

EGYETEMI DOKTORI (PhD)
ÉRTEKEZÉS

**Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 3 ioncsatorna
farmakológiai vizsgálata és szerepe a szomatoszenzoros
érzékelésben**

Kelemen Balázs

Témavezető: Dr. Tóth István Balázs



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. A TRP csatornák általános bemutatása	7
3.2. TRPM3 ioncsatorna bemutatása.....	12
3.2.1. Általános jellemzők.....	12
3.2.2. TRPM3 funkcionális jellemzői.....	13
3.2.3. TRPM3 farmakológiai jellemzői	14
3.2.3.1. Aktivátorok.....	14
3.2.3.1.1. Endogén aktivátorok-	15
3.2.3.1.2. Exogén aktivátorok.....	16
3.2.3.2. Antagonisták.....	16
3.2.3.2.1. Endogén antagonisták	16
3.2.3.2.2. Exogén gátlószerek.....	16
3.2.4. A TRPM3 fiziológiai szerepe, a <i>Trpm3</i> ^{-/-} egerek tulajdonságai	17
3.3. Illékony anesztetikumok	20
3.4. Fájdalom és viszketés	22
3.4.1. Fájdalom.....	24
3.4.2. Viszketés és elkülönülése a fájdalomtól	25
3.4.3. Viszketés vizsgálata egér modellekben	26
4. Célkitűzések	28
5. Anyagok és módszerek.....	29
5.1. Alkalmazott kémiai anyagok.....	29
5.2. IA-k stabil oldatának készítése és GC/MS ellenőrzése.....	30
5.3. Felhasznált állatok.....	31
5.4. Sejtenyésztés és primer neuron izolálás	32
5.4.1. HEK293T sejtek.....	32
5.4.2. TG és DRG neuron izolálás	33
5.5. Intracelluláris Ca ²⁺ -szint mérés.....	35
5.5.1. Ca ²⁺ mérés több sejttes elrendezése	35
5.5.2. Hőmérséklet aktivált Ca ²⁺ mérés több sejttes elrendezése	37

5.5.3.	<i>Ca²⁺ mérés egysejtes elrendezése</i>	37
5.6.	Patch Clamp mérések	38
5.7.	Egér viselkedés tesztek.....	39
5.8.	Statisztika.....	42
6.	Eredmények	44
6.1.	Illékony anesztetikumok hatása a TRPM3 ioncsatorna működésére	44
6.1.1.	<i>Anesztetikumok stabilitásának vizsgálata</i>	44
6.1.2.	<i>IA-k hatása a rekombináns TRPM3 kémiai aktivációja</i>	45
6.1.3.	<i>IA-k gátló hatása a TRPM3 hőmérséklet általi aktivációjára</i>	48
6.1.4.	<i>IA-k hatása a TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra</i>	49
6.1.5.	<i>IA-k hatása egér hátsógyöki ganglionokból izolált szenzoros neuronokon kifejeződő natív TRPM3 ioncsatornákra</i>	52
6.2.	A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata	56
6.2.1.	<i>PregS a TRPM3-on keresztül fájdalmat indukál, de viszketést nem</i>	56
6.2.2.	<i>Endogén pruritogén anyagok hatása Trpm3^{-/-} állatok viselkedésére</i>	59
6.2.3.	<i>A pruritogének hatása független a natív TRPM3-tól</i>	61
6.2.4.	<i>A TRPM3 farmakológiai gátlása nincs hatással a pruritogének által kiváltott neurális válaszokra</i>	63
7.	Diszkusszió	65
7.1.	Anesztetikumok hatása a TRPM3 ioncsatornára.....	66
7.2.	A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata	70
8.	Összefoglalás	77
9.	Summary	79
10.	Irodalomjegyzék	80
11.	Tárgyszavak.....	93
12.	Key words.....	94
13.	Köszönetnyilvánítás.....	95
14.	Függelék	97
	Függelék	99
	A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények	99

1. Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

[Ca²⁺]_{IC}: intracelluláris Ca²⁺

2-APB: 2-aminoethoxydifenil borát

5-HT: szerotonin

AITC: allyl isotio-cianát (a mustárolaj csípős ízéért felelős vegyület)

AM: acetoxi metilészter

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

CA: fahéj aldehid

Caps: kapszaicin

CMi: mechanikailag érzéketlen C-rostok

DCDPC: 4-chloro-2-(3-chloroanilino) benzoic acid

De-SPH: D-eythro-szfingozin

DHEA: dehidroepandroszteron

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNS: dezoxiribonukleotidsav

DRG: hátsó gyöki ganglion

EC₅₀: félhatásos aktiváló koncentráció

ER: endoplazmatikus retikulum

ET-1: endothelin-1

GABA_A: gamma-aminovajsav A receptor

GBM: glioblastoma multiforme (leggyakoribb és legagresszívabb felnőttkori primer agydaganat)

GC/MS: gázkromatográfia/ tömegspektrometria

GDNF: gliasejtekből származó neurotróf faktor

HCN1: hyperpolarizáció aktiválta és ciklikus nukleotid kapuzott csatorna 1

HEK293T: Humán embrionális vese sejtekből származó sejt vonal

HEK-M3: TRPM3-at overexpresszáló HEK293T sejt vonal

Hist: hisztamin

IA: illékony anesztetikum

IASP: a fájdalomkutatás nemzetközi szervezete (International Association for the Study of Pain)

IC₅₀: félhatásos gátló koncentráció

Isok: izozakuranetin

K2P: két pórusdoménnal rendelkező K⁺ csatorna

KO: knock out

LOC: eszméletvesztés (loss of consciousness)

MAC: altatást előidéző minimális alveoláris koncentráció

MRGPR: Mas-related G-protein coupled receptor

nACh: nikotierg acetyl-kolin receptor

NMDA: n-metil-d-aszparaginsav

NOMP-C: *Caenorhabditis elegans* „NO-mecha-potenciál C” fehérjéje

NT4: neurotrofin-4

P/S: penicillin/streptomycin

PAR2: protáz aktiválta receptor 2

PBS: foszfát pufferelt oldat

PCR: polimeráz láncreakció

PD: pórus formáló domén (pore domain)

PmC: polimodális C-rostok

PPAR- γ : perioxoszóma proliferátor-aktivátor receptor γ

PregS: pregnenolon-szulfát

Q₁₀: az ioncsatorna által mediált áram amplitúdójában bekövetkező relatív változás értéke, 10 °C hőmérsékleti változás hatására

Q-PCR: kvantitatív polimeráz láncreakció

RNS: ribonukleinsav

ROS: reaktív oxigén gyök

S1-S6: a TRP csatornák transzmembrán szegmenseinek jelölése

SD: standard deviáció

TG: trigeminális ganglion

TRP: tranziens receptor potenciál

TRPA: tranziens receptor potenciál ankirin transzmembrán protein alcsalád

TRPC: tranziens receptor potenciál klasszikus/ kanonikus alcsalád

TRPM: tranziens receptor potenciál melasztatin alcsalád

***Trpm3*^{-/-}:** TRPM3 ioncsatorna knock out egér

***Trpm3*^{+/+}:** vad típusú egér

TRPML: tranziens receptor potenciál mukolipin alcsalád

TRPN: tranziens receptor potenciál nem mechanoreceptor potenciál C alcsalád

TRPP: tranziens receptor potenciál policisztin alcsalád

TRPV: tranziens receptor potenciál vanilloid alcsalád

VSD: feszültség érzékelő domén (voltage sensing domain)

β -NGF: β -idegi növekedési faktor

2. Bevezetés

A kalandoknak megvan a maguk helye és ideje (...), de sok minden szól a rendszeres étkezés és a fájdalommentes élet mellett.-Neil Gaiman

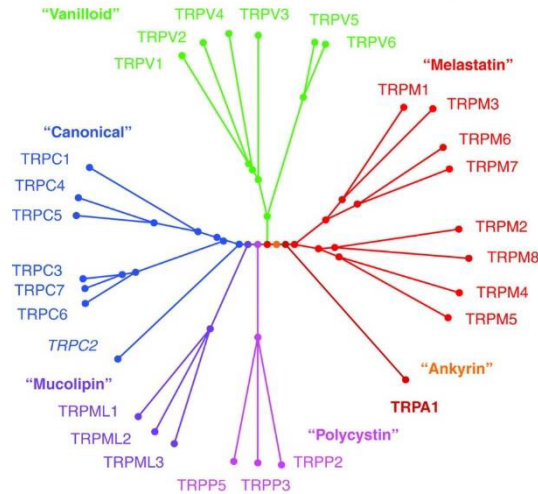
A fájdalomról és a viszketésről egyaránt elmondható, hogy olyan szenzoros jelenségek, melyekhez valamilyen negatív érzést társítunk. Laboratóriumunk, kollaborációs partnereinkkel közösen, évek óta foglalkozik az emberi bőr és a hozzá kapcsolódó különböző szenzoros funkciók, úgy, mint pl.: a fájdalom és viszketés, (kór)élettani folyamatainak különböző aspektusaival. Korábbi kísérletes eredményeink számos, a szenzoros funkciókban kimagasló szerepet játszó, Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatorna családba tartozó fehérje működésének és az általuk mediált mechanizmusok jobb megértéséhez járultak hozzá.

A fájdalmat és viszketést kiváltó ingerek detektálását a szomatoszenzoros neuronok idegvégződésein kifejeződő receptorok végzik. A fájdalomérzékelésben és annak transzdukciójában szerepet játszó molekuláris résztvevők egy jelentős része a hőérzékeny TRP ioncsatornák csoportjába tartozik. A hőérzékeny TRP csatornák közül a TRPV1 és TRPA1-ről korábban leírták, hogy nem csak a fájdalom- és hőmérsékletérzékelésben, de a viszketés érzékelésében és transzdukciójában is szerepet játszanak. Saját kutatásunk céljaként a fájdalom kialakulásában már ismertén szerepet játszó, de korábban említett TRP csatornákhöz képest kevésbé karakterizált hőérzékeny Tranziens Receptor Potenciál Melasztatin 3 (TRPM3) ioncsatorna további funkcionális és farmakológiai vizsgálatát tűztük ki. Kutatásaink során teszteltük különböző illékony anesztetikumok potenciális hatását a TRPM3 ioncsatornára nézve, illetve tanulmányoztuk a TRPM3 korábban még nem vizsgált potenciális szerepét a viszketés kialakulásában.

3. Irodalmi áttekintés

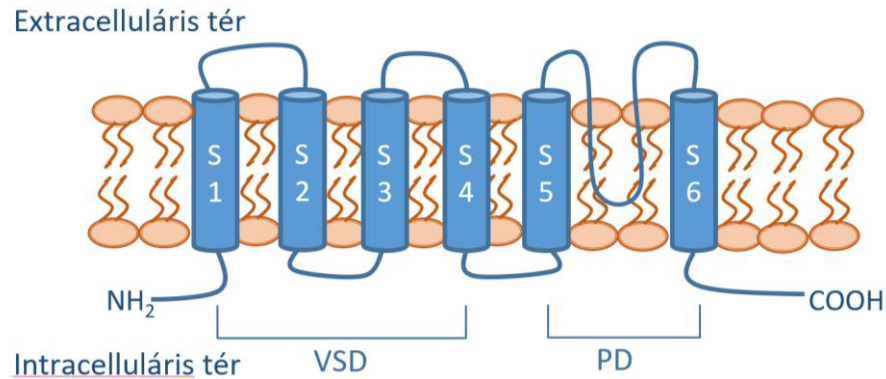
3.1. A TRP csatornák általános bemutatása

A TRP család tagjai a feszültség függő ioncsatornák szupercsaládjába tartoznak, és génjeik olyan integráns membránfehérjéket kódolnak, melyek funkcionális ioncsatornaként működnek. Nevüket onnan kapták, hogy az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) retinájában található fényérzékeny TRP fehérjével nagymértékű szekvencia és szerkezeti hasonlóságot mutatnak, azonban többségüknek a tényleges tranziens receptor potenciálhoz valójában csak névlegesen van köze (1,2). Különböző TRP csatornák az élesztőtől a gerincesekig a legtöbb fajban, szinte minden típusú szövetben, ingerelhető és nem ingerelhető sejtekben egyaránt megtalálhatóak. Számos szerteágazó élettani folyamat kulcsfontosságú szereplői. A teljesség igénye nélkül ilyenek például az izom kontrakciók és ionháztartás szabályozása, illetve különféle ingerek (íz, feromonok, fájdalom és hőmérséklet) érzékelése. A tudomány jelenlegi állása alapján a különböző fajokban, több, mint 100 TRP gént azonosítottak, melyeket a TRP szupercsaládon belül az alábbi alcsaládokba különítettünk el (**1.ábra**): *klasszikus* vagy *kanonikus* (TRPC) - legnagyobb homológiát mutat a *Drosophila* TRP fehérjével-, *vanilloid* (TRPV) –mely névadója a vanilloid receptor-1 (TRPV1)-, *melasztatin* (TRPM), *policisztin* (TRPP), *mukolipin* (TRPML), *ankirin* (TRPA) - mely család tagjai ankirin-szerű fehérjéket tartalmaznak-, illetve a TRPN család - alcsaládot a *Caenorhabditis elegans* „NO-mecha-potenciál C”(NOMP-C)-ről nevezték el. A TRPN csatornát gerincesekben eddig egyedül zebrahalban azonosítottak (3,4).



1. ábra: A gerincesekben megtalálható TRP csatornák filogenetikai fája. (5) .

A TRP csatornák általános felépítését tekintve hat transzmembrán szegmensből (S1-S6) álló, homo- vagy heterotetramer fehérjék. Az azonos vagy különböző alcsaládok tagjai között számos esetben írták le heteromultimer csatorna képződését (6–11). A transzmembrán régiók közül az S1-S4 szegmensek alkotják a csatornák feszültség szenzorát (voltage-sensing domain- VSD), melynek konformáció változása képes befolyásolni az S5 és S6 között elhelyezkedő pórusképző hurkot (pore domain-PD), ezáltal befolyásolva a csatorna kapuzását (8,11) (2. ábra). Korábbi kutatások bemutatták, hogy a TRP csatornák központi csatorna pórusa kettő szakaszra, egy felső és egy alsó kapura különíthető el, melyek közül a felső kapu alkotja a csatorna szelektivitási szűrőjét (8–10). Az intracelluláris régióban található változó hosszúságú és változatos összetételű amino- és karboxil- terminálisok képesek befolyásolni a csatornák különböző funkcionális és kapuzási tulajdonságait. Ezek jellemző motívumai lehetnek például a C-terminális régióban megjelenő TRP-box és prolin- gazdag régiók, vagy az N terminális régióban jelen lévő ankirin ismétlődések (4).



2. ábra: TRP csatornák általános felépítése.

VSD- feszültség szenzor domén (voltage-sensing domain), PD- pórus domén (pore domain)

Expressziójukat tekintve a TRP csatornák szinte minden sejtípusban kifejeződnek, ingerlékeny és nem ingerlékeny sejtekben egyaránt. A TRP csatornák jelen vannak majdnem minden sejtalkotó membránban, így a mitokondriumok, endoszómák, lizoszómák és más egyéb sejten belüli organellek működését és funkcióját is befolyásolják (12). A legtöbb TRP csatorna nem-szelektív kation csatorna, és alapvető szerepük van a Ca^{2+} és Mg^{2+} transzportjában. Kimondottan magas Ca^{2+} ion szelektivitás csak a TRPV5-t és a TRPV6-t jellemzi (13), míg a TRPM4 és TRPM5 a Ca^{2+} ionokra gyakorlatilag nem permeábilis. A csatornák kapuzása igen változatos, számos endogén és exogén ligand kötődése, illetve különböző környezeti változások képesek aktiválni, nyitni őket. Ilyen környezeti tényezők például a feszültség, az ozmolaritás vagy a hőmérséklet változása. Az aktivált, azaz nyitott állapotú TRP csatorna Ca^{2+} belépését teszi lehetővé és depolarizálja a sejtmembránt, melynek hatására más feszültségfüggő ioncsatornák nyílhatnak meg, mely az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció további változásához vezethet. A TRP csatornákról elmondható, hogy számos fiziológiai folyamat kialakulásához és transzdukciójához hozzájárulnak, így például szerepet játszanak a feromon-, íz-, fájdalom-, és hőmérsékletérzékelésben, számos homeosztatikus folyamat szabályozásában (Ca^{2+} és Mg^{2+} ion reabszorpció és ozmoreguláció), illetve az izom összehúzódás folyamatában is. Számos TRP

csatorna expresszálódik az ízlelőbimbókban, orr- és szájüreg különböző sejtípusain, és az ezeket a területeket beidegző szenzoros idegvégződéseken. Kutatások leírták, hogy a TRPM5 a II típusú ízlelő receptor sejteken nagy számban fejeződik ki és fontos szerepet játszik az ízlelés folyamatában: aktivációja Na^+ ion beáramlást okoz és depolarizációt vált ki, mely nagy mennyiségű ATP neurotranszmitter felszabadulást segíti elő (14). Azon szenzoros TRP csatornák, melyek a vomeronazális epitel sejteken, vagy a vomeronazális szervet beidegző szenzoros neuronokon fejeződnek ki, szerepet játszanak a feromonérzékelés folyamatában. Ilyen csatorna például a TRPC2 és TRPM5 (15). A TRP csatornák egy viszonylag újonnan azonosított szenzoros funkciója a reaktív oxigén gyökök (ROS) érzékelése. A ROS-ök hatással vannak a TRPV1 és a TRPA1 ioncsatornákra (16,17), illetve leírták, hogy az oxidatív stressz hatására keletkező ADP-ribóz pedig a TRPM2 ioncsatornát aktiválja (18).

Emellett, irodalmi adatok alapján, a TRP csatornák egy csoportjáról tudjuk, hogy a környezet ozmolaritás változásaira is érzékenyek. A TRPC, a TRPV és TRPP alcsalád számos tagjáról, illetve TRPM3, TRPM7 és TRPA1 csatornákról bizonyították, hogy mint ozmoszenzorok, érzékelik az ozmotikus változások hatására bekövetkező sejtduzzadás és zsugorodás okozta mechanikai feszülést a sejtmembránban, mely során mint mechano-szenzitív csatornák aktiválódnak, és növelik az intracelluláris Ca^{2+} szintet (19).

Más TRP csatornák, úgy, mint a TRPV1, TRPA1 és a TRPM8, kimondottan fontos szerepet játszanak a bőr, és különböző nyálkahártyák kémiai érzékenységében. Ezen csatornák nagyrészt szenzoros neuronokon és az orr-és szájüreg epitelsejtjein expresszálódnak, ahol különböző kémiai irritáló anyagok, úgy mint a kapszaicin, mustár olaj, fokhagyma, fahéjaldehid, és mentol elfogyasztása során, kellemetlen érzés kialakulását okozzák (20). Az irritáló hatású anyagok mellett, számos állati eredetű méreganyagról, úgy, mint például különböző skorpió és pók toxinról leírták, hogy képesek aktiválni, gátolni, vagy éppen potenciózni a TRPV1 által mediált áramokat,

vagy befolyásolni az ioncsatorna működését (21–25). Mivel a TRPV1 fontos szerepet játszik különböző fájdalmas ingerek transzdukciójában, így ezen toxinok hatással vannak a TRPV1 által mediált fájdalom érzésre is. Sőt mi több, nem csak a TRPV1-ről, de számos más TRP csatornáról is bebizonyították, hogy esszenciális szerepük van a fájdalom érzékelésébe. Ezen fájdalomérzékeny TRP csatornák, úgy mint a TRPA1 és a TRPM3, főleg a bőrt beidegző A δ - és C- szenzoros idegrostok végződésein fejeződnek ki, és szerepet játszanak különböző fájdalmas ingerek transzdukciójában (26).

Az irritáló kémiai anyagok és különböző toxinok mellett a TRP csatornák családjának számos tagját a hőmérséklet változása is aktiválhatja, mely csatornákat a hőérzékeny TRP csatornák csoportjába soroljuk. Azokat a TRP csatornákat tekintjük hőérzékenynek, amelyeken az átfolyó áram nagysága hőmérsékletváltozás hatására meredeken változik. Ezen hőmérsékleti stimulusra adott válaszok erősege a Q_{10} értékkel jellemezhető, mely megadja az ioncsatorna által mediált áram amplitúdójában bekövetkező relatív változás értékét, ha a hőmérséklet 10 °C-kal nő. Ugyan a Q_{10} értékek nagyban függhetnek a kísérletes és sejtes körülményektől, azonban a minimális Q_{10} értékeket hideg érzékeny TRP csatornáknál kevesebb, mint 0,2 értéknek, míg meleg érzékeny TRP csatornák esetében magasabb, mint 5 értéknek állapították meg. A fentebb bemutatott kritérium alapján, eddig legalább 11 emlős TRP csatornáról írták le, hogy hűtés vagy melegítés hatására valamilyen hőmérséklet tartományban jelentősen nő permeabilitása, Q_{10} értékük pedig >5 vagy $<0,2$. A TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5 ioncsatornák sorolhatóak a meleg érzékeny TRP csatornák közé, míg a TRPM8, TRPA1 és TRPC5 ioncsatornák a hideg érzékeny TRP csatornák csoportját alkotják. A fent felsorolt TRP csatornák egy része, a szenzoros neuronok idegvégződésein kifejeződve, központi szerepet játszik a hőmérséklet érzékelésében. A TRPM2-nek szerepe van a neutrális meleg érzékelésben, a TRPV1 és TRPM3 csatornákról kimutatták, hogy a fájdalmas meleg hőmérséklet, míg a TRPM8 a (hűsítő)

hideg, illetve TRPA1 a fájdalmasan hideg hőmérséklet hatására kialakuló szenzoros érzetek kialakulásában játszik fontos szerepet (27–29).

Szenzoros funkciójuk mellett a TRP csatornák számos egyéb folyamatban is szerepet játszhatnak. Fontos jelentőséggel bírnak például a hasnyálmirigy inzulin szekréciójának szabályozásában. Korábbi kutatások feltárták például, hogy *Trpm5*^{-/-} típusú egerekben jelentősen csökkent a glükóz által kiváltott inzulin szekréció, és csökkent az állatok glükóz toleranciája (30). Mindemellett, a TRP csatornák fontos szerepet játszanak az intracelluláris folyamatok szabályozásában is. Például, a TRPML1 expressziója a lizoszómák és endoszómák felületén, illetve a TRPP2 expressziója az endoplazmatikus retikulum (ER) membrán felületén, lehetővé teszik az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció emelkedését, azáltal, hogy Ca²⁺-ot szabadítanak fel a belső raktárakból (31,32).

Összegzésképpen elmondható, hogy a TRP csatornák megismerése nemcsak az érzékszervi és általános élettani folyamatok megértéséhez járul hozzá, hanem ezen csatornák módosult aktivitása feltételezhetően számos betegség és patológiás állapot (pl. neurdegeneratív betegségek, vesebetegségek, vázrendszeri diszpláziák és különböző fájdalomhoz kötődő szindrómák) kialakulásában is szerepet játszhat. Ezáltal a TRP csatornák potenciális farmakológiai célpontok lehetnek különböző betegségek kezelése során (33–36).

3.2. TRPM3 ioncsatorna bemutatása

3.2.1. Általános jellemzők

Kutatási projektjeink fő célpontja, a kevésbé karakterizált termoszenzitív TRPM3 ioncsatorna. A TRPM3 fehérjét kódoló gén emberben a 9q21.12, míg egérben a 19qb kromoszóma szakaszon helyezkedik el (37,38). A TRPM3 ioncsatorna számos izoformával rendelkezik,

melynek oka, hogy a teljes *Trpm3* génben, 28 exon található és számos alternatív hasítási hellyel rendelkezik (39,40). A különböző izoformák aktivitása, funkciója és ion áteresztő képessége különböző lehet. Az ismert variánsok közül a legelterjedtebben expresszáldó vad típusnak is tekinthető izoforma a TRPM3 α 2, mely Ca²⁺ ionokra is permeábilis (38,41). A különböző izoformák nagyfokú szerkezeti hasonlósága miatt, kihívást jelent specifikus antitestek és primerek tervezése, így a mai napig nem áll rendelkezésünkre információ az összes, különböző sejtípusokban kifejeződő, TRPM3 izoforma eloszlásáról, így a legtöbbjük eltérő élettani szerepe is a mai napig feltáratlan. Mindazonáltal Frühwald és mtsai., a plexus chorioideus-ban kifejeződő TRPM3 izoformák széleskörű vizsgálata során felfedték, hogy bizonyos izoformák reguláló és- vagy gátló hatással bírnak, más csatorna alegységekre (40).

TRPM3 expresszióját más TRP csatornához hasonlóan, számos különböző sejtípuson kimutatták. Magas szinten expresszáldóik expressziós az agyban és a gerincvelőben, RNS (ribonukleotidsav) és fehérje szinten is, a TRPV1 ioncsatornával átfedésben széleskörűen expresszáldóik szenzoros neuronokon, RNS, fehérje és funkcionális szinten egyaránt, illetve a hipofízis sejtjein is kimutatták a jelenlétét RNS szinten. Kifejeződését más, nem neurális sejteken is leírták, RNS és fehérjeszinten expresszáldóik a szemben, a vese, a here és a zsírszövet sejtjeiben. Mindemellett megtalálható az inzulintermelő β -sejteken, spermium sejtekben, petesejtben, a szív, erek és vese sejtjeiben is (28,37,42–44).

3.2.2. TRPM3 funkcionális jellemzői

A TRPM3 a TRP ioncsatornák melasztatin alcsaládjának Ca²⁺ permeábilis, nem-szelektív, feszültség érzékeny tagja. (38,39). A csatorna egyértékű (monovalens) és kétértékű (divalens) kationokra, úgy mint a Ca²⁺ és Mg²⁺, Zn²⁺, egyaránt permeábilis. Ugyanakkor az extracelluláris monovalens kationok, az intracelluláris Mg²⁺ és a pórus blokkoló La³⁺ gátolják a működését (38).

A TRPM3 ioncsatorna stimulációja és aktiválódása, egy kifelé rektifikáló áram megjelenését okozza a TRPM3-at expresszáló sejtekben. A TRPM3 ioncsatorna érzékeny az ozmolaritás változására, hipotóniás sejtduzzadás hatására a csatorna aktiválódik. Az elmúlt években kollaborációs partnereink a Leuveni Katolikus egyetemen, bemutatták, hogy a TRPM3 ioncsatorna Q_{10} értéke 5-nél magasabb, vagyis a meleg ingerekre aktiválódó hőérzékeny TRP csatornák közé tartozik, elsősorban a fájdalmas meleg hőmérsékleti tartományban. A szenzoros neuronokon kifejeződve részt vesz a hőmérséklet érzékelésben és a nocicepcióban is. *Trpm3*^{-/-} egereken végzett vizsgálataik rávilágítottak arra, hogy ezekben az állatokban, csökkent a meleg által kiváltott fájdalomérzet, a kémiaileg indukált fájdalom, valamint a gyulladáshoz kapcsolódó termális hiperalgészia is (28). Mindemellett kimutatták, hogy a TRPM3 ioncsatorna, a TRPV1-gyel és TRPA1-gyel együtt felelős a fájdalmas meleg hőmérséklet érzékeléséért (45). Kollaborációs partnereink tárták fel azt is, hogy a TRPM3 egyes ligandjai (CIM0216) és bizonyos ligandok kombinációja (pregnenolon-szulfát + klotrimazol), az ioncsatorna klasszikusnak nevezhető pórusa mellett egy másik, alternatív permeabilitási útvonalat is nyitnak, melyen keresztül a negatív membránpotenciál értékeken jelentősen fokozódik a Na⁺ ionok beáramlása, így jelentősen fokozva a TRPM3 által okozott depolarizációt, ezáltal emelve a TRPM3 által mediált fájdalmas reakciókat (46,47).

3.2.3. TRPM3 farmakológiai jellemzői

3.2.3.1. Aktivátorok

A korábban említett ozmolaritás és hőmérséklet érzékenység mellett a TRPM3-nak számos egyéb kémiai aktivátorát is azonosították az elmúlt években.

3.2.3.1.1. Endogén aktivátorok-

Az első ligand melyről leírták, hogy képes aktiválni a humán TRPM3-at a membránlipidek egy csoportját alkotó szfingolipidek közül került ki. Humán TRPM3-al transzfektált HEK293T sejtekben, FURA-2 alapú mikrofluometriás-Ca²⁺ mérésekkel azonosították, hogy a D-erythro-szfingozin (De-SPH) emeli a sejtek intracelluláris Ca²⁺ szintjét. A strukturálisan hasonló N,N-dimethyl- De-SPH és a dihydro- De-SPH szintén TRPM3 függő módon képes emelni az intracelluláris Ca²⁺ szintet (48). Azonban későbbi, egér Trpm3 izoformán végzett kutatások kimutatták, hogy a DeSPH kis hatásfokú korai aktivációja után megjelenő nagyobb lineáris áramok a nem transzfektált HEK293T sejteken is jelen vannak (42).

A neuroszteroid pregnenolon szulfát (PregS) a TRPM3 ioncsatorna gyors és reverzibilis aktivációját okozza a TRPM3-at overexpresszáló rendszerekben és a csatornát endogén expresszáló natív sejtekben egyaránt (28,42,43,49). Patch-clamp kísérletek során korábbi kutatások rávilágítottak arra, hogy PregS stimuláció hatására a korábban már tárgyalt kifelé rektifikáló áram jelenik meg, a TRPM3-at stabilan overexpresszáló HEK293T sejtekben. A korábbi irodalmi adatok alapján a PregS EC₅₀ értéke ~23 μM (42). A PregS neuroszteroidként jelentős koncentrációban megtalálható a humán vérplazmában (~100-800 nM), azonban olyan fiziológiás és vagy környezeti hatások, melyek annyira megemelnék a plazma PregS szintjét, hogy az befolyásolja a TRPM3 ioncsatorna működését nem ismertek (50). Érdekes módon azonban a hőmérséklet 25°C-ról 37°C-ra való emelése jelentősen fokozza a TRPM3 PregS érzékenységét. A mérési adatok alapján arra lehet következtetni, hogy a fiziológiás PregS koncentráció valószínűleg elég lehet a TRPM3 ioncsatorna aktiválásához 37°C-os testhőmérséklet mellett (28,42,51). A PregS-al szoros rokonságban álló dehidroepandroszteron (DHEA) és DHEA-szulfát csökkent hatékonysággal, de

szintén képes aktiválni a TRPM3-at (42). Számos más, PregS-hez hasonló szteroid analógról is kiderült, hogy hatással van a TRPM3 működésére (52,53).

3.2.3.1.2. Exogén aktivátorok

Az 1-4-dihidripiridin és a nifedipine hasonlóan a PregS-hez gyorsan és reverzibilisen képes aktiválni a TRPM3 ioncsatornát (42). Korábbi kutatások azonosították, hogy a nifedipin és PregS együttes aplikációja során magasabb TRPM3 aktiváció érhető el, mint a ligandok egyedül való alkalmazása során, még a legmagasabban alkalmazható PregS koncentráció esetén is. Ez az eredmény felveti a lehetőségét, hogy a nifedipin és a PregS különböző kötődési hellyel rendelkezik a TRPM3 csatornán (53). Kollaborációs partnereink nemrégiben mutatták be a TRPM3 egy új exogén és ultrapotens aktivátorát a CIM0216-ot, mely önmagában alkalmazva is képes nyitni a korábbi fejezetben már tárgyalt, klasszikus pórus mellett megjelenő alternatív permeabilitási útvonalat (Held et al., 2015).

3.2.3.2. Antagonisták

3.2.3.2.1. Endogén antagonisták

A TRPM3 ioncsatorna aktivitása részben gátlódik bizonyos endogén molekulák hatására, úgy, mint koleszterol, és számos szteroid származékok, mint a progeszteron, dihydrotesztoszteron, pregnenolone, 17-OH-progersteron 21-OH-progesteron és az estradiol (43,54). Mindazonáltal, e molekulák TRPM3 ioncsatornát részlegesen gátló hatásának fiziológias jelentősége még nyitott kérdés.

3.2.3.2.2. Exogén gátlószerek

Különböző, perioxizóma proliferátor-aktivátor receptor γ (PPAR- γ) agonisták, úgy mint a rosiglitazon, troglitazon és pioglitazon, voltak az első exogén molekulák, melyekről

bebizonyosodott, hogy hatékonyan képesek gátolni a PregS által kiváltott TRPM3 által mediált Ca^{2+} beáramlást, TRPM3-at overexpresszáló HEK sejtekben (55). A nem szteroid gyulladáscsökkentők közé tartozó fenamátok, úgy, mint a mefenamin sav, flufenamin sav, meclofenamin sav, tolfenamin sav és DCDPC (4-chloro-2-(3-chloroanilino) benzoic acid), nem szelektív gátlószerei a TRPM3-nak (56). Mindemellett, 5 különböző citrus flavovon származékról, úgy, mint az izozakuranetin, liquiritigenin, naringenin, eriodicyol és hesperitin, bizonyították be, hogy hatékony és a korábbiakkal ellentétben, szelektív inhibitorai a TRPM3 ioncsatornának (57). A felsorolt anyagok, más TRP csatornákkal szemben, nagy specifitást mutattak a rekombináns TRPM3 ioncsatorna felé és gátolták a PregS indukálta Ca^{2+} tranzienseket, egér hátsógyöki ganglionokból (DRG) izolált szenzoros neuronokon is. Az 5 azonosított flavovon származék közül az izozakuranetin és a liquiritigenin bizonyult a leghatásosabbnak. A deoxybeozin ononetin szintén hatásos és szelektív TRPM3 gátlószernek bizonyult (49).

További kutatások leírták, hogy a TRPM3 aktivitása gátolható bizonyos nem specifikus gátlószerekkel, úgy mint a 2-aminoethoxydifenil borát (2-APB) és a háromértékű lantanidok (Gd^{3+} és La^{3+}) (37,39,48). A TRPM3 által mediált transzmembrán áramok szintén gátolhatók TRPM3 specifikus poliklonális antitestekkel és egyéb szintetikus ligandokkal, mint a kalmodulin antagonist W-7, a nemszteroid gyulladáscsökkentő diklofenak és a görcsoldó hatású primidone (43,58–61).

3.2.4. A TRPM3 fiziológiai szerepe, a *Trpm3*^{-/-} egerek tulajdonságai

Az első, TRPM3 ioncsatornához köthető élettani funkcióként leírták, hogy TRPM3 funkcionálisan expresszálódik a pankréász inzulin termelő β -sejteiben, és magas dózisú (50 μM) PregS stimuláció hatására a glükóz indukálta inzulin szekréció fokozódik a β -sejtekben. Ezen felfedezés azt sugallta, hogy a TRPM3 ioncsatorna egy olyan ionotróp szteroid érzékeny receptor,

mely valószínűleg fontos szerepet játszik az endokrin rendszer szteroid és inzulin alapú jelátviteli útvonali között zajló kommunikációban (42). Ugyan a korábbiak előre vetítik a TRPM3 szerepét a normál glükóz indukálta inzulin szekréció szabályozásában, azonban *Trpm3^{-/-}* egereken végzett kísérletek során nem tapasztaltak változást a nyugalmi vércukorszintben, és a hiánya nem okoz fejlődésbeli és metabolikus zavarokat (28). Ettől függetlenül azonban nem zárható ki, hogy a TRPM3 fontos szereppel bír az inzulin szekréció szabályozásában bizonyos patofiziológiás elváltozások során (62).

Későbbi kutatások felfedték a TRPM3 ioncsatorna kémiai- és hőmérséklet-érzékelő szenzor szerepét a szomatoszernzoros rendszerben. Kimutatták azt is, hogy a TRPM3 a fájdalomérzékelő neuronok egy csoportján, a TRPV1 fehérjével viszonylag magas átfedésben, fejeződik ki egerekben. Ez a natív csatorna a heterológ expressziós rendszerekben megismert PregS –aktivált ioncsatornával megegyező farmakológiai és biofizikai tulajdonsággal rendelkezik.

TRPM3 agonisták, mint például a PregS *in vivo* alkalmazása során intraplanáris injekciót követően, a kísérleti állatok nyalogatták és vagy emelgették a beinjektált mancsukat, mely viselkedéses válaszok a fájdalom kialakulását jelzik. A *Trpm3^{-/-}* egerekben a PregS-szenzitív neuronok száma jelentős mértékben lecsökkent, és az *in vivo* kísérletek során tapasztalt fájdalomhoz köthető magatartásformák megjelenése is megszűnt (28). TRPM3 specifikus inhibitorok, mint például az izozakuranetin, hesperetin és primidone *in vivo* alkalmazása során PregS indukálta kémiai fájdalomra adott viselkedéses válaszok szintén szignifikánsan csökkentek a vizsgált egyedekben (49). A fent említett eredmények egyértelműen bizonyítják a TRPM3 kémiai anyagok által kiváltott fájdalomban betöltött szerepét. Mindemellett, a TRPM3 a hőmérséklet emelkedésre is aktiválódik, ezáltal fontos szerepet tölt be a meleg hőmérséklet érzékelésében. Azon meleg hőmérsékletre érzékeny neuronok száma, melyek PregS –ra érzékenyek, de kapszaicinre nem reagálnak, jelentősen lecsökken a *Trpm3^{-/-}* egerekben. A *Trpm3^{-/-}* egereken végzett különböző

in vivo viselkedés tesztek, egyértelműen rávilágítanak arra, hogy a *Trpm3* gén hiányában az egyedek csökkent érzékenységgel reagálnak a hőmérséklet emelkedésére, és jelentősen csökken a forróságot kerülő védekezési reakciójuk. Komplet Freund adjuváns használata esetén a *Trpm3*^{+/+} és *Trpm3*^{-/-} egerek közötti hőmérsékletérzékelésben megnyilvánuló különbség még egyértelműbb. A kezelés után fellépő gyulladáshoz vezető reakció a vad típusú egyedekben jelentősen csökkentette a hőmérséklet emelésére adott viselkedés válaszok reakcióidejét, míg ez a csökkenés a *Trpm3*^{-/-} egyedekben elmaradt (28,46). TRPM3 specifikus inhibitor izozakuranetin *in vivo* farmakológiai gátlás hatása hasonló, mint a *Trpm3* gén kiütése esetében tapasztalt, mindemellett az antagonisták alkalmazása sincs befolyással a testhőmérsékletre (49). Kollaborációs partnereink nemrégiben kimutatták, hogy az akut, fájdalmas hőmérsékleti ingerek érzékeléséhez három TRP csatorna együttes jelenléte szükséges, melyek a TRPM3, TRPV1 és TRPA1. Különböző *in vivo* viselkedés tesztekkel, és sejtes szinten is kimutatták, hogy a fent említett hármas közül, legalább az egyik jelenléte szükséges hogy a szomatomotoros neuronokban fájdalmas meleg hőmérséklet indukálta válaszok alakuljanak ki. A három ioncsatorna teljes genetikai hiánya, illetve farmakológiai gátlása, megszüntette a fájdalmas meleg indukálta válaszokat szenzoros neuronokon, és a bőrt beidegző C és A δ szenzoros idegrostokon, mindemellett az *in vivo* viselkedési tesztek során tapasztalt fájdalmas meleg hőmérséklet indukálta védelmi reakciók szinte teljesen elmaradtak (45,63). Összességében elmondható, hogy a TRPM3 nem csak a kémiai fájdalom érzékelésben, de a (fájdalmas) meleg hőmérséklet érzékelésben is fontos szerepet tölt be.

Mindezek mellett, TRPM3 agonistákkal és antagonistákkal végzett kutatások alapján feltételezhető, a TRPM3 ioncsatorna számos sejtélettani folyamatban (64,65) fontos szereppel bírhat. Ilyenek például az erek összehúzódása, simaizomsejtek proliferációja (58), pupilla összehúzódás (66), csontképződés (67). Az előbb említett élettani és sejtműködésbeli

folyamatokkal kapcsolatos fenotipusos elváltozásokat TRPM3 hiányos egerekben eddig még nem írtak le..

Annak ellenére, hogy még nincs információnk a TRPM3 ioncsatorna kémiai és hőmérséklet érzékelő szerepéhez köthető öröklődő humán betegségről, nemrégiben leírták a *Trpm3* gén 3-as exonján bekövetkező mutáció szerepét örökletes szembetgségben (68). Számos más kutatás is feltárta a *Trpm3* gén mutációjának szerepét más betegségekben is. A *Trpm3* gén-t is magába foglaló 9q21.11-q21.12 kromoszóma szakaszon bekövetkező mutáció, a Kabuki szindróma kialakulásért lehet felelős, mely egy ritka, több szervrendszert érintő betegség, amelyhez jellegzetes arcvonások, a növekedés elmaradása, változó mértékű mentális retardáció, a csontozatban jelentkező rendellenességek és apró termet társul (69). A leggyakoribb és legagresszívabb felnőttkori primer agydaganatban a glioblastoma multiforme-ban (GBM) szenvedő betegekben a TRPM3 RNS szintű expressziója significánsan emelkedett (70), illetve kimutatták az gingivo-bukkális orális laphámsejtes karcinóma egyes eseteiben a *Trpm3* gén módosulásait. (71). Nemrégiben két, a TRPM3 ioncsatornában megjelenő mutáció kóroki szerepét mutatták ki értelmi fogyatékosággal, hypotoniával és epilepsziával együtt járó idegrendszeri rendellenesség eseteiben (72). További kutatások leírták a TRPM3 fentebb említett mutációihoz kötődő funkcionális változásokat, megerősítve a TRPM3 ioncsatorna emberi agyban betöltött fontos szerepét ezzel (73,74).

3.3. Illékony anesztetikumok

Az illékony anesztetikumok (IA-k) a legáltalánosabban használt szerek az általános anesztéziát alkalmazó humán terápiás beavatkozások és állatkísérletek során (75). Az általános anesztézia során alkalmazott anyagok kémiai szerkezetének változatossága legalább annyira szerteágazó, mint az anesztetikumok alkalmazása során megjelenő fiziológiai hatások száma mint

például a fájdalomcsillapítás, befolyásoló hatásuk a tanulás és emlékezés folyamatára, illetve a cardiovascularis és respiratorikus rendszerekre. Azonban minden, az anesztetikumok csoportjába sorolt anyagra jellemző az a hatás, mely során elég magas koncentrációban alkalmazva, visszafordítható eszméletvesztést okoznak emberben, vagy valamilyen magasabb rendű állatban, ekkor azok nem reagálnak fájdalmas ingerekre (76). Ugyan a hatásmechanizmusuk minden részlete a mai napig sem teljesen ismert, de a rendelkezésünkre álló irodalmi adatok alapján elfogadott, hogy a különböző anesztetikumok, az általános anesztézia során kialakuló reverzibilis tudatvesztést elsősorban a központi idegrendszer egyes sejtalkotó fehérjéire, azokon belül is nagy valószínűséggel számos ioncsatornára gyakorolt hatásokon keresztül fejtik ki. A GABA_A receptor és a hyperpolarizáció aktiváló és ciklikus nukleotid kapuzott csatorna 1 (HCN1) (77) aktivációja, egyes K⁺csatornák, úgy, mint a Kv1 és a kétpórusú K⁺ csatornák (K₂P) (78) serkentése és ezáltal a neurális sejtmembrán hyperpolarizációja, illetve az NMDA és nACh receptorok gátlása, egyaránt az illékony anesztetikumok applikációja során bekövetkező eszméletvesztés kialakulásához vezethetnek (76). Az előbb felsoroltak mellett, korábbi kutatások rávilágítottak arra, hogy az illékony anesztetikumok számos más ioncsatorna működését is befolyásolják. Ilyen ioncsatornák például a feszültségfüggő Na⁺, K⁺ és Ca²⁺ csatornák (79,80). Mindemellett az elmúlt években számos kutatás felfedte, hogy az illékony anesztetikumok hatással vannak egyes TRP csatornákra is, mely TRP csatornák szerepét a noci-és pruricepcióban, valamint a hőmérsékletérzékelésben már bemutatták. Ugyan a TRP csatornák közvetlen vagy közvetett szerepe az altatás során kialakuló eszméletvesztésben még kérdéses, azonban azt már több korábbi kutatás is bebizonyította, hogy az IA-k TRP csatornákra kifejtett hatása hozzájárulhat bizonyos anesztetikumok által kiváltott kellemetlen mellékhatások megjelenéséhez. A TRPA1 volt első TRP csatorna, melyről leírták, hogy egyes anesztetikumok, mint pl. az izoflurán, aktiválhatják, ami fokozza a csatorna által modulált fájdalomérzetet és neurogén gyulladást, valamint aktivációja hozzájárulhat az irritáló

hatású anesztetikumok alkalmazását kísérő légúti irritáció kialakulásához (81,82). További kutatások feltárták, hogy a TRPA1 mellett, bizonyos anesztetikumok szenzitizáló és elég nagy koncentrációban alkalmazva, aktiváló hatással bírnak a TRPV1 ioncsatornára is, mely hozzájárulhat, bizonyos betegeknél, az altatásból való ébredés után fellépő fokozott fájdalomérzet kialakulásában (83). Egyes illékony anesztetikumok egy gyors kezdeti aktiváció után tartósan gátolják a hideg érzékeny TRPM8 ioncsatorna működését, mely hozzájárulhat az anesztézia során kialakuló hypotermiához, mint mellékhatásokhoz (84). A halotán és a kloroform klinikailag releváns koncentráció tartományban hatásosan gátolja TRPC5 működését (85). A korábban bemutatott hőérzékeny TRP csatornákkal ellentétben az anesztetikumok és az általunk vizsgált szintén hőérzékeny TRPM3 ioncsatorna kölcsönhatásairól nem rendelkezünk korábban információval.

3.4.Fájdalom és viszketés

A fájdalomkutatás nemzetközi szervezete (International Association for the Study of Pain-IASP) szerint, a fájdalom definíciója a következő: *egy tényleges vagy potenciális szövetkárosodáshoz, vagy ahhoz hasonló folyamathoz társult, kellemetlen érzelmi vagy érzékszervi érzet.* Az alábbi meghatározás nagymértékben megfeleltethető a viszketésnek is, azonban a két jelenség teljes mértékben elkülöníthető mind a szubjektív érzés, mind pedig a hozzá társuló motoros válaszreakciók tekintetében. Számos más tulajdonságukban viszont nagyon hasonlóak. Mindkettő az ártalmas ingerek elleni védelmet szolgálja, és detektálásukban is hasonló neurális mechanizmusok játszanak szerepet, illetve akut és krónikus körülmények között számos páciens életére hatással lehetnek. Éppen ezért nagy szükség van a fájdalom és viszketés molekuláris alapjait

célzó kutatásokra, melyek kiváló lehetőséget teremthetnek a jobb kezelési lehetőségek kifejlesztésére.

A fájdalom és viszketés érzékelésében elsősorban a bőrt és más szerveket beidegző szomatoszenzoros neuronok játszanak főszerepet. Ezen neuronok sejttestjei, ganglionokba tömörülve helyezkednek el egyrészt a gerincvelő mentén, melyeket hátsó gyöki ganglionoknak (DRG) nevezünk, másrészt a koponyaalapon, ahol a trigeminális ganglionokat (TG) alkotják. A TG neuronok szenzoros idegvégződése az arc teljes egészét illetve a fej frontális részét idegzik be, míg a DRG neuronok idegvégződése a test többi részébe nyúlnak el (86,87). Megjegyzendő, hogy a test belső szerveiben fellépő fájdalmat a nervus vagus viszceroszenzoros rostjai is továbbíthatják (88). A DRG és TG neuronok pseudo-unipoláris neuronok, egy axonnal rendelkeznek, ami kétfelé ágazva folytatódik, egyrészt a perifériás szövetek irányába, másrészt pedig DRG neuronok esetében a gerincvelő hátsó szarva felé, míg a TG neuronok centrális terminálisai az agytörzsbe futnak. A periféria felől jövő szenzoros információ kezdeti feldolgozását a gerincvelőben lévő interneuronok kezdik el, mely során a továbbított jel vagy lecseng, vagy pedig a felszálló idegpályákon keresztül továbbítódik a talamuszba, majd az agykéregbe (89), ahol a szenzoros információk további feldolgozása és interpretálása zajlik.

