

Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Муртазина Рамиля Зуфаровна

**Изучение физиологической роли рецепторов,
ассоциированных со следовыми аминами, на примере TAAR9**

Научная специальность 1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
канд. мед. наук,
Гайнетдинов Рауль Радикович

Санкт-Петербург

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность темы исследования.....	4
Теоретическая и практическая значимость работы.....	6
Цели и задачи работы	6
Научная новизна исследования	7
Положения, выносимые на защиту	7
Личный вклад автора.....	8
Публикации и апробация работы	8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Следовые амины	9
1.2 Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, TAAR	11
1.2.1 Рецептор TAAR1	12
1.2.2 Рецепторы TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8	14
1.2.3 Рецептор TAAR9.....	16
1.2.4 Роль TAAR в обонянии	18
1.3 Внутриклеточная сигнальная передача TAAR	20
1.4 Гетерологическая экспрессия TAAR	22
2 МАТЕРИАЛЫ.....	25
3 МЕТОДЫ	28
3.1 Анализ паттерна экспрессии генов TAAR	28
3.1.1 Анализ паттерна экспрессии в тканях крысы и мыши методом ОТ-ПЦР	28
3.1.2 Анализ данных РНК секвенирования из открытых баз данных.....	31
3.2 Исследования на нокаутных животных.....	32
3.2.1 Получение нокаутных животных методом CRISPR/Cas9	32
3.2.2 Генотипирование и валидация нокаута	33
3.2.3 Обратное скрещивание нокаутных животных	34
3.2.4 Животные.....	34
3.2.5 Анализ поведения животных.....	35
3.2.6 Непрерывный анализ температуры.....	38
3.2.7 Оценка содержания моноаминов в тканях мозга.....	40
3.2.8 Сравнительный анализ экспрессии генов моноаминергических систем	42
3.3 Методы <i>in vitro</i>	43
3.3.1 Клонирование	43
3.3.2 Клеточные культуры.....	48
3.4 Статистический анализ.....	51
4 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	52
4.1 Глава 1. Анализ паттерна экспрессии TAAR	52
4.1.1 Экспрессия генов Taar в тканях мыши и крысы	52
4.1.2 Мета-анализ данных по экспрессии гена TAAR9.....	54
4.2 Глава 2. Изучение линии крыс, нокаутных по гену TAAR9	56
4.2.1 Получение нокаутной линии	56
4.2.2 Валидация нокаута.....	57
4.2.3 Фенотипирование двух независимых линий TAAR9-KO крыс	58
4.2.4 Фенотипирование TAAR9-KO после проведения обратного скрещивания	64
4.2.5 Непрерывный анализ температуры тела крыс TAAR9-KO	69

4.2.6 Сравнительная экспрессия генов дофаминовой и серотониновой системы	73
4.2.7 Влияние агонистов TAAR9 на обоняние.....	74
4.3 Глава 3. Изучение TAAR9 <i>in vitro</i>	76
4.3.1 Гетерологическая экспрессия гена TAAR9	76
4.3.2 Оптимизация экспрессии TAAR9 <i>in vitro</i>	77
4.3.3 Оптимизация условий скрининга агонистов методом BRET	80
4.3.4 Скрининг агонистов TAAR9	83
5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	86
ВЫВОДЫ.....	91
БЛАГОДАРНОСТИ.....	94
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	95
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	104
ПРИЛОЖЕНИЯ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein-coupled receptors, GPCR) - наиболее распространное суперсемейство мембранных белков в эукариотических организмах, которые реагируют на различные внеклеточные сигналы, включая光оны, ионы, низкомолекулярные вещества, пептиды и белки. Они имеют общую семиспиральную топологию и играют важную роль в контроле и регулировании клеточных и физиологических процессов, что делает их перспективными мишениями для лекарственных препаратов [1]. Открытие в 2001 году нового класса рецепторов GPCR – рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами (trace amine-associated receptors, TAAR, 6 функциональных рецепторов идентифицированы у человека, TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8 и TAAR9) расширило возможности изучения функциональной роли эндогенных следовых аминов в физиологии и патологии млекопитающих [2,3]. Следовые амины (СА), такие, как β -фенилэтиламин, тирамин, триптамин и октопамин, структурно близки к классическимmonoаминам и играют важную роль в физиологии беспозвоночных, но их функции в организме млекопитающих, где они представлены в «следовых» количествах, остаются малоизученными. В целом, СА присутствуют в ЦНС и функционируют параллельно с monoaminergicкими путями, а также структурно связаны, колокализуются и высвобождаются вместе с биогенными аминами. Наиболее изученным рецептором среди TAAR является TAAR1. Результаты исследований с использованием селективных лигандов TAAR1 и генетически модифицированных животных с выключенным TAAR1 (TAAR1-KO мыши), в исследованиях позволили предположить, что TAAR1 может быть перспективной терапевтической мишенью при разработке новых фармакотерапевтических препаратов для лечения таких нейропсихических расстройств, как шизофрения, депрессия, СДВГ, наркомании, болезни Паркинсона, нарушения сна [4]. На данный момент TAAR1 уже является доказанной мишенью для фармакологии широкого спектра психиатрических, неврологических и метаболических расстройств, и агонисты TAAR1 находятся на стадии клинических испытаний компаниями F. Hoffmann La-Roche, Швейцария (нозология: шизофрения) и Sunovion, США (нозология: шизофрения, тревога, депрессия и галлюцинации, вызванные терапией

болезни Паркинсона). Кроме экспрессии TAAR1 в структурах мозга, этот рецептор был также обнаружен в поджелудочной железе, желудке и кишечнике, и доклинические исследования указывают на потенциальную клиническую эффективность агонистов TAAR1 при таких метаболических нарушениях как ожирение и сахарный диабет. Другие TAAR сначала были описаны как новый вид обонятельных рецепторов со схожим паттерном экспрессии в обонятельном эпителии и функцией детекции летучих аминов [5]. Однако, на данный момент существуют исследования об их экспрессии и функционировании как в ЦНС, так и на периферии. Например, второй по изученности рецептор, TAAR5, экспрессируется в миндалевидном теле и гипоталамусе [6]. Одним из важных подходов исследования TAAR в отсутствии селективных лигандов стала модель трансгенных животных с нокаутом генов. На данный момент описаны мыши с нокаутом генов TAAR2 и TAAR5. Было показано, что TAAR2, возможно, влияет на дофаминергическую систему мозга, а TAAR5, по-видимому, играет функциональную роль не только в обонянии, но также может быть вовлечен в контроль аффективного поведения [7–9]. Предполагается, что препараты-антагонисты TAAR5 могут обладать антидепрессивным и противотревожным действием, поэтому он представляет интерес как новая мишень для разработки психотропных препаратов [7]. Что касается остальных TAAR (TAAR6, TAAR8, TAAR9), в настоящее время опубликованных данных о функции этих рецепторов за пределами обонятельной системы, практически нет. Например, по запросу «TAAR9» в базе PubMed проиндексировано всего 15 работ. Однако, экспрессия этих TAAR в различных структурах как мозга, так и в периферических органах, может указывать на то, что эти рецепторы могут быть не только обонятельными. Например, экспрессия гена TAAR9 была найдена в гипофизе, желудочно-кишечном тракте, почках, клетках крови, и спинном мозге [4], хотя известно, что мыши с кластерной делецией (TAAR2-9-KO), у которых отсутствуют все TAAR, экспрессируемые в обонятельном эпителии, не отличаются от животных «дикого типа» в отношении фертильности, размера помета, распределения генотипа и соотношения полов у детенышей [10]. Также установлен ряд агонистов TAAR9, среди которых есть как третичные амины, так и ди- и полиамины [11]. Известно, что мышиный TAAR9 активируется неизвестными компонентами мочи многих видов млекопитающих, включая мышь, крысу, человека и плотоядных [12], однако, какое именно вещество является

непосредственным лигандом неизвестно. Исходя из приведенной выше информации, в целом, изучение физиологической роли данного рецептора с помощью модели трансгенных животных, а также поиск его лигандов представляет собой актуальную задачу современной биологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость. В данном исследовании для изучения функциональной роли TAAR9 были использованы животные, нокаутные по гену данного гена (TAAR9-KO). У животных TAAR9-KO повышена температура в нормальных условиях, а также изменена терморегуляция при охлаждении. Более того, у животных с нокаутом было выявлено снижение тревожности, а именно снижена температура при ответе на стрессорное воздействие, а также повышенено содержания дофамина в гипоталамусе. Полученные данные могут быть использованы для исследования вовлеченности TAAR9 в терморегуляцию. Паттерн экспрессии TAAR9, а также других исследованных TAAR, в нескольких структурах мозга может быть полезен для дальнейшего изучения функций этих рецепторов в ЦНС.

Практическая значимость. Разработанная методика поиска новых соединений-лигандов рецептора *in vitro* позволит продолжить поиск веществ, активирующих TAAR9, а также может быть использована для оптимизации *in vitro* скрининга агонистов других TAAR.

Цели и задачи работы

Цель исследования:

Изучить физиологическое значение рецептора, ассоциированного со следовыми аминами, 9-го подтипа, а также провести поиск его лигандов *in vitro*.

Задачи работы:

1. Оценить паттерн экспрессии генов TAAR в тканях человека, крысы и мыши;
2. Провести валидацию двух новых линий крыс с нокаутом гена TAAR9;

3. Фенотипировать крыс, нокаутных по гену TAAR9, в т.ч. охарактеризовать нейрохимические и поведенческие особенности, а также оценить состояние сенсорных систем;
4. Разработать систему *in vitro* скрининга лигандов TAAR9 и провести поиск веществ-агонистов.

Научная новизна исследования

Впервые в данной работе проведено комплексное исследование животных с нокаутом гена рецептора TAAR9 - нового, ещё не изученного члена семейства TAAR. Впервые описан паттерн экспрессии TAAR9 в нескольких структурах ЦНС. Впервые проведена фенотипическая оценка нейрохимических и поведенческих особенностей крыс, нокаутных по гену TAAR9. Впервые показано влияние нокаута TAAR9 на температуру тела. Также в работе впервые исследовано влияние различных факторов, таких, как добавление N-концевого тага β 2N9, коэкспрессии шаперона RTP1S для гетерологической экспрессии TAAR9, на активность и локализацию рецептора в клетке. Впервые N-концевой таг β 2N9 был успешно использован для гетерологической экспрессии TAAR9. Было проведен скрининг >400 веществ, ранее не исследованных на агонизм TAAR9.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия TAAR9 показана не только в обонятельном эпителии, но также впервые выявлена в прилежащем ядре, хвостатом ядре, черной субстанции, вентральной области покрышки, продолговатом мозге, вентральном гиппокампе и гипоталамусе;
2. Генетически модифицированные крысы, лишенные рецепторов, ассоциированных со следовыми аминами 9-го подтипа, характеризуются повышенной температурой тела в нормальных условиях, и большим снижением температуры при охлаждении;
3. Нокаут гена *Taar9* у крыс не приводит к значимым изменениям параметров при фенотипировании в тестах на локомоторную активность, тревожность, депрессивно-подобное поведение и память;

4. Выключение гена *Taar9* у крыс сопровождается изменением в дофаминергической системе гипоталамуса, а именно повышением уровня дофамина;
5. Разработан новый экспериментальный подход, включающий в себя гетерологическую экспрессию конструкции β 2N9-TAAR9 в клетках HEK293T, с последующим поиском лигандов при помощи методики BRET.

Личный вклад автора

Автор принимала участие во всех этапах решения поставленных задач: сбор и анализ данных литературы, руководство проведением обратного скрещивания, генотипирование и ведение линий TAAR9-KO; активное участие в фенотипировании новых линий генетически модифицированных животных, проведении мета-анализа открытых данных по РНК-секвенированию; выполнение статистического анализа данных, интерпретация и обсуждение результатов. Молекулярно-биологические методы, такие как выделение РНК, ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени, а также иммунофлюоресцентное окрашивание также были выполнены автором работы. Все работы, связанные с конструированием и получением векторов и культурами клеток (ведение клеточных линий HEK293, CHO-K1, трансфекция), а также методика BRET и скрининг агонистов были выполнены автором работы.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 8 работ: 7 научных статей в журналах, индексирующихся в WoS, Scopus и РИНЦ, 1 обзор в журнале, входящем в перечень ВАК. Основные положения и научные итоги диссертации были изложены в докладах на 5 научных конференциях, в т.ч. 2 международных: Актуальные проблемы трансляционной биомедицины – 2019, 2022; 33rd ECNP Congress Hybrid, Virtual, 12 - 15 сентября 2020 (онлайн); 27th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference “Stress and Behavior” 16-18 сентября 2020; Международная Школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», г.Пущино, Россия, 18 – 22 апреля 2022.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Следовые амины

СА структурно сходны с классическимиmonoаминами, однако, их концентрация в тканях мозга на порядок ниже, отсюда и их название (Рисунок 1) [13,14]. Несмотря на то, что СА известны более 100 лет, их функция и распределение в тканях изучены гораздо хуже, чем у дофамина, норадреналина и серотонина, хотя они, так же, как и эти нейротрансмиттеры, в большинстве случаев являются продуктами метаболизма аминокислот, и обнаруживаются в тканях мозга [2,15]. Более того, известно, что ферменты, отвечающие за синтез, и сама скорость синтеза СА и классических monoаминов примерно одинаковы. Важнейшим отличием и наиболее вероятная причина их низкой концентрации в тканях головного мозга в том, что данные вещества не накапливаются в синаптических везикулах и поэтому быстро деградируют. Биосинтез СА начинается с декарбоксилирования аминокислот-предшественников ферментом декарбоксилазой ароматических L-аминокислот (L-AADC). L-AADC также участвует в синтезе классических monoаминовых нейротрансмиттеров. Она достаточно высоко экспрессируется в тканях и, таким образом, не считается ферментом, ограничивающим скорость синтеза [13]. Деградация СА происходит главным образом с помощью ферментов monoаминоксидаз (MAO), участвующих в разрушении monoаминовых нейромедиаторов. Почти все СА не проявляют селективности и метаболизируются как MAO-А, так и MAO-Б [13]. Соответственно, ингибирование MAO приводит к быстрому увеличению концентрации β-фенилэтиламина и триптамина в головном мозге [16].

СА синтезируются многими, если не всеми, видами прокариот и эукариот. В царстве Животные эндогенно синтезированные СА были обнаружены у всех исследованных на сегодняшний день видов беспозвоночных и позвоночных, включая людей. В результате их широкого распространения как в растительном, так и в животном царстве, пищевые продукты могут содержать значительные количества СА в результате непреднамеренного бактериального воздействия (порча пищи), намеренного (например, в сыре и вине) или в результате грибкового заражения зерновых продуктов (например, зараженной спорыней ржи) [4]. Кроме

того, СА синтезируются в желудочно-кишечном тракте позвоночных под действием бактериальной L-AADC во время переваривания пищи, богатой белками. Известно, что у многих видов беспозвоночных СА играют роль основных нейротрансмиттеров [14].

Помимо структурного сходства сmonoаминовыми нейротрансмиттерами, СА имеют схожее строение с некоторыми психоактивными веществами, включая амфетамин, МДМА и их производные. У человека наиболее распространенными СА являются производные фенилэтиламина (фенилэтиламин, р-октопамин, м-тирамин, триметокстирамин, синефрин), производные тиронамина (тиронамин, трийодтиронамин), триптамин и его производные. Также в число СА включают ди- и полииамины (путресцин, кадаверин, спермин, спермидин) [4]. На данный момент накоплено достаточно большой объем литературы, в которой изменения в метаболизме СА связывают с неврологическими заболеваниями (шизофрения, депрессия, СДВГ, болезнь Паркинсона и т.д.), тем не менее, на чем основаны подобные изменения остается неясным [15,17]. Вопрос о физиологической роли СА оставался открытым до обнаружения рецепторов, ассоциированных с СА в 2001 году.

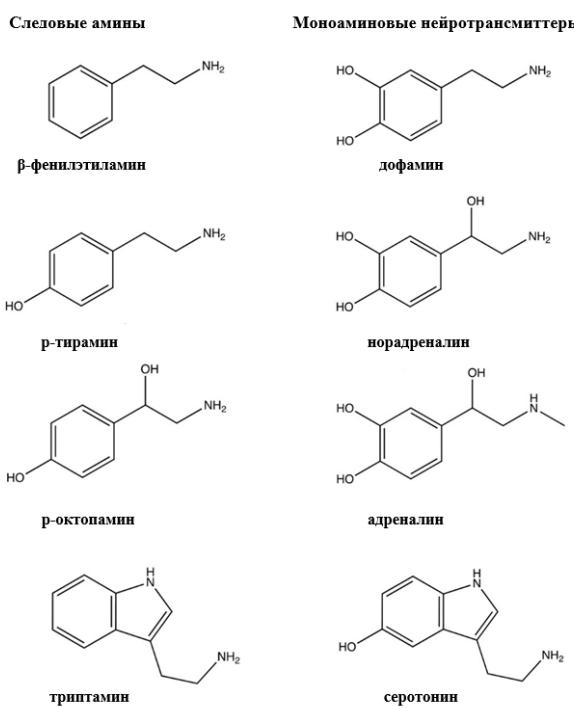


Рисунок 1. Соотношение структур следовых аминов и monoаминовых нейротрансмиттеров. Из Муртазина, Гайнэтдинов, 2019.

1.2 Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, TAAR

Рецептор 1-го подтипа (TAAR1) был открыт двумя независимыми группами в 2001 с помощью метода ПЦР с использованием вырожденных праймеров к известным на тот момент последовательностям серотониновых и катехоламиновых рецепторов [2,3]. Bunzow с коллегами при поиске новых катехоламиновых рецепторов исследовали кДНК раковой клеточной линии поджелудочной железы крыс, используя праймеры к 3 и 6 консервативным трансмембранным участкам GPCR в клетках. В ретроспективе становится понятно, что выбор именно этой клеточной линии был крайне удачен, так как последующие исследователи столкнулись с очень низкой экспрессией *Taar* в большинстве тканей, за исключением поджелудочной железы и, в частности, β -клеток, в которых наблюдается высокий уровень *Taar1* [2,14,18]. При экспрессии в гетерологических клеточных системах новый receptor вызывал продукцию циклического аденоzinмонофосфата (цАМФ, cAMP) после действия ρ -тирамина, β -фенилэтиламина, тогда как классическиеmonoамины (дофамин, норадреналин, серотонин) такого эффекта не оказывали или давали намного меньший ответ [2,3]. У человека выявлено 6 функциональных генов *TAAR* (*TAAR1*, *TAAR2*, *TAAR5*, *TAAR6*, *TAAR8*, *TAAR9*), а также 3 псевдогена (*TAAR3*, *TAAR4*, *TAAR7*), которые не кодируют функциональный белок. Гены *TAAR* человека сгруппированы на шестой хромосоме, а именно на участке 6q23.2, ассоциированным с шизофренией и биполярным расстройством [19]. Геномы мыши и крысы содержат 15 и 17 функциональных генов *Taar*, соответственно. У мыши гены *Taar* расположены в одном кластере в хромосоме 10 и пронумерованы в соответствии с порядком на хромосоме, от *Taar1* до *Taar9*, с пятью паралогами гена *Taar7* (*Taar7a*, *Taar7b*, *Taar7d*, *Taar7e* и *Taar7f*; *Taar7c* — единственный псевдоген) и тремя парalogичными вариантами гена *Taar8* (*Taar8a*, *Taar8b* и *Taar8c*). Все 17 генов *Taar* крысы расположены на хромосоме 1. Филогенетический анализ *TAAR* человека, крысы и мыши выявил, что изначальная последовательность *TAAR* претерпела восемь событий дупликации генов. Эти события дали начало группе из девяти генов до расхождения линий грызунов и приматов. Паралоги *Taar7* и *Taar8* грызунов, возможно, развились в результате недавних независимых дупликаций у мышей и крыс [20]. За исключением *TAAR2*, все представители семейства *TAAR* млекопитающих состоят из одного экзона. *TAAR*

филогенетически отдаленно связаны с биогенными рецепторами моноаминов, такими как рецепторы дофамина и серотонина. Единственным известным видом, у которого нет ни одного функционирующего TAAR, является афалина [21]. Интересно, что число генов *TAAR* коррелирует с количеством обонятельных рецепторов. TAAR можно разделить на две группы: в первую группу входят рецепторы первичных аминов (*TAAR1-TAAR4*), во вторую группу рецепторы третичных аминов (*TAAR5-TAAR9*). Причем предполагается, что первая группа эволюционировала под жестким негативным отбором, а вторая, более разнородная, путем положительного отбора. Группа *TAAR1-TAAR4* эволюционно древнее, консервативнее, и в различных геномах члены этой группы представлены одной изоформой. Предполагается, что вторая группа берет начало из одного гена [21].

1.2.1 Рецептор *TAAR1*

На сегодняшний день наиболее изученным членом этого семейства является *TAAR1* [22]. Первые данные о функциональной роли рецептора *TAAR1* в физиологических условиях были получены до появления селективных лигандов к нему благодаря трансгенным мышам с нокаутом гена *Taar1* (*TAAR1-KO*), которые были получены двумя независимыми группами [23,24] (Таблица 1). Многие известные эндогенные агонисты *TAAR1* действуют и на другие мишени в ЦНС, например, на дофаминовый транспортер (DAT) или на везикулярный транспортер моноаминов 2 (VMAT2). В отсутствии селективного лиганда *TAAR1*, мышь с нокаутом этого гена представляла собой единственно возможный вариант исследования возможных физиологических последствий дисфункции *TAAR1* и роли *TAAR1* в действии фармакологических агентов [25]. Мыши *TAAR1-KO* не имеют ярко выраженных фенотипических отличий от животных «дикого типа» (wild type, WT), мутанты успешно размножались и не показали отличий от WT в большинстве поведенческих тестов. Тем не менее было обнаружено значительное снижение реакции в teste преимпульсного ингибиования у мышей-нокаутов, которое может указывать на нарушения в механизмах сенсомоторной фильтрации, характерных для пациентов с шизофренией и рядом других заболеваний мозга. Более того, мыши без *TAAR1* характеризуются повышенной чувствительностью к стимулирующему действию амфетамина на двигательную активность. Также при введении этого психостимулятора у *TAAR1-KO* наблюдали значительное увеличение уровня

внеклеточных моноаминов [23]. Аналогичные результаты получены на параллельно созданной в компании Hoffmann La-Roche линии TAAR1-KO мышей [24]: мутантные животные также были более чувствительны к действию амфетамина, а уровень внеклеточного дофамина после введения амфетамина в стриатуме повышался сильнее, чем у WT. В нормальных условиях у нокаутов уровень влеклеточного дофамина и двигательная активность не отличались от мышей «дикого типа», однако, электрофизиологические записи вентральной области покрышки выявили увеличение спонтанной электрической активности дофаминовых нейронов [24]. Далее показано, что фармакологическая блокада TAAR1 сопровождается увеличением спонтанной электрической активности активности дофаминовых нейронов у мышей WT (но не у мышей-нокатуов), тогда как активация TAAR1 приводит к ингибированию их активности. Помимо этих изменений, у TAAR1-KO мышей были найдены отличия в эффекте некоторых антипсихотических лекарств, в частности, галоперидола и клозапина [26]. В 2012 г. была также охарактеризована линия мышей с повышенной экспрессией TAAR1 (TAAR1-OE) [27]. Мутантные животные данной линии не отличались по поведению и двигательной активности от мышей «дикого типа». Было замечено, что самки данной линии весили немного больше, и их температура слегка повышенна. Как и ожидалось, у TAAR1-OE было снижено стимулирующее действие амфетамина на двигательную активность, а уровень внеклеточного дофамина и норадреналина в прилежащем ядре, а также серотонина в префронтальной коре был повышен. Неожиданными стали данные электрофизиологии – так же, как у TAAR1-KO, в линии TAAR1-OE наблюдалось усиление спонтанной электрической активности дофаминовых нейронов вентральной области покрышки. Одно из объяснений данного факта заключается в сниженной активности популяции ГАМК-ergicических нейронов, которые в норме должны ингибировать дофаминовые нейроны [27]. Также была создана линия TAAR1-OE крыс, на которой изучали внутриклеточный сигналинг TAAR1 и паттерн экспрессии [28].

Стоит отметить, что экспрессия *TAAR1* выявлена в нескольких областях мозга, в том числе, в вентральной области покрышки, черной субстанции и дорзальных ядрах шва. Все перечисленные ядра являются ключевыми для моноаминовой нейропередачи [15,29]. Данные по экспрессии *Taar1* в мозге были подтверждены на трансгенных мышах, у которых в ген *Taar1* была вставлена

последовательность гена LacZ с целью определения специфической экспрессии β-галактозидазы с промотора *Taar1* [24]. В соответствии с его распределением в ЦНС, TAAR1, по-видимому, функционирует как регулятор активации рецепторов в других нейротрансмиттерных системах [30,31]. Особенno хорошо изучено взаимодействие TAAR1 с дофаминергической системой, где активация TAAR1 предотвращает дофаминергическую гиперактивность. Такие эффекты, по-видимому, связаны с изменением внутриклеточной сигнальной передачи D2-подобных дофаминовых рецепторов (D2R) в составе димера с TAAR1 при активации последнего [26,28,32]. Первые препараты с TAAR1 активностью в настоящее время уже проходят клинические испытания, а также ведется активный поиск новых агонистов [33–35]. 5HT1A/TAAR1 агонист, SEP-363856, разработанный компанией Sunovion Pharmaceuticals, снижает позитивные и негативные симптомы у больных шизофренией [33,36]. TAAR1 также, вероятно, функционирует и на периферии в поджелудочной железе, желудке, иммунной системе и при онкологии [4,37]

1.2.2 Рецепторы TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8

Новым витком в истории изучения роли СА стало опубликованное в 2006 году исследование, в котором TAAR были описаны в качестве нового класса обонятельных рецепторов [5]. Было показано, что все члены семейства, за исключением TAAR1, экспрессируются только в обонятельном эпителии. Как сейчас известно, из-за низкого уровня экспрессии и не очень чувствительных методов детекции их было сложно обнаружить в других тканях [31]. В целом, роль этих TAAR пока остается неизученной, хотя существуют данные об их экспрессии в тканях ЦНС. Стоит отметить, что экспрессия всех TAAR была также выявлена и в периферических тканях: клетки крови, сердечная ткань, почки, семенники и многие другие [4]. В ЦНС при помощи метода гибридизации *in situ* мРНК TAAR5 была найдена в области миндалевидного тела, дугообразном ядре, вентромедиальном гипоталамусе мыши, причем локализация в гипоталамусе и миндалевидном теле совпадала с TAAR1 [6]. Методом ОТ-ПЦР была обнаружена экспрессия TAAR6 в префронтальной коре, черной субстанции, миндалевидном теле, базальных ядрах и гиппокампе человека, причем самая высокая экспрессия была в гиппокампе [3,38]. мРНК TAAR8 была найдена в миндалевидном теле [3].

Поэтому для более точного определения функции этих рецепторов требовалась оценка животных, нокаутных по рецепторам индивидуальных следовых аминов TAAR2-TAAR9. Первые работы по изучению животных с нокаутом генов TAAR были сосредоточены на их роли в обонянии. Была создана линия мышей с полностью выключенным, за исключением *Taar1*, кластером *Taar* (TAAR2-TAAR9-KO мыши) [39,40]. Выключение сразу нескольких генов стало возможным ввиду кластеризации генов *Taar* на одной хромосоме. Эта модель была использована для изучения значимости ряда запахов, распознающих TAAR, и их влияние на поведение. Помимо изменений в обонянии, TAAR2-TAAR9-KO мыши не показала значимых отличий по массе, двигательной активности от животных «дикого типа» [39].

В лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии ИТБМ СПбГУ на мышах линии TAAR5-KO со вставкой LacZ была показана экспрессия *Taar5* в обонятельной луковице, орбитофронтальной и энторинальной коре, амигдале (миндалевидное тело), гиппокампе, прилежащем ядре, таламусе и гипоталамусе [7]. Эти данные согласуются с полученными при помощи метода *in situ* гибридизации [6]. Ранее экспрессия *TAAR5* была также найдена в миндалевидном теле у человека, что может говорить о консервативности экспрессии у мыши и человека [41]. Нокауты по TAAR5 были жизнеспособны и не показывали сильных отклонений в большинстве поведенческих тестов, однако, у них были изменения в тестах на депрессивно-подобное поведение и тревожность, а также был снижен уровень серотонина в стриатуме и гиппокампе. Интересно, что гипотермическое действие 8-OH-DPAT, агониста 5-HT1A-серотониновых рецепторов, у нокаутов по TAAR5 было более выражено, чем у животных WT [7]. Далее, на этих же мышах было показано увеличение количества дофаминергических нейронов и повышенное содержание дофамина в стриатуме [8]. Таким образом, TAAR5, по-видимому, играет функциональную роль не только в обонянии, но также может быть вовлечен в контроль аффективного поведения. У мышей линии TAAR2-KO со вставкой LacZ были снижены показатели тревожности, а также повышен уровень дофамина в стриатуме, а экспрессия бета-галактозидазы под промотором TAAR2 была обнаружена в обонятельной луковице, гиппокампе, гипоталамусе и стволе мозга [9]. Полученные данные позволяют предположить, что не только TAAR1, но и остальные члены семейства TAAR могут играть значимую роль в функционировании ЦНС, и

требуют дальнейшего изучения, в том числе с помощью трансгенных моделей животных [42].

Таблица 1. Характеристика линий трансгенных животных по TAAR

Линия	Вид	Характеристика	Источник
TAAR1-KO	мышь/ крыса	изменение поведения при действии амфетамина, снижение реакции в тесте преимпульсного ингибиования, увеличение числа спонтанных импульсов дофаминергических нейронов вентральной области покрышки.	[23,24]
TAAR1-OE	мышь/ крыса	поведение не изменено, снижено стимулирующее действие амфетамина на двигательную активность, увеличено число спонтанных импульсов дофаминергических нейронов вентральной области покрышки. обнаружена связь между TAAR1 и рецептором дофамина D2R <i>in vivo</i> и открыт β-аррестин2/AKT/GSK3 каскад при активации TAAR1	[28,43]
TAAR2-9-KO	мышь	изменен порог обонятельной чувствительности к летучим аминам	[39]
TAAR2-KO	мышь	изменения в дофаминовой системе	[9]
TAAR5-KO	мышь	изменения депрессивно-подобного поведения; изменения в дофаминовой и серотониновой системе; снижено влечение к триметиламину	[7,8,44]

1.2.3 Рецептор TAAR9

Ген *TAAR9* у человека кодирует белок 348 а.к. При выравнивании аминокислотной последовательности TAAR9 человека и крысы идентичность составляет 84.2%, человека и мыши – 86.8%. Полиморфизм A181T, приводящий к нефункциональному TAAR9 (стоп-кодон в результате мутации появляется после первой трасмембранный петли), известен у 20% популяции, однако, его клиническая значимость пока неясна [45,46].

Экспрессия *TAAR9* у человека была обнаружена в обонятельном эпителии [47], желудке [48], гипофизе, скелетных мышцах [45], лейкоцитах [49,50]. мРНК *Taar9* мыши также выявили в желудочно-кишечном тракте, где она преимущественно локализована в клетках слизистой двенадцатиперстной кишки

[51], селезенке [52], почках [18], сетчатке [53], обонятельном эпителии и обонятельной луковице [40]. У крыс всего несколько групп изучали экспрессию генов *Taar* [52,54,55]. Chiellini и коллеги брали гомогенаты целого мозга, а также периферических органов для проведения ОТ-ПЦР и показали экспрессию *Taar9* в коре, белом веществе мозга, мозжечке, кишечнике, а также в семенниках, однако, сигнал был меньше 10 копий $\text{кДНК}/1\mu\text{g}$ РНК, поэтому эти данные требуют подтверждения [54]. В еще одной работе экспрессия *Taar9* была выявлена наряду с другими TAAR в спинном мозге крыс [52].

Первые агонисты TAAR9 крысы оказались третичными аминами, N-метилпиперидин ($\text{EC50}=18.3 \mu\text{M}$) и N-диметилциклогексиламин ($\text{EC50}=26.6 \mu\text{M}$) [56] (Таблица 2). Далее список агонистов TAAR9 пополнился аминоэтилпиперидином, диамином кадаверином и полиаминами спермином и спермидином с $\text{EC50} \geq 50 \mu\text{M}$ у TAAR9 мыши [57], причем EC50 ранее описанных N-метилпиперидина и N-диметилциклогексиламина у мышного была $>100 \mu\text{M}$. В 2022 вышла работа по высокопроизводительному скринингу агонистов TAAR различных видов, было показано, что спермидин также активирует TAAR9 крысы, хомячка, кролика и кошки; кадаверин и спермин – крысы и кошки; N-метилпиперидин, N-диметилциклогексиламин, триэтиламин – только мыши и крысы [58]. Однако эти же вещества активировали и другие TAAR (TAAR5, TAAR6, TAAR8c, TAAR7b,c), за исключением кадаверина, спермидина и спермина, которые были агонистами только TAAR9. Известно, что рецептор TAAR9 мыши активируется компонентами мочи различных видов млекопитающих, включая мышей, крыс, человека и хищников [12].

Дифференциальная экспрессия *Taar9* была обнаружена в воспаленных зонах при болезни Крона [59] и в почке при моделировании диабетической нефропатии у крыс [60]. При исследовании влияния кадаверина на выживаемость при раке груди *in vitro* было показано, что положительный эффект кадаверина возможно опосредован, наряду с TAAR1 и TAAR8, через TAAR9 [61].

TAAR относятся к классу А рецепторов, сопряженных с G-белком (A-GPCR). Этот класс имеет два типа лиганд-связывающих сайтов: аллостерический и ортостерический. Аллостерические сайты располагаются на неупорядоченных внеклеточных петлях, а ортостерические – внутри трансмембранных доменов. Хотя на данный момент структурная основа распознавания лигандов рецепторами TAAR

не совсем понятна, у TAAR9 мыши на примере связывания с диаминами и полиаминами были описаны 2 туннеля для входа лиганда в ортостерический сайт связывания, а сайт-направленный мутагенез позволил выявить аминокислоты (Asp3.32, Tyr6.51, Tyr7.43), которые важны для распознавания лигандов [62,63].

Таблица 2. Агонисты TAAR9

Агонист TAAR9	EC50, μM	Вид	Источник
N, N-диметилциклогексиламин	122	мышь	[57]
	26.6	крыса	[56]
	~30		[58]
N-метилпиперидин	163	мышь	[57]
	18.3	крыса	[56]
триэтиламин	66	мышь	[57]
	-	крыса	[58]
1-(2-аминоэтил) пиперидин	66	мышь	[57]
спермидин	55	мышь	[57]
	-	крыса	[58]
	-	хомяк	
	-	кролик	
	-	кошка	
спермин	120	мышь	[57]
	-	крыса	[58]
	-	кошка	[58]
кадаверин	243	мышь	[57]
	-	кошка	[58]

1.2.4 Роль TAAR в обонянии

Как указывалось ранее, TAAR участвуют в распознавании запахов [5,64], поэтому они были отнесены к новому классу обонятельных рецепторов (ОР), регулирующих инстинктивное поведение. Известно, что первым шагом в восприятии запаха является взаимодействие одоранта с G-белком, сопряженным с обонятельными рецепторами, расположенными на поверхности обонятельных сенсорных нейронов (ОСН) в обонятельном эпителии носа. Активированный ОР инициирует каскад реакций, необходимых для передачи сигнала о запахе, который в конечном счёте попадает в мозг. Отдельный ОСН моноаллельно экспрессирует один функциональный ген рецептора запаха, нейроны с одним и тем же рецептором

случайным образом распределены в пределах одной обонятельной зоны эпителия. У млекопитающих известно более 1000 обонятельных рецепторов, что хорошо согласуется с их способностью обнаруживать и различать разнообразные запахи [65].

Было показано, что каждый *Taar* экспрессируется моногаптически и определяет уникальную популяцию сенсорных нейронов (<0.1% от общего числа), которая не экспрессирует другие гены *Taar* или ОР [40]. Таким образом, правило «один рецептор — один нейрон» канонических ОР, по-видимому, верно и для TAAR. Однако, похоже, что *Taar* имеют другой, чем у канонических ОР, механизм при выборе, какой ген экспрессировать. Эпигенетическая подпись гетерохроматина, характерная для молчащих генов ОР, отсутствует в генах *Taar* [66,67]. Кроме того, неактивные гены *Taar* находятся в другом ядерном компартменте, чем неактивные гены ОР [68]. Также одновременно двумя группами у генов *Taar* были описаны 2 энхансера, делеция которых приводила к полному исчезновению клеточной популяции TAAR-OCH [69,70].

У нокаутных TAAR2-9-КО животных описаны изменения в половом поведении и выборе партнёра [10]. Моча многих хищников содержит β-фенилэтиламин, что вызывает у мышей реакцию избегания, однако, при выключении TAAR2-9-КО у животных эта реакция исчезала [12,39]. У мышей с нокаутом *Taar5* была обнаружена потеря влечения к триметиламину, агонисту TAAR5 [44], который присутствует в моче мышей. Причем в высоких концентрациях он вызывает аверсивное поведение, а в низких, которые соответствуют физиологической концентрации, действует как аттрактант [44]. Мыши «дикого типа» демонстрируют избегание к кадаверину и N-метилпиперидину при разных концентрациях, причем низкие концентрации этих веществ перестают вызывать аверсию у мышей с кластерной делецией *Taar2-Taar9* [39]. Также ранее было показано, что рыбы *Danio rerio* проявляют аверсивное поведение к кадаверину, причем такое поведение обеспечивает рецептор TAAR13c [71].

Таким образом, эти рецепторы играют роль в распознавании запахов, регулирующих инстинктивное поведение (запах хищника, гниющих тканей, половых запахов) и, по-видимому, существует сложная связь TAAR с обонятельными сигналами и видоспецифичным поведением [64,67].

1.3 Внутриклеточная сигнальная передача TAAR

GPCR, к которым относятся TAAR, являются мембранными белками с > 800 идентифицированных генов у человека. Они передают большинство внутриклеточных ответов на внешние раздражители (свет, вкус, запах, гормоны, нейротрансмиттеры). GPCR обычно делятся на пять семейств в зависимости от их структуры и последовательности. Лиганды от небольших молекул до пептидов и белков связываются с классом А (родопсиноподобным) GPCR, к которым относятся TAAR. Пептидные гормоны активируют рецепторы класса В (семейство секретиновых рецепторов). Ионы и мелкие молекулы являются лигандами для рецепторов класса С (метаботропные глутаматные рецепторы). Лиганды адгезионных GPCR, в основном, неизвестны. GPCR семейства Frizzled являются рецепторами сигнальных пептидов wingless int-1 (WNT) [1].

Рецепторы семейства GPCR имеют гомологичную пространственную организацию, они содержат семь трансмембранных спиралей, а также внеклеточный N-концевой и внутриклеточный C-концевой участки. Сайты связывания низкомолекулярных соединений (лигандов) во многих случаях локализованы в трансмембранным домене рецептора, в то время как пептидные гормоны и регуляторы белковой природы взаимодействуют с N-концевым участком и внеклеточными петлями. После активации GPCR рецепторы образуют комплекс с гетеротримерным G-белком (гуанин нуклеотид связывающим белком). G-белок обычно является комплексом, состоящим из трёх субъединиц G_α , G_β , G_γ . Известно несколько типов G_α субъединиц, активация каждой из которых приводит к разным эффектам: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$, $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$ и малые мономерные ГТФазы [72]. Передача сигнала происходит благодаря изменению структуры рецептора, которое приводит к замене ГДФ на ГТФ в связывающем домене G_α субъединицы. Это приводит к распаду комплекса на G_α и $G_{\beta\gamma}$ субъединицы, каждая из которых запускает биохимический ферментативный каскад реакций, вызывающий геномные (изменение экспрессии генов и репликации) и внегеномные (активация ферментов, ионных каналов) ответы. цАМФ, ионы Ca^{2+} , инозитолтрифосфат, диацилглицерин и оксид азота являются наиболее распространенными вторичными мессенджерами этих каскадов реакций [1]. Кроме того, β -аррестин является важным партнером GPCR рецепторов. Несмотря на то, что 30-40% всех доступных в настоящее время

лекарств являются лигандами GPCR, в медицине задействованы только <10% известных GPCR [73].

Было обнаружено, что TAAR1 связан с G_{as} , который увеличивает внутриклеточную концентрацию цАМФ и активирует дальнейшую передачу сигналов [2], поэтому активацию TAAR1 в клеточной системе, в основном, изучали с использованием методов, основанных на продукции цАМФ [74]. Однако, есть работы, в которых *in vitro* активацию сигнальной передачи TAAR1 успешно исследовали через G_q (а именно G_{q16}) [75,76]. Также было показано, что в ответ на амфетамин TAAR1 может рекрутировать G_{aq} и G_{a13} [77]. Активация TAAR1 агонистом RO5166017 вовлекает белок $G_{\beta\gamma}$ и приводит к направленному наружу току ионов K^+ через связанные с G-белком внутренние ректифицирующие калиевые каналы (GIRK) в дофаминергических и серотонинергических нейронах [30]. Также активация TAAR1 может происходить по G-белок независимому пути через β -аррестин [28].

Несмотря на то, что TAAR филогенетически отличаются от канонических OR, они передают ответ, используя канонический каскад передачи обонятельного сигнала, по крайней мере в обонятельном эпителии [67]. TAAR передают сигнал через G-белки обонятельного типа G_{olf} , которые синтезируются в обонятельном эпителии и так же, как G_{as} , активируют аденилатциклазу III типа и увеличивают продукцию цАМФ [5,57,78]. В других тканях большинство TAAR сопряжены с G_{as} [11]. Однако есть сообщения, показывающие, что некоторые TAAR сопряжены с G_α другого типа. Например, базальная активность TAAR8 может быть опосредована G_{ai} и приводит к снижению уровня цАМФ *in vitro* [79]. Кроме того *in vitro*, было показано, что передача сигналов TAAR5 может вовлекать $G_{aq/11}$ - и $G_{a12/13}$ -зависимый МАР-киназный каскад [6]. Интересно, что TAAR2 может гетеродимеризоваться с TAAR1 в полиморфноядерных нейтрофилах (PMN), что необходимо для хемотаксического ответа [50]. Как и в случае других TAAR, активация TAAR9 приводит к накоплению цАМФ, опосредованным белком G_{as} и G_{olf} [11,12]. Интересно, что при изучении экспрессии обонятельных рецепторов за пределами обонятельной системы была показана коэкспрессия белков, участвующих в передаче обонятельных сигналов [80]

Сигнальные пути активации TAAR представляют собой особенный интерес, но многие группы столкнулись с проблемой изучения TAAR *in vitro* из-за

сложностей с их экспрессией на клеточной мембране, по крайней мере, в гетерологических клеточных системах [31].

1.4 Гетерологическая экспрессия TAAR

Для функционального анализа экспрессируемых рецепторов требуется надежная и чувствительная система анализа, подходящая для эффективного скрининга с большим количеством лигандов. Клеточная линия, полученная из клеток почек эмбриона человека HEK293 наиболее часто используется для функциональных тестов GPCR *in vitro*. Также применяются ооциты *Xenopus laevis*, клетки насекомых, другие клеточные линии млекопитающих. Для некоторых GPCR необходимы вспомогательные белки для правильного направления на клеточную мембрану [81].

Так как TAAR плохо экспрессируются на мемbrane *in vitro* в гетерологических системах, ранее использовали сигнальные последовательности GPCR, хорошо локализованных на мембране: первые 9 аминокислот $\beta 2$ -адренергического рецептора [82], первые 20 аминокислот человеческого [78] или бычьего [6] родопсина. Одной из причин сложности мембранный экспрессии может быть отсутствие гликозилирования на N-конце, которое было показано для TAAR1 [82]. Различные подходы для гетерологической экспрессии TAAR представлены в Таблице 3.

В целях повышения мембранный экспрессии TAAR также применяют подход, который используется при деорфанизации ОР, также сложно экспрессируемых в гетерологичной системе [83]. Причина этого в том, что белки остаются в эндоплазматическом ретикулуме и впоследствии деградируют в протеосоме [84]. Эти данные свидетельствуют о том, что обонятельные нейроны обладают молекулярным механизмом, который способствует правильному транспорту и фолдингу обонятельных рецепторов и, по-видимому, TAAR на клеточную поверхность, но компоненты этого механизма плохо изучены. Белок RTP1 (receptor transporting protein 1), наряду с несколькими другими (RTP2, REEP1) был открыт при поиске таких шаперонов, специфичных для обонятельных клеток. Для деорфанизации ОР на основе HEK293 была создана линия НААЗА, которая

конститутивно экспрессирует RTP1, RTP2, REEP1, G_{olf} [85]. Из всех этих белков наиболее выраженным эффектом обладает RTP1. Он представляет собой трансмембранный белок, экспрессирующийся в обонятельных нейронах, однако слабая экспрессия была также обнаружена в мозге. Также было показано, что удаление первых 36 N-концевых аминокислот этого белка (RTP1S, s – short) еще больше повышает поверхностную локализацию OP [86].

Таблица 3. Гетерологическая экспрессия TAAR

Рецептор	Вид	Линия клеток	Таг	Система для детекции	Котрансфекция вспомогательных белков	Источник
TAAR1	человек	HEK293T	β2N9, 3HA-tag	EPAC BRET биосенсор	нет	[82]
TAAR1	макака-резус	HEK293	нет	CRE*-управляемая репортерная продукция люциферазы	нет	[87]
TAAR1	человек	RD-HGA16 (клеточная линия яичника китайского хомячка, экспрессирующая Gα16)	нет	флюоресцентный краситель Calcium 3	Gq (Gα16)	[75]
TAAR1	крыса	AV12-664 (клеточная линия фибробласта в сирийского хомяка)	HA-tag	HitHunter cAMP XS kit	Gαs	[88]
mTAAR1, hTAAR1, mTAAR3, mTAAR4, mTAAR5, mTAAR7f	мышь	HEK293	bovine Rho-tag	CRE-управляемая репортерная продукция щелочной фосфатазы	нет	[5]
rTAAR3, rTAAR7b, rTAAR7d, rTAAR7h,	мышь, крыса	HEK293	bovine Rho-tag	CRE-управляемая репортерная продукция	нет	[56]

rTAAR8c, rTAAR9, mTAAR4, mTAAR7e ,				щелочной фосфатазы		
TAAR3, TAAR4, TAAR5	мышь, крыса, корова, человек, приматы	HEK293	HA-tag, Flag, bovine Rho-tag	CRE- управляемая репортерная продукция щелочной фосфатазы; Alpha-screen cAMP assay	нет	[89]
TAAR5	человека	HANA3A; ооциты Xenopus laevis	human Rho-tag	Dual-Glo™ Luciferase Assay System	RTP1S и Golf	[78]
TAAR5	мышь, человек	HEK293	HA-tag; bovine Rho-tag	Alpha-screen	нет	[6]
TAAR6	макака- резус	HEK293	нет	Dual- Luciferase™ Assay System	нет	[90]
TAAR8	человек, мышь	HEK293	HA-tag; bovine Rho-tag	Alpha-screen	нет	[79]

Bovine Rho-tag (20 а.к. бычьего родопсина – MNGTEGPNFYVPFSNKTGVV); Human Rho-tag (20 а.к. родопсина человека – MNGTEGPNFYVPFSNATGVV); β 2N9 – MCQPGNGSA; Метки для детекции антителами: HA-tag (гемагглютининовый таг); FLAG-tag. *CRE (cAMP response element) - последовательность ДНК, с которой связываются цАМФ-связывающие белки

2 МАТЕРИАЛЫ

Общие реактивы

Название	Производитель
Агароза	Хеликон
Ethidium bromide	Хеликон
Chloroform	Scharlau
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	AppliChem
Фосфатно-солевой буфер в таблетках (PBS)	Росмедбио
Potassium chloride (KCl)	AppliChem
Sodium chloride (NaCl)	AppliChem
Magnesium chloride (MgCl ₂)	AppliChem
Calcium chloride dihydrate	Biofroxx
Ампициллин	ОАО Синтез
Kanamycine	Applichem
Дрожжевой экстракт	Applichem
Agar	Applichem
Tryptone	Химмед

Выделение РНК, ОТ-ПЦР, генотипирование

Название	Производитель
Фиксатор IntactRNA	Евроген
Trizol	Sigma-Aldrich
TRI Reagent	MRC
Набор TURBO DNase	Thermo Scientific
Diethylpyrocarbonate (DEPC) для обработки воды	Amresco
Набор Revertaid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific
DNase I, RNase-free	Thermo Scientific
gDNA Eraser DNA Removal Kit	Grisp
Праймеры N6	Бигль, Россия
5x qPCRmix-HS SYBR	Евроген
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	Евроген
BioMaster HS-Taq PCR-Color reaction mix	Biolabmix, Россия
рестриктаза <i>SacI</i>	NEB
Праймеры	Евроген

ВЭЖХ**Состав мобильной фазы:**

NaH₂PO₄ 14.9g/L; Na₂HPO₄ 1.376 g/L; 1-octanesulfonic acid sodium salt 400 mg/L;
EDTA 50 mg/L; Methanol 19.5% v/v; pH=4.5

Название	Производитель
1-octanesulfonic acid sodium salt	Sigma-Aldrich
Dihydroxybenzoic acid (DHBA), 98%	Sigma-Aldrich
Sodium Phosphate monobasic	Sigma-Aldrich
Sodium Phosphate dibasic	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Perchloric acid	Fluka
<i>Стандарты</i>	
Dopamine hydrochloride	Sigma-Aldrich
Serotonin hydrochloride	Sigma-Aldrich
L-Noradrenaline hydrochloride	Sigma-Aldrich
Homovanillic acid	Sigma-Aldrich
Dihydroxyphenilacetic acid	Sigma-Aldrich
5-hidroxyindoleacetic acid	Sigma-Aldrich

Клонирование и очистка плазмид

Название	Производитель
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
10 mM dNTPs	Thermo Scientific
T4 ligase	Thermo Scientific
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Maxiprep kit	Thermo Scientific
<i>Рестриктазы</i>	
<i>EcoRI</i>	Thermo Scientific
<i>XbaI</i>	Thermo Scientific
<i>HindIII</i>	Thermo Scientific
<i>KpnI</i>	Thermo Scientific

Клеточные культуры, трансфекция

Название	Производитель
DMEM, (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, HEPES)	Gibco
DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12), #51445c	Sigma-Aldrich
Opti-MEM	Gibco
Minimum Essential Medium without phenol red	Gibco
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), 15140122	Gibco
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco

GlutaMAX	Gibco
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco
Sodium Pyruvate (100 mM)	Gibco
TrypLe Express	Gibco
PBS	Thermo Scientific
Lipofectamine 2000	Thermo Scientific

Метод BRET

Название	Производитель
Magnesium Sulfate	AppliChem
Ascorbic acid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Forskolin	Sigma-Aldrich
Isoproterenol hydrochloride	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma-Aldrich
Coelenterazine <i>h</i>	Promega

Культуральный пластик

Название	Производитель
Cell culture dish 100 mm	Eppendorf
6-well plate	Eppendorf
96-well plate, white clear-bottom	Costar

Реактивы для иммуноцитохимии

Название	Производитель
Антитело antiHA, mouse (ab18181)	Abcam
Антитело Alexa Fluor 555 goat anti-mouse (A21424)	Lifetech
Normal horse serum (ab7484)	Abcam
Гистологические стекла	Thermo Scientific
Покровные стекла 24x24mm #1, 0.13 – 0.16 mm	Deltalab
Poly-d-lysine	Биолот
Fluoroshield DAPI	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich

3 МЕТОДЫ

3.1 Анализ паттерна экспрессии генов TAAR

3.1.1 Анализ паттерна экспрессии в тканях крысы и мыши методом ОТ-ПЦР

Для анализа экспрессии гена *Taar9* крысы использовали группу самок (n=3, возраст 1 год) и две группы самцов (n=3, возраст 7 месяцев; n=3, возраст 3 месяца) линии Спрэг-Доули, для анализа экспрессии в гонадах дополнительно взяли группу крыс-самцов (n=2, возраст 1 год). У самок крыс забирали следующие структуры: стриатум, продолговатый мозг, тонкая кишечника, толстая кишечника, печень, селезенка, почка, надпочечник, бурый жир, белый жир. У самцов крыс возрастом 7 месяцев: средний мозг (отдельно черная субстанция, центральная область покрышки), прилежащее ядро, гиппокамп, гипоталамус, мозжечок. У самцов крыс возрастом 3 месяца: гипоталамус. Диссекцию тканей проводили на холоде, ткани сразу помещали в жидкий азот, далее хранили при температуре – 80°C до выделения. Подробности об анализе экспрессии генов *Taar* у мышей указаны в таблице:

Ген	Животные	Структуры
Taar5	самки, C57Black6N (n=3, возраст >1 года)	мозжечок, ствол
Taar2	самцы,	обонятельный эпителий, обонятельная луковица,
Taar6	C57Black6N	стриатум, мозжечок, ствол, гиппокамп, гипоталамус,
Taar9	(n=3, возраст 3-4 месяца);	фронтальная кора, шейный отдел спинного мозга

Выделение РНК и обработка ДНКазой. Кусочки печени и кишечника после диссекции помещали в раствор фиксатор IntactRNA для лучшей сохранности РНК, далее хранили при –20°C. Выделение РНК из стволов мозга и мозжечка мыши проводили с использованием набора для GeneJet RNA Purification kit (Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Выделение РНК из остальных тканей мыши и крысы проводили с использованием TRI Reagent в соответствии с инструкциями производителя. Осадок РНК ресуспендировали в воде, свободной от РНКаз, и хранили при -80°C до использования. Концентрацию и качество РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop (Германия). Для

удаления оставшейся геномной ДНК использовали набор TURBO DNase. Стоит отметить, что для полного удаления геномной ДНК этот набор был наиболее эффективен. Мы сравнивали работу ДНКазы I (Синтол), DNase I (ThermoScientific, EN0521), gDNA Eraser DNA Removal Kit (GK83, Grisp, Португалия).

