

Doktori értekezés tézisei

**A centrális tranziens receptor potenciál ankyrin  
1 ioncsatornák szerepének vizsgálata a  
poszttraumás stressz zavar egér modelljében**

**dr. Konkoly János**



**Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

**Pécs, 2023**

# **A centrális tranziens receptor potenciál ankyrin 1 ioncsatornák szerepének vizsgálata a poszttraumás stressz zavar egér modelljében**

**dr. Konkoly János**  
**Doktori értekezés tézisei**

**Témavezetők:**

**Prof. Dr. Pintér Erika** egyetemi tanár

**Dr. Gaszner Dr. Kormos Viktória** egyetemi adjunktus

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola,  
Neurofarmakológia Program vezetője:**

**Prof. Dr. Pintér Erika**

**Pécsi Tudományegyetem**  
**Általános Orvostudományi Kar**  
**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**  
**Pécs, 2023**



## 1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

### 1.1 A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) ioncsatorna szerkezete, agonistái, szerepe a periférián és a központi idegrendszerben

A TRPA1 egy nem szelektív kationcsatorna, mely négy alegységből épül fel, és alegységenként 6 transzmembrán  $\alpha$ -helikális szakaszt tartalmaz (S1-S6) (Meents és mtsai. 2019). Az S5 és S6-os szegmensek áthajlása között található hidrofíli hurok alkotja a csatorna kationokra (pl.:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) permeábilis pórúsát, lehetővé téve azok beáramlását az extracelluláris térből a sejtek belsejébe (Talavera és mtsai. 2020). A fehérje N-terminális citoplazmatikus részének közelében - az *ankyrin* ismétlődésekből felépülő szakasz és az első transzmembrán szegmens (S1) között - elhelyezkedő linker domén régiójában található cisztein aminosav oldalláncok felelősek az agonistának tekinthető elektrofil ágensek megkötéséért (Logashina és mtsai. 2019). A TRPA1 receptorok aktiválását és az ioncsatorna rész következményes megnyílását tehát egyfelől különböző exogén és endogén eredetű, elektrofil szerkezettel rendelkező vegyületek (allil-izotiocianát, lipid peroxidációs termékek) idézhetik elő, másfelől az agonisták egy további csoportjához tartoznak a nem-elektrofil szerkezetű, típusosan lipofil tulajdonságú vegyületek (mentol, arachidonsav) (Logashina és mtsai. 2019, Talavera és mtsai. 2020).

TRPA1 receptorok találhatóak a hátsógyöki, valamint a *nervus trigeminus* ganglionokhoz tartozó polimodális nociceptív afferensek végződéseiben (Talavera és mtsai. 2020), így hozzájárulva a bizonyos kórképekhez (pl.: neuropátiás fájdalom) társuló fájdalom szignál, mechanikai *allodynia*, valamint gyulladáshoz és immunválaszok kialakulásához (Koivisto és mtsai. 2012; Julius 2013; Marone és mtsai. 2018). A trigeminális nociceptív végződéseken expresszálandó TRPA1-receptorok szerepet játszhatnak továbbá egyes illékony, irritáló/averzív szagú anyagok észlelésében is (Wang és mtsai. 2018). Munkacsoportunk a *Trpa1* mRNS központi idegrendszeri expresszióját RNAscope *in situ* hibridizációs (ISH) technikával vizsgálta egerekben, mely során legnagyobb kópiaszámban a centrális projekciójú Etinger-Westphal mag (EWcp) urocortin 1 (UCN1) tartalmú neuronjain tudtuk kimutatni (Kormos és mtsai. 2022), továbbá ezen eredményeinket *post mortem* humán agymintákon elvégzett PCR vizsgálatok is megerősítettek (Kormos és mtsai. 2022). A TRPA1 ioncsatorna funkcionális aktivitását az EWcp urocortinerg sejtjein kutatócsoportunk elektrofiziológiai vizsgálatokkal bizonyította (Al-Omari és mtsai. 2023), valamint kimutattuk, hogy a krónikus variábilis enyhe stressz (CVMS) egér modelljében, illetve öngyilkos személyekből származó EWcp mintákban az EWcp/UCN1 neuronjain csökken a *Trpa1* mRNS expressziója, felvetve a TRPA1 receptorok lehetséges szerepét a stressz adaptáció folyamatában (Kormos és mtsai. 2022).

## 1.2 Az EWcp és az UCN1 szerepe a stressz adaptációban

A Selye János és Walter Cannon munkáján alapuló stresszelmélet szerint a szervezetet érő fiziológiai, illetve pszichológiai stresszorok neuroendokrin változásokat idéznek elő, melyek fő célja a stresszre adott adaptív válaszreakciók kialakítása. Ennek első és legismertebb lépései a szimpatoadrenomedulláris katekolamin mobilizálás, valamint a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely aktivációja (Adams és Hempelmann 1991). Ezen folyamatokon kívül azonban számos további idegrendszeri struktúra is hozzájárul a stressz adaptációs válaszok szabályozásához, ideértve az agytörzsi lokalizációjú - többféle neuropeptidet (kolecisztokinin, P-anyag, UCN1, kokain- és amfetamin-regulált transzkript) expresszáló - EWcp-t, melynek UCN1 tartalmú rostjai a *nucleus paraventricularis hypothalami* (PVN) neuronjain végződve szabályozzák a HPA tengely működését (Zuniga és Ryabinin 2020).

A stresszhatásra termelődő CRH-nak a HPA tengely szabályozásában betöltött szerepe már régóta ismert. A CRH család később felfedezett tagjai az urocortinok (UCN1, 2 és 3), melyek szintén hozzájárulnak a stressz adaptációhoz (Vaughan és mtsai. 1995; Hsu és Hsueh 2001; Gaszner és mtsai. 2004). Az UCN1 az agyban legnagyobb mennyiségben az EWcp urocortinerg sejtjeiben szintetizálódik, mely neuronok rostokat küldenek a hipotalamusz bizonyos magcsoportjaihoz (PVN, *nucleus supraopticus*, laterális hipotalamusz), valamint különböző limbikus (prefrontális kéreg (PFC), *nucleus interstitialis striae terminalis* (BNST), *amygdala*) és agytörzsi (*nucleus raphe dorsalis*) struktúrákhoz, így szabályozva többek között a stressz adaptációt, hőháztartást, táplálékfelvételt, illetve a hangulatot (Fekete és Zorrilla 2007; Zuniga és Ryabinin 2020). A CRH család tagjainak hatását a CRH receptorok (CRHR) közvetítik, melynek 1-es (CRHR1) és 2-es (CRHR2) altípusát azonosították (Hsu és Hsueh 2001; Bale és mtsai. 2002). Az UCN1 jellegzetessége, hogy a CRHR2 altípushoz mintegy 40-szer nagyobb kötődési affinitást mutat a CRH-hoz képest (Bale és mtsai. 2002; Im és mtsai. 2015), mely alapján felmerül, hogy az UCN1 a CRHR2 legjelentősebb endogén liganduma (Vaughan és mtsai. 1995; Bale és mtsai. 2002). Szakirodalmi adatok szerint a CRHR két altípusa egymással ellentétes hatásokat közvetít: míg a CRHR1 aktivációja szorongáskeltő (anxiogén) hatású, addig a CRHR2-n keresztül elsősorban szorongásoldó (anxiolitikus) hatások érvényesülnek (Bale, Lee és Vale 2002; Gaszner és mtsai. 2004). Ezek alapján feltételezhető EWcp/UCN1 neuronjai által közvetített, főként CRHR2-függő reakciók a stressz adaptáció késői fázisában a normális homeosztázis helyreállításához és a stresszválasz megszűnéséhez járulhatnak hozzá (Adams és Hempelmann 1991; Hsu és Hsueh 2001; Gaszner, és mtsai. 2004). Korábbi

kísérleteink során - a CVMS egér modelljében, illetve öngyilkos személyekből származó EWcp mintákban - az EWcp/UCN1 neuronokon detektált csökkent *Trpa1* mRNS expresszió felveti, hogy az UCN1 neuronokon expresszálandó TRPA1 receptorok hozzájárulhatnak az urocortinerg sejtek stressz adaptációban betöltött szerepéhez, és ezáltal érintettek lehetnek bizonyos stressz-függő maladaptív zavarok pathomechanizmusában.

