

TRANSZGENIKUS EGEREK ÉS SEJTVONALAK LÉTREHOZÁSA A TRPA1 ÉS SST₄ RECEPTOROK VIZSGÁLATÁHOZ GYÓGYSZERKUTATÁSI CÉLOKRA

Doktori (PhD) értekezés

Nemes Balázs



Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Neurofarmakológia Program

Doktori Iskola vezetője, programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezetők: Prof. Dr. Pintér Erika és Dr. Sándor Zoltán

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs, 2023.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	6
1. Általános bevezetés	10
1.1. <i>Transzgenikus állatok és sejtvonalak létrehozása</i>	10
1.2. <i>Fájdalom és gyulladás</i>	11
1.3. <i>TRPA1</i>	12
1.4. <i>Szomatosztatin</i>	13
1.5. <i>Szomatosztatin receptor 4 (SST₄) receptor</i>	14
2. Szomatosztatin receptor 4 (SST₄) humanizált egér létrehozása és az expresszió karakterizálása	15
2.1. <i>Bevezetés</i>	15
2.2. <i>Célkitűzés</i>	16
2.3. <i>Anyag és módszer</i>	16
2.3.1. <i>PiggyBac transzpozon vektor tervezése és létrehozása</i>	16
2.3.2. <i>Kísérleti állatok és etikai engedély</i>	18
2.3.3. <i>Transzgenezis</i>	19
2.3.4. <i>Ligálás-mediált PCR (LM-PCR)</i>	20
2.3.5. <i>Inverz PCR</i>	22
2.3.6. <i>Luciferáz és tdTomato in vivo képalkotás</i>	22
2.3.7. <i>tdTomato mikroszkópia</i>	23
2.3.8. <i>RNAscope</i>	24
2.3.9. <i>Reverz transzkripció kvantitatív PCR (RT-qPCR) szerv és agyterület specifikus expresszió mérésére</i>	25
2.4. <i>Eredmények</i>	26
2.4.1. <i>Vektorkészítés és transzgenezis</i>	26
2.4.2. <i>A hSSTR4 transzgén inszerciós helyei</i>	31

2.4.3.	<i>A kópia specifikus expressziós mintázat kimutatása a hSSTR4 génhez kapcsolt luciferáz enzim lumineszcenciája által, in vivo képalkotással</i>	31
2.4.4.	<i>A hSSTR4 génexpresszió mennyiségi vizsgálata RT-qPCR technikával</i>	33
2.4.5.	<i>A hSSTR4 transzgén expressziója különböző agyi idegsejt típusokban</i>	34
2.4.6.	<i>U1 és U2 keresztezés</i>	39
2.5.	<i>Megbeszélés</i>	39
2.6.	<i>Következtetés</i>	42
2.7.	<i>Mellékletek</i>	43
3.	Szerves poliszulfidok kötőhelyének azonosítása a humán TRPA1 receptoron	49
3.1.	<i>Bevezetés</i>	49
3.2.	<i>Célkitűzés</i>	51
3.3.	<i>Anyag és módszer</i>	52
3.3.1.	<i>A DMTS, DADS és DATS számítógépes dokkolása a TRPA1 receptorra</i>	52
3.3.2.	<i>Szerves poliszulfid szintézis</i>	53
3.3.3.	<i>A TRPA1 helyspecifikus mutagenezise PCR technikával</i>	54
3.3.4.	<i>Plazmid amplifikáció Escherichia coli baktériumban</i>	56
3.3.5.	<i>CHO transzfekció</i>	56
3.3.6.	<i>Immuncitokémia</i>	57
3.3.7.	<i>Kalcium érzékeny fluoreszcencia mérés áramlási citometriával</i>	58
3.3.8.	<i>A TRPA1 változatokat expresszáló CHO sejtek radioaktív kalcium-45 felvételének mérése folyadék szcintilláció számolással</i>	59
3.3.9.	<i>Whole-cell patch-clamp (egész sejtés folt-feszültségzár)</i>	59
3.4.	<i>Eredmények</i>	61
3.4.1.	<i>DMTS, DADS és DATS számítógépes dokkolása a TRPA1 receptorhoz</i>	61
3.4.2.	<i>Szerves poliszulfid szintetizálás</i>	65
3.4.3.	<i>TRPA1 helyspecifikus mutagenezise</i>	65
3.4.4.	<i>hTRPA1 expresszió vizsgálata immuncitokémiai módszerrel</i>	67

3.4.5.	<i>A mutációk hatására bekövetkezett TRPA1 funkció változások</i>	68
3.4.6.	<i>Szerves poliszulfidokkal indukált tranziens intracelluláris kalcium koncentráció változás mérése mutáns TRPA1 változatokban</i>	69
3.4.7.	<i>A TRPA1 változatokat expresszáló CHO sejtek radioaktív kalcium-45 felvételének mérése folyadék szcintilláció számolással</i>	72
3.4.8.	<i>Ionáram aktiváló hatása a szerves poliszulfidoknak mutáns TRPA1 receptort expresszáló sejtekben</i>	73
3.5.	Megbeszélés	75
3.6.	Következtetés	78
3.7.	Mellékletek	79
4.	Asztrocita specifikus TRPA1 kondicionális knockout egér létrehozása és az expresszió vizsgálata	87
4.1.	Bevezetés	87
4.2.	Célkitűzés	87
4.3.	Anyag és módszer	88
4.3.1.	<i>Kísérleti állatok és etikai engedély</i>	88
4.3.2.	<i>Kiindulási egérvonalak genotipizálása</i>	89
4.3.3.	<i>tdTomato in vivo képalkotás</i>	89
4.3.4.	<i>Gfap-Cre feltérképezése LM-PCR technikával</i>	90
4.3.5.	<i>Gfap-Cre feltérképezése inverz PCR technikával</i>	90
4.3.6.	<i>Gfap-Cre hetero- és homozigóta megkülönböztetése qPCR technikával</i>	90
4.3.7.	<i>LoxP hely feltérképezése</i>	91
4.3.8.	<i>TRPA1 kondicionális KO genotipizálás</i>	92
4.3.9.	<i>Reverz transzkripció kvantitatív PCR</i>	92
4.4.	Eredmények	93
4.4.1.	<i>A Cre-loxP rendszer megtervezése és a Gfap-Cre géb asztrocita specifikus expressziójának ellenőrzése</i>	93
4.4.2.	<i>Nehézségek a Gfap-Cre gén feltérképezésében</i>	98

4.4.3.	<i>A loxP szekvenciák elhelyezkedése a Trpa1 génben</i>	98
4.4.4.	<i>Gfap-Cre és Trpa1-floxolt egerek keresztezése</i>	101
4.5.	<i>Megbeszélés</i>	103
4.6.	<i>Következtetés</i>	104
4.7.	<i>Mellékletek</i>	106
5.	Összefoglalás	107
6.	Új eredmények	109
7.	Irodalomjegyzék	110
8.	Az értekezés alapjául szolgáló publikációk	124
9.	Egyéb publikációk és konferencia részvételek	124
9.1.	<i>Publikáció</i>	124
9.2.	<i>Hazai és nemzetközi konferencia részvételek</i>	124
10.	Támogatás	127
11.	Köszönetnyilvánítás	128

Rövidítésjegyzék

Actb: Béta-aktin gén, egy háztartási gén, amihez előszeretettel viszonyítják más gének expressziós szintjét az RT-qPCR-ban

Amp: Ampicillin, egy antibiotikum

BITC: Benzil-izotiocianát

BLA: Az amigdala bazolaterális magja

BMA: Az amigdala bazomediális magja

BO: (*Bulbus olfactorius*) szaglóhagyma

CA1: Hippokampusz Ammon-szarv 1. régiója

CA2: Hippokampusz Ammon-szarv 2. régiója

CAG: Citomegalovírus (CMV) korai enhanszer ©, csirke béta-aktin gén promóter, első exon és első intron (A), és nyúl béta-globulin gén *splice* akceptor (G) genetikai elemekből mesterségesen kialakított erős promóter

CPM: (*Count per minute*) radioaktív bomlásszám percenként, folyadékszintilláció számolásnál a minta átlagos radioaktivitásának mértékegysége, amely egyenesen arányos a radioaktív izotóp mennyiségével

cDNS: Komplementer DNS, az mRNS másolata

CGRP: (*Calcitonin gene-related peptide*) calcitonin gén-rokon peptid

CHO: (*Chinese hamster ovary*) kínai hörcsög petefészek epitél sejtvonala

cKO: Kondicionális *knockout*

CMV promóter: Citomegalovírus eredetű promóter, ami erős génexpressziót biztosít emlős sejtekben

Ct érték: RT-qPCR során az a ciklusszám, amikor a minta jelerőssége eléri a küszöbértéket

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, egy kék fluoreszcens DNS festék sejtmagjelöléshez

DNS: Deoxiribonukleinsav, örökítőanyag

DPA: Dinamikus plantáris észteziométer, mechanikai fájdalomküszöböt mérő műszer

ECS: (*Extracellular solution*) extracelluláris oldat, egy egyszerű izotóniás oldat emlős sejtek számára, előszeretettel használják áramlási citometriához

FTIR: Fourier-transzformációs infravörös spektroszkóp

GABA: (*Gamma-aminobutyric acid*) Gamma-aminovajsav, egy gátló neurotranszmitter

Gad1: Egér glutamát dekarboxiláz 1 gén

GC-MS: (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) gázkromatográfiás tömegspektrométer

Gfap: (*Glial fibrillar acidic protein*) gliális fibrilláris savas protein génje egérben

Gfap-Cre: Egér *Gfap* gén promótere által meghajtott Cre rekombinááz transzgén (felső indexben a (+/-) a heterozigótát, míg a (-/-) a nullzigótát, azaz a WT egeret jelöli)

Hem: Hemizigóta, amely az adott génből csak egyetlen allélt tud hordozni az eltérő nemi kromoszómapárja (heterogaméta) miatt, vagyis az emlősök esetében a hímek X és Y kromoszóma génjei.

Het: Heterozigóta, amely az adott génből különböző alléleket hordoz a kromoszómáin

Hom: Homozigóta, amely az adott génből azonos alléleket hordoz a kromoszómáin

hSSTR4: Humán szomatosztatin receptor 4 gén

I.p.: (*Intraperitoneal*) intraperitoneális, hasüregbe adott injekció

ISH: *In situ* hibridizáció

ITR: (*Inverted terminal repeat*) fordított terminális ismétlődő szakasz, a transzpozon végein egy-egy helyezkedik el egymással fordított irányban, melyek a transzpozáz felismerő szekvenciái,

IVIS: (*In Vivo Imaging System*) *in vivo* optikai képalkotó készülék

KO: *Knockout*, génhianyos

LM-PCR: Ligálás mediált PCR

MCS: (*Multiple cloning site*) többszörös klónozó hely, olyan mesterséges DNS szekvencia, amely több restriktációs endonukleáz hasító helyét tartalmazza a plazmidon

MQ víz: Milli-Q készülékkel tisztított, nagy tisztaságú (0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) és alacsony iontartalmú ($> 5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) víz

mRNS: (*Messenger*) hírvivő RNS, fehérjét kódoló transzkriptum

MS: (*Mass Spectrometry*) tömegspektrum, tömegspektroszkópia

NBF: (*Neutral buffered formalin*) neutrális pufferelt formalin oldat, egy fixálószer

NCBI: National Center for Biotechnological Information, Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (USA)

NEB: *New England Biolabs*, enzimekre előállítására szakosodott cég, gyártó

NSAID: (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug) nem szteroid gyulladáscsökkentő

OtolI: Egér otolin 1 gén

PB: PiggyBac, egy transzpozon fajta, illetve annak inszercióját végző transzpozáz enzimje

PBS: (*Phosphate-buffered saline*) foszfáttal pufferolt sóoldat, egy egyszerű izotóniás oldat emlős sejtek számára, előszeretettel használják *in vitro* sejtenyészetek mosásához

pcDNA: (*Plasmid cloning DNA*) plazmid DNS, egy expressziós vektor

PCR: (*Polymerase chain reaction*) polimeráz-lánreakció, DNS szakaszt enzimatikusan amplifikáló módszer (élő sejtek nélkül)

Pir: Piriform kéreg

Polr2a: Egér RNS polimeráz 2 A alegység génje

PolyA: Poliadenilációs szignál szekvencia a gén kódoló szakasza végén

Ppib: Egér peptidil-prolil izomeráz B génje

PrL: Prelimbikus kéreg

RNS: Ribonukleinsav

ROI: (*Range of interest*) a mérési terület (testfelület), amely azonos elhelyezkedésű, méretű és alakú a vizsgált egerek között

RT-qPCR: Reverz transzkripció kuantitatív PCR, mRNS relatív mennyiségét, azaz a génexpressziós szintet meghatározó módszer

S1: Elsődleges szomatoszenzoros kéregben

Sis: Egér szukráz-izomaltáz génje

SM: Szklerózis multiplex, egy neurodegeneratív betegség

SNP: (*Single nucleotide polymorphism*) egy pontos nukleotid polimorfizmus

SP: (*Substance P*) P anyag, egy neuropeptid

SRIF₁: (*Somatotropin release inhibiting factor receptor subgroup 1*) a szomatotropin (növekedési hormon) felszabadulást gátló faktor (szomatosztatin) receptorainak 1-es csoportja, amelybe az SST₂ SST₃ és SST₅ tartozik bele

SRIF₂: (*Somatotropin release inhibiting factor receptor subgroup 2*) a szomatotropin (növekedési hormon) felszabadulást gátló faktor (szomatosztatin) receptorainak 1-es csoportja, amelybe az SST₁ és SST₄ tartozik bele

SST₁₋₅: Szomatosztatin receptor 1-5 altípusa

Sstr₄: Szomatosztatin 4 receptor génje egérben

SSTR₄: Szomatosztatin 4 receptor génje emberben

SV: (*Seminal vesicle*) ondóvezeték

TBS: (*Tris-buffered saline*) Tris pufferelt sóoldat, egy egyszerű izotóniás oldat emlős sejtek számára, előszeretettel használják immunhisztokémiában a sejt- és szövetminták mosásához

tdTomato: *Tandem dimer Tomato*, egy vörös fluoreszcens riporter fehérje

THBD: Humán trombomodulin génje

TRG: Trigeminalis ganglion

TRPA₁: Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 fehérje

Trpa^{1^{Fl/Fl}}: Homozigóta floxolt egér *Trpa1* gén (ha Fl helyett mínuszjel van a felső indexben, az a *Trpa1* WT gént jelöli)

TRPV₁: Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 fehérje

UATR: (*Universal Attenuated Total Reflectance Accessory*) univerzális gyengített teljes reflexió spektroszkópiát lehetővé tevő kiegészítő műszer

Ubc: Egér ubikvitin C génje

Vglut1: Egér vezikuláris glutamát transzporter 1 génje

WT: (*wild type*) vad típus

1. Általános bevezetés

1.1. Transzgenikus állatok és sejtvonalak létrehozása

Az emberi szervezet molekuláris szintű fiziológiás és patológias működésének alaposabb megértéséhez (alapkutatáshoz) és az új gyógyszerek preklinikai kutatásához elengedhetetlen a megfelelő modellorganizmusok kiválasztása, amelyek megfelelő mértékben utánozzák a humán fehérjék működését. Sok esetben még nem létezik a legalkalmasabb élőlény, de a rohamosan fejlődő molekuláris biológiai eszközök segítségével egyre inkább elérhetővé válik, hogy a kutatólaboratóriumok maguknak megalkossák a tervezett modellorganizmust. A legegyszerűbb és legelterjedtebb módszer az emlős sejtek transzfekciója, mint a kínai hörcsög petefészek epitél (CHO) és humán embrionális vese sejt (HEK293), hogy ezek a sejtek expresszálják az emberi fehérjét, és így lehetővé tegyék a humán fehérje működésének *in vitro* vizsgálatát. Azonban az *in vitro* kísérletek nem adnak teljes képet a fehérjék komplex, élő szervezetben mutatott működéséről, ezért a kísérleti állatok nélkülözhetetlenek a mechanizmusok pontos megismerésében. Az egerek és patkányok az emberekkel nagyfokú homológiát mutatnak sok fehérje esetében, így elsőként gyakran az egerek és patkányok vad típusú fehérjéinek működését vizsgálják, majd ezt összehasonlítják a humán eredményekkel. Gyakori eszköz a génhianyos (*knockout* - KO) állatok használata, amelyeknél általában változásokat tapasztalhatunk (túlnyomóan sérült funkciót) a vad típusú (WT) állatokkal szemben, amik alapján következtetnek az adott fehérje működésére. Viszonylag új és még kevésbé elterjedt módszer az ilyen állatokban helyettesíteni a hiányzó gént a humán homológjával azért, hogy a humán fehérje működését állatokban vizsgálhassuk. Természetesen ez sem képes tökéletesen tükrözni az emberi szervezetben való működését, hiszen továbbra is az állati szervezet környezetében működik az adott humán fehérje. Azonban, ennek ellenére is értékes információkat nyerhetünk az emberi és állati fehérje működése közti faji különbségekről, illetve a gyógyszerkutatásban egy új hatóanyag tesztelése során közelebbi képet kaphatunk arról, amit az humán szervezetben várhatunk a klinikai tesztelések során.

A Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben a kutatócsoportunk érdeklődésének középpontjában áll a fájdalom és gyulladás modulációjában résztvevő Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 (TRPA1) és Szomatosztatin receptor 4 (SST₄) receptorok mechanizmusának vizsgálata. A PhD kutatásom során az ezekhez fűződő aktuális kutatási projektek számára hoztam létre modellorganizmusokat, és teszteltem a transzgén expresszióját és a fehérje működését.

1. Az SST₄ receptor egy ígéretes gyógyszer-célpont a fájdalomcsillapítás és gyulladáscsökkentésben. Az új SST₄ agonista gyógyszerjelölt molekulák preklinikai tesztelésére humanizált SST₄ egerekre volt szükségünk. Erre a célra szomatosztatin receptor 4 génhiányos (*Sstr4* KO) egerekbe bevittük a humán homológ gént (*hSSTR4*). A projektben az első transzgenikus egerek már létrejöttek, mire megkezdtem a PhD munkámat, így én az egerek mélyreható és alapos vizsgálatában tudtam részt venni.
2. A szerves poliszulfidok fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatású TRPA1 agonisták, és ígéretes gyógyszerhatóanyagok. A hatásmechanizmusuk alaposabb megértésére azonosítani akartuk a kötőhelyüket a humán TRPA1 receptoron. Erre a célra PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel számos TRPA1 változatot hoztunk létre, melyekben bizonyos ciszteineket alaninra cseréltünk. A TRPA1 változatokat CHO sejtekben expresszáztattunk, a funkciójukat *in vitro* kísérletekkel vizsgáltuk. A szerves poliszulfidok kötőhelyét annál a mutációnál azonosítottuk, amelyben a szerves poliszulfidok nem tudtak hatást kiváltani - ügyelve arra, hogy ezt ne globális funkcióvesztés okozza, amit pozitív kontroll agonista hatásával ellenőriztünk.
3. Az asztrociták szerepét vizsgáltuk a TRPA1 mediált kuprizon indukált demielinizációban, egy szklerózis multiplex (SM) betegségmodellben. Erre a célra specifikusan üttöttük ki a *Trpal* gént az asztrocita sejtekből Cre-loxP rendszerrel. A loxP helyek közötti *Trpal* génszakasz kivágódott és működésképtelenné vált azokban a sejtekben, amelyekben a Cre-rekombináz expresszáldott. A Cre-rekombináz expresszióját pedig asztrocita specifikus génhez kötöttük (*Gfap*), ezzel biztosítva, hogy csak asztrocita sejtekben történik meg a génkiütés. Az így létrehozott egerekben vizsgáltuk a kuprizon kezeléssel kiváltott demielinizáció jellegzetességeit.

1.2. Fájdalom és gyulladás

A Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség (*International Association for the Study of Pain*, IASP) meghatározása szerint a **fájdalom** a potenciális vagy már létrejött szöveti sérüléshez kapcsolódó kellemetlen érzés. Elkülöníthető a nociceptiótól, mivel a fájdalom nem kizárólag a szenzoros neuronok működéséből adódik, hanem egy komplex szubjektív élmény, amelyet a biológiai, pszichikai és szociális tényezők befolyásolnak. Habár a fájdalomnak elsődlegesen adaptív szerepe van, a krónikus fájdalom káros hatással lehet a testi funkciókra, illetve a szociális és pszichológiai jólétre (1).

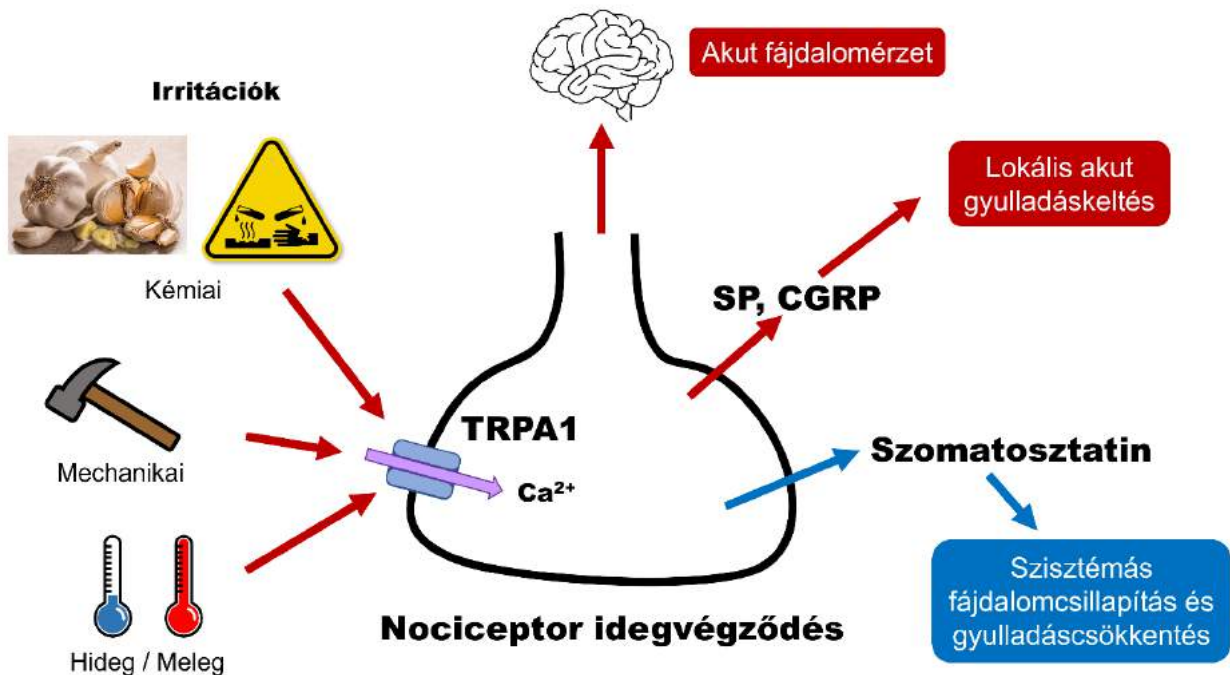
A **gyulladás** egy fontos védekezési mechanizmus, mely során a szervezet felismeri és eltávolítja a káros és idegen stimulust (elsődlegesen kórokozókat), majd megkezdi a gyógyulási folyamatot. A tartós gyulladás azonban káros hatással van a szervezetre, és a legtöbb krónikus degeneratív betegség kulcstényezője (pl. rák, diabétesz, reumatoid arthritisz, allergiás asztma, Alzheimer-kór, szklerózis multiplex) (2). Külön figyelmet igényelnek azok az esetek, amikor maga a gyulladás súlyosabb szöveti károsodást okoz, mint az eredeti stimulus, ilyen például a tuberkulózis, szilikózis, érlemeszesedés, allergia és autoimmun betegségek. Bár számos mechanizmus van a gyulladás megszüntetésére, a természeténél fogva hajlamos egy önfenntartó folyamatot létrehozni, ugyanis a gyulladás szövethárosodáshoz vezethet, a sejtnekrózis pedig serkenti a gyulladást. Így a gyulladás képessé válhat az eredeti stimulus megszűnése után is fennmaradni, és egy el nem múló (*non-resolving*) gyulladást kialakítani (3). A tartós gyulladás kezelése tehát elsődleges a velejáró fájdalom megszüntetésében, a károsodott funkciók visszaállításában, további szövödmények megelőzésében vagy mérséklésében, és a gyógyulási folyamatok akadálytalan működésében.

A krónikus fájdalom és a tartós gyulladás kezelésére használt hagyományos gyógyszerek (pl. opioidok, szteroidok, nem szteroid gyulladáscsökkentők - NSAID) azonban gyakran nem elég hatékonyak, vagy súlyos mellékhatásokat okozhatnak a hosszútávú kezelés során (4–8). Ezért szükséges megismernünk alaposabban ezeket a patomechanizmusoknak, hogy jobb gyógyszercélpontokat azonosíthassunk. Így kerültek a kutatásunk központjába a TRPA1 és SST₄ receptorok, amelyek ígéretes gyógyszercélpontok a krónikus fájdalom és tartós gyulladás kezelésében.

1.3. TRPA1

A **Tranziens Receptor Potenciál Ankirin 1 (TRPA1)** receptor egy nem-szelektív, nátrium és kalcium-áteresztő kation-csatorna, amely túlnyomóan a kapszaicin-érzékeny peptiderg nociceptív primer szenzoros neuronokon expresszálódik, ezen sejtek több, mint 90%-ában lokalizálódik a Transziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (TRPV1) receptorral (4,9,10). A TRPA1 receptor az irritációk széles választékát képes érzékelni, mint például a mechanikai stimulust, szélsőséges hideget és meleget, savas kémhatást, reaktív oxidatív gyököket és a már azonosított agonisták ezreit (**1.1. ábra**) (11). A TRPA1 receptor aktivációja akut fájdalomérzetet vált ki, továbbá gyulladáskeltő neuropeptidek szekrécióját (pl. P anyag, kalcitonin gén-rokon peptid), amely értágulatot és szöveti duzzanatot okoz, elősegítve a neurogén gyulladás kialakulását. Azonban a TRPA1 aktivációt követően a nociceptív idegsejt ellenszabályozást is végez általa, hogy fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő

neuropeptideket is felszabadít, mint a szomatosztatin (12–15). A **szomatosztatin** szisztémás fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását az SST₄ receptor közvetíti (**1.2. ábra**) (16–25).



1.1 ábra: A TRPA1 receptor funkciói. A TRPA1 elsődlegesen a nociceptív szenzoros neuronokon expresszálódik, így a neuron aktiválásával akut fájdalomérzetet vált ki. Továbbá indukálja a gyulladáskeltő neuropeptidek, mint a P anyag (SP), calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) szekrécióját, amivel lokális neurogén gyulladást vált ki. Ugyanakkor kiváltja a szomatosztatin felszabadulását is, ami szisztémás fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki az SST₄ receptoron keresztül.

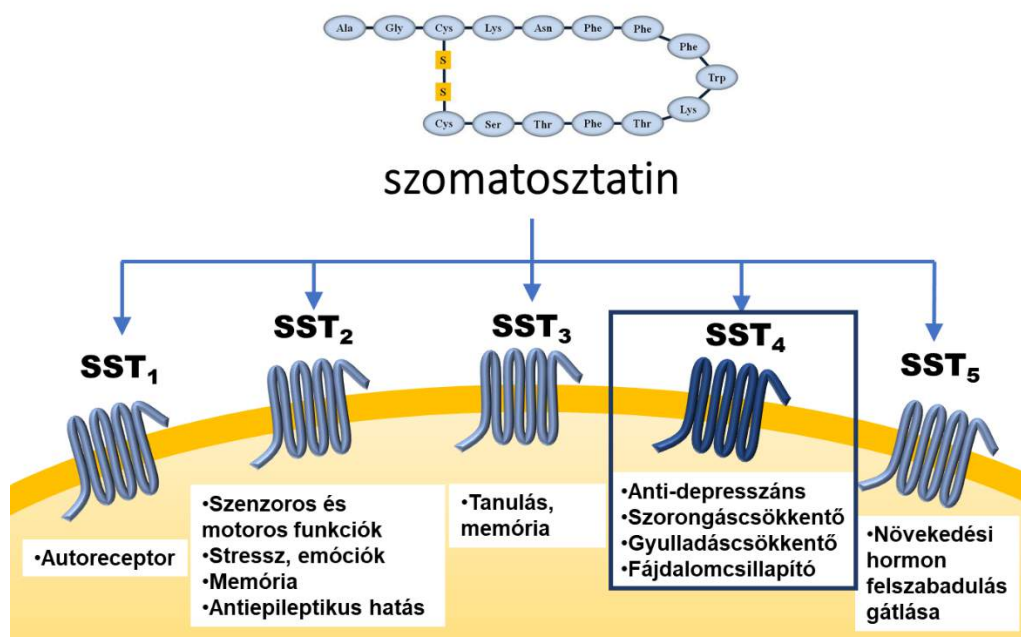
1.4. Szomatosztatin

A **szomatosztatin** egy ciklikus neuropeptid, melynek két izoformája van: SST-14 és SST-28. Gátolja a szekrécióját számos excitatorikus és gátló mediátornak, mint a szomatotropin, glukagon, inzulin, acetilkolin, glutamát és gamma-aminovajsav (GABA) (26). Széleskörű fiziológiai funkciót szabályoz, mint az alvást, motoros aktivitást, emóciókat, tanulást és memóriát; továbbá szerepe van különböző patológiás állapotok szabályozásában, mint a fájdalom és gyulladás (16–25), neurodegeneráció (27–30), szorongás és depresszió (31–34). A központi idegrendszerben találhatóak hosszú nyúlványú és rövid proximális GABA-erg interneuronok, melyek szekretálják a szomatosztatint (35–37). A periférián a kapszaicin-érzékeny peptiderg szenzoros neuronokon figyelték meg a szomatosztatin szekréciót, valamint

a szisztémás gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatását, melyet “szenzokrin” hatásnak neveztek el (1.1. ábra) (38,39).

1.5. Szomatosztatin receptor 4 (SST₄) receptor

A szomatosztatin széleskörű hatásait öt gátló hatású (inhibitor) G_i-protein kapcsolt receptor közvetíti, melyek az SST₁-SST₅ jelölést kapták (1.2. ábra). Ezeket a receptorokat két csoportra oszthatjuk, a SRIF₁-be tartozik az SST₂, SST₃ és SST₅, ezeket specifikusan aktiválja az oktreotid, míg a SRIF₂-be tartozó SST₁ és SST₄ receptorokat a CGP 23996 agonista aktiválja specifikusan (40–42). A kutatócsoportunk korábbi eredményei bizonyítják, hogy az SST₄ receptor aktivációja fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő, szorongáscsökkentő és antidepresszáns hatást vált ki más hormonok szekréciójának befolyásolása nélkül (16–25,27–34,38,39,43,44). Így vált az SST₄ receptor egy ígéretes új gyógyszercélponttá, és az utóbbi időben számos gyógyszerceg elindította az SST₄ agonisták fejlesztését (45–51). Az SST₄ receptornak nincs ismert antagonistája, így ez idáig *in vivo* funkcionális vizsgálataihoz *Sstr4* knockout állatokat használtunk negatív kontrollként (15,20–22,45).



1.2. ábra: A szomatosztatin az 5 tagú receptoreszaládon keresztül fejti ki széleskörű hatásait. Ezek közül az SST₄ receptor közvetíti a szomatosztatin fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásait, de endokrin hatásait nem.

2. Szomatosztatin receptor 4 (SST₄) humanizált egér létrehozása és az expresszió karakterizálása

2.1. Bevezetés

Számos kutatás folyik - köztük az intézetünkben is - az SST₄ funkcióinak vizsgálatára. Mivel nincs ismert SST₄ specifikus antagonistá, ezért a korábbi kutatásaink során *Sstr4 knockout* és vad típusú egereket használtunk (15,20–22,45). Az *Sstr4* KO egérmodell és a szintetikus SST₄ receptor agonista J-2156 vizsgálatával kapcsolatban számos kutatócsoport, köztük a mi intézetünk is igazolta, hogy az SST₄ receptor egy egyedi és újszerű gyógyszer-célpont lehet a krónikus fájdalom és a depresszió kezelésére (16,24,52–56). Ezen kórképek kezelésére használható jelenlegi gyógyszerek gyakran nem elég hatásosak és súlyos mellékhatásokat okoznak a hosszútávú kezelés során (4–8). Így került a gyógyszerfejlesztés érdeklődésének középpontjába az SST₄ receptor, és a gyógyszergyárak már számos nem-peptid SST₄ agonista fejlesztésébe kezdtek (51,54). Az agonisták tervezését jelentősen segítette a humán receptor szerkezetének *in silico* 3D modellezése (57,58).

Célunk volt ezeket az új agonistákat (J-2156 és pirrolo-pirimidin származékok) SST₄ humanizált egereken tesztelni. A humán receptort expresszáló egérmodell kifejezetten hasznos a transzlációs gyógyszerkutatásban, mivel jobban előremutató eredményeket adhat a humán betegségekkel kapcsolatban és relevánsabb modellállat a gyógyszerjelölt anyagok tesztelésében (59,60). Humanizált egereket túlnyomóan humán sejtek, szövetek vagy tumorok beültetésével hoznak létre, főleg immunológiai és onkológiai kutatási célokra (61–66), de a genetikai módosítás is egyre gyakrabban választott módszer (67–70). Genetikai módosítással már sikeresen kicserélték az egér bradikinin B₁ receptor génjét a humán megfelelőjével, hogy az *in vitro* eredmények után az NVP-SAA164 humán B₁ receptor specifikus antagonistát *in vivo* is teszteljék. Az NVP-SAA164 anti-hiperalgézias hatást váltott ki a humanizált egerekben, de a WT és a KO egerekben nem (71). Egy másik kísérletben különbséget találtak az egér és a humán melanokortin receptorok között az MC1R humanizált egerek használatával, mint például az erősen ligandfüggő eumelanogenezis a humanizált egérben. Ezzel szemben az egér Mc1r receptor a WT egérben *in vivo*, továbbá transzfektált sejtvonalakban az egér és humán receptor is ligandfüggetlen szignalizációt mutatott (72). Ezek is bizonyítják, hogy az *in vitro* és *in vivo* körülmények között a fehérjék eltérő működéséről a humanizált modellállatok értékes információkkal szolgálhatnak.

2.2. Célkitűzés

Az SST₄ expresszió és funkció viszonylag jól karakterizált az egeragyban (73), de a humán receptorról még keveset tudunk. Ezért a célunk volt, hogy olyan humanizált egeret hozzunk létre transzpozon vektorral, mely tartalmazza az humán *hSSTR4* gént a szabályozó elemeivel együtt, majd ennek a random inszerciós helyeit feltérképezzük, karakterizáljuk az expresszióját (mintázatát és szintjét), azonosítsuk az expresszáló idegsejt típusokat az agyban, és kiválasszuk a további funkcionális kísérletekre legalkalmasabb transzgenikus egérvonalat.

2.3. Anyag és módszer

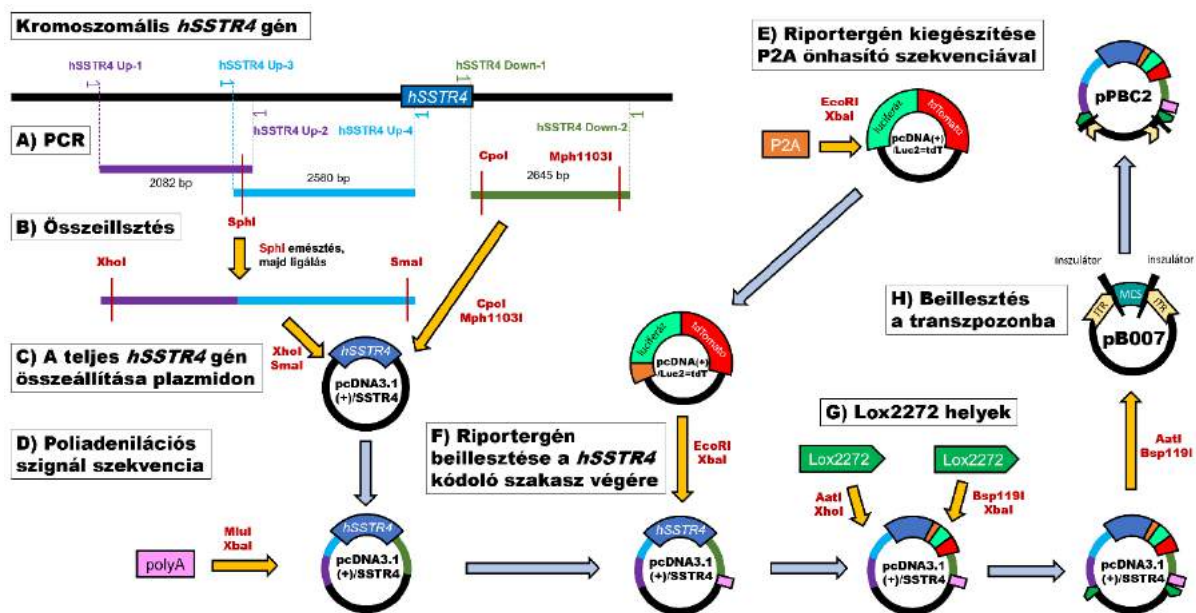
2.3.1. PiggyBac transzpozon vektor tervezése és létrehozása

Témavezetőm, Dr. Sándor Zoltán tervezte meg és hozta létre a pPBC2 plazmid vektort egy sok lépcsős molekuláris genetikai szerkesztéssel.

Előzetes vizsgálatként 5 különböző riporter fehérjét kifejező plazmid konstrukciót készítettünk, melyekben a különálló luciferáz, mCherry, tdTomato fehérjéket és a luciferáz-mCherry és luciferáz-tdTomato fúziós fehérjéket egyformán a citomegalovírus (CMV) promóter hajtotta meg. 1-1 µg plazmidot kínai hörcsög petefészek epitél sejtekbe (RRID: CVCL_0213) transzfektáltunk TurboFect (*ThermoFisher Scientific, USA*) transzfekciós reagens segítségével 24 lyukú lemezen. A lumineszcens és fluoreszcens jelet *In vivo* optikai képalkotó rendszer (*In Vivo Imaging System - IVIS*) Lumina III (CLS136334, *PerkinElmer*) segítségével detektáltuk (2.1. melléklet ábra).

A *hSSTR4* vektor létrehozásában elsőként két polimeráz-lánreakcióval (PCR) amplifikáltuk a humán genomi DNS *hSSTR4* kódoló szakasz előtti (*upstream*) 4 kb méretű régióját, mely a promótert és feltételezhetően minden más szabályozó elemet tartalmaz (2.1.A ábra). Minden PCR-t Taq DNS polimeráz enzimmel (M0273, *New England Biolabs*) végeztünk. Minden primer a Mellékletben megtalálható (2.1. melléklet táblázat). Az első, 2082 bp méretű fragmentet a *hSSTR4* Up-1 *forward* primerrel és a *hSSTR4* Up-2 *reverse* primerrel amplifikáltuk (2.1.A ábra). A második, 2580 bp méretű fragment, amely a *hSSTR4* kódoló szakasz elejét és a közvetlen előtte elhelyezkedő *upstream* régiót tartalmazza, a *hSSTR4* Up-3 *forward* primerrel és a *hSSTR4* Up-4 *reverse* primerrel amplifikáltuk (2.1.A ábra). A két PCR fragmentet az átfedő szakaszon tartalmazott SphI restriktív endonukleáz felismerési helyénél (GCATG/C) hasítottuk, majd T4 ligáz enzimmel kapcsoltuk össze őket (2.1.B ábra). Az így kapott DNS fragmentet a végeinél XhoI és SmaI restriktív endonukleázokkal emésztettük, mely

után az *upstream* régióból 3968 bp méretű szakasz és a *hSSTR4* gén kódoló szakaszának továbbra is az eleje maradt. Ezt a teljes *upstream* régiót kapcsoltuk a pcDNA3.1(+)/*SSTR4* (Cat# SSTR400000; Guthrie Research Institute, Sayre, Pennsylvania, USA) plazmidból származó teljes *hSSTR4* kódoló szakaszához, melyet szintén a XhoI és SmaI enzimekkel az egyedi hasítóhelyeiknél emésztettük előzetesen (**2.1.C ábra**). A kódoló szakaszt követő (*downstream*) 2645 bp hosszúságú genomi régiót a *hSSTR4* Down-1 *forward* primerrel és a *hSSTR4* Down-2 *reverse* primerrel amplifikáltuk PCR technikával (**2.1.A ábra**), majd CpoI és Mph1103I emésztést követően ligáltuk a *hSSTR4* kódoló szakasza végére (**2.1.C ábra**). A poliadenilációs szignál szekvenciát (polyA) kódoló DNS szakaszt mesterséges oligonukleotidként szintetizáltattuk, majd MluI és XbaI emésztést követően ligáltuk a *hSSTR4* gén végére a pcDNA3.1(+)/*SSTR4* plazmidon (**2.1.D ábra**). A P2A önhasító peptid szekvenciát kódoló DNS szakaszt hordozó szintetikus oligonukleotidot az EcoRI és XbaI emésztést követően a luciferáz-tdTomato fúziós riporter fehérjét kódoló DNS szakasz elé illesztettük a pcDNA(+)/Luc2=tdT (Cat#32904; Addgene, Watertown, Massachusetts, USA) plazmidon (**2.1.E ábra**). A P2A-Luciferáz-tdTomato konstruktot KpnI és NotI emésztést követően ligáltuk a *hSSTR4* kódoló szakasz végére a pcDNA3.1(+)/*SSTR4* plazmidon (**2.1.F ábra**). A Lox2272 helyeket (Cre rekombináza felismerőhelyek) kódoló DNS szakaszt mesterséges oligonukleotidként szintetizáltattuk, majd a *hSSTR4* transzgén mindkét végére illesztettük azonos irányba (azért, hogy a Cre irányított rekombináció deléciót eredményezzen, ha később kondicionális *knockout* (cKO) egérvonalat szeretnénk létrehozni). A Lox2272 linkert a *hSSTR4* transzgén 5' végére AatI és XhoI, a 3' végére pedig Bsp119I és XbaI emésztést követően ligáltuk (**2.1.G ábra**). Végül, a teljes transzgén konstruktot AatI és Bsp119I emésztést követően ligáltuk a pB007 PiggyBac vektor (Ref# SPB-007; Transposagen, Lexington, Kentucky, USA) *multiple cloning site* (MSC) szakaszába, amelyet mindkét oldalról inszulátorok és a transzpozon specifikus inverz terminális ismétlődő szakaszai (ITR) vettek közre (**2.1.H ábra**). Az eredményül kapott plazmid a pPBC2 nevet kapta, ezt használtuk a transzgenézishez (**2.1.H és 2.2.B ábra, utóbbit lásd a 2.4.1. eredményeknél**). A végső termék a kódoló szakaszon 4 darab nagyon gyakori SNP-t tartalmazott a humán *SSTR4* referencia szekvenciához képest (74), ezek az rs3746726 850T>G, rs2567609 897T>C, rs3746728 924C>T és rs2567608 962T>C voltak.



2.1. ábra: A *hSSTR4* transzgén hordozó PiggyBac transzpozon vektor összeállítása. A humán *hSSTR4* gén szabályozó elemeit tartalmazó *upstream* és *downstream* szakaszait PCR-ral amplifikáltuk kromoszomális DNS-ről (**A**). Az *upstream* szakasz két fragmentjét *SphI* enzimmel emésztettük, majd T4 ligázzal összekapcsoltuk (**B**). A PCR termékeket a *hSSTR4* kódoló szakaszát tartalmazó pcDNA3.1(+)/SSTR4 plazmidba illesztettük (**C**). A poliadenilációs szignál szekvenciát (polyA) a *hSSTR4* gén végére illesztettük (**D**). A P2A önhasító peptid szekvenciát kódoló DNS szakaszt a luciferáz-tdTomato fúziós riporter fehérjét kódoló pcDNA(+)/Luc2=tdT plazmidba illesztettük, a kódoló szakasz elejére (**E**). A P2A-luciferáz-tdTomato kódoló szakaszt a *hSSTR4* kódoló szakaszának végére illesztettük (**F**). A *hSSTR4* végeire egy-egy Lox2272 helyet illesztettünk azonos orientációban (**G**). Végül a *hSSTR4* transzgén konstruktot beillesztettük a pB007 transzpozon plazmid *multiple cloning site* (MCS) szakaszába, így a transzgén végeire inszulátorok és a transzpozon fordított terminális ismétlődő szakaszai (ITR) kerültek (**H**). Az ábrán a szaggatott vonalak a meghatározott PCR primerekkel amplifikált szakaszok határait jelöltük. Piros betűkkel az adott lépésben használt restriktív endonukleáz enzimeket jelöltük. A sárga nyilakkal jelöltük azokat a lépéseket, ahol a megnevezett enzimekkel hasítottuk mind a donor, mind az akceptor DNS-t, ezt követően pedig T4 ligáz enzimmel összekapcsoltuk őket. Kék nyilakkal jelöltük az adott lépéseket követően létrejött DNS konstruktokat.

2.3.2. Kísérleti állatok és etikai engedély

A transzgenézist az általunk biztosított pPBC2 vektorral és PiggyBac fehérjét kódoló mRNS-el a *Biotalentum Kft.* (Gödöllő, Magyarország) végezte. A transzgenézishez használt kiindulási egerek *Sstr4* KO (B6.129P2-Sstr4^{tm1Szo}, RRID: MGI:4355995) voltak, amelyek eredetileg Prof. Dr. Pierce C. Empson kutatócsoportjától (*Laboratory of Molecular*

Neuroscience, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Babraham, Cambridge CB22 3AT, Egyesült Királyság) származtak (16,20,21). Ezeknek az *Sstr4* KO genotípusú egereknek a zigótáit és álterhes nőstényeit használták a transzgenezishez, majd ugyanilyen hímeiket a létrejött transzgenikus egerek korai tenyésztéséhez. A transzgenezist követően különböző egérvonalakat hoztunk létre, amelyek a genomjukban különböző helyen hordozzák a transzgén egy-egy kópiáját. A létrehozott humanizált SST₄ expresszáló egérvonal a B6.129P2-*Sstr4*^{tm1Szo}-TgTn(pb-*SSTR4*-P2A-luc-tdTomato)1Szo nevet kapta, amely a transzgént a hármas kromoszómán hordozza (Chr3 jelölés). Az állatkísérletekhez a létrehozott transzgenikus egerek mellett az *Sstr4* KO és *Sstr4* WT (C57BL/6J, RRID: IMSR_JAX:000664, *The Jackson Laboratory*, USA) hím egyedeket használtunk kontrollként.

Az állatok a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet állatházában tenyésztettük és tartottuk, 22±2 °C hőmérsékleten és 12 órás világos-sötét napi ciklusban (világítást 6:00-tól 18:00-ig kaptak). Az állatokat 3-7 fős csoportokban, standard polikarbonát ketrecekben tartottuk faforgács almon. Standard kemény tápot és vizet kaptak *ad libitum*.

A tanulmány a tudományos célokra használt állatok védelméről szóló európai jogszabályok (2010/63 / EU irányelv) és a Magyar Kormányrendelet (40/2013., II. 14.) szerint készült. A projektet a Pécsi Tudományegyetem Állatvédelmi Bizottsága, az Országos Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság és a Baranya Megyei Kormányhivatal engedélyével végeztük (engedélyszám: BA02/2000-10/2019). Igyekeztünk a kísérlet elvégzéséhez szükséges legkisebb állatszámot használni, és a kísérletbe bevont állatok szenvedését minimálisra csökkenteni.

2.3.3. Transzgenezis

A transzgenezist a *BioTalentum Kft.* (Gödöllő, Magyarország) végezte a kutatócsoportunk megbízásából. A *hSSTR4* transzgén vektort (pPBC2) és a szuper PiggyBac transzpozáz mRNS-t (Ref# SPB-003; *Transposagen*, Lexington, Kentucky, USA) együtt mikroinjektálták *Sstr4* KO egér eredetű 56 darab zigóta sejtmagjába (2.2.A ábra, lásd a 2.4.1. eredményeknél), amiket utána álterhes *Sstr4* KO egerekbe ültettek (2.2.B ábra). Három alomból összesen 16 egér született (2.2.C ábra), amiket elsőként PCR technikával genotipizáltak, hogy hordozzák-e a *hSSTR4* transzgént, de ne hordozzák a vektor beépülésre nem kívánatos maradék részt, a *backbone*-t. A *hSSTR4* 3' régiójához a TR1 *forward* primert és TR2 *reverse* primert használták, ami 883 bp méretű PCR terméket eredményezhetett. A *hSSTR4* 5' régiójához a TR ST4 3

forward primert és a TR ST4 4 *reverse* primert használták, ami 717 bp méretű terméket eredményezhetett. A plazmid replikációs origójához (1. vektor *backbone*) a Cole1Ori-F *forward* primert és a Cole1Ori-R *reverse* primert használták, ami 475 bp PCR terméket eredményezhetett. Az ampicillin rezisztencia génhez (2. vektor *backbone*) a Backbone ctrl Fwd *forward* primert és a Backbone ctrl Rvs *reverse* primert használták, ami 623 bp PCR terméket eredményezhetett. Minden primer megtalálható a Mellékletben **(2.1. melléklet táblázat)**. Standard genotipizáló program a Mellékletben **(2.2. melléklet táblázat)**. A *hSSTR4* transzgén a vektor *backbone* nélkül összesen 3 egér genomjába épült be, mindhárom nőtény volt **(2.2.C ábra)**. Ezek alkották a transzgenikus egerek F0 generációját, és mindegyiket *Sstr4* KO hímekkel párosítva szaporítottunk **(2.2.D ábra)**.

Megjegyzés: PhD képzésem az F0 egerek megszületése után kezdődött meg, így a projektnek a további részében tudtam részt venni a munkámmal.

2.3.4. Ligálás-mediált PCR (LM-PCR)

Én végeztem a ligálás mediált PCR technikát, Dr. Sándor Zoltán ellenőrzésével.

Bryda és mtsai. (75) által leírt protokollt és az Y-linker szekvenciát használtuk. A genomi DNS-t az egerek fark szövetmintáiból vontuk ki a Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit (*F-170, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) készlet használatával. Az LM-PCR első lépéseként 3' túlnyúló véget eredményező emésztést végeztünk a DNS mintákon külön reakcióban egy-egy restriktív endonukleázzal: *TaiI*, *PstI* és *HhaI* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) a gyártói előírásoknak megfelelően. A *hSSTR4* transzgén mindkét végére 3-3 *nested* PCR primert terveztünk PrimerBLAST (*RRID: SCR_003095, (76)*) program segítségével. Minden primer megtalálható a Mellékletben **(2.1. melléklet táblázat)**. A *nested* PCR primerek a transzgénből kifelé irányú szintézist tesznek lehetővé, hogy lehetőleg a környező kromoszomális szekvenciából is tartalmazzon az emésztésből keletkező fragment, majd a másik végére kapcsolhassuk a Y-linkert, ami a fordított irányú primerek felismerő helyeit hordozza. A primerek sorrendje (a *nested* PCR-nak megfelelően) a transzgén megfelelő végétől legtávolabbi primer volt az első, míg a legközelebbi volt a harmadik. Az 5' vég specifikus primerek: az LM-V1B, LM-V2B és LM-V3B, míg a 3' vég specifikus primerek: LM-V1, LM-V2 és LM-V3 voltak. Az Y-linkert két, részben komplementer, mesterségesen szintetizált oligomer DNS fragment alkotja: az Y-linker A és az Y-linker E (75). Az Y-linker specifikus *nested* PCR primerek az Y-linker primer D és az Y-linker primer G voltak. Minden primert és az Y-linkert az *Integrated DNA Technologies (IDT; Coralville, IA, USA)* szintetizált

meg nekünk. Az Y-linker A és az Y-linker E fragmentek *annealing*-jével lett mindig frissen létrehozva az Y-linker az LM-PCR-hoz. Az első, egy ciklusos LM-PCR programot (**2.3. melléklet táblázat**) az egy-egy enzimmel (T*ai*I, P*st*I vagy H*ha*I) emésztett DNS-en végeztük el, külön reakcióban az 5' végen az LM-V1B primerrel (*annealing*: 45 °C), és külön a 3' végen az LM-V1 primerrel (*annealing*: 60 °C). Első PCR program: denaturáció 98 °C 10 perc; *annealing* primerfüggő hőmérsékleten 1 perc, elongáció 72 °C 10 perc. Ezt az első PCR programot Taq DNS polimeráz enzimmel (M0273, *New England Biolabs*) végeztük, hogy 5' túlnyúló véget adjon a primerek által felismert DNS fragmenteken, amihez képes kapcsolódni az Y-linker (szemben az emésztés után változatlanul maradt 3' túlnyúló végű DNS fragmentekkel). Az első PCR termékhez ligáltuk az Y-linkert T4 DNS ligáz enzimmel, majd ezt a ligátumot használtuk a két lépcsős *nested* PCR-hoz. A második és harmadik LM-PCR program megtalálható a Mellékletben (**2.4. melléklet táblázat**). A második PCR reakciót az Y-linker primer D és a transzgén végének megfelelő második primert használtuk (5' véghez LM-V2B *annealing*: 50 °C, 3' véghez LM-V2 *annealing*: 60 °C). A második PCR termékét használtuk a harmadik PCR reakcióhoz, amihez az Y-linker primer G és a transzgén végének megfelelő harmadik primert használtuk (5' véghez LM-V3B *annealing*: 50 °C, 3' véghez LM-V3 *annealing*: 60 °C). A második és harmadik PCR-hoz a *Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit* (F-170, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) készletet használtuk. A harmadik PCR végére minden egyes egér DNS mintából 6 darab PCR terméket kaptunk (külön mindhárom enzimnek, és minden enzimnek külön az 5' és 3' vég alapján), melyeket 1% agaróz gélen szeparáltunk elektroforézissel, és minden megjelent sávból izoláltuk a DNS-t *GeneJET Gel Extraction Kit* (*Thermo Scientific*) készlet segítségével. Az izolált DNS fragmentek szekvenálását a *BIOMI Kft. (Gödöllő, Magyarország)* végezte. A kapott szekvenciákat PrimerBLAST (RRID: SCR_003095, (76)) segítségével elemeztük. Az így azonosított lókuszek ellenőrzésére kromoszómaspecifikus (a transzgén inszerciós helyének közelében) primereket terveztünk az LM-V3 primerrel szemben: ChrXpr1 az X kromoszómához; Chr3pr2 a 3-as kromoszómához; Chr10pr2 a 10-es kromoszómához. A Chr3 *hSSTR4* transzgenikus egereket már rutinszerűen genotipizáljuk az LM-V3 *forward* primerrel, a Chr3pr2 *reverse* primerrel, és egy második, a Chr3pr3 *forward* primerrel. A reakció 527 bp méretű PCR terméket eredményez a vad típusú 3-as kromoszóma esetén, és 683 bp méretű PCR terméket eredményez a *hSSTR4* transzgén inszerciója esetén, ami lehetővé teszi a Chr3 *hSSTR4* homozigóta és heterozigóta egerek könnyű megkülönböztetését (**2.2.D ábra, lásd a 2.4.1. eredményeknél**). Mindhárom PCR program: kezdeti denaturáció 98 °C 5 perc; majd 20 ciklus: (1.) denaturáció 98 °C 30 mp,

(2.) *annealing* primerfüggő hőmérsékleten 30 mp, (3.) elongáció 72 °C 1,5 perc; a 20 ciklus után egy végső elongáció 72 °C 10 perc.

Az azonosítatlan U1 és U2 egerek LM-PCR alapú genotipizálását megismételtük külön-külön AatII, BbsI, DraIII, Eam1105I, HhaI, KpnI, PstI, SacI, SfiI, TaiI és XcmI (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) emésztéssel.

2.3.5. Inverz PCR

Én végeztem az inverz PCR technikát, Dr. Sándor Zoltán ellenőrzésével.

A genomi DNS az U1 és U2 egerek fark szövetmintáiból vontuk ki a *Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit (F-170, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)* készlet használatával. A DNS mintákat PstI és SnaBI (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) tompa végekkel hasító restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztettük külön-külön és együttesen is. Az emésztett mintákat 1x, 10x, 100x és 1000x-es hígításokban használtuk ligálásra, amit T4 ligázzal (*EL0012, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) végeztünk. A hígítás és a tompa DNS végek ugyanis csökkentik az intermolekuláris kapcsolódást. A ligátumot 3 lépéses *nested PCR*-nak vetettük alá, melyhez a *Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit (F170L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)* készletet használtuk. Minden primer megtalálható a Mellékletben **(2.1. melléklet táblázat)**. Az első PCR lépéshez az LM-V1 és LM-V1B primereket használtuk (*annealing*: 45 °C). Az első PCR termékeit használtuk a második PCR lépéshez az LM-V2 és LM-V2B primerekkel (*annealing*: 52 °C). A második PCR termékeit használtuk fel a harmadik PCR lépéshez az LM-V3 és LM-V3B primerekkel (*annealing*: 52 °C). Minden PCR terméket 1% agaróz gélen szeparáltunk elektroforézissel, és minden megjelent sávból izoláltuk a DNS-t *GeneJET Gel Extraction Kit (K0692, Thermo Scientific)* készlet segítségével. Az izolált DNS fragmentek szekvenálását a *BIOMI Kft. (Gödöllő, Magyarország)* végezte. A kapott szekvenciákat PrimerBLAST (*RRID: SCR_003095, (76)*) segítségével elemeztük.

2.3.6. Luciferáz és tdTomato in vivo képzés

Az IVIS méréseket Dr. Bölcsei Kata végezte, Dr. Sándor Zoltán és az én segítségével.

A luciferáz *in vivo* képzéséhez 6-8 hetes hím és nőstény *Sstr4* WT és KO, *hSSTR4* transzgenikus Chr3, ChrX, U1 és U2 egereket használtunk. Az állatokat 300 mg/kg i.p. D-luciferin nátriumos sóval (*Goldbio, St. Louis, MO, USA*) kezeltük és ketamin-xylozin (100 és 5 mg/kg) keverékkel altattuk. Az állatok pigmentált bundáját egy elektromos borotvával nyírtuk

le, hogy ne akadályozza a képalkotást. A biolumineszcens képalkotás 30 perccel a D-luciferin injektálása után végeztük IVIS Lumina III (CLS136334, PerkinElmer) képalkotó rendszerben a következő beállításokkal: expozíciós idő: 5 perc; 4-es *binning*. A biolumineszcens jel mérése a *total fluxus* (fotonszám/s) egyenlő méretű területen (ROI) a fejtetőn, ami teljesen magába foglalta az agyat. A tdTomato natív fluoreszcenciájának mérésére szintén az IVIS Lumina III (CLS136334, PerkinElmer) képalkotó rendszert használtuk. A tdTomato detekciójához 500, 520, 540 és 560 nm-es filtereket használtunk spektrum szétválasztásra (*spectral unmixing*) és egy 620 nm-es emissziós filtert, továbbá automatikus expozíciót és 2-es *binning*-et használtunk. A képalkotás után az állatokat egy alulról melegített dobozba helyeztük és felügyeltük az életfunkcióikat az ébredésig.

2.3.7. tdTomato mikroszkópia

Az egerek perfúzióját, agyminták izolálását és fixálását, szövetmetszetek preparálását Dr. Aczél Timea, a mikroszkópos képek kiértékelését Dr. Bölcskei Kata végezte.

Az *in vivo* képalkotásban használt egerekből genotípusonként (WT, KO, Chr3, ChrX, U1 és U2) két-két állatot a képalkotást követően mélyaltattunk uretánnal (2,4 g/kg i.p.) és transzkardiálisan perfundáltuk 4%-os paraformaldehiddel (Millonig-féle foszfát pufferben oldva). Az izolált agymintákat 24 óráig posztfixáltuk 30%-os szukróz oldatban (1x PBS pufferben) szobahőmérsékleten, majd kimostuk 1x foszfáttal pufferelt sóoldattal (*phosphate-buffered saline* - PBS) és VT1000S (Leica Biosystems, Németország) vibrációs mikrotómmal lemetszettük 30 µm-es rétegvastagságú metszetekre. A metszeteket *Superfrost Ultra Plus* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tárgylemezre vittük fel, szobahőmérsékleten, levegőn szárítottuk 3 órán keresztül. Ezt követően a metszeteket 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) festettük és ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) használatával fixáltuk konfokális mikroszkópozáshoz.

Paxinos és Franklin (77) térképe alapján határoztuk meg az agyterületeket, és fluoreszcens képeket készítettünk a prelimbikus kéregről (PrL), bazolaterális amigdaláról (BLA), primer szomatoszenzoros kéregről (S1), a hipotalamusz ammon-szarv 1. és 2. régiójáról (CA1 és CA2) és a piriform kéregről (Pir) az Olympus Fluoview FV-1000 lézeres beolvasó konfokális mikroszkóppal és a FluoView FV-1000S-IX81 képalkotó szoftverrel (Olympus, Tokió, Japán). A konfokális apertúra 80 µm-re volt állítva. Az analóg szekvenciális szkennelést 40x nagyítású objektív lencsékkel végeztük. Az optikai rétegvastagság 1 µm-re, a képfelbontás 1024 x 1024 pixelre volt beállítva. Az excitációs idő 4 µs / pixelre volt beállítva. Virtuális színeket

választottunk a fluoreszcens szignál megjelenítésére: kék a DAPI és piros a tdTomato. A képeket elmentettük a két csatornáról külön is és egyesített szuperimpozíciójukat is a fluoreszcens jelek kolokalizációjának kiértékeléséhez.

2.3.8. RNAscope

Az RNAscope in situ hibridizációt (ISH) Dr. Kecskés Angéla, Dr. Kormos Viktória és Hegedűs Dániel végezte a segítségével. A konfokális mikroszkópos képalkotást Dr. Gaszner Balázs segítségével végeztük. Én végeztem a nyers képek feldolgozását és kiértékelését.

Az RNAscope ISH-t 3-4 hónapos hím *Sstr4* KO és *hSSTR4* Chr3 homozigóta egereken végeztük (n=4). Az állatokat mélyaltattuk uretánnal (2,4 g/kg), majd transzkardiálisan perfundáltuk 4%-os paraformaldehiddel (Millonig-féle foszfát pufferben oldva). Az izolált agymintákat 72 óráig posztfixáltuk 30%-os szukróz oldatban (1x PBS pufferben) szobahőmérsékleten, majd kimostuk 1x PBS pufferrel és VT1000S (*Leica Biosystems, Németország*) vibrációs mikrotómmal lemetsztük 30 µm-es rétegvastagságú metszetekre. A metszeteket 0,01% Na-azid (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) tartalmú 1x PBS pufferben tároltuk felhasználásig. A metszeteket az RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (*Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA*) készlettel preparáltuk a gyártó által megadott protokoll szerint. A szöveteket előkezeltük 1 v/v% H₂O₂ oldattal (1x PBS-ben) 30 percig, majd mostuk 1x PBS pufferrel. Ezt követően a metszeteket *Superfrost Ultra Plus* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) tárgylemezre vittük fel. Először szobahőmérsékleten, levegőn szárítottuk 3 órán keresztül, majd inkubáltuk 60 °C-on 60 percig. Kétszer 10 perc Milli-Q (MQ) vízben mosás után 4 °C-on inkubáltuk 2 percig 10% semleges pufferelt formalin oldatban (*NBF, Merck KGaA, Darmstadt, Németország*). További háromszor 10 perces MQ vízben való mosás után a metszeteket 37 °C-on 15 percig emésztettük 100 µl 20 mg/ml proteináz K (*EO0491, Thermo Fisher Scientific*) oldatban 200 ml pufferben (0,1 M Tris/HCl, pH=8; 50 mM EDTA, pH=8). MQ vízzel mostuk, majd a metszeteket 10% NBF oldattal kezeltük 4 °C-on 2 percig, majd újra mostuk háromszor 10 percig MQ vízben. A metszeteket hibridizáltuk humán *SSTR4* vagy egér *Sstr4*, továbbá egér vezikuláris glutamát transzporter 1 (*Vglut1*) és glutamát-dekarboxiláz 1 (*Gad1*) mRNS specifikus RNAscope probe-okkal. A kontroll metszeteket az egér 3-plex pozitív vagy negatív RNAscope probe-okkal hibridizáltuk. A szignál amplifikációt, a csatorna kialakítását és a fixálást a gyártó által megadott protokoll szerint végeztük. A metszeteket DAPI-val is megfestettük, majd *ProLong Diamond Antifade Mountant* (*Thermo Fisher Scientific*) használatával fixáltuk a konfokális mikroszkópos képalkotáshoz. *Paxinos és*

Franklin (77) térképe alapján határoztuk meg az agyterületeket, és fluoreszcens képeket készítettünk a PrL, BLA, S1, CA1, CA2, Pir agyterületekről az *Olympus Fluoview FV-1000* lézeres beolvasó konfokális mikroszkóppal és a *FluoView FV-1000S-IX81* képalkotó szoftverrel (*Olympus, Tokió, Japán*). A konfokális apertúra 80 µm-re volt állítva. Az analóg szekvenciális szkennelést 40x nagyítású objektív lencsékkel végeztük (NA: 0,75). Az optikai rétegvastagság 1 µm-re, a képfelbontás 1024 x 1024 pixelre volt beállítva. Az excitációs idő 4 µs / pixelre volt beállítva. Virtuális színeket választottunk a fluoreszcens szignál megjelenítésére: kék a DAPI, zöld a fluorescein (*Vglut1* mRNA), piros a Cyanine 3 (*hSSTR4* vagy *mSstr4* mRNA), és a fehér a Cyanine 5 (*Gad1* mRNA). Képeket elmentettük a két csatornáról külön is és egyesített szuperimpozíciójukat is a fluoreszcens jelek kolokalizációjának kiértékeléséhez.

2.3.9. Reverz transzkripció kuantitatív PCR (RT-qPCR) szerv és agyterület specifikus expresszió mérésére

Az egerek szervmintáinak izolálását Dr. Bölcskei Kata, Dr. Sándor Zoltán és Dr. Szentes Nikolett végezte a segítségével. Az RNS izolációt én végeztem Dr. Szentes Nikolett és Draskóczy Lilla Gréta segítségével. Az RT-qPCR-t és az eredmények kiértékelését én végeztem Dr. Sándor Zoltán és Dr. Bölcskei Kata ellenőrzésével.

A teljes RNS tartalmat vontuk ki egér *Sstr4* WT és KO, továbbá humán *SSTR4* Chr3, U1 és U2 hím egerek következő szerveiből: *bulbus olfactorius* (BO, szaglóhagyma), agy, bél, máj, lép, tüdő, vese, szív, ondóvezeték, gyomor és trigeminális ganglionok (TRG). A totál RNS izolálást TRI Reagens és *Direct-Zol RNA isolation kit* (R2053, Zymo Research, Irvine, CA, USA) használatával a gyártói protokoll szerint. A minták RNS koncentrációját NanoDrop 2000 (ND-2000, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA) spektrofotométerrel mértük meg. A minták DNS tartalmát a DNáz I (R2053, Zymo Research, Irvine, CA, USA) enzimmel teljesen lebontottuk. Az RNS minták reverz transzkripcióját a *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (K1642, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) készlet használatával végeztük. A DNáz I emésztéshez szükséges inkubálást, majd a DNáz I enzim inaktiválását, és az egy ciklusos reverz transzkripció PCR reakciót a *Biometra TAdvanced Twin 48/48 G³* (846-2-070-2xx, Analytik Jena, Németország) használatával végeztük. Kvantitatív PCR-t az *Applied Biosystems Quantstudio5* (RRID:SCR_020240, Applied Biosystems, USA) kvantitatív PCR gép használatával végeztük. Minden reakció 20 ng komplementer DNS (cDNS) mintát, 1 µM-t mindkét primerből, 1x *Luminaris Color HiGreen*

Low ROX qPCR Master Mix (K0374, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) reakciókeveréket tartalmazott, továbbá mindegyik mintát 20 µl reakciótérfogatra egészítettük ki megfelelő mennyiségű nukleázmentes desztillált víz hozzáadásával. A *hSSTR4* mRNS amplifikálását a *hSSTR4* új F *forward* primerrel: TGG AAG GTG CTG GAG GT; és a *hSSTR4* új R *reverse* primerrel: GTT CTG GTT GCA GGG CTT végeztük. A kvantitatív PCR során referencia génnek a kutató csoportunk által hosszú ideje használt (14), az egér szövetmintákban stabilan expresszálódó béta-aktin (*Actb*) háztartási gént választottuk, amely amplifikálásához az Mm.PT.53. 31778008 *qPCR assay* primereket használtuk. A minták szennyeződés mentességének ellenőrzésére vizes kontrollt használtunk, amely nem tartalmazott cDNS mintát. A valós idejű qPCR a következő kondíciókkal volt végrehajtva: 95 °C 10 percre, majd 40 ciklus során 95 °C 30 másodpercre, 60 °C 30 másodpercre és 72 °C 1percre (ezután kezdődött újra a ciklus). Minden reakciót duplán végeztünk el. A szignál specificitást az olvadási görbe analízissel ellenőriztük. A relatív expressziós arányt a ΔCt módszerrel számoltunk ki, amit $2^{-\Delta Ct}$ képlettel linearizáltunk, mely számításokban a *hSSTR4* gén expresszióját az *Actb* referencia génhez viszonyítottunk. Az így kapott normalizált eredményeket *GraphPad Prism 8 (RRID: SCR_002798)* szoftverrel értékeltük ki.

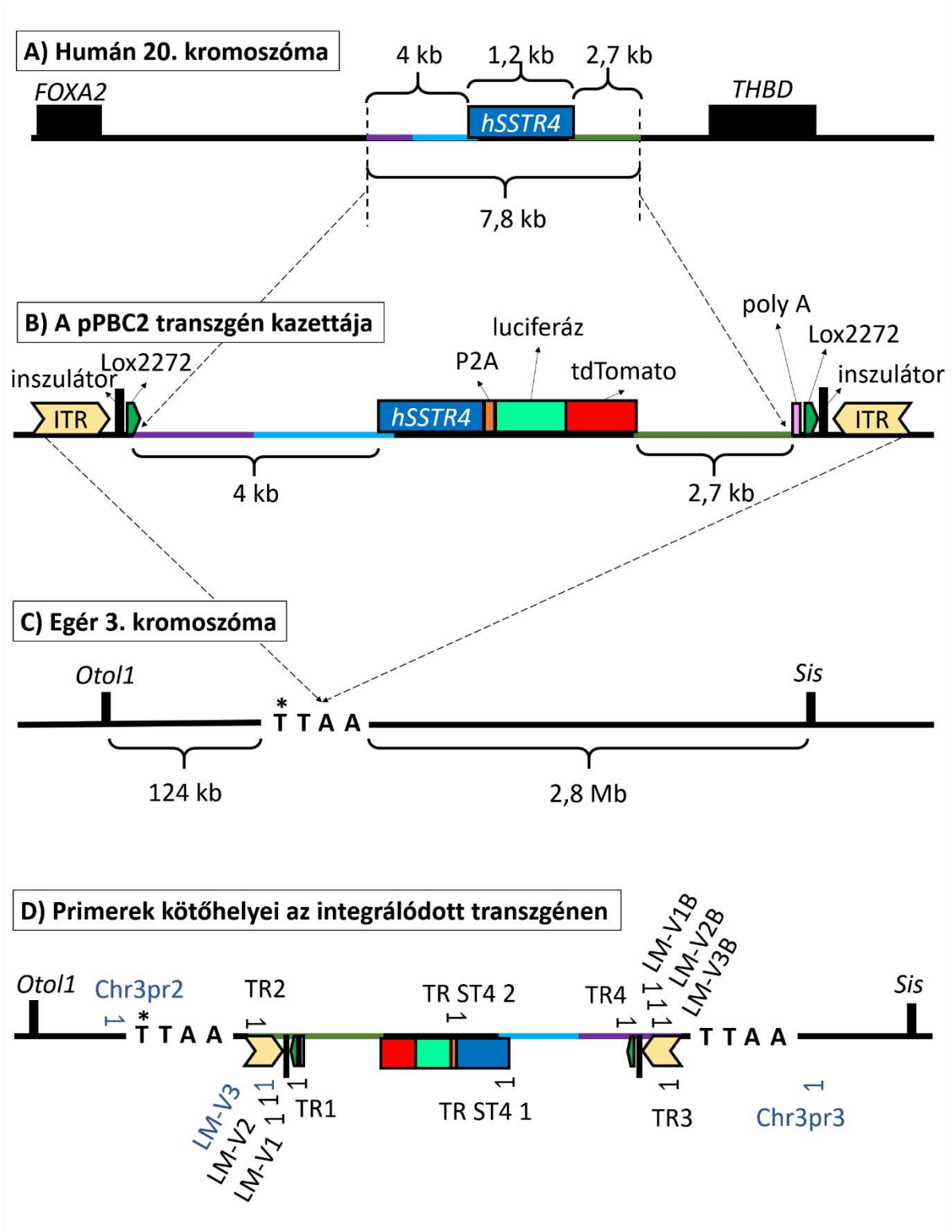
2.4. Eredmények

2.4.1. Vektorkészítés és transzgenezis

A végső pPBC2 plazmid tartalmazta a teljes *hSSTR4* gént 4 kb *upstream* és 2,7 kb *downstream* régióval együtt a 20. humán kromoszómáról, hogy minden ismert szabályozó elemet magába foglaljon (2.2.A ábra). A *hSSTR4* kódoló szakaszának végére a luciferáz és tdTomato riporter fehérjék kódoló szekvenciáját illesztettük, amelyek a P2A önhasító szekvenciával vannak elválasztva, így a receptortól külön, fúziós fehérjeként transzlálódnak, ezáltal a receptor funkcióját nem zavarják. A *downstream* régió végére egy poliadenilációs szignál szekvenciát (polyA) inszertáltunk a transzkripció terminálására. Az egész transzgen kassetta mindkét végén hordoz *Lox2272 Cre* rekombinááz felismerőhelyeket a kondicionális KO kialakításának lehetőségére; inszulátor szekvenciákat a pozíció effektus inhibíciójáért; és a PiggyBac (PB) transzpozon inverz terminális ismétlődő szekvenciáit (ITR), amelyek a PB transzpozáz enzim specifikus felismerő helyei (2.2.B ábra).