A szomatoszenzoros neuronok többféle szempontból csoportosíthatóak. Érzékenységük alapján megkülönböztethetünk csak termális vagy mechanikai ingerekkel aktiválható unimodális, illetve többféle, hő-, mechanikai és kémiai ingerekkel egyaránt stimulálható polimodális neuronokat. Axonjaik mielinizáltsága alapján megkülönböztethetünk nagy átmérőjű, gyors ingervezetésű, vastagon mielinizált A β rostokat, kis átmérőjű gyors ingervezetésű A δ és velőshüvely nélküli C rostokat, melyek csak erős ingerekkel stimulálhatóak (90). A fájdalom és viszketés érzékelésben szerepet játszó neuronok a nociceptorok illetve pruriceptorok. A fájdalom

érzékelést ugyanis nocicepciónak míg a viszketés érzékelést más szóval pruricepciónak hívjuk (91,92).

3.4.1. Fájdalom

Annak érdekében, hogy a környezetből érkező nociceptív ingerek fájdalomérzéssé alakuljanak, funkcionálisan és stukturálisan is magasan specializált sejtes és molekuláris résztvevők láncszerű működése szükséges, mely rendszer magába foglalja a periférás nociceptív receptorok mellett a felszálló pályarendszert alkotó, a ganglionokon keresztül a gerincvelőbe futó perifériás szenzoros neuronokat és a felszálló központi idegrendszeri pályákat alkotó másodlagos és harmadlagos érző neuronokat, valamint a fájdalmas ingereket feldolgozó központokat és egyéb moduláló elemeket. E rendszert összefoglaló néven fájdalomérzékelő (nociceptív) rendszernek nevezzük. A nocicepcióban szerepet játszó érző neuronokat a mielinizált A δ és velőshüvely nélküli C rostok csoportja alkotja. Az A δ rostok afferensei továbbítják a hőmérsékleti (különösen a hideg) változásokat, kémiai anyagok és mechanikai stimulus okozta akut „gyors” vagy „elsődleges” fájdalmat, míg a C rostok továbbítják, a kémiai anyagok (beleértve a pruritogén anyagokat is), hőmérséklet és mechanikai erő által kiváltott szöveti károsodással járó „lassú” vagy „másodlagos” fájdalmat (92,93). Az alacsony érzékenységű mechanoszenzitív C-rostok, melyek a gyenge érintésre is képesek aktiválódni, fájdalom csillapító hasással is bírnak (94). A fájdalom esetében az intenzitása és időtartama alapján megkülönböztetünk akut és krónikus fájdalmat. Az akut fájdalomról a szövetek károsodása esetében beszélhetünk, csillapítása tüneti kezeléssel elérhető és hossza 3-6 hónapnál nem tart tovább (95), míg krónikus fájdalom esetében az érzés 3-6 hónapnál hosszabb ideje fennáll, mely során a fájdalom érzése lehet konstans, vagy intermittáló (pl migrén) (96).

3.4.2. Viszketés és elkülönülése a fájdalomtól

A tudomány azon kérdésére, hogy a nociceptív rendszer mellett megtalálható-e egy specializált pruriceptív rendszer is, a mai napig számos válasz született. Sokáig elterjedt volt az intenzitás teória, ami szerint a viszketés egy küszöbinger alatti fájdalom érzet, melyet megerősít, Max von Frey híressé vált állítása, miszerint a „*viszketés a fájdalom kistestvére*” (97). Később a microneuroológiai technikák és vizsgálati módszerek fejlődése felfedte, hogy a mielinhüvely nélküli szenzoros rostok két csoportra különíthetők el, melyek egyike a mechanikai és hőérzékeny polimodális C-rostok (PmC- polymodal), illetve a mechanikailag érzéketlen C-rostok (CMi-mechano insensitive) (98,99). Ezen felfedezés nagy hatással volt a viszketés kutatásra, így mikor különböző kutatócsoportok bemutatták, hogy bizonyos pruritogén, például a hisztamin, kezelések hatására bekövetkező viszketés érzet továbbításában kimagasló szerep jut a CMi-rostok aktiválódásának, az felvetette ezen rostok specifitását a viszketés érzékelésében (specifitás teória) (100,101). Más csoportok azonban bemutatták, hogy ezen hisztamin érzékeny CMi-rostok a többi C-idegrosttal együttesen aktiválódnak különböző algogén anyagok hatására is, és fájdalmas érzést továbbítanak (102,103). Ez vezetett a mai napig elfogadott szelektivitás elmélethez, mely feltételezi, hogy a viszketés érzet kialakulásában csak a „viszketés-szelektív”, pruritogén érzékeny noiceptív neuronok aktiválódnak, míg a fájdalom érzet kialakításában a pruritogénekre érzéketlen nociceptív idegpályák és a viszketés érzékeny rostok is aktiválódnak (87,104–106). Azonban, a két érzet molekuláris szétválása, és e kérdés végleges megválaszolása még várat magára. Valószínűsíthető, hogy a jelérzékelésben szerepet játszó specifikus receptorok és továbbító molekulák, neurotranszmitterek szintjén különülnek el egymástól (87,106).

Az elmúlt évek kutatásai feltárták, hogy a viszketés transzdukciójában szerepet játszó molekulák nagy átfedésben vannak a nocicepcióban szerepet játszóakkal. Így például, a TRP

ioncsatornák családjának több tagjáról is leírták, hogy a fájdalom és hőmérséklet érzékelése mellett jelentős szerepük van a viszketés érzéklésében is. Ezen TRP csatornák azonban legtöbbször indirekt módon aktiválódnak, vagyis a pruritogén ligand a saját metabotróp receptorához kötődik, mely másodlagos jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül közvetett módon aktiválja a folyamatban szerepet játszó ioncsatornákat. Elsőként az ismert nociceptív tulajdonságokkal rendelkező hőérzékes TRPV1 és a szintén hőmérséklet érzékes TRPA1 viszketésben betöltött szerepét azonosították mind a hisztamin függő, mind pedig a hisztamin független viszketés kialakulásában (107,108). Az általunk vizsgált TRPM3 ioncsatorna, a korábban tárgyalt TRPV1 és TRPA1 csatornákkal közösen számos szenzoros folyamatban szerepet játszik, azonban a viszketésben betöltött szerepét a korábban még nem vizsgálták.

3.4.3. Viszketés vizsgálata egér modellekben

A humán kísérletekben a viszketés és a fájdalom érzése a szubjektív beszámolók alapján jól elkülöníthető, viszont az állatkísérletekben tapasztalható viselkedéses reakciók alapján nehezen különböztethető meg. Ugyanakkor a viszketés kutatásban mindig is nagy igény volt egy olyan állat viselkedés modell alkalmazására, mely lehetővé teszi a viszketéshez köthető viselkedéses válaszok kvantitatív elemzését. Kuraishi és munkatársai által bemutatott „*nape*” modell volt az első, mely ezt lehetővé. Ebben a modellben az egerek, a tarkóba injektált pruritogén vegyületek hatására, a hátsó lábukkal vakarták a kezelt területet, mely reakció számszerűsíthető és kvantitatív módon értékelhető. Azonban hamar kiderült, hogy fájdalmat keltő anyag, pl kapszaicin kezelés hatására is ugyan ez a hátsó lábbal történő vakarózó válaszreakció figyelhető meg (109). Ismert pruritogén hatású anyag használata esetén viszont a mai napig elfogadott viselkedés modellnek számít a viszketés kutatással foglalkozó kutatók körében. Így továbbra is igény volt egy olyan egér modell kialakítására, mely lehetővé teszi a fájdalomhoz és viszketéshez köthető válaszok elkülönítését,

mely modellt LaMotte és munkatársai mutatták be elsőként (110). Az általuk prezentált „*cheek*” modell, megfelelt annak az elvárt kritériumnak, miszerint egy adott terület pruritogén vagy nociceptív anyaggal való kezelése során, különböző viselkedéses válaszok figyelhetők meg a kezelt egyedeknél. Bemutatták, hogy ha viszketést kiváltó pruritogén anyagot intradermálisan injektálnak az egér pofájába, az az injektált oldalnak megfelelő hátsó lábbal vakarja azt, míg nociceptív anyaggal való kezelés hatására, az egér az azonos oldali első mancsával végez, dörzsölő simító mozdulatokat (**3. ábra**). Később ugyanez a kutató csoport egy másik egér modellt is bemutatott, melynél hasonló módon ugyanazon kezelési területre injektált pruritogén és nociceptív anyagok, különböző viselkedéses válaszokat váltottak ki. Az általuk bemutatott egér „*calf*” modell során, az egerek lábszárába injektálják intradermálisan a megfelelő kezelőanyagot, és a vizsgált egyed a pruritogén anyaggal való kezelés hatására a beinjektált területet harapdálja, míg nociceptív anyag hatására, nyalogatja azt (111).



3. ábra “*Cheek*”modell alkalmazása során megfigyelhető viselkedéses válaszok

Baloldal- Nociceptív anyaggal beinjektált terület azonos oldali elülső manccsal történő dörzsölése (wipe)
Jobboldal- Pruritogén anyaggal beinjektált terület azonos oldali hátsó manccsal történő vakarása (scratch) (110)

4. Célkitűzések

Vizsgálataink során a humán és állatgyógyászatban általánosan elterjedt illékony anesztetikumok TRPM3 ioncsatornára kifejtett hatását, és a TRPM3 ioncsatorna viszketés és fájdalom érzékelésben betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul.

A rekombináns TRPM3-at overexpresszáló HEK293T sejteken és a natív TRPM3-at expresszáló egér hátsógyöki ganglionokból származó szenzoros neuronokon vizsgáltuk a halotán, klorofom, izoflurán és szevoflurán hatását. Kísérleteink során az alábbiakra voltunk kíváncsiak:

1. Más hőérzékeny TRP csatornákhöz hasonlóan, az illékony anesztetikumok fejtenek-e ki valamilyen aktiváló, stimuláló, vagy gátló hatást a TRPM3 ioncsatornára?
2. Az anesztetikumok potenciális hatása változik-e valamilyen módon, a TRPM3 kémiai agonistákkal vagy hőmérséklet által történő aktivációja során?
3. Befolyásolják-e az anesztetikumok a CIM0216 által aktivált, a TRPM3 ioncsatorna alternatív pórusán átfolyó transzmembrán áramokat?
4. A rekombináns TRPM3 ioncsatorna mellett milyen hatást fejtenek ki az illékony anesztetikumok a natív TRPM3-ra?

In vivo viselkedés tesztek mellett, *in vitro* módszerekkel tanulmányoztuk a TRPM3 szerepét a különböző pruritogén anyagok celluláris hatásaiban, *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* egereken, illetve azok trigeminális ganglionjaiból származó szenzoros neuronokon. Kísérleteink során az alábbiakra voltunk kíváncsiak:

1. Más hő és fájdalomérzékelő TRP csatornákhöz hasonlóan van-e szerepe a TRPM3 ioncsatornának a viszketés kialakulásában?
2. Az ismert algogén hatású TRPM3 agonisták indukálnak-e viszketést?
3. A TRPM3 szerepet játszik-e az endogén pruritogén mediátorok hatásában?

5. Anyagok és módszerek

5.1. Alkalmazott kémiai anyagok

Az *in vitro* kísérleteink során, az anesztetikumok kivételével minden kezelőanyagból, a végkoncentrációhoz képest ezerszeres töménységű törzsoldatokat készítettünk DMSO (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) mint oldószer felhasználásával, melyeket használatig -20°C -on tároltunk. A kísérletekhez a törzsoldatokból a sejtek tenyésztő oldatában vagy a mérésekhez kompatibilis extracelluláris mérőoldatban hígítva készítettük el a szükséges végkoncentrációjú munkaoldatokat. Az *in vitro* méréseink során az oldószer koncentrációja minden esetben maximum 0,1% volt, míg kontrollként az önmagában alkalmazott oldószer azonos koncentrációját alkalmaztuk. *In vitro* kísérleteinkhez használt Endothelin-1-et (ET-1) (Merck) frissen oldottuk fel a megfelelő végkoncentrációban. *In vivo* kísérleteink során felhasznált anyagokat minden esetben PBS+7% TWEEN-80 (Merck) oldatban frissen, közvetlenül a kísérlet előtt oldottuk a megfelelő végkoncentrációban. A kísérleteink során kezelőanyagként használt anyagokat az **1. táblázatban** mutatom be.

Anyag neve	Hatás	Forgalmazó cég
Pregnenolone Sulphate (PregS)	TRPM3 agonista	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, Egyesült Államok
Kapszaicin	TRPV1 agonista	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Mustár olaj (Allyl isothiocyanate - AITC)	TRPA1 agonista	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, Egyesült Államok
Fahéjaldehid (Cinnemal aldehyde - CA)	TRPA1 agonista	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, Egyesült Államok
CIM0216	TRPM3 agonista	Tocris Bioscience Bristol, Egyesült Királyság
Hisztamin	Pruritogen	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Szerotonin (5-HT)	Pruritogen	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Endothelin-1 (ET-1)	Pruritogen	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Izozakuranetin (Isok)	TRPM3 antagonista	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Germany
Timol	TRP agonista (stabilizátor)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Kloroform	Illékony anesztetikum	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Halotán	Illékony anesztetikum	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Izoflurán	Illékony anesztetikum	Virbac, Carros, France
Szevoflurán	Illékony anesztetikum	AbbVie Inc., North Chicago, IL, USA
Dimetil szulfoxid (DMSO)	oldószer	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

1. táblázat: Kísérleteinkben alkalmazott kémiai anyagok

5.2. IA-k stabil oldatának készítése és GC/MS ellenőrzése

Az illékony anesztetikumok TRPM3 ioncsatornára gyakorolt hatásainak vizsgálatához a projekt során használt anesztetikumokból a méréseinkhez 10 mM-os törzsoldatokat készítettünk, úgy, hogy a tiszta anesztetikumokat a mérésekhez használt mérő oldatban (Ca^{2+} puffer vagy patch-clamp extracelluláris oldat) oldottuk. A tökéletes oldódás érdekében a törzsoldatokat légmentesen

zárt üveg lombikban egy éjszakán át kevertettük. A kísérletek során, a megfelelő végkoncentrációjú munka oldatokat minden esetben frissen készítettük a 10 mM-os törzsoldatból, amit 45 percen belül felhasználtunk a kísérlethez. 45 perc elteltével új hígítást készítettünk. A 10 mM-os törzsoldatok stabilitását nyitott, szabadon szellőző edényben GC/MS módszer segítségével a DE-ÁOK Igazságügyi Orvostani Intézetének Toxikológiai Laboratóriumában ellenőrizték. A stabilitás ellenőrzéshez a törzsoldatokat a fent leírt módon készítettük el. A gázkromatográfiás mérés során nyitott edényben tárolták az oldatokat, szimulálva a nyitott perfúziós rendszerben történő kísérletes elrendezésünket. A mérési protokoll során a 0., 10., 20., 30., 45.-percben történt minta vétel. Az anesztetikumok azonosítása Agilent 7980B-5977A gázkromatográf-tömegspektrométer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) felhasználásával történt. Az injektált minta térfogata 0,2 µl, az injektor hőmérséklete 250 °C volt. A méréshez J&W DB-35MS UI, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm kapilláris oszlopot használtunk. A specifikus csúcsokhoz tartozó „görbe alatti terület”-et a 0.percben vett minta értékéhez normalizáltuk.

A mérés paraméterei:

Mintázás: split: split arány-> 20:1. GC felfűtési programja: 65°C (2 perc tartási idő), felfűtési sebesség: 50°C/perc 230°C-ra; Interface: 280°C; MS hőmérséklet: 230°C; Ionizáció: EI; Detektálás módja: SCAN.

5.3.Felhasznált állatok

Az *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkhez egyaránt 10-14 hetes egereket használtunk, melyeket konvencionális állatházi körülmények között, 21°C-on, 12 órás világos-sötét ciklusok váltakozása mellett, korlátlan víz és étel hozzáféréssel tartottuk. A projektjeink során használt primer szenzoros TG és DRG neuronokat *Trpm3^{+/+}* (vad típusú - C57Bl6) és C57Bl6 eredetű *Trpm3^{-/-}* egerekből

izoláltuk. Az izoláláshoz vegyesen használtunk hím és nőstény egereket. Az *in vitro* kísérletekhez használt *Trpm3^{+/+}* egerek egy részét, a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet fenntartása alatt működő Kísérleti állatház, illetve *Trpm3^{-/-}* egyedeket és a *Trpm3^{+/+}* állatok másik részét Prof. Thomas Voets által vezetett Ioncsatorna kutató laboratórium (KU Leuven Belgium) által fenntartott állatház biztosította. A pruritogének TRPM3-ra gyakorolt hatásának vizsgálata során alkalmazott „cheek” modell viselkedés tesztekhez, *Trpm3^{-/-}* és *Trpm3^{+/+}* típusú, kizárólag hím állatokat használtunk, melyeket Prof. Thomas Voets által vezetett Ioncsatorna kutató laboratórium (KU Leuven Belgium) által fenntartott állatház biztosította, míg a „nape” modell során, a *Trpm3^{-/-}* és *Trpm3^{+/+}* típusú egyedekből a prof. Rohács Tibor által vezetett kutatócsoportban vegyesen használtak hím és nőstény egyedeket egyaránt. Az *in vivo* viselkedéses állat kísérleteket, a Leuveni Katolikus Egyetem Laboratóriumi Állatetikai Bizottsága (engedélyszám: P021/2018), és a Rutgers New Jersey Medical School Laboratóriumi Állatetikai Bizottsága felügyelte.

5.4. Sejttenyésztés és primer neuron izolálás

Az *in vitro* kísérleteinket HEK293T és mTRPM3 α 2 egér izoformát stabilan overexpresszáló HEK293T (HEK-M3) sejtvonalakon, illetve *Trpm3^{+/+}* egérből izolált primer DRG szenzoros neuronokon- és *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* egerekből egyaránt izolált primer TG szenzoros neuronokon végeztük.

5.4.1. HEK293T sejtek

A kontrollként használt „üres” HEK293T és a mTRPM3 α 2-t stabilan overexpresszáló HEK-M3 sejtvonalat Prof. Thomas Voets (Ioncsatorna kutató laboratórium (KU Leuven Belgium)) bocsátotta rendelkezésünkre. A HEK-M3 sejtvonalat Flp-In transzfekciós rendszer segítségével

hozták létre (Vriens és mtsai, 2011). A sejtvonalakat 37°C-on 5% CO₂ tartalom mellett termosztátban tenyésztették, endotoxin mentes DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tápoldatban. A tápoldatot 10% főtális borjúsavóval (FBS- Thermo Fisher), 50 IU/ml Penicillin (Merck), 50 µg/ml Streptomycin (Merck), 25 mg/ml L-glutamint (Thermo Fisher) és megfelelő mennyiségű 10x koncentrációjú nem esszenciális aminosav oldat (Thermo Fisher) hozzáadásával készítették. A HEK-M3 sejtek médiumát szelekciós antibiotikumként 200 µg/ml Hygromycinnel (Thermo Fisher) egészítették ki. A sejtenyészeteket 70-80%-os konfluencia elérésekor passzáltuk tovább kísérletre 0,25% tripszin tartalmú oldat felhasználásával. A HEK293T és HEK-M3 sejtvonalakon végzett kísérletek során a sejteket minden esetben poly-L-lizin HBr-al (Merck) kezelt, az adott kísérlettel kompatibilis mérő edénybe szélesztették.

5.4.2. TG és DRG neuronok izolálása

Az anesztetikumok vizsgálatához izolált szenzoros neuronokat *Trpm3*^{+/+} egerek hátsógyöki ganglionjaiból, míg a pruritogének vizsgálatához *Trpm3*^{+/+} és *Trpm3*^{-/-} egerek trigeminális ganglionjaiból izoláltuk enzimatikus módon. A neuronok izolálása során hím és nőstény egereket vegyesen használtunk. A DRG neuronok izolálása során az egereket CO₂ gáz felhasználásával termináltuk, míg a TG neuronok izolálása során cervicalis dislocatio-t alkalmaztunk. DRG neuronok izolálása során az állatok alkoholos fertőtlenítése után, az egerek hasán ejtett bemetszésnél körbe vágtuk a bőrt, melyet a fej felé húzva eltávolítottunk. A fejet a törzstől elválasztottuk és az egerek gerincét megtisztítottuk az izmoktól és egyéb kötőszövetektől. Ezt követően hajlított végű csipesz segítségével, egyesével letördeltük a gerinccsatornát fedő csigolya ívet, mely során láthatóvá válik a gerincvelő. Felnőtt állat esetében az utolsó kiperarálható DRG-k: az L4-es, illetve L5-ös csigolyánál találhatóak. A csigolyák letördelése után, mikrosebészeti olló és neuron megfogására alkalmas normálvégű, egyenes (Dumont #5.) csipesz segítségével

kiszedtük a ganglionokat, ügyelve arra, hogy az idegrostokat minél jobban eltávolítsuk, elkerülve, hogy a sejt izolátum sok axon törmelékot tartalmazzon. A TG neuronok izolálása során az állatok alkohollal fertőtlenítettük a terminálását követően, majd a fejet a törzstől eltávolítottuk, a fejről a bőrt az orr irányába lehúztuk, a koponyát megtisztítottuk az izmoktól és egyéb szövetektől. Az öreglyuknál tompa végű olló segítségével történt bemetszésekkel a koponyatetőt eltávolítottuk. Az agy – a látóidegek átmetszését követő - eltávolítása után a TG hozzáférhetővé válik.. Mikrosebészeti olló segítségével az idegrostokat elmetstettük és neuron megfogására alkalmas normálvégű, egyenes (Dumont #5.) csipesz segítségével a ganglionokat kiemeltük a koponyából. A kiemelt DRG-kat és TG-kat a preparálás során végig jégen tartott, NeuroBasal medium (Thermo Fisher) + 10% FBS + P/S (Merck) oldatba gyűjtöttük. Az állatok terminálását követően, legkésőbb 30 perccel megkezdjük a neuronok enzimátikus emésztését, 2 mg/ml collagenase (Tocris Bioscience, Bristol, UK) és 2,5 mg/ml dispase (Tocris) tartalmú oldatban, lezárt eppendorfban, vízfürdő kád segítségével, 37°C-on 40 percig. Az enzimátikus emésztést követően, az enzimés oldatot eltávolítottuk és háromszor átmostuk a sejteket neuron tenyésztő oldat (NeuroBasal (Thermo Fisher) + 10% FBS + P/S (Merck)) segítségével. Ezt követően a ganglionokat csökkenő átmérőjű orvosi fecskendőtűk (18G-> 20G-> 22G-> 26G) használatával egyedi sejtekre bontottuk. A DRG neuronokat a sejtizolálást követően poly-L-lysine HBr (Merck) kezelt üvegaljú petri csészére (MaTek, Ashland, MA, USA) szélesztettük és 10% FBS, 2% B-27-el (Thermo Fisher), 2 mM L-glutaminnal (Thermo Fisher), 100 µg/ml P/S-el (Merck) és 100 ng/ml β-NGF-el (PeproTech, London, UK) kiegészített NeuroBasal médiumban (Thermo Fisher) tenyésztettük 37°C 5% CO₂ jelenlétében. A TG neuronokat a sejtizolálást követően poly-L-ornitin (Merck) és laminin (Thermo Fisher) kezelt üvegaljú petri csészére szélesztettük és 10% FBS, 2% B-27-el (Thermo Fisher), 2 mM L-glutaminnal (Thermo Fisher), 100 µg/ml P/S-el (Merck), 2 ng/ml GDNF-el (Thermo Fisher) és 10 ng/ml NT4-el (PeproTech) kiegészített NeuroBasal médiumban

(Thermo Fisher) tenyésztettük 37°C-on 5% CO₂ jelenlétében. Az izolált szenzoros neuron tenyészeteket az izolálás után 24-36 órán belül felhasználtunk kísérlethez.

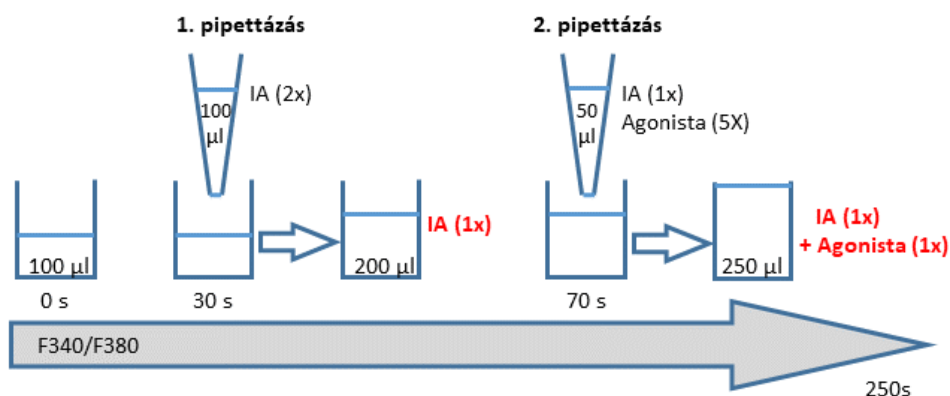
5.5. Intracelluláris Ca²⁺-szint mérés

A projektjeinkhez használt különböző intracelluláris Ca²⁺ mérések kísérletes elrendezése a felhasznált mérőrendszerek és a kísérletes protokollok tekintetében ugyan különböztek, azonban a mérések alapelve minden esetben hasonló. Az intracelluláris Ca²⁺ szint változás méréséhez fluoreszcens Ca²⁺ érzékeny Fluo-4-AM vagy Fura-2-AM (Thermo Fisher) festékeket alkalmaztunk. Közös tulajdonságuk hogy a festékmolekulához kapcsolt acetoxi-metilészter (AM) csoport segítségével képesek átjutni a sejtmembránon a sejt belsejébe, ahol a nem-specifikus észterázok lehasítják a festék molekuláról az AM csoportot, és az így szabaddá váló festékmolekula nem tud kijutni a sejtől, de képes a szabad Ca²⁺-ot megkötni. A Fluo-4-nek szabad Ca²⁺ jelenlétében jelentősen megnő a fluoreszcencia intenzitása, amit a mérés során detektálhatunk (excitáció: 490 nm; emisszió: 520 nm). A Fura-2 festék esetében a Ca²⁺-ot kötött festék molekula gerjesztési maximuma 340 nm, a nem kötött molekuláé 380 nm, míg az emissziója mind a két esetben 510 nm. Így, az emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából következtetni lehet az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció változására.

5.5.1. Ca²⁺ mérés több sejt elrendezése

HEK293T és HEK-M3 sejteket poly-L-lysin-nel kezelt 96 lyukú fekete falú platekbe (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) tenyésztettük 100000 sejt/lyuk sűrűségben normál sejtenyésző médiumban, a mérés előtt 1 napig. A szélesztést követő napon, 2 µM Fura-2-AM festékkel (Thermo Fisher) töltöttük fel a sejteket és 37°C – on 30 percig inkubálva, majd normál Ca²⁺-pufferrel (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM

glükóz xH₂O, 10 mM HEPES, pH=7,4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)) háromszor mostuk a sejteket. Ezt követően a lyukakban 100 µl puffert hagytunk a sejteken. Ezután a méréshez, a sejteket tartalmazó plate-et és az előre elkészített „compound” plate-et, a FlexStation III gépbe (Molecular Devices) helyeztük és Fura-2 festék (Thermo Fisher) esetében 340 és 380 nm gerjesztés mellett a fény emissziót 510 nm-en detektáltuk. Az anesztetikus mérések során alkalmazott protokollt a **4. ábrán** mutatom be. A készülék a compound plate-ről önműködően adagolta a kezelő oldatokat a megadott időpontokban, miközben folyamatosan mértük a fluoreszcenciát 4 másodperces mintavételezési frekvenciával. Az első 30 másodpercben, meghatároztuk az alapvonalat a nyugalmi Ca²⁺ szint mérésével, majd 100 µl térfogatban adtuk hozzá az első kezelőanyagot. A mérés 70. másodpercében újabb 50 µl ben történt a második pipettázás mely során az 1. anyag jelenlétében adtunk TRPM3 agonistát a sejtekre és további 3 percig mértük a fluoreszcencia változását. A compound plate-en, a különböző pipettázásokhoz szükséges kezelő oldatokat úgy állítottuk össze, hogy a plate-en a vizsgált anyagok kívánt végkoncentrációja (1x) állandó maradjon minden pipettázást követően. Más kísérletes protokollok esetében a pipettázások időpontján, a pipettázott oldatok térfogatán, illetve az pipettázások között eltelt inkubációs idő hosszán módosítottunk.



4.ábra Intracelluláris Ca²⁺ mérések Flex Station III pipettázó géppel történő mérésének reprezentatív protokollja

5.5.2. *Hőmérséklet aktivált Ca²⁺ mérés több sejtés elrendezése*

Hogy megvizsgáljuk a project során használt anyagok hatását a TRPM3 ioncsatorna hőmérséklet általi aktivációjára, Q-PCR rendszert (Agilent) használtunk. A HEK-M3 és HEK293T sejteket 2 μ M Fluo-4-AM (Thermo Fisher) festékekkel töltöttük fel és 30 percig 37°C-on inkubáltuk. Tripszin-es (Merck) emésztést követően a sejteket PCR csövekben gyűjtöttük össze 200000 sejt/cső mennyiségben, 200 μ l térfogatban, a kezelő anyagot megfelelő végkoncentrációban tartalmazó Ca²⁺ pufferben. A fluoreszcencia változását Stratagene Mx3005P QPCR készülék (Agilent) használatával végeztük a megfelelő fluoreszcens filtert alkalmazva, a hőmérsékletet 25°C-ról 3°C-onként 46°C-ra emelve.

5.5.3. *Ca²⁺ mérés egysejtés elrendezése*

A szenzoros TG és DRG neuronokat az izolálást követően 35 mm átmérőjű üvegaljú petri csészében (MaTek) tenyésztettük, maximum egy éjszakán át. A mérés előtt 2 μ M Fluo-4-AM vagy Fura-2-AM festékekkel töltöttük fel a sejteket és 30 percig 37°C on inkubáltuk, növekedési faktorokkal kiegészített neuron sejtenyésztő médiumban, majd átfolyó, nyitott perfúziós rendszer segítségével lecseréltük a festéket tartalmazó oldatot, a mérés során használt Ca²⁺ pufferre (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM glükóz, 10 mM HEPES, pH 7,4 (minden Merck)). A méréseket Fluo-4 festék használata esetén Zeiss LSM 5 Live (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) mikroszkóppal végeztük, 488 nm-es gerjesztő lézerrel és 520 nm-en detektáltuk a kibocsátást, míg Fura-2-es mérések esetén MT-10 megvilágító rendszerrel összekötött Olympus fluoreszcens mikroszkópot (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) használtunk és 340 és 380 nm gerjesztés mellett 510 nm detektálva végeztük a méréseket. A kísérleteink során a kezelő oldatokat gravitációs perfúziós rendszer segítségével folyamatosan perfundálva juttattuk a mérésre is szolgáló üveg aljú petri csészébe. A mérések kiértékelése során a sejtenyésztésben a

neuronokat a depolarizáló hatású 25 mM KCl oldatra adott Ca^{2+} válaszaik alapján azonosítottuk és csak a KCl-ra adott gyors intracelluláris Ca^{2+} növekedéssel válaszoló sejteket tekintettük neuronnak és ezeken végeztük el a további analíziseket. Az eredmények bemutatása a Flou-4-el végzett kísérletek esetében F_1/F_0 ahol az F_0 az első kezelő anyag előtt (30 mp időtartamban) mért átlagos alap fluoreszcencia mértéke, mint alapvonal, míg az F_1 az adott időpillanatban tényleges mért fluoreszcencia mértéke. Fura-2-vel végzett kísérletek esetében az eredményeinket pedig F_{340}/F_{380} rációban mutatjuk be, ahol F_{340} a 340 nm hullámhosszon (a Fura-2 Ca^{2+} -ot kötő formájának elnyelési maximuma), míg az F_{380} a 380 nm hullámhosszon (a Fura-2 Ca^{2+} -ot nem kötő formájának elnyelési maximuma) gerjesztett festék fluoreszcencia intenzitása. A kísérleteket minden esetben szobahőmérsékleten (21-26°C) végeztük el.

5.6. Patch Clamp mérések

Az anesztetikumok TRPM3-ra gyakorolt elektrofiziológiai hatásainak vizsgálatát, teljes sejt (whole-cell) elrendezésű patch-clamp kísérletek során végeztük el, Axopatch 1.D erősítő és Clampex 10.2 szoftver (Molecular Devices) segítségével. A HEK-M3 sejteket poli-L-lizin HBr-al kezelt 12 mm átmérőjű üveg fedőlemezekre passzáltuk, majd a sejt kirakás után 2-3 órával letapadt sejteken végeztük el a méréseket. A kísérlet során a külső, ún. „extracelluláris” oldat 150 mM NaCl-ot, 1 mM MgCl_2 -ot, és 10 mM HEPES puffert tartalmazott, pH-ját 7,4-re állítottuk be NaOH-dal. A pipetákban lévő belső, ún. „intracelluláris” oldat 100 mM aszpartátot, 45 mM CsCl-ot, 1,144 mM MgCl_2 -ot, 10 mM HEPES-t, és 10 mM EGTA-t (minden Merck-től) tartalmazott. A pH-ját CsOH-al (VWR, Radnor, PE, USA) 7,2-re állítottuk be, ami megközelítőleg 100 mM Cs-aszpartát végkoncentrációt eredményezett a pipettaoldatban. A Cs^+ -t a minden sejten előforduló kálium csatornák gátlása miatt használtuk. A Cs^+ gátolja a K^+ -csatornákat, viszont a TRPM3 a

többi TRP csatornához hasonlóan permeábilis rá. A mérések előtt a mikropipettákat egy programozható elektróda-húzó (P-2000, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) segítségével boroszilikát üveg kapillárisból készítettük, melyeknek mért ellenállása (pipetta ellenállás) 2–5 M Ω tartományban mozgott. A teljes sejtes konfiguráció létrehozása után, a sejtek kapacitása jellemzően 10 pF körüli értéket mutatott, míg a soros ellenállás 10 M Ω alatt mozgott, melyet 50-70 %-ban kompenzáltunk. A mérési protokollunk során feszültség zár technikát alkalmaztunk, mely során 0 mV tartópotenciál mellett 2 másodpercenként 200 ms hosszú, -150 mV-tól + 150 mV-ig terjedő depolarizációs rámpa alatt mértük a teljes sejtmembránon átfolyó ionáramokat.

5.7.Egér viselkedés tesztek

Különböző pruritogén és algogén anyagok hatását, vad típusú (*Trpm3^{+/+}*) és *Trpm3* génkiütött (*Trpm3^{-/-}*) C57/Bl6 egereken vizsgáltuk *in vivo*, az ún. „*nape*” modell és a „*cheek*” modell alkalmazásával. A „*cheek*” modell lehetővé teszi a fájdalmas és a viszketéses viselkedéses válaszok elkülönítését és kvantitatív jellemzését, míg a „*nape*” modell, csak ismert pruritogén hatású anyagok alkalmazása mellett teszi lehetővé a viszketéses viselkedéses válaszok kvantitatív jellemzését, mivel nociceptív anyag alkalmazása során is egységes, vakarózó viselkedéses válaszok figyelhetők meg az állatoknál (110). A „*cheek*” modell viselkedés tesztekhez használt protokollt Prof. Thomas Voets által vezetett Ioncsatorna kutató központ (KU Leuven Belgium) munkatársaival közösen, Lamotte és munkatársai (2008) által korábban bemutatott módszerének módosításával dolgoztuk át és állítottuk be. A modellhez tartozó kísérleteinket a leuveni laboratóriumban végeztem el. A „*nape*” modellt használó kísérleteket kollaborációs partnerünk, Rohács Tibor által vezetett kutató laboratóriumban, Nawoo Kim PhD hallgató végezte el, a kísérletes elrendezést szintén LaMotte és munkatársai által bemutatott protokoll átdolgozásával

állították be. A „cheek” modellhez tartozó előzetes kísérleteink során, több féle kísérletes elrendezést és injekciós módszert is kipróbáltunk, melyek kvantitatív elemzése során nem tapasztaltunk különbséget az intradermális illetve a szubkután injekciós formák között. Így LaMotte és munkatársai eredeti protokolljához képest, mind a „cheek” modell (5. ábra) mind pedig a „nape” modell (6. ábra) során szubkután injekciókat alkalmaztunk. Mindemellett a két különböző viselkedésszhez használt protokollok, a beinjektált terület kivételével nagyrészt megegyeznek.



5. ábra A “cheek” modell bemutatása

Bal- Állat megtartása injekciózás során/ Középső- Megfigyelő karma / Jobb- Injektálandó terület



6. ábra A “nape” modell bemutatása
Az állat megfogása, az injektálandó terület

A tesztekhez 8-14 hetes korú hím *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* egyedeket használtunk. Az állatokat a kísérletet megelőző 7. naptól, naponta egyszer adaptáltuk a kísérletes körülményekhez, mely magába foglalta az állatok beinjektálásához szükséges megfogást és megtartást, illetve a speciális plexiüveg megfigyelőkamrához való alkalmazkodást (**5.ábra**). A kísérlet előtti 1. napon a „*nape*” modell-hez leborotváltuk a szőrt az állatok tarkójáról, míg a „*cheek*” modell során, az állatok pofájáról. Az *in vivo* viselkedés tesztek során, az egereket az injektálás előtt 10 percig adaptáltuk a kísérletes körülményekhez és rögzítettük a spontán viselkedést videokamera segítségével. A szubkután mikroinjekciókat 1 ml-es Insulin fecskendőhöz rögzített 30G-s orvosi fecskendőtűvel végeztük el. A „*nape*” modell alkalmazása esetében, a pruritogén komponenseket szubkután injektáltuk az egerek előzetesen leborotvált tarkójába, majd az injekciót követően az egereket rögtön visszahelyeztük a megfigyelő kamrába, és ezt követően a pruritogén anyagokra adott viselkedéses válaszokat 30 percig rögzítettük videó kamera segítségével. A felvételek elemzése során a vakarózási események számát két független megfigyelő kvantifikálta. Egy vakarózási esemény egységnek tekintjük azt a teljes időhosszú esemény sort, amikor az állat, valamelyik hátsó lábát felemelve, a mancsával a beinjektált területet vakarja majd végül visszahelyezi a talajra vagy a szájához emeli és nyalogatja azt. A módszer során használt kezelőanyagokat 7% TWEEN-80 (Sigma Aldrich) tartalmú Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes foszfát pufferelt só oldatban (PBS) oldottuk fel és a következő koncentrációban alkalmaztuk: 200 $\mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ hisztamin, 30 $\mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ szerotonin és 250 $\text{ng}/50\ \mu\text{l}$ endothelin-1. A „*cheek*” modell alkalmazása esetén, a kísérlet napján, a kezelő anyagokat, az egerek előzetesen leborotvált pofájába szubkután injektáltuk 10 μl térfogatban. A vizsgálat során használt kezelő anyagok és koncentrációjuk: 10 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ PregS, 10 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ Capsaicin (Tocris), 5 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ CIM0216 (Tocris), 50 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ Histamine (Merck), 10 $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ Serotonin (Abcam, Cambridge, MA, USA), 150 $\text{ng}/10\ \mu\text{l}$ Endothelin-1 (Abcam) melyeket 7% TWEEN-80 (Merck) tartalmú Ca^{2+} és Mg^{2+} mentes foszfát pufferelt só oldatban (PBS) oldottunk

fel. Az egerek spontán viselkedésének videó kamerás rögzítését a kísérlet során, injekció előtt 10 perccel elkezdtük, majd az injekciót követően az egereket rögtön visszahelyeztük a megfigyelő kamrába, és ezt követően a pruritogén és algogén anyagokra adott viselkedéses válaszokat további 30 percig rögzítettük videokamera segítségével. A „cheek” modell eredményeinek elemzése során az egerek által vakarózással töltött teljes időhossz, illetve a vakarózási és fájdalmas reakciókra adott válasz események számát két független megfigyelő kvantifikálta. Egy fájdalmas egységnek tekintünk egy olyan egyedi mozdulatot mely során az állat, kizárólag az azonos oldali első mancsát emelve, a beinjektált területet megérinti, dörzsöli. A megfigyelések során, a viselkedésformák közül elkülönülő harmadik típust nem kvantifikáltuk, mely a tisztálkodás folyamatának tekinthető, és ami során az állat a két mellső mancsával együttesen, a fülek mögül az orr felé induló törölő-simító mozdulatokat tesz. A protokollok általános leírását a **2. táblázat** mutatja be.

-1.hét (naponta)	-1. nap	KÍSÉRLET	Kísérlet után
Az állatok adaptálása a kísérletes körülményekhez (megfogás, kamrába helyezés).	Injektálandó terület leborotválása.	Spontán viselkedéses válaszok rögzítése 10 percig , injekció előtt. Ezt követően 10 µl („cheek”) vagy 50 µl („nape”) kezelendő anyag szubkután injekciója az előzőleg leborotvált területbe. Spontán viselkedéses válaszok rögzítése 30 percig injekció után.	Állatok elaltatása CO ₂ -al CO ₂ kamrában, és ic Ca ²⁺ változás mérésre, TG neuron izolálás.

2. táblázat: A viselkedés tesztek során alkalmazott általános protokoll

5.8. Statisztika

A kísérletes adatok feldolgozását OriginPro 9.0 szoftverrel (OriginLab Corporation, Borthampton, MA, Egyesült Államok) végeztük. A dózis-hatás összefüggések vizsgálatához logisztikus dózishatás görbéket illesztettünk az alábbi egyenlet szerint: $y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p)$, ahol A₁: a minimális válasz értéke (y_{min}), A₂: a maximális válaszártéke (y_{max}), x₀: a

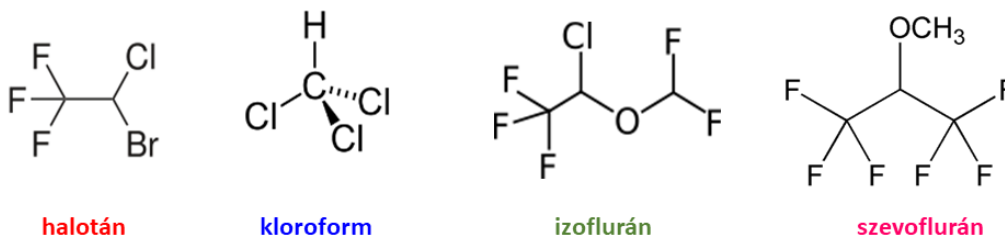
félhatásos koncentráció (EC_{50}/IC_{50}), p : a meredekséget meghatározó számított kitevő. Az y tengelyen a Ca^{2+} jelek amplitúdóját, míg az x tengelyen az alkalmazott anyag koncentrációjának 10-es alapú logaritmusát ábrázoltuk.

A statisztikai analíziseket részben IBM SPSS Statistic 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA), részben OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation) szoftver segítségével végeztük. Az izozakuranetin antagonisták hatásának tesztelésekor az agonista indukált Ca^{2+} szignálokat izozakuranetin jelenlétében és hiányában Student-féle kétoldali t -próbával hasonlítottuk össze. A különböző HEK-M3 sejtek között mért áramok nem kívánt variációinak kiküszöbölésére az IA-k jelenlétében mért TRPM3-áramokat normalizáltuk az ugyanazon a sejten mért agonista által indukált áramokat 100%-nak tekintve. A különböző sejteken mért adatokat Student-féle kétoldali t -tesztelével hasonlítottuk össze. A szenzoros neuronokon rögzített Ca^{2+} jelek esetén - hacsak másképpen nem említjük - a tranziensek amplitúdóját normalizáltuk az agonista 1. alkalmazása által kiváltott tranziensre, amelyet 100% -nak tekintünk. Ezután az adatokat statisztikai elemzésnek vettük alá egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával, hogy összehasonlítsuk az IA-k hatását a kontroll mérések eredményeivel. A csoportátlagok között minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek. *In vivo* viselkedéses kísérleteink során a statisztikai összehasonlításhoz Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Itt is minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek a csoportátlagok között. Az *in vivo* és *in vitro* kísérleteinkhez tartozó adatok, ha másképp nem jelöltük, átlag \pm SD formájában adtuk meg.

6. Eredmények

6.1. Illékony anesztetikumok hatása a TRPM3 ioncsatorna működésére

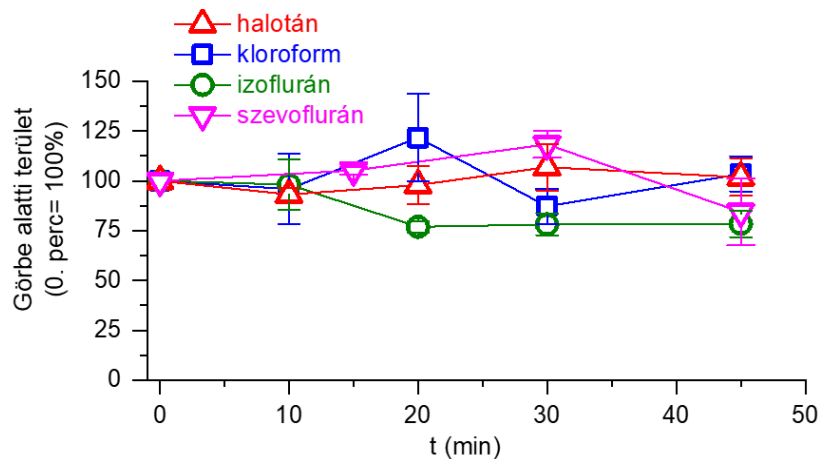
6.1.1. Anesztetikumok stabilitásának vizsgálata



7. ábra: Kísérleteink során felhasznált IA-k kémiai szerkezete

Halotán: trifluor-klór-bróm-etán, kloroform: triklórmétán („történelmi” anesztetikum), izoflurán: halogénezett metil-etil-éter, szevoflurán: halogénezett metil-izopropil-éter

Kísérleteink során különböző kémiai szerkezetű illékony anesztetikumok (IA-k) (7. ábra) TRPM3 ioncsatornára kifejtett hatásait vizsgáltuk. Figyelembe véve az anesztetikumok illékony és lipofil tulajdonságait, az *in vitro* kísérletekhez szükséges vizes alapú stabil oldatok elkészítése kihívást jelentett. Korábbi kutatások azonban kimutatták, hogy 25 °C-on (112) 10 mM vagy az alatti koncentrációban stabil oldat készíthető belőlük. Az általunk készített 10 mM koncentrációjú törzsoldatok stabilitását gázkromatográfiás (GC/MS) mérésekkel vizsgáltuk meg (8. ábra), nyitott, szabadon levegőző rendszerben, ezzel imitálva a szabadlevegőn és perfúziós rendszerekkel végzett kísérletes elrendezéseinket. A GC/MS méréseket dr. Posta János végezte el, a DE-ÁOK Igazságügyi Orvostani Intézetének Toxikológiai Laboratóriumában. A kísérlethez a 10 mM-os törzsoldatokat a módszerek fejezetben bemutatott módon egy nappal a mérések előtt készítettük el. Kísérletes eredményeink azt mutatták, hogy az anesztetikumok 10 mM-os törzsoldatainak a koncentrációja nyitott edényben, 45 perces időtartamon belül szignifikánsan nem változik, ezért a munkaoldatokat minden esetben frissen készítettük a kísérlethez használt megfelelő IA és mérőoldat felhasználásával, a munkaoldatokat pedig 45 percen belül vagy elhasználtuk, vagy lecseréltük frissen készítettre.



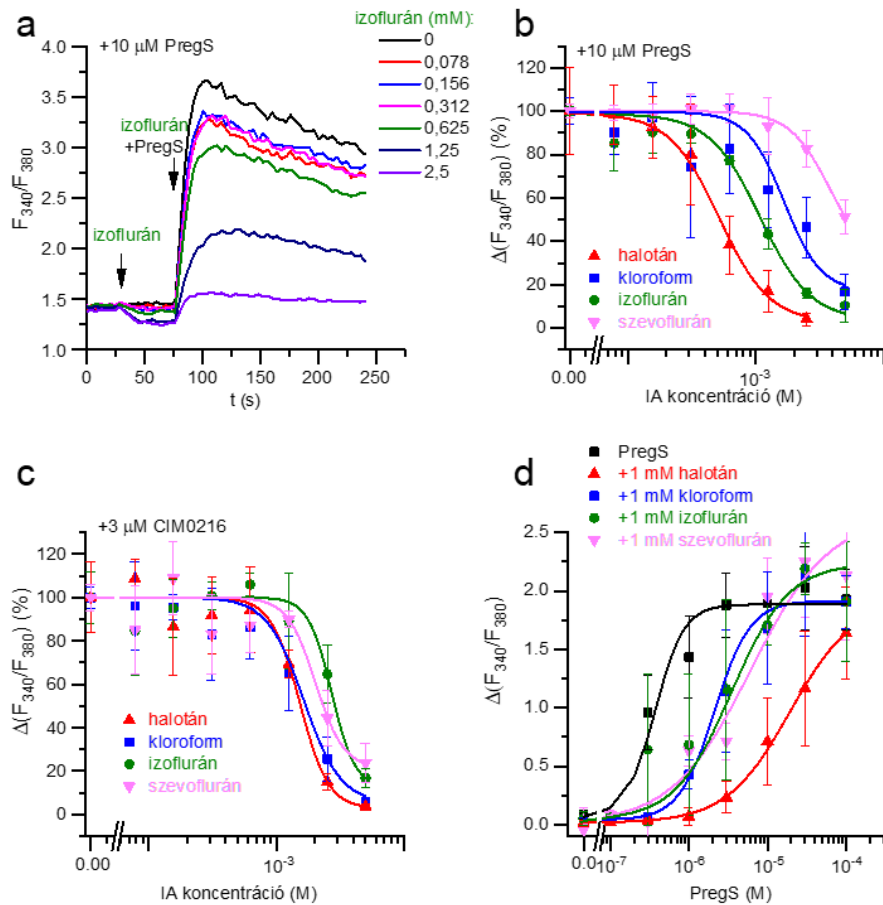
8. ábra: IA-k stabilitásának vizsgálata

A 10 mM törzsoldatok stabilitását nyitott, szabadon szellőző fiolákban a GC/MS módszerrel ellenőriztük a megadott időkeretben, az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint (n = 3 az egyes pontokban).

