

**NEUROPATHOLÓGIAI VIZSGÁLATOK AZ EGEREK KÖZPONTI
IDEGRENDSZERÉBEN-ÚJ FARMAKOLÓGIAI CÉLPOT VIZSGÁLATA A
CUPRIZONE MODELLBEN ÉS A PRIMER CILIUMOK ÖSSZEHASONLÍTÓ
SZÖVETANI ANALÍZISE A FIZIOLÓGIÁS KÖZPONTI IDEGRENDSZERBEN**

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISE



Dr. Sipos Éva

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Neurológiai Klinika

Témavezető: prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár, az MTA doktora

Dr. Ács Péter, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Programvezető: prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár, az MTA doktora

Doktori iskola vezetője: prof. Dr. Komoly Sámuel, egyetemi tanár, az MTA doktora

Pécs, 2020

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1 Sclerosis Multiplex általános áttekintése és neuropathológiai sajátosságai	3
1.1.1 Cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs állatmodell.....	5
1.2 A primer ciliumok szerepe a központi idegrendszerben	6
2. TANULMÁNYOK ÖSSZEFOGLALÁSA	9
2.1 Tanulmány 1.: A TRPA1 vizsgálata a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs állatmodellben- Új farmakológiai célpont az oligodendroglia apoptózis ellen.....	9
2.1.1 Tanulmány háttere és célkitűzések	9
2.1.2 Eredmények.....	10
2.1.2.1 A TRPA1 expressziója a központi idegrendszerben	10
2.1.2.2 Cuprizone kezelés mérsékelt demyelinizációt idéz elő a TRPA1 hiányos egerekben.....	10
2.1.2.3 Cuprizone által kiváltott OL pusztulás, gliózis és makrofág reakció csökkent a TRPA1 KO egerekben	11
2.1.2.4 Az éretlen OL száma fokozódik a cuprizone kezelt WT állatokban a TRPA1 KO egerekhez képest 11	
2.1.2.5 A <i>Bak</i> , <i>IGF-1</i> , <i>FGF-2</i> és <i>PDGFRα</i> mRNS expresszió vizsgálata a CC-ban	11
2.1.2.6 A TRPA1 genetikai hiánya mérsékli az érett OL apoptózist a p38-MAPK és c-Jun aktivációjának csökkentésén, valamint az ERK1/2 jelátviteli útvonal fokozott aktivitásán keresztül...12	
2.2 Tanulmány 2.: A primer cilium markerek expressziójának és hosszának kvantitatív összehasonlítása az egerek központi idegrendszerében	13
2.2.1 Tanulmány háttere és célkitűzések	13
2.2.2 Eredmények.....	14
2.2.2.1 Az AC3, Sstr3 és Arl13b-t expresszáló primer ciliumok celluláris karakterizálása a központi idegrendszerben.....	14
2.2.2.2 A neuronokra és asztrocitákra lokalizálódó primer ciliumok disztribúciójának összehasonlító elemzése az egerek központi idegrendszerében.....	15
2.2.2.3 A primer ciliumok regionális eloszlása az organellek hosszának változatos megjelenésével asszociálódik.	16
3. A TÉZIS ÖSSZEFOGLALÁSA, KONKLÚZIÓ ÉS JÖVŐBELI KILÁTÁSOK.....	18
4. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK.....	27
4.1 Az értekezéshez kapcsolódó publikációk	27
4.2 Idézhető absztraktok	27
4.3 Kongresszusi poszter prezentációk	27
4.4 Kongresszusi szóbeli előadások.....	28
5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ÉS TÁMOGATÁS.....	29
5.1 Köszönetnyilvánítás.....	29
5.2 Támogatás.....	29
6. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	30

1. BEVEZETÉS

1.1 Sclerosis Multiplex általános áttekintése és neuropathológiai sajátosságai

A Sclerosis Multiplex (SM) a központi idegrendszer (KIR) krónikus, gyulladásal és demyelinizációval járó neurodegeneratív betegsége. A SM a fiatal felnőtt kor egyik leggyakoribb neurológiai kórképe. Prevalenciája az északi országok felé folyamatosan növekszik [1] és megjelenését elsősorban női dominancia jellemzi (nő: férfi arány 1,5:1 és 2,5:1) [2]. Klinikai szempontból a betegség általában 25-35 éves kor között kezdődik és változatos idegrendszeri tünettannal jelentkezik. Az érintett KIR-i (agy és gerincvelő) területtől függően leggyakrabban látászavar, motoros- és autonóm idegrendszeri diszfunkciók, megváltozott szenzoros modalitások, illetve érzelmi és/vagy kognitív tünetek formájában manifesztálódik [3-12]. A tünetek kombinációja, intenzitása és megjelenésük gyakorisága egyénenként eltérő a betegség lefolyása során. Típusos esetben az újonnan diagnosztizált SM betegek neurológiai tünetei csak átmenetileg állnak fenn (ún. relapszáló-remittáló SM/RRSM), azonban a kórkép későbbi szakaszában adott tünettannal állandósul, javulás nem figyelhető meg (ún. másodlagos progresszív SM/SPSM). Ezzel szemben egyes betegek neurológiai tünetei progresszív romlást mutatnak már a betegség kezdetétől indulóan (ún. elsődleges progresszív SM/PPSM). Ritkább esetben, a diagnózis felállítását követő klinikai tünettannal egyenletes romlás figyelhető meg, amihez akut relapszusok is társulhatnak remisszióval vagy anélkül (ún. progresszív-relapszáló SM/ PRSM) [4, 13-16]. Az SM hátterében álló folyamatok évtizedek óta a kutatások fókuszában állnak. Jól ismert, hogy bizonyos környezeti tényezők és genetikai faktorok egyaránt hozzájárulnak a betegség kialakulásához [2]. Azonban, az SM pontos pathomechanizmusa részleteiben továbbra sem ismert. Tekintettel a kórkép változatos klinikai lefolyására, felmerült, hogy az SM különböző megjelenési formáihoz eltérő pathológiai folyamatok társulhatnak [17, 18].

Az SM fő neuropathológiai jellemzője a fokális, demyelinizációs plakk vagy ún. lézió megjelenése. A léziók típusos szövettani jellegzetessége az oligodendroglia (OL) károsodás, a gyulladásos sejtek, az axonális károsodás és a reaktív gliózis jelenléte [3, 19, 20]. A klasszikus elmélet szerint a léziók autoimmun gyulladásos folyamat során keletkeznek, melyben auto-reaktív T sejtek átjutnak a vér-agy gáton (VAG), majd a KIR-i immunsejtek közvetítésével specifikus OL-kat és myelint károsító gyulladást idéznek elő [19, 21]. Azonban az elmúlt évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy a léziók immunpathológiai megjelenése nem egységes és kialakulásukban sokkal összetettebb folyamatok játszanak szerepet. Korábbi kiemelkedő neurohisztológiai vizsgálatok [17, 22] különböző demyelinizációs mintázatokat találtak a SM betegek körében. A tanulmány során a léziókat négy eltérő formában kategorizálták (I-IV típus)

azok szövettani jellegzetességeit figyelembe véve. Ez alapján kettő eltérő folyamatot valószínűsítettek a demyelinizáció kialakulásának hátterében: 1) makrofág és antitest-közvetített demyelinizációs folyamat (I-II-es típus) vagy 2) elsődleges OL károsodás által kiváltott demyelinizáció (III-IV-es típus). Amíg az I-nél a léziók típusosan vénák mentén helyezkedtek el, azok éles határral elkülönültek a szövetben és az aktív demyelinizációs területen markáns gyulladásos infiltrátumokat detektáltak (T sejtek, makrofágok); a II-es típusnál kifejezett immunglobulin G (IgG) és komplement lerakódás is látható volt az aktív centrumban. Ezzel szemben a III-as típusnál feltűnő volt a kifejezett OL apoptózis (nukleáris kondenzáció és fragmentáció) a léziók szélén, de hiányzott azok centrumában. Ezen léziók határa kevésbé körülírt, nem követték a vénák elhelyezkedését, valamint a gyulladt érrendszer mentén sokszor egy vékony réteg myelin is megmaradt. Az OL pusztulását markáns myelin-asszociált glikoprotein (MAG) csökkenés kísérte a sérült szövetekben. A IV-es típusnál a léziók szövettani sajátosságai hasonlóságot mutattak az I-es típussal (elhelyezkedés, myelin fehérjék egységes csökkenése, sejtípusok jelenléte) Ig és komplement lerakódás nélkül. Kiemelendő, hogy kiterjedt OL pusztulás volt látható az aktív és inaktív léziókban, illetve DNS fragmentáció jelei detektálhatók a plakkot övező állományban ismételve utalva OL funkciózavarra (disztrófia/apoptózis). Az SM kórszövettanának széles spektruma alapján megkérdőjelezhetővé vált az általános immunológiai elmélet és felmerült a kérdés, hogy rendellenes gyulladásos folyamat vagy elsődleges OL pusztulás/neurodegeneráció áll az új léziók kialakulásának kezdőpontjában. Barnett és mtsai. [18] az új neurodegeneratív elméletet tovább vizsgálták új tüneteket okozó SM léziókban. Immunpatológiai elemzésük során korai OL apoptózishoz társuló mikroglia aktivációt figyeltek meg, amíg a T sejtek, a makrofágok és az asztrociták infiltrációja hiányzott az apoptotikus zónából. Eredményeik alapján feltételezték, hogy a különböző patológia folyamatok időbeli fejlődése vezet az SM léziók kialakulásához [18, 23]. Ezen elmélet szerint az elsődleges OL apoptózis olyan strukturális és molekuláris változásokat idéz elő a myelinhüvelyben, mely a helyi mikroglia aktiváción keresztül végső soron szisztémás immunválaszhoz vezet. Megfigyeléseikkel megerősítést nyert a teória, hogy OL apoptózis nem csak a III-as típusú SM léziók jellemzője [17], hanem a léziók kialakulásának kezdeti pontját képviselheti [18].

A kutatás jelen álláspontra szerint specifikus SM-et kiváltó okot eddig nem sikerült azonosítani, mely markáns autoimmun folyamatot aktiválna vagy progresszív cytodegeneratív elváltozást idézne elő. Vitathatatlan tény, hogy mindkét folyamat kulcsszerepet játszik az SM léziók patológiájának időben és egyéni heterogenitásában, valamint a betegség teljes megjelenési

spektrumában. Ezzel pedig a szöveti sérülés neuropathológiájának molekuláris szintű ismerete elengedhetetlen az SM adekvát terápiájának kialakításához.

1.1.1 Cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs állatmodell

A cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizáció az egyik leggyakrabban alkalmazott állatmodell a demyelinizációs és remyelinizációs folyamatok tanulmányozásához, melyet relatíve ép VAG mellett nem befolyásol a szerzett immunválasz [24, 25]. A cuprizone [Bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone] alapvető funkcióját illetően egy réz-kelátor, mely vegyület KIR-I hatásai az 1960-as években váltak ismertté [26, 27]. Korábbi tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a vegyület szisztémás használata- egerek 0,2%-os cuprizone tartalmú porított táppal történő etetése- időben és térben jól reprodukálható demyelinizációt idéz elő a kísérleti állatok KIR-ben [28]. A modell fő hisztopathológiai jellegzetessége a szelektív érett oligodendrocyta (OL) apoptózis jelenléte az egerek agyának meghatározott területein. Az OL halálát megamitochondriumok megjelenése előzi meg az érintett sejtekben [27, 29]. Bár az OL apoptózis mechanizmusa pontos részleteiben még mindig nem ismert, a közelmúltban végzett tanulmányok a folyamatot részben a réz-kelátor által kiváltott mitochondriális diszfunkciónak és megnövekedett oxidatív stressznek tulajdonítják [30-32]. Az OL-k halálát masszív demyelinizáció követi elsősorban az agy fehérállományának különböző területein (corpus callosum, commissura anterior, pedunculus cerebellaris superior). Ezen túl, más régiókban (hippocampus, cerebellum, putamen, nucl. caudatus ventralis része), illetve kortikális és mély szürkeállományi területeken (pl.: striatum) is kialakul mérsékeltebb demyelinizáció viszont megkíméli a gerincevelőt cord [31, 33-38]. A modell egy másik kórszövettani jellegzetessége, hogy a demyelinizált léziókhöz markáns asztrocyta és mikroglia/makrofág invázió társul. Ezen utóbbi sejtípusoknak a pontos szerepe mindmáig ellentmondásos. Eltérő kísérleti kondícióktól függően mind az asztrocyták, mind a mikroglia/ makrofágok jótékony és káros hatásairól számos publikáció jelent meg a szakirodalomban [39-42]. Azonban kiemelendő, hogy az asztrogliózis dinamikája és sűrűsége, valamint a mikroglia/makrofág invázió megjelenése időben korrelál a myelin fehérje gének (MBP, PLP, MAG) expressziójának változásával, jelezve azok kulcsszerepét a mikrokörnyezet befolyásolásában [43, 44]. A cuprizone modell ugyancsak alkalmas a remyelinizáció folyamatának sejtszintű vizsgálatára. Hat hetes cuprizone kezelés hatására komplett demyelinizáció alakul ki a fehér és szürkeállományban (ún. akut demyelinizáció). Ha 6 hét után a kezelést leállítják- és az állatokat cuprizone mentes táppal etetik tovább- az akut demyelinizációt rövidesen szinte teljes spontán remyelinizáció követi az oligodendroglia progenitor sejtek (OPC) aktivációján keresztül. Ezzel szemben a tartós

cuprizone kezelés (12 hét vagy hosszabb időtartam) krónikus demyelinizációt vált ki, mely után a spontán remyelinizációs képesség jelentősen romlik vagy teljesen megszűnik [33].