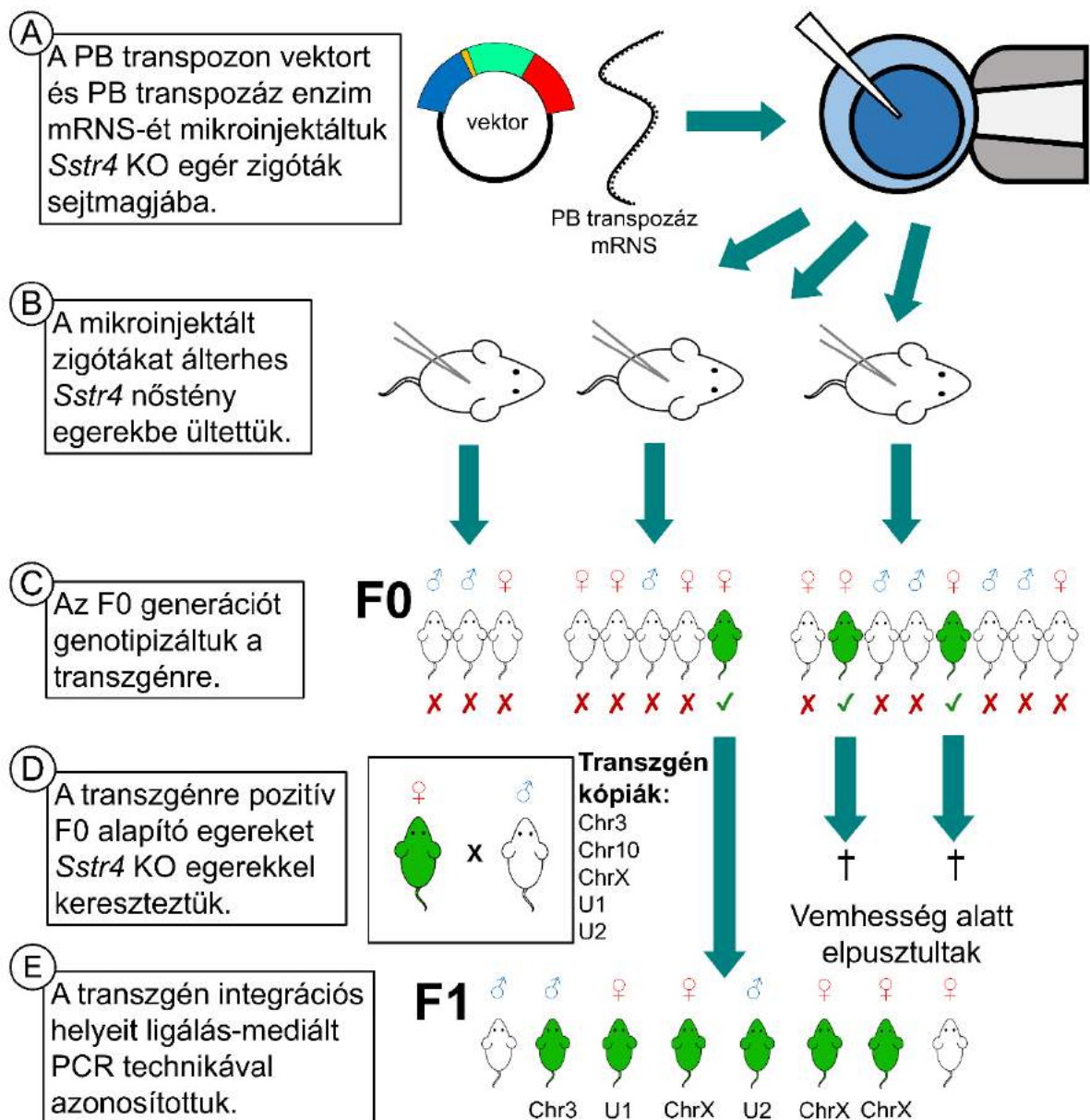
A vektort szekvenálással ellenőriztük, majd 56 darab *Sstr4* KO egér zigótába injektáltuk a PB transzpozáz enzim mRNS-ével együtt (2.3.A ábra). Az injektálást követően a zigótákat 3

darab álterhes *Sstr4* KO egérbe ültettük **(2.3.B ábra)**. Az F0 generációban 16 egér született, melyek közül 3 nőstény hordozta a hSSTR4 transzgént a vektor *backbone* nélkül **(2.3.C ábra)**. Ezeket a nőstényeket visszakereszteltük *Sstr4* KO hím egerekkel **(2.3.D ábra)**. Két nőstény elpusztult a vemhesség késői szakaszában. A harmadik nőstény sikeresen létrehozott 8 utódot (F1 generáció), ám a második vemhességben ő is elpusztult **(2.3.D ábra)**. Az alapító egérben a PB transzpozon inszerciós helyeit ligálás-mediált polimeráz láncreakció (LM-PCR) technikával állapítottuk meg **(2.3.E ábra)**. Az F1 generációtól kezdve az egérvonalak már csupán egy-egy kópiát hordoztak a transzgénből, amelyek az életképesek, fertilitásuk és viselkedésük alapján már nem mutatták a valószínűleg többszörös transzgen által okozott kóros fenotípust, amely az F0 generáció terhességi elhalálózását okozta.



2.2. ábra: A *hSSTR4* transzgen kialakítása a PiggyBac (PB) transzpozonban. A 20. humán kromoszóma a teljes *SSTR4* gén kódoló szekvenciájával és a szabályozó elemeket tartalmazó *upstream* és *downstream* szakaszokkal (összesen 7,8 kb), amelyekből a transzgént összeállítottuk, továbbá jelöltük a legközelebbi szomszédos géneket (*FOXA2* és *THBD*) a kromoszómán (A). A PB transzpozon vektor hordozza az *upstream* szabályozó elemeket (4 kb), ezt követően az humán *SSTR4* gén promóterét és kódoló szekvenciáját, majd a P2A önhasító szekvenciát, a luciferáz és tdTomato kódoló szekvenciáját,

az humán *SSTR4* *downstream* szabályozó elemeit (2,7 kb), és végül a poliadenilációs szignál szekvenciát (polyA). Az egész transzgén kazetta (12,7 kb) mindkét végén határolva van (bentről kifelé haladva) Lox2272 Cre rekombinááz felismerőhellyel, inszulátorral, és végül PB transzpozon inverz terminális ismétlődő szekvenciával (ITR), mindezt a pPBC2 plazmid tartalmazza **(B)**. A transzgén több kópiában épült be az egér genomba, ezek közül az egér 3. kromoszómáján demonstráljuk a transzgén inszerciós helyét a TTAA PB transzpozáz felismerési helyénél, aminek az eredeti pozíciója a 70,039,120. bázispár (*), amely az *Otoll* és *Sis* gének között helyezkedik el **(C-D)**. A kromoszóma konvencionális olvasási irányához (pter→qter) viszonyítva a transzgén fordítottan inszertálódott (reverz orientációban) **(D)**. A primerek helyzetét és irányát jelöltük az ábrán, amelyeket az F0 generáció genotipizálására (TR1-4), a hSSTR4 kódoló szakasz azonosítására (TR ST4 1-2), a ligálás-mediált PCR-hoz (LM-V primerek), illetve a rutinszerű genotipizáló PCR-hoz használtunk (Chr3pr2-3 és LM-V3, kékkel jelölve) **(D)**.



2.3. ábra: A transzgenezis lépései PB transzpozonnal. A hSSTR4 transzgenikus egér létrehozásának vázlatos ábrázolása (A-E). A fehér egerek szimbolizálják a *hSSTR4* transzgén nélküli *Sstr4* KO egereket, míg a megfelelően inszertálódott *hSSTR4* transzgén hordozó egereket zölden jelöltük. A transzgén kópiák a Chr3, Chr10, ChrX nevet kapták annak megfelelően, hogy a 3., 10. vagy X kromoszómán azonosítottuk az inszerciós helyeiket; illetve U1 és U2 nevet kapták az ismeretlen helyzetű kópiák.

2.4.2. A *hSSTR4* transzgén inszerciós helyei

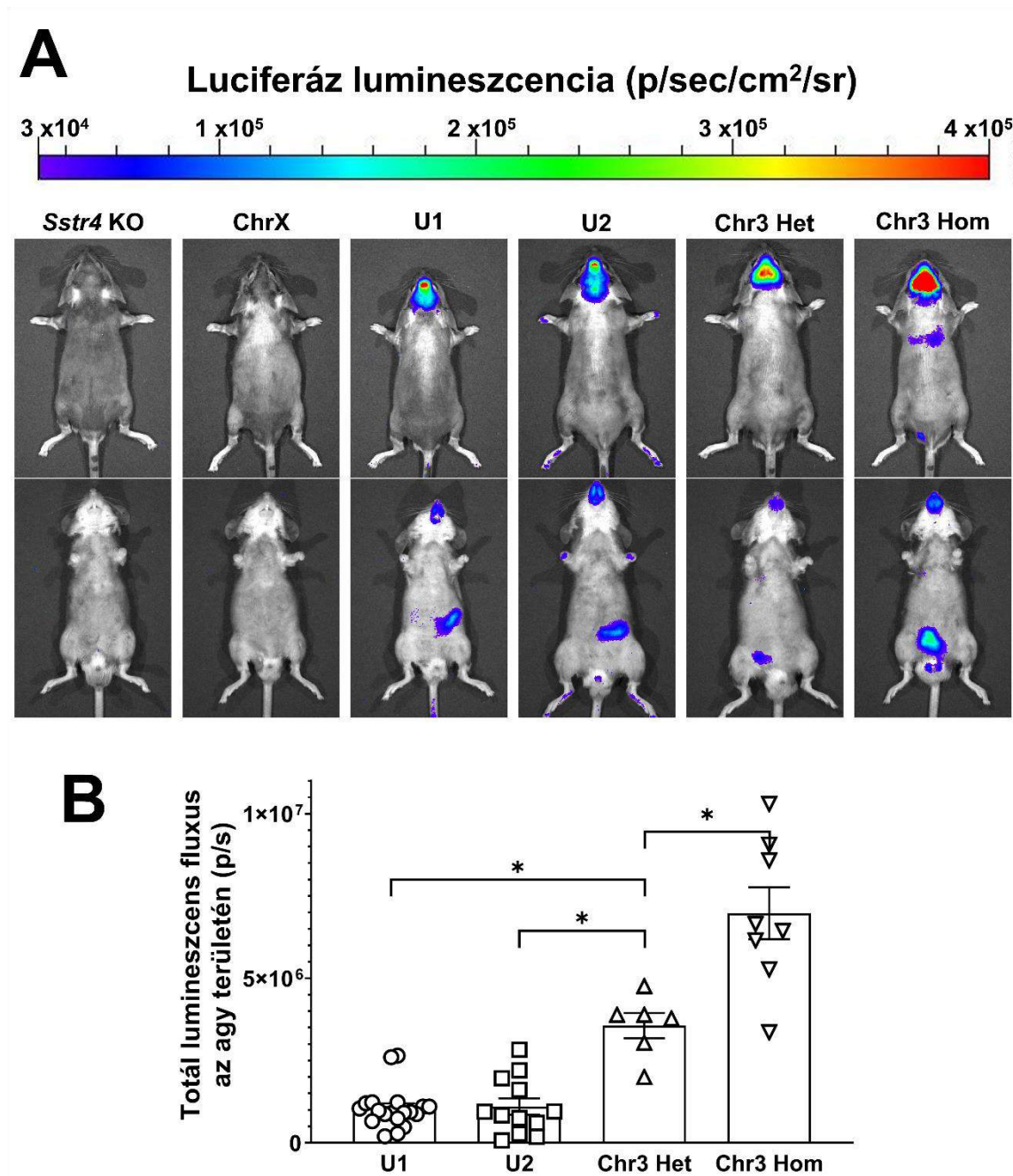
LM-PCR segítségével a *hSSTR4* transzgén több inszerciós helyét fedeztük fel az F0 generációt alkotó egérben. Az LM-PCR termékeket szekvenáltatva 3 inszerciós helyet sikerült azonosítanunk: egyet a 3., egyet a 10. és egyet az X egér kromoszómán, amely alapján a kópiák az Chr3, Chr10 és ChrX jelölést kapták. A Chr10 kópia nem jutott át az F1 generációba, így az alapító anyával együtt kihalt (**2.3.D-E ábra**). A transzgén a 3. kromoszómán a szukráz-izomaltáz (*Sis*) és otolin 1 (*Otol1*) gének közé, a kromoszóma konvencionális olvasási irányához (pter→qter) viszonyítva fordítottan inszertálódott (reverz orientációban) (**2.2.C-D ábra**). A PB transzpozáz a kromoszómán TTAA felismerési szekvenciába inszertálta a transzpozont, miközben a TTAA szekvenciát megkettőzte, így a transzgén mindkét végére került egy. Az eredeti TTAA inszerciós hely pozíciója: 70,039,120 (78) (**2.2.C-D ábra**). A 10. kromoszómán a transzgén a 67,335,940 (79) pozícióba inszertálódott *forward* orientációban. Az X kromoszómán a transzgén a 32,102,395 (80) pozícióba inszertálódott *forward* orientációban. Az F1 generációban 2 egér hordozta a *hSSTR4* transzgént, melyek helyzetét nem sikerült azonosítani sem LM-PCR, sem inverz PCR technikával, ezek a kópiák az U1 és U2 jelölést kapták (**2.3.D-E ábra**).

Az ismert kópiákat hordozó egérvonalakban helyspecifikus PCR primereket terveztünk rutin genotipizálás céljára, amelyek segítségével a hetero- és homozigóta egerek között is különbséget tudunk tenni. Az U1 és U2 ismeretlen helyzetű kópiák esetében csak a *hSSTR4* jelenlétét vagy hiányát tudtuk kimutatni rutin genotipizálással.

2.4.3. A kópia specifikus expressziós mintázat kimutatása a *hSSTR4* génhez kapcsolt luciferáz enzim lumineszcenciája által, *in vivo* képkalkotással

A transzgén expresszióját elsőként közvetetten sikerült mérnünk, a ko-expresszált riporter fúziós fehérje szignálján keresztül: a luciferáz lumineszcenciáját és a tdTomato vörös fluoreszcenciáját mértük. A luciferáz aktivitását *in vivo* mértük a transzgenikus egerek teljes testfelületén (**2.4.A ábra**), és a jelerősséget kvantifikáltuk az agy területén (**2.4.B ábra**). Nem tapasztaltunk luciferáz aktivitást az *Sstr4* KO egerekben, továbbá sem a hemizigóta hím, sem a homozigóta nőstény ChrX *hSSTR4* egerekben (**2.4.A ábra**). Mivel a ChrX egérvonal nem mutatott transzgén expressziót, ezért kivontuk a további kísérletekből. Az ismeretlen helyzetű kópiák (U1 és U2) hasonló expressziós mintázatot mutattak: gyenge jel a végtagokon és a farkon, közepes erősségű jel a nagyagy és kisagy területén, és kiemelkedően erős jel a *bulbus olfactorius* területén. A Chr3 egerekben a legerősebb jelet a nagyagy területén mértük. A Chr3

homozigóta egérben a jelerősség a Chr3 heterozigóta duplája volt. A Chr3 heterozigóta egerekben szignifikánsan erősebb jelet kaptunk, mint a szintén heterozigóta U1 és U2 egerekben (2.4.B ábra). A periférián a lumineszcens jel gyengébb és egyedenként változó volt, a transzgén elhelyezkedésétől függetlenül, de jellemzően az alhas és medence területén tapasztaltuk a legerősebb jelet. A tdTomato nem mutatott detektálható, az autofluoreszcenciától elkülöníthető jelet (2.2-3. melléklet ábrák).



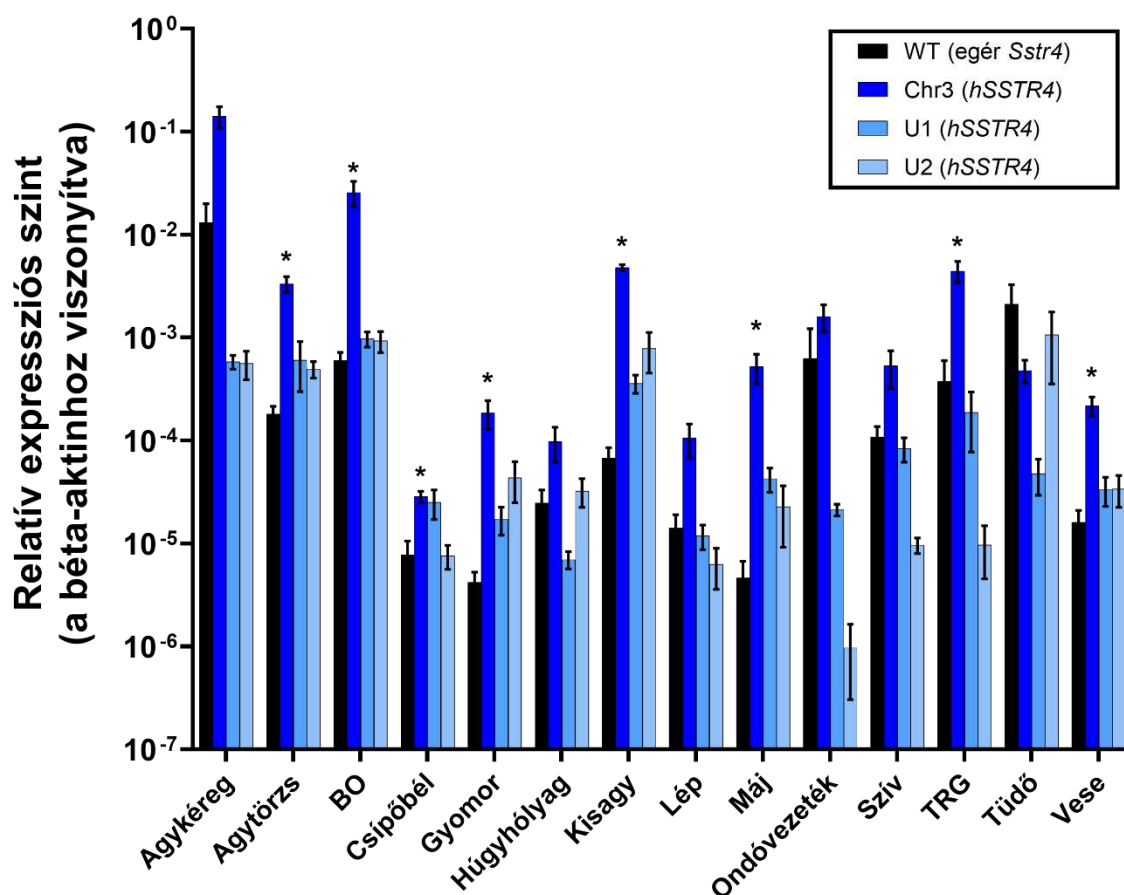
2.4. ábra: *In vivo* biolumineszcens képalkotás a hSSTR4 transzgénnel ko-expresszáldó luciferáz riporter fehérje aktivitásáról. Reprezentatív képek mutatják az eltérő expressziós mintázatot és lumineszcens jel intenzitását az egyes *hSSTR4* kópiákat hordozó egérvonalak között

(A). Szórás- és oszlopdigram mutatja a biolumineszcencia intenzitását az agyhoz tartozó azonos méretű területen (ROI) a különböző *hSSTR4* transzgén kópiákat hordozó egérvonalakban (B).
*Átlag±SEM, egyutas ANOVA Bonferroni összehasonlító teszt, *p < 0,0001; n = 6-19.*

2.4.4. A *hSSTR4* génexpresszió mennyiségi vizsgálata RT-qPCR technikával

A *hSSTR4* transzgén expressziója az RT-qPCR technikával mért szervek közül négyben volt a legmagasabb: a cerebrumban, a *bulbus olfactorius*-ban, a trigeminális ganglionokban, valamint a hím egerek esetében az ondóvezetékben; míg a maradék nyolc szervben egészen alacsony expressziót mértünk az *Actb* háztartási génhez viszonyítva (2.5. ábra).

A tüdő kivételével minden vizsgált szervben a Chr3 magasabb *hSSTR4* expressziós szintet mutatott, mint az egér *Sstr4* expresszió a WT egerekben. A Chr3 a legmagasabb *hSSTR4* expressziós szintet mutatta az idegrendszerben: az agykéregben, a *bulbus olfactorius*-ban, a trigeminális ganglionokban, a kisagyban és az agytörzsben; továbbá viszonylag magas expressziót mutatott az ondóvezetékben. Ezzel összehasonlítva, a WT egerekben az egér *Sstr4* expresszió a legmagasabb az agykéregben, a tüdőben, az BO-ban, az ondóvezetékben és a TRG-ben volt; de sokkal alacsonyabb volt az agytörzsben és a kisagyban, mint a humanizált egerekben a *hSSTR4* expresszió. Az U1 és U2 kópia a Chr3-nál általánosan alacsonyabb *hSSTR4* expressziót mutatott minden szervben a tüdő kivételével (2.5. ábra).

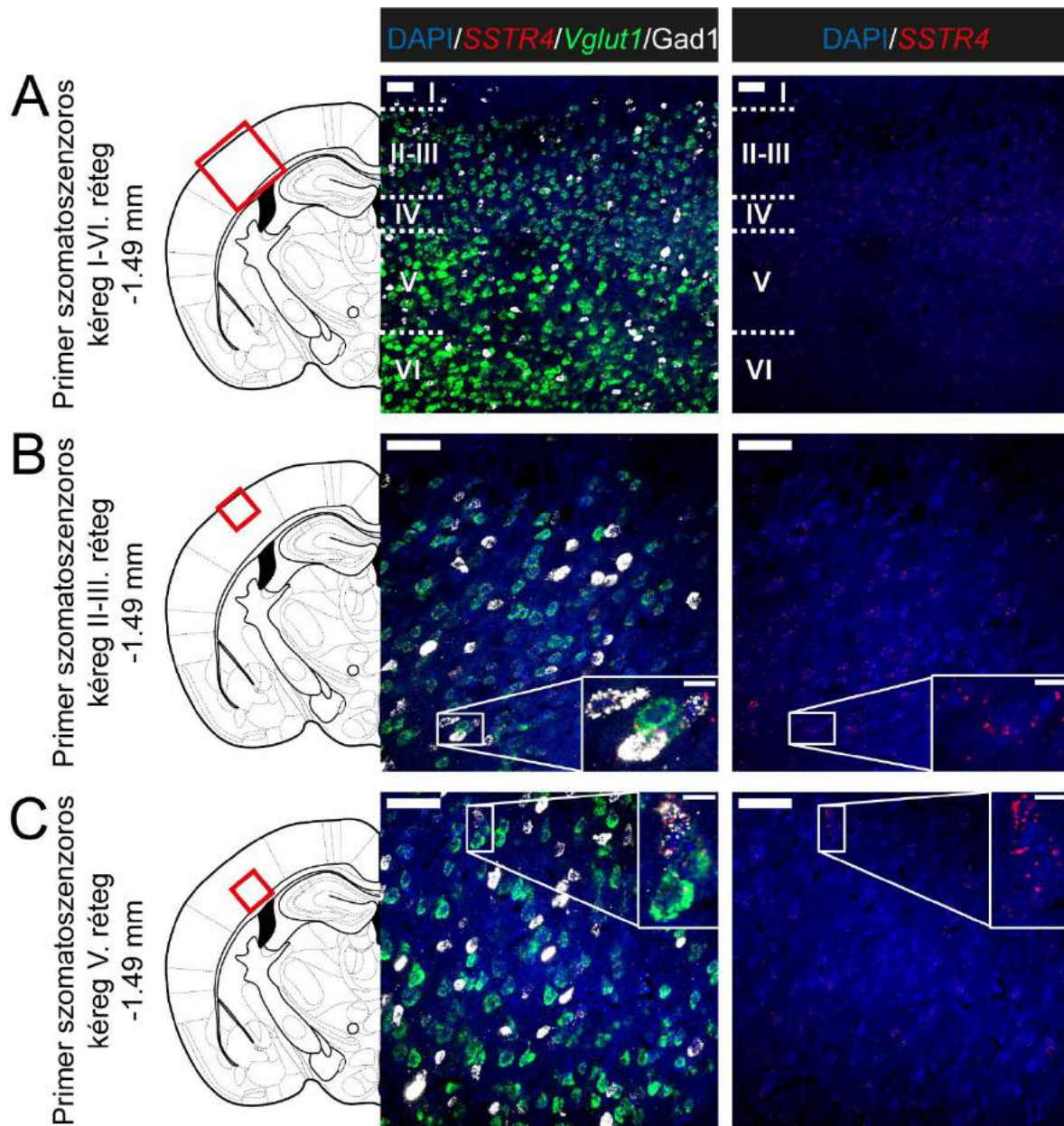


2.5. ábra: Relatív egér *Sstr4* és humán *SSTR4* mRNS expressziós szint a WT és humanizált (Chr3, U1 and U2) egerekben. A diagram a RT-qPCR eredmények normalizált értékét ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) mutatja a béta-aktin (*Actb*) mRNS-éhez viszonyítva a vizsgált szervekben. A **BO** a *bulbus olfactorius*, a **TRG** pedig a trigeminális ganglion rövidítése. *Átlag*±*SEM*. A WT és Chr3 egerek közötti expressziós különbségeket csillaggal jelöltük. Kruskal-Wallis-próba Dunn-féle post hoc teszttel kiegészítve; * $pp < 0,01$; $N = 3-7$ / genotípus.

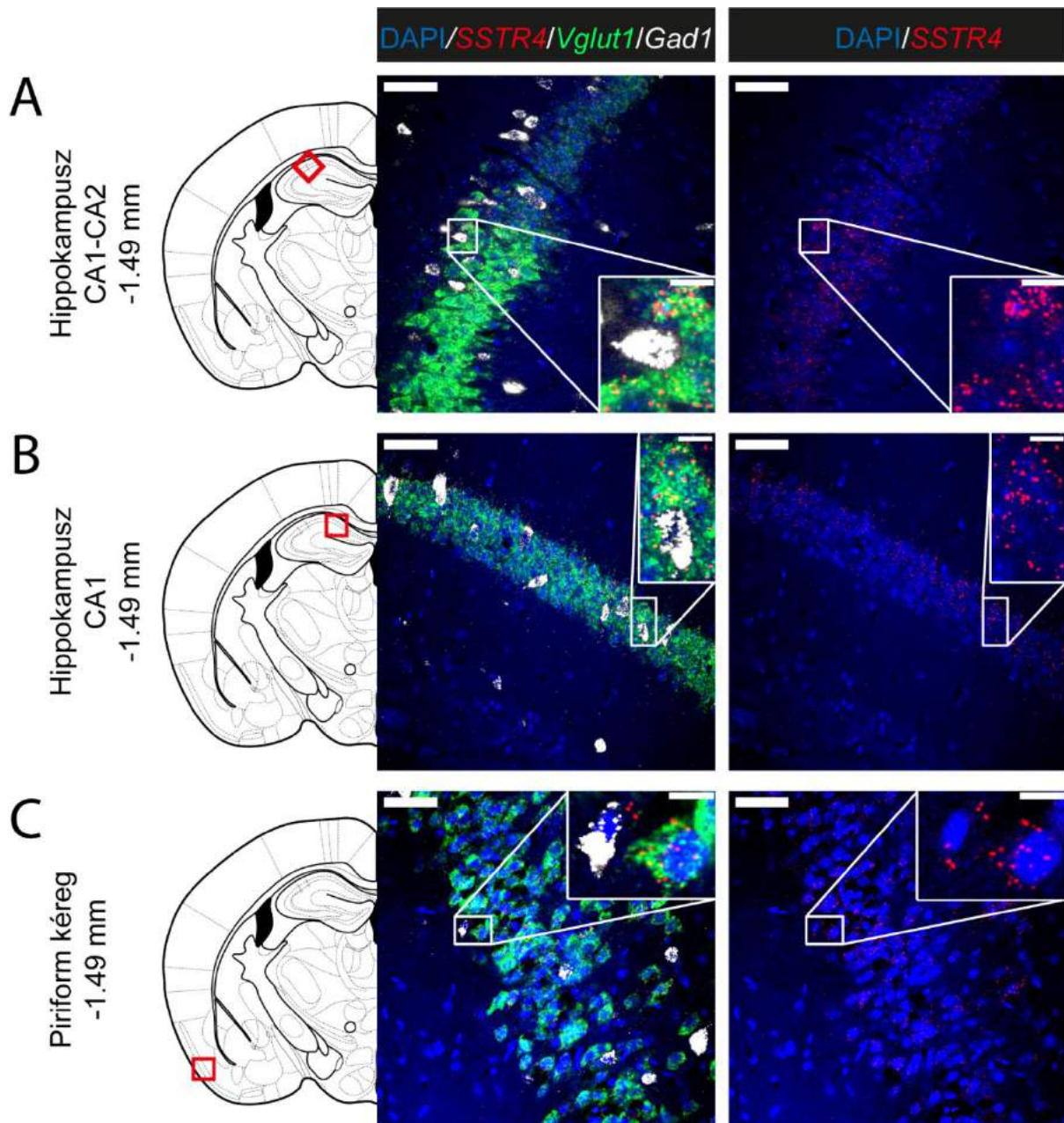
2.4.5. A *hSSTR4* transzgén expressziója különböző agyi idegsejt típusokban

Mivel *hSSTR4*-kapcsolt tdTomato fluoreszcenciája nem volt detektálható a natív agymetszeteken (2.3. melléklet ábra), és nincs forgalomban megbízhatóan specifikus humán *SST4* elleni antitest (elsősorban az egér és ember közötti, másrészt az *SST* receptorcsaládon belüli nagyfokú homológia miatt), ezért mRNS *in situ* hibridizációt használtunk a *hSSTR4* expressziós mintázatának mikroszkópos feltárására. A Chr3 *hSSTR4* homozigóta egerek agymintáiban a *hSSTR4* mRNS mérsékelt expressziós szintet mutatott. Az elsődleges

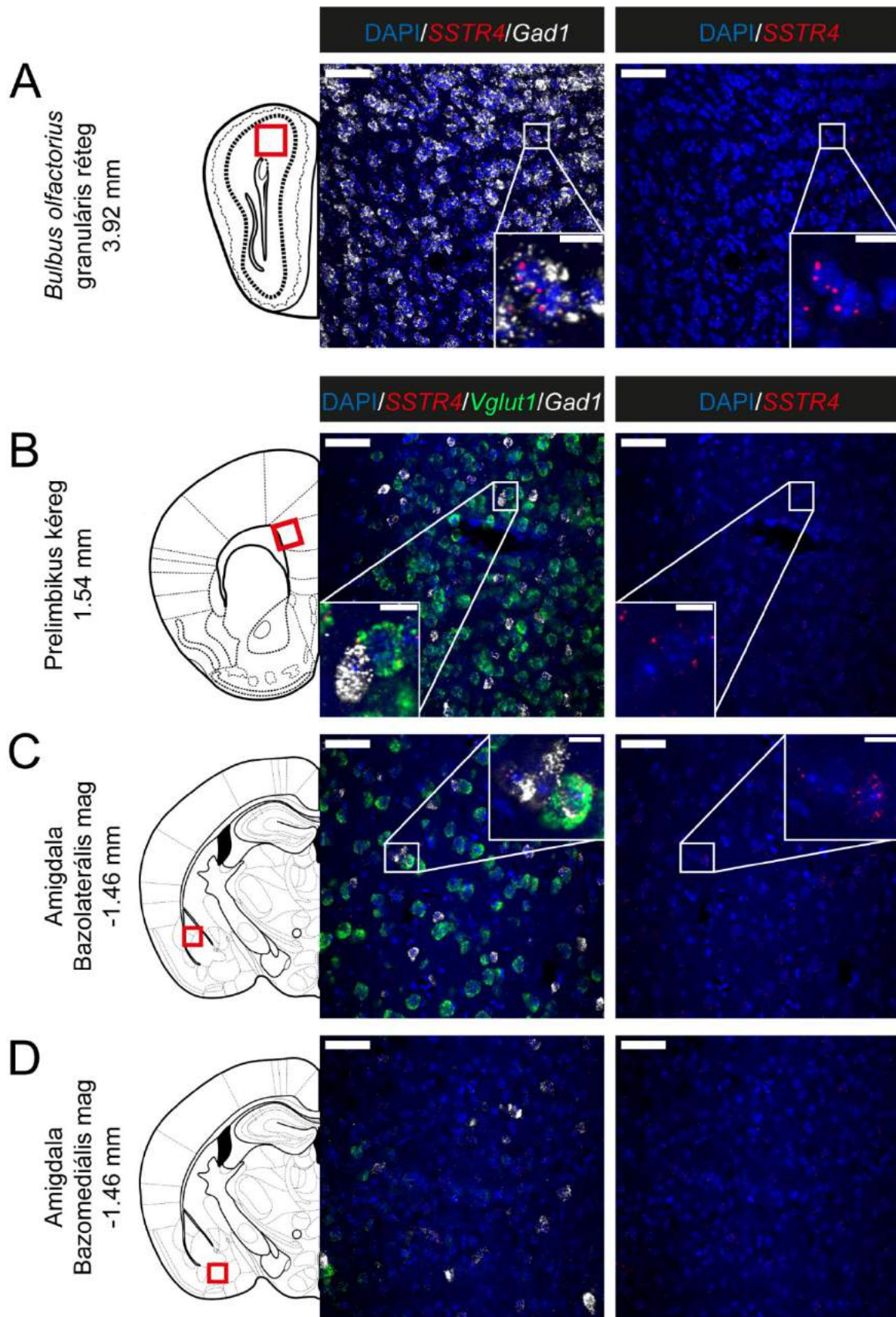
szomatoszenzoros kéregben (S1) a legmagasabb expressziós szintet a II-III. rétegben találtuk **(2.6.A-B ábra)**. A legmagasabb expressziós szintet a hippocampusz CA2 régiójában és a piriform kéregben (elsődleges szaglókéreg) volt **(2.7. ábra)**. Az agy más területein, mint a *bulbus olfactorius* granuláris rétegében, a prelimbikus kéregben, az amigdala bazolaterális (BLA) és bazomediális (BMA) magvakban alacsony, de számottevő *hSSTR4* expressziós szintet találtunk **(2.8. ábra)**. A *hSSTR4* túlnyomóan a glutamáterg excitációs neuronokban (*Vglut1*) expresszáldott, továbbá inkonzisztensen a GABA-erg neuronokban (*Gad1*) is az elsődleges szomatoszenzoros kéreg **(2.6. ábra)**, piriform kéreg **(2.7.C ábra)**, prelimbikus kéreg **(2.8.B ábra)**, BLA **(2.8.C ábra)** és BMA **(2.8.D ábra)** agyterületeken. A hippocampusz CA1 és CA2 régióiban a *hSSTR4* transzgén csak a glutamáterg excitációs neuronokban expresszáldott **(2.7.A-B ábra)**. A *bulbus olfactorius* granuláris rétegében nincsenek glutamáterg excitációs neuronok, de a GABA-erg neuronokban expresszáldott a *hSSTR4* **(2.8.A ábra)**. A kontroll minták a Mellékletben találhatóak **(2.4. melléklet ábra)**.



2.6. ábra: A *hSSTR4* mRNS expressziója az egér elsődleges szomatoszenzoros kéregben. Reprezentatív konfokális fluoreszcens mikroszkópos képek a Chr3 homozigóta egérből. Humán *SSTR4* (piros), egér *Vglut1* (zöld) és egér *Gad1* (fehér) mRNS-ek az elsődleges szomatoszenzoros kéregben (S1, Bregma -1,46 mm). A szövetmintákon a sejtmagokat DAPI (kék) festéssel jelöltük. A bal felső vonalas aránymérték 50 µm-t jelöl, míg a kinagyított képberakásokban a jobb felső vonalas aránymérték 10 µm-t jelöl.



2.7. ábra: A *hSSTR4* mRNS expressziója az egér hippocampusban és piriform kéregben. Reprezentatív konfokális fluoreszcens mikroszkópos képek a Chr3 homozigóta egérből. Humán *SSTR4* (piros), egér *Vglut1* (zöld) és egér *Gad1* (fehér) mRNS-ek a hippocampusz Ammon-szarv 1. és 2. régióiban (CA1-CA2, Bregma -1,46 mm), továbbá a piriform kéregben (Pir, Bregma -1,46 mm). A szövetmintákon a sejtmagokat DAPI (kék) festéssel jelöltük. A bal felső vonalas aránymérték 50 μ m-t jelöl, míg a kinagyított képberakásokban a jobb felső vonalas aránymérték 10 μ m-t jelöl.



2.8. ábra: A *hSSTR4* mRNS expressziója az egér *bulbus olfactorius*-ban, prelimbikus kéregben és az amigdalában. Reprezentatív konfokális fluoreszcens mikroszkópos képek a Chr3 homozigóta

egérből. Humán *SSTR4* (piros), egér *Vglut1* (zöld) és egér *Gad1* (fehér) mRNS-ek a *bulbus olfactorius* granuláris rétegében (BO, Bregma +3.92 mm), a prelimbikus kéregben (PrL, Bregma +1.54 mm), az amigdala bazolaterális és bazomediális magjaiban (BLA és BMA, Bregma -1.46 mm). A szövetszövetmintákon a sejtmagokat DAPI (kék) festéssel jelöltük. A bal felső vonalas aránymérték 50 µm-t jelöl, míg a kinagyított képberakásokban a jobb felső vonalas aránymérték 10 µm-t jelöl.

2.4.6. U1 és U2 keresztezés

A *hSSTR4* U1 és U2 homozigóta egereket kereszteztük, majd az F1 generációt beltenyésztettük, hogy az F2 generáció genotipizálásával megállapíthassuk, hogy a transzgén azonos, vagy különböző lókuszon helyezkedik el. Ha különböző kópiáról van szó, akkor az F1 generációban minden egér heterozigóta mindkét génre, és 1/16 eséllyel *SSTR4* KO egeret kell találnunk az F2 generációban. Ezzel szemben 100 egérből mind pozitív volt a *hSSTR4* génre ($p = 0,0127$, kétoldalas Fischer-féle egzakt teszt, $N = 100$), ami azt mutatja, hogy a két vonalban a transzgén azonos kromoszómán helyezkedik el. Az expressziós mintázat, a keresztezés eredménye és az, hogy egyik vonalban sem sikerült meghatározni az integrációs helyet, mind abba az irányba mutat, hogy az U1 és U2 vonal ugyanazt a transzgént hordozza.

2.5. Megbeszélés

A projekt legfontosabb eredménye, hogy sikeresen létrehoztunk *SSTR4* humanizált egérvonalakat a PB transzpozon vektor random inszerciójával, és karakterizáltuk a humán receptort expresszáló neuronokat a fájdalom- és hangulatszabályozáshoz kapcsolódó agyterületeken. Ezek az egerek hasznos modellállatok lehetnek az *SST4* receptor preklinikai kutatásában, ami egy új célpont a fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő és antidepresszáns gyógyszerek fejlesztésében (16,20,21).

A népszerű *knock-in* technika helyett azért választottuk a random inszerciót, hogy elkerüljük az egér *Sstr4* gén szabályozó elemeinek a befolyását a transzgénen. A transzpozon vektorba az humán gén kódoló szakaszán kívül az humán szabályozó elemeket is beillesztettük, és a transzgén végein inszulátorokkal gátoltuk a pozíció effektust, hogy remélhetőleg a transzgén minél inkább az humánhoz hasonló expressziós mintázatot mutasson. A módszer hátránya viszont, hogy a létrehozott transzgenikus egerekben az integrációs hely feltérképezése problémás lehet, továbbá az inszerció félbeszakíthat egér géneket (81,82).

A PB transzpozon random inszerciója a mi esetünkben több integrációs helyet eredményezett az F0 egér generációban. Ezek közül három kópiának a helyét sikeresen meghatároztuk LM-PCR technika (75) segítségével (Chr3, Chr10 és ChrX), de két kópia

elhelyezkedése még továbbra is ismeretlen (U1 és U2). Az, hogy sikertelen volt az U1 és U2 integrációs helyének meghatározása, arra enged következtetni minket, hogy a transzgenek a genom ismétlődő szakaszaiba integrálódhattak, ami jelentősen nehezíti a géntérképezést. A Chr3 kópia helyének pontos ismeretében helyspecifikus PCR próbát tudtunk tervezni, aminek a segítségével nemcsak a transzgen jelenlétét tudjuk meghatározni, hanem a hetero- és homozigóta egereket is meg tudjuk különböztetni.

Az F0 generációban mindhárom transzgenikus nőstény egér vemhességében és szülésében komplikációk léptek fel, amibe végül elpusztultak. Ez arra enged következtetni minket, hogy mindhárom esetben a transzgen többszörösen inszertálódhatott a genomba, és az ebből következő SST₄ overexpresszió okozhatta a problémát, mivel az egy-egy kópiát hordozó utódokban ez nem fordult elő többször. Ez a megfigyelés alátámasztja, hogy az SST₄ szerepet játszik terhességben, ugyanis a humán placentában túlnyomóan ezt a szomatostatin receptort találták meg (83,84).

A biolumineszcens *in vivo* képalkotás a *hSSTR4*-kapcsolt luciferáz enzim expresszióját mutatta a különböző szervek területén, a legerősebb lumineszcens jelet az agy területén mutatta. A Chr3 egerek a legerősebb expressziót a nagyagy területén mutatták, míg az U1 és U2 kópiák gyengébbet mutattak itt, de erősebbet a *bulbus olfactorius* és az agy hátsó területén. Az RT-qPCR alátámasztotta ezeket az eredményeket, mivel ebben az esetben is az agykéregben és a BO-ban mértük a legmagasabb *hSSTR4* expressziós szintet. Az egér *Sstr4* gén expressziója valamivel gyengébb volt, mint a *hSSTR4* a Chr3 egérben, a tüdő kivételével, ami a WT egérben sokkal magasabb volt, továbbá a kisagyban és az agytörzsben jóval alacsonyabb volt. Ezek az eredményeink megegyeznek a korábbi átfogó expressziós vizsgálatok adatbázisaival az egér és humán receptor összehasonlításában (73,84–86). U1 és U2 kópiák expressziója egymással hasonlóságot mutattak mind a luciferáz IVIS-ban, mint RT-qPCR eredményeiben, ami arra enged következtetni minket, hogy esetleg ez a két kópia valójában azonos. Tovább erősíti ezt a feltevést, hogy az U1 és U2 egérvonalak összekeresztelésében genotipizáltunk 100 utódot az F2 generációban, és nem találtunk *hSSTR4* KO egyedet. A transzgen integrációs helyétől függetlenül, a *hSSTR4* expressziós szint és mintázat is egyedenként változó volt a has és medence területén. Az adatbázisok szintén változó SST₄ expressziós szintet (a nem detektálhatótól a mérsékeltig) dokumentáltak mind az ember, mind az egér gasztrointesztinális és reprodukív szervrendszerében (87–91). Ezeket az adatokat alátámasztja a Chr3 egerekben RT-qPCR-rel mért viszonylag magas *hSSTR4* expressziós szint is. Az adatbázissal szemben viszont a gyomorban és bélben alacsony *hSSTR4* expressziót mértünk. Az agy területén a Chr3-ban volt a legerősebb luciferáz lumineszcens jel, közel háromszor erősebb, mint az U1 és U2

egerekben. Továbbá, az U1 és U2 egerekkel ellentétben, a Chr3 egerek esetében genotipizálással meg tudtuk különböztetni a hetero- és homozigóta egyedeket, amelyeket *in vivo* képalkotásban összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a homozigótákban a lumineszcens jelerősség kétszer akkora, mint a heterozigótákban.

A tdTomato nem mutatott detektálható jelet semelyik egérvonalban, sem az *in vivo* képalkotásnál, sem a fluoreszcens mikroszkópiánál, valószínűleg a transzgén általánosan alacsony expressziója miatt. A fluoreszcens riporterfehérjéket általában valamilyen nagyon erős víruspromóter (pl. citomegalovírus) vagy egy emlős háztartási gén promótere (pl. elongációs faktor 1 alfa) hajtja meg, hogy megfelelő mennyiségben expresszálódjanak, és erős jelet adjanak (92). Továbbá, bár a tdTomato toleránsabb az N-terminális fehérjemódosításokra, mint az mRFP1 elődje (93), mégis azt tapasztaltuk, hogy a tdTomato fluoreszcenciája jelentősen gyengül a fúziófehérje formában a natív tdTomato proteinhez képest (**2.1. melléklet ábra**), valószínűleg azért, mert a luciferáz kapcsolódása akadályozza a tdTomato fehérje *fold*ing-ot vagy a tetramerizációt (94,95).

A fajok közötti és az SST receptorcsaládon belüli erős homológia miatt nincs megbízhatóan *hSSTR4*-specifikus antitest, ezért immunhisztokémia helyett az RNS *in situ* hibridizációs technikát, az RNAscope-ot választottuk. A korábbi eredmények alapján a Chr3 kópiát találtuk a legmegfelelőbbnek a további kísérletekre, ezért ezekben karakterizáltuk a *hSSTR4* expressziót RNAscope technikával. A *hSSTR4* a legerősebb jelet a hippokampuszban (CA1 és CA2 régiókban) és az agykéregben (Pir, S1, PrL) mutatta, ami összhangban van az egér és ember expressziós adatbázisával (87–91). A Chr3 egerekben a *hSSTR4* főleg a Vglut1-pozitív glutamáterg excitációs neuronokban expresszálódik, hasonlóan az *Sstr4*-hez a WT egerekben, de annál láthatóan gyengébb expressziós szinten. A *hSSTR4* a GABA-erg interneuronokban is expresszálódott ugyanezekben az agyterületeken, míg az egér *Sstr4* expressziója a centrális amigdala magjában található GABA-erg sejtekben volt megfigyelhető. Az elsődleges szomatoszenzoros kéregben a *hSSTR4* legerősebb expressziója II-III. rétegekben volt, ami jelentősen különbözik az egér *Sstr4* expresszióval WT egerekben, mely legerősebben az V. rétegben expresszálódik (73). Egy korábbi tanulmányban az *Sstr4* a WT egerek BO glomeruláris rétegében expresszálódtak, de a granuláris rétegében nem (96), míg a transzgenikus egerekben a *hSSTR4* főleg a BO granuláris rétegében expresszálódott.

Ezek az expressziós különbségek az humán *SSTR4* és egér *Sstr4* között adódhatnak a fajok közötti különbségből, de adódhatnak a humanizált egérmodell limitációiból is, mint a pozíció effektus (82). Ezért ezeket a különbségeket érdemes még tovább vizsgálni.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a Chr3 *hSSTR4* egérvonalban a transzgén elsősorban a fájdalom- és hangulatszabályozásért felelős agyrégiók excitatorikus glutamáterg neuronjaiban expresszálódik, számos hasonlóságot és néhány különbséget mutatva az *Sstr4* expresszióhoz képest WT egerekben. A humán receptor funkciójának további alapos vizsgálatát követően a Chr3 egérvonal alkalmas transzlációs kutatási eszköz lehet az SST₄ receptor, mint analgetikus, antidepresszáns és gyulladáscsökkentő gyógyszer-célpont lehetőségeinek feltárásában, továbbá az új SST₄ agonista gyógyszerjelöltek preklinikai tesztelésében.

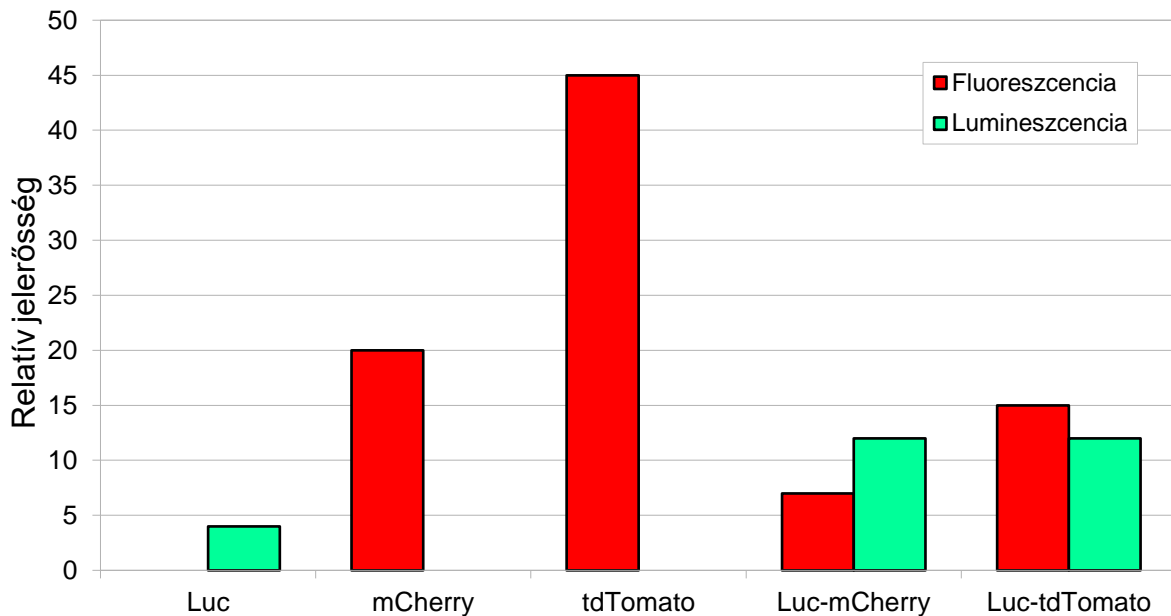
2.6. Következtetés

Kutatócsoportunk korábban már bizonyította, hogy a szomatosztatin 4-es receptor közvetíti a szomatosztatin fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő, továbbá antidepresszáns hatását endokrin hatások nélkül, ezért ez egy ígéretes gyógyszer-célponttá vált újfajta gyógyszer hatóanyagok fejlesztésében. Az SST₄ receptor expressziójában és funkciójában az egér és ember közötti faji különbségek legyőzésére létrehoztunk SST₄ humanizált egérvonalat, mely használható lehet transzlációs állatmodellként a preklinikai kutatásban. Egy olyan transzpozon vektort készítettünk, amely hordozza az emberi *hSSTR4* gént az összes expressziós szabályozóelemével együtt. Ezt a transzgént véletlenszerű helyre inszertáltuk *Sstr4* génhányos egerekbe, majd ligálás mediált PCR-rel azonosítottuk az elhelyezkedésüket. A luciferáz riportter fehérje lumineszcenciája alapján *in vivo* képalkotással kimutattuk, hogy a *hSSTR4* transzgén legfőképp az agy területén expresszálódik. RT-qPCR technikával megerősítettük, hogy az agyban és még néhány perifériás szervben expresszálódik a *hSSTR4* transzgén, ami megegyezett az *in vivo* képalkotásban kapott eredményekkel. RNAscope *in situ* hibridizációval kimutattuk, hogy a *hSSTR4* transzgén expresszálódik a glutamáterg excitációs neuronokban a hippokampusz CA1 és CA2 területén, a GABA-erg interneuronokban a *bulbus olfactorius* szemcsés rétegében, illetve mindkét fajta neuronban az elsődleges szomatoszenzoros kéregben, a piriform kéregben, prelimbikus kéregben és az amigdalában. Ez az SST₄ humanizált egérvonal segíthet nekünk alaposabban kivizsgálni az egér és ember közti faji különbségeket az SST₄ receptor expressziójában és funkciójában, továbbá segíthet kivizsgálni az SST₄ agonista gyógyszerjelölt molekulák hatásait.

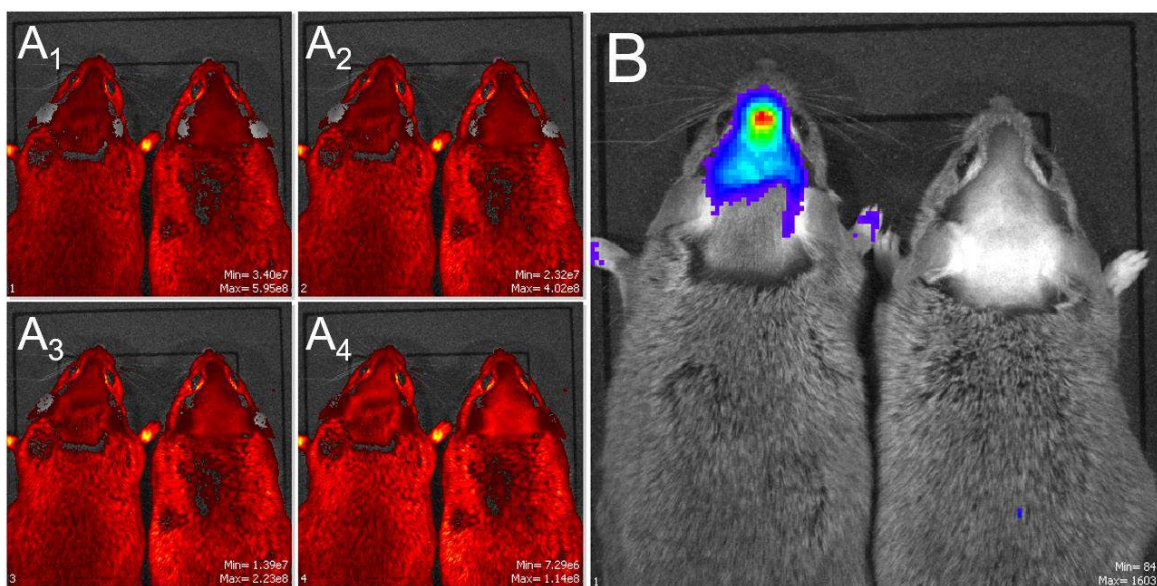
A kutatásunk következő lépése az SST₄ funkcionális kivizsgálása. Egy most induló új projekt keretében az emberi SST₄ funkcióját tervezzük kivizsgálni úgy, hogy összehasonlítjuk a humanizált *SSTR4* egereket az *Sstr4* WT és KO egerekkel az enyhe hősrülést követő mechanikai hiperalgésia tesztben. A kísérletet Dr. Pozsgai Gábor dolgozta ki (12), melyben a TRPA1 agonista dimetil-triszulfid (DMTS) fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását

vizsgálta, mi ezt a J-2156 és TT-232 SST₄ agonistákkal akarjuk összehasonlítani. Az eredeti kísérlet ugyanis kimutatta, hogy ugyan a DMTS közvetlenül a TRPA1 receptort aktiválja, de a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatása SST₄ receptor hiányában teljesen megszűnik.

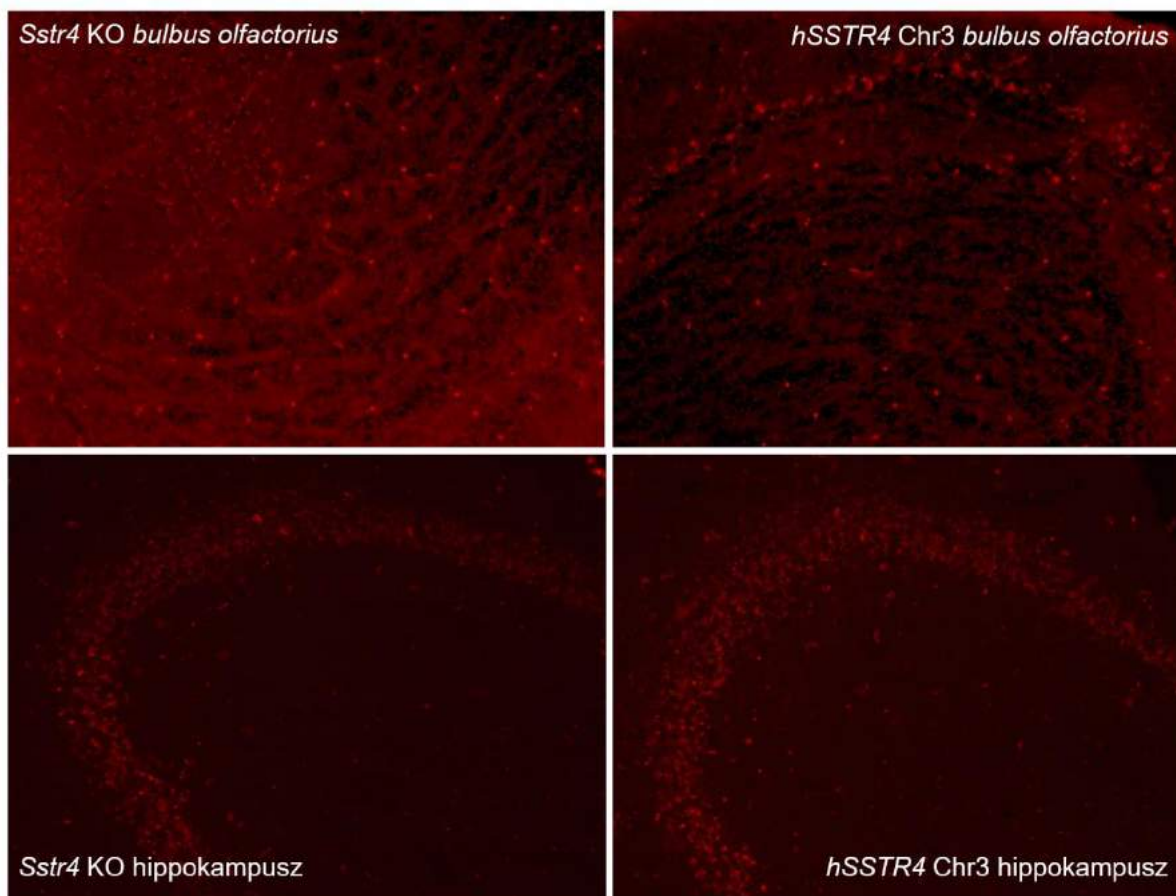
2.7. Mellékletek



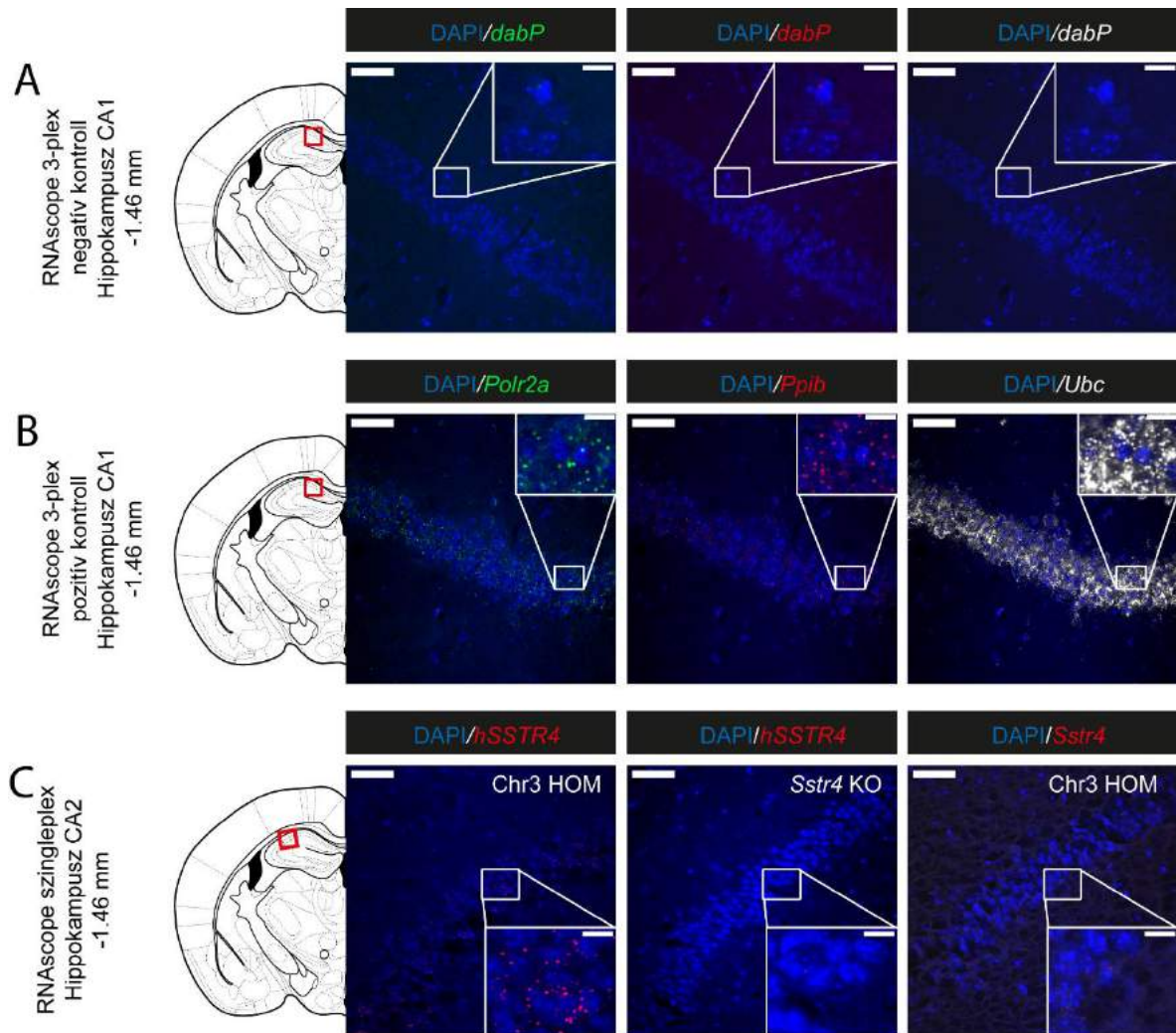
2.1. melléklet ábra: A riporter fehérjék jelerősségének összehasonlító diagramja. A luciferáz enzim, mCherry és tdTomato vörös fluoreszcens fehérjék, továbbá ezek fúziós kombinációi, ahol a luciferáz enzim van az N-terminálison, az mCherry vagy a tdTomato pedig a C-terminálison. A riporter fehérjék expressziós plazmidjait transzfektáltuk a CHO sejtekbe, majd IVIS-ban mértük a jelerősségüket. A fúziós fehérje forma mindkét vörös fluoreszcens fehérje szignálját csökkenti, de a tdTomato jelerőssége még mindig magasabb. A luciferáz enzimnek kedvez a fúziós fehérje forma, és erősebb lumineszcens jelet ad, mint önálló fehérjeként.



2.2. melléklet ábra: A tdTomato fluoreszcens és luciferáz lumineszcens jel összehasonlítása IVIS-ban. A tdTomato fluoreszcenciája IVIS-ban különböző filterekkel (A₁₋₄). Ugyanazoknak az egereknek a luciferáz lumineszcenciája IVIS-ban (B). Mindegyik képen a bal oldali egér *hSSTR4* U2 heterozigóta, a jobb oldali egér pedig *Sstr4* KO egér. A tdTomato nem adott az autofluoreszcenciánál erősebb, jól elkülöníthető jelet.



2.3. melléklet ábra: A tdTomato natív fluoreszcens mikroszkópos képek *Sstr4* KO és *hSSTR4* Chr3 egerek szövetmintáiban. A tdTomato nem adott az autofluoreszcenciánál erősebb, jól elkülöníthető jelet.



2.4. melléklet ábra: Reprezentatív RNAscope kontroll festések. Az RNAscope 3-plex negatív kontroll a bakteriális *dabP* mRNS-re specifikus, a minták a *hSSTR4* homozigóta egér CA1 (Bregma -1.46 mm) régióját mutatják (nem volt szennyezés) (A). Az RNAscope 3-plex pozitív kontroll az egér *Polr2a* (zöld), *Ppib* (piros) és *Ubc* (fehér) mRNS-re specifikus, a minták a *hSSTR4* homozigóta egér CA1 (Bregma -1.46 mm) régióját mutatják (B). A *hSSTR4* szimplex kontroll minta a *hSSTR4* homozigóta egér CA2 (Bregma -1.46 mm) régióját mutatja (C, bal oldali kép). A szimplex negatív kontrollként *hSSTR4* mRNS-specifikus próbát használtunk az *Sstr4* egér mintán (C, középső kép), illetve *mSstr4* mRNS-specifikus próbát használtunk a *hSSTR4* egér mintán (C, jobb oldali kép), a CA2 (Bregma -1.46 mm) régióban. A szövetmintákon a sejtmagokat DAPI (kék) festéssel jelöltük. A bal felső vonalas aránymérték 50 μm -t jelöl, míg a kinagyított képberakásokban a jobb felső vonalas aránymérték 10 μm -t jelöl.

Név	Szekvencia
hSSTR4 Up-1	ATC CTC ATT CAC TAT CCT GGG AAG T
hSSTR4 Up-2	CCT GGA ATC TTT CCT GTG CCT ACT T
hSSTR4 Up-3	TCC TGG AAG CAC TAG CTG TTT ATC A
hSSTR4 Up-4	TTC ACC AGC GTC TTC TGT CTC ACC
hSSTR4 Down-1	GGA GCC CTT CCC CTA CCC A
hSSTR4 Down-2	TGG GTA GGG GAA GGG CTC C-
LM-V1	AGC TCC AGC TTT TGT TCC CTT
LM-V2	ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAT
LM-V3	GGC GAA TTG GGT ACC GGG
LM-V1B	CTA TTC AAA TTA ATA AAT AAA CCT CG
LM-V2B	TAA ACC TCG ATA TAC AGA CCG
LM-V3B	CGA TAA AAC ACA TGC GTC AA
Chr3pr2	CTG GTT CCG AGT CTC TGA GG
Chr3pr3	TCA GGA GCA AGA GAG GAA GA
Chr10pr2	ATA ATG CCC CTG GCA TAG CTT TC
ChrXpr1	AAC TCC TTT ACC CGC TTG CTC
Cole1Ori-F	ATC GAC GCT CAA GTC AGA GG
Cole1Ori-R	CCG GAT CAA GAG CTA CCA AC
Backbone ctrl Fwd	GTG TCG CCC TTA TTC CCT TT
Backbone ctrl Rvs	AAC TTT ATC CGC CTC CAT CC
TR1	CTT TGC TCA TCC CTC CAT CT
TR2	GTC GCT GTG CAT TTA GGA CA
TR ST4 3	TTG ACG CAT GTG TTT TAT CG
TR ST4 4	ATC CTG GTA CCC ACC CAG AC

2.1. melléklet táblázat: Felhasznált primerek listája.

Az egerek farkáról levágtunk egy 1-2 mm-es szövetmintát, amiből a DNS-t tisztítását, majd a PCR reakciókeverék összeállítását a *Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit (F170L, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)* készlet segítségével végeztük a gyártói protokoll szerint. A PCR-t a Standard PCR programon végeztük *Biometra TAdvanced Twin 48/48 G (846-2-070-2xx, Analytik Jena)* gépben. A PCR termékek és az 1 kb *DNA Ladder (New England Biolabs Inc., USA)* DNS létra kontroll gélelektroforézisét 70 V-on, 1% agaróz gélen és 1x TAE pufferben végeztük. 30-45 perc után a gélt kivettük, és ultraibolya háttérfénnyel megvilágítva okostelefonnal lefényképeztük.

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Időtartam
Kezdeti denaturáció	98	5 perc
30 ciklus	denaturáció	98
	kapcsolódás	60
	meghosszabbítás	72
Végző meghosszabbítás	72	10 perc

2.2. melléklet táblázat: Standard PCR program genotipizáláshoz.

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Időtartam
denaturáció	98	5 perc s
kapcsolódás	60	30 s
meghosszabbítás	72	10 perc

2.3. melléklet táblázat: Ligálás mediált PCR első lépése, egy ciklusos PCR.

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Időtartam
Kezdeti denaturáció	98	5 perc
20 ciklus	denaturáció	98
	kapcsolódás	LM primer függő
	meghosszabbítás	72
Végső meghosszabbítás	72	10 perc

2.4. melléklet táblázat: Ligálás mediált PCR második és harmadik programja, továbbá az inverz PCR programjai.

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Időtartam
Kezdeti denaturáció	95	3 perc
40 ciklus	denaturáció	95
	kapcsolódás	62
	meghosszabbítás	72
		1 perc

2.5. melléklet táblázat: Kvantitatív PCR program

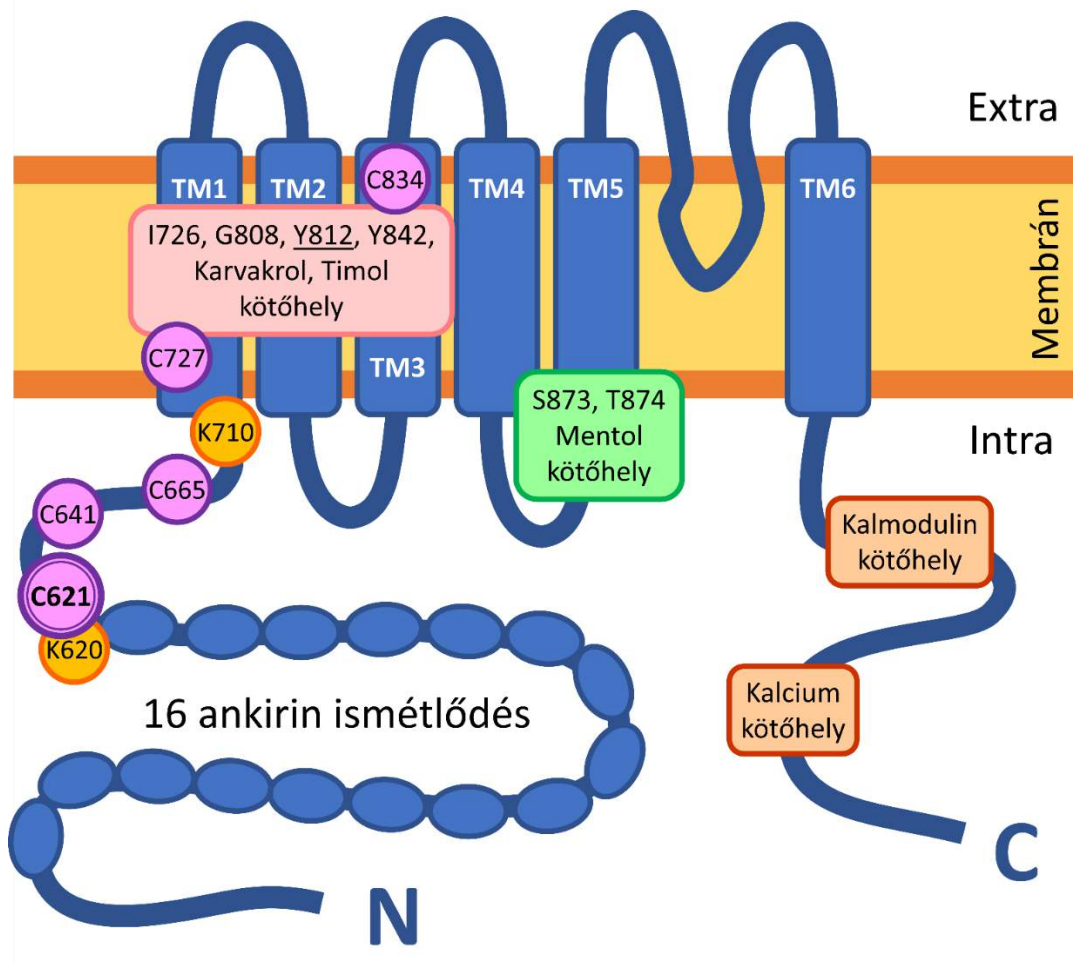
3. Szerves poliszulfidok kötőhelyének azonosítása a humán TRPA1 receptoron

3.1. Bevezetés

A krónikus fájdalom és tartós gyulladás komoly problémát jelentenek a modern társadalomban, világ szinten az emberek 20-45%-át érintik (3,97–101). A krónikus fájdalom közvetlen hatása az életminőség csökkenése és akár testi funkciók kiesése (1,102–104). Ha a tartós gyulladást nem kíséri fájdalom, akkor könnyen rejtve maradhat, de még úgy is hozzájárulhat sok más krónikus betegség kialakulásához, mint például a 2-es típusú cukorbetegséghez, allergiákhoz, szív- és érrendszerei betegségekhez és a rák több típusához is (2,105,106). A hagyományos fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő gyógyszerek, mint a szteroidok, az NSAID-ok és az opioidok nem alkalmasak hosszútávú kezelésre, mert fokozatosan a mellékhatásaik kerülnek túlsúlyba (4–8). Emiatt óriási az igény új hatásmechanizmusú gyógyszerek fejlesztésére a krónikus fájdalom és tartós gyulladás kezeléséhez. A poliszulfidok ígéretes hatóanyagok erre a célra, és a gyógyszerkutatásban egyre többet tanulmányozzák a hatásaikat. Korábban hidrogén-szulfidnak (H_2S) tulajdonították a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatásokat, amely egy gáz halmazállapotú endogén jelátvivő anyag. Ma már tisztázott, hogy a gyulladáskor lokálisan felszabaduló H_2S spontán oxidálódik nátrium-hidrogén-szulfiddá ($NaSH$) és nátrium-szulfiddá (Na_2S), és spontán polimerizálódik szerves poliszulfidokká (pl. Na_2S_3). Ezek a hatóanyagok elég reaktívak ahhoz, hogy a Transiens Receptor Potenciál Ankirin 1 (TRPA1) receptor ciszteinjeihez kovalensen kötődjenek és aktiválják azt (12,107–109). A TRPA1 aktiváció hatására szomatosztatin szabadul fel, ami az SST_4 receptoron keresztül szisztémás fájdalomcsillapítást és gyulladáscsökkentést vált ki (16–25). A poliszulfidok ezen a hatásait megszünteti a *Trpa1* vagy *Sstr4* gén kiütése (12). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a poliszulfidok fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását legalább részben a TRPA1 receptor aktiválásával fejtik ki. A jótékony hatásaik ellenére a szerves poliszulfidok nem alkalmasak gyógyszernek, mivel nagyon reaktív és instabil molekulák. Adagolásuk nagyon nehéz akár közvetlen bejuttatással, akár endogén szintézis által H_2S donor bejuttatásával (pl. GYY4137). Így fordult a figyelmünk a biológiailag hasonló hatású, de sokkal stabilabb szerves poliszulfidok felé, mint a dimetil-triszulfid (DMTS), a diallil-triszulfid (DATS) és a diallil-diszulfid (DADS) felé, amelyek a fokhagymában természetes módon megtalálhatóak (12,15,110–114).

A szerves poliszulfidok molekuláris hatásmechanizmusát már széleskörben kutatják, a szervesekéről azonban még nagyon keveset tudunk. Ezért a kutatómunkánk során az első lépésként azt tűztük ki célul, hogy azonosítsuk a szerves poliszulfidok kötőhelyét a TRPA1 receptoron helyspecifikus mutagenézis segítségével. A humán TRPA1 28 ciszteinje közül megvizsgáltuk az elektrofil agonisták konvencionális kötőhelyét alkotókat az N-terminális doménon (C621, C641 és C665) (115–118), illetve a transzmembrán régióban elhelyezkedő fehérjefelszíni ciszteineket, amelyek feltételezhetően kötőhelyül szolgálnak az erősen hidrofób agonistáknak (C727 és C834) (**3.1. ábra**) (119,120). Sikeresen létrehoztunk olyan TRPA1 mutáns változatokat, amelyeknek csökkent vagy teljesen megszűnt a szenzitivitása a szerves poliszulfidokkal szemben, de más funkciók sértetlenek maradtak (pl. a nem-elektrofil agonisták és antagonisták hatása). A mutáns receptorok kötési tulajdonságait előzetesen *in silico* molekuláris dokkolási technikával vizsgáltuk. A funkcionális változásokat *in vitro* módszerekkel vizsgáltuk: kalcium-érzékeny fluoreszcens áramlási citometriával, radioaktív ⁴⁵Ca folyadék szcintilláció számolással és *whole-cell patch-clamp* technikával.

A TRPA1 receptor szerkezete



3.1. ábra: A TRPA1 receptor homotetramer fehérje egy alegységének a szerkezete. A transzmembrán doméneket (TM), az intracelluláris teret (Intra), az extracelluláris teret (Extra), a peptid N-terminálisát (N), és a peptid C-terminálisát (C) jelöltük az ábrán. A jelölt aminosav rövidítések: C= cisztein, G = glutamin, I = izoleucin, K = lizin, S = szerin, T = treonin, Y = tirozin.

3.2. Célkitűzés

Az endogén, túlnyomóan szerves poliszulfidok (pl. Na-szulfid) kötőhelye már ismert a TRPA1 receptoron (121), de az exogén szerves poliszulfidok kötőhelye még feltérképezésre szorul. Ehhez olyan mutáns TRPA1 receptor változatot szeretnénk létrehozni, amelyet nem aktiválnak a szerves poliszulfidok, de más kötőhelyű agonisták (pl. karvakrol, timol, mentol) igen.

3.3. Anyag és módszer

3.3.1. A DMTS, DADS és DATS számítógépes dokkolása a TRPA1 receptorra

A számítógépes modellezést és kalkulációkat Dr. Zsidó Balázs Zoltán és Dr. Hetényi Csaba végezték.

A dimetil-triszulfidot (DMTS), diallil-diszulfidot (DADS) és diallil-triszulfidot (DATS) a *FITTED* szoftver *Sketcher 2D* eszközével szerkesztettük meg és a *CONVERT* eszközzel konvertáltuk mol2 fájlformátumba. A ligandok további előkészítését a *FITTED* szoftver SMART eszközével végeztük (122–124). A torziót minden forgásra képes kötés esetén engedélyeztük, hozzárendeltük az AMBER (125) atomtípusokat és hozzáadtuk a Gasteiger-Hückel (126) részleges töltéseket. Ugyanezeket a ligandokat előkészítettük AutoDock (*RRID:SCR_012746*, (127)) kalkulációkra is, ahogyan azt a korábbi publikációinkban már kifejtettük (128–131). Röviden: a struktúrákat *Maestro* (132) szoftverben készítettük, az energia-minimalizálást és a Gasteiger-Marsilli részleges töltések hozzáadását *OpenBabel* (*RRID: SCR_014920*) szoftverrel végeztük (133).

A ligandmentes TRPA1 receptorban az atomok elhelyezkedését (koordinációját) a *the Worldwide Protein Data Bank* (*wwPDB*, *RRID:SCR_006555* (134)) adattárából szereztük meg, a 6V9W hozzáférési kóddal azonosított fájlként (135). Mivel a fehérje négy azonos peptidláncból szimmetrikusan áll össze (homotetramer), ezért csak egy ilyen alegységet használtunk a számításokhoz, hogy csökkentsük a számítógépek igénybevételét. A ligandok úgy kötődnek egy-egy alegységhez, hogy azt a többi alegység nem befolyásolja. A hiányzó atomokat és csoportokat a *SWISS MODEL* (136) segítségével építettük fel, az energia-minimalizálást pedig *GROMACS* (137) szoftverrel végeztük. A legmeredekebb süllyedés optimalizálás konvergencia küszöbét 103 kJ mol⁻¹ nm⁻¹-re, a konjugált grádiens optimalizálását pedig 10 kJ mol⁻¹ nm⁻¹-re állítottuk be. AMBER99SB-ILDN erőteret (125) használtunk a kalkulációkhoz, és a nehézatomokra pozíció megkötésére a 103 kJ mol⁻¹ nm⁻² erő állandót használtuk. Ugyanezt az előkészítést végeztük a C621S mutáns (6PQQ) és holo (6PQP) receptor esetében, amiket a PDB adatbázisból szereztünk (138). A holo receptor olyan formában volt elérhető, ahol a benzil-izotiocianát (BITC) a C621 aminosavhoz kovalensen kötődött, így erről eltávolítottuk a BITC-t majd a hidrogén atomot visszaállítottuk a TRPA1 ciszteinen a kalkulációk előtt. A *FITTED* szoftver *ProCESS* eszközével tovább optimalizáltuk a célmolekulákat, ehhez az eredeti beállításokat használtuk (122). Az AutoDock esetében a

hozzáadott hidrogén atomokat és részleges töltéseket kihagytuk az energia-minimalizálásból. A 6PQQ apo receptor S621A tovább mutálását a *PyMol* (139) szoftverrel végeztük. A kovalens dokkolási kalkulációkat a *FITTED* szoftverrel végeztük. A kovalensen kötődő aminosav oldallánc (C621 vagy S621) és a szomszédos lúgos oldallánc (P622) a program grafikai felhasználói felületen illesztettük helyre. A négyzetes középérték (RMSD) számítását a krisztallográfias és reprezentatív ligandum konformációk között végeztük, ha elérhetőek voltak ezek az értékek. Minden mást az eredeti beállításon végeztünk. Minden ligandumot 10 dokkoláson futtattunk végig, és az így készült ligandum konformációkat a kalkulált kötési szabad entalpia értéke (ΔG_{kalk}) alapján rangsoroltuk.