Синтез кДНК. Для синтеза кДНК с помощью набора RevertAid RT Reverse Transcription Kit использовали 1 мкг РНК. Обратную транскриптазу и реакционную смесь, содержащую 1 мкМ праймеров N6, добавляли к обработанной ДНКазой РНК и применяли следующий протокол: отжиг при 25°C в течение 10 минут, транскрипция при 42°C в течение 90 минут и терминация при 70°C в течение 10 минут. Образцы кДНК хранили при -20°C. В качестве контроля успешного удаления геномной ДНК каждый образец дублировали, но не добавляли обратную транскриптазу (RT(-) контроль).

ПЦР. Экспрессию генов оценивали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Для обратной транскрипции использовали 1 мкг РНК, разведение образцов кДНК для количественной ПЦР составляло 1:30.

Состав ПЦР реакции:

1 μ L кДНК (соответствует 30 нг РНК)	
4 μ L	5x HS буфер
0.5 μ M	F праймер
0.5 μ M	R праймер
x μ L	вода деионизированная, свободная от нуклеаз
$\Sigma=20\mu$ L	

Программа амплификации

35 ц.	95°C → 5 мин
	1. 95°C → 20 сек
	2. 60°C → 20 сек
	3. 72°C → 30 сек
кривая плавления	4. 95°C → 60 сек
	5. 55°C → 95°C 10 сек приращение 0.5°C

Подбор праймеров осуществляли с помощью сайта PrimerBlast. Праймеры после получения проверяли на специфичность с помощью плазмид, несущих гены TAAR, и геномной ДНК, а также строили кривую разведения. Ген *Hprt* крысы и ген *Gapdh* мыши, которые являются генами «домашнего хозяйства», были включены в

качестве внутреннего контроля нагрузки. Для постановок использовали прибор CFX96 (Biorad, США). Реакции ставили в дубликатах, для каждой пробы также ставили RT(-) контроль. Для подтверждения специфичности амплификации после каждой реакции ПЦР проводили анализ кривой плавления продукта и сравнивали с положительным контролем (кДНК обонятельного эпителия). Во всех образцах наблюдали один пик на кривой плавления. Таким же образом проводили анализ RT(-) контроля. Пробы с загрязнением геномной ДНК исключали из анализа. Далее ампликоны, включая RT(-) контроль, дополнительно анализировали путем электрофореза в 2% агарозном геле в буфере SB [91].

Праймеры, использованные для оценки экспрессии TAAR

Ген	Праймер	Последовательность	Размер продукта, п.н.	Исто - чник
Taar2 мыши	mTAAR2_F	5'-CGGATTCAACCACATGCCAT-3'	105	[5]
	mTAAR2_R	5'- CTAAGCATCAGGTGAAAGCT -3'		
Taar5 мыши	mTAAR5_F1	5'-TTCTGCTACCAGGTGAATGGGT-3'	74	[92]
	mTAAR5_R	5'-GCCAGATAGATGACGACCTGGA-1 3'		
Taar6 мыши	mTAAR6F	5'-TCTCTCTTCCACCTGAGCTT-3'	92	[5]
	mTAAR6R	5'-GACACAGACACCGTGAACTT-3'		
Taar9 мыши	mTAAR9F	5'- TGGAGAGCTGCTGGTACTTT-3'	108	[5]
	mTAAR9R	5'-GGTCAATGGAGATGCAGCAT-3'		
Taar9 крыс	TAAR96_F	5'-AGCCAACGAGGAAGGGATTG-3'	124	-
	TAAR96_R	5'-GACGACAGTGGGCAGAAAGA-3'		
Gapdh мыши	mGAPDH_F_2	5'-TTGATGGCAACAATCTCCAC-3'	110	[92]
	mGAPDH_R_2	5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGT-3'		
Hprt крыс	ratHPRT-F	5'- CTCATGGACTGATTATGGACAGGA C-3'	123	[93]
	ratHPRT-R	5'- GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGC C-3'		

3.1.2 Анализ данных РНК секвенирования из открытых баз данных

Данные секвенирования РНК получали из открытой базы данных Национального центра биотехнологической информации (National Center of Biotechnology Information, NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO). Поиск данных осуществляли по терминам: "brain," "cortex," "cortical," "hippocampus," "hippocampal," "striatum," "striatal," "caudatus," "putamen," "accumbens," "raphe," "brainstem," "pons," "cerebellum," "cerebellar," "basal ganglia," и "white matter". Каждый набор данных GEO, включенных в анализ, соответствовал следующим критериям:

- (1) набор данных отражает результаты исследования транскриптома человека или мыши;
- (2) доступны числовые показатели экспрессии TAAR9, данные представлены в виде ненормализованного числа прочтений («raw counts») или числа прочтений на миллион (CPM, counts per million);
- (3) четкое описание происхождения образца (данные исключались, если структура мозга или область коры не была указана);
- (4) не менее 5 образцов от психоневрологически здоровых взрослых субъектов, или, в случае исследования материала, полученного от лабораторных животных, не менее 5 образцов от животных контрольной группы, относящихся к дикому типу и не подвергавшихся каким-либо воздействиям в ходе исследования;
- (5) не менее 40 миллионов прочтений для каждого образца в приложенных файлах SRA (Sequence Read Archive) в группах здоровых испытуемых/контрольных животных.

Кроме того, мы включили в обзор три набора данных мыши, которые состоят из данных о РНК, выделенной из отдельных нейронов или субклеточных структур (Приложение 2). Набор GSE130376 содержит данные для девяти одиночных холинергических нейронов, выделенных из прилежащего ядра. Нейроны были выделены из мышей, которые наследственно восприимчивы или устойчивы к кокаиновой зависимости. Только три животных были дикого типа, поэтому набор не полностью соответствовал критериям включения по количеству образцов. Другой

набор данных, GSE121199, содержит транскриптомные данные для D1- или D2-дофаминовых средних игольчатых нейронов (medium spiny neuron, MSN) прилежащего ядра мыши (D1-MSN и D2-MSN, соответственно). Образцы в этом наборе были секвенированы с меньшей глубиной, чем мы выбрали, чтобы соответствовать критериям включения. Однако, результаты секвенирования РНК в этих исследованиях достаточно информативны для выявления экспрессии TAAR, вероятно, из-за дизайна эксперимента, включающего фракционирование клеток.

Нормализацию данных показателей экспрессии в наборах, полученных при исследовании тканей человека осуществляли методом определения числа транскриптов на миллион прочтений, TPM (Transcripts Per Million) с помощью инструмента GEO2R. Анализ наборов данных, содержащих результаты, полученные при исследовании тканей мыши проводился с помощью программного пакета edgeR, с нормализацией методом СРМ (функция *cpm* программного пакета edgeR) [94]. Для обоих величин СРМ и TPM значение 0.1 считали пороговым. Анализ проводили вместе с научным сотрудником лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины к.б.н. Анастасией Николаевной Вагановой.

3.2 Исследования на нокаутных животных

3.2.1 Получение нокаутных животных методом CRISPR/Cas9

Линия TAAR9-KO крыс была создана с использованием метода CRISPR/Cas9 на основе генетического бэкграунда Спрэг-Доули. Последовательность гидовой РНК (sgRNA) была сконструирована с целью ее посадки на последовательность сайта инициации трансляции в первом и единственном экзоне гена TAAR9 в соответствии с протоколами Zhang Lab [95]. Для получения экспрессионной плазиды TAAR9-sgRNA олигонуклеотиды 330TAAR95 (5'-CACCGTTCTCGTAGCAGAGCTCCA-3')/ 330TAAR93 (5'- AAACTGGAGCTTGCTACGAGAAC-3'), кодирующие 20 п.н. последовательность sgRNA (5'- GTTCTCGTAGCAGAGCTCCA-3'), после этапа отжига были лигированы в плазиду pX330 (Addgene plasmid ID: 42230), порезанную рестриктазой *BbsI*. Для добавления последовательности T7 промотора к последовательности sgRNA использовали праймеры T7sgRNATAAR9fw (5'-

TTAATACGACTCACTATAAGTTCTCGTAGCAGA GCTCCA-3') и sgRNA31 (5'AAAAGCACCGACTCGGTGCC-3'). С полученного ампликона проводили *in vitro* транскрипцию с использованием T7 РНК-полимеразы (набор Ambion MEGA shortscript T7 kit (AM1354)). Смесь sgRNA (25 ng/μL) и мРНК *Cas9* (IDT, 30 ng/μL) использовали для микроинъекции в пронуклеус зиготы крыс Спрэг-Доули. После инъекции зиготы инкубировали до стадии 2 клетки и переносили в псевдобеременных самок в соответствии с установленными методиками [96]. Потомство генотипировали методом ПЦР с праймерами, flankирующими мишень gRNA (Taar95: 5'-CAGCAGGTAGAAAATGGGAG-3' and Taar931 5'-AGTGGAGGATAGCGGTGATG-3') и секвенированием по Сэнгеру. Было создано две линии крыс с нокаутом гена TAAR9 в результате делеции цитозина (TAAR9-KO-delC) и инсерции аденина (TAAR9-KO-insA). Работы по получению нокаутных животных проводились в коллaborации с сотрудником Института Трансляционной Биомедицины СПбГУ Ольгой Кореньковой, а также с сотрудниками лаборатории Майкла Бадера Натальей Алениной, Еленой Поповой в Max Delbruck Center of Molecular Medicine (MDC), Германия.

3.2.2 Генотипирование и валидация нокаута

В исследовании использовали две мутантные линии с однонуклеотидной инсерцией и однонуклеотидной делецией. Поскольку обе мутации приводили к потере сайта рестрикции *SacI*, генотипирование животных проводили как комбинацию ПЦР с последующим расщеплением *SacI*. Генотипирование проводили при помощи ПЦР с геномной ДНК, выделенной методом щелочного лизиса [97] из кусочка уха животного, и праймерами, flankирующими сайт мутации (5'-TGGCCTTTGCAAGAACGTTT -3' and 5' GCAAAGCAGAACGGAGGTGTC 3'). ПЦР проводили в буфере, содержащем 2× BioMaster HS-Taq PCR-Color reaction mix, 1 μM каждого праймера и ~500 нг геномной ДНК. Условия ПЦР: 3 мин при 95°C, 35 циклов по 20 сек при 95°C, 20 сек при 63°C, 40 сек при 72°C и конечная инкубация при 5 мин при 72°. Продукт реакции – ампликон 339 п.н. – далее подвергался реакции с рестриктазой *SacI*. При генотипе дикого типа обе аллели подвергаются рестрикции и образуют 2 бенда (195 и 143 п.н.); у гетерозигот только одна аллель подвергается рестрикции, образуется три бенда (339, 195 и 143 п.н.); в генотипе нокаута обе аллели теряют сайт рестрикции, поэтому образуется только один бенд (339 п.н.).

Валидацию нокаута проводили с помощью секвенирования. Анализ расщепления потомства проводили на 90 животных, родившихся после скрещивания пар гетерозигота+гетерозигота. Для оценки содержания мРНК TAAR9 в обонятельном эпителии после нокаута гена брали самок с тремя генотипами (TAAR9-KO-delC, TAAR9-KO-insA, WT, n=1, возраст - 7 месяцев). Выделение РНК, обратную транскрипцию, ПЦР проводили как в пункте 3.1.1. Для гена крысы использовали праймеры - TAAR93_F (5'-AAGAGTAGCCAGACGAGAGAGG-3') и TAAR93_R (5'-TCATGTAGGCATCAA-TCACGGC-3').

3.2.3 Обратное скрещивание нокаутных животных

Для проведения обратного скрещивания (бэккроссинга) линии TAAR9-KO-delC была закуплена линия крыс Спрэг-Доули в ЦКП «SPF-виварий» Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. Было проведено 6 последовательных раундов обратного скрещивания гетерозигот с чистым диким типом. Данный процесс занял 2,5 года.

3.2.4 Животные

Информация о видах, линиях и количестве животных, на которых были выполнены эксперименты, за исключением получения трансгенных линий, представлены в таблице 4. Было использовано две линии трансгенных крыс с нокаутом гена *Taar9*: нокаут с делецией цитозина (TAAR9-KO-delC) и нокаут с инсерцией аденина (TAAR9-KO-insA).

Таблица 4. Животные, которые были использованы в работе

Вид	Линия/сток	Генетическая модификация	Число животных	Пол
крысы	Спрэг-Доули	нет	38	34♂ + 4♀
крысы	Спрэг-Доули	TAAR9-KO-delC	27	26♂ + 1♀
крысы	Спрэг-Доули	TAAR9-KO-insA	11	10♂ + 1♀
мыши	C57Black	нет	6	3♂ + 3♀

Животных содержали в SPF-виварии СПбГУ. Крыс размещали в клетках из акрилового пластика с проволочными крышками. В качестве подстилочного

материала использовали древесные опилки или гранулированный древесный наполнитель для содержания лабораторных грызунов отечественного производства. В одной клетке размещали до 3 особей, за исключением эксперимента по имплантации температурных датчиков и анализа потребления корма и воды, где животных содержали по одному на клетку. Животные имели постоянный свободный доступ к корму для грызунов и воде. Животных содержали при комнатной температуре 20-22 °C при естественном уровне освещения с циклом день-ночь 12:12 (свет включался в 10:00).

Забой крыс во всех экспериментах осуществлялся за счёт декапитации после легкой ингаляционной анестезии изофлюраном, мышей - путем дислокации шейных позвонков. Во время забоя также забирали материал для повторного генотипирования, в анализ включали только животных с подтвержденным генотипом. Все процедуры были одобрены Этическим комитетом в области исследований на животных СПбГУ (Заключение № 131-03-4 от 15 мая 2021 г.).

3.2.5 Анализ поведения животных

Все поведенческие тесты, за исключением обонятельного теста, выполняли на следующих группах в два этапа:

1) одновременный сравнительный анализ трех групп следующих генотипов: дикий тип (WT), нокаут TAAR9-KO-delC (KO-delC) и нокаут TAAR9-KO-insA (KO-insA). Для данного этапа использовали самцов крыс, n=10 в каждой группе, возраст – 3 месяца. Использование двух независимых групп с различными мутациями, приводящими к нокауту одного и того же гена, позволяет с большой вероятностью получить достоверные эффекты, возникшие из-за выключения гена без влияния других факторов, в том числе нежелательных мутаций, которые могут возникнуть после CRISPR/Cas9.

2) на втором этапе после проведения обратного скрещивания, которое заняло 2,5 года, было исследовано поведение и нейрохимического состава мозга животных генотипа TAAR9-KO-delC и дикого типа, использовали 3-4 месячных самцов из одного помета (n=8) после 6-кратного обратного скрещивания. Этих животных также использовали для проведения обонятельного теста.

Перед проведением каждого поведенческого теста крыс габитуировали в течение ≥ 10 минут в комнате, соседней с помещением, где проводилось исследование. Поведенческие эксперименты выполняли вместе с сотрудниками лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ м.н.с Савелием Ростиславовичем Куварзиным и с.н.с., к.б.н. Евгенией Викторовной Ефимовой.

3.2.5.1 Открытое поле

Базовое двигательное поведение животных оценивали с помощью теста открытое поле. Установка представляла собой черную пластиковую круглую арену (диаметр 97 см) с отверстиями в полу манежа (диаметр отверстий 2 см). Исследование проводили в затемнённой комнате (10-20 люкс). Каждую крысу помещали в центр арены и регистрировали спонтанную исследовательскую активность посредством записи на видеокамеру. Записанный файл анализировали с помощью программного обеспечения для видео-трекинга Noldus Ethovision в течение 5 минут. Отслеживались следующие поведенческие показатели: общее пройденное расстояние, скорость, совокупная продолжительность пребывания в центральной зоне и частота заходов в центральную зону, длительность груминга, количество исследований норок и стоек.

3.2.5.2 Открытое поле с новым объектом

Для анализа долговременной памяти проводили тест открытое поле с новым объектом. Лабиринт представлял собой пластиковую круглую арену черного цвета (диаметр 97 см) с отверстиями в полу арены (диаметр отверстий 2 см). В первый день животных помещали в центр арены, содержащей два одинаковых круглых предмета в каждой половине арены (симметрично) и регистрировали спонтанную исследовательскую активность посредством записи на видеокамеру. Записанный файл анализировали с помощью программного обеспечения для видео-трекинга Noldus Ethovision в течение 5 минут. На второй день через 24 часа крыс помещали в центр той же арены, но один круглый предмет заменяли на новый предмет прямоугольной формы. Оценивали следующие параметры: время, проведенное рядом с новым объектом, а также время и частота обнюхивания нового объекта.

3.2.5.3 Приподнятый крестообразный лабиринт

Приподнятый крестообразный лабиринт использовали для оценки тревожноподобного поведения грызунов. Лабиринт состоял из двух противоположных открытых (50 x 14 см) рукавов без стенок и двух противоположных закрытых рукавов (50 x 14 x 30 см), приподнятых на 40 см от пола. В норме крысы предпочитают находиться в закрытых рукавах, поэтому исследовательское поведение в открытых рукавах считают показателем сниженной тревожности. Крыс помещали в центр приподнятого крестообразного лабиринта лицом к открытому рукаву и регистрировали спонтанную двигательную активность посредством записи на видеокамеру в течение 5 мин. Следующие параметры были проанализированы с помощью программного обеспечения Noldus Ethovision: совокупная продолжительность в открытых рукавах, частота входов в открытые рукава, общее расстояние, пройденное отдельно в открытых и закрытых рукавах, средняя скорость, количество вставаний на задние лапы в закрытых рукавах и количество свешиваний.

3.2.5.4 T-тест

Т-тест использовали для исследования кратковременной памяти животных. Размер лабиринта: стартовая аллея 50x16 см, ответвления 50x10 см, высота стены 32 см. Испытание проводится в два этапа. На первом этапе каждую крысу помещали в Т-образный лабиринт с одним закрытым рукавом на 5 минут, а через 45 минут помещали в тот же лабиринт на 5 минут, но оба рукава были открыты. В норме крыса исследует новый рукав чаще. Измеряли время, проведенное в известном и ранее закрытом рукаве, с помощью Noldus Ethovision.

3.2.5.5 Стress-индукцированная гипертермия

Для измерения температуры тела грызунов использовали цифровой термометр BIO-TK8851 (BIOSEB, Франция). При каждом измерении датчик вставляли в прямую кишку зафиксированного экспериментатором животного до тех пор, пока показания термометра не стабилизировались. Температуру животных оценивали дважды с разностью 10-15 минут.

3.2.5.6 Тест «принудительное плавание»

Для оценки депрессивноподобного поведения использовали тест «принудительное плавание». Исследование проводили в 4 цилиндрических ёмкостях, изготовленных из стекла (диаметр 20 см, высота 50 см). Перед каждым экспериментом цилинды заполняли свежей водопроводной водой (температура $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$) на 2/3. Крыс помещали в воду, продолжительность каждого теста составляла 10 минут. На видеозаписи один и тот же исследователь оценивал суммарное время пребывания в состоянии покоя, активного и пассивного плавания, фиксируя данные с помощью программы Realtimer (Россия).

3.2.5.7 Тест на обонятельное предпочтение

Метод проводили, как описано ранее у Saraiva и коллег [57]. Крыс помещали в новую клетку без подстила размером 52x40 см, h=20 см (по одной крысе на клетку) и габитуировали в ней в течение 10 мин. Воздействие обонятельных стимулов осуществляли путем осторожного опускания кусочков фильтровальной бумаги ($1,5 \times 2$ см), пропитанной $50 \mu\text{L}$ дистиллированной воды (H_2O), в один конец клетки и одоранта (85 mM в H_2O , что эквивалентно 4,25 мкмоль) в другой конец клетки. Поведение животных записывали на видео в течение 5 минут. Видео были оценены ослеплённым (в отношении одоранта и генотипа) экспериментатором. Общее время обнюхивания измеряли в течение 5 минут воздействия одоранта.

3.2.5.8 Измерение потребления корма и воды

Для измерения веса животных, потребления корма и воды 3-месячные самцы генотипа TAAR9-KO-delC ($n=8$) содержались по одному в клетке. В течение четырех дней раз в день взвешивали корм и поилку с водой, добавляя новую предваренную порцию.

3.2.6 Непрерывный анализ температуры

Исследование температуры с помощью датчиков проводили на 6-8-месячных самцах дикого типа и нокаутной линии TAAR9-KO-delC (WT, $n=8$; KO, $n=6$). Животные были поделены на две подгруппы с равным соотношением по 3 KO и 4 WT в подгруппе из-за ограниченного количества датчиков. Эксперименты старались проводить в максимально одинаковых условиях, соблюдая очередность различных

воздействий и интервал между ними. Полученные данные в двух подгруппах сначала анализировали отдельно и далее объединяли.

Имплантация датчиков. В брюшную полость имплантировали iButton Data Logger (научно-техническая лаборатория «Элин»). Животных анестезировали ингаляционным наркозом с изофлюраном. Выбирали нижнюю часть живота, обрабатывали бетадином и делали разрез кожи и стенки брюшины длиной 1,5–2 см. Затем iButton располагали в брюшной полости, и брюшина и кожа отдельно закрывались шовным материалом Vicryl Ethicon, 20 мм (Braun, Германия). Шов покрывали kleem БФ-6, обладающего ранозаживляющим и антисептическим действием. Пока животное было под наркозом делали в/м инъекцию гентамицина и кеторолака 10 мг/кг. После операции животных содержали в отдельных клетках и давали им выздороветь в течение 7 дней. Через три месяца после экспериментов животные были эвтаназированы декапитацией после анестезии с изофлюраном, и iButton были извлечены из брюшной полости. Параллельно мы проверили наличие признаков повреждения внутренних органов, вызванного iButton.

Запись данных температуры с помощью датчиков. Центральную температуру тела автоматически регистрировали с помощью внутрибрюшинно имплантированных датчиков iButton в непрерывном режиме. iButton весит 3,3 г (диаметр: 16 мм, толщина: 6 мм). Каждый датчик может хранить данные показаний температуры в заданном пользователем временном интервале. Начало измерения определяется пользователем. Здесь мы использовали 3-минутный интервал, период измерения составил более 30 дней. iButton начали регистрировать температуру за ~20 минут до имплантации.

Анализ данных по температуре. После извлечения датчиков данные переносили в Excel с помощью ПО iBDL_R (IButton Data Logger Revisor) и анализировали суточное изменение температуры каждого животного, среднюю температуру за день и ночь. В сутки от каждого животного было получено 480 точек. Для построения динамики средней температуры в течение недели использовали данные о температуре, начиная с 7 дня после операции. Для определения температуры тела за дневной период (часы 12:00-19:00) и ночной период (часы 00:00-07:00) вычисляли среднее по каждому животному (140 точек) в течение 6 дней, исключая первые 7 дней после операции, дни смены подстила, а также до начала первого воздействия в

виде нагревания на 17 день после операции. За День 1 в графиках и описании брали день операции.

Нагревание. Комнатную температуру в комнате с клетками поддерживали в течение 3 часов в пределах 30-36°C. Большую часть времени температура была ~33°C.

Охлаждение до 21°C и 17°C. Исследование проводили в 4 цилиндрических ёмкостях, изготовленных из стекла (диаметр 20 см, высота 50 см). Перед каждым экспериментом цилинды заполняли свежей водопроводной водой необходимой температуры (температура ± 1 °C) на 2/3. Продолжительность каждого теста составляла 10 минут. После купания крыс вынимали из воды, вытирали насухо полотенцем, возвращали в их домашнюю клетку и оставляли в теплой среде перед радиатором.

Иммобилизационный стресс: Крыс помещали в цилиндрический контейнер со свободным доступом воздуха, без возможности двигаться на 3 часа.

Операции по имплантации датчиков и эксперименты по термометрии были выполнены вместе с сотрудниками лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины м.н.с. Савелием Ростиславовичем Куварзинным, с.н.с., к.б.н. Евгенией Викторовной Ефимовой и с.н.с., к.б.н. Евгением Викторовичем Кановым.

3.2.7 Оценка содержанияmonoаминов в тканях мозга

Оценку проводили методом обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Диссекцию гипоталамуса, стриатума и фронтальной коры осуществляли на холоде. Выделенные структуры немедленно переносили в жидкий азот и хранили при температуре -80°C до анализа. Подготовка проб к хроматографическому анализу включала в себя их взвешивание, размораживание и гомогенизацию в необходимом объеме 0,1 М хлорной кислоты, содержащей 2,3-дигидроксибензойную кислоту (DHVA) заданной концентрации (объем кислоты высчитывался в зависимости от структуры и от веса этой структуры). Гомогенизацию проводили с помощью ультразвукового соникатора Q125 (Qsonica, США). Следующим этапом производилось центрифугирование (14000 g, 10 минут, +4°C). Супернатант переносили в пробирки с фильтром 20 μM (PVDF, Millipore) для проведения второго этапа центрифугирования (12000 g, 2 минуты, +4°C). Далее проводилось

хроматографическое разделение супернатанта, полученного в ходе фильтрации. Для анализа использовался прибор Eicom HTEC-500 (Japan). Разделение производилось на обращённо-фазной колонке CA-50DS (150*2.1 мм, Eicom, Japan). В состав подвижной фазы входили следующие компоненты: 100 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,17 мМ ЭДТА, 1,8 мМ октилсульфонат, 18% метанол, pH 4.5. Детектирование осуществлялось на аналитической ячейке с графитовым электродом WE-3G (Eicom, Japan), при потенциале +650 мВ. Расход элюента – 0,2 мл/мин. Для калибровки хроматографа использовались смеси рабочих стандартов определяемых веществ в концентрации 0,5 нмоль/мл. Работа с хроматограммами производилась с помощью программы “PowerChrom”. Определение содержанияmonoаминов и их метаболитов в структурах производилось с использованием внутреннего стандарта DHBA (дигидроксибензиламин, вещество катехоламиновой природы, но не встречающееся в нативной ткани) в концентрации 0,5 нмоль/мл. Для расчета содержания monoаминов и их метаболитов применялся фактор отклика (RF), который рассчитывался, как:

$$RF \text{ стандарта} = \frac{\text{Площадь пика внутреннего стандарта}}{\text{Площадь пика стандарта}} * \text{концентрация стандарта}$$

Концентрация вещества (дофамин, серотонин и т.д.) в пробе рассчитывалась как:

$$\text{Концентрация вещества в пробе} = \frac{\text{площадь пика вещества в пробе}}{\text{площадь пика внутреннего стандарта в пробе}} * RF \text{ стандарта}$$

Содержание определяемых веществ рассчитывалось в нг/мг ткани. Был проведен количественный анализ норадреналин, дофамина, серотонина, метаболитов дофамина (дигидроксифенилуксусная кислота (ДОФУК) и гомованилиновая кислота (ГВК)), а также метаболита серотонина 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК). Также были исследованы отношения метаболитов monoаминов к самим monoаминам – 5-ОИУК/серотонин, ДОФУК/дофамин и ГВК/дофамин, отражающие оборот соответствующих monoаминов, аналогично. ВЭЖХ-анализ проводили вместе с сотрудником лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ м.н.с Микаэлем Мором.

3.2.8 Сравнительный анализ экспрессии геновmonoаминергических систем

Была проведена оценка сравнительной экспрессии генов ключевых белков дофаминергической, глутаматергической и серотонинергической системы в мозге животных дикого типа и животных, нокаутных по гену TAAR9 с помощью ПЦР в реальном времени. Для анализа брали (n=6-8) 3-месячных самцов дикого типа и нокаутной линии TAAR9-KO-delC до завершения обратного скрещивания на потомстве F2. Для анализа на льду извлекали стриатум, средний мозг+продолговатый мозг, фронтальную кору, гипоталамус, обонятельную луковицу. Ткань сразу помещали в реагент Trizol и хранили на -20°C.

Подбор и валидация праймеров. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов, были разработаны с помощью NCBI PrimerBLAST на основе последовательностей мРНК. Где возможно, праймеры выбирали на стыке экзон-экзон. Критериями при подборе праймеров были:

- длина последовательности 18-22 bp.
- размер продукта ~ 120 bp.
- Tm ~ 60°C
- отсутствие шпилек и гомо-, гетеродимеров с $\Delta G < -10$ ккал/моль (оценивали в онлайн калькуляторе IDT Oligo Analyser)
- отсутствие неспецифического связывания в мРНК и геномной ДНК крысы, геномной ДНК человека.

После получения праймеров ставили ПЦР с кДНК стриатума крысы и анализировали кривую плавления с красителем SYBR, а также наносили продукт реакции на 2% агарозный гель. Праймеры, которые давали неспецифические продукты в отрицательном контроле (вода) или двойной пик на кривой плавления, исключали из работы. Далее серию из 5 разведений кДНК, полученной с 1 µg стриатума или среднего мозга крысы амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали для построения калибровочной кривой. Калибровочную кривую в координатах «*Ct* (значение порогового цикла) — концентрация кДНК» строили в Excel, вычисляя параметр R², который должен был быть > 0.99. Последовательности использованных в работе праймеров приведены в Приложении 3.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. Выделение РНК и ОТ-ПЦР проводили так же, как в разделе 3.1.1 с небольшими изменениями. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой I пр-ля ThermoScientific (1 U/1 µg РНК, 37°C, 10 мин), далее инактивировали ДНКазу инкубацией при 60°C. Далее проводили обратную транскрипцию 1 мкг РНК с помощью праймера N6 и набора RevertAid Kit в объеме 20 µL. Полученную кДНК разводили в 4 раза и использовали для количественной ПЦР в режиме реального времени со специфическими праймерами и праймерами к гену для нормализации (ген HPRT или ген 28S рибосомной РНК). Нормализацию и оценку экспрессии делали по методу $\Delta\Delta Ct$ [98].

3.3 Методы *in vitro*

3.3.1 Клонирование

Для этой работы ген *Taar9* крысы был клонирован в вектор для эукариотической экспрессии. Для экспрессии TAAR9 в клетках HEK293T под контролем промотора CMV был получен вектор pcDNA-β2N9-rTAAR9. В целях повышения уровня мембранный экспрессии был добавлен N-концевой таг β2N9-3xHA, состоящий из первых 9 аминокислот β2-адренергического рецептора (MCQPGNGSA). Также для детекции клеточной локализации с помощью антител на N-конец был добавлен гемагглютининовый таг в 3 повторах (YPYDVPDYA). Для анализа локализации белка в клетке последовательность гена *Taar9* клонировали в вектор pEGFPN3. Праймеры конструировали с помощью Benchling, последовательности генов брали с сайта NCBI.

Общий принцип клонирования: после ПЦР амплификации с помощью праймеров для ввода сайтов рестрикции проводили рестрикцию. Целевой вектор обрабатывали этими же рестриктазами. После лигирования компетентные клетки *E. coli* трансформировали с помощью лигазной смеси. Устойчивость к антибиотикам использовали для выявления потенциальных положительных клонов, что подтверждали путем рестрикционного анализа и секвенирования по Сэнгеру.

3.3.1.1 Векторы

Вектор pEGFPN3 был любезно предоставлен сотрудником Центра трансгенеза и редактирования генома ИТБМ СПбГУ Ю.В. Соповой. Вектор

pcDNA_RTP1S для экспрессии шаперона RTP1S был заказан в Addgene (#296736) [99]. Для детекции уровня цАМФ использовали имеющийся в лаборатории вектор, кодирующий биосенсор с белком EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP) из ранее опубликованной работы [82]. EPAC BRET-биосенсор содержит укороченную последовательность белка EPAC (а.к. 149-881), фланкированную последовательностями люциферазы *Renilla reniformis* и цитринового флюoresцентного белка на 5' и 3' концах, соответственно. pcDNA- β 2N9-hTAAR1, содержащую последовательность N-концевого тага β 2N9-3xHA уже имелась в лаборатории и описана в работе [82].

Вектор для экспрессии гена TAAR9 (pcDNA- β 2N9-rTAAR9). Ген *Taar9* методом ПЦР амплифицировали с геномной ДНК крысы дикого типа с введением рестрикционных сайтов *EcoRI* и *XbaI* с использованием праймеров rTAAR9_EcoRI_F и rTAAR9_XbaI_R. Далее ампликон очищали набором GeneJet Gel Extraction Kit, а затем клонировали по тупым концам в субклонирующий вектор pJet1.2 с использованием коммерческого набора CloneJET PCR Cloning Kit. Полученный вектор pJet_rTAAR9 секвенировали для подтверждения верной последовательности гена *TAAR9*. Затем гидролизовали рестриктазами *EcoRI* и *XbaI* и встраивали в имеющийся в лаборатории вектор pcDNA- β 2N9-hTAAR1[82], гидролизованный этими же рестриктазами.

Вектор для экспрессии гена TAAR9, слитого с EGFP (pEGFP- β 2N9-rTAAR9). Для изучения локализации белка в клетке был получен вектор pEGFP- β 2N9-rTAAR9, который содержит ген *Taar9*, слитый с геном *GFP*, под контролем промотора CMV. Для получения данного вектора амплифицировали кодирующую область гена *TAAR9* с N-концевым тагом при помощи ПЦР с использованием праймеров 3HA_HindIII_F и rTAAR9_KpnI_R, используя в качестве матрицы вектор pcDNA- β 2N9-rTAAR9. Полученный ампликон гидролизовали рестриктазами *HindIII* и *KpnI* и встраивали в вектор pEGFPN3, гидролизованный этими же рестриктазами.

Праймеры для клонирования

Клонирование β -TAAR9 в pcDNA- β 2N9-hTAAR1 с <i>EcoRI/XbaI</i>	
rTAAR9_EcoRI_F	5'- CAGGAATTCTGGAGCTCTGCTACGAGAAC
rTAAR9_XbaI_R	5'- CGCTCTAGATTAACCTGCACCTGCTTCTCA

Клонирование вектора для экспрессии белка TAAR9-GFP <i>HindIII/KpnIR</i>	
3HA_HindIII_F	5' – CATAAGCTTATGGCTAGCTACCCATACGATG
rTAAR9_KpnI_R	5' – CGCGGTACCACCTGCACCTGCTTCTTC

Праймеры для секвенирования

pJet1.2_F	5'- CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC
pJet1.2_R	5'- AAGAACATCGATTTCATGGCAG
CMV_F	5' – CGCAAATGGCGGTAGGCGTG
BGH_R	5' – TAGAAGGCACAGTCGAGG

3.3.1.2 ПЦР амплификация

ПЦР использовали для амплификации генов и добавления сайтов рестрикции.

Состав ПЦР реакции:

50-250 нг геномной ДНК или 10 нг плазмидной ДНК	
1 x	Hi Fi буфер
0.2mM	dNTPs
0.5μM	F праймер
0.5μM	R праймер
0.8U	Phusion High-Fidelity ДНК полимераза
x μL	вода деионизированная, свободная от нуклеаз
$\Sigma=40\mu\text{L}$	

Программа амплификации

	98°C → 3 мин
	1. 98°C → 20 сек
○ 35 ц.	2. 64°C → 15 сек
	3. 72°C → 40 сек
	72°C → 10 min

Фрагменты разделяли с помощью 1% агарозного гель-электрофореза с добавлением бромистого этидия, вырезали лезвием из геля и очищали GeneJet Gel Extraction Kit, основанного на связывании ДНК с силикагель колонками, элюцию проводили в объеме 10 μL. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Nanodrop. Очищенные фрагменты либо сразу подвергали рестрикции, либо хранили на -20°C до 2-3 дней.

3.3.1.3 Рестрикция и лигирование

Рестрикция. Протоколы рестрикции были сгенерированы с помощью онлайн DoubleDigest Calculator от Thermo Fisher Scientific. Рестрикции подвергали векторы и фрагменты для последующего лигирования или в целях рестрикционного анализа полученных клонов.

Общий протокол рестрикции

$10 \mu\text{L}$ очищенного ПЦР-фрагмента или $1 \mu\text{g}$ плазмидной ДНК	
1 x	соответствующий буфер для рестрикции
5-10 U	Рестриктаза
$x \mu\text{L}$	вода деионизированная, свободная от нуклеаз
$\Sigma=20 \mu\text{L}$	

Инкубация 1-2 часа при температуре 37°C

Лигирование. 50-100 нг ДНК брали для лигирования в соотношении 3:1 (вставка:вектор). Смесь для лигирования собирали на льду, далее инкубировали 30 мин. при температуре 22°C . Лигазную смесь сразу использовали для последующей трансформации либо хранили при -20°C в течение ночи.

Состав лигазной смеси

3:1 (вставка:вектор)	
1 x	T4 буфер
5 Weiss U	T4 лигаза
$x \mu\text{L}$	вода деионизированная, свободная от нуклеаз
$\Sigma=10 \mu\text{L}$	

В качестве контроля самолигирования вектора после рестрикции также проводили в отдельной пробирке лигирование без вставки и сравнивали количество колоний с контролем.

3.3.1.4 Трансформация *E.coli*

Компетентные клетки *E.coli* XL10-Gold использовали от Evrogen (Россия), либо получали методом с использованием CaCl_2 [100]. Компетентные клетки трансформировали лигазной смесью с помощью теплового шока. Аликвоты компетентных клеток, хранившихся при -80°C , размораживали на льду. Далее добавляли охлажденную лигазную смесь и аккуратно перемешивали. Смесь инкубировали в течение 30 минут на льду. Затем следовал тепловой шоком в течение

90 секунд при 42°C, 2 минуты во льду. Добавляли 600 µL среды SOC без антибиотика и инкубировали в течение часа при 37°C. В этот период клетки начинают нарабатывать ферменты для антибиотикорезистентности. Клетки высевали на чашки с агаром с ампциллином или канамицином для позитивной селекции и инкубировали при 37°C в течение ночи. 3-5 клонов засевали в 3-10 мл среды LB+антибиотик (канамицин или ампциллин), растили при покачивании 200-300 грт в течение ночи на +37°C. Далее очищали плазмиды набором GeneJet Plasmid Miniprep Kit, элюцию проводили в объеме 50 µL. Плазмиды подвергали рестрикции с дальнейшим анализом картины после разделения в агарозном геле и после отбора отправляли на секвенирование по методу Сэнгера для подтверждения верной вставки. Секвенирование проводилось сотрудниками Романович А.Э. и Машарским А.Э. на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. Анализ результатов секвенирования производили в программе Snapgene (США). Стоки плазмид хранили при -20°C.

3.3.1.5 Очистка плазмид для трансфекции

Для получения достаточного количества плазмидной ДНК бактерии трансформировали 10 нг плазмида и высевали в 100 мл среды LB или TB [101], далее растили в течение ночи при +37°C и покачивании 250 грт. Для очистки использовали набор GeneJet Plasmid Maxiprep kit с небольшими изменениями: для увеличения концентрации элюцию проводили в объеме 100-200 µL в несколько этапов. Далее объединяли наиболее концентрированные фракции. Концентрация для успешной трансфекции была 0.9-1 µg/µL. Также был использован способ для очистки пДНК по данной методике [101]. Стоит учитывать, что полученную этим методом пДНК нельзя хранить при +4°C, так как она подвергается гидролизу, также пДНК не подходит для рестрикционного анализа, тем не менее мы успешно использовали для трансфекции. Очищенную пДНК наносили на агарозный гель и оценивали качество и чистоту. Концентрацию ДНК в полученном растворе устанавливали при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). пДНК хранили при -20°C либо для длительного хранения при -80°C.

3.3.2 Клеточные культуры

3.3.2.1 Ведение клеточных линий

Культуру клеток HEK293T разстили на 100 mm чашках при аэрации с содержанием 5% CO₂ со средой DMEM, для СНО-K1 использовали среду DMEM/F-12 не более 16-20 пассажей. Обогащали среду добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1xGlutaMAX, 1 mM пирувата натрия, 1x MEM-NEAA (незаменимые аминокислоты) и 0.1 мг/мл пенициллина/стрептомицина при 37°C. Пересевали через каждые 2-3 дня с использованием улучшенного аналога трипсина Tryple Express. Все клеточные культуры рутинно проверяли раз в 2-3 месяца на контаминацию *Mycoplasma spp.* с помощью ПЦР [102].

3.3.2.2 Трансфекция

Для трансфекции использовали клетки HEK293T или СНО-K1 на ≥6 пассаже. Принцип трансфекции заключается в том, что липосомальный реагент Lipofectamine2000 приводит к формированию комплексов плазмидной ДНК и липосом. Липосомы интернализируются посредством эндоцитоза. После разрушения эндосом плазмидная ДНК освобождается и входит в ядро во время следующего клеточного деления. Клетки высевали на 100 mm чашку, разстили до достижения 70% конфлюентности, далее среду DMEM заменяли на среду OPTIMEM без антибиотиков с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки, 1x GlutaMAX (L-alanyl-L-glutamine), 1 mM пирувата натрия. Инкубировали 30 μL Lipofectamine2000 с 120 μL OPTIMEM в течение 5 минут. В это время доводили объем плазмидной ДНК средой OPTIMEM до объема 150 μL (5 μg плазмида EPAC + 5 μg плазмида TAAR9). Далее содержимое пробирки с Lipofectamine 2000 по каплям добавляли к раствору плазмидной ДНК и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. После по каплям добавляли к чашке с клетками. Инкубировали в течение 4-5 часов или ночи. Для конфокальной микроскопии клетки высевали на 6-луночный планшет и после достижения 70% конфлюентности трансфицировали по 1 μg плазмида TAAR9-GFP на лунку.

3.3.2.3 Конфокальная микроскопия и иммунофлюоресцентное окрашивание

Для анализа локализации рецептора в клетке использовали клетки, трансфецированные вектором pEGFPN3 в качестве положительного контроля, и вектор pEGFP_β2N9-rTAAR9, который кодирует TAAR9, сплитый с белком EGFP на С-конце. После трансфекции в течение ночи, клетки плотностью 100 000/лунка пересевали на 6-луночный планшет с покрытыми поли-Д-лизином стеклами на дне и растили на среде DMEM с добавками в течение суток. Для предварительной оценки трансфецированных клеток оценивали флюоресценцию GFP живых клеток на микроскопе ZOE Fluorescent Cell Imager (Biorad, США). Далее все этапы проводили в условиях комнатной температуры. Клетки отмывали от среды буфером PBS, фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 12,5 минут, после чего клетки отмывали раствором PBS 3 раза по 5 минут. Далее окрашивали красителем Fluoroshield DAPI и монтировали на предметное стекло. Для иммунофлюоресцентного окрашивания после фиксации и промывки проводили блокировку неспецифического связывания инкубацией с 5% normal horse serum, разведенной на PBS, в течение 1 часа при комнатной температуре. Инкубация с первыми antiHA антителами проводили в течение 60 минут при комнатной температуре или в течение ночи при +4°C, антитела разводили на 5% normal horse serum на PBS в соотношении 1:1000. Вторые антитела разводили на 5% normal horse serum на PBS в соотношении 1:1000, инкубацию проводили в течение 1 часа, после чего отмывали 3 раза PBS и окрашивали красителем Fluoroshield DAPI и монтировали на предметное стекло образцы. Анализ проводили на конфокальном микроскопе Leica TCSSP5 на базе «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ, используя длину волны возбуждения 488 нм для визуализации GFP, 553 нм для антитела Alexa Fluor 555.

3.3.2.4 Метод биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET)

Для BRET-детекции изменения уровня цАМФ производилась инициация биолюминесценции с помощью реагента целентеразина h (субстрат для Renilla-люциферазы). Клетки после трансфекции рассевали на 96-луночный планшет с белыми стенками из расчета 150 000 клеток/лунка (среда Minimum Essential Medium без фенолового красного с содержанием 2% фетальной бычьей сыворотки, 1xGlutaMAX, 1 mM пирувата натрия, 0.1 мг/мл пенициллин/стрептомицина). В

планшете инкубировали в течение 24 часов. Все анализы BRET проводились в конечном объеме 100 μL на лунку при комнатной температуре. Непосредственно перед экспериментом на дно планшета наклеивали наклейка Perkin Elmer Backseal, культуральная среда заменяли на 80 μL PBS (с добавлением 0,03% аскорбиновой кислоты, 100 mg/L CaCl₂ и MgSO₄) с последующим добавлением 10 μL 50 мкМ целентеразина-h (конечная концентрация 5 мкМ) и 10 μL 2 mM ингибитора фосфодиэстеразы IBMX (конечная концетрация 200 мкМ). Через 10 минут инкубации клеток с субстратом Rluc вносили исследуемые соединения или PBS в объеме 10 μL . Для скрининга соединения брали в конечной концентрации 50-250 мкМ. Для построения кривой разведения соединения брали в следующих концентрациях: 1000, 500, 250, 125 , 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 мкМ). В качестве положительных контролей использовали изопротеренол (агонист эндогенного β 2-адренергического рецептора HEK293T) в концентрации 1 μM , а также неспецифический активатор аденилатциклазы форсколин в концентрации 20 μM . Концентрация ДМСО не превышала 1%. Регистрацию BRET проводили динамически в течение 20 мин с помощью планшетного ридера Mithras Centro XS3 LB 960 (Berthold Technologies, Германия) с оптическими фильтрами 465-505 nm для донора (Rluc) и 515-555 nm для акцептора (YFP). Данные люминесцентного сигнала обрабатывали с помощью программы MicroWin. Сигнал BRET рассчитывали как отношение света, излучаемого при 540 nm, к свету, излучаемому при 480 nm (YFP/Rluc). Далее вычисляли $\Delta\text{BRET} = \text{BRET соотношение (PBS)} - \text{BRET соотношение (вещество)}$. Для построения кривой EC50 использовали значения ΔBRET . Для более наглядного представления результатов скрининга использовали BRET соотношение Rluc/YFP. Схема эксперимента представлена на Рисунке 2.

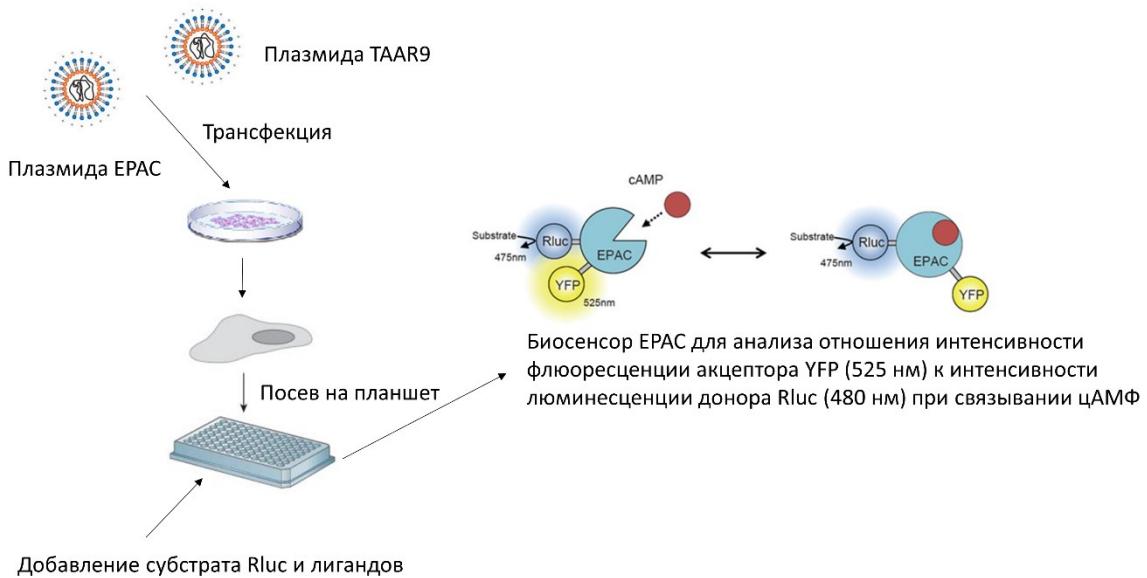


Рисунок 2. Схема проведения эксперимента по скринингу агонистов TAAR9 с использованием BRET. Иллюстрация биосенсора EPAC взята из Salahpour, 2012.

3.4 Статистический анализ

Полученные значения выражали как среднее \pm SEM. На графиках приведены также индивидуальные значения в виде точек. Для определения достоверности различий в исследуемых группах применялся непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни. Для анализа достоверности различий между группами при измерении температуры имплантированными датчиками использовали двухсторонний дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с апостериорным тестом Бонферрони. Для построения кривой EC₅₀ использовали функцию non-linear curve fitting. Анализ проводили с использованием GraphPad Prism версии 8.0 для Windows от GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США (www.graphpad.com). Значения $p < 0,05$ считались значимыми, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 Глава 1. Анализ паттерна экспрессии TAAR

4.1.1 Экспрессия генов *Taar* в тканях мыши и крысы

Исследование роли рецепторов семейства TAAR осложняется отсутствием на настоящий момент специфичных антител и селективных агонистов/антагонистов. Отсутствие специфичных антител не позволяет получить релевантные данные об экспрессии TAAR на уровне белка. Поэтому на данный момент оценка экспрессии TAAR возможна только на уровне мРНК, при помощи методов обратной транскрипции и гибридизации *in situ*. Кодирующая область генов *Taar*, за исключением *Taar2*, составляет один экзон, что не позволяет использовать праймеры, специфичные для кДНК, но не геномной ДНК. В качестве отрицательного контроля сигнала от геномной ДНК использовались образцы РНК, в которые при обратной транскрипции не добавляли обратную транскриптазу, и не содержащие таким образом кДНК. Ввиду того, что любая оставшаяся геномная ДНК в образце РНК может дать ложноположительный ответ, проводилась двойная проверка: анализировали сигнал флюоресценции в образце RT(-) (РНК без ревертазы), а также наносили этот контроль на гель. В анализ включали образцы, чистые в обоих случаях. У мыши методом ОТ-ПЦР были исследованы *Taar2*, *Taar6*, *Taar9* в следующих тканях: обонятельный эпителий, обонятельная луковица, стриатум, мозжечок, ствол, гиппокамп, гипоталамус, фронтальная кора, шейный отдел спинного мозга; *Taar5* – в мозжечке и стволе мозга. У крысы был подробно исследован паттерн экспрессии *Taar9*: обонятельный эпителий, стриатум, продолговатый мозг, средний мозг (черная субстанция, вентральная область покрышки), прилежащее ядро, гиппокамп, гипоталамус, мозжечок, тонкая кишечка, толстая кишечка, печень, селезенка, почка, надпочечник, семенники.

Экспрессия *Taar2*, *Taar6*, *Taar9* мыши была подтверждена в обонятельном эпителии и луковице. У мыши экспрессия *Taar2* была найдена в коре, гипоталамусе и стволе мозга [9], *Taar5* – в мозжечке и стволе [92], *Taar6* – в коре [103], *Taar9* – в мозжечке (Рисунок 3). Ни в одной из других изученных структурах мозга мыши мРНК *Taar9* обнаружено не было.