6.1.2. IA-k hatása a rekombináns TRPM3 kémiai aktivációja

Elsőként az IA-k rekombináns TRPM3-ra kifejtett hatását teszteltük. Intracelluláris Ca^{2+} mérések során IA-k jelenlétében vizsgáltuk a rekombináns TRPM3 kémiai aktivációját HEK-M3 sejteken. Kísérleteink során különböző koncentrációjú IA-kal kezeltük elő a sejteket, majd az anesztetikumok jelenlétében, az endogén agonista PregS vagy az exogén agonista CIM0216 felhasználásával aktiváltuk a TRPM3-at (**9. ábra**). A reprezentatív kísérletes protokollt a **9/a. ábra** mutatja be, mely elrendezés lehetővé tette, hogy egyszerre vizsgáljuk az anesztetikumok potenciális aktiváló és gátló hatását. Eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy az általunk használt anesztetikumok nem aktiválják a rekombináns TRPM3 ioncsatornát, azonban dózis függő módon gátolják az endogén PregS és a potensebb, exogén aktivátor CIM0216 (47) által kiváltott, TRPM3 mediálta Ca^{2+} belépést (**9/b-c. ábra**). Eredményeink bemutatják, hogy az 1 mM koncentrációban alkalmazott IA-k, a 0,1 és 300 μ M-os koncentráció tartományban alkalmazott PregS TRPM3-at aktiváló dózishatásgörbéjét (**9/d. ábra**) és a hozzá tartozó EC_{50} értékeket a magasabb koncentráció tartományok felé tolják el. A különböző IA-k 20 μ M PregS és 3 μ M

CIM2016 jelenlétben mért IC_{50} értékeit (átlag \pm SD) és az 1 mM koncentrációjú IA-k a PregS EC_{50} értékére gyakorolt hatásait az **3.-4. táblázatban** mutatjuk be.



9. ábra: IA-k hatása a rekombináns TRPM3 által mediált $[Ca^{2+}]_i$ jelekre

a) Flex Station III pipettázó automatával felszerelt mikroplate readerrel végzett fluoreszcens Ca^{2+} mérések reprezentatív kísérletes elrendezése. Az Ca^{2+} válaszokat 10 μ M PregS hatására, különböző izoflurán koncentrációk jelenlétében vizsgáltuk. Az IA-kat az agonistával egy időben, és azt megelőzően 30 másodperccel alkalmaztuk (átlagok, n=5 minden alkalmazott koncentráció esetén). **b)** 0-5 mM-ban alkalmazott IA-k dózishatásgörbéje a rekombináns TRPM3 10 μ M PregS általi aktivációjára nézve. A méréseket az (a) panelen látható módon hajtottuk végre. **c)** 0-5 mM-ban alkalmazott IA-k dózishatásgörbéje a rekombináns TRPM3 3 μ M CIM0216 általi aktivációjára nézve. A méréseket az (a) panelen látható módon hajtottuk végre, PregS helyett 3 μ M CIM0216-t alkalmazva. **d)** PregS dózishatás görbéje, 1 mM-ban alkalmazott IA-k jelenlétében és hiányában. A méréseket az (a) panelen látható módon hajtottuk végre, de PregS-t változó koncentrációban, míg a különböző IA-kat 1 mM koncentrációban alkalmaztuk. Az adatokat minden csoportban átlag \pm SD, formájában adtuk meg, n = 5.

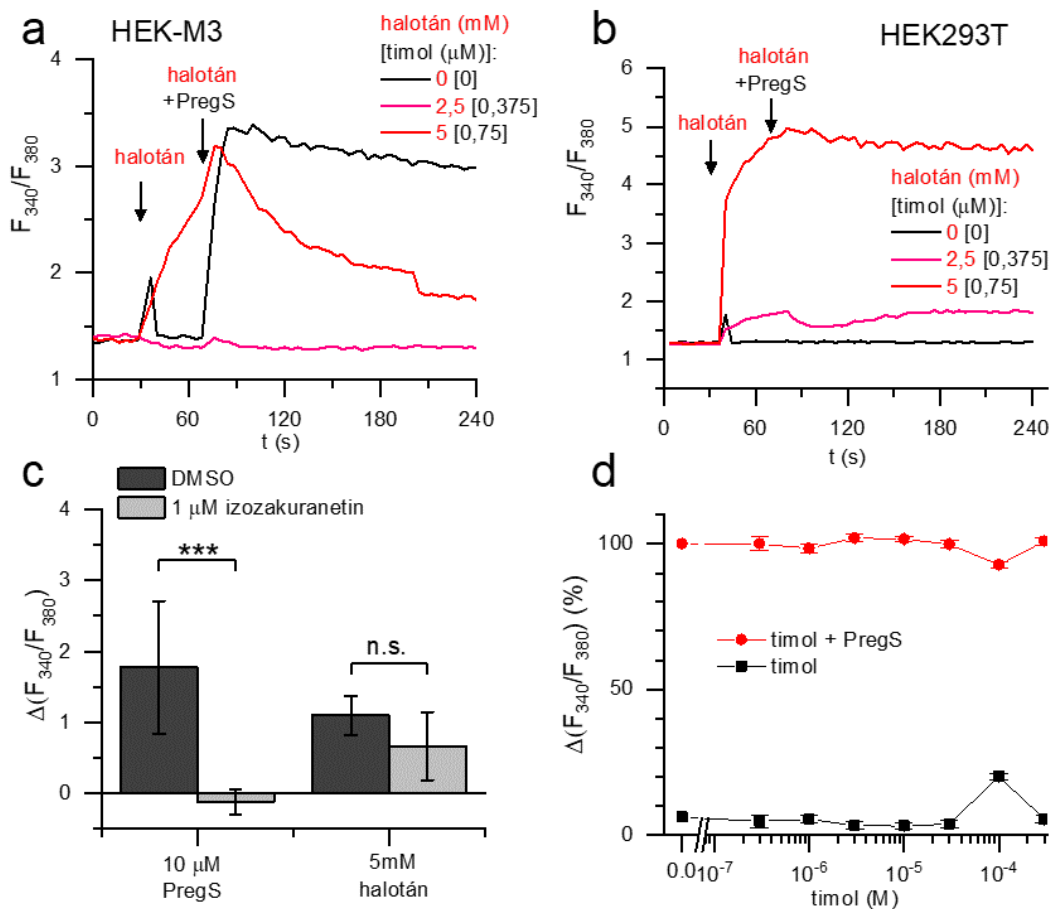
	IC_{50} (10 μ M PregS)	IC_{50} (3 μ M CIM0216)
halotán	0,52 \pm 0,05 mM	1,52 \pm 0,05 mM
kloroform	1,67 \pm 0,03 mM	1,64 \pm 0,25 mM
izoflurán	1,09 \pm 1,49 mM	2,71 \pm 0,88 mM
szevoflurán	3,83 \pm 2,39 mM	2,0 \pm 0,28 mM

3. táblázat: Az IA-k IC_{50} értéke a TRPM3 ionsatorna kémiai aktivátorainak jelenlétében

	EC₅₀ PregS
kontrol	0,37±11 μM
halotán	19,33±4,24 μM (~51x)
kloroform	2,13±0,35 μM (~6x)
izoflurán	3,49±1,3 μM (~8x)
szevoflurán	6,14±6,39 μM (~15x)

4. táblázat: Az 1 mM-ban alkalmazott IA-k hatása a PregS EC₅₀ értékére

Habár kísérleteink során a halotán bizonyult a legpotensebb TRPM3 inhibitornak a vizsgált anesztetikumok közül, 5 mM koncentrációban alkalmazva azonban önmagában is okozott Ca²⁺ tranzienszt. Ez a hatás, kísérletes eredményeink alapján TRPM3 függetlennek tekinthető, miszerint (I) az 5 mM halotán által okozott Ca²⁺ szignálok egyaránt megfigyelhetőek HEK293T és HEK-M3 sejteken is (**10/a-b. ábra**), illetve (II) a halotán által indukált Ca²⁺ jeleket a TRPM3 antagonistá izozakuranetin nem gátolta (**10/c. ábra**). Hogy kizárjuk az alkalmazott oldatok egyéb összetevőinek közvetett vagy közvetlen hatását a natív és TRPM3-at expresszáló HEK293T sejtekben megfigyelt Ca²⁺ jelekre, figyelembe kellett vennünk, hogy az általunk használt és kereskedelmi forgalomban elérhető halotán, stabilizátorként kb. 150 ppm timolt tartalmaz, ami kb 0,75 μM koncentrációjú timol jelenlétét eredményezi az vizsgálataink során alkalmazott legtöményebb (5 mM) halotán tartalmú munkaoldatban. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a timol képes aktiválni TRP ioncsatorna család különböző hőmérséklet érzékeny tagjait, úgy, mint a TRPV3-at (113,114) és a TRPA1-et (115). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a timol potenciális szerepét a halotán által kiváltott válaszokban, kísérleteink során megvizsgáltuk az önmagában alkalmazott timol hatását a TRPM3 ioncsatornára. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a timol, 0,3-tól 300 μM koncentráció tartományban alkalmazva nem aktiválja a TRPM3-t és nem is gátolja a TRPM3 PregS általi kémiai aktivációját sem (**10/d. ábra**).



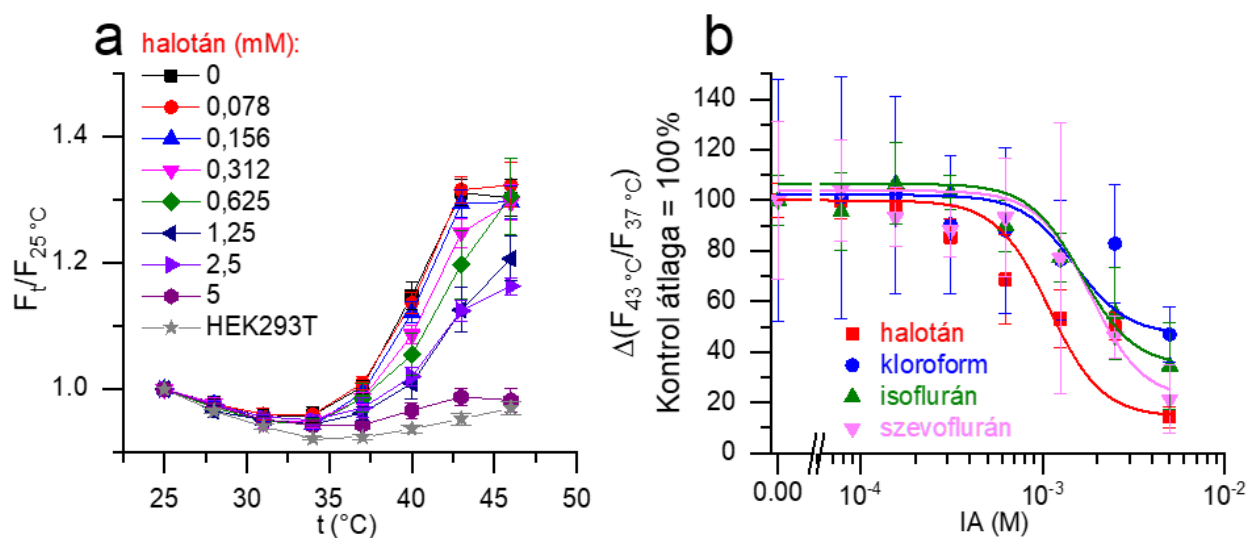
10. ábra: Halotán hatása a HEK-M3 és HEK293T sejteken

a) Halotán által kiváltott Ca^{2+} jelek HEK-M3 sejteken. **b)** Halotán által kiváltott Ca^{2+} jelek HEK293T sejteken. **c)** A PregS (10 μ M) és a halotán (5 mM) által kiváltott Ca^{2+} jelek statisztikai összehasonlítása HEK-M3 sejteken izozakuranetin jelenlétében és hiányában, független mintás Student t-teszt segítségével (** $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$). Az amplitúdót a vegyületek hozzáadása utáni 1. percben mértük. **d)** A timol dózis hatás görbéje 0,3- 300 μ M koncentrációban HEK-M3 sejteken 10 μ M PregS jelenlétében és hiányában. Az adatokat minden csoportban átlag \pm SD, $n = 5$ formájában adtuk meg

6.1.3. IA-k gátló hatása a TRPM3 hőmérséklet általi aktivációjára

Mivel korábbi kutatások kimutatták, hogy a TRPM3 ioncsatorna hőmérséklet érzékeny és szerepet játszik a hőmérséklet által indukált szenzoros folyamatok transzdukciójában, a továbbiakban kíváncsiak voltunk, hogy az általunk vizsgált IA-k hogyan befolyásolják a rekombináns TRPM3 ioncsatorna hőmérséklet általi aktivációját. Kísérleteink során Q-PCR műszer segítségével 3°C-onként emeltük a hőmérsékletet 25°C-ról 46°C-ra, miközben különböző koncentrációjú anesztetikumokkal kezeltük a HEK-M3 sejteket, kontrollként natív HEK293T sejteket használtunk. Eredményeink bemutatják, hogy az általunk használt anesztetikumok,

hasonlóan a TRPM3 kémiai aktivációjánál tapasztaltakhoz, dózisfüggő módon képesek gátolni a TRPM3 ioncsatorna hőmérséklet általi aktivációját (**11. ábra**). Az IA-k a csatorna hőmérséklet általi aktivációjára gyakorolt gátló hatására jellemző IC₅₀ értékeit az **5. táblázat** mutatja be.



11. ábra: IA-k hatása a TRPM3 hőmérséklet általi aktivációjára

a) A TRPM3 aktiváció hőmérséklet függésének vizsgálata Q-PCR készülék használatával, 3°C-os hőlépcsők alkalmazása során 0-5 mM halotán jelenlétében. b) 0-5 mM koncentrációban alkalmazott IA-k dózis-hatásgörbéje a TRPM3 hőmérséklet általi aktivációjára nézve (37 °C-ról 43 °C-ra). Az adatokat minden csoportban átlag ± SD, n = 5 formájában adjuk meg

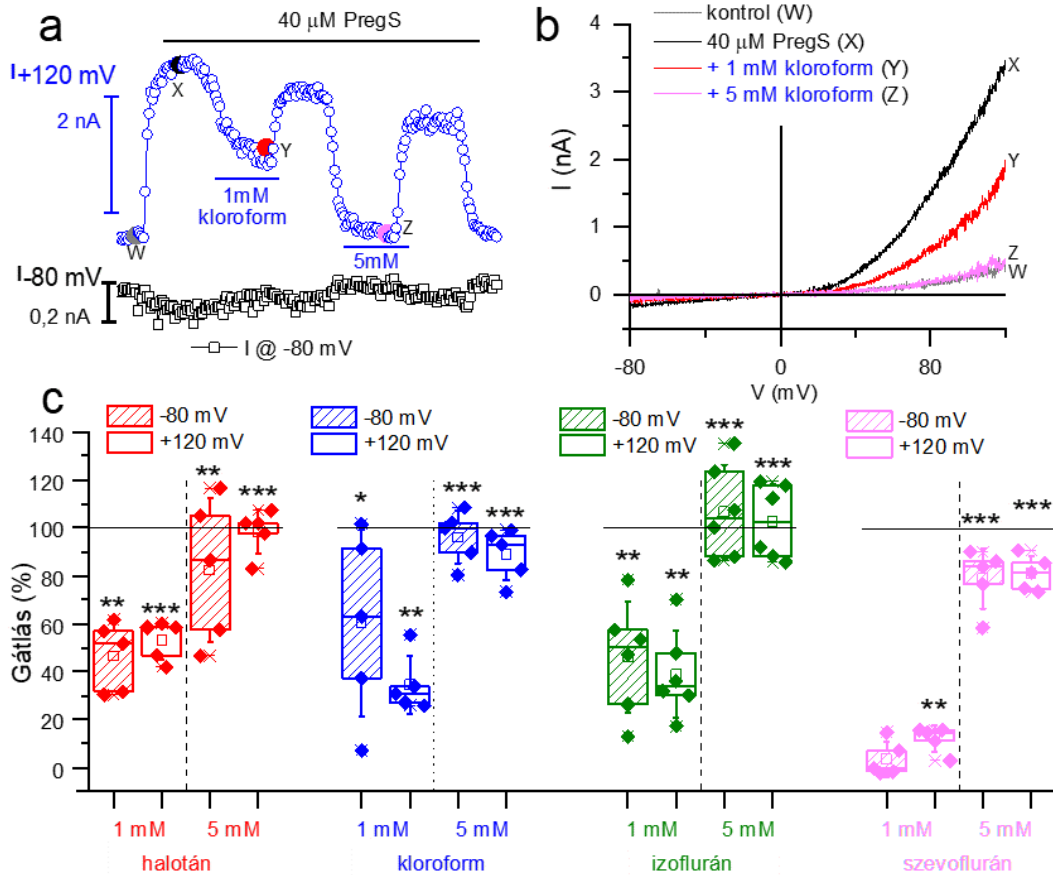
	IC ₅₀
halotán	1,08±0,58 mM
kloroform	1,50±0,63 mM
izoflurán	1,64±0,59 mM
szevoflurán	1,83±0,63 mM

5. táblázat: Anesztikumok IC₅₀ értékei a TRPM3 ioncsatorna hőmérséklet általi aktivációjára

6.1.4. IA-k hatása a TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra

A továbbiakban megvizsgáltuk az anesztikumok hatását a TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra nézve is, teljes sejtes (whole cell) konfigurációjú patch-clamp módszer segítségével. Kísérleteink során, a PregS által aktivált kifelé rektifikáló áramokat, az anesztikumok 1 mM koncentrációban részlegesen, míg 5 mM koncentrációban alkalmazva szinte teljes mértékben gátolták, mely hatások gyorsnak és kimoshatóknak bizonyultak (**12. ábra**). Patch

clamp kísérleteink során, hasonlóan a korábbi $[Ca^{2+}]_{IC}$ méréses kísérleteinkhez, most is a szevoflurán bizonyult a legkevésbé potens gátlószernek, 1 mM koncentrációban csak nagyon kevésel gátolta a PregS aktivált TRPM3 áramokat, azonban 5 mM koncentrációban alkalmazva erőteljesebb, de nem teljes gátlást figyelhettünk meg.



12. ábra: IA-k hatása a PregS-tal kiváltott TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra

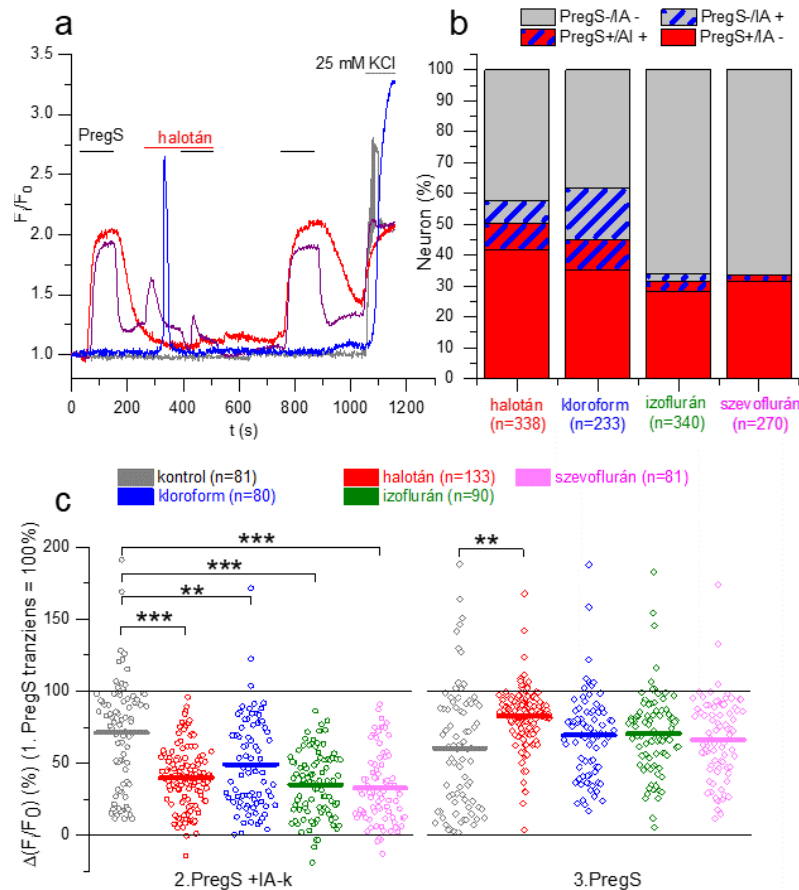
a) 40 μ M PregS által aktivált transzmembrán áramok időbeli változása HEK-M3 sejten +120 és -80 mV-on, teljes sejt konfigurációban, 1 és 5 mM kloroform jelenlétében. Az áramokat 2 másodpercenként -150 és +150 mV közötti feszültség rámpa alatt mértük. (Egy sejten mért reprezentatív eredmény.) **b)** Reprezentatív I/V görbék 1-5 mM kloroform hatásáról a TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra, 40 μ M PregS jelenlétében, az a panelen jelölt időpontokban **c)** Statisztikai elemzés az IA-k gátló hatásáról a PregS által kiváltott TRPM3 által mediált transzmembrán áramokra (n = 5 minden csoportban, kivéve az izofluránt, ahol n = 6). A méréseket az (a) panelen látható módon hajtottuk végre. Az IA-k hatását a PregS IA alkalmazás előtti hatásával hasonlítottuk össze, egy mintás t-tesztel (ahol a kontrol agonista által indukált áramot 100% -nak tekintjük). A négyzetdiagramok a 25 és 75 percentilis közötti tartományt, a vízszintes vonalak a medián értékeket, négyzet alakú szimbólumok az átlagot, a szórás vonalak pedig az SD-t jelölik. *p < 0,05, **p < 0,01 és ***p < 0,001

A CIM0216, a TRPM3 potensebb, exogén aktivátora, a csatorna fő permeabilitási pórusa mellett egy, a TRPM3 feszültség szenzor doménjében található alternatív permeabilitási útvonalat is nyit, melyen negatív membrán potenciál mellett befelé irányuló monovalens kationokra szelektív

6.1.5. IA-k hatása egér hátsógyöki ganglionokból izolált szenzoros neuronokon kifejeződő natív TRPM3 ioncsatornákra

A project folytatásaként egér hátsógyöki ganglionokból izolált szenzoros neuronokon vizsgáltuk az IA-k natív TRPM3 ioncsatornára kifejtett hatásait. Kísérleteink során PregS-tal aktiváltuk a sejteket és fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk az $[Ca^{2+}]_{IC}$ változását 1 mM koncentrációban alkalmazott IA-k jelenlétében és hiányában. A neuronokon végzett $[Ca^{2+}]_{IC}$ mérésekhez használt kísérletes elrendezést a **14/a. ábra** mutatja be, mely során háromszor ismételt 2 percig tartó PregS stimulációt alkalmaztunk, illetve a 2. alkalmazás előtt, 2 perc hosszan és további 2 perc hosszan a 2. PregS alkalmazással egyszerre, 1 mM koncentrációjú (az adott kísérlethez aktuálisan használt) anesztetikummal kezeltük a sejteket. Eredményeink analízise során, a kísérletes protokoll végén alkalmazott 25 mM KCl oldatra depolarizálódó sejteket neuronoknak, illetve a PregS-re (PregS+) válaszoló neuronokat pedig TRPM3-at expresszáló (TRPM3+) neuronoknak tekintettük. Korábbi kutatásokhoz hasonlóan, saját eredményeink is bizonyítják, hogy az illékony anesztetikumok direkt módon aktiválnak egyes szenzoros neuronokat, miszerint a halotán a szenzoros neuronok 15,3%-át aktiválta, míg a kloroform 21%-át, az izoflurán 5,1%-át, a szevoflurán pedig csupán 1,8%-át aktiválta (**14/b. ábra**). Az IA-k által aktivált neuronok aránya a TRPM3+ és TRPM3- neuronokban közel azonosnak adódott, illetve a TRPM3+ neuronok döntő többsége nem aktiválódott az IA kezelés hatására (IA- neuronok) (**14/b. ábra**). Ez az eredmény egyértelműen megerősíti azt a feltételezésünket, miszerint a neuronok IA-k általi aktivációja független a TRPM3 ioncsatornától. Hogy kizárjuk az IA-k által indukált TRPM3 független Ca^{2+} tranziensek hatását, a PregS indukált válaszok analízise során kizárólag a TRPM3+ de IA- neuronokat vizsgáltuk (**14/c. ábra**). Eredményeink bizonyítják, hogy az általunk használt IA-k, 1 mM koncentrációban alkalmazva hatásosan gátolják a PregS által kiváltott TRPM3 által

mediált Ca^{2+} tranzienseket. Az anesztetikumok által keltett gátló hatás 4 perccel az alkalmazásuk után kimoshatónak tekinthető.

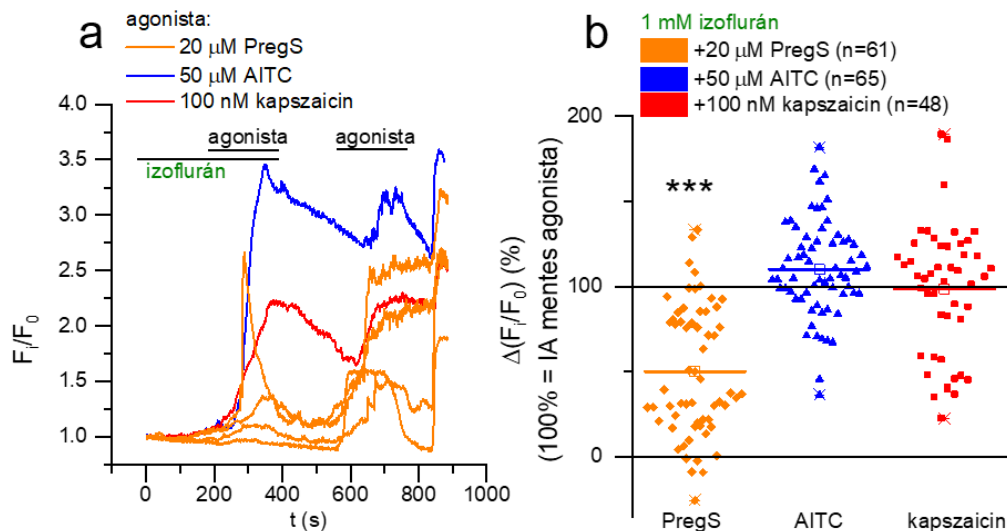


14. ábra: Az IA-k hatása az egér DRG neuronokon kifejeződő natív TRPM3-ra

a) A szenzoros neuronokon végzett fluoreszcens $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ mérések kísérletes elrendezése. Reprezentatív görbék illusztrálják a halotán hatását a DRG-ok szenzoros neuronjain kifejeződő natív TRPM3 ionsatorna működésére. A mérés során $20 \mu\text{M}$ PregS-t, 1 mM halotán illetve ezek kombinációjának az ábrán jelölt időben alkalmaztuk. **b)** $20 \mu\text{M}$ PregS és a különböző 1 mM -ban alkalmazott IA-k által aktivált DRG szenzoros neuronok %-os aránya. A méréseket az (a) panelen bemutatott elrendezésben végeztük. **c)** Statisztikai elemzés a különböző IA-k natív TRPM3-ra gyakorolt hatásáról a PregS+/IA- neuronokon. Az értékeket az első, IA-mentes PregS-indukált Ca^{2+} tranziens százalékában adtuk meg. A pontok az egyes neuronokat képviselik, a vízszintes vonalak pedig az átlagértékeket jelzik. A IA-k hatását egyszempontos ANOVA-t és Dunnett post-hoc tesztet alkalmazva hasonlítottuk össze a vivőanyaggal kezelt kontrolcsoporttal, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ és *** $p < 0,001$

Figyelembe véve a tényt, hogy a TRP csatornák aktivációja depolarizációt okoz a szenzoros neuronokon, feltételezhető, hogy a TRP csatornák aktivációja által keltett Ca^{2+} jelekhez a különböző feszültség függő Ca^{2+} csatornák közvetett aktiválódása is hozzájárulhat. Korábbi kutatások bemutatták, hogy az IA-k gátolják a feszültség függő Ca^{2+} csatornákat (117). Ezt figyelembe véve felmerül az a lehetőség, hogy a feszültség függő Ca^{2+} csatornák gátlása talán

hozzájárulhat az általunk tapasztalt PregS vagy más TRP csatornát aktiváló ligandok által indukált Ca^{2+} jelek gátlásához. Hogy ezt a lehetőséget tanulmányozzuk, megvizsgáltuk, hogy az általunk tesztelt anesztetikumok hatnak e más, szenzoros neuronokon kifejeződő, szintén depolarizáló termoszenzitív TRP csatornák aktiválása során keltett Ca^{2+} szignálokra. Ezen méréseink elvégzéséhez módosítottuk a korábban bemutatott kísérletes elrendezést **(15/a. ábra)**. Mivel a TRPV1 agonista kapszaicin és a TRPA1 agonista AITC hatása alig kimosható, az izoflurán kezelést az 1. agonista előtt és azzal egy időben alkalmaztuk, mely kezeléseket az anesztetikum kimosása után adott 2. agonista kezelésre normalizáltuk. Ha a korábbi feltételezésünk szerint az IA-k gátló hatása részben a feszültség függő Ca^{2+} csatornák gátlásán keresztül érvényesül, akkor várhatóan az izoflurán részben csökkenti más TRP csatornák aktiválódásának hatására kialakuló depolarizáció által kiváltott Ca^{2+} tranzienseket is. Eredményeink cáfolták ezt a teóriát. A kapszaicin és az AITC által kiváltott Ca^{2+} tranziensek amplitúdója nem csökkent izoflurán jelenlétében, míg a PregS által kiváltott Ca^{2+} tranziensek ismét szignifikánsan alacsonyabbak voltak. Az alábbi eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy az IA-k a feszültség függő Ca^{2+} csatornákra kifejtett hatásuktól független módon gátolják a PregS által kiváltott TRPM3 által mediált válaszokat **(15/b. ábra)**.



15. ábra: Az IA-k hatásának vizsgálata hőérzékeny TRP csatornák aktivációjára

a) Egyes hőérzékeny TRP csatorna agonisták hatása a szenzoros neuronok intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjára izoflurán jelenlétében és hiányában. Individuális neuronokon mért reprezentatív eredmények. TRPA1 aktiválására AITC-t, a TRPV1 aktiválása kapszaicint, míg a TRPM3 aktiválásra PregS-t használtunk. **b)** 1 mM izoflurán hatása a PregS, az AITC és a kapszaicin által indukált Ca^{2+} transziensekre. A méréseket az (a) panel szerint végeztük. Az izoflurán hatását összehasonlítottuk az izoflurán nélküli agonista által kiváltott transziensekkel egy mintás t-próbával. A pontok az egyes neuronokat képviselik, a vízszintes vonalak pedig az átlagértékeket jelzik. *** $p < 0,001$

6.2.A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata

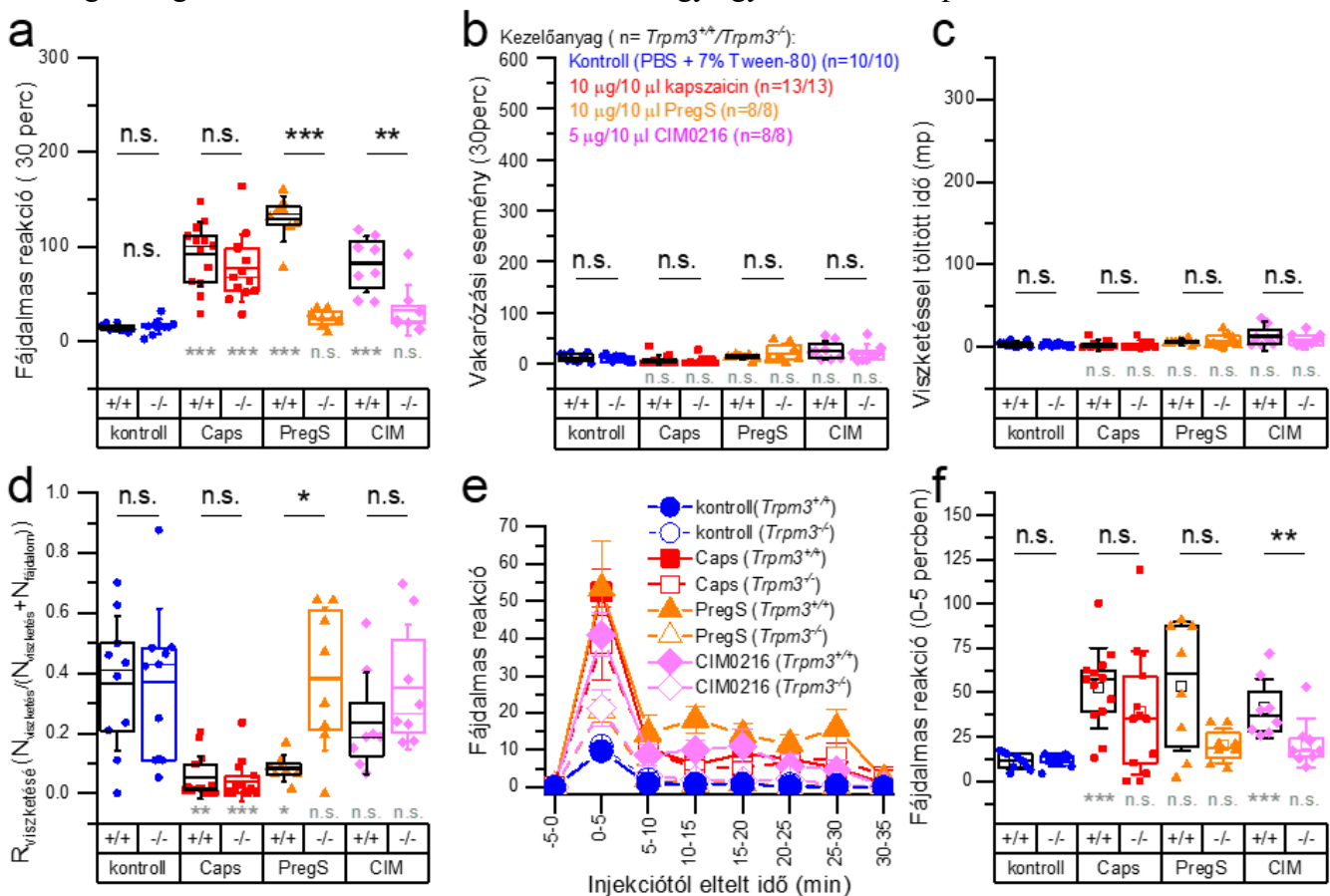
A TRPM3 viszketésben és fájdalomban betöltött szerepét vad típusú (*Trpm3^{+/+}*) és TRPM3 hiányos (*Trpm3^{-/-}*) egereken vizsgáltuk *in vivo* viselkedés vizsgálatokat és izolált primer szenzoros neuronokon végzett *in vitro* kísérleteket során. Az alábbi projekthez tartozó *in vitro* intracelluláris Ca²⁺ mérések egy részét, a Debreceni Egyetemen, míg másik részét, a „cheek” modell alkalmazásával végzett egér viselkedés tesztekkel együtt, kollaborációs partnereinknél Belgiumban a Leuveni Katolikus Egyetemen, Thomas Voets által vezetett Ioncsatorna Kutató Laboratóriumban végeztem el. Eredményeinkben bemutatott „nape” modellt alkalmazó kísérleteket, kollaborációs partnerünkönél, a Rohács Tibor vezette kutató laboratóriumban (Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA), Nawoo Kim PhD hallgató végezte el.

6.2.1. PregS a TRPM3-on keresztül fájdalmat indukál, de viszketést nem

Az általunk használt protokollhoz LaMotte és munkatársai (2008) által, korábban bemutatott módszert vettük alapul. Az apróbb módosításokkal véglegesített protokollt a módszerek fejezetben mutattam be részletesen. A „cheek” modell általunk használt protokolljának beállítását követően, különböző algogén és pruritogén anyagok hatását vizsgáltuk *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* egereken. Korábbi kutatások már bemutatták, hogy mind az endogén TRPM3 aktivátor PregS, mind pedig az exogén agonista CIM0216 fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszokat indukálnak különböző egér modellekben (28,47). Ezért elsőként megvizsgáltuk a PregS és a CIM0216 hatását, a kontrollként használt, ismertén algogén hatású kapszaicinhez illetve a negatív kontrollként használt vivőanyaghoz (PBS+ 7% TWEEN-80) hasonlítva. A „cheek” modellalkalmazása során, a kapszaicin mind a két egér törzsben fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszokat váltott ki, de nem váltott ki viszketéshez köthető válaszokat egyik genotípusban sem. A kontrollként használt vivőanyag se fájdalomhoz, sem pedig viszketéshez köthető válaszokat nem indukált egyik típusú

állatban sem. Kísérletes eredményeink bizonyítják, hogy sem az endogén, sem pedig az exogén TRPM3 agonista nem okozott viszketéshez köthető viselkedéses válaszokat sem a *Trpm3*^{+/+} sem pedig a *Trpm3*^{-/-} állatokban. Emellett, az általunk alkalmazott „cheek” modell megerősítette korábbi kutatások eredményeit, miszerint a PregS és CIM0216 kezelés során egyaránt fájdalomhoz köthető válaszokat tapasztaltunk a *Trpm3*^{+/+} egerekben, mely viselkedéses válaszok a *Trpm3*^{-/-} állatokban elmaradtak (**16/a-b. ábra**). Az, hogy „cheek”modell során a fájdalmas és viszketéses válaszok elkülöníthetőek egymástól, lehetővé tette számunkra egy új, az irodalomban eddig még nem használt paraméter, az ún. „viszketési ráta” ($R_{\text{viszketés}}$) bevezetését, mely segítségével megadható a vizsgált anyagok specificitása a fájdalom-viszketés tengelyén. Számítása során a viszketéses válaszok számát osztjuk, az összes viselkedéses válasz számával (fájdalmas és viszketéses válaszok összege). Az $R_{\text{viszketés}}$ értékek meghatározása során az alacsony (0 vagy ahhoz közeli) $R_{\text{viszketés}}$ érték jelenti a tisztán fájdalomra adott viselkedéses válaszokat, míg a magas (1 vagy ahhoz közeli) $R_{\text{viszketés}}$ értékek a tisztán viszketéshez köthető, de nem fájdalom által kiváltott viselkedéses válaszokat jelölik. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a TRPM3 agonista PregS és CIM0216, a TRPV1 agonista kapszaicinhez hasonlóan, a *Trpm3*^{+/+} állatokban algogén, az-az fájdalomkeltő hatású anyagként viselkedtek (**16/a-b. ábra**), alacsony $R_{\text{viszketés}}$ (**16/c. ábra**) értéket tapasztaltunk. Mindazonáltal, *Trpm3*^{-/-} állatokban, a kapszaicinnal ellentétben, a PregS és CIM0216 által kiváltott fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszok elmaradtak, illetve az $R_{\text{viszketés}}$ értékük 0,5 körülnek adódott, a vivőanyag kontrolhoz hasonló eloszlást mutattak. Eredményeink alapján, érdekes módon, a PregS, a *Trpm3*^{+/+} állatokban valamivel intenzívebb fájdalomra utaló viselkedéses válaszokat indukált, mint a kapszaicin (**16/a. ábra**), azonban eredményeink mélyreható analízise során, arra a következtetésre jutottunk, hogy a kapszaicin, az általunk használt koncentrációban alkalmazva intenzívebb fájdalom érzetet indukálhat az állatokban, mint a PregS vagy a CIM0216. Habár, mind a három agonista által indukált válaszok (a fájdalmas terület törlése)

elérték maximális értéküket az injekciót követő 5. percben, a csúcspont utáni csökkenés az kapszaicinnal kezelt csoport esetében meredekebbnek bizonyult, mint a PregS-el kezelt állatok esetében (16/e-f. ábra). A kapszaicinnal kezelt állatoknál nagy arányban figyeltük meg, hogy a fájdalomra adott, a kísérleti protokoll kritériuma szerint regisztrált viselkedési válaszok (wipe) mellett, más, feltehetően szintén fájdalomhoz köthető viselkedés típusát is produkáltak, mely során az állatok az injektált területet a megfigyelő kamra aljához nyomják, és turo, dörzsölő mozdulatot tesznek a fejükkel vagy letargikus állapotba kerülnek. Az erősebb fájdalomra utaló ezen típusú válaszreakciók a kapszaicinnal kezelt egyedek esetében nagy számban megfigyelhetőek voltak, míg a PregS-el kezelt állatok esetében kevésbé vagy egyáltalán nem tapasztaltuk.



16. ábra: TRPM3 agonisták és kapszaicin okozta viselkedési válaszok a „cheek” modellben

a) Fájdalmas reakciók száma, az injekciót követő 30 percen b) Vakarozási események száma az injekciót követő 30 percen c) Teljes vakarozással töltött idő, az injekciót követő 30 percen d) $R_{\text{viszketés}}$ e) A fájdalmas reakciók eloszlása a megfigyelési idő során 5 perc hosszú intervallumokra osztva. Az ábrákon a pontok jelzik az egyes állatokat, a dobozok 25–75 percentilis tartományt, a vastag és a vékony vonalak a dobozokban az átlagot, illetve a mediánt mutatják, a szórás vonalak pedig a SD-t jelölik. Az azonos genotípusba tartozó csoportokat a vivőanyaggal kezelt

kontroll csoporthoz hasonlítottuk Kruskal-Wallis próbával, és post hoc elemzésként Bonferroni-féle korigált Mann-Whitney U-tesztet használtunk (szürke jelölés), míg az ugyan olyan kezelést kapott *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* állatok összehonlítását Mann-Whitney U-teszt (fekete jelölés) alkalmazásával végeztük. ns: $p > 0,05$ (nem szignifikáns), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

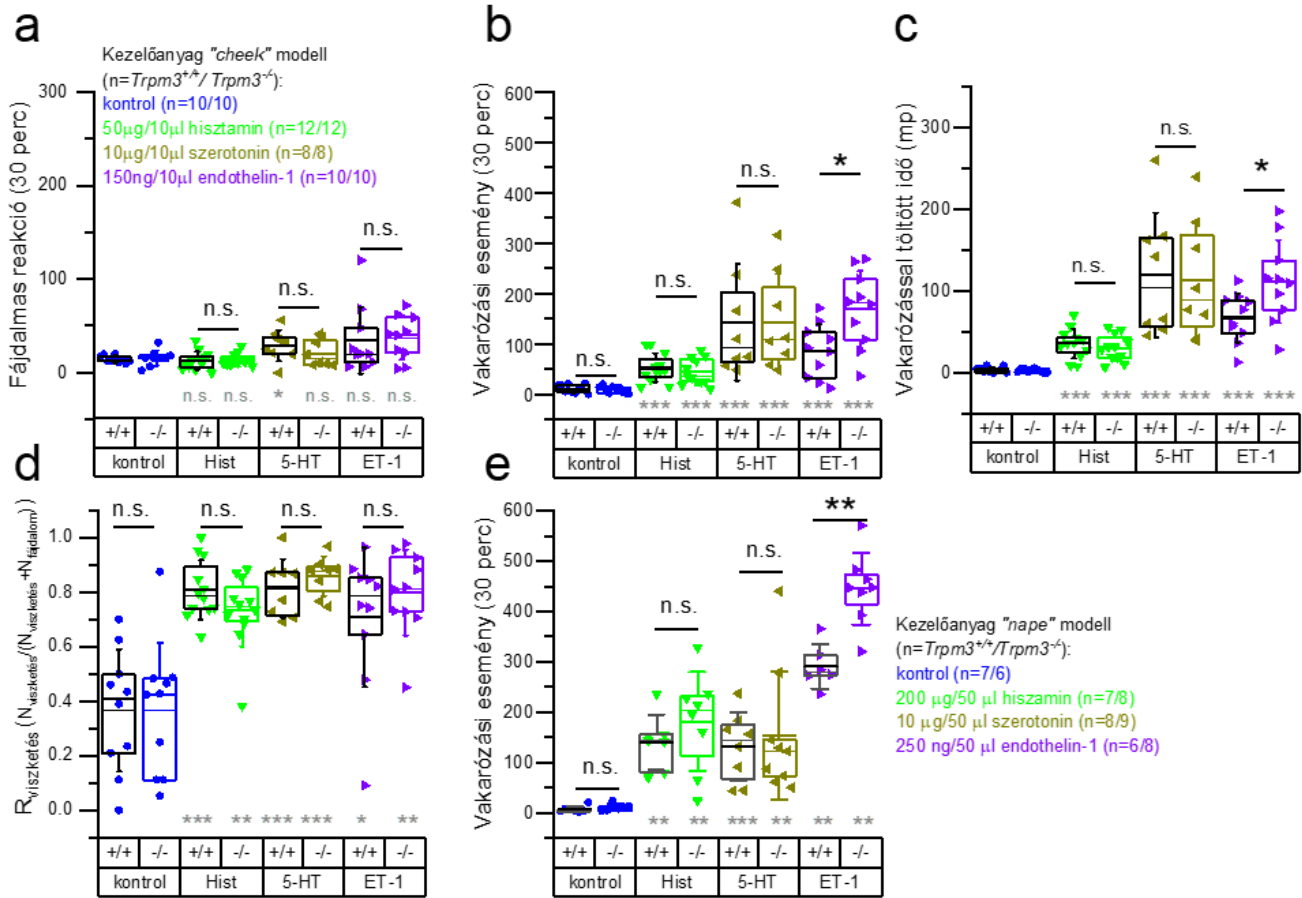
6.2.2. Endogén pruritogén anyagok hatása *Trpm3^{-/-}* állatok viselkedésére

Fentebb bemutatott eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a TRPV1 ioncsatornához hasonlóan, a TRPM3 közvetlen kémiai aktivációja fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszreakciókat vált ki és nem okoz viszketést, azonban ezen eredmények nem zárják ki azt a feltételezést, hogy a TRPM3-nak a TRPV1-hez és TRPA1-hez hasonlóan, közvetett, vagy közvetlen módon, de szerepe lehet a viszketéshez köthető szenzoros folyamatok kialakulásában (108,118). Korábbi kutatások kimutatták, hogy a TRPV1 közvetlen aktivációja fájdalmat okoz és nem viszketést, azonban pruriceptív szenzoros neuronokon expresszáldó TRPV1 szerepet játszik a hisztamin függő és bizonyos hisztamin független pruriceptív ingerek transzdukciójában (118). A továbbiakban, hogy megvizsgáljuk a TRPM3 ioncsatorna pruritogének indukálta viszketésben betöltött potenciális szerepét, *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* állatokon teszteltük a hisztamin és további endogén, nem hisztaminerg pruritogének (szerotonin (5-HT), endothelin-1 (ET-1)) hatását. Ezen anyagok mindegyikéről ismert, hogy viszketést indukálnak, mind emberben, mind pedig egér modellekben egyaránt (119,120).