3.3.2. Szerves poliszulfid szintézis

László Szabolcs végezte a DADS és DATS szerves poliszulfidok szintézisét, amelyek a DMTS-sel ellentétben nem könnyen beszerezhetőek.

3.3.2.1. Anyagok

A dimetil-triszulfidot, ként, nátrium-szulfidot, ammónium-hidroxidot, etanolt és aktív szenet a magyarországi *Reanal Zrt.*-től szereztük be. A *Sigma-Aldrich*-től vásároltuk a ciszteint (168149), tetrabutil-ammónium-jodidot (140775) és allil-bromidot (337528). A vásárolt anyagokat előzetes tisztítási lépések nélkül használtuk.

3.3.2.2. Műszerek

A két szerves poliszulfid szintetizálásához Yuan és mstai. (140) protokolljának módosított változatát használtuk. A publikációban szereplő fázis transzfer katalizátornál mi hatékonyabbat tudtunk használni, így egyszerűbb eszközökkel és energiatakarékosabb módon vittük végbe a reakciót a termék tisztaságának megtartása mellett. Az olvadáspontot *Buchi B-535* műszerrel mértük. Az infravörös fényelnyelési spektrumot a *Perkin Elmer Spectrum Two* Fourier-transzformációs infravörös spektroszkóppal (FTIR) mértük, amit *Universal Attenuated Total Reflectance Accessory* (UATR) fejjel egészítettünk ki. A tömegspektrumot (MS) GC/MS és a szintetizált anyagok összetételének analízisét QP-2010 spektrométerrel (EI, 70 eV) mértük. ZB5-MSI kapilláris csöveket használtunk, ami 30 m hosszú és 0,25 mm átmérőjű. A következő beállításokat használtuk: a kapilláris cső 80 °C hőmérsékletről indult, majd 250 °C-ig emeltük. Héliumot használtunk hordozógázként, amit 1 ml/perc lineáris áramoltatáson tartottunk.

3.3.2.3. *Diallil-diszulfid és diallil-triszulfid*

Mindkét vegyület a *Yuan és mtsai.* (140) által publikált protokoll módosított változata szerint készültek. Első lépésként a nátrium-diszulfid és a nátrium-triszulfid oldatokat készítettük elő kénnel és nátrium-szulfiddal a következő képpen: diallil-diszulfidhoz: 6,4 g (0,2 mól) kén, 48 g (0,2 mól) nátrium-szulfid; diallil-triszulfidhoz pedig: 6,4 g (0,2 mól) kén, 24 g (0,1 mól) nátrium-szulfid; és ezeket feloldottuk 100 ml desztillált vízben egy kerek aljú főzőlombikban. Az oldatot folyamatos keverés alatt tartottuk egy napig szobahőmérsékleten, majd szűrőpapíron átszűrtük. Hozzáadtunk 0,3 g tetrabutyl-ammónium-jodidot a vörösesbarna oldathoz fázistranszfer-katalizátornak. Diallil-diszulfidhoz 363 g (0,3 mól) allil-bromidot adtunk az oldathoz; diallil-triszulfidhoz pedig 18,2 g (0,15 mól) allil-bromidot adtunk az oldathoz cseppenként 20 perc alatt, és közben a reakcióelegy hőmérséklete nőtt. A hozzáadást követően jégen hűtöttük a keveréket. A keletkezett keveréket 300 ml éterrel vontuk ki. A szerves fázist vízmentes MgSO₄ segítségével szárítottuk egy éjszakán keresztül. Ezt egy forgó párologtatóban, nyomás alatt, keringetett levegővel végeztük, hogy eltávolítsuk az oldószert. A megmaradt fázist végül gyenge vákuumban desztilláltuk.

Diallil-diszulfid: a frakciót 45-60 °C-on és 0,8 torr-on gyűjtöttük. 25,8 g olajat kaptunk, aminek világos sárga színe és erős fokhagyma szaga volt. A diallil-diszulfid hozama 88%, tisztasága (gázkromatográfiás tömegspektrométer, GC-MS) 90% volt (**3.1. melléklet ábra**). A funkciócsoportokat FTIR segítségével azonosítottuk (**3.2. melléklet ábra**): (UATR, cm⁻¹): 3081 (=C-H); 3009 (-CH₂); 2979 (-CH₂); 1634 (C=C); 1422 (C-S);

Diallil-triszulfid: a frakciót 90-110 °C-on és 1,0 torr-on gyűjtöttük. 5,1 g olajat kaptunk, aminek világos sárga színe és erős fokhagyma szaga volt. A diallil-triszulfid hozama 37%, tisztasága (GC-MS) 63,5% volt (**3.3. melléklet ábra**). A funkciócsoportokat FTIR segítségével azonosítottuk (**3.4. melléklet ábra**): (UATR, cm⁻¹): 3081 (=C-H); 3009 (-CH₂); 2979 (-CH₂); 1634 (C=C); 1422 (C-S);

A 90% DADS 10% DATS-ot tartalmazott, a 63,5% DATS pedig 36,5% DADS-ot tartalmazott. Nem volt más kontamináció a szintetizált vegyületekben.

3.3.3. *A TRPA1 helyspecifikus mutagenézise PCR technikával*

A helyspecifikus mutagenézis tervezését és kivitelezését én végeztem.

Kutatócsoportunk már egy korábbi munka során elkészítette a humán TRPA1 cDNS-t hordozó pT31-hTRPA1 expressziós plazmidot (12). Ezt a vektort használtuk a kísérleteink során a WT TRPA1 expresszáló sejtvonalak és a mutáns TRPA1 változatok létrehozásához. Ez

a plazmid egy *Sleeping Beauty 100* transzpozonon belül hordozza a humán WT TRPA1 receptort kódoló cDNS-t, ami az 5' végén egy citomegalovírus (CMV) promóter hajt meg, 3' végén pedig egy polyA terminációs szekvencia zárja le. Szelektív markereknek ampicillin, kanamycin/neomycin/geneticin (G418) rezisztencia géneket használtunk.

Az egyszeresen mutáns TRPA1 változatokat a pT31-hTRPA1 plazmidból kétlépéses mutagén PCR reakcióval hoztuk létre. Ezekhez TAdvanced Twin (846-2-070-2xx, Analytik Jena) PCR készüléket és Q5 Hot Start High-Fidelity DNS polimeráz enzimet (M0493, New England Biolabs) használtunk a gyártó előírásainak megfelelően. Minden primert a PrimerBLAST (RRID: SCR_003095, (76)) és Integrated DNA Technologies (IDT) OligoAnalyzer Tool (RRID:SCR_001363, (141)) web-es eszközök segítségével terveztük meg, és az IDT szintetizálta nekünk. A mutációkat hordozó primereket úgy terveztük meg és készítettük el, hogy az adott cisztein kodonját kicseréltük alaninéra. Ezt elvégeztük minden célzott cisztein aminosav (C621, C641, C665, C727, C834) esetében, mind *forward*, mind *reverse* irányú primereket létrehozva (**3.1. melléklet táblázat**). A CysF2 és CysR2 terminális primereket (**3.1. melléklet táblázat**) úgy terveztük meg, hogy a PCR termék a végeinél majd egy-egy egyedi restriktív endonukleáz hasítóhely (BstEII az 5' végéhez közel és BbvCI a 3' végéhez közel) foglaljon magába. Az első PCR (**3.2.A melléklet táblázat**) során a mutációs primereket a terminális primerekkel párosítottuk két külön reakcióban (pl. CysF2 és C621A-R; C621A-F és CysR2), így a tervezett PCR terméket nem egészben, hanem két darabban kaptuk meg (**3.4.A ábra, lásd a 3.4.3. eredményeknél**). A második PCR (**3.2.B melléklet táblázat**) során ezt a két PCR termék darabot egyesítettük a terminális primerek (CysF2 és CysR2) segítségével (**3.4.B ábra**). Ezt a végső PCR terméket és az intakt pT31-hTRPA1 plazmidot egymás után emésztettük a BstEII-HF (R3162, New England Biolabs) és BbvCI (R0601, New England Biolabs) restriktív endonukleáz enzimekkel (**3.4.C ábra**), majd agaróz gélelektroforézis segítségével elválasztottuk a DNS fragmenteket, és ezeket *NucleoSpin DNA Gel and PCR Clean-up kit* (740609.50, Macherey-Nagel) segítségével tisztítottuk meg. Az „üres” plazmidba (8192 bp), amelyből már hiányzott a TRPA1 kódoló szakaszának egy része, beillesztettük az elkészült új, immár mutációt hordozó megfelelő TRPA1 kódoló szakaszt, és T4 DNS ligáz (M0202L, New England Biolabs) segítségével ligáltuk (**3.4.D ábra**).

Dupla és tripla mutánsokat ugyanígy készítettük, csak nem a WT TRPA1 gént hordozó plazmidból indultunk ki, hanem már egyszeres vagy kétszeres mutánsból. Minden mutáns TRPA1 változatot Cys-F és Cys-R primerekkel Sanger szekvenáltattunk ellenőrzés céljára (Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpont), hogy meggyőződjünk róla, hogy csak a tervezett mutációkat hordozzák az új plazmidok.

3.3.4. Plazmid amplifikáció *Escherichia coli* baktériumban

A plazmid felszaporítását és tisztítását én végeztem.

Kémiaiilag kompetens DH5 α *E. coli* baktérium sejteket a kalcium-klorid módszerrel hoztuk létre (142). 10 μ l ligálásból származó plazmidot adtunk 100 μ l kompetens sejthez és 30 percig inkubáltuk jégen. A sejteket hősokkal transzformáltuk 42 °C-on 60 másodpercig, majd hozzáadtunk 1 ml LB tápoldatot és 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk folyamatos rázatás mellett (200 rpm). Ezt követően 200 μ l-t szélesztettünk 100 μ g/ml Ampicillin (Amp) szelekciós LB-agar táptalajra, és egy napig inkubáltuk 37 °C-on. A kinőtt telepeket (TRPA1 variációnként legfeljebb 6-ot) új Amp-LB lemezekre oltottuk és egy újabb napig inkubáltuk 37 °C-on. A plazmidokat *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0503, ThermoFisher Scientific)* segítségével izoláltuk. A minták DNS koncentrációját Jenway 7310 UV/Vis spektrofotométerrel mértük. A plazmidokat először ellenőrző emésztéssel teszteltük, amelyekhez külön-külön SpeI (R0133), PvuII (R0150), PstI (R0140) és EcoRI (R0101) restriktációs endonukleázokat használtunk (*New England Biolabs*). A megfelelő plazmidokat a Cys-F és Cys-R primerek (**3.1. melléklet táblázat**) használatával Sanger szekvenálással is ellenőriztük (Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpont). A szekvenálási nyers adatokat *ApE A plasmid Editor (RRID: SCR_014266)* szoftverrel és *Nucleotide-BLAST (RRID: SCR_001598, NIH, NCBI)* webes eszközzel elemeztük, és az eredeti pT31-hTRPA1 plazmiddal vetettük össze. Azok a plazmidok feleltek meg, amelyek csak a tervezett mutációt hordozták. Az így kiválasztott plazmidokat hordozó baktériumokat nagy mennyiségben növesztettük: 200 ml Amp-LB tápoldatban 1 napig folyamatos rázatás mellett (200 rpm). A nagy mennyiségű plazmid DNS-t NucleoBond Xtra Maxi Plus EF Kit (740426.50, *Macherey-Nagel*) segítségével izoláltuk, majd a DNS koncentrációt Jenway 7310 UV/Vis spektrofotométerrel mértük. Végül a plazmidok koncentrációját egységesen 250 ng/ μ l koncentrációra állítottuk be a további kísérletekhez.

3.3.5. CHO transzfecció

A CHO sejtek tranziens transzfeccióját én és Dr. Sándor Zoltán végeztük.

A CHO sejtekbe (RRID: CVCL_0213) TurboFect (R0532, *ThermoFisher Scientific*) transzfecció reagens segítségével transzfeccióztuk a létrehozott TRPA1 változatokat hordozó plazmidokkal. A TurboFect-DNS-tápoldat arányát illetően szükség volt egy kis változtatásra a gyártói útmutatóhoz képest. Az optimális arány beállításához zöld fluoreszcens proteint (GFP) expresszáló pZS5 vektort használtuk. Az így tapasztalt optimális arány a 10 μ l TurboFect és 10 μ l plazmid (2,5 μ g DNS) volt 1 ml CHO sejthez, amik a 24 lyukú lemezen 50%-ban nőttek be

a lemez alját (~100 000 sejt lyukanként); a gyártó által ajánlott 2 µl TurboFect és 1 µg plazmid helyett. A TurboFect-et és a plazmidot 90 µl OptiMEM (*ThermoFisher Scientific 31985062*) tápoldathoz kevertük alapos vortex-szel és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 1 ml DMEM teljes tápoldatban növesztett CHO sejthez adtuk, és inkubáltuk egy éjszakán át 37 °C-on 5% széndioxid jelenlétében. Mivel ez csak egy tranziens transzfekció, ezért a sejtek csak a következő 24-48 órában expresszálták optimálisan a TRPA1 receptort, ezt követően drasztikusan csökkenni kezdett a receptor szintje és a sejtek alkalmatlanná váltak a kísérletek elvégzésére. Minden kísérlethez előző nap frissen transzfectált CHO sejteket használtunk.

3.3.6. Immuncitokémia

A sejtek tárgylemezre centrifugálását én, Dr. Sándor Zoltán és Dr. Kemény Ágnes végeztük. A sejtek fixálását és az immuncitokémiát Hírné Perkecz Anikó és Ordonicsné Szombati Veronika asszisztensek végezték. Az eredmények kiértékelését én végeztem.

A 24 lyukú lemezen 1 ml teljes DMEM-ben növesztett transzfectált (pT31-hTRPA1: WT, C621A, C641A és C834A) és nem transzfectált CHO sejteket 5 percig emésztettük 200 µl 0,05% tripszin-EDTA (*15400054, ThermoFisher Scientific*) oldatban emésztettük. Szigorúan minden sejtvonalat pontosan 5 percig tripszinezttük, hogy a sejt felszíni TRPA1 receptor lebomlását minimalizáljuk, és a sejt vonalak közötti különbségeket ne befolyásoljuk. Ezt követően 1 ml DMEM tápoldatban felfuszpendáltuk a sejteket, majd CytoSpin 4 (*A78310250, ThermoFisher Scientific*) centrifugában felvittük a sejteket egy-egy tárgylemezre. A mintákat háromszor mostuk 1x PBS-ben, majd az endogén peroxidáz aktivitást 0,3% H₂O₂-vel blokkoltuk. A blokkoló puffer 2% BSA-t (*bovine serum albumin, A7030, Sigma-Aldrich, Merck KGaA*) és 0,3% Triton X-100-at (*X100, Sigma-Aldrich, Merck KGaA*) tartalmazott. A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk egy éjszakán át poliklonális humán TRPA1 elleni nyúl IgG antitesttel (*OST00061W, ThermoFisher, USA*), 1:6000 arányban hígítva a blokkoló pufferben. Tris pufferelt sóoldat (*tris-buffered saline - TBS*) mosásokat követően a mintákat 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten peroxidáz kapcsolt poliklonális nyúl IgG elleni kecske IgG antitesttel (*31460, ThermoFisher Scientific, USA*), 1:5000 arányban hígítva a blokkoló pufferben. Az előhívást nikkell (II)-szulfát-hexahidrát/3,3'-diaminobenzidintetrahidroklorid (*Sigma-Aldrich, USA*) Tris-HCl oldatával végeztük. A mintákat hagytuk kiszáradni egy éjszakán át szobahőmérsékleten. Ezt követően növekvő etanol-koncentrációval (50%, 70%, 96% és abszolút etanol, 5-5 percig) dehidratáltuk, majd lefedtük DPX-szel (*Sigma-Aldrich, USA*), és hagytuk újra megszáradni. A képeket Nikon Microphot-FXA (*Nikon, Japan*),

mikroszkóppal készítettük. A képeket *GIMP 2.10.30* (143) szoftverrel elemeztük ki úgy, hogy elosztottuk a 186-nál alacsonyabb fényességértékű pixelek számát (összes sejtet lefedő képterület) a 131-nél kisebb fényesség értékű pixelek számával (a jól festődött, sötét sejtek, amelyeket sikeresen transzfektálnak tekintünk), majd az így kapott adatokat *GraphPad Prism 8* (RRID: SCR_002798) szoftverrel elemeztük. A TRPA1 változatokat expresszázó sejtvonalak eredményeit a negatív kontrollhoz, azaz a nem transzfektált sejtekhez viszonyítottuk.

3.3.7. Kalcium érzékeny fluoreszcencia mérés áramlási citometriával

Az áramlási citometriát én és Dr. Sándor Zoltán végeztük. Az eredményeket én értékeltem ki.

Minden transzfektált CHO sejtvonalból 1 ml-t (~100 000 sejtet) 4 µl Invitrogen Fluo-4, AM (*Invitrogen, ThermoFisher Scientific F14201*) sejtmembrán permeábilis kalcium érzékeny zöld fluoreszcens festékkel festettük 1 óra alatt 37 °C-on inkubálva. A mérések során mintánként 100 µl CHO sejtet új csőbe tettünk és 900 µl hatóanyagot adtunk. A hatóanyagokat extracelluláris folyadék (ECS) pufferben oldottuk, a kontroll mintához csak ECS-t adtunk. A hatóanyagok szerves poliszulfidok (DMTS, DADS és DATS) és más elektrofil agonisták (AITC, JT010 és fahéjaldehid), nem elektrofil agonisták (karvakrol, mentol és timol) és antagonisták (HC-030031 és A-967079) voltak. A hatóanyagokat több koncentrációban is kipróbáltuk, de a legtöbb esetben a 100 µM-ban használtuk, kivéve a rendkívül erős hatású irreverzibilis agonista JT010-et, amit a többi agonistához képest mindig 1000x kisebb koncentrációban használtunk (általában 100 nM-ban).

A hatóanyagok hozzáadását követően azonnal mértük a sejtek zöld fluoreszcenciájának (excitáció: 488nm, emisszió: 516 nm, filter: 527/30) *CyFlow Space Flow Cytometer (05-5006, Sysmex Partec, Germany)* áramlási citométerrel. Az eredményeket *FloMax* (RRID: SCR_014437) és *GraphPad Prism 8* (RRID: SCR_002798) szoftverekkel elemeztük ki. Az így kapott eredmények a karvakrolhoz viszonyítva normalizáltuk a következő féleképpen:

$$\text{relatív TRPA1 aktiváló hatás} = \frac{I_{\text{elektrofil agonista}} - I_{\text{kontroll}}}{I_{\text{karvakrol}} - I_{\text{kontroll}}}$$

ahol az I a sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitása (512-532 nm) mintaként. Elektrofil agonista a DMTS, 90% DADS, 63,5% DATS, AITC és JT010 voltak. A kontroll puffer az ECS volt.

3.3.8. A TRPA1 változatokat expresszázó CHO sejtek radioaktív kalcium-45 felvételének mérése folyadék szcintilláció számolással

A folyadék szcintilláció mérést én, Dr. Szőke Éva és Dr. Sándor Zoltán végeztük. Az eredményeket én értékeltem ki.

A TRPA1 változatokkal tranziensen transzfektált CHO sejteket addig növesztettük 24 lyukú lemezen, hogy 70%-ban fedjék a lemez alját, majd 5 percig emésztettük őket 200 µl tripszinben. A tripszin óvatos leszívása után a sejteket felszuszpendáltuk 300 µl DMEM teljes tápoldatban és 15 µl-enként 18 új lyukba tettük 72 lyukú *microbatch* lemezre, majd egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on 5% széndioxidban, hogy legyen elég idejük letapadni az új lemezre. A sejteket az inkubátoron belül külön párologtató dobozban tartottuk, nehogy kiszáradjanak. Másnap a sejteket 5-ször mostuk kalcium mentes Hank's oldatban (pH 7,4), majd ugyanebben a pufferben oldott 10 µL 200 µCi/mL ⁴⁵Ca izotóp (*1.3Ci/mmole, NEZ013001MC, PerkinElmer*) és hatóanyag keverékében inkubáltuk 2 percig szobahőmérsékleten. A hatóanyagok 100 µM DMTS (*Sigma-Aldrich W327506*), 90% DADS, 63,5% DATS, AITC (*377430, Sigma-Aldrich*) és karvakrol (*282197, Sigma-Aldrich*) voltak. Kontrollnak 10 µL 200 µCi/mL ⁴⁵Ca izotópot tartalmazó Hank's oldatot használtunk. Ezt követően a mintákat 5-ször mostuk jéghideg ECS pufferrel, majd ezt leitattuk, és a sejteket teljesen megszártítottuk 15 perc alatt 37 °C-on inkubálva. A sejtek által megtartott izotópot mintánként 15 µl 0,1% SDS-sel nyertük ki, és 2 ml *Ultima Gold XR scintillation liquid (6013119, Packard BioScience)* szcintillációs folyadékhoz kevertük. A radioaktív bomlások számát Packard Tri-Carb 2800 TR szcintilláció számlálóval mértük. Az így kapott eredményeket a karvakrolhoz viszonyítva a normalizáltuk a következő féleképpen:

$$\text{relatív TRPA1 aktiváló hatás} = \frac{\text{CPM}_{\text{elektrofil agonista}} - \text{CPM}_{\text{kontroll}}}{\text{CPM}_{\text{karvakrol}} - \text{CPM}_{\text{kontroll}}}$$

ahol a CPM (*count per minute*) a percenkénti radioaktív bomlások számát jelenti. Az elektrofil agonisták a DMTS, 63,5% DATS, 90% DADS és AITC voltak. 200 µCi/mL ⁴⁵Ca izotópot tartalmazó Hank's oldatot használtunk kontrollnak.

3.3.9. Whole-cell patch-clamp (egész sejtés folt-feszültségzár)

Az egész sejtés folt-feszültségzár (whole-cell patch-clamp, WCPC) méréseket Fehér Ádám, Dr. Papp Ferenc és Dr. Varga Zoltán végezték, a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofiziológiai és Sejtbiológiai Intézetben.

Feszültségzárba (*voltage-clamp*) szorított sejtek egész sejtés ionáramát kézi patch-clamp elektrofiziológiai módszerrel, a standard protokoll szerint mértük Axopatch 200B erősítővel. Az így kapott jeleket Digidata 1550B (*Molecular Devices, San Jose, CA, USA*) alacsony zajszintű adatgyűjtő rendszerrel digitalizáltuk, majd az adatokat *pClamp10.7* (*Molecular Devices, San Jose, CA, USA*) szoftverrel dolgoztuk fel. Az ionáramot az erősítő beépített analóg 4-pólusú Bessel alacsony-áteresztő (*low-pass*) filterével szűrtük, és mintát 5 kHz-en vettünk. Analízis előtt az adatokat tovább szűrtük digitálisan ötponos *boxcar* simítással (*five-point boxcar smoothing*). A GFP-pozitív TRPA1 ko-transzfektált CHO sejteket (kínai hörcsög petefészek epitél sejtek) egy Nikon Eclipse TE2000-U (*Auro-science Kft., Budapest, Magyarország*) fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk. A pipettákat GC 150F-15 boroszilikát üvegkapillárisokban (*Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA*) vezettük öt szakaszban, 4-10 M Ω ellenállással. Mérések előtt a sejteket petricsészében tartottuk a következő pufferben: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5,5 mM glükóz, and 10 mM HEPES (pH 7,35; 302–308 mOsmol/kg). A mérések során a *patch* pipettában a belső puffer (*internal solution*) a következő volt: 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, and 2 mM EDTA-Na (Ca²⁺-mentes oldat; pH 7,35; ~300 mOsmol/kg). A mérések során a külső puffer (*external solution*) ugyanaz volt, mint a belső, annyi eltéréssel, hogy 1 V/V% DMSO-t tartalmazott, mivel a karvakrolt is DMSO-ban oldottuk fel a törzsoldathoz. A mérések során a folyadékcsere gravitáció elvén működő perfúziós rendszerrel történt, a folyadéktöbblet folyamatos eltávolítása mellett. Az ionáram csúcsokat 5 másodpercenként mértük 20 ms hosszú szakaszokban +50mV feszültségen, miután végrehajtottunk egy-egy 100 ms-os feszültség emelést (*voltage ramp*) 0 mV-tól +50 mV-ig, a *holding* potenciált 0 mV-ra állítottuk. Az agonisták ionáram indító hatásának mérésére megkerestük azt a feszültségcsúcsot, ami fölé már nem emelkedett további 20 ms alatt. Ha mérhető volt az ionáram emelkedés 100 ms-en belül, akkor telítődésig vizsgáltuk az adott sejtet. Kizárólag azokat az eredményeket fogadtuk el és analizáltuk, amelyeknél megfelelő hatást váltott ki a pozitív kontroll agonista (100 μ M karvakrol) és az antagonistá (50 μ M HC-030031), ugyanis ez bizonyította, hogy a transzfektáció sikeres volt.

Az adatok megjelenítésére és elemzésére a *Clampfit 10.7* (*Molecular Devices, San Jose, CA, USA*) and *GraphPad Prism 7* (*Graphpad, San Diego, CA, USA*) szoftvert használtunk. Az ionáram aktivációt a következő képlettel tudtuk számszerűsíteni:

$$\frac{I_{\text{DMTS}}}{I_{\text{karvakrol}}} = \frac{I_{\text{DMTS csúcs}} - I_{\text{kontroll}}}{I_{\text{karvakrol csúcs}} - I_{\text{kontroll}}}$$

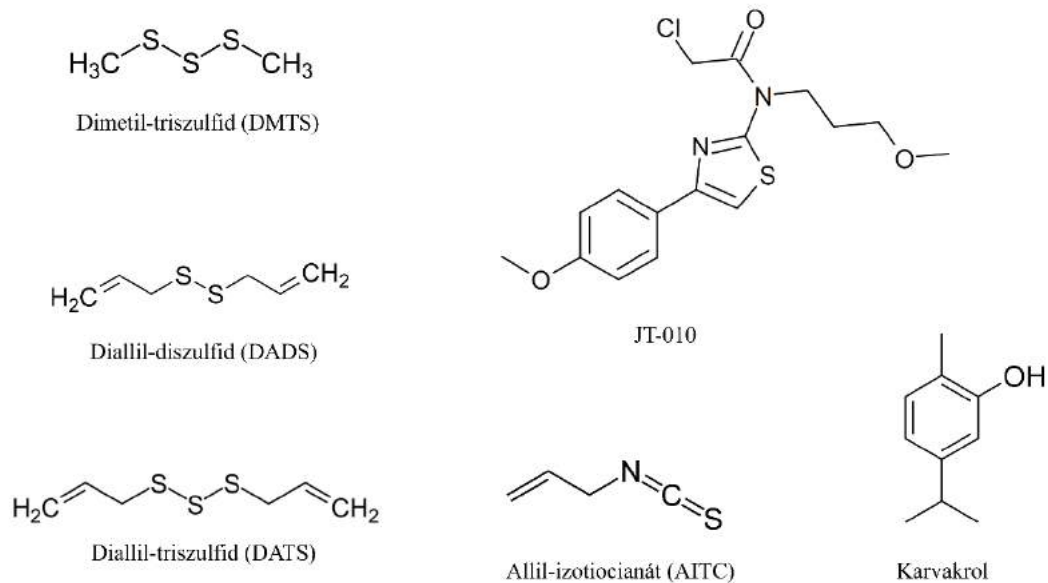
Ahol az I_{DMTS} és $I_{\text{karvakrol}}$ a DMTS vagy karvakrol által aktivált TRPA1 mért ionáramai. A kontroll áram (I_{kontroll}) a DMTS hozzáadása előtt mérhető ionáram volt, az $I_{\text{DMTS csúcs}}$ a 100 μM DMTS jelenlétében mérhető ionáram csúcs volt, a $I_{\text{karvakrol csúcs}}$ pedig a 100 μM karvakrol jelenlétében mérhető ionáram csúcs volt. Ugyanezt a számítást használtuk a többi szerves poliszulfid eredményeinek kiértékelésére is, ahol a DMTS helyett a DADS vagy DATS adatait használtuk. A mutáns TRPA1 variációk így kapott normalizált eredményeit a TRPA1 WT eredményeivel hasonlítottuk össze, ehhez *egyutas ANOVA-t használtunk Dunnet's többszörös összehasonlító teszttel. A szignifikáns különbségeket jelöltük, ha $*p < 0,05$.*

3.4. Eredmények

3.4.1. DMTS, DADS és DATS számítógépes dokkolása a TRPA1 receptorhoz

A TRPA1 receptor DMTS, DADS és DATS ligandum kötő konformációját a ligandum mentes TRPA1 receptor konformáció (6V9W) modelljének célzásával kalkuláltuk ki. A dokkolási számításokat még két mutáns receptoron (6PQQ: a C621S mutáns, és az ebből kialakított C621A), illetve a BITC kötő holo receptoron (6PQP) is elvégeztük, hogy alaposabban megvizsgáljuk a mutációk hatását a ligandum kötésre az atomok szintjén.

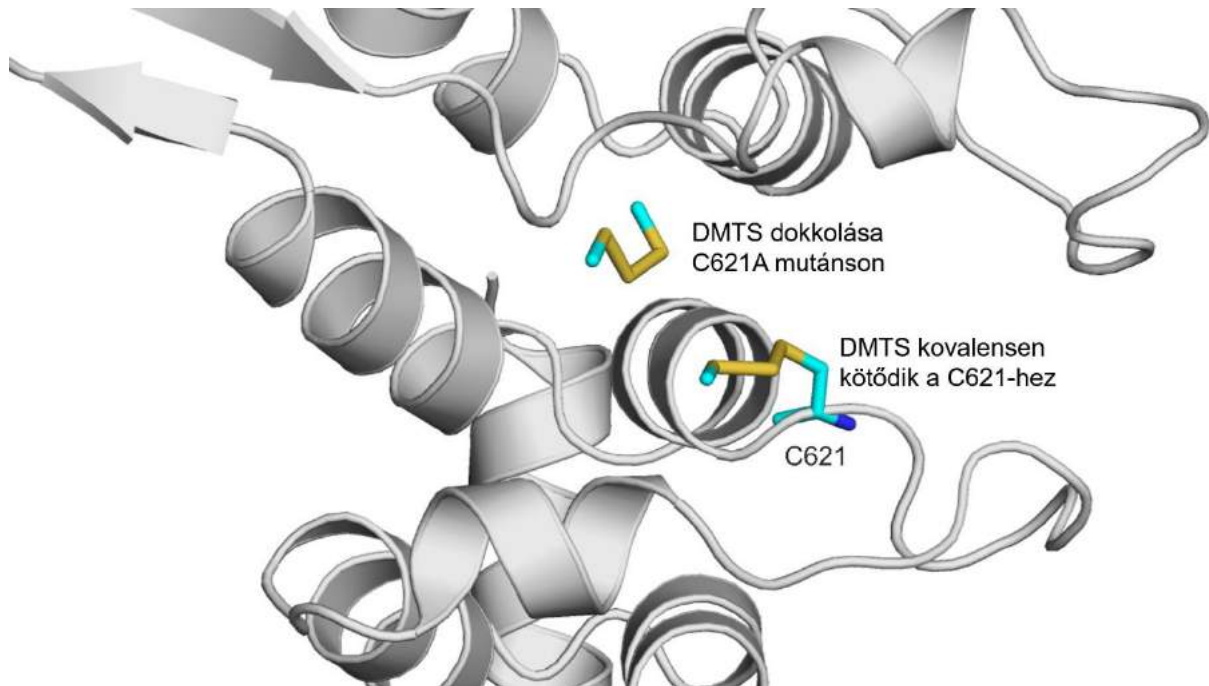
A szerves poliszulfid DMTS, DADS és DATS (**3.2. ábra**) képesek diszulfid kötések kialakítani a TRPA1 ciszteinjeinek kén atomjaival (**3.3. ábra**), de hogy pontosan mely ciszteinek vesznek részt a TRPA1 aktivációjában, az korábban nem volt ismert (144). A ligandum kötés során egy N-terminális hurok (A-hurok, 666-680 aminosav szakasz) elmozdul felfelé (135,145). A jelenlegi munkánk során azt találtuk, hogy ez a hurok elfedi a nukleofil kötőzsebet az apo struktúrában, illetve a P666 és F669 aminosavaknak segítő szerepe van a DMTS, DADS és DATS kötésében. Ezek az interakciók fontos szerepet játszhatnak az A-hurok felemelkedésének elindításában. A holo struktúrában a ligandumoknak az A-hurokkal már nincs interakciójuk (**3.1. táblázat**).



3.2. ábra: A használt TRPA1 agonisták szerkezete. A szerves poliszulfid dimetil-triszulfid (DMTS), diallil-diszulfid (DAD) és diallil-triszulfid (DATS) reverzibilis elektrofil agonisták. JT010 egy nagyon potens és szelektív, irreverzibilis elektrofil TRPA1 agonista. Allil-izotiocianát (AITC), vagy közismert nevén a mustárolaj egy potens, reverzibilis elektrofil TRPA1 agonista. A karvakrol egy nem elektrofil TRPA1 agonista egy másik kötőhellyel, így mutációk nem befolyásolhatják a hatását, ezért használtuk pozitív kontroll aktivátorként. A szerkezeti ábrákat *ChemDraw Direct* (RRID: SCR_016768) webes eszközzel készítettük.

A kiszámított kötési szabad entalpiákat (ΔG_{kalk} , **3.2. táblázat**) illetően fontos megjegyeznünk, hogy a receptor aktivációja szempontjából nem a ligandum kötési affinitás értéke a fontos, hanem a kovalens kötések kialakulásának gyakorisága. (144). Továbbá, a receptor zárt (ligandum mentes) konformációja nem alkalmas a ligandumok kötésére, mivel a DMTS és DATS minimális kötési pozíciójában is túl messze van a C621 kén atomjától (**3.3. melléklet táblázat**), és a molekuláknak valahogyan meg kell találniuk az utat, hogy az A-hurok alatt bejussanak a kovalensen kötő pozícióba. A ΔG_{kalk} mindhárom szerves poliszulfid esetében hasonlóan erős kötések mutat a különböző ciszteinekhez (**3.2. táblázat**), amik közül a DATS-nak vannak a legnagyobb negatív értékei a nagy molekulamérete miatt. Ahogy várható volt, jelentős csökkenést tapasztaltunk ΔG_{kalk} -ban a C621A mutáció esetében a hiányzó kovalens kötés hatására (**3.2. táblázat**), ha a vad típusú holo és apo receptorokhoz viszonyítjuk (**3.2. táblázat és 3.4. melléklet táblázat**). Továbbá, az **3.1. táblázatban** listázott interakciók azt

mutatják a C621A esetében, hogy a DMTS a C621-től távol foglal helyet egy kötőzsebben. Ugyanakkor C641 és C665 (gyakori interakciós aminosavak az **3.1. táblázatban**) lehetőséget mutatnak a DMTS-sel történő interakcióra, ha a C621 nem érhető el.



3.3. ábra: A DMTS kovalensen dokkolt kötési pozíciója a natív holo TRPA1-hez (kovalensen kötött a C621-hez) és a DMTS nem kovalensen dokkolt kötési pozíciója a C621A mutáns TRPA1-hez (távolabb helyezkedik el). A DMTS molekuláit pálcikás szerkezettel (*teal*), a fehérjét pedig szürke rajzzal jelöltük.

Táblázatok

	C621	C621A	C641	C665
L609	X	X		
F612	X			
K620	X			
C621	X			
P622	X			
I623	X	X		
T624	X			
L638			X	
D639			X	
F640			X	
C641			X	
M642			X	
L643			X	
N659			X	
K661		X	X	
Y662		X	X	X
L663		X		
Q664		X		X
C665				X
P666				X
T684				X

3.1. táblázat: Az aminosavak interakciója a DMTS kötésében a ciszteinekhez és a C621A mutáns receptorhoz. Csak 3,5 Å távolságon belül elhelyezkedő aminosavakat foglaltunk bele.

	C621	C641	C665	C621A
DMTS	-44.51	-47.01	-44.56	-34.59
DADS	-44.82	-46.01	-44.63	-38.93
DATS	-49.83	-49.86	-52.22	-46.02

3.2. táblázat: A DMTS, DADS és DATS kovalens dokkolása a *FITTED* szoftverrel a három ciszteinhez, amelyek a TRPA1 (6PQP holo struktúra) intracelluláris nukleofil kötőzsebet alkotják. Ugyanezek nem kovalens dokkolása a C621A mutáns receptorhoz. Minden kötési szabad entalpiát kcal/mol mértékegységben adtuk meg.

3.4.2. Szerves poliszulfid szintetizálás

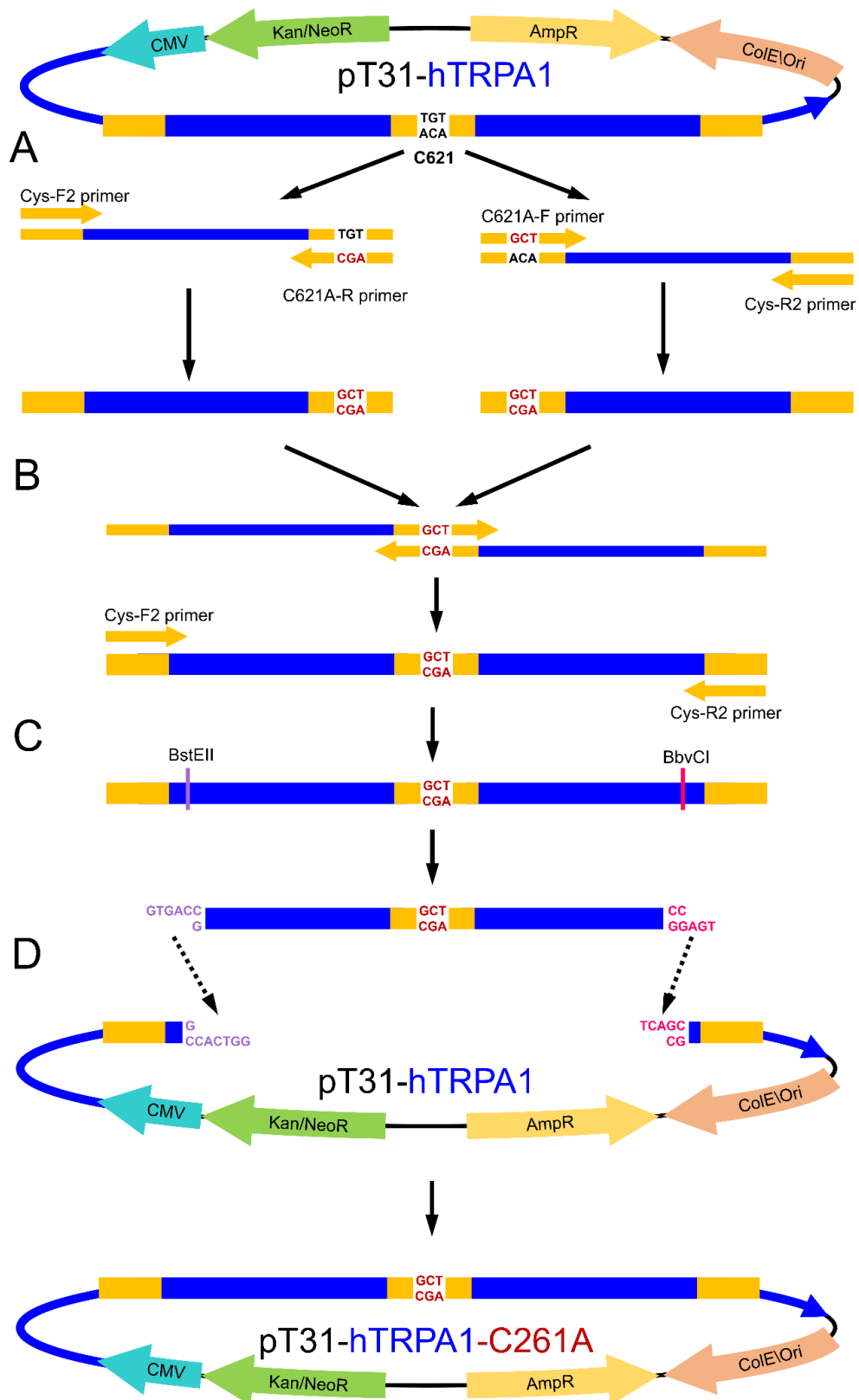
A DADS és DATS szerves poliszulfidok szintetizálására az irodalomban leírt módszer egy módosított változatát használtuk (140). Mi a reakcióhoz egy sokkal hatékonyabb fázis transzfer katalizátort használtunk, így energiatakarékosabban és egyszerűbben tudtuk végrehajtani, de emellett meg tudtuk tartani a termékek tisztaságát is. A GC-MS-el ellenőriztük **(3.1. és 3.3. melléklet ábrák)**, a vegyületek funkciós csoportjait pedig FTIR spektroszkóppal azonosítottuk **(3.2 és 3.4. melléklet ábrák)**. A DADS 90% tisztaságú lett 10% DATS szennyezéssel, a DATS tisztasága pedig 63,5% lett 36,5% DADS szennyezéssel. A termékekben nem volt más szennyezés. Ez a két vegyület azonban nagyon hasonlít egymásra fizikailag és kémiailag, és ezek a természetes forrásukban, a fokhagymaolajban is állandó kísérői egymásnak.

3.4.3. TRPA1 helyspecifikus mutagenézise

Kutatócsoportunk már egy korábbi munka során elkészítette az humán TRPA1 cDNS-t hordozó pT31-hTRPA1 expressziós plazmidot (12). Ezt a vektort használtuk a kísérleteink során a WT TRPA1 expresszáló sejtvonalak és a mutáns TRPA1 változatok létrehozásához. Ez a plazmid egy Sleeping Beauty 100 transzpozonon belül hordozza az humán WT TRPA1 receptor kódoló cDNS-t, amit kifejezetten arra terveztük, hogy a kísérletben használt sejtek genomjába inszertálhassuk a TRPA1 gént, és stabilan expresszáló sejtvonalat hozzunk létre. Ennek ellenére mi csupán tranziens transzfekcióra használtuk, ugyanis így sokkal gyorsabban tudtunk letesztelni a számos TRPA1 változatot, mint ha mindegyikből stabil sejtvonalat készítettünk volna.

A TRPA1 mutáns változatokat ebből a pT31-hTRPA1 vektorból hoztuk létre PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel. A klónozott szakaszt úgy terveztük meg, hogy nagyjából középen helyezkedjen el minden célzott cisztein kodonja, a végeihez közel pedig tartalmazzon egy-egy egyedi restriktációs endonukleáz hasítóhelyet (BstEII az 5' végéhez közel és BbvCI a 3' végéhez közel), hogy az alapján könnyen beilleszthető legyen a klónozott szakasz a plazmidba. Az első PCR során a klónozott szakaszt két részben külön amplifikáltuk fel úgy, hogy a terminális és mutációs primereket párosítottuk (pl. Cys-F2 és C621A-R, illetve C621A-F és Cys-R2) **(3.4.A ábra)**. A második PCR során ezeket a szakaszokat egyesítettük a terminális primerek segítségével (Cys-F2 és Cys-R2) **(3.4.B ábra)**. A teljes klónozott szakaszt és az eredeti pT31-hTRPA1 plazmidot emésztettük BstEII és BbvCI enzimekkel **(3.4.C ábra)**, majd a klónozott, immár mutációt hordozó szakaszt az „üres” vektorba ligáltuk **(3.4.D ábra)**. A többszörös mutáns változatok ugyanígy lettek létrehozva annyi különbséggel, hogy nem a WT

TRPA1-et hordozó plazmidból indultunk ki, hanem már egyszeres vagy kétszeres mutánsból. Minden TRPA1 változatot Sanger szekvenálással ellenőriztünk, és csak azokat használtuk a kísérletezésre, amelyek kizárólag a tervezett mutációt tartalmazták.

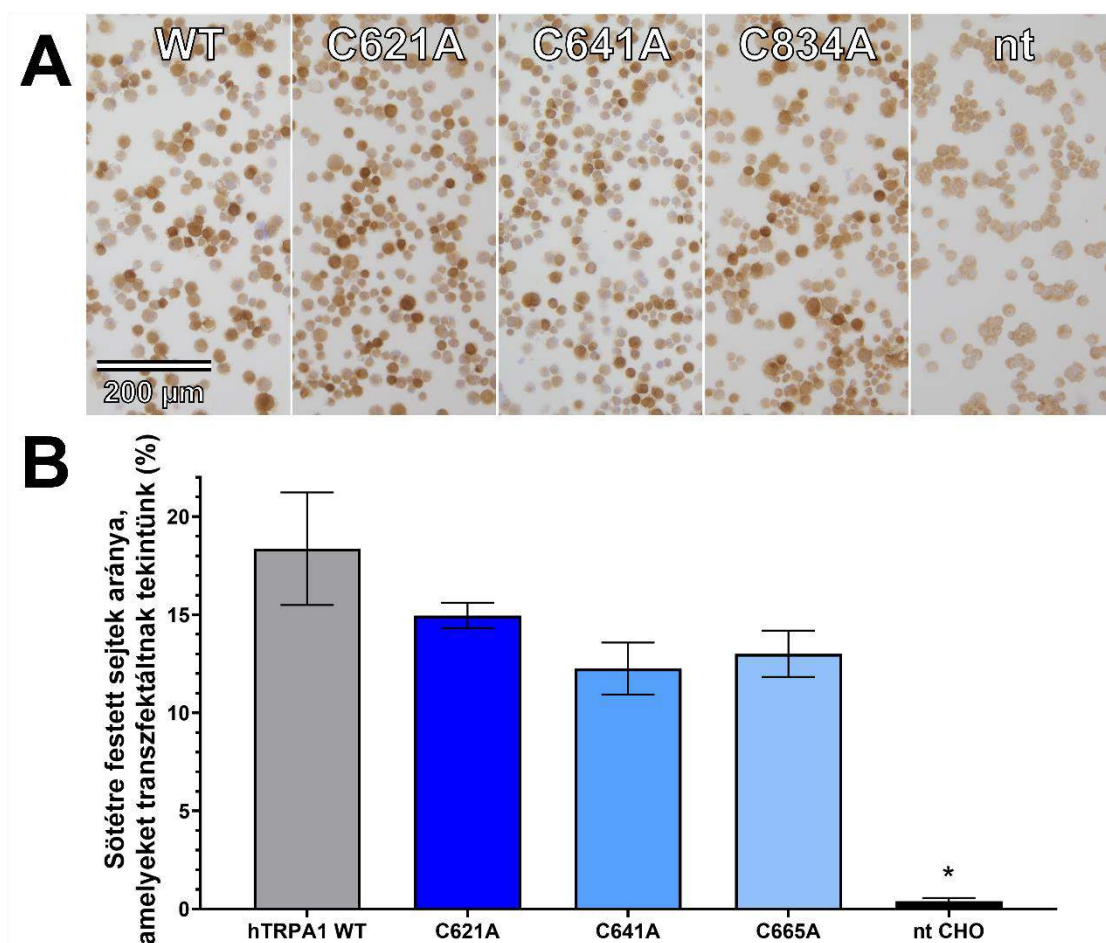


3.4. ábra: A TRPA1 helyspecifikus mutagenézisének folyamata a C621A mutáció példájával szemlélítve. A vad típusú TRPA1 kódoló pT31-hTRPA1 plazmidból kiindulva az első PCR-ral az érintett kódoló szakaszt két darabban külön amplifikáltuk fel a vegyesen összepárosított mutációs és terminális primerekkel (ebben az esetben: Cys-F2 és C621A-R, illetve C621A-F és Cys-R2) **(A)**. A második PCR során ezt a két darabot egyesítettük a terminális primerek (Cys-F2 és Cys-R2) segítségével **(B)**. A mutációt hordozó teljes PCR terméket és az eredeti pT31-hTRPA1 plazmidot a BstEII és BbvCI restriktív endonukleázzal hasítottuk, amelyeknek egyedi hasító helyei vannak a plazmidon **(C)**. A mutációt hordozó PCR terméket az „üres” plazmidba ligáltuk, így létrehozva a mutáns TRPA1 receptort hordozó expressziós vektort **(D)**.

CMV - citomegalovírus promóter; AmpR - ampicillin rezisztencia kazetta; Kan/NeoR - kanamicin és neomicin rezisztencia kazetta; ColE\Ori - Escherichia coli (*E. coli*) specifikus replikációs origó; kék DNS szakasz - TRPA1 cDNS; narancs - primer kötőhelyek; fekete betűs nukleotidok - a 621. cisztein kodonja; piros betűs nukleotidok - a ciszteinről megváltoztatott alanin kodonja (C621A mutáció); lila betűs nukleotidok - a BstEII hasítást követően létrejött tapadós DNS vég; rózsaszín betűs nukleotidok - a BbvCI hasítást követően létrejött tapadós DNS vég.

3.4.4. hTRPA1 expresszió vizsgálata immuncitokémiai módszerrel

A mutációk gátolhatják a fehérje expresszióját. Ennek ellenőrzésére a TRPA1 WT és mutáns receptorok expresszióját a transzfektált CHO sejtekben humán TRPA1 elleni antitest alapú immuncitokémiával, DAB barna festéssel vizualizáltuk. Az így kapott mikroszkópos képeket **(3.5.A ábra)** GIMP szoftverrel elemeztünk, ahol a sötét sejteket alkotó képpontok számát elosztottuk az összes sejtet alkotó képpontok számával **(3.5.B ábra)**. A TRPA1 változatokat expresszáló sejtvonalak eredményeit a negatív kontrollhoz, a nem transzfektált CHO sejtvonalhoz viszonyítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy az humán TRPA1 elleni elsődleges antitest megfelelően specifikus volt, és a nem transzfektált CHO sejtek csak minimálisan festődtek. A hTRPA1 receptor változatok expressziója a WT-hez képest sem szemmel láthatóan, sem statisztikailag nem volt szignifikánsan gyengébb a mutáns. A mutációk tehát nem gátolják a fehérje expresszióját a transzfektált sejtekben, így a vektorok alkalmasak a további kísérletekre. A tranziens transzfekciótól azonban nem várhatunk állandó expressziós szintet, így a további immuncitokémiai expressziós szint vizsgálat helyett inkább egy távoli kötőhelyű, nem elektrofil TRPA1 agonistához, a karvakrolhoz viszonyítottuk a szerves poliszulfidok hatását a további kísérleteinkben.



3.5. ábra: CHO sejtek humán TRPA1 elleni immuncitokémiai festése. Reprezentatív mikroszkópos képek a WT és mutáns hTRPA1 változatokat hordozó és nem transzfektált (nt) CHO sejtek humán TRPA1 elleni immuncitokémiai festésével (A). A mikroszkópos képek szoftveres elemzésével megállapított sötét sejtek aránya, amely a hTRPA1 expresszióval egyenesen arányos (B). A WT és mutáns hTRPA1 változatokat expressziós szintje között nincs szignifikáns különbség, míg a nem transzfektált (nt) CHO sejtek sokkal halványabban festődtek meg. *Átlag \pm SEM, egyutas ANOVA, * $p < 0,0001$; $n = 5$ kép/genotípus.*

3.4.5. A mutációk hatására bekövetkezett TRPA1 funkció változások

TRPA1 receptor egy nem szelektív kation csatorna, ezért az aktivitását követhetjük az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változás alapján. Erre a célra használtuk a Fluo-4 kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometriát és a radioaktív Ca-45 folyadék szcintilláció számolást. A *whole-cell patch-clamp* technikával az agonisták által aktivált ionáramot tudtuk mérni. A legtöbb kísérletben az agonistákat 100 μ M koncentrációban használtuk: DMTS, 90% DADS és 63,5% DATS, AITC és a karvakrolt (3.4. ábra). Kivétel a JT010 volt, ami a többinél

sokkal potensebb agonista, ezért mindig 1000x kisebb koncentrációban használtuk, mint a többi (általában 100 nM) (**3.4. ábra**). A karvakrol egy nem elektrofil agonista, aminek távoli kötőhelye van, így a hatását nem befolyásolhatják az általunk létrehozott mutációk, így kiválóan alkalmas volt kontroll agonistának, amihez a többi agonista hatását lehetett viszonyítani, normalizálni az eredményeket. Ez azért fontos, mert a tranziensen transzfektált sejteknek változó lehet az expressziós szintjük, ezt a normalizálás képes ellensúlyozni. Ha egy mutáns TRPA1 egyáltalán nem reagált a karvakrolra, akkor azt globálisan funkcióvesztett receptornak, azaz hibás vektornak tekintettük, és az adott mutáció létrehozását előlről kezdtük. Ha egy már igazoltan működő mutáns az egyik mérésnél nem reagált a karvakrolra, akkor ott a transzfekciót tekintettük sikertelennek, és a transzfekciótól ismételtük meg a mérést.

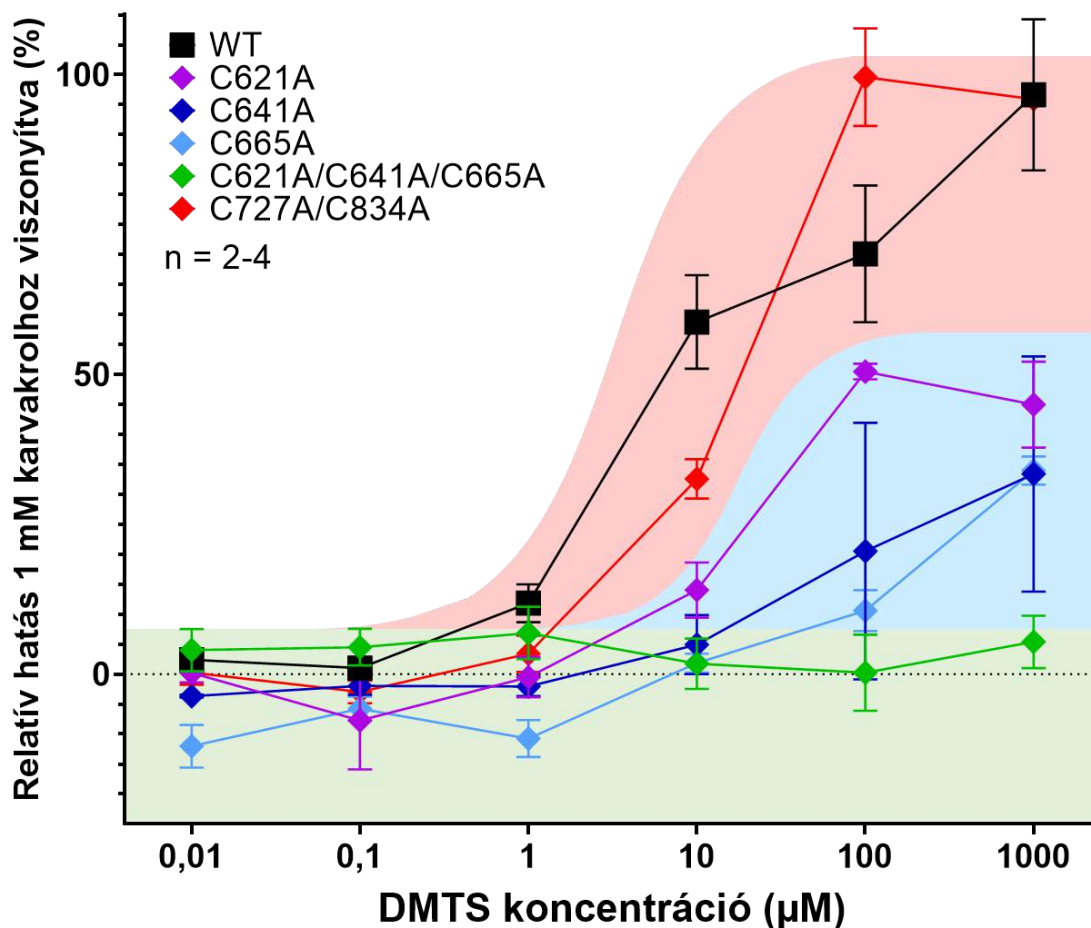
3.4.6. Szerves poliszulfidokkal indukált tranziens intracelluláris kalcium koncentráció változás mérése mutáns TRPA1 változatokban

A TRPA1 változatokat expresszáló CHO sejteket Fluo-4 sejtmembrán permeábilis kalcium érzékeny fluoreszcens festékkel festettük, majd az agonisták hatását áramlási citometriában mértük és karvakrolhoz viszonyítottuk.

Először a DMTS dózis-hatás összefüggését mértük a TRPA1 változatokon, amit 1 mM karvakrolhoz viszonyítottunk (**3.6. ábra**). A C621A, C641A és C665A egyszeres mutánsokban csökkent a DMTS hatása. Az egyszeres mutánsok között nem volt szignifikáns különbség, kivéve a C621A és C665A között 100 μ M DMTS koncentrációnál ($p > 0,05$; *kétutas ANOVA Bonferroni összehasonlító teszttel*). C621A/C641A dupla mutáns és a C621A/C641A/C665A tripla mutáns inszenzitivitást mutatott a DMTS-re. A transzmembrán doménen a feltételezett kötőhelyet alkotó C727 és C834 sem az egyszeres, sem az együttes dupla mutációja nem mutatott változást a DMTS hatásában (**3.6. ábra**). Így elvethetjük, hogy a C727 és C834 aminosavak részt vesznek a receptor aktiválásában az erősen hidrofób szerves poliszulfidok kötésével. Ezeket a mutációkat kizártuk a további kísérleteinkből. Az 1 mM karvakrol túl magas koncentrációnak találtuk, és félve attól, hogy esetleg aspecifikusan is okoz kalcium beáramlást, a többi kísérletnél lecsökkentettük 100 μ M-ra, bár ez a koncentráció nem tudta teljesen aktiválni a receptort, de specifikus hatást váltott ki.

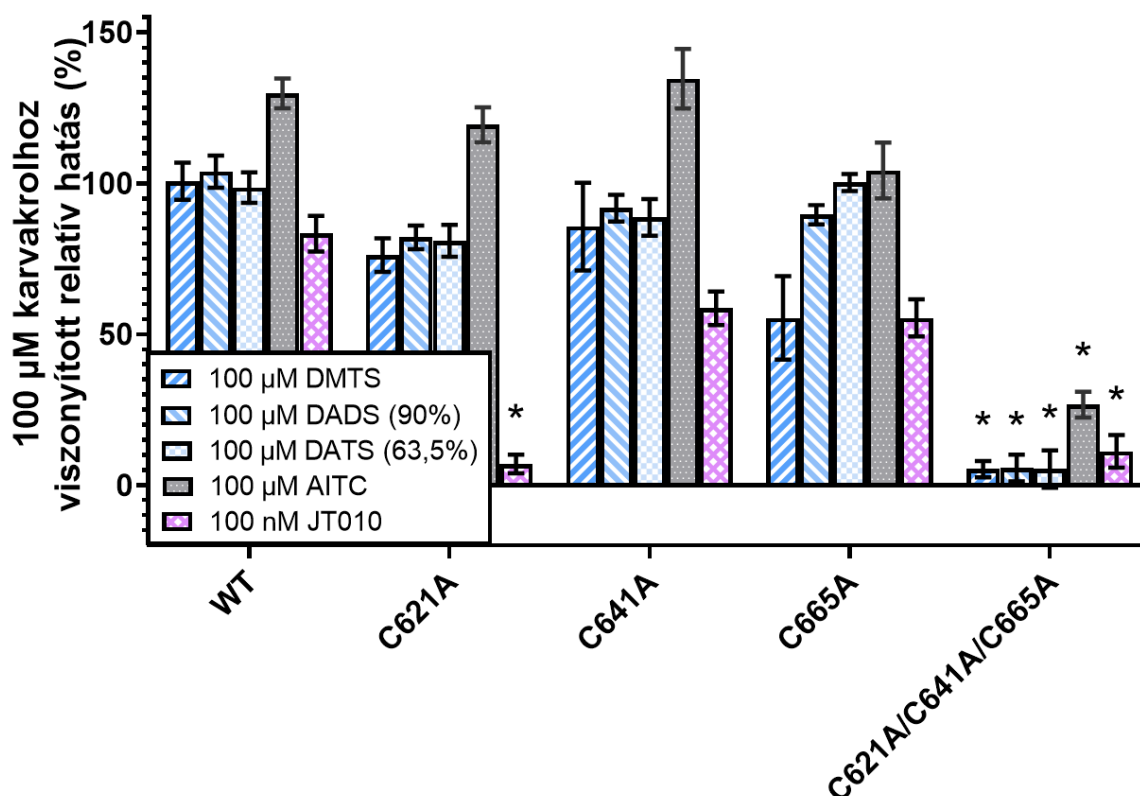
Ezt követően megvizsgáltuk a szerves poliszulfid DMTS, 90% DADS és 63,5% DATS, továbbá az AITC és JT010 hatását, és összehasonlítottuk 100 μ M karvakrollal (**3.7. ábra**). Mivel ekkora koncentrációban a karvakrol nem tudta teljesen aktiválni a receptort, ezért megfigyelhető a WT és egyszeres mutáns TRPA1 esetében, hogy az AITC magasabb hatást váltott ki 100%-nál. Az

egyszeres mutációk nem mutattak változást a szerves poliszulfidok és AITC hatásában, valószínűleg, mert a Fluo-4 telítődhetett kalciummal. A JT010 ezzel szemben nem tudott kifejteni hatást a C621A egyszeres mutánsban sem, és ebből következőleg a tripla mutánsban sem. A JT010 hatását a C641A és C665A egyszeres mutációk csökkentették. A tripla mutáns a DMTS, DADS, DATS és JT010 elektrofil agonistákra inszenzitivitást mutatott, de az AITC-nek maradt egy minimális hatása rá. A három szerves poliszulfid hatása között nem volt szignifikáns különbség.



3.6. ábra: A DMTS dózis-hatás görbéje a TRPA1 változatokon, 1 mM karvakrolhoz viszonyítva. Fluo-4 kalcium érzékeny fluoreszcenciát mértünk a TRPA1 változatokban a DMTS különböző koncentrációiban áramlási citometriával, majd ezt viszonyítottuk a kontroll agonista 1 mM karvakrol hatásához (100%). Az egyszeres mutációk csökkentették a DMTS hatását, míg a C621A/C641A dupla és C621A/C641A/C665A tripla mutánsok teljes inszenzitivitást mutattak a

DMTS-re. Ez bizonyítja, hogy ezek a ciszteinek részt vesznek a DMTS kötésében. A transzmembrán régióban elhelyezkedő ciszteinek dupla mutációja (C727A/C834A) nem okozott szignifikáns eltérést a WT receptortól, ami cáfolja a C727 és C834 szerepét a TRPA1 aktivációban az erősen hidrofób agonisták kötése által. *Átlag ± SEM, N = 2-4 (mérések száma TRPA1 változatonként), n > 2000 (a sejtek száma mintánként).*

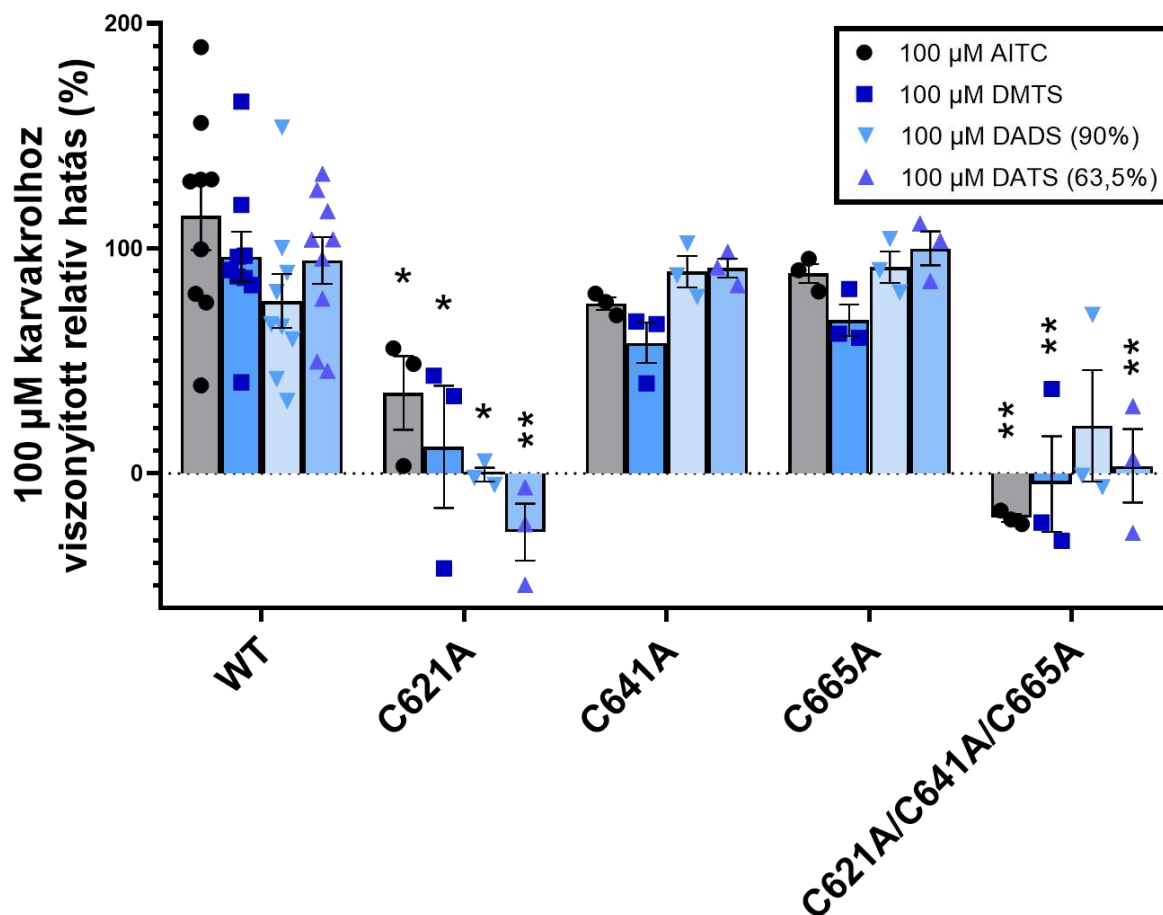


3.7. ábra: TRPA1 változatok aktivitása különböző agonisták hatására kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometriával mérve. A TRPA1 változatokat expresszáló CHO sejteket Fluo-4 kalcium érzékeny fluoreszcens festékkel festettük. A TRPA1 aktiváció kalcium beáramláshoz vezet, ami növeli a Fluo-4 festék fluoreszcenciáját, és ezt a fluoreszcenciát mérjük. Az így mért jelerősséget 100 μM karvakrolhoz viszonyítottuk (100%), amit pozitív kontrollként használtunk. A C621A, C641A és C665A egyszeres mutációk nem csökkentették szignifikánsan a 100 μM DMTS, 90% DADS, 63,5% DATS és AITC hatását, bár a C665A esetében látható egy tendencia a DMTS hatásának csökkenésére. A C621A egyszeres mutáció már önmagában is inszenzitivitást okozott a JT010-zel szemben, nemcsak a tripla mutáció. A másik két egyszeres mutáns (C641A és C665A) esetében megfigyelhető a tendencia a JT010 hatásának csökkenésére. A tripla mutáns inszenzitivitást mutatott a DMTS, DADS, DATS és JT010-zel szemben, azonban az AITC megtartott egy minimális hatást. *Kétutas ANOVA Bonferroni összehasonlítás teszttel, átlag ± SEM; szignifikáns különbség a WT TRPA1-hoz képest: *p < 0,0001, n = 4-19.*

3.4.7. A TRPA1 változatokat expresszálo CHO sejtek radioaktív kalcium-45 felvételének mérése folyadék szcintilláció számolással

Az eddigi eredmények megerősítésére és a szerves poliszulfidok kötésében a C621, C641 és C665 közötti prioritás felderítésére a TRPA1 változatokat expresszálo CHO sejteken DMTS, 90% DADS, 63,5% DATS és AITC agonisták hatására történő radioaktív Ca-45 felvételi vizsgálatot végeztünk (**3.8. ábra**). A radioaktív Ca-45 felvételt folyadék szcintilláció számolással mértük. Az eredményeket 100 μ M karvakrol hatásához viszonyítva normalizáltuk. A C621A egyszeres és a C621A/C641A/C665A tripla mutánsban szignifikánsan csökkent a DMTS, 90% DADS, 63,5% DATS és AITC hatása, kivéve a DADS hatása a tripla mutánsban egy kiugró érték miatt. A három szerves poliszulfid hatása között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

A kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometriához képest a folyadék szcintilláció mérés inkább a sejt kompartmentekben tárolt kalcium mennyiségét méri, nem pedig az átmeneti intracelluláris kalcium koncentrációt, így ez nem igazán időérzékeny mérési módszer. Továbbá, amíg a Fluo-4 festék jelerősége képes telítődni egy bizonyos kalcium koncentráció fölött, addig a radioaktív Ca-45 jele nem. Ezen tulajdonságainál fogva a folyadék szcintilláció egy pontosabb és megbízhatóbb mérési módszer volt a kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometriánál.

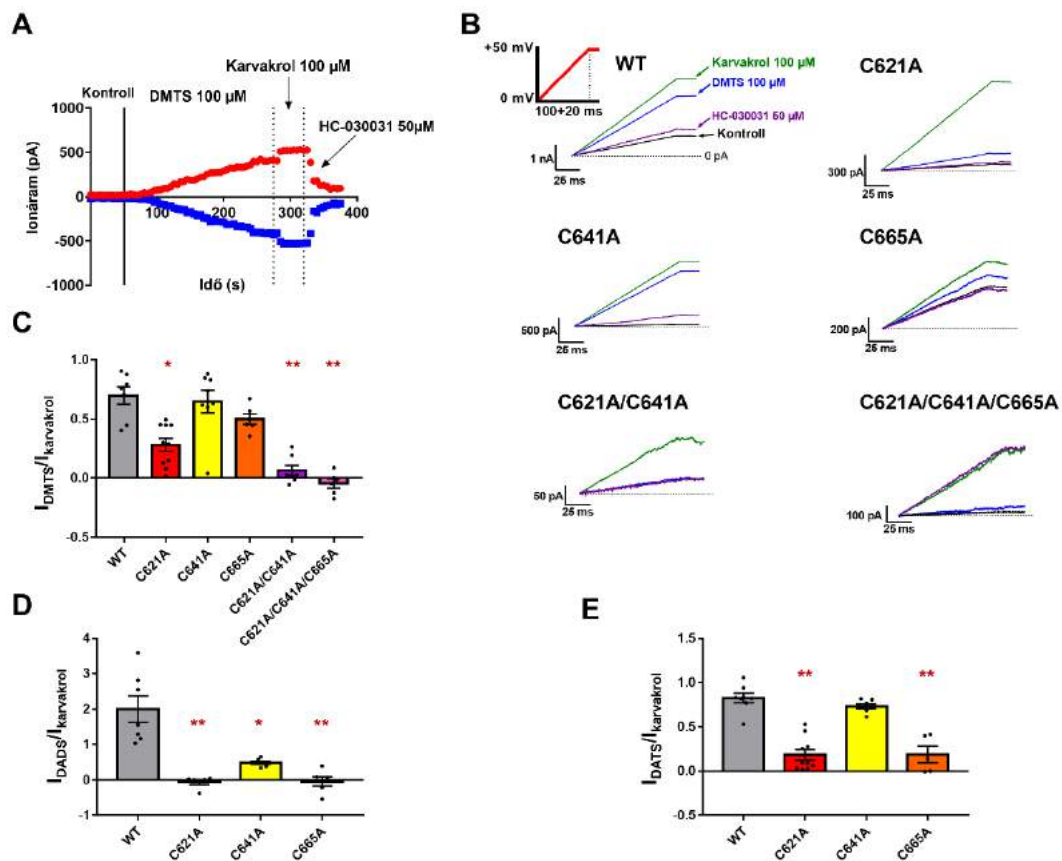


3.8. ábra: A TRPA1 változatok aktivitása radioaktív Ca-45 folyadék szcintillációval mérve. Az elektrofil agonista AITC, DMTS, DADS és DATS általi TRPA1 aktiváció hatására történő radioaktív Ca-45 felvételt folyadék szcintilláció számlálóval mértük, és 100 μM karvakrol hatásához viszonyítottuk. Az egyszeres mutánsok közül egyedül a C621A mutatott szignifikánsan csökkent aktivitást az elektrofil agonisták hatására, ami C621 kulcsszerepére utal az agonisták kötésében. A tripla mutáns inszenzitivitást mutatott az elektrofil agonistákra. *Kétutas ANOVA és Bonferroni összehasonlító teszt, átlag ± SEM, szignifikáns különbség a WT TRPA1-hez képest: * $p < 0,005$, ** $p < 0,0001$, $n = 3-6$.*

3.4.8. Ionáram aktiváló hatása a szerves poliszulfidoknak mutáns TRPA1 receptort expresszáló sejtekben

A C621, C641 és C665 ciszteinek szerves poliszulfid kötésének további vizsgálatára *whole-cell patch-clamp* technikával a DMTS, 90% DADS és 63,5% DATS ionáram aktiváló hatását mértük, és viszonyítottuk karvakrolhoz. A **3.9.A-B ábrák** mutatják be a DMTS mérési nyers eredményeket, míg a **3.9.C-E ábrák** a normalizált ionáram aktiválási összesített eredményeket.

A C621 mutációja alaninra szignifikánsan csökkentette a szerves poliszulfidok hatását a vad típusú receptorhoz képest. A C665 mutációja szintén szignifikánsan csökkentette a DADS és DATS hatását, de a DMTS hatását nem. A C641 mutációja azonban csak a DADS hatását csökkentette szignifikánsan, a DMTS és DATS hatását nem. A DMTS hatása C621A/C641A dupla mutánsban minimálisra csökkent, míg a C621A/C641A/C665A tripla mutáns teljes inszenzitivitást mutatott a DMTS-re (3.9.A és 3.9.B ábra). A DADS hatása erősebbnek mutatkozott a vad típusú TRPA1 receptorban, mint a másik két szerves poliszulfidé.