Az SM léziók kialakulásának pontos mechanizmusa vagy kiváltó oka mindmáig nem tisztázott. Jól ismert, hogy a legtöbb humán lézió kialakulásában fontos szerepet játszanak az autoimmun gyulladásos folyamatok. Ezen túl, korábbi immunpatológiai vizsgálatok rávilágítottak egy alternatív mechanizmusra, melyben az elsődleges OL pusztulás reprezentálhatja a léziók kialakulásának kezdetét, egy primer neurodegeneratív folyamatot [17, 18]. A cuprizone-indukált demyelinizációs modell kórszövettani jellegzetességei jelentős hasonlóságot mutatnak a humán III-as típusú SM plakkokkal [45, 46]. Nevezetesen, az elsődleges OL apoptózishoz korai és szelektív MAG mRNS szint csökkenés társul a többi myelin proteinekhez képest. A szövettanilag felismerhető OL pusztulást masszív demyelinizáció követi. Ezzel egyidejűleg kifejezett asztrocyta aktiváció és mikroglia/makrofág invázió detektálható a sérült myelin és axonális károsodás helyreállítására [43, 44, 47]. Azonban fontos kiemelni, hogy hiányzik a humán léziókban előforduló szignifikáns lymphocita infiltráció [48]. Összegezve, a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs modell számos lehetőséget nyújt a nem immun-mediált elsődleges neurodegeneratív kaszkádok, a remyelinizáció és elemeik sejtszintű megismeréséhez; utat teremtve új terápiás célpontok felfedezéséhez.

1.2 A primer ciliumok szerepe a központi idegrendszerben

A primer ciliumok (másnéven elsődleges csillók) a legtöbb emlős sejten megtalálható kis méretű, immobilis sejtfelszíni organellek. Összehasonlítva motilis ciliumokkal/flagellákkal, a primer ciliumok nem rendelkeznek mozgást vagy folyadékáramlást elősegítő funkcióval. Mára már általánosan elfogadott, hogy ezen ciliumok egyedi szenzoros és jelátviteli állomáspontként működnek. Az extracelluláris környezet változásait érzékelve különböző jelátviteli útvonalakat közvetítenek a sejtek felé, mellyel módosítják a celluláris folyamatokat. Kiemelendő, hogy az elsődleges csillók membránja szövet/szerv specifikus receptorkészlettel és jelátviteli molekulákkal rendelkezik, amivel kritikus szerepet játszanak az emlős szervezetben zajló, számos fejlődési, illetve fiziológiai jelátviteli útvonalak koordinálásában [49-53]. A primer ciliumok által mediált jelátvitel funkcionális jelentősége már régóta a kutatások fókuszában áll. Tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a primer ciliumok közvetített jelátviteli útvonalak kulcsszerepet játszanak az embryonális agyszövet mintázatának kialakításában, valamint az őssejtek migrációjának, differenciációjának és fenntartásának szabályozásában [54-60]. Ezen túl fény derült arra is, hogy a primer ciliumok sejtfelszíni hiánya vagy a ciliumokra lokalizálódó proteinek kóros működése hátterében állhat egy humán

genetikai betegségcsoport, a ciliopáthiák kialakulásában [61-64]. A ciliopáthiák klinikailag egy spektrum betegség, melyre nagy átfedést mutató, összetett fejlődési rendellenességek megjelenése jellemző. Kiemelendő, hogy bizonyos humán ciliopáthiákhoz sorolható kórképek – mint például a Bardet-Biedl szindróma [65-67], Joubert szindróma [68-70], Alström szindróma [71-73] vagy Meckel-Grüber szindróma [74, 75] – súlyos központi idegrendszeri (KIR) érintettséget is mutat (pl.: kognitív defektusok, mentális retardáció, agyi fejlődési rendellenességek).

Bár a primer ciliumok diszfunkciója vitathatatlan jelentőségűvé vált a fejlődési folyamatokban, azok pontos, fiziológiás szerepe a felnőtt KIR-ben mindmáig kevésbé ismert. Kiemelendő, hogy az agyi neuronok primer ciliumai szelektíven expresszálnak különböző G-protein kapcsolt receptorokat (GPCR) és molekulákat, mint a szomatosztatin 3 receptort (Sstr3) [76], melanin-koncentráló hormon receptor 1-t (Mch1r) [77, 78], szerotonin receptor 6-t (5HT₆) [79, 80], dopamin receptor 1-t (D1r) [81], kisspeptin receptor 1-t (Kiss1r) [82], neuropeptid Y 2 és 5 receptorokat (NPY2r and NPY5r) [83], valamint egy jelátvitelt közvetítő molekulát, az adenil-cikáz 3-t (AC3) [84]. Nevezetesen, ezen jelátviteli fehérjék ciliáris expressziója csak bizonyos neuron populációkra korlátozódik. Ez alapján feltételezik, hogy az elsődleges csillók szerepet játszanak a táplálékfelvétel (éhség-jóllakottság) fő központjának, a hipotalamusz szabályozásában. Korábbi tanulmányok rámutattak arra, hogy a hipotalamikusan neuronok ciliumaiban koncentrálnak specifikus fehérjék – Mch1r, AC3 és Bardet-Biedl szindróma (BBS) proteinek – aktivitása hozzájárul az étvágyat koordináló komplex jelátviteli útvonalak megfelelő működéséhez [77, 78, 85-87]. Ezen ciliumok struktúrájának vagy az azokra lokalizálódó fenti fehérjék genetikai hiánya kóros jelátvitelhez és következményes hiperfágia-indukált obezitáshoz vezetnek a kísérleti állatokban [88, 89]. Emellett kimutatták, hogy a hippocampális neuronális primer ciliumok (NPC) diszfunkciója során jelentősen károsodik a neuronok közötti kapcsolatrendszer és hátrányossá válik az egerek tanulása, memóriája, illetve az új tárgyak felismerésének képessége [85, 90]. A fentiekén túl, a ciliumok morfológiája és hossza is jól tükrözi az elsődleges csillók lehetséges funkcióit. A ciliumok hosszának változásáról (pl.: megnyúlás) feltételezik, hogy az organellek részben így adaptálódnak az extracelluláris környezet változásaihoz, a jelátviteli képességeinek finomhangolásához [91, 92]. Emellett, a kóros jelátvitel – amit az eltérő morfológia vagy alkalmazkodási képesség hiánya mutat – ugyancsak az NPC-vel kapcsolatos betegségek neuropathológiai jellemzői lehetnek. Hasonlóan a GPCR-hoz, az ADP ribozilációs faktor-szerű protein 13B (Arl13b) ugyancsak szelektíven lokalizálódik a NPC membránjában, valamint közvetlen szerepet játszik az organellek iniciációjában, differenciációjában és elongációjában [93-96]. Szakirodalmi adatok alapján, az

Arl13b funkcionális hiánya a sejtfelszíni ciliumok jelentős rövidüléséhez és strukturális eltéréseihez vezet, amíg az Arl13b túlexpressziója növeli a sejtek cilimainak hosszát [95-97]. Ezzel összhangban a tanulmányok arról is beszámoltak, hogy más ciliáris jelátviteli komponensek farmakológiai aktiválása, gátlása vagy genetikai hiánya befolyásolhatja a cilium hosszát és morfológiáját különböző kísérleti körülmények között [98-100]. A fentieket összegezve elmondható, hogy az elsődleges csillók dinamikusan alkalmazkodnak az extracelluláris térben detektált szignálokhoz molekuláris komponenseik és morfológiájuk megváltoztatásával. A KIR-i fejlődésben, neurogenesisben és homeosztázisban jól ismert szerepük mellett [54, 56, 59], újabb állatkísérletekből és *in vitro* sejtvonalakból nyert adatok felvetették, hogy az elsődleges csillók diszfunkciója (megváltozott morfológia, jelátviteli fehérje vagy teljes struktúra hiánya) hozzájárulhat bizonyos KIR-i daganatok kialakulásához [101-105], valamint más humán neurológiai betegségek pathogeneziséhez [106-119].

Eddigi megfigyeléseink ellenére az elsődleges csillók felnőtt KIR-ben betöltött pontos, fiziológiai szerepe még kevésbé ismert. Ezen túl, a primer ciliumok humán szövetekben fellelhető jellegzetességeiről információ jelenleg leginkább a humán mintákból származó *in vitro* sejtvonalakra korlátozódik az organellumok faj és szövetspecifikus sajátosságai miatt. Ezért a primer ciliumok neuropathológiai és celluláris karakterizálása a felnőtt rágsálók KIR-ben nélkülözhetetlen eszköz az agyban betöltött szerepük vizsgálatához, mely elősegítheti az organellumok klinikai relevanciájának pontosabb megismerését, valamint új detektálási módszerek kifejlesztését a post-mortem humán szövetek analíziséhez a jövőben.

2. TANULMÁNYOK ÖSSZEFOGLALÁSA

2.1 Tanulmány 1.: A TRPA1 vizsgálata a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs állatmodellben- Új farmakológiai célpont az oligodendroglia apoptózis ellen

2.1.1 Tanulmány háttere és célkitűzések

Az SM a KIR krónikus, demyelinizációval járó és degeneratív betegsége. Bár a léziók pathológiai szempontból heterogének [17], részletes immunpathológiai vizsgálatok egy része elsődleges degeneratív folyamatot feltételez a léziók kialakulásának iniciális szakaszában [18, 23]. Eszerint, a primer OL apoptózis rejtett antigének felszínre kerüléséhez vezet a myelinhüvely integritásának megbomlásával, mely következményes autoimmun gyulladást generál a KIR-ben. Ezt követően az OL pusztulása jelentősen fokozódik a betegség progresszív szakaszában (SPSM, PPSM) [120]. A jelenleg rendelkezésre álló immunmoduláló terápiák hatékonyan befolyásolják a betegség gyulladásos aspektusát, viszont mérsékelt hatékonyságúnak bizonyulnak a hosszútávú klinikai lefolyásban. Így egyre növekszik az igény új farmakológiai célpontok keresésére, az SM terápiás spektrumának szélesítésére. A cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizáció az egyik leggyakrabban alkalmazott állatmodell, mely jól prezentálja a humán III-IV-es típusú SM léziók pathológiai sajátosságait (elsődleges OL pusztulás, asztrocyta, valamint mikrogliá/makrofág aktiváció) [31, 46].

A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) receptor a TRP csatornák családjának egyik tagja [121]. Funkcióját illetően a TRPA1 egy non-szelektív kation csatorna, relatíve nagy Ca^{2+} permeabilitással. A receptort számos olyan endogén és exogén molekula képes aktiválni, melyek gyulladás, oxidatív stressz és szövetsérülés során szabadulnak fel [122-130]. A TRPA1 jól ismert szerepet tölt be a fájdalom, a mechanikai ingerek és a hidegérzés közvetítésében [126, 131, 132]. Emellett, széleskörű expressziója alapján (neurális és non-neurális eredetű sejtek) [133, 134], fontos funkcióját feltételezik különböző gyulladásal járó humán kórképekben [135-139]. Ezen túl, a receptor aktivációját kapcsolatba hozták az asztrocyta funkciók szabályozásában a KIR-ben [140].

A tanulmány célja az volt, hogy meghatározzuk: 1) TRPA1 expresszálódik-e az egerek KIR-ben, 2) TRPA1 expresszió milyen milyen sejt típusra korlátozódik, 3) TRPA1 genetikai hiányának van-e funkcionális szerepe a cuprizone-indukált kísérletes demyelinizációs modellben. A kérdéskör feltérképezéséhez a cuprizone modellt vad típusú (Wild type/WT) és TRPA1 genetikai hiányával született (TRPA1 KO) egereken alkalmaztuk, melyeket közös C57BL/6 genetikai háttéren tenyésztettek. Kísérletsorozatunk tartalmaz egy részletes összehasonlító szövettani analízist a cuprizone- által kiváltott demyelinizációs léziók sejtszintű folyamatainak elemzéséhez. Emellett, a kísérletek másik részében különböző *in vitro* molekuláris biológiai vizsgálatok használtunk az OL apoptózis és túléléshez kapcsolódó gének expressziójának meghatározásához.

2.1.2 Eredmények

2.1.2.1 A TRPA1 expressziója a központi idegrendszerben

Kísérletsorozatunk első lépéseként meghatároztuk a TRPA1 expresszióját az egerek KIR-ben. TRPA1 expresszió található számos agyi régióban, többek között a WT egerek corpus callosumában (CC). Ezen túl, kettős immunfluoreszcens jelölés során a TRPA1 szoros kollokalizációt mutatott a GFAP pozitív asztrociták felszínén mind a kontroll, mind a cuprizone kezelt kísérleti állatokból készült szövettani metszeteken.

2.1.2.2 Cuprizone kezelés mérsékelt demyelinizációt idéz elő a TRPA1 hiányos egerekben

További immunhisztokémiai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a cuprizone kezelés súlyos demyelinizációt idézett elő a WT és TRPA1 KO egerekben. A myelin károsodás mértékének megítélése LFB/CV festett metszetek szemikvantitatív értékelése alapján történt. A cuprizone súlyos fokú demyelinizációt idézett elő a WT egerekben (myelin pontszám: 2,6) és TRPA1 KO (myelin pontszám: 1,7) állatokban a kontroll csoportokhoz képest (myelin pontszám: 0,2). Kiemelendő, hogy a cuprizone statisztikailag enyhébb demyelinizációt váltott ki a KO egerekben, mint a WT csoportban (*** $P < 0.001$). Az érett, myelint szintetizáló OL markereinek (MBP és MAG) összehasonlító elemzése ugyancsak alátámasztotta a szövettannal látott különbséget. Az MBP marker szövettani vizsgálata mellett mérsékeltebb MAG protein expressziós szint csökkenést detektáltuk immunblot analízissel a cuprizone kezelt TRAP1 KO egerekben.