### 1.3 A poszttraumás stressz betegség (PTSD)

A PTSD a stressz adaptációs zavarok közé tartozó kórkép, mely intenzív érzelmi/fizika trauma (pl.: baleset, gyermekkori abúzus, szexuális erőszak, háborús trauma) hatására alakul ki. A betegségre jellemző a traumatikus élményre emlékeztető kulcsinger által kiváltott, epizodikusan visszatérő súlyos szorongás és pszichomotoros nyugtalanság (*hyperarousal*), a trauma emlékképeinek éber állapotban (spontán *flashback*, illetve intruzív emlékképek) vagy rémálmok formájában történő ismételt átélése, valamint az ehhez kapcsolódó elkerülő viselkedés (Auxéméry 2018).

Az PTSD pathogenezisében szerepet játszó, egyik legrészletesebben vizsgált neurobiológiai mechanizmus a neuroinflammáció, mely kialakulásához a túlzott mértékű vagy krónikusan fennálló stressz járulhat hozzá (Hori és Kim 2019). A stressz hatás egyrészt a PVN fokozott CRH termelése miatt bekövetkező szimpatikus idegrendszeri aktiváció és következményes katekolamin mobilizálás révén képes - közvetett úton - fokozni az immunsejtek proinflammatorikus citokin (interleukin 1 (IL-1); interleukin 6 (IL-6) és tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) termelését (Tan és mtsai. 2007). Másrészt stressz hatására a központi idegrendszer gliasejtjei (mikroglia, asztroglia) közvetlenül is képesek termelni a fent említett citokineket, így hozzájárulva a neuroinflammáció kialakulásához (Hori és Kim 2019). Lényeges továbbá, hogy az IL-1, IL-6 és TNF- $\alpha$  szint emelkedés a CRH szekréció fokozásával szerepet játszik a stressz válasz fenntartásában (Hori és Kim 2019). A kórkép kialakulásában szerepet játszó további lényeges neurobiológiai tényező az oxidatív stressz. Ennek létrejöttéhez egyrészt a proinflammatorikus állapot során aktivált gliasejtek járulhatnak hozzá, másrészt a mikroglia és asztrocita eredetű reaktív szabadgyökök maguk is képesek gliasejtaktivációt kiváltani, így erősítve a neuroinflammáció folyamatát (Miller és mtsai. 2015; Oroian és mtsai. 2021). A PTSD kialakulása során érintett legfontosabb agyterületek a mediális prefrontális kéreg (mPFC), az *amygdala* bazolaterális (BLA) és centrális (CeA) magcsoportjai, valamint a limbikus területek közül a hippokampusz, illetve a BNST (Miller és mtsai. 2018; Kamiya és Abe 2020).

A betegség kezelésében az úgynevezett manualizált pszichoterápiás eljárások az elsőként választandók, melyek fő célja a traumatikus emlékek, illetve az ehhez kötődő érzelmek

feldolgozása, a traumához kapcsolódó jelentésadások átértékelése, az elkerülő viselkedés csökkentése, valamint az adaptív funkciók helyreállítása (Goodnight és mtsai. 2019; Perczel-Forintos és Lisincki 2020; Schrader és Ross 2021). Ugyanakkor szakirodalmi adatok szerint a PTSD kezelésében rendelkezésre álló farmakoterápiás lehetőségek - amik elsősorban szelektív szerotonin visszavétel gátló hatású gyógyszerek alkalmazását jelentik - hosszú távú hatékonysága jelentősen elmarad a pszichoterápiás módszerekétől, illetve a tartós remisszió fenntartása folyamatos gyógyszeres terápiát igényel, mely a mellékhatások fellépésének fokozott kockázatával jár együtt (Lee és mtsai. 2016; Schrader és Ross 2021). A kórkép kezelésére használt gyógyszerek mindössze a betegség tüneteinek (depresszív hangulat, szorongás) tompításával javítanak a betegek állapotán, míg a kórkép háttérében álló neurobiológiai mechanizmusokat (pl.: a kondicionális félelem válasz nem megfelelő kioltása), érdemben nem befolyásolják (Lee és mtsai. 2016). A fent leírtak alapján a jövőben érdemes lenne nagyobb hangsúlyt fektetni a betegség kezelésében nagyobb hatékonyságot és kedvezőbb mellékhatás profilt mutató gyógyszerek kifejlesztésére.

#### **1.4 A szaglópálya felépítése, kapcsolatai és élettani jelentősége**

A szaglópálya egyike a legősibb fő szenzoros rendszereinknek, mely lehetővé teszi az illékony kémiai anyagok jelenlétének érzékelését. A szaglás folyamata az orrüregben található szaglóhamban (OE) kezdődik, mely szenzoros bipoláris neuronjai (OSN) az ingert a *bulbus olfactorius* (BO) glutamáterg sejtjeinek irányába továbbítják (Lage-Rupprecht és mtsai. 2020). A BO-ban található további jelentős sejttípus a gátló hatású gamma-amino-vajsav neurotranszmittert (GABA) termelő GABAerg neuronok csoportja (Lage-Rupprecht és mtsai. 2020). A glutamáterg neuronokból eredő axonok kötegekbe rendeződve pályákat alkotnak, amik a primer és szekunder szaglóközpontokban végződnek (pl.: *nucleus olfactorius anterior*, *tuberculum olfactorium*, *piriform* kéreg (PC) és *entorhinalis* kéreg). A legjelentősebb elsődleges szaglómező a PC, ami az információ-feldolgozást követően azt a másodlagos, illetve asszociációs központokba továbbítja (Truex és Carpenter 1969).

A szagingerek hatással vannak a szociális viselkedésünkre (Boesveldt és Parma 2021), valamint a legtöbb emlős esetében szerepet játszanak a szociális hierarchia kialakításában, a szexuális partner kiválasztásában, illetve az utódgondozásban (Vosshall 2005; Zou és mtsai. 2015; Oettl és Kelsch 2018). A szociális viselkedésre gyakorolt hatásain túl a szaglórendszer funkcionális integritása szükséges a ragadozók elkerüléséhez (Zou és mtsai. 2015), így hozzájárulva a veleszületett félelem válasz és az ahhoz kapcsolódó szorongás kialakulásához. Az elkerülő viselkedést kiváltó predátor eredetű kémiai ingerek a szaglórendszer közvetítésével, egyes

limbikus területek (*amygdala*, ventromediális hipotalamusz, BNST, periaqueductális szürkeállomány (PAG), PVN) aktivációját idézik elő, így kialakítva a veleszületett félelem választ és szorongást (Pérez-Gómez és mtsai. 2015; Janitzky és mtsai. 2015). Predátor szag alkalmazását követően ráadásul a - PTSD kialakulása során érintett leglényegesebb limbikus agyterületek (hippokampusz és PFC) noradrenerg beidegzését is biztosító - *locus coeruleus* területén szintén fokozott stressz-függő neuronális aktivációt találtak, bizonyítva ezen struktúra jelentőségét a stressz adaptációhoz társuló félelem válasz kialakulásában (Janitzky és mtsai. 2015). A fentiek alapján felmerül, hogy ezen limbikus rendszeri struktúrák és a kapcsolódó neurotranszmitter rendszerek esetlegesen zavart működése a veleszületett félelem válasz szabályozása mellett hozzájárulhat egyes stressz-függő adaptációs zavarok (pl.: PTSD) kialakulásához is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

### 2.1 A TRPA1 expresszió feltérképezése és karakterizálása a szaglópálya területén

Első célkitűzésünk a *Trpa1* mRNS expressziójának feltérképezése a szaglóhámban, valamint a szaginformáció feldolgozásában szerepet játszó lényegesebb primer szaglóközpontokban (BO, PC). Ennek meghatározásához RNAscope ISH-val kombinált immunfluoreszcenciát végeztünk, mely módszerek lehetővé teszik a *Trpa1* mRNS-t tartalmazó sejtek pontos karakterizálását.