3.9. ábra: A szerves poliszulfidok hatása a TRPA1 variánsokon *whole-cell patch-clamp* technikával vizsgálva. Egy demonstrációs ábra a WT TRPA1 receptort expresszáló CHO sejtek *whole-cell patch clamp* méréséről. A függőleges folytonos vonal jelölés előtt a sejteket kalcium mentes oldatban tartottuk, majd ezt kicseréltük szerves poliszulfid DMTS (100 μM) tartalmú pufferre, majd a pozitív kontroll nem elektrofil agonista karvakrolra (100 μM), végül az antagonistá HC-030031-re (50 μM) (A). A piros pontok az ionáram csúcsokat jelölik +50 mV-on, míg a kék pontok az ionáramokat -50 mV egyenfeszültségen (A). Demonstrációs ábrák a WT, C621A, C641A, C665A, C621A/C641A és C621A/C641A/C665A TRPA1 változatok *whole-cell patch-clamp* mérési eredményekről (telített ionáram jelek). Kék vonal jelöli a 100 μM DMTS, zöld a 100 μM karvakrol, lila vonal az 50 μM HC-030031, fekete vonal pedig a kalcium mentes kontroll mérési eredményeket mutatja. A vízszintes pontozott vonal jelöli a 0 pA ionáramot. A feszültség protokoll a bal felső kis panelen látható, piros

folytonos vonallal jelölve **(B)**. Oszlop diagramok és pontokkal jelölt egyedi mérési értékek mutatják a TRPA1 változatokban a szerves poliszulfidok **(C-E)**: 100 μ M DMTS **(C)**, 100 μ M 90% DADS **(D)** és 100 μ M 63,5% DATS **(E)** hatását a 100 μ M karvakrolhoz viszonyítva. *Egyutas ANOVA-t használtunk Dunnet's többszörös összehasonlító teszttel. Átlag \pm SEM. Szignifikáns különbségek a WT TRPA1-hez képest: * $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,0001$. $N_{transzfekeció} \geq 2$ és $n_{sejt} \geq 5$ minden kísérleti csoportban.*

3.5. Megbeszélés

A fokhagyma eredetű szerves poliszulfidok TRPA1 receptor aktiváló hatása jól ismert (12,15,110,111,144,146–148), azonban kísérleteinkkel mi igazoltuk elsőként a helyspecifikus TRPA1 mutáns változatokat a szerves poliszulfidok kötőhelyének azonosítására. Az eredményeinket a mutáns TRPA1 változatok számítógépes modellezése és három funkcionális tesztje alapján kaptuk: kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometria, radioaktív Ca-45 folyadék szcintilláció számlálás és *whole-cell patch-clamp*. Az eredményeink jelentősen átfednek egymással és alátámasztják egymást. Ebben a tanulmányban bebizonyítottuk, hogy a szerves poliszulfid DMTS, DADS és DATS kovalensen kötődik a C621, C641 és C665 aminosavakhoz, amivel aktiválják a TRPA1 receptort. Ezek közül a legfontosabb szerepe a C621-nek van, de a másik két cisztein is hozzájárul az elektrofil agonisták kötéséhez. Csak a három cisztein együttes mutációja vezetett a TRPA1 inszenzitivitásához a szerves poliszulfidokkal szemben.

A három szerves poliszulfid közül a legnagyobb molekula, a DATS mutatta a legkedvezőbb kalkulált kötési szabad entalpiát, de – ahogyan a kísérleti eredmények is kiemelték – az a fontos, hogy kialakuljon kovalens kötés a C621-gyel, és nem a kötés erőssége. Megjegyzendő, hogy a TRPA1 apo konformációja nem kedvező az elektrofil agonisták kötésére, ahogyan azt az előzetesen szükséges dokkolási kalkulációknál láttuk. Az előzetes dokkolás során a holo szerkezeten a kovalens kötésben résztvevő atomok között kisebb volt a távolság. Ezt a megfigyelést azzal tudjuk magyarázni, hogy az A-hurok fedi el a kötőhelyet a ligandok elől az apo struktúrában, de a holo struktúrában nem. Ahogyan azt már korábbi cikkek bemutatták (135,145), az A-hurok felemelkedik az előzetesen szükséges agonista kötés hatására, amiben a P666 és F669 aminosavak vesznek részt, és majd csak ezután lesz elérhető a kötőhely.

A C621, C641 és C665 alkotják az ismert kötőhelyét a legtöbb elektrofil agonistának, kivéve a az AITC-nek, ami még a K710-es lizinhez is kötődik az aktiváláshoz, illetve a JT010-nek, ami egyedül a C621-hez kötődik a TRPA1 aktivációjához (115–118,138).

A radioaktív Ca-45 folyadék szcintillációs és *whole-cell patch-clamp* mérésekkel szemben a Fluo-4 kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometria nem mutatott különbséget az

egyszeres TRPA1 mutánsok között. Ennek valószínűleg az volt az oka, hogy a Fluo-4 festék képes telítődni magas kalcium koncentrációnál, amit a szerves poliszulfidok viszonylag magas koncentrációja (100 μ M) eredményezhetett. Ezért a Ca-45 folyadék szcintilláció számolást és *whole-cell patch-clamp* technikát pontosabb és megbízhatóbb módszereknek ítéltük, és ezeket tudtuk használni a három cisztein funkcióbeli különbségeinek feltárására.

A három cisztein közül a C621 fontos szerepét a szerves poliszulfidok kötésében a számítógépes modellezés előrevetítette a számunkra, majd ezt a radioaktív Ca-45 folyadék szcintilláció számolás és *whole-cell patch-clamp* eredményei megerősítették. A C621 kulcsszerepe ismert számos elektrofil TRPA1 agonista, mint a JT010, jódetamid, BODIPY-jódetamid, AITC és BITC kötésében (116,138,149–151).

A *whole-cell patch-clamp* kimutatta, hogy a C665 a második legfontosabb cisztein a szerves poliszulfidok kötésében, míg a C641-nek van a legkisebb szerepe. A C665 szerepe már bebizonyosodott más elektrofil agonisták esetében is, mint a jódetamid, BODIPY-jódetamid, N-etilmaleimid és BITC (125,138,150,151).

Habár az egyszeres cisztein mutációk csak csökkentették a szerves poliszulfidok hatását a TRPA1-ben, addig a JT010 hatása teljesen elveszett a C621A egyedüli mutáció esetében. Több bizonyíték is arra mutat, hogy a JT010 nem kötődik kovalensen a többi ciszteinhez, csak a C621-hez (138,152,153). A mi kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometria eredményeink mégis azt mutatták, hogy a C641A és C665A egyszeres mutációk csökkentették a JT010 hatását, ami arra enged következtetni bennünket, hogy ezeknek az agonista kovalens kötése helyett más szerepük van. Feltételezhetően a C641 és C665 segítenek fenntartani a kötőzseb működőképes struktúráját vagy segítenek kialakítani egy attraktív környezetet az elektrofil agonisták számára, esetleg mindkettőben részt vesznek.

Mivel a C621 egyszeres mutációja nem volt elég, hogy teljesen megszüntesse a szerves poliszulfidok hatását, ebből arra következtethetünk, hogy a C641 és C665 is részt vesznek ezeknek a hatóanyagoknak a kovalens kötésében. A szerves poliszulfidok hatását csak a három cisztein együttes tripla mutációja volt képes teljesen megszüntetni. Más elektrofil agonistákról is ismert, hogy ennek a három ciszteinnek a tripla mutánsában elveszítik a hatásukat, kivéve az AITC, ami intakt K710 lizin mellett képes egy minimális hatást megtartani (115–118). A kalcium érzékeny fluoreszcens áramlási citometriai eredményeink során az AITC erősebb hatást mutatott a WT és egyszeres mutáns TRPA1 változatokban, mint a karvakrol. Ezzel szemben a tripla mutánsban már csak minimális hatása volt az AITC-nem, míg a karvakrol hatása megmaradt.

A C727 és C834 aminosavaknak sem az egyszeres, sem az együttes dupla mutációja nem okozott változást a DMTS hatásában a WT TRPA1-hez képest. Ez az eredményünk cáfolja azt a feltevést, hogy a C727 és C834 alkotná az erősen hidrofób elektrofil agonisták kötőhelyét a transzmembrán doménon (119,120).

Az egér Trpa1 receptort expresszáló HEK293 sejtekben kimutatták, hogy a C415 és C422 aminosavak részt vesznek a szerves poliszulfidok (dinátrium-triszulfid) és más elektrofil agonisták kötésében (108,149,154). Az, hogy ezeknek a humán megfelelői (C414 és C421) vagy esetleg a maradék 21 cisztein a 28-ból játszik-e szerepet a szerves poliszulfidok kötésében, még további vizsgálatra szorul.

Az általunk használt szerves poliszulfidok közül a gyárilag készült DMTS majdnem teljesen tiszta volt ($\geq 98\%$), de az általunk szintetizált DADS és DATS elválaszthatatlan kísérői voltak egymásnak, a DADS 90%-os volt, a DATS pedig 63,5%-os. Ezek a természetes forrásokban, a fokhagymaolajban is állandó szennyezései egymásnak. A *whole-cell patch-clamp* eredményeiben a DADS hatása erősebbnek mutatkozott a másik két szerves poliszulfidnál a WT TRPA1-ben, ugyanakkor ezt befolyásolták legjobban az egyszeres cisztein mutációk. Ameddig a C621A és C665A egyszeres mutációkban csökkent a DMTS és DATS hatása, addig a DADS hatása teljesen megszűnt. A C641A egyszeres mutáció csökkentette a DADS hatását, de a DMTS és DATS hatását nem. Ezek a felfedezések azt sugallják, hogy a három szerves poliszulfid közül a DADS a leghatékonyabb TRPA1 agonista, ám ezt nem támasztották alá a többi mérési módszereink eredményei, amelyek esetében a három szerves poliszulfid azonos hatást mutatott, így ez még további kivizsgálásra szorul.

A *whole-cell patch-clamp* kimutatta továbbá, hogy a C621A/C641A/C665A tripla mutáns inszenzitív volt a HC-030031 antagonistára, aminek az okát még tisztázni kellene, hogy a tripla cisztein mutáció okozta, vagy esetleg egy rejtett véletlen mutáció. A tripla mutáns inszenzitivitása a szerves poliszulfidokra és a HC-030031 antagonistára a mutációk hatására kialakult globális funkcióvesztés következtében is létrejöhetett volna, de a karvakrol hatása intakt maradt, ami bizonyítja, hogy a receptor megfelelően működőképes maradt, és alkalmas volt a kísérleteink elvégzésére.

Három különböző funkcionális teszt segítségével bizonyítottuk, hogy a TRPA1 aktiválásához a szerves poliszulfidok a C621, C641 és C665 ciszteinekhez kötődnek kovalensen, és ezeknek kizárólag az együttes tripla mutációja volt képes teljesen megszüntetni a szerves poliszulfidok hatását. Azonosítottuk továbbá ebben a C621 kulcsszerepét, illetve, hogy a C655 a második legfontosabb cisztein. Ez jelentősen átfed más elektrofil agonisták

ismert kötőhelyével, így az eredményeik más elektrofil agonisták kötési mechanizmusának megértését is jobban elősegítheti.

Ebben a tanulmányunkban nemcsak bemutattuk, hogy a TRPA1 egy fontos célpontja a szerves poliszulfidoknak, hanem azonosítottuk a pontos kötőhelyüket is mutáns receptor változatok segítségével.

3.6. Következtetés

Korábbi kutatások bizonyították, hogy az endogén szerves poliszulfidoknak jelentős biológiai hatásuk van a Tranzien Receptor Potenciál Ankirin 1 receptor aktiválásával. A szerves poliszulfidoknak hasonló hatásuk van, de sokkal stabilabb molekulák, így alkalmasabbak gyógyszer hatóanyagként. Ezzel a tanulmánnyal az volt a célunk, hogy a kötőhelyük azonosításával jobban megismerjük a szerves poliszulfidok hatásmechanizmusát a TRPA1 receptoron.

A poliszulfidok könnyen reagálnak a fehérje cisztein aminosavainak kén tartalmú tiol oldalláncával. Hogy jobban megismerjük ezek szerepét a TRPA1 aktivációban, több ciszteint is kicseréltünk alaninra helyspecifikus mutagenezissel. Olyan TRPA1 mutáns változatokat kerestünk, amelyeknek csökkent vagy teljesen megszűnt az érzékenysége a szerves poliszulfidokkal szemben, de más funkcióik sértetlenek maradtak (mint például a nem-elektrofil agonisták és antagonisták hatásai). A mutáns receptorok kötési tulajdonságait előzetesen *in silico* molekuláris dokkolási technikával vizsgáltuk. A funkcionális változásokat *in vitro* módszerekkel vizsgáltuk: kalcium-érzékeny fluoreszcens áramlási citometriával, radioaktív ⁴⁵Ca folyadék szcintilláció számolással és *whole-cell patch-clamp* technikával. Az eredmények azt mutatják, hogy a TRPA1 aktivációhoz a szerves poliszulfidok a C621, C641 és C665 kötődnek kovalensen, melyek közül a C621-nek van kulcsszerepe. Ugyanez a három cisztein alkotja az elektrofil agonisták általános kötőhelyét. A szerves poliszulfidok TRPA1 receptor aktiváló hatását azonban kizárólag a három cisztein együttes mutációja tudta teljesen megszüntetni.

3.7. Mellékletek

Név	Szekvencia	hossz (bp)	GC tartalom (%)	Olvadási hőmérséklet (°C)
Szekvenáló primerek				
CysF	CAG TGA CCA CAA TGG CTG GAC	21	57.1	58.5
CysR	GCA TCA TGC TGA AGG TCT GG	20	55.0	56.2
Terminális/klónozó primerek				
CysF2	GTC AGA GGC TCC TAC AAG ACA	21	52.4	55.9
CysR2	TGA AGT TCC ACC TGC ATA GC	20	50.0	55.0
Mutációs primerek				
CYS621F (C621A-F)	CAG GCA ATA AAG CTC CAA TTA CAG A	25	40.0	55.4
CYS621R (C621A-R)	TCT GTA ATT GGA GCT TTA TTG CCT G	25	40.0	55.4
CYS641F (C641A-F)	TTT TAG ATT TCG CTA TGT TGC ATT C	25	32.0	52.5
CYS641R (C641A-R)	GAA TGC AAC ATA GCG AAA TCT AAA A	25	32.0	52.5
CYS665F (C665A-F)	AAT ATC TTC AAG CTC CAT TAG AAT T	25	28.0	50.5
CYS665R (C665A-R)	AAT TCT AAT GGA GCT TGA AGA TAT T	25	28.0	50.5
CYS727F (C727A-F)	TAG GAT CTT ACG CTC TTG GTC TCA T	25	44.0	56.9
CYS727R (C727A-R)	ATG AGA CCA AGA GCG TAA GAT CCT A	25	44.0	56.9
CYS834F (C834A-F)	TGC AGT GGC AAG CTG GAG CAA TTG C	25	56.0	64.6
CYS834R (C834A-R)	GCA ATT GCT CCA GCT TGC CAC TGC A	25	56.0	64.6

3.1. melléklet táblázat: A helyspecifikus mutagenézishez és ellenőrző szekvenáláshoz használt primerek listája.

Lépés		Hőmérséklet (°C)	Időtartam
Kezdeti denaturáció		98	5 perc
5 ciklus	denaturáció	98	30 s
	kapcsolódás	40	30 s
	meghosszabbítás	72	90 s
5 ciklus	denaturáció	98	30 s
	kapcsolódás	45	30 s
	meghosszabbítás	72	90 s
30 ciklus	denaturáció	98	30 s
	kapcsolódás	50	30 s
	meghosszabbítás	72	90 s
Végső meghosszabbítás		72	10 perc

3.2.A melléklet táblázat: A helyspecifikus mutagenézis első PCR programja. A kapcsolódási (*annealing*) hőmérséklet alacsonyan kezdődik a ciszteint alaninra cserélő mutáns kodonok miatti bázispárosodási hibák miatt, de a kapcsolódási hőmérséklet fokozatos emelése optimális specificitáshoz vezet.

Lépés		Hőmérséklet (°C)	Időtartam
Kezdeti denaturáció		98	5 perc
5 ciklus	denaturáció	98	30 s
	kapcsolódás	50	30 s
	meghosszabbítás	72	2 perc
30 ciklus	denaturáció	98	30 s
	kapcsolódás	55	30 s
	meghosszabbítás	72	2 perc
Végső meghosszabbítás		72	10 perc

3.2.B melléklet táblázat: A helyspecifikus mutagenézis második PCR programja.

Számítógépes dokkolási módszer

Előzetesen szükséges kötési kalkulációkat az *AutoDock* (RRID: SCR_012746, (155)) szoftverrel végeztük. A rácspontok számát 60×60×60-ra állítottuk 0,375 Å rácspont közökkel. Lamarck-féle genetikai algoritmust használtunk, amelyben a flexibilitást engedélyeztük minden forgásra képes kötés között az összes ligandum esetében. Minden ligandum esetében 10 dokkolási kalkulációt végeztünk, az így kapott ligandum konformációs eredményeket pedig a kalkulált kötési szabad entalpiájuk (ΔG_{kalk}) alapján.

Számítógépes dokkolási eredmények

A DMTS és a DATS kötési módja a C621S mutáns TRPA1 receptorhoz.

Az adatbázisban elérhető C621 mutáns TRPA1 szerkezetben a ciszteint szerinre cserélték (C621S). Ebben az esetben a receptor C621S szerinje nem volt képes diszulfid kötést kialakítani a DMTS-sel és DATS-sel, így kovalens interakció nem tudott kialakulni. *Suo és mtsai.* (138) bemutatták, hogy JT010 és N-benziltioformamid (9BE) hatása teljesen megszűnt a C621S mutánsban, de egy másik cisztein egyszeres mutációja (pl. C665S) nem befolyásolta jelentősen a hatásukat, és továbbra is erős aktivációs jelet figyeltek meg. Ez alapján azt feltételezhetjük, hogy a nem poliszulfidok esetében sem történik C621S mutáns receptor aktiváció a C621 cisztein hiányában, még ha a közeli C641 és C665 ciszteinekhez képes is kovalensen kötődni az agonista. A C621S receptorban a DMTS szignifikánsan kisebb ΔG_{kalk} értékkel kötődik nem kovalensen az eredeti kötőzsebhez, mint a WT receptor esetében (**3.3. melléklet táblázat**). Érdekes módon a DATS hasonló ΔG_{kalk} értékkel kötődik nem kovalensen a mutáns receptorhoz, mint amekkorával kovalensen a WT receptorhoz.

Ligandum neve	DMTS	DATS
ΔG_{kalk} (kcal/mól)	-2,32	-2,98
Rang	1/3	1/3
A kovalensen kötődő atom távolsága a CYS621 kén atomtól (Å)	7,2	10,8

3.3.A melléklet táblázat: *AutoDock 4.2* (156) szoftverrel végzett előzetes szükséges kalkulációk a szerves poliszulfidok dokkolásához a natív apo (6V9W) TRPA1 receptor struktúrához.

Ligandum neve	DMTS	DATS
ΔG_{kalk} (kcal/mól)	-2,43	-3,26
Rang	2/2	½
A kovalensen kötődő atom távolsága a CYS621 kén atomtól (Å)	5,2	5,4

3.3.B melléklet táblázat: *AutoDock 4.2* (156) szoftverrel végzett előzetes szükséges kalkulációk a szerves poliszulfidok dokkolásához a natív holo (6PQP) TRPA1 receptor struktúrához.

Ligandum neve	DMTS	DATS
ΔG_{kalk} (kcal/mól)	-28,788	-35,36
Rang	1/10	1/10
A kovalensen kötődő atom távolsága a CYS621 kén atomtól (Å)	3,7	3,7

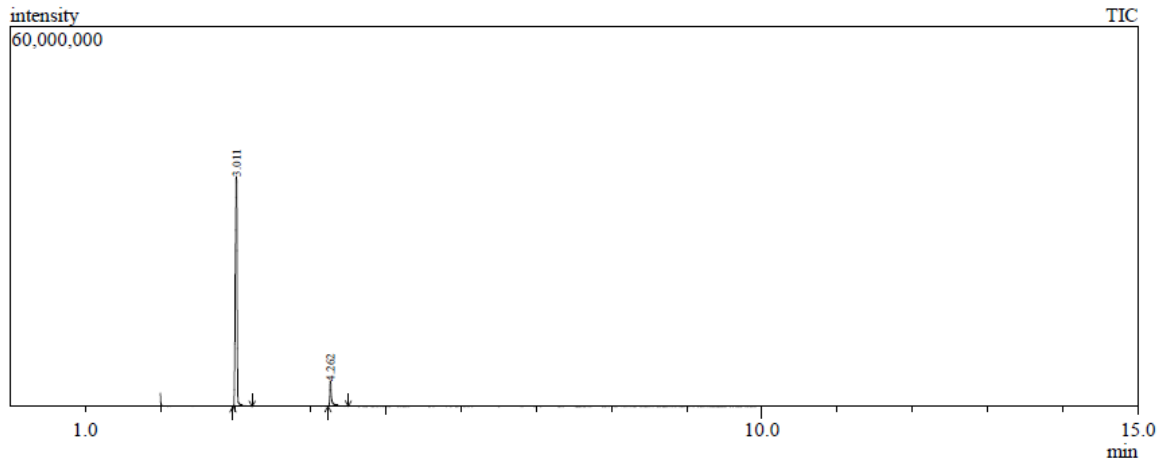
3.3.C melléklet táblázat: *FITTED* szoftverrel végzett előzetes szükséges kalkulációk a szerves poliszulfidok dokkolásához a natív holo (6PQP) TRPA1 receptor struktúrához.

Ligandum neve	DMTS	DATS
APO		
ΔG_{kalk} (kcal/mól)	-45,766	-45,393
Rang	1/5	1/5
Kovalens kötés típusa	diszulfid	diszulfid
C621S mutáns		
ΔG_{kalk} (kcal/mól)	-35,8	-46,435
Rang	1/5	1/5
Kovalens kötés típusa	nem kovalens	nem kovalens
C621A mutáns		
ΔG_{kalk} (kcal/mól)	-34,59	-46,02
Rang	1/3	1/3
Kovalens kötés típusa	nem kovalens	nem kovalens

3.4.A melléklet táblázat: A DMTS és DATS kovalens és nem kovalens dokkolása az apo szerkezetű WT, C621S és C621A egyszeres mutáns TRPA1 receptor változatokhoz a *FITTED* szoftverrel.

Ligandum neve	DMTS	DATS
ΔG_{kalk} (kcal/mól)	-44,641	-50,167
Rang	1/10	1/10
Kovalens kötés típusa	diszulfid	diszulfid

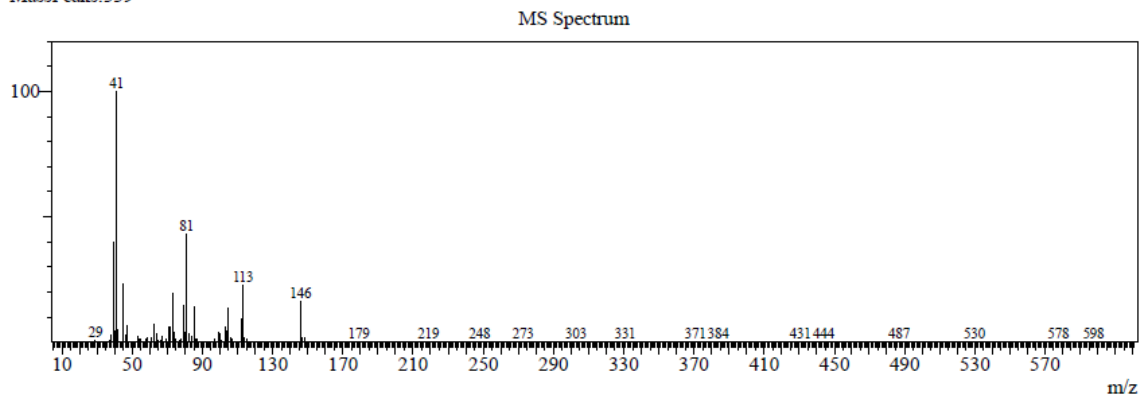
3.4.B melléklet táblázat: *FITTED* szoftverrel a szerves poliszulfidok kovalens dokkolása a natív holo szerkezetű (6PQP) TRPA1 receptor C621 ciszteinjéhez.



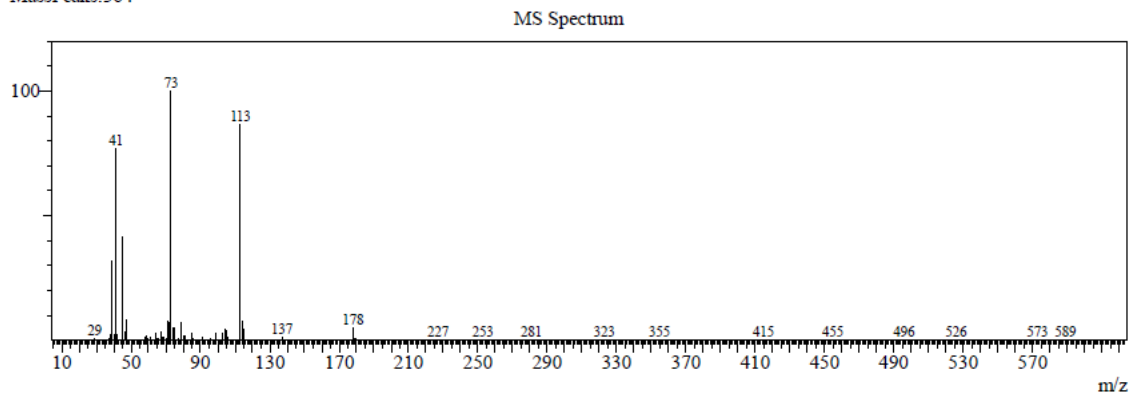
Peak Report TIC

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height%	Name
1	3.01 min	62049046	90.18	90.16	
2	4.26 min	6756556	9.82	9.84	
		68805602	100.00	100.00	

Peak# 1 R. Time: 3.011 (Scan#: 203)
MassPeaks: 339



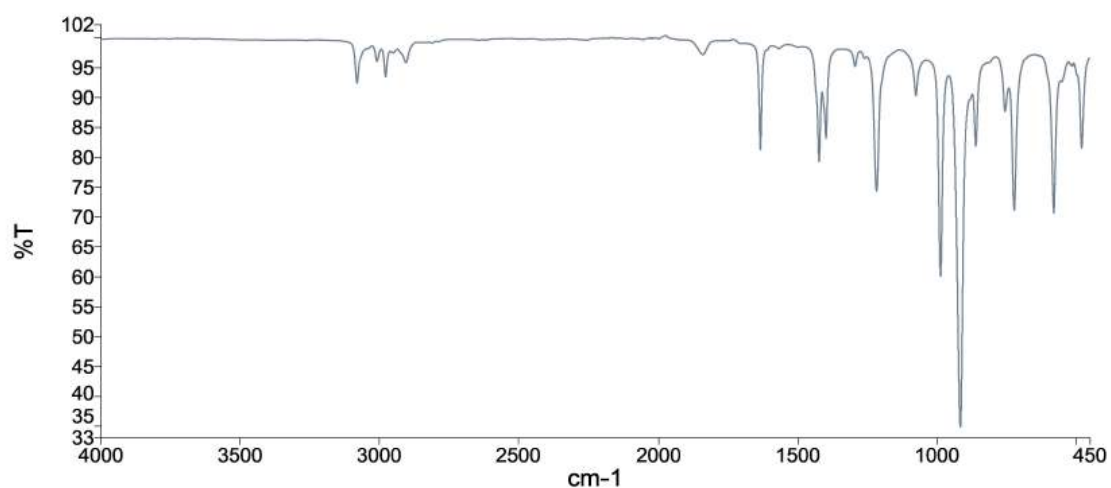
Peak# 2 R. Time: 4.262 (Scan#: 453)
MassPeaks: 364



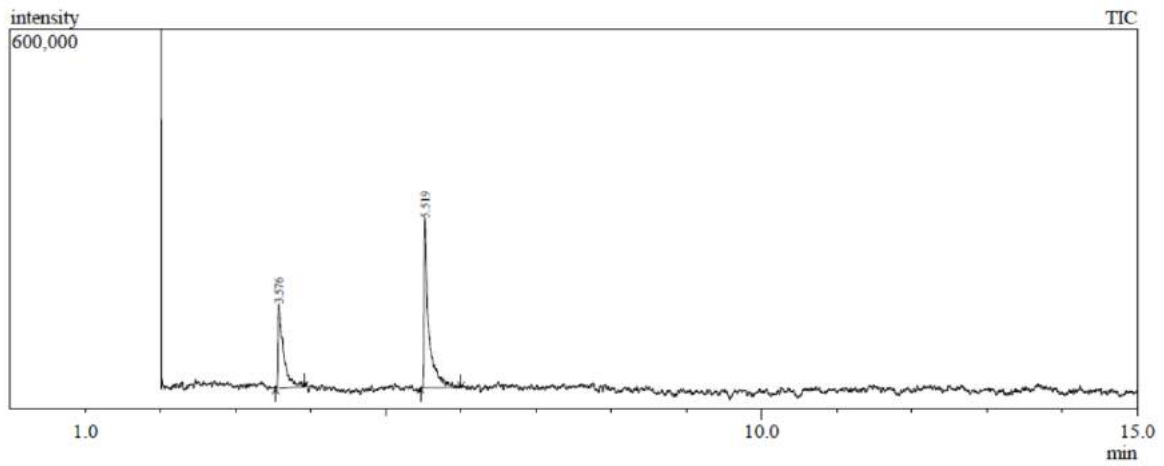
3.1. melléklet ábra: A DADS gázkromatográfiás tömegspektrometriai (GC-MS) mérési eredményei.

Szintetizált DADS kromatográfiás eredményei

Csúcs sorszáma	Retenciósi idő	Terület	Terület%	Magasság%	Név
1	3.01 perc	62049046	90.18	90.16	DADS
2	4.26 perc	6756556	9.82	9.84	DATS
		68805602	100.00	100.00	



3.2. melléklet ábra: A DADS Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópiai mérési eredménye.

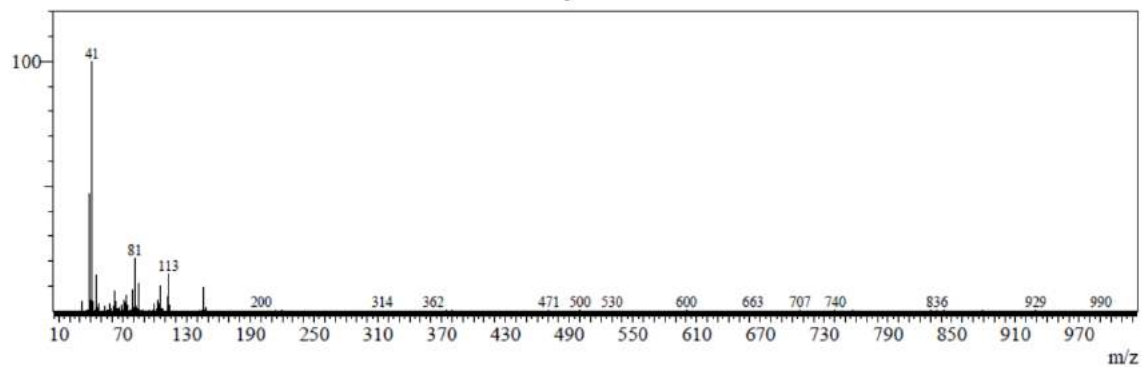


Peak Report TIC

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height%	Name
1	3.58 min	654538	36.47	33.18	
2	5.52 min	1140124	63.53	66.82	
		1794662	100.00	100.00	

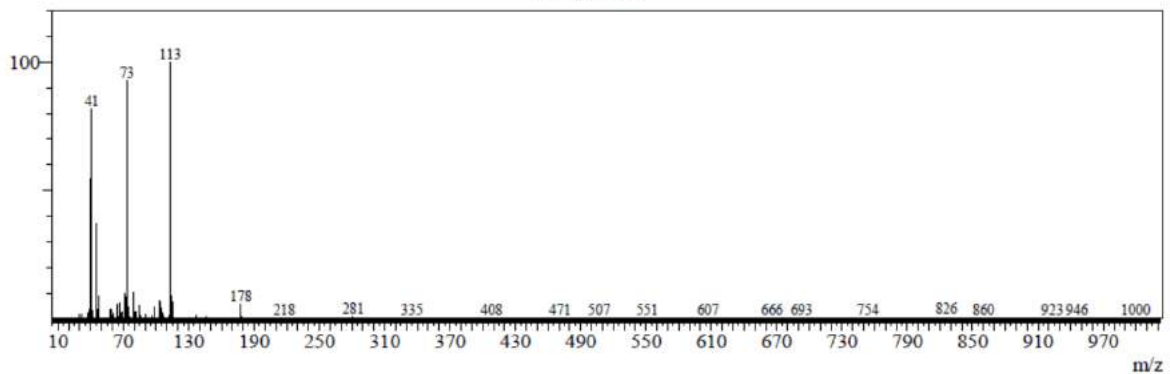
Peak#:1 R.Time:3.576(Scan#:316)
MassPeaks:512

MS Spectrum



Peak#:2 R.Time:5.519(Scan#:705)
MassPeaks:568

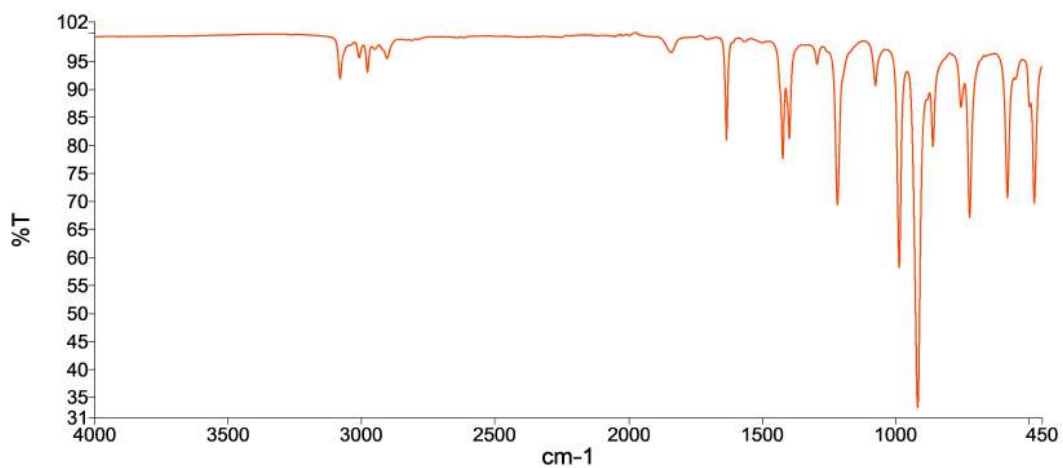
MS Spectrum



3.3. Melléklet ábra: A DATS gázkromatográfiás tömegspektrometriai (GC-MS) mérési eredményei.

Szintetizált DATS kromatográfiás eredményei

Csúcs sorszáma	Retenciósi idő	Terület	Terület%	Magasság%	Név
1	3.58 perc	654538	36.47	33.18	DADS
2	5.52 perc	1140124	63.53	66.82	DATS
Összesen		1794662	100.00	100.00	



3.4. Melléklet ábra: A DATS Fourier-transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópiai mérési eredménye.

4. Asztrocita specifikus *TRPA1* kondicionális *knockout* egér létrehozása és az expresszió vizsgálata

4.1. Bevezetés

A szklerózis multiplex (SM) egy központi idegrendszeri, súlyos neurodegeneratív autoimmun betegség, amely során a tartós gyulladás és tömeges sejtpusztulás következtében a neuronok axonjait burkoló mielinhüvely szétesik, ezáltal romlik az idegi működés (157,158). Az SM modellezésére széleskörűen alkalmazott módszer az egerek kuprizonnal történő tartós kezelése, amely egy oligodendrocita specifikus sejttöxikus szer, és hatására demielinizáció alakul ki elsősorban a *corpus callosum* területén, amely makrofág invázióval és asztrocita reakcióval társul (159,160). Korábbi kutatások kimutatták, hogy a kuprizon-indukált demielinizációval szemben sokkal ellenállóbbak a *TRPA1* KO egerek (160,161). Arra a következtetésre jutottunk, hogy a *TRPA1* szabályozza a mitogén-aktivált protein kináz útvonalat, ami a sejtek apoptózisához vezet, ezért a *TRPA1* hiányában sokkal kisebb a kifejlett oligodendroglia pusztulás kuprizon hatására. *TRPA1* gátlás egy új gyógyszermechanizmus lehetőségét jelenti a SM kezelésében.

A *TRPA1* receptor elsősorban a kapszaicin érzékeny nociceptív szenzoros neuronokban expresszálódik (4,9,10), de alacsonyabb szinten expresszálódik nem neuron sejtekben is, mint a keratinocitákban, endotél sejtekben és a gasztrointesztinális mukóza sejtekben (162–165), továbbá az agy területén az oligodendrogliaokban (166) és asztrocitákban (167–169). Az egér agykéregben kimutatták az alacsony szintű *TRPA1* expressziót a neuronokban, asztrocitákban, oligodendrogliaokban és mikrogliaokban (170). Kísérleteinkben az asztrociták szerepét vizsgáltuk az SM patomechanizmusában, ugyanis a reakív asztrocitákról már ismert, hogy hozzájárulnak a neurodegeneratív betegségek neuroinflammációs folyamataihoz (171,172).

4.2. Célkitűzés

Jelen kutatásunk során szeretnénk igazolni a kuprizon indukált oligodendrocita apoptózishoz vezető *TRPA1* mediált folyamatokban az asztrocita sejtek kulcsszerepét. Erre a célra olyan egérmodell létrehozását céloztuk meg a Cre-Lox rekombinációs rendszer segítségével, melynek az asztrocita sejteiből specifikusan ütik ki a *Trpa1* gént (kondicionális *knockout* - cKO). Az így létrehozott egerekben vizsgáljuk majd a kuprizon demielinizáló hatását, és *Trpa1* WT és globális KO egerekhez viszonyítjuk kapott eredményeket.

4.3. Anyag és módszer

4.3.1. Kísérleti állatok és etikai engedély

Az egerek keresztezését Dr. Bölcskei Kata és Dr. Sándor Zoltán tervezték. Az egerek genotipizálását én és Dr. Sándor Zoltán végeztük.

Az *Gfap* promóter által meghajtott *Trpa1* kondicionális *knockout* egereket a floxolt *Trpa1* egerek (B6.129S-*Trpa1*^{tm2Kykw/J}; RRID: IMSR_JAX:008650, *The Jackson Laboratory, USA*) és a *Gfap* promóter által meghajtott Cre rekombinááz gént expresszáló egerek (B6.Cg-Tg(*Gfap-cre*) 77.6Mvs/2J, RRID: IMSR_JAX:012887; *The Jackson Laboratory, USA*) keresztezésével hoztuk létre. A spermatogenezis során végbemenő nem-specifikus Cre aktiváció lehetősége miatt a keresztezésben csak *Gfap*-Cre transzgént hordozó nőtény egereket használtunk (anyai ágról örökítés). A nem-specifikus aktiváció és rekombináció esélyének további csökkentésére az *Gfap*-Cre gént a kizárólag heterozigóta formában tartottuk fenn és használtuk a keresztezéshez.

Előzetes tájékozódás céljára a *Gfap*-Cre expressziót, és így a várható floxolt *Trpa1* kondicionális KO kialakulását úgy vizsgáltuk meg, hogy a *Gfap*-Cre heterozigóta egeret egy STOP-floxolt tdTomato gént hordozó homozigóta (tdTomato riporter) egérrel (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J}, RRID: IMSR_JAX:007905, *The Jackson Laboratory, USA*) kereszteztük. A tdTomato riporter egereket Dr. Kovács Gergelytől kaptuk, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Élettani Intézet állatházából. A keresztezésből létrejött utódok közül a mindkét transzgénre heterozigóta (Cre^{+/-} tdTomato^{Fl/-}) egerek expressziós mintázatát vizsgáltuk a tdTomato vörös fluoreszcenciája alapján.

Első lépéseként az *Gfap*-Cre heterozigóta nőtény és floxolt *Trpa1* homozigóta hím egereket kereszteztük. A létrejött utódok közül a mindkét transzgénre heterozigóta (Cre^{+/-} *Trpa1*^{Fl/-}) nőtény egereket kereszteztük újra floxolt *Trpa1* homozigóta hím egerekkel. A második utódgenerációban létrejött Cre^{+/-} *TRPA1*^{Fl/Fl} hím egerek voltak a vizsgálataink fő célpontjai, míg az alomtestvéreik közül a Cre^{+/-} *Trpa1*^{Fl/-} and Cre^{-/-} *Trpa1*^{Fl/Fl} hím egereket használtuk floxolt *Trpa1* hetero és Cre negatív kontrollnak. Minden tenyésztésre vagy kísérletre szánt egeret alaposan szűrtünk globális *Trpa1* KO genotípusra farokminta genotipizálással, és ezeket kizártuk a további kísérletekből (a Cre^{+/-} egerek mintegy 10%-át).

Az állatok a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézet állatházában voltak tenyésztve, és a Szentágothai János Kutatóközpont állatházában voltak tartva, 22±2 °C hőmérsékleten és 12 órás világos-sötét napi ciklusban

(világítást 6:00-tól 18:00-ig kaptak). Az állatok 3-7 fős csoportokban standard polikarbonát ketrecekben voltak tartva faforgács almon. Standard kemény tápot és vizet kaptak *ad libitum*.

A tanulmány az európai jogszabályok (2010/63 / EU irányelv) és a Magyar Kormányrendelet (40/2013., II. 14.) szerint készült a tudományos célokra használt állatok védelméről. A projektet a Pécsi Tudományegyetem Állatvédelmi Bizottsága, az Országos Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság és a Baranya Megyei Kormányhivatal engedélyével végeztük (engedélyszám: BA02/2000-82/2017). Igyekeztünk a kísérlet elvégzéséhez szükséges legkisebb állatszámot használni, és a kísérletbe bevont állatok szenvedését minimálisra csökkenteni.

4.3.2. Kiindulási egérvonalak genotipizálása

Az egerek rendszeres genotipizálását én és Dr. Sándor Zoltán végeztük.

A floxolt *mTrpa1* egerek rutinszerű genotipizálása a tenyésztés során a szolgáltató által javasolt oIMR9168 *forward* primer és oIMR9169 *reverse* primer segítségével történt, melyek floxolt gén esetében 359 bp, vad típusú gén esetében pedig 472 bp méretű PCR termékeket eredményeztek. A *Gfap-Cre* egerek rutinszerű genotipizálása a tenyésztés során szintén a szolgáltató által javasolt 15831 *forward* primer és 15832 *reverse* primer segítségével történt, melyek a transzgén jelenlétében ~400 bp méretű PCR terméket eredményeztek, továbbá belső kontroll céljára az oIMR8744 *forward* primert és oIMR8745 *reverse* primert használtuk, melyek 200 bp méretű PCR terméket eredményeztek.

4.3.3. tdTomato in vivo képalkotás

Az IVIS méréseket én, Dr. Bölcskei Kata és Dr. Sándor Zoltán végeztük.

A tdTomato *in vivo* képalkotásához Cre^{+/-} tdTomato^{Fl/-} egereket használtunk. Az állatokat ketamin-xylazin (100 és 5 mg/kg) keverékkel altattuk. Az állatok pigmentált bundáját egy elektromos borotvával nyírtuk le, hogy ne akadályozza a képalkotást. A tdTomato natív fluoreszcenciájának mérésére az IVIS Lumina III (CLS136334, PerkinElmer) képalkotó rendszert használtuk. A tdTomato detekciójához 500, 520, 540 és 560 nm-es filtereket használtunk spektrum szétválasztásra (*spectral unmixing*) és egy 620 nm-es emissziós filtert, továbbá automatikus expozíciót és 2-es *binning*-et használtunk. A fluoreszcens jel mérése a totál fluxus (fotonszám/s) egyenlő méretű területen (ROI), ami teljesen magába foglalta az agyat. A képalkotás után az állatokat egy alulról melegített dobozba helyeztük és felügyeltük az életfunkcióikat az altatás elmúlásáig.

4.3.4. Gfap-Cre feltérképezése LM-PCR technikával

A primerek tervezését, az LM-PCR technikát és a szekvenálási eredmények kiértékelését én végeztem.

A Gfap-Cre gén helyének azonosítására ugyanazt az LM-PCR protokollt követtük, amit a 2.3.4. fejezetben korábban kifejtettem. A teljes genomi DNS emésztéséhez TaiI (NEB ER1142), HhaI (NEB ER1851), PstI (NEB ER0615) restriktív endonukleázokat használtunk külön reakciókban. A nested PCR-hoz az LM-V A1-3 primereket használtuk a transzgén 5' végéhez, és LM-V B1-3 primereket a 3' végéhez.

4.3.5. Gfap-Cre feltérképezése inverz PCR technikával

A primerek tervezését, az inverz PCR technikát és a szekvenálási eredmények kiértékelését én végeztem.

A Gfap-Cre gén helyének azonosítására ugyanazt az inverz PCR protokollt követtük, amit a 2.3.5. fejezetben korábban kifejtettem. A teljes genomi DNS emésztéséhez PsiI (NEB ER2061) és FspI (NEB ER1221) restriktív endonukleázokat használtunk külön-külön és együtt is. Az első PCR lépéshez az LM-A1 és LM-B1 primereket használtuk (*annealing*: 55 °C). Az első PCR termékeit használtuk a második PCR programhoz az LM-A2 és LM-B2 primerekkel (*annealing*: 60 °C). A második PCR termékeit használtuk fel a harmadik PCR programban az LM-A3 és LM-B3 primerekkel (*annealing*: 60 °C).

4.3.6. Gfap-Cre hetero- és homozigóta megkülönböztetése qPCR technikával

Én végeztem a kvantitatív PCR technikát, Dr. Sándor Zoltán ellenőrzésével.

Az Gfap-Cre transzgén homo- és heterozigóta továbbra sem volt megkülönböztethető genotipizáló PCR technikával, ugyanis az ismeretlen elhelyezkedése miatt nem lehetett erre alkalmas primereket készíteni. Ezt a problémát kromoszomális DNS alapú qPCR technikával igyekeztünk megkerülni.

Gfap-Cre egerek farokmintáiból tisztítottuk a DNS-t 350 µl Farok pufferrel (50 mM TRIS pH 7.5; 50 mM Na-EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 5 mM ditiotritol; 0,5 mM spermicid) és 20 µl 10 mg/ml proteináz K enzimmel (EO0491, ThermoFisher Scientific, USA) 55 °C-on egy éjszakán át. Másnap a mintákat lecentrifugáltuk (13000 rpm, 2 perc) és a felülúszót átpipettáztuk új csőbe. Hozzáadtunk 700 µl izopropanolt, majd alapos keverés (nem vortexszel, hanem csak kézzel rázogató) után lecentrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc), és óvatosan leszívtuk (eltávolítottuk) a felülúszót. A csapadékhoz 500 µl 70% etanolt adtunk, majd alapos

keverés után lecentrifugáltuk (13000 rpm, 2 perc), és óvatosan leszívtuk (eltávolítottuk) a felülúszót és szárítottuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A kiszáradt csapadékhoz 100 µl Tris-EDTA (TE) puffert adtunk, és 20 percig inkubáltuk 55 °C-on. Alapos keverés után megmértük a koncentrációjukat, majd egyformán 10 ng/µl koncentrációra hígítottuk a DNS mintákat.

Az RT-qPCR reakcióhoz *Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (K0374, ThermoFisher Scientific, USA)* kit-et és a genotipizálásban alkalmazott primereket használtuk: 15831 forward primer és 15832 reverse primer a Gfap-Cre transzgenhez, oIMR8744 forward primer és oIMR8745 reverse primer a belső pozitív kontrollhoz. Az RT-qPCR-t a Quantstudio5 (RRID:SCR_020240, Applied Biosystems, USA) kvantitatív PCR gépben végeztük az RT-qPCR programon (**2.5. melléklet táblázat**). Minden mintát kétszer mértünk a qPCR során, és meghatároztuk a Ct értéküket (az a ciklusszám, amikor a minta jelerőssége eléri a küszöbértéket). A Δ Ct értéket úgy kaptuk, hogy a Gfap-Cre Ct értékéből kivontuk a belső pozitív kontroll Ct értékét. A homozigóták esetében 0 Δ Ct értéket vártunk, a heterozigóták esetében pedig 1 Δ Ct értéket.

4.3.7. LoxP hely feltérképezése

A primerek tervezését, a PCR-t és a szekvenálási eredmények kiértékelését én végeztem.

A floxolt TRPA1 egerekben 24. intronban elhelyezkedő loxP szekvenciának már ismertük a pontos helyét (ugyanis ezt veszik közre a szolgáltató által megadott oIMR9168 és oIMR9169 primerek), a 21. intronban lévő azonban még feltérképezésre várt. Erre a célra terveztük az exon21 primer 1 és intron21 primer 2-5 *forward* primereket, továbbá az oIMR9169, továbbá a LoxP fwd *forward* és LoxP rev *reverse* primereket. A tervezést *PrimerBLAST* (RRID:SCR_003095, (76)) webes eszközzel végeztük, az így kapott primereket pedig *Integrated DNA Technologies (IDT) OligoAnalyzer Tool* (RRID:SCR_001363, (141)) segítségével ellenőriztük. A TRPA1 kondicionális KO egerek mintáin a 4 *forward* primert és 3 *reverse* primert minden kombinációban használtuk a standard PCR program (**2.2. melléklet táblázat**) során. Az exon21 *forward* primer és az oIMR9169 *reverse* primer eredményezett egy ~600 bp hosszú PCR terméket, amit ugyanezekkel a primerekkel szekvenált meg a *BIOMI Kft.* A szekvenálási eredményeket *PrimerBLAST* (RRID:SCR_003095, (76)) segítségével elemeztük, és *ApE A plasmid Editor* (RRID:SCR_014266) szoftverrel állítottuk össze a floxolt *mTRPA1* szekvenciát.

4.3.8. TRPA1 kondicionális KO genotipizálás

A primerek tervezését, mRNS izolálást és a genotipizáló RT-PCR technikát én végeztem.

Az *Trpa1* delécióját a loxP szekvenciák között az exon21 és oIMR9168 *forward* primerekkel és oIMR9169 *reverse* primerrel genotipizáltuk. Ez intakt *Trpa1* WT esetén 472 bp, intakt floxolt TRPA1 esetén 359 bp, kondicionális *Trpa1 knockout* esetén pedig 609 bp hosszú PCR terméket eredményezett. RT-PCR tesztet végeztünk az RNS mintákon az exon21 *forward* primer és exon25 *reverse* primer használatával, ami az intakt *Trpa1* mRNS esetén 573 bp, TRPA1 *knockout* esetén 191 bp hosszú RT-PCR terméket eredményezett. További ellenőrző RT-PCR vizsgálatokat végeztünk a cKO mRNA primer 1 *forward* primer (18. exonon) és cKO mRNA primer 2 *reverse* primer (21. és 25. exonok átfedésén), illetve a cKO mRNA primer 3 *forward* primer (21. és 25. exonok átfedésén) és cKO mRNA primer 4 *reverse* primer (27. exonon), amik csak *mTRPA1* KO esetén eredményeznek terméket: az 1-2 primerek 491 bp, a 3-4 primerek pedig 378 bp hosszú terméket.

A primerek tervezését *ApE A plasmid Editor* (RRID: SCR_014266) szoftverrel végeztük és *Integrated DNA Technologies (IDT) OligoAnalyzer Tool* (RRID:SCR_001363, (141)) segítségével ellenőriztük.

4.3.9. Reverz transzkripció kvantitatív PCR

Az RT-qPCR-t és az eredmények kiértékelését én és Dr. Sándor Zoltán végeztük.

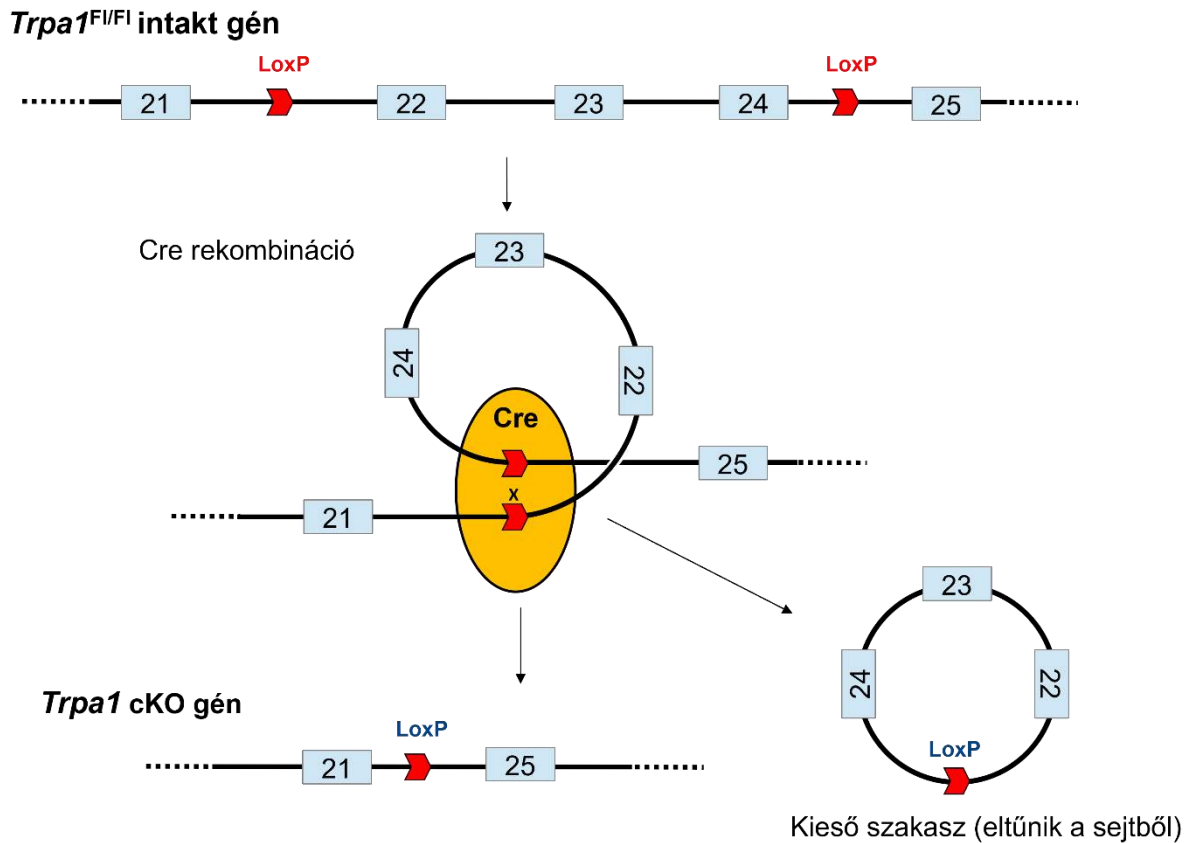
A teljes mRNS-t izoláltuk a homogenizált agymintákból TRI Reagens és Direct-Zol RNA izolációs kit (R2053, Zymo Research, Irvine, CA, USA) használatával a gyártói protokoll szerint. A tisztított RNS koncentrációját NanoDrop ND-1000 (*ThermoFisher Scientific, USA*) spektrofotométerrel határoztuk meg, majd 1 µg totál RNS-t kezeltünk DNáz I (EN0525, *ThermoFisher Scientific, USA*) emésztéssel, hogy eltávolítsuk a genomi DNS szennyezést a mintákból. Mintánként 0,5 µg totál RNS-ből készítettünk cDNS-t reverz transzkripcióval a *Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (K1642, *ThermoFisher Scientific, USA*) használatával. A PCR reakcióhoz *SensiFast Probe Lo-ROX Kit-et* (BIO-84050, *Bioline Inc., UK*), az exon23 jelölt próbát, ex23F *forward* primert (23. exonon) és ex24R *reverse* primert (24. exonon) használtunk. Az RT-qPCR-t a *Quantstudio5* (RRID:SCR_020240, *Applied Biosystems, USA*) kvantitatív PCR gépben végeztük az RT-qPCR programon (2.5. melléklet táblázat). Mivel a primerek és a jelölt próba kötőhelyei a Cre-Lox rekombináció során deletálódnak, és így hiányoznak a *mTRPA1* mRNS-éről, ezért ezzel az RT-qPCR vizsgálattal csak az intakt *mTrpa1* mRNS mennyiségét tudtuk mérni. A referenciagén a béta-aktin (*Actb*)

háztartási gén volt, amit a *Prime Time Std qPCR Assay Mm.PT.58.33540333 (Integrated DNA Technologies, USA)* próbával határoztunk meg ugyanabban a PCR programban. Minden mintát kétszer mértünk az RT-qPCR során, és meghatároztuk a Ct értéküket. A ΔCt értéket úgy kaptuk, hogy az *mTrpal* mRNS Ct értékéből kivontuk a béta-aktin mRNS Ct értékét. A $\Delta\Delta\text{Ct}$ értéket úgy kaptuk, hogy minden egyes minta ΔCt értékéből kivontuk a $\text{Cre}^{-/-}$ csoport átlagos ΔCt értékét (ez reprezentálja a 100% *mTrpal* expressziós szintet). Végül a $100/(2^{\Delta\Delta\text{Ct}})$ képlettel megkaptuk a minták linearizált expressziós arányértékét.

4.4. Eredmények

4.4.1. A *Cre-loxP* rendszer megtervezése és a *Gfap-Cre* géb asztrocita specifikus expressziójának ellenőrzése

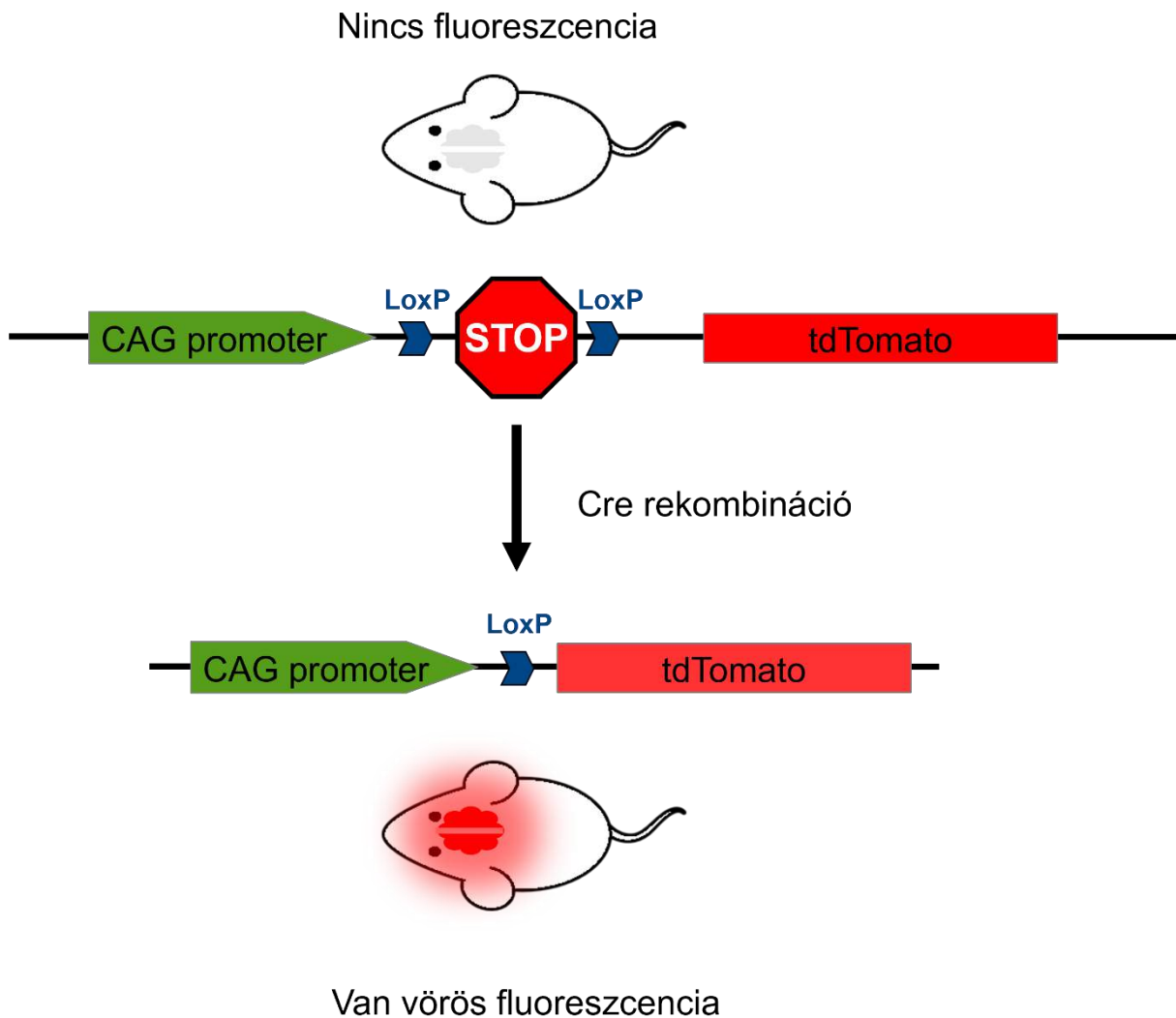
A *Cre-lox* rekombináció egy széleskörben használt módszer kondicionális KO állatok létrehozására (173–175). A *loxP* szekvenciák a *Cre* rekombináz felismerési és rekombinációs helyei, ezért, ha két *loxP* szekvencia ugyanazon a DNS szálon helyezkedik el azonos orientációban, akkor a rekombináció a közöttük lévő szakasz lehurkolódásával jár (**4.1. ábra**). A kivágódott szakasz extrakromoszomális DNS-sé válik, és a gyakorlatban teljesen elveszik a sejtből.



4.1. ábra: A Cre rekombináció által végzett géndeléción, ha a loxP szekvenciák azonos DNS szálon helyezkednek el és azonos orientációban. Ekkor a loxP szekvenciák közötti szakasz lehurkolódik, és gyakorlatilag elveszik a sejtől. A *Trpa1*^{F1/F1} génből ez csupán a 22-24. exonokat magába foglaló génszakaszt vágja ki, de ez elég ahhoz, hogy a deletált génről ne expresszáldhasson funkcionális fehérje.

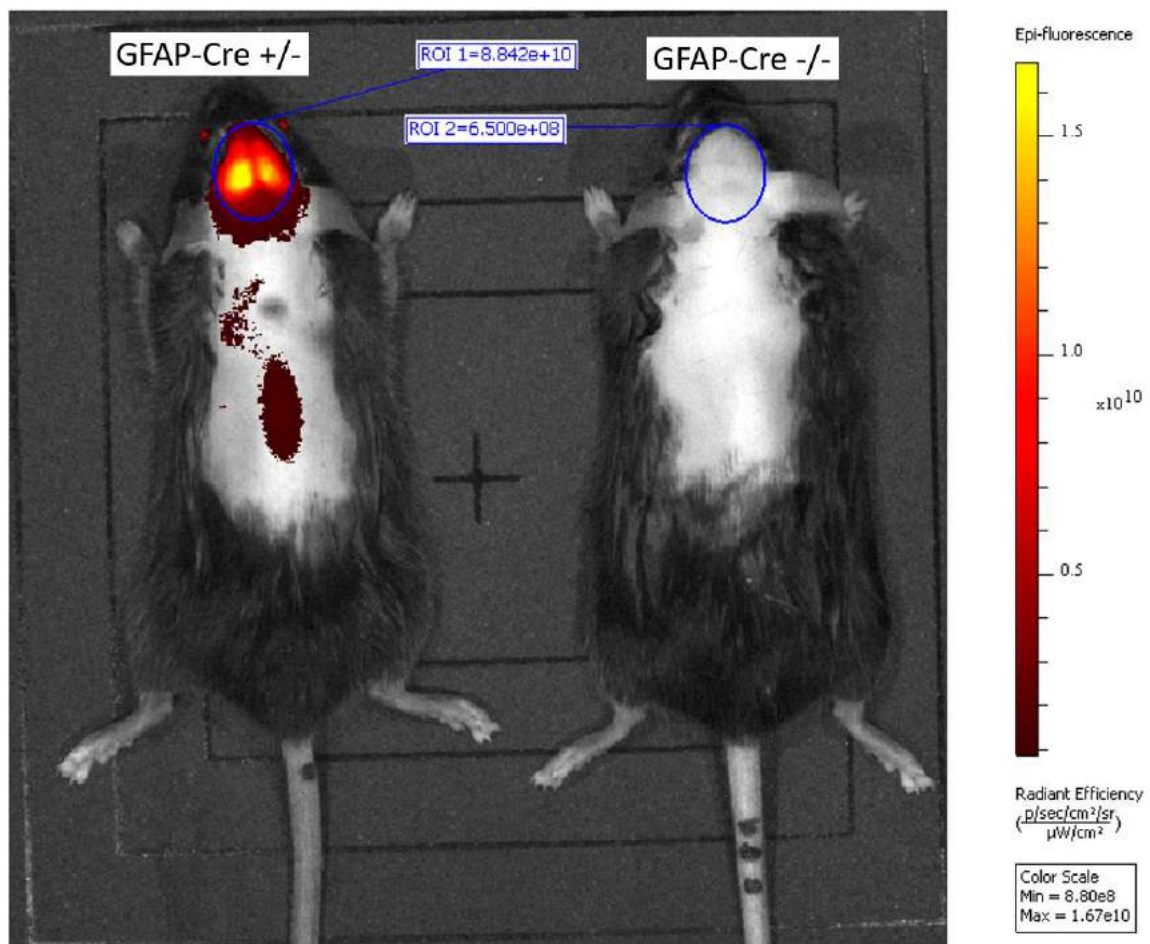
A Cre rekombináza gén expressziója feltételekhez köthető, mint sejt-specifikus gének promóteréhez (pl. *Gfap* gén promóteréhez), indukátorok (pl. tamoxifen, távoli vörös fény) vagy inhibitorok (pl. doxociklin) jelenlétéhez. A mi célunk asztrocita-specifikus kondicionális *Trpa1* KO egerek létrehozása volt, így az asztrocita progenitor sejt-specifikus *Gfap* gén promóteréhez kötött Cre rekombináza transzgén hordozó egeret választottunk, amelyet nem nekünk kellett létrehoznunk, hanem készen vettük a *The Jackson Laboratory* kísérleti állatokra specializálódott cégtől. A *Gfap*-Cre gén asztrocita-specifikus expresszióját mi magunk is tesztelni akartuk, amihez tdTomato riporter egerekkel kereszteztük őket. A tdTomato riporter eger egy olyan tdTomato vörös fluoreszcens riporter gént hordoz, ami előtt van egy CAG erős promóter és egy loxP szekvenciával közrefogott STOP kazetta. A floxolt STOP kazetta Cre rekombináció hiányában teljesen megakadályozza a gén expressziót. A Cre rekombináció

hatására kivágódik a floxolt STOP kazetta, és az CAG promóter nagy mennyiségben expresszálja a tdTomato riporter fehérjét, így a Cre rekombinázt expresszáló sejtek erős vörös fluoreszcens jelet fognak mutatni (4.2. ábra). Ez alapján a keresztezéssel létrejött F1 utódokban ($Gfap-Cre^{+/-}$ tdTomato^{F^L-}) várhatóan azokban a sejtekben kapunk vörös fluoreszcens jelet, amelyekben a *Gfap*-Cre gén expresszálódik, tehát remélhetőleg csak az asztrocitákban, de minden asztrocitában.



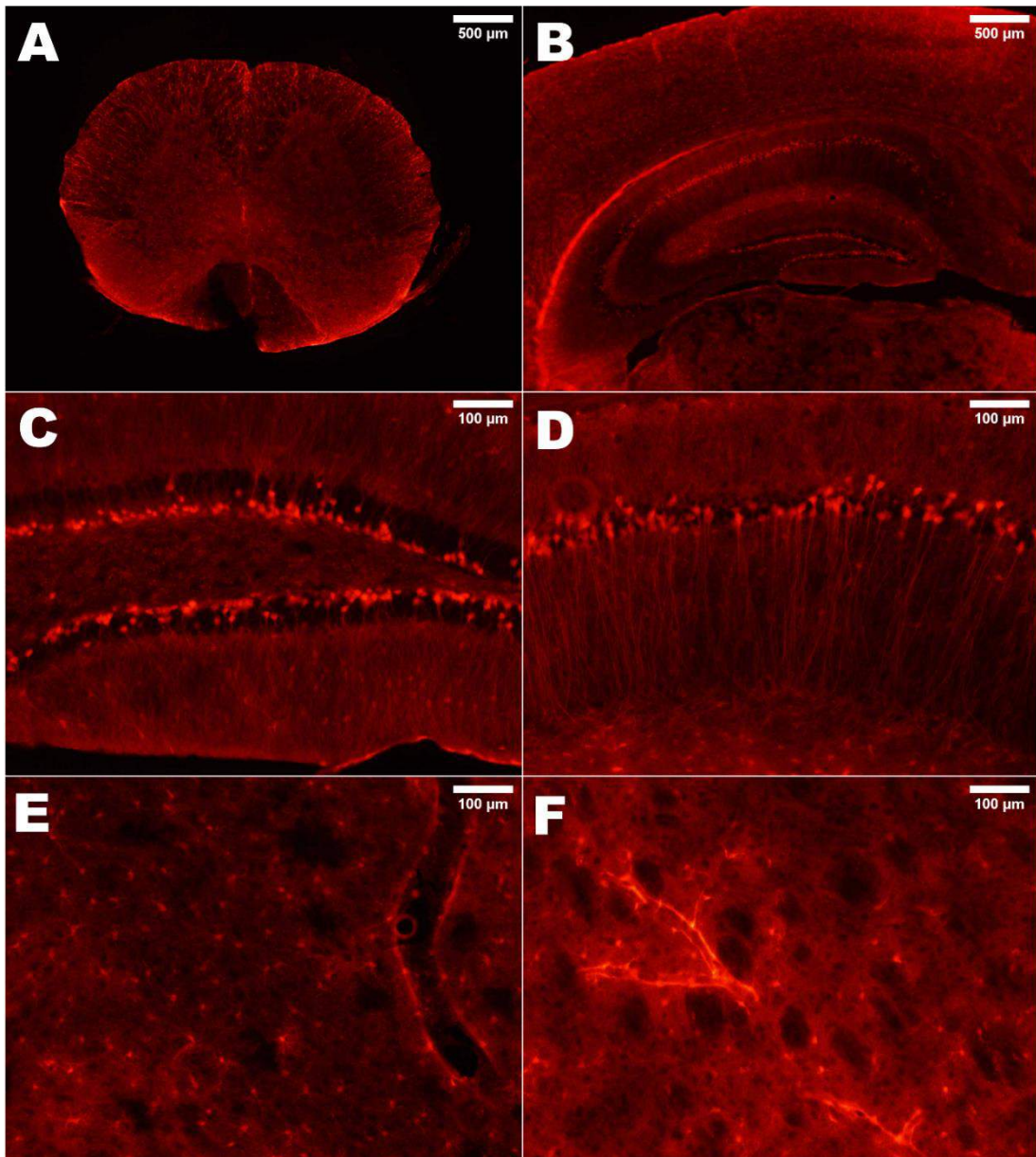
4.2. ábra: A tdTomato riporter egér működési modellje. Cre rekombinázt hiányában a floxolt STOP kazetta nem engedni expresszálódni a tdTomato gént, így nincs vörös fluoreszcencia az egérben. A Cre rekombináció hatására kivágódik a STOP kazetta, és a CAG promóter nagy mennyiségben expresszálja a tdTomato riporter fehérjét, ezzel a Cre rekombinázt expresszióval megegyező mintázatban megjelenik a vörös fluoreszcencia az egerekben.

A *Gfap-Cre*^{+/-} tdTomato^{Fl/-} egerekben *in vivo* képalkotással és szövetmetszeti fluoreszcens mikroszkópiával mértük a tdTomato vörös fluoreszcenciáját. Az *in vivo* képalkotás alapján a *Gfap* promóter által meghajtott Cre gén elsősorban az agy területén és a szemben (várhatóan a retinában) expresszáldott, továbbá kis mértékben a gerincvelő területén, a periférián pedig elhanyagolható mértékben (4.3. ábra). A vörös fluoreszcens mikroszkópia az idegrendszer területén azt mutatta, hogy az asztrociták és néhány jól azonosítható neuron expresszálják a tdTomato riporter fehérjét (4.4. ábra). A kapott eredményeket összehasonlítottuk más kutatási eredményekkel (176), és arra a következtetésre jutottunk, hogy az asztrociták nagy része expresszálja a *Gfap-Cre* gént, a neuronoknak pedig csak kis része, így *Gfap-Cre* gén megfelelően specifikus volt. Várhatóan a kísérletre tervezett *Gfap-Cre*^{+/-} tdTomato^{Fl/Fl} egerekben is ugyanilyen mintázatban fog kivágódni a *Trpa1* gén.



4.3. ábra: Reprezentatív eredmény a Cre rekombináz expressziós mintázatáról a tdTomato vörös fluoreszcencia alapján *in vivo* képalkotással. A bal oldali egér Cre^{+/-} tdTomato^{Fl/-} genotípusú, míg a jobb oldali Cre^{-/-} tdTomato^{Fl/-} genotípusú kontroll állat. A fluoreszcencia erőssége alapján a *Gfap* promóter

által meghajtott Cre gén elsősorban az agy területén és a szemben expresszálódott, továbbá kis mértékben a gerincvelő területén, a periférián pedig elhanyagolható mértékben. Az agy területén kijelölt egyenlő területen (ROI) látható az átlagos fluoreszcencia jelerőssége: a Cre^{+/+} egérnek ROI 1 = 8,842 x 10¹⁰ p (sec cm² sr)⁻¹ / μW (cm²)⁻¹, míg a kontroll a Cre^{-/-} egérnek ROI 2 = 6,5 x 10⁸ p (sec cm² sr)⁻¹ / μW (cm²)⁻¹.



4.4. ábra: Reprezentatív vörös fluoreszcens mikroszkópiás szövetmetzeti képek a központi idegrendszerből. Lumbális gerincvelő átfogó keresztmetzeti képe (A). Hippokampusz átfogó keresztmetzeti képe (B). Szemcses sejtek (neuronok) a hippocampuszban, *dentate gyrus* (C). Piramissejtek a hippocampuszban, CA1 (D). Asztrociták a szürkeállományban (E). Hajszálereket körvonalazó asztrociták a szürkeállományban (F).

4.4.2. Nehézségek a *Gfap-Cre* gén feltérképezésében

A *Gfap-Cre* gén elhelyezkedéséről a létrehozó cég sem tudott információval szolgálni (88). Ennek az egyik nagy hátránya, hogy a jelenlegi genotipizáló primerek csak azt tudják kimutatni, hogy a transzgén hordozza-e az egér vagy nem, de pozitív egerek esetében nem tud különbséget tenni hetero- és homozigóták között. A Cre rekombináz esetében azonban fontos volt, hogy minden kísérleti állatban hasonló mennyiségben expresszálódjon, ugyanis ez várhatóan hatással lesz a hatékonyságára és specificitására.

Korábban a ligálás-mediált és inverz PCR technikával sikeresen azonosítottunk az ismeretlen elhelyezkedésű (humán *SSTR4*) transzgéneket egerekben, így a *Gfap-Cre* génhez is ezeket a módszereket választottuk. Terveztünk primereket *nested* PCR-hoz, amelyeket egyaránt használtunk a ligálás-mediált és inverz PCR-hoz is. Többnyire azonban nem eredményeztek terméket a harmadik PCR program végére, de ha mégis, azok a szekvenálás során hoztak értékelhetetlen eredményeket. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a *Gfap-Cre* transzgén valószínűleg hosszú ismétlődő szekvenciába inszertálódhatott (hasonlóan a *hSSTR4* transzgén U1 és U2 kópiáihoz a humanizált egerekben).

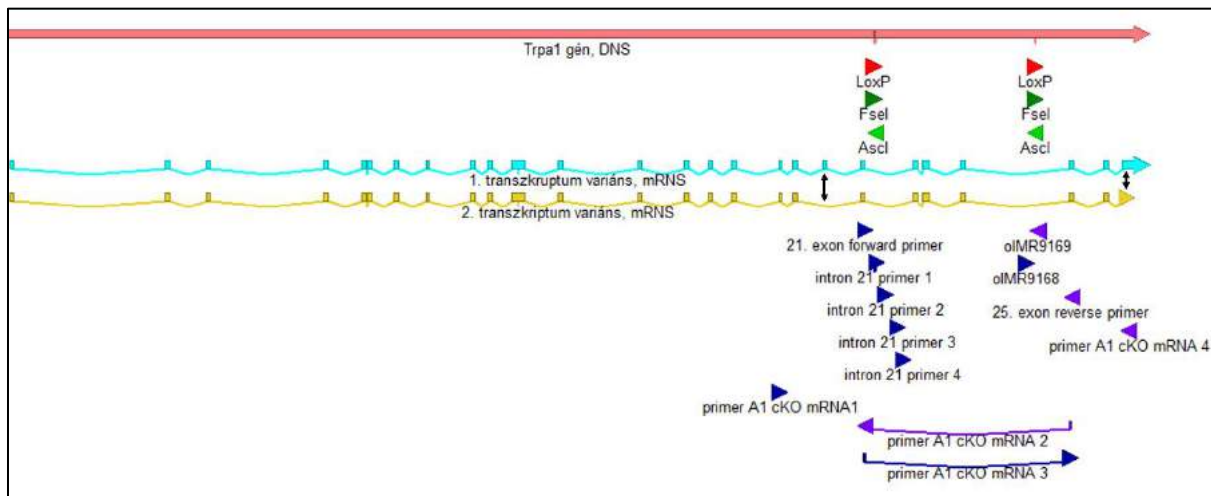
Így nem voltunk képesek optimális primereket tervezni a *Gfap-Cre* hetero- és homozigóta egerek megkülönböztetésére. Ezt a problémát genomi DNS alapú kvantitatív PCR technikával kerültük meg. Mivel a homozigóta egér dupla annyi *Gfap-Cre* transzgént hordoz, mint a hetero, ezért két jól elkülöníthető csoportra számítottunk az eredményeknél, ahol a két csoport között a $\Delta Ct = 1$. Ezzel szemben a pontosan beállított DNS mennyiségek ellenére is rendkívül nagy varianciát tapasztaltunk, így a Taqman-próba mentes, SYBR Green I DNS festék alapú qPCR módszert nem találtuk megbízhatóan pontosnak.