2.1.2.3 Cuprizone által kiváltott OL pusztulás, gliózis és makrofág reakció csökkent a TRPA1 KO egerekben

Molekuláris szinten, a cuprizone kezelés súlyos fokú érett OL sejtszám csökkenést okozott a WT és KO egerek CC-ban ($***P < 0.001$). Azonban, a sejtpusztulás mértéke szignifikánsan kevesebb volt a kezelt WT állatokhoz képest ($***P < 0.001$). Jól ismert, hogy a cuprizone által kiváltott szelektív OL pusztulást markáns asztrocyta és mikroglia/makrofág reakció kíséri az érintett demyelinizált területeken [32]. Az asztrocyta és mikroglia/ makrofág (GFAP és Iba-1) sejtmakrerek összehasonlító szövettani analízise során cuprizone expozíció hatására szintén enyhébb sejtreakciót találtunk a kezelt KO állatokban.

2.1.2.4 Az éretlen OL száma fokozódik a cuprizone kezelt WT állatokban a TRPA1 KO egerekhez képest

A fenti adatok alapján felmerült, hogy a TRPA1 KO egerekben látott mérsékelt OL pusztulás vajon egy OPC proliferációhoz kapcsolt fokozott remyelinizációs folyamat eredménye; vagy az érett OL sejtek túlélésének következménye. Kettős immunfluoreszcens jelölés során az Olig2/APC kettős pozitív sejtek (érett OL markerek) száma hasonló csökkenést mutatott a klasszikus immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeivel. Kiemelendő, hogy a kizárólag Olig2 pozitív sejtek (korai OPC marker, mely érett sejtmakrert nem mutat [141]) száma magasabb volt a cuprizone kezelt WT csoportban a KO egerekhez képest. A kontroll csoportokban különbséget nem találtunk. További génexpressziós analízis során a cuprizone kezelés szignifikáns NG2 mRNS szint emelkedést (OPC aktivációs marker, mely ellensúlyozza az érett OL sejtpusztulást) váltott ki a WT állatokban ($**P < 0.01$), amíg ez a változás a KO csoportban nem volt megfigyelhető.

2.1.2.5 A *Bak*, *IGF-1*, *FGF-2* és *PDGFR α* mRNS expresszió vizsgálata a CC-ban

A cuprizone által kiváltott érett OL pusztulás molekuláris mechanizmusának feltérképezéséhez megvizsgáltunk a myelinizációs folyamatban szerepet játszó növekedési faktorokat qPCR technikával. Cuprizone expozíció hatására az *IGF-1* mRNS szint szignifikánsan emelkedett mind a WT ($***P < 0.001$), mind a KO ($***P < 0.001$) állatokban. Azonban, a toxin indukált *IGF-1* mRNS szintemelkedés mértéke közel fele volt a KO csoportban a WT egerekkel összevetve ($***P < 0.001$). *PDGFR α* mRNS expresszióját egyik kísérleti csoportban sem befolyásolta a cuprizone kezelés. *FGF-2* mRNS szint emelkedő tendenciát mutatott a KO kontroll és kezelt KO csoportokban, de az emelkedés nem ért el statisztikailag szignifikáns

különbséget. *FGF-2* és *Bak* mRNS expresszió egyedül a cuprizone kezelt WT állatokban emelkedett szignifikánsan (**P < 0.01 és ***P<0.001).

2.1.2.6 A TRPA1 genetikai hiánya mérsékli az érett OL apoptózist a p38-MAPK és c-Jun aktivációjának csökkentésén, valamint az ERK1/2 jelátviteli útvonal fokozott aktivitásán keresztül

A szakirodalom alapján feltételezik, hogy a TRPA1 aktiváció szerepet játszhat a MAPK jelátviteli útvonalakban [142-144]. A TRPA1 pontos szerepének tisztázása érdekében elemeztük, hogy a TRPA1 genetikai hiánya milyen módon befolyásolhatja az OL apoptózishoz kapcsolódó jelátvitelt a cuprizone modellben. Az immunoblot analízis igazolta, hogy toxin expozíció hatására szignifikánsan emelkedett a foszforilált JNK, ERK1/2 (**P<0.01 és *P<0.05), valamint a c-Jun (*P<0.05) expresszió a WT állatokban. A p38 hasonló tendenciát követett, azonban ennek változása nem ért el statisztikailag szignifikáns különbséget az utóbbi csoportban. A TRPA1 hiánya mellett a cuprizone által kiváltott foszforilált p38-MAPK és ERK1/2 expressziójának változása nem vezetett szignifikáns különbséghez. Ezzel szemben csökkent foszforilált p38, c-Jun (*P<0.05 és *P<0.05), valamint emelkedett ERK1/2 expressziót (**P<0.01) detektáltunk a kezeletlen TRPA1 KO egerekben. A foszforilált JNK expressziója alapvetően magasabb volt a kezeletlen TRPA1 KO állatokban (**P<0.01), melyet a cuprizone kezelés nem befolyásolt a kísérlet során. Ezen túl, a cuprizone kezelés nem befolyásolta a MAPK jelátviteli rendszer szekvenciális célpontját, a c-Jun foszforilációt a TRPA1 KO csoportban.

2.2 Tanulmány 2.: A primer cilium markerek expressziójának és hosszának kvantitatív összehasonlítása az egerek központi idegrendszerében

2.2.1 Tanulmány háttere és célkitűzések

A primer ciliumok kisméretű, speciális, sejtfelszíni organellek, melyek fontos szenzoros és jelátviteli funkciókat biztosítanak az emlős szervezet fejlődése során, illetve a posztnatális celluláris folyamatok szabályozásában [49-53, 87, 145]. Feltételezik, hogy az elsődleges csillók diszfunkciója kiemelkedő szerepet játszik egy humán genetikai betegségcsoport, a ciliopáthiák kialakulásában. A ciliopáthiák klinikailag egy spektrum betegség, melyre nagy átfedést mutató, összetett fejlődési rendellenességek megjelenése és súlyos központi idegrendszeri érintettség jellemző [61-64]. Az agy veleszületett rendellenességein túl, az elsődleges csillók diszfunkciójához kapcsolt jelátviteli útvonalak fontos szerepet játszanak számos neuronális funkció szabályozásában (pl.: étvágy központi szabályozása, tanulás, memória, kognitív funkciók, szaglás vagy a nemi hormonok tengelyének szabályozása [82, 85, 88-90, 146-148], a sejtciklus regulációjában (peri- és posztnatális élet során [53, 145]), valamint feltételezik szerepüket különböző típusú tumorok (pl.: glioma, medulloblastoma) kialakulásában [101-105]. Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak arra, hogy a primer ciliumok idegrendszeri funkcióját a ciliáris membránban expresszálandó jelátviteli fehérjék és morfológiai sajátosságaik határozzák meg. Jól ismert, hogy speciális G-protein kapcsolt receptorok (GPCR) és jelátviteli molekulák- mint a szomatosztatin 3 receptor (Sstr3) [76], a másodlagos jelátvitelt közvetítő adenil-cikláz 3 (AC3) molekula [84], valamint az ADP-riboszilációs faktor-szerű 13 B (Arl13b) [93-96] protein- szelektíven expresszálnak a NPC membránjában. Eddigi megfigyelések ellenére az organellek pontos fiziológiás szerepe a felnőtt KIR-ben továbbra is csak részleteiben ismert.

Jelen tanulmány céljaként egy összehasonlító kórszövettani elemzést végeztünk a felnőtt egerek KIR-ben, mely során karakterizáltuk az AC3, Sstr3 és Arl13b proteineket expresszáló primer ciliumok 1) regionális disztribúcióját, 2) hosszát, valamint 3) a preferenciális celluláris megjelenését fiziológiás körülmények között. A primer ciliumok kvantitatív összehasonlítása immunhisztokémiai vizsgálatokkal történt az egér agy 19 különböző régiójában.

2.2.2 Eredmények

2.2.2.1 Az AC3, Sstr3 és Arl13b-t expresszáló primer ciliumok celluláris karakterizálása a központi idegrendszerben

Vizsgálataink első lépéseként elemeztük az AC3, Sstr3 és Arl13b pozitív primer ciliumok lokalizációját a KIR különböző sejtípusain. Az analízishez kettős immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk a szövettani metszeteken, mely során a három fenti cilium marker antitestjei mellett a neuronokat jelölő anti-NeuN, az asztrocytákat jelző anti-GFAP, az érett oligodendrogliaikat mutató anti-APC vagy az általános mikroglia/makrofágokat indikáló anti-Iba-1 antitesteket használtunk. Összhangban a korábbi adatokkal [76, 84], a legtöbb AC3 pozitív és összes Sstr3 pozitív primer cilium a NeuN-el jelölt neuronok felszínén volt detektálható. Amíg Sstr3 pozitív primer ciliumot nem találtunk az általunk vizsgált többi sejtípuson, kettős jelölés során ritkább AC3 pozitív primer ciliumok voltak láthatók a GFAP jelölt asztrocyták felszínén. Az Arl13b immun-pozitív primer ciliumok megjelenése szoros asszociációt mutatott a GFAP jelölést mutató asztrocytákkal, valamint a marker intenzitása sokkal halványabb és kevésbé volt szembetűnő a másik kettő vizsgált markerrel összehasonlítva. Az AC3 vagy Arl13b pozitív primer ciliumok nem mutattak kolokalizációt az Iba-1 jelölt mikroglia/makrofágokkal, sem az APC pozitív érett oligodendrogliaikkal.

2.2.2.2 A neuronokra és asztrocitákra lokalizálódó primer ciliumok disztribúciójának összehasonlító elemzése az egerek központi idegrendszerében

Korábbi tanulmányok alapján ismert [76, 84], hogy bizonyos primer ciliumok markerek expressziója az agy különböző régióira korlátozódik. A cilium markerek preferenciális expressziójának feltérképezéséhez összehasonlítottuk az AC3⁺/NeuN⁺ és Sstr3⁺/NeuN⁺ neuronális primer ciliumok (AC3⁺NPC és Sstr3⁺NPC), valamint az Arl13b⁺/GFAP⁺ pozitív asztrocyta felszíni primer ciliumok (Arl13b⁺AsPC) számát az agy meghatározott területein.

A legfelszínebb rétegektől eltekintve, egyenletes AC3, Sstr3 és Arl13b pozitív primer cilium eloszlás volt megfigyelhető a cinguláris, szenzoros, motoros és piriform cortex területén. Mind az AC3, mind az Sstr3 a piriform cortexben mutatta a legnagyobb sűrűséget, ahol a sejtek 53,73% -nál és 29,68% -nál volt AC3- és Sstr3-pozitív primer cilium. Az Arl13b⁺AsPC száma szignifikánsan kevesebb volt az összes kortikális régióban (11,56–16,59%). Amíg az AC3⁺NPC nagy számban és sűrűségben voltak detektálhatók a tuberculum olfactorium (91,8%), a nucleus accumbens (85,36%) és a caudo / putamen (81,3%) területén; addig az Arl13b⁺AsPC alacsony száma (8,2–18,69%) mellett nem észleltünk Sstr3 immunreaktív NPC-t ezeken a területeken. Ezzel szemben az Sstr3⁺NPC-k nagyobb számban fordultak elő a claustrum és nucleus endopiriformis régióiban (21,51% és 29,21%), azonban számuk ismételt szignifikánsan alacsonyabb volt az AC3⁺NPC-hez képest (61,49 és 63,66%).

A hippocampus területén mind az AC3⁺NPC, mind az Sstr3⁺NPC végig megtalálhatók voltak a stratum pyramidale összes alrégiójában. Kiemelendő, hogy az Sstr3 száma és sűrűsége csökkenő tendenciát követett, nevezetesen CA3 > CA2 > CA1. Ezen túl, a CA2 átmeneti régióban az Sstr3 expressziós mintázata eltérést mutatott, Sstr3 immnunreaktivitás csak a sejtmagokat körülvevő pontok formájában jelent meg. Az arányokat figyelembe véve elmondható, hogy az Sstr3 általános expressziós mintázata fordítottan arányos az AC3⁺NPC számával, beleértve a gyrus dentatus régióját is. A neuronális cilium markerekkel szemben, az Arl13b⁺AsPC egyenletes eloszlást mutatott a stratum pyramidale-t övező stratum oriens és radiatum területén. Továbbá, az Arl13b⁺AsPC sűrűsége és denzitása a legmagasabb a hippocampális stratum lacunosum-moleculare és polymorph rétegekben volt.

Az amygdala alrégióiban az AC3⁺NPC és az Sstr3⁺NPC denzitása magasabb volt az Arl13b⁺AsPC-kal összehasonlítva. Azonban, az AC3⁺NPC száma statisztikailag szignifikánsan nagyobb volt (61,67%) az Sstr3⁺NPC-vel (19,2%) vagy Arl13b⁺AsPC (19,13%) összevetve. A primer ciliumok disztribúciója és mintázata ugyancsak változatos volt a hypothalamikus magvak területén. Mind az AC3⁺NPC, mind az Arl13b⁺AsPC kimutatható volt az összes fő szubnukleuszban, beleértve a paraventricularis (PVN), dorsomedialis (DM), ventromedialis

(VM), arcuate (ARC) és suprachiasmatic (SCN) magvakat. Az AC3⁺NPC, és az Arl13b⁺AsPC száma és sűrűsége az SCN (85,08%) és a PVN (30,93%) régiókban volt a legnagyobb. Ezzel szemben az Sstr3 ciliáris expressziója a VM-re korlátozódott, amelyben a neuronok 32,04% -a rendelkezett Sstr3-pozitív primer ciliummal. Bár nem találtunk Sstr3⁺NPC-t a hypothalamusz többi részében, a sejtmagok körüli pontszerű Sstr3 immunreaktivitást ugyancsak megfigyelhető volt, hasonlóan a hippocampus CA1-CA2 átmenet mintázatához.