A „cheek” modell-t alkalmazó kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a hisztamin, 5-HT és ET-1 a *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* állatokban egyaránt viszketést váltott ki, míg fájdalmat nem indukáltak (17/a-b. ábra). A pruritogén anyagok kezelése során megfigyelt fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszok száma nem különbözik a negatív kontrollként használt vivőanyag során tapasztalt fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszok számától, míg a vakarózási események száma, és az állatok vakarózással töltött ideje, mind három vizsgált pruritogén anyag esetében mind két genotípusú állatnál megemelkedett. A hisztamin és az 5-HT esetében a *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}*

állatok esetében a pruritogének által indukált vakarózási válaszreakciók számában nem tapasztaltunk különbséget, azonban érdekes módon az ET-1 által indukált viszketés a *Trpm3*^{-/-} állatok esetében szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a *Trpm3*^{+/+} állatok esetében. Az állatok $R_{\text{viszketés}}$ értékei mind a 3 pruritogén anyag esetében, mindkét genotípusban a skála tetején helyezkednek el, ami alátámasztja az anyagok pruritogén specifitását (**17/d. ábra**).

A fent bemutatott, „cheek” modell alkalmazása során kapott kísérletes eredmények egyértelműen bizonyítják a pruritogén anyagok hatását a trigeminális ganglionok (TG) által beidegzett pofa területén, így következő lépésként megvizsgáltuk a hisztamin, 5-HT, és ET-1 hatását hátsó gyöki ganglionok által beidegzett területen alkalmazott pruritogén kezelések során. Ehhez az egér „nape” modellt alkalmaztuk, mely során a vizsgálni kívánt anyagokat az egerek tarkójába injektáltuk. Ugyan ez az egér modell a viszketéses és fájdalmas viselkedéses válaszreakciók megkülönböztetésére nem alkalmas (mivel mindkettő során ugyanolyan vakarózó válaszreakció tapasztalható), de a „cheek” modellben, az általunk tapasztalt magas $R_{\text{viszketés}}$ értékek és a korábbi kutatások irodalmi adatai tekintetében, a „nape” modell során megfigyelt pruritogének által kiváltott válaszreakciók viszketéshez köthető válaszoknak tekinthetőek (110,111). Eredményeink bizonyítják, hogy a hisztamin és az 5-HT hasonló intenzitású viszketést váltott ki mind a *Trpm3*^{+/+}, mind *Trpm3*^{-/-} egyedekben egyaránt, hasonlóan a „cheek” modellben tapasztaltakhoz. Az ET-1 által kiváltott viszketéshez köthető viselkedéses válaszreakciók a „cheek” modell során tapasztalt viszketéses válaszokhoz hasonlóan a „nape” modell alkalmazása esetén is, szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a *Trpm3*^{-/-} egyedekben, mint a *Trpm3*^{+/+} állatokban (**17/e. ábra**).

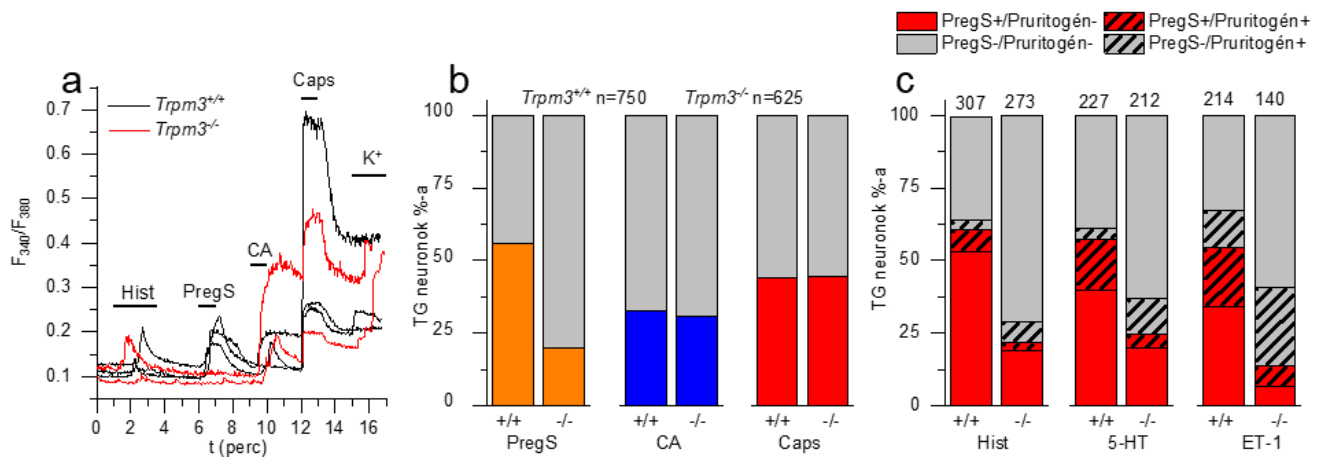


17. ábra: Endogén pruritogén mediátorok okozta viselkedéses válaszok a „cheek” és „nape” modellben
 $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ egerek pófájába szubkután injektáltuk az ábrán jelölt anyagokat a megadott koncentrációban. **a)** Fájdalmas események száma, az injekciót követő 30 percen. **b)** Vakarózási események száma az injekciót követő 30 percen. **c)** Teljes vakarózással töltött idő, az injekciót követő 30 percen. **d)** $R_{viszketés}$. **e)** Vakarózási események száma a „nape” modell alkalmazása során az injekciót követő 30 percen. A pontok jelzik az egyes állatokat, a dobozok 25–75 percentilist, a vastag és a vékony vonalak a dobozokban az átlagot, illetve a mediánt mutatják, a szórás vonalak pedig s SD-t jelölik. Az azonos genotípusba tartozó csoportokat a vivőanyaggal kezelt kontroll csoporthoz hasonlítottuk Kruskal-Wallis próbával, és post hoc elemzésként Bonferroni-féle korigált Mann-Whitney U-tesztet használtunk (szürke jelölés), míg az ugyan olyan kezelést kapott $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ állatok összehonlítását Mann-Whitney U-teszt (fekete jelölés) alkalmazásával végeztük. ns: $p > 0,05$ (nem szignifikáns), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6.2.3. A pruritogének hatása független a natív TRPM3-tól

Hogy megvizsgáljuk a TRPM3 ionsatorna szerepét a pruritogének által indukált celluláris válaszokban, illetve, hogy validáljuk az *in vivo* „cheek” modellhez kapcsolódó eredményeinket, a továbbiakban *in vitro* $[Ca^{2+}]_{IC}$ méréseket végeztünk $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ egerekből izolált szenzoros TG neuronokon, két féle kísérletes elrendezésben. Elsőként, összehasonlítottuk a pruritogén kezelések során válaszoló szenzoros neuronok arányát $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ egerekből

izolált TG neuron kultúrákban. Ezen $[Ca^{2+}]_{IC}$ méréseink során a szenzoros TG neuronokat először vagy hisztaminnal vagy 5-HT-nal vagy ET-1-gyel kezeltük majd a TRPM3 agonista PregS-ot, a TRPA1 agonista fahéj aldehidet (CA-et) és a TRPV1 agonista kapszaicint alkalmaztuk. Egy kísérletben csak egy adott pruritogént és mindhárom TRP agonistát alkalmaztuk a **18/a ábrán** bemutatottak szerint. Kísérleteink során csak azokat a sejteket tekintettük szenzoros neuronoknak és számítottuk bele a későbbi elemzésünkbe, melyek reagáltak a kísérletek végén alkalmazott depolarizáló hatású KCl oldatra vagy a kapszaicinre. A kísérletek eredményét a **18. ábra** foglalja össze. Ahogy az várható volt, a PregS-re reagáló neuronok aránya (PregS+) jelentősen lecsökkent a *Trpm3^{-/-}* egerekből izolált szenzoros TG neuronban, ugyanakkor összhangban korábbi kutatások eredményeivel (28), néhány neuron ezen állatokban is reagált a PregS-ra, mely a TRPM3 ioncsatornától eltérő további célpont jelenlétét feltételezi. A kapszaicinre, és a fahéj aldehidre válaszoló neuronok aránya megegyezett a TRPM3 ioncsatorna jelenlétében és hiányában (**18/b. ábra**). A *Trpm3^{+/+}* állatok PregS+ és PregS- neuronjainak egy kisebb csoportja egyaránt aktiválódott, az általunk alkalmazott pruritogének hatására, mely eredmény azt sugallja, hogy ezen pruritogének hatása független a TRPM3 ioncsatornától. Ezen eredményt alátámasztva, eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a *Trpm3^{+/+}* és a *Trpm3^{-/-}* állatokból izolált szenzoros TG neuronok a hisztaminra (10,7 vs. 9,9%; $\chi^2=0,115$, $p=0,735$), szerotoninra (21,6 vs. 17,0%; $\chi^2=1,489$, $p=0,222$) és endothelin-1-re (33,2 vs. 34,3%; $\chi^2=0,006$, $p=0,939$) hasonló arányban válaszoltak (**18/c. ábra**).



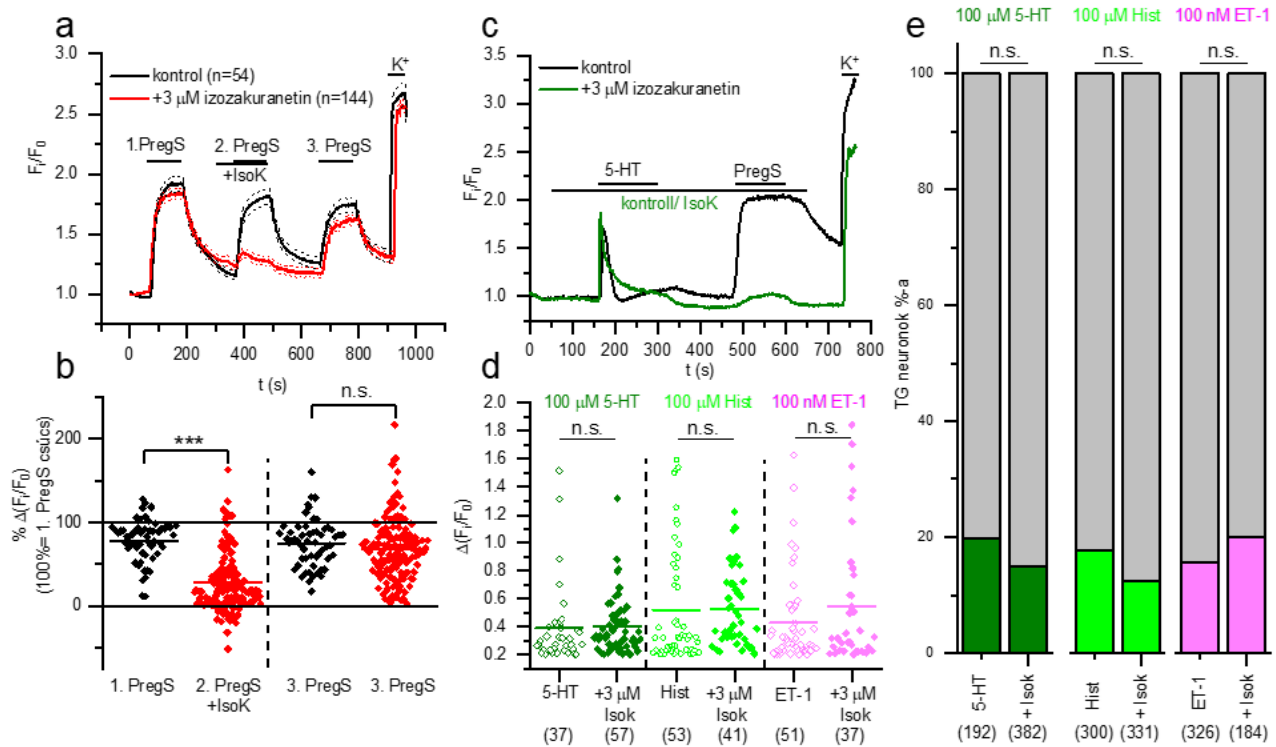
18. ábra: Endogén pruritogén mediátorok hatása $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ egerekből izolált TG szenzoros neuronokon

a) 100 μ M Hist, 20 μ M PregS, 100 μ M CA, 1 μ M Caps hatása az $[Ca^{2+}]_{IC}$ -ra $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ egerek TG neuronjain, reprezentatív sejteken mért eredmények. **b)** PregS (PregS+), CA (CA+) és Caps (Caps+) alkalmazására válaszoló TG neuronok aránya $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ egerekben. A kísérletes elrendezést az **a)** panel mutatja be. **c)** 100 μ M Hist, 100 μ M 5-HT és 100 nM ET-1 kezelésre válaszoló PregS+ és PregS- TG neuronok aránya $Trpm3^{+/+}$ és $Trpm3^{-/-}$ egerekben. A kísérletes elrendezést az **a)** panel mutatja be. Mindegyik csoportban ≥ 3 egérből izoláltunk idegsejteket.

6.2.4. A TRPM3 farmakológiai gátlása nincs hatással a pruritogének által kiváltott neurális válaszokra

Végezetül, megvizsgáltuk a $Trpm3^{+/+}$ egerek trigeminális ganglionjaiból izolált szenzoros neuronokon a TRPM3 kémiai gátlásának hatását. Kísérleteink során, a TRPM3 agonista PregS-t, a hisztamint, 5-HT-t és az ET-1-et alkalmaztuk, a flavanon származék TRPM3 antagonista izozakuranetin (Isok) jelenlétében és hiányában (**19. ábra**). Az Isok nagy hatásfokkal és reverzibilis módon gátolja a PregS által indukált Ca^{2+} tranzienseket a TG neuronokban, mely eredmény összhangban van a korábbi kutatások eredményeivel, melyek hátsó gyöki ganglionokból származó neuronokon mutatták be az izozakuranetin TRPM3 ioncsatorna aktivitását gátló hatást (**19. ábra**). A fenti eredményeinkkel összhangban, ami szerint a TRPM3 jelenléte vagy genetikai hiánya nem befolyásolja a pruritogének hatását, a $Trpm3^{+/+}$ egerek TG-jaiból izolált szenzoros neuronokon végzett kísérleteink eredményei szerint a TRPM3 kémiai gátlása sincs hatással a pruritogének által kiváltott neurális aktivációra. Sem a különböző pruritogének által kiváltott Ca^{2+}

tranziensek amplitúdója, sem pedig a Hist⁺, 5-HT⁺ és ET-1⁺ neuronok aránya nem változott szignifikánsan 3 μ M Isok jelenlétében vagy hiányában.



19. ábra Iozakuranetin hatása a PregS és az endogén pruritogén mediátorok által kiváltott Ca^{2+} tranziensekre *Trpm3*^{+/+} trigeminális szenzoros neuronokon

a) 20 μ M PregS hatása az $[Ca^{2+}]_{IC}$ koncentrációra 3 μ M izozakuranetin jelenlétében és hiányában, *Trpm3*^{+/+} egerekből származó trigeminális ganglionokból izolált PregS⁺ neuronokon átlaga. **b)** Iozakuranetin hatása a PregS által indukált Ca^{2+} tranziensek amplitúdójára. A mérések az **a)** panelen bemutatott elrendezésben történtek. Az értékeket az első PregS-indukálta Ca^{2+} tranziens százalékában adtuk meg. A pontok az egyes idegsejteket jelölik, a vízszintes vonalak pedig az átlagértékeket jelzik. Az Isok hatását Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze a vivőanyaggal kezelt kontrolcsoporttal, n.s.: $p > 0,05$ (nem szignifikáns), *** $p < 0,001$. **c)** Reprezentatív $[Ca^{2+}]_{IC}$ koncentráció változások 5-HT⁺ trigeminális szenzoros neuronokon 100 μ M 5-HT és 20 μ M PregS hatására 3 μ M izozakuranetin jelenlétében és hiányában. **d)** Az izozakuranetin hatása az endogén pruritogén mediátorok által indukált Ca^{2+} tranziensek amplitúdójára. A mérések a **c)** panelen bemutatott protokoll szerint történtek, 5-HT helyett az ábrán feltüntetett pruritogént alkalmazva. Az értékeket $\Delta(F_i/F_0)$ formában adtuk meg, a pontok az egyes idegsejteket értékeit mutatják, a vízszintes vonalak pedig az átlagértékeket jelzik. Az Isok hatását Mann-Whitney teszttel hasonlítottuk össze a vivőanyaggal kezelt kontrolcsoporttal, n.s.: $p > 0,05$ (nem szignifikáns). **e)** *Trpm3*^{+/+} egerekből származó az ábrán feltüntetett pruritogénekre válaszoló és nem válaszoló TG neuronok aránya 3 μ M izozakuranetin jelenlétében és hiányában. A méréseket a **c)** panelen bemutatottak szerint végeztük. A pruritogén válaszadók megoszlását a TG szenzoros neuronok között Chi négyzet teszt segítségével hasonlítottuk össze, n.s.: $p > 0,05$ (nem szignifikáns). A válaszadókat a megjelölt színekkel, a nem válaszolókat szürkével jelöltük. Mindegyik csoportban ≥ 3 egérből izoláltunk idegsejteket, amiket független kísérletekben mértünk.

7. Diszkusszió

Számos kutatás bizonyította, hogy a hőérzékeny TRP csatornák kiemelkedő szerepet játszanak a hőmérsékleti ingerek érzékelésében és sokoldalú aktivációjuk által központi szerepet töltenek be a fájdalom, illetve a viszketés érzékelésében is. Ezen tulajdonságoknak köszönhetően kiemelkedően vonzó farmakoterápiás célpontok lehetnek új típusú fájdalomcsillapítók, illetve viszketés terápiában alkalmazható gyógyszerek fejlesztése során. Az elmúlt évtizedben számos gyógyszergyár indított kutatásokat ezen cél elérése érdekében, elsősorban a TRPV1 ioncsatornát megcélozva (121–123). Azonban általánosan használható TRPV1-re ható fájdalomcsillapítókat az intenzív kutatások ellenére sem sikerült még forgalomba állítani. Ennek egyik fő oka az, hogy ugyan a TRPV1 (első generációs) gátlószerei, akár csak agonistái (az ioncsatorna deszenzitizációját okozva), fájdalomcsillapító hatásúak lehetnek, alkalmazásukat azonban számos, nehezen tolerálható mellékhatás kíséri. Ilyen mellékhatások pl. az alkalmazás helyén jelentkező égő, fájdalmas érzés, szisztémás alkalmazás esetén a testhőmérséklet emelkedése, vagy a forró hőmérséklet iránti relatív érzéketlenség, ami a fájdalmasan meleg ingerek által kiváltott szövetkárosodás és a forrázásos balesetek kockázatát növeli meg (122). Ezen mellékhatások csökkentése és elkerülése érdekében, az alapkutatói adatok alapján felvetődik más, a nocicepcióban is szerepet játszó, hőérzékeny TRP csatornák terápiás kihasználásának a lehetősége is. Ilyen lehetséges célpont az általunk is vizsgált, nemrégiben karakterizált TRPM3 ioncsatorna, amely a TRPV1-el összemérhető mértékben expresszálódik a hátsó gyöki ganglionokon és hasonló szerepet játszik a fájdalmas meleg hőmérséklet érzékelésében, illetve a gyulladás esetén fellépő termális hyperalgésia kialakulásában is (28,45,124). Ezt a következtetést aláámasztja, hogy a TRPM3 antagonisták állatmodellekben fájdalomcsillapító hatásúnak bizonyultak (49,61,125,126).

A viszketés kialakulását vizsgáló kutatások bizonyítják, hogy egyes termoszenzitív nociceptorok szerepet játszanak a viszketés kialakulásában és transzdukciójában is. Ilyen receptorok a fájdalom és hőérzékeny TRPV1,-3,-4 és TRPA1 ioncsatornák (107,108,118,127–129). A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepét azonban korábban még nem vizsgálták.

7.1. Anesztetikumok hatása a TRPM3 ioncsatornára

Különböző illékony anesztetikumok befolyásolják számos feszültség vezérelt ioncsatorna aktivációját, mely csatornák egy részéről már bebizonyosodott korábban, hogy szerepet játszanak az illékony anesztetikumok alkalmazása során bekövetkező reverzibilis tudatvesztés kialakulásában (130). Ilyen ioncsatornák, például a hiperpolarizációra aktiválódó és ciklikus nukleotid által kapuzott csatorna 1 (HCN1) (77), a feszültség függő K^+ csatornák (K_v1) (78), és a 2 pórus doménnel rendelkező K^+ csatornák (K_2P). Emellett különböző IA-k hatékonyan gátolják a feszültség vezérelt Na^+ és Ca^{2+} csatornák aktivációját is (117,131). Mindemellett korábbi kutatások bemutatták, hogy különböző illékony anesztetikumok befolyásolják bizonyos hőérzékeny TRP csatornák működését is. Ezen kutatási eredmények meggyőző magyarázatot adhatnak számos, az altatás során használt anesztetikumok által okozott kellemetlen mellékhatások megjelenésére. Az anesztetikumok, egy gyors aktivációt követően hatékonyan gátolják a hideg és mentol aktivált TRPM8-at, mely így az anesztézia során ritkán előforduló hipotermia kialakulásában játszhat szerepet (84). Ehhez hasonlóan a halotán és a kloroform hatékonyan gátolja a szintén hideg érzékeny TRPC5 aktivációját is (Bahnasi et al., 2008; Zimmermann et al., 2011), a meleg érzékeny TRPM2-re azonban nincsenek hatással (85). A fájdalmas meleg érzékeny TRPV1 szenzitizálódik (83) vagy elég magas koncentrációban alkalmazva az anesztetikumokat, aktiválódik (133).

Különböző irritáló mellékhatású anesztetikumok, mint pl. az izoflurán és a desflurán közvetlen módon aktiválják a TRPA1-et, melynek az irritáló hatású kémiai anyagokra való érzékenysége jól ismert (134,135). A TRPA1 aktivációján keresztül ezen irritáló hatású anesztetikumok hörgőösszehúzóást, valamint más, fájdalmas válaszreakciókat válthatnak ki és fokozhatják a neurogén gyulladás intenzitását, illetve a csatorna aktivációja szerepet játszhat ezen anaesztetikumok kellemetlen mellékhatásainak kialakulásában is, mint a légúti irritáció (82,134–136). A nem irritáló hatású anesztetikumok viszont nincsenek hatással a TRPA1 ioncsatorna működésére (136). Saját kutatásunkban célul tűztük ki az illékony anesztetikumok TRPM3 ioncsatornára gyakorolt hatásának vizsgálatát, mely ioncsatorna a TRPV1 és TRPA1 csatornákkal közösen fontos szerepet játszik az akut meleg indukálta fájdalom kialakulásában (28,45).

Saját kísérleteink bizonyították, hogy az általunk tesztelt halotán, kloroform, szevoflurán és izoflurán, a hőérzékeny TRPV1-gyel és TRPA1-gyel szemben, nem szenzitizálja és nem is aktiválja a TRPM3-at. Eredményeink szerint azonban ezek az anesztetikumok a rekombináns TRPM3 ioncsatorna mind a kémiai ligand által, mind pedig a hőmérséklet által kiváltott aktivációját. A használt anesztetikumok közül, a halotán bizonyult a legpotensebbnek. A PregS által kiváltott TRPM3 aktivációt a halotán már ~0,5 mM IC_{50} érték mellett gátolta, ami kb. kétszerese az altatás során a reverzibilis tudatvesztést előidéző minimális alveoláris koncentrációnak (MAC-nak) (117,137). Ugyan a kloroform IC_{50} értéke valamivel magasabb, ~1,67 mM volt, ez is megfeleltethető kb. 1,5 MAC értéknek (138). A többi általunk vizsgált anesztetikum kevésbé bizonyult hatékonynak a klinikailag releváns koncentráció tartományban. Ennek megfelelően a PregS által okozott TRPM3 aktivációval szemben az izoflurán IC_{50} értéke 3 MAC-nak (~1,1 mM), míg a szevofluráné 10 MAC-nak (3,8 mM) adódott. A vizsgált anesztetikumokat 1 mM koncentrációban alkalmazva a TRPM3 PregS aktivációs görbáját a magasabb koncentráció tartomány felé tolták el. Ebben az esetben is a halotán bizonyult a legpotensebbnek, a PregS EC_{50}

értékét 50-szeresére növelte. Összehasonlítva azon ioncsatornák anesztetikumok iránti érzékenységgel, melyek szerepet játszanak az anesztetikumokkal kiváltott altatás folyamatában, a TRPM3 anesztetikumokra való érzékenysége valamivel alacsonyabbnak mondható. Példának okáért, különböző anesztetikumok a klinikailag releváns koncentráció tartományban (mely 1 MAC értéknek feleltethető meg), aktiválják a K_2P csatorna család számos tagját, melyek K^+ konduktancia növelésével hozzájárulnak a membrán hiperpolarizációjához (139). A TASK-1 által mediált K^+ áramok tekintetében a halotán EC_{50} értéke 0,23 mM míg a szevofluráné 0,29 mM (140). Sőt mi több, korábbi kutatások rávilágítottak arra, hogy a NMDA receptor által mediált áramokat az egyes anesztetikumok effektíven gátolják 0,25-1,3 MAC közé eső EC_{50} értékkel (141,142). Az izoflurán és szevoflurán 1 MAC-nak megfelelő EC_{50} értékeken potenciózó hatással van a GABA által kiváltott $GABA_A$ receptor aktivációjára (142,143). Mindazonáltal a halotán TRPM3 ioncsatornát gátló IC_{50} értéke nagyon hasonló az NMDA receptorok esetén tapasztalt értékhez ($IC_{50}= 0,57mM$, mely $\sim 2MAC$) (144) és $GABA_A$ potenciózását kiváltó értékekhez ($EC_{50}=0,67 mM$, mely $\sim 2MAC$) (145).

Habár növekvő számú bizonyíték támasztja alá, hogy az anesztetikumok direkt módon képesek befolyásolni különböző TRP csatornák működését, tudásunk még mindig limitált az e mögött rejlő mechanizmusok és a lehetséges molekula kötődési helyek tekintetében. A korábbi TRPV1-et és TRPA1-et célzó kutatások felfedték, hogy a pórus formáló domén fontos szerepet játszhat az anesztetikumok kötőhelyének kialakításában (133,146), ugyanakkor más kutatások során készült szimulációk többszörös kötőhelyek lehetőségét vetik fel a TRPV1 ioncsatornán (147). Ugyan saját kutatásunk során nem vizsgáltuk az anesztetikumok TRPM3-at moduláló hatásának (szub)molekuláris meghatározóit, azonban elektrofiziológiai méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az anesztetikumok nemcsak az endogén PregS által aktivált TRPM3 klasszikus pórusán átfolyó áramokat, hanem az exogén CIM0216 által kiváltott alternatív permeabilitási

útvonalon átfolyó áramokat is csökkentették (46,47,116,148). Ezen eredményeink egyértelműen sugallják, hogy a vizsgált anesztetikumok a csatorna egészének a működését akadályozzák és nem szelektívek egyik pórusra sem, hanem valószínűsíthetően csatorna kapuzását gátolják, valamilyen, aktivációt gátló konformáció változás elősegítésével.

Megvizsgálva az anesztetikumok natív TRPM3-ra gyakorolt hatását is, azt tapasztaltuk, hogy 1 mM koncentrációban alkalmazva minden általunk vizsgált anesztetikum reverzibilisen gátolta az egér hátsó gyöki ganglionokból izolált szenzoros neuronokon kifejeződő natív TRPM3 ioncsatornát. A kísérleteinkből származó adatok alapján megállapítható, hogy az anesztetikumok TRPM3-at gátló hatása reverzibilis és gyorsan kimosható.

Eredményeink nem csak egy újabb, az anesztetikumok által befolyásolt ioncsatornát mutattak be, de az anesztetikumok lehetséges analgetikus hatásainak újabb mechanizmusait tárják fel, és növelik tudásunkat, a szenzoros funkciókat is szabályzó TRPM3 ioncsatorna farmakológiai interakcióval kapcsolatban is. Így értékes információval szolgálhatnak új típusú, a TRPM3-on ható fájdalomcsillapítók fejlesztéséhez is. A TRPM3 gátlása ugyanis, mint azt a korábban idézett eredmények is alátámasztják, hatékony stratégiát jelenthet a fájdalom csillapításában, fájdalomhoz köthető szindrómák kezelésében (35,121,149). A TRPM3-at célzó szerek előnye lehet az első generációs TRPV1 antagonistákkal szemben a kedvezőbb mellékhatás profiljuk. Az eddigi eredmények szerint ugyanis a TRPM3 PregS általi aktivációja – a TRPV1-el szemben – nem befolyásolta a kísérleti állatok testhőmérsékletét, vagyis a TRPM3 feltehetően nem vesz részt a termoreguláció szabályozásában (28,150). A TRPM3-at gátló növényi flavonon származék izozakuranetin és az antiepileptikus gyógyszerként használt primidone fájdalomcsökkentő hatását állat modellekben is bizonyították (49,61,125).

Mivel az anesztetikumok affinitása a TRPM3 felé alacsonyabbnak bizonyult, mint elsődleges terápiás célpontjaik, a GABA_A és K₂P csatornák, irányába, így tényleges TRPM3

gátlószerként való klinikai alkalmazási lehetőségeik limitáltak, ugyanakkor eredményeink számos új eredménnyel szolgálhatnak további, a TRPM3-at, mint potenciális fájdalomcsillapító targetet célzó kutatások számára.

7.2.A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata

A súlyos akut és krónikus viszketés az egyik legelterjedtebb bőrgyógyászati tünet a világon, mely számos páciens életét képes megkeseríteni. Talán ennek eredményeként is, az elmúlt években megemelkedett az olyan kutatások száma, melyek különböző mediátorok, receptorok, molekuláris interakciók és jelátviteli utak viszketés kialakulásában betöltött szerepének vizsgálatát tűzték ki célul. Ezen kutatások új típusú bőrgyógyászati terápiás eszközök és gyógyszerek kifejlesztésének lehetőségét is keresik. A viszketés kutatása során sokáig nyitott kérdésnek számított, hogy vajon beszélhetünk-e egy autonóm, a fájdalmat érzékelő idegpályáktól elkülönülő, viszketés érzékelő pruriceptív rendszerről. Mára általánosan elfogadott a viszketés érzékelés „szelektív” teóriája, miszerint a viszketést érzékelő szenzoros neuronok (pruritogén neuronok), egy specializált alpopulációt alkotnak a fájdalomérzékelő neuronokon (nociceptív neuronokon) belül (105,151–154). Mindemellett az is bizonyított, hogy a nociceptív neuronok nagyobb csoportja érzéketlen a különböző pruritogén anyagok hatására. Ezen funkcionális különbség okait a pruritogén érzékeny és pruritogén érzéketlen nociceptív neuronok között molekuláris szinten kell keresnünk. Így nem meglepő, hogy számos kutatás célja, a viszketésspecifikus molekuláris markerek, viszketésspecifikus neuronok és neurális hálózatok azonosítása, mely célokat nagyban motiválja az orvostudományi igény a fájdalom és viszketéscsillapításhoz szükséges szelektív farmakoterápiás targetek azonosítására. Számos viszketést okozó pruritogén anyag receptoráról azonosították már, hogy kifejeződnek a bőrt beidegző szenzoros neuronokon emberben és egérben

egyaránt. Ilyen receptorok például a hisztamin receptor, a „Mas related” G fehérjékhez kapcsolódó receptorok (MRGPR) családjába tartozó klorokvinin érzékeny receptor (MRGPRA3) és a BAM8-22 érzékeny receptor (MRGPRC11) vagy a proteináz aktivált receptor 2 (PAR2) (118,155–161). Emellett a közelmúltban számos kutatás felfedte néhány, a fájdalom kialakulásában már ismert szerepet játszó receptor ioncsatorna szerepét a viszketés kialakulásában is. Ilyen csatornák például, a TRP csatornák családján belül a hőérzékeny TRPV1 és TRPA1 csatornák, melyek egyaránt kifejeződnek a fájdalom és a viszketés érzékeny neuronokon is, és kiemelt szereppel bírnak mindkét szenzoros modalitás érzékelésében (107,108,118,127,128). Újabban más hőérzékeny TRP csatornákról is bebizonyosodott, hogy mind a viszketés, mind pedig a fájdalom kialakulásában is szerepet játszanak. A TRPV3 és TRPV4 ioncsatornák nagyrészt a bőr nem neurális sejtjein fejeződnek ki, és kiemelt szerepet játszanak a főként gyulladáshoz köthető endogén pruritogén és algogén anyagok felszabadításában (162–166). Korábbi kutatások leírták, hogy a TRPV4 szerepet játszik az allergiás folyamatokhoz kapcsolódó és az azoktól független viszketés kialakulásában is. A TRPV4 szerepet játszik a 5-HT felszabadulás szabályozásában a hízósejtekből és a keratinocytákból, de aktiválódása a keratinocitákból további ET-1 felszabadulást is eredményez. Emellett kiemelt szereppel bír a napégés okozta fájdalom kialakulásában is (167,168). Az 5-HT nem neurális sejtjeiből történő felszabadításán kívül, a TRPV4 fontos szerepet játszik a viszketés érzékeny neuronokban az 5-HT által kiváltott viszketés kialakulásában is (169,170). A TRPV3 szintén nagymértékben expresszálódik keratinocytákon és aktivációja hozzájárul a gyulladáshoz köthető folyamatok mellett a viszketés számos formájának kialakulásához, azáltal, hogy a TRPV4-hez hasonlóan gyulladáshoz köthető mediátorokat szabadít fel (165,171,172).

Annak ellenére, hogy viszonylag sok adat áll már rendelkezésünkre a különböző TRP csatornák viszketésben betöltött szerepével kapcsolatban, a szintén hő- és fájdalom érzékeny ioncsatorna TRPM3 viszketésben betöltött szerepét korábban még nem vizsgálták. A szenzoros

idegvégződéseken kifejeződő TRPM3 fájdalmas meleg vagy a neurosteroid PregS hatására bekövetkező aktivációja rágcsálókban fájdalmat vált ki (46,47). A csatorna egyes ligandjai, vagy ligandjainak speciális kombinációi, egy alternatív permeabilitási útvonalat nyitnak a feszültség-szenzor doménen (S1-S4) keresztül, mely negatív membránpotenciálon egy erős depolarizáló áramot eredményez, melynek hatására a fájdalom érzet súlyosbodik (46,47) és a szenzoros végződésekből a neuropeptidok felszabadulása is fokozódik. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a TRPM3 ioncsatorna expressziója és funkciója a fájdalom érzékelő szenzoros neuronokon nagy átfedésben van más hőérzékelő, nociceptív TRP csatornákkal. A TRPM3, a TRPV1-el és TRPA1-el közösen, fontos szerepet játszik a meleg indukálta termális fájdalom érzékelésében. A funkcionális hasonlóságok mellett, a hátsógyöki ganglionok szomatoszenzoros neuronjain is jelentős mértékben ko-expresszálódnak (45,46,173). A TRPV1 és TRPA1 a fájdalomban betöltött szerepükön kívül fontos résztvevői a viszketéshez köthető szenzoros transzdukciós folyamatoknak is a szenzoros idegvégződéseken (174). Ezen funkcionális és anatómiai hasonlóság alapján feltételeztük, hogy a szomatoszenzoros neuronokon expresszáló TRPM3, a TRPV1 és TRPA1 csatornához hasonlóan, a pruritogén transzdukció folyamatában is szerepet játszhat. A már említett TRPV1 és TRPA1, a viszketés transzdukciója során jellemzően közvetlenül aktiválódnak azáltal, hogy a pruritogén anyag bekötődve saját receptorához, másodlagos jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül aktiválja ezen TRP csatornák valamelyikét. A TRPV1 szerepet játszik a hisztamin receptor és a PAR2 (118) által aktivált jelátviteli útvonalakban, míg a TRPA1 fontos résztvevő az 5-HT (108,120), az MRGPR aktivátorok (107), a TSLP (108) és az epesavak (128) által kiváltott pruritogén szignálok kialakításában és továbbításában.

Hogy megvizsgáljuk a TRPM3 ioncsatorna potenciális szerepét a viszketés kialakulásában és szabályozásában, *in vivo* eger viselkedés teszteket és *in vitro* intracelluláris Ca²⁺ szint változást mérő módszereket alkalmaztunk. Mivel a TRPM3 ioncsatorna fájdalomban és fájdalom

kialakulásában betöltött szerepe ismert, azonban a csatorna aktivátorainak lehetséges pruritogén hatása egyelőre ismeretlen, ezért fontos volt, hogy az *in vivo* kísérleteinkhez olyan módszert alkalmazzunk, mely lehetővé teszi a viszketésre és fájdalomra adott viselkedéses válaszok elkülöníthetőségét. Ezt a LaMotte és munkatársai által korábban bemutatott, és széleskörűen használt egér „*cheek*” modell teljes mértékben lehetővé tette (111,154). A projekt során alkalmazott további egér viselkedés teszt, a „*nape*” modell, ugyan nem teszi lehetővé a két különböző érzetű társított viselkedéses válaszok elkülönítését, de ismert pruritogén hatású anyag használata esetén széleskörűen elterjedt módszer a viszketéses válaszok kvantitatív vizsgálatához. Kísérleteink során a vad típusnak megfeleltethető *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* hím C57Bl6 egereket használtunk. Az *in vivo* kísérletes eredményeink, melyeket a „*cheek*” modell alkalmazása során nyertünk, demonstrálták, hogy a TRPM3 szelektív farmakológiai aktiválása fájdalom kialakulását okozza a trigeminális ganglionok által beidegzett területen is, mely hatás a TRPM3 genetikai hiányában elmaradt. Eredményeink párhuzamba állíthatóak korábbi kutatások eredményeivel, melyek a hátsógyöki ganglionok által beidegzett területen mutatták ki, hogy a TRPM3 farmakológiai aktiválása fájdalmat vált ki (28,46,47). Emellett a TRPM3 agonisták nem okoztak viszketéshez köthető viselkedéses válaszokat a „*cheek*” modell alkalmazása során, vagyis a TRPM3 ioncsatorna aktivációja önmagában nem vált ki viszketést. Azonban, annak ellenére, hogy a csatorna aktivációja kizárólag fájdalomhoz köthető viselkedéses válaszok megjelenését indukálta, eredményeink nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a TRPM3 ioncsatorna a pruriceptív szenzoros neuronokon, vagy azok egy szubpopulációján expresszálandó ne játszhatna szerepet a viszketést kiváltó szenzoros transzdukcióban. Erre példa a TRPV1 kapszaicin általi aktivációja is, amely égető fájdalmas érzést okoz, de nem vált ki viszketést. Ennek ellenére, a TRPV1 a viszketés érzékeny szenzoros neuronokon is expresszálandó és szerepe van a hisztamin függő, és a PAR2 által mediált hisztamin független viszketés kialakulásában (118). Mindemellett kimutatták, hogy a

pruriceptív, MrgprA3-at expresszáló szenzoros neuronokon kifejező TRPV1 aktivációja kapszaicinnel viszketést és nem pedig fájdalmat indukál (158). A fentebb említettek alapján, a kutatásunk során azt vizsgáltuk, hogy a TRPM3 ioncsatorna szerepet játszik-e, a hisztamin, 5-HT és ET-1 endogén pruritogén mediátorok által indukált viszketés kialakulásában. Eredményeink szerint szubkután injektálást követően a használt endogén pruritogén mediátorok mindegyike hasonló intenzitású viszketést váltott ki *Trpm3^{+/+}* és *Trpm3^{-/-}* egerekben egyaránt, mind a trigeminális neuronok által beidegzett pofa régióban, mind pedig a hátsógyöki ganglionok által beidegzett tarkó-gerinc régióban. Ezen *in vivo* eredményeinkkel teljesen összhangban, trigeminális ganglionokból izolált, hisztamin, 5-HT, és ET-1 kezelés hatására aktiválódott szenzoros neuronok arányára a *Trpm3* genetikai hiánya nem volt hatással, annak ellenére sem, hogy a vizsgált pruritogének mindegyike aktivált a *Trpm3^{+/+}* típusú egerből származó TRPM3-at expresszáló (PregS+) és nem expresszáló (PregS-) neuronokat egyaránt. Sőt mi több, a TRPM3-at gátló izozakuranetin sem gátolta a pruritogének hatását *Trpm3^{+/+}* egerek TG-jaiból izolált szenzoros neuronokon: az izozakuranetin nem befolyásolta sem a különböző pruritogének által aktivált a neuronok arányát, sem pedig a kiváltott Ca^{2+} tranziensek amplitúdóját. Ezen eredményeink meggyőző bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a TRPM3 ioncsatornának nincs szignifikáns szerepe a hisztamin, 5-HT és ET-1 által kiváltott sejtes válaszokban, és nem járul hozzá az általuk kiváltott viszketés kialakulásához.

Az ET-1 injekciót követően azonban a *Trpm3^{-/-}* állatoknál szignifikánsan több vakarózási választ figyeltünk meg, ami intenzívebb viszketésre utalt, mint a *TRPM3^{+/+}* állatok esetén. Ezen eredményünk valószínűleg magyarázható azzal az általános megfigyeléssel és kísérletes ténnyel, miszerint a fájdalom gerincvelői szinten gátolja a viszketés kialakulását (175,176). Saját eredményeinket figyelembe véve, elképzelhető, hogy a TRPM3 genetikai hiánya, a fájdalom érzékeny neuronok alap aktivitásának csökkenését eredményezheti, mely bizonyos esetekben a

viszketés intenzitásának fokozódását válthatja ki. Ugyanakkor nem zárható ki az a lehetőség sem, hogy maga az ET-1 a nociceptorok enyhe aktiválását okozza, ami részlegesen gátolja a viszkető válaszokat, de ez a feltételezett gátlás a *Trpm3*^{-/-} állatokban csökkent a *Trpm3*^{+/+} állatokhoz viszonyítva. Az ET-1-ről valóban leírták, hogy szerepe van a fájdalom közvetítésében (177,178), azonban kísérleteinkben ET-1 alkalmazását követően csak mérsékelt nocifenzív viselkedést tapasztaltunk, és az általunk megfigyelt R_{viszketés} érték is főként pruritogén anyagként jellemzi az ET-1-et.

Kísérletes eredményeink, arra a következtetésre vezetnek, hogy a TRPM3 ioncsatorna specifikusan a fájdalom érzékelésében játszik szerepet, és nem vesz részt különböző endogén pruritogén anyagok, mint a hisztamin, 5-HT, és ET-1 által kiváltott viszketés transzdukciójában. Mindazonáltal nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy a TRPM3 szükséges és fontos résztvevője esetleg más ligandok vagy mechanizmusok által kiváltott viszketéses folyamatoknak. Eredményeink méginkább alátámasztják azt a feltételezést, hogy a TRPM3 igéretes célpontja lehet új típusú fájdalomcsillapító gyógyszerek fejlesztésének. Korábbi kutatások rávilágítottak arra, hogy a TRPM3 farmakológiai gátlása és vagy geneteikai hiánya, csökkenti a kémiai anyagok, hőmérséklet és gyulladás által kiváltott fájdalom érzetet a DRG neuronok által beidegzett területeken (28,49,124,179,180). Ezt kibővítve a „cheek” modell alkalmazásával elért eredményeink bemutatják, hogy az endogén PregS és az exogén CIM0216 által kiváltott fájdalom a *Trpm3*^{-/-} egerekben gyakorlatilag eltűnt a trigeminális szenzoros neuronok által beidegzett pofa régióban is.

Mint minden állatkísérletes kutatás esetében, a jelen eredmények értékelése során is fontos megtárgyalni az eredményeink emberre vonatkozatható transzlációját. Bár a legjobb tudásunk szerint a TRPM3 ligandok hatásait még nem vizsgálták humán *in vivo* kísérletek során, az ismert farmakológiai és celluláris adatok azt mutatják, hogy az egérben és az emberben megtalálható vad

típusú TRPM3 funkcionálisan azonos: a foszfolipidek, valamint a G fehérjék $\beta\gamma$ alegységei révén hasonlóan szabályozottak, és az agonisták és antagonisták is megegyeznek (173,179–182). Az általunk alkalmazott „*cheek*” modell, kiváló kísérletes módszer a fájdalom és viszketés során tapasztalt viselkedéses válaszok elkülönítésére (111), és az alkalmazott endogén pruritogén mediátorokról bizonyított, hogy mind egér modellekben, mind pedig humán kísérleti alanyokon viszketést indukálnak (119,174,183,184).

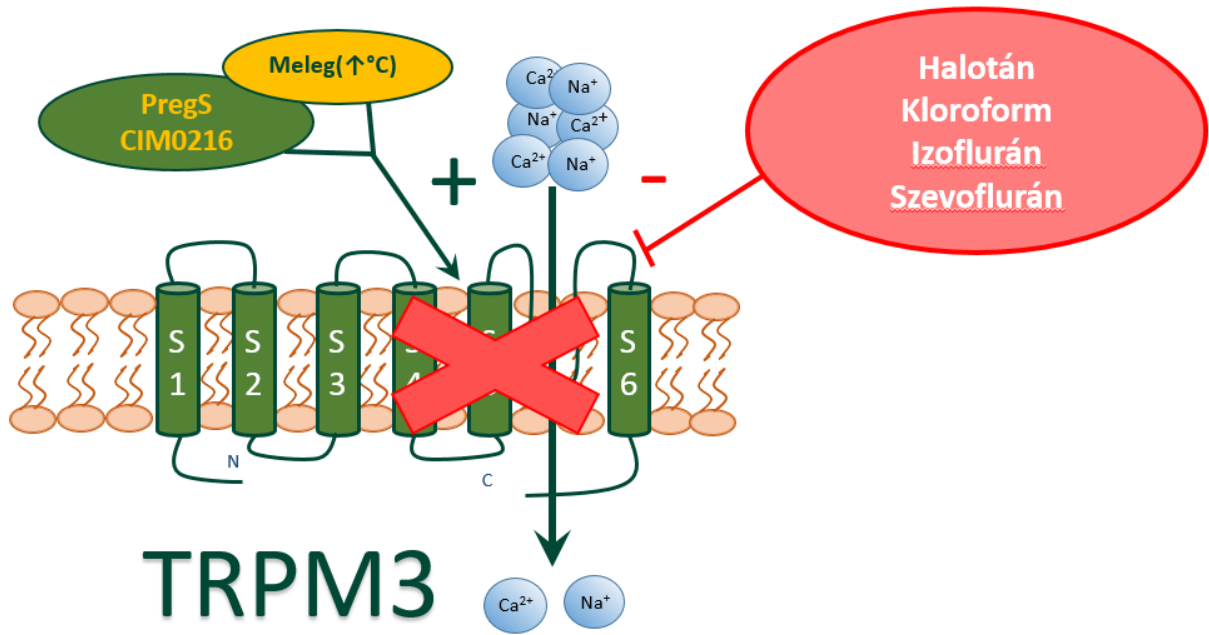
A fenti hasonlóságok tükrében, az *in vivo* és *in vitro* kísérletes eredményeink alapján feltételezhető, hogy a TRPM3 ioncsatorna egér és humán esetben sem vesz részt az endogén pruritogének által indukált viszketés kialakulásában, és direkt kémiai aktivációja kizárólag fájdalmat vált ki és nem járul hozzá a viszketés kialakulásához.

8. Összefoglalás

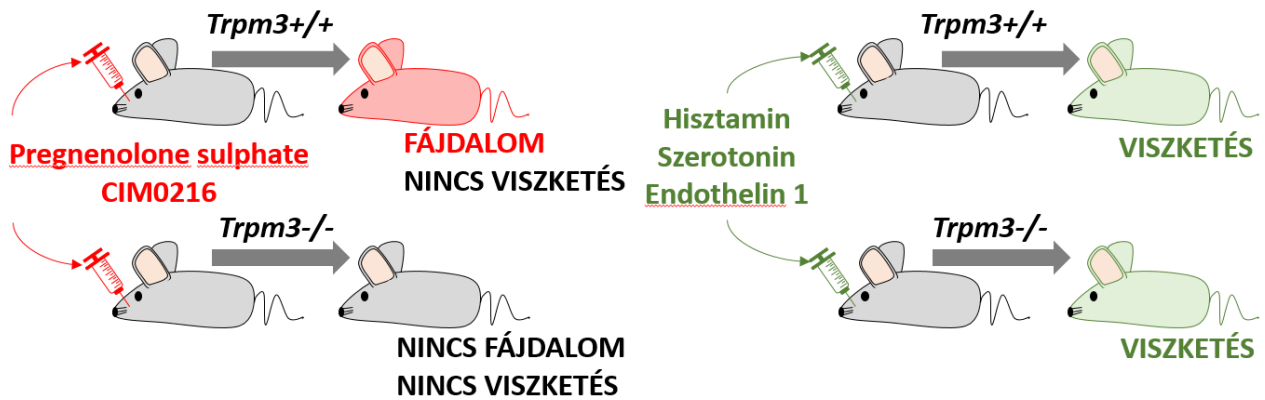
Korábbi kutatásokból már ismerjük a TRPM3 ioncsatorna szerepét a hőmérsékletérzékelésben és a fájdalom kialakulásában, illetve annak transzdukciójában. Jelen munkánk során, *in vitro* vizsgáltuk az illékony anesztetikumok hatását a TRPM3 ioncsatorna működésére, valamint *in vitro* és *in vivo* módszerekkel tanulmányoztuk a TRPM3 ioncsatorna esetleges szerepét egyes endogén mediátorok által kiváltott viszketés kialakulásában.