### 2.2 A TRPA1 szerepének vizsgálata a predátor szag hatására kialakuló félelemválaszban

*Trpa1* génhíányos állatok bevonásával vizsgáltuk a két különböző predátor (róka és macska) szagát imitáló vegyület hatását az állatok veleszületett félelemválaszára. Ennek során viselkedés vizsgálatokat végezve határoztuk meg az állatok lefagyási reakcióját, majd hormonszint mérések segítségével vizsgáltuk a HPA tengely szagtesztekre adott választát, végül TRPA1 ioncsatornát overexpresszáló sejtvonalak felhasználásával meghatároztuk ezen szaganyagok esetleges TRPA1 receptorokat aktiváló képességét.

### 2.3 A TRPA1 szerepének vizsgálata a PTSD kialakulásában

Mivel az EWcp/UCN1 neuronjain található TRPA1 befolyásolhatja a stressz adaptáció szabályozását feltételezzük, hogy az EWcp/TRPA1/UCN1 neuronok hozzájárulhatnak a stresszadaptáció zavara által okozott PTSD pathomechanizmusához. Ennek megállapításához két különböző PTSD modellt (*single prolonged stressz* (SPS) és elektromos lábsokk) alkalmazva vizsgáltuk a *Trpa1* vad típusú (WT) és *knockout* (KO) állatok viselkedésében tapasztalható különbségeket, illetve az EWcp területén végzett RNAscope technika és immunfluoreszcens vizsgálatok segítségével morfológiai vizsgálatokat végeztünk az urocortinerg neuronokra fókuszálva.



### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Állatok

Kísérleteink során 9-14 hetes hím C57BL/6, valamint *Trpa1* WT és KO egereket használtunk. Az állatokat a PTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetében standard polikarbonát ketrecekben 12 órás nappali-éjszakai ciklusban tartottuk, 24-25 °C fokon, *ad libitum* ellátva ivóvízzel és rágcsáló táppal.

#### 3.2 Kísérleti elrendezés

##### 3.2.1 A *Trpa1* mRNS expresszió vizsgálata egér szaglópálya területén

A *Trpa1* szaglópálya területén való expressziójának meghatározását C57BL/6 egerekből származó szaglóhám, BO és PC mintákon végeztük. A *Trpa1* expresszáló sejtek karakterizálása céljából a szaglóhámra anti- $\beta$ -tubulin III immunfluoreszcenciával kombinált RNAscope ISH-t, míg a BO-t, valamint PC-t tartalmazó agymintákon, neuronális nukleáris fehérje (*NeuN*), vezikuláris glutamát transzporter 1 (*Vglut1*), valamint glutamát dekarboxiláz 1 (*Gad1*) mRNS-re specifikus próbák alkalmazásával multiplex RNAscope ISH-t hajtottunk végre.

##### 3.2.2 A TRPA1 szerepének vizsgálata a predátor szaggal kiváltott félelemválaszban

A predátor szaggal kiváltott veleszületett félelemválasz vizsgálatához róka (2-metil-2 tiazolin (2-MT)), illetve macska (valeriánsav) szagát imitáló vegyületeket használtunk. Ennek során *Trpa1* WT és KO egereknél, elsősorban a predátor szag által előidézett lefagyási reakciót értékeltük, illetve a kísérletet követően meghatároztuk a stressz hormon szinteket (adrenokortikotrop hormon (ACTH) és kortikoszteron).

##### 3.2.3 A valeriánsav és a 2-MT TRPA1-aktiválóképességének vizsgálata

A szagaverziós tesztekben alkalmazott 2-MT és valeriánsav felhasználásával - egér és humán TRPA1 receptorokat expresszáló *Chinese Hamster Ovary* (CHO) sejt vonalakon -  $Ca^{2+}$  beáramlás mérést végeztünk a szaganyagok TRPA1 receptor aktiváló képességének megállapítása céljából.

##### 3.2.4 A TRPA1 szerepének vizsgálata PTSD egérmodellekben

A PTSD kiváltásához *Trpa1* KO és WT állatokon két különböző kísérleti protokollt alkalmaztunk. Az egyik modell a SPS volt, mely során az állatokat *restraint* stressznek, *forced swim* tesztnek (FST), valamint éter narkózisnak vetettük alá, majd vizsgáltuk az állatok immobilitását. A másik modell során, a stressznek kitett egerekben hanghatással kombinált ismétlődő lábsokkot alkalmaztunk, majd értékeltük az állatok lefagyási reakcióját, valamint ugrálását. A PTSD modelleket, illetve az azokhoz kapcsolódó viselkedés teszteket a korai sötét

fázisban, 18 és 22 óra között hajtottuk végre. Mindkét paradigma esetén a viselkedés tesztek elvégzését követően 36 órával az állatokat termináltuk, és további szövettani vizsgálatok céljából agymintát gyűjtöttünk.

### **3.3 RNAscope *in situ* hibridizáció immunfluoreszcenciával kombinálva**

A koronális BO, PC és EWcp metszeteken RNAscope ISH vizsgálatot végeztünk. Ennek során a minták célgénjeit egér *Trpa1*, *NeuN*, *Vglut1*, *Gad1* és *Ucn1* specifikus próbákkal hibridizáltuk. A csatornahívásnál a *targetek* identifikálásához különböző emissziós spektrumú fluorofórokot alkalmaztunk (*Trpa1* -Cyanine 3 (Cy3), *NeuN* - Cyanine 5 (Cy5), *Vglut1* - fluorescein, *Gad1* - Cy5, *Ucn1* - Cy3). Az EWcp metszetein UCN1 immunfluoreszcenciát is végeztünk, mely során a festést rekombináns nyúl anti-urocortin 1 antitesttel, majd Alexa Fluor 488-al konjugált szamar anti-nyúl szekunder antitesttel végeztük. A transzverzálisan metszett szaglóhám mintákon *Trpa1*-re specifikus RNAscope ISH-t hajtottunk végre, amit  $\beta$ -tubulin III immunfluoreszcencia követett, mely során a festést poliklonális nyúl anti- $\beta$ -tubulin III antitesttel, majd Alexa Fluor 488-al konjugált szamar anti-nyúl szekunder antitesttel végeztük.

### **3.4 Mikroszkópia, morfometria**

A képkalkotáshoz Olympus Fluoview FV-1000 lézer pásztázó konfokális mikroszkópot és FluoView FV-1000S-IX81 képelemző szoftvert használtunk. Az EWcp-t tartalmazó szeletekből nyert nyers képeken az ImageJ szoftver (1.52a verzió) segítségével morfometriát végeztünk. Ennek során az *Ucn1* mRNS és az UCN1 peptid esetében állatonként négy EWcp szeletről készült kép alapján, szeletenként 5-10 sejtestben határoztuk meg a fluoreszcens specifikus jelintenzitást (SSD), melyet önkényes egységben (au) fejeztünk ki. A *Trpa1* mRNS jel esetében szintén manuálisan, szeletenként 5-10 neuronban számoltuk meg a sejtenkénti kópiák számát, állatonként négy szeletben.