Végül úgy határoztunk, hogy a *Gfap-Cre* gént mindig hetero formában tartjuk a tenyésztés során, hogy biztosítsuk a kísérleti egerekben az azonos expressziós szintet. Úgy véltük, hogy az alacsonyabb Cre rekombináz expresszió csökkenti a nem specifikus rekombinációk esélyét, így ezt még előnyösnek is találtuk a kísérlet szempontjából.

4.4.3. A *loxP* szekvenciák elhelyezkedése a *Trpa1* génben

A *Trpa1^{Fl/Fl}* egerekben nem volt ismert a *loxP* szekvenciák (a Cre rekombináz specifikus felismerési és rekombinációs szekvenciái) pontos elhelyezkedése az egér *Trpa1* génben. A 3' véghez közelebbi *loxP* szekvencia pontos helyét már ismertük, mert ezt fogja közre az egereket létrehozó cég által megadott genotipizáló primerek (oIMR9168 és oIMR9169). A másik *loxP* szekvenciáról annyi információt kaptunk, hogy a 21. intronban helyezkedik el, így erre a

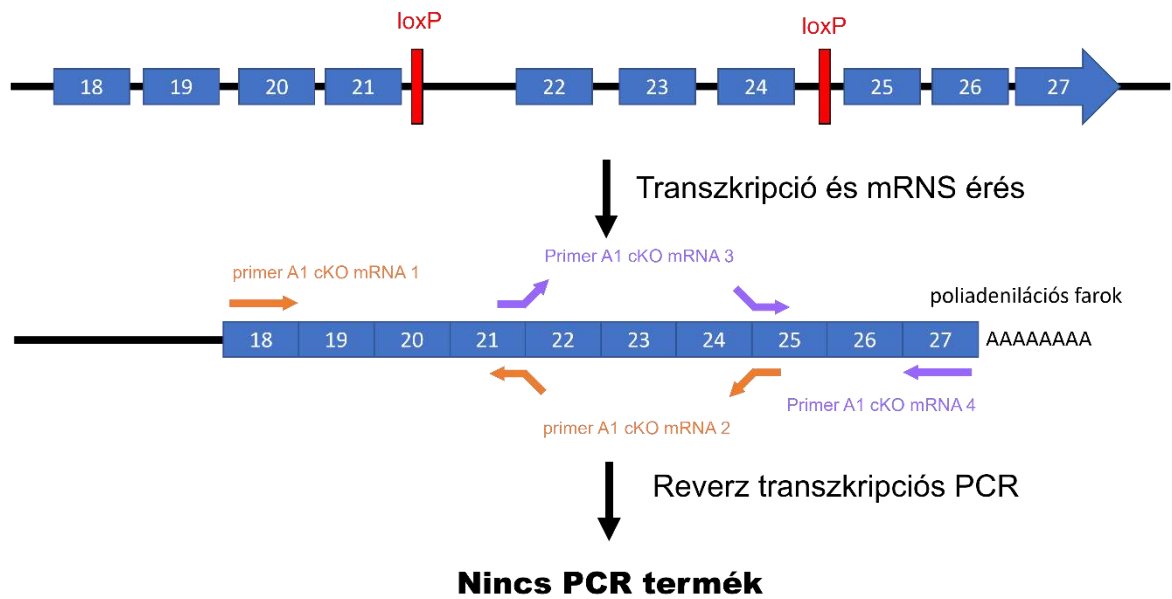
szakaszra 4 *forward* primert terveztünk, illetve még egyet a 21. exonra, majd ezeket párosítottuk a loxP szekvenciára illeszkedő primerrel. A kapott PCR terméket szintén szekvenáltattuk, és az eredmények alapján összeállítottuk a *Trpa1*^{Fl/Fl} gén pontos szekvenciáját (4.5. ábra).



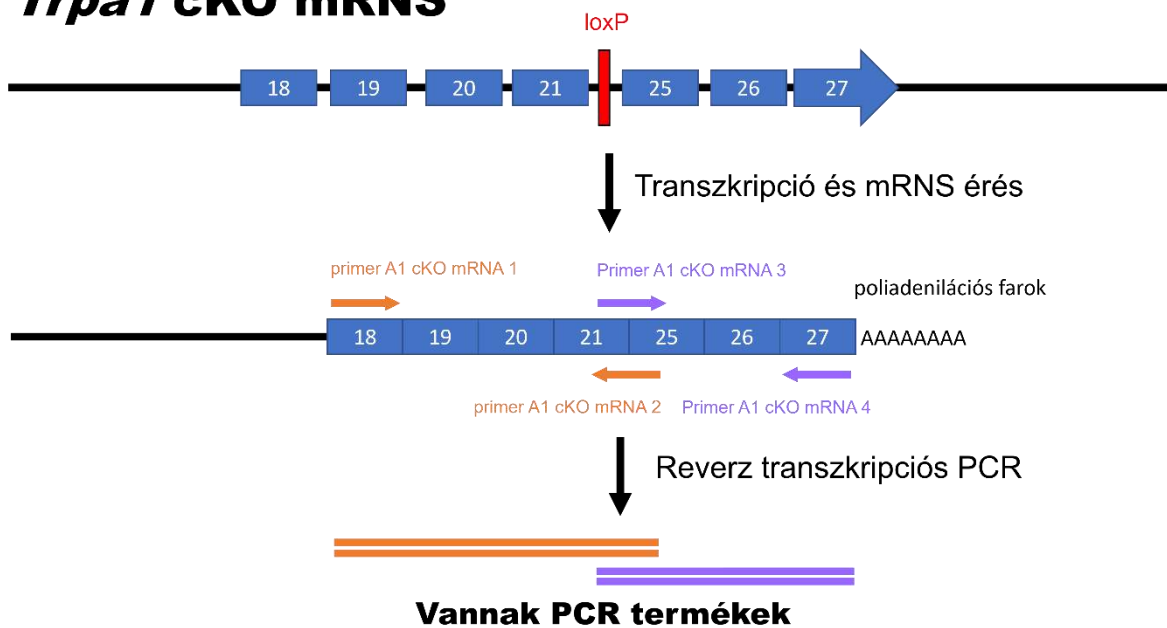
4.5. ábra: Géntérkép. A rózsaszín sáv a teljes egér *Trpa1* gén kódoló szakaszát szemlélteti, jobb végén a nyíl jelöli a gén orientációját (5' végtől a 3' vég felé). A különböző transzkriptumokat világoskék (transzkriptum variáns 1) és sárga (transzkriptum variáns 2) jelölik, azon belül a függőleges sávok az exonok, míg az alsó íves átkötő vonalak a kivágódó intronok. A transzkriptum variánsok között a különbségeket fekete kettős nyilak jelölik, az 1. transzkriptum variánsban eggyel több exon van (20. exon), és az utolsó exon hosszabb. Itt kiemelnénk, hogy az exonok számozását az 1. transzkriptum variáns szerint vezettük. Piros nyilak mutatják az azonosított loxP szekvenciák elhelyezkedését és azonos orientációját. Zöld nyilak jelölik a loxP szekvenciákat határoló FseI és AscI restriktációs endonukleázok hasító helyeit, ezek segítségével ellenőriztük a loxP szekvenciák azonos orientációját. A jobbra mutató kék nyilak a *forward* primereket, míg a balra mutató világoskék nyilak a *reverse* primereket jelölik. A primer A1 cKO mRNA 2 és 3 primerek csak a 21. és 25. exonok találkozásakor tudnak az mRNS-hez kapcsolódni, azaz akkor, ha a loxP szekvenciák közötti szakasz kivágódásával létrejött a *Trpa1* kondicionális KO.

Erre terveztünk olyan PCR primereket, amikkel rutinszerűen azonosíthattuk a Cre rekombináció hatására kivágódott *Trpa1* szakaszt mind a DNS-ben (exon 21 *forward*, oIMR9168 *forward* és oIMR9169 *reverse* primerek), mind az RNS-ben (primer A1 cKO mRNA 1-2 és 3-4 primer párok), így azonosíthatókká váltak a kondicionális és globális KO egerek (4.5. és 4.6. ábra). Az aspecifikus Cre expresszió hatására véletlenül létrejött globális KO egereket kizártuk a további tenyésztésből és a kísérletekből.

Intakt *Trpa1* mRNS



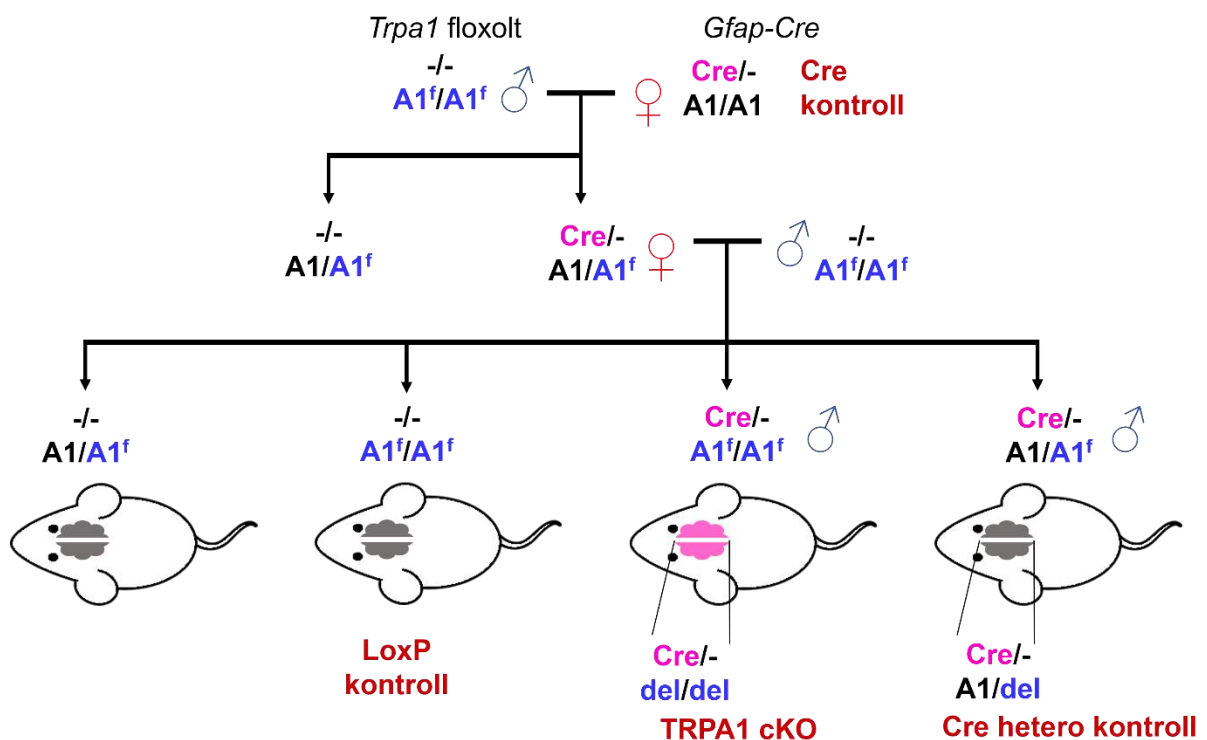
Trpa1 cKO mRNS



4.6. ábra: Az mRNS alapú PCR tesztek a *Trpa1* cKO egerek genotipizálására. A primer A1 cKO 2-3 primerek átfedőek a szekvenciával, ami a 21. és 25. exon összekapcsolódásakor jön létre, így csak a *Trpa1* cKO génekről készült mRNS eredményez PCR terméket. A narancs és lila színnel jelölt primer párokat külön PCR reakciókban használtuk.

4.4.4. *Gfap-Cre* és *Trpa1*-floxolt egerek keresztezése

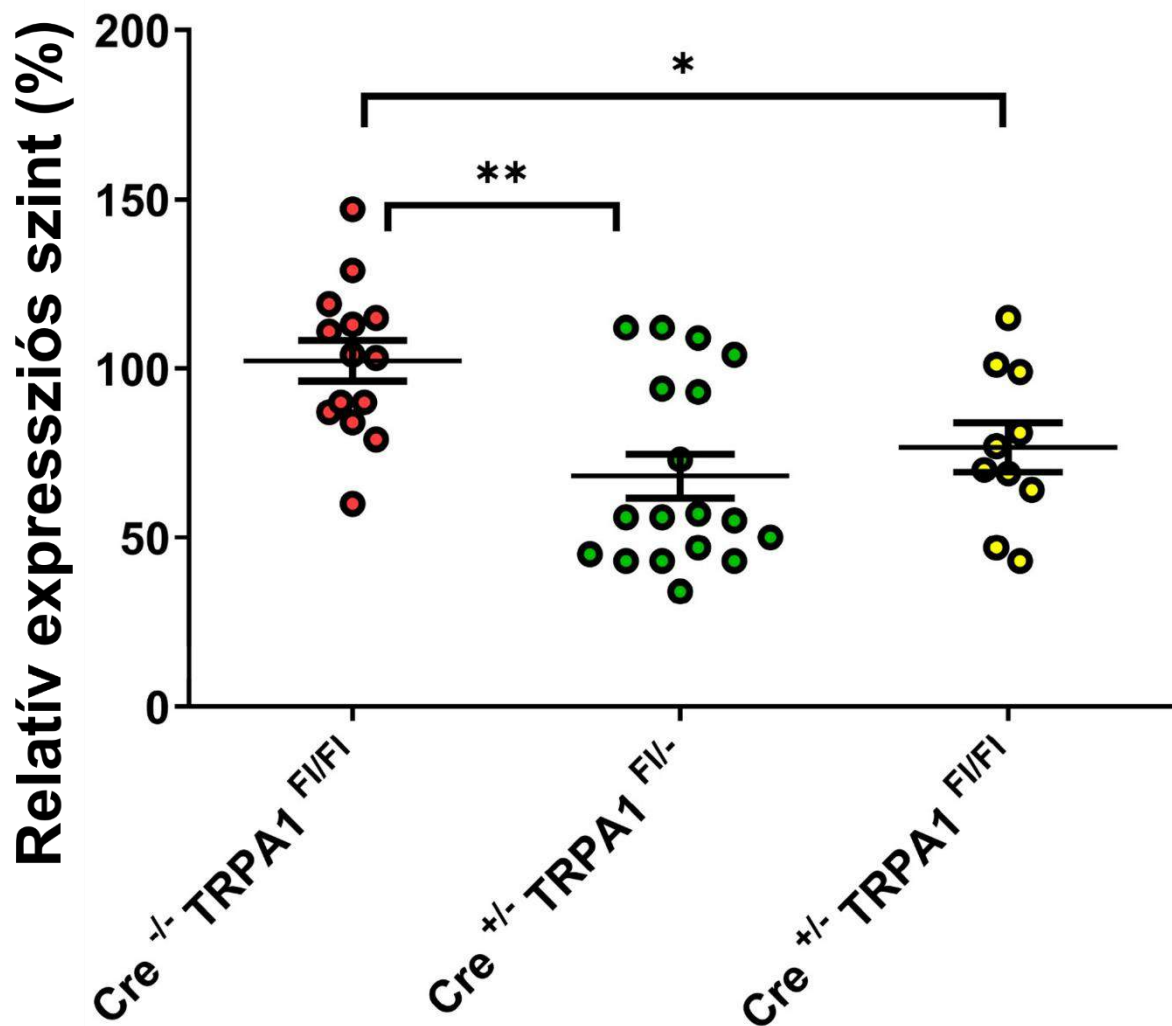
A kísérletre tervezett asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egereket úgy hoztuk létre, hogy kereszteztük a *Gfap-Cre*^{+/-} és *Trpa1*^{F1/F1} egereket (4.7. ábra). Az F1 generációban kapott mindkét génre heterozigóta *Gfap-Cre*^{+/-} *Trpa1*^{F1/-} egereket visszakeresztettük egyszer *Trpa1*^{F1/F1} egerekkel. Az így kapott *Gfap-Cre*^{+/-} *Trpa1*^{F1/F1} egerek asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egerek voltak, míg az alomtestvéreik közül kontrollnak használtuk a *Gfap-Cre*^{+/-} *Trpa1*^{F1/-} (hetero kontroll, fele mennyiségben deletált *Trpa1* gén), *Gfap-Cre*^{-/-} *Trpa1*^{F1/F1} (loxP kontroll, Cre rekombináza mentes, gyakorlatilag *Trpa1* WT fenotípusú) és *Gfap-Cre*^{+/-} *Trpa1*^{-/-} (Cre kontroll, loxP mentes, csak asztrocita specifikus Cre rekombinációk vizsgálatához). A tenyésztéshez és kísérletekhez minden egeret genotipizáltunk, hogy hordozzák-e a *Gfap-Cre*, floxolt *Trpa1* és *Trpa1* cKO géneket. Ha egy egérnek a farokból vett mintájában kimutattuk a *Trpa1* cKO gén jelenlétét, akkor véletlen kialakult *Trpa1* globális KO-nak ítéltük, és kivontuk a tenyésztésből és kísérletekből.



4.7. ábra: A *Gfap-Cre*^{+/-} és *Trpa1*^{F1/F1} egerek keresztezési sémája. Az A1 a WT *Trpa1* gén jelöli, az A1^f a floxolt *Trpa1* gént, a Cre a *Gfap* promóter által meghajtott Cre rekombináza gén, mínusz jel (-) a Cre transzgen hiányát, a del pedig a Cre rekombináció hatására az asztrocita sejtekben (az agyban) kivágott (deletált) *Trpa1* gént jelöli.

A kísérletben használt egereknek megmértük az egész agyban expresszált intakt *Trpa1* mRNS szintjét, és azt tapasztaltuk, hogy a *Trpa1* WT fenotípusú loxP kontroll egerekhez képest

(*Gfap-Cre^{-/-} Trpa1^{F1/F1}*) szignifikánsan csökkent az asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egerekben (*Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/F1}*), továbbá már a heterozigóta egerekben is (*Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/-}*), amelyekben csak az egyik kromoszómáról tudott kivágódni a *Trpa1* gén (4.8. ábra). Természetesen azt vártuk, hogy minden egérben maradjon intakt *Trpa1* mRNS expresszió, hiszen az asztrocitákon kívül a többi sejtől nem deletálódhatott a *Trpa1* gén, különben azt jelezte volna, hogy *Trpa1* globális KO egér jutott a kísérleti állatok közé.



4.8. ábra: Az intakt *Trpa1* mRNS relatív expressziós szintje az asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egerekben (*Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/F1}*) és kontroll alomtöveikben (*Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/-}* és *Gfap-Cre^{-/-} Trpa1^{F1/F1}*). $\bar{x} \pm SEM$, egyutas ANOVA, Tukey összehasonlító teszt. Szignifikáns különbségek: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 7-9$.

4.5. Megbeszélés

A TRPA1 receptor hozzájárul a neurodegenerációs betegségek neuroinflammációs folyamataihoz. Korábbi kutatásunk kimutatta az SM betegségmodellben, hogy a *Trpa1* globális KO egerek ellenállóbbak a kuprizon indukált demielinizációval szemben (160,161). Arra a következtetésre jutottunk, hogy a TRPA1 szabályozza a mitogén-aktivált protein kináz útvonalat, ami a sejtek apoptózisához vezet, ezért a TRPA1 hiányában sokkal kisebb a kifejlett oligodendroglia pusztulás kuprizon hatására. TRPA1 gátlás egy új gyógyszermechanizmus lehetőségét jelenti a SM kezelésében.

Mivel a reaktív asztrocitákról ismert, hogy hozzájárulnak a neurodegeneratív betegségek neuroinflammációs folyamataihoz (171,172), ezért az asztrociták szerepét akartuk vizsgálni az SM patomechanizmusában részt vevő TRPA1 mediált folyamatokban, a kuprizon indukált demielinizációs SM betegségmodelljében. Erre a célra asztrocita specifikus TRPA1 cKO egereket terveztünk, amit Cre-loxP rendszerrel akartunk létrehozni. A legszéleskörűbben alkalmazott asztrocita marker a *Gfap* gén, így olyan egeret választottunk, amelyben a Cre rekombinááz génjét a *Gfap* promóter hajtja meg. A *Gfap-Cre^{+/-}* egereket előzetesen úgy teszteltük, hogy kereszteztük tdTomato riporter egerekkel. Az így kapott utódokban a tdTomato vörös fluoreszcens fehérje azokban a sejtekben expresszáldott, ahol a Cre rekombinááz is. A tdTomato fluoreszcenciát egész testen *in vivo* képalkotással, az agy területén pedig fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy elsősorban az agy területén, az asztrocita sejtekben expresszáldódik a Cre rekombinááz, de kis részben aktivitást mutatott neuronokban is. Ezt megfelelően specifikus expresszióknak ítéltük, és ha ennek megfelelően deletáldódik a *Trpa1* a kísérletre szánt *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/F1}* egerekben, akkor a várható funkció kiesést valóban az asztrocitákhoz köthetjük. Más kutatócsoportok is tapasztalták a *Gfap-Cre* egerekben, hogy az asztrociták túlnyomó többségében végbemegy a rekombinááció, de kis arányban a neuronokban és oligodendrogliaokban is megfigyelhető volt (176–178). Feltételezhetően ez a sejtek közötti anyagtranszfernek és a kis mértékű aspecifikus génextpresszióknak köszönhető. A *Gfap-Cre* transzgén ismeretlen inszerciós helyét az egér genomban ligálás mediált és inverz PCR technikákkal igyekeztünk azonosítani, de sajnos sikertelenül. Arra a következtetésre jutottunk, hogy valószínűleg hosszú ismétlődő szekvenciába épült be.

A kísérletre szánt egereket *Gfap-Cre^{+/-}* és *Trpa1^{F1/F1}* egerek keresztezésével hoztuk létre. A *Trpa1^{F1/F1}* egerekben a loxP helyeket PCR technikával és szekvenálással azonosítottuk. Ezt követően olyan genotipizáló primereket tudtunk tervezni rá, amelyekkel megkülönböztethetőkké váltak a sejtek csak egy részéből (kondicionális), és az összes sejtből

(globális) kiütött *Trpa1* gént hordozó egerek. Így a kísérletre keresztezett állatokat már tudtuk szűrni a Cre rekombináza véletlen aszpecifikus működése következtében létrejött *Trpa1* globális KO genotípusra. A keresztezés végén létrehozott *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{Fl/Fl}* egerekben RT-qPCR segítségével mértük az intakt *Trpa1* csökkent expressziós szintjét. A vizsgálatokat összesítve a létrehozott *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{Fl/Fl}* egereket megfelelőnek találtuk a kuprizon indukált demielinizációs kísérletre. Kontroll csoportoknak, *Gfap-Cre^{-/-} Trpa1^{Fl/Fl}* (loxP kontroll, ami gyakorlatilag *Trpa1* WT fenotípust mutat) és *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{Fl/-}* egereket (hetero kontroll) biztosítottunk.

Dr. Kriszta Gábor vezette funkcionális kísérletekben az asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egerek a *Trpa1* WT egerekhez képest szignifikánsan ellenállóbbak voltak a kuprizon indukált demielinizációval szemben a legintenzívebb patofiziológias elváltozások időszaka alatt, azaz a kezelés 3-5. heteiben, majd a 6. hétre mindkét csoportban mérséklődtek a tünetek és a csoportok között tapasztalható különbségek. A korábban vizsgált globális *Trpa1* KO egerekhez képest az asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egerek kevésbé voltak ellenállóbbak a kuprizon indukált demielinizációval szemben, ami arra utal, hogy az asztrocitáknak nem egyedüli szerepe van a szklerózis multiplex során a TRPA1 mediált demielinizációban (179). A TRPA1 receptorok expressziója és működése az agy más sejtjeiben (oligodendrociták, mikroglia, neuronok) további vizsgálatot igényel (166,180).

4.6. Következtetés

A TRPA1 receptort elsősorban primer szenzoros neuronok expresszálják; azonban nemrégiben egér agykéregben kimutatták asztrocitákban és oligodendrocitákban. Kutatócsoportunk már korábban bizonyította egerekben, hogy a *Trpa1* gén deléciója enyhíti a kuprizon által kiváltott oligodendrocita apoptózist, és ezáltal a demielinizációt. Jelen tanulmányban asztrocita specifikus *Trpa1* kondicionális *knockout* egerek létrehozását tűztük ki célul, amelyekben az asztrociták szerepét vizsgáltuk a kuprizon indukált demielinizációs SM betegségmodellben. Ezeket az állatokat *Gfap-Cre^{+/-}* és *Trpa1^{Fl/Fl}* egerek keresztezésével hoztuk létre. Az asztrocita sejt-specifikus *Gfap* promóter által meghajtott Cre rekombináza gén expressziós mintázatát tdTomato riporter egér segítségével térképeztük fel. Kimutattuk, hogy elsősorban az agy területén, az asztrocita sejtekben expresszálódik a Cre rekombináza, de kis részben aktivitást mutatott neuronokban is. A *Gfap-Cre* transzgén elhelyezkedését nem sikerült azonosítanunk az egér genomjában. A *Trpa1^{Fl/Fl}* egerekben azonosítottuk a loxP szekvenciák elhelyezkedését, és rutin genotipizálási módszert alakítottunk ki hozzá, ezáltal a kuprizon indukált demielinizációs kísérletre létrehozott *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{Fl/Fl}* egereket tudtuk

ellenőrizni, hogy ne alakuljanak ki *Trpa1* globális KO egerek a Cre rekombinááz nem asztrocita specifikus működésének következtében. A *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/F1}* egerek agyában mértük az intakt *Trpa1* gén expressziós szintjének változását. Megerősítettük, hogy a kísérletre szánt asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egerek létrehozása sikeres volt.

Az asztrocita specifikus *Trpa1* kondicionális knockout egerek a *Trpa1* globális knockout egerekhez képest kevésbé voltak ellenállóbbak a kuprizon indukált demielinizációval szemben, ami arra utal, hogy az asztrocitáknak nem egyedüli szerepe van a szklerózis multiplex során a TRPA1 mediált demielinizációban.

4.7. Mellékletek

Név	Szekvencia
15831	TCC ATA AAG GCC CTG ACA TC
15832	TGC GAA CCT CAT CAC TCG T
oIMR8744	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
oIMR8745	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
oIMR9168	AGC AGG AGC AGA AGT ATG GAA
oIMR9169	GAA GGC CAT GGC ATC TTA AC
exon 21	TGT TCC TCA ACA TCC CAG CG
exon 25	CGT GCC TGG GTC TAT TTG GA
intron 21-2	CAC CAG CTG CAG ATA ACC ATC
intron 21-3	TGA GAG CAC TGG GAA TGT ACT G
intron 21-4	AGA GGA CAG AGG TAG CAC TTG
intron 21-5	ACA CTC TAT TCA GGG TTA CAC AG
mA1seqprimer	ATA TCT CCT TCA ATG TCC AC
ex23F	ATG CCT TCA GCA CCC CAT TG
ex24R	GAC CTC AGC AAT GTC CCC AA
exon23 jelölt próba	56FAM/tgggcagct/ZEN/tattgccttcacaat/3IABkFQ
LM-A1	CCT GTC ATA GCA ACA GCC TAT ACT
LM-A2	AGC CTA TAC TCC ATA CCA GCG A
LM-A3	GCG ACA TGG TAT TTG TTT GAG CT
LM-B1	TCT CCG GGT CTG AGA GTG AG
LM-B2	CTG AGA GTG AGG CTG GGT AG
LM-B3	GGT TAT TAC GCC CAA CCG GA

4.1. melléklet táblázat: Felhasznált primerek és a qPCR-hoz használt jelölt próba

5. Összefoglalás

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiái Intézetben a kutatócsoportunk érdeklődésének középpontjában áll a fájdalom és gyulladás modulációjában résztvevő TRPA1 és SST₄ receptorok mechanizmusának vizsgálata. A PhD kutatásom során az ezekhez fűződő aktuális kutatási projektek számára hoztam létre modellorganizmusokat, és teszteltem a transzgén expresszióját és a fehérje működését.

Sikeresen létrehoztuk a humanizált *SSTR4* egereket, melyek alkalmasak lesznek a humán és egér homológ SST₄ receptorok közötti faji különbségek alaposabb feltárására, a humán SST₄ receptor fiziológiás és patológiás működésének alaposabb vizsgálatára, továbbá az SST₄ agonista új gyógyszerjelöltek preklinikai vizsgálatára. Ezeket az egereket úgy hoztuk létre, hogy készítettünk egy olyan transzpozon vektort, amely hordozza a humán *hSSTR4* gént az összes expressziós szabályozóelemével együtt, majd a transzgént véletlenszerű helyre inszertáltuk *Sstr4* génhányos egerekbe. Ezeknek a kópiáknak az elhelyezkedését az egér genomban ligálás mediált PCR-ral azonosítottuk. A luciferáz riporter fehérje lumineszcenciája alapján *in vivo* képalkotással kimutattuk, hogy a *hSSTR4* transzgén legfőképp az agy területén expresszálódik. RT-qPCR technikával megerősítettük, hogy az agyban és még néhány perifériás szervben expresszálódik a *hSSTR4* transzgén, ami megegyezett az *in vivo* képalkotásban kapott eredményekkel. RNAscope *in situ* hibridizációval kimutattuk, hogy a *hSSTR4* transzgén expresszálódik a glutamáterg excitációs neuronokban a hippocampusz CA1 és CA2 területén, a GABA-erg interneuronokban a *bulbus olfactorius* szemcsés rétegében, illetve mindkét fajta neuronban az elsődleges szomatoszenzoros kéregben, a piriform kéregben, prelimbikus kéregben és az amigdalában.

Sikeresen létrehoztunk humán TRPA1 egyszeres és többszörös mutáns változatokat, mellyel sikerült azonosítanunk, hogy a szerves poliszulfidok a C621, C641 és C665 ciszteinekhez kovalensen kapcsolódva aktiválják a receptort. Csak ezek együttes tripla mutációja okozza a TRPA1 inszenzitivitását a szerves poliszulfidok iránt, mely megegyezik az elektrofil agonisták általános kötőhelyével. A transzmembrán régióban a C727 és C834 ciszteinek, melyek feltételezett kötőhelyei az erősen hidrofób elektrofil agonistáknak, nem vesznek részt a szerves poliszulfidok indukálta TRPA1 aktivációban. A kísérletekhez használt TRPA1 mutáns változatokat humán TRPA1 cDNS-t expresszáló plazmid vektor PCR alapú helyspecifikus mutagenézisével hoztuk létre. A mutáns receptorok kötési tulajdonságait előzetesen *in silico* molekuláris dokkolási technikával vizsgáltuk. A funkcionális változásokat *in vitro*

módszerekkel vizsgáltuk: kalcium-érzékeny fluoreszcens áramlási citometriával, radioaktív ^{45}Ca folyadék szcintilláció számolással és *whole-cell patch-clamp* technikával.

Sikeresen létrehoztuk az asztrocita specifikus *Trpa1* cKO egereket az asztrociták szerepének vizsgálatára a TRPA1 mediált kuprizon indukált demielinizációban, egy SM betegségmodellben. Ezeket az állatokat *Gfap-Cre^{+/-}* és *Trpa1^{Fl/Fl}* egerek keresztezésével hoztuk létre. Előzetes vizsgálat során tdTomato riporter egér segítségével kimutattuk, hogy a *Gfap* promóter által meghajtott Cre rekombinááz gén elsősorban az agy területén, az asztrocita sejtekben expresszálódik, de kis részben aktivitást mutatott neuronokban is. A *Gfap-Cre* transzgén elhelyezkedését nem sikerült kimutatnunk az egér genomjában. A *Trpa1^{Fl/Fl}* egerekben azonosítottuk a loxP szekvenciák elhelyezkedését, melyhez rutin genotipizálási módszert alakítottunk ki. Ezáltal a kuprizon indukált demielinizációs kísérletre létrehozott *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{Fl/Fl}* egereket tudtuk ellenőrizni, hogy ne alakuljanak ki *Trpa1* globális KO egerek a Cre rekombinááz nem asztrocita specifikus működésének következtében. A *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{Fl/Fl}* egerek agyában mértük az intakt *Trpa1* gén expressziós szintjének változását.

Funkcionális állatkísérletek során kimutatták, hogy az asztrocita specifikus *Trpa1* kondicionális KO egerek a *Trpa1* globális KO egerekhez képest kevésbé voltak ellenállóbbak a kuprizon indukált demielinizációval szemben. Ezáltal arra következtethetünk, hogy a szklerózis multiplexben az asztrocitáknak nem egyedüli szerepe van a TRPA1 mediált demielinizációban, hanem feltételezhetően az agyban más TRPA1 expresszáló sejteinek (oligodendrociták, mikroglia, neuronok) (166,180). Ez további vizsgálatot igényel.

Kijelenthetjük, hogy a jelenleg elérhető molekuláris biológiai és genetikai eszközöknek köszönhetően képesek voltunk létrehozni a kutatásunkhoz szükséges minden tervezett egyedi modellorganizmust. Szerencsére a molekuláris technológia továbbra is folyamatosan és rohamosan fejlődik, ami egyre több lehetőséget biztosít az gyógyászati célú kutatások számára.

6. Új eredmények

- Sikeresen létrehoztuk az *SSTR4* humanizált egereket.
- Azonosítottuk a létrehozott *SSTR4* humanizált egerekben a véletlenszerűen inszertálódott 3 transzgén elhelyezkedését. Ezekre rutin genotipizálási módszert alakítottunk ki.
- Meghatároztuk a *hSSTR4* transzgének expressziós szintjét a humanizált egerek agyában és a belső szerveiben.
- Karakterizáltuk a *hSSTR4* transzgén Chr3 kópiájának expresszióját a humanizált egér agyában. Különbségeket találtunk a WT egerek *Sstr4* expressziójához képest, ami a homológ gének közötti faji különbségekre utalnak.

- A szerves poliszulfidok kovalens kötésében részt vesznek a C621, C641 és C665 ciszteinek a TRPA1 receptor aktiválásához. Csak ezek együttes, tripla mutációja okoz teljes inszenzitivitást a TRPA1 receptorban a szerves poliszulfidok iránt.
- A szerves poliszulfidok kötőhelye megegyezik az elektrofil agonisták általános kötőhelyével.
- A transzmembrán régióban elhelyezkedő C727 és C834 ciszteinek nem részei a szerves poliszulfidok kötőhelyének.

- *Gfap*-Cre és STOP-loxP egerek keresztezésével sikeresen szemléltettük a Cre rekombináza asztrocita specifikus expresszióját, és kis részben az átjutását és működését neuronokban is.
- *Gfap*-Cre és *Trpal*-loxP egerek keresztezésével létrehoztunk olyan transzgenikus egereket, amelyeknek az asztrocitáikból specifikusan ütöttük ki az egér *Trpal* gént.
- Bizonyítottuk az intakt *Trpal* gén expressziós szintjének csökkenését a humanizált egerek agyában.
- A *Trpal* globális KO egerekhez képest az asztrocita specifikus *Trpal* cKO egerek kevésbé voltak ellenállóak a kuprizon indukált demielinizációval szemben, ami arra utal, hogy ebben a patomechanizmusban az asztrocitáknak nem egyedüli szerepe van.

7. Irodalomjegyzék

1. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, és mtsai. The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020. szeptember 1.;161(9):1976–82.
2. Pahwa R, Goyal A, Bansal P, Jialal I. *Chronic Inflammatio*. 2021 [idézi 2022. május 16.]; Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173>
3. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell*. 2010. március 19.;140(6):871–82.
4. Horváth Á, Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély É, és mtsai. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res Ther*. 2016. január 8.;18(1):6.
5. Schuelert N, McDougall JJ. Involvement of Nav 1.8 sodium ion channels in the transduction of mechanical pain in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2012. január 7.;14(1):R5.
6. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):656–64.
7. Alarcón GS. Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A Clinician's perspective. *Immunopharmacology*. 2000. május;47(2–3):259–71.
8. Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol* [Internet]. 2019. március 22. [idézi 2021. január 4.];33. Elérhető: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6431761/>
9. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, és mtsai. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*. 2003. március 21.;112(6):819–29.
10. Bonet IJM, Fischer L, Parada CA, Tambeli CH. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology*. 2013. február 1.;65:206–12.
11. Liu C, Reese R, Vu S, Rougé L, Shields SD, Kakiuchi-Kiyota S, és mtsai. A Non-covalent Ligand Reveals Biased Agonism of the TRPA1 Ion Channel. *Neuron*. 2021. január 20.;109(2):273-284.e4.
12. Pozsgai G, Payrits M, Sággy É, Sebestyén-Bátai R, Steen E, Szőke É, és mtsai. Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide*. 2017. május 1.;65:10–21.
13. Zygmunt PM, Högestätt ED. TRPA1. In: Nilius B, Flockerzi V, szerkesztő. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014 [idézi 2022. november 17.]. o. 583–630. (Handbook of Experimental Pharmacology). Elérhető: https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_23

14. Kun J, Szitter I, Kemény Á, Perkecz A, Kereskai L, Pohóczky K, és mtsai. Upregulation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel in the Inflamed Human and Mouse Colon and Its Protective Roles. *PLOS ONE*. 2014. szeptember 29.;9(9):e108164.
15. Dombi Á, Sánta C, Bártai IZ, Kormos V, Kecskés A, Tékus V, és mtsai. Dimethyl Trisulfide Diminishes Traumatic Neuropathic Pain Acting on TRPA1 Receptors in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. január;22(7):3363.
16. Helyes Z, Pinter E, Sandor K, Elekes K, Banvolgyi A, Keszthelyi D, és mtsai. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. augusztus 4.;106(31):13088–93.
17. Helyes Z, Pintér E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó, és mtsai. Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *British Journal of Pharmacology*. 2006. október;149(4):405–15.
18. Markovics A, Szőke É, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény Á, és mtsai. Comparison of the Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-14 in Distinct In Vitro and In Vivo Model Systems. *J Mol Neurosci*. 2012. január;46(1):40–50.
19. Qiu C, Zeyda T, Johnson B, Hochgeschwender U, Lecea L de, Tallent MK. Somatostatin Receptor Subtype 4 Couples to the M-Current to Regulate Seizures. *J Neurosci*. 2008. április 2.;28(14):3567–76.
20. Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K, Ádori C, Borbély É, és mtsai. Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology*. 2016. február;101:204–15.
21. Scheich B, Csekő K, Borbély É, Ábrahám I, Csernus V, Gaszner B, és mtsai. Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Neuroscience*. 2017. március;346:320–36.
22. Nemes B, Bölcskei K, Kecskés A, Kormos V, Gaszner B, Aczél T, és mtsai. Human Somatostatin SST4 Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. január;22(7):3758.
23. Sándor K, Elekes K, Szabó Á, Pintér E, Engström M, Wurster S, és mtsai. Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *European Journal of Pharmacology*. 2006. június;539(1–2):71–5.
24. Pintér E, Pozsgai G, Hajna Z, Helyes Z, Szolcsányi J. Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;77(1):5–20.
25. Matsuoka N, Maeda N, Yamaguchi I, Satoh M. Possible involvement of brain somatostatin in the memory formation of rats and the cognitive enhancing action of FR121196 in passive avoidance task. *Brain Research*. 1994. április 11.;642(1):11–9.

26. Baraban SC, Tallent MK. Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides – endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends in Neurosciences*. 2004. március 1.;27(3):135–42.
27. Tuboly G, Vecsei L. Somatostatin and Cognitive Function in Neurodegenerative Disorders. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013. január 1.;13(1):34–46.
28. Martel G, Dutar P, Epelbaum J, Viollet CP. Somatostatinergic systems: an update on brain functions in normal and pathological aging. *Front Endocrinol [Internet]*. 2012 [idézi 2020. december 15.];3. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2012.00154/full>
29. Sandoval KE, Farr SA, Banks WA, Crider AM, Morley JE, Witt KA. Somatostatin receptor subtype-4 agonist NNC 26-9100 decreases extracellular and intracellular A β ₁₋₄₂ trimers. *Eur J Pharmacol*. 2012. május 15.;683(1-3):116–24.
30. Sandoval K, Umbaugh D, House A, Crider A, Witt K. Somatostatin Receptor Subtype-4 Regulates mRNA Expression of Amyloid-Beta Degrading Enzymes and Microglia Mediators of Phagocytosis in Brains of 3xTg-AD Mice. *Neurochem Res*. 2019. november;44(11):2670–80.
31. Lin LC, Sibille E. Somatostatin, neuronal vulnerability and behavioral emotionality. *Molecular Psychiatry*. 2015. március;20(3):377–87.
32. Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT. Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: Behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience*. 2008. 0 2.;157(3):666–76.
33. Lin LCMS, Sibille EPD. Reduced brain somatostatin in mood disorders: a common pathophysiological substrate and drug target? *Front Pharmacol [Internet]*. 2013 [idézi 2020. december 7.];4. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2013.00110/full>
34. Kormos V, Gaszner B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: From animals to humans. *Neuropeptides*. 2013. 0 1.;47(6):401–19.
35. Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: Physiology and pathological modifications. *Progress in Neurobiology*. 1986. 0 1.;27(1):63–100.
36. Gulyás AI, Hájos N, Katona I, Freund TF. Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *European Journal of Neuroscience*. 2003;17(9):1861–72.
37. Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, és mtsai. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *European Journal of Neuroscience*. 2005;21(6):1587–600.
38. Szolcsányi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*. 2004. 0 1.;38(6):377–84.
39. Thán M, Németh J, Szilvássy Z, Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic

- sensory fibres of the rat and guinea-pig. *European Journal of Pharmacology*. 2000. július;399(2–3):251–8.
40. Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PPA, és mtsai. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1995. március 1.;16(3):86–8.
 41. Patel YC. Somatostatin and Its Receptor Family. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1999. július 1.;20(3):157–98.
 42. Thoss VS, Piwko C, Probst A, Hoyer D. Autoradiographic analysis of somatostatin SRIF1 and SRIF2 receptors in the human brain and pituitary. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1997. február;355(2):168–76.
 43. Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Oroszi G, Németh J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *British Journal of Pharmacology*. 1998. október;125(4):916–22.
 44. Helyes Z, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri G, és mtsai. Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neuroscience Letters*. 2000. január;278(3):185–8.
 45. Szolcsanyi J, Pinter E, Helyes Z, Petho G. Inhibition of the Function of TRPV1-Expressing Nociceptive Sensory Neurons by Somatostatin 4 Receptor Agonism: echanism and Therapeutical Implications. *CTMC*. 2011. szeptember 1.;11(17):2253–63.
 46. Hannon JP, Nunn C, Stolz B, Bruns C, Weckbecker G, Lewis I, és mtsai. Drug design at peptide receptors. *J Mol Neurosci*. 2002. február 1.;18(1):15–27.
 47. Feytens D, Cescato R, Reubi JC, Tourwé D. New sst4/5-Selective Somatostatin Peptidomimetics Based on a Constrained Tryptophan Scaffold. *J Med Chem*. 2007. július 1.;50(14):3397–401.
 48. Rivier J, Erchegyi J, Hoeger C, Miller C, Low W, Wenger S, és mtsai. Novel sst4-Selective Somatostatin (SRIF) Agonists. 1. Lead Identification Using a Betide Scan. *J Med Chem*. 2003. december 1.;46(26):5579–86.
 49. Gademann K, Kimmerlin T, Hoyer D, Seebach D. Peptide Folding Induces High and Selective Affinity of a Linear and Small β -Peptide to the Human Somatostatin Receptor 4. *J Med Chem*. 2001. július 1.;44(15):2460–8.
 50. Prasad V, Birzin ET, McVaugh CT, van Rijn RD, Rohrer SP, Chicchi G, és mtsai. Effects of Heterocyclic Aromatic Substituents on Binding Affinities at Two Distinct Sites of Somatostatin Receptors. Correlation with the Electrostatic Potential of the Substituents. *J Med Chem*. 2003. május 1.;46(10):1858–69.
 51. <https://www.lilly.com/discovery/pipeline> [Internet]. 2020. Lilly.com (2020) Clinical Development Pipeline [online].
 52. Markovics A, Szőke É, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény Á, és mtsai. Comparison of the Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-

- 14 in Distinct In Vitro and In Vivo Model Systems. *J Mol Neurosci*. 2012. január 1.;46(1):40–50.
53. Botz B, Bölcskei K, Helyes Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017. május;9(3).
54. Kántás B, Börzsei R, Szőke É, Bánhegyi P, Horváth Á, Hunyady Á, és mtsai. Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *IJMS*. 2019. december 11.;20(24):6245.
55. Shenoy PA, Kuo A, Khan N, Gorham L, Nicholson JR, Corradini L, és mtsai. The Somatostatin Receptor-4 Agonist J-2156 Alleviates Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Breast Cancer Induced Bone Pain. *Front Pharmacol*. 2018. május 15.;9:495.
56. Park TSW, Khan N, Kuo A, Nicholson JR, Corradini L, Smith MT. J-2156, a somatostatin receptor type 4 agonist, alleviates mechanical hyperalgesia in a rat model of chronic low back pain. *Biomed Pharmacother*. 2019. szeptember;117:109056.
57. Szőke É, Bálint M, Hetényi C, Markovics A, Elekes K, Pozsgai G, és mtsai. Small molecule somatostatin receptor subtype 4 (sst4) agonists are novel anti-inflammatory and analgesic drug candidates. *Neuropharmacology*. 2020. 0 1.;178:108198.
58. Liu Z, Crider AM, Ansbro D, Hayes C, Kontoyianni M. A Structure-Based Approach to Understanding Somatostatin Receptor-4 Agonism (sst4). *J Chem Inf Model*. 2012. január 23.;52(1):171–86.
59. Henderson CJ, Kapelyukh Y, Scheer N, Rode A, McLaren A, MacLeod AK, és mtsai. An Extensively Humanized Mouse Model to Predict Pathways of Drug Disposition and Drug/Drug Interactions, and to Facilitate Design of Clinical Trials. *Drug Metab Dispos*. 2019. június 1.;47(6):601–15.
60. Ueda O, Tateishi H, Higuchi Y, Fujii E, Kato A, Kawase Y, és mtsai. Novel genetically-humanized mouse model established to evaluate efficacy of therapeutic agents to human interleukin-6 receptor. *Scientific Reports*. 2013. február 1.;3(1):1196.
61. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007. február;7(2):118–30.
62. Manz MG, Di Santo JP. Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology. *Nat Immunol*. 2009. október;10(10):1039–42.
63. Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Humanized SCID mouse models for biomedical research. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;324:25–51.
64. Ito M, Kobayashi K, Nakahata T. NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;324:53–76.
65. Legrand N, Weijer K, Spits H. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *J Immunol*. 2006. február 15.;176(4):2053–8.

66. Zhang B, Duan Z, Zhao Y. Mouse models with human immunity and their application in biomedical research. *J Cell Mol Med*. 2009. június;13(6):1043–58.
67. Devoy A, Bunton-Stasyshyn RKA, Tybulewicz VLJ, Smith AJH, Fisher EMC. Genomically humanized mice: technologies and promises. *Nature Reviews Genetics*. 2012. január;13(1):14–20.
68. Zhu F, Nair RR, Fisher EMC, Cunningham TJ. Humanising the mouse genome piece by piece. *Nature Communications*. 2019. április 23.;10(1):1845.
69. Lamprecht Tratar U, Horvat S, Cemazar M. Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front Oncol* [Internet]. 2018 [idézi 2021. február 18.];8. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00268/full>
70. Moriwaki T, Abe S, Oshimura M, Kazuki Y. Transchromosomal technology for genomically humanized animals. *Experimental Cell Research*. 2020. május 15.;390(2):111914.
71. Fox A, Kaur S, Li B, Panesar M, Saha U, Davis C, és mtsai. Antihyperalgesic activity of a novel nonpeptide bradykinin B1 receptor antagonist in transgenic mice expressing the human B1 receptor. *Br J Pharmacol*. 2005. április;144(7):889–99.
72. Jackson IJ, Budd PS, Keighren M, McKie L. Humanized MC1R transgenic mice reveal human specific receptor function. *Human Molecular Genetics*. 2007. október 1.;16(19):2341–8.
73. Kecskés A, Pohóczky K, Kecskés M, Varga ZV, Kormos V, Szőke É, és mtsai. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. január;21(20):7788.
74. Homo sapiens somatostatin receptor 4 (SSTR4), mRNA [Internet]. 2019 [idézi 2021. január 27.]. Elérhető: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001052.2
75. Bryda EC, Pearson M, Agca Y, Bauer BA. Method for detection and identification of multiple chromosomal integration sites in transgenic animals created with lentivirus. *BioTechniques*. 2006. december;41(6):715–9.
76. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012. június 18.;13:134.
77. Paxinos G, Franklin KBJ. Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates [Internet]. 2019 [idézi 2021. január 7.]. Elérhető: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=1892234>
78. Mus musculus chromosome 3, GRCm39 reference primary assembly C57BL/6J. 2020. július 15. [idézi 2021. január 21.]; Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM000996.3>

79. Mus musculus chromosome 10, GRCm39 reference primary assembly C57BL/6J. 2020. július 15. [idézi 2021. január 21.]; Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM001003.3>
80. Mus musculus chromosome X, GRCm39 reference primary assembly C57BL/6J. 2020. július 15. [idézi 2021. január 21.]; Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM001013.3>
81. Scheer N, Snaith M, Wolf CR, Seibler J. Generation and utility of genetically humanized mouse models. *Drug Discovery Today*. 2013. 0 1.;18(23):1200–11.
82. Davis J, Maillet M, Miano JM, Molkentin JD. Lost in Transgenesis: A Users guide for Genetically Manipulating the Mouse in Cardiac Research. *Circ Res*. 2012. augusztus 31.;111(6):761–77.
83. Caron P, Buscail L, Beckers A, Estève JP, Igout A, Hennen G, és mtsai. Expression of Somatostatin Receptor SST4 in Human Placenta and Absence of Octreotide Effect on Human Placental Growth Hormone Concentration during Pregnancy¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997. 0 1.;82(11):3771–6.
84. Møller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. Somatostatin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2003. szeptember 22.;1616(1):1–84.
85. Schwabe W, Brennan MB, Hochgeschwender U. Isolation and characterization of the mouse (*Mus musculus*) somatostatin receptor type-4-encoding gene (mSSTR4). *Gene*. 1996. 0 1.;168(2):233–5.
86. Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*. 2008. október 31.;135(3):561–71.
87. SSTR4 protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [idézi 2021. január 21.]. Elérhető: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000132671-SSTR4>
88. Sstr4 MGI Mouse Gene Detail - MGI:105372 - somatostatin receptor 4 [Internet]. [idézi 2021. január 21.]. Elérhető: <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:105372>
89. Sstr4 RT-PCR Gene Expression Assay - GXD [Internet]. [idézi 2021. január 21.]. Elérhető: <http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:1204215>
90. Sstr4 RT-PCR Gene Expression Assay - GXD [Internet]. [idézi 2021. január 21.]. Elérhető: <http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:1204217>
91. Sstr4 RT-PCR Gene Expression Assay - GXD [Internet]. [idézi 2021. január 21.]. Elérhető: <http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:1204442>
92. Teschendorf C, Warrington KH, Siemann DW, Muzyczka N. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Res*. 2002. december;22(6A):3325–30.
93. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004. december;22(12):1567–72.

94. Lauf U, Lopez P, Falk MM. Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins¹. *FEBS Letters*. 2001;498(1):11–5.
95. Palmer E, Freeman T. Investigation Into the use of C- and N-terminal GFP Fusion Proteins for Subcellular Localization Studies Using Reverse Transfection Microarrays. *Comparative and Functional Genomics*. 2004;5(4):342–53.
96. Nocera S, Simon A, Fiquet O, Chen Y, Gascuel J, Datiche F, és mtsai. Somatostatin Serves a Modulatory Role in the Mouse Olfactory Bulb: Neuroanatomical and Behavioral Evidence. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2019 [idézi 2021. január 18.];13. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2019.00061/full>
97. Mha AN, Peleg R, Singer Y, Sherf M, Shvartzman P. Chronic Pain: A Population-Based Study. 2008;10:5.
98. Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY. Towards a theory of chronic pain. *Progress in Neurobiology*. 2009. február 1.;87(2):81–97.
99. Harden RN, Bruehl S, Perez RSGM, Birklein F, Marinus J, Maihofner C, és mtsai. Validation of proposed diagnostic criteria (the “Budapest Criteria”) for Complex Regional Pain Syndrome. *Pain*. 2010. augusztus;150(2):268–74.
100. Gaborit M, Massotte D. Therapeutic potential of opioid receptor heteromers in chronic pain and associated comorbidities. *British Journal of Pharmacology*. 2023;180(7):994–1013.
101. Réthelyi JM, Berghammer R, Kopp MS. Comorbidity of pain-associated disability and depressive symptoms in connection with sociodemographic variables: results from a cross-sectional epidemiological survey in Hungary. *Pain*. 2001. augusztus 1.;93(2):115–21.
102. Keeley P, Creed F, Tomenson B, Todd C, Borglin G, Dickens C. Psychosocial predictors of health-related quality of life and health service utilisation in people with chronic low back pain. *PAIN®*. 2008. március 1.;135(1):142–50.
103. Niv D, Kreitler S. Pain and quality of life. *Pain Pract*. 2001. június;1(2):150–61.
104. Helyes Z, Tékus V, Szentes N, Pohóczky K, Botz B, Kiss T, és mtsai. Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1–induced mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. június 25.;116(26):13067–76.
105. Nathan C. Nonresolving inflammation redux. *Immunity*. 2022. április 12.;55(4):592–605.
106. Medzhitov R. The spectrum of inflammatory responses. *Science*. 2021. november 26.;374(6571):1070–5.
107. Bártai IZ, Sár CP, Horváth Á, Borbély É, Bölskei K, Kemény Á, és mtsai. TRPA1 Ion Channel Determines Beneficial and Detrimental Effects of GYY4137 in Murine Serum-Transfer Arthritis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019 [idézi 2021. június 12.];10. Elérhető:

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00964/full?utm_source=S-TWT&utm_medium=SNET&utm_campaign=ECO_FPHAR_XXXXXXXXXX_auto-dlvrit

108. Hatakeyama Y, Takahashi K, Tominaga M, Kimura H, Ohta T. Polysulfide Evokes Acute Pain through the Activation of Nociceptive TRPA1 in Mouse Sensory Neurons. *Mol Pain*. 2015. január 1.;11:s12990-015-0023–4.
109. Ogawa H, Takahashi K, Miura S, Imagawa T, Saito S, Tominaga M, és mtsai. H₂S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience*. 2012;218:335–43.
110. Bátaí IZ, Horváth Á, Pintér E, Helyes Z, Pozsgai G. Role of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Ion Channel and Somatostatin sst4 Receptor in the Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Sodium Polysulfide and Dimethyl Trisulfide. *Frontiers in Endocrinology* [Internet]. 2018 [idézi 2022. május 21.];9. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00055>
111. Koizumi K, Iwasaki Y, Narukawa M, Iitsuka Y, Fukao T, Seki T, és mtsai. Diallyl sulfides in garlic activate both TRPA1 and TRPV1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. május 8.;382(3):545–8.
112. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, és mtsai. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. augusztus 23.;102(34):12248–52.
113. Bai AP, Ouyang Q, Hu RW. Diallyl Trisulfide Inhibits Tumor Necrosis Factor- α Expression in Inflamed Mucosa of Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci*. 2005. augusztus 1.;50(8):1426–31.
114. Lee HJ, Lee HG, Choi KS, Surh YJ, Na HK. Diallyl trisulfide suppresses dextran sodium sulfate-induced mouse colitis: NF- κ B and STAT3 as potential targets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013. július 26.;437(2):267–73.
115. Hinman A, Chuang H hu, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *PNAS*. 2006. december 19.;103(51):19564–8.
116. Eberhardt MJ, Filipovic MR, Leffler A, de la Roche J, Kistner K, Fischer MJ, és mtsai. Methylglyoxal Activates Nociceptors through Transient Receptor Potential Channel A1 (TRPA1). *J Biol Chem*. 2012. augusztus 17.;287(34):28291–306.
117. Deering-Rice CE, Romero EG, Shapiro D, Hughen RW, Light AR, Yost GS, és mtsai. Electrophilic Components of Diesel Exhaust Particles (DEP) Activate Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1): A Probable Mechanism of Acute Pulmonary Toxicity for DEP. *Chem Res Toxicol*. 2011. június 20.;24(6):950–9.
118. Shapiro D, Deering-Rice CE, Romero EG, Hughen RW, Light AR, Veranth JM, és mtsai. Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1) in Lung Cells by Wood Smoke Particulate Material. *Chem Res Toxicol*. 2013. május 20.;26(5):750–8.
119. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature*. 2015. április;520(7548):511–7.

120. Alvarado MG, Thakore P, Earley S. Transient Receptor Potential Channel Ankyrin 1: A Unique Regulator of Vascular Function. *Cells*. 2021. május;10(5):1167.
121. Kimura H. Signaling Molecules: Hydrogen Sulfide and Polysulfide. *Antioxid Redox Signal*. 2015. február 10.;22(5):362–76.
122. Corbeil CR, Englebienne P, Moitessier N. Docking Ligands into Flexible and Solvated Macromolecules. 1. Development and Validation of FITTED 1.0. *J Chem Inf Model*. 2007. március 1.;47(2):435–49.
123. Pottel J, Therrien E, Gleason JL, Moitessier N. Docking Ligands into Flexible and Solvated Macromolecules. 6. Development and Application to the Docking of HDACs and other Zinc Metalloenzymes Inhibitors. *J Chem Inf Model*. 2014. január 27.;54(1):254–65.
124. Therrien E, Englebienne P, Arrowsmith AG, Mendoza-Sanchez R, Corbeil CR, Weill N, és mtsai. Integrating Medicinal Chemistry, Organic/Combinatorial Chemistry, and Computational Chemistry for the Discovery of Selective Estrogen Receptor Modulators with Forecaster, a Novel Platform for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*. 2012. január 23.;52(1):210–24.
125. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*. 2004. július 15.;25(9):1157–74.
126. Gasteiger J, Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*. 1980. január 1.;36(22):3219–28.
127. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, és mtsai. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998;19(14):1639–62.
128. Zsidó BZ, Balog M, Erős N, Poór M, Mohos V, Fliszár-Nyúl E, és mtsai. Synthesis of Spin-Labelled Bergamottin: A Potent CYP3A4 Inhibitor with Antiproliferative Activity. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):508.
129. Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Lemli B, Zsidó BZ, Hetényi C, Mladěnka P, és mtsai. Testing the Pharmacokinetic Interactions of 24 Colonic Flavonoid Metabolites with Human Serum Albumin and Cytochrome P450 Enzymes. *Biomolecules*. 2020. március 6.;10(3):409.
130. Fliszár-Nyúl E, Faisal Z, Mohos V, Derdák D, Lemli B, Kálai T, és mtsai. Interaction of SZV 1287, a novel oxime analgesic drug candidate, and its metabolites with serum albumin. *Journal of Molecular Liquids*. 2021. július 1.;333:115945.
131. Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Ungvári O, Bakos É, Kuffa K, Bencsik T, és mtsai. Effects of Chrysin and Its Major Conjugated Metabolites Chrysin-7-Sulfate and Chrysin-7-Glucuronide on Cytochrome P450 Enzymes and on OATP, P-gp, BCRP, and MRP2 Transporters. *Drug Metab Dispos*. 2020. október 1.;48(10):1064–73.
132. Schrödinger Release 2022-4: Maestro. New York, NY, USA: Schrödinger LLC; 2022.
133. O’Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*. 2011. október 7.;3(1):33.

134. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, és mtsai. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002. június;58(Pt 6 No 1):899–907.
135. Zhao J, Lin King JV, Paulsen CE, Cheng Y, Julius D. Irritant-evoked activation and calcium modulation of the TRPA1 receptor. *Nature*. 2020. szeptember;585(7823):141–5.
136. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, és mtsai. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018. július 2.;46(W1):W296–303.
137. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*. 2005;26(16):1701–18.
138. Suo Y, Wang Z, Zubcevic L, Hsu AL, He Q, Borgnia MJ, és mtsai. Structural Insights into Electrophile Irritant Sensing by the Human TRPA1 Channel. *Neuron*. 2020. március 4.;105(5):882-894.e5.
139. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
140. Yuan X ke, Chen X qing, Jiang X yu, Nie Y li. Synthesis, characterization and bioactivity evaluation of diallyl disulfide. *J Cent South Univ Technol*. 2006. október 1.;13(5):515–8.
141. Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almabrazi HG, és mtsai. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*. 2008. július 1.;36(suppl_2):W163–9.
142. Chang AY, Chau VWY, Landas JA, Pang Y. Preparation of Calcium Competent *Escherichia coli* and Heat-Shock Transformation [Internet]. 2017 [idézi 2022. október 13.]. Elérhető: <https://ujemi.microbiology.ubc.ca/node/127>
143. GIMP [Internet]. [idézi 2022. május 19.]. GIMP. Elérhető: <https://www.gimp.org/>
144. Pozsgai G, Bártai IZ, Pintér E. Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels. *Br J Pharmacol*. 2019. február;176(4):628–45.
145. Zsidó BZ, Börzsei R, Pintér E, Hetényi C. Prerequisite Binding Modes Determine the Dynamics of Action of Covalent Agonists of Ion Channel TRPA1. *Pharmaceuticals*. 2021. október;14(10):988.
146. Terada Y, Hosono T, Seki T, Ariga T, Ito S, Narukawa M, és mtsai. Sulphur-containing compounds of durian activate the thermogenesis-inducing receptors TRPA1 and TRPV1. *Food Chemistry*. 2014. augusztus 15.;157:213–20.
147. Bártai IZ, Dombi Á, Borbély É, Fehér Á, Papp F, Varga Z, és mtsai. Investigation of the Role of the TRPA1 Ion Channel in Conveying the Effect of Dimethyl Trisulfide on Vascular and Histological Changes in Serum-Transfer Arthritis. *Pharmaceuticals*. 2022. június;15(6):671.

148. Mahajan N, Khare P, Kondepudi KK, Bishnoi M. TRPA1: Pharmacology, natural activators and role in obesity prevention. *European Journal of Pharmacology*. 2021. december 5.;912:174553.
149. Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, és mtsai. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 2007. február 1.;445(7127):541–5.
150. Bahia PK, Parks TA, Stanford KR, Mitchell DA, Varma S, Stevens SM, és mtsai. The exceptionally high reactivity of Cys 621 is critical for electrophilic activation of the sensory nerve ion channel TRPA1. *Journal of General Physiology*. 2016. június 1.;147(6):451–65.
151. Habgood M, Seiferth D, Zaki AM, Alibay I, Biggin PC. Atomistic mechanisms of human TRPA1 activation by electrophile irritants through molecular dynamics simulation and mutual information analysis. *Sci Rep*. 2022. március 23.;12(1):4929.
152. Takaya J, Mio K, Shiraishi T, Kurokawa T, Otsuka S, Mori Y, és mtsai. A Potent and Site-Selective Agonist of TRPA1. *J Am Chem Soc*. 2015. december 23.;137(50):15859–64.
153. Matsubara M, Muraki Y, Hatano N, Suzuki H, Muraki K. Potent Activation of Human but Not Mouse TRPA1 by JT010. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. január;23(22):14297.
154. Fujita F, Uchida K, Moriyama T, Shima A, Shibasaki K, Inada H, és mtsai. Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *J Clin Invest*. 2008. december 1.;118(12):4049–57.
155. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, és mtsai. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009. december;30(16):2785–91.
156. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, és mtsai. Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998;19:1639–62.
157. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000. szeptember 28.;343(13):938–52.
158. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*. 2001;11(1):107–16.
159. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JPY, Suzuki K, Matsushima GK. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology*. 1998. december 1.;92(1):38–49.
160. Ságghy É, Sipos É, Ács P, Böleskei K, Pohóczky K, Kemény Á, és mtsai. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination—A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia*. 2016;64(12):2166–80.

161. Bölcskei K, Kriszta G, Sághy É, Payrits M, Sipos É, Vranesics A, és mtsai. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *Journal of Neuroimmunology*. 2018. július 15.;320:1–10.
162. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch*. 2012;464(5):425–58.
163. Chen J, Hackos DH. TRPA1 as a drug target--promise and challenges. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015. április;388(4):451–63.
164. Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, és mtsai. Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol Rev*. 2020. április 1.;100(2):725–803.
165. Fernandes E, Fernandes M, Keeble J. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166(2):510–21.
166. Hamilton NB, Kolodziejczyk K, Kougioumtzidou E, Attwell D. Proton-gated Ca²⁺-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature*. 2016. január;529(7587):523–7.
167. Shigetomi E, Jackson-Weaver O, Huckstepp RT, O'Dell TJ, Khakh BS. TRPA1 Channels Are Regulators of Astrocyte Basal Calcium Levels and Long-Term Potentiation via Constitutive d-Serine Release. *J Neurosci*. 2013. június 12.;33(24):10143–53.
168. Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci*. 2012. január;15(1):70–80.
169. Verkhratsky A, Reyes RC, Parpura V. TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia. In: Nilius B, Gudermann T, Jahn R, Lill R, Offermanns S, Petersen OH, szerkesztő. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology 166* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [idézi 2023. május 5.]. o. 1–22. (Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology). Elérhető: https://doi.org/10.1007/112_2013_15
170. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, és mtsai. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci*. 2014. szeptember 3.;34(36):11929–47.
171. Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzériat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Internet]. 2015 [idézi 2023. május 5.];9. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00278>
172. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and disease*. 2019. június 1.;10(3):664–75.
173. Hoess RH, Abremski K. The Cre-lox Recombination System. In: Eckstein F, Lilley DMJ, szerkesztő. *Nucleic Acids and Molecular Biology 4* [Internet]. Berlin, Heidelberg:

Springer; 1990 [idézi 2023. május 8.]. o. 99–109. (Nucleic Acids and Molecular Biology).
Elérhető: https://doi.org/10.1007/978-3-642-84150-7_6

174. Song AJ, Palmiter RD. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in Genetics*. 2018. május 1.;34(5):333–40.
175. Enghiad B, Huang C, Guo F, Jiang G, Wang B, Tabatabaei SK, és mtsai. Cas12a-assisted precise targeted cloning using in vivo Cre-lox recombination. *Nat Commun*. 2021. február 19.;12(1):1171.
176. Hill S, Blaeser A, Coley A, Xie Y, Shepard K, Harwell C, és mtsai. Sonic hedgehog signaling in astrocytes mediates cell-type-specific synaptic organization. 2019.
177. Park YM, Chun H, Shin JI, Lee CJ. Astrocyte Specificity and Coverage of hGFAP-CreERT2 [Tg(GFAP-Cre/ERT2)13Kdmc] Mouse Line in Various Brain Regions. *Exp Neurobiol*. 2018. december;27(6):508–25.
178. Casper KB, McCarthy KD. GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2006. április 1.;31(4):676–84.
179. Kriszta G, Nemes B, Sándor Z, Ács P, Komoly S, Berente Z, és mtsai. Investigation of Cuprizone-Induced Demyelination in mGFAP-Driven Conditional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor Knockout Mice. *Cells*. 2020. január;9(1):81.
180. Xia M, Chen W, Wang J, Yin Y, Guo C, Li C, és mtsai. TRPA1 Activation-Induced Myelin Degradation Plays a Key Role in Motor Dysfunction After Intracerebral Hemorrhage. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Internet]. 2019 [idézi 2023. május 5.];12. Elérhető: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00098>

8. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk

Nemes Balázs, Bölcskei Kata, Kecskés Angéla, Kormos Viktória, Gaszner Balázs, Aczél Timea, Hegedüs Dániel, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna és Sándor Zoltán: „Human Somatostatin SST4 Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization”. *International Journal of Molecular Sciences*, köt. 22, sz. 7 (2021. január): 3758.

<https://doi.org/10.3390/ijms22073758>

Nemes Balázs, László Szabolcs, Zsidó Balázs Zoltán, Hetényi Csaba, Fehér Ádám, Papp Ferenc, Varga Zoltán, Szőke Éva, Sándor Zoltán, Pintér Erika: „Elucidation of the binding mode of organic polysulfides on the human TRPA1 receptor”. *Frontiers in Physiology: Insights in Redox Physiology*: 2022, köt. 14 (2023. június).

<https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1180896>

Kriszta Gábor, Nemes Balázs, Sándor Zoltán, Ács Péter, Komoly Sámuel, Berente Zoltán, Bölcskei Kata és Pintér Erika: „Investigation of Cuprizone-Induced Demyelination in MGFAP-Driven Conditional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor Knockout Mice”. *Cells*, köt. 9, sz. 1 (2020. január): 81.

<https://doi.org/10.3390/cells9010081>

9. Egyéb publikációk és konferencia részvételek

9.1. Publikáció

Bátai István Zoárd, Pápainé Sár Cecília, Horváth Ádám, Borbély Éva, Bölcskei Kata, Kemény Ágnes, Sándor Zoltán, Nemes Balázs, Helyes Zsuzsanna, Perkecz Anikó, Mócsai Attila, Pozsgai Gábor és Pintér Erika: „TRPA1 Ion Channel Determines Beneficial and Detrimental Effects of GYY4137 in Murine Serum-Transfer Arthritis”. *Frontiers in Pharmacology* 10 (2019).

<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00964>.

9.2. Hazai és nemzetközi konferencia részvételek

III. Pécsi Tudományegyetem Idegtudományi Centrum PhD és TDK konferencia, Pécs
2018.11.22-23.

Előadás címe: Humanizált szomatosztatin receptor 4 (hSSTR4) hordozó transzgenikus egerek létrehozása idegrendszeri kutatások céljára

Előadó: Nemes Balázs

Témavezetők: Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna, Sándor Zoltán

MITT, Magyarországi Idegtudományi Társaság 2019. évi Konferenciája, Debrecen

2019.01.17-18.

Poszter prezentáció címe: Transgenic mice expressing human somatostatin receptor 4 (hSSTR4): A humanized model for pharmacological research

Balázs Nemes, Kata Bölcskei, Timea Aczél, Adnan Ahmad Alkurdi, Erika Pintér, Zsuzsanna Helyes, Zoltán Sándor

Remedicon, Gyógyszer Innováció 2019 Konferencia, Gárdony

2019.04.01-03.

Poszter prezentáció címe: Humanizált szomatosztatin receptor 4 expresszáló transzgenikus egerek: Egy új modell a transzlációs medicinában

Nemes Balázs, Bölcskei Kata, Aczél Timea, Adnan Ahmad Alkurdi, Dinnyés András, Kobolák Julianna, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna, Sándor Zoltán

1st Pécs-Osijek Ph.D. Symposium, Pécs

2019.05.10.

Poszter prezentáció címe: Human somatostatin receptor 4 expressing transgenic mice generation for pharmacological research

Balázs Nemes, Kata Bölcskei, Timea Aczél, Adnan Ahmad Alkurdi, András Dinnyés, Julianna Kobolák, Erika Pintér, Zsuzsanna Helyes, Zoltán Sándor

FAMÉ 2019 - MÉT, MFT, MAT, MMVBT közös vándorgyűlése, Budapest

2019.06.05-08.

Poszter prezentáció címe: Humanizált szomatosztatin receptor 4 expresszáló transzgenikus egerek: egy új modell a transzlációs medicinában

Nemes Balázs, Bölcskei Kata, Aczél Timea, Adnan Ahmad Alkurdi, Dinnyés András, Kobolák Julianna, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna, Sándor Zoltán

7th Summer School on Stress, Szentpétervár

2019.06.25-28.

Poszter prezentáció címe: Novel humanized model for pharmacological research: Generating human somatostatin receptor 4 (hSSTR4) expressing transgenic mice

Balázs Nemes, Kata Bölcskei, Timea Aczél, Adnan Ahmad Alkurdi, Yazan Abuawwad, András Dinnyés, Julianna Kobolák, Erika Pintér, Zsuzsanna Helyes, Zoltán Sándor

FENS Regional Meeting 2019, Belgrád

2019.07.10-13.

Poszter prezentáció és rövid előadás (Blitz Session) címe: Generating human somatostatin receptor 4 (hSSTR4) expressing transgenic mice for pharmacological research

Balázs Nemes, Kata Bölcskei, Timea Aczél, Adnan Ahmad Alkurdi, Yazan Abuawwad, András Dinnyés, Julianna Kobolák, Erika Pintér, Zsuzsanna Helyes, Zoltán Sándor

MOFT konferencia 2019, Szeged

2019.11.08-09.

Poszter prezentáció címe: Humanizált szomatosztatin receptor 4 expresszáló egerek: novel állatmodel a szomatosztatin analóg hatóanyagok fejlesztéséhez

Nemes Balázs, Bölcskei Kata, Aczél Timea, Adnan Ahmad Alkurdi, Yazan Abuawwad, Dinnyés András, Kobolák Julianna, Pintér Erika, Helyes Zsuzsanna, Sándor Zoltán

ISCTICO-HUPHAR-IUPHAR 2021, Pécs

2021.10.27-30.

Poszter prezentáció címe: Characterization of transgenic mice expressing the human somatostatin receptor subtype 4

Balázs Nemes, Kata Bölcskei, Angéla Kecskés, Timea Aczél, Adnan Ahmad Alkurdi, Yazan Abuawwad, Erika Pintér, Zsuzsanna Helyes, Zoltán Sándor

MOFT konferencia 2021, Szeged

2021.11.05-06.

Poszter prezentáció címe: Szerves poliszulfidok kötőhelyének vizsgálata TRPA1 receptoron helyspecifikus mutagenezissel

Nemes Balázs, Dr. Fehér Ádám, Dr. Papp Ferenc, Dr. Sándor Zoltán, Dr. Pozsgai Gábor, Prof. Dr. Pintér Erika

MOFT konferencia 2022, Szeged

2022.11.04-05.

Előadás címe: A szerves poliszulfidok kötőhelyének azonosítása a humán TRPA1 receptoron gyógyszerfejlesztési célokra

Nemes Balázs, Dr. Zsidó Balázs, Dr. Hetényi Csaba, Dr. Fehér Ádám, Dr. Papp Ferenc, Dr. Szőke Éva, Dr. Sándor Zoltán, Prof. Dr. Pintér Erika

10. Támogatás

A PhD tanulmányaim során végzett kutatómunkám a következő támogatásokkal valósulhatott meg:

Richter Gedeon Talentum Alapítvány Tanulmányi Ösztöndíj; Nemzeti Agykutatási Program 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (NAP-2; Krónikus Fájdalom Kutatócsoport); Nemzeti Agykutatási Program 3.0 (NAP 3.0); GINOP-2.3.2-15-2016-00050 (A peptiderg szignalizáció komplexitása és szerepe szisztémás betegségekben; PEPSYS); EFOP 3.6.2-17-2017-00008 N (2017-2019), EFOP-3.6.1-16-2016-00004 és EFOP-3.6.2-16-2017-00006; FIKPII-17886-4/23018/FEKUTSTRAT; NKFIH-OTKA-K 134214; RRF-2.3.1-21-2022-00015 Nemzeti Gyógyszerkutatási és Fejlesztési Laboratórium (PharmaLab); TKP2021-EGA-16 Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Iroda és az Eötvös Loránd Kutatási Hálózat (ELKH).

11. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Pintér Erikának és Dr. Sándor Zoltánnak a sok támogatásért és a kiváló kutatóként mutatott szakmai segítségükért, melyben az egész PhD képzésem folyamán részesültem.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának, hogy az egész kutatómunkám során értékes szakmai segítséggel és tanácsokkal látott el.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Bölcskei Katának, Dr. Kecskés Angélának, Dr. Szőke Évának, Dr. Kemény Ágnesnek, Dr. Pozsgai Gábornak, Dr. Kormos Viktóriának és Dr. Nemes-Szentes Nikolettnek, hogy a kezdetektől fogva mindenben segítettek a fejlődésemet és megtanították, a kísérletes munka során elengedhetetlen, precíz és szakszerű munkavégzést.

Köszönöm a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben dolgozó kollégáimnak, Dr. Szabó Katalinnak, Dr. Nehr-Majoros Andreának, Dr. Hetényi Csabának, Dr. Zsidó Balázs Zoltánnak, Dr. Báthai István Zoárdnak, Dr. Csekő Katának, Dr. Pohóczky Krisztinának, Dr. Payrits Majának, Dr. Aczél Timeának, Dr. Tékus Valériának, Dr. Kriszta Gábornak és Móriczné Bencze Noéminek, a kutatómunkában az együttműködésüket, szakmai és technikai segítségüket, valamint az intézetben minden hajdani és jelenlegi munkatársamnak, hogy mindvégig egy emberileg is jó közösségbe tartozhattam.