Fluoreszcens alapú, Ca^{2+} szint változást mérő kísérleteink eredményei bizonyították, hogy a vizsgált IA-k hatékonyan és dózis függő módon képesek gátolni a rekombináns TRPM3 kémiai és a hőmérséklet által kiváltott aktivációját. A vizsgált anesztetikumok 1 mM-ban alkalmazva az egér DRG szenzoros neuronokon kifejeződő natív TRPM3 ioncsatornát is hatékonyan és reverzibilis módon gátolták. Kimutattuk, hogy az vizsgált IA-k a TRPM3 ioncsatorna klasszikus pórusán és alternatív permeabilitási útvonalán átfolyó transzmembrán áramokat is gátolják.

A TRPM3 ioncsatorna viszketésben betöltött szerepének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a TRPM3 nem vesz részt sem a hisztamin függő, sem pedig a hisztamin független viszketés kialakulásában. A „cheek” modell alkalmazása során bevezettünk egy új paramétert, a viszketési rátát ($R_{\text{viszketés}}$), mely megadja a „cheek” modell során használt anyagok specificitását a viszketés-fájdalom tengelyén. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a TRPM3 ioncsatorna agonistái (PregS, CIM0216) *Trpm3*^{+/+} állatokban fájdalmat indukálnak ami a *Trpm3*^{-/-} állatokban elmarad, azonban nem váltanak ki viszketést. *Trpm3*^{+/+} és *Trpm3*^{-/-} egerek TG-ból izolált szenzoros neuronokon végzett *in vitro* $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ mérések során demonstráltuk, hogy a vizsgált pruritogén anyagok a TRPM3 genetikai hiányában és jelenlétében is hasonló módon hatnak, és a TRPM3 ioncsatorna farmakológiai gátlása sincs befolyással a pruritogének által kifejtett celluláris hatásokra. A projectek során elért eredményeinket a **20-21. ábrán** mutatjuk be összefoglalva.



20. ábra IA-k gátolják a TRPM3 ioncsatorna működését



21. ábra TRPM3 ioncsatorna aktiválása fájdalmat vált ki, de nem játszik szerepet az endogén pruritogének által kiváltott viszketés kialakulásában

9. Summary

Previous studies have demonstrated the role of the TRPM3 ion channel in thermosensation and in the development and transduction of pain. In our current studies we investigated the effect of volatile anaesthetics on TRPM3 *in vitro*, as well as its role in the development of itch elicited by endogenous mediators using both *in vivo*, and *in vitro* experiments.

Using fluorescence based intracellular Ca^{2+} concentration measurements, we showed that the investigated volatile anaesthetics effectively inhibited – in a dose-dependent manner – chemical and thermal activation of the recombinant TRPM3. The native TRPM3 ion channel expressed on sensory neurons isolated from the dorsal root ganglia of mice was also effectively and reversibly inhibited by the anesthetics applied in 1 mM. We have presented that the studied VAs inhibited transmembrane currents flowing through both the classical pore, and the alternative ion permeation pathway of TRPM3.

Investigating the role of TRPM3 in pruritus, we found that it is not involved in the development of either histamine-dependent or histamine-independent pruritus evoked by endogenous mediators. Using the “cheek” model, we introduced a new parameter, the itch ratio (R_{itch}), which indicates the specificity of the compounds used in the “cheek model” on the itch-pain axis. In our experiments we demonstrated that TRPM3 agonists (PregS, CIM0216), induce pain in *Trpm3*^{+/+} animals, which is abolished in *Trpm3*^{-/-} animals, while demonstrating no measurable pruritic activity. Fluorescent $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ic}}$ measurements on sensory neurons isolated from trigeminal ganglia of *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice showed that the effect of the studied pruritogenic substances is independent of the presence of TRPM3, while the pharmacological inhibition of the TRPM3 ion channel did not influence the effect of the pruritogens. Our results are summarized in **Figures 20** and **21**.

10. Irodalomjegyzék

1. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. 1969. október 18.;224(5216):285–7.
2. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989. április;2(4):1313–23.
3. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001. 0;53(4):527–52.
4. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*. 2011;12(3):218.
5. Gees M, Colson B, Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. október;2(10):a003962.
6. Lambert S, Drews A, Rizun O, Wagner TFJ, Lis A, Mannebach S, és mtsai. Transient receptor potential melastatin 1 (TRPM1) is an ion-conducting plasma membrane channel inhibited by zinc ions. *J Biol Chem*. 2011. április 8.;286(14):12221–33.
7. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*. 2013. 0;504(7478):113–8.
8. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2013. 0;504(7478):107–12.
9. Paulsen CE, Armache J-P, Gao Y, Cheng Y, Julius D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature*. 2015. április 23.;520(7548):511–7.
10. Huynh KW, Cohen MR, Jiang J, Samanta A, Lodowski DT, Zhou ZH, és mtsai. Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM. *Nat Commun*. 2016. március 29.;7:11130.
11. Saotome K, Singh AK, Yelshanskaya MV, Sobolevsky AI. Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6. *Nature*. 2016. 23;534(7608):506–11.
12. Dong X-P, Wang X, Xu H. TRP channels of intracellular membranes. *J Neurochem*. 2010. április;113(2):313–28.
13. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:685–717.
14. Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, és mtsai. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*. 2005. 0;438(7070):1022–5.
15. Zufall F. TRPs in olfaction. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;223:917–33.

16. Kozai D, Ogawa N, Mori Y. Redox regulation of transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal*. 2014. 0;21(6):971–86.
17. Shimizu S, Takahashi N, Mori Y. TRPs as chemosensors (ROS, RNS, RCS, gasotransmitters). *Handb Exp Pharmacol*. 2014;223:767–94.
18. Miller BA. TRPM2 in Cancer. *Cell Calcium*. 2019;80:8–17.
19. Plant TD. TRPs in mechanosensing and volume regulation. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;223:743–66.
20. Roper SD. TRPs in Taste and Chemesthesis. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;223:827–71.
21. Siemens J, Zhou S, Piskorowski R, Nikai T, Lumpkin EA, Basbaum AI, és mtsai. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*. 2006. 0;444(7116):208–12.
22. Andreev YA, Kozlov SA, Koshelev SG, Ivanova EA, Monastyrnaya MM, Kozlovskaya EP, és mtsai. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J Biol Chem*. 2008. 0;283(35):23914–21.
23. Min J-W, Liu W-H, He X-H, Peng B-W. Different types of toxins targeting TRPV1 in pain. *Toxicon*. 2013. szeptember;71:66–75.
24. Hakim MA, Jiang W, Luo L, Li B, Yang S, Song Y, és mtsai. Scorpion Toxin, BmP01, Induces Pain by Targeting TRPV1 Channel. *Toxins (Basel)*. 2015. szeptember 14.;7(9):3671–87.
25. Geron M, Hazan A, Priel A. Animal Toxins Providing Insights into TRPV1 Activation Mechanism. *Toxins (Basel)*. 2017. 16;9(10).
26. Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals. *Nat Rev Neurosci*. 2014. szeptember;15(9):573–89.
27. Talavera K, Nilius B, Voets T. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci*. 2008. június;31(6):287–95.
28. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, és mtsai. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron*. 2011. május 12.;70(3):482–94.
29. Tan C-H, McNaughton PA. The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature*. 2016. 25;536(7617):460–3.
30. Colsoul B, Schraenen A, Lemaire K, Quintens R, Van Lommel L, Segal A, és mtsai. Loss of high-frequency glucose-induced Ca²⁺ oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010. március 16.;107(11):5208–13.
31. Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, és mtsai. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nature Cell Biology*. 2002. március;4(3):191–7.
32. Wang W, Zhang X, Gao Q, Xu H. TRPML1: an ion channel in the lysosome. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;222:631–45.

33. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007. 0;87(1):165–217.
34. Nilius B, Owsianik G. Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch.* 2010. július;460(2):437–50.
35. Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev.* 2014. július;66(3):676–814.
36. Tóth BI, Nilius B. Chapter 2 - Transient Receptor Potential Dysfunctions in Hereditary Diseases: TRP Channelopathies and Beyond A2 - Szallasi, Arpad. In: *TRP Channels as Therapeutic Targets* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [idézi 2016. augusztus 1.]. o. 13–33. Elérhető: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124200241000023>
37. Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, és mtsai. Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem.* 2003. június 6.;278(23):20890–7.
38. Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V, Philipp SE. Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem.* 2005. június 10.;280(23):22540–8.
39. Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C. Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem.* 2003. június 13.;278(24):21493–501.
40. Frühwald J, Camacho Londoño J, Dembla S, Mannebach S, Lis A, Drews A, és mtsai. Alternative splicing of a protein domain indispensable for function of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) ion channels. *J Biol Chem.* 2012. október 26.;287(44):36663–72.
41. Oberwinkler J, Philipp SE. TRPM3. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;222:427–59.
42. Wagner TFJ, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, és mtsai. Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol.* 2008. 0;10(12):1421–30.
43. Naylor J, Li J, Milligan CJ, Zeng F, Sukumar P, Hou B, és mtsai. Pregnenolone Sulphate- and Cholesterol-Regulated TRPM3 Channels Coupled to Vascular Smooth Muscle Secretion and Contraction. *Circ Res.* 2010. május 14.;106(9):1507–15.
44. Yu W, Hill WG, Apodaca G, Zeidel ML. Expression and distribution of transient receptor potential (TRP) channels in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011. január;300(1):F49–59.
45. Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, és mtsai. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature.* 2018. 29;555(7698):662–6.
46. Vriens J, Held K, Janssens A, Tóth BI, Kerselaers S, Nilius B, és mtsai. Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel. *Nat Chem Biol.* 2014. március;10(3):188–95.

47. Held K, Kichko T, De Clercq K, Klaassen H, Van Bree R, Vanherck J-C, és mtsai. Activation of TRPM3 by a potent synthetic ligand reveals a role in peptide release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. március 17.;112(11):E1363-1372.
48. Grimm C, Kraft R, Schultz G, Harteneck C. Activation of the Melastatin-Related Cation Channel TRPM3 by d-erythro-Sphingosine. *Mol Pharmacol*. 2005. március 1.;67(3):798–805.
49. Straub I, Krügel U, Mohr F, Teichert J, Rizun O, Konrad M, és mtsai. Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo. *Mol Pharmacol*. 2013. 0;84(5):736–50.
50. Havlíková H, Hill M, Hampl R, Stárka L. Sex- and age-related changes in epitestosterone in relation to pregnenolone sulfate and testosterone in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002. május;87(5):2225–31.
51. Harteneck C. Pregnenolone Sulfate: From Steroid Metabolite to TRP Channel Ligand. *Molecules*. 2013. szeptember 27.;18(10):12012–28.
52. Majeed Y, Agarwal A, Naylor J, Seymour V, Jiang S, Muraki K, és mtsai. Cis-isomerism and other chemical requirements of steroidal agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels. *Br J Pharmacol*. 2010. szeptember;161(2):430–41.
53. Drews A, Mohr F, Rizun O, Wagner TFJ, Dembla S, Rudolph S, és mtsai. Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. *Br J Pharmacol*. 2014. február;171(4):1019–32.
54. Majeed Y, Tumova S, Green BL, Seymour VAL, Woods DM, Agarwal AK, és mtsai. Pregnenolone sulphate-independent inhibition of TRPM3 channels by progesterone. *Cell Calcium*. 2012. január;51(1):1–11.
55. Majeed Y, Bahnasi Y, Seymour VAL, Wilson LA, Milligan CJ, Agarwal AK, és mtsai. Rapid and Contrasting Effects of Rosiglitazone on Transient Receptor Potential TRPM3 and TRPC5 Channels. *Mol Pharmacol*. 2011. június;79(6):1023–30.
56. Klose C, Straub I, Riehle M, Ranta F, Krautwurst D, Ullrich S, és mtsai. Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *Br J Pharmacol*. 2011. április;162(8):1757–69.
57. Straub I, Mohr F, Stab J, Konrad M, Philipp SE, Oberwinkler J, és mtsai. Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3. *Br J Pharmacol*. 2013. április;168(8):1835–50.
58. Naylor J, Milligan CJ, Zeng F, Jones C, Beech DJ. Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Br J Pharmacol*. 2008. október;155(4):567–73.
59. Harteneck C, Gollasch M. Pharmacological Modulation of Diacylglycerol-Sensitive TRPC3/6/7 Channels. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011. január;12(1):35–41.
60. Suzuki H, Sasaki E, Nakagawa A, Muraki Y, Hatano N, Muraki K. Diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, is an antagonist of human TRPM3 isoforms. *Pharmacol Res Perspect*. 2016. június;4(3):e00232.

61. Krügel U, Straub I, Beckmann H, Schaefer M. Primidone inhibits TRPM3 and attenuates thermal nociception in vivo. *Pain*. 2017;158(5):856–67.
62. Wagner TFJ, Drews A, Loch S, Mohr F, Philipp SE, Lambert S, és mtsai. TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch*. 2010. szeptember;460(4):755–65.
63. Vriens J, Voets T. Heat sensing involves a TRIPlet of ion channels. *Br J Pharmacol*. 2019. október;176(20):3893–8.
64. Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Taguri M, Kumagaya S, Ishiwata R, és mtsai. Decreased serum osmolality promotes ductus arteriosus constriction. *Cardiovascular Research*. 2014. november 1.;104(2):326–36.
65. Siroky BJ, Kleene NK, Kleene SJ, Varnell CD, Comer RG, Liu J, és mtsai. Primary cilia regulate the osmotic stress response of renal epithelial cells through TRPM3. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017. április 1.;312(4):F791–805.
66. Hughes S, Potheary CA, Jagannath A, Foster RG, Hankins MW, Peirson SN. Profound defects in pupillary responses to light in TRPM-channel null mice: a role for TRPM channels in non-image forming photoreception. *Eur J Neurosci*. 2012. január;35(1):34–43.
67. Son GY, Yang YM, Park WS, Chang I, Shin DM. Hypotonic Stress Induces RANKL via Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) and Vanilloid 4 (TRPV4) in Human PDL Cells. *J Dent Res*. 2015. március;94(3):473–81.
68. Bennett TM, Mackay DS, Siegfried CJ, Shiels A. Mutation of the Melastatin-Related Cation Channel, TRPM3, Underlies Inherited Cataract and Glaucoma. *PLoS One*
69. Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, és mtsai. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet*. 2009. május;54(5):304–9.
70. Alptekin M, Eroglu S, Tutar E, Sencan S, Geyik MA, Ulasli M, és mtsai. Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumour Biol*. 2015. 0;36(12):9209–13.
71. India Project Team of the International Cancer Genome Consortium. Mutational landscape of gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma reveals new recurrently-mutated genes and molecular subgroups. *Nat Commun [Internet]*. 2013.
72. Dymant DA, Terhal PA, Rustad CF, Tveten K, Griffith C, Jayakar P, és mtsai. De novo substitutions of TRPM3 cause intellectual disability and epilepsy. *Eur J Hum Genet*. 2019. október;27(10):1611–8.
73. Van Hoeymissen E, Held K, Nogueira Freitas AC, Janssens A, Voets T, Vriens J. Gain of channel function and modified gating properties in TRPM3 mutants causing intellectual disability and epilepsy. *Elife*. 2020. május 19.;9.

74. Zhao S, Yudin Y, Rohacs T. Disease-associated mutations in the human TRPM3 render the channel overactive via two distinct mechanisms. *Elife*. 2020. április 28.;9.
75. Bovill JG. Inhalation anaesthesia: from diethyl ether to xenon. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(182):121–42.
76. Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*. 2008. május;9(5):370–86.
77. Goldstein PA. HCN1 Channels as Targets for Volatile Anesthetics: Coming to the Fore. *Anesth Analg*. 2015. szeptember;121(3):594–6.
78. Lioudyno MI, Birch AM, Tanaka BS, Sokolov Y, Goldin AL, Chandy KG, és mtsai. Shaker-related potassium channels in the central medial nucleus of the thalamus are important molecular targets for arousal suppression by volatile general anesthetics. *J Neurosci*. 2013. október 9.;33(41):16310–22.
79. Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. 1994. február 17.;367(6464):607–14.
80. Nau C. Voltage-gated ion channels. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;(182):85–92.
81. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. június 24.;105(25):8784–9.
82. Eilers H, Cattaruzza F, Nassini R, Materazzi S, Andre E, Chu C, és mtsai. Pungent general anesthetics activate transient receptor potential-A1 to produce hyperalgesia and neurogenic bronchoconstriction. *Anesthesiology*. 2010. június;112(6):1452–63.
83. Cornett PM, Matta JA, Ahern GP. General anesthetics sensitize the capsaicin receptor transient receptor potential V1. *Mol Pharmacol*. 2008. 0;74(5):1261–8.
84. Vanden Abeele F, Kondratskyi A, Dubois C, Shapovalov G, Gkika D, Busserolles J, és mtsai. Complex modulation of the cold receptor TRPM8 by volatile anaesthetics and its role in complications of general anaesthesia. *J Cell Sci*. 2013. október 1.;126(Pt 19):4479–89.
85. Bahnasi YM, Wright HM, Milligan CJ, Dedman AM, Zeng F, Hopkins PM, és mtsai. Modulation of TRPC5 cation channels by halothane, chloroform and propofol. *Br J Pharmacol*. 2008. április;153(7):1505–12.
86. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007. 0;55(3):353–64.
87. LaMotte RH, Dong X, Ringkamp M. Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nat Rev Neurosci*. 2014. 0;15(1):19–31.
88. Gebhart GF, Bielefeldt K. Physiology of Visceral Pain. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. American Cancer Society; 2016 [idézi 2020. május 6.]. o. 1609–33. Elérhető: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.c150049>

89. Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron*. 2014. május 7.;82(3):522–36.
90. Fu X, Froicu D, Sinatra R. Anatomic and Physiologic Principles of Pain. In: Vadivelu N, Urman RD, Hines RL, szerkesztő. *Essentials of Pain Management* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [idézi 2020. május 6.]. o. 31–44. Elérhető: https://doi.org/10.1007/978-0-387-87579-8_3
91. Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, Schmelz M. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci*. 2006. július;7(7):535–47.
92. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009. október 16.;139(2):267–84.
93. Schmidt R, Schmelz M, Ringkamp M, Handwerker HO, Torebjörk HE. Innervation territories of mechanically activated C nociceptor units in human skin. *J Neurophysiol*. 1997. 0;78(5):2641–8.
94. Habig K, Schänzer A, Schirner W, Lautenschläger G, Dassinger B, Olausson H, és mtsai. Low threshold unmyelinated mechanoafferents can modulate pain. *BMC Neurol*. 2017. szeptember 15.;17(1):184.
95. Carr DB, Goudas LC. Acute pain. *The Lancet*. 1999. június 12.;353(9169):2051–8.
96. Loeser JD. What is chronic pain? *Theor Med Bioeth*. 1991. szeptember 1.;12(3):213–25.
97. Namer B, Reeh P. Scratching an itch. *Nature Neuroscience*. 2013. február;16(2):117–8.
98. Meyer RA, Davis KD, Cohen RH, Treede RD, Campbell JN. Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. *Brain Res*. 1991. október 11.;561(2):252–61.
99. Michaelis M, Häbler HJ, Jäenig W. Silent afferents: a separate class of primary afferents? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996. február;23(2):99–105.
100. Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjörk HE. Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci*. 1997. október 15.;17(20):8003–8.
101. Andrew D, Craig AD. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat Neurosci*. 2001. 0;4(1):72–7.
102. Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjörk HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol*. 2003. május;89(5):2441–8.
103. Simone DA, Zhang X, Li J, Zhang J-M, Honda CN, LaMotte RH, és mtsai. Comparison of responses of primate spinothalamic tract neurons to pruritic and algogenic stimuli. *J Neurophysiol*. 2004. 0;91(1):213–22.
104. Handwerker HO, Schmelz M. Pain: itch without pain—a labeled line for itch sensation? *Nat Rev Neurol*. 2009. 0;5(12):640–1.
105. Handwerker HO. Microneurography of pruritus. *Neuroscience Letters*. 2010. 0 19.;470(3):193–6.

106. Han L, Ma C, Liu Q, Weng H-J, Cui Y, Tang Z, és mtsai. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci.* 2013. február;16(2):174–82.
107. Wilson SR, Gerhold KA, Bifolck-Fisher A, Liu Q, Patel KN, Dong X, és mtsai. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci.* 2011. május;14(5):595–602.
108. Wilson SR, Nelson AM, Batia L, Morita T, Estandian D, Owens DM, és mtsai. The ion channel TRPA1 is required for chronic itch. *J Neurosci.* 2013. május 29.;33(22):9283–94.
109. Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algisogenic agents in mice. *European Journal of Pharmacology.* 1995. március 14.;275(3):229–33.
110. Shimada SG, LaMotte RH. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. *Pain.* 2008. október 31.;139(3):681–7.
111. LaMotte RH, Shimada SG, Sikand P. Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans. *Exp Dermatol.* 2011. október;20(10):778–82.
112. Seto T, Mashimo T, Yoshiya I, Kanashiro M, Taniguchi Y. The solubility of volatile anaesthetics in water at 25.0 degrees C using 19F NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal.* 1992. 0;10(1):1–7.
113. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.* 2006. május;9(5):628–35.
114. Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, és mtsai. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol.* 2007. június;151(4):530–40.
115. Lee SP, Buber MT, Yang Q, Cerne R, Cortés RY, Sprou DG, és mtsai. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol.* 2008. április;153(8):1739–49.
116. Held K, Gruss F, Aloï VD, Janssens A, Ulens C, Voets T, és mtsai. Mutations in the voltage-sensing domain affect the alternative ion permeation pathway in the TRPM3 channel. *J Physiol (Lond).* 2018. június;596(12):2413–32.
117. Franks NP, Lieb WR. Selective actions of volatile general anaesthetics at molecular and cellular levels. *Br J Anaesth.* 1993. július;71(1):65–76.
118. Imamachi N, Park GH, Lee H, Anderson DJ, Simon MI, Basbaum AI, és mtsai. TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. július 7.;106(27):11330–5.
119. Gomes LO, Hara DB, Rae GA. Endothelin-1 induces itch and pain in the mouse cheek model. *Life Sciences.* 2012. október 15.;91(13):628–33.
120. Morita T, McClain SP, Batia LM, Pellegrino M, Wilson SR, Kienzler MA, és mtsai. HTR7 Mediates Serotonergic Acute and Chronic Itch. *Neuron.* 2015. július 1.;87(1):124–38.
121. Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011. 0;10(8):601–20.

122. Brederson J-D, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol.* 2013. szeptember 15.;716(1–3):61–76.
123. Moran MM. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018. 06;58:309–30.
124. Alkhatib O, da Costa R, Gentry C, Quallo T, Bevan S, Andersson DA. Promiscuous G-Protein-Coupled Receptor Inhibition of Transient Receptor Potential Melastatin 3 Ion Channels by Gβγ Subunits. *J Neurosci.* 2019. október 2.;39(40):7840–52.
125. Straub I, Mohr F, Stab J, Konrad M, Philipp SE, Oberwinkler J, és mtsai. Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3. *Br J Pharmacol.* 2013. április;168(8):1835–50.
126. Jia S, Zhang Y, Yu J. Antinociceptive Effects of Isosakuranetin in a Rat Model of Peripheral Neuropathy. *Pharmacology.* 2017;100(3–4):201–7.
127. Cevikbas F, Kempkes C, Buhl T, Mess C, Buddenkotte J, Steinhoff M. Role of Interleukin-31 and Oncostatin M in Itch and Neuroimmune Communication. In: Carstens E, Akiyama T, szerkesztő. *Itch: Mechanisms and Treatment [Internet].* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014 [idézi 2020. február 12.]. (Frontiers in Neuroscience). Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200913/>
128. Lieu T, Jayaweera G, Zhao P, Poole DP, Jensen D, Grace M, és mtsai. The bile acid receptor TGR5 activates the TRPA1 channel to induce itch in mice. *Gastroenterology.* 2014. 0;147(6):1417–28.
129. Wilson SR, Bautista DM. Role of Transient Receptor Potential Channels in Acute and Chronic Itch. In: Carstens E, Akiyama T, szerkesztő. *Itch: Mechanisms and Treatment [Internet].* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014 [idézi 2020. február 12.]. (Frontiers in Neuroscience). Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200927/>
130. Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev.* 2005. 0;57(4):387–95.
131. Hemmings HC. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics. *Br J Anaesth.* 2009. július;103(1):61–9.
132. Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, és mtsai. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. 0;108(44):18114–9.
133. Kimball C, Luo J, Yin S, Hu H, Dhaka A. The Pore Loop Domain of TRPV1 Is Required for Its Activation by the Volatile Anesthetics Chloroform and Isoflurane. *Mol Pharmacol.* 2015. július;88(1):131–8.
134. Mutoh T, Taki Y, Tsubone H. Desflurane but not sevoflurane augments laryngeal C-fiber inputs to nucleus tractus solitarii neurons by activating transient receptor potential-A1. *Life Sci.* 2013. május 2.;92(14–16):821–8.

135. Li F, Guo CJ, Huang C-C, Yu G, Brown SM, Xu S, és mtsai. Transient receptor potential A1 activation prolongs isoflurane induction latency and impairs respiratory function in mice. *Anesthesiology*. 2015. április;122(4):768–75.
136. Kichko TI, Niedermirtl F, Leffler A, Reeh PW. Irritant volatile anesthetics induce neurogenic inflammation through TRPA1 and TRPV1 channels in the isolated mouse trachea. *Anesth Analg*. 2015. február;120(2):467–71.
137. Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci*. 2008. május;9(5):370–86.
138. Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. 1994. február 17.;367(6464):607–14.
139. Li Y, Xu J, Xu Y, Zhao X-Y, Liu Y, Wang J, és mtsai. Regulatory Effect of General Anesthetics on Activity of Potassium Channels. *Neurosci Bull*. 2018. október;34(5):887–900.
140. Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, Bayliss DA. The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics. *J Neurosci*. 2000. szeptember 1.;20(17):6347–54.
141. Hollmann MW, Liu HT, Hoenemann CW, Liu WH, Durieux ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part II: interactions with volatile anesthetics. *Anesth Analg*. 2001. május;92(5):1182–91.
142. Ming Z, Knapp DJ, Mueller RA, Breese GR, Criswell HE. Differential modulation of GABA- and NMDA-gated currents by ethanol and isoflurane in cultured rat cerebral cortical neurons. *Brain Res*. 2001. 0;920(1–2):117–24.
143. Nishikawa K, Harrison NL. The actions of sevoflurane and desflurane on the gamma-aminobutyric acid receptor type A: effects of TM2 mutations in the alpha and beta subunits. *Anesthesiology*. 2003. szeptember;99(3):678–84.
144. Perouansky M, Kirson ED, Yaari Y. Mechanism of action of volatile anesthetics: effects of halothane on glutamate receptors in vitro. *Toxicol Lett*. 1998. 0;100–101:65–9.
145. Lin LH, Chen LL, Zirrolli JA, Harris RA. General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acidA receptors expressed by *Xenopus* oocytes: lack of involvement of intracellular calcium. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992. 0;263(2):569–78.
146. Ton HT, Phan TX, Abramyan AM, Shi L, Ahern GP. Identification of a putative binding site critical for general anesthetic activation of TRPA1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017. 04;114(14):3762–7.
147. Jorgensen C, Domene C. Location and Character of Volatile General Anesthetics Binding Sites in the Transmembrane Domain of TRPV1. *Mol Pharm*. 2018. 04;15(9):3920–30.
148. Held K, Voets T, Vriens J. Signature and Pathophysiology of Non-canonical Pores in Voltage-Dependent Cation Channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2016;170:67–99.

149. Sousa-Valente J, Andreou AP, Urban L, Nagy I. Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. *Br J Pharmacol*. 2014. május;171(10):2508–27.
150. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997. október 23.;389(6653):816–24.
151. Handwerker HO, Forster C, Kirchhoff C. Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli. *Journal of Neurophysiology*. 1991. július 1.;66(1):307–15.
152. Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjork HE, Handwerker HO. Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *J Neurophysiol*. 2003. május;89(5):2441–8.
153. Namer B, Carr R, Johaneck LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M. Separate Peripheral Pathways for Pruritus in Man. *J Neurophysiol*. 2008. október;100(4):2062–9.
154. Ma C, Nie H, Gu Q, Sikand P, LaMotte RH. In vivo responses of cutaneous C-mechanosensitive neurons in mouse to punctate chemical stimuli that elicit itch and nociceptive sensations in humans. *J Neurophysiol*. 2012. január 1.;107(1):357–63.
155. Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, Kim A, és mtsai. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell*. 2009. 0;139(7):1353–65.
156. Liu Q, Weng H-J, Patel KN, Tang Z, Bai H, Steinhoff M, és mtsai. The distinct roles of two GPCRs, MrgprC11 and PAR2, in itch and hyperalgesia. *Sci Signal*. 2011. július 12.;4(181):ra45.
157. Jeffry J, Kim S, Chen Z-F. Itch Signaling in the Nervous System. *Physiology (Bethesda)*. 2011. augusztus;26(4):286–92.
158. Han L, Ma C, Liu Q, Weng H-J, Cui Y, Tang Z, és mtsai. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nat Neurosci*. 2013. február;16(2):174–82.
159. Roberson DP, Gudes S, Sprague JM, Patoski HAW, Robson VK, Blas F, és mtsai. Activity-dependent silencing reveals functionally distinct itch-generating sensory neurons. *Nat Neurosci*. 2013. július;16(7):910–8.
160. Schley M, Rukwied R, Blunk J, Menzer C, Konrad C, Dusch M, és mtsai. Mechano-insensitive nociceptors are sufficient to induce histamine-induced itch. *Acta Derm Venereol*. 2013. július 6.;93(4):394–9.
161. Akiyama T, Tominaga M, Takamori K, Carstens MI, Carstens E. Roles of glutamate, substance P, and gastrin-releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and nonhistaminergic itch. *Pain*. 2014. 0;155(1):80–92.
162. Nilius B, Bíró T. TRPV3: a „more than skinny” channel. *Exp Dermatol*. 2013. július;22(7):447–52.
163. Nilius B, Bíró T, Owsianik G. TRPV3: time to decipher a poorly understood family member! *J Physiol (Lond)*. 2014. 0;592(2):295–304.

164. Tóth BI, Oláh A, Szöllősi AG, Bíró T. TRP channels in the skin. *Br J Pharmacol*. 2014. május;171(10):2568–81.
165. Szöllősi AG, Vasas N, Angyal Á, Kistamás K, Nánási PP, Mihály J, és mtsai. Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2018. február;138(2):365–74.
166. Szántó M, Oláh A, Szöllősi AG, Tóth KF, Páyer E, Czakó N, és mtsai. Activation of TRPV3 Inhibits Lipogenesis and Stimulates Production of Inflammatory Mediators in Human Sebocytes-A Putative Contributor to Dry Skin Dermatoses. *J Invest Dermatol*. 2019. 0;139(1):250–3.
167. Moore C, Cevikbas F, Pasolli HA, Chen Y, Kong W, Kempkes C, és mtsai. UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013. 0;110(34):E3225-3234.
168. Luo J, Feng J, Yu G, Yang P, Mack MR, Du J, és mtsai. Transient receptor potential vanilloid 4-expressing macrophages and keratinocytes contribute differentially to allergic and nonallergic chronic itch. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(2):608-619.e7.
169. Akiyama T, Ivanov M, Nagamine M, Davoodi A, Carstens MI, Ikoma A, és mtsai. Involvement of TRPV4 in Serotonin-Evoked Scratching. *J Invest Dermatol*. 2016. 0;136(1):154–60.
170. Snyder LM, Kuzirian MS, Ross SE. An Unexpected Role for TRPV4 in Serotonin-Mediated Itch. *J Invest Dermatol*. 2016. 0;136(1):7–9.
171. Zhang H, Sun X, Qi H, Ma Q, Zhou Q, Wang W, és mtsai. Pharmacological Inhibition of the Temperature-Sensitive and Ca²⁺-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel by Natural Forsythoside B Attenuates Pruritus and Cytotoxicity of Keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;368(1):21–31.
172. Seo SH, Kim S, Kim S-E, Chung S, Lee SE. Enhanced Thermal Sensitivity of TRPV3 in Keratinocytes Underlies Heat-Induced Pruritogen Release and Pruritus in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2020. április 2.;
173. Vangeel L, Benoit M, Miron Y, Miller PE, De Clercq K, Chaltin P, és mtsai. Functional expression and pharmacological modulation of TRPM3 in human sensory neurons. *Br J Pharmacol*. 2020. június;177(12):2683–95.
174. Dong X, Dong X. Peripheral and Central Mechanisms of Itch. *Neuron*. 2018. május 2.;98(3):482–94.
175. Yosipovitch G. How to treat that nasty itch. *Exp Dermatol*. 2005. június;14(6):478–9.
176. Andersen HH, Elberling J, Lo Vecchio S, Arendt-Nielsen L. Topography of itch: evidence of distinct coding for pruriception in the trigeminal nerve. *Itch (Phila)*. 2017. március;2(1):e2.
177. Hans G, Schmidt BL, Strichartz G. Nociceptive sensitization by endothelin-1. *Brain Res Rev*. 2009. április;60(1):36–42.

178. Smith TP, Haymond T, Smith SN, Sweitzer SM. Evidence for the endothelin system as an emerging therapeutic target for the treatment of chronic pain. *J Pain Res.* 2014;7:531–45.
179. Badheka D, Borbiri I, Rohacs T. Transient receptor potential melastatin 3 is a phosphoinositide-dependent ion channel. *J Gen Physiol.* 2015. július;146(1):65–77.
180. Dembla S, Behrendt M, Mohr F, Goecke C, Sondermann J, Schneider FM, és mtsai. Anti-nociceptive action of peripheral mu-opioid receptors by G-beta-gamma protein-mediated inhibition of TRPM3 channels. *Elife.* 2017. 15;6.
181. Badheka D, Yudin Y, Borbiri I, Hartle CM, Yazici A, Mirshahi T, és mtsai. Inhibition of Transient Receptor Potential Melastatin 3 ion channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Elife.* 2017. 15;6.
182. Tóth BI, Konrad M, Ghosh D, Mohr F, Halaszovich CR, Leitner MG, és mtsai. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM3 by phosphoinositides. *J Gen Physiol.* 2015. július;146(1):51–63.
183. Katugampola R, Church MK, Clough GF. The neurogenic vasodilator response to endothelin-1: a study in human skin in vivo. *Exp Physiol.* 2000. 0;85(6):839–46.
184. Kido-Nakahara M, Buddenkotte J, Kempkes C, Ikoma A, Cevikbas F, Akiyama T, és mtsai. Neural peptidase endothelin-converting enzyme 1 regulates endothelin 1-induced pruritus. *J Clin Invest.* 2014. június;124(6):2683–95.

11. Tárgyszavak

TRP ioncsatorna

TRPM3

Anaesztetikum

Fájdalom

Viszketés

Endogén pruritogének

„*Cheek*” modell

12. Key words

TRP ion channel

TRPM3

Anaesztheticum

Pain

Itch

Endogenous pruritogens

Cheek-model

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok **Prof. Dr. Csernoch László professzor úrnak**, az Élettani Intézet és a Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola vezetőjének, amiért lehetőséget és teret adott, hogy a PhD értekezésemhez szükséges munkát elvégezhessem. Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Tóth István Baláznak**, aki szakmai irányításán túl barátilag is támogatott az elmúlt évek során.

Köszönöm kollaborációs partnereinknek, **Prof. Dr. Rohács Tibornak** és **Nawoo Kimnek**, hogy szakmai tudásukkal hozzájárultak a munkám sikerességéhez. Külön köszönettel tartozok **Prof. Dr. Thomas Voets-nak**, és a **leuveni Ioncsatorna Kutató Laboratórium** minden munkatársának, a tőlük kapott összes segítségért, támogatásért és baráti kapcsolatokért. Köszönöm **Prof. Dr. Bíró Tamásnak** minden támogatását és a lehetőséget, amit kaptam tőle.

Végtelenül hálás vagyok **Dr. Szöllősi Attila Gábornak**, **Dr. Lisztes Erikának** és **Dr. Oláh Attilának**, hogy bármilyen problémámmal is fordultam hozzájuk, biztos lehettem benne, hogy baráti tanácsaikkal és magas szintű szakmai tudásukkal mindig a segítségemre lesznek. Köszönettel tartozom a közvetlen munkatársaimnak, **munkacsoportunk** minden jelenlegi és korábbi tagjának. Külön köszönöm **Dr. Almássy Jánosnak** hogy a patch-clamp szoba ajtaja mindig nyitva volt számomra. Végezetül köszönöm az **Élettani Intézet** és az **Immunológiai Intézet valamennyi dolgozójának** és **PhD hallgatójának**, akik az évek során segítették a munkámat.

Legvégül, de egyáltalán nem utolsó sorban, szeretném kifejezni hálámat a **családom** irányába, azért a hatalmas mennyiségű támogatásért, amit tőlük kaptam utam során. Külön köszönöm feleségemnek, **Kelemen-Kövér Vandának**, a végtelen nagy türelmet és odaadást, amit személyétől kapok.

A kutatás magyar (K_120187, PD_121360, FK_125053, FK_125055, PD_128034, PD-134791, GINOP-2.3.2-15-2016-00015 „I-KOM Teaming”, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, EFOP-3.6.1-16-2016-00022, ÚNKP-19-3-IDE-140, ÚNKP-19-4-DE-142, ÚNKP-19-4-DE-285, ÚNKP-19-4-DE-287, ÚNKP-20-5-DE-422, MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíj), flamand (FWO G0B7620N, G084515N, G0B1819N, VIB, KU Leuven Research Council, Belgian Foundation Against Cancer and the Queen Elisabeth Medical Foundation for Neurosciences), NIH (NS055159, GM093290, GM131048) és EU Horizon 2020 (No. 739593) kutatói programok és ösztöndíjak támogatásával valósult meg.

14. Függelék



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/4/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kelemen Balázs
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056714

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kelemen, B.**, Pinto, S., Kim, N., Lisztes, E., Hanyicska, M., Vladár, A., Oláh, A., Péntes, Z., Shu, B., Vriens, J., Bíró, T., Rohács, T., Voets, T., Tóth, I. B.: The TRPM3 ion channel mediates nociception but not itch evoked by endogenous pruritogenic mediators.
Biochem. Pharmacol. 183, 1-11, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114310>
IF: 4.96 (2019)
2. **Kelemen, B.**, Lisztes, E., Vladár, A., Hanyicska, M., Almássy, J., Oláh, A., Szöllösi, A. G., Péntes, Z., Posta, J., Voets, T., Bíró, T., Tóth, I. B.: Volatile anaesthetics inhibit the thermosensitive nociceptor ion channel transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3).
Biochem. Pharmacol. 174, 1-14, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113826>
IF: 4.96 (2019)





További közlemények

3. Kemény, Á., Kodji, X., Horváth, S., Komlódi, R., Szőke, É., Sándor, Z., Perkecz, A., Gyömőrei, C., Sétáló, G., **Kelemen, B.**, Bíró, T., Tóth, I. B., Brain, S. D., Pintér, E., Gyulai, R.: TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice.
J. Invest. Dermatol. 138 (8), 1774-1784, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2018.02.040>
IF: 6.29
4. Ambrus, L., **Kelemen, B.**, Szabó, T., Bíró, T., Tóth, I. B.: Human podocytes express functional thermosensitive transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels.
Br. J. Pharmacol. 174 (23), 4493-4507, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14052>
IF: 6.81

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,02

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,92**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.01.07.



Függelék

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények



Volatile anaesthetics inhibit the thermosensitive nociceptor ion channel transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3)



Balázs Kelemen^{a,b,2}, Erika Lisztes^{a,3}, Anita Vladár^{a,b}, Martin Hanyicska^{a,b}, János Almássy^a, Attila Oláh^{a,4}, Attila Gábor Szöllösi^{c,5}, Zsófia Péntes^{b,c}, János Posta^d, Thomas Voets^{e,f,6}, Tamás Bíró^{c,g,7,1}, Balázs István Tóth^{a,1,8,*}

^a Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^b Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^c Department of Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^d Laboratory of Toxicology, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^e Laboratory of Ion Channel Research, VIB-KU Leuven Center for Brain & Disease Research, Leuven, Belgium

^f Department of Cellular and Molecular Medicine and TRP Research Platform Leuven (TRPLe), KU Leuven, Leuven, Belgium

^g Hungarian Center of Excellence for Molecular Medicine, Szeged, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Volatile anaesthetics
TRP ion channels
TRPM3
Nociception
Thermosensation

ABSTRACT

Background: Volatile anaesthetics (VAs) are the most widely used compounds to induce reversible loss of consciousness and maintain general anaesthesia during surgical interventions. Although the mechanism of their action is not yet fully understood, it is generally believed, that VAs depress central nervous system functions mainly through modulation of ion channels in the neuronal membrane, including 2-pore-domain K⁺ channels, GABA and NMDA receptors. Recent research also reported their action on nociceptive and thermosensitive TRP channels expressed in the peripheral nervous system, including TRPV1, TRPA1, and TRPM8. Here, we investigated the effect of VAs on TRPM3, a less characterized member of the thermosensitive TRP channels playing a central role in noxious heat sensation.

Methods: We investigated the effect of VAs on the activity of recombinant and native TRPM3, by monitoring changes in the intracellular Ca²⁺ concentration and measuring TRPM3-mediated transmembrane currents.

Results: All the investigated VAs (chloroform, halothane, isoflurane, sevoflurane) inhibited both the agonist-induced (pregnenolone sulfate, CIM0216) and heat-activated Ca²⁺ signals and transmembrane currents in a concentration dependent way in HEK293T cells overexpressing recombinant TRPM3. Among the tested VAs, halothane was the most potent blocker (IC₅₀ = 0.52 ± 0.05 mM). We also investigated the effect of VAs on native TRPM3 channels expressed in sensory neurons of the dorsal root ganglia. While VAs activated certain sensory neurons independently of TRPM3, they strongly and reversibly inhibited the agonist-induced TRPM3 activity.

Conclusions: These data provide a better insight into the molecular mechanism beyond the analgesic effect of VAs and propose novel strategies to attenuate TRPM3 dependent nociception.

* Corresponding author.

E-mail address: toth.istvan@med.unideb.hu (B.I. Tóth).

¹ TB and BIT contributed equally to the work as senior authors.

² 0000-0002-8994-0132.

³ 0000-0002-8517-6536.

⁴ 0000-0003-4122-5639.

⁵ 0000-0001-6046-8236.

⁶ 0000-0001-5526-5821.

⁷ 0000-0002-3770-6221.

⁸ 0000-0002-4103-4333.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113826>

Received 25 November 2019; Accepted 22 January 2020

Available online 25 January 2020

0006-2952/ © 2020 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Volatile anaesthetics (VAs) are the most commonly used compounds to maintain general anaesthesia during operation both in human therapeutic interventions and in animal experiments [1]. Although the exact mechanisms, whereby VAs cause a reversible loss of consciousness are not yet fully understood, it is generally accepted that they suppress the activity of the central nervous system by specifically targeting cellular proteins, including several ion channels, among others. A few of these ion channels, especially GABA_A receptors and various K⁺ channels, are considered to play a central role in the general depression of the central nervous system functions resulting in reversible loss of the consciousness initiated by VAs [2–4]. However, VAs can also influence several other ion channels, including voltage-gated Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ channels [5,6]. Moreover, in recent years, their action on sensory transient receptor potential (TRP) channels has also been reported.

TRP channels form a heterogeneous and multifunctional group in the voltage gated-like superfamily of ion channels. The 6-transmembrane domain containing TRP proteins form non-specific, mostly Ca²⁺ permeable cationic channels, and are functional as homo- or heterotetramers [7–9]. Most TRP channels are considered to function as polymodal “cellular sensors” sensitive to diverse changes in the physico-chemical environment (e.g. temperature, pH, osmolarity, ionic concentrations, endogenous mediators, external chemical irritants, etc.) [10,11] and increasing body of evidence indicates their emerging roles in various diseases [12,13]. In primary sensory neurons, the most widely studied sensory TRPs are the thermosensitive TRPV1, TRPA1 and TRPM8 channels. Their versatile role in diverse (patho)physiological sensory processes, including thermosensation, itch, pain (together with different forms of hyperalgesia and allodynia), and inflammation has inspired a plethora of research studies [14–21]. This in turn has urged several pharmaceutical companies to find effective tools targeting these thermosensitive TRP channels as potential novel drugs to manage several, mostly pain related, clinical syndromes [22]. Recently, VAs were also reported to activate TRPA1 [23,24], to sensitize TRPV1 [25] and also to modulate TRPM8 [26], and these results may explain some adverse effects related to general anaesthesia.

TRPM3 was recently introduced as a novel thermosensitive nociceptor TRP channel expressed by a large subset of primary sensory neurons of the dorsal root and trigeminal ganglia (DRG and TG). TRPM3 has an essential role in acute heat pain sensation [27], it contributes to the development of inflammatory heat hyperalgesia and transmits chemical pain sensation evoked by its endogenous steroid ligand pregnenolone sulfate (PregS) [28]. The stimulation of TRPM3 by certain ligands e.g. CIM0216, or special ligand combinations, e.g. co-application of PregS and the antifungal agent clotrimazole revealed an alternative ion permeation pathway beyond the main pore, which resulted in a strong inward current at negative membrane potentials. This unique current displays the general characteristics of the so-called omega currents reported earlier in mutant K⁺ and Na⁺ channels, and may have a high (patho)physiological relevance exacerbating TRPM3 related pain sensation [29–31]. The above results, together with the fact that modulation of TRPM3 activity, in contrast with TRPV1, did not induce any change in the core body temperature of experimental animals [28], introduce TRPM3 as an appealing drug target for novel therapeutic interventions in pain related syndromes. However, in order to exploit the putative therapeutic potential of TRPM3 as a potential drug target, a better understanding of its regulation and pharmacological interactions are of greatest importance.

In this study, we investigated the effect of VAs on recombinant and native TRPM3 ion channels and found that they potently inhibit TRPM3 function. These results further enhance our knowledge about VAs' mechanism of action and may contribute to the development of novel analgesics targeting TRPM3.

2. Materials and methods

2.1. Cell culturing and isolation of sensory neurons

Native HEK293T cells, and HEK293T cells stably overexpressing the mouse TRPM3α2 variant (HEK-M3 cells) were cultured as described before [28]. In brief, cells were cultured in DMEM medium (Invitrogen, Paisley, UK), supplemented with 10% foetal bovine serum, (Invitrogen), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (both from ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 10 mM Glutamax, Non-Essential-Amino-Acids and 200 µg/ml Hygromycin (all from Invitrogen) at 37 °C. Sensory neurons of dorsal root ganglia (DRGs) were obtained from adult (8–12 week old) C57BL6 mice, as described before [28]. Briefly, mice were euthanized by CO₂, DRGs were isolated and digested with collagenase and dispase (both from Invitrogen). Suspension of sensory neurons was seeded on poly-L-lysine HBr (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) coated glass bottom culture dishes (MatTek, Ashland, MA, USA) and cultured in Neurobasal medium supplemented with 2% B-27 supplement (both from Invitrogen), 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin/streptomycin (both from ThermoFisher), and 100 ng/ml β-NGF (Pepro Tech EC, Ltd., London, UK) at 37 °C in 5% CO₂ containing atmosphere. Neurons were used for experiments within 24 to 36 h following isolation. We aimed at obtaining high number of sensory neurons yielding n ≥ 50 neurons in each experimental group for highly reliable statistical analysis. Therefore, respecting the 3R principles, we established multiple primary sensory neuron cultures from an animal and used them in independent measurements. Cultures were randomly recruited into the different experimental groups, and cultures from 3 individual animals were recruited into each group. Altogether, 12 animals were used for the study. All experimental procedures and animal husbandry were conducted following the European Parliament and the Council Directive (2010/63/EU) and national legislation.