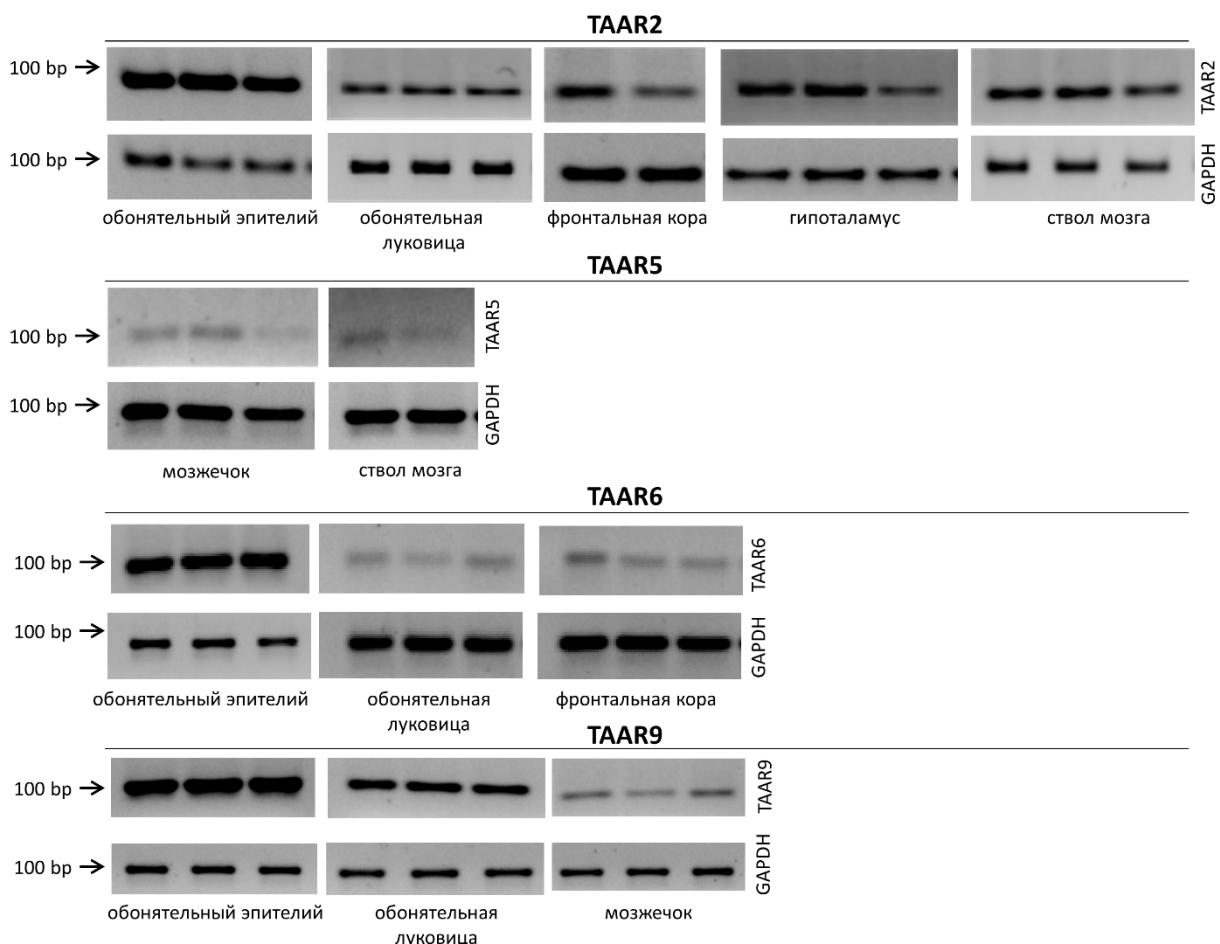


Рисунок 3. Оценка экспрессии генов *Taar* в тканях мыши методом ОТ-ПЦР. На 2% агарозный гель наносили продукты ОТ-ПЦР. На гель наносили 10 μ L ампликонов *Taar*, 4-5 μ L ампликонов *Gapdh* в качестве внутреннего контроля нагрузки РНК.

Однако, у крыс экспрессия гена *Taar9* была гораздо разнообразнее: мРНК была обнаружена в вентральной области покрышки, в черной субстанции, а также в прилежащем ядре (Рисунок 4). Так же мРНК *Taar9* есть в вентральной части гиппокампа, гипоталамусе и в продолговатом мозге. На периферии была подтверждена экспрессия в обонятельном эпителии, а также найдена экспрессия в семенниках. В печени, а также в тонкой и толстой кишке экспрессию обнаружить не удалось, а количество выделенной из бурого и белого жира РНК было недостаточно для анализа. Самый высокий уровень экспрессии наблюдали в обонятельном эпителии.

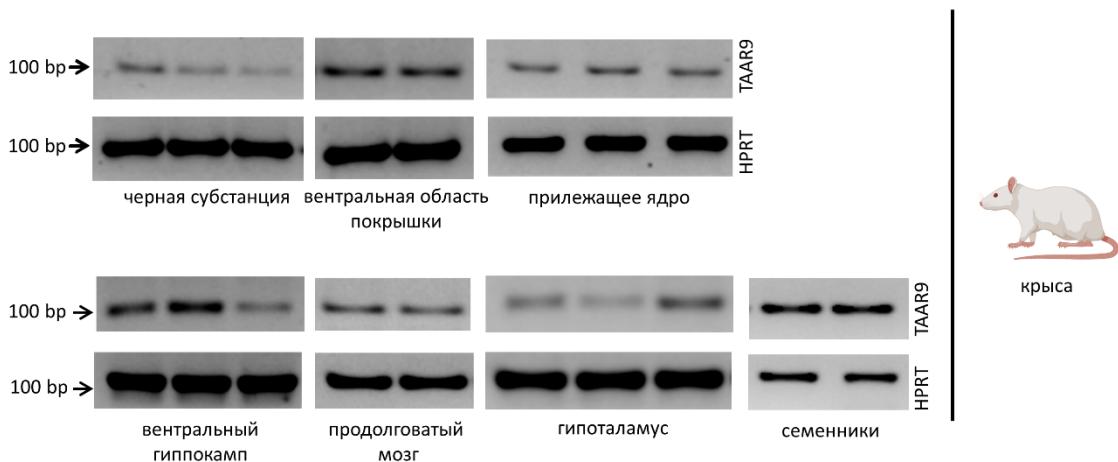


Рисунок 4. Оценка экспрессии гена *Taar9* в тканях крысы методом ОТ-ПЦР. На 2% агарозный гель наносили продукты ОТ-ПЦР. На гель наносили 10 μ L ампликонов TAAR9, 4-5 μ L ампликонов HPRT. В качестве внутреннего контроля нагрузки РНК использовали ген HPRT крысы.

4.1.2 Мета-анализ данных по экспрессии гена *TAAR9*

Анализ экспрессии TAAR9 с помощью ОТ-ПЦР в тканях мыши и крысы мы дополнili данными из открытых баз данных. Для этого был проведен мета-анализ данных РНК-секвенирования структур мозга мыши и человека из базы GEO. Было проанализовано 13 наборов, содержащих данные, полученные при исследовании тканей головного мозга человека, и 15 наборов, отражающих результаты исследований образцов, полученных от мышей. Дополнительно было проанализировано 3 набора данных, полученных при исследовании отдельных дофаминергических нейронов среднего мозга (GSE64452) и фракции холинергических интернейронов прилежащего ядра мыши (GSE130376); а также один набор данных, полученный при исследовании цитоплазматической и ядерной фракции D1- и D2- средних игольчатых нейронов (medium spiny neuron, MSN) (GSE121199). Использованные наборы и число проанализированных образцов указаны в Приложении 1 – для человека, Приложении 2 – для мыши. По накопленному в нашей лаборатории опыту на данный момент в репозитории GEO подходящих по глубине прочтения наборов данных для тканей крысы не

представлено, поэтому мы сосредоточились на исследовании экспрессии TAAR9 в структурах головного мозга мыши и человека.

У человека наиболее представленной структурой в исследовании была кора (префронтальная кора = 121 образцов, поясная извилина = 32 образца, моторная кора = 13, теменная кора = 10, фронтальная кора = 5). Из них в единственном наборе данных GSE135838 экспрессия мРНК TAAR9 была выявлена в двух из пяти образцов теменной коры на уровне 0.25 TPM. В прилежащем ядре стриатума во всех 81 образцах экспрессия TAAR9 была ниже порога отсечения, так же как в гиппокампе и мозолистом теле. В склерупе стриатума экспрессия TAAR9 была выше cut-off в двух образцах из 59. В хвостатом ядре стриатума в 10 образцах из 59 экспрессия TAAR9 была выше порога (Рисунок 5А).

В соответствии с полученными с помощью ОТ-ПЦР данными в мозге мыши TAAR9 экспрессируется крайне слабо. Однако, как было установлено в ходе проведённого анализа данных репозитория GEO, это касается исследования транскриптома целых фрагментов ткани, включающих различные типы нейронов и других клеток нервной ткани. При секвенировании отдельных клеточных фракций, а именно средних игольчатых нейронов и холинергических интернейронов прилежащего ядра, экспрессия TAAR9 была значительно выше порогового значения (Рисунок 5Б).

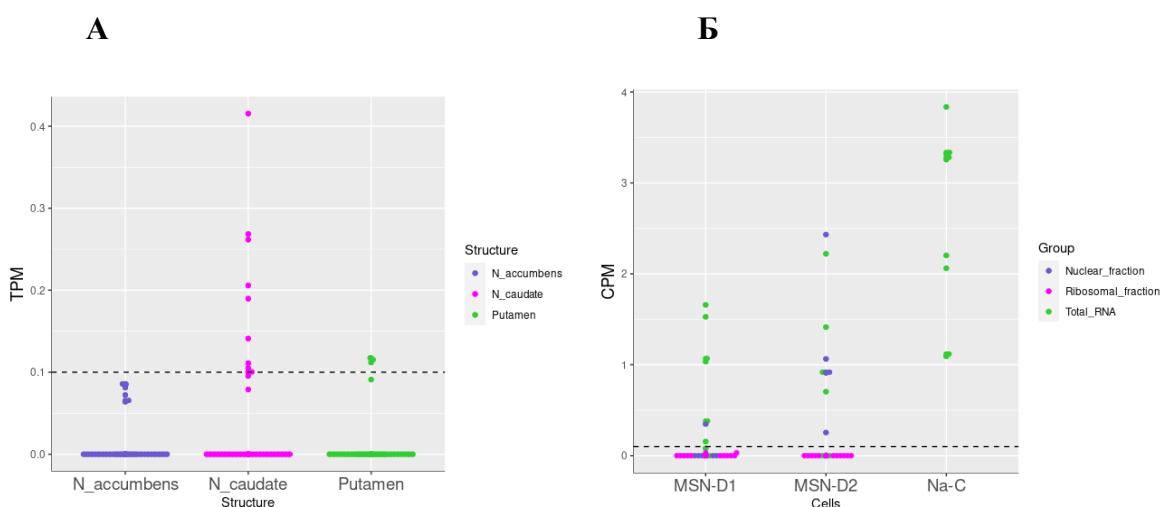


Рисунок 5. Нормализованные данные мета-анализа данных РНК-секвенирования А) в ядрах стриатума человека: в прилежащем (N accumbens), хвостатом (N caudate) и склерупе (putamen); (Б) отдельных клеток и фракций нейронов прилежащего ядра мыши. MSN-D1, MSN-D2 - средние игольчатые нейроны, Na-C - холинергические интернейроны. Чёрная пунктирная линия – cut-off = 0.1

4.2 Глава 2. Изучение линии крыс, нокаутных по гену TAAR9

Как показал приведенный выше анализ паттерна экспрессии *Taar9* у крыс по сравнению с мышами гораздо более интересная и выраженная экспрессия в ЦНС. Поэтому в качестве модели для изучения роли TAAR9 были выбраны крысы, у которых было выполнено нокаутирования гена *Taar9*.

4.2.1 Получение нокаутной линии

Для разработки новых пород мутантных животных сегодня предпочтительным методом является CRISPR/Cas9 технология [104]. Благодаря высокой скорости и точности CRISPR/Cas9 позволяет получить нокаутное животное уже в первом поколении. В основе метода лежит внесение двухцепочечного разрыва в ДНК гена, который необходимо выключить, с последующей репарацией в режиме SOS. Для создания крыс с нокаутом гена *Taar9* было использовано геномное редактирование на основе CRISPR/Cas9. Направляющая или гидовая РНК (гРНК) и мотив РАМ (мотив, прилегающий к протоспейсеру), были подобраны для редактирования кодирующей части гена с предполагаемым участком разрыва на 5 п.н. после кодона инициации трансляции (Рисунок 6А). В общей сложности самкам было имплантировано 31 эмбрионов с микроинъекцией гРНК и мРНК Cas9. Родилось 17 фаундеров, которые были проанализированы на наличие мутаций. Из них два животных несли мутации в области гена мишени, делецию цитозина и инсерцию аденина (Рисунок 6Б), и дали начало двум линиям крыс TAAR9-KO, TAAR9-KO-delC и TAAR9-KO-insA, соответственно [93]. Обе мутации приводили к потере сайта рестрикции *SacI* (Рисунок 6Б), который был использован для генотипирования животных (Рисунок 6В). Отобранные фаундеры были скрещены с крысами WT для получения гетерозиготных (НЕТ) поколений F1 и F2. Далее было продолжено обратное скрещивание для исключения потенциального нежелательного (офф-таргет) эффекта от генетических манипуляций CRISPR/Cas9 [105]. Мы расширили колонию поколения F2 для проведения части исследований (см. Методы 3.2.5). Наблюдая аналогичные изменения в двух независимо полученных линий с нокаутом одного и того же гена, мы исключили вероятность вклада нежелательной мутации в результаты [93].

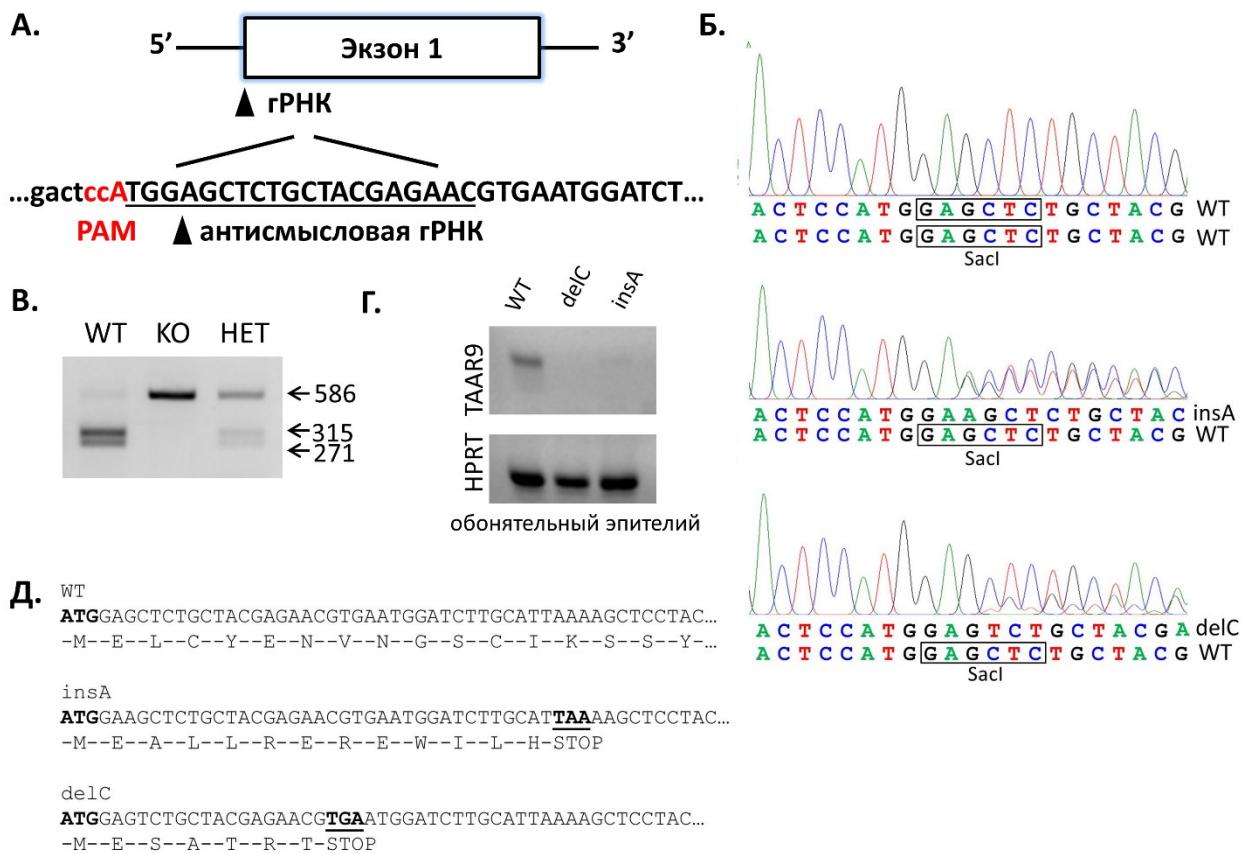


Рисунок 6. Создание нокаутной линии крыс TAAR9-KO. (А) Схема положения гидовой (направляющей) РНК в экзоне 1 гена TAAR9, последовательность гРНК выделена подчеркиванием, последовательность мотива, прилегающего к протоспайсеру (PAM) указана красным; стрелка указывает место разрыва нуклеазой Cas9; последовательность прописными буквами указывает на открытую рамку считывания TAAR9. (Б) Хроматограммы секвенирования геномной последовательности TAAR9 от животных дикого типа (верхняя строчка), гетерозиготных insA (средняя строчка), гетерозиготных delC (нижняя строчка). Черная рамка указывает на сайт рестрикции *SacI* на аллеле WT. Сайт *SacI* был разрушен делецией цитозина или инсерцией аденина. (В) Генотипирование крыс TAAR9-KO, созданных с помощью технологии CRISPR/Cas9, путем расщепления *SacI* фрагментов ПЦР. Неразрезанная полоса 586 п.н. соответствует генотипу КО; появление двух полос, 315 п.н. и 271 п.н., соответствует WT. Наличие всех трех полос соответствует гетерозиготному животному. (Г) ПЦР с обратной транскрипцией со специфическими праймерами TAAR9 и HPRT (ген домашнего хозяйства) с использованием РНК, выделенной из обонятельного эпителия крыс WT и крыс delC-KO и insA-KO. (Д) Последовательности N-концевой части белка TAAR9 животных дикого типа и нокаутов. Делеция цитозина приводит к появлению преждевременного стоп-кодона и синтезу короткого нефункционального пептида из 7 а.к. Инсерция аденина приводит к стоп-кодону в 14 а.к. положении. Рисунок адаптирован из статьи Murtazina et al. 2021 с изменениями.

4.2.2 Валидация нокаута

Животные WT, HET и КО обеих линий рождались с соотношением, близким к менделевскому, а гомозиготные животные КО были жизнеспособны и достигали зрелости. Далее была проведена валидация животных TAAR9-KO на уровне мРНК. мРНК выделяли из обонятельного эпителия, места с высокой экспрессией *Taar9* [5],

животных WT и TAAR9-KO, получали кДНК и далее проводили количественный ПЦР. Хотя транскрипты гена «домашнего хозяйства» (*Hprt*) были на одном уровне во всех проанализированных образцах, уровень мРНК *Taar9* у животных TAAR9-KO был существенно ниже, чем в образцах дикого типа. Кроме того, значительное снижение экспрессии TAAR9 было видно, когда продукты ПЦР наносили на агарозный гель (Рисунок 6Г). Мутация приводит к сдвигу рамки считывания, что приводит к появлению преждевременного стоп-кодона (Рисунок 6Д). Вставка стоп-кодона в экзоне 1 может привести к потере экспрессии мРНК, возможно из-за нонсенс-опосредованного распада мРНК [106].

4.2.3 Фенотипирование двух независимых линий TAAR9-KO крыс

Как указывалось ранее, были созданы две линии крыс с нокаутом гена TAAR9. В этой работе был проведен одновременный сравнительный анализ трех групп: дикий тип, нокаут с делецией цитозина (KO-delC) и нокаут (KO-insA). Использование двух независимых групп с различными мутациями, приводящими к нокауту одного и того же гена позволяет с большой вероятностью получить достоверные эффекты, возникшие из-за выключения гена без влияния других факторов, в том числе для исключения офф-таргет эффекта после CRISPR.

Ввиду того, что ранее при изучении других линий с нокаутом родственных TAAR (TAAR2 и TAAR5) были обнаружены различия в поведении, а также в концентрации дофамина и серотонина в мозге [7–9], мы начали фенотипирование TAAR9-KO с оценки поведения в различных тестах, а также с анализа содержания моноаминов в различных отделах мозга.

4.2.3.1 Поведенческий анализ

Для анализа поведения использовали три группы трехмесячных самцов из одного помета (n=10): дикий тип, нокаут KO-delC, нокаут KO-insA. В teste Открытое поле измеряли время, проведенное в центральной зоне, скорость и пройденное расстояние. В трех группах были минимальные различия (Рисунок 8).

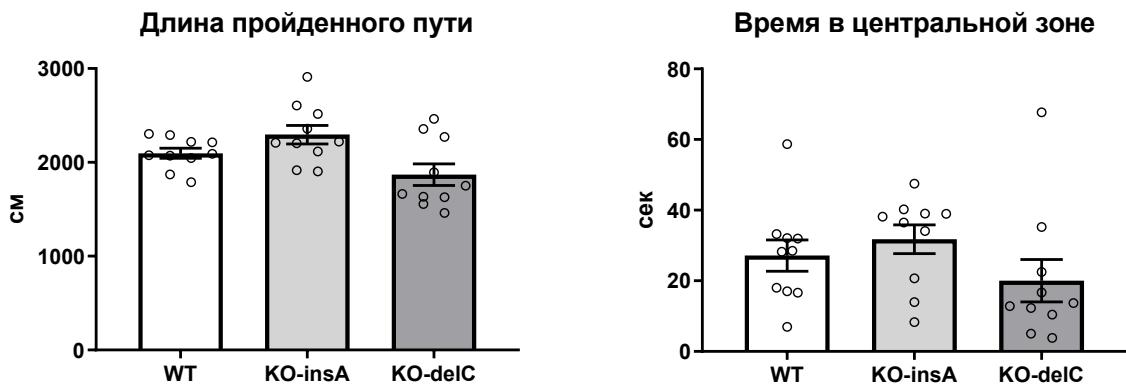


Рисунок 8. Анализ параметров в тесте Открытое поле у животных трех генотипов.

Для исследования памяти у крыс использовали два метода: открытое поле с новым объектом и Т-тест. В тесте Открытое поле с новым объектом, который используется для анализа долговременной памяти не было выявлено различий в длительности нахождения в зоне с новым объектом между животными трех групп. Длительность обнюхивания нового объекта также было сравнимым. В Т-тесте на кратковременную память, крысы обеих линий с нокаутом TAAR9 также не отличались по времени нахождения в новом рукаве (Рисунок 7).

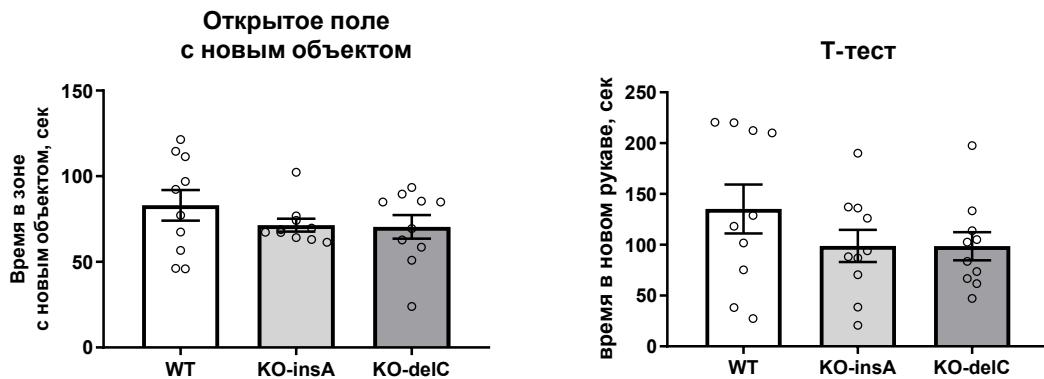


Рисунок 7. Исследование двух линий TAAR9-KO в тестах Открытое поле с новым объектом и Т-тест

Для оценки общей тревожности крыс использовали методику Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). В тесте ПКЛ время, проведенное в открытых и закрытых рукавах, а также время нахождения в центральной зоне между животными трех групп не отличалось. Вертикальная активность в виде стоек и свешиваний с открытых рукавов, длительность груминга также была сравнима. В норме грызуны предпочитают находиться в закрытых рукавах, поэтому исследовательское поведение в открытых рукавах считается показателем сниженной тревожности (Рисунок 9).

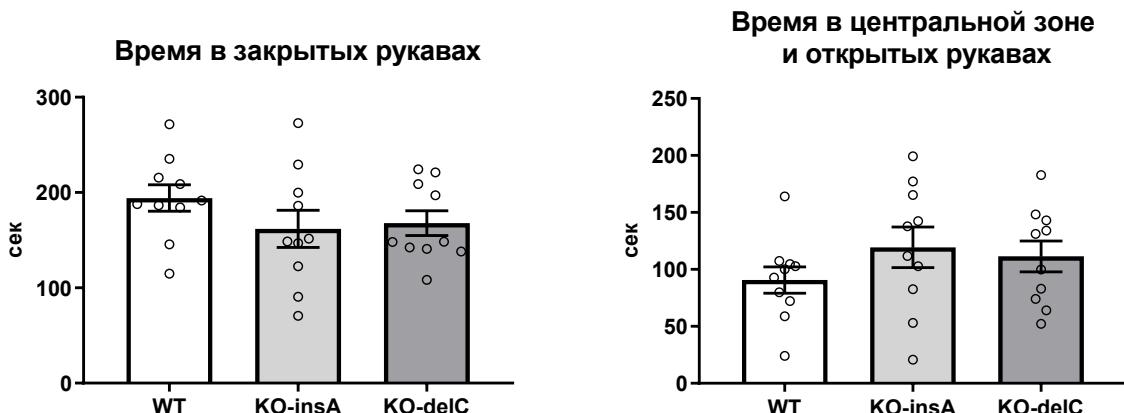


Рисунок 9. Исследование уровня тревожности при выключении гена *Taar9* в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт.

Формирование депрессивно-подобного поведения у TAAR9-KO крыс обеих групп изучали при помощи теста «принудительное плавание». Данная методика позволяет оценить устойчивость животных к стрессовым воздействиям. По параметрам активное, пассивное плавание и замирание в трех группах не было различий (Рисунок 10).

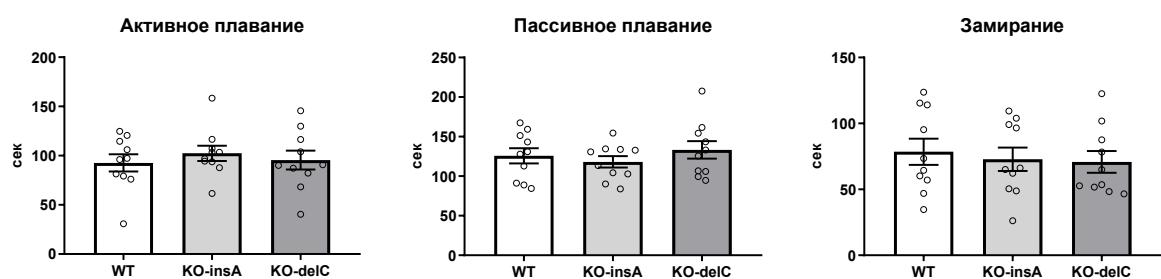


Рисунок 10. Тест «принудительное плавание» для оценки депрессивно-подобного поведения животных.

В тесте стресс-индуцированная гипертермия, оценивающем вызванное стрессом повышение температуры у животных обеих нокаутных линий был снижен параметр ΔT (KO-insA 0.86 ± 0.06 °C ; KO-delC 0.8 ± 0.09 °C против WT 1.26 ± 0.05 °C, $p < 0.0005$) (Рисунок 11).

Таким образом, по результатам сравнения двух нокаутных линий с выключенным *Taar9* мы не обнаружили значимых различий в большинстве поведенческих тестов, однако, в teste стресс-индуцированная гипертермия ΔT была снижена.

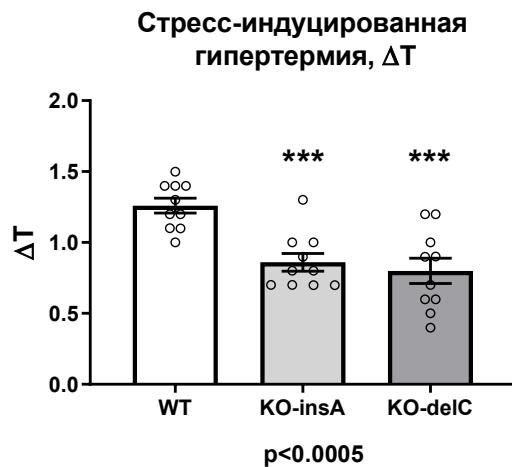


Рисунок 11. Изменение ΔT у животных двух нокаутных линий в teste стресс-индуцированная гипертермия.

4.2.3.2 Анализ содержанияmonoаминов в тканях мозга животных трех генотипов

После поведенческого анализа была проведена оценка содержания важнейших моноаминов в мозге нокаутных животных двух линий. Измеряли уровень дофамина и его метаболитов ДОФУК и ГВК; серотонина и его метаболита 5-ОИУК; норадреналина во фронтальной коре и стриатуме. Оценка концентрации моноаминергических нейромедиаторов, таких как дофамин и серотонин, требуют особых условий и отлаженной методики измерения, поскольку они содержатся в мозге в относительно низкой концентрации и легко деградируют. ВЭЖХ-ЭД позволяет с высокой точностью определить даже низкие концентрации моноаминов и работать с низким объемом проб (Рисунок 12).

В коре мы не обнаружили значимых изменений в уровне дофамина и его метаболитов, так же, как и серотонина и норадреналина (Рисунок 13). Аналогично в стриатуме все параметры не отличались в группах с нокаутом TAAR9 и диким типом (Рисунок 14).

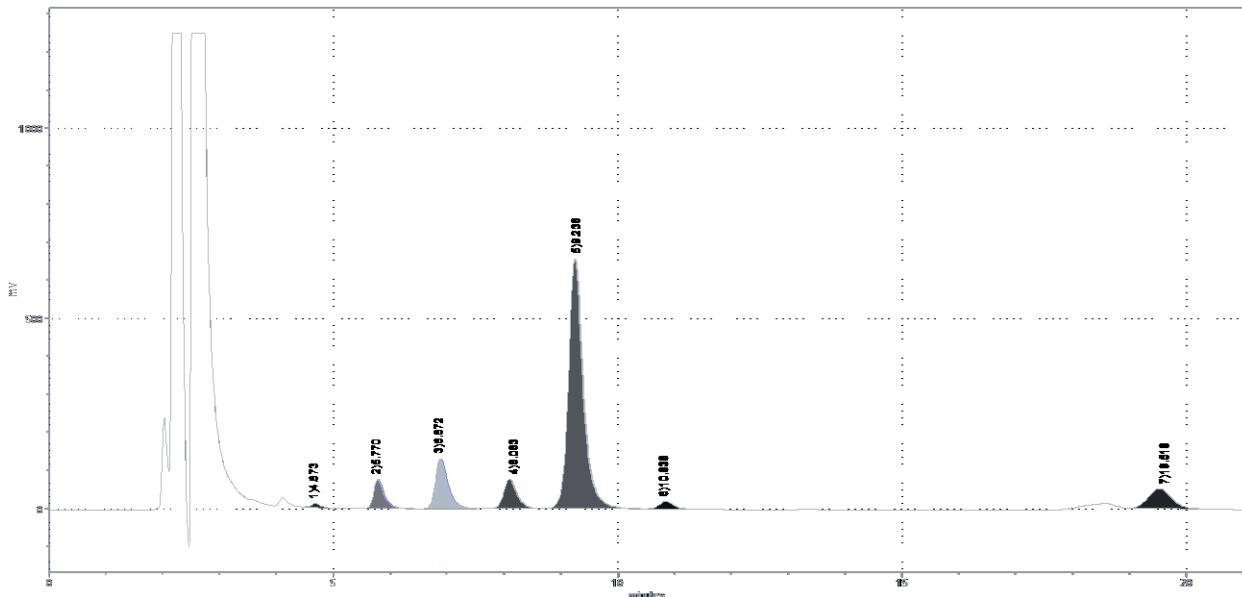


Рисунок 12. Пример хроматограммы гомогената стриатума крысы с 7 отдельными пиками отдельных веществ, разделенных методом ВЭЖХ-ЭД, и элюированных в определенное время выхода. 1) норадреналин, 2) диоксифенилуксусная кислота, 3) стандарт DHBA (внутренний контроль), 4) 5-гидроксииндолуксусная кислота, 5) дофамин, 6) гомованилиновая кислота, 7) серотонин

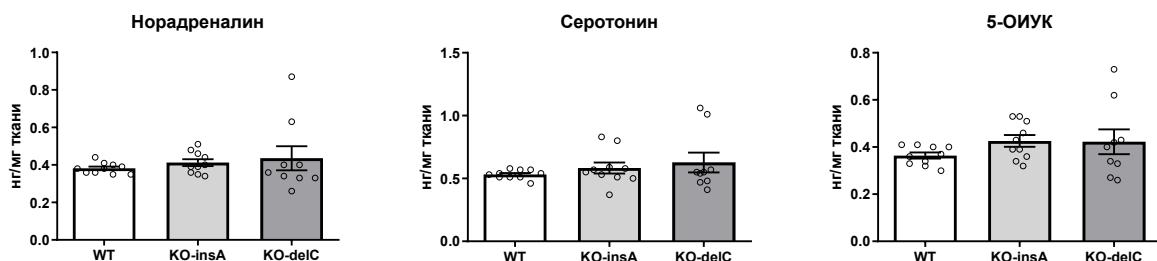


Рисунок 13. Оценка содержания серотонина и его метаболита 5-ОИУК, а также норадреналина в группах TAAR9-KO и WT в коре.

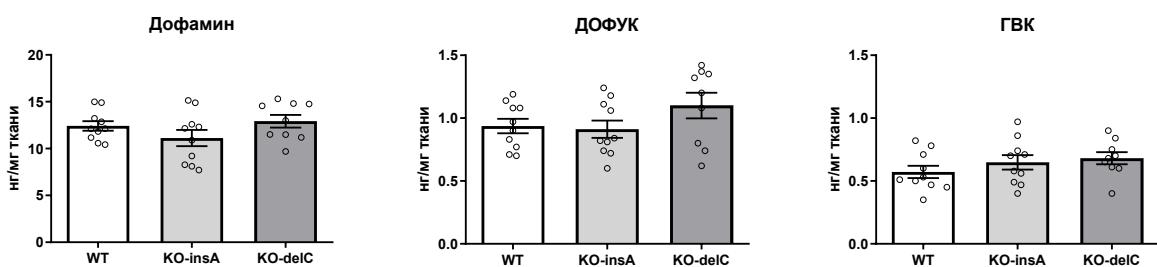


Рисунок 14. Оценка содержания дофамина и его метаболитов в стриатуме крыс линий TAAR9-KO и WT.

4.2.3.3 Оценка суточного потребления пищи и воды

Интересно, что в обеих группах животных с нокаутом TAAR9 сравнительный анализ биохимии крови выявил значимое снижение общего холестерина и холестерина ЛПНП. Эти данные были опубликованы в статье [93]. На неслучайную роль в этом TAAR9 указывает снижение в обеих линиях с нокаутом этого гена. Данное открытие было неожиданным, так как в настоящий момент участие TAAR в липидном обмене – это неисследованная область. Также в рамках этого направления был проведен сравнительный анализ состава микробиоты у животных дикого типа и с нокаутом TAAR9 [107], который выявил увеличение разнообразия видов бактерий у TAAR9-KO, а также появление рода *Saccharimonas*, который отсутствовал в образцах дикого типа. Однако, вопрос, чем может быть обусловлено снижение уровня холестерина при нокауте гена TAAR9, должен быть исследован в дальнейших работах.

В связи с этим было оценено количество потребляемого корма и воды в группе дикого типа и одной линии нокаутов TAAR9-KO-delC в течение четырех дней. Вес животных не отличался, а количество корма и воды, потребленного нокаутами, было немного ниже. Однако, при пересчете на вес животного разницы между двумя группами не было, что говорит об отсутствии изменений в потреблении пищи и воды при нокауте гена *Taar9* (Рисунок 15).

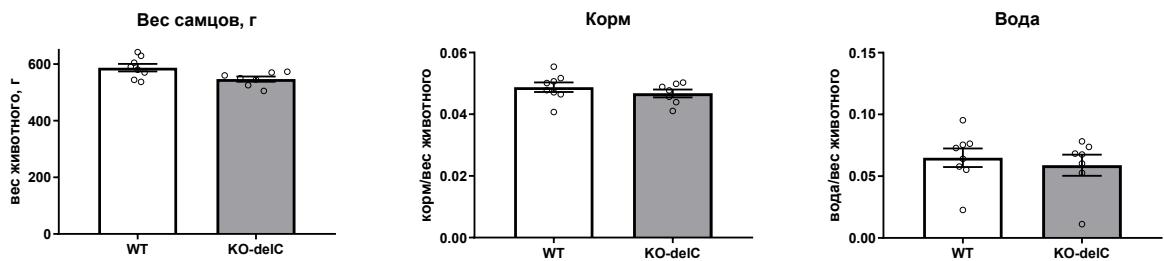


Рисунок 15. Анализ суточного потребления пищи и воды в группе дикого типа и нокаутов не выявил различий в группах дикого типа и нокаутов. Вес самцов в группе нокаутов также был сравним с весом дикого типа

4.2.4 Фенотипирование TAAR9-KO после проведения обратного скрещивания

После получения данных по оценке различных параметров в двух линиях с нокаутом гена *Taar9*, описание которых приведено выше, обратное скрещивание было продолжено и завершено. Далее эксперименты повторили, а также дополнили новыми на одной линии TAAR9-KO-delC (далее обозначена как КО или TAAR9-KO) после 6-кратного обратного скрещивания. Для анализа поведения, нейрохимического состава, использовали 3-4 месячных самцов дикого типа и КО из одного помета ($n=8$).

4.2.4.1 Нокаут гена TAAR9 не вызывает изменений в поведении

Тест открытое поле использовали для анализа исследовательской активности крыс. По длине пройденного пути в течение 5 минут у крыс TAAR9-KO, как и на предыдущем этапе, не было различий, что указывает на нормальное исследовательское поведение (Рисунок 16). Другие параметры, в том числе время нахождения в центральной зоне, количество стоек, длительность груминга также не отличались у крыс TAAR9-KO по сравнению с WT.

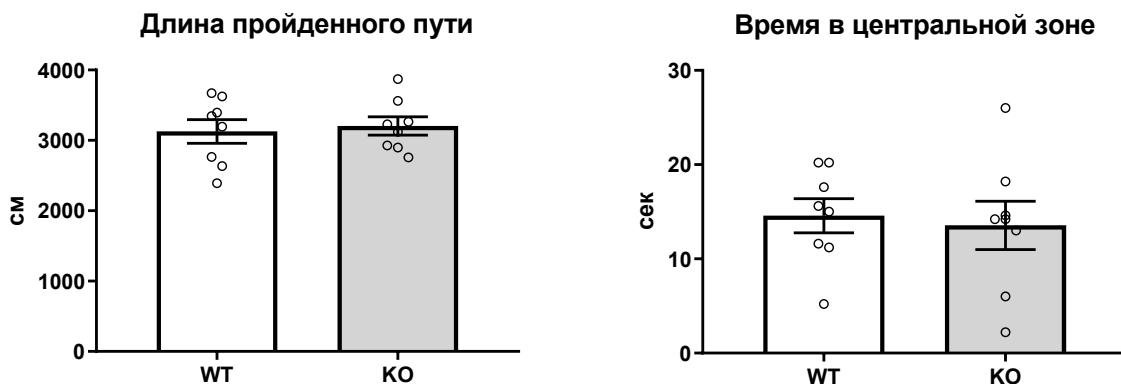


Рисунок 16. Параметры TAAR9-KO и WT в тесте Открытое поле. Длина пройденного пути и время в центральной зоне (показатель тревожноподобного поведения) не отличались.

Для исследования памяти повторно использовали два теста. Тест Открытое поле с новым объектом использовался для исследования функции долговременной памяти. Время нахождения в зоне с новым объектом, время обнюхивания объекта у крыс TAAR9-KO не отличалось (Рисунок 17). Для измерения кратковременной

памяти был использован Т-образный лабиринт, в котором также не было значимых отличий в двух группах (Рисунок 17).

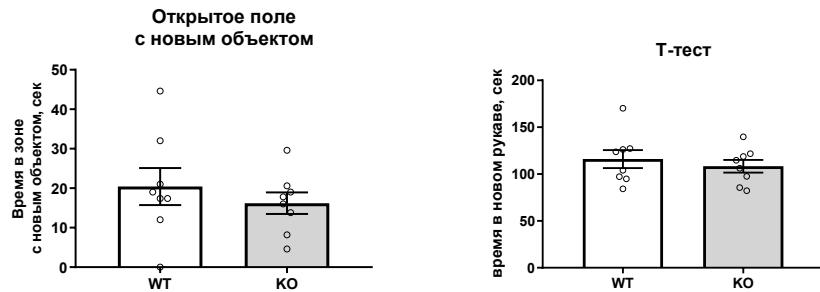


Рисунок 17. Параметры TAAR9-KO и WT в тестах на исследование памяти: Тест открытое поле с новым объектом; Т-тест

Для измерения уровня тревожности был использован тест приподнятый крестообразный лабиринт. В норме грызуны проводят больше времени в закрытых темных рукавах, поэтому увеличение времени, проведенного в открытых рукавах может свидетельствовать о сниженной тревожности. В teste ожидалось не было обнаружено различий во времени, проведенном в открытых рукавах. Пройденное расстояние, время в закрытых рукавах и количество стоек также не отличались у крыс TAAR9-KO по сравнению с крысами WT (Рисунок 18).

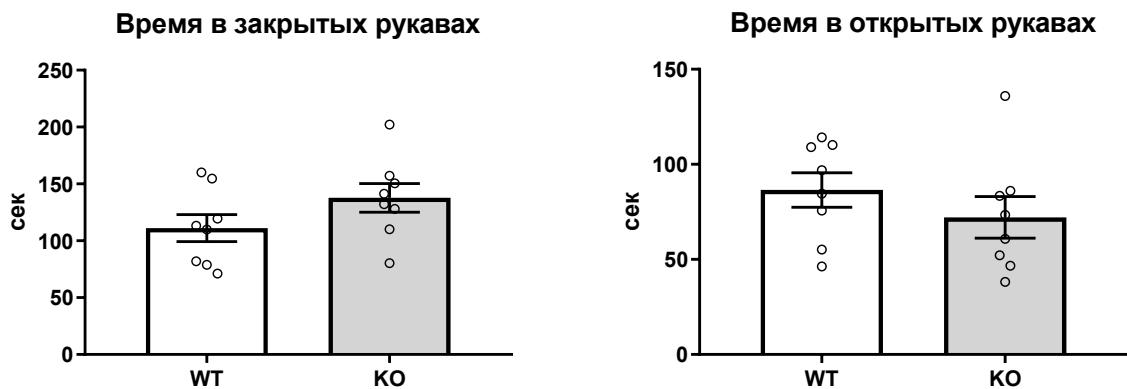


Рисунок 18. Параметры TAAR9-KO и WT в teste Приподнятый крестообразный лабиринт.

Тест «принудительное плавание» повторно не выявил различий в двух группах. Сравнивали время замирания, пассивного и активного плавания (Рисунок 19).

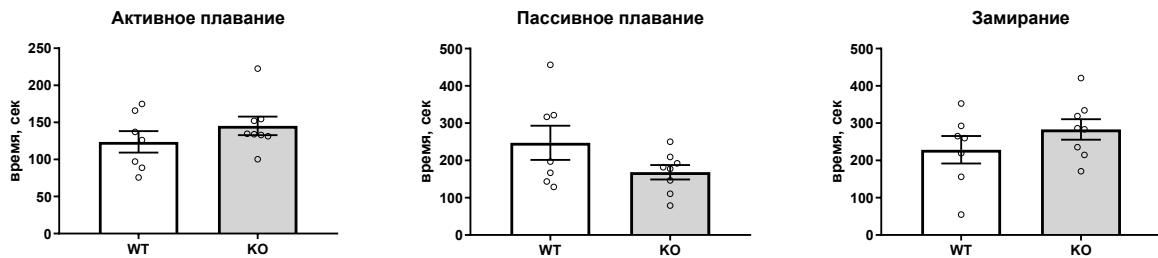


Рисунок 19. Сравнительное исследование двух групп в тесте «принудительное плавание».

В тесте стресс-индукционная гипертермия было выявлено снижение ΔT ($KO = 0.88 \pm 0.10$ против $WT = 1.3 \pm 0.09, p < 0.05$) (Рисунок 20). Такое же снижение ΔT в тесте ранее мы наблюдали в животных двух нокаутных линий, что свидетельствует о неслучайности данного изменения и о вкладе в этот эффект именно выключения гена *Taar9*.

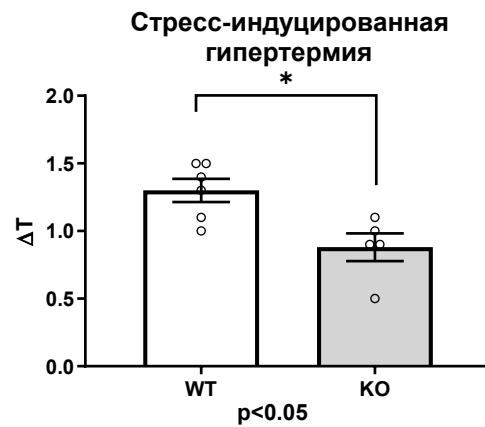


Рисунок 20. Параметры TAAR9-KO и WT в тесте стресс-индукционная гипертермия. Нокаут гена TAAR9 снижает ΔT в тесте стресс-индукционная гипертермия.

4.2.4.2 Анализ уровняmonoаминов в мозге TAAR9-KO после обратного скрещивания

Ранее при сравнении уровня моноаминов в стриатуме и коре дикого типа и двух нокаутных групп мы не выявили значимых отличий. При повторе анализа на группе TAAR9-KO-delC после обратного скрещивания мы дополнили структуры гипоталамусом. Во фронтальной коре уровень дофамина и серотонина и их

метаболитов у нокаутов повторно не отличался от показателей дикого типа. Из полученных данных можно предполагать, что нокаут TAAR9 не оказывает значительного влияния наmonoаминергическую систему в коре (Таблица 5).

Таблица 5. Содержание monoаминовых нейротрансмиттеров и их метаболитов во фронтальной коре крыс дикого типа и нокаутов.

	WT	\pm SEM	KO	\pm SEM
Дофамин	0.078	0.004	0.067	0.003
ДОФУК	0.019	0.001	0.020	0.002
ГВК	0.012	0.001	0.010	0.002
Серотонин	0.572	0.030	0.607	0.024
5-ОИУК	0.197	0.009	0.186	0.012
Норадреналин	0.595	0.031	0.559	0.018

Данные представлены как ng/mg ткани.

Аналогично коре в стриатуме уровень норадреналина, серотонина и его метаболитов, норадреналина статистически значимо не отличался от показателей дикого типа. Однако, на этот раз концентрация ДОФУК, метаболита дофамина, была немного ниже у животных с нокаутом *Taar9* (0.94 ± 0.07 нг/мг ткани в группе KO против 1.19 ± 0.94 нг/мг ткани в группе WT) (Рисунок 21). ДОФУК образуется в результате работы фермента МАО-А. Уровень дофамина и другого метаболита ГВК тем не менее был сравним с уровнем дикого типа.

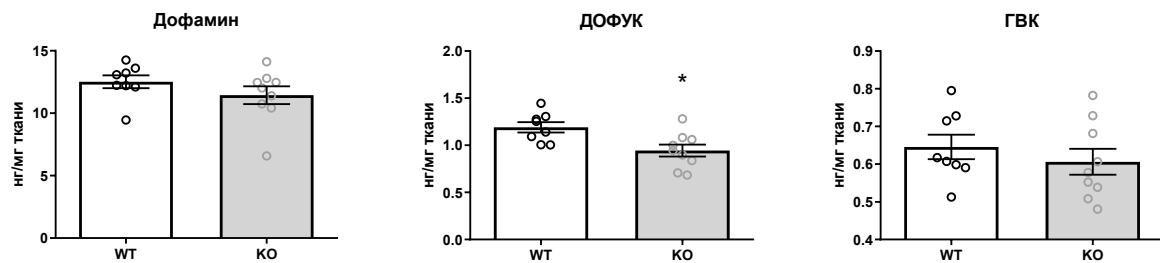


Рисунок 21. Определение концентрации дофамина и его метаболитов в стриатуме крыс. WT – дикий тип, KO – нокаут TAAR9. ДОФУК - диоксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота. * $p < 0,05$

В гипоталамусе значимых изменений в содержании серотонина и его метаболита 5-ОИУК выявлено не было, хотя наблюдали небольшое повышение уровня серотонина, но оно не достигало статистической значимости (Рисунок 22).

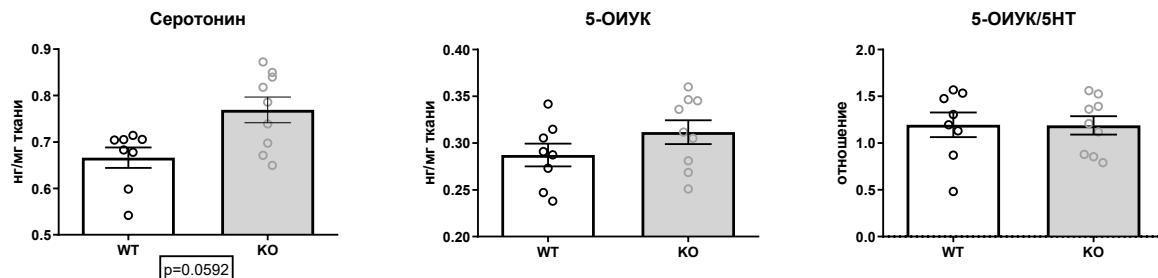


Рисунок 22. Определение концентрации серотонина и его метаболита 5-ОИУК в гипоталамусе крыс. WT – дикий тип, KO – нокаут TAAR9.

Однако, было выявлено статистически значимое повышение уровня дофамина у животных TAAR9-KO (0.48 ± 0.04 нг/мг ткани в группе KO против 0.33 ± 0.03 нг/мг ткани в группе WT, $p=0.023$) (Рисунок 23). Метаболиты дофамина, ДОФУК и ГВК, были на том же уровне, что и у животных дикого типа.

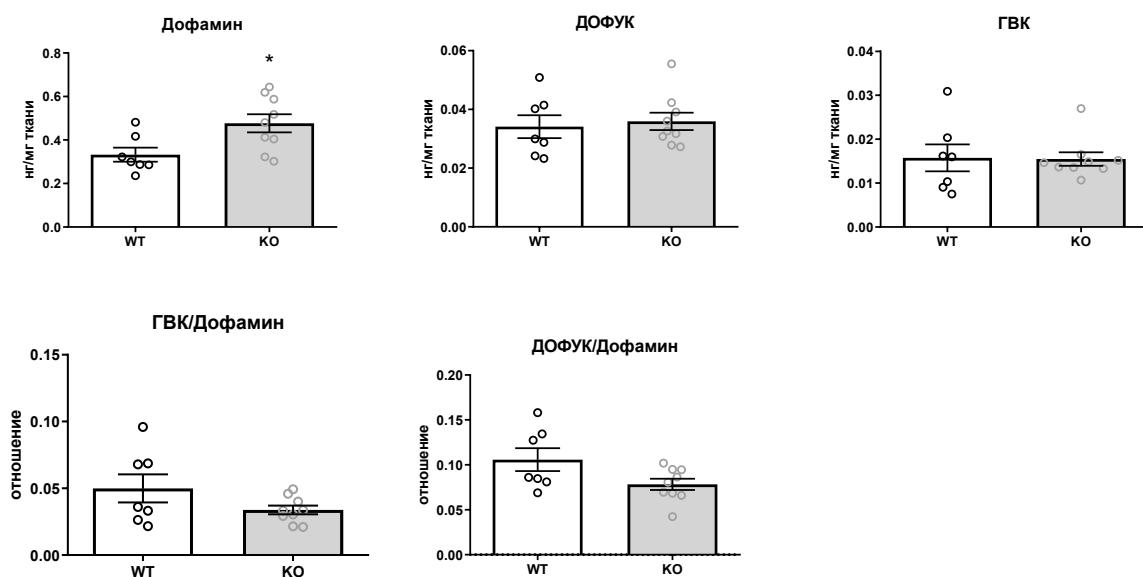


Рисунок 23. Определение концентрации дофамина и его метаболитов в гипоталамусе крыс. WT – дикий тип, KO – нокаут TAAR9.