Köszönöm Dr. Papp Ferencnek, Fehér Ádámnak, László Szabolcsnak, valamint minden külső együttműködő partnerünknek a közös kutatómunkát.

Köszönöm továbbá Rajnai Tündének, Öböli Dórának, Sánta Csengének, Draskóczi Lillának és Tóth Norbertnek, hogy nemcsak a munkában nyújtott segítséggel, de barátságukkal is támogattak.

Köszönöm Molvay Róbertnek, hogy sokat segített a hivatalos ügyintézésben.

Köszönöm Bálint Leventének, hogy megkönnyítette és felgyorsította a kutatáshoz elengedhetetlen anyagok és eszközök beszerzését.

Köszönet Disztl Cecília, Bíró-Sütő Tünde, Bagoly Teréz, Pappné Bényei Ildikó, Ordonicsné Szombati Veronika, Hírné Perkecz Anikó, Kiss Árpádné és Zöldhegyi Józsefné asszisztenseknek a professzionális munkájáért, mellyel hozzájárultak a kísérletek sikerességéhez.

Köszönöm Schveibert Istvánnak és Walter Lászlónak a széleskörű technikai segítséget.

Végül szeretném megköszönni feleségemnek, Dr. Nemes-Szentes Nikolettnek, és Családomnak, hogy támogatták tanulmányaimat és a munkámat, valamint a rengeteg bátorítást és szeretetet, mellyel ösztönöztek a legjobb eredmények elérésére.



Article

Human Somatostatin SST₄ Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization

Balázs Nemes^{1,2}, Kata Bölcskei^{1,2}, Angéla Kecskés^{1,2} , Viktória Kormos^{1,2} , Balázs Gaszner³ ,
Timea Aczél^{1,2}, Dániel Hegedüs³, Erika Pintér^{1,2,4,5,†} , Zsuzsanna Helyes^{1,2,4,5,*} and Zoltán Sándor^{1,†}

¹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School & Centre for Neuroscience, H-7624 Pécs, Hungary; balazs.nemes@aok.pte.hu (B.N.); kata.bolcskei@aok.pte.hu (K.B.); angela.kecsek@aok.pte.hu (A.K.); viktor.kormos@aok.pte.hu (V.K.); aczel.timea@pte.hu (T.A.); erika.pinter@aok.pte.hu (E.P.); zoltan.sandor@aok.pte.hu (Z.S.)

² János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, H-7624 Pécs, Hungary

³ Research Group for Mood Disorders, Department of Anatomy, University of Pécs Medical School & Centre for Neuroscience, H-7624 Pécs, Hungary; balazs.b.gaszner@aok.pte.hu (B.G.); hedani93@gmail.com (D.H.)

⁴ PharmInVivo Ltd., H-7629 Pécs, Hungary

⁵ Algonist Biotechnologies GmbH, 1030 Wien, Austria

* Correspondence: zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu; Tel.: +36-72-501-500/29043

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Nemes, B.; Bölcskei, K.; Kecskés, A.; Kormos, V.; Gaszner, B.; Aczél, T.; Hegedüs, D.; Pintér, E.; Helyes, Z.; Sándor, Z. Human Somatostatin SST₄ Receptor Transgenic Mice: Construction and Brain Expression Pattern Characterization. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3758. <https://doi.org/10.3390/ijms22073758>

Academic Editor: Timofey S. Rozhdestvensky

Received: 29 March 2021

Accepted: 31 March 2021

Published: 4 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Somatostatin receptor subtype 4 (SST₄) has been shown to mediate analgesic, antidepressant and anti-inflammatory functions without endocrine actions; therefore, it is proposed to be a novel target for drug development. To overcome the species differences of SST₄ receptor expression and function between humans and mice, we generated an SST₄ humanized mouse line to serve as a translational animal model for preclinical research. A transposon vector containing the *hSSTR4* and reporter gene construct driven by the *hSSTR4* regulatory elements were created. The vector was randomly inserted in *Sstr4*-deficient mice. *hSSTR4* expression was detected by bioluminescent in vivo imaging of the luciferase reporter predominantly in the brain. RT-qPCR confirmed the expression of the human gene in the brain and various peripheral tissues consistent with the in vivo imaging. RNAscope in situ hybridization revealed the presence of *hSSTR4* transcripts in glutamatergic excitatory neurons in the CA1 and CA2 regions of the hippocampus; in the GABAergic interneurons in the granular layer of the olfactory bulb and in both types of neurons in the primary somatosensory cortex, piriform cortex, prelimbic cortex and amygdala. This novel SST₄ humanized mouse line might enable us to investigate the differences of human and mouse SST₄ receptor expression and function and assess the effects of SST₄ receptor agonist drug candidates.

Keywords: somatostatin; *Sstr4* KO mice; *SSTR4* humanized mice; PiggyBac (PB) transposon vector; ligation-mediated PCR; RNAscope in situ hybridization

1. Introduction

Somatostatin is a cyclic neuropeptide, which inhibits the secretion of several excitatory and inhibitory mediators, such as somatotropin, glucagon, insulin, acetylcholine, glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) [1]. It regulates a range of physiological functions like sleep, motor activity, sensory functions, emotions, learning and memory, as well as different pathological conditions like pain, inflammation [2–5], neurodegeneration [6–9], anxiety and depression [10–13]. In the central nervous system, there are long protruding and short proximal somatostatin-containing GABAergic interneurons [14–16]. In the periphery, activated capsaicin-sensitive peptidergic sensory nerves were observed to release somatostatin and induce systemic anti-inflammatory and analgesic effects, which was termed “sensocrine” action [17,18]. Five G_i-protein-coupled receptors, designated SST₁–SST₅, mediate the actions of somatostatin. Previous work provided evidence that the SST₄

receptor activation produces analgesic, anti-inflammatory, anti-amyloid, anti-anxiety and antidepressant effects without influencing hormone secretion [2,19–23].

Previous studies used *Sstr4* knockout (KO) and wild-type (WT) mice, since no SST₄ receptor specific antagonist is commercially available. Investigating *Sstr4* KO mouse models and the synthetic SST₄ receptor agonist J-2156, we and other workgroups provided evidence that the SST₄ receptor is a unique novel drug target for the treatment of chronic pain and depression [2,4,20,24–27].

The presently available drugs for these conditions are often not efficacious enough and cause serious side effects upon long-term use [28]. Thus, the SST₄ receptor has recently come into the focus of interest of drug development, and pharmaceutical companies have started to develop non-peptide SST₄ agonists [29]. The agonist design has been greatly enhanced by the in silico 3D modeling of the human receptor structure [30,31].

Humanized mice are predominantly generated by engrafting human cells, tissues and tumors and used extensively for immunological and oncological research [32–37], but genetic modification is also an increasingly applied method [38–41]. Human receptor expressing mouse models are useful in translational drug research, providing more predictive results relevant for the human diseases and more relevant platforms for testing drug candidates [42,43]. For example, Fox et al. replaced the native bradykinin B₁ receptor gene in mouse with its human B₁ receptor gene to investigate the human B₁ receptor-specific antagonist NVP-SAA164 in vivo after the successful in vitro results. NVP-SAA164 showed an anti-hyperalgesic function in these humanized mice, but not in WT nor in KO mice [44]. Jackson et al. found functional differences between mouse and human melanocortin receptor using MC1R humanized mice, such as the high ligand dependent eumelanogenesis in humanized mice. Mouse Mc1r receptor in WT mice in vivo, and both mouse and human melanocortin receptors in transfected cell lines in vitro showed ligand independent signaling [45].

The mouse SST₄ expression and function is relatively well-characterized in the brain [46], but little is known about the human receptor.

Therefore, our aims were to produce humanized mice by using a transposon vector containing the *hSSTR4* gene with its regulatory elements, locate the random insertion sites and characterize the distribution pattern and the neuron populations expressing the transgene in the brain, as well as select the most useful mouse line for further functional research.

2. Results

2.1. Vector Construction and Transgenesis

The final construct pPBC2 plasmid contained the full-length *hSSTR4* gene with a 4-kb upstream and 2.7-kb downstream region of the human chromosome 20 to include every known regulatory element (Figure 1A). At the end of the *hSSTR4* coding sequence, luciferase and the tandem dimer Tomato (tdTomato) coding sequence were inserted, separated from the receptor by the P2A self-cleaving site, but the reporters were expected to be translated as a fusion protein. At the end of the downstream chromosomal region, a polyadenylation signal (polyA) sequence was added for transcription termination. The entire transgene cassette was flanked at both ends by Lox2272 Cre recombinase recognition sites as an option for conditional KO by insulators to inhibit position effects and by Piggy-Bac (PB) transposon inverted terminal repeats (ITR) as specific recognition sites for the PB transposase enzyme (Figure 1B).

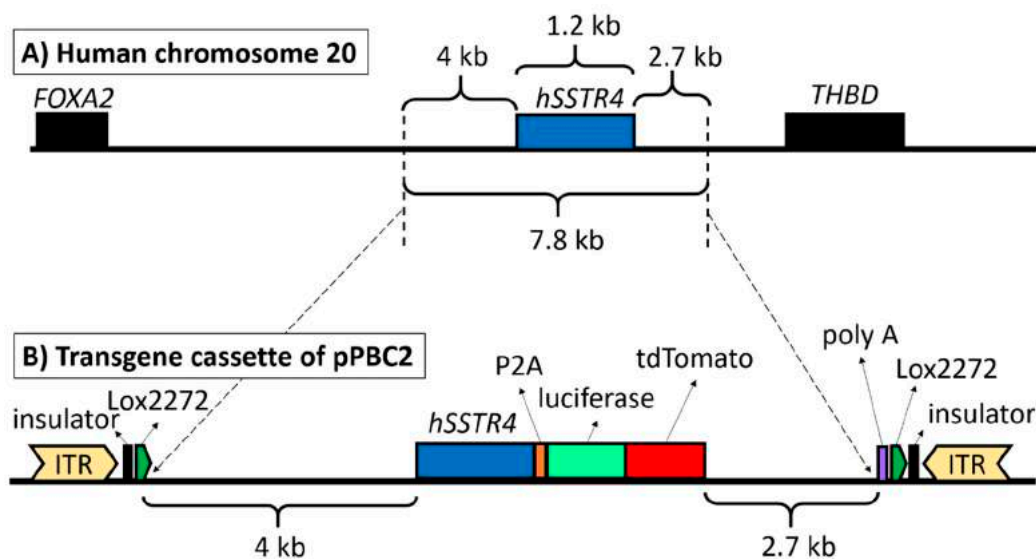


Figure 1. The structure of the PiggyBac (PB) transposon. Human chromosome 20 showing the full-length *hSSTR4* coding sequence with up- and downstream regulatory elements (7.8 kb) as copied fragments and the neighboring genes (*FOXA2* and *THBD*) (A). PB transposon vector carrying the upstream regulatory elements (4 kb) and human *SSTR4* coding sequence followed by the P2A self-cleaving peptide sequence, luciferase and tdTomato coding sequences downstream *SSTR4* regulatory elements (2.7 kb) and polyadenylation signal sequence (poly A). The entire transgenic cassette (12.7 kb) was flanked by the PB transposon inverted terminal repeats (ITR), insulators and Lox2272 Cre recombinase recognition sites (B).

The vector was verified by sequencing as successfully constructed before it was injected into 56 *Sstr4* KO zygotes, along with the PB transposase mRNA (Figure 2A). After injection, the intact zygotes were implanted into three pseudo-pregnant *Sstr4* KO mice (Figure 2B). Sixteen mice were born in the F0 generation, out of which three female mice were verified by PCR carrying the PB transposon without the plasmid backbone (Figure 2C). These transgene positive mice were crossbred with *Sstr4* KO mice. Two females died in late pregnancy. The third female produced 8 offspring (F1 generation), but it also died during its second pregnancy (Figure 2D). In this founder mouse, the PB transposon integration sites were located by ligation-mediated polymerase chain reaction (LM-PCR) (Figure 2E). From the F1 generation onwards, all mouse lines carried a single copy of the transgene, and none of those lines manifest a harmful phenotype based on viability, fertility and behavior. There were no differences between the litter sizes of the mouse lines (WT: 6.2 ± 0.4 , KO: 5.8 ± 0.3 , Chr3: 6.5 ± 0.4 , U1: 6.0 ± 0.4 , and U2: 5.9 ± 0.4).

2.2. Integration Sites of the *hSSTR4* Transgene

The LM-PCR detected multiple insertion loci of the transgene in the F0 founder female. By sequencing of the LM-PCR products, three distinct integration sites were identified in chromosomes 3, 10 and X (copies were named Chr3, Chr10 and ChrX, respectively). The transgene inserted in the chromosome 10 did not pass onto the F1 generation (Figure 2). The transgene in the chromosome 3 was inserted between the *Sis* and *Otol1* genes, coding on the negative strand of the chromosome (Figure 3). The PB transposase inserted the transposon while duplicating the TTAA recognition site, which started in the original position of 70,039,120 [47] (Figure 3). The transgene inserted in the chromosome 10 in the position of 67,335,940 [48], coding on the positive strand. The transgene inserted in the chromosome X at the position of 32,102,395 [49], coding on the positive strand. There were two mouse lines in which we were unable to locate the insertion site of the transgene (named U1 and U2) (Figure 2).

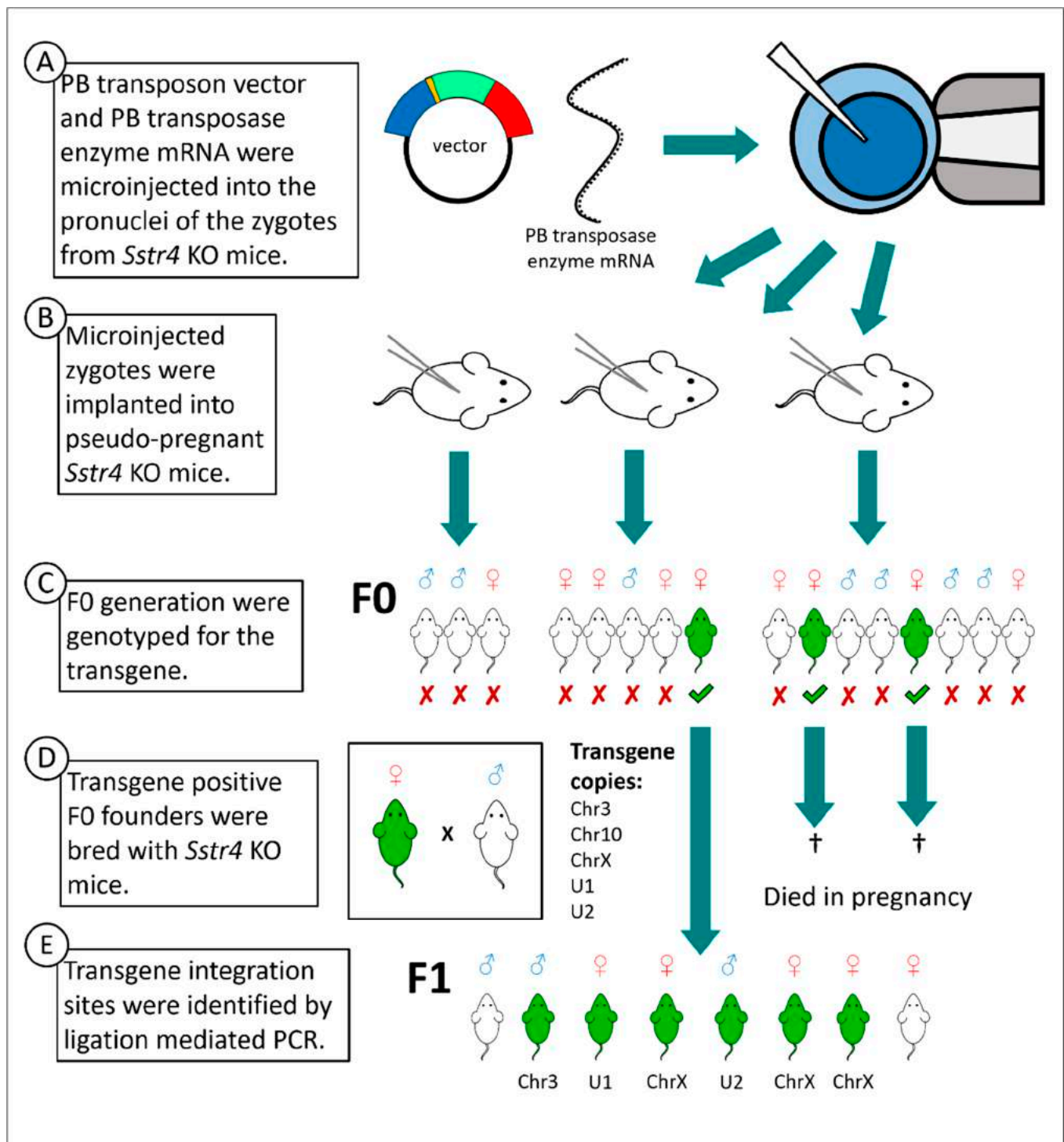


Figure 2. Steps of transgenesis by PB transposon vector. Schematic generation of *hSSTR4* transgenic mice (A–E). White mice symbolize *Sstr4* knockout (KO) mice lacking *hSSTR4* transgene, green mice symbolize the correctly inserted *hSSTR4* transgene. The transgene copies are named Chr3, Chr10 and ChrX (located in chromosomes 3, 10 and X, respectively) and U1 and U2 (the two copies in an unknown location).

To keep track of the transgene in the mouse lines, we designed site-specific genotyping assays for each copy in a known location, and we could differentiate hetero- and homozygotes. In the case of U1 and U2, we could only detect the presence of the transgene, but we could not distinguish the hetero- and homozygotes; therefore, we bred them strictly with *Sstr4* KO mice to obtain only heterozygous mice for testing.

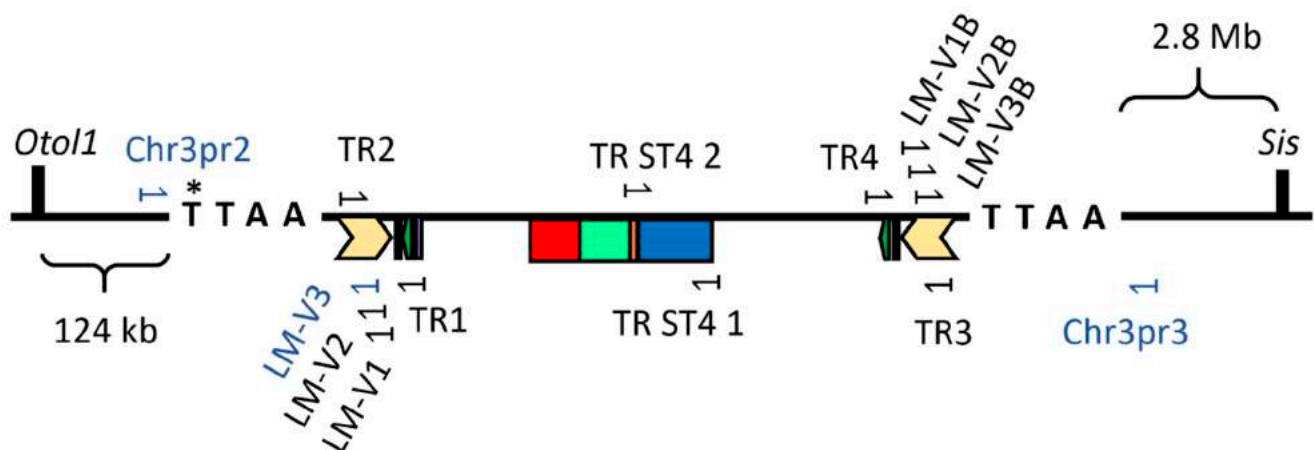


Figure 3. The insertion site of the PB transposon in chromosome 3 of the *Sstr4* KO mouse genome, along with the primers used for genotyping. Mouse chromosome 3 showing the location of the transgene insertion in the PB transposase recognition site (TTAA) at the original position of 70,039,120th base pair (*), which was located between the neighboring genes (*Otol1* and *Sis*). Primer sites are shown in the transgene, which integrated in the chromosome 3 used for the first genotyping test of the F0 generation (TR1–4), for verifying the sequencing of the *hSSTR4* coding sequence (TR ST4 1–2), for ligation-mediated PCR (LM-V primers) and for present routine genotyping PCR (LM-V3 and Chr3pr2–3, marked with blue).

2.3. Distinct Expression Pattern of the *hSSTR4*-Related Luciferase by Luminescent In Vivo Optical Imaging in Various Mouse Lines

First, we characterized the expression of the transgene by measuring the signals of the co-expressed reporter fusion protein: the luminescence of the luciferase and the fluorescence of the tdTomato. Luciferase activity was visualized in the whole body (Figure 4A) and quantified in regions of interest (ROI) in the area of the brain (Figure 4B) by IVIS Lumina III. No luciferase activity was detected either in *Sstr4* KO mice or in hemizygote male or homozygote female ChrX *hSSTR4*-positive mice. Therefore, we excluded the ChrX line from later research, since the transgene was not expressed. Copies in unknown loci (U1 and U2) showed similar expression patterns: weak signal in the extremities and tail, medium signal strength in the area of cerebrum and the caudal part of the brain and strongest signal in the area of olfactory bulb (OB). Chr3 mice showed the strongest signal in the area corresponding to the cerebral hemispheres. Chr3 homozygous mice had nearly exactly double the signal intensity compared to Chr3 heterozygous mice. Chr3 Het mice had significantly stronger signal than U1 and U2 (also heterozygous) mice (Figure 4B). In the periphery, the luminescent signal was weaker and variable, with the highest levels in the lower abdomen and pelvis, regardless of the chromosomal location of the copy of the transgene. Fluorescence of tdTomato linked to *hSSTR4* was not detectable in vivo by optical imaging (image is not shown).

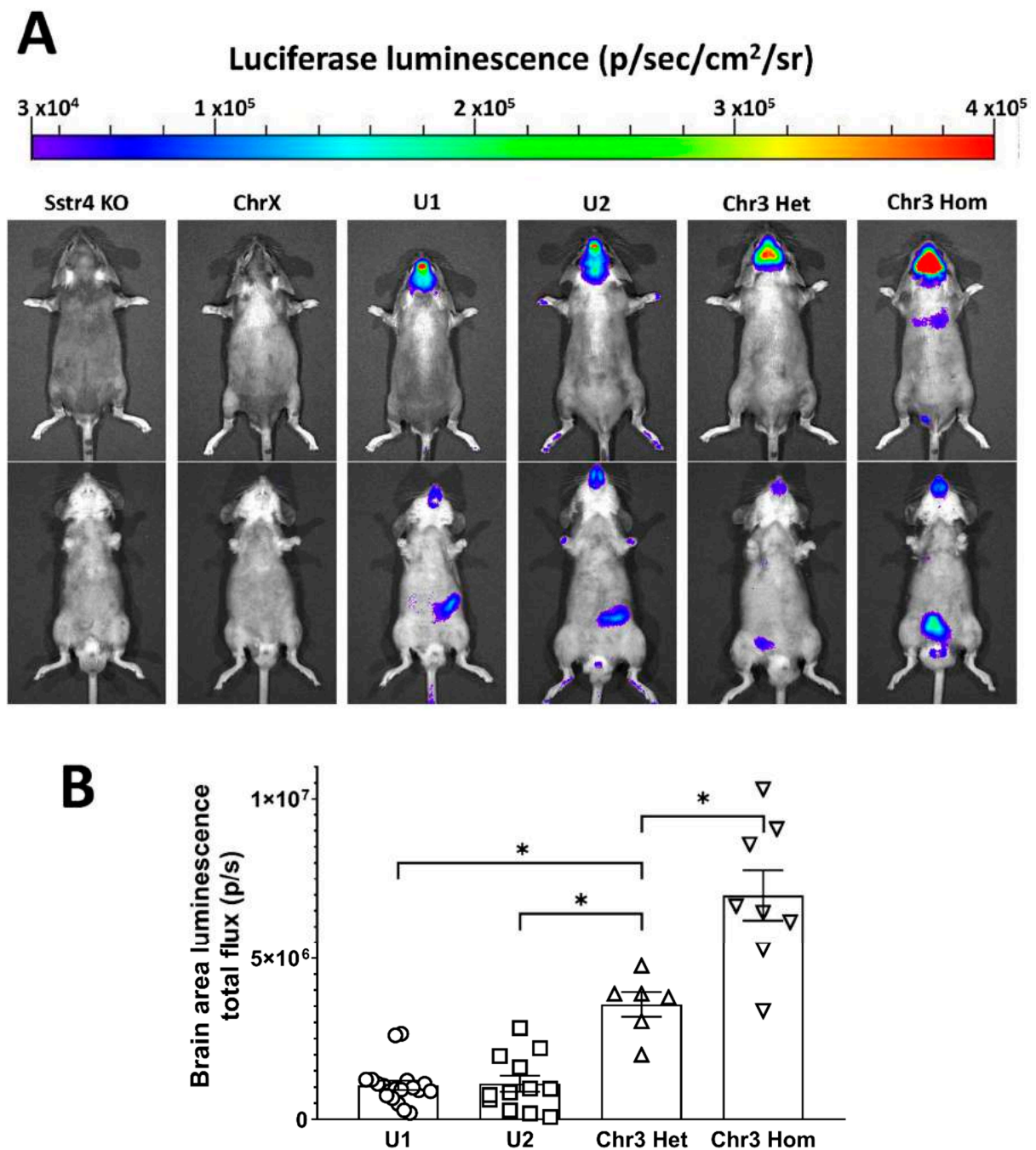


Figure 4. In vivo bioluminescent imaging of the luciferase reporter protein co-expressed with the *hSSTR4* gene. Representative images show the differences of expression pattern and luminescence intensity of luciferase in the different mouse lines (A). Scatter plot with bars show the means \pm SEM with the individual data points of the luminescence intensity in equal size areas of the head corresponding to the brain (B). One-way ANOVA, * $p < 0.0001$, $N = 6-19$ /genotype.

2.4. *hSSTR4* Expression Level Assessed by RT-qPCR

In every inspected organ, with the exception of the lungs, Chr3 showed a higher expression of *hSSTR4* than the mouse *Sstr4* expression in the WT mice. Chr3 showed the highest *hSSTR4* expression in the nervous system: cerebral cortex, olfactory bulb (OB), trigeminal ganglia (TG), cerebellum and brain stem, and also a relatively high expression in the epididymis. In comparison, the mouse *Sstr4* expression in the WT mice was the highest in the cerebral cortex, lungs, OB, epididymis and TG but much lower in the brain stem and cerebellum than the humanized mice. Generally, U1 and U2 showed lower expression

levels of *hSSTR4* in every organ, with the exception of the lungs, compared to Chr3 mice. (Figure 5).

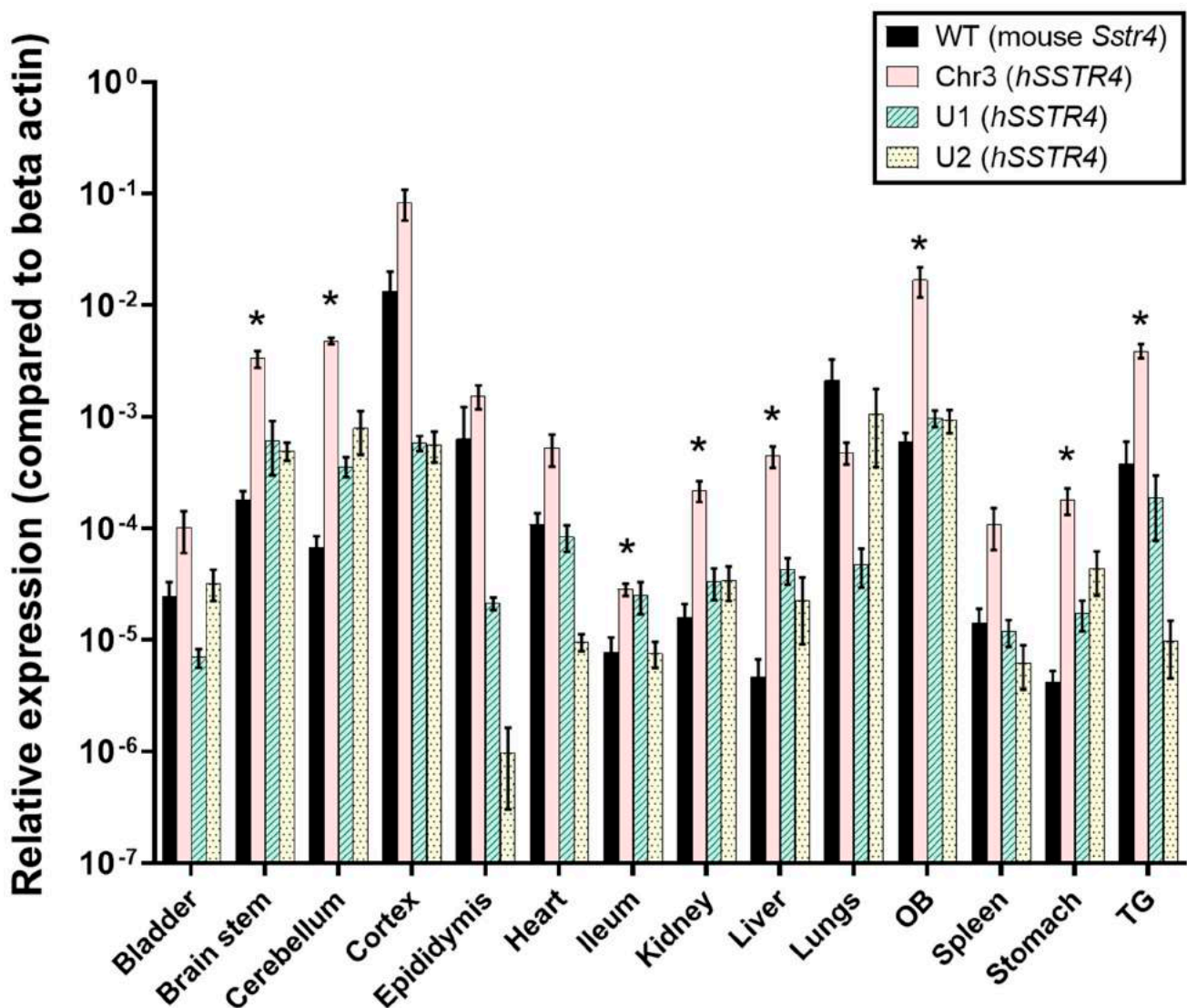


Figure 5. Relative mouse *Sstr4* and human *SSTR4* mRNA expression levels in wild-type (WT) and humanized (Chr3, U1 and U2) mice, respectively. The diagram shows RT-qPCR results ($2^{-\Delta C_t}$) relative to the beta actin (*Actb*) mRNA reference gene in the tested organs. Cortex, OB and TG stand for cerebral cortex, olfactory bulb and trigeminal ganglion, respectively. Each column shows the mean \pm SEM. The significant differences between the WT and Chr3 mice are indicated with an asterisk above the Chr3 column. Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test; * $p < 0.01$; $N = 3-7$ /genotype.

2.5. Expression of *hSSTR4* mRNA in Different Types of Neurons in the Brain

Since the *hSSTR4*-related tdTomato fluorescence was not detectable in native brain sections either (data not shown), and there is no reliably specific anti-SST₄ antibody on the market, in situ hybridization of the *hSSTR4* mRNA was performed to explore its expression pattern. In brain samples of the *hSSTR4* Chr3 homozygous mice, the *hSSTR4* transcript showed a moderate expression level. Within the primary somatosensory cortex (S1), the highest level of expression was found in layers II and III (Figure 6A,B). The highest *hSSTR4* expression was detected in the CA2 field of the hippocampus and in the piriform cortex (Figure 7). Other areas of the brain, such as the granular layer of the OB, the prelimbic cortex, the basolateral (BLA) and the basomedial (BMA) nucleus of the amygdala, showed low, but still considerable *hSSTR4* expression levels (Figure 8).

hSSTR4 was predominantly localized on glutamatergic excitatory neurons (*Vglut1*) with inconsistent cases in the GABAergic interneurons (*Gad1*) in the primary somatosensory cortex (Figure 6), piriform cortex (Figure 7C), prelimbic cortex (Figure 8B), BLA (Figure 8C) and BMA (Figure 8D). In the hippocampus, CA1 and CA2 *hSSTR4* were localized in the glutamatergic excitatory neurons (Figure 7A,B). In the granular layer of the OB, *hSSTR4* transcripts were detected in the GABAergic interneurons (Figure 8A). See the control samples in Appendix A (Figure A1).

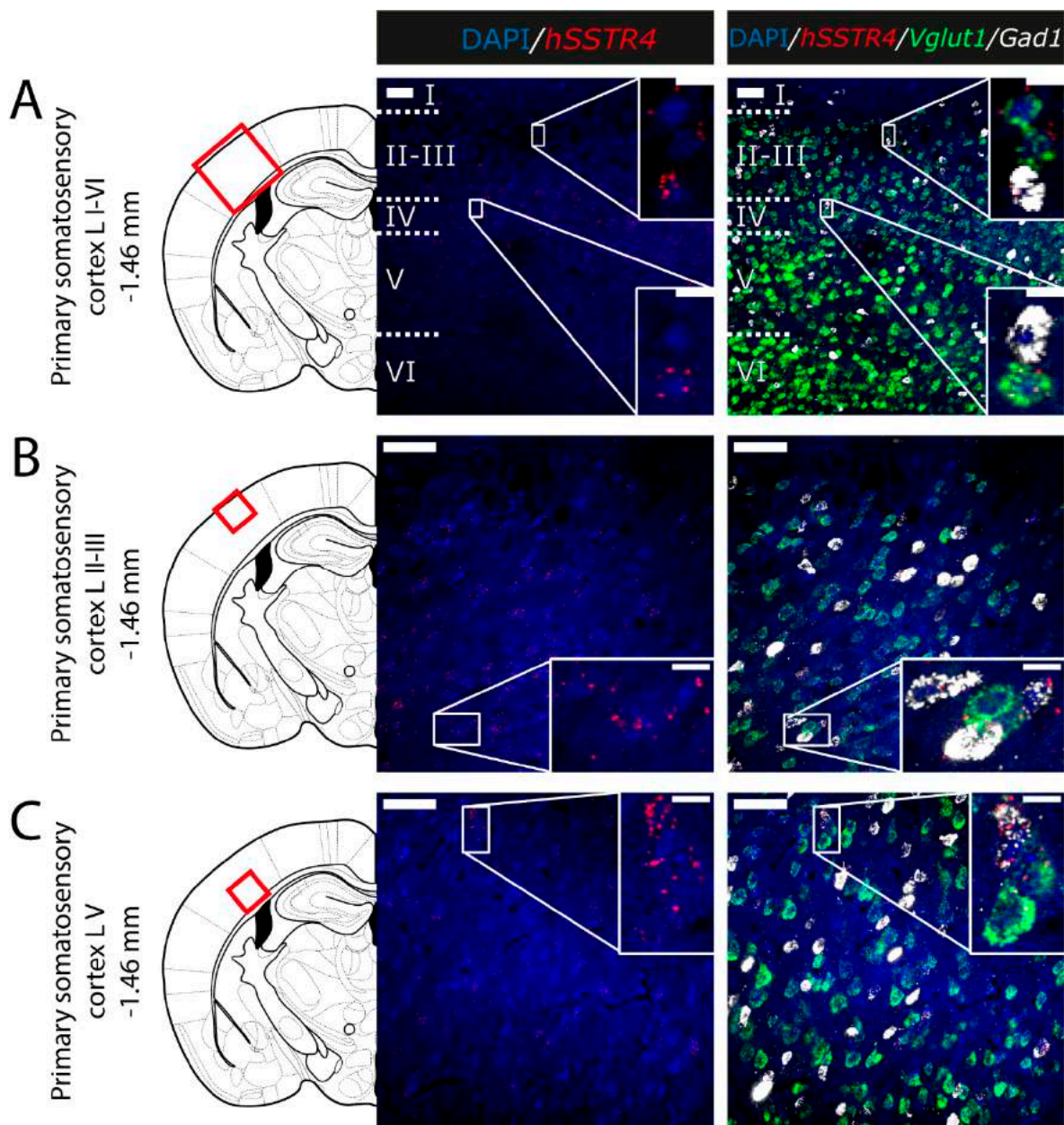


Figure 6. Expression of the *hSSTR4* mRNA in the mouse primary somatosensory cortex. Representative confocal images from Chr3 homozygote mice. Human *SSTR4* (red), mouse *Vglut1* (green) and mouse *Gad1* (white) mRNA expressions counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue) were shown in the layer I-VI (A), the layer II-III (B) and the layer V (C) of the primary somatosensory cortex (S1, Bregma -1.46 mm). Scale bar: $50\ \mu\text{m}$, and inset scale bar: $10\ \mu\text{m}$.

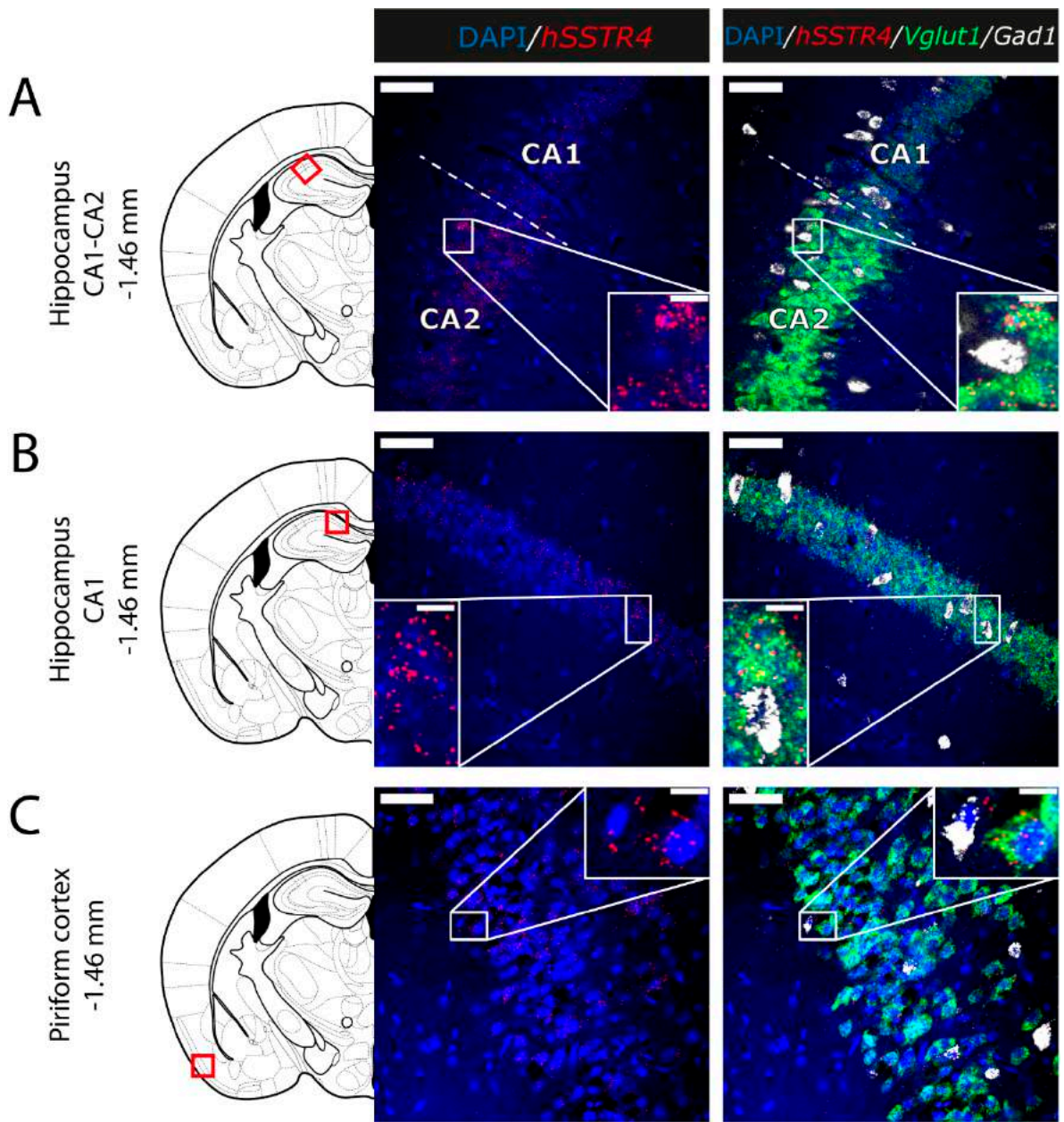


Figure 7. Expression of the *hSSTR4* mRNA in the mouse hippocampus and piriform cortex. Representative confocal images from Chr3 homozygote mice. Human *SSTR4* (red), mouse *Vglut1* (green) and mouse *Gad1* (white) mRNA expressions counterstained with DAPI (blue) were shown in the CA1-CA2 region (Bregma -1.46 mm, (A)), CA1 region of the hippocampus (Bregma -1.46 mm, (B)) and the piriform cortex (Pir, Bregma -1.46 mm, (C)). Scale bar: $50\ \mu\text{m}$, and inset scale bar: $10\ \mu\text{m}$.

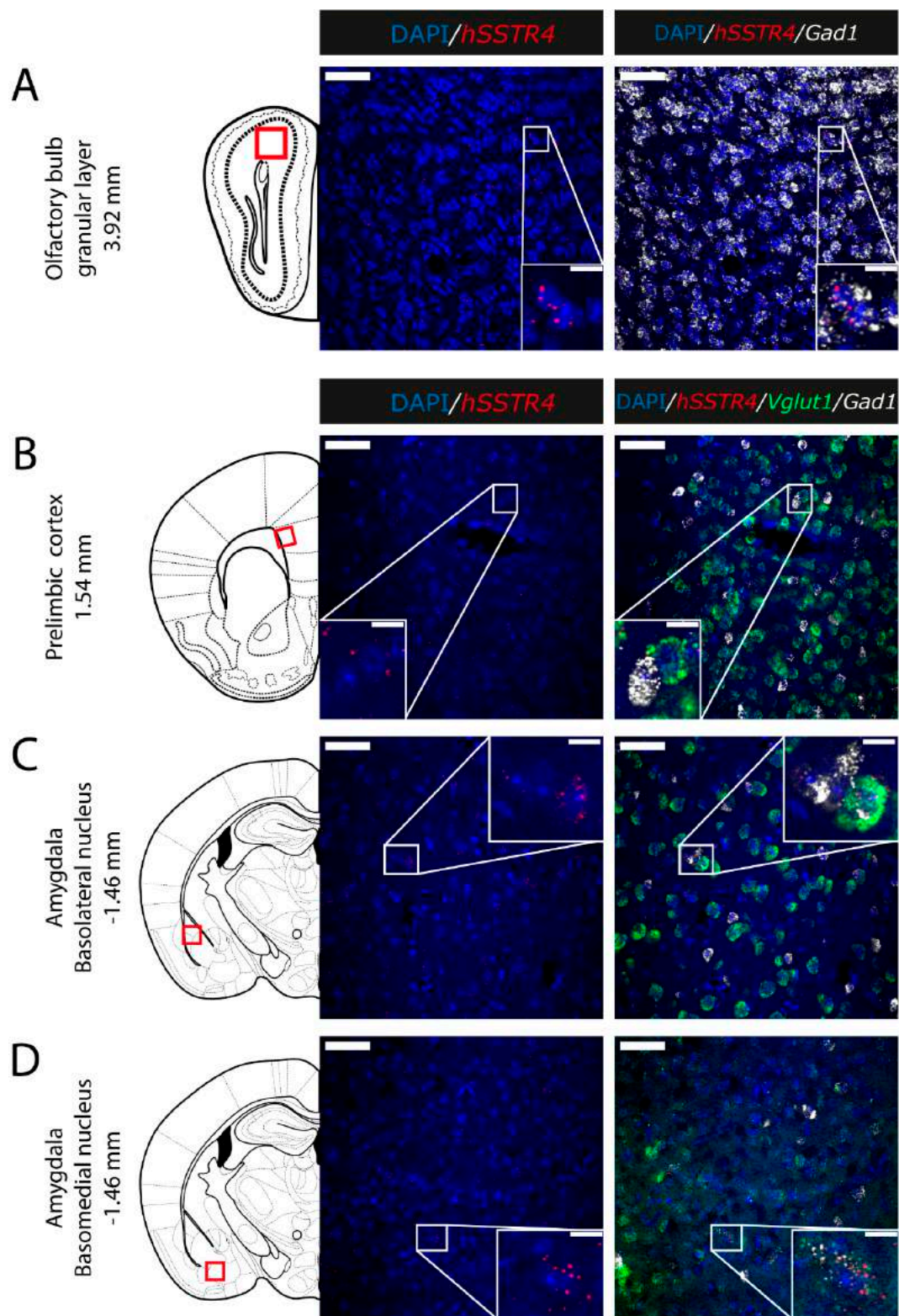


Figure 8. Expression of the *hSSTR4* mRNA in the mouse olfactory bulb, prelimbic cortex and amygdala. Representative confocal images from Chr3 homozygote mice. Human *SSTR4* (red), mouse *Vglut1* (green) and mouse *Gad1* (white) mRNA expressions counterstained with DAPI (blue) were shown in the granular layer of the olfactory bulb (OB, Bregma +3.92 mm, (A)), prelimbic cortex (PrL, Bregma +1.54 mm, (B)), basolateral (BLA, (C)) and basomedial (BMA, (D)) nucleus of the amygdala (Bregma −1.46 mm). Scale bar: 50 μ m, and inset scale bar: 10 μ m.

3. Discussion

The main impacts of the present work are that we successfully generated the first *hSSTR4* transgenic mouse line via random insertion of a PB transposon vector and characterized the receptor-expressing neurons in pain and mood regulation-related brain regions. These mice can be useful tools for preclinical research of the SST₄ receptor, which is a promising novel target for analgesic and antidepressant drug development [2,22,23].

We chose random insertion instead of the popular knock-in approach, because we aimed to avoid the influence of mouse regulatory elements of the *Sstr4* gene on the transgene. We used a transposon vector with the intact human regulatory elements flanked by insulator regions to resemble the human receptor expression pattern. However, the disadvantage of this technique is that the mapping of the integration sites can be problematic, and the insert may disrupt mouse genes [50,51].

The random insertion of the PB transposon resulted in multiple integration sites in the F0 mouse generation. We successfully located three copies of the transgene by LM-PCR [52]: Chr3, Chr10 and ChrX, but the insertion sites of two copies (U1 and U2) are still unknown. The unsuccessful attempts to locate the integration sites of U1 and U2 suggest that they were inserted in repeat regions of the genome that makes mapping of the transgene difficult. Due to the known location of the transgene in the Chr3 mouse line, we could design site-specific genotyping assay to distinguish hetero- and homozygous mice.

All three transgenic mice in the F0 generation experienced complications during pregnancy and delivery and eventually died. This might have been due to the multicopy insertion of the transgene and the consequent overexpression of SST₄, because this problem never occurred again in the offspring carrying a single copy. This observation also supports a role of SST₄ in embryonal growth regulation, since it was demonstrated to be the predominant somatostatin receptor in the human placenta [53,54].

Bioluminescent in vivo optical imaging showed *hSSTR4*-linked luciferase expression pattern in different organs, and quantification showed that the luminescent signal was the strongest in the area corresponding to the brain. Chr3 mice showed a high expression in the area of the cerebrum, whereas U1 and U2 showed a lower expression here but a higher expression in the area of the OB and the caudal part of the brain. RT-qPCR supported these results, as it also showed the highest *hSSTR4* expressions in the cerebral cortex and the OB. The mouse *Sstr4* expression was somewhat lower but similar to the *hSSTR4* expression in Chr3 mice, with the exception of the lungs, where it was much higher, and the cerebellum and brain stem, where it was much lower. These findings are in agreement with previous data obtained in large-scale expression studies of both the human and mouse receptors [46,54–56]. In both luciferase IVIS and RT-qPCR, U1 and U2 showed some similarities in *hSSTR4* expression for both the pattern and level, suggesting that these two mouse lines carry a copy in the same integration site, but this needs further investigation. Each mouse showed individually different luciferase activity for both the intensity and pattern in the areas of the abdomen and the pelvis. The databases demonstrate variable SST₄ expression levels (from not detected to moderate) in both human and mouse gastrointestinal and reproductive systems [57–61]. The Chr3 RT-qPCR results showing the relatively high *hSSTR4* expression in the epididymis support this data, but the lower expression in the stomach and the intestine does not. Chr3 had the strongest luciferase signal in the area of the brain (roughly three times as much as observed in U1 and U2), and unlike U1 and U2, we could distinguish and compare the hetero- and homozygous mice. This showed a strong positive association: the double the gene, the double the signal intensity. Therefore, we selected Chr3 as the most useful mouse line and characterized the *hSSTR4* expression by RNAscope.

The tdTomato fluorescence was not detectable in any of the mouse lines either in vivo or in the histological sections, probably due to the low expression level of the *hSSTR4* transgene. TdTomato is usually driven by a strong viral promoter like the human cytomegalovirus or the promoter of a mammalian housekeeping gene like elongation factor-1 alpha, to be expressed at high level for a strong fluorescent signal [62]. Furthermore, while

the tdTomato has been considered more tolerant of N-terminal fusion than the mRFP1 it was derived from [63], we observed its fluorescence to be greatly diminished in the luciferase-tdTomato fusion protein compared to the native tdTomato protein (data not shown), probably due to the disrupted folding or tetramerization of the tdTomato [64,65].

The *hSSTR4* had the most prominent signal in the hippocampus (CA1 and CA2) and the cerebral cortex (Pir, S1 and PrL), which corresponds to the mouse and human databases [57–61]. RNAscope in the brain of the Chr3 mice shows *hSSTR4* predominantly to be expressed in *Vglut1*-positive glutamatergic excitatory neurons similarly to the *Sstr4* receptor in wild-type mice, although at a visibly lower expression level. *hSSTR4* was also expressed in GABAergic interneurons in the same regions, whereas, previously, the mouse *Sstr4* mRNA was detected in GABAergic neurons only in the core of the central amygdala. In S1, *hSSTR4* had a higher expression in layer V than in layers II–IV, as opposed to the mouse *Sstr4* expression [46]. In a previous study, in the OB of the wild-type mice, *Sstr4* was expressed in the glomerular layer but not in the granular cell layer [66], whereas, in transgenic mice, the *hSSTR4* was expressed mostly in the granular layer of the OB.

Differences in the expression pattern between human *SSTR4* and mouse *Sstr4* might be due to species differences but can also result from limitations of the humanized mouse model, such as the positional effect of the integration site [51]. Therefore, these differences need to be further investigated.

We concluded that the Chr3 *hSSTR4* mouse line showed measurable *hSSTR4* expression, mainly in excitatory glutamatergic neurons of pain- and mood regulation-related brain regions, with several similarities and, also, some differences compared to the mouse *Sstr4* expression. Therefore, after confirming the receptor function, this transgenic mouse line can be a suitable translational research tool to determine the potential of *SST4* as an analgesic, antidepressant and anti-inflammatory drug target and to test the *SST4* agonist candidates during preclinical development.

4. Materials and Methods

4.1. PiggyBac Transposon Vector

Vector pPBC2 was constructed as follows: The 4 kb sequence upstream of the *hSSTR4* coding region containing the promoter and putative regulatory sequences was obtained in two PCR reactions on human genomic DNA. The first segment was amplified by the forward primer 5'-ATC CTC ATT CAC TAT CCT GGG AAG T-3' and reverse primer 5'-CCT GGA ATC TTT CCT GTG CCT ACT T-3' resulting in a 2082-bp-long fragment. The second segment containing the beginning of the *hSSTR4* coding region, and the immediate upstream sequence was amplified by using forward primer 5'TCC TGG AAG CAC TAG CTG TTT ATC A-3' and reverse primer 5'-TTC ACC AGC GTC TTC TGT CTC ACC-3', producing a 2580-bp-long fragment. The two PCR fragments were cloned together at the SphI restriction site in the overlapping section, and a XhoI-SmaI fragment of it was incorporated into the construct containing the beginning of the *SSTR4* coding region and 3968 bp upstream sequence. The rest of the *hSSTR4* coding sequence was cloned from vector pcDNA3.1(+)/*SSTR4* (Cat# SSTR400000; Guthrie Research Institute, Sayre, PA, USA) and fused to the previously described fragment at the unique SmaI site in the *hSSTR4* coding sequence. In the final construct, the coding region contains four single-nucleotide polymorphisms (SNP) compared to the human *SSTR4* reference sequence [67]. These high-frequency SNPs are rs3746726 850T > G, rs2567609 897T > C, rs3746728 924C > T and rs2567608 962T > C. The 2645-bp-long downstream genomic region behind the *hSSTR4* coding sequence was obtained by genomic PCR using forward primer 5'-GGA GCC CTT CCC CTA CCC A-3' and reverse primer 5'-TGG GTA GGG GAA GGG CTC C-3'. The fragment coding the luciferase-tdTomato marker protein was cloned from vector pcDNA(+)/Luc2 = tdT (Cat#32904; Addgene, Watertown, MA, USA). The sequence coding the P2A peptide was constructed from oligonucleotides and inserted between the *hSSTR4* and luciferase-tdTomato sequences. Lox2273 sites and the artificial polyA site was also assembled from oligonucleotides and inserted into the appropriate positions. Finally, the

whole construct was inserted into the pB007 PiggyBac vector (Ref# SPB-007; Transposagen, Lexington, KY, USA) to obtain the pPBC2 vector that was used for transgenesis.

4.2. Animals

B6.129P2-*Sstr4*^{tm1Szo} (*Sstr4* KO) mice [2,22,23] were used for the transgenesis (both the zygotes and the pseudo-pregnant females), for the early breeding of transgenic mice and, later, as control animals in experiments. Distinct mouse lines were created by breeding, each containing a single copy of the transgene. The proposed name of the humanized *SSTR4* expressing mouse strain is B6.129P2-*Sstr4*^{tm1Szo}-TgTn(pb-*SSTR4*-P2A-luc-tdTomato)1Szo.

Animals were bred and kept in the animal house of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School at a temperature of 22 ± 2 °C and a 12-h light–dark cycle. Standard rodent chow and water were provided ad libitum.

4.3. Transgenesis

The transgenesis was made in commission by BioTalentum Ltd. (Gödöllő, Hungary). The *hSSTR4* transgene vector (pPBC2) and the super piggyBac transposase mRNA (Ref# SPB-003; Transposagen, Lexington, KY, USA) were microinjected into the pronuclei of 56 zygotes from *Sstr4* KO mice, and the transfected zygotes were implanted into pseudo-pregnant *Sstr4* KO mice that resulted in 16 transfected mice (F0 generation). These mice were genotyped by PCR for both the *hSSTR4* transgene and the vector backbone. Primers for the *hSSTR4* 3' region: primer TR1: CTT TGC TCA TCC CTC CAT CT and primer TR2: GTC GCT GTG CAT TTA GGA CA (product size: 883 bp). For the *hSSTR4* 5' region: TR ST4 3: TTG ACG CAT GTG TTT TAT CG and TR ST4 4: ATC CTG GTA CCC ACC CAG AC (product size: 717 bp). For the plasmid origin (vector backbone 1): Cole1Ori-F: ATC GAC GCT CAA GTC AGA GG and Cole1Ori-R: CCG GAT CAA GAG CTA CCA AC (product size: 475 bp). For the Ampicillin resistance gene (vector backbone 2): Backbone ctrl Forward: GTG TCG CCC TTA TTC CCT TT and Backbone ctrl Reverse: AAC TTT ATC CGC CTC CAT CC (product size: 623 bp).

The *hSSTR4* transgene without the plasmid backbone integrated into only 3 female mice from the F0 generation, and all of them were backcrossed with *Sstr4* KO males.

4.4. Ligation-Mediated PCR

We followed the protocol and Y-linker sequences from Bryda et al. [52]. Genomic DNA was extracted from tail biopsies using the Thermo Scientific Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Digestion was performed with different 3' overhang creator restriction endonucleases separately: *Tai*I, *Pst*I and *Hha*I. Three transgene specific nested primers were designed to both 5' and 3' end regions of the transgene using Primer-BLAST (NCBI, Rockville Pike, Bethesda MD, USA). The nested primers were oriented to the outward of the transgene, where the Y-linker is expected to be attached, and the primers were arranged accordingly (primer 1 is furthest from the end of the transgene, and primer 3 is the closest). 5' end specific primers: LM-V1B: CTA TTC AAA TTA ATA AAT AAA CCT CG, LM-V2B: TAA ACC TCG ATA TAC AGA CCG and LM-V3B: CGA TAA AAC ACA TGC GTC AA. 3' end specific primers: LM-V1: AGC TCC AGC TTT TGT TCC CTT, LM-V2: ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAT and LM-V3: GGC GAA TTG GGT ACC GGG. The Y-linker consists of 2 partially complementary oligo DNA fragments: Y-linker A: GTG CAG CCT TGG GTC GCC GTG T/3InvdT/(nonexpendable base end) and Y-linker E: GCA AAC GAT AAA TGC GAG GAC GGT ACA GGC CGA CCC AAG GCT GCA CT [52]. The Y-linker-specific nested PCR primers: Y-linker primer D: GCA AAC GAT AAA TGC GAG GAC GGT and Y-linker primer G: ATG CGA GGA CGG TAC AGG CCG ACC. All primers and the Y-linker were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT; Coralville, IA, USA). The Y-linker was prepared by the annealing of Y-linker A and Y-linker E. The first (single round) PCR was performed with digested DNA, Taq DNA polymerase enzyme (5' overhang synthesizing tendency) and transgene specific primer 1 (LM-V1 and LM-V1B in separate reactions). The Y-linker was ligated with the product of the first PCR

by T4 DNA ligase and then was amplified by 2 consecutive PCRs with nested primer pairs. The second PCR was made with the product of ligation, Y-linker primer D and transgene specific primer 2 (LM-V2 or LM-V2B, matching to the primer 1 used in the first PCR) and the third PCR was made with the product of the second PCR, Y-linker primer G and transgene specific primer 3 (LM-V3 or LM-V3B, matching to the primer 1 and 2 used in the previous PCRs). Each was made with Phire Tissue Direct PCR Master Mix. Products of the third PCR were separated by gel electrophoresis, and all detected bands were isolated using the GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The nucleotide sequence of each product of the third PCR was acquired by Sanger sequencing in the commissioned BIOMI Ltd. (Gödöllő, Hungary). The acquired sequences were analyzed by National Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide-BLAST. For verification of the identified loci, mouse chromosome specific (near the insertion site of the transgene) primers were designed to be paired with a LM-V3 transgene specific primer: ChrXpr1: AAC TCC TTT ACC CGC TTG CTC for chromosome X, Chr3pr2: CTG GTT CCG AGT CTC TGA GG for chromosome 3 and Chr10pr2: ATA ATG CCC CTG GCA TAG CTT TC for chromosome 10. Chr3 *hSSTR4* mice are since genotyped routinely by LM-V3 forward primer, Chr3pr2 reverse primer and a secondary forward primer Chr3pr3: TCA GGA GCA AGA GAG GAA GA, resulting in PCR products in the size of 527 bp for wild-type chromosomes and 683 bp for the inserted *hSSTR4* transgene, allowing the identification of Chr3 homozygotes and heterozygotes (Figure 3).

4.5. Detecting *hSSTR4* Expression by In Vivo Optical Imaging of the Luciferase Enzyme and *tdTomato*

For the in vivo imaging of luciferase, 8–10-week-old male animals were injected with 300 mg/kg D-luciferin sodium salt (Goldbio, St. Louis, MO, USA) intraperitoneally (i.p.) and then anaesthetized with ketamine-xylazine (100 and 5 mg/kg i.p.). The fur was removed with a fine electrical shaver. Bioluminescent imaging was performed 30 min after D-luciferin administration with the IVIS Lumina III imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) with the following settings: exposure time 5 min and, binning 4. The bioluminescent signal of the brain was quantified as a total flux (photons/s) in equal-size regions of interest (ROI) corresponding to the top of the skull. Fluorescent optical imaging of *tdTomato* expression was also performed with the IVIS Lumina III imaging system. For *tdTomato* detection, excitation filters of 500, 520, 540 and 560 nm for spectral unmixing and an emission filter of 620 nm, auto exposure and a binning of 2 were used. After imaging, animals were placed onto a heating pad and monitored until they recovered from anesthesia.

4.6. Investigating *hSSTR4*-Linked *tdTomato* Expression in the Mouse Brain by Confocal Microscopy

After luminescent optical imaging, the animals were deeply anesthetized with an overdose of urethane (2.4 g/kg i.p.) and perfused transcardially with 30 mL of 4% paraformaldehyde in Millonig's phosphate buffer. Dissected brains were postfixed for 24 h at room temperature (RT), rinsed in 1x phosphate-buffered saline (PBS) and sectioned (by 30 μ m) using a vibrating microtome (VT1000S, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Sections were mounted on Superfrost Ultra Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), air-dried for 3 h at RT and the sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted with ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for confocal imaging.

Fluorescent images of PrL, BLA, S1, CA1, CA2 and Pir, according to Paxinos and Franklin [48], were acquired using an Olympus Fluoview FV-1000 laser scanning confocal microscope and FluoView FV-1000S-IX81 image acquisition software system (Olympus, Tokyo, Japan). The confocal aperture was set to 80 μ m. The analog sequential scanning was performed using a 40x objective lens (NA: 0.75). The optical thickness was set to 1 μ m, and the resolution was 1024 \times 1024 pixels. The excitation time was set to 4 μ s per pixel. Virtual colors were selected to depict fluorescent signals: blue for DAPI and red for *tdTomato*).

Images of the two respective channels were stored both individually and superimposed to evaluate the colocalization of fluorescent signals.

4.7. Measuring Organ-Specific *hSSTR4* Expression by RT-qPCR

Total RNA was extracted from WT (C57BL/6), *Sstr4* KO, Chr3, U1 and U2 8–10-week-old male mice from the following 14 mouse organs: bladder, brain stem, cerebellum, cerebral cortex, epididymis, heart, ileum, kidney, liver, lungs, OB, spleen, stomach and TG. TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) and Direct-Zol RNA isolation kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) were used for total RNA extraction. The concentration of the RNA samples was measured by a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Genomic DNA contamination in the RNA samples was fully digested by DNase I (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Reverse transcription of the RNA samples was made by Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Incubation for DNA digestion, DNase I heat inactivation and reverse transcription PCR were performed in a Biometra TAdvanced Twin 48/48 G³ (Analytik Jena, Jena, Germany). Quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Each reaction contained 20 ng of cDNA sample, 1X Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 1 μ M of each primers and additional nuclease-free water to a total reaction volume of 20 μ L. The following primer pairs were used: for the *hSSTR4* cDNA: *hSSTR4* new F: TGG AAG GTG CTG GAG GT and *hSSTR4* new R: GTT CTG GTT GCA GGG CTT; for the mouse *Sstr4* cDNA: *mSSTR4*gfor: GCC CTG GTC ATC TTC GTG AT and *mSSTR4*grev: ATG AAG AGC TCA TCG GCG AC and for the reference gene beta actin (*Actb*) cDNA: *mBACTIN* F: GTC GAG TCG CGT CCA CC and *mBACTIN* R: GTC ATC CAT GGC GAA CTG for endogenous control. These primers were tested on KO mice (data not shown) and RT-qPCR amplification and the melting curve analysis indicated that both the human *SSTR4* and mouse *Sstr4* primers are specific to their respective genes. Water control was used to check the reactions for contamination. Real-time qPCR was performed under the following conditions: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. Each reaction was carried out in a duplicate. Signal specificity was ensured by melt curve analysis. Relative expression ratios were calculated using the Δ Ct method and linearized by $2^{-\Delta$ Ct, in which the *hSSTR4* expression level was compared to the *Actb* reference gene.

4.8. Characterizing *hSSTR4* Expressing Neurons in the Mouse Brain by RNAscope In Situ Hybridization

RNAscope ISH were performed on 3 to 4-month-old male *Sstr4* KO and *hSSTR4* Chr3 Hom mice ($n = 4$). Animals were deeply anesthetized with an overdose of urethan (2.4 g/kg) and perfused transcardially with 30 mL of 4% paraformaldehyde in Millonig's phosphate buffer. Dissected brains were postfixed for 72 h at 4 °C, rinsed in 1x PBS and sectioned (by 30 μ m) using a vibrating microtome (VT1000S, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Sections were stored in 1x PBS with 0.01% Na-azide (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

RNAscope assay was performed on 30- μ m-thick vibratome-sliced brain sections using RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA), according to the manufacturer's protocols. Tissue pretreatment was performed by treatment with 1 v/v% H₂O₂ solution in PBS for 30 min. After PBS washes, sections were mounted on Superfrost Ultra Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sections were air-dried for 3 h at RT and incubated at 60 °C for 60 min. After 2 \times 10-min washes in Milli-Q (MQ) water, slides were incubated in 10% neutral buffered formalin solution (NBF, Merck KGaA) at 4 °C for 2 min. After 3 \times 10 min MQ water rinses, sections were digested in proteinase K solution at 37 °C for 15 min (0.01 mg/ml proteinase K (EO0491, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in 0.1 M Tris/HCl, pH = 8 and 0.05 M EDTA, pH = 8 buffer. After rinsing in MQ water, slides were treated with 10% NBF

at 4 °C for 2 min, followed by 3 × 10-min washes in MQ water. Sections were hybridized with probes specific to human *SSTR4* and mouse *Sstr4*, *Vglut1* and *Gad1*, in parallel with RNAscope 3-plex mouse positive and negative control probes. Signal amplification, channel development and mounting were performed according to the manufacturer's protocols. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted with ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for confocal imaging. Fluorescent images of PrL, BLA, S1, CA1, CA2 and Pir, according to Paxinos and Franklin [68], were acquired using an Olympus Fluoview FV-1000 laser scanning confocal microscope and FluoView FV-1000S-IX81 image acquisition software system (Olympus, Tokyo, Japan). The confocal aperture was set to 80 µm. The analog sequential scanning was performed using a 40x objective lens (NA: 0.75). The optical thickness was set to 1 µm, and the resolution was 1024 × 1024 pixels. The excitation time was set to 4 µs per pixel. Virtual colors were selected to depict the fluorescent signals: blue for DAPI, green for fluorescein (*Vglut1* mRNA), red for Cyanine 3 (*hSSTR4* and *mSstr4* mRNA) and white for Cyanine 5 (*Gad1* mRNA). Images of the respective four channels were stored both individually and superimposed to evaluate the co-localization of fluorescent signals.

Author Contributions: Conceptualization, Z.S., B.N., K.B., A.K., E.P. and Z.H.; methodology, Z.S., B.N., K.B., A.K., V.K. and B.G.; formal analysis, B.N., Z.S., K.B. and A.K.; investigation, B.N., Z.S., A.K., K.B., V.K., T.A., B.G. and D.H.; resources, B.N., Z.S., K.B., A.K. and V.K.; writing—original draft preparation, B.N., Z.S., A.K. and K.B.; writing—review and editing, A.K., K.B., Z.S., V.K., B.G., T.A., D.H., E.P. and Z.H.; visualization, B.N., A.K., K.B., V.K., B.G. and Z.S.; supervision, Z.S., Z.H. and E.P. and funding acquisition, Z.S., E.P. and Z.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the National Brain Research Program 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (NAP-2; Chronic Pain Research Group), GINOP-2.3.2-15-2016-00050 (Peptidergic Signaling in Health and Disease; PEPSYS), EFOP 3.6.2-17-2017-00008 N (2017-2019), EFOP-3.6.1-16-2016-00004, EFOP-3.6.2-16-2017-00006, FIKPII-17886-4/23018/FEKUTSTRAT and NKFIH-OTKA-K 134214. A.K. was sponsored by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. B.N. was sponsored by the Talentum Foundation Scholarship of the Gedeon Richter Plc. V.K. was supported by a research grant from Medical School, University of Pécs (KA-2019-12) and by the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund (ÚNKP-20-4-II-PTE-874). Project no. TKP2020-IKA-08 has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme to BG.

Institutional Review Board Statement: The study was designed and conducted according to European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) on the protection of animals used for scientific purposes. The study was approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary and licensed by the Government Office of Baranya County on 14 March 2019 (license No. BA02/2000-10/2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are thankful to Miklós Kecskés for his useful suggestions for data interpretation and further functional studies, Nikolett Szentes for collecting and processing mouse organs for RT-qPCR, Lilla Draskóczi for processing mouse organs for RT-qPCR, and Tünde Bíró-Sütő for processing the mouse brain samples for microscopy. The in vivo imaging experiments were performed in the Small Animal Imaging Core Facility of the Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Hungary.

Conflicts of Interest: We declare no conflict of interest. Z.H. and E.P. are the founders of PharmInVivo Ltd., Pécs, Hungary. Z.H. and E.P. are stakeholders of ALGONIST Biotechnologies GmbH, Wien, Austria. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

Abbreviations

BLA	basolateral nucleus of the amygdala
BMA	basomedial nucleus of the amygdala
CA1	Cornu Ammonis 1 region of the hippocampus
CA2	Cornu Ammonis 2 region of the hippocampus
Ct value	threshold cycle value (in RT-qPCR)
<i>dabP</i>	gene of the bacterial D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, a blue-fluorescent DNA stain
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>FOXA2</i>	gene of the human forkhead box A2
GABA	gamma-aminobutyric acid
<i>Gad1</i>	gene of the mouse glutamate decarboxylase 1
Het	heterozygote/heterozygous, carrying different alleles of the gene
Hom	homozygote/homozygous, carrying identical alleles of the gene
<i>hSSTR4</i>	gene of human somatostatin receptor subtype 4
i.p.	intraperitoneally
KO	knock-out, an artificially created nonfunctional variant of the gene
LM-PCR	ligation-mediated polymerase chain reaction
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OB	olfactory bulb
<i>Otol1</i>	gene of the mouse otolin 1
PB	piggyBac, a type of transposon system
PBS	phosphate-buffered saline
pcDNA	plasmid cloning DNA
PCR	polymerase chain reaction
Pir	piriform cortex
<i>Polr2a</i>	gene of the mouse RNA polymerase II subunit A
polyA	polyadenylation signal sequence
<i>Ppib</i>	gene of the mouse peptidylprolyl isomerase B
PrL	prelimbic cortex
RT	room temperature
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
S1	primary somatosensory cortex
<i>Sis</i>	gene of the mouse sucrase-isomaltase
SNP	single-nucleotide polymorphism
SST ₁₋₅	somatostatin receptor subtype 1-5
<i>Sstr4</i>	gene of mouse somatostatin receptor subtype 4
SV	seminal vesicle
tdTomato	tandem dimer Tomato, a red fluorescent reporter protein
TG	trigeminal ganglion
<i>THBD</i>	gene of the human thrombomodulin
<i>Ubc</i>	gene of the mouse ubiquitin C
<i>Vglut1</i>	gene of the mouse vesicular glutamate transporter 1
WT	wild type

Appendix A

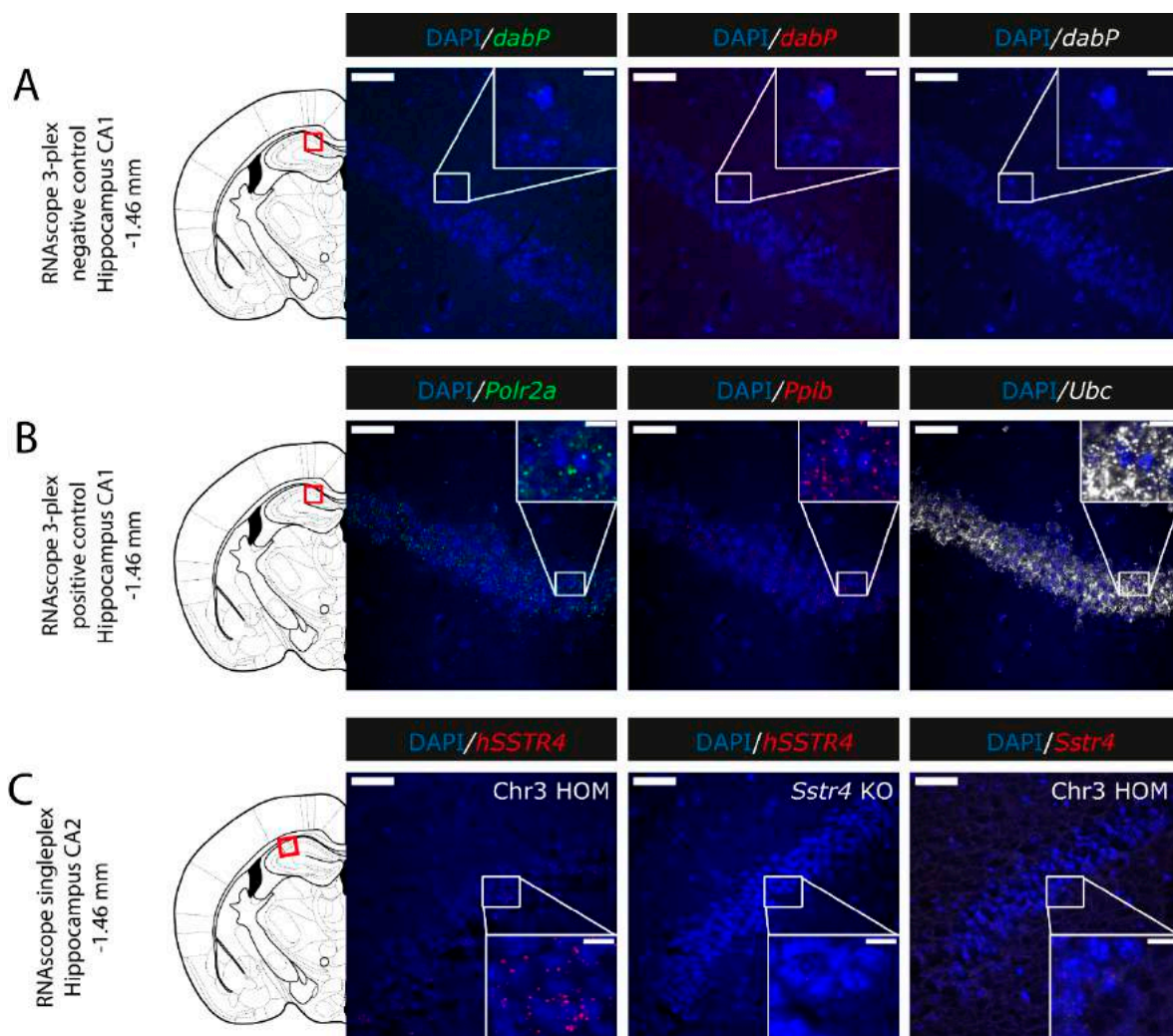


Figure A1. Representative control conditions for the RNAscope (counterstained with DAPI). RNAscope 3-plex-negative control specific to the bacterial *dabP* gene shown in the CA1 of *hSSTR4* homozygote mice (A). RNAscope 3-plex-positive control probes specific to mouse *Polr2a*, *Ppib* and *Ubc* mRNA targets shown in green, red and white, respectively, in the CA1 (Bregma -1.46 mm) of *hSSTR4* Chr3 homozygous animals (B). Human *SSTR4* singleplex control shown in the CA2 (Bregma -1.46 mm) of *hSSTR4* homozygous mice ((C), left panel). As negative tissue controls (no human *SSTR4* transcript was detected in *Sstr4* KO mice ((C), middle panel). Additionally, no mouse *Sstr4* signal was shown in *hSSTR4* homozygote mice ((C), right panel). Scale bar: $50\ \mu\text{m}$, and inset scale: $10\ \mu\text{m}$.