2.2. Fluorescent Ca²⁺ measurements

Fluorescent measurement of cytoplasmic Ca²⁺ concentration in HEK cells and in individual DRG neurons were performed according to our previously optimized protocols: HEK-M3 cells were seeded in Poly-L-Lysine HBr (Sigma-Aldrich) coated 96-well/clear-bottom plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) at a density of 100,000 cells per well in normal cell culture medium and incubated overnight. Next day, cells were loaded with 2 µM Fura-2-AM (Invitrogen) at 37 °C for 30 min, and washed three times with Ca²⁺-buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂·x6H₂O, 2 mM CaCl₂·x2H₂O, 10 mM glucose xH₂O, 10 mM HEPES, pH 7.4 (all from Sigma-Aldrich)). The plates were then placed into a FlexStation 3 fluorescent microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and cytoplasmic Ca²⁺ concentration (reflected by the ratio of fluorescence measured at λ_{EX1}: 340 nm, λ_{EX2}: 380 nm, λ_{EM}: 516 nm (F₃₄₀/F₃₈₀)) was monitored during application of compounds in various concentrations. During the measurements, cells in a given well were exposed to only one given concentration of the agents. Measurements were carried out at ambient temperature.

To determine the VAs' effect on the temperature-evoked activation of TRPM3, we used a Fluo-4 based assay and a QPCR system. HEK-M3 and non-transfected HEK293T cells were loaded with 2 µM Fluo-4-AM (Invitrogen) for 30 min, then they were trypsinised and re-suspended in Ca²⁺-buffer in the presence or absence of VAs and transferred into PCR tubes with optical transparent cover (200.000 cells/tube, 200 µL). Fluorescence was measured with a Stratagene Mx3005P QPCR instrument (Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA) using an appropriate filter set while the well temperature was increased from 25 °C to 46 °C in steps of 3 °C.

To measure cytoplasmic Ca²⁺ concentration in individual DRG neurons, we used a microscope based calcium imaging system. On the day after the isolation, DRG neurons were loaded with 2 µM Fluo-4-AM

(Invitrogen) dissolved in normal Ca^{2+} -buffer, then placed on the stage of a Zeiss LSM 5 Live confocal fluorescent microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) and Fluo-4 loaded cells were captured with constant settings in every 1 s (λ_{EX} : 488 nm, λ_{EM} : 516 nm). During the measurements, cells were continuously perfused with Ca^{2+} -buffer and different compounds were applied via the perfusion. Data were presented as F_1/F_0 , where F_0 is the average fluorescence of the baseline (before the first compound application) and F_1 is the actual fluorescence. Experiments were performed at room temperature (21–22 °C).

2.3. Electrophysiology

HEK-M3 cells were seeded to 12 mm glass coverslips previously coated with poly-L-lysine HBr (Sigma-Aldrich) and whole cell patch clamp measurements were carried out by using an Axopatch 1.D amplifier and Clampex 10.2 software (Molecular Devices). Pipettes with final resistances of 2–5 M Ω were fabricated and filled with intracellular solution containing 100 mM aspartic acid, 45 mM CsCl, 1.144 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, and 10 mM EGTA (all from Sigma-Aldrich). pH was adjusted to 7.2 using CsOH (VWR, Radnor, PE, USA). Experiments were performed in a bath solution composed of 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 10 mM HEPES buffered to pH 7.4 (NaOH) (all from Sigma-Aldrich). To record TRPM3 mediated currents, the holding potential was 0 mV and cells were ramped every 2 s from –150 to +150 mV over the course of 200 ms. Recorded data were analysed and plotted using Origin 9.0 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.4. Preparation of working solutions of VAs

10 mM stock solutions of VAs were prepared in extracellular solution by a rigorous overnight stirring in air-tight closed vials. From these stock solutions, fresh dilutions of the final working solutions were prepared and used for measurements within 45 min. If needed, new working solutions were diluted in every 30 min.

2.5. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

The stability of the stock solutions of VAs in an open, freely ventilating system was checked by GC/MS. Stock solutions prepared as described above were kept in an open vial at room temperature for 45 min simulating the conditions in an open perfusion system used for patch clamp and Ca^{2+} measurements. During this incubation time, samples were taken at different time points and subjected for analysis immediately. The active agents in the samples were identified by a GC/MS method using an Agilent 7980B-5977A instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at the Toxicology Laboratory of the Institute of Forensic Medicine of the University of Debrecen. The injection volume was 0.2 μL , and the injector temperature was 250 °C. The applied capillary column was a J&W DB-35MS UI, 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm . The detection parameters were the followings: Sampling: split; split ratio: 20:1. Oven temperature program: 65 °C (2 min. hold time), heating: 50 °C/min to 230 °C; Interface: 280 °C; MS source: 230 °C; Ionization: EI; Detection mode: SCAN. The 'area under curve' of the specific peaks were determined in arbitrary units and normalized to that of obtained from the sample taken at the beginning (0 min) of the incubation.

2.6. Chemicals

Chloroform and halothane were obtained from Sigma Aldrich, isoflurane (sold as Vetflurane) was from Virbac (Carros, France) and sevoflurane from AbbVie Inc. (North Chicago, IL, USA). Pregnenolone sulphate (PregS), allyl isothiocyanate (AITC), capsaicin, thymol, CIM0216 were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Isosakuranetin was obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

Working solutions of VAs were prepared as described above. All other drugs were prepared as stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO), and then diluted into extracellular solutions to reach the desired final concentration. Concentration of the vehicle (DMSO) in the final working solutions was 0.1%.

2.7. Curve fitting

Logistic dose-response curves were fitted using the equation $y = A2 + (A1 - A2)/(1 + (x/x0)^p)$ where the calculated parameters are: A1: initial value (y_{min}), A2: final value (y_{max}), $x0$: center (EC_{50}) and p is the calculated power. Fittings were carried out and parameters were calculated using Origin 9.0 (OriginLab Corporation).

2.8. Data and statistical analysis

Electrophysiological data were analysed using ClampFit 10.0 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and Origin 9.0 (OriginLab Corporation) were used for statistical analysis and data display. When testing antagonistic effect of isosakuranetin, agonist induced Ca^{2+} signals in the presence and absence of isosakuranetin were compared pairwise by two-tailed Student's t -test for independent samples. To control unwanted variances of measured currents between HEK-M3 cells, TRPM3 currents measured in the presence of VAs were normalized, and compared to the agonist induced current (considered as 100%) in the same cell and two-tailed Student's t -test for one sample was used for statistical evaluation. In case of Ca^{2+} signals recorded on sensory neurons, if it is not mentioned otherwise, signal amplitudes were normalized to the 1st agonist evoked signal, considered as 100%, to control variances experienced between individual neurons. Then, data were subjected for statistical analysis using one-way ANOVA with Dunnett post-hoc test to compare the effect of VAs to vehicle control. In every case, $P < 0.05$ was regarded as showing significant differences between group means. All data are presented as mean \pm SD.

3. Results

3.1. VAs formed stabile solutions

In our study, we investigated the effect of VAs with various chemical structures (Fig. 1a) on TRPM3 ion channel functions. Due to their volatile and lipophilic nature, we assumed that it might be challenging to prepare a stabile aqueous solution of VAs suitable for measurements, although they reportedly can be solved > 10 mM in water at 25 °C [32]. Therefore, we aimed at testing the stability of the stock solutions of VAs applied in an open, freely ventilating system mimicking the conditions in our perfusion and liquid handling systems used in the experiments. For this, we performed GC/MS measurements on 10 mM stock solutions of the VAs, which were prepared by rigorous overnight stirring in an airtight vial, as described in the Materials and methods. The concentration of the stock solutions in open vials did not change dramatically during 45 min (Fig. 1b). Therefore, working solutions were freshly prepared from 10 mM stock solutions stored in airtight vials and used for measurements within 30 min. After 30 min, new working solutions were prepared.

3.2. VAs inhibited chemical agonist induced activation of recombinant TRPM3

First, we investigated the effect of VAs on recombinant TRPM3 by carrying out Ca^{2+} measurements on HEK-M3 cells. During the measurements, we applied various concentrations of VAs followed by the application of TRPM3 agonists PregS or CIM0216 in the continuous presence of VAs, as shown in Fig. 2a. This experimental design enabled us to investigate both potential activating and inhibiting effect of VAs.

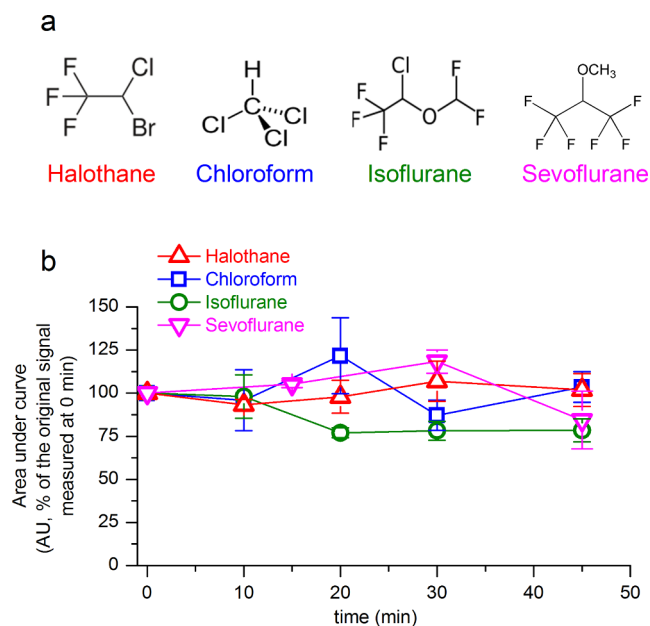


Fig. 1. The structure and stability of the investigated volatile anaesthetics (VAs). (a) Chemical structure of VAs investigated in this study: halothane (a halogenated alkene), chloroform (trichloromethane), isoflurane (a halogenated methyl-ethyl ether) and sevoflurane (fluorinated methyl-isopropyl ether). (b) The stability of the most concentrated 10 mM stock solutions in open, freely ventilating vials was checked by GC/MS in the given timeframe as described in the “Materials and methods” section ($n = 3$ at each point).

We found that none of the investigated VAs activated the recombinant TRPM3, whereas each of them inhibited the TRPM3-mediated Ca^{2+} signals evoked by the endogenous TRPM3 agonist PregS and by the more potent synthetic TRPM3 agonist CIM0216 [30] in a dose dependent manner (Fig. 2a-c). The IC_{50} values for halothane, chloroform, isoflurane, and sevoflurane were (mean \pm SEM) 0.52 ± 0.05 mM, 1.67 ± 0.03 mM, 1.09 ± 1.49 mM and, 3.83 ± 2.39 mM, respectively, when TRPM3 was activated by 10 μM PregS (Fig. 2b), while the IC_{50} values were 1.52 ± 0.05 mM, 1.64 ± 0.25 mM, 2.71 ± 0.88 mM and, 2.0 ± 0.28 mM when activated by 3 μM CIM0216, respectively (Fig. 2c). Moreover, the EC_{50} value of PregS was shifted from 0.37 ± 11 μM to 19.33 ± 4.24 μM ($\sim 51 \times$ fold), 2.13 ± 0.35 μM ($\sim 6 \times$ fold), 3.49 ± 1.3 μM ($\sim 8 \times$ fold), and 6.14 ± 6.39 μM ($\sim 15 \times$ fold) by 1 mM halothane, chloroform, isoflurane, and sevoflurane, respectively (Fig. 2d).

Although halothane was found to be the most potent inhibitor of TRPM3 among the tested VAs, it also evoked robust Ca^{2+} transients when applied alone at high concentrations (≥ 5 mM) (Fig. 3a). This stimulatory effect of halothane was found to be independent of TRPM3, because (i) it was equally observed in native HEK293T cells and HEK-M3 cells (Fig. 3a-b) and (ii) the halothane-induced Ca^{2+} signals were not inhibited by the TRPM3 antagonist isosakuranetin (Fig. 3c). It is important to mention that the commercially available halothane applied in the current study also contained ca. 150 ppm thymol, as stabilizer resulting in ca. 0.75 μM thymol in the most concentrated (5 mM) halothane working solution tested. Since thymol was reported to be an activator of TRPV3 [33,34] and TRPA1 [35], other thermosensitive members of TRP family, we also investigated the effect of thymol on TRPM3, to clarify its potential contribution to the effect of halothane. Our results indicated that thymol applied at concentrations up to 300 μM did not affect TRPM3 functions: it neither activated HEK-M3 cells nor inhibited their activation evoked by PregS (Fig. 3d).

3.3. VAs inhibited the heat-evoked activation of TRPM3

Next, we tested whether the VAs influence activation of TRPM3 by thermal stimuli, in addition to their effect on ligand-induced activation of the channel. HEK-M3 cells were challenged by precise temperature steps using a Quantitative real-time PCR instrument, and the intracellular Ca^{2+} concentration was monitored in the presence of VAs at various concentrations. Our results revealed that VAs also inhibited warming-induced activation of TRPM3: the obtained IC_{50} values of halothane, chloroform, isoflurane, and sevoflurane were 1.08 ± 0.58 mM, 1.50 ± 0.63 mM, 1.64 ± 0.59 mM, and 1.83 ± 0.63 mM, respectively, when cells were heated from 37 to 43 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4).

3.4. VAs inhibited TRPM3 mediated transmembrane currents

In whole-cell patch-clamp measurements, PregS induced an outwardly rectifying whole-cell current in HEK-M3 cells (Fig. 5a-b). This TRPM3-mediated current was partially inhibited by 1 mM chloroform, halothane and isoflurane, and almost fully abolished when these VAs were applied at 5 mM. Sevoflurane was less effective: when applied at 1 mM, it only minimally inhibited the PregS-induced TRPM3 current, whereas at 5 mM it evoked a marked but incomplete inhibition (Fig. 5c). The effects of the VAs were fast and reversible (Fig. 5a).

The PregS-induced current is conducted by the canonical pore of the TRPM3, but CIM0216 also induces the opening of an additional permeation pathway through the voltage-sensing domain of TRPM3 resulting in the appearance of a marked inward current at negative membrane potentials [29–31]. We found that VAs also inhibited the opening of the alternative ion permeation pathway, when activated by CIM0216 (Fig. 5d-f).

3.5. VAs inhibited native TRPM3 in sensory neurons of mouse dorsal root ganglia

To study the effect of VAs on native TRPM3, we investigated sensory neurons isolated from mouse DRGs. We used Ca^{2+} imaging to probe PregS responses in the presence and absence of VAs (Fig. 6a). We considered the PregS-responsive (PregS+) neurons as TRPM3 expressing (TRPM3+) neurons. As suggested in previous studies, our results also confirmed that some sensory neurons were directly stimulated by VAs: 15.3%, 21%, 5.1%, and 1.8% of the DRG neurons were activated by 1 mM halothane, chloroform, isoflurane and sevoflurane, respectively (Fig. 6b). The distribution of the neurons activated by VAs was similar in the TRPM3+ and TRPM3- population and, importantly, the large majority of TRPM3+ neurons was not activated by VAs (VA-neurons) (Fig. 6b). These results clearly argue for the conclusion that VAs activated a subset of sensory neurons independently of TRPM3. To investigate the VAs' potential inhibitory effect on native TRPM3, we compared the PregS evoked Ca^{2+} signals in the presence and absence of VAs. We analysed only the TRPM3+ but VA- sensory neurons to eliminate the influence of the TRPM3-independent Ca^{2+} signals evoked by VAs on PregS-induced responses. In our experiments, we applied repeated 2-minute-long pulses of PregS in the presence or absence of VAs, as shown in Fig. 6a. Only those cells that responded to a depolarizing pulse evoked by 25 mM KCl at the end of the measurement were considered as sensory neurons. We found that all of the investigated VAs applied at 1 mM decreased the PregS-induced, TRPM3-mediated Ca^{2+} transients. The inhibitory effect of VAs was reversible within 4 min after application (Fig. 6c).

Since activation of TRP channels results in depolarization of sensory neurons, Ca^{2+} signals evoked by activating TRP channels may be further amplified by the consequent activation of voltage-gated Ca^{2+} channels. Previous studies revealed that VAs inhibit some voltage-dependent Ca^{2+} channels, as well [36]. Therefore, we considered, that the inhibition of voltage-gated Ca^{2+} channels might contribute to the

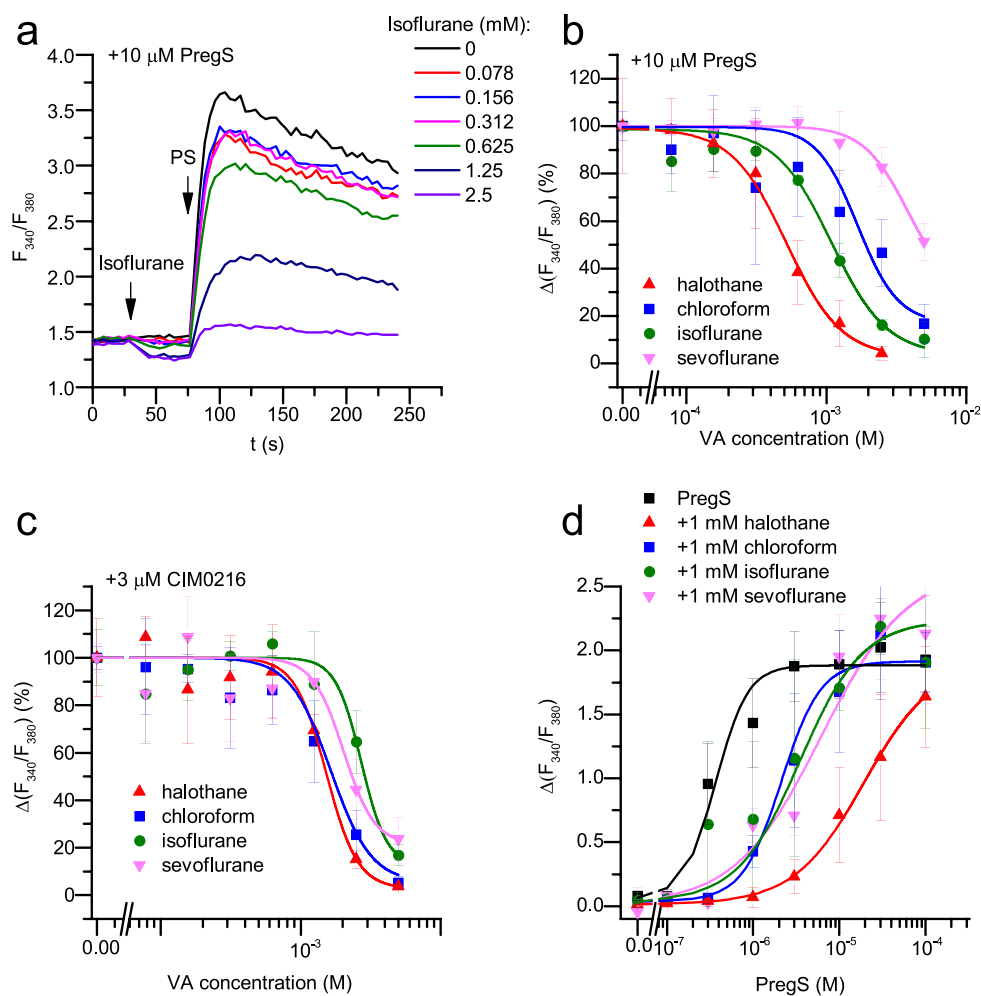


Fig. 2. Identification of different VAs as inhibitors of the recombinant TRPM3. (a) Averaged Ca^{2+} responses ($n = 5$) on HEK-M3 cells evoked by $10 \mu\text{M}$ PregS (PS) in the presence of various concentrations of isoflurane, as indicated. Compounds were added at the indicated time points. (b) Concentration dependent inhibitory effect of VAs on the recombinant TRPM3 activated by $10 \mu\text{M}$ PregS. The measurements were carried out as shown in panel (a), VAs were applied 30 s in advance to the agonist. (c) Concentration dependent inhibitory effect of VAs on the recombinant TRPM3 activated by CIM0216. The measurements were carried out as in panel (a) but $3 \mu\text{M}$ CIM0216 was applied instead of PregS. (d) Dose-response relationship of PregS in the presence and absence of various VAs, as indicated in the figure. The measurements were carried out as in panel (a), but PregS was applied at various concentration and VAs were applied in 1 mM . Data are presented as mean \pm SD, $n = 5$ in each group.

apparent inhibition of signals induced by PregS or agonists of other TRP channels. To challenge the role of voltage-gated Ca^{2+} channels, we tested whether or not VAs influence Ca^{2+} responses evoked by activating other native thermosensitive TRP channels expressed on sensory neurons. During these experiments, we slightly modified the previous protocol as illustrated in Fig. 6d. Because the effect of capsaicin and AITC is poorly reversible, we applied isoflurane before and together with the 1st agonist application, and the effect was compared to the 2nd agonist application after the wash out of the VAs. If the inhibitory effect of VAs experienced in our previous experiments were partially or totally mediated by some other voltage-gated Ca^{2+} channels, then VAs should also inhibit Ca^{2+} transients evoked by activating other TRP channels that cause depolarization of sensory neurons. Our results refuted this theory. The amplitudes of the Ca^{2+} transients activated by the TRPV1-specific agonist capsaicin and the TRPA1 agonist AITC did not decrease in the presence of isoflurane, whereas, the PregS-evoked Ca^{2+} transients were again significantly decreased (Fig. 6d-e). These results clearly argue for the conclusion that VAs inhibit PregS-induced responses via TRPM3, without influencing voltage gated Ca^{2+} channels.

4. Discussion

Activation of several members of the superfamily of the voltage-gated ion channels [37] is influenced by VAs, and a number of these channels, in particular the hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1) [38], shaker-related delayed rectifier K^+ channels (K_v1) [39] and two-pore-domain K^+ channels (K2P) have been implicated in the induction of general anaesthesia. Voltage-gated

Na^+ and Ca^{2+} channels can also be inhibited by VAs [36,40]. Moreover, recent studies reported the effect of VAs on thermosensitive TRP channels, as well. The cold- and menthol-activated TRPM8, after an initial activation, was inhibited by VAs. Likewise TRPC5 [41], another cold-sensitive family member, was inhibited by halothane and chloroform [42]. The warmth sensor TRPM2 was not influenced by halothane or chloroform [41], whereas the noxious heat sensor TRPV1 was sensitized [25], or, if applied at higher concentration, even activated by VAs [43]. Moreover, irritant VAs, isoflurane and desflurane directly activated TRPA1, a general target of several irritant chemicals, whereas the non-irritating halothane and sevoflurane did not induce TRPA1 activation [24]. These results can explain some adverse effects often associated with general anaesthesia induced by certain VAs. Indeed, irritant VAs evoke mechanical hyperalgesia and bronchoconstriction, impaired respiratory pattern, augmented laryngeal C-fiber activity and stimulate tracheal CGRP release mainly mediated by TRPA1 [24,44–46]. In our current study, we investigated the effect of VAs on TRPM3, a less characterized thermo-nociceptive TRP channel, which together with TRPV1 and TRPA1 play a crucial role in acute heat pain sensation [27,28].

In contrast to the other two heat-pain sensors TRPV1 and TRPA1, TRPM3 was found to be neither sensitized nor activated by any of the investigated VAs. In contrast, activation of TRPM3 by both chemical ligands and heat was markedly inhibited by the investigated VAs. Among those, halothane was found to be the most potent, inhibiting PregS-evoked TRPM3 activity with an IC_{50} of approximately 0.5 mM , equivalent to ca. 2-times the minimal alveolar concentration (2 MAC) that induces anaesthesia in different species [2,47]. Although the IC_{50}

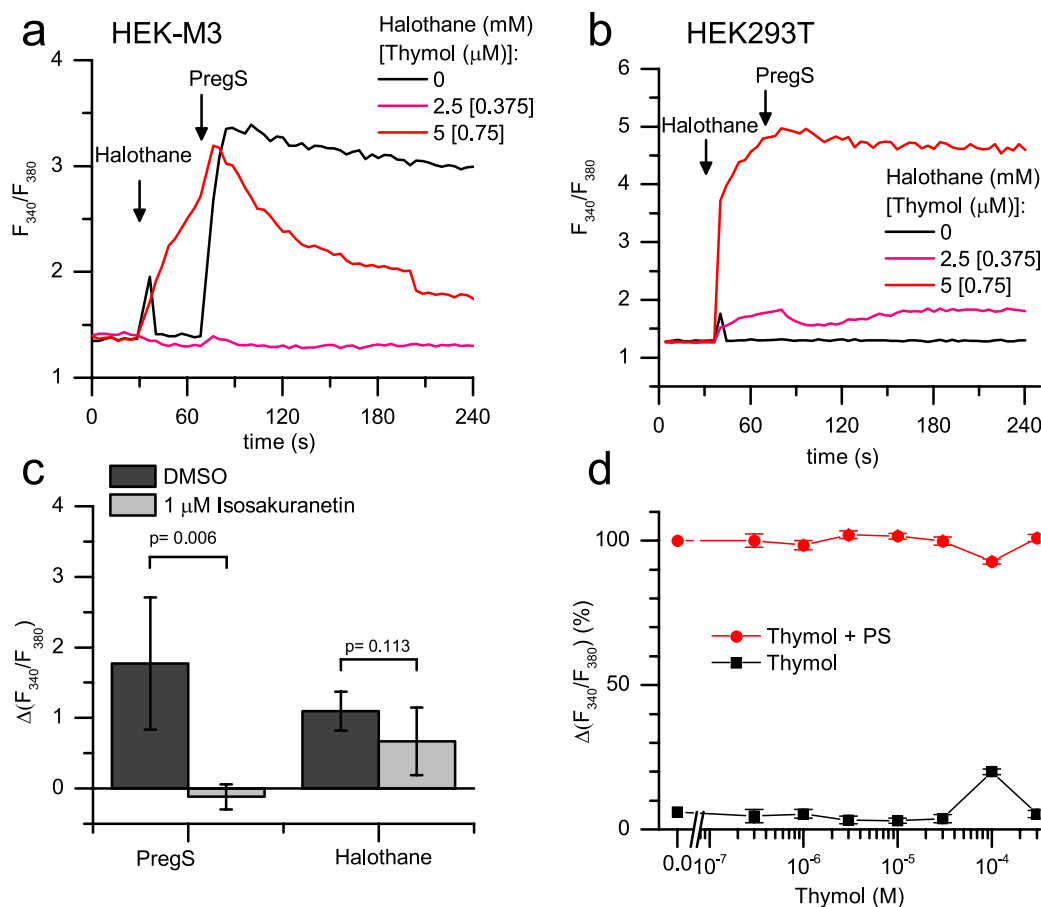


Fig. 3. High concentration of halothane induced Ca²⁺ signals independently of TRPM3 and thymol used in 150 ppm as stabilizer in halothane. (a-b) Representative Ca²⁺ signals evoked by halothane applied in high concentration in HEK-M3 (a) and HEK293T (b) cells. (c) Statistical analysis of PregS (PS, 10 μM) and halothane (5 mM) induced Ca²⁺ signals in the presence and absence of isosakuranetin in HEK-M3 cells using two-tailed Student's *t*-test for independent samples. Amplitude was measured within the 1st minute after the application of the compounds. (d) Dose-response relationship of thymol on HEK-M3 cells, before and after applying 10 μM PregS, as shown in panel (a-b), but thymol was applied without halothane. Data are presented as mean ± SD, n = 5 in each group.

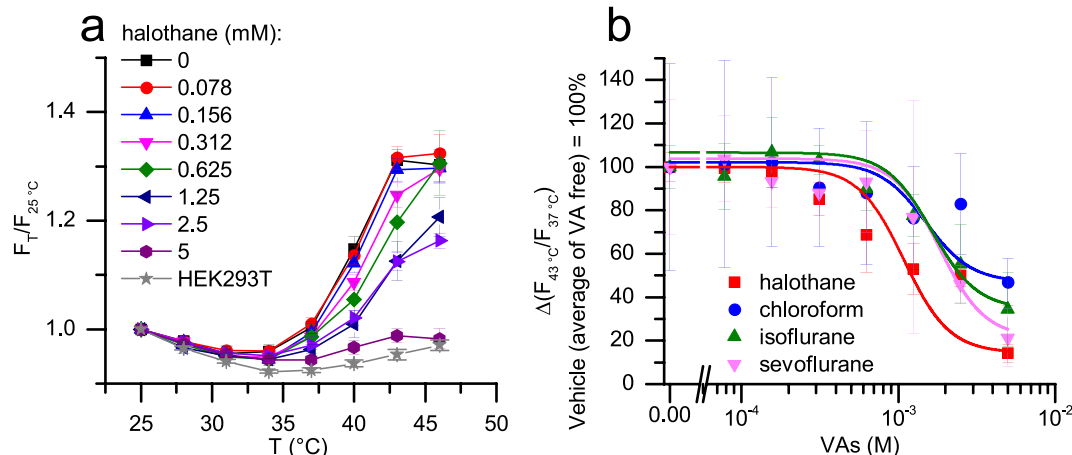


Fig. 4. VAs inhibited thermal activation of TRPM3. (a) Changes in intracellular Ca²⁺ concentration of HEK-M3 cells upon elevating temperature in the presence of various concentrations of halothane as indicated in the figure. Native HEK293T cells were used as negative control. (b) Dose dependent inhibitory effect of VAs on the recombinant TRPM3 activated by temperature shift from 37 to 43 °C. The measurements were carried out as in panel (a). Data are presented as mean ± SD, n = 5 in each group.

of chloroform was slightly higher (ca. 1.67 mM), this value also corresponded to approximately 1.5 MAC [5]. Other VAs were less effective in clinically relevant concentrations: the IC₅₀ value for isoflurane (≈ 1.1 mM) is equivalent to about 3 MAC, whereas the IC₅₀ of sevoflurane approached 10 MAC against PregS-evoked activation. Applied at 1 mM, each VA shifted the PregS activation curve of TRPM3 toward higher concentrations. Again, halothane was found to be the most effective, as it increased the EC₅₀ of PregS approximately 50-fold. Importantly, at 1 mM, all investigated VAs inhibited the activation of native TRPM3 in sensory neurons of mouse DRGs, as well. Moreover,

VAs inhibited not only the activity of TRPM3 induced by PregS, but they also inhibited the effect of the synthetic agonist CIM0216 and the heat-induced TRPM3 responses with very similar potencies.

The sensitivity of TRPM3 toward some VAs seems to be slightly lower than sensitivity of ion channels generally believed to mediate anaesthesia. Clinically relevant concentrations (≈ 1 MAC) of volatile anaesthetics activate several members of the K2P channel family known to conduct background K⁺ currents, which crucially contribute to the negative membrane potential [3]. For example, the EC₅₀ of halothane and sevoflurane that induce TASK-1 mediated K⁺ currents were

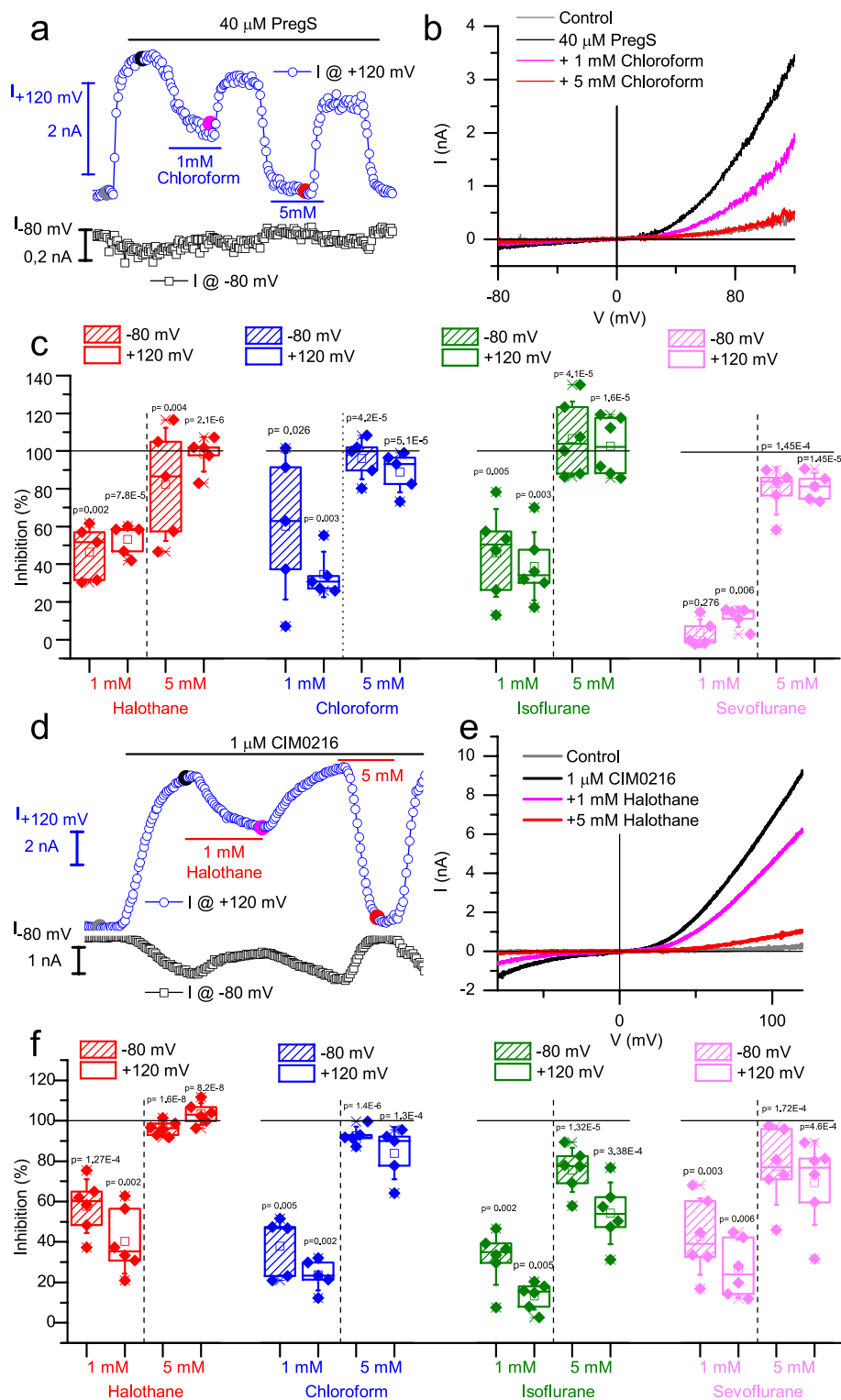


Fig. 5. Reversible inhibition of whole-cell TRPM3 currents by various VAs. (a) Representative time courses illustrating the effect of PregS and chloroform on TRPM3 mediated transmembrane currents at -80 and $+120$ mV. Currents were measured during a voltage ramp from -150 to $+150$ mV applied at every 2 s. (b) I/V relationship of the transmembrane currents at different time points as indicated in panel (a), illustrating the concentration dependent inhibition of PregS induced currents by chloroform. (c) Statistical analysis of VAs' effect on PregS induced transmembrane currents ($n = 5$ in each group, except in case of isoflurane, where $n = 6$). The measurements were carried out as shown in panel (a). (d) Representative time courses illustrating the effect of CIM0216 and halothane on TRPM3 mediated transmembrane currents at -80 and $+120$ mV. A voltage ramp from -150 to $+150$ mV was applied at every 2 s. (e) I/V relationship of the transmembrane currents at different time points as indicated in panel (d), illustrating the concentration dependent inhibition of CIM0216 induced currents by halothane. (f) Statistical analysis of VAs' effect on CIM0216 induced transmembrane currents ($n = 6$, except in case of chloroform, where $n = 5$). The measurements were carried out as in panel (d). Effect of VAs was compared to the agonist (PregS or CIM0216) induced current before applying the VAs (one sample t-test, control agonist induced current is considered as 100%). Box plots represent the range between 25 and 75 percentile values, horizontal lines mark the median values, square symbols mark the means and whiskers represent SD.

0.23 mM and 0.29 mM (near to 1 MAC), respectively [48]. Moreover, NMDA receptor mediated currents were also effectively inhibited by isoflurane and sevoflurane with reported IC_{50} values between 0.25 and 1.3 MAC and ca. 1.25 MAC, respectively [49,50]. The EC_{50} of isoflurane and sevoflurane potentiating GABA induced activity of GABA_A receptors was found also around 1 MAC (0.29 mM and 0.33 mM, respectively) [49,51]. However, the potency of halothane inhibiting NMDA receptor mediated postsynaptic excitatory currents ($IC_{50} = 0.57$ mM, equivalent with ca. 2 MAC) [52] and potentiating

GABA induced GABA_A currents ($EC_{50} = 0.67$ mM, ca. 2 MAC) [53] were very close to the value we found for TRPM3.

Although we analysed the $\alpha 2$ variant and native channels from mice, we strongly believe that our findings can be easily extrapolated to native human channels which is not characterized functionally. Until today, the best characterized variant is the mTRPM3 $\alpha 2$ [54] which functionally seem to be hardly distinguishable from the native mouse and the recombinant human TRPM3: each of these variants form Ca²⁺-permeable cation channels [55–57], are activated by PregS [58,59],

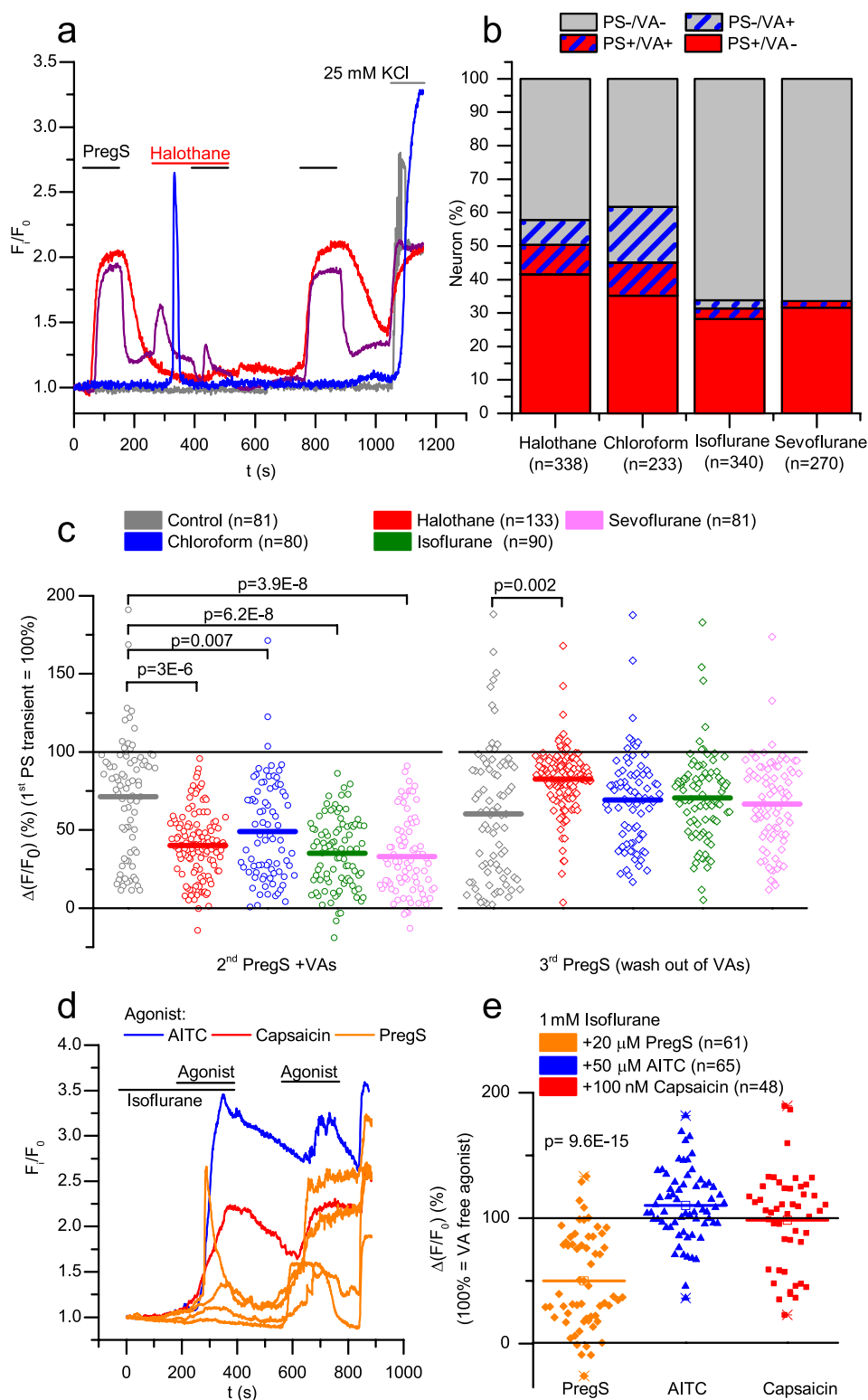


Fig. 6. VAs inhibited TRPM3 dependent Ca^{2+} transients in somatosensory neurons isolated from mouse DRGs. (a) Representative traces showing typical changes of intracellular Ca^{2+} concentration in DRG neurons from wild-type mice in response to 20 μ M PregS, 1 mM halothane, and their combination as indicated in the panel. 25 mM KCl was used as positive control to depolarize the neuronal cell membrane. (b) Percentage of DRG neurons responding to PregS (PS+) and various VAs applied in 1 mM (VA+). The measurements were carried out as in panel (a). (c) Statistical analysis of VAs' effect (1 mM each) on PregS induced Ca^{2+} transients in PregS +VA- sensory neurons. Values are given as percentage of the first PregS-induced Ca^{2+} transient without VAs. Dots represents individual neurons, and horizontal lines indicate mean values. Effect of VAs was compared to the vehicle treated control group by ANOVA and Dunnett's post-hoc test. (d) Representative traces showing typical changes in intracellular Ca^{2+} concentration in DRG neurons in response to PregS (multiple traces), AITC, and capsaicin in the presence and absence of 1 mM isoflurane, as indicated in the figure. (e) Statistical analysis on the amplitude of PregS, AITC and capsaicin induced Ca^{2+} in the presence and absence of 1 mM isoflurane. Measurements were carried out as in panel (d). Effect of isoflurane was compared to transients evoked by isoflurane free agonist as 100% by one-sample *t*-test. Dots represents individual neurons, and horizontal lines indicate mean values.

and undergo very similar regulation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [60,61] and by the $\beta\gamma$ subunit of G protein coupled receptors [62–65]. Heat sensitivity is also a shared feature of the recombinant (mTRPM3 α 2) and native TRPM3 channels [27,28]. Importantly, both mouse and human TRPM3 were effectively blocked by diclofenac and primidone [59,66]. These close functional and pharmacological similarities suggest that our findings on mouse TRPM3 can be generalized to native human channels.

While our results indicate that VAs inhibit homotetrameric TRPM3,

potential heteromerization between different TRP channel subunits can influence the functional characteristic of the tetramer channels, as described for example for the thermosensitive members of the TRPV family [67,68]. However, available data do not suggest significant participation of TRPM3 in forming heteromeric TRP channels. Although the closest relative TRPM1 was shown to be able to form heteromultimeric channels with TRPM3, TRPM4 was found not to interact with TRPM3 [69]. Considering that expression of TRPM1 is mainly restricted to melanocytes and retinal bipolar cells [70,71], and it is not

expressed in mouse DRGs [72], we do not assume significant heteromerization which would influence the responsiveness of TRPM3 to VAs. However, PregS and VAs induced responses may be influenced by the presence of alternative targets expressed by sensory neurons. Indeed, although ca. half of the sensory neurons isolated from wild type DRG are activated by PregS and considered as TRPM3+ neurons, about 10% of the neurons obtained from TRPM3-/- mice are also activated by PregS [27,28] indicating the presence of TRPM3 independent mechanisms. This has to be considered when interpreting our experiments carried out on sensory neurons: a low percentage of the PregS induced responses is probably independent of TRPM3. However the exact nature of additional target(s) is mainly elusive. Although sensory neurons of the DRG express both NMDA and GABA_A receptors, their role is questionable in PregS induced responses without their primary ligands.

Although an emerging body of evidence supports the direct action of VAs on TRP channels, we have only a limited knowledge about the underlying mechanisms and the potential binding sites. Studies on TRPA1 and TRPV1 highlighted the role of the pore domain in forming the binding pocket for VAs [43,73], although molecular dynamics simulation suggested multiple binding sites on TRPV1 [74]. Our experiments did not directly address the mechanism of action of VAs on TRPM3, but we observed in our electrophysiological measurements that VAs inhibited not only the canonical pore currents but also the alternative pore currents induced by CIM0216 at negative membrane potential [30]. These currents are mediated by the opening of an alternative permeation pathway established by the voltage sensing domain of the channel [29,31,75]. The finding that both the canonical and the alternative pore mediated currents are blocked by VAs indicates that VAs do not act as classical pore blockers, but rather inhibit channel gating via a conformational change affecting activation by various mechanisms.

Our results not only reveal an additional ion channel affected by VAs, but also extend our knowledge about the pharmacological interactions of TRPM3 that potentially modulate sensory functions mediated by this channel. TRP channels are promising targets pursued by several pharmaceutical companies for the development of novel drugs to manage several, mostly pain related, clinical syndromes [22,76,77]. Despite significant efforts, several TRP-targeting drugs, in particular the first generation of antagonists targeting TRPV1, failed in clinical trials due to undesirable side effects such as hyperthermia and impaired noxious heat sensation [22,78,79]. From this point of view, TRPM3 may be a safer target, since its activation by PregS, in contrast to capsaicin, a potent and selective activator of TRPV1 [80], did not affect core body temperature [28]. To date, only a few blockers of TRPM3 have been characterised, and in animal models some of these were indeed found to inhibit TRPM3-mediated pain, including the flavanone derivative isosakuranetin [81] or the antiepileptic drug primidone [66]. Our results introduce VAs as a new class of TRPM3 inhibitors. A potential advantage of VAs is that they are well established, approved compounds and large amount of data available about their safety in human applications. However, their slightly lower affinity to TRPM3 than to several other targets, e.g. to GABA_A and K2P channels, can limit their usage in clinical applications as TRPM3 targeting blockers. In spite of concerns about specificity of VAs, our data provide important new information contributing to the characterization of TRPM3 as potential pharmacological target of novel analgesics. The knowledge about the general mechanism of action of VAs may help identify targetable regions and basic biophysical and molecular interactions which can be utilized in future studies applying rational drug design approach. In the other hand, characterizing VAs, as a new class of chemicals inhibiting TRPM3 may also advance the field of pharmacology of TRP channels.

In conclusion, we characterised TRPM3 on sensory neurons as a potential target of VAs. These findings may contribute to the better understanding of the analgesic effect of VAs, and may aid in the further development of TRPM3 modulators as novel analgesics.

5. Authors' contributions

Balázs Kelemen, Thomas Voets, Tamás Bíró and Balázs István Tóth conceptualized the project and designed the study. Balázs Kelemen, Erika Lisztes, Anita Vladár, Martin Hanyicska, János Almássy, Attila Oláh, Attila Gábor Szöllösi, Zsófia Péntes, János Posta, Balázs István Tóth conducted the research presented in the manuscript. Balázs Kelemen, János Almássy, Attila Oláh, Attila Gábor Szöllösi, János Posta, Thomas Voets, Tamás Bíró, and Balázs István Tóth performed formal analysis of the results. All authors contributed significantly to the writing, editing and review of the final version of the manuscript. Tamás Bíró and Balázs István Tóth were responsible for funding acquisition.

CRediT authorship contribution statement

Balázs Kelemen: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Erika Lisztes:** Investigation, Writing - original draft. **Anita Vladár:** Investigation, Writing - original draft. **Martin Hanyicska:** Investigation, Writing - original draft. **János Almássy:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Attila Oláh:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Attila Gábor Szöllösi:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Zsófia Péntes:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **János Posta:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Thomas Voets:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Tamás Bíró:** Funding acquisition, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Balázs István Tóth:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Project administration, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

TB and AO provide consultancy services to Phytects Inc. (TB) and Botanix Pharmaceuticals Ltd. (AO). TV is co-inventor on patents entitled "Treatment of pain" derived from WO2012149614, and his lab has received research funding for pain-related research from industrial parties. Botanix Pharmaceuticals Ltd, Phytects Inc., and the founding sponsors had no role in conceiving the study, designing the experiments, writing of the manuscript, or in the decision to publish it. Other authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The presented work was supported by research grants of the National Research, Development and Innovation Office (K_120187, PD_121360, PD_128034, FK_125053, FK_125055, GINOP-2.3.2-15-2016-00050). The project has received funding from the EU's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 739593. The work of AO, AGSz, MH and BIT was supported by the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology (ÚNKP-19-4-DE-287, ÚNKP-19-4-DE-142, ÚNKP-19-3-I-DE-140, and ÚNKP-19-4-DE-285). The work of AO, AGSz, JA, and BIT was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences and JA was supported by the Lajos Szodoray Research Scholarship of the Faculty of Medicine, University of Debrecen.