Из полученных данных можно предполагать, что нокаут TAAR9 вызывает изменения вmonoаминергической системе в гипоталамусе.

4.2.5 Непрерывный анализ температуры тела крыс TAAR9-KO

В связи с изменениями в тесте стресс-индуцированная гипертермия на отдельной группе TAAR9-KO-delC ($n=6$) и WT ($n=8$) было проведено суточное измерение температуры в течение нескольких недель. С помощью датчиков непрерывного измерения температуры IButton, имплантированных внутрибрюшинно, были получены данные о температуре каждого животного с частотой измерения каждые 3 минуты. Как показано на рисунке 24, у крыс наблюдался четкий суточный ритм температуры тела с низкими значениями во время неактивной световой фазы ($36,85\pm0,15^{\circ}\text{C}$ в группе WT; $37,13\pm0,39^{\circ}\text{C}$ в группе KO) и высокими значениями в активной темновой фазе ($37,86\pm0,19^{\circ}\text{C}$ в группе WT; $38,18\pm0,37^{\circ}\text{C}$ в группе KO) в обеих группах животных (Рисунок 24). На графике видно, что средняя температура животных генотипа TAAR9-KO была выше. Далее было проведено сравнение средней температуры (усредненное значение 140 точек, полученных в течение 7 часов) каждого животного в дневной (с 12 до 19 часов) и ночной период (с 00 до 07 часов) в течение нескольких дней. Почти во все дни было выявлено статистически значимое повышение температуры, причем в ночной период разница была выше (Рисунок 25).

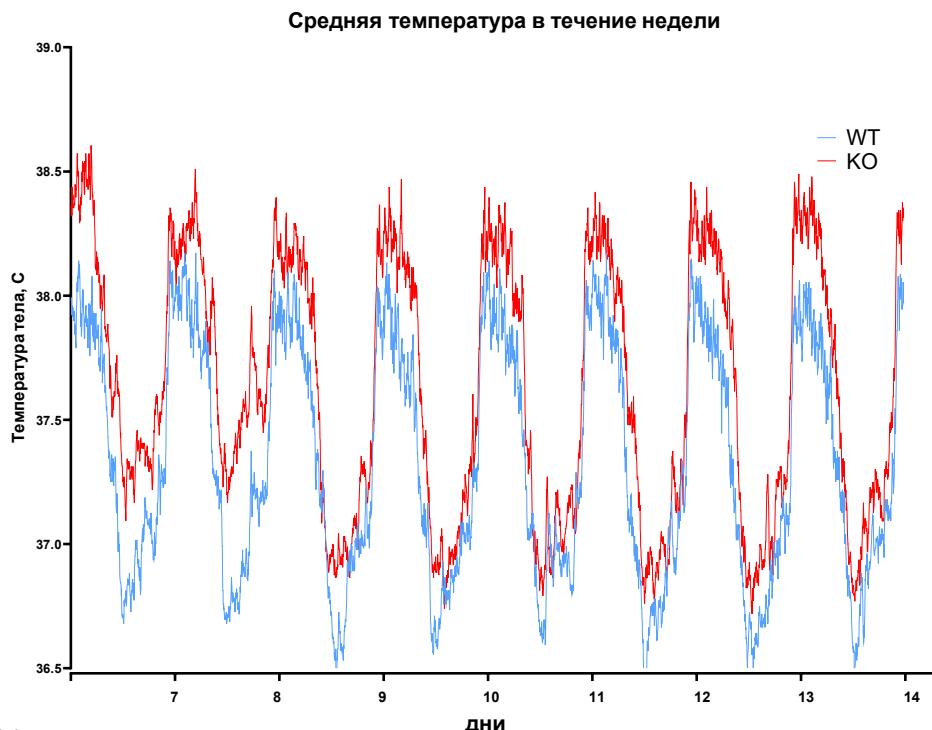


Рисунок 24. Динамика средней температуры тела в группе животных дикого типа и нокаутного в течение 8 дней (День 7 – День 14). Данные представлены как арифметическое среднее. 1 деление шкалы – 24 часа. Виден суточный ритм с повышением температуры в течение активной фазы (ночь), снижением – в дневной период. График начинается с времени 00:00 дня 7

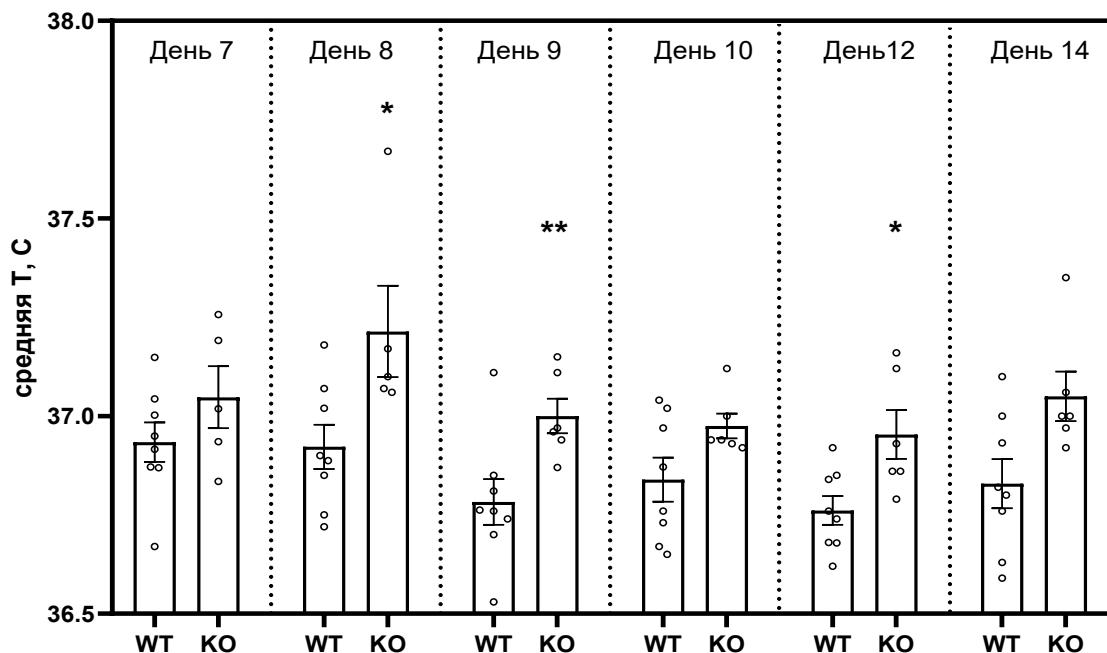
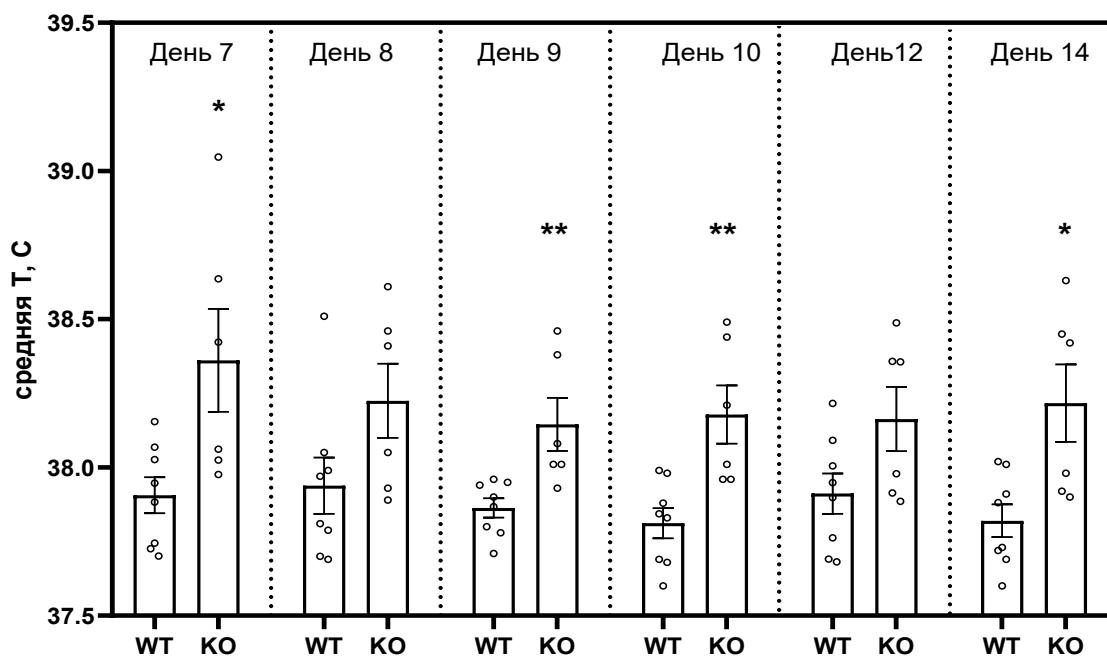
День 12:00-19:00**Ночь 00:00-07:00**

Рисунок 25. Сравнение средней температуры каждого животного в дневной (с 12 до 19 часов) и ночной период (с 00 до 07 часов) в течение нескольких дней. Почти во всех сравнениях было выявлено статистически значимое повышение температуры, причем в ночной период разница выше.

Далее мы исследовали, как влияет нагревание, охлаждение и иммобилизационный стресс на животных с нокаутом гена TAAR9. Нагревание в течение 3 часов в двух подгруппах объединить не получилось из-за разной длительности нагревания между подгруппами. Поэтому этот эффект необходимо исследовать в дальнейшей работе. Иммобилизационный стресс по нашим данным не выявил температурных различий у животных двух групп (Рисунок 26).

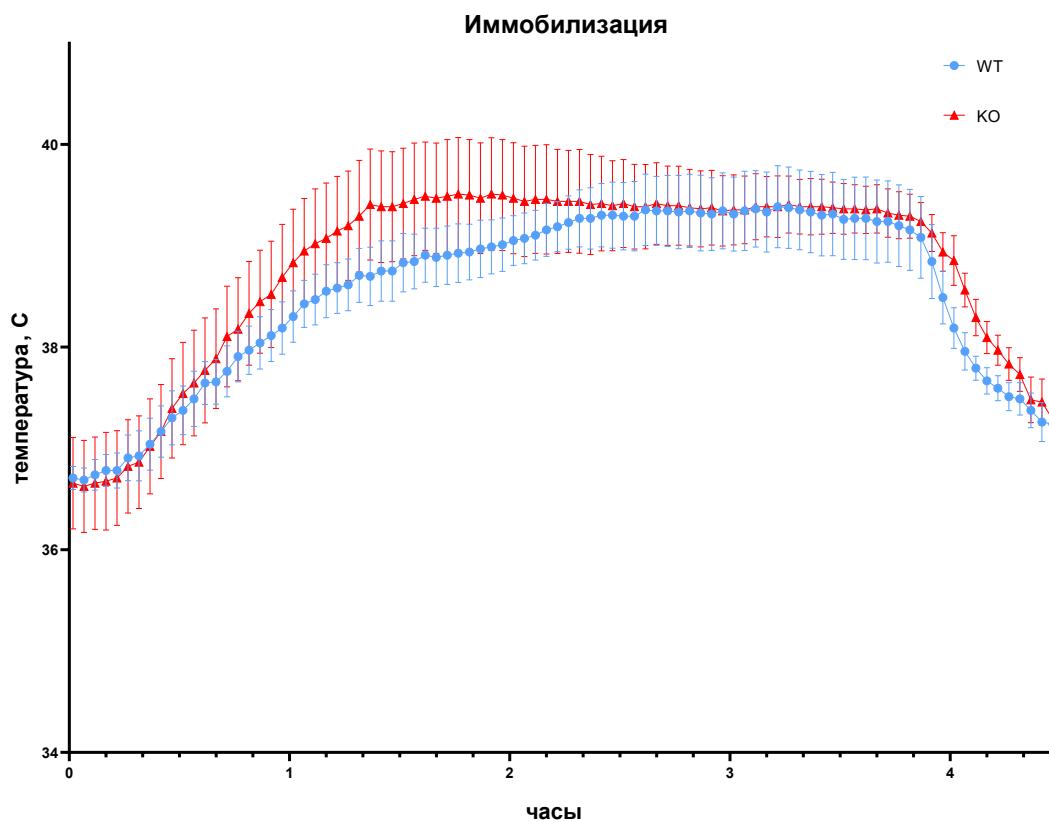


Рисунок 26. Влияние иммобилизационного стресса на температуру животных TAAR9-KO и WT.

Однако, охлаждение выявило интересные изменения. Животных в течение 10 минут охлаждали в воде с температурой 17°C и 21°C. Эксперименты выполняли с разницей в несколько дней. Далее анализировали температурные данные с датчиков, полученные за полчаса до воздействия и в течение 4 часов после. Нокауты с одинаковой скоростью охлаждались, однако температура их тела падала сильнее по сравнению с диким типом в обоих экспериментах, причем разница была статистически значима при охлаждении 17°C, с минимальным значением 27.86 ± 0.39 для WT и 26.46 ± 0.16 . (Рисунок 27).

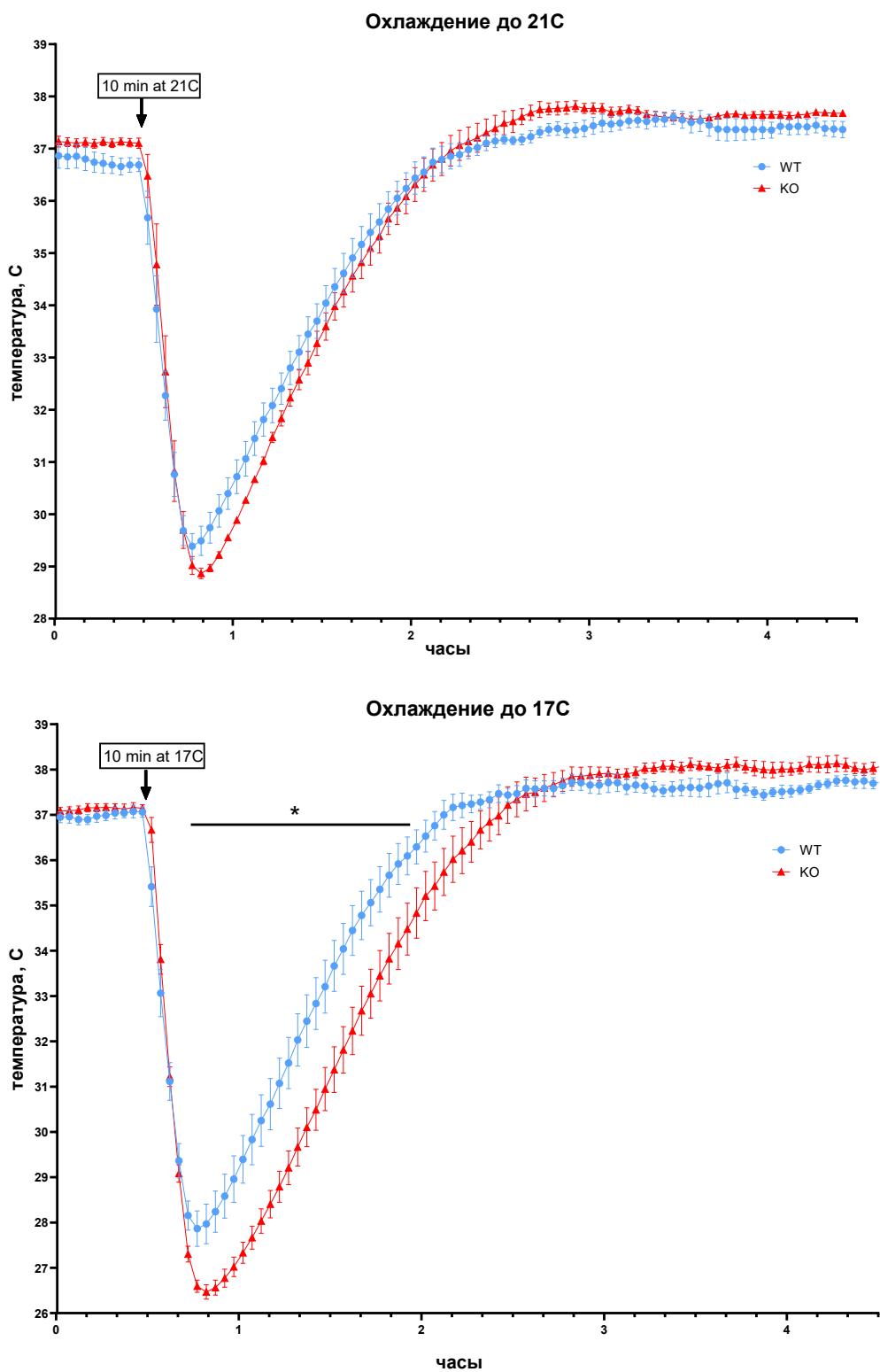


Рисунок 27. Влияние охлаждения на температуру тела животных дикого типа и TAAR9-KO.

4.2.6 Сравнительная экспрессия генов дофаминовой и серотониновой системы

Ввиду того, что экспрессия гена *Taar9* была обнаружена в нескольких отделах мозга, мы решили оценить уровень экспрессии генов ключевых белков дофаминергической, глутаматергической и серотонинергической системы в нескольких структурах мозга при выключении гена. С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени в среднем и продолговатом мозге была проведена оценка экспрессии генов ферментов, участвующих в метаболизме нейромедиаторов (TH, COMT, MAO-A, MAO-B, TPH2, Ache), дофаминовых рецепторов (D1DR, D2DR), нейротрофинов (BDNF, CDNF) и транспортеров (DAT, GAT1). Несмотря на минимальные различия, уровень ни одного из изученных генов статистически значимо не отличался (Рисунок 28).

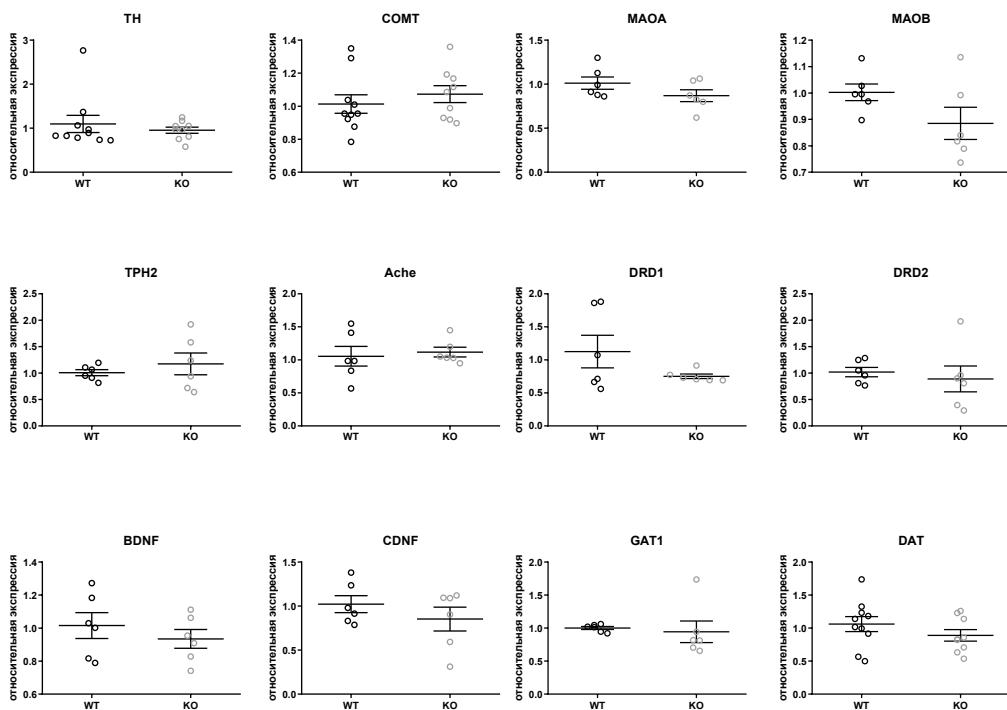


Рисунок 28. Сравнительная экспрессия генов ферментов, участвующих в метаболизме нейромедиаторов (TH, COMT, MAO-A, MAO-B, TPH2, Ache), нейрональных рецепторов (D1DR, D2DR), нейротрофинов (BDNF, CDNF) и транспортеров (DAT, GAT1) в среднем и продолговатом мозге.

Аналогичным образом оценивали экспрессию в стриатуме, обонятельной луковице, коре (Приложение 4), где также исследованные гены экспрессировались в группе TAAR9-KO на уровне дикого типа. В гипоталамусе в связи с повышением уровня дофамина мы исследовали уровень экспрессии рецепторов дофамина, а также

ферментов тирозин гидроксилазы, МАО-А и МАО-Б, который не отличался в двух группах (Рисунок 29).

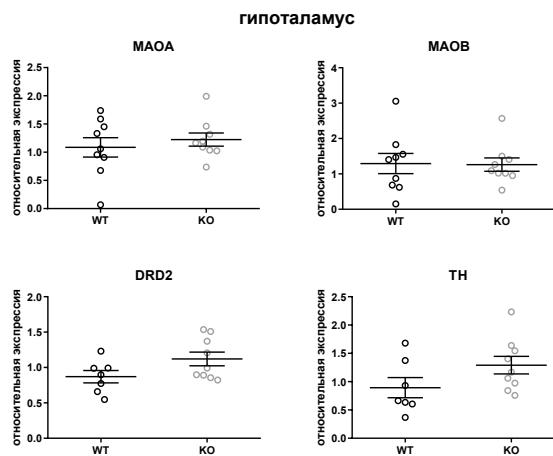


Рисунок 29. Уровень экспрессии генов в гипоталамусе TAAR9-KO и WT.

Таким образом, нокаут гена TAAR9 не вызывает значительных изменений экспрессии изученных генов.

4.2.7 Влияние агонистов TAAR9 на обоняние

Как будет показано ниже, мы подтвердили, что агонистами TAAR9 крысы являются кадаверин и N-метилпиперидин. Для оценки возможных изменений в обонянии у животных с выключенным *Taar9* при предъявлении агонистов TAAR9 был проведен тест обонятельного предпочтения на животных дикого типа и TAAR9-KO-delC (Рисунок 30). По результатам в группе дикого типа время обнюхивания воды и кадаверина (CAD) или N-метилпиперидина (PIP) не отличалось, так же, как и в группе TAAR9-KO. В группе TAAR9-KO животные проводили в зоне с N-метилпиперидином больше, чем зоне с водой, однако время обнюхивания не изменилось. Таким образом, обонятельный тест не выявил предпочтение или аверсию к агонистам TAAR9 крыс ни в группе дикого типа, ни в группе TAAR9-KO.

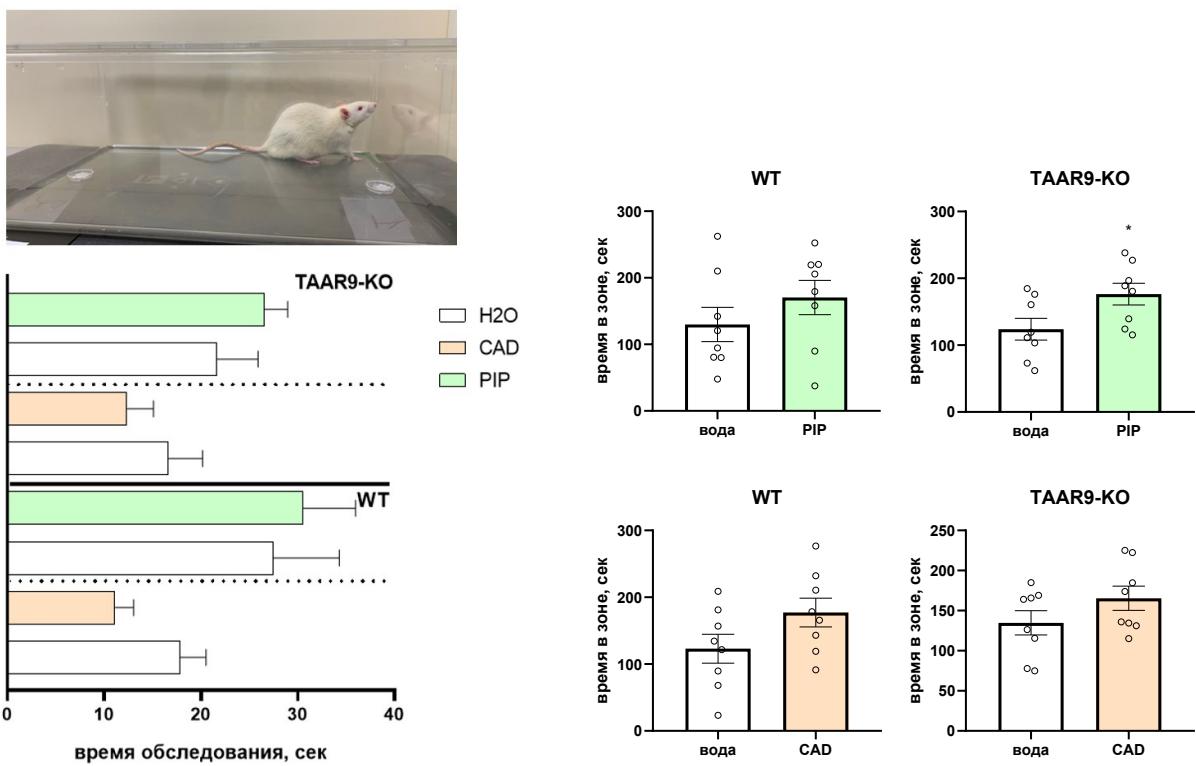


Рисунок 30. Животные без TAAR9 и животные дикого типа были протестированы в поведенческом тесте на предпочтение или аверсию при предъявлении одорантов, агонистов TAAR9 крысы. Для этого животным предъявляли две фильтровальные бумажки, пропитанные водой или агонистом, и измеряли время обнюхивания (обследования), а также время пребывания в зоне с веществом. PIP-N-метилпиперидин, CAD – кадаверин.

4.3 Глава 3. Изучение TAAR9 *in vitro*

4.3.1 Гетерологическая экспрессия гена *TAAR9*

Отдельным этапом исследования TAAR9 была разработка системы для поиска лигандов этого рецептора. Известно, что TAAR плохо экспрессируются на мембране *in vitro* в гетерологических системах [20]. В этой работе мы использовали подход Barak et al., в которой, заметив отсутствие распространенного у родопсинового семейства GPCR гликозилирования у TAAR1 при экспрессии в HEK293T, на N-конец рецептора добавили первые 9 а.к. β 2-адренорецептора, что позволило белку расположиться на мембране [82]. Была проведена работа по клонированию рецептора TAAR9 крысы в экспрессионный вектор с добавлением N-концевого тага. Для этого последовательность из геномной ДНК крысы была заклонирована в клонирующий вектор pJet. Для экспрессии TAAR9 в клетках HEK293T под контролем промотора CMV был получен вектор pcDNA- β 2N9-rTAAR9. В целях повышения уровня мембранный экспрессии был добавлен N-концевой таг, состоящий из первых 9 аминокислот β 2-адренергического рецептора (MCQPGNGSA). Также для регистрации клеточной локализации с помощью антител на N-конец был добавлен гемагглютининовый таг в 3 повторах (3xYPYDVPDYA). Для изучения локализации белка в клетке был получен вектор pEGFP- β N9-rTAAR9, который содержит ген *Taar9* с тагом β 2N9_3HA, слитый с геном GFP на C-конце, под контролем промотора CMV (Рисунок 32).

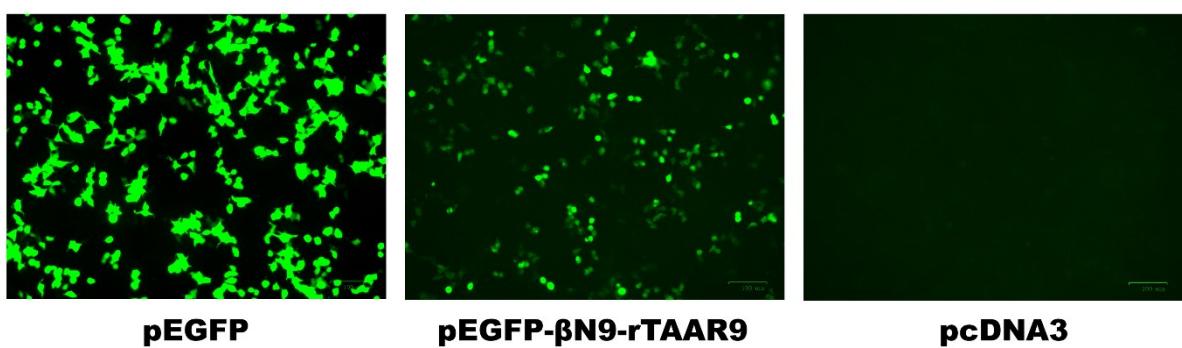


Рисунок 31. Приживленная визуализация гибридного белка TAAR9-GFP в клетках HEK293T и сравнение с клетками, трансфицированными геном только GFP, а также пустым вектором pcDNA3 в качестве отрицательного контроля.

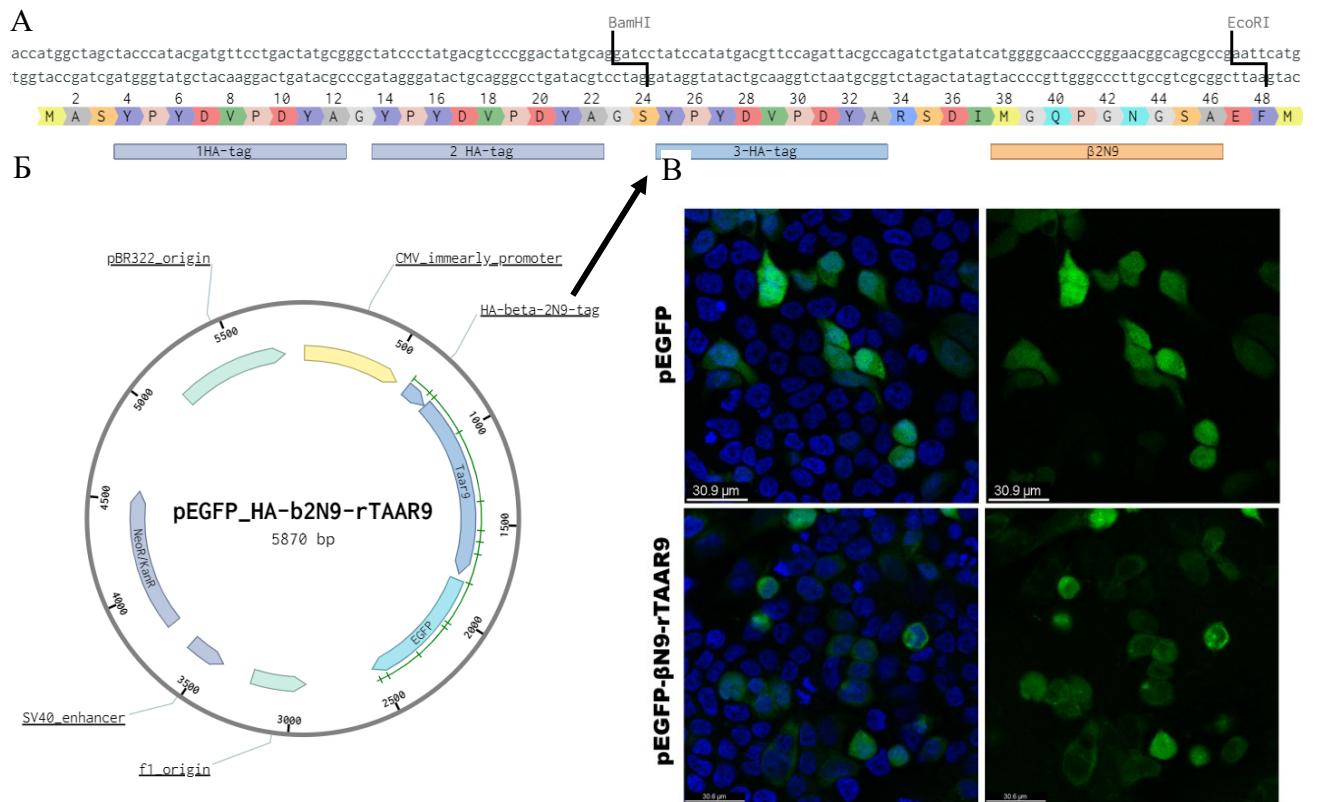


Рисунок 32. Гетерологическая экспрессия белка TAAR9, слитого с EGFP в клетках млекопитающих. А. нуклеотидная и аминокислотная последовательности N-концевого тага 3 повтора гемагглютинин + 9 первых а.к. β 2-адренергического рецептора; Б. Схема плазмида для экспрессии гибридного белка rTAAR9-GFP с N-концевым тагом; В. Сравнение локализации белков EGFP и гибридного белка rTAAR9-EGFP при транзиентной трансфекции клеток линии HEK293T. В левой части наложение красителя DAPI и GFP, в правой – только GFP. При сравнении с EGFP, который экспрессируется цитоплазматически, белок rTAAR9-GFP имеет слабую тенденцию в мембранный локализации.

4.3.2 Оптимизация экспрессии *TAAR9* *in vitro*

Для изучения локализации рецептора в клетке была осуществлена трансфекция гена белка β 2N9-TAAR9 с EGFP на конце. В качестве контроля параллельно оценивали локализацию белка GFP, а также трансфекцию пустым вектором pcDNA3 (Рисунок 31). На конфокальном микроскопе было видно, что меньше половины клеток экспрессировали GFP. Но при сравнении GFP и TAAR9-GFP мы увидели, что в отдельных клетках гибрид чаще локализуется на мембране в отличие от GFP в цитоплазме, хотя во многих клетках с TAAR9-GFP было заметно диффузное распределение гибридного белка (Рисунок 32). Однако, иммунофлюоресцентное окрашивание фиксированных параформальдегидом без этапа пермеабилизации клеток, трансфицированных β 2N9-TAAR9, указывает на то, что в некоторых клетках НА-таг на N-конце рецептора расположен на внешней

стороне плазматической мембраны (Рисунок 34). Причем сигнал от GFP был очень слабый для интерпретации.

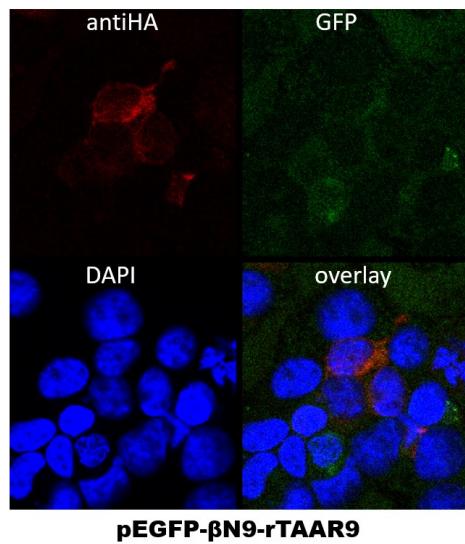


Рисунок 34. Иммунофлюоресцентное окрашивание фиксированных клеток HEK293T мышним anti-HA антителом с последующей инкубацией вторым антителом GAM-Alexa Fluor 555 без permeabilization. Клетки трансформировали rTAAR9-GFP.

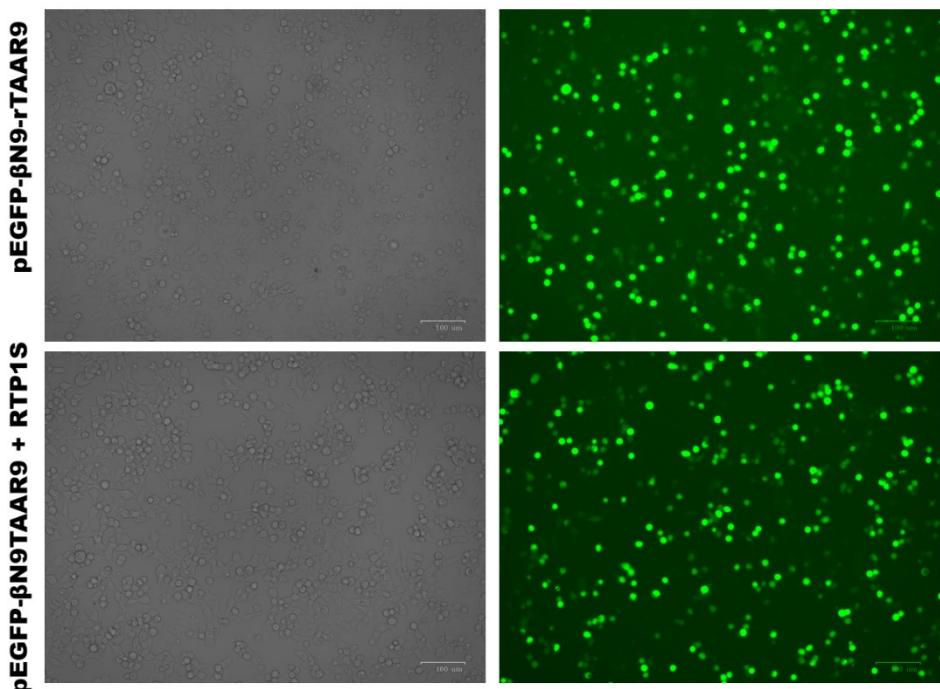


Рисунок 33. Приживленная визуализация белка TAAR9-GFP в клетках HEK293T и сравнение котрансекции шаперона RTP1S на уровень экспрессии TAAR9. Верхний ряд – клетки HEK293T, экспрессирующие TAAR9-GFP в проходящем свете и при визуализации GFP. Нижний ряд - коэкспрессия TAAR9-GFP и шаперона RTP1S.

В целях повышения мембранный экспрессии мы далее применили подход, который часто используется при деорфанизации обонятельных рецепторов, также сложно экспрессируемых в гетерологичной системе. Коэкспрессия обонятельных рецепторов с RTP1S существенно повышала мембранные локализацию рецепторов. Мы осуществляли котрансфекцию RTP1S с β 2N9-TAAR9-GFP в клетках HEK293T (Рисунок 33). Прижизненная визуализация клеток подтвердила примерно равное количество клеток с TAAR9-GFP в присутствии шаперона и без него. Мы далее иммунофлюоресцентным окрашиванием без permeabilization метили НА-таг на N-конце рецептора. Однако, шаперон RTP1S не вносил существенный вклад в локализацию рецептора, так как без котрансфекции клетки с TAAR9 имели схожую картину мембранных расположений (Рисунок 35). Более того, как будет показано ниже, котрансфекция RTP1S смешала EC50 агониста TAAR9 вправо, то есть скорее ухудшала чувствительности системы.

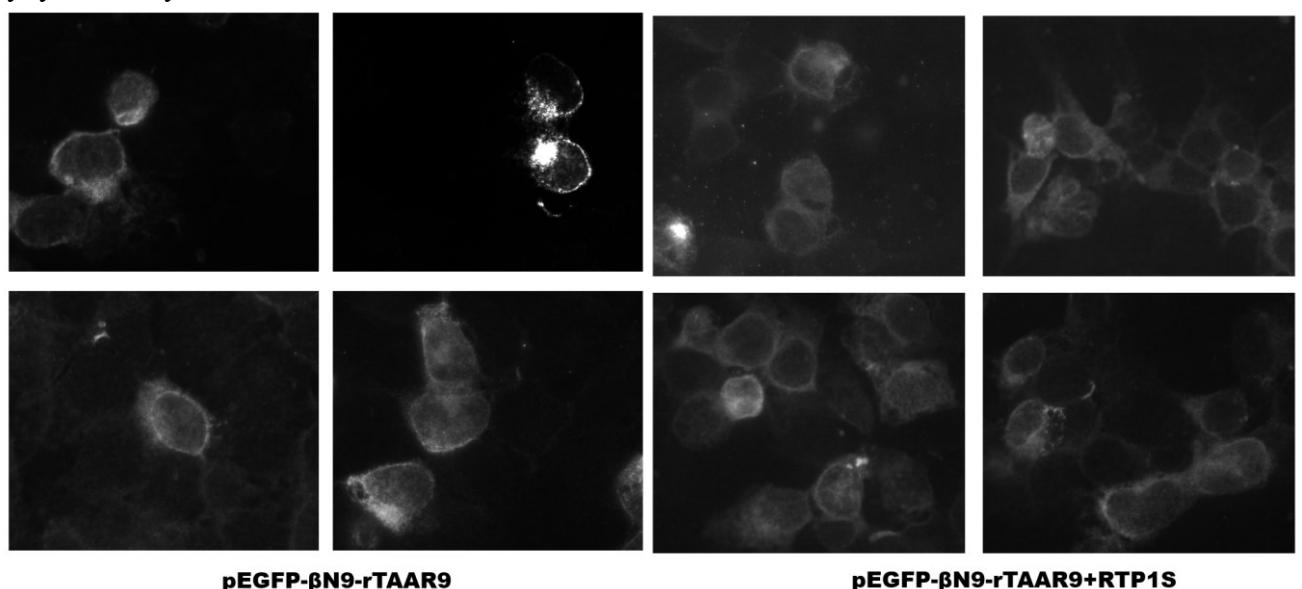


Рисунок 35. Иммунофлюоресцентное окрашивание фиксированных клеток HEK293T мышиным anti-НА антителом с последующей инкубацией вторым антителом GAM-Alexa Fluor 555 без permeabilization. Влияние шаперона обонятельных рецепторов RTP1S на локализацию гибридного белка rTAAR9-EGFP при трансфекции. Левая половина - трансфекция только rTAAR9-GFP; правая половина - трансфекция rTAAR9-GFP и RTP1S. По данным иммунофлюоресцентного окрашивания шаперон RTP1S не вносит существенный вклад в повышение мембранный локализации рецептора rTAAR9.

4.3.3 Оптимизация условий скрининга агонистов методом BRET

Для скрининга применялся метод измерения биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) с помощью цАМФ-биосенсора EPAC. Принцип BRET заключается в переносе энергии между донором (люцифераза светлячка *Renilla*, Rluc) и акцептором (YFP) [32,82,108]. Существуют различные пары донор-акцептор [109]. В основе лежит цАМФ-зависимый фактор EPAC1 (Exchange protein activated by cAMP1), который в ответ на связывание молекулы цАМФ изменяет свою конформацию [110]. При окислении субстрата люциферазы – *h*-колентеразина, Rluc испускает свет с пиком 475 нм. Если донор находится поблизости (около 10 нм), энергия, испущенная Rluc, возбуждает YFP, который в свою очередь испускает свет с пиком 530 нм. Изменение соотношения между эмиссией Rluc и YFP отражает изменение расстояния между этими молекулами. В биосензоре EPAC при низкой базовой концентрации цАМФ Rluc и YFP находятся в близости друг к другу, что приводит к повышенному сигналу BRET. А при связывании EPAC с цАМФ происходит конформационное изменение, Rluc и YFP отдаляются, что снижает BRET соотношение. Для проведения BRET культуру клеток HEK293T котрансфецировали двумя экспрессионными векторами EPAC, который обеспечивает конститутивную экспрессию гибридного гена Rluc-EPAC-YFP, и TAAR9. В качестве положительного контроля использовали неселективный агонист β 2-адренергического рецептора – изопротенерол в концентрации 1 μ M. Данный receptor присутствует на цитоплазматической мемbrane клеток HEK293T в нормальном состоянии и будет давать положительный сигнал от EPAC биосенсора. Чтобы оценить работоспособность системы, клетки трансфецировали в течение 5 часов, и использовали единственный известный агонист TAAR9 крысы – N-метилпиперидин. Для исключения собственного ответа других рецепторов клеток на лиганд также измеряли уровень ответа клеток трансфецированных «пустым» вектором pcDNA3.0. В первом эксперименте был получен специфический положительный ответ рецептора TAAR9 на агонист N-метилпиперидин, а также измерена EC₅₀ = 87 μ M (Рисунок 36).

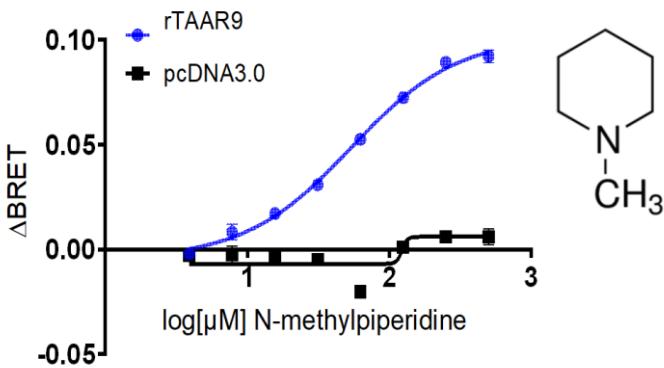


Рисунок 36. Специфический доз озависимый ответ TAAR9 на N-метилпиперидин. Клетки HEK293T котрансфецировали векторами, кодирующими EPAC и rTAAR9 или EPAC и pcDNA3. Данные представлены как среднее Δ BRET относительно фона \pm SEM. Измерение проводили в дубликатах.

В целях повышения чувствительности системы провели сравнение длительности трансфекции: 5 часов и в течение ночи. Однако, на уровень ответа длительность трансфекции влияла не сильно, хотя для варианта с ночной трансфекцией характерна меньшая EC₅₀, поэтому далее использовали трансфекцию в течение ночи (Рисунок 37).

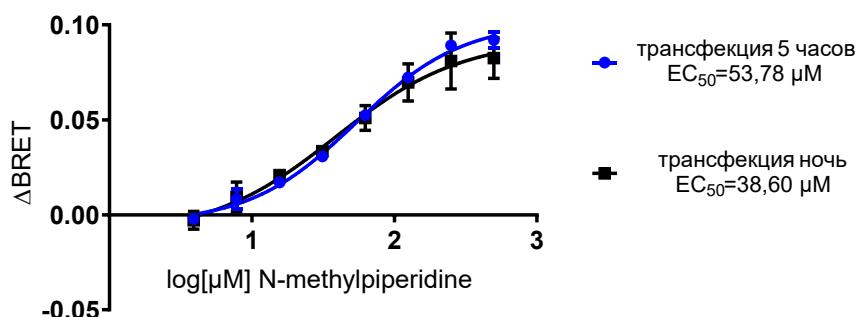


Рисунок 37. Сравнение EC₅₀ агониста TAAR9 в зависимости от длительности трансфекции TAAR9 в клетках HEK293T. Измерение проводили в дубликатах.

Также провели сравнение кривой EC₅₀ агониста TAAR9 N-метилпиперидина методом BRET для оценки влияния шаперона на чувствительность системы. Однако, при одновременной экспрессии рецептора и шаперона сигнал от G_{αs} пути становится слабее по сравнению с экспрессией без шаперона RTP1S (Рисунок 38).

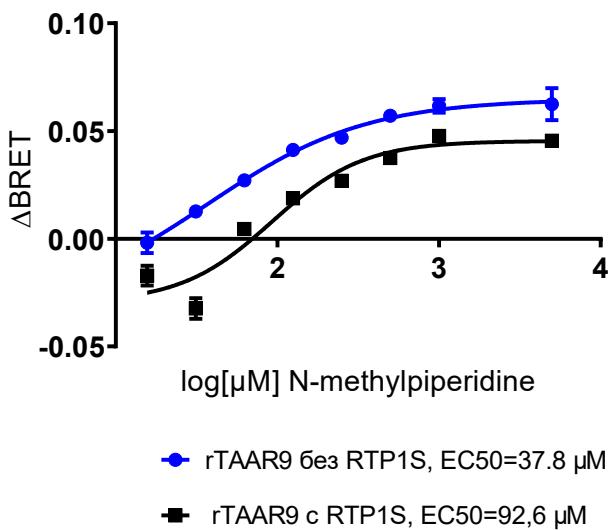


Рисунок 38. Влияние шаперона обонятельных рецепторов RTP1S на ответ рецептора rTAAR9 на агонист N-метилпиперидин. Клетки HEK293T были котрансфектированы векторами, кодирующими TAAR9, биосенсор BRET без/с шапероном RTP1S, инкубировали с различными концентрациями лиганда и оценивали репортерную активность. При одновременной экспрессии рецептора и шаперона сигнал от $G\alpha_s$ пути становится существенно слабее по сравнению с экспрессией без шаперона, EC50 повысилась в три раза. Данные представлены как дубликаты \pm SEM.

В порядке оптимизации также была проведена работа по оценке возможности влияния клеточной линии-«хозяина» HEK293T для временной трансфекции на линию CHO-K1. Ранее рецептор TAAR1 успешно экспрессировался в этой линии, причем без добавления N-концевого тага [75,76]. Однако, мы заметили очень высокий фон при трансфекции сенсора EPAC и TAAR9 в клетки CHO-K1, поэтому сигнал от агониста не достигал пороговых значений относительно фона ни в одной из концентраций. Хотя мы наблюдали дозозависимое увеличение сигнала, первоначально выбранная линия HEK293T это оптимальный вариант.

Таким образом, по итогам работы оптимальными условиями для скрининга агонистов TAAR9 методом BRET являются временная трансфекция TAAR9 с тагом $\beta 2N9$ в клетках линии HEK293T течение ночи, дальнейшая инкубация в течение суток. В данных условиях EC50 для N-метилпиперидина составляет 38 μ M. По данным других групп, EC50 этого агониста для TAAR9 крысы была 18 μ M [56] и 163 μ M для мыши [57].

4.3.4 Скрининг агонистов TAAR9

Скрининг агонистов методом BRET с использованием HEK293T проводили в формате 96-луночного планшета. Скрининг вели при концентрации 50, 100, 250 μM . В данном случае критично использовать низкую концентрацию ДМСО 0,1 – 0,5%, так как при большей концентрации появляется высокий уровень фона и плохая воспроизводимость. Для определения EC₅₀ лиганд добавляли в разведениях от 10 μM до 1000 μM .

Был проведен скрининг 435 соединений различной природы (Приложение 5). N-метилпиперидин, агонист TAAR9, был использован как контроль. Также включали форсколин 20 μM , который неспецифически повышает концентрацию цАМФ, и изопротеренол в качестве положительных контролей. На первом этапе были исследованы следовые амины, одоранты, а также нейротрансмиттеры (Рисунок 39).

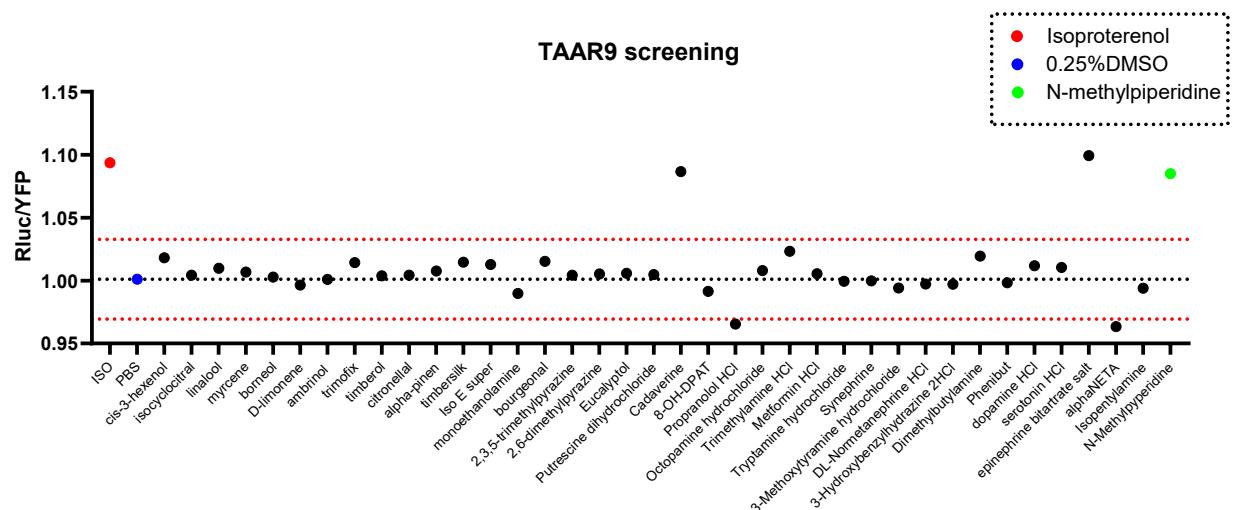


Рисунок 39. Скрининг одорантов, следовых аминов и нейротрансмиттеров на агонизм TAAR9 в концентрации 250 μM . Чёрная пунктирная линия – среднее значение фона (0,25% ДМСО) \pm SD (красные пунктирные линии). Контроли выделены цветом. Был обнаружен ответ кадаверина, а также адреналина. Адреналин исключили в ходе дальнейшего анализа из-за неспецифичности ответа.

