

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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.

1. Általános bevezetés

1.1. Transzgenikus állatok és sejtvonalak létrehozása

Az emberi szervezet molekuláris szintű fiziológiás és patológiás 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 génhiányos (*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 *Trpa1* gént az asztrocita sejtekből Cre-loxP rendszerrel. A loxP helyek közötti *Trpa1* 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 megkezd 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 szövődmények 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 Tranziens 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 (11). A TRPA1 receptor aktivációja akut fájdalomérzetet vált ki, továbbá gyulladáskeltő neuropeptidek szekrécióját (pl. P anyag, calcitonin 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 azáltal, hogy fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő neuropeptideket is felszabadít, mint a

szomatosztatin (12–15). A **szomatosztatin** szisztémás fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő hatását az SST₄ receptor közvetíti (16–25).

1.4. Szomatosztatin

A **szomatosztatin** egy ciklikus neuropeptid, melynek két izoformája van: SST-14 és SST-28. Gátolja a szekréciónak 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 szekréciónak, valamint a szisztémás gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatását, melyet “szenzokrin” hatásnak neveztek el (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. 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 szekréciónak befolyásolása nélkül (16–25,27–34,38,39,43,44). Így vált az SST₄ receptor egy ígéretes új gyógyszer-célpontrá, és az utóbbi időben számos gyógyszer-cél 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).

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-hiperalgégiás 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 egéragyban (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. Eredmények

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 transzgénnek 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 transzgén 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 transzgén 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 szomatosztatin 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 egyedeket. A transzgén 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 riporterfehérjét általában valamilyen nagyon erős víruspromóter (pl. citomegalovírus) vagy egy emlős háztartási gén promótere (pl.

elongációs faktor 1 alfa) hajtja meg, hogy megfelelő mennyiségben expresszáldjonak, 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 fúziósfehérje formában a natív tdTomato proteinhez képest, 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 expresszáldik, hasonlóan az *Sstr4*-hez a WT egerekben, de annál láthatóan gyengébb expressziós szinten. A *hSSTR4* a GABA-erg interneuronokban is expresszáldott 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 expresszáldik (73). Egy korábbi tanulmányban az *Sstr4* a WT egerek BO glomeruláris rétegében expresszáldottak, de a granuláris rétegében nem (96), míg a transzgenikus egerekben a *hSSTR4* főleg a BO granuláris rétegében expresszáldott.

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 expresszáldik, 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.

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 Tranziens 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) (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 Ca-45 folyadék szcintilláció számolással és *whole-cell patch-clamp* technikával.

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. A TRPA1 mutánsok szerves poliszulfid kötő tulajdonságait elsőként számítógépes modellezéssel vizsgáljuk, az így tervezett mutációkat helyspecifikus mutagenézissel hozzuk létre, majd a TRPA1 változatok funkcióját *in vitro* módszerekkel vizsgáljuk.

3.3. Eredmények

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 fedeli 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, jóacetamid, BODIPY-jóacetamid, 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 jóacetamid, BODIPY-jóacetamid, 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 doménen (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.

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 oligodendrogliaiban (166) és asztrocitákban (167–169). Az egér agykéregben kimutatták az alacsony szintű *TRPA1* expressziót a neuronokban, asztrocitákban, oligodendrogliaiban és mikrogliaiban (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 sejtjeiből specifikusan üjtük 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. Eredmények

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 legszéleskörűben 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 expresszálódott, 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 expresszálódik a Cre rekombinááz, de kis részben aktivitást mutatott neuronokban is. Ezt megfelelően specifikus expressziónak ítéltük, és ha ennek megfelelően deletálódik 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 rekombináció, de kis arányban a neuronokban és oligodendrogliaikban 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 tudunk tervezni rá, amelyekkel megkülönböztethetőkké váltak a sejtek csak egy részéből (kondicionális), és az összes sejtől (globális) kiűtött *Trpa1* gént hordozó egerek. Így a kísérletre keresztezett állatokat már tudtuk szűrni a Cre rekombinááz véletlen aspecifikus működése következtében létrejött *Trpa1* globális KO genotípusra. A keresztezés végén létrehozott *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/F1}* egerekben RT-qPCR segítségével mértük az intakt *Trpa1* csökkent expressziós szintjét. A vizsgálatokat összesítve a létrehozott *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/F1}* egereket megfelelőnek találtuk a kuprizon indukált demielinizációs kísérletre. Kontroll csoportoknak, *Gfap-Cre^{-/-} Trpa1^{F1/F1}* (loxP kontroll, ami gyakorlatilag *Trpa1* WT fenotípust mutat) és *Gfap-Cre^{+/-} Trpa1^{F1/-}* 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 patofiziológiás 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).

5. Összefoglalás

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai 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 genomon ligálás mediált PCR-rel 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 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.