### **3.5 Predátor tesztek**

A predátor szagokkal kiváltott veleszületett félelemválasz vizsgálata során felnőtt hím *Trpa1* WT és KO egereknél (n = 12 mindkét csoportban) vizsgáltuk a 2-MT és valeriánsav által előidézett lefagyási reakciót.

### **3.6 Radioimmun-assay**

A szagaverziós tesztek elvégzése után az állatokból azonnal vért gyűjtöttünk, majd a centrifugálást követően nyert szérumban ACTH és kortikoszteron meghatározást végeztünk a Kísérletes Orvostudományi Kutató Intézet (Budapest, Magyarország) által kifejlesztett antitestek felhasználásával (Zelena és mtsai. 2003).

### **3.7 A Ca<sup>2+</sup> beáramlás mérése áramlási citometriával**

A 2-MT és valeriánsav által kiváltott kalcium válaszokat áramlási citometria segítségével egér és humán TRPA1-et overexpresszáló CHO sejtvonalakon vizsgáltuk.

### **3.8 Az SPS PTSD modell és a kapcsolódó viselkedésvizsgálatok**

Felnőtt hím *Trpa1* KO (n=12) és WT (n=9) egerek egy-egy csoportját SPS tesztnek tettük ki, míg egy másik csoport KO (n=10) és WT (n=10) állatot nem stresszelt kontrollként használtunk. Két hét elteltével mind a négy csoporton 15 percig *restraint* és 6 percig FST-et végeztünk, melyek során vizsgáltuk az állatok immobilitását.

### **3.9 Elektrosokk PTSD modell és a kapcsolódó viselkedésvizsgálatok**

Az elektromos lábsokk paradigma során a *Trpa1* KO (n=10), és WT (n=10) egerek egy csoportját akusztikus riasztó stimulussal (ASS) kombinált elektromos lábsokkknak tettük ki (félelem kondicionálás), míg a nem stresszelt kontroll KO (n=9) és WT (n=11) csoportok csupán az ASS-ban részesültek. A félelem kondicionálást követően négy héttel az állatokat ebbe az eredeti kontextusba (emlékeztető szituáció) helyeztük vissza, azonban ennek során sok leadása nélkül kizárólag ASS-t használtunk minden egyes csoportban, és vizsgáltuk az állatok viselkedését, melynél elősorban a lefagyási reakcióra, valamint az ugrálásra fókuszáltunk.

### **3.10 Statisztikai analízis**

A statisztikai értékelést a Statistica 13.5.0 szoftverrel végeztük. A szagaverziós tesztek során a WT és KO egerek viselkedését, valamint a PTSD modellekben a WT állatoknál a *Trpa1* mRNS-expresszió összehasonlítását kétmintás t-próbával végeztük. A többi esetben a főhatásokat kétutas varianciaanalízissel vizsgáltuk, melyet követően Tukey-féle *post hoc* tesztet végeztünk. Statisztikailag szignifikánsnak vettük az eredményt, ha a p-érték 0,05-nél kisebb volt.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 A *Trpa1* mRNS expresszió vizsgálata egér szaglópálya területén

A szaglópálya területén a *Trpa1* mRNS igen alacsony kópiaszámban volt kimutatható, és kolokalizációt a  $\beta$ -tubulin III-al nem detektáltunk. A BO mintákban *Trpa1* mRNS-t kizárólag a *NeuN* tartalmú neuronális elemeken igazoltunk, ezek közül a *Trpa1* mérsékelt expressziója volt kimutatható a *Gad1* mRNS-t tartalmazó GABAerg gátló neuronokban, míg a *Vglut1* pozitív serkentő sejtekkel kolokalizáció alig volt detektálható. Ezzel szemben a PC-ben *Trpa1* mRNS-t kizárólag a glutamaterg serkentő neuronokban igazoltunk.

### 4.2 A TRPA1 szerepének vizsgálata a predátor szaggal kiváltott félelemválaszban

A *Trpa1* KO egereknél 2-MT-t alkalmazva szignifikánsan csökkent a ledermedés időtartama és ezzel párhuzamosan fokozódott a szagforrás szagolgasának ideje a WT állatokhoz képest. Valeriánsavat használva hasonló szignifikáns különbséget észleltünk a genotípusok között a szagolgas tekintetében, ugyanakkor a ledermedésnél csak a tendencia volt kimutatható. A vérminták vizsgálata során kizárólag a 2-MT expozíciót követően észleltünk szignifikánsan emelkedett ACTH-szintet a KO-egereknél, míg a kortikoszteron szintekben egyik predátor szag alkalmazását követően sem mutatkozott eltérés genotípusok között.

### 4.3 A valeriánsav és a 2-MT TRPA1-aktiválóképességének vizsgálata

A 2-MT hatására mind a humán mind pedig az egér sejtvonalnál a fluoreszcens szignál koncentrációfüggő növekedése volt kimutatható a nem stimulált sejtekhez képest, ugyanakkor egyik TRPA1-et expresszáló sejtvonal sem reagált a valeriánsavra.

### 4.4 A TRPA1 szerepének vizsgálata PTSD egérmodellekben

#### 4.4.1 SPS modell

A viselkedés vizsgálatoknál *restraint* stresszt alkalmazva fokozott immobilitást észleltünk mindkét stresszelt csoportban a kontroll (nem stresszelt) állatokhoz képest. Az FST során a stressznek kitett WT egerek szignifikánsan nagyobb mértékű immobilitást mutattak kontroll társaikhoz képest, míg hasonló különbségek a KO állatok esetén nem voltak detektálhatók.

A morfológiai vizsgálatok során a WT egereknél SPS modellt alkalmazva szignifikánsan csökkent *Trpa1* mRNS expressziót detektáltunk a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az *Ucn1* mRNS szint változásait vizsgálva mind a bazális, mind pedig az SPS indukálta *Ucn1* expresszió szignifikánsan emelkedett volt a KO állatokban a WT társaikhoz képest, ugyanakkor stressz hatásra bekövetkező szignifikáns expresszió változás egyik genotípusnál sem volt kimutatható. A WT állatokban SPS hatására szignifikánsan fokozott UCN1 peptid tartalmat találtunk,

azonban hasonló SPS által okozott változások a KO egerekben nem voltak megfigyelhetők, amit a stressz-genotípus változók közötti szignifikáns interakció is alátámasztott.

#### **4.4.2 Elektrosokk PTSD modell**

Az elektromos lábsokk modellben - az emlékeztető szituáció során - jelentősen fokozott lefagyás volt észlelhető mindkét stressznek kitett csoportban a kontroll (nem sokkolt) állatokhoz képest, míg a genotípus esetén szignifikáns főhatás nem volt igazolható. Ugyanakkor a sokkra emlékeztető hanghatás használata szignifikánsan fokozott ugrálási gyakoriságot eredményezett a stressznek kitett KO állatokban kontroll társaikhoz képest, míg a WT egereknél hasonló eltérés nem volt detektálható, amit a stressz-genotípus változók közötti szignifikáns interakció is megerősített.

A morfológiai vizsgálatok során a WT állatokban - a PTSD kiváltása után - szignifikánsan csökkent *Trpa1* mRNS expressziót észleltünk a kontroll csoporthoz képest. A további RNAscope-os vizsgálatoknál - lábsokk alkalmazását követően - szignifikánsan magasabb *Ucn1* mRNS expressziót észleltünk a WT állatokban, míg a KO egerekben hasonló sokk-indukálta változások nem voltak megfigyelhetők, amit a két változó között kimutatható szignifikáns interakció is igazolt. Ráadásul az UCN1 immunfluoreszcencia során az UCN1 peptid tartalom sokk által kiváltott tendenciózus növekedése, mely csak WT állatokban volt megfigyelhető, a genotípus főhatás szignifikáns különbségével társult.