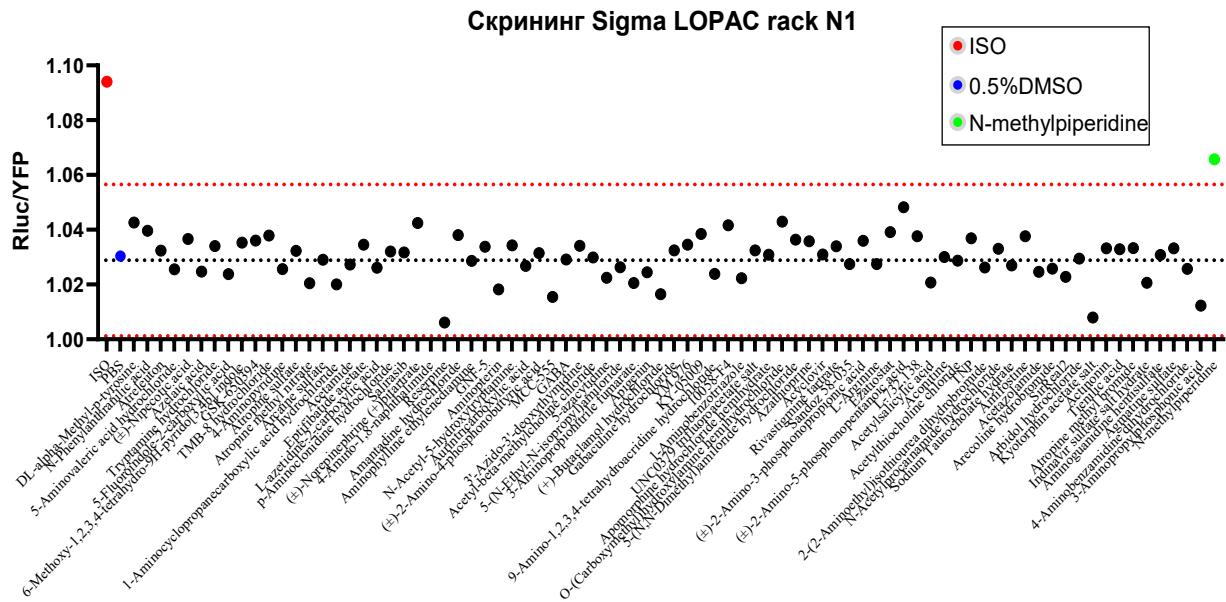


Рисунок 40. Пример BRET скрининга агонистов TAAR9. 80 соединений из планшета №1 библиотеки SigmaLOPAC1280 были протестированы в единой концентрации 50 μM . Измерение проводили через 5 минут после добавления веществ. Черная пунктирная линия – среднее значение фона (0,5% ДМСО) \pm SD (красные пунктирные линии). Контроли выделены цветом.

Далее 320 соединений из библиотеки фармакологически активных веществ, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), Sigma LOPAC 1280 оказались неактивными в отношении рецептора TAAR9. Для соединений библиотеки концентрация была 50 μM , чтобы сохранить концентрацию ДМСО ниже 1%. Пример результатов скрининга библиотеки SigmaLOPAC представлен на рисунке 40.

В ходе скрининга был обнаружен ответ кадаверина на TAAR9 (Рисунок 41). Была оценена его EC₅₀, которая была 81 μM . Кроме кадаверина было найдено несколько соединений (2-аминофосфонопентаноевая к-та, 2-хлороаденозин, норадреналин, адреналин), которые повышали концентрацию цАМФ, однако, при проведении теста на специфичность на клетках, трансфецированных пустым вектором, также был получен ответ, что говорит о неспецифичности ответа. В случае норадреналина это скорее всего эндогенные адренорецепторы HEK293T, а 2-хлороаденозина – аденоzinовые рецепторы [111]. Ни одно из других исследованных соединений из группы следовых аминов не активировало TAAR9, так же как и одоранты.

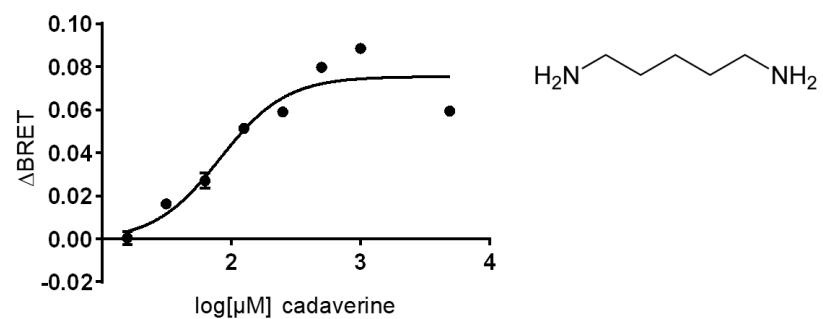


Рисунок 41. Дозозависимая кривая агониста TAAR9 кадаверина. EC50=81 μM

5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе был исследован рецептор TAAR9. На момент начала работы информация о роли TAAR9, за исключением его участия в обонянии, практически отсутствовала. Однако, исследования на животных с нокаутом других членов семейства TAAR1, TAAR2 и TAAR5 показали их экспрессию и возможную функцию в лимбической системе, нейрогенезе и в когнитивных процессах [4,8,9,112,113]. Также, как показал проведенный в этой работе анализ паттерна экспрессии *Taar9* у крыс гораздо более интересная и выраженная экспрессия в ЦНС по сравнению с мышами. Поэтому в качестве модели для изучения роли TAAR9 были выбраны крысы, у которых было выполнено нокаутирование гена *Taar9*.

Мы создали две линии крыс TAAR9-KO методом CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования генов в зиготах. В ген была внесена мутация делеции цитозина или инсерции аденина, приводящая к сдвигу рамки считывания TAAR9 с ранним стоп-кодоном в двух линиях, что привело к резкому снижению уровня мРНК TAAR9 в обонятельном эпителии. Далее нами была поставлена задача с помощью различных подходов охарактеризовать TAAR9 за пределами обонятельной системы. Эксперименты, проведённые в рамках исследования, являются первой попыткой охарактеризовать влияние выключения гена TAAR9 на поведение животных.

Так как метод CRISPR/Cas9 может повлечь за собой нежелательные мутации, важно было исключить это влияние. Для этого на первом этапе, чтобы убрать этот эффект, мы проводили оценку на двух независимых линиях, а затем после длительного процесса обратного скрещивания для избавления от возможных нежелательных мутаций, повторили эксперименты на одной линии. При выполнении исследований установлено, что генетическое выключение TAAR9 не влияет на общее состояние, двигательную активность, память и аффективное поведение у крыс. Однако мы обнаружили сниженную тревожность крыс без TAAR9 в тесте «стресс-индуцированная гипертермия». Стоит отметить, что наши результаты были продемонстрированы сначала на крысах двух разных нокаутных линий, а затем на животных после обратного скрещивания, что дополнительно указывает на то, что обнаруженное изменение было связано именно с выключением TAAR9. При этом,

однако, в других поведенческих тестах, которые также были направлены на оценку тревожности поведение, крысы без TAAR9 не отличались от животных «дикого типа». Поэтому, чтобы лучше понять, чем обусловлено такое изменение в температуре, животным были имплантированы датчики постоянного мониторинга температуры. По результатам исследования нами показано, что крысы TAAR9-KO характеризуются постоянно повышенной температурой тела при обычных условиях. При этом охлаждение сопровождается большим понижением температуры тела у мутантных животных, чем у крыс дикого типа. Подобное изменение температуры у животных с нокаутом гена TAAR продемонстрировано впервые, хотя ранее было показано, что у TAAR5-KO гипотермическое действие агониста рецептора серотонина 5-HT1A типа, 8-OH-DPAT, было более выраженным [7], а TAAR1 агонист/TAAR5 антагонист, 3-йодтиронамин, производное тиреоидного гормона, оказывает гипотермическое действие на животных, хотя механизм такого охлаждения пока не выяснен [6,114].

Экспрессия гена *Taar9* была обнаружена в ЦНС крысы, впервые в среднем мозге, а именно в центральной области покрышки и черной субстанции, где располагаются ядра дофаминергических нейронов, а также в прилежащем ядре, куда идут проекции от этих нейронов. мРНК *Taar9* также была обнаружена в центральном гиппокампе, гипоталамусе и в продолговатом мозге. У мыши в соответствии с предыдущими исследованиями экспрессия *Taar9* в мозге ограничивалась обонятельной луковицей и мозжечком [5,40]. Однако, согласно проведенному нами мета-анализу открытых данных РНК-секвенирования структур ЦНС человека и мыши, слабая экспрессия TAAR9 обнаруживается в хвостатом ядре стриатума человека и отдельных фракциях нейронов прилежащего ядра мыши. Это подтверждает предположение, что TAAR9, как и другие TAAR, в мозге экспрессируется в клетках определённых типов, поэтому при анализе целых структур их экспрессия чаще всего оказывается ниже предела детекции [103,115]. Экспрессия TAAR9 в ЦНС, в т.ч. в гипоталамусе вызывает определенный интерес в связи с тем, что проведенный нами анализ содержанияmonoаминов выявил небольшое повышение уровня дофамина в гипоталамусе, однако, уровень экспрессии ферментов, участвующих в метаболизме дофамина ТН и МАО у TAAR9-KO не изменился. Также стоит отметить, что гипоталамус – это структура, которая является центром терморегуляции у млекопитающих [116]. Хотя нам не удалось

показать участие TAAR9 в функционировании ЦНС, его экспрессия в нескольких структурах мозга косвенно может указывать на возможную вовлеченность TAAR9. Помимо *Taar9*, был также изучен паттерн экспрессии других *Taar* в мозге мыши. Экспрессия *Taar2* и *Taar6* мыши была подтверждена в обонятельном эпителии и луковице. У мыши экспрессия *Taar2* также была найдена в коре, гипоталамусе и стволе мозга [9], *Taar5* – в стволе мозга и мозжечке [92], *Taar6* – в коре [103]. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего более детального изучения паттерна экспрессии генов *Taar* в мозге.

На периферии экспрессия *Taar9* крысы была обнаружена в яичках, что интересно ввиду того, что сперма содержит кадаверин, спермин и спермидин, которые, в том числе и по нашим данным, являются агонистами TAAR9. Известно, что остальные TAAR, а также ОР экспрессируются там же [4,117], что позволяет предположить, что данные рецепторы могут функционировать в качестве указателей для хемотаксиса сперматозоидов, как уже было показано для ОР hOR17-4 [118]. Показано, что экспрессия и функционирование ОР может быть и за пределами обонятельной системы [80,119,120]. Например, описано их участие в метаболизме глюкозы и липидов [121], а снижение экспрессии ОР было показано в коре больших полушарий у пациентов с болезнью Паркинсона [122] и т.д. Интересно, что ранее в нашей лаборатории было показано, что выключение TAAR9 приводит к снижению концентрации холестерина и ЛПНП у животных TAAR9-KO [93].

Важной информацией о функции рецептора являются его лиганды. В рамках этой работы нами была предпринята попытка найти агонисты TAAR9. Для этого была оптимизирована система гетерологической экспрессии TAAR9. В первых исследованиях TAAR *in vitro* на примере экспрессии TAAR1 в клетках HEK293 было показано, что TAAR1 локализуется в цитоплазме [2], однако, мембранные расположение GPCR критично для функционирования рецепторов. Причиной неправильной локализации может быть отсутствие сигнальной последовательности, а также сайта гликозилирования на N-конце, которые способствуют процессингу GPCR в эндоплазматическом ретикулуме и направлению на мембрану [2,82]. Поэтому нами была использована последовательность первых девяти аминокислот β 2-адренорецептора в качестве N-концевой метки для экспрессии TAAR9 в клетках HEK293T [82]. Далее мы показали, что β 2N9-TAAR9 локализуется на мембране. О

функциональности рецептора свидетельствовала его активация на известный агонист. В целях повышения чувствительности системы мы коэкспрессировали обонятельный шаперон RTP1S, это подход для улучшения мембранный экспрессии ОР, который используется несколькими группами, занимающимися деорфанизацией TAAR [78,83]. В наших условиях RTP1S не повышал чувствительность метода, что косвенно может указывать на то, что он не участвует в направлении TAAR на мембрану. Однако, есть ли у TAAR отдельные белки для фолдинга или транспорта к мембране требует отдельного исследования. Таким образом, нами была разработана и оптимизирована система для гетерологической экспрессии гена TAAR9 в клетках HEK293 с использованием тага β 2N9, которую мы успешно использовали для скрининга агонистов TAAR9 методом BRET [108].

В ходе скрининга 435 соединений, среди которых были СА, одоранты, феромоны, нейротрансмиттеры, а также фармакологически активные вещества из библиотеки веществ, одобренных FDA, нам не удалось обнаружить новые лиганды TAAR9, но мы подтвердили данные других групп по агонизму N-метилпиперидина с EC₅₀=37 μ M для TAAR9 крысы [57,58], а также обнаружили агонизм кадаверина с EC₅₀=81 μ M. На момент выполнения работы возможность активации TAAR9 крысы кадаверином была также обнаружена группой Guo с коллегами, однако данных о EC₅₀ этого агониста указано не было [58], а EC₅₀ кадаверина для TAAR9 мыши 243 μ M [57]. Довольно высокое значение EC₅₀ может свидетельствовать о неоптимальном функционировании рецептора в гетерологической системе, так как чувствительность TAAR, экспрессирующихся в нативных условиях, гораздо выше, чем было показано *in vitro* [123]. Мы также не выявили отличий в обонятельном тесте между нокаутами TAAR9 и диким типом при действии агонистов кадаверина и N-метилпиперидина. Кадаверин – продукт декарбоксилирования аминокислоты лизина, который наряду с путресцином в большом количестве присутствует в продуктах разложения, и для человека обладает отталкивающим запахом и сигналом о бактериальной инфекции [11]. Ранее было показано, что рыбы *Danio rerio* проявляют аверсивное поведение к кадаверину, причем такое поведение обеспечивает рецептор TAAR13c [71]. А мыши дикого типа демонстрируют аверсию к кадаверину и N-метилпиперидину при разных концентрациях, причем низкие концентрации этих веществ перестают вызывать аверсию у мышей с кластерной делецией TAAR2-TAAR9 [39]. Судя по всему, подобная аверсия видоспецифична и

отсутствует у крыс. Интересно, что согласно предыдущим исследованиям крысы чаще закапывали объекты, смоченные кадаверином, по сравнению с пропитанными водой [124,125]. Кадаверин также содержится в спинномозговой жидкости, а экспрессия *TAAR9*, наряду с другими генами *TAAR*, показана в сосудистом сплетении желудочек мозга, поэтому было высказано предположение, что эти рецепторы могут участвовать в контроле состава спинномозговой жидкости, обеспечивая точную концентрацию веществ [126,127].

Результаты опытов, проведённых в рамках данной работы, позволили впервые продемонстрировать физиологическое значение *TAAR9*: было показано, что выключение *TAAR9* приводит к изменению функции терморегуляции у животных. Исходя из вышесказанного, необходимо отметить, что функцию *TAAR9* невозможно свести только к распознаванию запахов. Таким образом, полученные результаты дают экспериментальное обоснование для продолжения поиска селективных лигандов *TAAR9* и последующего изучения роли *TAAR9* в метаболизме липидов и терморегуляции в том числе с применением нокаутных животных.

ВЫВОДЫ

1. Впервые была выявлена экспрессия гена TAAR9 в черной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга, прилежащем к хвостатом ядрах стриатума, гиппокампе и продолговатом мозге;
2. Нокаут гена TAAR9 приводит к сниженному ответу в тесте «Стресс-индуцированная гипертермия», в то же время в других поведенческих тестах не оказывает существенного влияния на поведение животных;
3. Крысы без TAAR9 характеризуются повышенной температурой тела в нормальных условиях, а охлаждение сопровождается большим снижением температуры тела
4. TAAR9 экспрессируется в гипоталамусе, а выключение TAAR9 сопровождается повышением содержания дофамина в данной структуре;
5. Разработана и валидирована клеточная система для скрининга лигандов TAAR9 *in vitro* и подтвержден агонизм кадаверина и N-метилпиперидина по отношению к TAAR9

Список статей, опубликованных в журналах, индексируемых системами WoS и Scopus:

1. Vaganova A.N., **Murtazina R.Z.**, Shemyakova, T.S., Prjibelski A.D., Katolikova, N. V., Gainetdinov, R.R. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets Analysis // Int. J. Mol. Sci. Int J Mol Sci, 2021. Vol. 22, № 16. P. 8802.
2. Kalinina D.S., Ptukha M.A., Goriaanova, A. V., Merkulyeva, N.S., Kozlova, A.A., **Murtazina, R.Z.**, Shemiakova T.S., Kuvarzin S.R., Vaganova A.N., Volnova A.B., Gainetdinov R.R., Musienko P.E. Role of the trace amine associated receptor 5 (TAAR5) in the sensorimotor functions // Scientific Reports. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 11, № 1. 23092 p.
3. **Murtazina R.Z.**, Zhukov I.S., Korenkova O.M., Popova E.A., Kuvarzin S.R., Efimova E.V., Kubarskaya L.G., Batotsyrenova E.G., Zolotoverkhaya E.A., Vaganova A.N., Apryatin S.A., Alenina N.V., Gainetdinov R.R. Genetic deletion of trace-amine associated receptor 9 (TAAR9) in rats leads to decreased blood cholesterol levels // Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2021. Vol. 22, № 6. P. 1–15.
4. Krasavin M., Peshkov A.A., Lukin A., Komarova K., Vinogradova L., Smirnova D., Kanov E. V., Kuvarzin S.R., **Murtazina R.Z.**, Efimova E. V., Gureev M., Onokhin K., Zakharov K., Gainetdinov R. R. Discovery and In Vivo Efficacy of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 4-(2-Aminoethyl)-N-(3,5-dimethylphenyl)piperidine-1-carboxamide Hydrochloride (AP163) for the Treatment of Psychotic Disorders // Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 23, № 19. P. 11579.
5. Vaganova A.N., Katolikova N.V., **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Gainetdinov R.R. Public Transcriptomic Data Meta-Analysis Demonstrates TAAR6 Expression in the Mental Disorder-Related Brain Areas in Human and Mouse Brain // Biomolecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 12, № 9. P. 1259.
6. Efimova E.V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., Katolikova N.V., Shemiakova T.S., Razenkova V., Ptukha M., Kozlova A.A., **Murtazina R.Z.**, Smirnova D., Veshchitskii A.A., Merkulyeva N.S., Volnova A.B., Musienko P.E., Korzhevskii D.E., Budygin E.A., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis // Front. Behav. Neurosci. Frontiers Media SA, 2022. Vol. 16.
7. Zhukov I.S., Vaganova A.N., **Murtazina R.Z.**, Alferova L.S., Ermolenko E.I., Gainetdinov R.R. Gut Microbiota Alterations in Trace Amine-Associated Receptor 9 (TAAR9) Knockout Rats // Biomolecules. MDPI, 2022. Vol. 12, № 12. P. 1823.

Обзор в журнале, включенном в перечень ВАК:

8. **Муртазина Р.З.**, Гайнетдинов Р.Р. Трансгенные животные в экспериментальной фармакологии: фокус на рецепторах следовых аминов //

Российский Физиологический Журнал Им И М Сеченова. 2019. Vol. 105, № 11. P. 1373–1380.

Список тезисов на конференциях:

1. **Муртазина Р.З.**, Куварзин С.Р., Ефимова Е.В., Коренькова О.М., Аленина Н.В., Гайнетдинов Р.Р. Изучение функциональной роли рецептора следовых аминов TAAR9. Актуальные проблемы трансляционной биомедицины – 2019, Ленинградская область, Россия,
2. **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Zhukov I.S., Efimova E.V., Korenkova O.M., Alenina N.V., Gainetdinov R.R. P.059 Identifying the role of trace amine-associated receptor 9 in behavior, brain neurochemistry and blood biochemistry., 33rd ECNP Congress Hybrid, Virtual, 12 - 15 сентября 2020 (онлайн)
3. **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Zhukov I.S., Efimova E.V., Korenkova O.M., Alenina N.V., Gainetdinov R.R. Investigation of physiological functions of trace amine-associated receptor 9 (TAAR9). 27th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference “Stress and Behavior”. г. Санкт-Петербург, Россия, 16-18 сентября 2020
4. **Муртазина Р.З.**, Канов Е.В., Куварзин С.Р., Жуков И.С., Гайнетдинов Р.Р. Изучение функции рецептора следовых аминов TAAR9. Международная Школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», г.Пущино, Россия, 18 – 22 апреля 2022
5. **Муртазина Р.З.**, Куварзин С.Р., Жуков И.С., Гайнетдинов Р.Р. Исследование роли рецептора следовых аминов TAAR9 в физиологии млекопитающих. Актуальные проблемы трансляционной биомедицины – 2022, Ленинградская область, Россия, 25 – 26 июля 2022

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь, особую благодарность выражаю моему научному руководителю, Раулю Гайнетдинову, за руководство в выполнении диссертации, за возможность работать в его лаборатории, а также за неизменную веру в результат.

За помощь в выполнении этой работы, за дружескую атмосферу, взаимовыручку и поддержку выражаю свою благодарность всему научному коллективу лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ. Особенно Евгении Ефимовой за организацию работы лаборатории и помошь и обучение работе с животными, а также ценные советы при интерпретации данных, Савелия Куварзина за совместные поведенческие эксперименты и помошь в диссекции, Микаэля Мора за обучение и проведение экспериментов методом ВЭЖХ, Евгения Канова за обучение работе с клеточными культурами и методике BRET, Наталью Католикову за многочисленные ценные советы и помошь за все время обучения, за обучение работе с РНК и обратной транскрипцией, а также за порядок в лаборатории, Анастасию Ваганову за проведение мета-анализа и за терпеливое обучение работе с GEO. Сотрудникам ресурсного центра СПбГУ Анне Романович и Алексею Машарскому за проведение секвенирования векторов, Николаю Костину за помошь при работе с конфокальным микроскопом. Сотрудникам вивария СПбГУ за уход и содержание животных и помошь в работе с ними. Сотруднику центра трансгенеза и геномного редактирования СПбГУ Юлии Соловой за полезные советы по конструированию векторов. Сотрудникам лаборатории Майкла Бадера в Max Delbruck Center for Molecular Medicine Наталье Алениной и Елене Поповой и сотруднице ИТБМ СПбГУ Ольге Кореньковой за создание животных методом CRISPR. Профессору University of Toronto Ali Salahpour за важные советы по оптимизации методики BRET. Заведующему лабораторией фармакологии поведения Института фармакологии им. А.В. Вальдмана Первого СПбГМУ Илье Михайловичу Суханову за ценные советы при написании этой работы.

И моим родным и близким за веру в меня и неизменную поддержку научной карьеры.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pierce K.L., Premont R.T., Lefkowitz R.J. Seven-transmembrane receptors // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 3, № 9. P. 639–650.
2. Bunzow J.R., Sonders M.S., Arttamangkul S., Harrison L.M., Zhang G., et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor // *Mol. Pharmacol.* 2001. Vol. 60, № 6. P. 1181–1188.
3. Borowsky B., Adham N., Jones K.A., Raddatz R., Artymyshyn R., et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, № 16. P. 8966–8971.
4. Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace amines and their receptors // *Pharmacol. Rev.* 2018. Vol. 70, № 3. P. 549–620.
5. Liberles S.D., Buck L.B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium // *Nature*. 2006. Vol. 442, № 7103. P. 645–650.
6. Dinter J., Mühlhaus J., Wienchol C.L., Yi C.X., Nürnberg D., et al. Inverse agonistic action of 3-iodothyronamine at the human trace amine-associated receptor 5 // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 2. P. 1–19.
7. Espinoza S., Sukhanov I., Efimova E. V., Kozlova A., Antonova K.A., et al. Trace Amine-Associated Receptor 5 Provides Olfactory Input Into Limbic Brain Areas and Modulates Emotional Behaviors and Serotonin Transmission // *Front. Mol. Neurosci.* 2020. Vol. 13, № March. P. 1–10.
8. Efimova E. V., Kozlova A.A., Razenkova V., Katolikova N. V., Antonova K.A., et al. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice // *Neuropharmacology*. 2021. Vol. 182, № October 2020. P. 108373.
9. Efimova E. V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., Katolikova N. V., Shemiakova T.S., et al. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis // *Front. Behav. Neurosci.* 2022. Vol. 16. P. 847410.
10. Harmeier A., Meyer C.A., Staempfli A., Casagrande F., Petrinovic M.M., et al. How female mice attract males: A urinary volatile amine activates a trace amine-associated receptor that induces male sexual interest // *Front. Pharmacol.* 2018. Vol. 9, № AUG. P. 1–18.
11. Xu Z., Li Q. TAAR Agonists // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2020. Vol. 40, № 2. P. 257–272.
12. Ferrero D.M., Lemon J.K., Fluegge D., Pashkovski S.L., Korzan W.J., et al. Detection and avoidance of a carnivore odor by prey // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Vol. 108, № 27. P. 11235–11240.
13. Berry M.D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators // *Journal of Neurochemistry*. 2004. Vol. 90, № 2. P. 257–271.
14. Grandy D.K. Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast? // *Pharmacol. Ther.* 2007. Vol. 116, № 3. P. 355–390.
15. Lindemann L., Hoener M.C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family // *Trends Pharmacol. Sci.* 2005. Vol. 26, № 5. P. 274–281.
16. Durden D.A., Philips S.R. Kinetic measurements of the turnover rates of phenylethylamine and tryptamine in vivo in the rat brain. // *J. Neurochem.* 1980.

- Vol. 34, № 6. P. 1725–1732.
17. Farooqui T., Farooqui A.A. Trace Amines and Their Relevance to Neurological Disorders: A Commentary // *Trace Amines and Neurological Disorders: Potential Mechanisms and Risk Factors*. 2016. 257–268 p.
 18. Regard J.B., Sato I.T., Coughlin S.R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression // *Cell*. 2008. Vol. 135, № 3. P. 561–571.
 19. Zucchi R., Chiellini G., Scanlan T.S., Grandy D.K. Trace amine-associated receptors and their ligands // *Br. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 149, № 8. P. 967–978.
 20. Lindemann L., Ebeling M., Kratochwil N.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., et al. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors // *Genomics*. 2005. Vol. 85, № 3. P. 372–385.
 21. Eyun S. II, Moriyama H., Hoffmann F.G., Moriyama E.N. Molecular evolution and functional divergence of trace amine-associated receptors // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 3. P. 1–24.
 22. Суханов И.М., Звартай Э.Э., Гайнэтдинов Р.Р. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, 1-го подтипа как новая терапевтическая мишень в нейропсихофармакологии // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2019. Vol. 82, № 5. P. 3–7.
 23. Wolinsky T.D., Swanson C.J., Smith K.E., Zhong H., Borowsky B., et al. The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: An animal model with relevance to schizophrenia // *Genes, Brain Behav.* 2007. Vol. 6, № 7. P. 628–639.
 24. Lindemann L., Meyer C.A., Jeanneau K., Bradaia A., Ozmen L., et al. Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008. Vol. 324, № 3. P. 948–956.
 25. Sotnikova T.D., Caron M.G., Gainetdinov R.R. Trace amine-associated receptors as emerging therapeutic targets // *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 76, № 2. P. 229–235.
 26. Espinoza S., Salahpour A., Masri B., Sotnikova T.D., Messa M., et al. Functional Interaction between Trace Amine-Associated Receptor 1 and Dopamine D2 Receptor // *Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 80, № 3. P. 416–425.
 27. Revel F.G., Moreau J.-L., Gainetdinov R.R., Ferragud A., Velázquez-Sánchez C., et al. Trace Amine-Associated Receptor 1 Partial Agonism Reveals Novel Paradigm for Neuropsychiatric Therapeutics // *Biol. Psychiatry*. 2012. Vol. 72, № 11. P. 934–942.
 28. Harmeier A., Obermueller S., Meyer C.A., Revel F.G., Buchy D., et al. Trace amine-associated receptor 1 activation silences GSK3 β signaling of TAAR1 and D2R heteromers // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2015. Vol. 25, № 11. P. 2049–2061.
 29. Di Cara B., Maggio R., Aloisi G., Rivet J.-M., Lundius E.G., et al. Genetic Deletion of Trace Amine 1 Receptors Reveals Their Role in Auto-Inhibiting the Actions of Ecstasy (MDMA) // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 47. P. 16928–16940.
 30. Revel F.G., Moreau J.L., Gainetdinov R.R., Bradaia A., Sotnikova T.D., et al. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 20. P. 8485–8490.
 31. Berry, Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges // *Pharmacol. Ther.* 2017. Vol. 180. P. 161–180.

32. Salahpour A., Espinoza S., Masri B., Lam V., Barak L.S., et al. BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2012. Vol. 3, № AUG. P. 105.
33. Heffernan M.L.R., Herman L.W., Brown S., Jones P.G., Shao L., et al. Ulotaront: A TAAR1 Agonist for the Treatment of Schizophrenia // *ACS Med. Chem. Lett.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 92–98.
34. Krasavin M., Peshkov A.A., Lukin A., Komarova K., Vinogradova L., et al. Discovery and In Vivo Efficacy of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 4-(2-Aminoethyl)-N-(3,5-dimethylphenyl)piperidine-1-carboxamide Hydrochloride (AP163) for the Treatment of Psychotic Disorders // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 19. P. 11579.
35. Krasavin M., Lukin A., Sukhanov I., Gerasimov A.S., Kuvarzin S., et al. Discovery of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 2-(5-(4'-Chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)ethan-1-amine (LK00764) for the Treatment of Psychotic Disorders // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 11. P. 1650.
36. Koblan K.S., Kent J., Hopkins S.C., Krystal J.H., Cheng H., et al. A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia. // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 382, № 16. P. 1497–1506.
37. Fleischer L.M., Somaiya R.D., Miller G.M. Review and meta-analyses of TAAR1 expression in the immune system and cancers // *Front. Pharmacol.* 2018. Vol. 9, № JUN.
38. Duan J., Martinez M., Sanders A.R., Hou C., Saitou N., et al. Polymorphisms in the trace amine receptor 4 (TRAR4) gene on chromosome 6q23.2 are associated with susceptibility to schizophrenia // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. Vol. 75, № 4. P. 624–638.
39. Dewan A., Pacifico R., Zhan R., Rinberg D., Bozza T. Non-redundant coding of aversive odours in the main olfactory pathway // *Nature*. 2013. Vol. 497, № 7450. P. 486–489.
40. Pacifico R., Dewan A., Cawley D., Guo C., Bozza T. An Olfactory Subsystem that Mediates High-Sensitivity Detection of Volatile Amines // *Cell Rep.* 2012. Vol. 2, № 1. P. 76–88.
41. Zeng Z., Fan P., Rand E., Kyaw H., Su K., et al. Cloning of a putative human neurotransmitter receptor expressed in skeletal muscle and brain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. Vol. 242, № 3. P. 575–578.
42. Муртазина Р.З., Гайнетдинов Р.Р. Трансгенные животные в экспериментальной фармакологии: фокус на рецепторах следовых аминов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Vol. 105, № 11. P. 1373–1380.
43. Revel F.G., Meyer C.A., Bradaia A., Jeanneau K., Calcagno E., et al. Brain-Specific Overexpression of Trace Amine-Associated Receptor 1 Alters Monoaminergic Neurotransmission and Decreases Sensitivity to Amphetamine // *Neuropsychopharmacology*. 2012. Vol. 37, № 12. P. 2580–2592.
44. Li Q., Korzan W.J., Ferrero D.M., Chang R.B., Roy D.S., et al. Synchronous Evolution of an Odor Biosynthesis Pathway and Behavioral Response // *Curr. Biol.* 2013. Vol. 23, № 1. P. 11–20.
45. Vanti W.B., Muglia P., Nguyen T., Cheng R., Kennedy J.L., et al. Discovery of a null mutation in a human trace amine receptor gene // *Genomics*. 2003. Vol. 82, № 5. P. 531–536.
46. Müller D.J., Chiesa A., Mandelli L., Luca V. De, Ronchi D. De, et al. Correlation

- of a set of gene variants, life events and personality features on adult ADHD severity // J. Psychiatr. Res. 2010. Vol. 44, № 9. P. 598–604.
47. Carnicelli V., Santoro A., Sellari-Franceschini S., Berrettini S., Zucchi R. Expression of trace amine-associated receptors in human nasal mucosa // Chemosens. Percept. 2010. Vol. 3, № 2. P. 99–107.
48. Ohta H., Takebe Y., Murakami Y., Takahama Y., Morimura S. Tyramine and β -phenylethylamine, from fermented food products, as agonists for the human trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1) in the stomach // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2017. Vol. 81, № 5. P. 1002–1006.
49. D'Andrea G., Terrazzino S., Fortin D., Farruggio A., Rinaldi L., et al. HPLC electrochemical detection of trace amines in human plasma and platelets and expression of mRNA transcripts of trace amine receptors in circulating leukocytes // Neurosci. Lett. 2003. Vol. 346, № 1–2. P. 89–92.
50. Babusyte A., Kotthoff M., Fiedler J., Krautwurst D. Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2 // J. Leukoc. Biol. 2013. Vol. 93, № 3. P. 387–394.
51. Ito J., Ito M., Nambu H., Fujikawa T., Tanaka K., et al. Anatomical and histological profiling of orphan G-protein-coupled receptor expression in gastrointestinal tract of C57BL/6J mice // Cell Tissue Res. 2009. Vol. 338, № 2. P. 257–269.
52. Gozal E.A., O'Neill B.E., Sawchuk M.A., Zhu H., Halder M., et al. Anatomical and functional evidence for trace amines as unique modulators of locomotor function in the mammalian spinal cord // Front. Neural Circuits. 2014. Vol. 8. P. 134.
53. Pronin A., Levay K., Velmeshev D., Faghihi M., Shestopalov V.I., et al. Expression of Olfactory Signaling Genes in the Eye // PLoS One / ed. Ljubimov A. V. 2014. Vol. 9, № 4. P. e96435.
54. Chiellini G., Erba P., Carnicelli V., Manfredi C., Frascarelli S., et al. Distribution of exogenous [125 I]-3-iodothyronamine in mouse *in vivo*: relationship with trace amine-associated receptors // J. Endocrinol. 2012. Vol. 213, № 3. P. 223–230.
55. Chiellini G., Frascarelli S., Ghelardoni S., Carnicelli V., Tobias S.C., et al. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function // FASEB J. 2007. Vol. 21, № 7. P. 1597–1608.
56. Ferrero D.M., Wacker D., Roque M.A., Baldwin M.W., Stevens R.C., et al. Agonists for 13 Trace Amine-Associated Receptors Provide Insight into the Molecular Basis of Odor Selectivity // ACS Chem. Biol. 2012. Vol. 7, № 7. P. 1184–1189.
57. Saraiva L.R., Kondoh K., Ye X., Yoon K.H., Hernandez M., et al. Combinatorial effects of odorants on mouse behavior // Proc. Natl. Acad. Sci. 2016. Vol. 113, № 23. P. E3300–E3306.
58. Guo L., Dai W., Xu Z., Liang Q., Miller E.T., et al. Evolution of Brain-Expressed Biogenic Amine Receptors into Olfactory Trace Amine-Associated Receptors // Mol. Biol. Evol. 2022. Vol. 39, № 3.
59. Taquet N., Philippe C., Reimund J.-M., D. C. Inflammatory Bowel Disease G-Prote in Coupled Receptors (GPCRs) Expression Profiling with Microfluidic Cards // Crohn's Disease. 2012.
60. Ruiz-Hernández A., Cabrera-Becerra S., Vera-Juárez G., Hong E., Fengyang H., et al. Diabetic nephropathy produces alterations in the tissue expression profile of the orphan receptors GPR149, GPR153, GPR176, TAAR3, TAAR5 and TAAR9 in

- Wistar rats // Nucleosides Nucleic Acids. 2020. Vol. 39, № 8. P. 1150–1161.
61. Kovács T., Mikó E., Vida A., Sebő É., Toth J., et al. Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors // Sci. Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–14.
 62. Xu Z., Guo L., Qian X., Yu C., Li S., et al. Two entry tunnels in mouse TAAR9 suggest the possibility of multi-entry tunnels in olfactory receptors // Sci. Rep. 2022. Vol. 12, № 1. P. 2691.
 63. Jia L., Li S., Dai W., Guo L., Xu Z., et al. Convergent olfactory trace amine-associated receptors detect biogenic polyamines with distinct motifs via a conserved binding site // J. Biol. Chem. 2021. Vol. 297, № 5. P. 101268.
 64. Liberles S.D. Trace amine-associated receptors: Ligands, neural circuits, and behaviors // Current Opinion in Neurobiology. 2015. Vol. 34. P. 1–7.
 65. Fleischer J. Mammalian olfactory receptors // Front. Cell. Neurosci. 2009. Vol. 3, № AUG. P. 1–10.
 66. Johnson M.A., Tsai L., Roy D.S., Valenzuela D.H., Mosley C., et al. Neurons expressing trace amine-associated receptors project to discrete glomeruli and constitute an olfactory subsystem // Proc. Natl. Acad. Sci. 2012. Vol. 109, № 33. P. 13410–13415.
 67. Dewan A. Olfactory Signaling Via Trace Amine-Associated Receptors // Cell Tissue Res. 2021. Vol. 383, № 1. P. 395.
 68. Yoon K.H., Ragoczy T., Lu Z., Kondoh K., Kuang D., et al. Olfactory receptor genes expressed in distinct lineages are sequestered in different nuclear compartments // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. Vol. 112, № 18. P. E2403–E2409.
 69. Fei A., Wu W., Tan L., Tang C., Xu Z., et al. Coordination of two enhancers drives expression of olfactory trace amine-associated receptors // Nat. Commun. 2021. Vol. 12, № 1. P. 3798.
 70. Shah A., Ratkowski M., Rosa A., Feinstein P., Bozza T. Olfactory expression of trace amine-associated receptors requires cooperative cis-acting enhancers // Nat. Commun. 2021. Vol. 12, № 1.
 71. Hussain A., Saraiva L.R., Ferrero D.M., Ahuja G., Krishna V.S., et al. High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. Vol. 110, № 48. P. 19579–19584.
 72. Wettschureck N., Offermanns S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions // Physiol. Rev. 2005. Vol. 85, № 4. P. 1159–1204.
 73. Wise A., Gearing K., Rees S. Target validation of G-protein coupled receptors // Drug Discov. Today. 2002. Vol. 7, № 4. P. 235–246.
 74. Murtazina R.Z., Kuvarzin S.R., Gainetdinov R.R. TAARs and Neurodegenerative and Psychiatric Disorders // Handbook of Neurotoxicity. 2021. P. 1–18.
 75. Navarro H.A., Gilmour B.P., Lewin A.H. A Rapid Functional Assay for the Human Trace Amine–Associated Receptor 1 Based on the Mobilization of Internal Calcium // SLAS Discov. 2006. Vol. 11, № 6. P. 688–693.
 76. Decker A.M., Mathews K.M., Blough B.E., Gilmour B.P. Validation of a High-Throughput Calcium Mobilization Assay for the Human Trace Amine-Associated Receptor 1 // SLAS Discov. 2021. Vol. 26, № 1. P. 140–150.
 77. Underhill S.M., Hullihen P.D., Chen J., Fenollar-Ferrer C., Rizzo M.A., et al. Amphetamines signal through intracellular TAAR1 receptors coupled to Gα13 and GαS in discrete subcellular domains // Mol. Psychiatry. 2021. Vol. 26, № 4. P. 1208–1223.

78. Wallrabenstein I., Kuklan J., Weber L., Zborala S., Werner M., et al. Human Trace Amine-Associated Receptor TAAR5 Can Be Activated by Trimethylamine // PLoS One / ed. Matsunami H. 2013. Vol. 8, № 2. P. e54950.
79. Mühlhaus J., Dinter J., Nürnberg D., Rehders M., Depke M., et al. Analysis of Human TAAR8 and Murine Taar8b Mediated Signaling Pathways and Expression Profile // Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15, № 11. P. 20638.
80. Flegel C., Manteniotis S., Ostholt S., Hatt H., Gisselmann G. Expression Profile of Ectopic Olfactory Receptors Determined by Deep Sequencing // PLoS One / ed. Reisert J. 2013. Vol. 8, № 2. P. e55368.
81. Brady A.E., Limbird L.E. G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction // Cell. Signal. 2002. Vol. 14, № 4. P. 297–309.
82. Barak L.S., Salahpour A., Zhang X., Masri B., Sotnikova T.D., et al. Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor // Mol. Pharmacol. 2008. Vol. 74, № 3. P. 585–594.
83. Li Q. Deorphanization of Olfactory Trace Amine-Associated Receptors // Methods in Molecular Biology. 2018. Vol. 1820. P. 21–31.
84. Lu M., Echeverri F., Moyer B.D. Endoplasmic Reticulum Retention, Degradation, and Aggregation of Olfactory G-Protein Coupled Receptors // Traffic. 2003. Vol. 4, № 6. P. 416–433.
85. Saito H., Kubota M., Roberts R.W., Chi Q., Matsunami H. RTP Family Members Induce Functional Expression of Mammalian Odorant Receptors // Cell. 2004. Vol. 119, № 5. P. 679–691.
86. Zhuang H., Matsunami H. Synergism of Accessory Factors in Functional Expression of Mammalian Odorant Receptors // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 20. P. 15284–15293.
87. Miller G.M., Verrico C.D., Jassen A., Konar M., Yang H., et al. Primate trace amine receptor 1 modulation by the dopamine transporter // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. Vol. 313, № 3. P. 983–994.
88. Wainscott D.B., Little S.P., Yin T., Tu Y., Rocco V.P., et al. Pharmacologic Characterization of the Cloned Human Trace Amine-Associated Receptor1 (TAAR1) and Evidence for Species Differences with the Rat TAAR1 // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. Vol. 320, № 1. P. 475–485.
89. Stäubert C., Böselt I., Bohnekamp J., Römplер H., Enard W., et al. Structural and Functional Evolution of the Trace Amine-Associated Receptors TAAR3, TAAR4 and TAAR5 in Primates // PLoS One. 2010. Vol. 5, № 6. P. e11133.
90. Xie Z., Vallender E.J., Yu N., Kirstein S.L., Yang H., et al. Cloning, expression, and functional analysis of rhesus monkey trace amine-associated receptor 6: evidence for lack of monoaminergic association // J. Neurosci. Res. 2008. Vol. 86, № 15. P. 3435–3446.
91. Brody J.R., Kern S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis // Biotechniques. 2004. Vol. 36, № 2. P. 214–216.
92. Kalinina D.S., Ptukha M.A., Goriainova A. V., Merkulyeva N.S., Kozlova A.A., et al. Role of the trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) in the sensorimotor functions // Scientific Reports. 2021. Vol. 11, № 1. 23092 p.
93. Murtazina R.Z., Zhukov I.S., Korenkova O.M., Popova E.A., Kuvarzin S.R., et al. Genetic deletion of trace-amine associated receptor 9 (TAAR9) in rats leads to decreased blood cholesterol levels // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 6. P. 1–15.

94. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 26, № 1. P. 139–140.
95. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 11. P. 2281–2308.
96. Popova E., Krivokharchenko A., Ganten D., Bader M. Efficiency of transgenic rat production is independent of transgene-construct and overnight embryo culture // *Theriogenology*. 2004. Vol. 61, № 7–8. P. 1441–1453.
97. Truett G.E., Heeger P., Mynatt R.L., Truett A.A., Walker J.A., et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) // *Biotechniques*. 2000. Vol. 29, № 1. P. 52–54.
98. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29, № 9. P. 45e – 45.
99. Inagaki S., Iwata R., Iwamoto M., Imai T. Widespread Inhibition, Antagonism, and Synergy in Mouse Olfactory Sensory Neurons In Vivo // *Cell Rep.* 2020. Vol. 31, № 13. P. 107814.
100. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids // *Gene*. 1990. Vol. 96, № 1. P. 23–28.
101. Kachkin D. V., Khorolskaya J.I., Ivanova J.S., Rubel A.A. An efficient method for isolation of plasmid DNA for transfection of mammalian cell cultures // *Methods Protoc.* 2020. Vol. 3, № 4. P. 1–9.
102. Timenetsky J., Santos L.M., Buzinhani M., Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR // *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2006. Vol. 39, № 7. P. 907–914.
103. Vaganova A.N., Katolikova N. V., Murtazina R.Z., Kuvarzin S.R., Gainetdinov R.R. Public Transcriptomic Data Meta-Analysis Demonstrates TAAR6 Expression in the Mental Disorder-Related Brain Areas in Human and Mouse Brain // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 9. P. 1259.
104. Yang H., Wang H., Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering // *Nat. Protoc.* 2014. Vol. 9, № 8. P. 1956–1968.
105. Leonova E.I., Gainetdinov R.R. CRISPR/Cas9 technology in translational biomedicine // *Cell. Physiol. Biochem.* 2020. Vol. 54, № 3. P. 354–370.
106. Popp M.W., Maquat L.E. Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine // *Cell*. 2016. Vol. 165, № 6. P. 1319–1322.
107. Zhukov I.S., Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Alferova L.S., Ermolenko E.I., et al. Gut Microbiota Alterations in Trace Amine-Associated Receptor 9 (TAAR9) Knockout Rats // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 12. P. 1823.
108. Espinoza S., Masri B., Salahpour A., Gainetdinov R.R. BRET Approaches to Characterize Dopamine and TAAR1 Receptor Pharmacology and Signaling // *Methods in Molecular Biology*. 2013. Vol. 964, № June 2015. P. 107–122.
109. Pfleger K.D.G., Seeber R.M., Eidne K.A. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 1. P. 337–345.
110. Jiang L.I., Collins J., Davis R., Lin K.M., DeCamp D., et al. Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 14. P. 10576–10584.
111. Cooper J., Hill S.J., Alexander S.P.H. An endogenous A2B adenosine receptor

- coupled to cyclic AMP generation in human embryonic kidney (HEK 293) cells // Br. J. Pharmacol. 1997. Vol. 122, № 3. P. 546–550.
112. Lam V.M., Espinoza S., Gerasimov A.S., Gainetdinov R.R., Salahpour A. In-vivo pharmacology of Trace-Amine Associated Receptor 1 // Eur. J. Pharmacol. 2015. Vol. 763, № Pt B. P. 136–142.
113. Maggi S., Bon C., Gustincich S., Tucci V., Gainetdinov R.R., et al. Improved cognitive performance in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knock-out mice // Sci. Reports 2022 121. 2022. Vol. 12, № 1. P. 1–12.
114. Scanlan T.S., Suchland K.L., Hart M.E., Chiellini G., Huang Y., et al. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone // Nat. Med. 2004. Vol. 10, № 6. P. 638–642.
115. Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Shemyakova T.S., Prjibelski A.D., Katolikova N.V., et al. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets Analysis // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 16. P. 8802.
116. Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2011. Vol. 301, № 5. P. R1207–R1228.
117. Oh S.J. System-Wide Expression and Function of Olfactory Receptors in Mammals // Genomics Inform. 2018. Vol. 16, № 1. P. 2–9.
118. Spehr M., Gisselmann G., Poplawski A., Riffell J.A., Wetzel C.H., et al. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis // Science (80-.). 2003. Vol. 299, № 5615. P. 2054–2058.
119. Lee S.J., Depoortere I., Hatt H. Therapeutic potential of ectopic olfactory and taste receptors // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. Vol. 18, № 2. P. 116–138.
120. Feldmesser E., Olender T., Khen M., Yanai I., Ophir R., et al. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes // BMC Genomics. 2006. Vol. 7. P. 121.
121. Zhang S., Li L., Li H. Role of ectopic olfactory receptors in glucose and lipid metabolism // Br. J. Pharmacol. 2021. Vol. 178, № 24. P. 4792–4807.
122. Garcia-Esparcia P., Schlüter A., Carmona M., Moreno J., Ansoleaga B., et al. Functional genomics reveals dysregulation of cortical olfactory receptors in parkinson disease: Novel putative chemoreceptors in the human brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2013. Vol. 72, № 6. P. 524–539.
123. Zhang J., Pacifico R., Cawley D., Feinstein P., Bozza T. Ultrasensitive detection of amines by a trace amine-associated receptor // J. Neurosci. 2013. Vol. 33, № 7. P. 3228–3239.
124. Pinel J.P.J., Gorzalka B.B., Ladak F. Cadaverine and putrescine initiate the burial of dead conspecifics by rats // Physiol. Behav. 1981. Vol. 27, № 5. P. 819–824.
125. Montoya C.P., Sutherland R.J., Whishaw I.Q. Cadaverine and burying in the laboratory rat // Bull. Psychon. Soc. 1981. Vol. 18, № 3. P. 118–120.
126. Gonçalves I., Hubbard P.C., Tomás J., Quintela T., Tavares G., et al. ‘Smelling’ the cerebrospinal fluid: olfactory signaling molecules are expressed in and mediate chemosensory signaling from the choroid plexus // FEBS J. 2016. Vol. 283, № 9. P. 1748–1766.
127. Almeida-Santos D., Duarte A.C., Gonçalves I., Ferreira C.L., Ferrer I., et al. Cadaverine and Spermine Elicit Ca²⁺ Uptake in Human CP Cells via a Trace Amine-Associated Receptor 1 Dependent Pathway // J. Mol. Neurosci. 2021. Vol. 71, № 3. P. 625–637.
128. Jaubert A., Drutel G., Leste-Lasserre T., Ichas F., Bresson-Bepoldin L. Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression in lactotrophs from postlactating rats: Involvement in dopamine-induced apoptosis // Endocrinology. 2007. Vol.

- 148, № 6. P. 2698–2707.
- 129. Li X., Yu J., Wu Y., Li B. Effect on the dopaminergic metabolism induced by oral exposure to simazine during the prepubertal period in rats // Int. J. Mol. Med. 2018. Vol. 41, № 1. P. 421–429.
 - 130. Qian Z., Lin Y., Xing J., Qiu Y., Ren L. Expression and functions of glutamate and γ -aminobutyric acid transporters in ischemic models. // Mol. Med. Rep. 2018. Vol. 17, № 6. P. 8196–8202.
 - 131. Krawczyk M., Mason X., Debacker J., Sharma R., Normandea C.P., et al. D1 Dopamine Receptor-Mediated LTP at GABA Synapses Encodes Motivation to Self-Administer Cocaine in Rats. 2013. Vol. 33, № 29. P. 11960–11971.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-ОИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота
 28S – 28S рРНК
 Ache – ацетилхолинстераза
 BDNF – нейротрофический фактор мозга
 BRET – биолюминесцентный резонансный перенос энергии
 CDNF – дофаминовый нейротрофический фактор мозга
 COMT – катехол-О-метилтрансфераза
 D1R – дофаминовый рецептор D1
 D2R – дофаминовый рецептор D2
 DAT – дофаминовый транспортер
 DHBA – дигидроксибензойная кислота
 EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) – белок, активируемый цАМФ
 GAT1 – ГАМК транспортер 1 типа
 GDNF – глиальный нейротрофический фактор
 GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком
 HPRT – гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза
 MAO (monoamine oxidase) – моноаминоксидаза
 MAO-A – моноаминоксидаза А
 MAO-B – моноаминоксидаза В
 NMDAR1 – глутаматный рецептор 1
 RTP1S – белок-транспортер рецепторов, short
 SEM – стандартная ошибка среднего
 TAAR2-KO (TAAR2 knockout) – нокаут по гену TAAR2
 TAAR5-KO (TAAR5 knockout) – нокаут по гену TAAR5
 TAAR9-KO (TAAR9 knockout) – нокаут по гену TAAR9
 TAARs (trace amine-associated receptors) – рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами
 TH – тирозин гидроксилаза
 TPH2 – триптофан гидроксилаза 2 типа
 VTA – вентральная область покрышки
 WT (wild type) – дикий тип
 ГВК – гомованиловая кислота
 ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота
 ОР – обонятельный рецептор
 ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
 СА – следовые амины
 цАМФ – циклический аденоzinмонофосфат

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Наборы транскриптомных данных GEO человека, соответствующие критериям включения, и включенные в анализ.