2.2.2.3 A primer ciliumok regionális eloszlása az organellek hosszának változatos megjelenésével asszociálódik.

Korábbi tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a ciliumra lokalizálódó jelátviteli fehérjék modulálhatják az elsődleges ciliumok funkcióit hosszuk dinamikus szabályozásával [100, 119]. A központi idegrendszeri primer ciliumok lehetséges regionális funkcióinak további vizsgálatához megmértük és összehasonlítottuk a neuronális és asztrocyta sejtfelszíni primer ciliumok hosszát az egerek agyában. Az AC3⁺NPC vagy az Sstr3⁺NPC átlagos hossza változó volt a négy vizsgált kortikális régióban, az általunk mért hosszuk 4,88 és 5,51 μm (cingularis cortex), ill. 5,55 μm és 5,18 μm (piriform cortex) tartományban mozgott. Az NPC mellett az Arl13b⁺AsPC átlagos hossza 2,95 és 3,33 μm között változott. Míg az Arl13b⁺AsPC szignifikánsan rövidebbek voltak mindkét NPC típushoz képest (** $P < 0,001$ és / vagy **** $P \leq 0,001$), az AC3 és az Sstr3⁺NPC hosszának összehasonlítása egyik kortikális régióban sem érte el statisztikailag szignifikáns különbséget.

Az AC3⁺NPC-ket lényegesen hosszabbnak mértük a tuberculum olfactorium (10,68 μm), a nucleus accumbens (9,84 μm) és caudo/putamen (9,61 μm) területein, összehasonlítva a kéregben mért AC3⁺NPC hosszával. Emellett mind az AC3, mind az Sstr3⁺NPC átlagos hossza hasonlóan rövid volt az clausztrumban (5,41 és 4,92 μm) és a nucleus endopiriformisban (6,16 és 5,14 μm), mint a kérgi területeken. Nevezetesen, az AC3⁺NPC szignifikánsan hosszabb volt az Sstr3⁺NPC-hez képest az endopiriform régióban (** $P < 0,001$). Ezen túlmenően az Arl13b⁺AsPC átlagos hossza 3,37–4,2 μm közötti tartományban mozgott és statisztikailag szignifikánsan rövidebb volt az AC3⁺NPC és / vagy az Sstr3⁺NPC-vel összevetve ezeken a területeken.

A hippocampus CA régióiban az AC3⁺NPC (5,0–5,91 μm) és az Sstr3⁺NPC (3,79–5,46 μm) átlagos hossza hasonló tendenciát mutatott a kérgi régióban detektált értékekhez. Kiemelendő, hogy az AC3⁺NPC (5,82 μm) szignifikánsan hosszabbak voltak az Sstr3⁺NPC-hez (3,79 μm) képest a CA1 régióban (**** $P \leq 0,001$). Ezenkívül nem találtunk szignifikáns különbséget az AC3 és az Sstr3⁺NPC átlagos hosszának összehasonlítása során a gyrus-dentatusban (3,2 és

2,78 μm) és az amygdala alrégióiban (6,73 és 6,48 μm). Az Arl13b⁺AsPC átlagos hossza az amygdalában és a hippocampusban megegyezett a kortikális értékekkel (2,8–3,2 μm), hosszuk ugyancsak szignifikánsan rövidebbnek bizonyult a fenti területeken a gyrus dentátus kivételével. Az AC3⁺NPC-t hosszabbnak mértük a hypothalamusban és annak magjaiban. Átlagos hosszuk 8,0 μm (PVN) és 10,48 μm (VM) között változott. Szintén hosszabb Sstr3-t expresszáló NPC-t detektáltunk a VM mag (8,18 μm) területén, azonban ezek az elsődleges ciliumok statisztikailag szignifikánsan rövidebbek voltak az AC3⁺NPC -hez képest (** P <0,01). Ismételten, az Arl13b⁺AsPC-k szignifikánsan rövidebbek (3,6–4,09 μm) voltak a hypothalamus összes magjában (**** P $\leq$ 0,001).

3. A TÉZIS ÖSSZEFOGLALÁSA, KONKLÚZIÓ ÉS JÖVŐBELI KILÁTÁSOK

A TRPA1 receptor vizsgálata a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs modellben- Új farmakológiai célpont az oligodendroglia apoptózis ellen

A Sclerosis Multiplex (SM) a központi idegrendszer (KIR) egy krónikus, gyulladásal és demyelinizációval járó degeneratív betegsége. A jelenleg alkalmazott immunmoduláló terápiák kiválóan ellensúlyozzák a betegség bizonyos szakaszaiban zajló immun-mediált folyamatokat. Ezen készítmények hatása a betegség hosszútávú lefolyására még nem tisztázott teljesen, de úgy tűnik, hogy kizárólag az autoimmun mechanizmusok gátlása révén ideális terápiás válasz nem érhető el. Ezért, az SM adekvát terápiája új farmakológiai célpontokat igényel, melyekkel gátolható a demyelinizáció vagy elősegíthető a KIR-i regeneráció.

A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) receptor egy non-szelektív kation csatorna, relatíve nagy Ca^{2+} permeabilitással. A receptor aktiválása- endogén és exogén molekulák által – jól ismert szerepet játszik az eltérő szomatoszenzoros modalitások (pl. viszketés, fájdalom) és protektív válaszok kialakításában a különböző szervrendszerekben. Azonban, a KIR-ben betöltött pathofiziológiai szerepe eddig még kevésbé ismert. Jelen tanulmányunkban megvizsgáltuk a TRPA1 expresszióját és lehetséges szerepét a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs modellben. A modell használata kiváló lehetőséget nyújt az SM nem immun-mediált folyamatinak feltérképezéséhez, az elsődleges oligodendrocyta (OL) apoptózis és következményes demyelinizációs folyamatok sejtszintű megismeréséhez.

Vizsgálataink során TRPA1 expressziót detektáltunk az egerek agyának számos régiójában. Emellett kimutattuk, hogy a receptor expressziója az asztrocyták felszínére lokalizálódik fiziológias körülmények között. Ezt követően feltérképeztük, hogy a TRPA1 milyen szerepet játszhat a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs modellben. Összehasonlító szövettani elemzés alapján, mérsékelt demyelinizációt és sejtreakciót (asztrocyta, mikrogliá/makrofág) detektáltunk a TRPA1 hiányos cuprizone kezelt állatokban. Kiemelendő, hogy a TRPA1 genetikai hiánya mellett ugyancsak mérsékeltebb érett OL sejtszám csökkenést találtunk a kezelt egerek szövettani metszetein. Jól ismert, hogy a toxin- indukált demyelinizáció során endogén regeneratív folyamatok is aktiválódnak. A szelektív érett OL pusztulást és következményes demyelinizációt spontán, közel teljes remyelinizáció követheti újonnan toborzott, proliferálódó és differenciálódó oligodendroglia prekursor (OPC) sejtek aktiválódásán keresztül [149-151]. Megfigyeléseink felvetették a kérdést, hogy a cuprizone kezelt TRPA1 KO egerekben látott mérsékelt OL apoptózis vajon a sejtek csökkent

vulnerabilitásának vagy egy fokozott endogén remyelinizációs folyamatnak az eredménye. Cuprizone expozíciót követően nem találtunk szignifikáns OPC (csak Olig2 pozitív és NG2 mRNS expresszió) sejtszám növekedést a KO állatokban, mely megerősíti a feltételezést, hogy a TRPA1 hiánya csökkenti a sejtek apoptózist, de nem fokozza a remyelinizációt. Ezen túl, további IHC analízisből nyert adataink rávilágított arra, hogy a mérsékelt sejtreakció (asztrocyta és mikroglia/makrofág) szövettani mintázata szorosan egybeesik a túlélő OL sejtek eloszlásával. A látott disztribúciós eltérések ismételt alátámasztják, hogy a TRPA1 hiánya előnyös, kisebb-fokú szövetsérülést eredményez a modellben.

A fenti kórszövettani eredményeink alapján feltételeztük, hogy a TRPA1 jelenléte vagy hiánya ellentétes hatású sejtválaszokat mediál elsősorban az astrocyta funkciók befolyásolásán keresztül. Továbbá arra következtettünk, hogy a TRPA1 szerepet játszhat az apoptózis modulálásában- részben- az OL és astrocyta közti sejtkapcsolatok koordinálásával. Szakirodalmi adatok alapján ismert, hogy a TRPA1 képes befolyásolni az astrocyták fiziológiai funkcióját [140, 152]. Az astrocytából felszabaduló növekedési faktorok (GFs) regulálják a myelinizációs folyamatokban részt vevő sejtek sorsát, mint az OPC-k proliferációját, differenciációját és az érett OL sejtek túlélését különböző kísérleti körülmények között [39, 43, 149, 153, 154]. Kísérletsorozatunk következő lépéseként megvizsgáltuk, hogy a TRPA1 genetikai hiánya enyhíti-e a cuprizone által kiváltott érett OL apoptózist az astrocyta eredetű GF expressziójának befolyásolásával. A qPCR elemzés során az *FGF-2* és *PDGFRα* mRNS szint nem változott szignifikáns mértékben a cuprizone kezelt KO egerekben, mely ugyancsak prezentálja, hogy a myelin struktúra megtartásáért nem az OPC-k fokozott aktivitása felelős. Cuprizone hatására emelkedett *IGF-1* mRNS expressziót detektáltunk a WT és KO állatokban. Azonban, az *IGF-1* mRNS szintnövekedés mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a KO egerekben a WT állatokhoz képest ($***P < 0.001$), ami ismételt a mérsékelt astrocyta aktiváció és OL apoptózis következményeinek tekinthető fokozott OPC toborzás hiányában. Jól ismert, hogy a mitochondriális diszfunkció fontos szerepet játszik a toxin-indukált OL apoptózis folyamatában. A cuprizone toxicitás a celluláris stresszhez és apoptózishoz kapcsolódó mitochondriális mechanizmusok károsodásához vezet, illetve a mitochondriális transzmembrán potenciál csökkentésével jár [30, 31, 155]. A mitochondriális eredetű Bcl-2 család anti-apoptotikus és pro-apoptotikus (pl. Bax, Bid, Bak) elemeiről kimutatták, hogy jelentősen képesek befolyásolni az OL sorsát [156, 157]. Cuprizone kezelés hatására szignifikánsan emelkedett *Bak* mRNS expressziót találtunk a WT egerekben ($***P < 0.001$), amíg a KO állatokban szignifikáns változás nem volt látható. Ezen eredményeink erős

összhangban állnak IHC-ből nyert adatainkkal, a TRPA1 hiány csökkenti az érett OL apoptózist a cuprizone expozíció során.

A fentiek alapján feltételeztük, hogy a TRPA1 aktivációja (non-szelektív kation csatorna, mely részt vesz a Ca^{2+} kapcsolt jelátvitelében [158-162]) hozzájárulhat az apoptotikus sejthalálhoz magasabb intracelluláris Ca^{2+} koncentráció kialakításával, mely elősegítheti az apoptotikus jelátviteli útvonalak aktiválódását az érett OL-ban a cuprizone modellben. A TRPA1-ből kiinduló jelátvitelt korábban már összefüggésbe hozták a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád tagjaival [142-144]; és kimutatták, hogy a cuprizone által kiváltott apoptózis részben a (c-Jun N-terminal kinase) JNK és p38-MAPK jelátviteli útvonalakon keresztül valósul meg [163]. Ismereteink alapján feltételeztük, hogy az utóbbi jelátviteli útvonalak lehetséges keresztező pontjai lehetnek a cuprizone toxicitásnak és TRPA1 aktivációnak. Az immunoblot elemzés során tartósan magas és változatlan JNK szintet detektáltunk a mind a kezeletlen, mind a kezelt KO csoportokban. Ezzel szemben szignifikánsan alacsonyabb p38-MAPK alapszint volt mérhető a KO állatokban (* $P < 0.05$), mely cuprizone kezelést követően sem változott. Ez alapján feltételeztük, hogy a TRPA1 hiánya csökkentheti a p38-MAPK útvonal aktiválódását és következményesen az OL pusztulást. A szakirodalmat áttekintve, a JNK és p38-MAPK jelátviteli útvonalak nukleáris célpontja a transzkripciós faktor c-Jun kulcsszerepet játszik az apoptózisban különböző KIR-i inzultus során [164, 165]. A c-Jun alapszintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kezeletlen TRPA1 KO állatokban a WT csoportokhoz képest (* $P < 0.05$), illetve szintje változatlan maradt cuprizone expozíció után; mely ismételt csökkenés OL apoptózisra utal a TRPA1 genetikai hiányos egerekben. Cuprizone intoxikáció ERK1/2 jelátviteli aktiválódást is kiváltott, ami a TRPA1 hiányában jelentősen fokozódott. Tekintettel arra, hogy az ERK1/2 jelátviteli útvonal aktiválódása kiemelt szerepet játszik az OL-k túlélésében [166-168], eredményeink egyértelmű protektív hatás jelenlétére utalnak az érett OL apoptózis ellen a TRPA1 KO egerekben. Eredményeinket összegezve, a TRPA1 aktiváció hozzájárul a cuprizone által kiváltott szelektív OL apoptózishoz azáltal, hogy fokozza a Ca^{2+} beáramlását az asztrocitákba, mely következményes JNK és p38-MAPK jelátviteli útvonal és c-Jun aktivációt idéz elő az érett OL-ban.