## 5. DISZKUSSZIÓ

Elsőként igazoltuk a *Trpa1* mRNS expresszióját a szaglópálya területén. Ennek során kimutattuk, hogy a *Trpa1* kópiák elsősorban a BO GABAerg, illetve a PC glutamaterg sejtjein található. A *Trpa1* WT és KO állatokon elvégzett szagaverziós vizsgálatok megerősítették továbbá a TRPA1 ioncsatorna szerepét a predátor szaggal kiváltott veleszületett félelemválasz kialakulásában, melyet más szakirodalom is alátámaszt (Wang és mtsai. 2018).

Egy korábbi közlemény szerint a rókaszag közvetlen aktivátorként képes hatni a szaglópályában található TRPA1 receptorokon (Wang és mtsai. 2018), amit kutatócsoportunk a 2-MT alkalmazása során humán és egér TRPA1-et expresszáló CHO sejtvonalak segítségével egyaránt igazolt. Másfelől a macskaszagot imitáló valeriánsavat alkalmazva egyik CHO sejtvonalon sem sikerült fokozott  $Ca^{2+}$ -beáramlást kimutatni, amit az magyarázhat, hogy a valeriánsav nem rendelkezik elektrofil tulajdonságokkal, ezért feltehetően nem képes közvetlenül aktiválni a TRPA1 receptorokat. Ráadásul a macskaszag alkalmazása során a két genotípus viselkedése közötti eltérés csak a KO állatok WT társaikhoz viszonyított hosszabb idejű és gyakoribb szagolgtatásában nyilvánult meg, míg a lefagyási reakciót egyáltalán nem érintette. A kétféle predátor szagra adott különböző viselkedési válaszok egyik lehetséges magyarázata, hogy a valeriánsav szaga általánosságban kevésbé félelmetes az egerek számára. Ugyanakkor lényeges hangsúlyozni, hogy a TRPA1 ioncsatorna hiánya általánosságban nem csökkenti a félelemválasz mértékét, melyet egy korábbi - egerek kondicionális félelem választ vizsgáló - tanulmányban a *Trpa1* KO állatok fokozott lefagyási reakciója is alátámasztott (Lee és mtsai. 2017). Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a szaginger irányába mutatott érdeklő viselkedés kiváltásában inkább a szaglórendszer centrális részein (pl.: BO vagy PC) található TRPA1 receptorok szerepe lehet hangsúlyosabb, míg az OE területén a főként trigeminális nociceptív afferenseken expresszálódó ioncsatorna inkább az irritáló szagokhoz társuló fájdalomérzet közvetítésében játszhat szerepet (Talavera és mtsai. 2020), így alakítva az állatok viselkedési válaszait, továbbá a kialakuló fájdalom, illetve a PC és a PVN közötti közvetlen kapcsolat (Kondoh és mtsai. 2016) fokozhatja egyes stresszre érzékeny agyterületek (pl.: PAG és PVN) neuronális aktivitását (Wang és mtsai. 2018). A *Trpa1* KO állatok a 2-MT kezelésre emelkedett ACTH szintekkel reagáltak, mely ellentmondásosnak tűnő megfigyelést a KO egerek predátor teszt során mért fokozott lokomotoros aktivitása magyarázhatja (White-Welkley és mtsai. 1995). Valeriánsav alkalmazásánál ugyanakkor egyik vizsgált stressz hormon szintjében sem volt detektálható eltérés a két genotípus között, mely eredmény

lehetséges magyarázata az eltérő szagok érzékelése során aktiválódó neuronális útvonalak különbözősége.

A TRPA1 szaglásban betöltött jelentőségének igazolására kimutattuk annak jelenlétét a szaglórendszer egyes központi idegrendszeri részein. Ugyanakkor az OE területén a *Trpal* mRNS csak alacsony kópiaszámban volt detektálható, és egyáltalán nem kolokalizált az OSN-re specifikus immunmarkerrel, mely felveti, hogy a receptor más OE struktúrákon (pl.: a trigeminális neuronok végződésein) expresszálódhat (Koike és mtsai. 2021). A BO területén a *Trpal* mRNS mérsékelt expresszióját mutattuk ki főként a GABAerg gátló neuronokon, amit egy korábbi tanulmány is megerősít (Dong és mtsai. 2012). Az itt lokalizálódó TRPA1 receptorok így feltehetően hozzájárulhatnak az averzív szagingerek hatásainak alakításához. Kutatócsoportunk elsőként igazolta, hogy a *Trpal* mRNS a PC területének fő neuron típusán, a glutamáterg sejteken is expresszálódik, melyekhez számos más szaglórendszeri struktúrából és limbikus területekről (pl.: BLA) is érkezik ingerület, illetve ezen sejtek szerteágazó afferentációja határozza meg az információ finomhangolását (Wang és mtsai. 2020).

A fent részletezett viselkedés vizsgálatok, valamint morfológiai eredmények felvetik a TRPA1 receptornak a szaginformáció centrális feldolgozásában, illetve a különböző szagok által kiváltott viselkedési mintázatok alakításában betöltött szerepét.

Munkacsoportunk korábbi kísérletei során a *Trpal* mRNS expresszió csökkenését figyeltük meg az EWcp/UCN1 neuronjain a depresszió CVMS egérmodelljében, valamint öngyilkos személyekből származó humán mintákban (Kormos és mtsai. 2022). Ez a megfigyelés felveti a lehetőségét, hogy az UCN1 neuronokon expresszálódó TRPA1 receptorok szerepet játszhatnak bizonyos stressz adaptációs zavarok, például a PTSD pathomechanizmusában. Ezen feltételezésünket támasztják alá korábbi tanulmányok eredményei is, melyek közvetlen kapcsolatot mutattak ki az EWcp, valamint a PTSD kialakulásában érintett leglényegesebb agyi struktúrák (PFC, *amygdala* és hippocampusz) között (Zuniga és Ryabinin 2020; Topilko és mtsai. 2022).

A PTSD kiváltására alkalmazott modellek validálása során mindkét kísérleti paradigma (SPS és elektromos lábsokk) alkalmasnak bizonyult a betegség modellezésére, mivel a *Trpal* WT egerek mind az SPS után elvégzett FST és *restraint* stressz, mind pedig a sokkot követően alkalmazott emlékeztető szituáció esetén a betegségre jellemző fokozott immobilitást/lefagyást mutattak (Török és mtsai. 2019). A FST során igazoltuk, hogy a TRPA1 ioncsatornák funkcionális hiánya megakadályozhatja egyes stressz-függő viselkedési változások

kialakulását, ami összhangban van az irodalomban leírt eredményekkel (De Moura és mtsai. 2014; Kormos és mtsai. 2022). Ugyanakkor a sokk modellnél alkalmazott emlékeztető szituáció során eltérést a két genotípus lefagyásának időtartamában nem detektáltunk. Lényeges azonban, hogy a sokk modellben a KO egerek fokozott ugrálási gyakorisága hasonlóan a lefagyáshoz a kondicionált félelemválasz jellemzésére használható, és elsődlegesen a CeA által kiváltott reakció (Hitchcock és mtsai. 1989; Davis 1992; Lee és mtsai. 2017), mely végső soron a *locus coeruleus* aktivációja által mediált fokozott izgalmi állapotnak (*hyperarousal*) tekinthető (Hitchcock és mtsai. 1989; Davis 1992; Gresack és Risbrough 2011). A fentiek alapján feltételezhető, hogy a TRPA1 receptorok funkcionális ablációja a CeA által meghatározott félelem kondicionálást felerősíti és/vagy annak kioltását nehezíti, ami - az irodalomban leírt, kifejezettebbé váló passzív elkerülő viselkedés mellett (Lee és mtsai. 2017) - eleve fokozottabb vagy tartósabban magas szinten perzisztáló izgalmi állapotot eredményez a KO állatoknál. A kétféle modell során detektált - viselkedési paramétereket érintő - eltérések így bizonyítékot szolgáltathatnak a TRPA1 ioncsatornák PTSD pathomechanizmusában betöltött szerepére.