References

- [1] J.G. Bovill, Inhalation anaesthesia: from diethyl ether to xenon, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2008) 121–142, https://doi.org/10.1007/978-3-540-74806-9_6.
- [2] N.P. Franks, General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal, *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (2008) 370–386, <https://doi.org/10.1038/nrn2372>.
- [3] Y. Li, J. Xu, Y. Xu, X.-Y. Zhao, Y. Liu, J. Wang, G.-M. Wang, Y.-T. Lv, Q.-Y. Tang,

- Z. Zhang, Regulatory effect of general anesthetics on activity of potassium channels, *Neurosci. Bull.* 34 (2018) 887–900, <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0239-1>.
- [4] P.S. Garcia, S.E. Kolesky, A. Jenkins, General anesthetic actions on GABA(A) receptors, *Curr. Neuropharmacol.* 8 (2010) 2–9, <https://doi.org/10.2174/157015910790909502>.
- [5] N.P. Franks, W.R. Lieb, Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia, *Nature* 367 (1994) 607–614, <https://doi.org/10.1038/367607a0>.
- [6] C. Nau, Voltage-gated ion channels, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2008) 85–92, https://doi.org/10.1007/978-3-540-74806-9_4.
- [7] B. Nilius, T. Voets, TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels, *Pflügers Arch.* 451 (2005) 1–10, <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1462-y>.
- [8] S.F. Pedersen, G. Owsianik, B. Nilius, TRP channels: an overview, *Cell Calcium* 38 (2005) 233–252, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.028>.
- [9] B. Nilius, G. Owsianik, The transient receptor potential family of ion channels, *Genome Biol.* 12 (2011) 218, <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>.
- [10] D.E. Clapham, TRP channels as cellular sensors, *Nature* 426 (2003) 517–524, <https://doi.org/10.1038/nature02196>.
- [11] T. Voets, K. Talavera, G. Owsianik, B. Nilius, Sensing with TRP channels, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 85–92, <https://doi.org/10.1038/nchembio0705-85>.
- [12] B. Nilius, G. Owsianik, T. Voets, J.A. Peters, Transient receptor potential cation channels in disease, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 165–217, <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2006>.
- [13] B.I. Tóth, B. Nilius, Transient Receptor Potential Dysfunctions in Hereditary Diseases: TRP Channelopathies and Beyond, in: *TRP Channels as Therapeutic Targets*, Academic Press, Boston, 2015: pp. 13–33. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124200241000023> (accessed September 1, 2016).
- [14] K. Talavera, B. Nilius, T. Voets, Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers, *Trends Neurosci.* 31 (2008) 287–295, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.03.002>.
- [15] J. Vriens, B. Nilius, T. Voets, Peripheral thermosensation in mammals, *Nat. Rev. Neurosci.* 15 (2014) 573–589, <https://doi.org/10.1038/nrn3784>.
- [16] D.N. Cortright, A. Szallasi, TRP channels and pain, *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 1736–1749.
- [17] D. Julius, TRP channels and pain, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29 (2013) 355–384, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833>.
- [18] B.I. Tóth, A. Szallasi, T. Bíró, Transient receptor potential channels and itch: how deep should we scratch? *Handb. Exp. Pharmacol.* 226 (2015) 89–133, https://doi.org/10.1007/978-3-662-44605-8_6.
- [19] C. Moore, R. Gupta, S.-E. Jordt, Y. Chen, W.B. Liedtke, Regulation of pain and Itch by TRP channels, *Neurosci. Bull.* 34 (2018) 120–142, <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0200-8>.
- [20] X. Dong, X. Dong, Peripheral and central mechanisms of itch, *Neuron* 98 (2018) 482–494, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.023>.
- [21] N.A. Veldhuis, D.P. Poole, M. Grace, P. McIntyre, N.W. Bunnett, The G protein-coupled receptor-transient receptor potential channel axis: molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation, *Pharmacol. Rev.* 67 (2015) 36–73, <https://doi.org/10.1124/pr.114.009555>.
- [22] M.M. Moran, M.A. McAlexander, T. Bíró, A. Szallasi, Transient receptor potential channels as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 601–620, <https://doi.org/10.1038/nrd3456>.
- [23] J.A. Matta, P.M. Cornett, R.L. Miyares, K. Abe, N. Sahibzada, G.P. Ahern, General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation, *PNAS* 105 (2008) 8784–8789, <https://doi.org/10.1073/pnas.0711038105>.
- [24] H. Eilers, F. Cattaruzza, R. Nassini, S. Materazzi, E. Andre, C. Chu, G.S. Cottrell, M. Schumacher, P. Geppetti, N.W. Bunnett, Pungent general anesthetics activate transient receptor potential-A1 to produce hyperalgesia and neurogenic bronchoconstriction, *Anesthesiology* 112 (2010) 1452–1463, <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181d94e00>.
- [25] P.M. Cornett, J.A. Matta, G.P. Ahern, General anesthetics sensitize the capsaicin receptor transient receptor potential V1, *Mol. Pharmacol.* 74 (2008) 1261–1268, <https://doi.org/10.1124/mol.108.049684>.
- [26] F. Vanden Abeele, A. Kondratskiy, C. Dubois, G. Shapovalov, D. Gkika, J. Busserolles, Y. Shuba, R. Skryma, N. Prevarskaia, Complex modulation of the cold receptor TRPM8 by volatile anaesthetics and its role in complications of general anaesthesia, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 4479–4489, <https://doi.org/10.1242/jcs.113631>.
- [27] I. Vandewauw, K. De Clercq, M. Mulier, K. Held, S. Pinto, N. Van Ranst, A. Segal, T. Voet, R. Vennekens, K. Zimmermann, J. Vriens, T. Voets, A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing, *Nature* 555 (2018) 662–666, <https://doi.org/10.1038/nature26137>.
- [28] J. Vriens, G. Owsianik, T. Hofmann, S.E. Philipp, J. Stab, X. Chen, M. Benoit, F. Xue, A. Janssens, S. Kerselaers, J. Oberwinkler, R. Vennekens, T. Gudermann, B. Nilius, T. Voets, TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat, *Neuron* 70 (2011) 482–494, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.051>.
- [29] J. Vriens, K. Held, A. Janssens, B.I. Tóth, S. Kerselaers, B. Nilius, R. Vennekens, T. Voets, Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel, *Nat. Chem. Biol.* 10 (2014) 188–195, <https://doi.org/10.1038/nchembio.1428>.
- [30] K. Held, T. Kichko, K. De Clercq, H. Klaassen, R. Van Bree, J.-C. Vanherck, A. Marchand, P.W. Reeh, P. Chaltin, T. Voets, J. Vriens, Activation of TRPM3 by a potent synthetic ligand reveals a role in peptide release, *PNAS* 112 (2015) E1363–E1372, <https://doi.org/10.1073/pnas.1419845112>.
- [31] K. Held, F. Gruss, V.D. Aloï, A. Janssens, C. Ulens, T. Voets, J. Vriens, Mutations in the voltage-sensing domain affect the alternative ion permeation pathway in the TRPM3 channel, *J. Physiol. (Lond.)* 596 (2018) 2413–2432, <https://doi.org/10.1113/JP274124>.
- [32] T. Seto, T. Mashimo, I. Yoshiya, M. Kanashiro, Y. Taniguchi, The solubility of volatile anaesthetics in water at 25.0 degrees C using 19F NMR spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 1–7.
- [33] H. Xu, M. Delling, J.C. Jun, D.E. Clapham, Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels, *Nat. Neurosci.* 9 (2006) 628–635, <https://doi.org/10.1038/nn1692>.
- [34] A.K. Vogt-Eisele, K. Weber, M.A. Sherkheli, G. Vielhaber, J. Panten, G. Gisselmann, H. Hatt, Monoterpenoid agonists of TRPV3, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2007) 530–540, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707245>.
- [35] S.P. Lee, M.T. Buber, Q. Yang, R. Cerne, R.Y. Cortés, D.G. Sprou, R.W. Bryant, Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 1739–1749, <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.85>.
- [36] N.P. Franks, W.R. Lieb, Selective actions of volatile general anaesthetics at molecular and cellular levels, *Br. J. Anaesth.* 71 (1993) 65–76, <https://doi.org/10.1093/bja/71.1.65>.
- [37] F.H. Yu, V. Yarov-Yarovoy, G.A. Gutman, W.A. Catterall, Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 387–395, <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.13>.
- [38] P.A. Goldstein, HCN1 channels as targets for volatile anesthetics: coming to the fore, *Anesth. Analg.* 121 (2015) 594–596, <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000871>.
- [39] M.I. Lioudyno, A.M. Birch, B.S. Tanaka, Y. Sokolov, A.L. Goldin, K.G. Chandry, J.E. Hall, M.T. Alkire, Shaker-related potassium channels in the central medial nucleus of the thalamus are important molecular targets for arousal suppression by volatile general anesthetics, *J. Neurosci.* 33 (2013) 16310–16322, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0344-13.2013>.
- [40] H.C. Hemmings, Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anaesthetics, *Br. J. Anaesth.* 103 (2009) 61–69, <https://doi.org/10.1093/bja/aep144>.
- [41] Y.M. Bahnsi, H.M. Wright, C.J. Milligan, A.M. Dedman, F. Zeng, P.M. Hopkins, A.N. Bateson, D.J. Beech, Modulation of TRPC5 cation channels by halothane, chloroform and propofol, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 1505–1512, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707689>.
- [42] K. Zimmermann, J.K. Lennerz, A. Hein, A.S. Link, J.S. Kaczmarek, M. Delling, S. Uysal, J.D. Pfeifer, A. Riccio, D.E. Clapham, Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system, *PNAS* 108 (2011) 18114–18119, <https://doi.org/10.1073/pnas.1115387108>.
- [43] C. Kimball, J. Luo, S. Yin, H. Hu, A. Dhaka, The pore loop domain of TRPV1 is required for its activation by the volatile anesthetics chloroform and isoflurane, *Mol. Pharmacol.* 88 (2015) 131–138, <https://doi.org/10.1124/mol.115.098277>.
- [44] F. Li, C.J. Guo, C.-C. Huang, G. Yu, S.M. Brown, S. Xu, Q. Liu, Transient receptor potential A1 activation prolongs isoflurane induction latency and impairs respiratory function in mice, *Anesthesiology* 122 (2015) 768–775, <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000607>.
- [45] T. Mutoh, Y. Taki, H. Tsubone, Desflurane but not sevoflurane augments laryngeal C-fiber inputs to nucleus solitarii neurons by activating transient receptor potential-A1, *Life Sci.* 92 (2013) 821–828, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.02.015>.
- [46] T.I. Kichko, F. Niedermirtil, A. Leffler, P.W. Reeh, Irritant volatile anesthetics induce neurogenic inflammation through TRPA1 and TRPV1 channels in the isolated mouse trachea, *Anesth. Analg.* 120 (2015) 467–471, <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000568>.
- [47] N.P. Franks, W.R. Lieb, Temperature dependence of the potency of volatile general anesthetics: implications for in vitro experiments, *Anesthesiology* 84 (1996) 716–720, <https://doi.org/10.1097/0000542-199603000-00027>.
- [48] J.E. Sirois, Q. Lei, E.M. Talley, C. Lynch, D.A. Bayliss, The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics, *J. Neurosci.* 20 (2000) 6347–6354.
- [49] Z. Ming, D.J. Knapp, R.A. Mueller, G.R. Breeze, H.E. Criswell, Differential modulation of GABA- and NMDA-gated currents by ethanol and isoflurane in cultured rat cerebral cortical neurons, *Brain Res.* 920 (2001) 117–124, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03044-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03044-X).
- [50] M.W. Hollmann, H.T. Liu, C.W. Hoenemann, W.H. Liu, M.E. Durieux, Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. Part II: interactions with volatile anesthetics, *Anesth. Analg.* 92 (2001) 1182–1191, <https://doi.org/10.1097/0000539-200105000-00020>.
- [51] K. Nishikawa, N.L. Harrison, The actions of sevoflurane and desflurane on the gamma-aminobutyric acid receptor type A: effects of TM2 mutations in the alpha and beta subunits, *Anesthesiology* 99 (2003) 678–684, <https://doi.org/10.1097/0000542-200309000-00024>.
- [52] M. Perouansky, E.D. Kirson, Y. Yaari, Mechanism of action of volatile anesthetics: effects of halothane on glutamate receptors in vitro, *Toxicol. Lett.* 100–101 (1998) 65–69, [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00166-0).
- [53] L.H. Lin, L.L. Chen, J.A. Zirrolli, R.A. Harris, General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acid receptors expressed by *Xenopus* oocytes: lack of involvement of intracellular calcium, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 (1992) 569–578.
- [54] J. Oberwinkler, S.E. Philipp, TRPM3, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 427–459, https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_17.
- [55] C. Grimm, R. Kraft, S. Sauerbruch, G. Schultz, C. Harteneck, Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21493–21501, <https://doi.org/10.1074/jbc.M300945200>.
- [56] N. Lee, J. Chen, L. Sun, S. Wu, K.R. Gray, A. Rich, M. Huang, J.-H. Lin, J.N. Feder, E.B. Janovitz, P.C. Levesque, M.A. Blunar, Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3), *J. Biol. Chem.* 278

- (2003) 20890–20897, <https://doi.org/10.1074/jbc.M211232200>.
- [57] J. Oberwinkler, A. Lis, K.M. Giehl, V. Flockerzi, S.E. Philipp, Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22540–22548, <https://doi.org/10.1074/jbc.M503092200>.
- [58] T.F.J. Wagner, S. Loch, S. Lambert, I. Straub, S. Mannebach, I. Mathar, M. Düfer, A. Lis, V. Flockerzi, S.E. Philipp, J. Oberwinkler, Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 1421–1430, <https://doi.org/10.1038/ncb1801>.
- [59] H. Suzuki, E. Sasaki, A. Nakagawa, Y. Muraki, N. Hatano, K. Muraki, Diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, is an antagonist of human TRPM3 isoforms, *Pharmacol. Res. Perspect.* 4 (2016) e00232, <https://doi.org/10.1002/prp2.232>.
- [60] B.I. Tóth, M. Konrad, D. Ghosh, F. Mohr, C.R. Halaszovich, M.G. Leitner, J. Vriens, J. Oberwinkler, T. Voets, Regulation of the transient receptor potential channel TRPM3 by phosphoinositides, *J. Gen. Physiol.* 146 (2015) 51–63, <https://doi.org/10.1085/jgp.201411339>.
- [61] D. Badheka, I. Borbiro, T. Rohacs, Transient receptor potential melastatin 3 is a phosphoinositide-dependent ion channel, *J. Gen. Physiol.* 146 (2015) 65–77, <https://doi.org/10.1085/jgp.201411336>.
- [62] D. Badheka, Y. Yudin, I. Borbiro, C.M. Hartle, A. Yazici, T. Mirshahi, T. Rohacs, Inhibition of transient receptor potential melastatin 3 ion channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits, *Elife* 6 (2017), <https://doi.org/10.7554/eLife.26147>.
- [63] T. Quallo, O. Alkhatib, C. Gentry, D.A. Andersson, S. Bevan, G protein $\beta\gamma$ subunits inhibit TRPM3 ion channels in sensory neurons, *Elife* 6 (2017), <https://doi.org/10.7554/eLife.26138>.
- [64] O. Alkhatib, R. da Costa, C. Gentry, T. Quallo, S. Bevan, D.A. Andersson, Promiscuous G-protein-coupled receptor inhibition of transient receptor potential melastatin 3 Ion channels by G $\beta\gamma$ subunits, *J. Neurosci.* 39 (2019) 7840–7852, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0882-19.2019>.
- [65] S. Dembla, M. Behrendt, F. Mohr, C. Goecke, J. Sondermann, F.M. Schneider, M. Schmidt, J. Stab, R. Enzeroth, M.G. Leitner, P. Nuñez-Badinez, J. Schwenk, B. Nürnberg, A. Cohen, S.E. Philipp, W. Greffrath, M. Bünemann, D. Oliver, E. Zakharian, M. Schmidt, J. Oberwinkler, Anti-nociceptive action of peripheral mu-opioid receptors by G-beta-gamma protein-mediated inhibition of TRPM3 channels, *Elife* 6 (2017), <https://doi.org/10.7554/eLife.26280>.
- [66] U. Krügel, I. Straub, H. Beckmann, M. Schaefer, Primidone inhibits TRPM3 and attenuates thermal nociception in vivo, *Pain* 158 (2017) 856–867, <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000846>.
- [67] W. Cheng, C. Sun, J. Zheng, Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity, *Protein Cell* 1 (2010) 802–810, <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0108-9>.
- [68] M. Schaefer, Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits, *Pflugers Arch.* 451 (2005) 35–42, <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1467-6>.
- [69] J. Frühwald, J. Camacho Londoño, S. Dembla, S. Mannebach, A. Lis, A. Drews, U. Wissenbach, J. Oberwinkler, S.E. Philipp, Alternative splicing of a protein domain indispensable for function of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) ion channels, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 36663–36672, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.396663>.
- [70] S. Irie, T. Furukawa, TRPM1, *Handb. Exp. Pharmacol.* 222 (2014) 387–402, https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_15.
- [71] E. Oancea, J. Vriens, S. Brauchi, J. Jun, I. Splawski, D.E. Clapham, TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes, *Sci. Signal.* 2 (2009) ra21, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000146>.
- [72] I. Vandewauw, G. Owsianik, T. Voets, Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse, *BMC Neurosci.* 14 (2013) 21, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-21>.
- [73] H.T. Ton, T.X. Phan, A.M. Abramyan, L. Shi, G.P. Ahern, Identification of a putative binding site critical for general anesthetic activation of TRPA1, *PNAS* 114 (2017) 3762–3767, <https://doi.org/10.1073/pnas.1618144114>.
- [74] C. Jorgensen, C. Domene, Location and character of volatile general anesthetics binding sites in the transmembrane domain of TRPV1, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 3920–3930, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00381>.
- [75] K. Held, T. Voets, J. Vriens, Signature and pathophysiology of non-canonical pores in voltage-dependent cation channels, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 170 (2016) 67–99, https://doi.org/10.1007/112_2015_5003.
- [76] J. Sousa-Valente, A.P. Andreou, L. Urban, I. Nagy, Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2508–2527, <https://doi.org/10.1111/bph.12532>.
- [77] B. Nilius, A. Szallasi, Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine, *Pharmacol. Rev.* 66 (2014) 676–814, <https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>.
- [78] J.-D. Brederson, P.R. Kym, A. Szallasi, Targeting TRP channels for pain relief, *Eur. J. Pharmacol.* 716 (2013) 61–76, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.003>.
- [79] M.M. Moran, TRP channels as potential drug targets, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58 (2018) 309–330, <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052832>.
- [80] M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389 (1997) 816–824, <https://doi.org/10.1038/39807>.
- [81] I. Straub, U. Krügel, F. Mohr, J. Teichert, O. Rizun, M. Konrad, J. Oberwinkler, M. Schaefer, Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo, *Mol. Pharmacol.* 84 (2013) 736–750, <https://doi.org/10.1124/mol.113.086843>.



The TRPM3 ion channel mediates nociception but not itch evoked by endogenous pruritogenic mediators

Balázs Kelemen^{a,b,c,d}, Silvia Pinto^b, Nawoo Kim^e, Erika Lisztes^a, Martin Hanyicska^{a,d}, Anita Vladár^{a,d}, Attila Oláh^a, Zsófia Péntes^{c,d}, Brian Shu^e, Joris Vriens^f, Tamás Bíró^c, Tibor Rohács^e, Thomas Voets^{b,*}, Balázs István Tóth^{a,*1}

^a Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^b Laboratory of Ion Channel Research (VIB-KU Leuven Center for Brain & Disease Research) Department of Cellular and Molecular Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium

^c Department of Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^d Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

^e Department of Pharmacology, Physiology and Neuroscience, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ, United States

^f Laboratory of Endometrium, Endometriosis and Reproductive Medicine, Department of Development and Regeneration, KU Leuven, Leuven, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

Nociception
Itch
TRP channels
TRPM3
Cheek model
Endogenous pruritogens

ABSTRACT

During the molecular transduction of itch, the stimulation of pruriceptors on sensory fibers leads to the activation or sensitization of ion channels, which results in a consequent depolarization of the neurons. These ion channels mostly belong to the transient receptor potential (TRP) channels, which are involved in nociception and thermosensation. In particular, TRPV1 and TRPA1 were described in the transduction of both thermal nociception as well as histaminergic and non-histaminergic itch. The thermosensitive TRPM3 plays an indispensable role in heat nociception together with TRPV1 and TRPA1. However, the role of TRPM3 in the development of pruritus has not been studied yet. Therefore, in this study we aimed at investigating the potential role of TRPM3 in the transduction of pruritus and pain by investigating itch- and nociception-related behavior of *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice, and by studying the activation of somatosensory neurons isolated from trigeminal ganglia upon application of algogenic and pruritogenic substances. Activators of TRPM3 evoked only nocifensive responses, but not itch in *Trpm3*^{+/+} animals, and these nocifensive responses were abolished in the *Trpm3*^{-/-} strain. Histamine and endogenous non-histaminergic pruritogens induced itch in both *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice to a similar extent. Genetic deletion or pharmacological blockade diminished TRPM3 mediated Ca²⁺ responses of sensory neurons, but did not affect responses evoked by pruritogenic substances. Our results demonstrate that, in contrast to other thermosensitive TRP channels, TRPM3 selectively mediates nociception, but not itch sensation, and suggest that TRPM3 is a promising candidate to selectively target pain sensation.

1. Introduction

Although pain and itch are associated with clearly different subjective sensations, their general definitions emphasize common features: both can be described as an unpleasant sensation associated with protective somatosensory responses [1]. Our knowledge about how the somatosensory system manages pain and itch sensation have advanced a lot in the last two decades, but there are still several controversies and open questions regarding the relationship between nociception and

pruriception, as well as the molecular mechanisms underlying their sensory transduction. Nowadays the “selectivity theory of itch” is increasingly accepted, which states that a subpopulation of nociceptive fibers innervating the skin can be activated by various pruritogenic substances, and that the selective activation of these fibers results in itch sensation, whereas the more general activation of nociceptors evokes pain [2]. Although serious efforts were made to reveal molecular markers of itch-specific neurons [3–7], the molecular mechanisms of the sensory transduction of painful and pruritic stimuli seems to overlap

* Corresponding authors at: Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1, Hungary.

E-mail address: toth.istvan@med.unideb.hu (B.I. Tóth).

¹ TV and BIT contributed equally to the work as senior authors.

[8–13].

The activation of nociceptors is initiated by the opening of nociceptive ion channels, including thermosensitive transient receptor potential (TRP) channels, acid sensing ion channels (ASICs) [14] or P2X ionotropic purinoreceptors [15–17], which results in depolarization and consequent discharge of the nociceptive neurons. These ion channels can be directly activated by painful stimuli (extreme temperatures, acidosis or pain-evoking chemical ligands) or indirectly, via intracellular signaling pathways initiated by algogenic or inflammatory signals [18]. Thermosensitive TRP channels play an especially important role as multimodal integrators of various painful stimuli [19]. For example, TRP vanilloid 1 (TRPV1), probably the most studied thermo-TRP channel, is directly activated by noxious heat, acidosis or its potent chemical ligand capsaicin (each evoking pain) and can also be sensitized by inflammatory mediators [20–25]. Beyond TRPV1, TRPA1, TRPM8 and the recently characterized TRPM3 also play important roles in the transduction of thermal, chemical and inflammatory pain in somatosensory neurons [19,26–32]. Although the activation of pruriceptive (itch sensitive) sensory neurons is also related to the activation of ion channels partially overlapping with the nociceptor channels, they are typically activated via an indirect way: pruritic ligands bind to their metabotropic receptors thereby activating the pruritic channels via downstream signaling pathways [8,9]. A particular role of the heat-pain mediating TRPV1 and TRPA1 was also described in the transduction of histaminergic and non-histaminergic itch [11,12,33–36].

TRPM3 was recently identified as a heat sensitive TRP channel expressed by somatosensory neurons of the trigeminal and dorsal root ganglia (TGs and DRGs). Its chemical activators evoke nociception, and the channel also plays a role in inflammatory thermal hyperalgesia [30,32,37]. Together with the above mentioned TRPV1 and TRPA1, it has an essential contribution to the heat-induced nociception [38]. However, in contrast to TRPV1 and TRPA1, the potential role of TRPM3 in itch was not investigated yet. Therefore, in this study we aimed at describing its role in nociception and itch sensation by comparing itch-related and nocifensive behavior in wild type (*Trpm3*^{+/+}) and TRPM3 deficient (*Trpm3*^{-/-}) mice *in vivo*, and by exploring the responses of their sensory neurons to algogenic TRP ligands and well known endogenous pruritogens *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Animals

8–14 week-old wild-type (*Trpm3*^{+/+}, from Janvier labs, Le Genest Saint Isle, France) and TRPM3 deficient (*Trpm3*^{-/-}, established in our laboratory at KU Leuven (Leuven, Belgium) as described in our previous publication) [32] C57BL/6J mice weighted 20–30 g were used in all experiments. Only male mice were used to study itch and nocifensive behavior in the cheek assay to eliminate any potential influence of the estrus cycle on the scratching behavior, and male and female mice were used in other experiments. Mice were housed in a conventional animal facility at constant 21 °C in a 12-h light–dark cycle with unrestricted access to food and water. All animals were drug and test naïve prior being recruited to experiments. All experiments using animals were carried out in accordance with the European Union Community Council guidelines and approved by the KU Leuven Ethical Committee for Animal Experimentation under project number P021/2018 or by the Institutional Animal Care and Use Committee at Rutgers New Jersey Medical School.

2.2. Behavior assays

2.2.1. Cheek-assay

The itch-induced scratching and nociception-related behavior was selectively assessed using the cheek model paradigm [39]. Mice were habituated to a plexiglass recording chamber and the observation room

for 30 min, once daily during the week before testing. The fur of the affected cheek was shaved a day in advance of the experiment. The mouse was held tightly by the experimenter and the fur was shaved with a single movement using a small electric hair clipper (Aesculap Isis from Aesculap Suhl GmbH, Shul, Germany), carefully avoiding the whiskers and not hurting the skin. On the day of the experiment, mice were randomly allocated into experimental groups by a person who was not involved in the further investigation. Mice were placed into the plexiglass recording chamber and video recording was started. 10 min later, investigated compounds were applied s.c. via microinjections into the cheek using a 30G needle attached to a 1 ml insulin syringe. The applied doses were selected based on previous literature data and tested in pilot experiments. The following compounds were applied: 10 µg pregnenolone sulfate (PregS), 10 µg capsaicin (Caps), 5 µg CIM0216 (all from Tocris, Bristol, UK), 50 µg histamine (Hist), 10 µg serotonin (5-HT) and 150 ng endothelin-1 (ET-1) (all pruritogens from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) each dissolved in 10 µl of Ca²⁺- and Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS) with 7% of Tween-80 (Sigma-Aldrich) and injected as a 10 µl volume [39]. Then, mice were placed back into the recording chamber, the experimenter left the room and spontaneous behavior was captured for an additional 30 min after the injection. The amount of time each mouse spent scratching, the number of scratch bouts and the number of wipes on the injected site were quantified over the course of a 30-min period following the injection. One bout of scratching was defined as an episode in which a mouse lifted its hind paw and scratched continuously for any length of time, until the paw was returned to the floor or to its mouth. During treatment and behavioral scoring, investigators were blinded for genotype and treatment.

2.2.2. Calculation of scratch ratio ($R_{scratch}$)

Based on the results of the cheek assay, the pruritogenic and algogenic nature of the compounds applied was characterized by calculating a novel parameter, the scratch ratio ($R_{scratch}$), defined as: $R_{scratch} = N_{scratch}/(N_{scratch} + N_{wipe})$, where $N_{scratch}$ and N_{wipe} are the number of scratches and wipes, respectively, detected during the observation. Value of $R_{scratch}$ can vary between 0 and 1 where 0 indicates pure nociception related responses (wipes) without any scratching, and 1 represents exclusively itch-related behavioral responses. Values in the middle range of the scale are characteristic for neutral compounds inducing neither significant nociception nor itch or for compounds inducing similarly frequent nocifensive and itch responses.

2.2.3. Nape-assay

In order to further assess the potential role of TRPM3 in mediating itch in different regions of the skin, pruritogenic compounds were also injected into the nape of *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice. The animals were acclimated to the test chamber the day before the experiment for 1 h, and the nape of the neck was shaved. The experimenter restrained the mouse with one hand and carefully shaved the nape area behind the ears using small electronic clippers (PepPet, Guangdong, China). Care was taken to avoid skin and ear injury. Mice were allowed to acclimatize for 10 min before the injection took place on the day of the experiment. Pruritogenic compounds were injected s.c. into the nape, and the mouse was immediately placed back into the chamber, the experimenter left the room, and scratching behavior was video recorded for 30 min. As pruritogenic compounds, 200 µg Hist, 10 µg 5-HT, and 250 ng ET-1 dissolved in 50 µl PBS were injected. The applied doses and injection volume were selected corresponding to previous literature data and tested in pilot experiments. The records were analyzed by experimenters blinded to genotype and compound injected.

2.3. Culturing and isolation of sensory neurons

Sensory neurons of trigeminal ganglia (TGs) were obtained from 8 to 12 week-old *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice, as described before [32,37]. Briefly, mice were euthanized by CO₂, TGs were isolated and digested

with collagenase (2 mg/ml) and dispase (2,5 mg/ml) (both from Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Suspension of sensory neurons was seeded on laminin (100 µg/ml) and poly-L-ornithine HBr (500 µg/ml) (both from Sigma Aldrich) coated glass bottom culture dishes (MatTek, Ashland, MA, USA) and cultured in Neurobasal medium supplemented with 2% B-27 supplement, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin/streptomycin, 2 ng/ml glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (all from Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) and 10 ng/ml NT-4 (Peprotech, London, UK) at 37 °C in 5% CO₂ containing humidified atmosphere. Neurons were used for experiments within 24 to 36 hrs following isolation.

2.4. Fluorescent measurements of intracellular Ca²⁺ concentration

To measure the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in individual sensory neurons, we used microscope-based calcium imaging systems. On the day after the isolation, TG neurons were loaded with acetoxymethyl ester-conjugated fluorescent Ca²⁺ indicators dissolved in culturing medium. 2 µM Fura-2-AM (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) was used in experiments comparing the responses of sensory neurons from *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} animals, and 2 µM Fluo-4-AM (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) was applied when investigating the effect of pharmacological inhibition of TRPM3. Both dyes possess a K_d value for Ca²⁺ in submicromolar range, and are therefore equally suitable to detect relevant changes in cytoplasmic Ca²⁺ concentration. Fura-2-loaded cells were placed on the stage of a Nikon fluorescent microscope and captured with constant setting every 1 s (λ_{EX} :340 nm, λ_{EM} :380 nm and λ_{EM} :505 nm) and data were obtained as the ratio of the fluorescence measured at 340 and 380 nm excitation wavelengths (F_{340}/F_{380}). Fluo-4 loaded cells were placed on the stage of a Zeiss LSM 5 Live confocal microscope and captured at λ_{EX} :488 and λ_{EM} :516 once every second and data were presented as F_1/F_0 , where F_0 is the average fluorescence of the baseline (before the first compound application) and F_1 is the actual fluorescence. During the measurements, cells were continuously perfused with Ca²⁺-buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM glucose xH₂O, 10 mM HEPES, pH 7.4 (all from Sigma-Aldrich)) and different compounds were applied via the perfusion. All experiments were performed at room temperature (21–22 °C).

2.5. Materials

The endogenous TRPM3 agonist PregS, the TRPA1 agonist cinnamaldehyde (CA), the TRPV1 agonist Caps, and the exogenous TRPM3 agonist CIM0216 were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK). The TRPM3 antagonist Isosakuranetin (Isok) was obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The well-characterized pruritogen Hist was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); and the non-histaminergic endogenous pruritic mediators 5-HT and ET-1 were purchased from Abcam (Abcam, Cambridge, MA, USA) or Sigma Aldrich.

2.6. Data and statistical analysis

Origin 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) was used for analysis and data display for both *in vivo* and *in vitro* data. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22 software (IBM, Armonk, NY, USA). Kruskal-Wallis test was used to compare multiple groups. Whenever it reported significant differences, Mann-Whitney tests with Bonferroni adjustment were used as post hoc analysis for pairwise comparison (e.g. comparing the effect of several treatments within one genotype). The Mann-Whitney test was also applied to compare only two groups (e.g. *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} within a particular treatment). The distribution of various neurons between the different groups was compared using Chi-squared (χ^2) test. In every case, $P < 0.05$ was regarded as showing significant differences

between groups. If not mentioned otherwise, individual data were presented in scatterplots marking mean \pm SD.

3. Results

3.1. TRPM3 agonists induced nociception but not itch in the mouse cheek model

To assess the role of TRPM3 in itch sensation and nociception, we investigated wild type (*Trpm3*^{+/+}) and TRPM3-deficient (*Trpm3*^{-/-}) C57/Bl6 mice [32] in the “cheek model” paradigm, which allows differentiation between behavioral responses related to nociception and pruriception [39].

First, we injected the TRPM3 agonists PregS and CIM0216 to the cheek of the animals as described in the Methods section. The injection technique and behavioral analysis were optimized in preliminary experiments. As a negative control, we injected the same volume of the vehicle buffer and used the TRPV1 agonist Caps as a well-established algogenic substance to assess TRPM3-independent nocifensive responses. We found that TRPM3 agonists induced marked nocifensive responses in *Trpm3*^{+/+} animals compared to the vehicle control quantified by the number of wiping events on the injected cheek as described in the Materials and methods (Fig. 1A, Suppl. video file 1). These nocifensive responses were abolished in *Trpm3*^{-/-} animals, clearly indicating that PregS- and CIM0216-induced nociception is mediated by TRPM3 in the cheek. Caps also induced marked nocifensive behavior but it was not influenced by the deletion of *Trpm3*, demonstrating, as found earlier in other assays [32], that the effect of Caps is independent of TRPM3 in the cheek model. Importantly, similar to Caps, none of the TRPM3 agonists induced significant itch-related behavior in *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} animals, as assessed by the number of scratches and the total time spent with scratching (Fig. 1B–C).

To better characterize the quality of the sensory phenomena evoked by a particular compound, we introduced a new measure, “scratch ratio” ($R_{scratch}$) as defined in the Methods. We found that TRPM3 agonists, as well as the TRPV1 agonist Caps behaved as algogenic substances in *Trpm3*^{+/+} animals i.e. they induced mainly nociception and hardly any itch. However, in *Trpm3*^{-/-} animals, PregS and CIM0216, but not Caps, were found to behave as neutral compounds, as $R_{scratch}$ was near to 0.5 (Fig. 1D). Interestingly, PregS induced slightly more intense wiping in *Trpm3*^{+/+} animals than Caps (Fig. 1A), however detailed analysis of the observation suggested, that in the applied doses, Caps may induce more intense pain than PregS or CIM0216. For each agonist, the peak response was reached during the first 5 min, after which the responses decayed, and this decay was more pronounced in the capsaicin- than in the PregS-treated group (No. of wipes_{0-5 min} Caps vs. PregS: 52.38 \pm 22.70 vs. 53.38 \pm 36.24, $U = 55.0$, $p = 0.860$ and No. of wipes_{10-15 min} Caps vs. PregS: 6.00 \pm 5.58 vs. 18.13 \pm 10.52, $U = 91.0$, $p = 0.003$) (Fig. 1E). However, in the Caps treated group we observed additional nociception-related behavior including “tunneling” (where the animal digs a tunnel in the bedding while pressing the injected cheek to the bottom of the cage, Suppl. video file 2) and lethargy. Although, as previous studies assessing nociception in the cheek model, we restricted the quantitative analysis to the number of wipes (as a pre-defined measure), these unreported patterns of behavior in the cheek assay may also indicate nociception as a form of counter irritation, analogue to pressing or rubbing a painful area aiming at alleviating pain. These signs of nociception were more typical in the Caps injected group in the later phase of the observation, and were less characteristic for the PregS-injected group.

3.2. TRPM3 is not involved in the sensation of itch induced by Hist or non-histaminergic pruritogens 5-HT and ET-1

Although direct activation of TRPM3, similar to TRPV1, resulted exclusively in nociception and not itch, these results cannot exclude that

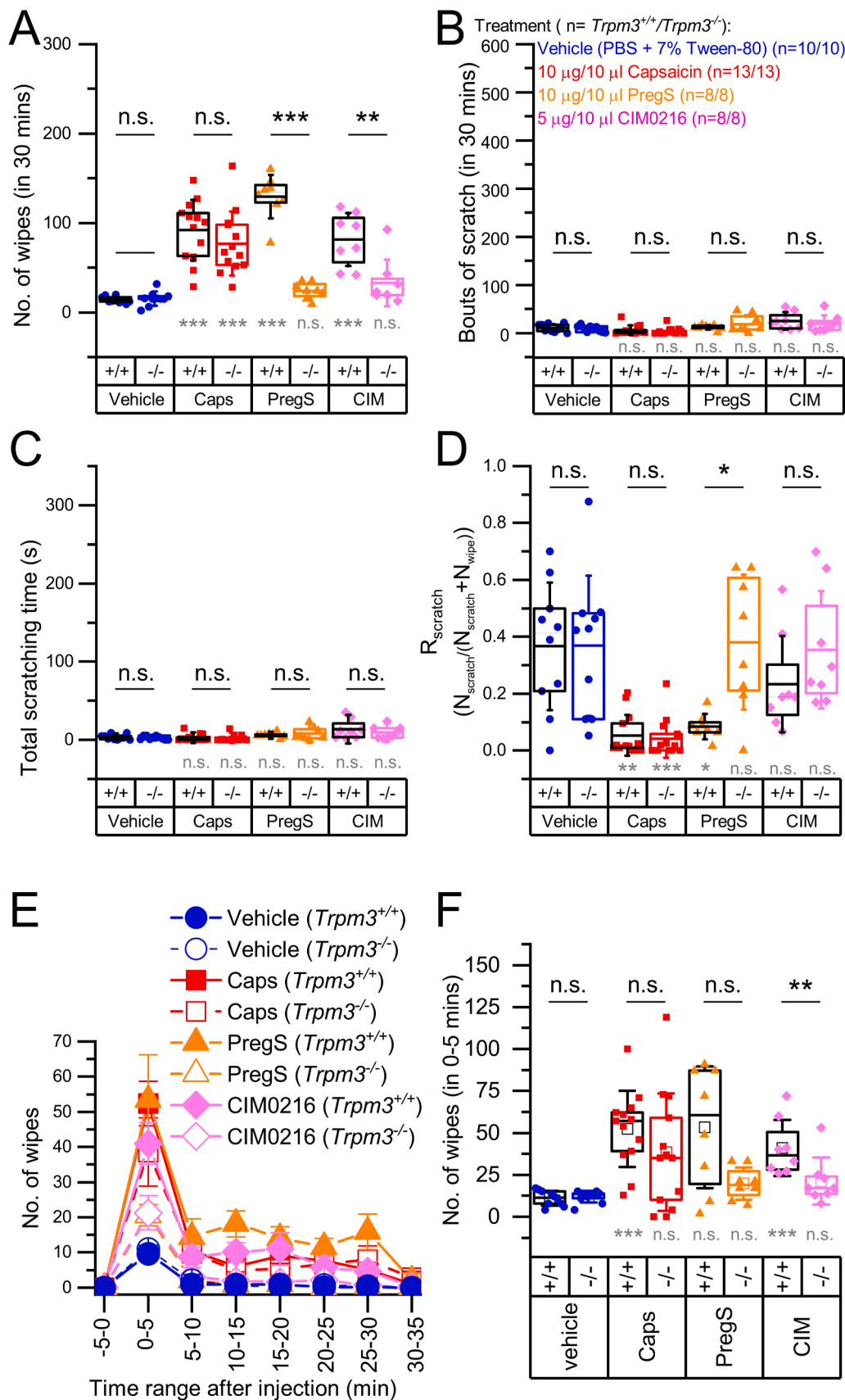


Fig. 1. Pain and itch behavior induced by TRPM3 agonist and capsaicin in the mouse cheek model *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice were injected in the cheek with the agonists indicated in the figure. (A) Number of wipes, (B) bouts of scratches, and (C) total time of scratching as determined within 30 min following the injection. (D) Scratch ratio ($R_{scratch}$) calculated as described in the methods. (E) Mean time courses of the number of wipes after injecting the agonists in 5 min-long intervals within 35 min after injection. (F) Statistical comparison of the number of wipes in the 0-5 min interval, as indicated in panel (E). Dots mark data from individual animals, boxes indicate 25-75 percentile, thick lines and thin lines in the boxes point the mean and median, respectively, whiskers show SD. n.s.: $p > 0.05$ (non-significant), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared either to the vehicle treated group within the same genotype using Kruskal-Wallis test with Bonferroni adjusted Mann-Whitney U test as post hoc analysis (grey marking) or compared between *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} within the same treatment, as indicated, using Mann-Whitney U test (black marking).

TRPM3 signaling can also contribute to the sensory transduction of pruritus, as has been described for TRPV1. Indeed, direct, general activation of TRPV1 is known to induce nociception and not itch, but TRPV1 expressed locally in pruriceptive sensory neurons takes part in the transduction of both histaminergic and some forms of non-histaminergic pruritus [9,11,31,40–42]. To investigate the role of TRPM3 in the sensory transduction of pruritus evoked by the endogenous mediators Hist, 5-HT and ET-1 (each known to evoke severe itch in both human and rodent models [43,44]), we tested these compounds in the cheek model paradigm in *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice. We found that Hist, 5-HT and ET-1 induced pronounced itch but hardly any nociception in *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} animals (Fig. 2A–C): the number of wipes detected was comparable to vehicle whereas the number of scratches and the time spent scratching were strongly elevated by each pruritogenic compound, irrespective of genotype. Most importantly, the number of scratches induced by the pruritogens was not decreased in the *Trpm3*^{-/-} strain compared to wild type animals. High R_{scratch} values also indicated that Hist, 5-HT, and ET-1 evoked a predominant pruritogenic and not algogenic effect in both strains (Fig. 2D). Interestingly, ET-1 induced itch was found to be significantly more intense in the *Trpm3*^{-/-} group than in the *Trpm3*^{+/+} group.

Since high R_{scratch} values indicated that Hist, 5-HT and ET-1 evoked mainly itch and hardly nociception, we also tested their effect injected in the nape of *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} animals. Although behavioral reactions after nape injection cannot clearly discriminate between itch and nociception (both induce similar scratching responses), known “pure” pruritogen compound-induced responses can be interpreted as signs of itch [39,44]. Studying the behavioral responses evoked by the aforementioned pruritogens in the nape, we aimed at investigating the role of TRPM3 in the innervation area of dorsal root ganglia (DRGs) to compare to the results of the cheek injections which affected the innervation area of the trigeminal ganglion (TG). We found that Hist and 5-HT evoked similarly intense pruritus in *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice, as we observed in case of cheek injection, as well (Fig. 2E). The ET-1 induced responses were also in line with the scratches evoked in the cheek model: *Trpm3*^{-/-} animals showed significantly stronger ET-1-induced itch responses than *Trpm3*^{+/+} mice.

3.3. Pruritogens activated trigeminal sensory neurons independently of TRPM3

Next, we tested whether cellular responses induced by pruritogens are related to TRPM3. For this purpose, we isolated somatosensory neurons from TGs of *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice and investigated *in vitro* cellular Ca^{2+} responses evoked by Hist, 5-HT, ET-1 and PregS, CA and Caps, agonists of TRPM3, TRPA1 and TRPV1, respectively. Different pruritogens were tested in individual experiments to avoid potential interactions. Only those cells were considered sensory neurons and included in the subsequent analysis which responded to depolarizing KCl solution or Caps applied at the end of the measurements, as shown in Fig. 3A. As expected, the ratio of PregS responsive (PregS+) neurons was strongly reduced in *Trpm3*^{-/-} TG neurons, although, consistent with previous results [32], some neurons still responded to PregS suggesting other, as yet unidentified targets available in *Trpm3*^{-/-} animals. The ratios of CA+ and Caps+ neurons were practically identical in the presence and absence of TRPM3 (Fig. 3B). Pruritogens activated a subpopulation of both PregS+ and PregS- neurons in *Trpm3*^{+/+} animals, indicating that the pruritogen-induced responses do not correlate with TRPM3 expression. Most importantly, the ratios of the neurons responding to Hist (10.7 vs. 9.9%; $\chi^2 = 0.115$, $p = 0.735$), 5-HT (21.6 vs. 17.0%; $\chi^2 = 1.489$, $p = 0.222$) and ET-1 (33.2 vs. 34.3%; $\chi^2 = 0.006$, $p = 0.939$) were not different between the *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} groups (Fig. 3C).

3.4. Pharmacological blockade of TRPM3 inhibited PregS evoked activation of trigeminal sensory neurons but did not affect pruritogen induced cellular responses

Finally, we investigated how the pharmacological blockade of TRPM3 influences cellular activation of sensory neurons isolated from TGs of *Trpm3*^{+/+} animals. TRPM3 agonist PregS, as well as Hist, 5-HT, and ET-1 were applied during intracellular Ca^{2+} measurements in the presence and absence of the TRPM3 antagonist Isok (Fig. 4). As shown earlier on DRG derived neurons [45], PregS-induced responses were strongly inhibited by Isok in a reversible way (Fig. 4A–B). In contrast, pharmacological inhibition of TRPM3 did not affect the neural activation induced by the endogenous pruritogens: neither the amplitude of the pruritogen-induced Ca^{2+} signals nor the ratio of the Hist+, 5-HT+ and ET-1+ neurons were significantly changed in the presence of 3 μM Isok (Fig. 4C–E).

4. Discussion

Emerging evidence suggests that pruriceptive neurons form a subpopulation within nociceptive neurons, rather than forming a purely pruritogen-specific peripheral sensory neuron population, [46–49] but the organization of nociceptive and pruriceptive sensory system is still unclear. Non-pruritogenic nociceptive neurons were identified to be unresponsive to pruritic chemical signals [2], and there are numerous attempts to identify itch-specific molecular markers. Such studies not only aim at identifying itch-specific/selective neurons and pathways but are also motivated by the medical need to identify molecular targets for pharmacotherapies selectively alleviating itch or pain [2,6,41,48,50,51]. TRP channels are long-chased targets for analgesic therapies, as they seem to be promising targets in the management of pruritus, as well [10,52–54]. Among TRP channels, the thermosensitive TRPV1 and TRPA1 are of special importance: they seem to be promiscuously expressed in nociceptive and pruriceptive neurons and were shown to play role in the sensory transduction of both pain and itch.

Moreover, other thermosensitive TRP channels can be also involved in the development of both itch and pain. TRPV4 and TRPV3 are expressed in non-neuronal cells of the skin, and can play roles in the release of endogenous pruritogens and algogens, especially related to inflammation [55–59]. The role of TRPV4 was described in both allergic and non-allergic pruritus by mediating 5-HT release from mast cells and keratinocytes, respectively [60], and its activation in keratinocytes results in ET-1 release, as well, which is thought to play a role in sunburn-associated pain [61]. Beyond 5-HT release, TRPV4 is also involved in the sensory transduction of 5-HT-mediated itch in the pruriceptive fibers [62], and as an osmo-mechanoreceptor it plays a role in the development of mechanical hyperalgesia [63–66]. TRPV3 is also highly expressed by keratinocytes and its activation can contribute to inflammation and several forms of itch by inducing the release of inflammatory and pruritic mediators [58,67–70], similar to non-neuronal TRPV4.