Номер GEO	Название статьи	Структура	n ¹
GSE110716	RNA-seq of brain tissue from Parkinson's disease patients [coding exome RNA-seq]	Cingulate gyrus	8
GSE122649	Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia	Motor cortex	6
		Frontal cortex	5
		Parietal cortex	5
GSE123496	Human brain tissues from healthy controls and multiple sclerosis patients	Hippocampus	5
		Corpus callosum	5
		Internal capsule	5
GSE135036	Hemispheric asymmetry in the human brain and in Parkinson's disease is linked to divergent epigenetic patterns in neurons	Prefrontal cortex	5
GSE135838	Transcriptomic Profiles of Sepsis in the Human Brain	Parietal cortex	5
GSE138614	Next-generation sequencing study in multiple sclerosis white matter brain lesions	White matter	25
GSE160521	Diurnal rhythms across the human dorsal and ventral striatum	Nucleus accumbens	59
		Nucleus caudatus	59
		Putamen	59
GSE53239	RNA-sequencing of the brain transcriptome implicates dysregulation of neuroplasticity, circadian rhythms, and GTPase binding in bipolar disorder	Dorsolateral prefrontal cortex	11
GSE53697	RNAseq in Alzheimer's Disease patients	Prefrontal cortex	8
GSE57152	Alternative poly(A) in Alzheimer's disease	medial temporalis gyrus	8
GSE68719	mRNA-Seq expression and MS3 proteomics profiling of human post-mortem BA9 brain tissue for Parkinson Disease and neurologically normal individuals	Prefrontal cortex	73
GSE79666	Transcriptome sequencing reveals aberrant alternative splicing in Huntington's disease	Motor cortex	7
		Nucleus accumbens	22
GSE80655	RNA-sequencing of human post-mortem brain tissues	Dorsolateral prefrontal cortex	24
		Anterior cingulate cortex	24

¹ n- количество образцов от контрольных субъектов, включенных в мета-анализ.

Приложение 2. Наборы транскриптомных данных GEO мыши, соответствующие критериям включения, и включенные в анализ.

Номер GEO	Название статьи	Структура	n ¹
GSE107183	RNA changes in hippocampus of transgenic murine model of tauopathy (rTg4510 mice) compared to controls at asymptomatic stage (2 months) of neurodegeneration as determined by mRNA deep sequencing.	Hippocampus	6
GSE112575	Frontal cortex transcriptomic analysis of a TDP-43 Q331K knock-in mouse [20month]	Frontal cortex	8
GSE116752	Striatal transcriptome of a mouse model of ADHD reveals a pattern of synaptic remodeling	Striatum	5
GSE126814	Quantitative Analysis of Wild Type and Neat1 -/- Cerebral Frontal Cortex Transcriptomes	Frontal cortex	5
GSE130254	Expression profiling by high throughput sequencing	Cerebellum Nucleus accumbens Prefrontal cortex	48 47 48
GSE136869	Transcriptome analysis using RNA sequencing of the hippocampus of aged LPAR2-/- versus wildtype control mice	Hippocampus	7
GSE147842	Adult mouse hippocampal transcriptome changes associated with long-term behavioral and metabolic effects of gestational air pollution toxicity	Hippocampus	5
GSE148075	Wild mice with different social network sizes vary in brain gene expression	Frontal cortex Hippocampus Hypothalamus	29 29 28
GSE166831	Altered hippocampal transcriptome dynamics following sleep deprivation	Hippocampus	9
GSE79666	Transcriptome sequencing reveals aberrant alternative splicing in Huntington's disease	BA4	7
GSE170997	Transcriptomics data of blood and brain from the YAC128 Huntington's disease mouse model [brain]	Brainstem Cerebellum Cortex Striatum	8 8 8 8
GSE64452	RNA-SEQ profiling of dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area regions of the mouse mid-brain	dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons from the ventral tegmental area	6
GSE84503	Activity-Dependent Regulation of Alternative Cleavage and Polyadenylation (APA) During Hippocampal Long-Term Potentiation (LTP) [RNA-Seq]	Hippocampus	6
GSE94559	Hippocampus CA1 pyramidal cells Transcriptomic profile in WT and Fmr1 KO mice, using Wfs1-CreERT2:RiboTag:Fmr1 knockout and wildtype mice	Hippocampus	6
GSE99353	Frontal cortex transcriptomic analysis of a TDP-43 Q331K knock-in mouse [5month]	Frontal cortex	6
GSE130376	Next-generation sequencing of cholinergic interneurons in the nucleus accumbens of cocaine-addicted and non-addicted mice	cholinergic interneurons in the nucleus accumbens	9
GSE121199	Biology and Bias in Cell Type-Specific RNAseq of Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons	Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons (D1) Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons (D2)	9 7

GSE146628	Identification of Natural Antisense Transcripts in Mouse Brain and Their Association with Autism Spectrum Disorder Risk Genes	Prefrontal cortex	5
		Striatum	5

¹ n- количество образцов от животных дикого типа или контрольной группы,
включенных в мета-анализ.

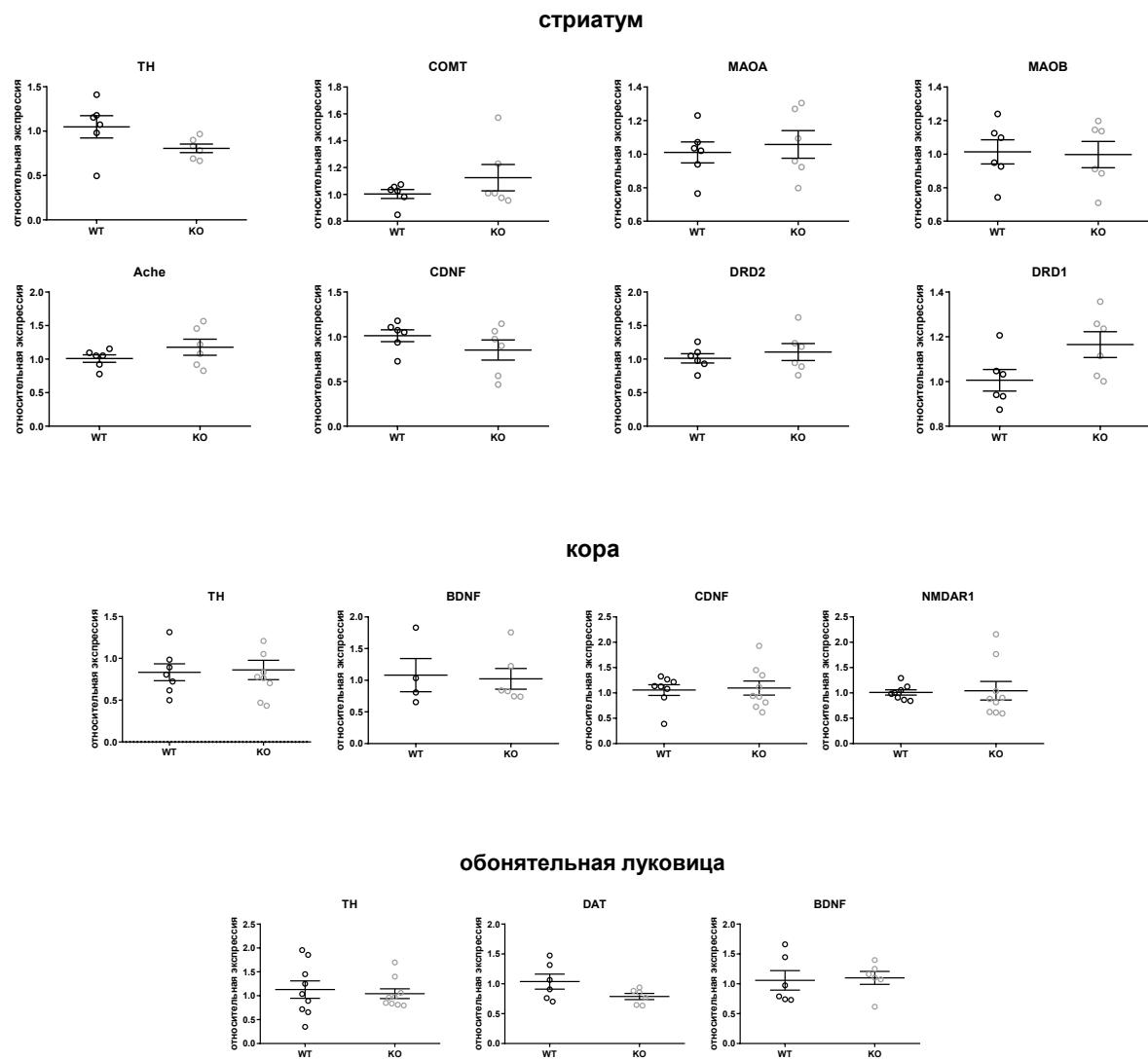
Приложение 3. Последовательности праймеров для оценки сравнительной экспрессии.

Ген	Сокращение -нное название	Название праймера	Последовательность 5'-3'	Размер продукта , п.н.
Тирозин гидроксилаза	TH	rTH F	CCTTCCAGTACAAGCACGGT	109
		rTH R	TGGGTAGCATAGAGGCCCTT	
Дофаминовый транспортер	DAT [128]	rDAT F	AGACACCAGTGGAGGCTCAAGA	71
		rDAT R	GCCGATGACTGATAGCAGGAA	
Катехол-О- метилтрансфераза	COMT	rCOMT F	GCCTTAGGCGGTTAGGGCT	93
		rCOMT R	AGCCAACGGCATCTCCTCAA	
Моноаминоксидаза А	MAOA [129]	rMAOA F	TTCGCCAGCCAGTAGGTAGGAT	116
		rMAOA R	ATTCAACACCTCTAGCTGCTCG	
Моноаминоксидаза В	MAOB	rMAOB F	ATCTGTGGATGTCCCAGCAAG	137
		rMAOB R	TTTTGTGGGCCAGGAAACCA	
Триптофан гидроксилаза 2 типа	TPH2	rTPH2_fw 1	CCTTGCAAGCAAGAACGGTC	154
		rTPH2_rev 1	TTGGAAGGTGGTATTAGGC	
ГАМК транспортер 1 типа	GAT1 [130]	rGAT1 F	GCAATGCCGTGAACCTCTTC	168
		rGAT1 R	AGGAAATGGAGACACACTCAAAG A	
Ацетилхолинстераза	Ache	rAche F	ACGTGAGCCTGAACCTGAAG	116
		rAche R	CTCGTCCAGCGTGTCTGTG	
Нейротрофический фактор мозга	BDNF	rBDNF F	TACCTGGATGCCGAAACAT	104
		rBDNF R	GCTGTGACCCACTCGCTAAT	
Дофаминовый нейротрофический фактор мозга	CDNF	rCDNF F	AGAAAAACGCCCTGTGCTATT	103
		rCDNF R	CTTCACCGTGGCATGTGTA	
Глиальный нейротрофический фактор	GDNF	rGDNF 2F	GAAGACCACTCCCTCGGC	79
		rGDNF 2R	GGTCAGGATAATCTCGGGCA	
Глутаматный рецептор 1	NMDAR 1	NMDAR1 F	ATGCACCTGCTGACATTG	142
		NMDAR1 R	TATTGGCCTGGTTACTGCCT	
Дофаминовый рецептор D1	DRD1 [131]	rD1R F	CGCGTAGACTCTGAGATTCTGAAT T	77
		rD1R R	GAGTTAAGGAGGCCACACATCAG T	

Дофаминовый рецептор D2	D2R	rDRD2 F	TGCCCTTCATCGTCACTCTG	138
		rDRD2 R	GGGTACAGTTGCCCTTGAGT	
Гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза 28S pPHK	HPRT	ratHPRT-RT F	CTCATGGACTGATTATGGACAGG AC	123
		ratHPRT-RT R	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAG CC	
	28S	rat28S_F	GCAAGGTGTTCTTCACCACAAA	79
		rat28S_R	CAGTTCTTACGGCGTCTGTGAT	

Источники указаны для последовательностей праймеров, взятых из ранее опубликованных работ

Приложение 4. Сравнительная экспрессия генов ферментов, участвующих в метаболизме нейромедиаторов (TH, COMT, MAO-A, MAO-B, TPH2, Ache), нейрональных рецепторов (D1DR, D2DR, NMDAR1), нейротрофинов (BDNF, CDNF) и транспортеров (DAT, GAT1) в стриатуме, фронтальной коре и обонятельной луковице животных TAAR9-KO-delC после обратного скрещивания и дикого типа WT. Данные представлены как среднее±SEM



Приложение 5. Вещества, использованные для скрининга TAAR9.

N	ВЕЩЕСТВО	ПР-ЛЬ	ДЕЙСТВИЕ	СЕЛЕКТИВНОСТЬ
1	Dexmedetomidine hydrochloride	Sigma	Sedatives	
2	Putrescine dihydrochloride	Sigma	Trace amine	
3	Cadaverine	Sigma	Trace amine	
4	N,N-Methylpiperidine	Sigma	TAAR agonist	TAAR9
5	8-OH-DPAT	Sigma	5-HT1A receptor agonist	
6	Haloperidol	Sigma	Antipsychotic	
7	Deprenyl hydrochloride/Selegiline	Sigma	MAO-B inhibitor	
8	Tyramine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
9	β -phenylethylamine	Sigma	Trace amine	
10	Isoniazid	Sigma	Antibiotic	
11	Phenylpiracetam	Sigma	Nootropic	
12	RO5263397H	Roche	TAAR1 agonist	TAAR1
13	Mefloquine hydrochloride	Sigma	Antimalarial	
14	5-Hydroxy-L-tryptophan	Sigma	Amino acid	
15	2-Bromo-alpha-ergocryptine methanesulfonate salt	Sigma	D2, D3 agonist	
16	N-methyl-1-phenylethanamine	Sigma	Natural product found in Vachellia rigidula	
17	Dimethylbutylamine	Sigma	Amine	
18	Acetyl-L-Carnitine	NOW	Dietary supplement	
19	Carnitine	NOW	Involved in metabolism	
20	LK00281	лаб. Красавина*	Synthesized as TAAR1 agonist	
21	LK00445	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	
22	LK00386	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	
23	LK00764	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	TAAR1
24	LK00760	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	
25	LK00761	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	
26	LK00334	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	
27	LK00725	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	
28	LK00424	лаб. Красавина	Synthesized as TAAR1 agonist	
29	Cis-3-hexenol	Sigma	Odorant	
30	Isocyclocitral	Sigma	Odorant	
31	Linalool	Sigma	Odorant	
32	Myrcene	Sigma	Odorant	
33	Borneol	Sigma	Odorant	
34	D-limonene	Sigma	Odorant	
35	Ambrinol 10% DPG (propyleneglycol)	Sigma	Odorant	

36	Trimofix 50%	Sigma	Odorant	
37	Timberol	Sigma	Odorant	
38	Citronellal	Sigma	Odorant	
39	Alpha-pinene	Sigma	Odorant	
40	Timbersilk	Sigma	Odorant	
41	Iso E super	Sigma	Odorant	
42	Monoethanolamine	Sigma	Odorant	
43	Bourgeonal 50%	Sigma	Odorant	
44	2,3,5-trimethylpyrazine	Sigma	Odorant	
45	2,6-dimethylpyrazine	Sigma	Odorant	
46	Eukalyptol	Sigma	Odorant	
47	Trimethylamine hydrochloride	Sigma	TAAR5 agonist	TAAR5
48	Metformin hydrochloride	Sigma	Antidiabetic	
49	Tryptamine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
50	Synephrine	Sigma	Trace amine	
51	3-Methoxytyramine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
52	DL-Normetanephrine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
53	3-Hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride	Sigma	L-AADC inhibitor	L-AADC
54	Phenibut	Sigma	GABA receptor agonist	GABA
55	Dopamine hydrochloride	Sigma	Neurotransmitter	DA
56	Serotonin hydrochloride	Sigma	Neurotransmitter	5-HT
57	Epinephrine bitartrate salt	Fluka	Neurotransmitter	
58	α NETA	Sigma	TAAR5 agonist	TAAR5
59	Isopentylamine	Sigma	TAAR agonist	
60	2,5-lutidine (2,5-Dimethylpyridine)	Sigma	Pheromone	
61	2,3-dimethyl pyrazine	Sigma	Pheromone	
62	2,5-dimethyl pyrazine	Sigma	Pheromone	
63	2,5-pyrazinedicarboxylic acid dihydrate	Sigma	Pheromone	
64	5-methyl,2-pyrazine carboxylic acid	Sigma	Pheromone	
65	Farnesene, mixture of isomers	Sigma	Pheromone	
66	DMAA (Methylhexanamine)	NOW		
67	DMHA (Dimethylhexylamine)	NOW		
68	Agmatine sulfate salt	Sigma	Trace amine	
69	SU 4312	Sigma	Inhibitor	KDR
70	SR 59230A oxalate	Sigma	Antagonist	beta3
71	rac BHFF	Sigma	modulator	GABA-B
72	Zofenopril calcium	Sigma	Inhibitor	ACE
73	SIB 1757	Sigma	Antagonist	mGluR5
74	SIB 1893	Sigma	Antagonist	mGluR5
75	Danshensu sodium salt	Sigma	Cardioprotectant	
76	Ketanserin tartrate	Sigma	Antagonist	5-HT2
77	1-(2-Methoxyphenyl)piperazine hydrochloride	Sigma	Agonist	5-HT1 > 5-HT2
78	PAPP	Sigma	Agonist	5-HT1A

79	Dolasetron mesylate hydrate	Sigma	Antagonist	5-HT3
80	SR-95531	Sigma	Antagonist	GABA-A
81	(±)-6-Chloro-PB hydrobromide	Sigma	Agonist	D1
82	L-Beta-threo-benzyl-aspartate	Sigma	Antagonist	EAAT3
83	Suramin sodium salt	Sigma	Antagonist	P2X, P2Y
84	SQ 22536	Sigma	Inhibitor	Adenylyl cyclase
85	Sepiapterin	Sigma	Cofactor	NOS
86	Amisulpride	Sigma	Antagonist	D2/D3
87	(±)-SKF 38393, N-allyl-, hydrobromide	Sigma	Agonist	D1
88	SDZ-205,557 hydrochloride	Sigma	Antagonist	5-HT4
89	SB 206553 hydrochloride	Sigma	Antagonist	5-HT2C/5-HT2B
90	Granisetron hydrochloride	Sigma	Antagonist	5-HT3
91	L-Tryptophan	Sigma	Precursor	
92	Tranilast	Sigma	Inhibitor	LTC4
93	Tiapride hydrochloride	Sigma	Antagonist	D2/D3
94	Taurine	Sigma	Agonist	
95	FAUC 213	Sigma	Antagonist	D4
96	Tolbutamide	Sigma	Releaser	Insulin
97	Tetraethylthiuram disulfide	Sigma	Inhibitor	Alcohol Dehydrogenase
98	TCPOBOP	Sigma	Agonist	CAR
99	Tetraisopropyl pyrophosphoramido	Sigma	Inhibitor	Butyrylcholinesterase
100	Tetramisole hydrochloride	Sigma	Inhibitor	Phosphatase
101	Trihexyphenidyl hydrochloride	Sigma	Antagonist	Muscarinic
102	Theophylline	Sigma	Antagonist	A1 > A2
103	(E)-4-amino-2-butenoic acid	Sigma	Agonist	GABA-C
104	Tetradecylthioacetic acid	Sigma	Agonist	PPAR-alpha
105	Abiraterone acetate	Sigma	Inhibitor	CYP17A1
106	Tyrphostin AG 879	Sigma	Inhibitor	TrkA
107	Tetraethylammonium chloride	Sigma	Antagonist	Nicotinic
108	Tolazamide	Sigma	Releaser	Insulin
109	Terbutaline hemisulfate	Sigma	Agonist	beta
110	4-Hydroxyphenethylamine hydrochloride	Sigma	Agonist	
111	Triflupromazine hydrochloride	Sigma	Antagonist	D2
112	Trimipramine maleate	Sigma	Inhibitor	Reuptake
113	Oltipraz metabolite M2	Sigma	Inhibitor	LXRa
114	TTNPB	Sigma	Ligand	RAR-alpha, beta, gamma
115	Lubeluzole dihydrochloride	Sigma	Antagonist	NMDA
116	Triamterene	Sigma	Blocker	
117	DL-alpha-Methyl-p-tyrosine	Sigma	Inhibitor	Tyrosine hydroxylase
118	6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-9H-pyrido[3,4b] indole	Sigma	Inhibitor	MAO
119	Acetamide	Sigma	Inhibitor	Carbonic anhydrase
120	Amantadine hydrochloride	Sigma	Releaser	

121	GABA	Sigma	Agonist	
122	Gabaculine hydrochloride	Sigma	Inhibitor	GABA transaminase
123	O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride	Sigma	Inhibitor	Aminotransferase
124	Ezatiostat	Sigma	Inhibitor	GSTP1-1
125	N-Acetylprocainamide hydrochloride	Sigma	Blocker	
126	Actinonin	Sigma	Inhibitor	Leucine aminopeptidase
127	N-Phenylanthranilic acid	Sigma	Blocker	
128	GSK-650394	Sigma	Antagonist	SGK1
129	Eptifibatide acetate	Sigma	Inhibitor	GPIIb/IIIa
130	Aminophylline ethylenediamine	Sigma	Antagonist	A1/A2
131	3'-Azido-3'-deoxythymidine	Sigma	Inhibitor	Reverse transcriptase
132	YM 976	Sigma	Inhibitor	PDE 4
133	5-(N,N-Dimethyl)amiloride hydrochloride	Sigma	Blocker	Na+/H+ Antiporter
134	(±)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid	Sigma	Antagonist	NMDA
135	Sodium Taurocholate hydrate	Sigma	Modulator	Conjugate Pathway
136	Tienilic acid	Sigma	Inhibitor	P450
137	Atreleuton	Sigma	Inhibitor	5-lipoxygenase
138	TMB-8 hydrochloride	Sigma	Antagonist	
139	L-azetidine-2-carboxylic acid	Sigma	Inhibitor	Collagen
140	GNF-5	Sigma	Inhibitor	BRC-Abl
141	Acetyl-beta-methylcholine chloride	Sigma	Agonist	M1
142	KY-05009	Sigma	Inhibitor	TNIK
143	Azathioprine	Sigma	Inhibitor	Purine synthesis
144	L-732,138	Sigma	Antagonist	NK1 > NK2, NK3
145	Amifostine	Sigma	Inhibitor	Cytoprotectant
146	Atropine methyl bromide	Sigma	Antagonist	Muscarinic
147	5-Aminovaleric acid hydrochloride	Sigma	Antagonist	GABA-B
148	4-Aminopyridine	Sigma	Blocker	A-type
149	p-Aminoclonidine hydrochloride	Sigma	Agonist	alpha2
150	Aminopterin	Sigma	Inhibitor	Dihydrofolate reductase
151	5-azacytidine	Sigma	Inhibitor	DNA methyltransferase
152	9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride	Sigma	Inhibitor	Cholinesterase
153	Acyclovir	Sigma	Inhibitor	Viral DNA synthesis
154	Acetylsalicylic acid	Sigma	Inhibitor	COX-3 > COX-1 > COX-2
155	Acetazolamide	Sigma	Inhibitor	Carbonic anhydrase
156	Indinavir sulfate salt hydrate	Sigma	inhibitor	HIV
157	(±)-Nipecotic acid	Sigma	Inhibitor	Uptake
158	Atropine sulfate	Sigma	Antagonist	Muscarinic
159	Salirasib	Sigma	Inhibitor	RAS
160	N-Acetyl-5-hydroxytryptamine	Sigma	Precursor	
161	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride	Sigma	Blocker	Na+/H+ Antiporter

162	10058-F4	Sigma	Inhibitor	c-Myc
163	Rivastigmine tartrate	Sigma	Inhibitor	cholinesterase
164	Aconitine	Sigma	Blocker	Na+/H+ Antiporter
165	Arecoline hydrobromide	Sigma	Agonist	
166	Aminoguanidine hemisulfate	Sigma	Inhibitor	NOS
167	Azelaic acid	Sigma	Inhibitor	
168	Atropine methyl nitrate	Sigma	Antagonist	Muscarinic
169	(±)-Norepinephrine (+)bitartrate	Sigma	Agonist	
170	Aurintricarboxylic acid	Sigma	Inhibitor	TopoII
171	3-Aminopropionitrile fumarate	Sigma	Substrate	CYP450
172	1-Aminobenzotriazole	Sigma	Inhibitor	CYP450, chloroperoxidase
173	Sandoz 58-035	Sigma	Inhibitor	ACAT
174	Acetylthiocholine chloride	Sigma	Agonist	Nicotinic
175	SirReal2	Sigma	Inhibitor	Sirt2
176	Tryptamine hydrochloride	Sigma	Ligand	
177	Arcaine sulfate	Sigma	Antagonist	NMDA-Polyamine
178	4-Amino-1,8-naphthalimide	Sigma	Inhibitor	PARP
179	(±)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid	Sigma	Antagonist	NMDA
180	Apigenin	Sigma	Inhibitor	
181	UNC0379 trifluoroacetate salt	Sigma	Inhibitor	SETD8
182	(±)-2-Amino-3-phosphonopropionic acid	Sigma	Antagonist	NMDA
183	TNP	Sigma	Inhibitor	IP3K
184	Arbidol hydrochloride	Sigma	Inhibitor	
185	4-Aminobenzamidine dihydrochloride	Sigma	Inhibitor	Trypsin
186	5-Fluoroindole-2-carboxylic acid	Sigma	Antagonist	NMDA-Glycine
187	1-Aminocyclopropanecarboxylic acid hydrochloride	Sigma	Agonist	NMDA-Glycine
188	Reserpine	Sigma	Inhibitor	Uptake
189	MCC-555	Sigma	Inhibitor	
190	(+)-Butaclamol hydrochloride	Sigma	Antagonist	
191	Apomorphine hydrochloride hemihydrate	Sigma	Agonist	
192	L-Arginine	Sigma	Precursor	
193	2-(2-Aminoethyl)isothiourea dihydrobromide	Sigma	Inhibitor	NOS
194	Kyotorphin acetate salt	Sigma		
195	3-Aminopropylphosphonic acid	Sigma	Agonist	GABA-B
196	AubipyOMe	Sigma	Phosphorylation	TRAP/ACP5
197	Cyclosporin A	Sigma	Phosphorylation	Calcineurin phosphatase
198	Carbachol	Sigma	Cholinergic	
199	Cephalexin hydrate	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
200	Roscovitine	Sigma	Phosphorylation	CDK
201	Cyproheptadine hydrochloride	Sigma	Serotonergics	5-HT2
202	3-Morpholinosydnonimine hydrochloride	Sigma	Nitric Oxide	

203	Cantharidin	Sigma	Phosphorylation	PP2A
204	Chlorpromazine hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	
205	Centrophenoxine hydrochloride	Sigma	Nootropic	
206	Tirapazamine	Sigma	Apoptosis	
207	D-Cycloserine	Sigma	Glutamatergics	NMDA-Glycine
208	Chlorzoxazone	Sigma	Nitric Oxide	iNOS
209	Chlorothiazide	Sigma	Biochemistry	Carbonic anhydrase
210	SB 204741	Sigma	Serotonergics	5-HT2B
211	GR 79236X	Sigma	Adenosine	A1
212	Cefaclor	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
213	Citalopram hydrobromide	Sigma	Serotonergics	Reuptake
214	Cefsulodin sodium salt hydrate	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
215	Clemastine fumarate	Sigma	Histaminergics	H1
216	(±)-Chlorpheniramine maleate	Sigma	Histaminergics	H1
217	8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP sodium	Sigma	Cyclic Nucleotides	
218	L-Cysteinesulfinic Acid	Sigma	Glutamatergics	
219	(+)-Chlorpheniramine maleate	Sigma	Histaminergics	H1
220	Ceftriaxone sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
221	Cefmetazole sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
222	DL-Cycloserine	Sigma	Sphingolipid	Ketosphinganine synthase, Alanine aminotransferase
223	Clonidine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2
224	Caffeic acid phenethyl ester	Sigma	Cell Cycle	NFkB
225	Lumefantrine	Sigma	Immunomodulators and Antibiotics	
226	Cortisone 21-acetate	Sigma	Hormone	Cortisol
227	Calmidazolium chloride	Sigma	Intracellular Calcium	Ca2+ATPase
228	9-cyclopentyladenine	Sigma	Cyclic Nucleotides	Adenylate cyclase
229	Cefazolin sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
230	L-798106	Sigma	Lipids	EP3
231	Clozapine	Sigma	Dopaminergics	D4 > D2,D3
232	McN-A-343	Sigma	Cholinergic	M1
233	Cefotaxime sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
234	Imipenem monohydrate	Sigma	Antibiotic	
235	Pyrocatechol	Sigma	Cell Cycle	
236	Cephalosporin C zinc salt	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
237	GR 113808	Sigma	Serotonergics	5-HT4
238	Cephalothin sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
239	Clemizole hydrochloride	Sigma	Histaminergics	H1
240	(-)-Cotinine	Sigma	Cholinergic	Nicotinic
241	(±)-p-Chlorophenylalanine	Sigma	Neurotransmission	Tryptophan hydroxylase
242	Canrenone	Sigma	Cell Signaling	
243	Cilostamide	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE III
244	Cephradine	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis

245	ML277	Sigma	Ion Channels	KCNQ1 > KCNQ2, KCNQ4
246	Nestorone	Sigma	Lipid Signaling	Progesterone receptor
247	Carbamazepine	Sigma	Anticonvulsant	
248	Cimetidine	Sigma	Histaminergics	H2
249	2-Chloroadenosine	Sigma	Adenosine	A1 > A2
250	DMH4	Sigma	Kinase/Phosphotase	VEGF
251	Chloroquine diphosphate	Sigma	DNA	DNA
252	Cystamine dihydrochloride	Sigma	Glutamatergics	Transglutaminase
253	Chelidamic acid	Sigma	Glutamatergics	L-glutamic decarboxylase
254	Artemether	Sigma	Immunomodulators and Antib	
255	Argatroban monohydrate	Sigma	Cell signaling	Thrombin
256	Cyproterone acetate	Sigma	Hormone	Androgen
257	Captopril	Sigma	Neurotransmission	ACE
258	Cyclobenzaprine hydrochloride	Sigma	Serotonergics	5-HT2
259	Bethanechol chloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
260	Cinepazide maleate	Sigma	Ca2+ Channel	A2
261	Clofibrate	Sigma	Lipid	Lipoprotein lipase
262	Clomipramine hydrochloride	Sigma	Serotonergics	Reuptake
263	1G244	Sigma	Protease	DPP8/DPP9
264	Cinoxacin	Sigma	Antibiotic	
265	Colchicine	Sigma	Cytoskeleton and ECM	Tubulin
266	DL-p-Chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride	Sigma	Neurotransmission	Tryptophan hydroxylase
267	CNS-1102	Sigma	Glutamatergics	NMDA
268	AR-R17779 Hydrochloride	Sigma	Cholinergic	alpha7 nACh
269	Cinnarizine	Sigma	Ca2+ Channel	
270	Clotrimazole	Sigma	K+ Channel	Ca2+-activated K+ channel
271	Cytosine-1-beta-D-arabinofuranoside hydrochloride	Sigma	DNA Metabolism	
272	Calcimycin	Sigma	Intracellular Calcium	Ca2+
273	SJ000291942	Sigma	Cytokines	BMP
274	Droxinostat	Sigma	Gene Regulation	HDAC3, HDAC6, and HDAC8
275	L-Canavanine sulfate	Sigma	Nitric Oxide	iNOS
276	Nitrendipine	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
277	SDZ 220-581 hydrochloride	Sigma	Neurotransmission	NMDA
278	Lamotrigine isethionate	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	
279	Orphenadrine hydrochloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
280	(±)-Octoclohepin maleate	Sigma	Dopaminergics	D2
281	O-Phospho-L-serine	Sigma	Glutamatergics	NMDA
282	Pancuronium bromide	Sigma	Cholinergic	
283	CID 11210285 hydrochloride	Sigma	Gene Regulation	Wnt
284	Valproic acid sodium	Sigma	Anticonvulsant	
285	Pyrilamine maleate	Sigma	Histaminergics	H1

286	Nimodipine	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
287	NS-1619	Sigma	K+ Channel	Ca2+ activated
288	Oleic Acid	Sigma	Phosphorylation	PKC
289	AZ191	Sigma	Cell Cycle	DYRK1B
290	Progesterone	Sigma	Hormone	Progesterone
291	(±)-Propranolol hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	beta
292	3-alpha,21-Dihydroxy-5-alpha-pregnan-20-one	Sigma	GABAergics	GABA-A
293	1-Phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea	Sigma	Dopaminergics	beta-Hydroxylase
294	Promethazine hydrochloride	Sigma	Histaminergics	H1
295	Piroxicam	Sigma	Prostaglandin	COX
296	Nisoxetine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	Reuptake
297	HA155	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	autotaxin
298	Oxymetazoline hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2A
299	Ofloxacin	Sigma	Antibiotic	DNA Synthesis
300	Topotecan hydrochloride hydrate	Sigma	Apoptosis	topoisomerase I
301	SKF-525A hydrochloride	Sigma	Multi-Drug Resistance	Microsomal oxidation
302	Pirfenidone	Sigma	Immune System	
303	Mitiglinide calcium	Sigma	Ion channels	KATP
304	Praziquantel	Sigma	Antibiotic	Ca2+ Ionophore
305	Atglistatin	Sigma	Lipids	ATGL
306	Nyldrin hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	beta
307	NBQX disodium	Sigma	Glutamatergics	AMPA/kainate
308	Sodium Oxamate	Sigma	Biochemistry	Lactate Dehydrogenase
309	Oxotremorine sesquifumarate salt	Sigma	Cholinergic	M2
310	Piceatannol	Sigma	Phosphorylation	Syk / Lck
311	Picrotoxin	Sigma	GABAergics	GABA-C
312	1,3-Dimethyl-8-phenylxanthine	Sigma	Adenosine	A1
313	Cisplatin	Sigma	DNA	
314	Propafenone hydrochloride	Sigma	K+ Channel	hKv1.5
315	Phenylephrine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha1
316	JW55	Sigma	Gene Regulation	TNKS1/2
317	NSC405020	Sigma	Extracellular Matrix	MT1-MMP
318	Oxybutynin Chloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
319	SC-514	Sigma	Phosphorylation	IKK-2
320	Pentamidine isethionate	Sigma	Glutamatergics	NMDA
321	LP44	Sigma	Serotonergics	5-HT7
322	PRE-084	Sigma	Opioid	sigma1
323	Podophyllotoxin	Sigma	Cytoskeleton and ECM	
324	CPCCOEt	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	mGluR1
325	Perphenazine	Sigma	Dopaminergics	D2
326	Terutroban	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	TPr
327	(±)-Octopamine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha

328	Oxiracetam	Sigma	Nootropic	
329	SB 216763	Sigma	Phosphorylation	GSK-3
330	Pemetrexed disodium heptahydrate	Sigma	Apoptosis	
331	Pentoxifylline	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE
332	NAV-2729	Sigma	G protein	ARF6
333	LDN-27219	Sigma	Neurobiology	TG2
334	PNU-282987	Sigma	Cholinergic	Nicotinic alpha7
335	Pentylenetetrazole	Sigma	Neurotransmission	CNS
336	Naftopidil dihydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha1
337	N-Oleoylethanolamine	Sigma	Sphingolipid	Ceramidase
338	Ouabain	Sigma	Ion Pump	Na+/K+ ATPase
339	Suprafenacine	Sigma	Apoptosis	
340	Parthenolide	Sigma	Serotonergics	
341	Pimozone	Sigma	Dopaminergics	D2
342	GSK180736A	Sigma	Phosphorylation	ROCK1/GRK
343	Palmitoyl-DL-Carnitine chloride	Sigma	Phosphorylation	PKC
344	Piracetam	Sigma	Glutamatergics	AMPA
345	(+)-Pilocarpine hydrochloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
346	Bisoprolol hemifumarate salt	Sigma	Adrenoceptor	Beta1
347	Oxolinic acid	Sigma	Antibiotic	DNA Gyrase
348	ODQ	Sigma	Cyclic Nucleotides	NO-sensitive guanylyl cyclase
349	Oxotremorine methiodide	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
350	Nanchangmycin	Sigma	Antiviral	Viral Entry
351	L-Glutamic acid, N-phthaloyl-	Sigma	Glutamatergics	NMDA
352	Papaverine hydrochloride	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE
353	R(-)-N6-(2-Phenylisopropyl)adenosine	Sigma	Adenosine	A1
354	Phosphomycin disodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
355	Pilocarpine nitrate	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
356	Dofetilide fumarate	Sigma	Mult-Drug Resistance	MDR-1
357	Tomoxetine	Sigma	Adrenoceptor	Reuptake
358	Tamoxifen citrate	Sigma	Phosphorylation	PKC
359	Telenzepine dihydrochloride	Sigma	Cholinergic	M1
360	Uridine 5'-diphosphate sodium	Sigma	P2 Receptor	P2Y
361	U-69593	Sigma	Opioid	kappa
362	U-99194A maleate	Sigma	Dopaminergics	D3
363	Vincristine sulfate	Sigma	Cytoskeleton and ECM	Tubulin
364	WIN 62,577	Sigma	Tachykinin	NK1
365	Yohimbine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2
366	Tetracaine hydrochloride	Sigma	Na+ Channel	
367	Brinzolamide	Sigma	Carbonic anhydrase	anhydrase II
368	Terfenadine	Sigma	Histaminergics	H1
369	Thioperamide maleate	Sigma	Histaminergics	H3
370	U-74389G maleate	Sigma	Cell Stress	
371	UK 14,304	Sigma	Adrenoceptor	alpha2

372	U0126	Sigma	Phosphorylation	MEK1/MEK2
373	AMG 9810	Sigma	Ion Channels	TRPV1
374	Ara-G hydrate	Sigma	Apoptosis	
375	YS-035 hydrochloride	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
376	Remodelin hydrobromide	Sigma	Gene Regulation	NAT10
377	4-DAMP	Sigma	Cholinergic	M3
378	Tropicamide	Sigma	Cholinergic	M4
379	(±)-Thalidomide	Sigma	Cytoskeleton and ECM	TNFalpha
380	CCT007093	Sigma	Apoptosis	PPM1D
381	U-62066	Sigma	Opioid	kappa
382	SID 3712249	Sigma	Gene Regulation	MiR-544
383	CP466722	Sigma	Kinase/Phosphatase	ATM
384	WAY-100635 maleate	Sigma	Serotonergics	5-HT1A
385	YC-1	Sigma	Cyclic Nucleotides	Guanylyl cyclase
386	Tyrphostin 51	Sigma	Phosphorylation	EGFR
387	Trifluoperazine dihydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1/D2
388	THIP hydrochloride	Sigma	GABAergics	GABA-A
389	A-68930 hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1
390	L2-b	Sigma	Cell Biology	
391	Erdosteine	Sigma	Antioxidants and Cytoprotectants	
392	(±)-Verapamil hydrochloride	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
393	L-Mimosine from Koa hoale seeds	Sigma	Apoptosis	
394	TDFA trifluoroacetate salt	Sigma	Gene Regulation	PAD4 or PADI4
395	Zaprinast	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE V
396	RN-9893	Sigma	Ca2+ Channel	TRPV4
397	D-609 potassium	Sigma	Lipid	PIPLC
398	Trifluperidol hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1/D2
399	5HPP-33	Sigma	Cytoskeleton and ECM	microtubules
400	Zibotentan	Sigma	Endothelin	ET(A)
401	CCT137690	Sigma	Kinase/Phosphatase Biology	Aurora A, B and C
402	Galloflavin potassium	Sigma	Cell Stress	LDN-A/B
403	Wortmannin from Penicillium funiculosum	Sigma	Phosphorylation	PI3K
404	Xylazine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2
405	Zonisamide sodium	Sigma	Anticonvulsant	
406	Bropirimine	Sigma	Immunomodulators	
407	Thioridazine hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1/D2
408	3-Tropanyl-indole-3-carboxylate hydrochloride	Sigma	Serotonergics	5-HT3
409	CIQ	Sigma	Neurotransmission	NR2C/NR2D
410	4-Imidazoleacrylic acid	Sigma	Histaminergics	Histidine ammonia-lyase/ decarboxylase
411	Wiskostatin	Sigma	Actin	N-WASP
412	Vinpocetine	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE I
413	EMPA	Sigma	Orexin	OXR2

414	SCH 58261	Sigma	Purinoceptor	alpha2A
415	Caroverine hydrochloride	Sigma	Glutamatergics	NMDA/AMPA
416	Tyrphostin AG 538	Sigma	Apoptosis	Pin-1
417	Furamidine dihydrochloride	Sigma	Apoptosis	kDNA / Tdp1
418	XCT790	Sigma	Gene Regulation	ERRalpha
419	TPMPA	Sigma	GABAergics	GABA-C
420	Urapidil hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha1
421	(-) -trans-(1S,2S)-U-50488 hydrochloride	Sigma	Opioid	kappa
422	Vancomycin hydrochloride from Streptomyces orientalis	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
423	Acepromazine maleate	Sigma	Neurotransmission	
424	Xylometazoline hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha
425	Olprinone hydrochloride	Sigma	Phosphodiesterase	PDE3
426	Trimethoprim	Sigma	Antibiotic	Dihydrofolate reductase
427	IPA-3	Sigma	Phosphorylation	Pak1
428	Lorcainide hydrochloride	Sigma	Ion Channel Modulator	Nav1.5
429	Tipiracil hydrochloride	Sigma	Neuroscience	p53
430	Urapidil, 5-Methyl-	Sigma	Adrenoceptor	alpha1A
431	U-101958 maleate	Sigma	Dopaminergics	D4
432	(±)-gamma-Vinyl GABA	Sigma	GABAergics	Transaminase
433	Darglitazone sodium salt	Sigma	Gene Regulation	PPAR/RXR
434	Roslin 2	Sigma	Phosphorylation	p53/FAK
435	Zimelidine dihydrochloride	Sigma	Serotonergics	Reuptake

Вещества рядов 69-435 из библиотеки Sigma LOPAC1280

*лаб. Красавина – вещества синтезированы в лаборатории химической фармакологии Института химии СПбГУ

Saint-Petersburg State University

Printed as manuscript

Murtazina Ramilya Zufarovna

**The study of the physiological role of
trace amine-associated receptors (TAARs) with a focus on TAAR9**

Scientific speciality 1.5.3. Molecular Biology

Thesis for a Candidate degree in biological sciences
Translation from Russian

Scientific supervisor:
Candidate of Medical Sciences,
Gainetdinov Raul Radikovich

Saint-Petersburg
2023

Contents

Introduction.....	125
The relevance of research	125
The theoretical and practical significance of the work	126
Aims and objectives of the study	127
The scientific novelty of the study	127
Main findings	128
Personal contribution of the author.....	128
Publications.....	128
1 Literature review	130
1.1 Trace amines	130
1.2 Trace amine-associated receptors, TAARs.....	131
1.2.1 TAAR1.....	133
1.2.2 TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8	134
1.2.3 TAAR9.....	136
1.2.4 TAARs and olfaction	138
1.3 TAAR signaling	139
1.4 Heterologous TAAR expression.....	141
2 Materials	144
3 Methods.....	147
3.1 TAARs gene expression analysis.....	147
3.1.1 Expression analysis of rat and mouse tissues by RT-PCR	147
3.1.2 Public transcriptomic data meta-analysis of mRNA expression.....	149
3.2 Knockout animal studies.....	150
3.2.1 Generation of TAAR9 knockout rats with CRISPR/Cas9	150
3.2.2 Genotyping and knockout validation	151
3.2.3 Backcrossing of knockout animals	152
3.2.4 Animals	152
3.2.5 Behavioral analysis	153
3.2.6 Body temperature recording	156
3.2.7 Monoamine tissue content analysis	157
3.2.8 Relative gene expression.....	158
3.3 In vitro methods	159
3.3.1 Cloning.....	159
3.3.2 Cell culture.....	163
3.4 Statistical analysis.....	166
4 Results.....	167
4.1 Chapter 1. A pattern of TAARs expression	167
4.1.1 Expression of Taars in mouse and rat tissues	167
4.1.2 Meta-analysis of TAAR9 gene expression data.....	169
4.2 Chapter 2. Characterization of TAAR9-KO rats	171
4.2.1 Generation of TAAR9-KO Rats	171
4.2.2 Validation of TAAR9-KO Rats	171
4.2.3 Phenotyping of two independent lines of TAAR9-KO rats.....	173
4.2.4 Phenotyping TAAR9-KO after backcrossing	178
4.2.5 Continuous body temperature analysis of TAAR9-KO rats	182
4.2.6 Relative gene expression of key neuronal markers.....	187
4.2.7 Effects of TAAR9 agonists on olfaction.....	188
4.3 Chapter 3. Study of TAAR9 in vitro.....	190

4.3.1	Heterologous TAAR9 expression	190
4.3.2	TAAR9 in vitro expression optimization.....	191
4.3.3	TAAR9 ligand screening optimization	194
4.3.4	TAAR9 agonists screening	196
5	Discussion	199
	Conclusions.....	203
	Author's publications.....	204
	Acknowledgments.....	206
	References.....	207
	Abbreviations	216
	Appendix.....	217

Introduction

The relevance of research

G protein-coupled receptors (GPCRs) are the most common superfamily of membrane proteins in eukaryotic organisms that respond to various extracellular signals, including photons, ions, low molecular weight substances, peptides, and proteins. They share a seven-spiral topology and play an important role in controlling and regulating of cellular and physiological processes, making them promising drug targets [1]. The discovery in 2001 of a new class of GPCR receptors, trace amine-associated receptors (TAAR, 6 functional receptors identified in humans, TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8, and TAAR9) has expanded the possibilities of studying the functional role of endogenous trace amines in mammalian physiology and pathology [2,3]. Trace amines (TAs), such as β -phenylethylamine, tyramine, tryptamine, and octopamine, are structurally close to classical monoamines and play an important role in invertebrate physiology, but their functions in mammals, where they are present in "trace" amounts, remain poorly understood. In general, TAs are present in the CNS and function in parallel with monoaminergic pathways and are structurally related, colocalized, and released together with biogenic amines. The most studied receptor among TAARs is TAAR1. The results of studies using selective TAAR1 ligands and genetically modified animals with TAAR1 turned off (TAAR1-KO mice), suggested that TAAR1 may be a promising therapeutic target in the development of new pharmacotherapeutic agents for the treatment of neuropsychiatric disorders such as schizophrenia, depression, ADHD, substance abuse, Parkinson's disease, sleep disorders [4]. TAAR1 is already a proven target for pharmacology in a wide range of psychiatric, neurological, and metabolic disorders, and TAAR1 agonists are in clinical trials by F. Hoffmann La-Roche, Switzerland (nosology: schizophrenia) and Sunovion, USA (nosology: schizophrenia, anxiety, depression, and hallucinations caused by Parkinson's disease therapy). In addition to TAAR1 expression in brain structures, this receptor has also been found in the pancreas, stomach, and intestines, and preclinical studies indicate potential clinical efficacy of TAAR1 agonists in metabolic disorders such as obesity and diabetes. Other TAARs were first described as a new type of olfactory receptor with a similar pattern of expression in the olfactory epithelium and function in detecting volatile amines [5]. However, there are currently studies on their expression and function both in the CNS and in the periphery. For example, the second

most studied receptor, TAAR5, is expressed in the amygdala and hypothalamus [6]. One important approach to TAAR research in the absence of selective ligands was the gene knockout in transgenic animal model. So far, TAAR2 and TAAR5 knockout mice have been described. It was shown that TAAR2 possibly influences the dopaminergic brain system, while TAAR5 seems to play a functional role not only in olfaction but may also be involved in the control of affective behavior [7–9]. It has been suggested that TAAR5 antagonist drugs may have antidepressant and anti-anxiety effects, so it is of interest as a new target for psychotropic drug development [7]. As for the other TAARs (TAAR6, TAAR8, TAAR9), there are currently almost no published data on the function of these receptors outside the olfactory system. For example, only 15 papers are indexed in the PubMed database by the query "TAAR9". However, the expression of these TAARs in various structures in both the brain and peripheral organs may indicate that these receptors may be more than just olfactory. For example, expression of the TAAR9 gene has been found in the pituitary, gastrointestinal tract, kidneys, blood cells, and spinal cord [4], although it is known that mice with a cluster deletion (TAAR2-9-KO), which lack all TAARs expressed in the olfactory epithelium, do not differ from wild-type animals with respect to fertility, litter size, genotype distribution, and sex ratio in their cubs [10]. A number of TAAR9 agonists have also been identified, including both tertiary amines and di- and polyamines [11]. Mouse TAAR9 is known to be activated by unknown urinary components in many mammalian species, including mice, rats, humans, and carnivores [12], however, which substance is the direct ligand is unknown. Based on the above information, the study of the physiological role of this receptor using transgenic animals, as well as the search for its ligands, is a perspective direction of research.

The theoretical and practical significance of the work

Theoretical Significance. In this study, we used animal knockout model to study the functional role of TAAR9. TAAR9-KO animals have increased temperature under normal conditions and altered thermoregulation in response to exposure to cold. Moreover, knockout animals were found to have decreased anxiety, namely decreased temperature in response to stressors, as well as increased dopamine content in the hypothalamus. These findings can be used in further studies of TAAR9 and its involvement in thermoregulation.

The expression pattern of TAAR9, as well as other studied TAARs, in several brain structures, might be helpful for the study of these receptors function in CNS.

Practical Significance. The developed methodology of TAAR9 ligands screening might be useful for further search of TAAR9 agonists and antagonists, as well as for optimization of other TAARs' heterologous expression.

Aims and objectives of the study

Aim of the study:

To study the physiological significance of the trace amine-associated receptor 9, as well as to search for its ligands *in vitro*.

Objectives:

1. Evaluate the expression pattern of TAAR genes in human, rat, and mouse tissues;
2. Validation of two new rat lines with TAAR9 gene knockout;
3. Phenotyping of TAAR9 gene knockout rats, including characterization of possible changes in neurochemistry and behavior;
4. Development of an *in vitro* screening system for TAAR9 ligands and search for its agonists.

The scientific novelty of the study

This work was the first attempt of comprehensive study of animals with TAAR9 receptor gene knockout, a new, not yet studied member of the TAAR family. The expression pattern of TAAR9 in several CNS structures was described. Phenotypic characterization of the neurochemical and behavioral features of rats with TAAR9 gene knockout was performed for the first time. The effect of TAAR9 knockout on body temperature was shown for the first time. The work also investigated for the first time the effect of various factors, such as the addition of the N-terminal β 2N9 tag, RTP1S chaperone co-expression for heterologous expression of TAAR9, on the activity and localization of the receptor in the cell. For the first time, the N-terminal tag of β 2N9 was successfully used for heterologous expression of TAAR9. More than 400 substances not previously investigated for TAAR9 agonism were screened.

Main findings

1. TAAR9 expression has been shown not only in the olfactory epithelium, but also for the first time in the nucleus accumbens, caudate nucleus, substantia nigra, ventral tegmental area, medulla oblongata, ventral hippocampus, and hypothalamus;
2. Genetically modified rats with knockout of trace amine-associated receptor 9 are characterized by elevated body temperature and a lower temperature when exposed to cold; knockout of *Taar9* gene in rats leads to changes in the dopaminergic system of the hypothalamus, i.e. elevated dopamine level;
3. *Taar9* gene knockout in rats does not lead to significant changes in parameters in tests for locomotor activity, anxiety, depressive-like behavior, and memory;
4. A new experimental approach involving heterologous expression of the β2N9-TAAR9 construct in HEK293T cells, followed by ligand search using the BRET technique, has been developed.

Personal contribution of the author

The author was involved in all stages of the project: collection and analysis of literature data, planning and carrying out backcrossing and maintenance of TAAR9-KO lines, active participation in phenotyping of new lines of genetically modified animals, conducting a meta-analysis of open RNA sequencing data, performing statistical analysis of data, interpreting and discussing results. Molecular biology techniques such as RNA isolation, RT-PCR, real-time PCR, and immunofluorescent staining were also performed by the author of this work. All work related to the design and preparation of vectors and cell cultures (maintenance of HEK293 and CHO-K1 cell lines, transfection), as well as the BRET technique and agonist screening, were performed by the author of the work.

Publications

Results of the dissertation were published in 8 papers: 7 scientific articles in journals indexed in WoS, Scopus, and RSCI, 1 review in the journal included in the Higher Attestation Commissions list.

Main scientific findings were presented at 5 scientific conferences, including 2 international: Actual problems of translational biomedicine - 2019, 2022; 33rd ECNP Congress Hybrid, Virtual, September 12 - 15, 2020 (online); 27th Multidisciplinary

International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference "Stress and Behavior"
September 16-18, 2020; International School-conference of young researchers "Biology -
Science of XXI century", Pushchino, Russia, April 18 - 22, 2022.