References

1. Baraban, S.C.; Tallent, M.K. Interneuron Diversity Series: Interneuronal Neuropeptides—Endogenous Regulators of Neuronal Excitability. *Trends Neurosci.* **2004**, *27*, 135–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Helyes, Z.; Pinter, E.; Sandor, K.; Elekes, K.; Banvolgyi, A.; Keszthelyi, D.; Szoke, E.; Toth, D.M.; Sandor, Z.; Kereskai, L.; et al. Impaired Defense Mechanism against Inflammation, Hyperalgesia, and Airway Hyperreactivity in Somatostatin 4 Receptor Gene-Deleted Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13088–13093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sándor, K.; Elekes, K.; Szabó, Á.; Pintér, E.; Engström, M.; Wurster, S.; Szolcsányi, J.; Helyes, Z. Analgesic Effects of the Somatostatin Sst4 Receptor Selective Agonist J-2156 in Acute and Chronic Pain Models. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *539*, 71–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pintér, E.; Pozsgai, G.; Hajna, Z.; Helyes, Z.; Szolcsányi, J. Neuropeptide Receptors as Potential Drug Targets in the Treatment of Inflammatory Conditions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2014**, *77*, 5–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Matsuoka, N.; Maeda, N.; Yamaguchi, I.; Satoh, M. Possible Involvement of Brain Somatostatin in the Memory Formation of Rats and the Cognitive Enhancing Action of FR121196 in Passive Avoidance Task. *Brain Res.* **1994**, *642*, 11–19. [[CrossRef](#)]

6. Tuboly, G.; Vecsei, L. Somatostatin and Cognitive Function in Neurodegenerative Disorders. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 34–46. [[CrossRef](#)]
7. Martel, G.; Dutar, P.; Epelbaum, J.; Viollet, C.P. Somatostatinergic Systems: An Update on Brain Functions in Normal and Pathological Aging. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3*, 154. [[CrossRef](#)]
8. Sandoval, K.E.; Farr, S.A.; Banks, W.A.; Crider, A.M.; Morley, J.E.; Witt, K.A. Somatostatin Receptor Subtype-4 Agonist NNC 26-9100 Decreases Extracellular and Intracellular A β _{1–42} Trimers. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *683*, 116–124. [[CrossRef](#)]
9. Sandoval, K.; Umbaugh, D.; House, A.; Crider, A.; Witt, K. Somatostatin Receptor Subtype-4 Regulates MRNA Expression of Amyloid-Beta Degrading Enzymes and Microglia Mediators of Phagocytosis in Brains of 3xTg-AD Mice. *Neurochem. Res.* **2019**, *44*, 2670–2680. [[CrossRef](#)]
10. Lin, L.C.; Sibille, E. Somatostatin, Neuronal Vulnerability and Behavioral Emotionality. *Mol. Psychiatry* **2015**, *20*, 377–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Engin, E.; Stellbrink, J.; Treit, D.; Dickson, C.T. Anxiolytic and Antidepressant Effects of Intracerebroventricularly Administered Somatostatin: Behavioral and Neurophysiological Evidence. *Neuroscience* **2008**, *157*, 666–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lin, L.-C.M.S.; Sibille, E.P.D. Reduced Brain Somatostatin in Mood Disorders: A Common Pathophysiological Substrate and Drug Target? *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kormos, V.; Gaszner, B. Role of Neuropeptides in Anxiety, Stress, and Depression: From Animals to Humans. *Neuropeptides* **2013**, *47*, 401–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Epelbaum, J. Somatostatin in the Central Nervous System: Physiology and Pathological Modifications. *Prog. Neurobiol.* **1986**, *27*, 63–100. [[CrossRef](#)]
15. Gulyás, A.I.; Hájos, N.; Katona, I.; Freund, T.F. Interneurons Are the Local Targets of Hippocampal Inhibitory Cells Which Project to the Medial Septum. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *17*, 1861–1872. [[CrossRef](#)]
16. Tomioka, R.; Okamoto, K.; Furuta, T.; Fujiyama, F.; Iwasato, T.; Yanagawa, Y.; Obata, K.; Kaneko, T.; Tamamaki, N. Demonstration of Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Mouse Neocortex. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 1587–1600. [[CrossRef](#)]
17. Szolcsányi, J. Forty Years in Capsaicin Research for Sensory Pharmacology and Physiology. *Neuropeptides* **2004**, *38*, 377–384. [[CrossRef](#)]
18. Thán, M.; Németh, J.; Szilvássy, Z.; Pintér, E.; Helyes, Z.; Szolcsányi, J. Systemic Anti-Inflammatory Effect of Somatostatin Released from Capsaicin-Sensitive Vagal and Sciatic Sensory Fibres of the Rat and Guinea-Pig. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *399*, 251–258. [[CrossRef](#)]
19. Helyes, Z.; Pintér, E.; Németh, J.; Sándor, K.; Elekes, K.; Szabó, A.; Pozsgai, G.; Keszthelyi, D.; Kereskai, L.; Engström, M.; et al. Effects of the Somatostatin Receptor Subtype 4 Selective Agonist J-2156 on Sensory Neuropeptide Release and Inflammatory Reactions in Rodents. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 405–415. [[CrossRef](#)]
20. Markovics, A.; Szőke, É.; Sándor, K.; Börzsei, R.; Bagoly, T.; Kemény, Á.; Elekes, K.; Pintér, E.; Szolcsányi, J.; Helyes, Z. Comparison of the Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-14 in Distinct In Vitro and In Vivo Model Systems. *J. Mol. Neurosci.* **2012**, *46*, 40–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Qiu, C.; Zeyda, T.; Johnson, B.; Hochgeschwender, U.; de Lecea, L.; Tallent, M.K. Somatostatin Receptor Subtype 4 Couples to the M-Current to Regulate Seizures. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 3567–3576. [[CrossRef](#)]
22. Scheich, B.; Gaszner, B.; Kormos, V.; László, K.; Ádori, C.; Borbély, É.; Hajna, Z.; Tékus, V.; Bölcskei, K.; Ábrahám, I.; et al. Somatostatin Receptor Subtype 4 Activation Is Involved in Anxiety and Depression-like Behavior in Mouse Models. *Neuropharmacology* **2016**, *101*, 204–215. [[CrossRef](#)]
23. Scheich, B.; Csekő, K.; Borbély, É.; Ábrahám, I.; Csernus, V.; Gaszner, B.; Helyes, Z. Higher Susceptibility of Somatostatin 4 Receptor Gene-Deleted Mice to Chronic Stress-Induced Behavioral and Neuroendocrine Alterations. *Neuroscience* **2017**, *346*, 320–336. [[CrossRef](#)]
24. Botz, B.; Bölcskei, K.; Helyes, Z. Challenges to Develop Novel Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnology* **2017**, *9*, e1427. [[CrossRef](#)]
25. Kántás, B.; Börzsei, R.; Szőke, É.; Bánhegyi, P.; Horváth, Á.; Hunyady, Á.; Borbély, É.; Hetényi, C.; Pintér, E.; Helyes, Z. Novel Drug-Like Somatostatin Receptor 4 Agonists Are Potential Analgesics for Neuropathic Pain. *IJMS* **2019**, *20*, 6245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shenoy, P.A.; Kuo, A.; Khan, N.; Gorham, L.; Nicholson, J.R.; Corradini, L.; Vetter, I.; Smith, M.T. The Somatostatin Receptor-4 Agonist J-2156 Alleviates Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Breast Cancer Induced Bone Pain. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 495. [[CrossRef](#)]
27. Park, T.S.W.; Khan, N.; Kuo, A.; Nicholson, J.R.; Corradini, L.; Smith, M.T. J-2156, a Somatostatin Receptor Type 4 Agonist, Alleviates Mechanical Hyperalgesia in a Rat Model of Chronic Low Back Pain. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cavalli, E.; Mammana, S.; Nicoletti, F.; Bramanti, P.; Mazzon, E. The Neuropathic Pain: An Overview of the Current Treatment and Future Therapeutic Approaches. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2019**, *33*, 205873841983838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Clinical Development Pipeline | Science | Eli Lilly and Company. Available online: <https://www.lilly.com/discovery/clinical-development-pipeline> (accessed on 2 April 2021).

30. Szőke, É.; Bálint, M.; Hetényi, C.; Markovics, A.; Elekes, K.; Pozsgai, G.; Szűts, T.; Kéri, G.; Órfi, L.; Sándor, Z.; et al. Small Molecule Somatostatin Receptor Subtype 4 (Sst4) Agonists Are Novel Anti-Inflammatory and Analgesic Drug Candidates. *Neuropharmacology* **2020**, *178*, 108198. [CrossRef] [PubMed]
31. Liu, Z.; Crider, A.M.; Ansbros, D.; Hayes, C.; Kontoyianni, M. A Structure-Based Approach to Understanding Somatostatin Receptor-4 Agonism (Sst4). *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 171–186. [CrossRef] [PubMed]
32. Shultz, L.D.; Ishikawa, F.; Greiner, D.L. Humanized Mice in Translational Biomedical Research. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 118–130. [CrossRef] [PubMed]
33. Manz, M.G.; Di Santo, J.P. Renaissance for Mouse Models of Human Hematopoiesis and Immunobiology. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 1039–1042. [CrossRef] [PubMed]
34. Pearson, T.; Greiner, D.L.; Shultz, L.D. Humanized SCID Mouse Models for Biomedical Research. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *324*, 25–51. [CrossRef] [PubMed]
35. Ito, M.; Kobayashi, K.; Nakahata, T. NOD/Shi-Scid IL2rgamma(Null) (NOG) Mice More Appropriate for Humanized Mouse Models. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *324*, 53–76. [CrossRef]
36. Legrand, N.; Weijer, K.; Spits, H. Experimental Models to Study Development and Function of the Human Immune System in Vivo. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 2053–2058. [CrossRef]
37. Zhang, B.; Duan, Z.; Zhao, Y. Mouse Models with Human Immunity and Their Application in Biomedical Research. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 1043–1058. [CrossRef]
38. Devoy, A.; Bunton-Stasyshyn, R.K.A.; Tybulewicz, V.L.J.; Smith, A.J.H.; Fisher, E.M.C. Genomically Humanized Mice: Technologies and Promises. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 14–20. [CrossRef]
39. Zhu, F.; Nair, R.R.; Fisher, E.M.C.; Cunningham, T.J. Humanising the Mouse Genome Piece by Piece. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1845. [CrossRef]
40. Lamprecht Tratar, U.; Horvat, S.; Cemazar, M. Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 268. [CrossRef]
41. Moriwaki, T.; Abe, S.; Oshimura, M.; Kazuki, Y. Transchromosomal Technology for Genomically Humanized Animals. *Exp. Cell Res.* **2020**, *390*, 111914. [CrossRef]
42. Henderson, C.J.; Kapelyukh, Y.; Scheer, N.; Rode, A.; McLaren, A.; MacLeod, A.K.; Lin, D.; Wright, J.; Stanley, L.A.; Wolf, C.R. An Extensively Humanized Mouse Model to Predict Pathways of Drug Disposition and Drug/Drug Interactions, and to Facilitate Design of Clinical Trials. *Drug. Metab. Dispos.* **2019**, *47*, 601–615. [CrossRef]
43. Ueda, O.; Tateishi, H.; Higuchi, Y.; Fujii, E.; Kato, A.; Kawase, Y.; Wada, N.A.; Tachibe, T.; Kakefuda, M.; Goto, C.; et al. Novel Genetically-Humanized Mouse Model Established to Evaluate Efficacy of Therapeutic Agents to Human Interleukin-6 Receptor. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1196. [CrossRef] [PubMed]
44. Fox, A.; Kaur, S.; Li, B.; Panesar, M.; Saha, U.; Davis, C.; Dragoni, I.; Colley, S.; Ritchie, T.; Bevan, S.; et al. Antihyperalgesic Activity of a Novel Nonpeptide Bradykinin B1 Receptor Antagonist in Transgenic Mice Expressing the Human B1 Receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 889–899. [CrossRef] [PubMed]
45. Jackson, I.J.; Budd, P.S.; Keighren, M.; McKie, L. Humanized MC1R Transgenic Mice Reveal Human Specific Receptor Function. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 2341–2348. [CrossRef] [PubMed]
46. Kecskés, A.; Pohóczky, K.; Kecskés, M.; Varga, Z.V.; Kormos, V.; Szőke, É.; Henn-Mike, N.; Fehér, M.; Kun, J.; Gyenesi, A.; et al. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7788. [CrossRef] [PubMed]
47. Mus Musculus Chromosome 3, GRCm39 Reference Primary Assembly C57BL/6J. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM000996.3> (accessed on 2 April 2021).
48. Mus Musculus Chromosome 10, GRCm39 Reference Primary Assembly C57BL/6J. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM001003.3> (accessed on 2 April 2021).
49. Mus Musculus Chromosome X, GRCm39 Reference Primary Assembly C57BL/6J. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CM001013.3> (accessed on 2 April 2021).
50. Scheer, N.; Snaith, M.; Wolf, C.R.; Seibler, J. Generation and Utility of Genetically Humanized Mouse Models. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 1200–1211. [CrossRef] [PubMed]
51. Davis, J.; Maillet, M.; Miano, J.M.; Molkentin, J.D. Lost in Transgenesis: A Users Guide for Genetically Manipulating the Mouse in Cardiac Research. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 761–777. [CrossRef]
52. Bryda, E.C.; Pearson, M.; Agca, Y.; Bauer, B.A. Method for Detection and Identification of Multiple Chromosomal Integration Sites in Transgenic Animals Created with Lentivirus. *BioTechniques* **2006**, *41*, 715–719. [CrossRef]
53. Caron, P.; Buscail, L.; Beckers, A.; Estève, J.-P.; Igout, A.; Hennen, G.; Susini, C. Expression of Somatostatin Receptor SST4 in Human Placenta and Absence of Octreotide Effect on Human Placental Growth Hormone Concentration during Pregnancy1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 3771–3776. [CrossRef]
54. Møller, L.N.; Stidsen, C.E.; Hartmann, B.; Holst, J.J. Somatostatin Receptors. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2003**, *1616*, 1–84. [CrossRef]
55. Schwabe, W.; Brennan, M.B.; Hochgeschwender, U. Isolation and Characterization of the Mouse (Mus Musculus) Somatostatin Receptor Type-4-Encoding Gene (MSSTR4). *Gene* **1996**, *168*, 233–235. [CrossRef]
56. Regard, J.B.; Sato, I.T.; Coughlin, S.R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell* **2008**, *135*, 561–571. [CrossRef] [PubMed]

57. SSTR4 Protein Expression Summary—The Human Protein Atlas. Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000132671-SSTR4> (accessed on 21 January 2021).
58. Sstr4 MGI Mouse Gene Detail—MGI:105372—Somatostatin Receptor 4. Available online: <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:105372> (accessed on 21 January 2021).
59. Sstr4 RT-PCR Gene Expression Assay—GXD. Available online: <http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:1204215> (accessed on 21 January 2021).
60. Sstr4 RT-PCR Gene Expression Assay—GXD. Available online: <http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:1204217> (accessed on 21 January 2021).
61. Sstr4 RT-PCR Gene Expression Assay—GXD. Available online: <http://www.informatics.jax.org/assay/MGI:1204442> (accessed on 21 January 2021).
62. Teschendorf, C.; Warrington, K.H.; Siemann, D.W.; Muzyczka, N. Comparison of the EF-1 Alpha and the CMV Promoter for Engineering Stable Tumor Cell Lines Using Recombinant Adeno-Associated Virus. *Anticancer. Res.* **2002**, *22*, 3325–3330. [[PubMed](#)]
63. Shaner, N.C.; Campbell, R.E.; Steinbach, P.A.; Giepmans, B.N.G.; Palmer, A.E.; Tsien, R.Y. Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from *Discosoma* Sp. Red Fluorescent Protein. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567–1572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lauf, U.; Lopez, P.; Falk, M.M. Expression of Fluorescently Tagged Connexins: A Novel Approach to Rescue Function of Oligomeric DsRed-Tagged Proteins1. *FEBS Lett.* **2001**, *498*, 11–15. [[CrossRef](#)]
65. Palmer, E.; Freeman, T. Investigation Into the Use of C- and N-Terminal GFP Fusion Proteins for Subcellular Localization Studies Using Reverse Transfection Microarrays. *Comp. Funct. Genom.* **2004**, *5*, 342–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Nocera, S.; Simon, A.; Fiquet, O.; Chen, Y.; Gascuel, J.; Datiche, F.; Schneider, N.; Epelbaum, J.; Viollet, C. Somatostatin Serves a Modulatory Role in the Mouse Olfactory Bulb: Neuroanatomical and Behavioral Evidence. *Front. Behav. Neurosci.* **2019**, *13*, 61. [[CrossRef](#)]
67. Homo Sapiens Somatostatin Receptor 4 (SSTR4), MRNA. Available online: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001052.2 (accessed on 2 April 2021).
68. Paxinos, G.; Franklin, K. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th ed; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; ISBN 978-0-12-816157-9.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Miriam M. Cortese-Krott,
Heinrich Heine University of Düsseldorf,
Germany

REVIEWED BY

Alexandre Denadai-Souza,
KU Leuven, Belgium
Janaine Prata de Oliveira,
KU Leuven, Belgium, in collaboration with
reviewer AD-S
Grigori Rychkov,
University of Adelaide, Australia
Dayana Benchoam,
Universidad de la República, Uruguay

*CORRESPONDENCE

Balázs Nemes,
✉ balazs.nemes@aok.pte.hu,
Zoltán Sándor,
✉ zoltan.sandor@aok.pte.hu

[†]These authors have contributed equally
to this work and share last authorship

RECEIVED 06 March 2023

ACCEPTED 22 May 2023

PUBLISHED 07 June 2023

CITATION

Nemes B, László S, Zsidó BZ, Hetényi C,
Feher A, Papp F, Varga Z, Szóke É,
Sándor Z and Pintér E (2023), Elucidation
of the binding mode of organic
polysulfides on the
human TRPA1 receptor.
Front. Physiol. 14:1180896.
doi: 10.3389/fphys.2023.1180896

COPYRIGHT

© 2023 Nemes, László, Zsidó, Hetényi,
Feher, Papp, Varga, Szóke, Sándor and
Pintér. This is an open-access article
distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s)
and the copyright owner(s) are credited
and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Elucidation of the binding mode of organic polysulfides on the human TRPA1 receptor

Balázs Nemes^{1*}, Szabolcs László^{1,2}, Balázs Zoltán Zsidó¹,
Csaba Hetényi¹, Adam Feher³, Ferenc Papp³, Zoltan Varga³,
Éva Szóke¹, Zoltán Sándor^{1*†} and Erika Pintér^{1†}

¹Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary,

²Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology and Biotechnology, Budapest University of Technology and Economics, Budapest, Hungary, ³Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Introduction: Previous studies have established that endogenous inorganic polysulfides have significant biological actions activating the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor. Organic polysulfides exert similar effects, but they are much more stable molecules, therefore these compounds are more suitable as drugs. In this study, we aimed to better understand the mechanism of action of organic polysulfides by identification of their binding site on the TRPA1 receptor.

Methods: Polysulfides can readily interact with the thiol side chain of the cysteine residues of the protein. To investigate their role in the TRPA1 activation, we replaced several cysteine residues by alanine via site-directed mutagenesis. We searched for TRPA1 mutant variants with decreased or lost activating effect of the polysulfides, but with other functions remaining intact (such as the effects of non-electrophilic agonists and antagonists). The binding properties of the mutant receptors were analyzed by *in silico* molecular docking. Functional changes were tested by *in vitro* methods: calcium sensitive fluorescent flow cytometry, whole-cell patch-clamp and radioactive calcium-45 liquid scintillation counting.

Results: The cysteines forming the conventional binding site of electrophilic agonists, namely C621, C641 and C665 also bind the organic polysulfides, with the key role of C621. However, only their combined mutation abolished completely the organic polysulfide-induced activation of the receptor.

Discussion: Since previous papers provided evidence that organic polysulfides exert analgesic and anti-inflammatory actions in different *in vivo* animal models, we anticipate that the development of TRPA1-targeted, organic polysulfide-based drugs will be promoted by this identification of the binding site.

KEYWORDS

human TRPA1, site-directed mutagenesis, DMTS, DATS, DADS, binding site, organic polysulfide, electrophilic TRPA1 agonist

1 Introduction

Chronic pain and persistent inflammation are major problems in the modern population (Mha et al., 2008; Apkarian et al., 2009; Harden et al., 2010; Nathan and Ding, 2010). Chronic pain is a direct cause of diminishing quality of life or even loss of body functions (Niv and Kreitler, 2001; Keeley et al., 2008; Helyes et al., 2019; Raja et al., 2020). Persistent inflammation without pain sensation may stay latent, but can contribute to a wide variety of other chronic diseases, such as type II diabetes, allergies, cardiovascular diseases, and several types of cancer (Medzhitov, 2021; Pahwa et al., 2021; Nathan, 2022). Conventional analgesic and anti-inflammatory drugs, such as steroids, NSAIDs, and opioids are, commonly unsuitable for long-term treatments because of their gradually overwhelming adverse effects (Alarcón, 2000; Schett and Gravallese, 2012; Schuelert and McDougall, 2012; Horváth et al., 2016; Cavalli et al., 2019). Therefore, there is a great demand for new drugs against chronic pain and persistent inflammation. Polysulfides could be promising drug candidates and became increasingly well-studied compounds in pharmacological research. Formerly, the gaseous regulator hydrogen sulfide (H₂S) was thought to have analgesic and anti-inflammatory effects. Now, it is well-understood that H₂S released in the location of inflammation is spontaneously oxidized into sodium hydrosulfide (NaSH) and sodium sulfide (Na₂S) and polymerized into inorganic polysulfides (e.g. Na₂S₃). These compounds are reactive enough to bind covalently to the cysteine residues of the transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor and activate it (Ogawa et al., 2012; Hatakeyama et al., 2015; Pozsgai et al., 2017; Bártai et al., 2019).

TRPA1 is a non-selective cation channel sensing a wide variety of irritations such as mechanical stimuli, extreme heat and cold, acids, reactive oxidative species, and thousands of identified agonists (Liu et al., 2021). TRPA1 is mainly expressed in the capsaicin-sensitive peptidergic nociceptive primary sensory neurons; therefore, receptor activation leads to local acute pain and to the secretion of pro-inflammatory neuropeptides (e.g., substance P and calcitonin gene-related peptide), which contribute to neurogenic inflammation by prompting vasodilation and plasma leakage. However, as a counter-regulation, these peptidergic neurons also release analgesic and anti-inflammatory neuropeptides such as somatostatin upon TRPA1 activation (Kun et al., 2014; Zygmunt and Högestätt, 2014; Pozsgai et al., 2017; Dombi et al., 2021). Somatostatin has systemic analgesic and anti-inflammatory effects mediated by the SST₄ receptor (Matsuoka et al., 1994; Helyes et al., 2006; 2009; Sándor et al., 2006; Qiu et al., 2008; Markovics et al., 2012; Pintér et al., 2014; Scheich et al., 2016; 2017; Nemes et al., 2021). Gene knockout in mice of either *Trpa1* or *Sstr4* significantly attenuates these effects of polysulfides (Pozsgai et al., 2017). Based on the previous data listed previously, we assume that polysulfides exert their anti-inflammatory and pain-relieving effects, at least in part, through the activation of the TRPA1 receptor.

Despite the advantageous effects of inorganic polysulfides, they are highly unstable molecules; therefore, their delivery to the target cells or endogenous synthesis from added H₂S donors is extremely challenging, which makes them unsuitable as drugs. So, our attention turned to the much more stable organic polysulfides such as dimethyl trisulfide (DMTS), diallyl disulfide (DADS), and diallyl trisulfide (DATS), which have similar biological effects (Bai

et al., 2005; Bautista et al., 2005; Koizumi et al., 2009; Lee et al., 2013; Pozsgai et al., 2017; Bártai et al., 2018; Dombi et al., 2021).

Although the molecular mechanism of action of inorganic polysulfides has been better studied, little is known about organic polysulfides. In the first step, we aimed to identify the binding site of organic polysulfides on the TRPA1 receptor via site-directed mutagenesis. Therefore, out of the 28 cysteine residues in the human TRPA1, we investigated those within the conventional binding site of electrophilic agonists on the N-terminal domain (C621, C641, and C665) (Hinman et al., 2006; Deering-Rice et al., 2011; Eberhardt et al., 2012; Shapiro et al., 2013) and the theoretical binding site of the strongly hydrophobic agonists in the transmembrane domains (C727 and C834) (Figure 1) (Paulsen et al., 2015; Alvarado et al., 2021). We created mutant TRPA1 variants, which lost the sensitivity to the tested organic polysulfides, but their other functions remained intact (e.g., sensitivity to non-electrophilic agonists and antagonists). The binding properties were calculated *in silico*, and the receptor functions were tested *in vitro* by calcium-sensitive fluorescent flow cytometry, radioactive calcium-45 liquid scintillation counting, and whole-cell patch clamp.

2 Materials and methods

2.1 Computational docking of DMTS, DADS, and DATS

Dimethyl trisulfide (DMTS), diallyl disulfide (DADS), and diallyl trisulfide (DATS) were prepared by the Sketcher 2D tool of FITTED, and the CONVERT tool performed the conversion into a mol2 file. The ligands were further prepared by the SMART tool of FITTED (Corbeil et al., 2007; Therrien et al., 2012; Pottel et al., 2014). The torsion around all rotatable bonds was allowed, AMBER (Wang et al., 2004) atom types were assigned, and Gasteiger-Hückel (Gasteiger and Marsili, 1980) partial charges were added. The same ligands were prepared for AutoDock (RRID:SCR_012746 (Morris et al., 1998)) calculations, as described before (Mohos et al., 2020a; 2020b; Zsidó et al., 2020; Fliszár-Nyúl et al., 2021); briefly, the structures were built by Maestro (Schrödinger, 2022), energy was minimized by OpenBabel (RRID: SCR_014920), and Gasteiger-Marsili partial charges were added with OpenBabel (O'Boyle et al., 2011).

The atomic coordinate file of the ligand-free TRPA1 receptor was obtained from the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB, RRID: SCR_006555 (Berman et al., 2002)), under the accession code 6V9W (Zhao et al., 2020). As the four chains of the target are symmetrical (homotetramer), only one chain was used to reduce computational costs. The amino acids of a chain do not interfere with the binding of the ligand to another chain. The missing atoms and residues were rebuilt using SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), and energy was minimized with GROMACS (Van Der Spoel et al., 2005). The convergence threshold of the steepest descent optimization was set to 103 kJ mol⁻¹ nm⁻¹, and that of the conjugate gradient optimization to 10 kJ mol⁻¹ nm⁻¹. The AMBER99SB-ILDN force field (Wang et al., 2004) was used for calculation, and a position restraint at a force constant of 103 kJ mol⁻¹ nm⁻² was applied on heavy atoms. The same preparation process was carried out for the mutant (C621S) receptor, accessible under the PDB code 6PQQ (Suo et al., 2020), and the holo

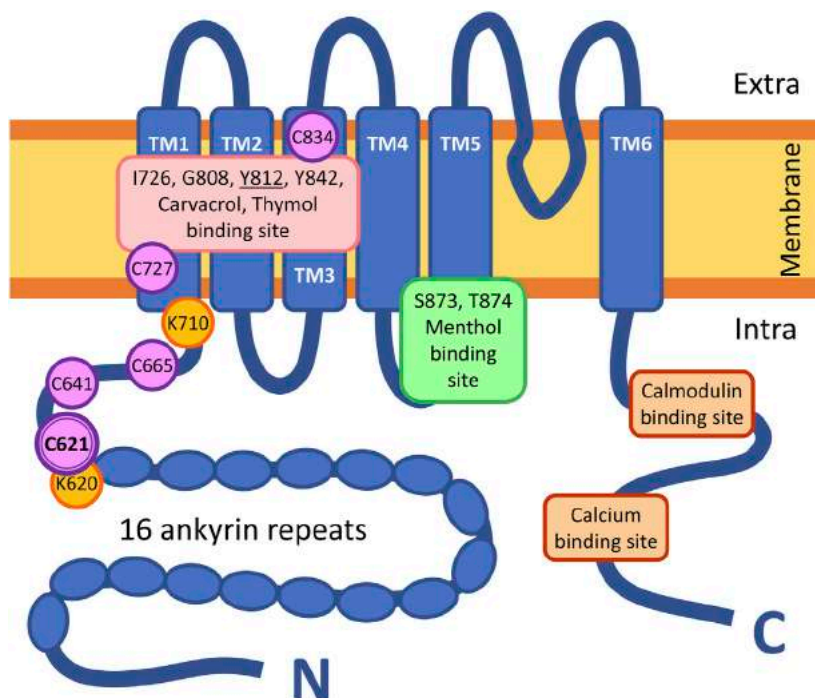


FIGURE 1

Structure of a subunit of the homotetrameric TRPA1 receptor. TM = transmembrane domain; intra = intracellular space; extra = extracellular space; N = N-terminus of the peptide, C = C-terminus of the peptide. Symbols of the highlighted amino acids: C = cysteine; G = glutamine; I = isoleucine; K = lysine; S = serine; T = threonine; Y = tyrosine.

(6PQP) receptor. The holo receptor contains benzyl isothiocyanate (BITC) covalently bound to the C621 amino acid, BITC was removed, and the hydrogen atom was restored on the target side before calculations. The targets were further optimized by the ProCESS tool of FITTED, with the original settings (Corbeil et al., 2007). In the case of AutoDock, the added H atoms and partial charges were kept from energy minimization. The mutation of the 6PQQ apo receptor S621A was performed by PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, 2022).

Covalent docking calculations were carried out using FITTED. The covalent residue (C621 or S621) and adjacent basic residue (P622) were adjusted in the graphical user interface of the program. Root mean square deviation (RMSD) values were calculated between the crystallographic and representative ligand conformations, if available. All other settings were used as the default of the program. Ten docking runs were performed for all ligands, and the resulting ligand conformations were ranked based on their calculated free energy of binding (ΔG_{calc}) values.

2.2 Organic polysulfide synthesis

2.2.1 Chemicals

Dimethyl trisulfide, sulfur, sodium sulfide, ammonium hydroxide, ethanol, and activated charcoal were purchased from Reanal, Hungary. Cysteine (168149), tetrabutyl ammonium iodide (140775), and allyl bromide (337528) were purchased from Sigma-Aldrich.

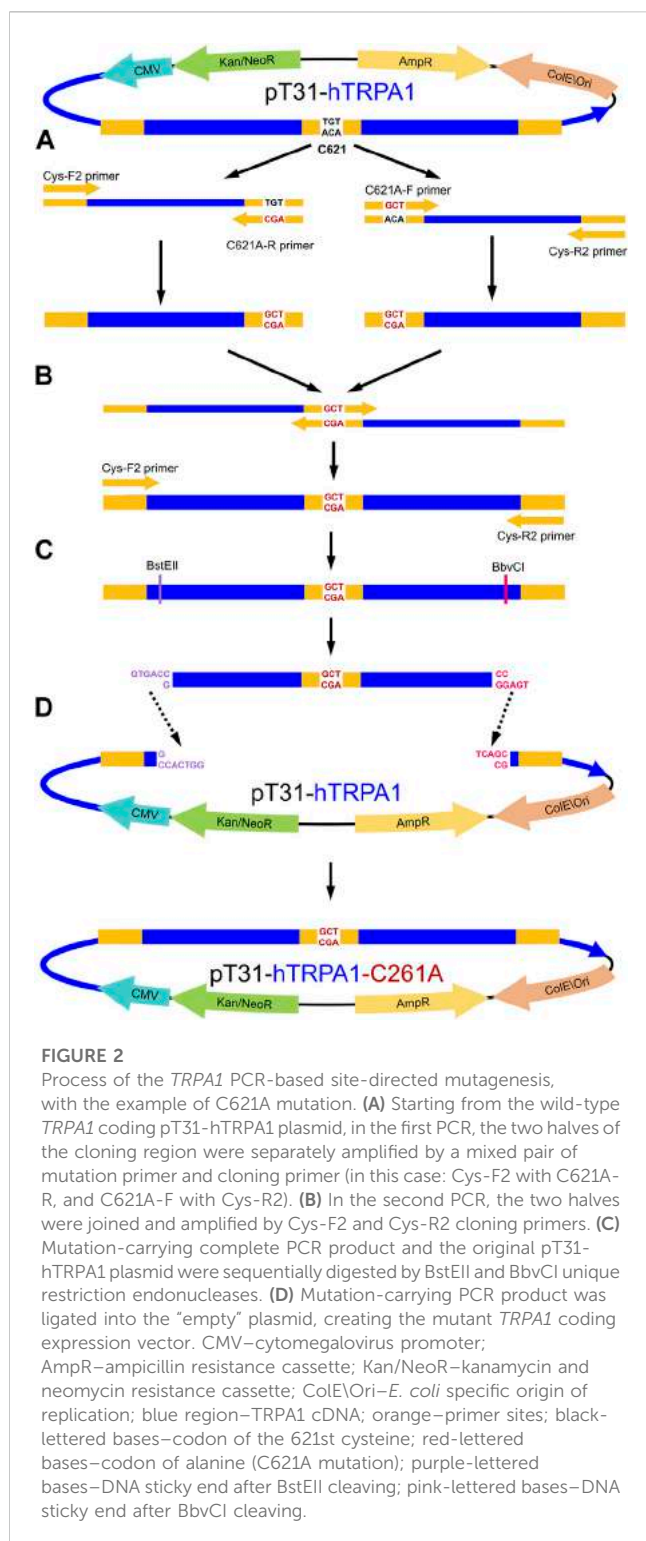
All reagents and materials were used without purification.

2.2.2 Instruments

For the synthesis of the two sulfides we prepared, we used a modified version of the method found in the literature (Yuan et al., 2006). In our reaction, by using a more efficient phase transfer catalyst than the published one, the reaction could be carried out in a more energy-efficient way and with simpler tools, while maintaining the original production and purity. Infrared spectra were recorded on a PerkinElmer Spectrum Two Fourier-transform infrared spectrometer (FTIR) with a universal attenuated total reflectance accessory (UATR) head. Mass spectra (MS) and the analysis of the product compounds were obtained by a GC/MS QP-2010 spectrometer (EI, 70 eV). The capillary column used was ZB5-MSI, 30 m in length and 0.25 mm in diameter. The conditions were as follows: column temperature was set at 80°C and then increased to 250°C; helium was used as carrier gas at a linear flow of 1 ml/min.

2.2.3 Diallyl disulfide and diallyl trisulfide

Both compounds were prepared by a modified version of the method published by Yuan et al. (2006). In the first step, sodium disulfide and sodium trisulfide solutions were prepared by sulfur and sodium sulfide as follows: for diallyl disulfide: 6.4 g (0.2 mol) sulfur and 48 g (0.2 mol) sodium sulfide, and for diallyl trisulfide: 6.4 g (0.2 mol) sulfur and 24 g (0.1 mol) sodium sulfide, and the solution was dissolved in 100 ml distilled water in a round-bottom flask. The solutions were stirred at RT for 1 day and then filtrated using a paper



filter. About 0.3 g tetrabutyl-ammonium iodide was added to the brownish red solutions as a phase transfer catalyst. For diallyl disulfide and diallyl trisulfide, 36.3 g (0.3 mol) allyl bromide and 18.2 g (0.15 mol) allyl bromide were added dropwise in 20 min, respectively, and the temperature of the reaction mixture was increased. After addition, the reaction mixtures were cooled with ice. The resulting mixtures were extracted with 300 ml ether. The

organic phase was dried over anhydrous $MgSO_4$ overnight. The organic phase was placed on a rotary evaporator under aspirator pressure to eliminate the solvent. Then, the residual phase was distilled in low vacuum.

Diallyl disulfide: the fraction at 45°C–60°C and 0.8 torr. was obtained. In addition, 25.8 g diallyl disulfide oil with light yellow color and intensive garlic smell was obtained with the yield of 88%, purity (GC-MS): 90% (Supplementary Figure S1).

The functional group was identified by FT-IR (UATR, cm^{-1}): 3,081 (=C-H); 3,009 (-CH₂); 2,979 (-CH₂); 1,634 (C=C); 1,422 (C-S). (Supplementary Figure S2).

Diallyl trisulfide: the fraction at 90°C–110°C and 1.0 torr. was obtained. In addition, 5.1 g diallyl trisulfide oil with yellow color and intensive garlic smell was obtained with the yield of 37%, purity (GC-MS): 63.5% (Supplementary Figure S3).

The functional group was identified by FT-IR (UATR, cm^{-1}): 3,081 (=C-H); 3,009 (-CH₂); 2,979 (-CH₂); 1,634 (C=C); 1,422 (C-S). (Supplementary Figure S4).

The impurity of DADS was DATS, and the impurity of DATS was DADS. No other contaminant was found in either compound. The difference in retention times for GC-MS measurements is due to instrument maintenance between the two measurements (Supplementary Figures S1, 3).

2.3 Site-directed mutagenesis via PCR

Our research group has already created an expression vector containing the wild-type human *TRPA1* cDNA, which is now called pT31-hTRPA1, and its creation was described by Pozsgai et al. (2017). This plasmid contains the *TRPA1* coding sequence within a Sleeping Beauty 100 transposon, flanked by a cytomegalovirus (CMV) promoter at the 5' end and the bovine growth hormone polyA at the 3' end. Selective markers were ampicillin, kanamycin/neomycin, and geneticin (G418) resistance genes. Although this vector was originally prepared for integrating the transgene into the chromosome of the CHO cells, we only used it for transient transfection, without the SB100 transposase enzyme.

The single mutant *TRPA1* variants were created in two consecutive PCR reactions (Supplementary Tables S1A, B). TAdvanced Twin (Analytik Jena 846-2-070-2xx) PCR machine and Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs M0493) were used for all PCR reactions, following the manufacturer's manuals. All primers were designed by Primer-BLAST (RRID: SCR_003095 (Ye et al., 2012)) and Integrated DNA Technologies (IDT) OligoAnalyzer Tool (RRID:SCR_001363 (Owczarzy et al., 2008)), synthesized by IDT. Mutation-carrying primers were designed for each codon of the targeted amino acids (C621, C641, C665, C727, and C834), both in forward and reverse orientation (Supplementary Table S2). Terminal primers CysF2 and CysR2 (Supplementary Table S2) were designed to include unique restriction endonuclease cutting sites (BstEII near the 5' end and BbvCI near the 3' end) in the PCR product. In the first PCR (Supplementary Table S1A), the mutation-carrying primers were paired with their opposing terminal primer, each orientation in a separate reaction (e.g., CysF2 and C621A-R; C621A-F and CysR2) creating two halves of the intended final mutation-carrying PCR product (Figure 2A). These halves were combined in the second

PCR by the terminal primers (Figure 2B; Supplementary Table S1B). The final PCR products and intact pT31-hTRPA1 plasmid were digested by BstEII-HF (New England Biolabs R3162) and BbvCI (New England Biolabs R0601) enzymes (Figure 2C), then isolated by agarose gel electrophoresis, and extracted by NucleoSpin DNA Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel 740609.50). The vector fragment without the intact TRPA1 coding fragment (8,192 bp) and the new mutation-carrying fragment (1,461 bp) were ligated by T4 DNA ligase (New England Biolabs M0202L) (Figure 2D).

Double- and triple-mutant TRPA1 variants were created the same way, except they were produced from single- and double-mutant pT31-hTRPA1 variants, respectively, rather than from the WT. All TRPA1 mutant variants were examined by Cys-F and Cys-R sequencing primers in Sanger sequencing (Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Hungary) for carrying the intended mutations but lacking any unintended mutation.

2.4 Plasmid amplification in *E. coli*

Chemically competent DH5a *E. coli* cells were prepared by the calcium chloride method (Chang et al., 2017). About 10 µl ligated vector was added to 100 µl competent cells, and then the cells were incubated for 30 min on ice. The cells were transformed by heat-shock (42 °C for 60 s), then 1 ml LB medium was added, and the cells were incubated at 37 °C for 1 h. Then, 200 µl cells was spread on 100 µg/ml ampicillin (Amp) selective LB-agar plates and incubated at 37 °C overnight. The grown colonies were streaked on new Amp plates (max. six colonies per TRPA1 mutant variant) and incubated at 37 °C overnight. One colony of each cell line was transferred to 1 ml 100 µg/ml ampicillin selective LB medium and incubated with continuous shaking at 200 rpm at 37 °C overnight. The plasmids were isolated by the GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific K0503). The plasmid concentration was measured by the Jenway 7310 UV/Vis spectrophotometer. First, the plasmids were tested by a diagnostic digest by SpeI (R0133), PvuI (R0150), PstI (R0140), and EcoRI (R0101) DNA restriction endonucleases from New England Biolabs. Second, intact plasmids were tested by Sanger sequencing (Bioinformatical Research Group, Szentágothai Research Centre, University of Pécs) using the CysF and CysR primers (Supplementary Table S2). The raw sequencing data were analyzed by the ApE A plasmid Editor (RRID: SCR_014266) and Nucleotide-BLAST (NIH, NCBI RRID: SCR_001598) and compared to those of the TRPA1 WT in pT31-hTRPA1 plasmid. Only those plasmids were suitable and used for later research, which contained only the intended mutation. These selected plasmids were amplified by transferring the carrying bacterium cells from the streaking plate to 200 ml and 100 µg/ml ampicillin selective LB medium, and these cells were incubated with continuous shaking at 200 rpm at 37 °C overnight. A high amount of plasmid DNA was isolated by the NucleoBond Xtra Maxi Plus EF Kit (Macherey-Nagel 740426.50), and their concentration was measured by the Jenway 7310 UV/Vis spectrophotometer. The final concentration of each plasmid was set to 250 ng/µl.

2.5 CHO transfection

The Chinese hamster ovary (CHO, RRID: CVCL_0213) cells were transfected by TurboFect (Thermo Fisher Scientific R0532). Regarding the TurboFect–DNA–medium ratio, some alterations from the manufacturer's recommendation were needed to achieve an optimal transfection rate. The empirical data showed best results with 10 µl TurboFect and 10 µl plasmid (2.5 µg DNA) for 1 ml CHO cells at 50% confluency in a 24-well plate (~100,000 cells per well) instead of 2 µl TurboFect and 1 µg plasmid recommended by the manufacturer. TurboFect and the plasmid were mixed in 90 µl Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific 31985062) and were incubated at room temperature (RT) for 30 min before adding to 1 ml CHO cells. The CHO cells were incubated at 37 °C for 24 h before the experiment. Since this method is a transient transfection, the TRPA1 expression was drastically decreased after 48 h, and the cells became unsuitable for experimentation.

The expression of TRPA1 variants was tested by immunohistochemistry, using polyclonal anti-human TRPA1 rabbit IgG primary antibody (Thermo Fisher OST00061W, RRID: AB_2207890) and peroxidase-linked polyclonal anti-rabbit IgG goat IgG secondary antibody (Thermo Fisher Scientific 31460, RRID: AB_228341), and stained by the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich D7304). Non-transfected CHO cells were used as negative control. The resulting microscopic images were measured by pixel darkness analysis. Immunohistochemistry showed no inhibition in the TRPA1 expression due to the mutations (data not shown).

2.6. Fluo-4 flow cytometry

In total, 1 ml (~100,000 cells) of each transfected CHO cell line was stained by 4 µl Invitrogen Fluo-4, AM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific F14201) cell permeant calcium indicator fluorescent dye at 37 °C for 1 h in non-adhesive tubes. For each sample condition, 100 µl of CHO cells was transferred to a fresh tube and 900 µl reagent was added. The reagents were organic polysulfides (DMTS, 90% DADS, 63.5% DATS), other electrophilic agonists (allyl isothiocyanate (AITC) and cinnamaldehyde, JT010), non-electrophilic agonists (carvacrol, menthol, and thymol), and antagonists (HC-030031 and A-967079). The vehicle and control solutions were the extracellular solution (ECS) buffer containing 1 mM CaCl₂. The final concentration of reagents was mostly 100 µM, except for the much more competent JT010, which needed to be used always in 1,000 x dilution compared to other agonists (usually in 100 nM).

Right after adding the agonist, each sample was measured for green fluorescence (excitation: 488 nm, emission: 516 nm, filter: 527/30) by the CyFlow Space Flow Cytometer (Sysmex Partec, Germany). The results were analyzed by FloMax (RRID: SCR_014437) and GraphPad Prism 8 (RRID: SCR_002798) software. The data were analyzed by the following equation:

$$\text{relative TRPA1 activating effect} = \frac{I_{\text{electrophilic agonist}} - I_{\text{control}}}{I_{\text{Carvacrol}} - I_{\text{control}}}$$

where I is the average fluorescence (512–542 nm) intensity of the cells per sample. Electrophilic agonists were the DMTS, 63.5% DATS, 90% DADS, AITC, and JT010. ECS buffer was the control.

2.7 Radioactive calcium-45 uptake experiments in CHO cells expressing mutant TRPA1 receptor variants

Transiently transfected CHO cells expressing TRPA1 WT, C621A, C641A, C665A, and C621A/C641A/C665A mutants were grown to approximately 70% confluency in a 24-well plate, then digested in trypsin for 5 min, and suspended in 300 μ l complete DMEM per well. The suspended cells were transferred to 72-well microbatch plates (15 μ l suspended cells per well) and incubated overnight to adhere properly to the bottom of the well. The following day, the cells were washed five times with calcium-free Hank's solution (pH 7.4) and incubated in 10 μ l of the same buffer containing 200 μ Ci/ml 45 Ca isotope (1.3 Ci/mmol, PerkinElmer NEZ013001MC) and 100 μ M of either carvacrol (Sigma-Aldrich 282197), AITC (Sigma-Aldrich 377430), DMTS (Sigma-Aldrich W327506), 63.5% DATS, or 90% DADS (and control sample without the TRPA1 agonist) for 2 min at room temperature. After washing five times with ice-cold ECS, the residual buffer was evaporated in 10 min at 37°C. Then, the retained isotope in the cells was collected in 15 μ l of 0.1% SDS, and the radioactivity was measured in 2 ml Ultima Gold XR scintillation liquid (Packard BioScience 6013119) in a Packard Tri-Carb 2800 TR scintillation counter. The data were analyzed by the following equation:

$$\text{relative TRPA1 activating effect} = \frac{\text{CPM}_{\text{electrophilic agonist}} - \text{CPM}_{\text{control}}}{\text{CPM}_{\text{Carvacrol}} - \text{CPM}_{\text{control}}},$$

where CPM means “count per minute”, the number of radioactive decays per sample measured during 2 min and averaged for 1 min. The electrophilic agonists were the DMTS, 63.5% DATS, 90% DADS, and AITC. The calcium-free Hank's solution was the control.

2.8 Whole-cell patch clamp

Whole-cell currents of voltage-clamped cells were recorded through manual patch-clamp electrophysiology according to standard protocols using Axopatch 200B amplifiers connected to a computer and digitized with Digidata 1550B (Molecular Devices, San Jose, CA, United States). Data were acquired with pClamp10.7 (Molecular Devices, San Jose, CA, United States). In general, currents were low-pass-filtered using the built-in analog four-pole Bessel filters of the amplifiers and sampled at 5 kHz. Before analysis, whole-cell current traces were digitally filtered (five-point boxcar smoothing). GFP-positive TRPA1 co-transfected CHO (Chinese hamster ovary) cells were identified using a Nikon Eclipse TE2000-U fluorescence microscope (Auro-science LLC, Budapest, Hungary). Pipettes were pulled from GC 150F-15 borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, Holliston, MA, United States) in five stages with 4–10 M Ω resistance. Before the measurement, the cells were maintained in the recording Petri dish in a bath solution that

consisted of 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose, and 10 mM HEPES (pH 7.35; 302–308 mOsmol/kg). For the recordings, the composition of the solution used in the patch pipette (internal solution) was 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, and 2 mM EDTA-Na (Ca²⁺-free solution; pH 7.35; ~300 mOsmol/kg). The composition of the external (control) solution was the same as that of the pipette solution, with the addition of 1 V/V% DMSO as carvacrol was dissolved in DMSO. The solution exchange was achieved by a gravity-driven perfusion system with continuous excess fluid removal. Peak currents were measured every 5 s during 20 m steps at +50 mV after 100-m voltage ramps from 0 mV to +50 mV using a holding potential of 0 mV. To quantify the current activating effect of the activators, if the current increase was detected within 100 s, we waited for its saturation, defined by no further current increase in a 20-s-long period. Only measurements where the positive control agonist (100 μ M carvacrol) and antagonist (50 μ M HC-030031) showed the desired effect were included in the analysis.

2.8.1 Data analysis

Clampfit 10.7 (Molecular Devices, San Jose, CA, United States of America) and GraphPad Prism 7 (Graphpad, San Diego, CA, United States of America) were used for data display and analysis. The current activation ratio was quantified by the following equation:

$$\frac{I_{\text{DMTS}}}{I_{\text{Carvacrol}}} = \frac{I_{\text{DMTS peak}} - I_{\text{control}}}{I_{\text{Carvacrol peak}} - I_{\text{control}}},$$

where I_{DMTS} and $I_{\text{Carvacrol}}$ are the activated TRPA1 currents by DMTS and carvacrol, respectively. The control current (I_{control}) is the peak current measured before the addition of the DMTS, $I_{\text{DMTS peak}}$ is the peak current measured in the presence of 100 μ M DMTS, and $I_{\text{Carvacrol peak}}$ is the peak current measured in the presence of 100 μ M carvacrol, a known activator of TRPA1. This calculation was used for the other polysulfides (90% DADS, 63.5% DATS in 100 μ M) as well.

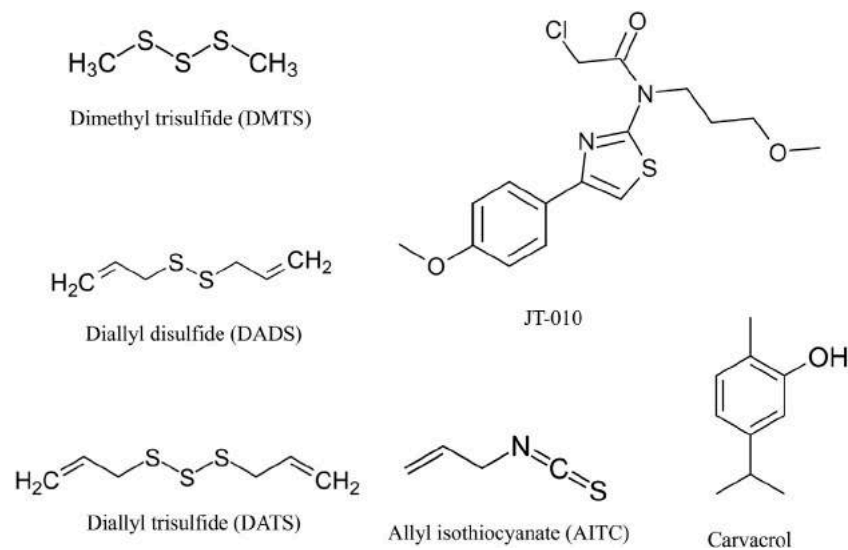
To investigate whether point mutations altered the response to the application of the tested agonists, we used one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-hoc test. Differences were labeled as significant if $p < 0.05$.

3 Results

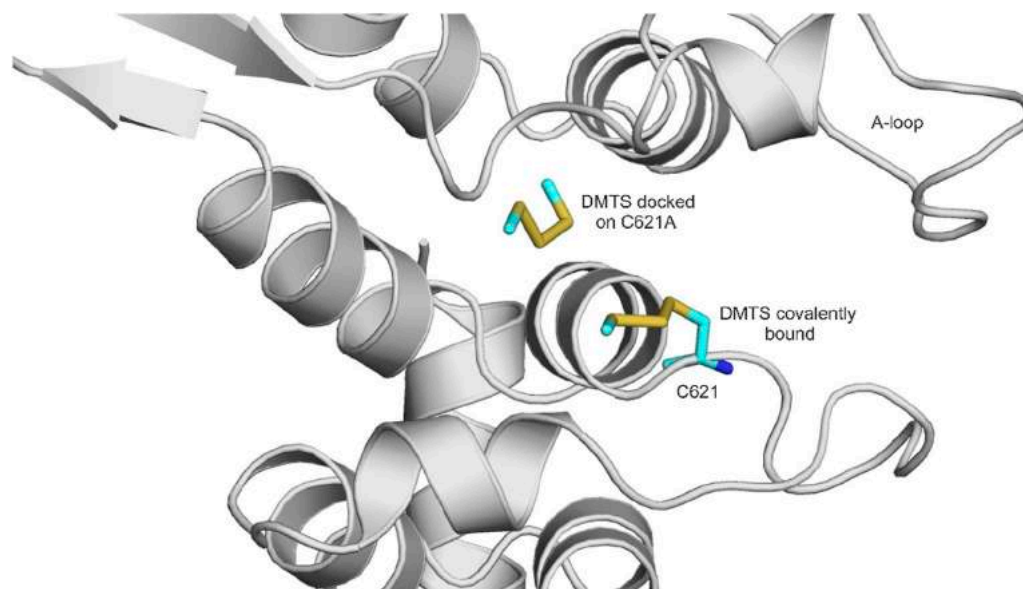
3.1 Computational docking of DMTS, DADS, and DATS

The ligand-binding conformation of DMTS, DADS, and DATS was calculated targeting the ligand-free conformation of the TRPA1 receptor (6V9W) as described in the Methods section. The docking calculations were also performed on two mutant receptors (6PQQ: C621S and a modeled C621A receptor) and the holo receptor (6PQP) to analyze the effect of the mutation on ligand binding at an atomic resolution level.

DMTS, DADS, and DATS are polysulfide compounds (Figure 3) that presumably form a disulfide bond with previously unknown active site cysteine residues of the TRPA1 receptor (Pozsgai et al.,

**FIGURE 3**

Structure of tested TRPA1 agonists. Organic polysulfides, dimethyl trisulfide (DMTS), diallyl trisulfide (DATS), and diallyl disulfide (DADS), are reversible electrophile agonists. JT010 is a very potent and selective irreversible electrophile TRPA1 agonist. Allyl isothiocyanate (AITC) or mustard oil is a potent natural reversible electrophile TRPA1 agonist. Carvacrol is a non-electrophile TRPA1 agonist with different binding sites on TRPA1, and we used it as a control activator. Illustration is made by ChemDraw Direct (RRID: SCR_016768).

**FIGURE 4**

Covalently docked binding position of DMTS to the native holo TRPA1 (attached covalently to C621) and the non-covalently docked binding position of DMTS to the alanine mutant TRPA1 (located further to the left). DMTS is shown as all atom representation sticks (teal). The protein is shown as gray cartoon. A-loop (see Results) is labeled.

2019) (Figure 4), which are important in receptor activation. During ligand binding, an intracellular N-terminal loop (A-loop), defined by amino acid residues 666–680, elicits an upward motion (Zhao et al., 2020; Zsidó et al., 2021). In the present study, we found that in the apo structure, this loop overlays the nucleophilic binding cavity, and the amino acids P666 and F669 play a role in the binding of DMTS, DADS, and DATS. These interactions might play an

important role in the beginning of the upward motion of the A-loop. In the holo structures, the ligands do not interact with the A-loop (Table 1).

Regarding the calculated free energies of binding (ΔG_{calc} , Table 2), it is important to note that from the perspective of receptor activation, only the occurrence of the covalent binding is significant, and not the actual value of binding affinity (Pozsgai

TABLE 1 Interacting amino acids in the binding of DMTS to the binding site cysteines and to the alanine mutant receptor. Amino acids within 3.5 Å distance are included.

	C621	C621A	C641	C665
L609	X	X		
F612	X			
K620	X			
C621	X			
P622	X			
I623	X	X		
T624	X			
L638			X	
D639			X	
F640			X	
C641			X	
M642			X	
L643			X	
N659			X	
K661		X	X	
Y662		X	X	X
L663		X		
Q664		X		X
C665				X
P666				X
T684				X

TABLE 2 Covalent docking of DMTS, DADS, and DATS with FITTED to the three cysteines forming the nucleophilic binding cavity in the intracellular TRPA1 (6pqp holo structure) agonist binding site. Non-covalent docking of the same ligand to the C621A mutant receptor. All calculated binding free energy values are in kcal/mol.

	C621	C641	C665	C621A
DMTS	-44.51	-47.01	-44.56	-34.59
DADS	-44.82	-46.01	-44.63	-38.93
DATS	-49.83	-49.86	-52.22	-46.02

et al., 2019). Furthermore, as the closed (ligand-free) conformation of TRPA1 is not appropriate for ligand binding, the prerequisite binding position of DMTS and DATS is far from the S atom of C621 (Supplementary Table S3), and the molecules have to find their way under the A-loop to reach their covalent binding positions. The ΔG_{calc} of all three compounds similarly reflects strong binding to the different cysteine residues (Table 2), with DATS having the largest negative values due to its larger size. As it was expected, a considerable decrease of ΔG_{calc} can be observed in the case of the C621A mutant due to the missing covalent bond (Table 2), if compared with the wild-type holo and the apo receptors (Table 2; Supplementary Table S4). Furthermore, the interaction

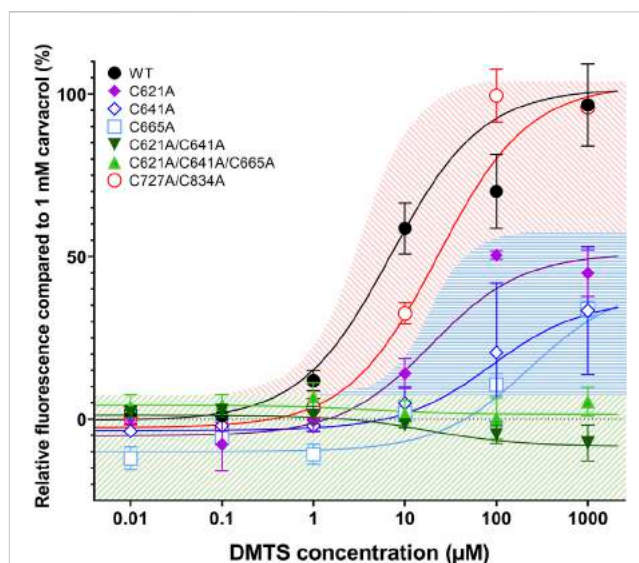


FIGURE 5

DMTS dose-effect curves in TRPA1 mutant variants, compared to the effect of 1 mM carvacrol. Fluo-4 calcium-sensitive fluorescence was measured by flow cytometry in different TRPA1 variants, using increasing DMTS concentration, compared to the fluorescent signal of 1 mM carvacrol (100%). The single mutation of C621, C641, and C834 decreased the effect of DMTS in TRPA1, but C621A/C641A double mutant and C621A/C641A/C665A triple mutant showed insensitivity to DMTS, indicating that these amino acids are involved in the binding site of the organic polysulfides. The combined double mutation of C727 and C834 (C727A/C834A) made no significant difference from the wild-type TRPA1, suggesting that they are not parts of the binding site of the organic polysulfides. Mean \pm SEM, N = 2-4 (number of measurements per TRPA1 variation), n > 10000 (number of cells per measurement).

list in Table 1 reflects that in the case of C621A, and DMTS occupies a binding pocket far from C621. At the same time, approaching C641 and C665 (common interacting residues in Table 1) shows the possibility of the interaction between the DMTS and these cysteines, if C621 is not available for covalent bonding.

3.2 The changes in TRPA1 function due to the mutations

Since the TRPA1 receptor is a non-selective cation channel, its activity is trackable by the intracellular Ca^{2+} concentration changes. For this purpose, we used the Fluo-4 calcium-sensitive fluorescent flow cytometry and radioactive Ca-45 liquid scintillation counting. The whole-cell patch clamp was used to measure the agonist-activated cation current. For most measurement, we used each agonist in 100 μM concentration: organic polysulfides DMTS, DADS, and DATS; AITC and carvacrol; except JT010, which is much more potent than the others, and it was used in 100 nM concentration (Figure 2). The purity of the factory-made DMTS was $\geq 98\%$. The purity of our own synthesized DADS was 90% with 10% DATS, and the purity of DATS was 63.5%, with 36.5% DADS as a contaminant. No other contaminant was found in either synthesized compound; only these two compounds, which are chemically and physically very similar and are also contaminants

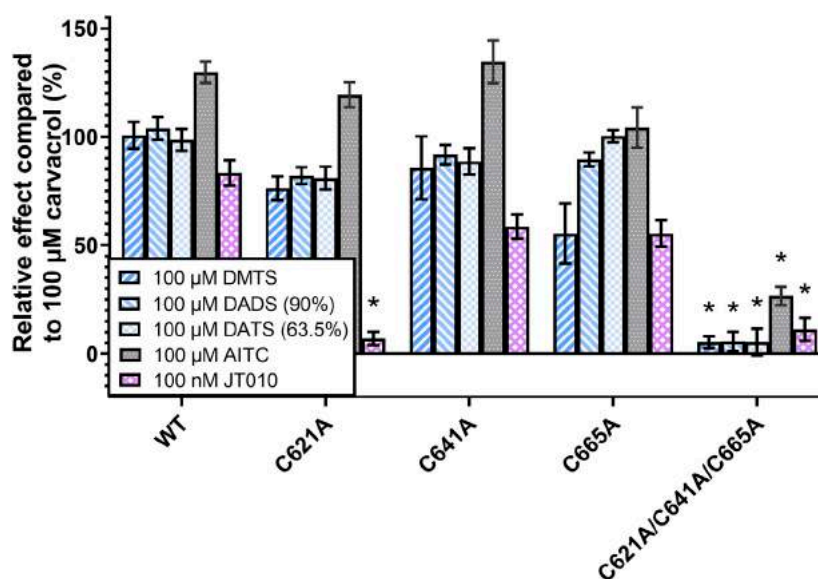


FIGURE 6

TRPA1 activity measured by calcium-sensitive fluorescence flow cytometry. The different TRPA1 variant-expressing CHO cells were stained by Fluo-4 calcium-sensitive fluorophore. TRPA1 activation causes calcium influx, and therefore increases the intensity of fluorescence, which was measured by flow cytometry. The signal intensity was compared to the effect of 100 μ M carvacrol, which was used as a non-electrophilic control agonist. Relatively high concentration (100 μ M) of organic polysulfides (DMTS, 90% DADS and 63.5% DATS) showed only slight changes in their receptor-activating effect in the case of TRPA1 single mutants (C621A, C641A, and C665A), but their effect was completely eliminated in the triple-mutant TRPA1 variant (C621A/C641A/C665A). The effect of JT010 was eliminated even in the C621A single mutant, and the other two single mutants also showed a tendency for decreased JT010 sensitivity. Diagram shows the means \pm SEM, two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, significance compared to WT TRPA1: * $p < 0.0001$, WT TRPA1 replication experiments ($N = 4-12$), mutant TRPA1 replication experiments ($N = 2-5$), sample size ($n = 4-19$), cell number per sample ($n > 2000$).

in their natural source, garlic oil, were found. The purity of DADS and DATS was measured by GC-MS (Supplementary Figures S1, 3), and their functional groups were identified by FTIR (Supplementary Figures S2, 4).

Transient transfection was a good method to test the numerous TRPA1 variants much faster than creating stable expressing cell lines before measurements. However, this method needs the cells transfected each time before the experiment, resulting in fluctuating transfection efficiency, and therefore, fluctuating expression levels of TRPA1 regardless of the mutations. The expression level differences have been compensated by normalizing the results to the effect of the non-electrophile agonist carvacrol (Figure 2), which has a different binding site on the TRPA1, and its effect should be unaffected by the mutations we created. Only carvacrol-sensitive TRPA1 variants were adequate for examining the effects of organic polysulfides because they proved to retain other receptor functions.

3.2.1 Transient intracellular calcium concentration changes in mutant TRPA1-expressing cells induced by organic polysulfides

Each mutant TRPA1 variant expressing CHO cells was stained by Fluo-4 calcium-sensitive fluorescent dye, and then the activating effect of agonists was measured by flow cytometry and compared to that of carvacrol.

First, we measured the dose-dependent effect of DMTS on each TRPA1 mutant variant and compared it to that of 1 mM carvacrol (Figure 5). The single mutation of C621, C641, and C665 showed

decreased sensitivity to DMTS. Except between C621A and C665A at 100 μ M DMTS ($p = 0.0024$), there were no significant differences between the single mutants ($p > 0.05$, two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test). The C621A/C641A double mutant and C621A/C641A/C665A triple mutant showed insensitivity to DMTS.

In the transmembrane domain, the theoretical binding sites C727 and C834 showed no contribution to the DMTS binding because neither their single (not shown) nor double mutation caused any difference in the effect of DMTS on the TRPA1 receptor, compared to wild-type TRPA1. Therefore, we can reject the idea of C727 and C834 to be parts of the binding site of the strongly hydrophobic organic polysulfides. These mutations were excluded from further experiments.

Next, we measured the effect of organic polysulfides DMTS, 90% DADS and 63.5% DATS, as well as AITC and JT010, and compared to that of 100 μ M carvacrol (Figure 6). It is important to note that 100 μ M carvacrol could not fully activate the TRPA1, in contrast to 1 mM in the previous measurement. This was also the reason why AITC had a consistently higher effect than 100%, except in the triple mutant. The single-mutant TRPA1 variants did not show significant changes, probably due to the limitation of Fluo-4 dye, which was easily saturated by calcium at the relatively high organic polysulfide concentration (100 μ M). However, C621A had completely lost sensitivity to JT010, which is strong evidence that C621 binds to this agonist covalently. JT010 showed decreased efficacy in C641A and C665A mutations, which suggests their assisting role in binding JT010 to C621. The triple mutation of C621, C641, and

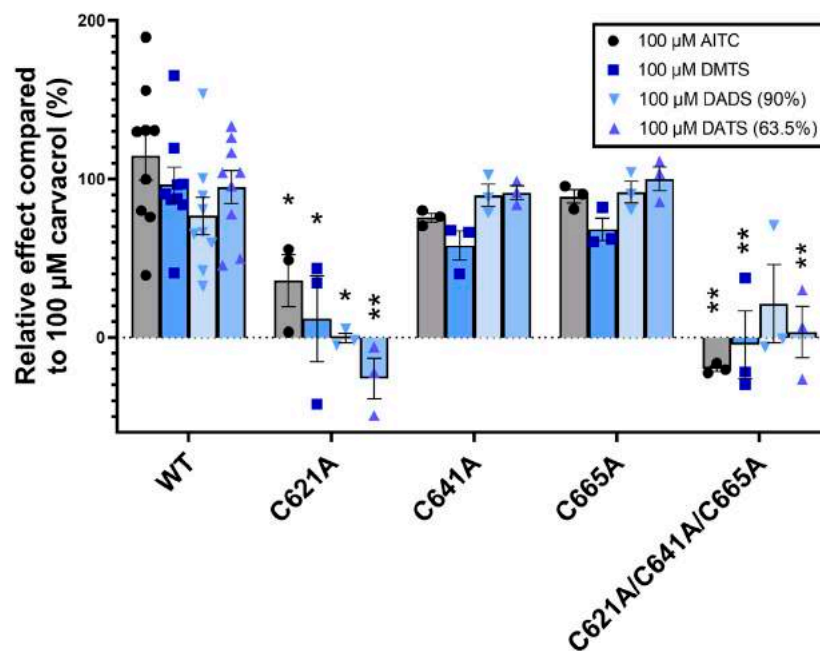


FIGURE 7

TRPA1 activity measured by radioactive Ca-45 liquid scintillation counting. The radioactive Ca-45 uptake due to TRPA1 activation was measured by liquid scintillation counting and compared to the effect of 100 μ M carvacrol. Out of the three TRPA1 single mutants, C621A shows the highest decrease in sensitivity to electrophilic agonists, indicating its key role in agonist binding. Triple mutation eliminated the effect of electrophilic agonists. Diagram shows the individual values and means \pm SEM, two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, significance compared to WT TRPA1: * p < 0.005, ** p < 0.0001, n = 3–6

C665 resulted in complete insensitivity to DMTS, DATS, DADS, and JT010, but only minimized the effect of AITC. There was no significant difference between the effects of the three organic polysulfides.

3.2.2 Radioactive Ca-45 uptake in mutant TRPA1-expressing cells induced by organic polysulfides

To confirm the results with an alternative method and to better understand the priorities between C621, C641, and C665 cysteines in binding the organic polysulfides, we tested the effect of DMTS, 90% DADS, 63.5% DATS, and AITC on each mutant TRPA1 variant in the radioactive Ca-45 uptake assay (Figure 7). The radioactive Ca-45 uptake due to TRPA1 activation was measured by liquid scintillation counting. The results were compared to those of 100 μ M carvacrol. C641A and C665A single mutations showed no significant changes, suggesting the secondary role of these cysteines in binding organic polysulfides. C621A and the triple mutant had significantly reduced sensitivity to all measured electrophilic agonists, except for the triple mutant to DADS due to an outlier. There was no significant difference between the effects of the three organic polysulfides.

3.2.3 Current-activating effect of organic polysulfides in mutant TRPA1-expressing cells

To further confirm the possible binding sites of the tested sulfide-containing agonists, we used the patch-clamp technique and determined the current-activating ability of DMTS, 90% DADS, and 63.5% DATS relative to carvacrol. Using the formula

described in the Materials and methods section, a ratio was calculated, which shows the relative channel-opening ability of the tested agonists normalized to the current-activating effect of the known non-electrophilic agonist carvacrol. Figures 8A,B show the representative measurements of DMTS, while in Figures 8C–E, the current activation ratios are plotted. Mutating C621 to alanine significantly decreased the effect of the polysulfides compared to the WT. The mutation in C665 also affected the current-activating ability of DADS and DATS, but failed to significantly alter the effect of DMTS. Mutation C641A did not influence the agonist effect of DMTS and DATS, but only modified the effect of DADS. We also have checked the effect of DMTS on the double (C621A/C641A) and triple (C621A/C641A/C665A) mutants (Figures 8B, C). The TRPA1 currents of the double- and triple-mutant channels in the presence of DMTS were significantly reduced compared to the WT ($p \leq 0.0001$ for both) and also compared to the C621A mutant ($p = 0.01$ and 0.0006, respectively, data not shown). DADS showed a stronger effect on WT TRPA1 than the other organic polysulfides, compared to 100 μ M carvacrol. The C621A/C641A/C665A triple mutant showed insensitivity to HC-030031 antagonist.

4 Discussion

The activating effect of garlic-derived organic polysulfides on the TRPA1 receptor is well-established (Koizumi et al., 2009; Terada et al., 2014; Pozsgai et al., 2017; 2019; Batai et al., 2018; 2022; Dombi et al., 2021; Mahajan et al., 2021), but we are the first

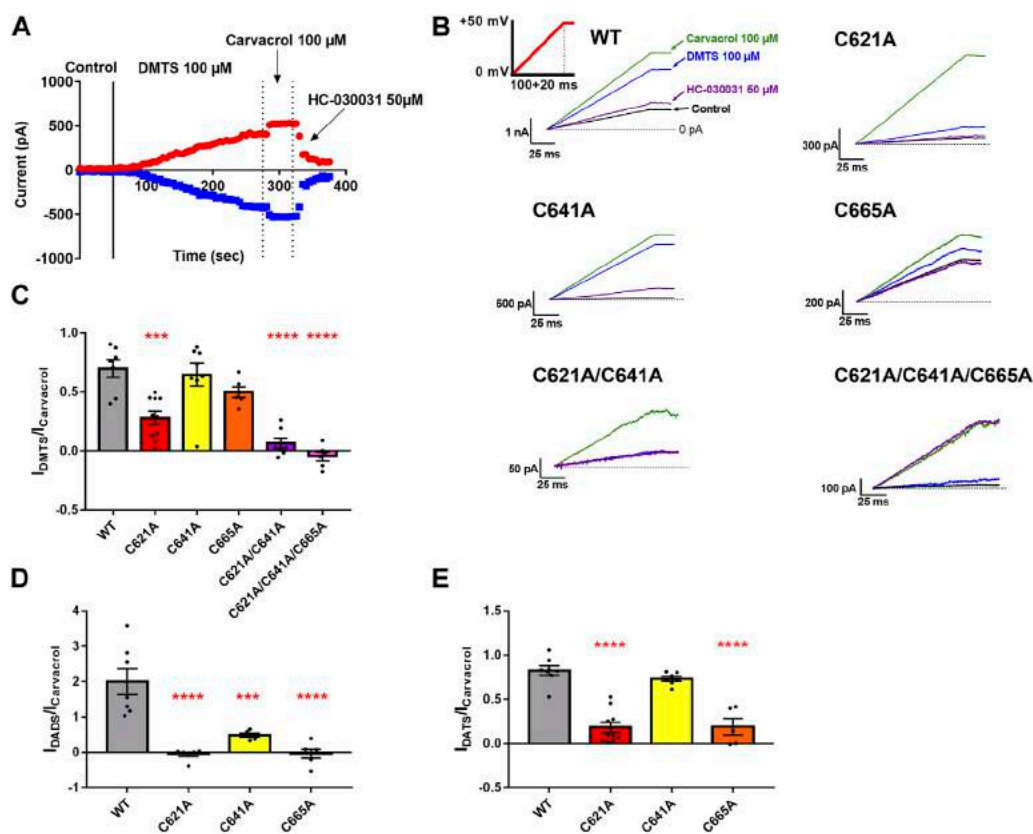


FIGURE 8

Effect of the polysulfides on the WT and on the cysteine mutant TRPA1 using the whole-cell patch-clamp technique. (A) Representative whole-cell patch-clamp measurement of a WT TRPA1-expressing CHO cell. Until the continuous line, Ca²⁺-free control solution was applied, and between the continuous and the first dotted line, the effect of 100 μM DMTS is shown. Between the two dotted lines, and after the second dotted line, we can see the effects of the two positive controls (carvacrol and HC-030031, respectively). The red symbols represent the peak currents at +50 mV, while the blue ones are the peak currents at -50 mV command voltage. (B) Representative whole-cell measurements regarding the WT, C621A, C641A, C665A, C621A/C641A, and C621A/C641A/C665A populations (saturated traces). The green, blue, purple, and black solid lines were measured in the presence of 100 μM carvacrol, 100 μM DMTS, 50 μM HC-030031, and Ca²⁺-free control solution, respectively. The horizontal dashed line represents 0 pA current. The voltage protocol is shown with a solid red line as an inset on the top left panel. The fluctuation of the effect of carvacrol correlated to and indicated the overall TRPA1 response rate. (C–E) Bar charts of the activated current ratios by the application of 100 μM DMTS, 90% DADS, and 63.5% DATS, respectively. The colored bars represent the WT and the C621A, C641A, C665A, C621A/C641A, and C621A/C641A/C665A mutant TRPA1 ($N_{transfection} \geq 2$ and $n_{cell} \geq 5$ for each population). Black dots indicate individual measurements, and bar chart height and error bars show mean \pm SEM. Asterisks represent significant difference (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p \leq 0.0001$).

to create site-directed mutant variants of TRPA1 to identify the binding site of organic polysulfides. Our data were acquired on these mutant TRPA1 variants by *in silico* modeling and three different functional methods: whole-cell patch clamp, radioactive calcium-45 liquid scintillation counting, and calcium-sensitive fluorescent flow cytometry. The results are overlapping and strongly support each other. In the present study, we have proven that organic polysulfides DMTS, DADS, and DATS bind covalently to the C621, C641, and C665 amino acids activating the human TRPA1 receptor, respectively. C621 had the most important role, but C641 and C665 also contributed to binding the electrophilic agonists. Only their combined triple mutation led the TRPA1 to become completely insensitive to organic polysulfides.

Out of the three polysulfides, DATS, the largest ligand, showed the most favorable calculated free energy of binding; however, as it was highlighted by experimental results, the formation of a

covalent bond with C621 is more important than the strength of the binding interactions. Notably, the apo TRPA1 conformation is not favorable for binding the electrophilic agonists, as seen in the prerequisite docking calculations. Prerequisite docking on the holo target protein resulted in smaller distances between the covalently binding atoms. This observation is explained by the overlapping A-loop in the binding site that hinders ligand accessibility in the apo structure, but not in the holo structure. As shown in our previous paper (Zhao et al., 2020; Zsidó et al., 2021), the upward motion of the A-loop after the prerequisite binding of the agonist to P666 and F669 is necessary for the accessibility of the actual binding site.

These three cysteine residues have been known to conform the binding site of most electrophilic agonists, with the exception of AITC, which additionally binds to the K710 lysine, and the irreversible agonist JT010, whose activating effect can be abolished entirely by the mutation of C621 alone (Hinman et al.,

2006; Deering-Rice et al., 2011; Eberhardt et al., 2012; Shapiro et al., 2013; Suo et al., 2020).

In contrast to the patch clamp and calcium-45 liquid scintillation measurements, the calcium-sensitive fluorescent flow cytometry did not show distinction between the single-mutant TRPA1 variants. This was probably due to the limitation of Fluo-4 dye, which could be easily saturated by calcium at the relatively high concentration (100 μ M) of organic polysulfides. Therefore, radioactive calcium-45 liquid scintillation counting and whole-cell patch clamp are more precise and more reliable methods, and we could use them to find the differences between the three cysteine residues.

Out of these three cysteine residues, the key role of C621 in organic polysulfide binding has been predicted by our *in silico* model and supported by the results of calcium-45 liquid scintillation counting and whole-cell patch clamp. The key role of C621 is well-known for numerous electrophilic agonists, such as JT010, iodoacetamide, BODIPY-iodoacetamide, AITC, N-benzylthioformamide (9BE), and benzyl isothiocyanate (Macpherson et al., 2007; Eberhardt et al., 2012; Bahia et al., 2016; Suo et al., 2020; Habgood et al., 2022). Whole-cell patch clamp showed C665 as the second-most important cysteine in organic polysulfide binding. The secondary role of C665 has also been shown in cases of some other electrophilic agonists, such as iodoacetamide, BODIPY-iodoacetamide, N-ethylmaleimide, and benzyl isothiocyanate (Wang et al., 2004; Bahia et al., 2016; Suo et al., 2020; Habgood et al., 2022).