A primer cilium markerek expressziójának és hosszának összehasonlítása az egerek központi idegrendszerében

A primer ciliumok (vagy másnéven elsődleges csillók) apró, antenyszerű celluláris függelékek, amelyek fontos szenzoros és jelátviteli funkciókat biztosítanak az emlős szervi rendszerekben, különösen a központi idegrendszerben (KIR). Számos tanulmány kimutatta, hogy az elsődleges csillók kritikus szerepet játszanak az emlős agy fejlődésének lépéseiben és a későbbi neuronális homeosztázis fenntartásában [169-171]. Korábbi megfigyelések alapján, a primer ciliumok lehetséges funkcióit három fő jellemző határozza meg: (1) a ciliáris membránban koncentrált jelátviteli molekulák, (2) a cilium struktúra hossza, illetve (3) az organellek celluláris és regionális lokalizációja a KIR-ben. Ismert, hogy speciális G-protein kapcsolt receptorok (GPCR) és jelátviteli molekulák- mint a szomatosztatin 3 receptor (Sstr3) [76], a másodlagos jelátvitelt közvetítő adenil-cikláz 3 (AC3) molekula [84], valamint az ADP-ribozilációs faktor-szerű 13 B (Arl13b) protein [93-96]- szelektíven expresszálódnak a neuronok primer ciliumainak (neuronális primer ciliumok/NPC) membránjában; melyek szerepet játszanak számos neuronális funkció szabályozásában [82, 85, 88-90, 146-148]. Eddigi megfigyeléseink ellenére azonban az organellek felnőtt KIR-ben betöltött pontos szerepe mindmáig csak részleteiben ismert.

Jelen tanulmányban az AC3, Sstr3 és Arl13b expresszáló primer ciliumok morfológiai jellemzőire fókuszáló összehasonlító és kvantitatív hisztopathológiai elemzéseket végeztünk a felnőtt egerek központi idegrendszerében. Kísérletsorozatunk első lépéseként karakterizáltuk az AC3, Sstr3 és Arl13b pozitív primer ciliumok expresszióját a különböző központi idegrendszeri sejtípusokon. Összhangban a korábbi megfigyelésekkel [76, 84], AC3 és Sstr3 markereket expresszáló primer ciliumokat a neuronok felszínén találtunk. Bár a kettős immunfluoreszcens jelölés során gyenge Arl13b-pozitív primer ciliumok is láthatók voltak neuronokon, egyértelmű Arl13b expresszió az asztrociták felszínén elhelyezkedő primer ciliumokhoz (AsPC) asszociálódott. Ezen túl, csak néhány AC3 immunreaktív cilium mutatott kolokalizációt asztrocitákkal, és egyik markert sem volt megfigyelhető érett oligodendroglákkal (OL) vagy mikroglia/ makrofágokkal. A szakirodalom alapján ismert, hogy az Sstr3⁺NPC expressziója és előfordulási gyakorisága dinamikusan változik a KIR fejlődésének különböző szakaszaiban [172]; valamint az AC3 és Arl13b expressziója a NPC és AsPC-n fordított arányosságot mutat a fiatal és a felnőtt egerek agyában [94]. Eredményeink alátámasztják a szakirodalmi megfigyeléseket, melyben a KIR-i sejtípusok primer ciliumai fejlődéstanilag meghatározott funkcióval rendelkeznek, különösen az érett neuronok és az asztrociták szubpopulációjában.

Vizsgálataink következő lépéseként megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a NPC és AsPC markerek 1) az expressziós mintázatát, 2) hosszát és 3) előfordulásuk arányát az agy szabályozó központjaiban. Eredményeink alapján megerősítést nyert, hogy az AC3 a leggyakoribb megjelenésű ciliáris marker az egér agy teljes területén. Ezzel szemben az Sstr3 eloszlása sokkal korlátozottabb expressziós mintázattal rendelkezik, számuk és hosszuk régió specifikus változásokat mutat. A statisztikai elemzés során a tuberculum olfactorium területén volt az AC3⁺ NPC denzitása a legmagasabb és leghosszabb (a teljes frakció 91,8% -a és átlagos hossza 10,68 μm), mely alátámasztja a szakirodalomban leírt szaglásban betöltött jelentős szerepüket [173-176]. Emellett, az AC3⁺ NPC-kat hosszabbnak mértük a caudo/putamen (9,61 μm) és nucleus accumbens (9,84 μm) régiókban. Tekintettel arra, hogy az elsődleges csillók fehérje komponensei határozzák meg a funkciójukat, valamint hasonló ciliáris morfológiát találtunk az tuberculum olfactorius területén; feltételezhető, hogy az utóbbi két régió funkcionális működéséhez is elengedhetetlen az AC3-kapcsolt ciliáris jelátvitel. Azonban, további vizsgálatok szükségesek ennek a lehetőségnek a molekuláris szintű feltérképezéséhez.

Korábbi irodalmi adatok rávilágítottak arra, hogy az Sstr3⁺NPC előfordulási gyakorisága fordított arányban áll az AC3-t expresszáló primer ciliumok megjelenésével az agyi régiókban [84]. Ezzel összhangban [78, 177, 178] inverz expressziós mintázatot találtunk a két marker összehasonlító vizsgálata során (legfőképpen a hippocampális és kortikális területeken); mely ugyancsak jelzi, hogy csak bizonyos neuron populációk rendelkeznek Sstr3 pozitív primer ciliumokkal. Kiemelendő, hogy a hippocampális CA2 átmeneti régió stratum pyramidale rétegében pontszerű Sstr3 immunreaktivitást találtunk a sejtmagok körül. Figyelembe véve azt, hogy az Sstr3 a celluláris kompartmentben található és az AC3 a ciliáris struktúrára lokalizálódik, eredményeink ismételtén azt sugallják, hogy az NPC pontos funkciói a neuronok alpopulációiban időben változhatnak. Ismert, hogy az Sstr3 által indukált jelátvitel szorosan kapcsolódik az adenil-cikláz aktivitáshoz a hippocampusban [85]; és mind az AC3, mind az Sstr3 genetikai hiánya jelentősen befolyásolja a régiókkal kapcsolatos funkciókat (pl: az egerek memóriáját [85, 90, 146, 179]). Ezen túl a ciliáris fehérje expressziójának és hosszának dinamikus változásait szintén leírták farmakológiai vagy agonista kezelés hatására [119, 178]. Ezért, érdekes lenne további vizsgálatok folytatni a jövőben, hogy ezek a hippocampusban található specifikus primer ciliumok 1) képesek-e a transzportálni a receptort a celluláris kompartmentből, 2) megváltoztatják-e morfológiájukat és hosszukat, illetve 3) módosítják-e a neuronális funkciókat a felnőtt KIR-ben különböző kísérleti körülmények között, mint például stressz. Azonban, a gyrus dentatusban észlelt Sstr3⁺NPC számával és sűrűségével kapcsolatos eredményeink ellentétben állnak a korábban közzétett adatokkal [172], amelyekben az Sstr3

pozitív primer ciliumok sűrűségének fokozatos növekedését és magasabb szintjét figyelték meg a felnőtt patkányok agyában. A különbség feltehetően az általunk alkalmazott, eltérő immunjelölési módszerből adódhat (antitest és detektálási módszer a korábban használt anti-szérummal szemben, valamint hasonló eljáráshoz kapcsolt különbségeket már korábban leírtak [180]), illetve eredményeink életkor és/vagy a fajhoz kapcsolódó eltéréseket is tükrözhetnek a rágcsálók agyában. Jól ismert, hogy az elsődleges csillók és diszfunkciójuk fontos szerepet játszik a táplálékfelvétel központjának, a hypothalamus szabályozásában [83, 88, 89, 147, 148, 175, 181, 182]. Számos AC3⁺NPC-t detektáltunk az összes hypothalamikus alrégióban, melyek alátámasztják az AC3 pozitív ciliumok szerepét az étvágy központi szabályozásában. Kiemelendő, hogy az Sstr3 ciliáris expressziója csak a ventromedialis magra (VM) korlátozódott, valamint pontszerű perinukleáris Sstr3 immunreaktivitás jelent meg a hypothalamus többi részében. Eredményeink arra utalnak, hogy a homeosztázis fenntartásán túl bizonyos NPC-nak több funkcionális szerepe is lehet a hypothalamusban. Korábban leírásra került, hogy az Sstr3-t és kisspeptin receptor 1-t (kiss1r) expresszáló NPC-k a hypothalamikus neuronok különböző populációira lokalizálódnak, melyek kiemelt szerepet játszanak a neuroendokrin tengely centrális szabályozásában mint a növekedési hormon (GH) és gondotropin hormon (GnRH) szekréciójában [82, 183-186]. Az Sstr3-t expresszáló primer ciliumok a GH szekretáló sejtek felszínén fontos szerepet játszanak a szomatosztatin ligandok érzékelésében az egerek adenohipofízisében [187]. Továbbá, a hypothalamikus NPC aktívan szabályozzák hosszukat a különböző anyagcsere-szükségleteknek és tápláltsági állapotnak megfelelően [188]. A fentiek alapján eredményeink azt sugallják, hogy az Sstr3⁺NPC feltehetően közvetíthetik a szomatosztatin biológiai hatásai a neuroendokrin sejtekre, illetve hozzájárulhatnak a hypothalamusban fellelhető neuronális kapcsolatok komplex szabályozásához. Tekintettel arra, hogy a hypothalamus egy rendkívül összetett, magasszintű belső kapcsolatrendszer rejt, valamint általánosan hosszabb Sstr3 és AC3⁺NPC-eket detektáltunk (8,0-10,48μm); feltételezhető, hogy a megnövekedett ciliáris hossz elengedhetetlen több potenciális ligand érzékeléséhez és hozzájárul számos jelátviteli útvonal koordinálásához, a régió-specifikus funkciók kivitelezéséhez. Emellett, a hosszabb ciliáris struktúra lehetővé teheti azt is, hogy teret enged számos ligand-kötési hely és/vagy receptor szállításának változtatásához, mellyel fokozza a jelátvitel hatékonyságát. Azonban, további tanulmányokra van szükség az ilyen lehetőségek feltérképezéséhez. Bár a primer ciliumok jelenléte az asztrocyták felszínén már régóta elfogadott [84, 177, 189, 190], azok pontos, fiziológiás funkciói kevésbé ismertek. Vizsgálatainkkal megerősítettük, hogy az Arl13b-pozitív primer ciliumok többsége az asztrocyták felszínére lokalizálódik (Arl13b-pozitív

asztrocyta felszíni primer cilium/Arl13b⁺AsPC), illetve ezeken a sejtípusokban csak néhány AC3 pozitív primer ciliumot detektálható. Figyelembe véve az asztrocyták rendkívüli jelentőségét az agyi homeosztázis fenntartásában [191, 192], ez a preferenciális expressziós profil arra utal, hogy különböző asztrocyta alpopulációk léteznek, illetve az Arl13b-kapcsolt jelátvitel egy lehetséges kiegészítő regulációs mechanizmust jelenthet a régiófüggő funkciók szabályozásában. Kiemelendő, hogy az Arl13b⁺AsPC száma és denzitása kifejezetten magasabb volt a hippocampus stratum granulare-t övező rétegekben, mely régió jól ismert szerepet játszik a felnőtt ős/progenitor sejtekből történő neuronok generálásában [193, 194]. A KIR-i primer ciliumok kritikus szerepet töltenek be a fejlődéshez szükséges bizonyos jelátviteli útvonal közvetítésében (mint a Sonic Hedgehog/Shh) [54, 195, 196]. Az Arl13b vagy más ciliáris fehérjék hiánya rendellenes Shh jelátvitelhez [95, 97] és hippocampális neurogenesishez vezet az egerek KIR-ben [56, 197]. Feltételezhető, hogy a nem germinális eredetű asztrocyták közvetített Arl13b jelátvitel hozzájárul egy permisszív környezet kialakításához és a gyrus dentatusban zajló neurogenesis fenntartásához a perinatális és posztnatális élet során. A fentieken túl, az AsPC hossza szignifikánsan rövidebbnek bizonyult a NPC-hoz képest az összes vizsgált agyterületen. Azonban, egyes régiók esetében az Arl13b-t expresszáló ciliumok átlagos hossza eltérést mutatott a korábban leírtaktól [94]. Ismételten, az eltérő eredmények háttérében fellelhető oknak az általunk alkalmazott detektálási módszert (metodikai lépések és antitest) tekintettük, hasonlóan az Sstr3⁺NPC-nál észlelt differens expressziós mintázathoz a hippocampusban. Az Arl13b a Ras GTPáz családdhoz tartozik. A primer cilium mediált Arl13b jelátvitel jól ismert szabályozó funkciót lát el a ciliáris mikrotubulusok és proteinek transzportjának szervezésében, valamint regulálja a polarizált radiális gliák kialakulását és az azokon keresztül történő neuronális migrációt a fejlődő idegrendszerben [93, 97, 198-201]. Emellett, az AC3⁺AsPC mediált jelátvitelről feltételezik, hogy hozzájárul a szinaptikus transzmisszió szabályozásához [84]. A fentieket figyelembe véve az Arl13b mediált jelátvitel valószínűleg ugyancsak hozzájárul az asztrocyták biológiai funkcióinak szabályozásához. Azonban, az Arl13b általános jelenléte és asztrocytákra kifejtett funkcionális jelentősége további kutatások tárgyát képezi.

