülékenységi állapotot hoz létre. A KAT II szerepének pontosítása a KYN útvonalon és a kapcsolódó Trp-anyagcsere útvonalakban olyan mechanisztikus keretet biztosít, amely hozzájárulhat a neuropszichiátriai vulnerabilitás jobb megértéséhez, és alapot teremthet célzott, anyagcsere-alapú terápiás megközelítések jövőbeli fejlesztéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Vécsei László professzor úrnak és Dr. Tanaka Masarunak a doktori munkám során nyújtott szakmai iránymutatásért, támogatásért és mentorálásért.

Köszönettel tartozom Klivényi Péter professzor úrnak, hogy lehetőséget és háttérrel biztosított a kutatási tevékenységemhez a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Klinikai Központjának Neurológiai Klinikáján.

Hálás vagyok a HUN-REN–SZTE Idegtudományi Kutatócsoport jelenlegi és korábbi munkatársainak, különösen Martos Diánának, Fülöpné Bohár Zsuzsannának, Fejes-Szabó Annamáriának és Spekker Eleonórának, valamint Lukács Erzsébetnek a laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért.

Köszönöm együttműködő partnereinknek, Galla Zsoltnak, Monostori Péternek, Juhász Lászlónak, Spisák Krisztinának, Boros Mihálynak, Szűcs Mónikának és Toldi József professzor úrnak a közös munka során nyújtott szakmai hozzájárulást. Illetve köszönet illeti Etsuro Ono professzor urat és munkatársait a Kyushu University (Fukuoka, Japán) intézményében a genetikailag módosított egértörzsek biztosításáért számunkra.

Végül, de nem utolsósorban, szeretném kifejezni legmélyebb hálámat szeretett családomnak és barátaimnak feltétel nélküli szeretetükért, türelmükért, folyamatos támogatásukért, valamint azért, hogy ezekben a nehéz években mindvégig mellettem álltak és hittek bennem. “*Sub pondere crescit palma.*”

A kutatást a GINOP-2.3.2-15-2016-00034, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH, K138125), az SZTE SZAOK-KKA program (2022/5S729), a HUN-REN Magyar Kutatási Hálózat, a Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) kétoldalú együttműködési programja (Grant No. JPJSBP120203803), valamint a Magyar Tudományos Akadémia (NKM-65/1/2021) támogatta. Doktori tanulmányaim során részbeni támogatásban részesültem a Szegedi Tudományegyetem Albert Szent-Györgyi Orvostudományi Kar Klinikai Orvostudományi Doktori Iskolájától.

Tézisem elkészítése során a nyelvi ellenőrzéshez, korrekcióhoz, illetve tudományos nyelvezet finomításához Grammarly és ChatGPT 5.2 alkalmazásokat használtam.