Although a single mutation of either cysteine only reduces the efficacy of organic polysulfides, the activating effect of JT010 was completely eliminated by the single mutation of C621. Several pieces of evidence have shown that JT010 only binds to C621 covalently, and not to other cysteines (Takaya et al., 2015; Suo et al., 2020; Matsubara et al., 2022). According to this fact, the reduced effect of JT010 on TRPA1 with the single mutation of C641 or C665 suggests other roles of these cysteines instead of directly binding the electrophilic agonist, which has been shown in our calcium-sensitive fluorescent flow cytometry. Presumably, C641 and C665 amino acids maintain the structure of the binding pocket or create an attracting environment for the electrophilic agonists or both. Since the single mutation of C621 was not enough for the complete inhibition of polysulfides, we conclude that C641 and C665 also bind covalently to these compounds. Only the combined triple mutation of these cysteines completely abolished the activating effect of organic polysulfides. Other electrophilic agonists have also been reported to lose effects on the triple cysteine mutant TRPA1 variant, except for the AITC, which retains a minimal effect in the presence of intact K710 lysine (Hinman et al., 2006; Deering-Rice et al., 2011; Eberhardt et al., 2012; Shapiro et al., 2013). According to our calcium-sensitive fluorescent flow cytometry data, AITC showed higher efficacy than the control agonist non-electrophilic carvacrol both in wild-type TRPA1 and single-mutant variants. In contrast with the total insensitivity to the organic polysulfides, triple-mutant TRPA1 showed a minimal sensitivity to AITC.

Neither the single nor the combined double mutation of C727 and C834 made any difference in the effect of DMTS, compared to wild-type TRPA1. Therefore, we have to reject the idea that C727 and C834 are parts of the binding site for highly

hydrophobic organic polysulfides, and possibly other electrophilic agonists.

In HEK293 cells expressing mouse Trpa1, C415, and C422, cysteine residues have been shown to bind inorganic polysulfide (disodium trisulfide) and other electrophilic agonists (Macpherson et al., 2007; Fujita et al., 2008; Hatakeyama et al., 2015). Whether the human homologous cysteine residues (C414 and C421) or the remaining 21 out of 28 cysteine residues have any role in binding organic polysulfides and other electrophilic agonists has to be clarified.

Out of the organic polysulfides we used, the factory-made DMTS was almost pure ($\geq 98\%$), but the synthesized DADS and DATS were inseparable, as our DADS was 90% and the DATS was 63.5%, accompanying each other much like in their natural source, garlic oil. The whole-cell patch clamp showed the effect of DADS to be higher on WT TRPA1, but more affected by single mutations than the effect of other organic polysulfides. C621A and C665A single mutants showed decreased sensitivity to DMTS and DATS, and they were completely insensitive to DADS. The C641A single mutant showed decreased sensitivity to DADS, but not to DMTS and DATS. This finding may suggest a higher efficacy of DADS, but this needs to be further investigated as it is not supported by our data from other measurement methods, in which the three organic polysulfides showed equivalent effects. In the whole-cell patch clamp technique, the C621A/C641A/C665A triple mutant showed insensitivity to antagonist HC-030031, which needs further investigation. The triple-mutant receptors were completely insensitive to polysulfides, but their remained functional ability was proven by the fact that they still showed well-measurable activity in response to carvacrol.

We have to mention that the main limitation of the present study is that the overall TRPA1 response rate fluctuated from transfection to transfection in cell lines, which was the drawback of the applied transient transfection method. The transient transfection efficiency is highly dependent on a wide range of conditions, and even slight changes may lead to different results, and therefore, practically, it has intrinsic variability. The complexity of expression from transiently transfected plasmids highlights the importance of appropriate experimental controls (Bollin et al., 2011; Nejeplinska et al., 2012; Di Blasi et al., 2021; Fus-Kujawa et al., 2021). The fluctuation of the effect of carvacrol correlated to and indicated the overall TRPA1 response rate. After a detailed analysis of our data, we are confident that the sensitivity of the TRPA1 variants did not change in response to carvacrol. This has been demonstrated by the consistent [electrophilic agonist/carvacrol] effect ratio in our repeated experiments. For the equivalent C621S/C641S/C665S triple-mutant human TRPA1, carvacrol has been used commonly as a positive control agonist and shown to retain its complete effect (Babes et al., 2013; Ibarra and Blair, 2013; Meents et al., 2016; Schenk et al., 2019).

Using three functional tests, we have proven that organic polysulfides covalently bind to C621, C641, and C665 cysteine residues activating the TRPA1 receptor, and only their combined triple mutation is able to abolish the effect of organic polysulfides. We also identified C621 as the most important and C665 as the second most important cysteine in the binding of organic polysulfides. This highly overlaps with the binding site of most electrophilic agonists on the TRPA1 receptor, which, in turn, may

further clarify the binding mechanism of the other electrophilic agonists.

Our present study has not only demonstrated that TRPA1 can be an important target molecule for organic polysulfides but also determined their precise binding sites using mutant receptors.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Material](#); further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Author contributions

EP, ZS, and CH guided the scope of the research. BZ and CH performed the *in silico* docking. SL synthesized and purified the polysulfides. BN and ZS created the mutant TRPA1 variants and tested their expression level by immunohistochemistry and their function by fluorescent flow cytometry. ES, BN and ZS tested the function of mutant TRPA1 variants by radioactive Ca-45 liquid scintillation counting. AF, FP, and ZV tested the function of mutant TRPA1 variants with the whole-cell patch-clamp technique. BN researched the background and wrote the first manuscript. EP, ZS, and CH revised it critically to meet the standard for publication. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

EP, ZS, and BN were funded by National Brain Research Program 3.0 (NAP 3.0); RRF-2.3.1-21-2022-00015 National Laboratory for Drug Research and Development; TKP2021-EGA-16 National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary and the ELKH Network. BZ and CH were supported by the Medical School, University of Pécs (PTE ÁOK KA-2022-26), and by the European Union, co-financed by the European Social Fund (project name and code: Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs, EFOP-3.6.1-16-2016-00004). SL was funded by OTKA_NKFI-K-134214. Project no. TKP2021-EGA-13 was implemented with the support provided from the National Research, Development, and Innovation Fund of

References

- Alarcón, G. S. (2000). Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A Clinician's perspective. *Immunopharmacology* 47, 259–271. doi:10.1016/s0162-3109(00)00184-3
- Alvarado, M. G., Thakore, P., and Earley, S. (2021). Transient receptor potential channel ankyrin 1: A unique regulator of vascular function. *Cells* 10, 1167. doi:10.3390/cells10051167
- Apkarian, A. V., Baliki, M. N., and Geha, P. Y. (2009). Towards a theory of chronic pain. *Prog. Neurobiol.* 87, 81–97. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.09.018
- Babes, A., Fischer, M. J. M., Filipovic, M., Engel, M. A., Flonta, M. -L., and Reeh, P. W. (2013). The anti-diabetic drug glibenclamide is an agonist of the transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) ion channel. *Eur. J. Pharmacol.* 704, 15–22. doi:10.1016/j.ejphar.2013.02.018
- Bahia, P. K., Parks, T. A., Stanford, K. R., Mitchell, D. A., Varma, S., Stevens, S. M., et al. (2016). The exceptionally high reactivity of Cys 621 is critical for electrophilic activation of the sensory nerve ion channel TRPA1. *J. General Physiology* 147, 451–465. doi:10.1085/jgp.201611581
- Bai, A.-P., Ouyang, Q., and Hu, R.-W. (2005). Diallyl trisulfide inhibits tumor necrosis factor- α expression in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 50, 1426–1431. doi:10.1007/s10620-005-2857-5
- Bátai, I. Z., Dombi, Á., Borbély, É., Fehér, Á., Papp, F., Varga, Z., et al. (2022). Investigation of the role of the TRPA1 ion channel in conveying the effect of dimethyl trisulfide on vascular and histological changes in serum-transfer arthritis. *Pharmaceuticals* 15, 671. doi:10.3390/ph15060671

Hungary, financed under the EGA-13 funding scheme; National Research, Development and Innovation Office (Pharma-Lab, RRF-2.3.1-21-2022-00015). ZV was funded by OTKA_NKFI-K-132906, and AF was supported by the UNKP-22-3-II-DE-38 New National Excellence Program of the Ministry for Culture and Innovation from the source of the National Research, Development and Innovation Fund.

Acknowledgments

The authors are thankful to Gábor Pozsgai for his expertise in polysulfides and his helpfulness with regular consultations. The research was performed in collaboration with Genomics and Bioinformatics Core Facility at the Szentágotthai Research Centre of the University of Pécs. They acknowledge the support from the Governmental Information Technology Development Agency, Hungary. They also acknowledge that the results of this research have been achieved using the DECI resource Archer2 based in the United Kingdom at the National Supercomputing Service with support from the PRACE aisbl. They are grateful to the referees and editors of the journal for their thorough work and valuable suggestions.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1180896/full#supplementary-material>

- Báta, I. Z., Horváth, Á., Pintér, E., Helyes, Z., and Pozsgai, G. (2018). Role of transient receptor potential ankyrin 1 ion channel and somatostatin sst4 receptor in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of sodium polysulfide and dimethyl trisulfide. *Frontiers in Endocrinology* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00055> (Accessed May 21, 2022).
- Báta, I. Z., Sár, C. P., Horváth, Á., Borbély, É., Bölcseki, K., Kemény, Á., et al. (2019). TRPA1 ion channel determines beneficial and detrimental effects of GYY4137 in murine serum-transfer arthritis. *Front. Pharmacol.* 10, 964. doi:10.3389/fphar.2019.00964
- Bautista, D. M., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H. E., Sterner, O., Högestätt, E. D., et al. (2005). Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 12248–12252. doi:10.1073/pnas.0505356102
- Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., et al. (2002). The protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58, 899–907. doi:10.1107/s0907444902003451
- Bollin, F., Dechavanne, V., and Chevalet, L. (2011). Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expr. Purif.* 78, 61–68. doi:10.1016/j.pep.2011.02.008
- Cavalli, E., Mammana, S., Nicoletti, F., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2019). The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 33, 2058738419838383. doi:10.1177/2058738419838383
- Chang, A. Y., Chau, V. W. Y., Landas, J. A., and Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. Available at: <https://ujemi.microbiology.ubc.ca/node/127> (Accessed October 13, 2022).
- Corbeil, C. R., Englebienne, P., and Moitessier, N. (2007). Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 1. Development and validation of FITTED 1.0. *J. Chem. Inf. Model.* 47, 435–449. doi:10.1021/ci6002637
- Deering-Rice, C. E., Romero, E. G., Shapiro, D., Hughen, R. W., Light, A. R., Yost, G. S., et al. (2011). Electrophilic components of diesel exhaust particles (dep) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): A probable mechanism of acute pulmonary toxicity for dep. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 950–959. doi:10.1021/tx200123z
- Di Blasi, R., Marbahi, M. M., Siciliano, V., Polizzi, K., and Ceroni, F. (2021). A call for caution in analysing mammalian co-transfection experiments and implications of resource competition in data misinterpretation. *Nat. Commun.* 12, 2545. doi:10.1038/s41467-021-22795-9
- Dombi, Á., Sánta, C., Báta, I. Z., Kormos, V., Kecskés, A., Tékus, V., et al. (2021). Dimethyl trisulfide diminishes traumatic neuropathic pain acting on TRPA1 receptors in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3363. doi:10.3390/ijms22073363
- Eberhardt, M. J., Filipovic, M. R., Leffler, A., de la Roche, J., Kistner, K., Fischer, M. J., et al. (2012). Methylglyoxal activates nociceptors through transient receptor potential channel A1 (TRPA1): A possible mechanism of metabolic neuropathies. *J. Biol. Chem.* 287, 28291–28306. doi:10.1074/jbc.M111.328674
- Fliszár-Nyúl, E., Faisal, Z., Mohos, V., Derdák, D., Lemli, B., Kálai, T., et al. (2021). Interaction of SZV 1287, a novel oxime analgesic drug candidate, and its metabolites with serum albumin. *J. Mol. Liq.* 333, 115945. doi:10.1016/j.molliq.2021.115945
- Fujita, F., Uchida, K., Moriyama, T., Shima, A., Shibasaki, K., Inada, H., et al. (2008). Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 4049–4057. doi:10.1172/JCI35957
- Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., and Kowalczyk, A. (2021). An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.701031> (Accessed May 2, 2023)
- Gasteiger, J., and Marsili, M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity—A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36, 3219–3228. doi:10.1016/0040-4020(80)80168-2
- Ibarra, Y., and Blair, N. T. (2013). Benzoquinone Reveals a Cysteine-Dependent Desensitization Mechanism of TRPA1. *Mol. Pharmacol.* 83, 1120–1132. doi:10.1124/mol.112.084194
- Habgood, M., Seifert, D., Zaki, A.-M., Alibay, I., and Biggin, P. C. (2022). Atomistic mechanisms of human TRPA1 activation by electrophile irritants through molecular dynamics simulation and mutual information analysis. *Sci. Rep.* 12, 4929. doi:10.1038/s41598-022-08824-7
- Harden, R. N., Bruehl, S., Perez, R. S. G. M., Birklein, F., Marinus, J., Maihofner, C., et al. (2010). Validation of proposed diagnostic criteria (the “budapest criteria”) for complex regional pain syndrome. *Pain* 150, 268–274. doi:10.1016/j.pain.2010.04.030
- Hatakeyama, Y., Takahashi, K., Tominaga, M., Kimura, H., and Ohta, T. (2015). Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. *Mol. Pain* 11, 24–015. doi:10.1186/s12990-015-0023-4
- Helyes, Z., Pintér, E., Németh, J., Sándor, K., Elekes, K., Szabó, A., et al. (2006). Effects of the somatostatin receptor subtype 4 selective agonist J-2156 on sensory neuropeptide release and inflammatory reactions in rodents. *Br. J. Pharmacol.* 149, 405–415. doi:10.1038/sj.bjp.0706876
- Helyes, Z., Pinter, E., Sandor, K., Elekes, K., Banvolgyi, A., Keszthelyi, D., et al. (2009). Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13088–13093. doi:10.1073/pnas.0900681106
- Helyes, Z., Tékus, V., Szentes, N., Pohóczy, K., Botz, B., Kiss, T., et al. (2019). Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 13067–13076. doi:10.1073/pnas.1820168116
- Hinman, A., Chuang, H., Bautista, D. M., and Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *PNAS* 103, 19564–19568. doi:10.1073/pnas.0609598103
- Horváth, Á., Tékus, V., Boros, M., Pozsgai, G., Botz, B., Borbély, É., et al. (2016). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: *In vivo* study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* 18, 6. doi:10.1186/s13075-015-0904-y
- Keeley, P., Creed, F., Tomenson, B., Todd, C., Borglin, G., and Dickens, C. (2008). Psychosocial predictors of health-related quality of life and health service utilisation in people with chronic low back pain. *PAIN®* 135, 142–150. doi:10.1016/j.pain.2007.05.015
- Koizumi, K., Iwasaki, Y., Narukawa, M., Iitsuka, Y., Fukao, T., Seki, T., et al. (2009). Diallyl sulfides in garlic activate both TRPA1 and TRPV1. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 382, 545–548. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.066
- Kun, J., Sztter, I., Kemény, Á., Perkecz, A., Kereskai, L., Pohóczy, K., et al. (2014). Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. *PLOS ONE* 9, e108164. doi:10.1371/journal.pone.0108164
- Lee, H.-J., Lee, H. G., Choi, K.-S., Surh, Y.-J., and Na, H.-K. (2013). Diallyl trisulfide suppresses dextran sodium sulfate-induced mouse colitis: NF- κ B and STAT3 as potential targets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 267–273. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.064
- Liu, C., Reese, R., Vu, S., Rougé, L., Shields, S. D., Kakiuchi-Kiyota, S., et al. (2021). A non-covalent ligand reveals biased agonism of the TRPA1 ion channel. *Neuron* 109, 273–284.e4. doi:10.1016/j.neuron.2020.10.014
- Macpherson, L. J., Dubin, A. E., Evans, M. J., Marr, F., Schultz, P. G., Cravatt, B. F., et al. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445, 541–545. doi:10.1038/nature05544
- Mahajan, N., Khare, P., Kondepudi, K. K., and Bishnoi, M. (2021). TRPA1: Pharmacology, natural activators and role in obesity prevention. *Eur. J. Pharmacol.* 912, 174553. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174553
- Markovics, A., Szöke, É., Sándor, K., Börzsei, R., Bagoly, T., Kemény, Á., et al. (2012). Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 in distinct *in vitro* and *in vivo* model systems. *J. Mol. Neurosci.* 46, 40–50. doi:10.1007/s12031-011-9577-4
- Matsubara, M., Muraki, Y., Hatano, N., Suzuki, H., and Muraki, K. (2022). Potent activation of human but not mouse TRPA1 by JT010. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 14297. doi:10.3390/ijms232214297
- Matsuoka, N., Maeda, N., Yamaguchi, I., and Satoh, M. (1994). Possible involvement of brain somatostatin in the memory formation of rats and the cognitive enhancing action of FR121196 in passive avoidance task. *Brain Res.* 642, 11–19. doi:10.1016/0006-8993(94)90900-8
- Medzhitov, R. (2021). The spectrum of inflammatory responses. *Science* 374, 1070–1075. doi:10.1126/science.abi5200
- Meents, J. E., Fischer, M. J. M., and McNaughton, P. A. (2016). Agonist-induced sensitisation of the irritant receptor ion channel TRPA1. *The Journal of Physiology* 594, 6643–6660. doi:10.1113/jp272237
- Mha, A. N., Peleg, R., Singer, Y., Sherf, M., and Shvartzman, P. (2008). Chronic pain. *A Population-Based Study* 10, 5.
- Mohos, V., Fliszár-Nyúl, E., Lemli, B., Zsidó, B. Z., Hetényi, C., Mladěnka, P., et al. (2020a). Testing the pharmacokinetic interactions of 24 colonic flavonoid metabolites with human serum albumin and cytochrome P450 enzymes. *Biomolecules* 10, 409. doi:10.3390/biom10030409
- Mohos, V., Fliszár-Nyúl, E., Ungvári, O., Bakos, É., Kuffa, K., Bencsik, T., et al. (2020b). Effects of chrysin and its major conjugated metabolites chrysin-7-sulfate and chrysin-7-glucuronide on cytochrome P450 enzymes and on OATP, P-gp, BCRP, and MRP2 transporters. *Drug Metab. Dispos.* 48, 1064–1073. doi:10.1124/dmd.120.000085
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., et al. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639–1662. doi:10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B
- Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Nonresolving Inflamm.* Cell 140, 871–882. doi:10.1016/j.cell.2010.02.029
- Nathan, C. (2022). Nonresolving inflammation redux. *Immunity* 55, 592–605. doi:10.1016/j.immuni.2022.03.016
- Nejepinska, J., Malik, R., Moravec, M., and Svoboda, P. (2012). Deep Sequencing Reveals Complex Spurious Transcription from Transiently Transfected Plasmids. *PLOS ONE* 7, e43283. doi:10.1371/journal.pone.0043283

- Nemes, B., Bölskei, K., Kecskés, A., Kormos, V., Gaszner, B., Aczél, T., et al. (2021). Human somatostatin SST4 receptor transgenic mice: Construction and brain expression pattern characterization. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3758. doi:10.3390/ijms22073758
- Niv, D., and Kreitler, S. (2001). Pain and quality of life. *Pain Pract.* 1, 150–161. doi:10.1046/j.1533-2500.2001.01016.x
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., and Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminformatics* 3, 33. doi:10.1186/1758-2946-3-33
- Ogawa, H., Takahashi, K., Miura, S., Imagawa, T., Saito, S., Tominaga, M., et al. (2012). H(2)S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience* 218, 335–343. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.044
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., et al. (2008). IDT SciTools: A suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 36, W163–W169. doi:10.1093/nar/gkn198
- Pahwa, R., Goyal, A., Bansal, P., and Jialal, I. (2021). Chronic inflammation. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173> (Accessed May 16, 2022).
- Paulsen, C. E., Armache, J.-P., Gao, Y., Cheng, Y., and Julius, D. (2015). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520, 511–517. doi:10.1038/nature14367
- Pintér, E., Pozsgai, G., Hajna, Z., Helyes, Z., and Szolcsányi, J. (2014). Neuropeptide receptors as potential drug targets in the treatment of inflammatory conditions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 77, 5–20. doi:10.1111/bcp.12097
- Pottel, J., Therrien, E., Gleason, J. L., and Moitessier, N. (2014). Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 6. Development and application to the docking of HDACs and other zinc metalloenzymes inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 254–265. doi:10.1021/ci400550m
- Pozsgai, G., Bátaí, I. Z., and Pintér, E. (2019). Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels. *Br. J. Pharmacol.* 176, 628–645. doi:10.1111/bph.14514
- Pozsgai, G., Payrits, M., Sággy, É., Sebestyén-Bátaí, R., Steen, E., Szőke, É., et al. (2017). Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and st4 receptors. *Nitric Oxide* 65, 10–21. doi:10.1016/j.niox.2017.01.012
- Qiu, C., Zeyda, T., Johnson, B., Hochgeschwender, U., Lecea, L., and Tallent, M. K. (2008). Somatostatin receptor subtype 4 couples to the M-current to regulate seizures. *J. Neurosci.* 28, 3567–3576. doi:10.1523/JNEUROSCI.4679-07.2008
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., et al. (2020). The revised international association for the study of pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. *Pain* 161, 1976–1982. doi:10.1097/j.pain.0000000000001939
- Sándor, K., Elekes, K., Szabó, Á., Pintér, E., Engström, M., Wurster, S., et al. (2006). Analgesic effects of the somatostatin sst4 receptor selective agonist J-2156 in acute and chronic pain models. *Eur. J. Pharmacol.* 539, 71–75. doi:10.1016/j.ejphar.2006.03.082
- Scheich, B., Csekő, K., Borbély, É., Ábrahám, I., Csernus, V., Gaszner, B., et al. (2017). Higher susceptibility of somatostatin 4 receptor gene-deleted mice to chronic stress-induced behavioral and neuroendocrine alterations. *Neuroscience* 346, 320–336. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.01.039
- Scheich, B., Gaszner, B., Kormos, V., László, K., Ádori, C., Borbély, É., et al. (2016). Somatostatin receptor subtype 4 activation is involved in anxiety and depression-like behavior in mouse models. *Neuropharmacology* 101, 204–215. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.021
- Schenk, S. A., Dick, F., Herzog, C., Eberhardt, M. J., and Leffler, A. (2019). Active metabolites of dipyrone induce a redox-dependent activation of the ion channels TRPA1 and TRPV1. *Pain Rep* 4, e720. doi:10.1097/PR9.0000000000000720
- Schett, G., and Gravallesse, E. (2012). Bone erosion in rheumatoid arthritis: Mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 656–664. doi:10.1038/nrrheum.2012.153
- Schrödinger (2022). *Schrödinger Release 2022-4*. Maestro.
- Schuelert, N., and McDougall, J. J. (2012). Involvement of Nav 1.8 sodium ion channels in the transduction of mechanical pain in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R5. doi:10.1186/ar3553
- Shapiro, D., Deering-Rice, C. E., Romero, E. G., Huguen, R. W., Light, A. R., Veranth, J. M., et al. (2013). Activation of transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) in lung cells by wood smoke particulate material. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 750–758. doi:10.1021/tx400024h
- Suo, Y., Wang, Z., Zubcevic, L., Hsu, A. L., He, Q., Borgnia, M. J., et al. (2020). Structural insights into electrophile irritant sensing by the human TRPA1 channel. *Neuron* 105, 882–894. doi:10.1016/j.neuron.2019.11.023
- Takaya, J., Mio, K., Shiraishi, T., Kurokawa, T., Otsuka, S., Mori, Y., et al. (2015). A potent and site-selective agonist of TRPA1. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 15859–15864. doi:10.1021/jacs.5b10162
- Terada, Y., Hosono, T., Seki, T., Ariga, T., Ito, S., Narukawa, M., et al. (2014). Sulphur-containing compounds of durian activate the thermogenesis-inducing receptors TRPA1 and TRPV1. *Food Chem.* 157, 213–220. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.031
- The PyMOL Molecular Graphics System (2022). *The PyMOL molecular Graphics system, version 2.0*. New York: Schrödinger, LLC.
- Therrien, E., Englebienne, P., Arrowsmith, A. G., Mendoza-Sanchez, R., Corbeil, C. R., Weill, N., et al. (2012). Integrating medicinal chemistry, organic/combinatorial chemistry, and computational chemistry for the discovery of selective estrogen receptor modulators with forecaster, a novel platform for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 210–224. doi:10.1021/ci2004779
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. C. (2005). Gromacs: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 26, 1701–1718. doi:10.1002/jcc.20291
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., and Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 25, 1157–1174. doi:10.1002/jcc.20035
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., et al. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. doi:10.1093/nar/gky427
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinforma.* 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Yuan, X., Chen, X., Jiang, X., and Nie, Y. (2006). Synthesis, characterization and bioactivity evaluation of diallyl disulfide. *J. Cent. South Univ. Technol.* 13, 515–518. doi:10.1007/s11771-006-0079-4
- Zhao, J., Lin King, J. V., Paulsen, C. E., Cheng, Y., and Julius, D. (2020). Irritant-evoked activation and calcium modulation of the TRPA1 receptor. *Nature* 585, 141–145. doi:10.1038/s41586-020-2480-9
- Zsidó, B. Z., Balog, M., Erős, N., Poór, M., Mohos, V., Fliszár-Nyúl, E., et al. (2020). Synthesis of spin-labelled bergamottin: A potent CYP3A4 inhibitor with antiproliferative activity. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 508. doi:10.3390/ijms21020508
- Zsidó, B. Z., Börzsei, R., Pintér, E., and Hetényi, C. (2021). Prerequisite binding modes determine the dynamics of action of covalent agonists of ion channel TRPA1. *Pharmaceuticals* 14, 988. doi:10.3390/ph14100988
- Zygmunt, P. M., and Högestätt, E. D. (2014). “TRPA1,” in Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels: Volume I *handbook of experimental pharmacology*. Editors B. Nilius and V. Flockerzi (Berlin, Heidelberg: Springer), 583–630. doi:10.1007/978-3-642-54215-2_23

Glossary

AITC	Allyl isothiocyanate (mustard oil)
Amp	Ampicillin, an antibiotic used for selective bacterium growth
BODIPY-iodoacetamide	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-yl)methyl)iodoacetamide, a fluorescent dye-conjugated iodoacetamide
C414	Cysteine in the 424th position in the human TRPA1 peptide sequence
C415	Cysteine in the 415th position in the mouse Trpa1 peptide sequence
C421	Cysteine in the 421st position in the human TRPA1 peptide sequence
C422	Cysteine in the 422nd position in the mouse Trpa1 peptide sequence
C621	Cysteine in the 621st position in the human TRPA1 peptide sequence
C621A	Mutation, in which the cysteine is replaced by alanine in the 621st position in the human TRPA1 peptide sequence
C621S	Mutation, in which the cysteine is replaced by serine in the 621st position in the human TRPA1 peptide sequence
C641	Cysteine in the 641st position in the human TRPA1 peptide sequence
C641A	Mutation, in which the cysteine is replaced by alanine in the 641st position in the human TRPA1 peptide sequence
C641S	Mutation, in which the cysteine is replaced by serine in the 641st position in the human TRPA1 peptide sequence
C665	Cysteine in the 665th position in the human TRPA1 peptide sequence
C665A	Mutation, in which the cysteine is replaced by alanine in the 665th position in the human TRPA1 peptide sequence
C665S	Mutation, in which the cysteine is replaced by serine in the 665th position in the human TRPA1 peptide sequence
C727	Cysteine in the 727th position in the human TRPA1 peptide sequence
C834	Cysteine in the 834th position in the human TRPA1 peptide sequence
CHO	Chinese hamster ovary cells, mammalian model cells excellent for recombinant protein expression
DADS	Diallyl disulfide
DATS	Diallyl trisulfide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium, a minimal essential medium for mammalian cell growth
DMSO	Dimethyl sulfoxide, an organic solvent miscible with both polar and apolar compounds
DMTS	Dimethyl trisulfide
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry
GFP	Green fluorescent protein, a reporter protein
HEK293 cells	Human embryonic kidney 293 cells, human model cells excellent for human protein expression
JT010	2-Chloro-N-[4-(4-methoxyphenyl)-2-thiazolyl]-N-(3-methoxypropyl)acetamide
K710	Lysine in the 710th position in the human TRPA1 peptide sequence
LB medium	Lysogeny broth medium, a simple medium for bacterium growth
PCR	Polymerase chain reaction, a DNA fragment amplifying technique
SDS	Sodium dodecyl sulfate, a strong organic detergent used for lysing cells
TRPA1	Human transient receptor potential ankyrin 1 receptor
Trpa1	Mouse transient receptor potential ankyrin 1 receptor
WT	Wild type, not mutated, intact (gene; protein)

Article

Investigation of Cuprizone-Induced Demyelination in mGFAP-Driven Conditional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor Knockout Mice

Gábor Kriszta^{1,2,3}, Balázs Nemes¹, Zoltán Sándor¹, Péter Ács⁴, Sámuel Komoly⁴, Zoltán Berente^{3,5}, Kata Bölcskei^{1,2,†} and Erika Pintér^{1,2,*,†}

¹ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School, Pécs H-7624, Hungary; gabor.kriszta@aok.pte.hu (G.K.); balazs.nemes@aok.pte.hu (B.N.); zoltan.sandor@aok.pte.hu (Z.S.); kata.bolcskei@aok.pte.hu (K.B.)

² Molecular Pharmacology Research Group and Center for Neuroscience, János Szentágotthai Research Center, University of Pécs, Pécs H-7624, Hungary

³ Research Group for Experimental Diagnostic Imaging, University of Pécs Medical School, Pécs H-7624, Hungary; zoltan.berente@aok.pte.hu

⁴ Department of Neurology, University of Pécs Medical School, Pécs H-7623, Hungary; acs.peter@pte.hu (P.Á.); komoly.samuel@pte.hu (S.K.)

⁵ Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, Pécs H-7624, Hungary

* Correspondence: erika.pinter@aok.pte.hu

† These authors contributed equally to this work.

Received: 7 November 2019; Accepted: 20 December 2019; Published: 28 December 2019



Abstract: Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors are non-selective cation channels responsive to a variety of exogenous irritants and endogenous stimuli including products of oxidative stress. It is mainly expressed by primary sensory neurons; however, expression of TRPA1 by astrocytes and oligodendrocytes has recently been detected in the mouse brain. Genetic deletion of TRPA1 was shown to attenuate cuprizone-induced oligodendrocyte apoptosis and myelin loss in mice. In the present study we aimed at investigating mGFAP-Cre conditional TRPA1 knockout mice in the cuprizone model. These animals were generated by crossbreeding GFAP-Cre^{+/-} and floxed TRPA1 (TRPA1^{Fl/Fl}) mice. Cuprizone was administered for 6 weeks and demyelination was followed by magnetic resonance imaging (MRI). At the end of the treatment, demyelination and glial activation was also investigated by histological methods. The results of the MRI showed that demyelination was milder at weeks 3 and 4 in both homozygous (GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl}) and heterozygous (GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-}) conditional knockout animals compared to Cre^{-/-} control mice. However, by week 6 of the treatment the difference was not detectable by either MRI or histological methods. In conclusion, TRPA1 receptors on astrocytes may transiently contribute to the demyelination induced by cuprizone, however, expression and function of TRPA1 receptors by other cells in the brain (oligodendrocytes, microglia, neurons) warrant further investigation.

Keywords: transient receptor potential ankyrin 1; cuprizone; demyelination; astrocyte; conditional knockout; magnetic resonance imaging

1. Introduction

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptors are non-selective cation channels which are responsive to a variety of exogenous and endogenous stimuli including mustard oil, cinnamaldehyde, irritant chemicals such as formalin or acrolein, as well as reactive oxygen species

and oxidized lipid molecules [1–3]. Apart from being a nocisensor for exogenous irritant compounds, it has been suggested to work as a sensor for oxidative stress [4]. Originally described to be localized on a subgroup of nociceptive primary afferent neurons [5,6], it was later revealed that TRPA1 is also expressed at lower levels by various non-neuronal cells including keratinocytes, endothelial cells and cells of the gastrointestinal mucosa [1–3,7]. More importantly, several studies have supported the presence of TRPA1 receptors in the brain on astrocytes [8–10], as well as oligodendrocytes [11]. A recent cell-specific transcriptome analysis of the mouse cortex revealed low level expression of TRPA1 on neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia, as well [12].

In astrocytes, TRPA1 receptors were implicated in both physiological and pathophysiological processes. Astrocyte TRPA1 receptors were shown to regulate resting Ca^{2+} levels and modulate GABA-ergic inhibitory transmission by reducing GABA transport [8]. TRPA1 receptors on astrocytes were also suggested to play a role in long-term potentiation in the mouse hippocampus [9]. Since reactive astrocytes can contribute to the progression of neuroinflammation in neurodegenerative diseases [13,14], several workgroups, including ours, had started to investigate the role of TRPA1 in animal models of neurodegenerative diseases. Our previous study aimed at examining the role of TRPA1 in the cuprizone-induced demyelination model in mice. Cuprizone treatment constitutes an accepted non-immune animal model of multiple sclerosis [15,16] which produces lesions resembling type III lesions seen in patients [17]. Feeding mice with cuprizone leads to a well-reproducible demyelination of the corpus callosum as well as other subcortical and cortical brain areas by inducing oligodendrocyte apoptosis and a secondary activation of astrocytes and microglia [15,16,18–21]. We have revealed that demyelination of the corpus callosum was significantly reduced in TRPA1 receptor gene-deleted mice [22,23]. Based on our data we have assumed that TRPA1 receptors localized on astrocytes may influence the astrocyte-oligodendrocyte crosstalk. Activation of these receptors on the astrocytes increases the intracellular Ca^{2+} concentration and subsequent release of mediators. Astrocyte-derived signaling molecules may contribute to the apoptosis of oligodendrocytes by promoting the proapoptotic p38-MAPK pathway resulting in c-Jun activation [22]. We have also shown that TRPA1 deficiency did not affect the number of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) during cuprizone treatment. In TRPA1 KO mice, there was no increase or a less pronounced increase of growth factors promoting OPC proliferation (FGF-2, IGF-1). The level of Bak mRNA, a marker of apoptosis and levels of pro-apoptotic signalling proteins were significantly lower in cuprizone-treated TRPA1 KO animals. All these data suggest that TRPA1 deficiency did not affect oligodendrocyte development but reduced the apoptosis of mature oligodendrocytes [22]. In contrast with our theory, Hamilton and coworkers assumed a direct action of TRPA1 activation on myelination. They detected the functional expression of TRPA1 on oligodendrocytes and showed that ischemia-induced demyelination was diminished in the lack of TRPA1 receptors [11]. Likewise, another group showed that in TRPA1 receptor gene-deleted mice behavioral deficits and neuroinflammation were less severe in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [24]. The same group also later demonstrated that the loss of TRPA1 is associated with decreased anxiety-like behavior and improved performance in spatial memory and social discrimination tests [25].

Based on these prior data we focused on further elucidating the role of TRPA1 receptors in the cuprizone model. In the present study, the effects of cuprizone in the corpus callosum were studied in mGFAP-driven conditional TRPA1 knockout mice.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics

The study was designed and conducted according to European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) on the protection of animals used for scientific purposes. The project was approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary and licensed by the Government Office of Baranya County (license No. BA02/2000-82/2017).

2.2. Animals

Animals were bred in the Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy of the University of Pécs and kept in the Animal House of the Szentágothai Research Center during the experiments. Mice were housed in groups of 3–7 in standard polycarbonate cages on wood shavings bedding. Food and water were provided *ad libitum*. The temperature was maintained at 24 °C and the lighting was set to a 12 h light-dark cycle (lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m.).

The mGFAP-driven conditional TRPA1 receptor knockout mice were produced via crossbreeding floxed TRPA1 carrying mice (B6.129S-Trpa1tm2Kykwl/J) by GFAP promoter directed Cre recombinase gene expressing mice (B6.Cg-Tg(Gfap-cre) 77.6Mvs/2J) both obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), stock numbers #008650 and #024098, respectively. Only female mice carrying the GFAP-Cre transgene were used to prevent non-specific Cre activation during spermatogenesis. The GFAP-Cre transgene was also maintained in heterozygote form, to minimize the chance of non-specific recombination. As the first step, GFAP-Cre heterozygote females were crossbred by floxed TRPA1 homozygote males. Next, female mice heterozygote for both genes were backcrossed by floxed TRPA1 homozygote males. The obtained male Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} mice were the main subjects of the experiments, whereas their male siblings (Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1}) were used as hetero controls and Cre negative controls, respectively. Animals showing a global KO genotype by tail analysis were excluded from the experiments (approximately 10% of all genotyped Cre^{+/-} animals).

Genotyping of floxed TRPA1 was done according to the protocol suggested by the provider, using forward primer oIMR9168 (AGC AGG AGC AGA AGT ATG GAA) and reverse primer oIMR9169 (GAA GGC CAT GGC ATC TTA AC) producing 359 bp (floxed) and/or 472 bp (wild type) PCR products.

Genotyping of GFAP-Cre was done by forward primer 15831 (TCC ATA AAG GCC CTG ACA TC) and reverse primer 15832 (TGC GAA CCT CAT CAC TCG T) also using internal positive control forward primer oIMR8744 (CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG) and reverse primer oIMR8745 (GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT) which produced 200 bp (internal positive control) and ~400 bp (GFAP-Cre positive) PCR products. Genotyping of conditional TRPA1 receptor knockout was carried out by using forward primer exon 21 (TGT TCC TCA ACA TCC CAG CG), second forward primer oIMR9168 (AGC AGG AGC AGA AGT ATG GAA) and reverse primer oIMR9169 (GAA GGC CAT GGC ATC TTA AC) producing 609 bp (knockout), 359 bp (intact floxed) and/or 472 bp (intact wild type) PCR products, respectively. RT-PCR analysis of conditional TRPA1 receptor knockout messenger RNA was done by forward primer exon 21 (TGT TCC TCA ACA TCC CAG CG) and reverse primer exon 25 (CGT GCC TGG GTC TAT TTG GA) which produce 573 bp (intact) or 191 bp (knockout) RT-PCR products.

2.3. Mouse TRPA1 Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from homogenized brain samples by using TRI Reagent (Molecular Research Centre Inc., Cincinnati, OH, USA) and Direct-Zol RNA isolation kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was quantified by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and 1 µg total RNA was treated with DNase I (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) to remove genomic DNA contamination from the samples. First strand cDNA synthesis was carried out with 0.5 µg of total RNA/sample using Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). In the PCR reaction we used SensiFast Probe Lo-ROX Kit (Bioline Inc., London, UK) and forward primer 5' atgccttcagcacccttg (binding site in exon 23), reverse primer 5' gacctcagcaatgtcccaa (binding site in exon 24) and labeled probe 56FAM/tgggcagct/ZEN/tattgccttcacaat/3IABkFQ (binding site in exon 23), 1 µM each, all obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). The following PCR protocol was used on an Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) Quantstudio5 quantitative PCR machine: 3 min 95 °C original denaturation, followed by 40 cycles of 30 s 95 °C denaturation, 30 s 62 °C annealing, 1 min 72 °C extension. The sites of the primers and probe are missing from the Cre-Lox recombined mRNA therefore this assay measures only the amount of intact TRPA1 mRNA. Mouse beta-actin mRNA was used as reference and the expression was determined by using Prime Time Std qPCR Assay

Mm.PT.58.33540333 obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) under the same PCR conditions. All qRT-PCR assays were done in duplicates in each sample and Ct values were determined. dCt values were obtained by subtracting the corresponding beta-actin Ct values from the TRPA1 Ct values. ddCt values were calculated for each sample by subtracting the average dCt value of the Cre^{-/-} group (representing the 100% expression level) from each dCt value. Finally, for each sample the obtained ddCt were converted to relative expression level by the $100/(2^{\text{ddCt}})$ formula.

2.4. Cuprizone Treatment

Cuprizone was administered orally for 6 weeks as previously described [22,23]. Briefly, standard rodent chow was ground and 0.2% cuprizone was thoroughly mixed into ground chow which was placed into the cages in small ceramic bowls. Control mice were fed the milled chow without the addition of cuprizone. The chow was provided *ad libitum* to all groups and it was changed to a fresh batch each day. The general health status of animals was also monitored daily and body weights were measured every 2 days.

2.5. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

The timeline of demyelination was monitored by T2-weighted MRI measurements on 4 mice from each group. Animals were scanned once before cuprizone administration and later once per week starting from week 2 of the treatment. The measurements were performed using a Bruker[®] PharmaScan[®] (4.7 T) small animal MRI instrument (Bruker, Billerica, MA, USA).

Anesthesia was induced by 3.5% *v/v* of isoflurane in a gas mixture of 33% O₂ and 66% N₂O via induction chamber and maintained with 1–2% isoflurane in a rodent face mask controlled by respiratory monitoring and gating system.

The imaging protocol was performed on the same day and same time each week. After B₀ mapping a multislice T2 Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (RARE) experiment was performed (TR/TE: 3000/50 ms, FOV: 16 × 16 mm, Thk: 0.8 mm, Gap: 0.2 mm, matrix: 160 × 160, 4 averages, RARE factor: 4) on seven coronal slices positioned to cover the whole corpus callosum. The total imaging time was roughly 12 min per animal.

Before the analysis, all imaging data were converted first into a Digital Imaging Communications in Medicines (DICOM) format and stored in an isolated hardware in a local system. Any further processing was performed via DICOM-handling software packages. (3D-Slicer v4.6 NA-MIC and Onis v2.5, Digitalcore, Tokyo, Japan) [26]. For the quantification of the damage, regions of interests (ROI) were manually circumscribed, fitted by anatomical structures in the medial corpus callosum and the signal intensities (as mean ± SEM) of ROIs have been recorded. Results were expressed in percentage of intensity ratio, compared to the pre-treatment intensity (considered as 100%) measured in the identical brain area of the same individual animal. The evaluation was performed in a blinded manner.

2.6. Histological Assessment of Cuprizone-Induced Changes in the Corpus Callosum

Animals were anesthetized with pentobarbital (70 mg/kg *i.p.*) at the end of the cuprizone treatment (week 6) and perfused transcardially in two steps, first with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and then with 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. Brains were postfixed over one night in the same fixative. 5 μm thin coronal sections from paraffin embedded brains were made and mounted onto a silane-coated slides.

2.6.1. Luxol Fast Blue-cresyl Violet (LFB/CV) Staining

LFB/CV staining was used to evaluate the severity of demyelination as described previously [20,22] on coronal sections obtained from different regions (0.14, −0.22, −1.06, and −1.94 mm) according to the mouse brain atlas of Paxinos and Franklin [27]. Brain sections on silane-coated slides were rehydrated in graded series of alcohol and incubated at 60 °C in LFB solution (0.01%), overnight. Thereafter, sections were differentiated in a solution of Li₂CO₃ (0.05%) and counterstained with CV. Four sections

of each animal were scored by a semiquantitative four-tiered scoring system (0–3) in a blinded manner. Intact myelin was scored with 0 and the totally damaged myelin was labeled with score 3.

2.6.2. Immunohistochemical Detection of Myelin Basic Protein (MBP) and Astrocyte and Microglia Markers

In addition to the LFB/CV staining, immunohistochemical detection of myelin basic protein (MBP) was also performed to evaluate demyelination. Furthermore, astrocyte and microglia activation in the corpus callosum was detected with immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1), respectively. Briefly, 8 μm -thick paraffin sections were deparaffinized and heat-unmasked in citrate buffer. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity, treated with BSA and incubated for 1 h with the following primary antibodies: anti-MBP (1:100, mouse monoclonal antibody from Novocastra/Leica Biosystems (Nussloch, Germany, catalogue No. NCL-MBP; Antibody Registry No AB_563893), anti-GFAP (1:1000, rabbit polyclonal antibody from Dako, Glostrup, Denmark; catalogue No. Z0334; Antibody Registry No AB_10013382) to visualize astrocytes, anti-Iba1, (1:500, rabbit polyclonal antibody from Wako Chemicals, Neuss, Germany; catalogue No. 019-19741; Antibody Registry No AB_839504) as a marker for microglia/macrophages. Incubation was performed with the HISTO-Labeling System, the reaction was visualized using 3,3'-diaminobenzidine reaction. Sections were photographed with an Olympus DP50 camera attached to an Olympus BX51 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) under 200x magnification. Quantification was performed by determining the mean density of equal-sized regions of interest of the medial corpus callosum with the Image-ProPlus software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). The experimenter evaluating the slides was blinded to the group allocation.

2.7. Materials

Cuprizone and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise previously indicated. Pentobarbital (Euthanimal 20% injection ad us. vet.) was obtained from Alfasan Nederland B.V. (Woerden, The Netherlands) while isoflurane was purchased from Medicus Partner Ltd. (Biatorbágy, Hungary).

2.8. Statistics

In each group, means \pm S.E.M. of parameters were calculated. Statistical analysis was carried out with the GraphPad Prism 8.0.1 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For comparison of qPCR relative expression values and MRI relative intensity values, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used. Paired t-test was used to compare density values of LFB/CV and immunohistological staining, * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Determination of TRPA1 mRNA Levels in the Mouse Brain

Intact TRPA1 mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR in brain samples of GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1} compared to GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} mice. The obtained relative expression levels, means and standard deviations are presented in Figure 1 for each group. Compared to GFAP-Cre^{-/-} control mice where TRPA1 expression level was $102 \pm 22\%$, both the GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} mouse groups had lower expression levels, $68 \pm 28\%$ and $77 \pm 23\%$, respectively. These results indicate that some of the TRPA1 mRNA was lost due to Cre-LoxP recombination in both GFAP-Cre^{+/-} groups. ANOVA statistical analysis showed that there was a significant difference between the groups ($p=0.0017$). The post hoc test demonstrated that the differences were significant when both the GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} group were compared to the GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1} control group ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively),

but there was no significant difference in TRPA1 mRNA expression between the GFAP-Cre^{+/-} groups (Figure 1).

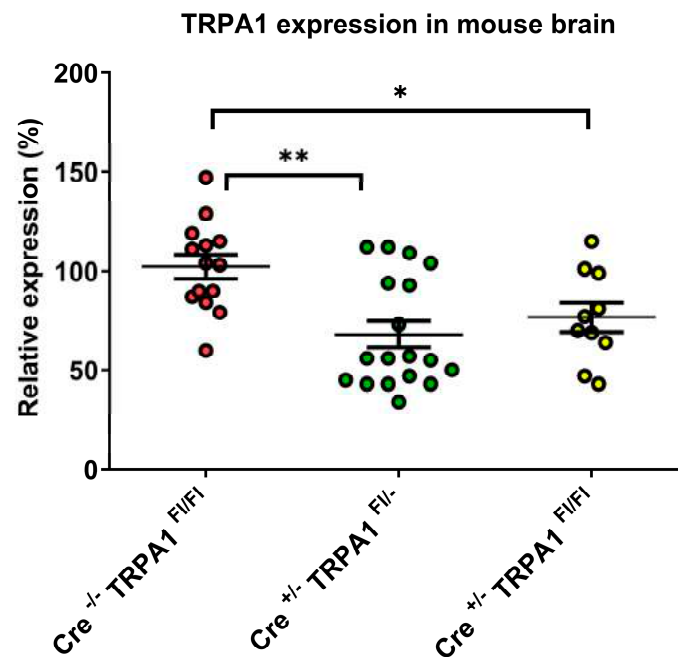


Figure 1. Relative expression levels of TRPA1 mRNA in the brain in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{Fl/Fl} ($n = 7$), GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} ($n = 5$) and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} mice ($n = 9$). Asterisks show statistically significant differences between the indicated groups ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

3.2. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

The timeline of damage was followed by the evaluation of signal intensity changes of T2 weighted MRI (Figure 2) in the medial part of the corpus callosum between week 2 and 6.

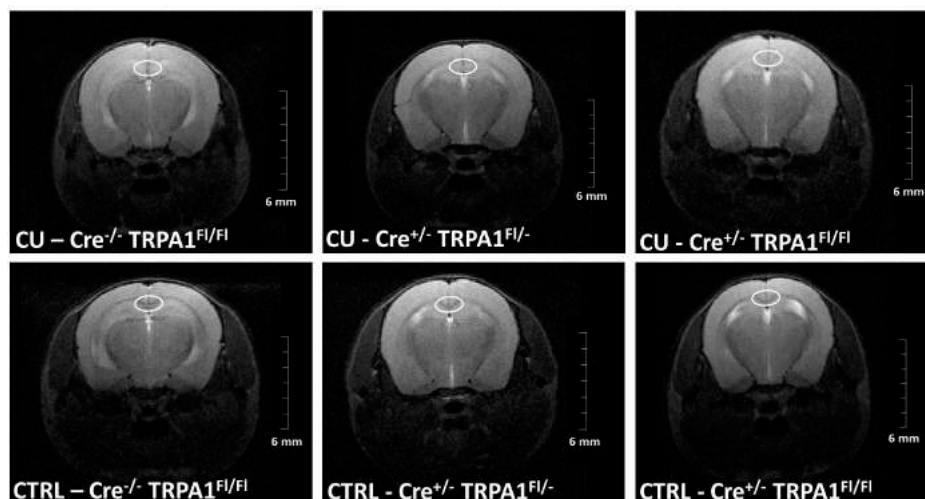


Figure 2. Representative MR images, constructed on fourth week. The medial corpus callosum is highlighted by a white ellipse.

The intensities in the untreated control groups were not significantly different and no changes were detected in any of the control animals throughout the whole experiment. (Figure 3a). In contrast, the signal intensity was significantly increased in cuprizone-treated GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{Fl/Fl} mice compared to GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} animals on week 3 and week 4 ($*p <$

0.05, $**p < 0.01$; Figure 3b). The most pronounced increase was detected on the fourth week, 179.75% in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1} group versus 134.25% (GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-}) and 134.75% (GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1}). These results indicate that the myelin damage was less severe in the corpus callosum of both heterozygous and homozygous mGFAP-Cre conditional TRPA1 knockout mice on weeks 3 and 4. The difference between genotypes decreased at later time points. At the end of the treatment we did not detect significant differences between the cuprizone-treated GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} animals. Each cuprizone-treated group showed a significantly elevated intensity from the third to sixth weeks compared to their respective control groups (Figure 3a,b; significance not shown).

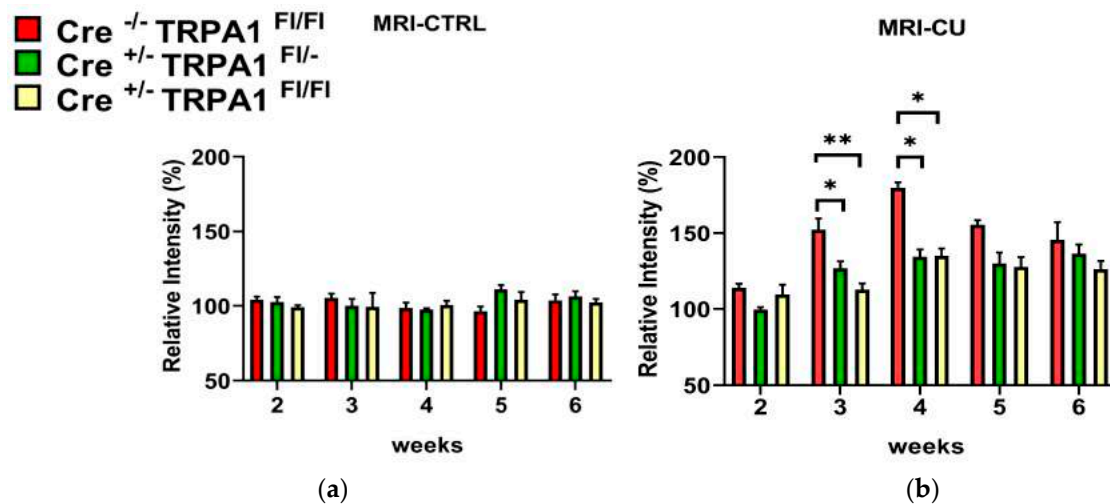


Figure 3. Changes of signal intensity in the medial corpus callosum measured by magnetic resonance imaging between week 2 and 6 of cuprizone treatment in (a) control (CTRL) and (b) cuprizone-treated (CU) groups of GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} mice. Data are means \pm S.E.M. of images obtained from animals (n = 4/group). The signal intensities were normalized to the baseline values (100%) for each animal and indicated by percentages of relative intensity. Asterisks show statistically significant differences between respective CU and CTRL groups ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$).

3.3. Cuprizone-Induced Demyelination Determined by LFB/CV Staining and MBP Immunohistochemistry

After the six weeks of the treatment, significant demyelination was detected in all three cuprizone-treated groups with the LFB/CV staining, compared to their respective control groups (Figure 4a,b). No statistically significant differences were found between the demyelination scores of the three genotypes. Likewise, immunohistochemical staining of MBP revealed a significant reduction in all cuprizone-fed animals compared to controls, but no difference was detected between the MBP content of GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} mice (Figure 5a,b). The results show that the attenuating effect of mGFAP-driven conditional deletion of the TRPA1 receptor on the severity of cuprizone-induced demyelination was diminished by week 6 of treatment.

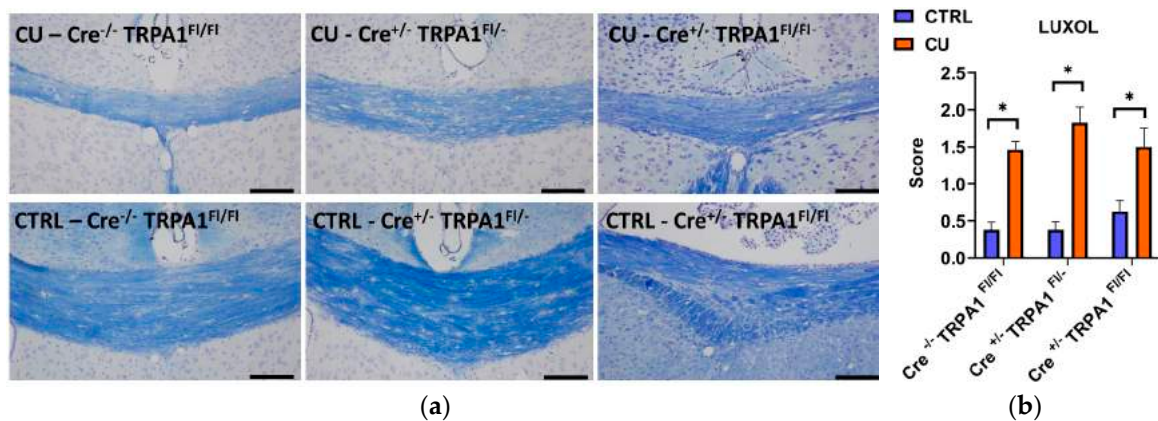


Figure 4. Evaluation of myelin content with Luxol Fast Blue/cresyl violet (LFB/CV) staining after 6 weeks of cuprizone treatment **(a)**. Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{Fl/Fl}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} mice.; **(b)** Semiquantitative demyelination scores of LFB/CV staining, * $p < 0.05$, $n = 3-5$ /group, Scale bar = 100 μm .

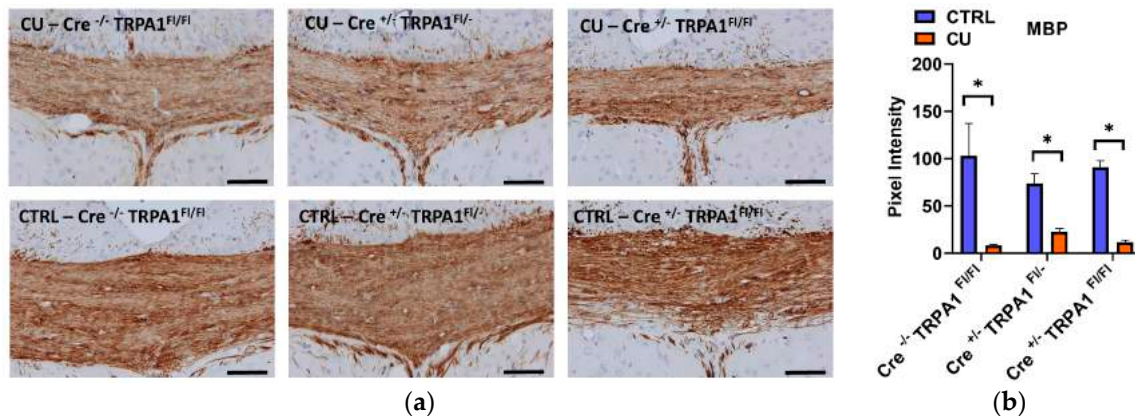


Figure 5. Evaluation of myelin content with myelin basic protein (MBP) immunohistochemistry after 6 weeks of cuprizone treatment **(a)**. Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{Fl/Fl}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} mice.; **(b)** Pixel intensities of diaminobenzidine staining in the middle part of the corpus callosum in each group, * $p < 0.05$, $n = 3-5$ /group, Scale bar = 100 μm .

3.4. Cuprizone-Induced Astrocyte and Microglia Activation

At the end of the 6-week treatment, a significant increase of GFAP and Iba1 immunostaining was detected in all three cuprizone-treated groups, compared to their respective control groups (Figures 6a and 7a). Quantifying the intensity of the staining, no statistically significant differences were found in the DAB staining intensities between the three genotypes (Figures 6b and 7b). Therefore, by the end of the 6-week treatment the mGFAP-driven conditional deletion of the TRPA1 receptor had no effect on the astrocyte and microglia accumulation induced by cuprizone.

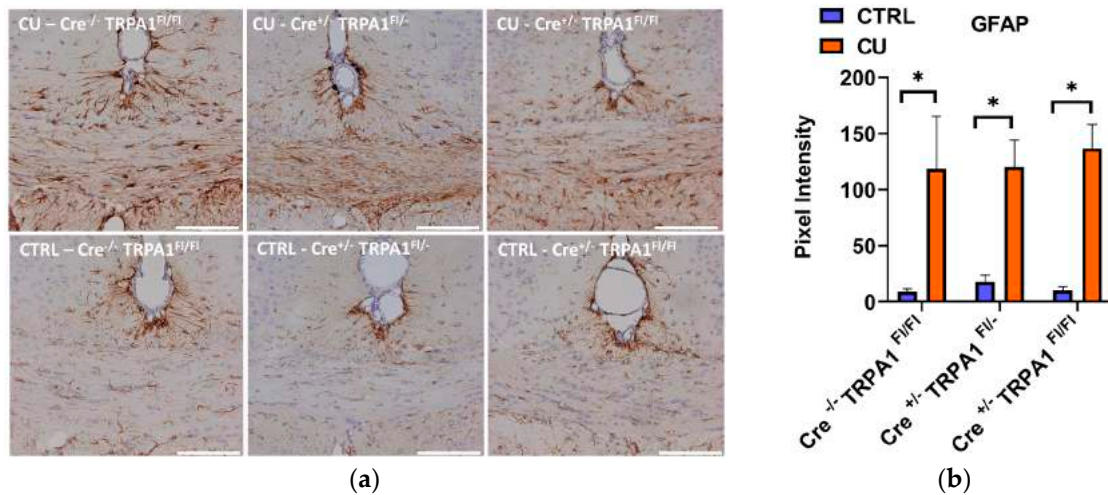


Figure 6. Evaluation of astrocyte activation by GFAP immunohistochemistry after 6 weeks of cuprizone treatment (a) Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{Fl/Fl}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} mice.; (b) Pixel intensities of diaminobenzidine staining in the middle part of the corpus callosum in each group; **p* < 0.05, *n* = 3–5/group, Scale bar = 100 μm.

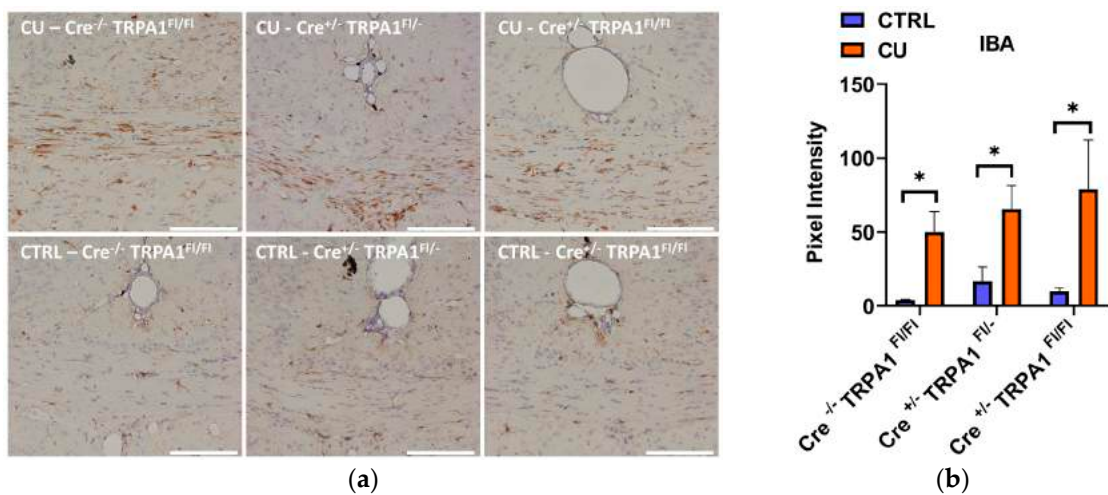


Figure 7. Evaluation of microglia activation by Iba1 immunohistochemistry after 6 weeks of cuprizone treatment (a) Representative images of control (CTRL) and cuprizone-treated (CU) groups in GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{Fl/Fl}, GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{Fl/Fl} mice.; (b) Pixel intensities of diaminobenzidine staining in the middle part of the corpus callosum in each group **p* < 0.05, *n* = 3–5/group, Scale bar = 100 μm.

4. Discussion

In the present study we have investigated the modulatory role of TRPA1 receptors expressed by GFAP positive cells in the cuprizone-induced demyelination model using mGFAP-driven conditional TRPA1 receptor knockout mice. The glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a generally accepted marker of astrocytes. Brain diseases are characterized by the active inflammatory state of astrocytes, which is usually manifested as up-regulation of GFAP [28].

Our results show that the genetic lack of TRPA1 receptors in GFAP positive cells influences the demyelination process induced by cuprizone feeding in mice. Reduced pathological changes were detected in the corpus callosum by MRI between the 3rd and 5th weeks of the treatment. In contrast, at the end of week 6, no significant differences were found in the demyelination evaluated either by MRI or histology.

In a previous study using embryonic global TRPA1 KO animals we demonstrated that TRPA1 receptor deficiency attenuated the cuprizone-induced demyelination by reduction of apoptosis of mature oligodendrocytes [22]. Additionally, it was recently published that oligodendrocytes express TRPA1 receptors [11]. Therefore, a direct effect of TRPA1 activation on oligodendrocyte apoptosis in the cuprizone model could be hypothesized. Since our investigations have not provided sufficient evidence for TRPA1 expression in oligodendrocytes, it was presumed that TRPA1 receptor deficiency might alleviate the cuprizone-induced loss of mature oligodendrocytes by altering the release of mediators by astrocytes. TRPA1 receptors localized on astrocytes may participate in the astrocyte-oligodendrocyte crosstalk. Since TRPA1 can be triggered by several noxious stimuli, including inflammation, tissue damage or oxidative stress on one hand, and astrocytes influence the extent of this toxin-induced demyelination on the other [29], we assumed that this receptor might modulate the demyelination process. Numerous earlier studies have provided substantial morphological and functional evidence that astrocytes express the TRPA1 receptor, functioning as a regulator of resting Ca^{2+} levels [8,9,24,30,31]. In a very recent study, Oh et al., using the cell-type-specific gene-silencing and ultrasensitive sniffer-patch techniques, identified astrocytes as the cellular target and TRPA1 as the molecular sensor for the low intensity, low frequency ultrasound (LILFU). They demonstrated that LILFU-induced neuromodulation was initiated by opening of TRPA1 channels in astrocytes. The Ca^{2+} entry through TRPA1 caused a release of gliotransmitters including glutamate from the astrocytes activating NMDA receptors in neighboring neurons [32]. In another newly-published paper, Xia et al. raised the involvement of TRPA1 in myelin damage and oxidative stress injury in a mouse intracerebral hemorrhage (ICH) model. They showed that TRPA1 was activated by the increased reactive oxygen species (ROS) after ICH, leading to an increase of Ca^{2+} influx. The increased Ca^{2+} further contributed to the rise in NOX1 and Calpain1, causing oxidative stress damage and myelin degradation. [33].

Since our previous data also supported the TRPA1 immunopositivity of astrocytes in the corpus callosum and astrocytic reactions were less prominent in cuprizone-treated TRPA1 receptor deficient mice compared to wild-type counterparts, we have supposed a pivotal role of TRPA1 receptors expressed by astrocytes [22]. For our further investigations, mGFAP-driven conditional TRPA1 knockout mice were bred by our laboratory in order to reveal the precise role of astrocytic TRPA1 receptors. These mice were created via crossbreeding floxed TRPA1 carrying mice (B6.129S-Trpa1^{tm2Kyk/w}/J) by GFAP promoter-directed Cre recombinase gene expressing mice (B6.Cg-Tg(Gfap-cre) 77.6Mvs/2J). This technique allows the selective cutout of the *Trpa1* gene only from the GFAP-positive cells and the examination of cuprizone-induced demyelination in the lack of astrocyte-specific TRPA1 receptors.

Cuprizone-treatment significantly increased T2-weighted MRI signal intensities measured on the 3rd and 4th weeks in all three animal groups compared to the baseline, proving the reliability of the model. Myelin loss with the concomitant water accumulation enhances the signal intensity on T2-weighted MR images [34]. The intensity of T2-weighted images of ROIs corresponding to the medial corpus callosum was reproducible. Remarkably, the MRI was sensitive enough to notice the milder severity of myelin loss in GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-} and GFAP-Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1} animals compared to the GFAP-Cre^{-/-} TRPA1^{F1/F1} group. The most pronounced difference was detected on the 4th week, but the disparity decreased at later time points. In our previous study in the cuprizone model with embryonic global TRPA1 KO mice, we provided MRI-based evidence that the severity of myelin loss in the gene-deleted animals was significantly lower at all measurement points during the six-week experiment compared to the wild-type controls [23]. In accordance with the present results, the largest differences in signal intensities were detected on the 3rd and 4th weeks. Considering the data of the follow-up in vivo imaging, we conclude that genetic loss of the astrocyte-specific TRPA1 receptors attenuates the progress of demyelination in the corpus callosum, but these effects can be noticed only at the time of the most intensive pathological changes. The homozygote (Cre^{+/-} TRPA1^{F1/F1}) and heterozygote (Cre^{+/-} TRPA1^{F1/-}) mice showed similar alterations which is explained by a similar reduction of mRNA levels in both genotypes. However, by the 6th week these disparities had disappeared, as we could not detect any differences with histological examinations at the end of

the study. Neither the semiquantitative scoring of demyelination, based on Luxol fast blue staining technique, nor the MBP immunohistochemistry showed significant differences in the mGFAP-driven conditional TRPA1 knockout mice compared to the Cre^{-/-} controls. Similarly to the demyelination, the cuprizone-induced accumulation of the astrocytes and microglial cells in the corpus callosum was not influenced by the genetic loss of TRPA1 in the GFAP positive cells. In contrast to the results obtained with embryonic global TRPA1 KO mice, these results suggest that deletion of the receptor in the astrocytes does not exert substantial inhibitory effect eventually on the six-week cuprizone treatment-induced demyelination of the corpus callosum.

5. Conclusions

According to the currently available data, we presume that TRPA1 receptors localized on astrocytes can be activated by electrophilic ligands, reactive oxygen species in response to cuprizone challenge and the consequent release of pro-inflammatory mediators contributes to the progression of oligodendrocyte apoptosis. However, since the global TRPA1 KO mice presented a more attenuated demyelination compared to the conditional KO mice, it can be concluded that TRPA1 receptors on astrocytes contribute to the demyelination induced by cuprizone only transiently and TRPA1 receptors expressed by other cell types in the brain (e. g. oligodendrocytes, microglia, neurons) may participate in the demyelination process [11,33]. The expression and function of TRPA1 receptors by other cells in the brain warrant further investigation.

Author Contributions: Conceptualization, E.P., Z.S., K.B., P.Á. S.K.; methodology, G.K., K.B., P.Á., Z.S., Z.B., E.P.; formal analysis, G.K., K.B., B.N., Z.S., P.Á., Z.B.; investigation, G.K., K.B., B.N., Z.S., P.Á.; writing—original draft preparation, G.K., K.B., B.N., Z.S., E.P.; writing—review and editing, G.K., K.B., B.N., Z.S., P.Á., S.K., Z.B., E.P.; supervision, E.P., Z.S., K.B., P.Á., Z.B.; funding acquisition, E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants “The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics” (EFOP-3.6.2-16-2017-00008); EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009; Hungarian Brain Research Program 2. 2017-1.2.1-NKP-2017-00002. and the University of Pécs is acknowledged for a support by the 17886-4/23018/FEKUTSTRAT excellence grant. G.K. was supported by Richter Gedeon Centenarium Foundation.

Acknowledgments: The authors wish to thank Krisztina Fülöp and Anikó Perkecz for expert technical assistance in the histological techniques. The authors also acknowledge Anett Vranesics for contributing to the development of the MRI protocol.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Nilius, B.; Appendino, G.; Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: From gene to pathophysiology. *Pflug. Arch.* **2012**, *464*, 425–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Chen, J.; Hackos, D.H. TRPA1 as a drug target—promise and challenges. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2015**, *388*, 451–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Talavera, K.; Startek, J.B.; Alvarez-Collazo, J.; Boonen, B.; Alpizar, Y.A.; Sanchez, A.; Naert, R.; Nilius, B. Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: From structure to disease. *Physiol. Rev.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Andersson, D.A.; Gentry, C.; Moss, S.; Bevan, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 2485–2494. [[CrossRef](#)]
5. Story, G.M.; Peier, A.M.; Reeve, A.J.; Eid, S.R.; Mosbacher, J.; Hricik, T.R.; Earley, T.J.; Hergarden, A.C.; Andersson, D.A.; Hwang, S.W.; et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **2003**, *112*, 819–829. [[CrossRef](#)]
6. Kobayashi, K.; Fukuoka, T.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Dai, Y.; Tokunaga, A.; Noguchi, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with aδ/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *493*, 596–606. [[CrossRef](#)]

7. Fernandes, E.; Fernandes, M.; Keeble, J. The functions of TRPA1 and TRPV1: Moving away from sensory nerves. *Br. J. Pharm.* **2012**, *166*, 510–521. [[CrossRef](#)]
8. Shigetomi, E.; Tong, X.; Kwan, K.Y.; Corey, D.P.; Khakh, B.S. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 70–80. [[CrossRef](#)]
9. Shigetomi, E.; Jackson-Weaver, O.; Huckstepp, R.T.; O'Dell, T.J.; Khakh, B.S. TRPA1 Channels Are Regulators of Astrocyte Basal Calcium Levels and Long-Term Potentiation via Constitutive D-Serine Release. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 10143–10153. [[CrossRef](#)]
10. Verkhatsky, A.; Reyes, R.C.; Parpura, V. TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia. *Rev. Physiol Biochem Pharm.* **2014**, *166*, 1–22. [[CrossRef](#)]
11. Hamilton, N.B.; Kolodziejczyk, K.; Kougioumtzidou, E.; Attwell, D. Proton-gated Ca²⁺-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature* **2016**, *529*, 523–527. [[CrossRef](#)]
12. Zhang, Y.; Chen, K.; Sloan, S.A.; Bennett, M.L.; Scholze, A.R.; O'Keeffe, S.; Phatnani, H.P.; Guarnieri, P.; Caneda, C.; Ruderisch, N.; et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 11929–11947. [[CrossRef](#)]
13. Ben Haim, L.; Carrillo-de Sauvage, M.-A.; Ceyzériat, K.; Escartin, C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*. [[CrossRef](#)]
14. Li, K.; Li, J.; Zheng, J.; Qin, S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis* **2019**, *10*, 664–675. [[CrossRef](#)]
15. Kipp, M.; Clarner, T.; Dang, J.; Copray, S.; Beyer, C. The cuprizone animal model: New insights into an old story. *Acta Neuropathol.* **2009**, *118*, 723–736. [[CrossRef](#)]
16. Kipp, M.; Nyamoya, S.; Hochstrasser, T.; Amor, S. Multiple sclerosis animal models: A clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol.* **2017**, *27*, 123–137. [[CrossRef](#)]
17. Lucchinetti, C.; Brück, W.; Parisi, J.; Scheithauer, B.; Rodriguez, M.; Lassmann, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* **2000**, *47*, 707–717. [[CrossRef](#)]
18. Matsushima, G.K.; Morell, P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* **2001**, *11*, 107–116. [[CrossRef](#)]
19. Praet, J.; Guglielmetti, C.; Berneman, Z.; Van der Linden, A.; Ponsaerts, P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2014**, *47*, 485–505. [[CrossRef](#)]
20. Ács, P.; Kálmán, B. Pathogenesis of Multiple Sclerosis: What Can We Learn from the Cuprizone Model. In *Autoimmunity*; Perl, A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2012; Volume 900, pp. 403–431. ISBN 978-1-60761-719-8.
21. Gudi, V.; Gingele, S.; Skripuletz, T.; Stangel, M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: Lessons learned. *Front. Cell Neurosci.* **2014**, *8*, 73. [[CrossRef](#)]
22. Ságghy, É.; Sipos, É.; Ács, P.; Bölcskéi, K.; Pohóczky, K.; Kemény, Á.; Sándor, Z.; Szóke, É.; Sétáló, G.; Komoly, S.; et al. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination—A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia* **2016**, *64*, 2166–2180. [[CrossRef](#)]
23. Bölcskéi, K.; Kriszta, G.; Ságghy, É.; Payrits, M.; Sipos, É.; Vranesics, A.; Berente, Z.; Ábrahám, H.; Ács, P.; Komoly, S.; et al. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *J. Neuroimmunol.* **2018**, *320*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lee, K.-I.; Lee, H.-T.; Lin, H.-C.; Tsay, H.-J.; Tsai, F.-C.; Shyue, S.-K.; Lee, T.-S. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **2016**, *13*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lee, K.-I.; Lin, H.-C.; Lee, H.-T.; Tsai, F.-C.; Lee, T.-S. Loss of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Deregulates Emotion, Learning and Memory, Cognition, and Social Behavior in Mice. *Mol Neurobiol* **2017**, *54*, 3606–3617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fedorov, A.; Beichel, R.; Kalpathy-Cramer, J.; Finet, J.; Fillion-Robin, J.-C.; Pujol, S.; Bauer, C.; Jennings, D.; Fennessy, F.; Sonka, M.; et al. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging* **2012**, *30*, 1323–1341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Paxinos, G.; Franklin, K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001; ISBN 978-0-12-547636-2.

28. Siracusa, R.; Fusco, R.; Cuzzocrea, S. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
29. Skripuletz, T.; Hackstette, D.; Bauer, K.; Gudi, V.; Pul, R.; Voss, E.; Berger, K.; Kipp, M.; Baumgärtner, W.; Stangel, M. Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain* **2013**, *136*, 147–167. [[CrossRef](#)]
30. Lee, S.M.; Cho, Y.S.; Kim, T.H.; Jin, M.U.; Ahn, D.K.; Noguchi, K.; Bae, Y.C. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* **2012**, *45*, 45–49. [[CrossRef](#)]
31. Bosson, A.; Paumier, A.; Boisseau, S.; Jacquier-Sarlin, M.; Buisson, A.; Albrieux, M. TRPA1 channels promote astrocytic Ca²⁺ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide. *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12*, 53. [[CrossRef](#)]
32. Oh, S.-J.; Lee, J.M.; Kim, H.-B.; Lee, J.; Han, S.; Bae, J.Y.; Hong, G.-S.; Koh, W.; Kwon, J.; Hwang, E.-S.; et al. Ultrasonic Neuromodulation via Astrocytic TRPA1. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, 3386–3401.e8. [[CrossRef](#)]
33. Xia, M.; Chen, W.; Wang, J.; Yin, Y.; Guo, C.; Li, C.; Li, M.; Tang, X.; Jia, Z.; Hu, R.; et al. TRPA1 Activation-Induced Myelin Degradation Plays a Key Role in Motor Dysfunction After Intracerebral Hemorrhage. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*. [[CrossRef](#)]
34. Merkler, D.; Boretius, S.; Stadelmann, C.; Ernsting, T.; Michaelis, T.; Frahm, J.; Brück, W. Multicontrast MRI of remyelination in the central nervous system. *Nmr Biomed.* **2005**, *18*, 395–403. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).