Konklúzió és jövőbeli kilátások

A TRPA1 receptor vizsgálata a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs modellben- Új farmakológiai célpont az oligodendroglia apoptózis ellen

A Sclerosis Multiplex (SM) a központi idegrendszer (KIR) egy krónikus, gyulladásal járó degeneratív és progresszív betegsége. A kórkép pontos oka mindmáig nem ismert és a betegséget gyógyító terápiával nem rendelkezünk. A jelenleg alkalmazott immunmoduláló készítmények kiválónak bizonyulnak a betegség bizonyos szakaszaiban zajló immun-mediált gyulladásos folyamatok kezeléséhez, azonban mérsékelt hatékonyságúnak tűnnek a kórkép hosszútávú klinikai alkalmazásában. Ezért, az SM adekvát terápiájának kialakítása új farmakológiai célpontokat igényel, melyekkel gátolható a demyelinizáció vagy elősegíthető a KIR-i regeneráció. Tanulmányunkban megvizsgáltuk a TRPA1 expresszióját és lehetséges szerepét a cuprizone által kiváltott kísérletes demyelinizációs modellben. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a TRPA1 expressziója az asztrociták felszínére lokalizálódik fiziológias körülmények között. Továbbá, a TRPA1 genetikai hiánya szignifikánsan mérsékelt demyelinizációhoz vezet a cuprizone modellben az érett OL apoptózisának csökkentésével. Kísérleti eredményeink alapján elmondható, hogy a multisztérikus ioncsatorna nyílása intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedést idéz elő. A TRPA1 aktivációja feltehetően (közvetetten az asztrocita funkciók modulálásán keresztül, vagy közvetlen az OL sejteken hatva) hozzájárul az OL apoptózist indukáló pro-apoptotikus p38-MAPK jelátviteli útvonal és nukleáris célpontjának (transzkripciós faktor c-Jun) aktiválásához, a következményes sejthalálhoz. Azonban, adataink a TRPA1 aktiválásának közvetett hatását támasztják alá. Összegezve, a TRPA1 receptorok farmakológiai gátlása ígéretes terápiás célpont lehet a jövőben, az SM degeneratív patológiájának kezelésében.

A primer cilium markerek expressziójának és hosszának kvantitatív összehasonlítása az egerek központi idegrendszerében

A primer ciliumok (vagy másnéven elsődleges csillók) apró, antennaszerű celluláris függelékek, melyek fontos szenzoros és jelátviteli funkciókat biztosítanak az emlős szervezetben, különösen a központi idegrendszerben. Az organellumok klinikai és biológiai relevanciája egyre inkább a kutatások fókuszába került az utóbbi években. Kutatási eredmények rávilágítottak arra, hogy a primer ciliumok diszfunkciója háttérében állhat számos humán genetikai betegség (például veleszületett ciliopáthiák), bizonyos tumorok és más neurológiai betegségek kialakulásában. Bár az elsődleges csillók széleskörű megjelenése jól ismert az agy régióiban, ezen organellumok pontos, élettani szerepe még mindig kevésbé tisztázott. A szakirodalmi adatok alapján, a neuronális primer ciliumok lehetséges funkciót a ciliáris membrán lokalizálódó jelátviteli proteinek, morfológiai jellemzőik és központi idegrendszeri elhelyezkedésük határozza meg. Jelen tanulmány céljaként egy összehasonlító kórszövettani elemzést végeztünk a felnőtt egerek KIR-ben, mely során karakterizáltuk az AC3, Sstr3 és Arl13b proteineket expresszáló primer ciliumok regionális disztribúcióját, hosszát, valamint a preferenciális celluláris megjelenését fiziológiás körülmények között. Eredményeink feltárták, hogy a neuronok és asztrocyták primer ciliumai meghatározott ciliáris marker expressziós profillal rendelkeznek a különböző agyi régiókban. Ezen túl, hosszuk, sűrűségük és előfordulási arányuk kvantitatív összehasonlítása jól látható különbségekre hívta fel a figyelmet a központi idegrendszer szabályozó központjai között; melyek egyúttal jelzik az elsődleges ciliumok lehetséges, még ismeretlen szerepét az agyi funkciókban.

Összegezve, tanulmányuk egy részletes, áttekintő elemzést nyújt a primer ciliumok celluláris és morfológiai tulajdonságairól a felnőtt egerek agyának régióiban, mely elősegítheti az organellumok pontos szerepének megértését a jövőben. Figyelembe véve számos humán neurodegeneratív betegség genetikai etiológiáját, a diszfunkcionális primer ciliumok karakterizálása kísérletes állatmodellekben és post-mortem humán agyszöveten eddig ismeretlen aspektusát tárhatja fel a betegségek pathogenezisének, illetve új terápiás lehetőségeket fedhet fel az idegrendszeri betegségek- mint például Parkinson kór vagy Sclerosis Multiplex- klinikai kezeléséhez.

4. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

4.1 Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

Sággy*, É., Sipos*, É., Ács, P., Bölcskei, K., Pohóczky, K., Kemény, A., Sándor, Z., Szőke, É., Sétáló, Gy. Jr., Komoly, S. and Pintér, E. (2016). "TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis." *Glia*, 64(12), 2166-2180. doi: 10.1002/glia.23051

*megosztott első szerző

Bölcskei, K., Kriszta, G., Sággy, É., Payrits, M., Sipos, É., Vranesics, A., Berente, Z., Ábrahám, H., Ács, P., Komoly, S. and Pintér, E. (2018). "Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. " *J Neuroimmunol*, 320, 1-10. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.03.020

Sipos, É., Komoly, S. and Ács, P. (2018). "Quantitative Comparison of Primary Cilia Marker Expression and Length in the Mouse Brain." *J Mol Neurosci*, 64(3), 397-409. doi: 10.1007/s12031-018-1036-z

4.2 Idézhető absztraktok

Pintér, E., Bölcskei, K., Sággy, É., Payrits, M., Kriszta, G., Vranesics, A., Sipos, É., Ács, P., Berente, Z., Ábrahám, H., Komoly, S. (2017) "TRPA1 receptor deficiency substantially diminishes the cuprizone-induced demyelination. " *Journal of Neurochemistry* 142 : 1 pp. 171-172., 2 p.

4.3 Kongresszusi poszter prezentációk

Sipos, É., Komoly, S., Ács, P. "Expression of primary ciliary markers in satiety centers of the brain. " Department of Neurology, Medical School of Pécs, University of Pécs, Hungary. P91, *IBRO Workshop*, Debrecen, Magyarország, 2014

Sággy É., Bölcskei K., Perkecz A., Sándor Z., Kemény Á., Szőke É., Ács P., Sipos É., Gaszner B., Komoly S., Helyes Zs., Pintér Erika. "A Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) receptor szerepe cuprizone-indukált kísérletes demyelinizáció modellben. " A Magyar Élettani

Társaság 79. Vándorgyűlése és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Konferenciája, Szeged, Magyarország, 2015.

Sághy É., **Sipos É.**, Ács P., Bölcskei K., Pohóczky K., Kemény Á., Sándor Z., Szőke É., Sétáló Gy. Jr., Komoly S., Pintér E. "A TRPA1 receptor szerepe a sclerosis multiplex kísérletes állatmodelljében. " Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, Magyarország, 2016.

Sághy É., Bölcskei K., Péter Á., Komoly S., **Sipos É.**, Szőke É., Perkecz A., Gaszner B., Kemény Á., Sándor Z., Helyes Zs., Pintér E. "Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor has regulatory role in the cuprizone-induced demyelination in mice. " *IBRO Workshop*, Budapest, Magyarország, 2016.

4.4 Kongresszusi szóbeli előadások

Pintér E., Sághy É., Payrits M., Bölcskei K., Perkecz A., Sándor Z., Kemény Á., Szőke É., Ács P., **Sipos É.**, Komoly S., Helyes Zs., Ábrahám I. "A Tranziens Receptor Potencial Ankyrin 1 (TRPA1) Receptor szerepe a neurodegeneratív kórképekben. " Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, Magyarország, 2016.

Sághy, É., Bölcskei K., Ács, P., Komoly, S., Perkecz, A., Gaszner, B., **Sipos, É.**, Kemény, A., Szőke, É., Sándor, Z., Helyes, Zs., Pintér, E. "Genetic deletion of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor inhibits cuprizone-induced demyelination in mice. " *Neuropeptides*, Aberdeen, Scotland, United Kingdom, 2015.

Sipos É., Ács P., Komoly S. "Elsődleges csillók a központi idegrendszerben."

BAW – Brain Awareness Week/ Agykutatás Hete, Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, 2017. március 13-19.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ÉS TÁMOGATÁS

5.1 Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom programvezetőmnek Prof. Komoly Sámuelnek M.D., Ph.D., D.Sc és témavezetőmnek Ács Péternek M.D., Ph.D. irányításukért, támogatásukért és a kutatói munkám során nyújtott magasszintű szakmai tanácsaikért.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Pintér Erikának M.D, Ph.D., D.Sc, Bölcskei Katának M.D, Ph.D és Sághy Évának Pharm.D., Ph.D. az egész kutatás során nyújtott együttműködésért.

Hálás vagyok kollégáimnak és a Pécsi Tudományegyetem Patológia Intézet munkatársainak, hogy lehetőséget teremtettek a tanulmány gyakorlati kivitelezéséhez, valamint hasznos gyakorlati tanácsokkal láttak el a kísérletek során.

Külön köszönet illeti Prof. Palkovits Miklós M.D., Ph.D., D.Sc. Tanár urat és a Semmelweis Tudományegyetem Neuroanatómia Intézet munkatársait, hogy hozzájárultak szakmai fejlődésemmhez és támogattak a kutatói munkám során.

Nagyra értékelem ifj. Sétáló György M.D., Ph.D. közreműködését, támogatását és tanácsait.

Köszönettel tartozom Fábiánkovics Andreának, M. D., Fülöp Krisztinának, Vecsernyés Mónikának, Perkecz Anikónak és Bognár Ernőnek a kísérletekben nyújtott közreműködésükért és technikai segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak támogatásukért és feltétlen szeretetükért.

5.2 Támogatás

A tanulmány az alábbi anyagi támogatások segítségével jött létre:

Nemzeti Agykutatási Program–A KTIA_NAP_13-1-2013-0001; Richter Gedeon Talentum Alapítvány; EFOP 3.6.1.-16.2016.00004; és Pécsi Tudományegyetem KA-2015-09

6. FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1.] **Leray, E., et al.**, Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*, 2016. 172(1): p. 3-13.
- [2.] **Ascherio, A. and K.L. Munger**, Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention- An Update. *Semin Neurol*, 2016. 36(2): p. 103-14.
- [3.] **Noseworthy, J.H., et al.**, Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2000. 343(13): p. 938-52.
- [4.] **Goldenberg, M.M.**, Multiple sclerosis review. *P t*, 2012. 37(3): p. 175-84.
- [5.] **Sofologi, M., et al.**, Analyzing social cognition and understanding of social inferences in patients with multiple sclerosis. A comparative study. *Hell J Nucl Med*, 2019. 22 Suppl 2: p. 15-26.
- [6.] **Shin, J.S., et al.**, Comparison of psychiatric disturbances in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Medicine (Baltimore)*, 2019. 98(38): p. e17184.
- [7.] **Silveira, C., et al.**, Neuropsychiatric Symptoms of Multiple Sclerosis: State of the Art. *Psychiatry Investig*, 2019.
- [8.] **Hoff, J.M., et al.**, Visual dysfunction in multiple sclerosis. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2019. 139(11).
- [9.] **Capone, F., et al.**, Spinal cord dysfunction contributes to balance impairment in multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg*, 2019. 184: p. 105451.
- [10.] **Coghe, G. and F. Corona**, Is There Any Relationship between Upper and Lower Limb Impairments in People with Multiple Sclerosis? A Kinematic Quantitative Analysis. 2019. 2019: p. 9149201.
- [11.] **McDonald, I. and A. Compston**, The symptoms and signs of multiple sclerosis, in *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 2005. p. 287-346.
- [12.] **Motl, R.W., E.M. Snook, and R.T. Schapiro**, Symptoms and physical activity behavior in individuals with multiple sclerosis. *Res Nurs Health*, 2008. 31(5): p. 466-75.
- [13.] **Tullman, M.J., et al.**, Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2004. 10(4): p. 451-4.
- [14.] **McKay, K.A., et al.**, Risk factors associated with the onset of relapsing-remitting and primary progressive multiple sclerosis: a systematic review. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: p. 817238.
- [15.] **Lublin, F.D., et al.**, Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 2014. 83(3): p. 278-86.
- [16.] **Thompson, A.J., et al.**, Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*, 2018. 17(2): p. 162-173.
- [17.] **Lucchinetti, C., et al.**, Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*, 2000. 47(6): p. 707-17.
- [18.] **Barnett, M.H. and J.W. Prineas**, Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*, 2004. 55(4): p. 458-68.
- [19.] **Kutzelnigg, A. and H. Lassmann**, Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Handb Clin Neurol*, 2014. 122: p. 15-58.
- [20.] **Lassmann, H.**, Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018. 8(3).
- [21.] **Popescu, B.F.G. and C.F. Lucchinetti**, Chapter 9 - Neuropathology of Multiple Sclerosis, in *Multiple Sclerosis*, A. Minagar, Editor. 2016, Academic Press: San Diego. p. 181-200.
- [22.] **Lucchinetti, C.F., et al.**, Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol*, 1996. 6(3): p. 259-74.
- [23.] **Barnett, M.H. and I. Sutton**, The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Curr Opin Neurol*, 2006. 19(3): p. 242-7.
- [24.] **Ruther, B.J., et al.**, Combination of cuprizone and experimental autoimmune encephalomyelitis to study inflammatory brain lesion formation and progression. 2017. 65(12): p. 1900-1913.
- [25.] **Berghoff, S.A., et al.**, Dietary cholesterol promotes repair of demyelinated lesions in the adult brain. *Nat Commun*, 2017. 8: p. 14241.
- [26.] **Suzuki, K. and Y. Kikkawa**, Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone). *Am J Pathol*, 1969. 54(2): p. 307-25.
- [27.] **Blakemore, W.F.**, Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *J Neurocytol*, 1972. 1(4): p. 413-26.
- [28.] **Hiremath, M.M., et al.**, Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol*, 1998. 92(1-2): p. 38-49.
- [29.] **Acs, P. and S. Komoly**, Selective ultrastructural vulnerability in the cuprizone-induced experimental demyelination. *Ideggyogy Sz*, 2012. 65(7-8): p. 266-70.
- [30.] **Praet, J., et al.**, Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014. 47: p. 485-505.
- [31.] **Acs, P., et al.**, Distribution of oligodendrocyte loss and mitochondrial toxicity in the cuprizone-induced experimental demyelination model. *J Neuroimmunol*, 2013. 262(1-2): p. 128-31.
- [32.] **Gudi, V., et al.**, Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci*, 2014. 8: p. 73.