1 Literature review

1.1 Trace amines

TAs are structurally similar to classical monoamines, however, their concentration in brain tissues is an order of magnitude lower, hence their name (Figure 1) [13,14]. Although TAs have been known for over 100 years, their function and distribution in tissues are much less well studied than that of dopamine, noradrenaline, and serotonin, although they, like these neurotransmitters, mostly are products of amino acid metabolism, and are found in brain tissues [2,15]. Moreover, it is known that the enzymes responsible for the synthesis and the very rate of synthesis of TAs and classical monoamines are approximately the same. The most important difference and the most probable reason for their low concentration in brain tissues is that these substances do not accumulate in synaptic vesicles and therefore degrade rapidly. TAs biosynthesis begins with the decarboxylation of precursor amino acids by the enzyme aromatic L-amino acid decarboxylase (L-AADC). L-AADC is also involved in the synthesis of classical monoamine neurotransmitters. It is fairly highly expressed in tissues and thus is not considered to be a rate-limiting enzyme for synthesis[13]. TAs are degraded mainly by monoamine oxidase (MAO) enzymes involved in the degradation of monoamine neurotransmitters. Almost all TAs are not selective and are metabolized by both MAO-A and MAO-B [13]. Accordingly, MAO inhibition leads to a rapid increase in the concentration of β -phenylethylamine and tryptamine in the brain [16].

TAs are synthesized by many, if not all, species of prokaryotes and eukaryotes. In the animal kingdom, endogenously synthesized TAs have been found in all invertebrate and vertebrate species studied to date, including humans. As a result of their widespread occurrence in both the plant and animal kingdoms, food products may contain significant amounts of TAs as a result of unintentional bacterial action (food spoilage), intentional (e.g., in cheese and wine) or as a result of fungal contamination of grain products (e.g., ergot-infested rye)[4]. In addition, TAs are synthesized in the gastrointestinal tract of vertebrates under the action of bacterial L-AADC during the digestion of protein-rich food. In many invertebrate species, TAs are known to play the role of major neurotransmitters [14].

In addition to their structural similarity to monoamine neurotransmitters, TAs have a similar structure to some psychoactive substances, including amphetamine, MDMA, and their derivatives. In humans, the most common TAs are phenylethylamine derivatives (phenylethylamine, p-octopamine, m-tyramine, 3-methoxytyramine, synephrine), thyronamine derivatives (thyronamine, 3-iodothyronamine), and tryptamine and its derivatives. TAs also include di- and polyamines (putrescine, cadaverine, spermine, spermidine)[4]. Currently, there is a large body of literature in which changes in TAs metabolism are associated with neurological diseases (schizophrenia, depression, ADHD, Parkinson's disease, etc.); however, the basis for such changes remains unclear [15,17]. The question of the physiological role of TAs remained open until the discovery of trace amine-associated receptors in 2001.

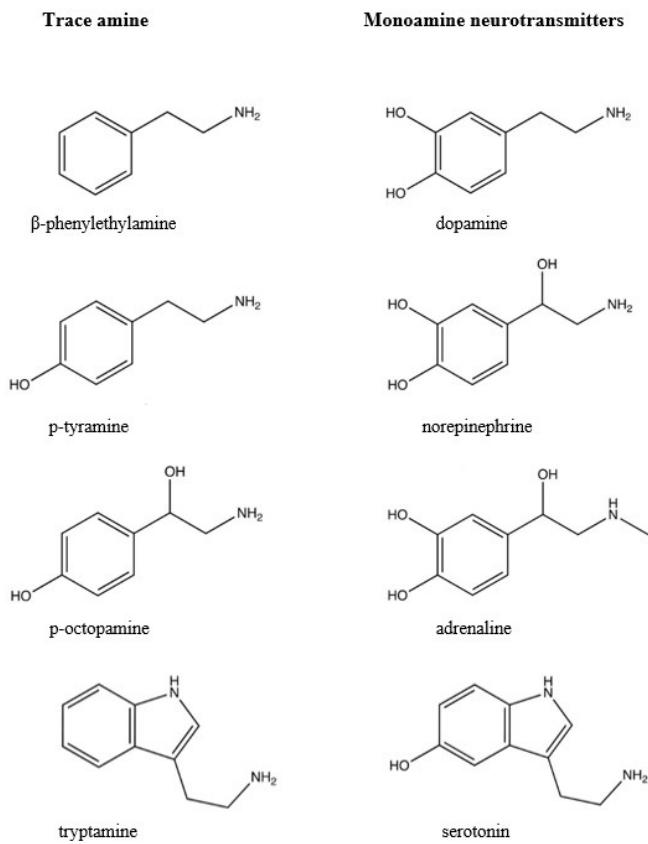


Figure 1. Correlation of the structures of trace amines and monoamine neurotransmitters. From: Murtazina, Gainetdinov, 2019.

1.2 Trace amine-associated receptors, TAARs

TAAR1 was discovered by two independent groups in 2001 by TAAR1 was

identified through a degenerate PCR approach, using complex mixtures of oligonucleotides whose sequences were chosen based on the G protein-coupled receptors for serotonin or catecholamines [2,3]. Bunzow and colleagues analyzed the cDNA of a rat pancreatic cancer cell line using primers to 3 and 6 conserved transmembrane GPCR domains while searching for new catecholamine receptors. In retrospect, it becomes clear that the choice of this particular cell line was extremely fortunate, since subsequent researchers encountered very low TAAR expression in most tissues, except the pancreas and, in particular, β -cells, which show high levels of TAAR1 [2,14,18]. When expressed in heterologous cell systems, the new receptor caused production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) after the action of p-tyramine, β -phenylethylamine, whereas the classical monoamines (dopamine, noradrenaline, serotonin) had no such effect or gave a much smaller response [2,3]. Six functional TAAR genes (TAAR1, TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8, TAAR9), as well as three pseudogenes (TAAR3, TAAR4, TAAR7) that do not encode a functional protein, were identified in humans. The human TAAR genes are clustered on chromosome 6, specifically at the 6q23.2 region, associated with schizophrenia and bipolar disorder [19]. The mouse and rat genomes contain 15 and 17 functional *Taar* genes, respectively. In the mouse, *Taar* genes are located in a single cluster in chromosome 10 and are numbered according to the order of their appearance on the chromosome, from *Taar1* to *Taar9*, with five paralogs of the *Taar7* gene (*Taar7a*, *Taar7b*, *Taar7d*, *Taar7e*, and *Taar7f*; *Taar7c* is the only pseudogene) and three paralogous variants of the *Taar8* gene (*Taar8a*, *Taar8b*, and *Taar8c*). All 17 rat *Taar* genes are located on chromosome 1. Phylogenetic analysis of human, rat, and mouse TAAR revealed that the original TAAR sequence underwent eight gene duplication events. These events gave rise to a group of nine genes before the divergence of rodent and primate lineages. The rodent *Taar7* and *Taar8* paralogs may have evolved from recent independent duplications in mice and rats [20]. Except for TAAR2, all members of the mammalian TAAR family consist of a single exon. TAARs are phylogenetically distantly related to biogenic monoamine receptors such as dopamine and serotonin receptors. The only known species that does not have a single functioning TAAR is the afalone [21]. Interestingly, the number of TAAR genes correlates with the number of olfactory receptor genes. TAARs can be divided into two groups: the first group includes primary amine receptors (TAAR1-TAAR4) and the second group includes tertiary amine receptors (TAAR5-TAAR9). Moreover, it is assumed that the first group evolved under strict negative selection, and the second, more

heterogeneous group, by positive selection. The TAAR1-TAAR4 group is evolutionarily older, more conservative, and members of this group are represented by a single isoform in different genomes. It is assumed that the second group originates from the same gene [21].

1.2.1 *TAAR1*

By far the most studied member of the family is TAAR1 [22]. First evidence on the functional role of the TAAR1 receptor under physiological conditions was obtained before the discovery of selective ligands using transgenic mice with the *Taar1* gene knockout (TAAR1-KO) generated by two independent groups [23,24] (Table 1). Many known endogenous TAAR1 agonists also act on other targets in the CNS, such as dopamine transporter (DAT) or vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2). In the absence of a selective TAAR1 ligand, the mouse with a knockout of this gene represented the only possible option to investigate the potential physiological consequences of TAAR1 dysfunction and the role of TAAR1 in the action of pharmacological agents [25]. TAAR1-KO mice had no distinct phenotype compared to wild-type (WT) animals, the mutants successfully reproduced and showed no differences from WT in most behavioral tests. Nevertheless, a significant decrease in response in the prepulse inhibition test was found in the knockout mice, which may indicate disturbances in sensorimotor filtration mechanisms characteristic of patients with schizophrenia and several other brain diseases. Moreover, TAAR1-KO showed enhanced amphetamine-induced locomotor activity. Also, when injected with this psychostimulant, TAAR1-KO mice showed a significant increase in extracellular monoamines [23]. Similar results were obtained with TAAR1-KO mouse line developed at Hoffmann La-Roche [24]: mutant animals were also more sensitive to the action of amphetamine, and the level of extracellular dopamine was higher in the striatum after amphetamine injection than in WT. Under normal conditions in the knockouts, the level of extracellular dopamine and motor activity did not differ from the WT mice, however, electrophysiological recordings of the ventral tegmental area revealed an increase in the spontaneous electrical activity of dopamine neurons [24]. It was further shown that pharmacological blockade of TAAR1 is accompanied by an increase in the spontaneous electrical activity of dopamine neurons in WT animals (but not in knockout mice), whereas TAAR1 activation leads to inhibition of their activity. In addition to these changes, TAAR1-KO mice showed differences in the effects of some antipsychotic drugs, in particular haloperidol and clozapine [26]. In 2012, a line of mice with increased expression

of TAAR1 (TAAR1-OE) was also characterized [27]. TAAR1-OE transgenic mice did not show overt behavioral abnormalities under baseline conditions, despite elevated extracellular levels of dopamine and noradrenaline in the nucleus accumbens and of serotonin in the medial prefrontal cortex. In females, only minor increase in body weight and body temperature were shown. As expected, TAAR1-OE showed a reduced stimulatory effect of amphetamine on locomotor activity. The electrophysiology data were unexpected - just as in TAAR1-KO, in TAAR1-OE line there was an increase in the spontaneous electrical activity of dopamine neurons in the ventral tegmental area. One explanation for this fact is the reduced activity of the population of GABAergic neurons, which normally should inhibit dopamine neurons [27]. The TAAR1-OE rat line was also generated, and TAAR1 intracellular signaling and expression pattern were studied [28].

It is worth noting that *TAAR1* expression has been detected in several brain regions, including the ventral tegmental area, substantia nigra, and the dorsal raphe nucleus. All of the above nuclei are key for monoamine neurotransmission [15,29]. Data on *Taar1* expression in the brain were confirmed in transgenic mice in which the LacZ gene sequence was inserted into the *Taar1* gene to determine the specific expression of β-galactosidase under *Taar1* promoter [24]. According to its distribution in the CNS, TAAR1 appears to function as a regulator of receptor activation in other neurotransmitter systems [30,31]. TAAR1 interaction with the dopaminergic system is particularly well studied, where TAAR1 activation prevents dopaminergic hyperactivity. Such effects appear to be related to changes in the intracellular signaling of D2-like dopamine receptors (D2R) as part of the D2R-TAAR1 dimer after TAAR1 [26,28,32]. The first drugs with TAAR1 activity are now in clinical trials, and new agonists are being actively sought [33–35]. 5HT1A/TAAR1 agonist, SEP-363856, developed by Sunovion Pharmaceuticals, reduces positive and negative symptoms in schizophrenia patients [33,36]. TAAR1 also likely functions peripherally in the pancreas, stomach, immune system, and oncology [4,37]

1.2.2 TAAR2, TAAR5, TAAR6, TAAR8

A new chapter in the history of studying the role of TAs became a paper published in 2006 in which TAARs were described as a new class of olfactory receptors [5]. It has been shown that all members of the family, except for TAAR1, are expressed only in the olfactory epithelium. As we now know, due to low expression and not very sensitive

detection methods, they were difficult to detect in other tissues [31]. In general, the role of these TAARs remains understudied, although there are data on their expression in CNS tissues. It is worth noting that the expression of all TAARs has also been detected in peripheral tissues: blood cells, cardiac tissue, kidneys, testes, and many others [4]. In the CNS, using *in situ* hybridization, *Taar5* mRNA was found in the amygdala, arcuate nucleus, and ventromedial hypothalamus of the mouse, with localization in the hypothalamus and amygdala coinciding with TAAR1 [6]. The expression of *TAAR6* in the human prefrontal cortex, substantia nigra, amygdala, basal nuclei, and hippocampus was detected by RT-PCR, with the highest expression in the hippocampus [3,38]. *TAAR8* mRNA was found in the amygdala [3].

Therefore, the characterization of animals with individual TAAR knockout was required to more accurately determine the function of these receptors. The first studies on animals with TAAR gene knockout focused on their role in olfaction. A cluster deletion mouse lacking all TAARs expressed in the olfactory epithelium, was developed (TAAR2-TAAR9-KO mice) [39,40]. Deletion of several genes at once was possible due to the clustering of *Taar* genes on a single chromosome. This model was used to study the significance of several odors recognized by TAAR and their effects on behavior. In addition to changes in olfaction, TAAR2-TAAR9-KO mice showed no significant differences in mass, or locomotor activity [39].

TAAR5-KO mice with LacZ insertion were used to show *Taar5* expression in the olfactory bulb, orbitofrontal and entorhinal cortex, amygdala (amygdala body), hippocampus, nucleus accumbens, thalamus, and hypothalamus in the laboratory of neurobiology and molecular pharmacology of the Institute of Translational Biomedicine of SPBU [7]. These data are consistent with those obtained by *in situ* hybridization [6]. Previously, expression of *TAAR5* was also found in the amygdala in humans, which may indicate conservative expression in the mouse and humans [41]. TAAR5 knockouts were viable and did not show strong abnormalities in most behavioral tests; however, they had changes in tests for depressive-like behavior and anxiety, and there were decreased serotonin levels in the striatum and hippocampus. Interestingly, the hypothermic effects of 8-OH-DPAT, a 5-HT1A-serotonin receptor agonist, were more pronounced in TAAR5 knockouts than in WT animals [7]. Further studies of these animals revealed an increase in the number of dopaminergic neurons and an elevated dopamine level in the striatum [8].

Thus, TAAR5 appears to play a functional role not only in olfaction but may also be involved in the control of affective behavior. The TAAR2-KO mice with LacZ insertion had an increase in locomotor activity and less immobility in the forced swim test, elevated dopamine levels in the striatum, and expression of beta-galactosidase under *Taar2* promoter was detected in the olfactory bulb, hippocampus, hypothalamus, and brainstem [9]. These findings suggest that not only TAAR1 but also other members of the TAAR family may play a significant role in CNS functioning and require further study, including using transgenic animal models [42].

Table 1. TAAR transgenic animal lines

Line	Species	Characteristics	Ref.
TAAR1-KO	mouse/rat	enhancement of amphetamine-induced locomotor activity, decreased response in the prepulse inhibition test, increased number of spontaneous impulses of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area	[23,24]
TAAR1-OE	mouse/rat	the stimulatory effect of amphetamine on locomotor activity is reduced, number of spontaneous impulses of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area is increased. elevated extracellular levels of dopamine and noradrenaline in the nucleus accumbens and of serotonin in the medial prefrontal cortex; the connection between TAAR1 and D2R was confirmed <i>in vivo</i> , and a β-arrestin2/AKT/GSK3 cascade was discovered upon TAAR1 activation	[28,43]
TAAR2-9-KO	mouse	altered threshold of olfactory sensitivity to volatile amines	[39]
TAAR2-KO	mouse	increased locomotor activity and less immobility in the forced swim test, increased dopamine levels in the striatum	[9]
TAAR5-KO	mouse	changes in depressive-like behavior; changes in the dopamine and serotonin system; decreased attraction to trimethylamine	[7,8,44]

1.2.3 TAAR9

Human *TAAR9* gene encodes a 348 a.a. protein. Alignment of human and rat TAAR9 amino acid sequence results in the identity of 84.2%, human and mouse - 86.8%. A181T polymorphism leading to nonfunctional TAAR9 (stop codon as a result of mutation

appears after the first transmembrane loop) is known in 20% of the population, however, its clinical significance is still unclear [45,46].

TAAR9 expression in humans was detected in the olfactory epithelium [47], stomach [48], pituitary, skeletal muscle [45], and leukocytes [49,50]. *Taar9* mRNA was also detected in the murine gastrointestinal tract, where it is predominantly localized to duodenal mucosal cells [51], as well as spleen [52], kidney [18], retina [53], olfactory epithelium, and olfactory bulb [40]. In rats, only a few groups have studied the expression of the *Taar9* gene. [52,54,55]. Chiellini and colleagues analyzed whole-brain and peripheral organs homogenates using RT-PCR and showed weak expression of *Taar9* in the cortex, brain white matter, cerebellum, intestine, and testes, but the signal was less than 10 copies cDNA/1 μ g RNA, so these data need confirmation [54]. In another study, expression of *Taar9* was detected along with other TAARs in the spinal cord of rats [52].

First rat TAAR9 agonists turned out to be tertiary amines, N-methylpiperidine (EC50=18.3 μ M) and N-dimethylcyclohexylamine (EC50=26.6 μ M) [56] (Table 2). The list of TAAR9 agonists was further expanded to include aminoethylpiperidine, the diamine cadaverine, and the polyamines spermine and spermidine with EC50 \geq 50 μ M for murine TAAR9 [57], and the EC50 of the previously described N-methylpiperidine and N-dimethylcyclohexylamine of the murine TAAR9 was >100 μ M. A 2022 study with a high-throughput screening of TAAR agonists of various species revealed that spermidine also activates rat, hamster, rabbit, and cat TAAR9; cadaverine and spermine - rat and cat; N-methylpiperidine, N-dimethylcyclohexylamine, triethylamine - mouse and rat only [58]. However, these compounds also activated other TAARs (TAAR5, TAAR6, TAAR8c, TAAR7b, TAAR7c), except for cadaverine, spermidine, and spermine, which were agonists of TAAR9 alone. Also, murine TAAR9 is known to be activated by a currently unknown component(s) of both carnivore and noncarnivore urine, including mice, rats, humans, and predators [12].

Differential expression of *TAAR9* was found in inflamed areas in Crohn's disease [59] and in the kidney in a model of diabetic nephropathy in rats [60]. When studying the positive effect of cadaverine on breast cancer survival *in vitro*, it was shown that this effect may be mediated, along with TAAR1 and TAAR8, through TAAR9 [61].

TAARs belong to the class A G-protein coupled receptor (A-GPCR). This class has two types of ligand-binding sites: allosteric and orthosteric. Allosteric sites are located on disordered extracellular loops, while orthosteric sites are located within transmembrane

domains. Although the structural basis for ligand recognition by TAAR receptors is not fully understood at this time, in mouse TAAR9, two entry tunnels and two vestibular binding pockets have been described, and site-directed mutagenesis has identified amino acids (Asp3.32, Tyr6.51, Tyr7.43) that are important for ligand recognition [62,63].

Table 2. List of TAAR9 agonists

TAAR9 agonist	EC50, μM	Species	Reference
N, N-dimethylcyclohexylamine	122	mouse	[57]
	26.6	rat	[56]
	~30		[58]
N-methylpiperidine	163	mouse	[57]
	18.3	rat	[56]
triethylamine	66	mouse	[57]
	-	rat	[58]
1-(2-aminoethyl) piperidine	66	mouse	[57]
spermidine	55	mouse	[57]
	-	rat	[58]
	-	hamster	
	-	rabbit	
	-	cat	
spermine	120	mouse	[57]
	-	rat	[58]
	-	cat	[58]
cadaverine	243	mouse	[57]
	-	cat	[58]

1.2.4 TAARs and olfaction

As stated earlier, TAARs are involved in odor recognition [5,64], so they have been assigned to a new class of olfactory receptors (ORs) that regulate instinctive behavior. It is known that the first step of odor perception is the interaction of odorant with G-protein coupled OR located on the surface of olfactory sensory neurons (OSNs) in the olfactory epithelium of the nose. Activated OR initiates the signaling cascade necessary to transmit the odor signal, which ultimately reaches the brain. An individual OSN monoallelically expresses a single functional odorant receptor gene; neurons with the same receptor are randomly distributed within the same olfactory epithelial zone. More than 1000 olfactory

receptors are known in mammals, which agrees well with their ability to detect and distinguish a variety of odors [65].

It has been shown that each *Taar* is expressed monoallelically and defines a unique population of sensory neurons (<0.1% of the total) that does not express other *Taar* or canonical odorant receptor (*Olfr*) genes [40]. Thus, the "one-receptor-one-neuron rule" of canonical ORs appears to be true for TAARs as well. However, it seems that *Taar* have a different mechanism than canonical *Olfr* in choosing which gene to express. The epigenetic heterochromatin signature characteristic of silent OR genes is absent in the *Taar* genes [66,67]. In addition, the inactive *Taar* genes are in a different nuclear compartment than the inactive *Olfr* genes [68]. Also, two groups simultaneously described two enhancers in the *Taar* genes. Deletion of both of these enhancers led to the complete elimination of the TAAR-OSN cell population [69,70].

Changes in sexual behavior and mate choice have been described in TAAR2-9-KO knockout animals [10]. The urine of many predators contains β-phenylethylamine, which induces an avoidance response in mice; however, when TAAR2-9-KO was turned off in the animals, this response disappeared [12,39]. TAAR5-KO mice were found to lose attraction to trimethylamine, a TAAR5 agonist that is present in the urine of mice [44]. And in high concentrations, it causes aversive behavior, and in low concentrations, which correspond to the physiological concentration, it acts as an attractant [44]. Wild-type mice show avoidance of cadaverine and N-methylpiperidine at different concentrations, with low concentrations of these substances no longer causing aversion in mice with the *Taar2-Taar9* cluster deletion [39]. It has also previously been shown that Danio rerio fish exhibit aversive behavior to cadaverine through the TAAR13c receptor [71].

Thus, these receptors play a role in odor recognition that regulate instinctive behavior (predator smell, rotting tissues, sex odors) and there appears to be a complex relationship between TAARs to olfactory cues and species-specific behavior [64,67].

1.3 TAAR signaling

GPCRs, which include TAARs, are membrane proteins with >800 identified genes in humans. They transmit most intracellular responses to external stimuli (light, taste, smell, hormones, neurotransmitters). GPCRs are usually divided into five families

depending on their structure and sequence. Ligands from small molecules to peptides and proteins bind to class A (rhodopsin-like) GPCRs, which include TAARs. Peptide hormones activate class B receptors (secretin receptor family). Ions and small molecules are ligands for class C receptors (metabotropic glutamate receptors). The ligands of adhesion GPCRs are largely unknown. GPCRs of the Frizzled family are receptors for wingless int-1 (WNT) signal peptides [1].

The GPCR family receptors have a similar structure; they contain seven transmembrane helices as well as extracellular N-terminal and intracellular C-terminal sites. The binding sites of low molecular weight compounds (ligands) in many cases are localized in the transmembrane domain of the receptor, while peptide hormones and regulators of protein nature interact with the N-terminal site and extracellular loops. After GPCR activation, the receptors form a complex with a heterotrimeric G-protein (guanine nucleotide-binding protein). G-protein is usually a complex consisting of three subunits G_{α} , G_{β} , G_{γ} . Several types of G_{α} subunits are known, the activation of each of which leads to different effects: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}/G_{\alpha 0}$, $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$, and small monomeric GTPases [72]. Signal transduction occurs due to a change in the receptor structure, which leads to the replacement of GDP by GTP in the binding domain of the G_{α} subunit. This leads to the breakdown of the heterotrimeric complex into G_{α} and $G_{\beta\gamma}$ subunits, each of which triggers a biochemical enzymatic reaction cascade that causes genomic (changes in gene expression and replication) and other (activation of enzymes, ion channels) responses. cAMP, Ca^{2+} ions, inositol triphosphate, diacylglycerol, and nitric oxide are the most common secondary messengers of these signaling cascades [1]. In addition, β -arrestin is an important GPCR partner. Although 30-40% of all currently available drugs are GPCR ligands, only <10% of known GPCRs are used in medicine [73].

TAAR1 was found to bind to $G_{\alpha s}$, which increases the intracellular concentration of cAMP and activates further signal transduction [2]. Therefore, the activation of TAAR1 in the cellular system was mainly studied using methods based on the production of cAMP [74]. However, there are also studies in which *in vitro* activation of TAAR1 signaling has been successfully analyzed via G_q (namely, G_{q16}) [75,76]. It has also been shown that in response to amphetamine, TAAR1 can recruit $G_{\alpha q}$ and $G_{\alpha 13}$ [77]. Activation of TAAR1 by the agonist RO5166017 involves the $G_{\beta\gamma}$ protein and leads to outward K^+ ion current through G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in

dopaminergic and serotonergic neurons [30]. Also, TAAR1 activation can occur via the G-protein independent pathway via β -arrestin [28].

Although TAARs are phylogenetically distinct from canonical ORs, they transmit a response using the canonical cascade of olfactory signal transmission, at least in the olfactory epithelium [67]. TAARs signal through olfactory G-proteins G_{\alphaolf} , which are synthesized in the olfactory epithelium and, like $G_{\alpha s}$, activate adenylate cyclase type III and increase the production of cAMP [5,57,78]. In other tissues, most TAARs are coupled to $G_{\alpha s}$ [11]. However, reports are showing that some TAARs are coupled to different G_{α} . For example, the basal activity of TAAR8 can be mediated by $G_{\alpha i}$ and leads to a decrease in the cAMP level in heterologous cells [79]. In addition, it has been shown that TAAR5 signaling can involve the $G_{\alpha q/11}$ - and $G_{\alpha 12/13}$ -dependent MAP-kinase cascade *in vitro* [6]. Interestingly, TAAR2 can heterodimerize with TAAR1 in polymorphonuclear neutrophils (PMN), which is necessary for the chemotactic response [50]. As in the case of other TAARs, activation of TAAR9 leads to $G_{\alpha s}$ - and G_{\alphaolf} -coupled accumulation of cAMP [11,12]. Interestingly, a study of olfactory receptor expression outside the olfactory system showed co-expression of proteins involved in the transmission of olfactory signals [80].

TAAR signaling pathways are of particular interest, but many groups have had a problem studying TAARs *in vitro* because of the difficulty in expressing them on the cell membrane, at least in heterologous cell systems [31].

1.4 Heterologous TAAR expression

Functional analysis of receptors requires a reliable and sensitive assay system suitable for the efficient screening of a large number of ligands. A cell line derived from human embryonic kidney cells HEK293 is most commonly used for functional GPCR tests *in vitro*. *Xenopus laevis* oocytes, insect cells, and other mammalian cell lines are also used. For some GPCRs, accessory proteins are required for proper targeting to the cell membrane [81].

Since TAARs are poorly expressed on the membrane in heterologous systems *in vitro*, signal sequences of previously studied GPCR that are well localized on the membrane are being used: first 9 amino acids of the $\beta 2$ -adrenergic receptor [82], first 20 amino acids of human [78] or bovine [6] rhodopsin. One reason for poor membrane expression may be

the lack of glycosylation at the N-terminus, which has been shown for TAAR1 [82]. Different approaches for the heterologous expression of TAAR are summarized in Table 3.

To increase the membrane expression of TAAR, the approach used in ORs deorphanization, which are also difficult to express in a heterologous system, is also used in several studies [83]. This is because the proteins remain in the endoplasmic reticulum and are subsequently degraded in the proteasome [84]. These data suggest that olfactory neurons possess a molecular mechanism that facilitates the proper transport and folding of olfactory receptors and, apparently, TAAR on the cell surface, but the components of this mechanism are poorly understood. The RTP1 protein (receptor transporting protein 1), along with several others (RTP2, REEP1) have been discovered in the search for such olfactory cell-specific chaperones. The HEK293-derived HANA3A line, which constitutively expresses RTP1, RTP2, REEP1, and G_{olf}, was developed for this purpose [85]. Of all these proteins, RTP1 has the most pronounced effect. It is a transmembrane protein expressed in olfactory neurons, although weak expression has also been found in the brain. It has also been shown that deletion of the first 36 N-terminal amino acids of this protein (RTP1S, s - short) further increases the surface localization of ORs [86].

Table 3. Heterologous expression of TAARs

Receptor	Species	Cell line	N-tag	Detection	Accessory protein co-expression	Reference
TAAR1	human	HEK293T	β2N9, 3HA-tag	EPAC BRET biosensor	no	[82]
TAAR1	rhesus monkey	HEK293	no tag	CRE ¹ -driven luciferase reporter construct	no	[87]
TAAR1	human	RD-HGA16 (CHO-K1 derived)	no tag	Calcium 3 fluorescent dye	G _q (G _{α16})	[75]
TAAR1	rat	AV12-664 cell line (Syrian hamster fibroblast cell line)	HA-tag	HitHunter cAMP XS kit	rat G _{αs}	[88]
mTAAR1, hTAAR1, mTAAR3, mTAAR4, mTAAR5, mTAAR7f:	mouse	HEK293	bovine Rho-tag	CRE-SEAP ² activity	no	[5]
rTAAR3, rTAAR7b,	rat, mouse	HEK293	bovine Rho-tag	CRE-SEAP activity	no	[56]

rTAAR7d, rTAAR7h, rTAAR8c, rTAAR9, mTAAR4, mTAAR7e, mTAAR7f, mTAAR7b, mTAAR7e, mTAAR7f						
TAAR3, TAAR4, TAAR5	primate, mouse, rat, cow, human	HEK293	HA-tag, Flag, bovine Rho-tag	CRE-SEAP; Alphascreen cAMP assay	no	[89]
TAAR5	human	HANA3A (HEK293T- derived); Xenopus laevis oocytes.	human Rho-tag	Dual-Glo™ Luciferase Assay System	RTP1S and Golf	[78]
TAAR5	mTAAR5, hTAAR5, chimera	HEK293	HA-tag; bovine Rho-tag	Alphascreen	no	[6]
TAAR6	rhesus monkey	HEK293	no tag	Dual- Luciferase Reporter Assay	no	[90]
TAAR8	human, mouse	HEK293	HA-tag; bovine Rho-tag	Alphascreen	no	[79]

Bovine Rho-tag (20 aa of bovine rhodopsin – MNGTEGPNFYVPFSNKTGVV); Human Rho-tag (20 aa of human rhodopsin – MNGTEGPNFYVPFSNATGVV); β 2N9 – MCQPGNGSA; tags for antibody detection: HA-tag (hemagglutinin tag); FLAG-tag. ¹CRE (cAMP response element) – DNA sequences, to which cAMP response element-binding protein binds. ²SEAP – secreted alkaline phosphatase

2 Materials

General chemicals

Compound	Supplier
Agarose	Helicon, Russia
Ethidium bromide	Helicon, Russia
Chloroform	Scharlau
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	AppliChem
PBS tablets	Rosmedbio
Potassium chloride (KCl)	AppliChem
Sodium chloride (NaCl)	AppliChem
Magnesium chloride (MgCl ₂)	AppliChem
Calcium chloride dihydrate	Biofroxx
Ampicillin	Sintez, Russia
Kanamycin	Applichem
Yeast extract	Applichem
Agar	Applichem
Tryptone	Chimmed, Russia

RNA extraction, RT-PCR, qPCR, genotyping

Compound	Supplier
IntactRNA	Evrogen, Russia
Trizol	Sigma-Aldrich
TRI Reagent	MRC
TURBO DNase Kit	Thermo Scientific
Diethylpyrocarbonate (DEPC), for water treatment	Amresco
Revertaid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific
DNase I, RNase-free	Thermo Scientific
gDNA Eraser DNA Removal Kit	Grisp
Random hexamer, N6	Beagle, Russia
5x qPCRmix-HS SYBR	Evrogen, Russia
Deionized water, nuclease-free	Evrogen, Russia
BioMaster HS-Taq PCR-Color reaction mix	Biolabmix, Russia
<i>SacI</i> restriction endonuclease	NEB
Primers	Evrogen, Russia

HPLC**Mobile phase composition:**

NaH₂PO₄ 14.9g/L; Na₂HPO₄ 1.376 g/L; 1-octanesulfonic acid sodium salt 400 mg/L; EDTA 50 mg/L; Methanol 19.5% v/v; pH=4.5

Compound	Supplier
1-octanesulfonic acid sodium salt	Sigma-Aldrich
Dihydroxybenzoic acid (DHBA), 98%	Sigma-Aldrich
Sodium Phosphate monobasic	Sigma-Aldrich
Sodium Phosphate dibasic	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Perchloric acid	Fluka
<i>Standards</i>	
Dopamine hydrochloride	Sigma-Aldrich
Serotonin hydrochloride	Sigma-Aldrich
L-Noradrenaline hydrochloride	Sigma-Aldrich
Homovanillic acid	Sigma-Aldrich
Dihydroxyphenilacetic acid	Sigma-Aldrich
5-hidroxyindoleacetic acid	Sigma-Aldrich

Cloning and plasmid purification

Compound	Supplier
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
10 mM dNTPs	Thermo Scientific
T4 ligase	Thermo Scientific
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Maxiprep kit	Thermo Scientific
<i>Restrictases</i>	
<i>EcoRI</i>	Thermo Scientific
<i>XbaI</i>	Thermo Scientific
<i>HindIII</i>	Thermo Scientific
<i>KpnI</i>	Thermo Scientific

Cell culture, transfection

Compound	Supplier
DMEM, (high glucose, GlutaMAX™ Supplement, HEPES)	Gibco
DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12), #51445c	Sigma-Aldrich
Opti-MEM	Gibco
Minimum Essential Medium without phenol red	Gibco
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), 15140122	Gibco
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco
GlutaMAX	Gibco

MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco
Sodium Pyruvate (100 mM)	Gibco
TrypLe Express	Gibco
PBS	Thermo Scientific
Lipofectamine 2000	Thermo Scientific

BRET

Compound	Supplier
Magnesium Sulfate	AppliChem
Ascorbic acid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Forskolin	Sigma-Aldrich
Isoproterenol hydrochloride	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma-Aldrich
Coelenterazine <i>h</i>	Promega

Plastic consumables for cell culture

Name	Supplier
Cell culture dish 100 mm	Eppendorf
6-well plate	Eppendorf
96-well plate, white clear-bottom	Costar

Reagents for immunohistochemistry

Compound	Supplier
antiHA antibody, mouse (ab18181)	Abcam
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse antibody (A21424)	Lifetech
Normal horse serum (ab7484)	Abcam
Adhesive microscope slides	Thermo Scientific
Cover slides 24x24mm #1, 0.13 – 0.16 mm	Deltalab
Poly-d-lysine	Biolot, Russia
Fluoroshield DAPI	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich

3 Methods

3.1 TAARs gene expression analysis

3.1.1 Expression analysis of rat and mouse tissues by RT-PCR

To analyze expression of *Taar9* gene in rats, we used a group of Sprague-Dawley female rats (n=3, age 1 year) and two groups of male rats (n=3, age 7 months; n=3, age 3 months); for analysis of gonads, we additionally took two male rats (age 1 year). The following structures were taken from females: striatum, medulla oblongata, small intestine, colon, liver, spleen, kidney, adrenal gland, brown fat, and white fat. Male rats, 7 months: midbrain (separately black substance, ventral tegmental area), nucleus accumbens, hippocampus, hypothalamus, cerebellum. Male rats, 3 months: hypothalamus. Tissues were dissected on ice, and immediately placed in liquid nitrogen, then stored at -80°C until isolation. Details of *Taar* gene expression analysis in mice are in the table:

Gene	Animals	Structures
Taar5	female, C57Black6N (n=3, >1 year)	cerebellum, brainstem
Taar2	male,	
Taar6	C57Black6N	olfactory epithelium, olfactory bulb, striatum, cerebellum,
Taar9	(n=3, 3-4 months);	brainstem, hippocampus, hypothalamus, frontal cortex, cervical spinal cord.

RNA isolation and DNase treatment. Liver and intestine after dissection were placed in IntactRNA fixative solution for better preservation of RNA and then stored at -20°C. RNA isolation from the mouse brainstem and cerebellum was performed using the GeneJet RNA Purification kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. RNA isolation from the remaining mouse and rat tissues was performed using TRI Reagent according to the manufacturer's instructions. RNA precipitate was resuspended in RNase-free water and stored at -80°C until use. RNA concentration and quality were determined using a NanoDrop spectrophotometer (Germany). A TURBO DNase kit was used to remove the remaining genomic DNA. It is worth noting that this kit was the most effective for the complete removal of genomic DNA. We compared the performance of DNase I

(Syntol, Russia), DNase I (ThermoScientific, EN0521), and gDNA Eraser DNA Removal Kit (GK83, Grisp, Portugal).

cDNA Synthesis. 1 µg of RNA was used for cDNA synthesis using the RevertAid RT Reverse Transcription Kit. Reverse transcriptase and reaction mixture containing 1 µM N6 primers were added to DNase-treated RNA and the following protocol was applied: annealing at 25°C for 10 min, transcription at 42°C for 90 min, and termination at 70°C for 10 min. The cDNA samples were stored at -20°C. As a control for the successful removal of genomic DNA, each sample was exposed to the same treatment except that the reverse transcriptase was not added (RT(-) control).

PCR. Gene expression was assessed by quantitative real-time PCR on a CFX96 instrument (Bio-Rad, USA). 1 µg of RNA was used for reverse transcription, and the dilution of cDNA for PCR was 1:30.

PCR mix:

1 µL cDNA (corresponding to 30 ng RNA)	
4 µL	5x HS buffer
0.5µM	F primer
0.5µM	R primer
x µL	deionized, nuclease-free water
$\Sigma=20\mu\text{L}$	

Amplification program

C 35 c.	95°C → 5 min
	1. 95°C → 20 sec
	2. 60°C → 20 sec
	3. 72°C → 30 sec
	4. 95°C → 60 sec
melting curve	5. 55°C → 95°C 10 sec increment 0.5°C

Primers were designed using PrimerBlast. Upon delivery, primers were tested for specificity using plasmids carrying the TAAR genes and genomic DNA, and a dilution curve was constructed. The rat *Hprt* gene and the mouse *Gapdh* gene, which are housekeeping genes, were included as internal loading controls. The CFX96 instrument (Biorad, USA) was used for PCR. Reactions were performed in duplicates, and RT(-) controls were also included for each assay. To confirm target amplification, melting curve was analyzed after each PCR reaction and compared with the positive control (olfactory epithelium cDNA). A single peak on the melting curve was observed in all samples. RT(-) control was analyzed in the same manner. Samples with genomic DNA contamination were

excluded from the analysis. Further, PCR products, including RT(-) controls, were additionally analyzed in 2% agarose gel electrophoresis in SB buffer [91].

Primers used for Taar gene expression analysis

Gene	Primer name	Sequence	Product length, bp	Ref.
Taar2 mouse	mTAAR2_F	5'-CGGATTCAACCATCATGCCAT-3'	105	[5]
	mTAAR2_R	5'- CTAAGCATCAGGTCGAAGCT -3'		
Taar5 mouse	mTAAR5_F1	5'-TTCTGCTACCAGGTGAATGGGT-3'	74	[92]
	mTAAR5_R1	5'-GCCAGATAGATGACGACCTGGA-3'		
Taar6 mouse	mTAAR6F	5'-TCTCTCTTCCACCTGAGCTT-3'	92	[5]
	mTAAR6R	5'-GACACAGACACCGTGAACCTT-3'		
Taar9 mouse	mTAAR9F	5'- TGGAGAGCTGCTGGTACTTT-3'	108	[5]
	mTAAR9R	5'-GGTCAATGGAGATGCAGCAT-3'		
Taar9 rat	TAAR96_F	5'-AGCCAACGAGGAAGGGATTG-3'	124	-
	TAAR96_R	5'-GACGACAGTGGGCAGAAAGA-3'		
GAPDH H mouse	mGAPDH_F2	5'-TTGATGGCAACAATCTCCAC-3'	110	[92]
	mGAPDH_R2	5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGT-3'		
HPRT rat	ratHPRT-F	5'- CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC- 3'	123	[93]
	ratHPRT-R	5'- GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC -3'		

3.1.2 Public transcriptomic data meta-analysis of mRNA expression

Transcriptomic data were retrieved from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) database. GEO Browser was searched for the terms “brain”, “cortex”, “cortical”, “hippocampus”, “hippocampal”, “striatum”, “striatal”, “caudatus”, “putamen”, “accumbens”, “raphe”, “brainstem”, “pons”, “cerebellum”, “cerebellar”, “basal ganglia”, and “white matter”. Each GEO dataset included in the analysis meets the following criteria:

- (1) human or mouse RNAseq study;
- (2) TAAR9 values are available, and expression data are represented in raw counts or counts per million (CPM, counts per million);

- (3) clear explanation of sample origin (i.e., data were excluded if the part of the brain or cortex was not specified;
- (4) at least 5 samples from healthy adult subjects/non-treated control animals per dataset;
- (5) at least 40 million reads per SRA file (Sequence Read Archive) in healthy subject/control animal groups.

Additionally, we have included 3 mouse datasets that consist of data on RNA isolated from single neurons or subcellular fractions (Appendix 2). GSE130376 contains data for nine single cholinergic neurons isolated from the nucleus accumbens. Cells were isolated from mice that were hereditarily susceptible or resistant to cocaine addiction. Only three animals were wild-type, so this dataset did not fully meet the inclusion criteria for the number of samples. Another dataset, GSE121199, contains transcriptomic data of D1- or D2- dopamine medium spiny neuron (MSN) cell fraction of the mouse nucleus accumbens (D1-MSN and D2-MSN, respectively). Samples in this dataset were sequenced with less depth than inclusion criteria. However, the RNA sequencing results in these studies are sufficiently informative to detect TAAR expression, probably due to the design of the experiment involving cell fractionation.

Normalization of expression of human tissue datasets was performed by a number of transcripts per million reads, TPM (Transcripts Per Million) using the GEO2R tool. For estimation of the expression levels, all murine data were CPM-normalized by the cpm function in the edgeR package [94]. For both CPM and TPM, a value of 0.1 was considered a threshold value. The analysis was performed with the great help and guidance of Dr. Anastasia Vaganova, a researcher at the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology at the Institute of Translational Biomedicine.

3.2 Knockout animal studies

3.2.1 *Generation of TAAR9 knockout rats with CRISPR/Cas9*

TAAR9-KO rats were produced using CRISPR/Cas9-based technology on the Sprague-Dawley outbred genetic background. Single guide RNA (sgRNA) was designed to target the translation initiation site at the TAAR9 single exon according to the Zhang Lab protocols [95]. To prepare the TAAR9-sgRNA expression plasmid, the oligo pairs

330TAAR95 (5'- CACCGTTCTCGTAGCAGAGCTCCA-3')/330TAAR93 (5'- AAACTGGAGCTCTGCTACGA GAAC-3') encoding the 20-nt guide sequences (5'- GTTCTCGTAGCAGAGCTCCA-3') were annealed and ligated into pX330 plasmid (Addgene plasmid ID: 42230) digested with *BbsI*. The sgRNA was amplified with primers T7sgRNATAAR9fw (5'-TTAATACG ACTCACTATAGGTCTCGTAGCAGAGCTCCA-3') and sgRNA31 (5'- AAAAGCACC GACTCGGTGCC-3') to add a T7 promoter sequence. sgRNA was transcribed *in vitro* by T7 RNA polymerase using Ambion MEGA shortscript T7 kit (AM1354). A mixture of sgRNA (25 ng/μL) and Cas9 mRNA (IDT, 30 ng/μL) was microinjected into pronuclei of fertilized eggs from Sprague Dawley rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). The injected zygotes were cultured to the 2-cell stage and transferred into pseudo-pregnant females according to established methods [96]. The resulting offspring were genotyped by polymerase chain reaction with primers flanking the gRNA target region (Taar95: 5'- CAGCAGGTAGAAAATGGGAG-3' and Taar931 5'- AGTGGAGGATAGCGGTGATG-3') and screened by Sanger sequencing. The generation of knockout animals was carried out in collaboration with Olga Korenkova of the Institute of Translational Biomedicine, SPBU, Natalia Alenina and Elena Popova of the Michael Bader laboratory at the Max Delbrück Center of Molecular Medicine (MDC), Germany.

3.2.2 Genotyping and knockout validation

Two mutant lines, with a single nucleotide insertion (TAAR9-KO-insA) and single nucleotide deletion (TAAR9-KO-delC), were used in the study. Since both mutations resulted in a loss of *SacI* restriction site, genotyping of animals was performed as a combination of PCR followed by *SacI* digestion. PCR was run on genomic DNA isolated by alkaline lysis [97] from ear biopsies using primers flanking the mutation site (TAAR952: 5'-TGGCCTTGCAAGAAGTTT-3' and TAAR932: 5'- GCAAAGCAGAAGGAGGTGTC-3'). PCR amplification was performed in a buffer containing 2 × BioMaster HS-Taq PCR-Color reaction mix with 1 μM of each primer, and 500 ng genomic DNA. After incubation at 95 °C for 3 min, 35 cycles of 20 s at 95 °C, 20 s at 63 °C, 40 s at 72 °C, and a final incubation of 72 °C at 5 min, the resulting 586 bp product was digested by *SacI* restriction enzyme. The appearance of two bands at 315 and 271 bp corresponds to the WT; of three bands at 586, 315, and 271 bp to HET; and of a single undigested 586 bp band to KO genotypes.

Validation of the knockout was performed by sequencing. For the offspring ratio 90 animals born to heterozygote+heterozygote pairs were analyzed. To evaluate *Taar9* mRNA level from the olfactory epithelium after gene knockout females of three genotypes (TAAR9-KO-delC, TAAR9-KO-insA, WT, n=1, age 7 months) were used. RNA isolation, reverse transcription, and PCR were performed as in 3.1.1. Primers used for the rat *Taar9* gene were TAAR93_F (5'-AAGAGTAGAGCCAGACGAGAGAGAGAGG-3') and TAAR93_R (5'-TCATGTAGGCATCAATCACGGC-3').

3.2.3 Backcrossing of knockout animals

For backcrossing, Sprague-Dawley rats were purchased from the SPF Vivarium of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. Six consecutive rounds of backcrossing of heterozygotes with pure wild type were performed. This process took 2.5 years.

3.2.4 Animals

Information on the species, lines, and number of animals used in all experiments, except knockout generation, is presented in Table 4. Two mutant lines of rats with a *Taar9* gene knockout were used: with a single cytosine deletion (TAAR9-KO-delC) and with a single nucleotide insertion (TAAR9-KO-insA).

Table 4. Animals

Species	Line/background	Mutation	Number of animals	Sex
rat	Sprague Dawley	no	38	34♂ + 4♀
rat	Sprague Dawley	TAAR9-KO-delC	27	26♂ + 1♀
rat	Sprague Dawley	TAAR9-KO-insA	11	10♂ + 1♀
mouse	C57Black	no	6	3♂ + 3♀

The animals were kept in the SPF vivarium of St. Petersburg State University. Rats were housed in acrylic plastic cages with wire covers. Wood sawdust or domestically produced granulated wood filler for laboratory rodents were used as bedding material. Up to 3 animals were housed in one cage, except for the experiment on implantation of temperature sensors and analysis of food and water consumption, where animals were kept

one per cage. Animals were allowed access to food and water ad libitum and kept at a room temperature of 20-22°C under natural light levels with a day-night cycle of 12:12 (lights were turned on at 10:00 a.m.).

Animals (rats) were sacrificed by decapitation after light inhalation anesthesia with isoflurane, and mice - by cervical dislocation. The genotypes of all rats used in this study were confirmed twice, from samples collected at weaning and after the sacrifice. All procedures were approved by the Ethical Committee of St. Petersburg State University (No. 131-03-4, May 15, 2021).

3.2.5 Behavioral analysis

All behavioral tests, except the olfactory preference test, were performed on the following groups in two rounds:

- 1) comparative analysis of three groups of the following genotypes: wild type (WT), TAAR9-KO-delC (KO-delC) knockout, and TAAR9-KO-insA (KO-insA) knockout. Male rats, n=10 in each group, 3 months of age, were used for this round. The use of two independent knockout lines with different mutations of the same gene provides reliable results from gene knockout without the influence of other factors, including off-target mutations that may occur after CRISPR/Cas9.
- 2) second round took place after 2.5 years of backcrossing, behavior, and brain neurochemistry analysis of TAAR9-KO-delC and wild type were investigated. Two groups of 3-4-month-old male littermates (n=8) after 6-fold backcrossing were taken for this round. These animals were also used for the olfactory test.

Before each behavioral test, animals were habituated for ≥10 min in a room adjacent to the experimental room. Behavioral experiments were performed together with my colleagues from the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology at the Institute of Translational Biomedicine, SPBU, Savelii Rostislavovich Kuvarzin, and Ph.D. Evgeniia Viktorovna Efimova.

3.2.5.1 Open field

The baseline locomotor activity of the animals was assessed using an open field test. The setup was a black plastic circular arena (97 cm in diameter) with holes in the floor of the arena (2 cm in diameter). Each rat was placed in the center of the arena and

spontaneous exploratory activity was recorded with a video camera. The recorded file was analyzed using Noldus Ethovision video-tracking software for 5 minutes. The following behavioral indicators were monitored: total distance traveled, speed, time in the central zone and frequency of visits to the central zone, number of holes explorations, number of rears, and total time of grooming.

3.2.5.2 Open field with a novel object

To analyze long-term memory, we conducted an open field test with a novel object. The setup was a black plastic circular arena (97 cm in diameter) with holes in the arena floor (2 cm in diameter). On the first day, animals were placed in the center of the arena containing two identical round objects in each half of the arena (symmetrically) and spontaneous exploratory activity was recorded by a video camera. The recorded file was analyzed using Noldus Ethovision video-tracking software for 5 minutes. On the second day, 24 hours later, the rats were placed in the center of the same arena, but one round object was replaced by a new rectangular-shaped object. The following parameters were assessed: time spent near the new object, as well as time and frequency of sniffing the new object.

3.2.5.3 Elevated plus maze test

The elevated plus maze is used to measure anxiety-like behavior in rodents. The maze consisted of two opposite open arms without walls (50 x 14 cm), and two opposite closed arms (50 x 14 x 30 cm) raised 40 cm from the floor. Normally, animals prefer to stay in closed sleeves, so exploratory behavior in open sleeves is considered an indicator of reduced anxiety. Rats were placed in the center of the maze facing the open arm and spontaneous motor activity was recorded by a video camera for 5 min. The following parameters were analyzed using Noldus Ethovision software: cumulative duration in open arms, frequency of entries into open arms, total distance traveled separately in open and closed arms, average speed, number of rears in closed arms, and a number of head dips in open arms.

3.2.5.4 T-test

T-test was used to study short-term memory of animals. T-maze parameters were as follows: starting alley 50x16 cm, arms 50x10 cm, wall height 32 cm. The test was conducted in two stages. In the first stage, each rat was placed in a T-shaped maze with one

arm closed for 5 minutes, and after 45 minutes was placed in the same maze for 5 minutes, but both arms were open. Normally, animals explore new arm more frequently. Time spent in the known and previously closed arm was measured using recorded video with Noldus Ethovision.

3.2.5.5 Stress-induced hyperthermia

A BIO-TK8851 digital thermometer (BIOSEB, France) was used to measure rodent body temperature. For each measurement, the sensor was inserted into the rectum of the animal until the thermometer reading stabilized. The temperature of the animals was assessed twice with a difference of 10-15 minutes.

3.2.5.6 Forced swim test

To assess depressive-like behavior, we used a forced swim test. The study was conducted in 4 cylindrical containers made of glass (diameter 20 cm, height 50 cm). Before each experiment, the cylinders were filled by 2/3 with fresh tap water (temperature $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Rats were placed in the water and the duration of each test was 10 minutes. On video recording, the same researcher estimated the total time of immobilization, active and passive swimming, using Realtimer software (Russia).

3.2.5.7 Olfactory preference test

The method was carried out as previously described by Saraiva and colleagues [57]. Animals were placed in a new cage without bedding, 52x40 cm, h=20 cm (one rat per cage), and habituated there for 10 min. Exposure to olfactory stimuli was performed by gently dropping pieces of filter paper (1.5×2 cm) soaked with 50 μL distilled water (H_2O) in one end of the cage and odorant (85 mM in H_2O , equivalent to 4.25 μmol) into another end. Animal behavior was recorded on video for 5 minutes. Recordings were evaluated by a “blinded” (with respect to odorant and genotype) experimenter. Total sniffing time was measured during 5 minutes of exposure to the odorant.