TRPM3 is also a thermosensitive nociceptor ion channel activated by noxious heat and the endogenous neurosteroid PregS. Its selective activation results in neuropeptide release from the sensory terminals and evokes nociception in rodents [30,32]. Certain ligands and ligand combinations open an extra permeability pathway in the channel, which results in a strong depolarizing current at negative membrane potentials and in the exacerbation of pain sensation, as well [30,37]. In the nociceptive system, TRPM3 functions seem to partially overlap with other thermosensitive TRP channels. Together with TRPV1 and TRPA1, TRPM3 plays a crucial role in the sensory transduction of noxious heat sensation and it was also found to be involved in inflammatory heat hyperalgesia. Moreover, beyond the functional similarities, its expression in the somatosensory neurons of DRGs largely overlaps with TRPA1 and TRPV1 [32,38]. The functional and anatomical overlap, and the molecular relationship between these thermosensitive TRP channels led to the plausible preposition that TRPM3 expressed by the somatosensory

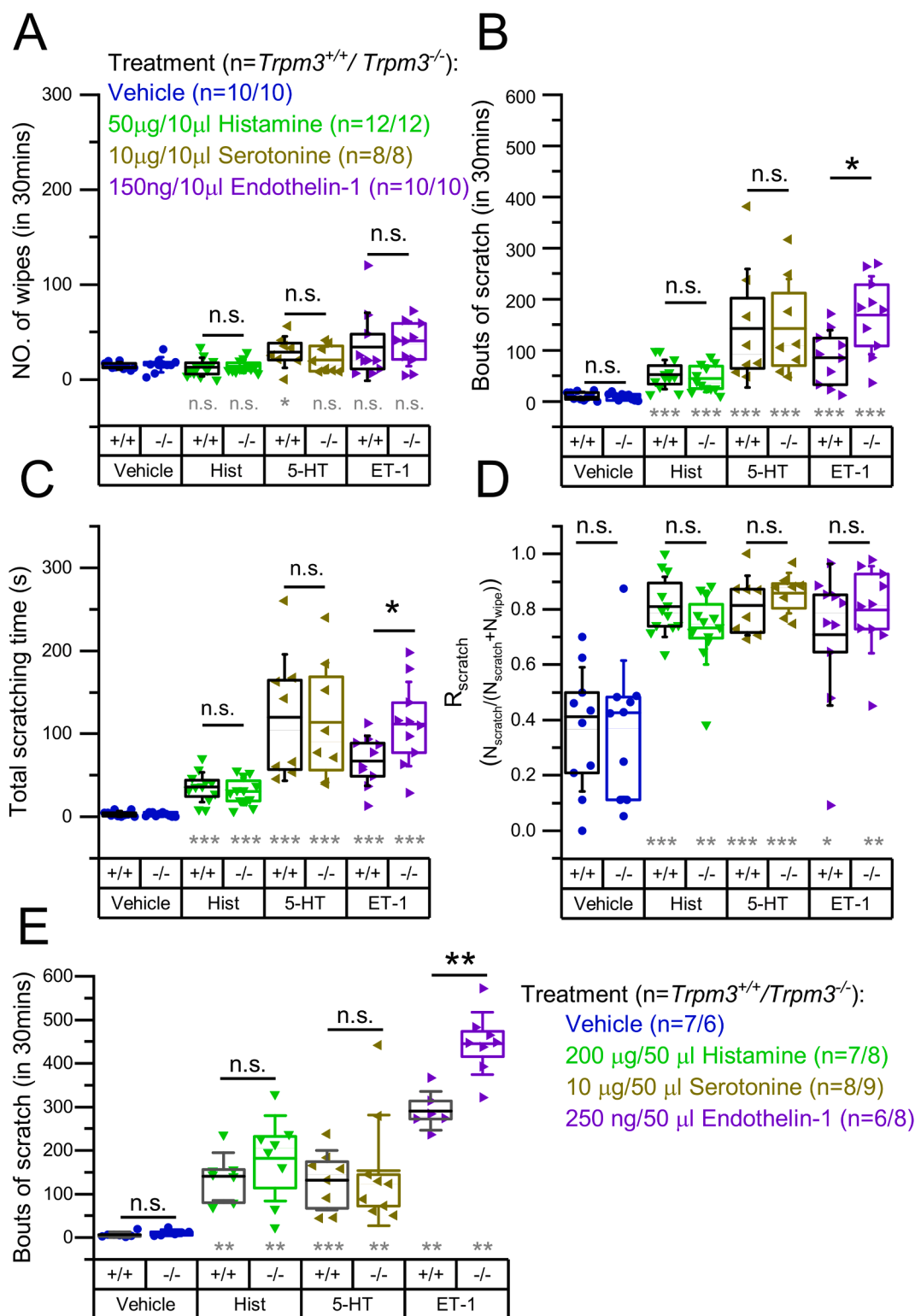


Fig. 2. Quantification of the itch and pain related behavior induced by Hist, 5-HT, and ET-1 in *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice. *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice were injected in the cheek with the pruritogens indicated in the figure. (A) Number of wipes, (B) bouts of scratches, and (C) total time of scratching as determined within 30 min following the injection. (D) Scratch ratio ($R_{scratch}$) calculated as described in the methods. (E) Bouts of scratches after injecting indicated compounds in the nape of *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice. Vehicle treated control groups presented in panel (A)–(D) are identical with those presented in Fig. 1A–D. Dots mark data from individual animals, boxes indicate 25–75 percentile, thick lines and thin lines in the boxes point the mean and median, respectively, whereas whiskers show SD. n.s.: $p > 0.05$ (non-significant), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, between *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} within the same treatment, as indicated, using Mann-Whitney *U* test (black marking) or compared to the vehicle treated group within the same genotype using Kruskal-Wallis test with Bonferroni adjusted Mann-Whitney *U* test as post hoc analysis (grey marking).

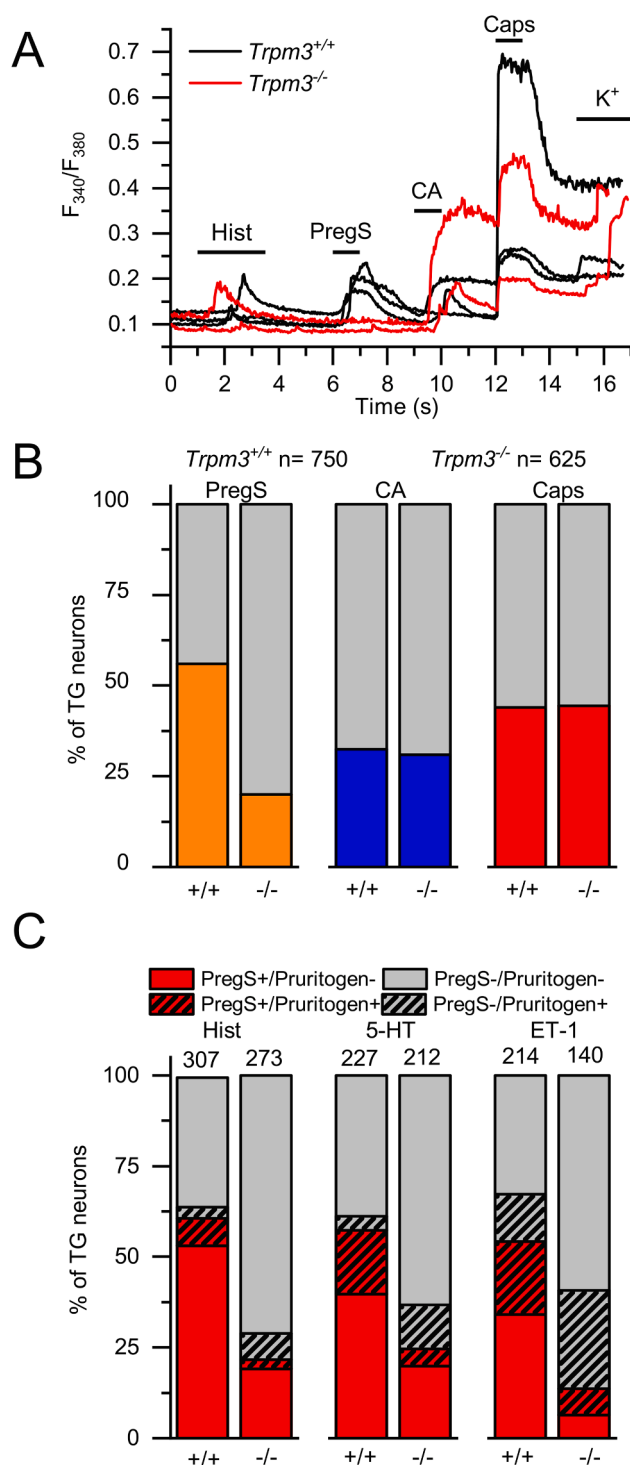


Fig. 3. Effect of pruritogens in TG neurons isolated from *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} animals. (A) Representative traces showing typical changes in intracellular Ca²⁺ concentration of TG neurons isolated from *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice in response to 100 μ M Hist, 20 μ M PregS, 100 μ M CA, 1 μ M Caps as indicated in the panel. 25 mM KCl was used as positive control to depolarize the neuronal cell membrane. (B) Percentage of TG neurons form *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice responding to PregS (PregS+), CA (CA+) and Caps (Caps+). The measurements were carried out as in panel (A). (C) Percentage of TG neurons form *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice responding to 100 mM Hist, 100 mM 5-HT and 100 nM ET-1 in the experiments. Sample size (n) is indicated over the columns. The measurements were carried out as in panel (A). In each group, neurons were isolated from ≥ 3 mice, each measured in independent experiment.

neurons could share even more functions with TRPV1 and TRPA1, for example in pruriception.

As mentioned above, beyond nociception and thermosensation, TRPV1 and TRPA1 are also important players in itch transduction at the sensory terminals: they were shown to be involved in the detection of various forms of itch (for a recent review see [9]). For example, TRPV1 was found to be involved in histamine receptor and protease activated receptor 2 (PAR2) signaling [31] and TRPA1 was shown to transmit the pruritic effect of 5-HT [71], bile acid [34], activators of Mas-Related G Protein-Coupled Receptors (Mrgprs) [35], and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) [72].

In our study, we challenged the pruriceptive role of TRPM3 for the first time and we investigated its selective role in itch and nociception using the generally accepted cheek model [44,49]. Our results clearly indicate that TRPM3 is involved in nociception but not in pruriception.

The role of TRPM3 in thermal nociception and inflammatory heat hyperalgesia is well established by previous results [32,37,38,73], and TRPM3 antagonists evoked promising analgesic effects in animal studies [45,74,75]. Our *in vivo* results obtained in the cheek model further support the previous conclusion, and demonstrate that the selective pharmacological activation of TRPM3 resulted in nociception even in the cheek, i.e., in the innervation area of TGs, and this was abolished by the genetic ablation of the channel. As opposed to nociception, TRPM3 agonists did not induce scratching behavior in the animals, suggesting that TRPM3 activation did not evoke itch sensation on its own. Although its general activation resulted exclusively in pain, these findings do not exclude that expressed in certain subpopulation of the somatosensory neurons, TRPM3 can contribute to pruritic signaling and take part in the transduction of itch. For example, it is also known from TRPV1 that its general activation by Caps evokes a burning pain but not itch sensation [44]. However, as discussed above, TRPV1 is expressed in pruriceptive nociceptors, and takes part in the transduction of histaminergic, and non-histaminergic itch [31], as well. Furthermore, if TRPV1 is expressed exclusively in pruriceptive, MrgprA3 expressing neurons, its activation with Caps results in itch but not pain sensation [41]. Therefore, we tested whether TRPM3 is necessary for the pruriceptive effect of highly relevant endogenous pruritic mediators, Hist, 5-HT and ET-1. We found that each mediator evoked similarly intense scratching in *Trpm3*^{+/+} and *Trpm3*^{-/-} mice injected to either the cheek or the nape, skin areas that are innervated by neurons from the TG and the DRGs, respectively. In good accordance with the *in vivo* findings, the ratio of the trigeminal sensory neurons activated by Hist, 5-HT, and ET-1 was not affected by the deletion of *Trpm3*, although the investigated pruritogens activated both TRPM3 expressing (PregS+) and TRPM3 non-expressing (PregS-) neurons of wild type (*Trpm3*^{+/+}) animals. Moreover, the pharmacological blockade of TRPM3 by Isok affected neither the number of pruritogen responsive neurons nor the amplitude of their Ca²⁺ transients evoked by the itch mediators. These results strongly argue for that TRPM3 does not play any significant role in cellular signaling events evoked by Hist, 5-HT or ET-1 that result in the pruritic effect of these compounds.

Intriguingly, ET-1 induced more intense scratching in *Trpm3*^{-/-} animals. This finding may be explained by the common observation and experimental findings that painful stimuli inhibit itch [76,77]. In the last decade, the underlying spinal circuits were also revealed involving vesicular glutamate transporter type 2 (Vglut2) expressing nociceptors [4,5], Bhlhb5 transcription factor expressing inhibitory interneurons and kappa opioid receptor signaling [78,79] (for a current review see [80]). Regarding our results, it is possible that the lack of TRPM3 results in decreased (basal) activity of the nociceptive neurons, which consequently leads to enhanced itch signaling in certain cases. It cannot be excluded that ET-1 itself causes a minor activation of the nociceptors which partially inhibit itch responses, but this inhibition is diminished in *Trpm3*^{-/-} animals. ET-1 was also reported to mediate nociception [81,82], although in our experiments it initiated only moderate nociceptive behavior (wiping) and was characterized by high scratch ratio as

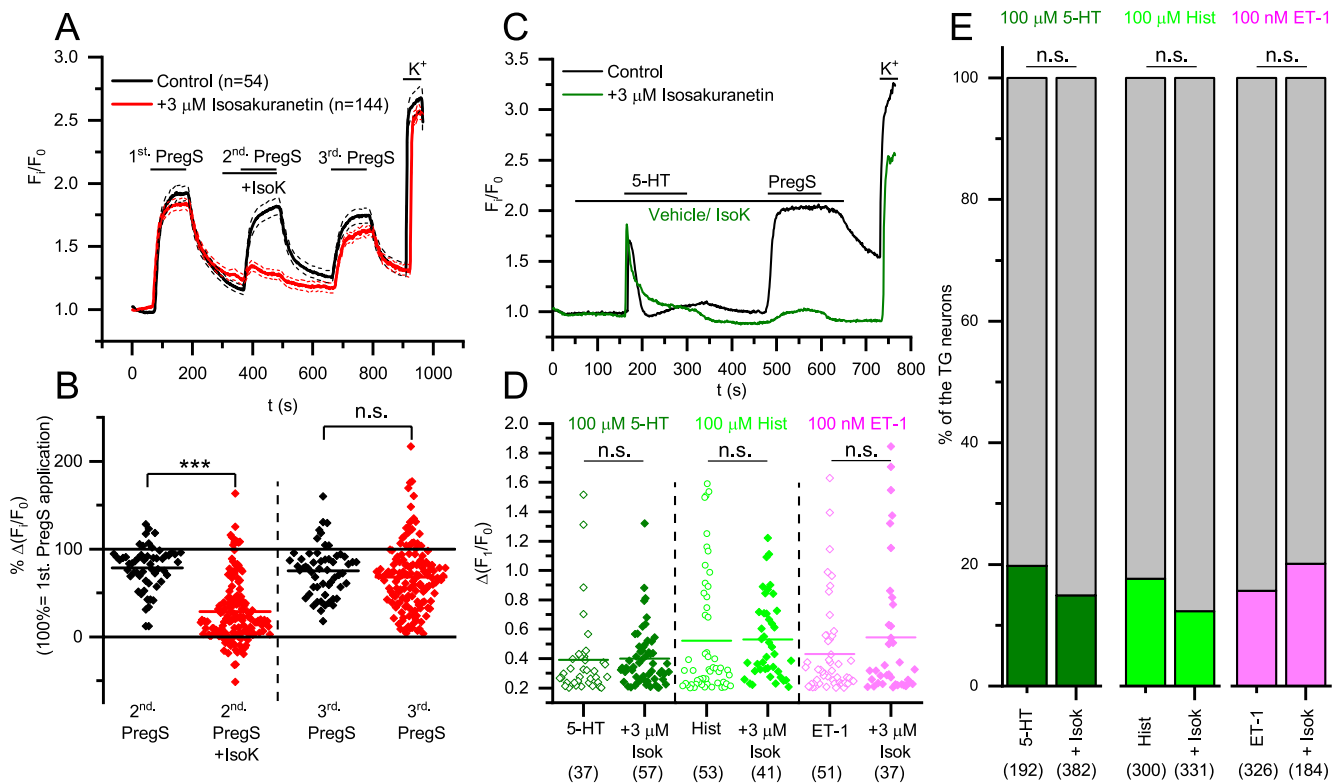


Fig. 4. Effect of Isok on the Ca^{2+} signals evoked by PregS and pruritogens in $\text{Trpm3}^{+/+}$ mice. (A) Averaged traces of several PregS+ TG neurons from $\text{Trpm3}^{+/+}$ mice showing mean changes in intracellular Ca^{2+} concentration in response to 20 μM PregS in the presence or absence of 3 μM IsoK. 25 mM KCl was used as positive control to depolarize the neuronal cell membrane. (B) Statistical analysis of Isok effect on PregS induced Ca^{2+} transients in PregS+ $\text{Trpm3}^{+/+}$ TG sensory neurons as shown in panel (A). Values are given as percentage of the first PregS-induced Ca^{2+} transient. Dots represent individual neurons, and horizontal lines indicate mean values. Effect of Isok was compared to the vehicle treated control group by Mann-Whitney test, n.s.: $p > 0.05$ (non-significant), *** $p < 0.001$. (C) Representative traces showing typical changes of intracellular Ca^{2+} concentration in TG neurons from $\text{Trpm3}^{+/+}$ mice in response to 100 μM serotonin and 20 μM PregS in the presence and absence of 3 μM Isok. 25 mM KCl was used as positive control to depolarize the neuronal cell membrane. (D) Statistical analysis of Isok effect on the pruritogens induced Ca^{2+} transients in pruritogen responsive TG sensory neurons from $\text{Trpm3}^{+/+}$ animals. Values are given as $\Delta(F_1/F_0)$, dots represent individual neurons, and horizontal lines indicate mean values. Effect of Isok was compared to the vehicle treated control group by Mann-Whitney test, n.s.: $p > 0.05$ (non-significant). (E) Percentage of TG neurons from WT mice responding to Hist, 5-HT and ET-1 in the presence and absence of 3 μM Isok. The measurements were carried out as in panel (C). The distribution of the pruritogen responders among TG sensory neurons was compared using Chi squared test, n.s.: $p > 0.05$ (non-significant). Responders are marked with the indicated colors and non-responders are marked with grey. In each group, neurons were isolated from ≥ 3 mice and measured in independent experiments.

a mainly pruritogenic substance.

Our results led to the conclusion that TRPM3 is exclusively related to nociception but not itch transmission, since it was not involved in the transmission of the pruritic effect of key endogenous itch mediators (i.e., Hist, 5-HT, and ET-1). However, it cannot be excluded that TRPM3 might be necessary for itch evoked by some other mechanisms.

The effect of temperature changes on itch is controversial. Noxious heat (as other noxious stimuli) are known to inhibit itch [80], but moderate warming can amplify pruritus, as reported especially in atopic dermatitis [83,84]. However, the role of TRPM3 is less likely in warm induced atopic pruritus. Although chemical activation of TRPM3 is already potentiated at 33 $^{\circ}\text{C}$, its heat-induced activation is more prominent at noxious temperatures [32]. Compared to TRPV1, the current-temperature relationship curve of TRPM3 is shifted slightly towards higher temperatures [85]. In line with this characteristic, behavioral experiments indicated that TRPM3 plays an essential role in noxious heat sensation, but also that its genetic ablation had only a moderate effect on warm sensation in neutral temperature zone [32,38,86]. A recent study described that warm induced pruritus and pruritogen release from atopic keratinocytes is mediated by TRPV3 [68].

Our results further support the idea that TRPM3 represents a promising candidate target to specifically treat pain. Earlier results already showed that its genetic ablation or pharmacological inhibition alleviates chemical and thermal nociception, as well as inflammatory

pain in the innervation area of DRGs [32,45,73,87]. Our results also demonstrated that PregS- or CIM0216- induced nociception is diminished in $\text{Trpm3}^{-/-}$ animals in the cheek model, in the trigeminal innervation area, as well. Moreover, we also demonstrated that it does not take part in itch sensation and its inhibition or deletion hardly influence pruritic responses. With the previous results, our findings suggest that TRPM3 may be a superior target in pain therapies than other TRP channels, including the long pursued TRPV1. Indeed, activation or inhibition of TRPV1 can drastically influence core body temperature, which was not found in case of TRPM3 [32,88–90], and our results suggest that the role of TRPM3 is more selective for nociception over pruriception than TRPV1 or TRPA1. Moreover, this latest result can have an impact on the better understanding of the molecular organization of nociceptive and pruriceptive systems.

As for most animal studies, it is important to consider to what extent we can translate these results to humans. In general, the cheek model can similarly discriminate between itch and nociception as subjective reporting of human subjects [44] and the applied Hist, 5-HT, and ET-1 are known to induce itch both in mice and humans [9,43,91,92]. Although, based on our best knowledge, effects of TRPM3 ligands were not published in human *in vivo* studies yet, the available pharmacological and cellular data suggest that the mouse and human wild type TRPM3 are functionally identical: they share agonists, antagonists, and regulation by phospholipids, as well as by $\beta\gamma$ subunits of G proteins

[87,93–96]. These data suggest that selective targeting of nociception via TRPM3 may be a promising approach even in human analgesia.

CRedit authorship contribution statement

Balázs Kelemen: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Silvia Pinto:** Conceptualization, Investigation, Formal analysis. **Nawoo Kim:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Erika Lisztes:** Investigation, Writing - original draft. **Martin Hanyicska:** . **Anita Vladár:** Investigation, Writing - original draft. **Attila Oláh:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Zsófia Péntzes:** Investigation, Writing - original draft. **Brian Shu:** Investigation, Formal analysis. **Joris Vriens:** Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Tamás Bíró:** Funding acquisition, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Tibor Rohács:** Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Thomas Voets:** Funding acquisition, Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Balázs István Tóth:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Project administration, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

TB and AO provide consultancy services to Phytects Inc. (TB) and Botanix Pharmaceuticals Ltd. (AO). TV is co-inventor on patents entitled “Treatment of pain” derived from WO2012149614, and his lab has received research funding for pain-related research from industrial parties. Botanix Pharmaceuticals Ltd, Phytects Inc., and the founding sponsors had no role in conceiving the study, designing the experiments, writing of the manuscript, or in the decision to publish it. Other authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The presented work was supported by research grants of the National Research, Development and Innovation Office (K_120187, PD_121360, PD-134791, FK_125055, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, EFOP-3.6.1-16-2016-00022). The work of AO, and BIT was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences. B. I. T. was also supported by the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology (ÚNKP-20-5-DE-422). The work of NK and TR was supported by NIH grants NS055159, GM093290 and GM131048 to T.R. Research in the lab of T.V. is supported by grants from the VIB, the KU Leuven Research Council, the Research Foundation-Flanders (FWO G0B7620N to T.V. and G084515N and G0B1819N to J.V.), the Belgian Foundation Against Cancer and the Queen Elisabeth Medical Foundation for Neurosciences.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114310>.

References

- [1] A. Ikoma, M. Steinhoff, S. Ständer, G. Yosipovitch, M. Schmelz, The neurobiology of itch, *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (7) (2006) 535–547.
- [2] R.H. LaMotte, X. Dong, M. Ringkamp, Sensory neurons and circuits mediating itch, *Nat. Rev. Neurosci.* 15 (1) (2014) 19–31.
- [3] D.M. Barry, X.-T. Liu, B. Liu, X.-Y. Liu, F. Gao, X. Zeng, J. Liu, Q. Yang, S. Wilhelm, J. Yin, A. Tao, Z.-F. Chen, Exploration of sensory and spinal neurons expressing gastrin-releasing peptide in itch and pain related behaviors, *Nat. Commun.* 11 (1) (2020).
- [4] M.C. Lagerström, K. Rogoz, B. Abrahamsen, E. Persson, B. Reinius, K. Nordenankar, C. Ölund, C. Smith, J.A. Mendez, Z.-F. Chen, J.N. Wood, Å. Wallén-Mackenzie, K. Kullander, VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch, *Neuron* 68 (3) (2010) 529–542.
- [5] Y. Liu, O. Abdel Samad, L. Zhang, B.o. Duan, Q. Tong, C. Lopes, R.-R. Ji, B. B. Lowell, Q. Ma, VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch, *Neuron* 68 (3) (2010) 543–556.
- [6] S.K. Mishra, M.A. Hoon, The cells and circuitry for itch responses in mice, *Science* 340 (6135) (2013) 968–971.
- [7] M. Pagani, G.W. Albigsetti, N. Sivakumar, H. Wildner, M. Santello, H.C. Johannssen, H.U. Zeilhofer, How Gastrin-Releasing peptide opens the spinal gate for itch, *Neuron* 103 (1) (2019) 102–117.e5.
- [8] T. Akiyama, E. Carstens, Neural processing of itch, *Neuroscience* 250 (2013) 697–714.
- [9] X. Dong, X. Dong, Peripheral and central mechanisms of itch, *Neuron* 98 (3) (2018) 482–494.
- [10] C. Moore, R. Gupta, S.-E. Jordt, Y. Chen, W.B. Liedtke, Regulation of pain and itch by TRP channels, *Neurosci. Bull.* 34 (1) (2018) 120–142.
- [11] W.-S. Shim, M.-H. Tak, M.-H. Lee, M. Kim, M. Kim, J.-Y. Koo, C.-H. Lee, M. Kim, U. Oh, TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase, *J. Neurosci.* 27 (9) (2007) 2331–2337.
- [12] S.R. Wilson, D.M. Bautista, Role of transient receptor potential channels in acute and chronic itch, in: E. Carstens, T. Akiyama (Eds.), *Itch: Mechanisms and Treatment*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2014 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200927/> (accessed February 12, 2020).
- [13] B.I. Tóth, A.G. Szöllösi, T. Bíró, TRP Channels in Itch and Pain, in: *Itch and Pain. Similarities, Interactions, and Differences*, IASP - Wolters Kluwer, 2020. <https://shop.lww.com/Itch-and-Pain/p/9781975153038>.
- [14] C.-H. Lee, C.-C. Chen, Roles of ASICs in nociception and proprioception, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1099 (2018) 37–47, https://doi.org/10.1007/978-981-13-1756-9_4.
- [15] T. Bele, E. Fabbretti, P2X receptors, sensory neurons and pain, *Curr. Med. Chem.* 22 (2015) 845–850, <https://doi.org/10.2174/0929867321666141011195351>.
- [16] F. De Logu, P. Geppetti, Ion channel pharmacology for pain modulation, *Handb. Exp. Pharmacol.* 260 (2019) 161–186, https://doi.org/10.1007/164_2019_336.
- [17] G. Stephan, L. Huang, Y. Tang, S. Vilotti, E. Fabbretti, Y.e. Yu, W. Nörenberg, H. Franke, F. Göllöncser, B. Sperlágh, A. Dopychai, R. Hausmann, G. Schmalzing, P. Rubini, P. Illes, The ASIC3/P2X3 cognate receptor is a pain-relevant and ligand-gated cationic channel, *Nat. Commun.* 9 (1) (2018), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03728-5>.
- [18] A.I. Basbaum, D.M. Bautista, G. Scherrer, D. Julius, Cellular and Molecular Mechanisms of Pain, *Cell* 139 (2) (2009) 267–284.
- [19] D. Julius, TRP channels and pain, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29 (1) (2013) 355–384.
- [20] M.J. Caterina, A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin, J. Trafton, K.R. Petersen-Zeit, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, D. Julius, Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor, *Science* 288 (2000) 306–313.
- [21] M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389 (6653) (1997) 816–824.
- [22] J.B. Davis, J. Gray, M.J. Gunthorpe, J.P. Hatcher, P.T. Davey, P. Overend, M. H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S.A. Hughes, K. Rance, E. Grau, A. J. Harper, P.L. Pugh, D.C. Rogers, S. Bingham, A. Randall, S.A. Sheardown, Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia, *Nature* 405 (6783) (2000) 183–187.
- [23] M.J.M. Fischer, P.W. Reeh, Sensitization to heat through G-protein-coupled receptor pathways in the isolated sciatic mouse nerve, *Eur. J. Neurosci.* 25 (12) (2007) 3570–3575.
- [24] R. Rukwied, B.A. Chizh, U. Lorenz, O. Obreja, S. Margarit, M. Schley, M. Schmelz, Potentiation of nociceptive responses to low pH injections in humans by prostaglandin E2, *J. Pain* 8 (5) (2007) 443–451.
- [25] M. Tominaga, M.J. Caterina, A.B. Malmberg, T.A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A.I. Basbaum, D. Julius, The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli, *Neuron* 21 (3) (1998) 531–543.
- [26] M. Bandell, G.M. Story, S.W. Hwang, V. Viswanath, S.R. Eid, M.J. Petrus, T. J. Earley, A. Patapoutian, Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin, *Neuron* 41 (6) (2004) 849–857.
- [27] D.M. Bautista, S.-E. Jordt, T. Nikai, P.R. Tsuruda, A.J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A.I. Basbaum, D. Julius, TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents, *Cell* 124 (6) (2006) 1269–1282.
- [28] R.W. Colburn, M.L. Lubin, D.J. Stone Jr., Y. Wang, D. Lawrence, M. D’Andrea, M. R. Brandt, Y.i. Liu, C.M. Flores, N. Qin, Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice, *Neuron* 54 (3) (2007) 379–386.
- [29] A. Dhaka, A.N. Murray, J. Mathur, T.J. Earley, M.J. Petrus, A. Patapoutian, TRPM8 is required for cold sensation in mice, *Neuron* 54 (3) (2007) 371–378.
- [30] K. Held, T. Kichko, K. De Clercq, H. Klaassen, R. Van Bree, J.-C. Vanherck, A. Marchand, P.W. Reeh, P. Chaltin, T. Voets, J. Vriens, Activation of TRPM3 by a potent synthetic ligand reveals a role in peptide release, *PNAS* 112 (11) (2015) E1363–E1372.
- [31] N. Imamachi, G.H. Park, H. Lee, D.J. Anderson, M.I. Simon, A.I. Basbaum, S.-K. Han, TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (27) (2009) 11330–11335.
- [32] J. Vriens, G. Owsianik, T. Hofmann, S. Philipp, J. Stab, X. Chen, M. Benoit, F. Xue, A. Janssens, S. Kerselaers, J. Oberwinkler, R. Vennekens, T. Gudermann, B. Nilius, T. Voets, TRPM3 Is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat, *Neuron* 70 (3) (2011) 482–494.

- [33] B.M. Kim, S.H. Lee, W.S. Shim, U. Oh, Histamine-induced Ca²⁺ influx via the PLA2/lipoxygenase/TRPV1 pathway in rat sensory neurons, *Neurosci. Lett.* 361 (1–3) (2004) 159–162.
- [34] T. Lieu, G. Jayaweera, P. Zhao, D.P. Poole, D. Jensen, M. Grace, P. McIntyre, R. Bron, Y.M. Wilson, M. Krappitz, S. Haerteis, C. Korbmayer, M.S. Steinhoff, R. Nassini, S. Materazzi, P. Geppetti, C.U. Corvera, N.W. Bunnett, The bile acid receptor TGR5 activates the TRPA1 channel to induce itch in mice, *Gastroenterology* 147 (6) (2014) 1417–1428.
- [35] S.R. Wilson, K.A. Gerhold, A. Bifolck-Fisher, Q. Liu, K.N. Patel, X. Dong, D. M. Bautista, TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch, *Nat. Neurosci.* 14 (5) (2011) 595–602.
- [36] S.R. Wilson, A.M. Nelson, L. Batia, T. Morita, D. Estandian, D.M. Owens, E. A. Lumpkin, D.M. Bautista, The ion channel TRPA1 is required for chronic itch, *J. Neurosci.* 33 (22) (2013) 9283–9294.
- [37] J. Vriens, K. Held, A. Janssens, B.I. Tóth, S. Kerselaers, B. Nilius, R. Vennekens, T. Voets, Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel, *Nat. Chem. Biol.* 10 (3) (2014) 188–195.
- [38] I. Vandewauw, K. De Clercq, M. Mulier, K. Held, S. Pinto, N. Van Ranst, A. Segal, T. Voet, R. Vennekens, K. Zimmermann, J. Vriens, T. Voets, A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing, *Nature* 555 (7698) (2018) 662–666.
- [39] S.G. Shimada, R.H. LaMotte, Behavioral differentiation between itch and pain in mouse: *Pain* 139 (3) (2008) 681–687.
- [40] R. Costa, D.M. Marotta, M.N. Manjavachi, E.S. Fernandes, J.F. Lima-Garcia, A.F. Paszcuk, N.L.M. Quintão, L. Juliano, S.D. Brain, J.B. Calixto, Evidence for the role of neurogenic inflammation components in trypsin-elicited scratching behaviour in mice, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2008) 1094–1103. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.172>.
- [41] L. Han, C. Ma, Q. Liu, H.-J. Weng, Y. Cui, Z. Tang, Y. Kim, H. Nie, L. Qu, K.N. Patel, Z. Li, B. McNeil, S. He, Y. Guan, B. Xiao, R.H. LaMotte, X. Dong, A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch, *Nat. Neurosci.* 16 (2) (2013) 174–182.
- [42] B.I. Tóth, A. Szallasi, T. Biró, Transient receptor potential channels and itch: how deep should we scratch? *Handb. Exp. Pharmacol.* 226 (2015) 89–133. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44605-8_6.
- [43] M. Kido-Nakahara, J. Buddenkotte, C. Kempkes, A. Ikoma, F. Cevikbas, T. Akiyama, F. Nunes, S. Seeliger, B. Hasdemir, C. Mess, T. Buhl, M. Sulk, F.-U. Müller, D. Metzke, N.W. Bunnett, A. Bhargava, E. Carstens, M. Furue, M. Steinhoff, Neural peptidase endothelin-converting enzyme 1 regulates endothelin 1-induced pruritus, *J. Clin. Invest.* 124 (6) (2014) 2683–2695.
- [44] R.H. LaMotte, S.G. Shimada, P. Sikand, Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans, *Exp. Dermatol.* 20 (2011) 778–782. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01367.x>.
- [45] I. Straub, U. Krügel, F. Mohr, J. Teichert, O. Rizun, M. Konrad, J. Oberwinkler, M. Schaefer, Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo, *Mol. Pharmacol.* 84 (5) (2013) 736–750.
- [46] H.O. Handwerker, C. Forster, C. Kirchhoff, Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli, *J. Neurophysiol.* 66 (1) (1991) 307–315.
- [47] M. Schmelz, R. Schmidt, C. Weidner, M. Hilliges, H.E. Torebjörk, H. O. Handwerker, Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens, *J. Neurophysiol.* 89 (5) (2003) 2441–2448.
- [48] B. Namer, R. Carr, L.M. Johaneck, M. Schmelz, H.O. Handwerker, M. Ringkamp, Separate peripheral pathways for pruritus in man, *J. Neurophysiol.* 100 (4) (2008) 2062–2069.
- [49] C. Ma, H. Nie, Q. Gu, P. Sikand, R.H. LaMotte, In vivo responses of cutaneous C-mechanosensitive neurons in mouse to punctate chemical stimuli that elicit itch and nociceptive sensations in humans, *J. Neurophysiol.* 107 (1) (2012) 357–363.
- [50] P. Geppetti, N. Veldhuis, T. Lieu, N. Bunnett, G protein-coupled receptors: dynamic machines for signaling pain and itch, *Neuron* 88 (4) (2015) 635–649.
- [51] S.-K. Han, M.I. Simon, Intracellular signaling and the origins of the sensations of itch and pain, *Sci. Signal.* 4 (185) (2011) pe38 pe38.
- [52] T. Biró, B.I. Tóth, R. Marinicsák, N. Dobrosi, T. Géczy, R. Paus, TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Basis Dis.* 1772 (8) (2007) 1004–1021.
- [53] M.M. Moran, M.A. McAlexander, T. Biró, A. Szallasi, Transient receptor potential channels as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (8) (2011) 601–620.
- [54] Z. Xie, H. Hu, TRP Channels as drug targets to relieve itch, *Pharmaceuticals (Basel)* 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/ph11040100>.
- [55] B. Nilius, T. Biró, TRPV3: a ‘more than skinny’ channel, *Exp. Dermatol.* 22 (7) (2013) 447–452.
- [56] B. Nilius, T. Biró, G. Owsianik, TRPV3: time to decipher a poorly understood family member! TRPV3, *J. Physiol.* 592 (2) (2014) 295–304.
- [57] M. Szántó, A. Oláh, A.G. Szöllösi, K.F. Tóth, E. Páyer, N. Czákó, Á. Pór, I. Kovács, C. C. Zouboulis, L. Kemény, T. Biró, B.I. Tóth, Activation of TRPV3 inhibits lipogenesis and stimulates production of inflammatory mediators in human sebocytes—a putative contributor to dry skin dermatoses, *J. Invest. Dermatol.* 139 (1) (2019) 250–253.
- [58] A.G. Szöllösi, N. Vasas, Á. Angyal, K. Kistamás, P.P. Nánási, J. Mihály, G. Béke, E. Herczeg-Lisztes, A. Szegedi, N. Kawada, T. Yanagida, T. Mori, L. Kemény, T. Biró, Activation of TRPV3 regulates inflammatory actions of human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 138 (2) (2018) 365–374.
- [59] B.I. Tóth, A. Oláh, A.G. Szöllösi, T. Biró, TRP channels in the skin: TRP channels in the skin, *Br. J. Pharmacol.* 171 (10) (2014) 2568–2581.
- [60] J. Luo, J. Feng, G. Yu, P.u. Yang, M.R. Mack, J. Du, W. Yu, A. Qian, Y. Zhang, S. Liu, S. Yin, A. Xu, J. Cheng, Q. Liu, R.G. O’Neil, Y. Xia, L. Ma, S.M. Carlton, B.S. Kim, K. Renner, Q. Liu, H. Hu, Transient receptor potential vanilloid 4-expressing macrophages and keratinocytes contribute differentially to allergic and nonallergic chronic itch, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (2) (2018) 608–619.e7.
- [61] C. Moore, F. Cevikbas, H.A. Pasolli, Y. Chen, W. Kong, C. Kempkes, P. Parekh, S. H. Lee, N.-A. Kontchou, I. Yeh, I. Ye, N.M. Jøkerst, E. Fuchs, M. Steinhoff, W. B. Liedtke, UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling, *PNAS* 110 (2013) E3225–3234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312933110>.
- [62] T. Akiyama, M. Ivanov, M. Nagamine, A. Davoodi, M.I. Carstens, A. Ikoma, F. Cevikbas, C. Kempkes, J. Buddenkotte, M. Steinhoff, E. Carstens, Involvement of TRPV4 in serotonin-evoked scratching, *J. Invest. Dermatol.* 136 (1) (2016) 154–160.
- [63] N. Alessandri-Haber, O.A. Dina, J.J. Yeh, C.A. Parada, D.B. Reichling, J.D. Levine, Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat, *J. Neurosci.* 24 (2004) 4444–4452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0242-04.2004>.
- [64] N. Alessandri-Haber, E. Joseph, O.A. Dina, W. Liedtke, J.D. Levine, TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator: *Pain* 118 (1) (2005) 70–79.
- [65] N. Alessandri-Haber, J.J. Yeh, A.E. Boyd, C.A. Parada, X. Chen, D.B. Reichling, J. D. Levine, Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat, *Neuron* 39 (3) (2003) 497–511.
- [66] P. Zhao, T. Lieu, N. Barlow, M. Metcalf, N.A. Veldhuis, D.D. Jensen, M. Kocan, S. Sostegni, S. Haerteis, V. Baraznenok, I. Henderson, E. Lindström, R. Guerrero-Alba, E.E. Valdez-Morales, W. Liedtke, P. McIntyre, S.J. Vanner, C. Korbmayer, N. W. Bunnett, Cathepsin S causes inflammatory pain via biased agonism of PAR 2 and TRPV4, *J. Biol. Chem.* 289 (39) (2014) 27215–27234.
- [67] C.W. Park, H.J. Kim, Y.W. Choi, B.Y. Chung, S.-Y. Woo, D.-K. Song, H.O. Kim, TRPV3 channel in keratinocytes in scars with post-burn pruritus, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms1812425>.
- [68] S.H. Seo, S. Kim, S.-E. Kim, S. Chung, S.E. Lee, Enhanced thermal sensitivity of TRPV3 in keratinocytes underlies heat-induced pruritus release and pruritus in atopic dermatitis, *J. Invest. Dermatol.* 140 (11) (2020) 2199–2209.e6.
- [69] H. Zhang, X. Sun, H. Qi, Q. Ma, Q. Zhou, W. Wang, K. Wang, Pharmacological inhibition of the temperature-sensitive and Ca²⁺-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 channel by natural forsythoside b attenuates pruritus and cytotoxicity of keratinocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 368 (1) (2019) 21–31.
- [70] J. Zhao, A. Munanairi, X.-Y. Liu, J. Zhang, L. Hu, M. Hu, D. Bu, L. Liu, Z. Xie, B. S. Kim, Y. Yang, Z.-F. Chen, PAR2 mediates itch via TRPV3 signaling in keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 140 (8) (2020) 1524–1532.
- [71] T. Morita, S. McClain, L. Batia, M. Pellegrino, S. Wilson, M. Kienzler, K. Lyman, A. Olsen, J. Wong, C. Stucky, R. Brem, D. Bautista, HTR7 Mediates serotonergic acute and chronic itch, *Neuron* 87 (1) (2015) 124–138.
- [72] S. Wilson, L. Thé, L. Batia, K. Beattie, G. Katibah, S. McClain, M. Pellegrino, D. Estandian, D. Bautista, The Epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch, *Cell* 155 (2) (2013) 285–295.
- [73] O. Alkhatib, R. da Costa, C. Gentry, T. Quallo, S. Mannebach, P. Weissgerber, M. Freichel, S.E. Philipp, S. Bevan, D.A. Andersson, Promiscuous G-protein-coupled receptor inhibition of transient receptor potential melastatin 3 ion channels by Gβγ subunits, *J. Neurosci.* 39 (40) (2019) 7840–7852.
- [74] S. Jia, Y. Zhang, J. Yu, Antinociceptive Effects of Isosakuranetin in a Rat Model of Peripheral Neuropathy, *Pharmacology* 100 (2017) 201–207. <https://doi.org/10.1159/000478986>.
- [75] U. Krügel, I. Straub, H. Beckmann, M. Schaefer, Primidone inhibits TRPM3 and attenuates thermal nociception in vivo: *Pain* 158 (5) (2017) 856–867.
- [76] H.H. Andersen, J. Elberling, N. Sharma, L.E. Hauberg, P. Gazerani, L. Arendt-Nielsen, Histaminergic and non-histaminergic elicited itch is attenuated in capsaicin-evoked areas of allodynia and hyperalgesia: A healthy volunteer study, *Eur. J. Pain* 21 (6) (2017) 1098–1109.
- [77] G. Yosipovitch, K. Fast, J.D. Bernhard, Noxious heat and scratching decrease histamine-induced itch and skin blood flow, *J. Investigative Dermatol.* 125 (6) (2005) 1268–1272.
- [78] A. Kardon, E. Polgár, J. Hachisuka, L. Snyder, D. Cameron, S. Savage, X. Cai, S. Karnup, C. Fan, G. Hemenway, C. Bernard, E. Schwartz, H. Nagase, C. Schwarzer, M. Watanabe, T. Furuta, T. Kaneko, H.R. Koerber, A. Todd, S. Ross, Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord, *Neuron* 82 (3) (2014) 573–586.
- [79] S.E. Ross, A.R. Mardinly, A.E. McCord, J. Zurawski, S. Cohen, C. Jung, L. Hu, S. I. Mok, A. Shah, E.M. Savner, C. Tollas, R. Corfas, S. Chen, P. Inquimbert, Y.i. Xu, R. McInnes, F.L. Rice, G. Corfas, Q. Ma, C.J. Woolf, M.E. Greenberg, Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in *bhlhb5* mutant mice, *Neuron* 65 (6) (2010) 886–898.
- [80] X.-J. Chen, Y.-G. Sun, Central circuit mechanisms of itch, *Nat. Commun.* 11 (1) (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16859-5>.
- [81] G. Hans, B.L. Schmidt, G. Strichartz, Nociceptive sensitization by endothelin-1, *Brain Res. Rev.* 60 (1) (2009) 36–42.
- [82] T.P. Smith, T. Haymond, S.N. Smith, S.M. Sweitzer, Evidence for the endothelin system as an emerging therapeutic target for the treatment of chronic pain, *J. Pain Res.* 7 (2014) 531–545. <https://doi.org/10.2147/JPR.S65923>.
- [83] H. Fruhstorfer, M. Hermanns, L. Latzke, The effects of thermal stimulation on clinical and experimental itch: *Pain* 24 (2) (1986) 259–269.
- [84] H. Murota, M. Izumi, M.I.A. Abd El-Latif, M. Nishioka, M. Terao, M. Tani, S. Matsui, S. Sano, I. Katayama, Artemin causes hypersensitivity to warm sensation, mimicking warmth-provoked pruritus in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (3) (2012) 671–682.e4.
- [85] J. Vriens, B. Nilius, T. Voets, Peripheral thermosensation in mammals, *Nat. Rev. Neurosci.* 15 (9) (2014) 573–589.

- [86] R. Paricio-Montesinos, F. Schwaller, A. Udhayachandran, F. Rau, J. Walcher, R. Evangelista, J. Vriens, T. Voets, J.F.A. Poulet, G.R. Lewin, The sensory coding of warm perception, *Neuron* 106 (5) (2020) 830–841.e3.
- [87] S. Dembla, M. Behrendt, F. Mohr, C. Goecke, J. Sondermann, F.M. Schneider, M. Schmidt, J. Stab, R. Enzeroth, M.G. Leitner, P. Nuñez-Badinez, J. Schwenk, B. Nürnberg, A. Cohen, S.E. Philipp, W. Greffrath, M. Bünemann, D. Oliver, E. Zakharian, M. Schmidt, J. Oberwinkler, Anti-nociceptive action of peripheral mu-opioid receptors by G-beta-gamma protein-mediated inhibition of TRPM3 channels, *Elife*. 6 (2017). <https://doi.org/10.7554/eLife.26280>.
- [88] A. Garami, Y.P. Shimansky, E. Pakai, D.L. Oliveira, N.R. Gavva, A.A. Romanovsky, Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia, *J. Neurosci.* 30 (4) (2010) 1435–1440.
- [89] N.R. Gavva, A.W. Bannon, S. Surapaneni, D.N. Hovland, S.G. Lehto, A. Gore, T. Juan, H. Deng, B. Han, L. Klionsky, R. Kuang, A. Le, R. Tamir, J. Wang, B. Youngblood, D. Zhu, M.H. Norman, E. Magal, J.J.S. Treanor, J.-C. Louis, The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation, *J. Neurosci.* 27 (13) (2007) 3366–3374.
- [90] N.R. Gavva, J.J.S. Treanor, A. Garami, L. Fang, S. Surapaneni, A. Akrami, F. Alvarez, A. Bak, M. Darling, A. Gore, G.R. Jang, J.P. Kesslak, L. Ni, M. H. Norman, G. Palluconi, M.J. Rose, M. Salfi, E. Tan, A.A. Romanovsky, C. Banfield, G. Davar, Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans: Pain 136 (1) (2008) 202–210.
- [91] L.O. Gomes, D.B. Hara, G.A. Rae, Endothelin-1 induces itch and pain in the mouse cheek model, *Life Sci.* 91 (13–14) (2012) 628–633.
- [92] R. Katugampola, M.K. Church, G.F. Clough, The neurogenic vasodilator response to endothelin-1: a study in human skin in vivo, *Exp. Physiol.* 85 (2000) 839–846.
- [93] D. Badheka, I. Borbiri, T. Rohacs, Transient receptor potential melastatin 3 is a phosphoinositide-dependent ion channel, *J. Gen. Physiol.* 146 (2015) 65–77. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411336>.
- [94] D. Badheka, Y. Yudin, I. Borbiri, C.M. Hartle, A. Yazici, T. Mirshahi, T. Rohacs, Inhibition of Transient Receptor Potential Melastatin 3 ion channels by G-protein β subunits, *Elife*. 6 (2017). <https://doi.org/10.7554/eLife.26147>.
- [95] B.I. Tóth, M. Konrad, D. Ghosh, F. Mohr, C.R. Halaszovich, M.G. Leitner, J. Vriens, J. Oberwinkler, T. Voets, Regulation of the transient receptor potential channel TRPM3 by phosphoinositides, *J. Gen. Physiol.* 146 (2015) 51–63. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411339>.
- [96] L. Vangeel, M. Benoit, Y. Miron, P.E. Miller, K. De Clercq, P. Chaltin, C. Verfaillie, J. Vriens, T. Voets, Functional expression and pharmacological modulation of TRPM3 in human sensory neurons, *Br. J. Pharmacol.* 177 (12) (2020) 2683–2695.