- [33.] **Matsushima, G.K. and P. Morell**, The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol*, 2001. 11(1): p. 107-16.
- [34.] **Norkute, A., et al.**, Cuprizone treatment induces demyelination and astrogliosis in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, 2009. 87(6): p. 1343-55.
- [35.] **Koutsoudaki, P.N., et al.**, Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neurosci Lett*, 2009. 451(1): p. 83-8.
- [36.] **Pott, F., et al.**, Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Res*, 2009. 1305: p. 137-49.
- [37.] **Skripuletz, T., et al.**, Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain Pathol*, 2010. 20(2): p. 301-12.
- [38.] **Skripuletz, T., et al.**, Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol*, 2008. 172(4): p. 1053-61.
- [39.] **Kang, Z., et al.**, IL-17-induced Act1-mediated signaling is critical for cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci*, 2012. 32(24): p. 8284-92.
- [40.] **Pasquini, L.A., et al.**, The neurotoxic effect of cuprizone on oligodendrocytes depends on the presence of pro-inflammatory cytokines secreted by microglia. *Neurochem Res*, 2007. 32(2): p. 279-92.
- [41.] **Skripuletz, T., et al.**, Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain*, 2013. 136(Pt 1): p. 147-67.
- [42.] **Voss, E.V., et al.**, Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis*, 2012. 45(1): p. 519-28.
- [43.] **Gudi, V., et al.**, Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the dynamics of repair priming. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e22623.
- [44.] **Morell, P., et al.**, Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci*, 1998. 12(4-5): p. 220-7.
- [45.] **Acs, P. and B. Kalman**, Pathogenesis of multiple sclerosis: what can we learn from the cuprizone model. *Methods Mol Biol*, 2012. 900: p. 403-31.
- [46.] **Torkildsen, O., et al.**, The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl*, 2008. 188: p. 72-6.
- [47.] **Mason, J.L., et al.**, Episodic demyelination and subsequent remyelination within the murine central nervous system: changes in axonal calibre. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2001. 27(1): p. 50-8.
- [48.] **Hiremath, M.M., et al.**, MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *J Neuroimmunol*, 2008. 203(1): p. 23-32.
- [49.] **Gerdes, J.M., E.E. Davis, and N. Katsanis**, The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*, 2009. 137(1): p. 32-45.
- [50.] **Marshall, W.F. and S. Nonaka**, Cilia: Tuning in to the Cell's Antenna. *Current Biology*, 2006. 16(15): p. R604-R614.
- [51.] **Singla, V. and J.F. Reiter**, The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. *Science*, 2006. 313(5787): p. 629-633.
- [52.] **Wheway, G., L. Nazlamova, and J.T. Hancock**, Signaling through the Primary Cilium. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2018. 6: p. 8-8.
- [53.] **Fabbri, L., F. Bost, and N.M. Mazure**, Primary Cilium in Cancer Hallmarks. *International journal of molecular sciences*, 2019. 20(6): p. 1336.
- [54.] **Alvarez-Satta, M., L. Moreno-Cugnon, and A. Matheu**, Primary cilium and brain aging: role in neural stem cells, neurodegenerative diseases and glioblastoma. *Ageing Res Rev*, 2019. 52: p. 53-63.
- [55.] **Amador-Arjona, A., et al.**, Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: implications for learning and memory. *J Neurosci*, 2011. 31(27): p. 9933-44.
- [56.] **Breunig, J.J., et al.**, Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(35): p. 13127-32.
- [57.] **Han, Y.G. and A. Alvarez-Buylla**, Role of primary cilia in brain development and cancer. *Curr Opin Neurobiol*, 2010. 20(1): p. 58-67.
- [58.] **Han, Y.G., et al.**, Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci*, 2008. 11(3): p. 277-84.
- [59.] **Khatri, P., et al.**, Proliferation and cilia dynamics in neural stem cells prospectively isolated from the SEZ. *Scientific Reports*, 2014. 4(1): p. 3803.
- [60.] **Tong, C.K., et al.**, Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(34): p. 12438-43.
- [61.] **Badano, J.L., et al.**, The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2006. 7(1): p. 125-148.
- [62.] **Grochowsky, A. and M. Gunay-Aygun**, Clinical characteristics of individual organ system disease in non-motile ciliopathies. *Transl Sci Rare Dis*, 2019. 4(1-2): p. 1-23.

- [63.] **Kim, Y.J. and J. Kim**, Therapeutic perspectives for structural and functional abnormalities of cilia. *Cell Mol Life Sci*, 2019. 76(19): p. 3695-3709.
- [64.] **Reiter, J.F. and M.R. Leroux**, Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. 18(9): p. 533-547.
- [65.] **Forsythe, E. and P.L. Beales**, Bardet–Biedl syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 2013. 21(1): p. 8-13.
- [66.] **Forsythe, E., et al.**, Managing Bardet–Biedl Syndrome—Now and in the Future. *Frontiers in Pediatrics*, 2018. 6(23).
- [67.] **Kenny, J., et al.**, Toward personalized medicine in Bardet-Biedl syndrome. *Per Med*, 2017. 14(5): p. 447-456.
- [68.] **Parisi, M.A.**, Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 2009. 151C(4): p. 326-340.
- [69.] **Parisi, M.A.**, The molecular genetics of Joubert syndrome and related ciliopathies: The challenges of genetic and phenotypic heterogeneity. *Transl Sci Rare Dis*, 2019. 4(1-2): p. 25-49.
- [70.] **Sattar, S. and J.G. Gleeson**, The ciliopathies in neuronal development: a clinical approach to investigation of Joubert syndrome and Joubert syndrome-related disorders. *Dev Med Child Neurol*, 2011. 53(9): p. 793-798.
- [71.] **Alvarez-Satta, M., S. Castro-Sanchez, and D. Valverde**, Alstrom syndrome: current perspectives. *Appl Clin Genet*, 2015. 8: p. 171-9.
- [72.] **Jan, D.M., et al.**, Alstrom Syndrome: Genetics and Clinical Overview. *Current Genomics*, 2011. 12(3): p. 225-235.
- [73.] **Hearn, T.**, ALMS1 and Alstrom syndrome: a recessive form of metabolic, neurosensory and cardiac deficits. *J Mol Med (Berl)*, 2019. 97(1): p. 1-17.
- [74.] **Barker, A.R., R. Thomas, and H.R. Dawe**, Meckel-Gruber syndrome and the role of primary cilia in kidney, skeleton, and central nervous system development. *Organogenesis*, 2014. 10(1): p. 96-107.
- [75.] **Hartill, V., et al.**, Meckel–Gruber Syndrome: An Update on Diagnosis, Clinical Management, and Research Advances. *Frontiers in Pediatrics*, 2017. 5(244).
- [76.] **Händel, M., et al.**, Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience*, 1999. 89(3): p. 909-926.
- [77.] **Berbari, N.F., et al.**, Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell*, 2008. 19(4): p. 1540-7.
- [78.] **Berbari, N.F., et al.**, Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(11): p. 4242-6.
- [79.] **Brailov, I., et al.**, Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res*, 2000. 872(1-2): p. 271-5.
- [80.] **Hamon, M., et al.**, Antibodies and Antisense Oligonucleotide for Probing the Distribution and Putative Functions of Central 5-HT6Receptors. *Neuropsychopharmacology*, 1999. 21(1): p. 68-76.
- [81.] **Domire, J.S., et al.**, Dopamine receptor 1 localizes to neuronal cilia in a dynamic process that requires the Bardet-Biedl syndrome proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011. 68(17): p. 2951-2960.
- [82.] **Koemeter-Cox, A.I., et al.**, Primary cilia enhance kisspeptin receptor signaling on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. 111(28): p. 10335-10340.
- [83.] **Loktev, Alexander V. and Peter K. Jackson**, Neuropeptide Y Family Receptors Traffic via the Bardet-Biedl Syndrome Pathway to Signal in Neuronal Primary Cilia. *Cell Reports*, 2013. 5(5): p. 1316-1329.
- [84.] **Bishop, G.A., et al.**, Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. *J Comp Neurol*, 2007. 505(5): p. 562-71.
- [85.] **Einstein, E.B., et al.**, Somatostatin Signaling in Neuronal Cilia Is Critical for Object Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, 2010. 30(12): p. 4306-4314.
- [86.] **Pissios, P., R.L. Bradley, and E. Maratos-Flier**, Expanding the Scales: The Multiple Roles of MCH in Regulating Energy Balance and Other Biological Functions. *Endocrine Reviews*, 2006. 27(6): p. 606-620.
- [87.] **Schou, K.B., L.B. Pedersen, and S.T. Christensen**, Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO reports*, 2015. 16(9): p. 1099-1113.
- [88.] **Davenport, J.R., et al.**, Disruption of Intraflagellar Transport in Adult Mice Leads to Obesity and Slow-Onset Cystic Kidney Disease. *Current Biology*, 2007. 17(18): p. 1586-1594.
- [89.] **Wang, Z., et al.**, Adult Type 3 Adenylyl Cyclase–Deficient Mice Are Obese. *PLOS ONE*, 2009. 4(9): p. e6979.
- [90.] **Wang, Z., T. Phan, and D.R. Storm**, The Type 3 Adenylyl Cyclase Is Required for Novel Object Learning and Extinction of Contextual Memory: Role of cAMP Signaling in Primary Cilia. *The Journal of Neuroscience*, 2011. 31(15): p. 5557-5561.

- [91.] **Dummer, A., et al.**, Measuring the primary cilium length: improved method for unbiased high-throughput analysis. *Cilia*, 2016. 5(1): p. 7.
- [92.] **Hilgendorf, K.I., C.T. Johnson, and P.K. Jackson**, The primary cilium as a cellular receiver: organizing ciliary GPCR signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 2016. 39: p. 84-92.
- [93.] **Cevik, S., et al.**, Joubert syndrome Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes protein transport in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology*, 2010. 188(6): p. 953-969.
- [94.] **Kasahara, K., et al.**, Visualization of astrocytic primary cilia in the mouse brain by immunofluorescent analysis using the cilia marker Arl13b. *Acta Med Okayama*, 2014. 68(6): p. 317-22.
- [95.] **Larkins, C.E., et al.**, Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 2011. 22(23): p. 4694-4703.
- [96.] **Lu, H., et al.**, A function for the Joubert syndrome protein Arl13b in ciliary membrane extension and ciliary length regulation. *Developmental Biology*, 2015. 397(2): p. 225-236.
- [97.] **Caspary, T., C.E. Larkins, and K.V. Anderson**, The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Dev Cell*, 2007. 12(5): p. 767-78.
- [98.] **Miyoshi, K., et al.**, Lithium treatment elongates primary cilia in the mouse brain and in cultured cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. 388(4): p. 757-762.
- [99.] **Ou, Y., et al.**, Adenylate cyclase regulates elongation of mammalian primary cilia. *Experimental Cell Research*, 2009. 315(16): p. 2802-2817.
- [100.] **Miyoshi, K., et al.**, Lack of Dopaminergic Inputs Elongates the Primary Cilia of Striatal Neurons. *PLOS ONE*, 2014. 9(5): p. e97918.
- [101.] **Basten, S.G. and R.H. Giles**, Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis. *Cilia*, 2013. 2(1): p. 6.
- [102.] **Liu, H., A.A. Kiseleva, and E.A. Golemis**, Ciliary signalling in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2018. 18(8): p. 511-524.
- [103.] **Sarkisian, M.R. and S.L. Semple-Rowland**, Emerging Roles of Primary Cilia in Glioma. *Front Cell Neurosci*, 2019. 13: p. 55.
- [104.] **Han, Y.-G., et al.**, Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nature Medicine*, 2009. 15(9): p. 1062-1065.
- [105.] **Di Pietro, C., et al.**, Primary Cilia in the Murine Cerebellum and in Mutant Models of Medulloblastoma. *Cell Mol Neurobiol*, 2017. 37(1): p. 145-154.
- [106.] **Ma, X., R. Peterson, and J. Turnbull**, Adenylyl cyclase type 3, a marker of primary cilia, is reduced in primary cell culture and in lumbar spinal cord in situ in G93A SOD1 mice. *BMC Neurosci*, 2011. 12: p. 71.
- [107.] **Armato, U., et al.**, Alzheimer's disease: an update of the roles of receptors, astrocytes and primary cilia (review). *Int J Mol Med*, 2013. 31(1): p. 3-10.
- [108.] **Chakravarthy, B., et al.**, Reduction of the immunostainable length of the hippocampal dentate granule cells' primary cilia in 3xAD-transgenic mice producing human Abeta(1-42) and tau. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 427(1): p. 218-22.
- [109.] **Chakravarthy, B., et al.**, The p75 neurotrophin receptor is localized to primary cilia in adult murine hippocampal dentate gyrus granule cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 401(3): p. 458-62.
- [110.] **Hu, L., B. Wang, and Y. Zhang**, Serotonin 5-HT6 receptors affect cognition in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating cilia function. *Alzheimers Res Ther*, 2017. 9(1): p. 76.
- [111.] **Kaliszewski, M., A.B. Knott, and E. Bossy-Wetzel**, Primary cilia and autophagic dysfunction in Huntington's disease. *Cell Death Differ*, 2015. 22(9): p. 1413-24.
- [112.] **Keryer, G., et al.**, Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease. *J Clin Invest*, 2011. 121(11): p. 4372-82.
- [113.] **Mustafa, R., et al.**, Targeted Depletion of Primary Cilia in Dopaminergic Neurons in a Preclinical Mouse Model of Huntington's Disease. *Front Cell Neurosci*, 2019. 13: p. 565.
- [114.] **Bae, J.E., et al.**, Primary cilia mediate mitochondrial stress responses to promote dopamine neuron survival in a Parkinson's disease model. 2019. 10(12): p. 952.
- [115.] **Dhekne, H.S. and I. Yanatori**, A pathway for Parkinson's Disease LRRK2 kinase to block primary cilia and Sonic hedgehog signaling in the brain. 2018. 7.
- [116.] **Canterini, S., et al.**, Shortened primary cilium length and dysregulated Sonic hedgehog signaling in Niemann-Pick C1 disease. *Hum Mol Genet*, 2017. 26(12): p. 2277-2289.
- [117.] **Lucarelli, M., et al.**, Anomalies in Dopamine Transporter Expression and Primary Cilium Distribution in the Dorsal Striatum of a Mouse Model of Niemann-Pick C1 Disease. *Front Cell Neurosci*, 2019. 13: p. 226.
- [118.] **Kirschen, G.W., et al.**, The radial organization of neuronal primary cilia is acutely disrupted by seizure and ischemic brain injury. *Front Biol (Beijing)*, 2017. 12(2): p. 124-138.