Az SPS és az elektrosokk paradigmánál elvégzett morfológiai vizsgálatok során mindkét modellnél sikerült igazolnunk, hogy WT állatokban a stresszorok alkalmazását követően szignifikánsan csökkent a *Trpa1* mRNS expressziója, ami összhangban áll a CVMS modellben kapott korábbi eredményeinkkel (Kormos és mtsai. 2022). A *Trpa1* mRNS kópiaszám csökkenésének hátterében álló egyik lehetséges mechanizmus az ioncsatorna expresszió - agonista-receptor kölcsönhatás által előidézett - downregulációja lehet, mely folyamat - a környező gliasejtekből származó reaktív szabad gyökök, valamint az oxidatív stressz és a neuroinflammáció során felszabaduló mediátorok (Hori és Kim 2019; Oroian és mtsai. 2021) révén előidézett - elnyújtott agonista hatást hívatott megelőzni (Rang és mtsai. 2018). Ugyanakkor további farmakológiai vizsgálatok szükségesek az említett gyulladásos mediátorok feltételezett szabályozó hatásainak pontos meghatározásához. WT egereknél mindkét PTSD modellben igazoltuk, hogy a *Trpa1* mRNS expressziójának csökkenésével párhuzamosan fokozódott az UCN1 peptid tartalom. Másrészt a WT állatokban elektromos lábsokkot alkalmazva fokozott *Ucn1* mRNS expressziót detektáltunk a kontroll csoporthoz képest. Ezzel szemben a génihiányos állatokban - egyik modell alkalmazásának hatására sem következett be szignifikáns fokozódás a neuronális *Ucn1* mRNS vagy UCN1 peptid tartalomban a kontroll csoporthoz képest.

Lényeges, hogy az SPS-nek kitett KO állatoknál észlelt hiányzó *Ucn1*/UCN1 expresszió fokozódás összhangban van az immobilitás - FST során detektált - változatlan időtartamával.



Ezen megváltozott stressz válasz háttérében a KO állatok EWcp/UCN1 sejtjeinek beszűkült adaptációs képessége állhat, mely mind a WT egerekhez viszonyított magasabb bazális *Ucn1* mRNS expressziós szintekben, mind pedig az SPS-re adott hiányzó viselkedési és urocortinerg válaszokban is megmutatkozik. Ezzel szemben elektrosokkot alkalmazva a génihiányos állatoknál megfigyelhető hiányzó *Ucn1* mRNS és UCN1 peptid tartalom fokozódás a WT egerekhez viszonyított fokozott ugrálási gyakorisággal járt együtt a szituációs emlékeztető során, ami a PTSD-re jellemző *hyperarousal*-al ekvivalens viselkedési mintázatnak tekinthető (Hitchcock és mtsai. 1989; Gresack és Risbrough 2011). Irodalmi adatok szerint az EWcp/UCN1 neuronjai a stressz adaptáció késői fázisában a normális homeosztázis helyreállításához és a stresszválasz megszűnéséhez járulhatnak hozzá (Hsu és Hsueh 2001; Gaszner és mtsai. 2004), így felmerül, hogy a sokk modell alkalmazása során a KO egereknél megfigyelhető tartósan fokozott izgalmi állapot az UCN1 neuronok stresszre adott csökkent válaszával magyarázható, ami a stressz tengelyre kifejtett szabályozó funkció zavarához, és így egyes stressz-függő viselkedési válaszok nem megfelelő kioltásához vezethet. További érdekes megfigyelés, hogy míg az SPS-nél leírt *Ucn1* mRNS expresszióját érintő különbségek mindkét genotípusnál sokban hasonlítanak a CVMS modellben kapott korábbi eredményekhez (Kormos és mtsai. 2022), addig elektrosokk modell esetén ezektől lényegesen eltérő *Ucn1* mRNS expressziós dinamikát tapasztaltunk. Ennek magyarázata az lehet, hogy míg az SPS és CVMS paradigmák során részben hasonló stresszorokat (pl.: *restraint* stressz, FST) alkalmaztunk, addig az elektromos lábsokk által kiváltott PTSD a nociceptív hatáson alapul (Sawchenko és mtsai. 2000; Dayas és mtsai. 2001).

Az *Ucn1* mRNS expressziójára kifejtett hatásain túl feltételezhető, hogy a TRPA1 receptor intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szint emelkedés révén fokozhatja az UCN1 felszabadulását és ezáltal a stressz adaptáció folyamatát (Kormos és mtsai. 2022; Ujvári és mtsai. 2022; Casello és mtsai. 2022). Ezzel kapcsolatban felmerül, hogy a *Trpa1* mRNS expresszió stressz által kiváltott csökkenése a túlzott mértékű UCN1 felszabadulást és a kapcsolódó viselkedési válaszokat hívatott kompenzálni, bár ennek igazolása további vizsgálatokat igényel. Ugyanakkor az SPS modellt kivitelezve látszólagos ellentmondás volt a stressznek kitett TRPA1 KO állatok alacsony EWcp/UCN1 peptid szintjei, valamint az *Ucn1* mRNS expresszió fokozódása között, mely ellentmondás magyarázata az UCN1 peptid felszabadulás megváltozott dinamikája lehet. Ennek kapcsán ugyanakkor nem zárható ki, hogy az EWcp/UCN1 neuronjain található egyéb kationcsatornák (Zuniga és Ryabinin 2020) kompenzálhatják a TRPA1 hiányát a KO egerekben.

Az ismertett eredmények alapján felmerül a lehetősége, hogy az EWcp/UCN1 neuronok hozzájárulhatnak egyes stressz adaptációs zavarok kialakulásához (Kormos és mtsai. 2022), így szerepet játszhatnak a PTSD pathomechanizmusában is.

## 6. KONKLÚZIÓ, EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A TRPA1 receptorok szaglópálya különböző szintjein való expressziója alapján felmerül, hogy ezen ioncsatornának szerepe lehet az averzív/irritáló szagok érzékelésében és a szagingerek központi feldolgozásában, így hozzájárulva az azokhoz társuló viselkedési mintázatok kialakításához. A PTSD modellek során a WT állatok EWcp neuronjaiban tapasztalt *Trpa1* mRNS expresszió csökkenés az UCN1 peptid tartalom parallel fokozódásával felveti a lehetőségét, hogy a TRPA1 ioncsatornák hatással lehetnek a stressz adaptációs válaszokra, így befolyásolva a PTSD pathomechanizmusát. A KO állatok SPS modellnél tapasztalt csökkent immobilitása, illetve elektrosokk alkalmazásánál detektált fokozott ugrálási gyakorisága felveti a TRPA1 lehetséges szerepét a PTSD során fellépő depresszió-szerű viselkedés kialakulásában, valamint a *hyperarousal* kioltásában.