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 inszenzitívitását 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 Ca-45 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 *Trpal* cKO 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 A, 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, Roug   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, S  ghy   , Sebesty  n-B  tai R, Steen E, Sz  ke   , és mtsai. Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide*. 2017. m  jus 1.;65:10–21.
13. Zygmunt PM, H  gest  tt ED. TRPA1. In: Nilius B, Flockerzi V, szerkeszt  . *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014 [  dzi 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, Sztter I, Kemény   , 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   , S  nta C, B  tai IZ, Kormos V, Kecskés A, T  kus 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,   s 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, Pinter E, Németh J, Sándor K, Elekes K, Szabó,   s 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, Sz  ke   , Sándor K, B  rsei R, Bagoly T, Kemény   ,   s mtsai. Comparison of the Anti-inflammatory and Antinociceptive 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.   prilis 2.;28(14):3567–76.
20. Scheich B, Gaszner B, Kormos V, László K,   dori C, Borbély   ,   s 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, Csek   K, Borbély   ,   brah  m I, Csern  v, Gaszner B,   s 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,   s 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   , Pinter E, Engström M, Wurster S,   s 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. Pinter 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.   prilis 11.;642(1):11–9.
26. Baraban SC, Tallent MK. Interneuron Diversity series: Interneuron 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 [  dzi 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  ₁₋₄₂ trimers. *Eur J Pharmacol*. 2012. m  jus 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 [  dzi 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 Schmiedeberg's 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. Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Petho G. Inhibition of the Function of TRPV1-Expressing Nociceptive Sensory Neurons by Somatostatin 4 Receptor Agonism: Mechanism 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. Feytsen 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, Erchegey 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 JJ, 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, GRCh39 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, GRCh39 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, GRCh39 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, Maillot M, Miano JM, Molkenin 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, Buscaïl L, Beckers A, Estève JP, Igout A, Hennen G, és mtsai. Expression of Somatostatin Receptor SST4 in Human Placenta and Absence of Ocreotide 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):325–30.
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, Szentés 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. Bátaí 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_XXXXXXXXX_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. H(2)S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience*. 2012;218:335–43.
110. Bátai 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, Mladénka 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, Tatarov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almagbrazi 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, Bátai 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, Seifert 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. Sághy É, Sipos É, Ács P, Bölskei 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. Bölskei 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. Verkhatsky 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. Egyéb publikációk

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>.

Pintér Erika, Bölcskei Kata, Kriszta Gábor, Sándor Zoltán, **Nemes Balázs**, Ács Péter, Komoly Sámuel, Berente Zoltán: „Examination of the demyelination process in mGFAP-driven conditional transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor knockout mice”. *The FASEB Journal*, köt. 34, sz. S1 (2020).

<https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.04614>

9.2. Hazai és nemzetközi konferencia részvételek

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

2018.11.22-23.

Előadás címe: Humanizált szomatostatin 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 szomatostatin 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 szomatostatin 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, Szentpétersvár

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.

Előadás és poszter prezentáció 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. Szakmai eredmények

Közlemények száma: **5**

Hirsch index (MTMT): **3**

i10 index (Google Scholar): **3**

Értekezés alapját szolgáló közlemények impakt faktora: **16.808**

Összes közlemény impakt faktora: **21.033**

Független citációk száma (MTMT): **18**

Összes citációk száma (MTMT): **27**

Összes citációk száma (Google Scholar): **39**

11. Szakmai elismerések

- 2017-2021. Elnyertem a Richter Gedeon Talentum Alapítvány Tanulmányi Ösztöndíjat.
- 2019.07.10-13. Belgrádban, a nemzetközi FENS konferencián felkértek, hogy tartsak előadást a poszterem anyagából.
- 2020.06.25-28. Meghívtak Szentpétervárra a nemzetközi „Summer School of Stress” tanulmányi programba és Koltushi-ban a Pavlov Kutatási Intézetbe és Múzeumba tanulmányi útra.
- 2021-2022. Elnyertem a PTE ÁOK PhD+1 tanulmányi ösztöndíjat.
- 2023.04.12. A Magyarországi Fájdalom Társaság pályázatán 2. helyezést értem el a poszteremmel, és ezzel megnyertem a támogatást az elkövetkező nemzetközi EFIC konferenciára (2023.09.20-23.).

12. Támogatás

A PhD tanulmányaim során végzett kutatómunkám a következő támogatásokkal valósulhatott meg: Richter Gedeon Talentum Alapítvány Tanulmányi Ösztöndíj; Nemzeti Agykutató Program 2017-1.2.1-NKP-2017-00002 (NAP-2; Krónikus Fájdalom Kutatócsoport); Nemzeti Agykutató 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 Gyógyszerkutató és Fejlesztési Laboratórium (PharmaLab); TKP2021-EGA-16 Nemzeti Kutató, Fejlesztési és Innovációs Iroda és az Eötvös Loránd Kutatói Hálózat (ELKH).

13. 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, Ömböli 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.