- [119.] **Parker, A.K., et al.**, Neonatal seizures induced by pentylentetrazol or kainic acid disrupt primary cilia growth on developing mouse cortical neurons. *Experimental Neurology*, 2016. 282: p. 119-127.
- [120.] **Kutzelnigg, A., et al.**, Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 2005. 128(Pt 11): p. 2705-12.
- [121.] **Clapham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strubing**, The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2001. 2(6): p. 387-96.
- [122.] **Bandell, M., et al.**, Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 2004. 41(6): p. 849-57.
- [123.] **Bautista, D.M., et al.**, Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(34): p. 12248-52.
- [124.] **Taylor-Clark, T.E., et al.**, Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal. *J Physiol*, 2008. 586(14): p. 3447-59.
- [125.] **Trevisan, G., et al.**, TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med*, 2014. 72: p. 200-9.
- [126.] **Andersson, D.A., et al.**, Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci*, 2008. 28(10): p. 2485-94.
- [127.] **Sisignano, M., et al.**, 5,6-EET is released upon neuronal activity and induces mechanical pain hypersensitivity via TRPA1 on central afferent terminals. *J Neurosci*, 2012. 32(18): p. 6364-72.
- [128.] **Taylor-Clark, T.E., et al.**, Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol*, 2008. 73(2): p. 274-81.
- [129.] **Taylor-Clark, T.E., et al.**, TRPA1: a potential target for anti-tussive therapy. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009. 22(2): p. 71-4.
- [130.] **Motter, A.L. and G.P. Ahern**, TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e38439.
- [131.] **Story, G.M., et al.**, ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 2003. 112(6): p. 819-29.
- [132.] **Bautista, D.M., et al.**, TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 2006. 124(6): p. 1269-82.
- [133.] **Nagata, K., et al.**, Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci*, 2005. 25(16): p. 4052-61.
- [134.] **Nilius, B., G. Appendino, and G. Owsianik**, The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch*, 2012. 464(5): p. 425-58.
- [135.] **Grace, M.S., et al.**, Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease. *Br J Pharmacol*, 2014. 171(10): p. 2593-607.
- [136.] **Oxford, G.S. and J. Hurley**, The role of TRP channels in migraine. *Open Pain J*, 2013(6): p. 37-49.
- [137.] **Engel, M.A., et al.**, TRPA1 and substance P mediate colitis in mice. *Gastroenterology*, 2011. 141(4): p. 1346-58.
- [138.] **Wilson, S.R., et al.**, TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci*, 2011. 14(5): p. 595-602.
- [139.] **DeBerry, J.J., E.S. Schwartz, and B.M. Davis**, TRPA1 mediates bladder hyperalgesia in a mouse model of cystitis. *Pain*, 2014. 155(7): p. 1280-7.
- [140.] **Shigetomi, E., et al.**, TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci*, 2011. 15(1): p. 70-80.
- [141.] **Islam, M.S., et al.**, Olig2-expressing progenitor cells preferentially differentiate into oligodendrocytes in cuprizone-induced demyelinated lesions. *Neurochem Int*, 2009. 54(3-4): p. 192-8.
- [142.] **Kondo, T., et al.**, Transient receptor potential A1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. *Gut*, 2009. 58(10): p. 1342-52.
- [143.] **Kondo, T., et al.**, Role of transient receptor potential A1 in gastric nociception. *Digestion*, 2010. 82(3): p. 150-5.
- [144.] **Kondo, T., et al.**, Activation of p38 MAPK through transient receptor potential A1 in a rat model of gastric distension-induced visceral pain. *Neuroreport*, 2013. 24(2): p. 68-72.
- [145.] **Izawa, I., et al.**, Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia*, 2015. 4(1): p. 12.
- [146.] **Chen, X., et al.**, Ablation of Type III Adenylyl Cyclase in Mice Causes Reduced Neuronal Activity, Altered Sleep Pattern, and Depression-like Phenotypes. *Biological Psychiatry*, 2016. 80(11): p. 836-848.
- [147.] **Mukhopadhyay, S. and P.K. Jackson**, Cilia, tubby mice, and obesity. *Cilia*, 2013. 2: p. 1.
- [148.] **Berbari, N.F., et al.**, Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(19): p. 7796-801.

- [149.] **Acs, P., et al.**, 17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia*, 2009. 57(8): p. 807-14.
- [150.] **Gudi, V., et al.**, Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res*, 2009. 1283: p. 127-38.
- [151.] **Mason, J.L., et al.**, Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. *J Neurosci Res*, 2000. 61(3): p. 251-62.
- [152.] **Shigetomi, E., et al.**, TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J Neurosci*, 2013. 33(24): p. 10143-53.
- [153.] **Linares, D., et al.**, Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. *J Neurosci*, 2006. 26(49): p. 12672-81.
- [154.] **Zeger, M., et al.**, Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia*, 2007. 55(4): p. 400-11.
- [155.] **Benardais, K., et al.**, Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotox Res*, 2013. 24(2): p. 244-50.
- [156.] **Itoh, T., A. Itoh, and D. Pleasure**, Bcl-2-related protein family gene expression during oligodendroglial differentiation. *J Neurochem*, 2003. 85(6): p. 1500-12.
- [157.] **Lindsten, T., et al.**, The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, 2000. 6(6): p. 1389-99.
- [158.] **Hamilton, N.B., et al.**, Proton-gated Ca(2+)-permeable TRP channels damage myelin in conditions mimicking ischaemia. *Nature*, 2016. 529(7587): p. 523-7.
- [159.] **Hasan, R., et al.**, Calmodulin is responsible for Ca2+-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 45098.
- [160.] **Hasan, R. and X. Zhang**, Ca(2+) Regulation of TRP Ion Channels. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(4).
- [161.] **Vangeel, L. and T. Voets**, Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019. 11(6).
- [162.] **Zygmunt, P.M. and E.D. Hogestatt**, TRPA1. *Handb Exp Pharmacol*, 2014. 222: p. 583-630.
- [163.] **Veto, S., et al.**, Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain*, 2010. 133(Pt 3): p. 822-34.
- [164.] **Crocker, S.J., et al.**, c-Jun mediates axotomy-induced dopamine neuron death in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(23): p. 13385-90.
- [165.] **Watson, A., et al.**, Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, 1998. 18(2): p. 751-62.
- [166.] **Domercq, M., et al.**, Dual-specific phosphatase-6 (Dusp6) and ERK mediate AMPA receptor-induced oligodendrocyte death. *J Biol Chem*, 2011. 286(13): p. 11825-36.
- [167.] **Lee, J.Y., T.H. Oh, and T.Y. Yune**, Ghrelin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes via ERK and p38MAPK signaling. *Endocrinology*, 2011. 152(6): p. 2377-86.
- [168.] **Xia, Z., et al.**, Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 1995. 270(5240): p. 1326-31.
- [169.] **Fry, A.M., M.J. Leaper, and R. Bayliss**, The primary cilium. *Organogenesis*, 2014. 10(1): p. 62-68.
- [170.] **Lee, J.H. and J.G. Gleeson**, The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiology of Disease*, 2010. 38(2): p. 167-172.
- [171.] **Valente, E.M., et al.**, Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews Neurology*, 2014. 10(1): p. 27-36.
- [172.] **Stanić, D., et al.**, Developmental changes in frequency of the ciliary somatostatin receptor 3 protein. *Brain Research*, 2009. 1249: p. 101-112.
- [173.] **Challis, Rosemary C., et al.**, An Olfactory Cilia Pattern in the Mammalian Nose Ensures High Sensitivity to Odors. *Current Biology*, 2015. 25(19): p. 2503-2512.
- [174.] **Kaupp, U.B.**, Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nature Reviews Neuroscience*, 2010. 11(3): p. 188-200.
- [175.] **Qiu, L., et al.**, Type 3 adenylyl cyclase: a key enzyme mediating the cAMP signaling in neuronal cilia. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2016. 8(3): p. 95-108.
- [176.] **Wong, S.T., et al.**, Disruption of the Type III Adenylyl Cyclase Gene Leads to Peripheral and Behavioral Anosmia in Transgenic Mice. *Neuron*, 2000. 27(3): p. 487-497.
- [177.] **Berbari, N.F., et al.**, Hippocampal neurons possess primary cilia in culture. *J Neurosci Res*, 2007. 85(5): p. 1095-100.
- [178.] **Green, J.A., et al.**, Recruitment of β -Arrestin into Neuronal Cilia Modulates Somatostatin Receptor Subtype 3 Ciliary Localization. *Molecular and Cellular Biology*, 2016. 36(1): p. 223-235.

- [179.] **Guadiana, S.M., et al.**, Arborization of Dendrites by Developing Neocortical Neurons Is Dependent on Primary Cilia and Type 3 Adenylyl Cyclase. *The Journal of Neuroscience*, 2013. 33(6): p. 2626-2638.
- [180.] **Hua, K. and R.J. Ferland**, Fixation methods can differentially affect ciliary protein immunolabeling. *Cilia*, 2017. 6(1): p. 5.
- [181.] **Mok, C., E. Héon, and M. Zhen**, Ciliary dysfunction and obesity. *Clinical Genetics*, 2010. 77(1): p. 18-27.
- [182.] **Seo, S., et al.**, Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Human Molecular Genetics*, 2009. 18(7): p. 1323-1331.
- [183.] **Brazeau, P., et al.**, Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. *Science*, 1973. 179(4068): p. 77-79.
- [184.] **Johansson, O., T. Hökfelt, and R.P. Elde**, Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience*, 1984. 13(2): p. 265-IN2.
- [185.] **Patel, Y.C.**, Somatostatin and Its Receptor Family. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1999. 20(3): p. 157-198.
- [186.] **Yasuda, K., et al.**, Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J Biol Chem*, 1992. 267(28): p. 20422-8.
- [187.] **Iwanaga, T., T. Miki, and H. Takahashi-Iwanaga**, Restricted expression of somatostatin receptor 3 to primary cilia in the pancreatic islets and adenohypophysis of mice. *Biomedical Research*, 2011. 32(1): p. 73-81.
- [188.] **Han, Y.M., et al.**, Leptin-promoted cilia assembly is critical for normal energy balance. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014. 124(5): p. 2193-2197.
- [189.] **Danilov, A.I., et al.**, Ultrastructural and antigenic properties of neural stem cells and their progeny in adult rat subventricular zone. *Glia*, 2009. 57(2): p. 136-152.
- [190.] **Doetsch, F., J.M. García-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla**, Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. 96(20): p. 11619-11624.
- [191.] **Parpura, V., et al.**, Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*, 2012. 121(1): p. 4-27.
- [192.] **Verkhatsky, A. and V. Parpura**, Recent advances in (patho)physiology of astroglia. *Acta Pharmacol Sin*, 2010. 31(9): p. 1044-54.
- [193.] **Ming, G.L. and H. Song**, Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 2011. 70(4): p. 687-702.
- [194.] **Walton, R.M.**, Postnatal neurogenesis: of mice, men, and macaques. *Vet Pathol*, 2012. 49(1): p. 155-65.
- [195.] **Bangs, F. and K.V. Anderson**, Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017. 9(5).
- [196.] **Park, S.M., H.J. Jang, and J.H. Lee**, Roles of Primary Cilia in the Developing Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019. 13(218).
- [197.] **Han, Y.-G., et al.**, Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 2008. 11(3): p. 277-284.
- [198.] **Higginbotham, H., et al.**, Arl13b in Primary Cilia Regulates the Migration and Placement of Interneurons in the Developing Cerebral Cortex. *Developmental Cell*, 2012. 23(5): p. 925-938.
- [199.] **Higginbotham, H., et al.**, Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. *Nature Neuroscience*, 2013. 16(8): p. 1000-1007.
- [200.] **Humbert, M.C., et al.**, ARL13B, PDE6D, and CEP164 form a functional network for INPP5E ciliary targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. 109(48): p. 19691-19696.
- [201.] **Li, Y., et al.**, The small GTPases ARL-13 and ARL-3 coordinate intraflagellar transport and ciliogenesis. *Journal of Cell Biology*, 2010. 189(6): p. 1039-1051.