Új eredmények:

- Elsőként igazoltuk a *Trpa1* mRNS jelenlétét a PC glutamáterg neuronjain.
- Kimutattuk, hogy a *Trpa1* hiánya befolyásolja a predátor szag (róka és macska) hatására kialakuló viselkedési válaszokat.
- A *Trpa1* mRNS csökkent expresszióját detektáltuk PTSD egérmodelljeiben.
- Bizonyítottuk, hogy a *Trpa1* hiánya befolyásolja EWcp urocortinerg neuronjainak működését, *Ucn1* mRNS és UCN1 peptid tartalmát, valamint a viselkedési válaszokat PTSD egérmodelljeiben.
- Elsőként vetettük fel az EWcp/TRPA1/UCN1 neuronok lehetséges szerepét a PTSD pathomechanizmusában.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Achenbach J, Rhein M, Gombert S, Meyer-Bockenamp F, Buhck M, Eberhardt M, Leffler A, Frieling H és Karst M. Childhood traumatization is associated with differences in TRPA1 promoter methylation in female patients with multisomatoform disorder with pain as the leading bodily symptom. *Clinical Epigenetics*. 2019 Aug;28;11(1):126.
2. Adams HA és Hempelmann G. Die endokrine Streßreaktion in Anästhesie und Chirurgie-Ursprung und Bedeutung. *AINS - Anästhesiologie · Intensivmedizin · Notfallmedizin · Schmerztherapie*. 1991; 26(6): 294-305.
3. Al-Omari A, Kecskés M, Gaszner B, Biró-Sütő T, Fazekas B, Berta G, Kuzma M, Pintér E és Kormos V. Functionally active TRPA1 ion channel is downregulated in peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus upon acute alcohol exposure. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023 Jan;10;10:1046559.
4. Auxéméry Y. Post-traumatic psychiatric disorders: PTSD is not the only diagnosis. *Presse Medicale*. 2018 May;47(5):423-430.
5. Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW és Lee KF. Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *Journal of Neuroscience* 2002 Jan;1;22(1):193-9.
6. Bale TL, Lee KF és Vale WW. The role of corticotropin-releasing factor receptors in stress and anxiety. *Integrative and Comparative Biology*. 2002 Jul;42(3):552-5.
7. Boesveldt S és Parma V. The importance of the olfactory system in human well-being, through nutrition and social behavior. *Cell and Tissue Research*. 2021 Jan;383(1):559-567.
8. Casello SM, Flores RJ, Yarur HE, Wang H, Awanyai M, Arenivar MA, Jaime-Lara RB, Bravo-Rivera H és Tejada HA. Neuropeptide System Regulation of Prefrontal Cortex Circuitry: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Neural Circuits*. 2022 Jun;21;16:796443.
9. Davis M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1992 Jan;13(1):35-41.
10. Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y és Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *European Journal of Neuroscience*. 2001 Oct;14(7):1143-52.
11. Dong HW, Davis JC, Ding S, Nai Q, Zhou FM, és Ennis M. Expression of transient receptor potential (TRP) channel mRNAs in the mouse olfactory bulb. *Neuroscience Letters*. 2012 Aug;22;524(1):49-54.
12. Fekete EM és Zorrilla EP. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2007 Apr;28(1):1-27.
13. Gaszner B, Csernus V és Kozicz T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 2004 Dec;6;480(2):170-9.
14. Goodnight JRM, Ragsdale KA, Rauch SAM és Rothbaum BO. Psychotherapy for PTSD: An evidence-based guide to a theranostic approach to treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019 Jan;10;88:418-426.
15. Gresack JE és Risbrough VB. Corticotropin-releasing factor and noradrenergic signalling exert reciprocal control over startle reactivity. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2011 Oct;14(9):1179-94.
16. Hitchcock JM, Sananes CB és Davis M. Sensitization of the startle reflex by footshock: blockade by lesions of the central nucleus of the amygdala or its efferent pathway to the brainstem. *Behavioral Neuroscience*. 1989 Jun;103(3):509-18.
17. Hori H és Kim Y. Inflammation and post-traumatic stress disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2019 Apr;73(4):143-153.
18. Hsu SY és Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nature Medicine*. 2001 May;7(5):605-11.
19. Julius D. TRP channels and pain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2013;29:355-84.
20. Im E. Multi-facets of Corticotropin-releasing Factor in Modulating Inflammation and Angiogenesis. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2015 Jan;1;21(1):25-32. doi: 10.5056/jnm14076. PMID: 25540945.
21. Janitzky K, D'Hanis W, Kröber A és Schwegler H. TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a suitable model for uncontrollable intense stress. *Brain Research*. 2015 Mar;2;1599:1-8.
22. Kamiya K és Abe O. Imaging of Posttraumatic Stress Disorder. *Neuroimaging Clinics of North America*. 2020 Feb;30(1):115-123.

23. Koike K, Yoo SJ, Blyemehl K, Omura M, Zapiec B, Pyrski M, Blum T, Khan M, Bai Z, Leinders-Zufall T, Mombaerts P és Zufall F. Danger perception and stress response through an olfactory sensor for the bacterial metabolite hydrogen sulfide. *Neuron*. 2021 Aug;4;109(15):2469-2484.e7.
24. Koivisto A, Hukkanen M, Saarnilehto M, Chapman H, Kuokkanen K, Wei H, Viisanen H, Akerman KE, Lindstedt K és Pertovaara A. Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral diabetic neuropathy. *Pharmacological Research*. 2012 Jan;65(1):149-58.
25. Kondoh K, Lu Z, Ye X, Olson DP, Lowell BB és Buck LB. A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. *Nature*. 2016 Apr;7;532(7597):103-6.
26. Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Alomari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E és Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2022 May;4;47(3):E162-E175.
27. Lage-Rupprecht V, Zhou L, Bianchini G, Aghvami SS, Mueller M, Rózsa B, Sassoè-Pognetto M és Egger V. Presynaptic NMDARs cooperate with local spikes toward GABA release from the reciprocal olfactory bulb granule cell spine. *Elife*. 2020 Nov;30;9:e63737.
28. Lee DJ, Schnitzlein CW, Wolf JP, Vythilingam M, Rasmusson AM és Hoge CW. Psychotherapy versus pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder: systemic review and meta-analyses to determine first-line treatments. *Depression and Anxiety*. 2016 Sep;33(9):792-806.
29. Lee KI, Lin HC, Lee HT, Tsai FC és Lee TS. Loss of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Deregulates Emotion, Learning and Memory, Cognition, and Social Behavior in Mice. *Molecular Neurobiology*. 2017 Jul;54(5):3606-3617.
30. Logashina YA, Korolkova YV, Kozlov SA és Andreev YA. TRPA1 Channel as a Regulator of Neurogenic Inflammation and Pain: Structure, Function, Role in Pathophysiology, and Therapeutic Potential of Ligands. *Biochemistry (Mosc)*. 2019 Feb;84(2):101-118.
31. Marone IM, De Logu F, Nassini R, De Carvalho Goncalves M, Benemei S, Ferreira J, Jain P, Li Puma S, Bunnnett NW, Geppetti P és Materazzi S. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. *Brain*. 2018 Aug;1;141(8):2312-2328.
32. Meents JE, Ciotu CI és Fischer MJM. TRPA1: a molecular view. *Journal of Neurophysiology*. 2019 Feb;1;121(2):427-443.
33. Miller MW, Wolf EJ, Sadeh N, Logue M, Spielberg JM, Hayes JP, Sperbeck E, Schichman SA, Stone A, Carter WC, Humphries DE, Milberg W és McGlinchey R. A novel locus in the oxidative stress-related gene ALOX12 moderates the association between PTSD and thickness of the prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Dec;62:359-65.
34. Miller MW, Lin AP, Wolf EJ és Miller DR. Oxidative Stress, Inflammation, and Neuroprogression in Chronic PTSD. *Harvard Review of Psychiatry*. 2018 Mar/Apr;26(2):57-69.
35. de Moura JC, Noroes MM, Rachetti Vde P, Soares BL, Preti D, Nassini R, Materazzi S, Marone IM, Minocci D, Geppetti P, Gavioli EC és André E. The blockade of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) signalling mediates antidepressant- and anxiolytic-like actions in mice. *British Journal of Pharmacology*. 2014 Sep;171(18):4289-99.
36. Oettl LL és Kelsch W. Oxytocin and Olfaction. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2018;35:55-75.
37. Oroian BA, Ciobica A, Timofte D, Stefanescu C és Serban IL. New Metabolic, Digestive, and Oxidative Stress-Related Manifestations Associated with Posttraumatic Stress Disorder. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 Dec;20;2021:5599265.
38. Perczel-Forintos D és Lisincki A. „A PTSD kezelése NICE irányelvek alapján 1”. 2020. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng116>.
39. Pérez-Gómez A, Blyemehl K, Stein B, Pyrski M, Birnbaumer L, Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F és Chamero P. Innate Predator Odor Aversion Driven by Parallel Olfactory Subsystems that Converge in the Ventromedial Hypothalamus. *Current Biology*. 2015 May;18;25(10):1340-6.
40. Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan D és Rang HP. *Rang & Dale's Pharmacology*, 9th Edition. London: Elsevier. 2018.
41. Sawchenko PE, Li HY és Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Progress in Brain Research*. 2000;122:61-78.
42. Schrader C és Ross A. A Review of PTSD and Current Treatment Strategies. *Missouri Medicine*. 2021 Nov-Dec;118(6):546-551.

43. Talavera K, Startek JB, Alvarez-Collazo J, Boonen B, Alpizar YA, Sanchez A, Naert R és Nilius B. Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiological Reviews*. 2020 Apr;1;100(2):725-803.
44. Tan KS, Nackley AG, Satterfield K, Maixner W, Diatchenko L és Flood PM. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal*. 2007 Feb;19(2):251-60.
45. Topilko T, Diaz SL, Pacheco CM, Verny F, Rousseau CV, Kirst C, Deleuze C, Gaspar P és Renier N. Edinger-Westphal peptidergic neurons enable maternal preparatory nesting. *Neuron*. 2022 Apr;20;110(8):1385-1399.e8.
46. Török B, Sipos E, Pivac N és Zelena D. Modelling posttraumatic stress disorders in animals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2019 Mar;2;90:117-133.
47. Truex RC és Carpenter MB. *Human neuroanatomy*, 6th edition. Williams and Wilkins. 1969.
48. Ujvári B, Pytel B, Márton Z, Bognár M, Kovács LÁ, Farkas J, Gaszner T, Berta G, Kecskés A, Kormos V, Farkas B, Füredi N és Gaszner B. Neurodegeneration in the centrally-projecting Edinger-Westphal nucleus contributes to the non-motor symptoms of Parkinson's disease in the rat. *Journal of Neuroinflammation*. 2022 Feb;2;19(1):31.
49. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, és mtsai. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. 1995 Nov;16;378(6554):287-92.
50. Vosshall LB. Social signals: the secret language of mice. *Current Biology*. 2005 Apr;12;15(7):R255-7.
51. White-Welkley JE, Bunnell BN, Mougey EH, Meyerhoff JL és Dishman RK. Treadmill exercise training and estradiol differentially modulate hypothalamic-pituitary-adrenal cortical responses to acute running and immobilization. *Physiology & Behavior*. 1995 Mar;57(3):533-40.
52. Wang Y, Cao L, Lee CY, Matsuo T, Wu K, Asher G, Tang L, Saitoh T, Russell J, Klewe-Nebenius D, Wang L, Soya S, Hasegawa E, Chérasse Y, Zhou J, Li Y, Wang T, Zhan X, Miyoshi C, Irukayama Y, Cao J, Meeks JP, Gautron L, Wang Z, Sakurai K, Funato H, Sakurai T, Yanagisawa M, Nagase H, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Beutler B és Liu Q. Large-scale forward genetics screening identifies *Trpa1* as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. *Nature Communications*. 2018 May;23;9(1):2041.
53. Wang L, Zhang Z, Chen J, Manyande A, Haddad R, Liu Q és Xu F. Cell-Type-Specific Whole-Brain Direct Inputs to the Anterior and Posterior Piriform Cortex. *Frontiers in Neural Circuits*. 2020 Feb;7;14:4.
54. Zelena D, Mergl Z, Foldes A, Kovács KJ, Tóth Z és Makara GB. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2003 Nov;285(5):E1110-7.
55. Zou J, Wang W, Pan YW, Lu S és Xia Z. Methods to measure olfactory behavior in mice. *Current Protocols in Toxicology*. 2015 Feb;2;63:11.18.1-11.18.21.
56. Zuniga A és Ryabinin AE. Involvement of Centrally Projecting Edinger-Westphal Nucleus Neuropeptides in Actions of Addictive Drugs. *Brain Sciences*. 2020 Jan;26;10(2):67.

## 8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

**Konkoly J\***, Kormos V\*, Gaszner B, Sándor Z, Kecskés A, Al-Omari A, Szilágyi A, Szilágyi B, Zelena D, Pintér E

*The role of TRPA1 channels in the central processing of odours contributing to the behavioural responses of mice*

PHARMACEUTICALS (2021) 14(12):1336. doi: 10.3390/ph14121336.

Impakt faktor: 5,215

Független citáció: 1

Folyóirat besorolása (2022): Q1

\* Megosztott elsőszerzős közlemény

**Konkoly J\***, Kormos V\*, Gaszner B, Correia P, Berta G, Biró-Sütő T, Zelena D, Pintér E

*Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel expressed by the Edinger-Westphal nucleus contributes to stress adaptation in murine model of posttraumatic stress disorder*

FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY (2022) 10:1059073. doi: 10.3389/fcell.2022.1059073.

Impakt faktor: 5,5

Független citáció: 0

Folyóirat besorolása (2023): Q1

\* Megosztott elsőszerzős közlemény

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 10,715

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összes független citációja: 1

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Prof. Dr. Pintér Erikának a Doktori iskola vezetőjének és intézetvezetőnknek, illetve Dr. Gaszner Dr. Kormos Viktória egyetemi adjunktusnak a PhD munkám során nyújtott oktatómunkáért, vezetésért, anyagi támogatásért kutatói példamutatásért, tanácsokért és segítségért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Zelena Dórának az állatkísérletes modellekben, viselkedés vizsgálatokban és statisztikai analízisben nyújtott segítségéért és tanácsaiért, illetve az állatkísérleteknél használt eszközök és egerek biztosításáért.

Köszönettel tartozom Dr. Gaszner Baláznak az immunfluoreszcens módszerek és RNAscope ISH során nyújtott anyagi támogatásáért és szakmai tanácsaiért, valamint a szövettani minták fotózásában nyújtott segítségéért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Sándor Zoltánnak az általunk is használt CHO sejtvonal létrehozásáért, valamint a  $Ca^{2+}$  beáramlás mérésénél nyújtott munkájáért, Dr. Kecskés Angélnak szakmai segítségéért, illetve Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkóphoz való hozzáférés biztosításáért.

Szeretnék köszönetet mondani Biró-Sütő Tündének asszisztensi munkájáért, Szabó Adriennek és Török Bibiánának az állatkísérleteknél, Dr. Ammar Al-Omarinak a laboratóriumi munka során, továbbá Schram Flóra TDK hallgatónak a morfológiai vizsgálatok kiértékelésében nyújtott segítségéért.

Köszönetemet szeretném kifejezni továbbá a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és az Élettani Intézet minden dolgozójának, akik hozzájárultak munkámhoz.

Hálás köszönettel tartozom Családomnak, különösen Édesanyámnak és Édesapámnak, illetve Menyasszonyomnak szeretetükért, támogatásukért, türelmükért és segítségükért.

A PhD dolgozatban összefoglalt kutatási tevékenység anyagi támogatásáért köszönet illeti a támogatókat: Richter Gedeon Talentum Alapítvány: Richter Gedeon Kiválósági PhD. Ösztöndíj; Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal: TKP2021-EGA-16; Nemzeti Agykutatási Program 2.0: 2017-1.2.1.-NKP-2017-00002; Nemzeti Agykutatási Program 3.0: RRF-2.3.1-21-2022-00015.