3.2.5.8 Food and water consumption measurement

To measure animal weight, food and water consumption, 3-month-old males of the TAAR9-KO-delC genotype (n=8) were kept by one in a cage. For four days, food and water were weighed once a day.

3.2.6 Body temperature recording

Thermometry studies were performed on 6-8-month-old wild-type and TAAR9-KO-delC knockout males (WT, n=8; KO, n=6). Animals were divided into two subgroups with an equal number of 3 KO and 4 WT per subgroup because of the limited number of loggers. Experiments were performed under as similar conditions as possible, including the sequence of different exposures and the interval between them. The data obtained in the two subgroups were first analyzed separately and then combined.

iButton implantation. The iButton Data Loggers were implanted into the peritoneal cavity (“Elin”, Russia). The animals were anesthetized with isoflurane narcosis. The lower abdomen was shaved, treated with betadine, and a 1.5-2 cm long incision was made in the skin and the peritoneal wall. Then iButton was inserted into the peritoneal cavity, and the peritoneum and skin were closed separately with Vicryl Ethicon absorbable suture material, 20 mm (Braun, Germany). The suture was covered with BF-6 glue, which had wound-healing and antiseptic effects. While the animal was under anesthesia, an intramuscular injection of gentamicin and ketorolac 10 mg/kg was administered. After surgery, the animals were kept in separate cages and allowed to recover for 7 days. Three months after the experiments, the animals were euthanized by decapitation after anesthesia with isoflurane, and the iButtons were removed from the abdominal cavity. In parallel, we checked for any signs of injury of internal organs caused by iButton.

Recording of body temperature with iButton. Central body temperature was automatically recorded using intraperitoneally implanted iButtons in continuous mode. The iButtons weigh 3.3 g (diameter: 16 mm, thickness: 6 mm). Each sensor can store temperature readings at a user-defined time interval. The start of the measurement is defined by the user. Here we used a 3-minute interval and the measurement period was over 30 days. The iButton started recording the temperature ~20 minutes before implantation.

Temperature recording analysis. After the removal of the sensors, data were transferred to Excel using iBDL_R software (IButton Data Logger Revisor). A daily temperature change of each animal and the average temperature for the day and night were analyzed. We obtained 480 points per day from each animal. Temperature data from day 7 postoperatively were used to plot the dynamics of mean temperature during the week. To determine body temperature at day time (hours 12:00-19:00) and nighttime (hours 00:00-

07:00), the average for each animal (140 points) was calculated for 6 days, excluding the first 7 days after surgery, days of bedding change, and before the first experiments (i.e. heating on day 17 after surgery). The day of surgery was taken as Day 1 in the graphs and descriptions.

Heating. The ambient temperature in the room with the cells was maintained between 30-36°C for 3 hours. Most of the time the temperature was ~33°C.

Exposure to 21°C and 17°C. Exposure to cold was conducted in 4 cylindrical containers made of glass (diameter 20 cm, height 50 cm). Before each experiment, the cylinders were filled with fresh tap water of the required temperature (temperature \pm 1 °C) by 2/3. The duration of each test was 10 minutes. After bathing, the rats were taken out of the water, wiped dry with a towel, returned to their home cage, and left in a warm environment.

Immobilization stress: Rats were placed in a cylindrical container with free access to air, without the ability to move for 3 hours.

Operations and thermometry experiments were performed together with members of the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology of the Institute of Translational Biomedicine, M.S. Saveliy Rostislavovich Kuvarzin, Ph.D., Evgeniia Viktorovna Efimova and Ph.D., Evgeny Viktorovich Kanov.

3.2.7 Monoamine tissue content analysis

Analysis was performed by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Dissection of the hypothalamus, striatum, and frontal cortex was performed on ice. The isolated structures were immediately transferred to liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Samples for chromatographic analysis were weighed, thawed, and homogenized in an appropriate volume of 0.1 M chloric acid containing 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) at a given concentration (acid volume was calculated depending on the structure and its weight). Homogenization was performed using a Q125 ultrasonic sonicator (Qsonica, USA). The next step was centrifugation (14000 g, 10 min, +4°C). The supernatant was transferred to 20 µM filter tubes (PVDF, Millipore) for the second centrifugation step (12000 g, 2 min, +4°C). Next, chromatographic separation of the supernatant obtained during filtration was performed. An Eicom HTEC-500 (Japan) instrument was used for the analysis. The separation was performed on a reversed-phase CA-50DS column (150*2.1 mm, Eicom, Japan). The mobile phase

consisted of the following components: 100 mM sodium phosphate buffer, 0.17 mM EDTA, 1.8 mM octyl sulfonate, 18% methanol, and pH 4.5. Detection was performed on an analytical cell with graphite electrode WE-3G (Eicom, Japan), at a potential of +650 mV. The eluent flow rate was 0.2 ml/min. To calibrate the chromatograph, mixtures of working standards of the substances to be determined at a concentration of 0.5 nmol/ml were used. The chromatograms were processed using the "PowerChrom" program. The content of monoamines and their metabolites was determined using an internal standard DHBA (a substance of catecholamine nature, but not found in native tissue) at a concentration of 0.5 nmol/ml.

The content was calculated in ng/mg of tissue. Norepinephrine, dopamine (DA), serotonin (5-HT), metabolites of dopamine (dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA)), and serotonin metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were analyzed. The 5-HIAA/5-HT, DOPAC/DA, and HVA/DA ratios reflecting the turnover of the respective monoamines, were also examined. HPLC analysis was performed together with M.S. Mikael Mor from the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology at the Institute of Translational Biomedicine, SPBU.

3.2.8 Relative gene expression

Relative gene expression of key proteins of the dopaminergic, glutamatergic, and serotonergic systems in the brains of wild-type and TAAR9 knockout animals was analyzed using real-time PCR. For the analysis, 3-month-old males of WT and TAAR9-KO-delC were used (n=6-8) before the completion of backcrossing. Striatum, midbrain+medulla oblongata, frontal cortex, hypothalamus, and olfactory bulb were dissected on ice. Tissue was immediately placed in Trizol reagent and stored at -20°C.

Primer design and validation. Primers used for cDNA amplification were designed using NCBI PrimerBLAST instrument based on mRNA sequences. Where possible, primers were selected at the exon-exon junction. Criteria for primer selection were as follows:

- length 18-22 bp.
- product size ~ 120 bp.
- $T_m \sim 60^\circ\text{C}$
- no hairpins and homo-, heterodimers with $\Delta G < -10 \text{ kcal/mol}$ (evaluated with the IDT OligoAnalyzer online calculator)

- absence of nonspecific binding to rat mRNA and genomic DNA, human genomic DNA.

Upon delivery, PCR was performed with rat striatum cDNA, and the melting curve was analyzed with SYBR green dye, then the product was analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. Primers that gave nonspecific products in the negative control (water) or double peak on the melting curve were excluded. Next, a series of 5 dilutions of cDNA obtained from 1 µg of rat striatum or midbrain was amplified simultaneously in separate tubes and used to construct a calibration curve. The calibration curve in the coordinates "Ct (threshold cycle value) - cDNA concentration" was constructed in Excel by calculating the R² parameter, which had to be > 0.99. The sequences of the primers used in this work are given in Appendix 3.

RNA isolation and RT-qPCR. RNA extraction and RT-qPCR were performed as in section 3.1.1 with slight modifications. Isolated RNA was treated with DNase I (ThermoScientific) (1 U/1 µg RNA, 37°C, 10 min) and then DNase was inactivated by incubation at 60°C. Then, 1 µg of RNA was reverse transcribed using primer N6 in a 20 µL reaction with RevertAid Kit. cDNA was diluted 4-fold and used for quantitative real-time PCR with specific primers and primers for normalization (HPRT gene or 28S ribosomal RNA gene). Normalization and analysis were performed using the ΔΔCt method [98].

3.3 In vitro methods

3.3.1 Cloning

For this work, the rat *Taar9* gene was cloned into a vector for eukaryotic expression. The pcDNA-β2N9-rTAAR9 vector was developed to express TAAR9 in HEK293T cells under the control of the CMV promoter. An N-terminal β2N9-3xHA tag consisting of the first 9 amino acids of the β2-adrenergic receptor (MCQPGNGSA) was added to enhance membrane expression. A hemagglutinin tag in 3 repeats (YPYDVPDYA) was also added to detect cellular localization using antibodies. This tag will further be referred to as β2N9. To analyze protein localization in the cell, β2N9-TAAR9 gene sequence was cloned into the pEGFPN3 vector. Primers were designed using Benchling, and gene sequences were from the NCBI site.

General cloning principle: after PCR with primers to insert restriction sites, restriction was performed. The target vector was processed with the same restrictases. After ligation, competent *E. coli* cells were transformed with the ligation mix. Antibiotic resistance was used for potential positive clones' selection, then clones were confirmed by restriction analysis and Sanger sequencing.

3.3.1.1 Vectors

The pEGFPN3 vector was a kind gift of Y.V. Sopova of the Center for Genome Transgenesis and Editing of the ITBM SPBU. pcDNA_RTP1S vector for RTP1S expression was obtained from Addgene (#296736) [99]. The Exchange Protein directly Activated by cAMP (EPAC) BRET biosensor to detect cAMP level was the same construct as published previously [82]. The BRET EPAC cAMP biosensor contains a truncated EPAC (residues 149-881), flanked by *Renilla reniformis* luciferase and citrine fluorescent protein on the 5' and 3' ends respectively. Plasmid pcDNA- β 2N9-hTAAR1 was the same construct as published previously [82].

TAAR9 gene expression vector (pcDNA_β2N9-rTAAR9). The *Taar9* gene was amplified from rat genomic DNA by PCR with the introduction of *EcoRI* and *XbaI* restriction sites using primers rTAAR9_EcoRI_F and rTAAR9_XbaI_R. Next, the amplicon was purified with the GeneJet Gel Extraction Kit and then cloned by blunt end cloning into pJet1.2 subcloning vector using the commercial CloneJET PCR Cloning Kit. The resulting pJet_rTAAR9 vector was sequenced to confirm the correct sequence of the TAAR9 gene. Then, it was hydrolyzed with *EcoRI* and *XbaI*, and inserted into the pcDNA- β 2N9-hTAAR1 vector hydrolyzed with the same restrictases.

Vector for the expression of the TAAR9 fused with EGFP (pEGFP-β2N9-rTAAR9). To study the cellular localization of the protein, pEGFP- β 2N9-rTAAR9 vector was developed, with the *Taar9* gene fused with GFP gene at 3'-end under the control of the CMV promoter. To obtain this vector, the β 2N9-TAAR9 gene was amplified by PCR using 3HA_HindIII_F and rTAAR9_KpnI_R primers, pcDNA- β 2N9-rTAAR9 vector as a matrix. The resulting amplicon was hydrolyzed by restrictases *HindIII* and *KpnI*, and inserted into the pEGFPN3 vector hydrolyzed with the same restrictases.

Primers for cloning

β N9-TAAR9 cloning into pcDNA- β 2N9-hTAAR1 with <i>EcoRI/XbaI</i>	
rTAAR9_EcoRI_F	5'- CAGGAATTCATGGAGCTCTGCTACGAGAAC
rTAAR9_XbaI_R	5'- CGCTCTAGATTAACCTGCACCTGCTTCTCA
β N9-TAAR9-EGFP cloning with <i>HindIII/KpnI</i> R	
3HA_HindIII_F	5' - CATAAGCTTATGGCTAGCTACCCATACGATG
rTAAR9_KpnI_R	5' - CGCGGTACCAACCTGCACCTGCTTCTCA

Primers for sequencing

pJet1.2_F	5'- CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC
pJet1.2_R	5'- AAGAACATCGATTTCATGGCAG
CMV_F	5' - CGCAAATGGCGGTAGGCGTG
BGH_R	5' - TAGAAGGCACAGTCGAGG

3.3.1.2 PCR amplification

A PCR was used to amplify genes and add restriction sites and tags.

PCR mix:

50-250 ng of genomic DNA or 10 ng of plasmid DNA	
1 x	Hi-Fi buffer
0.2mM	dNTPs
0.5 μ M	F primer
0.5 μ M	R primer
0.8U	Phusion High-Fidelity DNA polymerase
x μ L	deionized, nuclease-free water
$\Sigma=40\mu$ L	

Amplification program

	98°C → 3 min
	1. 98°C → 20 sec
○ 35 c.	2. 64°C → 15 sec
	3. 72°C → 40 sec
	72°C → 10 min

Fragments were separated by 1% agarose gel electrophoresis, cut from the gel, and purified with GeneJet Gel Extraction Kit based on DNA binding to silica gel columns; elution volume was 10 μ L. DNA concentration was measured spectrophotometrically using

Nanodrop. Purified fragments were either immediately subjected to restriction or stored at -20°C for up to 2-3 days.

3.3.1.3 Restriction and ligation

Restriction. Restriction protocols were generated using online DoubleDigest Calculator from ThermoFisher Scientific. Vectors and fragments were subjected to restriction for subsequent ligation or for restriction analysis of the resulting clones.

General restriction protocol:

10 µL purified PCR product or 1 µg plasmid DNA	
1 x	suitable buffer
5-10 U	restrictase
x µL	deionized, nuclease-free water
$\Sigma=20\mu\text{L}$	

Incubation for 1-2 hours at 37°C.

Ligation. In total 50-100 ng of DNA was used for ligation with an insert: vector ratio being 3:1. The ligation mix was made on ice, then incubated for 30 minutes at 22°C. The ligation mix was either immediately used for transformation or stored at -20°C overnight.

Ligation mix	
3:1 (insert: vector)	
1 x	T4 buffer
5 Weiss U	T4 ligase
x µL	deionized, nuclease-free water
$\Sigma=10\mu\text{L}$	

As a control for self-ligation of the vector after restriction, a ligation without insert was also performed in a separate tube, and the number of colonies was compared with the control.

3.3.1.4 Transformation of E. coli

Competent E.coli XL10-Gold cells were either purchased from Evrogen (Russia) or made using the CaCl₂ method [100]. The competent cells were transformed with a ligation mix using heat shock. Aliquots of competent cells stored at -80°C were thawed on ice. Cold ligation mix was then added and gently mixed. The reaction was incubated for 30 minutes on ice. This was followed by a heat shock for 90 seconds at 42°C, and 2 minutes on ice. 600 µL of SOC medium without antibiotics was added and incubated for one hour

at 37°C. During this period, bacteria begin to produce enzymes for antibiotic resistance. Cells were seeded on agar plates with ampicillin or kanamycin for positive selection and incubated at 37°C overnight. Then 3-5 clones were seeded in 3-10 ml of LB medium + antibiotic (kanamycin or ampicillin), grown at 200-300 rpm overnight at +37°C. Plasmids were then purified using GeneJet Plasmid Miniprep Kit and eluted in 50 µL. Plasmids were subjected to restriction and analyzed with 1% agarose gel electrophoresis for bands of predicted length. Selected clones were then analyzed by Sanger sequencing to confirm correct insertion. Sequencing was performed by A.E. Romanovich and A.E. Masharskii at the Centre for Molecular and Cell Technologies, SPBU. Sequencing results were analyzed using Snapgene software (United States). Plasmid stocks were stored at -20°C.

3.3.1.5 Plasmid preparation for transfection

To obtain a sufficient amount of plasmid DNA, bacteria were transfected with 10 ng of plasmid and seeded in 100 ml of LB or TB medium [101], then grown overnight at +37°C and 250 rpm. The GeneJet Plasmid Maxiprep kit was used for purification with slight modifications: elution was performed in a volume of 100-200 µL in several steps to increase the concentration. Next, the most concentrated fractions were combined. The concentration for successful transfection was 0.9-1 µg/µL. Another plasmid purification method was used as published [101]. It should be taken into account that the plasmid DNA obtained by this method cannot be stored at +4°C, as it starts to degrade; also, these plasmids are not suitable for restriction analysis, nevertheless, we successfully used it for transfection. Purified plasmid DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis. NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to determine plasmid concentration. Plasmid DNA was stored at -20°C or for long-term storage at -80°C.

3.3.2 Cell culture

3.3.2.1 Cell culture

HEK293T cell culture was grown on 100 mm dishes in humidified air containing 5% CO₂ using DMEM medium, and DMEM/F-12 medium was used for CHO-K1 for no more than 16-20 passages. The medium was supplemented with 10% fetal bovine serum, 1xGlutaMAX (L-alanyl-L-glutamine), 1 mM sodium pyruvate, 1x MEM-NEAA (non-essential amino acids), and 0.1 mg/ml penicillin/streptomycin at 37°C. Cells were passaged

every 2-3 days by treating with Tryple Express, an improved trypsin analog. All cell cultures were routinely checked for *Mycoplasma spp.* contamination by PCR every 2-3 months [102].

3.3.2.2 Transfection

HEK293T or CHO-K1 cells at ≥ 6 passages were used for transfection. The principle of transfection is that the liposomal reagent Lipofectamine2000 leads to the complexation of plasmid DNA and liposomes. Liposomes are internalized through endocytosis. After endosome degradation, the plasmid DNA is freed and enters the nucleus during the next cell division. Cells were seeded on a 100 mm dish, and grown to 70% confluence, then DMEM medium was replaced by antibiotic-free OptiMEM medium supplemented with 2% fetal bovine serum, 1x GlutaMAX, and 1 mM sodium pyruvate. 30 μ L Lipofectamine2000 was incubated with 120 μ L OptiMEM for 5 minutes. At this time, the plasmid DNA volume was brought up to 150 μ L in OptiMEM medium (5 μ g of EPAC plasmid + 5 μ g of TAAR9 plasmid). Then, the contents of the tube with Lipofectamine 2000 were added dropwise to the plasmid DNA solution and incubated for 20 minutes at room temperature, and gently added to the cells. Then cells were incubated for 4 hours or overnight. For confocal microscopy, cells were seeded on a 6-well plate and 1 μ g of TAAR9-GFP plasmid per well was transfected after reaching 70% confluence.

3.3.2.3 Confocal microscopy and immunofluorescence staining

Cells transfected with the pEGFPN3 vector as a positive control and the pEGFP_β2N9-rTAAR9 vector, which encodes TAAR9 fused to the EGFP protein at the C-terminus, were used to analyze receptor localization in the cell. After transfection overnight, cells were seeded to a 6-well plate at a density of 100 000/well with poly-D-lysine-coated slides on the bottom and grown on a supplemented DMEM for 24 hours. For preliminary evaluation of transfected cells, GFP fluorescence of live cells was visualized using a ZOE Fluorescent Cell Imager (Biorad, USA). Next, all steps were performed at room temperature. Cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde solution for 12.5 minutes, then washed with PBS solution 3 times for 5 minutes each. Next, cells were mounted on a slide with Fluoroshield DAPI. For immunofluorescent staining, after fixation and washing, nonspecific binding was blocked by incubation with 5% normal horse serum diluted in PBS for 1 hour at room temperature. Incubation with the primary antiHA

antibodies was performed for 60 minutes at room temperature or overnight at +4°C, antibodies were diluted with 5% normal horse serum on PBS at a ratio of 1:1000. A secondary antibody was diluted with 5% normal horse serum on PBS at a ratio of 1:1000, incubated for 1 hour, then washed 3 times with PBS. Next, cells were mounted on a slide with Fluoroshield DAPI Cells were visualized by a Leica TCSSP5 confocal microscope at the Centre for Molecular and Cell Technologies, SPBU, using an excitation wavelength of 488 nm to visualize GFP, 553 nm for the Alexa Fluor 555 antibody.

3.3.2.4 Bioluminescence resonance energy transfer assay (BRET)

For the BRET assay of cAMP level coelenterazine h reagent (a substrate for Renilla luciferase) was used to initiate bioluminescence. Transfected cells were plated on a 96-well white plate at 150 000 cells/well (Minimum Essential Medium without phenol red supplemented with 2% fetal bovine serum, 1xGlutaMAX, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mg/ml penicillin/streptomycin). Plate was incubated for 24 hours. All BRET assays were performed at a final volume of 100 µL per well at room temperature. Right at the start of the experiment, a Perkin Elmer Backseal sticker was applied to the bottom of the plate, and the culture medium was replaced with 80 µL of PBS (with 0.03% ascorbic acid, 100 mg/L CaCl₂, and MgSO₄) followed by the addition of 10 µL of 50 µM coelenterazine-h (final concentration 5 µM) and 10 µL of 2 mM phosphodiesterase inhibitor IBMX (final concentration 200 µM). After 10 min of incubation with Rluc substrate, 10 µL of tested compounds or vehicle were added. For screening, compounds were used at a final concentration of 50-250 µM. For EC50 following concentrations were used: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 µM). Isoproterenol (an agonist of the endogenous β2-adrenergic receptor HEK293T) at 1 µM and the nonspecific adenylylate cyclase activator forskolin at 20 µM were used as positive controls. DMSO concentration did not exceed 1%. BRET signal was analyzed dynamically for 20 minutes using Mithras Centro XS3 LB 960 plate reader (Berthold Technologies, Germany) with optical filters of 465-505 nm for the donor (Rluc) and 515-555 nm for the acceptor (YFP). Data were analyzed using MicroWin software. BRET signal was calculated as the ratio of light emitted at 540 nm to light emitted at 480 nm (YFP/Rluc). Next, $\Delta\text{BRET} = \text{BRET ratio (PBS)} - \text{BRET ratio (compound)}$ was calculated. ΔBRET values were used to plot the EC50. BRET ratio

Rluc/YFP was used to better represent the results of the screening. The experiment scheme is shown in Figure 2.

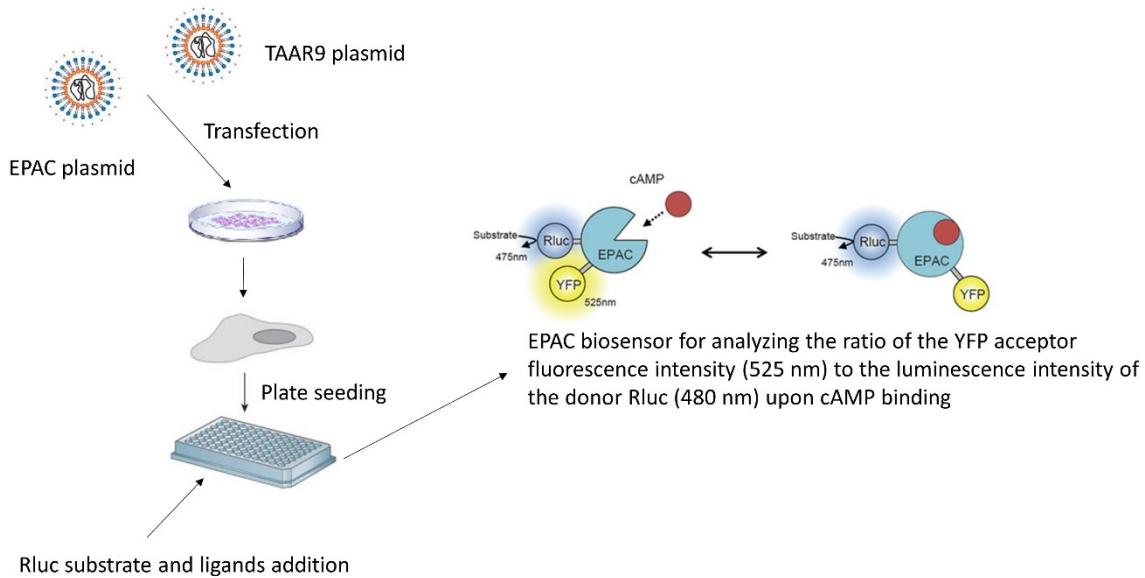


Figure 2. Schematic of the TAAR9 agonist screening experiment using BRET. Illustration of the EPAC biosensor is from Salahpour, 2012.

3.4 Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM. The graphs also show individual values as points. Data were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney *U* test. Two-way ANOVA with Bonferroni *posthoc* test was used to analyze continuous iButton temperature recording. Dose-response curves were fitted with non-linear curve fitting. Analysis was performed using GraphPad Prism version 8.0 for Windows from GraphPad Software, San Diego, CA, USA (www.graphpad.com). Values of $p < 0.05$ were considered significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4 Results

4.1 Chapter 1. A pattern of TAARs expression

4.1.1 Expression of *Taars* in mouse and rat tissues

The study of TAARs is complicated by the current lack of specific antibodies and selective agonists/antagonists. The lack of specific antibodies does not allow to obtain relevant data on TAAR expression at the protein level. Therefore, TAAR expression mostly can be assessed at the mRNA level using reverse transcription and in situ hybridization methods. The coding region of *Taar* genes, except *Taar2*, is consisted of one exon. Therefore, we could not use primers specific to cDNA but not genomic DNA. Here, for each sample, we used RT (-) control to check genomic DNA contamination: RNA without reverse transcriptase added during reverse transcription and thus not containing cDNA. A double check was performed by analyzing the fluorescence signal on the melting curve of RT (-) control and agarose gel electrophoresis. Samples clean in both cases were included in the analysis. In the mouse, *Taar2*, *Taar6*, and *Taar9* were examined by RT-PCR in the following tissues: olfactory epithelium, olfactory bulb, striatum, cerebellum, brainstem, hippocampus, hypothalamus, frontal cortex, cervical spinal cord; *Taar5* in cerebellum and brainstem. In rats, the expression pattern of *Taar9* was examined in the following tissues: olfactory epithelium, striatum, medulla oblongata, midbrain (substantia nigra, ventral tegmental area), nucleus accumbens, hippocampus, hypothalamus, cerebellum, small intestine, large intestine, liver, spleen, kidney, adrenal gland, testes.

Expression of mouse *Taar2*, *Taar6*, and *Taar9* was confirmed in the olfactory epithelium and olfactory bulb. In the mouse, *Taar2* expression was also found in the cortex, hypothalamus, and brainstem [9], *Taar5* – in the cerebellum and brainstem [92], *Taar6* – in the frontal cortex [103], *Taar9* – in the cerebellum (Figure 3). No *Taar9* mRNA was found in any of the other studied mouse brain structures. However, in rats, *Taar9* gene expression was much more diverse: mRNA was detected in the ventral tegmental area, substantia nigra, and nucleus accumbens (Figure 4). *Taar9* mRNA was also present in the ventral hippocampus, hypothalamus, and medulla oblongata. In the periphery, expression was confirmed in the olfactory epithelium and testes. The expression could not be detected in the liver and small and large intestines, and the amount of RNA isolated from brown and

white adipose tissue was insufficient for analysis. The highest level of expression was observed in the olfactory epithelium.

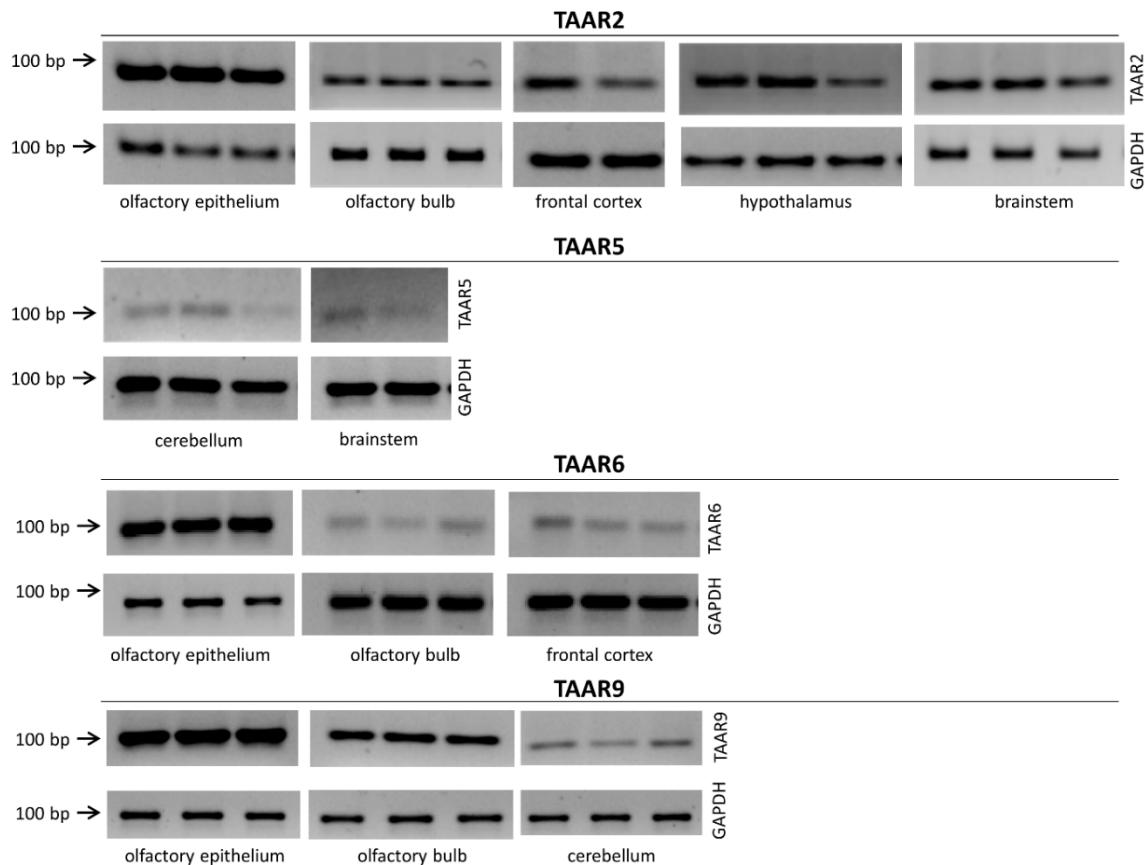


Figure 3. Taar gene expression in mouse tissues by RT-PCR. RT-PCR products were applied to a 2% agarose gel. 10 μ L of *Taar* amplicons, 4-5 μ L of *Gapdh* amplicons as an internal RNA loading control were applied to the gel.

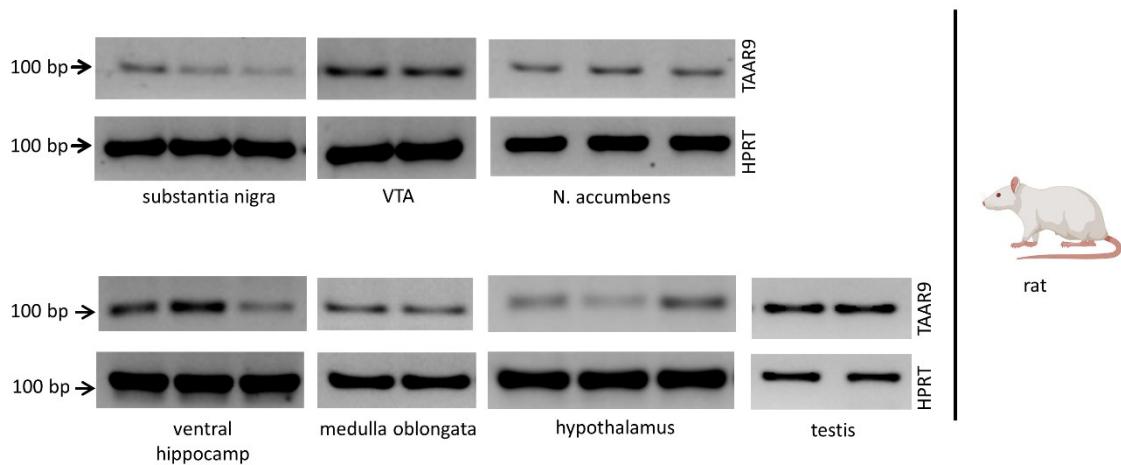


Figure 4. *Taar9* gene expression in rat tissues by RT-PCR. RT-PCR products were applied to a 2% agarose gel. 10 μ L of *Taar9* amplicons and 4-5 μ L of *Hprt* amplicons were applied to the gel. Rat *Hprt* gene was used as an internal RNA loading control.

4.1.2 Meta-analysis of *TAAR9* gene expression data

We expanded our RT-PCR analysis of *TAAR9* expression with data from open databases. For this purpose, we performed a meta-analysis of RNA sequencing data of mouse and human brain structures from the GEO database. Thirteen datasets containing data from human brain tissue studies and 15 murine datasets were analyzed. Additionally, 3 datasets from studies of individual midbrain dopaminergic neurons (GSE64452) and a cholinergic interneuron fraction of the mouse nucleus accumbens (GSE130376) were analyzed; as well as a cytoplasmic and nuclear fraction of D1- and D2- medium spiny neurons (MSN) (GSE121199). Information about datasets and a number of samples analyzed is given in Appendix 1 for humans, and Appendix 2 for mice. According to our previous experience, currently, there are no suitable rat datasets in the GEO repository, so we focused on *TAAR9* expression in mouse and human brain structures.

In humans, the most represented structure was cortex (prefrontal cortex = 121 samples, cingulate cortex = 32 samples, motor cortex = 13, parietal cortex = 10, frontal cortex = 5). Of these, in the single GSE135838 dataset, expression of *TAAR9* mRNA was detected in two of the five parietal cortex samples at 0.25 TPM (cut-off = 0.1). In the nucleus accumbens, *TAAR9* expression was below cut-off in all 81 samples, as well as in the hippocampus and corpus callosum. In the putamen, *TAAR9* expression was above cut-off in two of 59 samples. In the caudate nucleus of the striatum, *TAAR9* expression was above the threshold in 10 of 59 samples (Figure 5a).

According to our RT-PCR data, *Taar9* is expressed extremely weakly in the mouse brain. However, analysis of the GEO repository data showed that this is true for the whole tissue fragments. When sequencing individual cell fractions, namely MSNs and cholinergic interneurons of the nucleus accumbens, expression of *Taar9* was higher than the threshold value (Figure 5b).

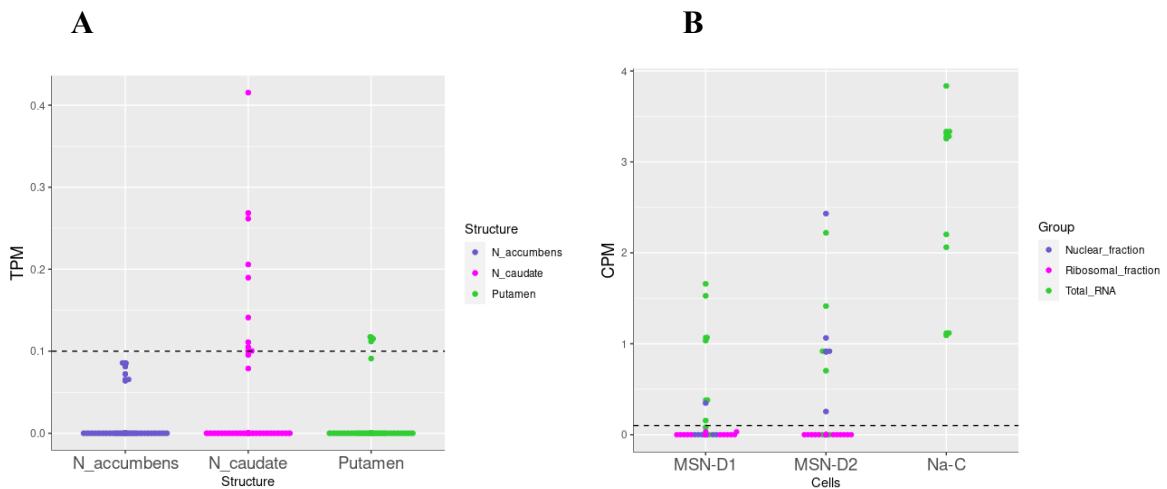


Figure 5. Normalized data of RNA sequencing A) of human striatal nuclei: accumbens (N_accumbens), caudate (N_caudate) and putamen; (B) Cell fractions of neurons in the mouse nucleus accumbens. MSN-D1, MSN-D2 - medium spiny neurons, Na-C - cholinergic interneurons. Black dotted line - cut-off =0.1

4.2 Chapter 2. Characterization of TAAR9-KO rats

As *Taar9* expression pattern analysis showed, rats have a much more interesting and pronounced expression in the CNS compared to mice. Therefore, rats were chosen for *Taar9* gene knockout as a model to study the role of the receptor.

4.2.1 Generation of TAAR9-KO Rats

For the development of new mutant animal lines, CRISPR/Cas9 technology is now the preferred method [104]. Due to its high speed and accuracy, CRISPR/Cas9 makes it possible to obtain a knockout animal already in the first generation. The method is based on introducing a double-stranded break in the DNA of the gene to be switched off, followed by SOS repair. To generate knockout rats, we targeted rat *Taar9* gene by using CRISPR/Cas9 genome editing. A single guide RNA (sgRNA) and protospacer adjacent motif (PAM) were designed to target the coding strand of the rat *Taar9* gene with a predicted cut site 5 bp downstream of the translation initiation codon (Figure 6A). A total of 31 embryos microinjected with sgRNA and Cas9 mRNA were implanted to foster mothers that resulted in the birth of 17 founder offspring, which were analyzed for edits. Two founders carried mutations in the targeted region, deletion of cytosine, and insertion of adenine (Figure 6B), and gave rise to two TAAR9-KO rat lines, TAAR9-KO-delC and TAAR9-KO-insA, respectively [93]. Both mutations led to the loss of the *SacI* restriction site (Figure 6B), that was used to distinguish WT and KO alleles for the genotyping of the animals (Figure 6C). The selected founders were backcrossed to WT rats to generate the heterozygous (HET) F1 and F2 generations. While we continued backcrossing to exclude potential off-target mutations from CRISPR/Cas9 genetic manipulations [105], we also expanded a colony of F2 generation to perform part of the experiments (refer to 3.2.5). By observing similar alterations in two independently developed strains of knockout of the same gene, we excluded the likelihood of the contribution of off-target mutations to the effects observed [93].

4.2.2 Validation of TAAR9-KO Rats

WT, HET, and KO animals for the TAAR9 of both strains were born at close to Mendelian ratios, and homozygous KO animals were viable and reached adulthood without any overt phenotypes. Next, we performed validation of the TAAR9-KO animals at the

mRNA level. mRNA was isolated from an olfactory epithelium (OE), the site with the highest TAAR9 expression [5], of WT and both KO-insA and KO-delC TAAR9-KO strains, reverse-transcribed into cDNA and quantified by qPCR.

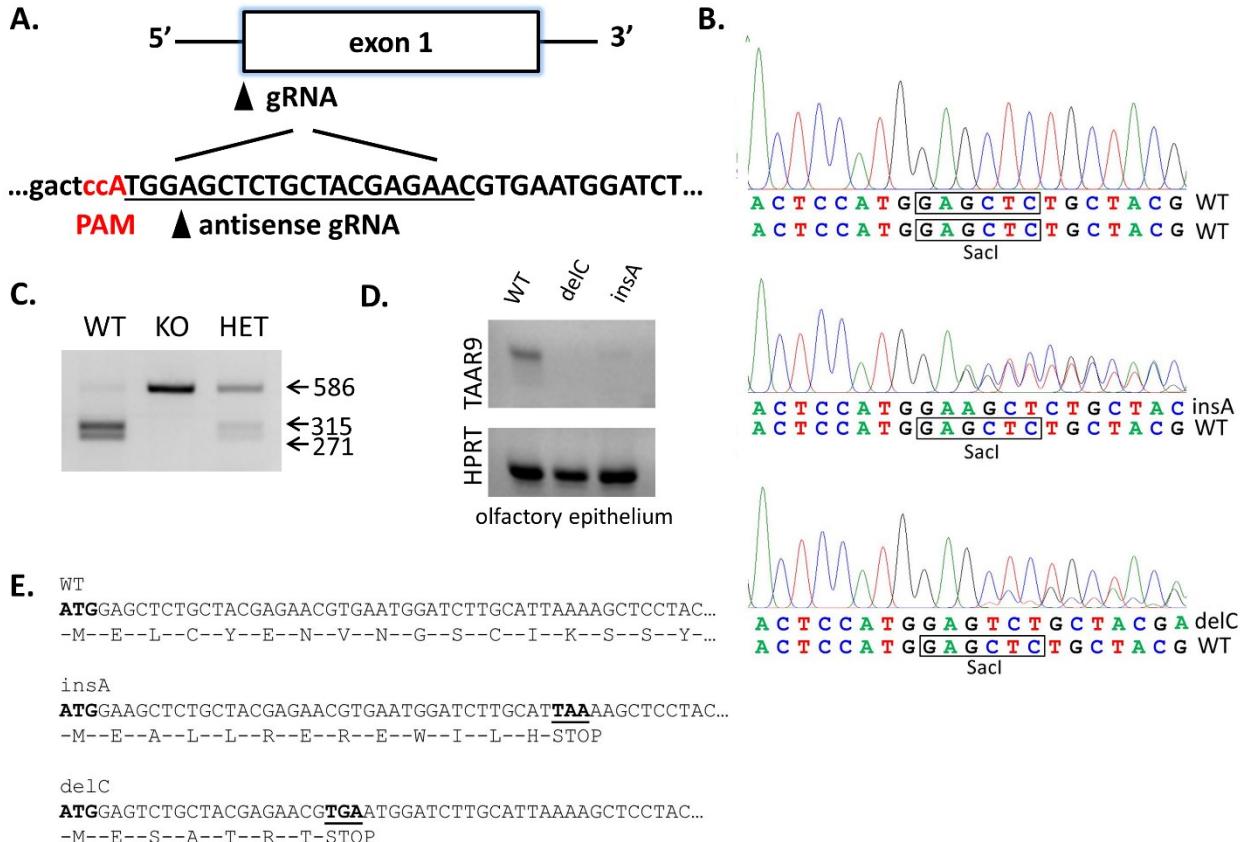


Figure 6. Generation of TAAR9-KO rats. (A) Diagram of the TAAR9 exon 1 sgRNA. The sgRNA sequence is underlined. Protospacer adjacent motif (PAM) sequence is indicated in red; the arrow indicates the Cas9 cutting site; the sequence in capital letters indicates the TAAR9 open reading frame. (B) Chromatograms of the TAAR9 genomic sequence from WT (upper panel), heterozygous insA (middle panel), and heterozygous delC (lower panel) animals. The black frame indicates the *SacI* restriction site on the WT allele. The *SacI* site was destroyed by both A insertion and C deletion. (C) Genotyping of TAAR9-KO rats generated by CRISPR/Cas9 technology by *SacI* digestion of PCR fragments. Undigested 586 bp band corresponds to the KO allele; the appearance of two bands, 315 bp and 271 bp, corresponds to a WT allele. The presence of all three bands corresponds to a heterozygous animal. (D) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with TAAR9- and HPRT (housekeeping gene)-specific primers using RNA isolated from the main olfactory epithelium (MOE) of WT, KO-delC, and KO-insA rats. (E) N-terminal TAAR9 protein sequences of the WT, KO-insA, and KO-delC animals. Both A insertion and C deletion result in a premature stop codon and synthesis of short, non-functional peptides. From Murtazina et al. 2021 with modifications.

Although housekeeping transcripts (*Hprt*) were identified in all probes analyzed, *Taar9* mRNA was expressed only in WT animals but was undetectable in mutant rats by qPCR. Additionally, a drastic reduction in TAAR9 expression was visible when PCR products were run on the agarose gel (Figure 6D). Both mutations lead to a reading frame

shift resulting in a premature stop codon (Figure 6E). The insertion of a premature termination codon in exon 1 in both strains may result in a loss of mRNA expression likely due to the nonsense-mediated decay of mRNA [106].

4.2.3 Phenotyping of two independent lines of TAAR9-KO rats

As indicated earlier, two lines of rats with the TAAR9 gene knockout were established. In this work, a simultaneous comparative analysis of three groups was performed: wild-type, TAAR9-KO-delC (KO-delC), and TAAR9-KO-insA (KO-insA). Examining two distinct knockout lines with separate mutations that result in the knockout of the same gene can be advantageous in obtaining accurate results from gene knockout, free from the impact of external factors such as off-target effects after CRISPR.

As previous studies have shown differences in behavior and levels of dopamine and serotonin in other TAAR knockout lines (such as TAAR2 and TAAR5) [7–9], we initiated the phenotyping of TAAR9-KO by conducting behavioral tests and analyzing monoamine levels in the brain.

4.2.3.1 Behavioral analysis

For behavioral analysis, 3-month-old male littermates were divided into three groups: wild type, KO-delC, and KO-insA. Open Field test was conducted to measure basic locomotor activity. Time spent in the central area, speed, and distance traveled were measured. However, the differences observed in these parameters in animals of the three groups were negligible (Figure 7).

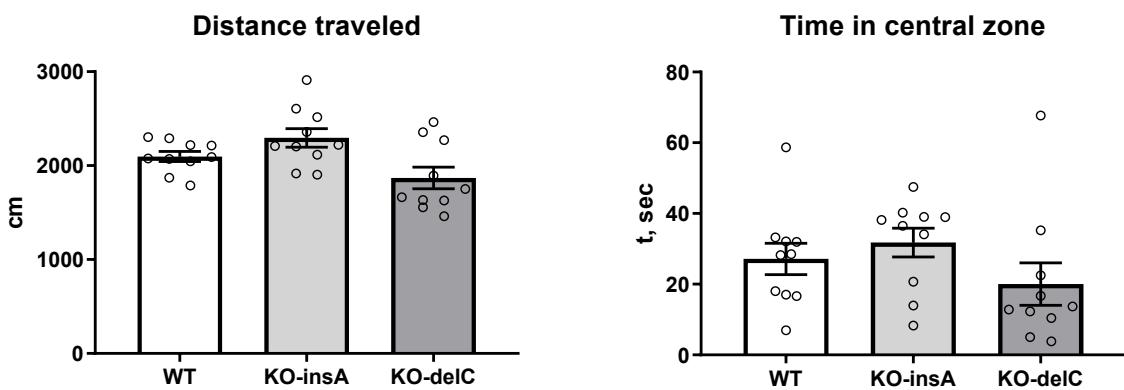


Figure 7. Open field test in animals of three genotypes.

Two methods were used to assess memory in rats: Open field with novel object and T-test. In the Open field with a novel object test, which is used to analyze long-term

memory, there were no differences in the time in the zone with a novel object between the three groups. The duration of sniffing novel object was also comparable. In the T-test used for short-term memory, rats of both lines with TAAR9 knockout also did not differ in the time spent in the novel arm (Figure 8).

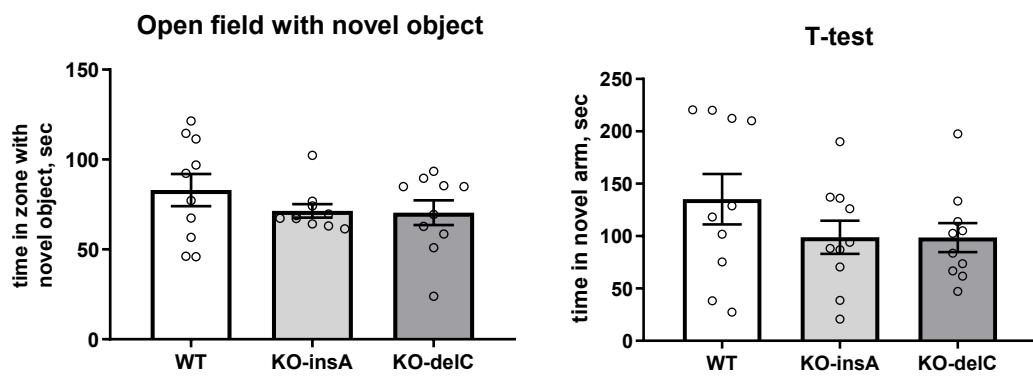


Figure 8. Study of two TAAR9-KO lines in the Open field with novel object and T-Test

To assess general anxiety in rats, we used Elevated Plus Maze (EPM) test. Normally, rodents prefer to stay in closed sleeves, so exploratory behavior in open sleeves is considered an indicator of reduced anxiety. In the EPM test, time spent in open and closed arms, as well as the time spent in the central zone, did not differ between the animals of the three groups. Vertical activity in the form of rears and head dips from open sleeves, as well as grooming duration were also comparable. (Figure 9).

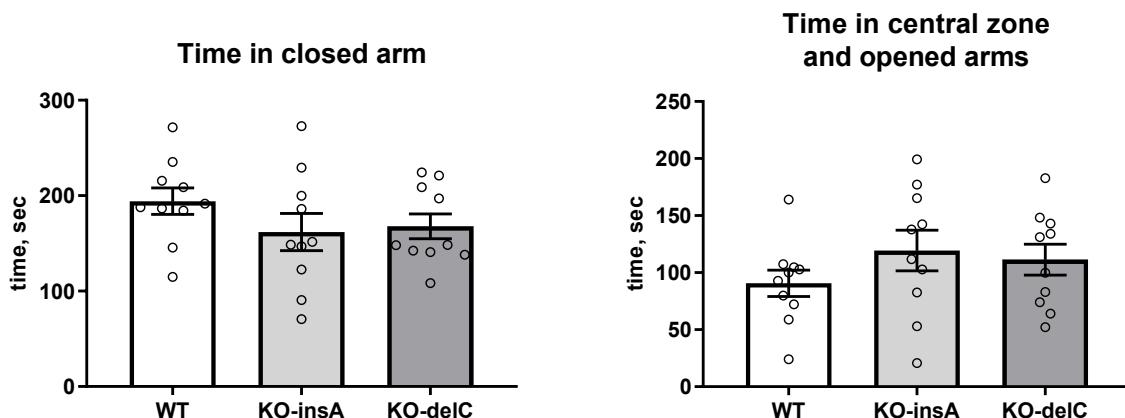


Figure 9. A study of anxiety levels in the Elevated Plus Maze test.

Depressive-like behavior in TAAR9-KO rats of both groups was studied using Forced swim test. This test assesses animals' resistance to stressful influences. There were no differences in active, passive swimming, and freezing in the three groups (Figure 10).

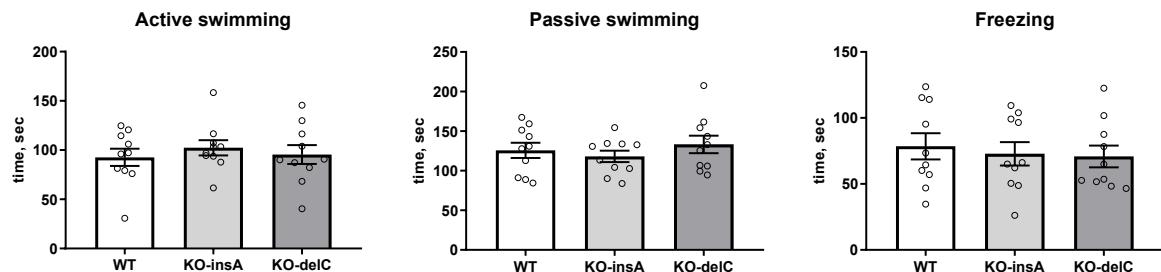


Figure 10. Forced swim test used assessing depressive-like behavior in animals.

In the stress-induced hyperthermia test assessing stress-induced temperature increase in animals of both knockout lines, the ΔT parameter was reduced (KO-insA $0.86 \pm 0.06^\circ\text{C}$; KO-delC $0.8 \pm 0.09^\circ\text{C}$ versus WT $1.26 \pm 0.05^\circ\text{C}$, $p < 0.0005$) (Figure 11).

Thus, based on the results of the comparison of two knockout lines, we found no significant differences in most of the behavioral tests, however, in the stress-induced hyperthermia ΔT parameter was reduced.

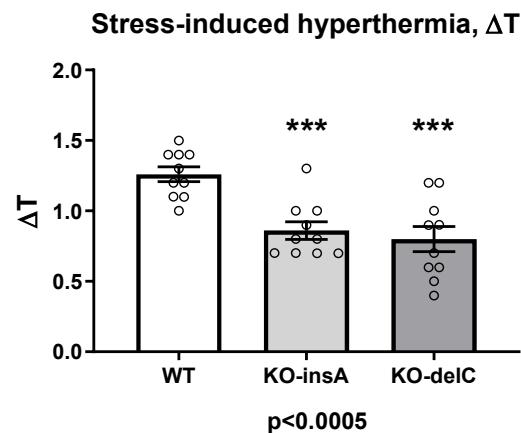


Figure 11: Change in ΔT in animals of the two knockout lines in the stress-induced hyperthermia test.

4.2.3.2 Analysis of monoamine content in brain tissues of animals of three genotypes

After behavioral analysis, the content of the monoamines in the brain of knockout animals of two lines was evaluated. We measured the levels of dopamine and its metabolites DOPAC and HVA; serotonin and its metabolite 5-HIAA; and noradrenaline in

the frontal cortex and striatum. Assessing the concentration of monoaminergic neurotransmitters, such as dopamine and serotonin, requires special conditions and a well-established measurement technique because they are found in the brain in relatively low concentrations and are easily degraded. HPLC-ED allowed us to detect even low concentrations of monoamines with high accuracy and work with low sample volume (Figure 12).

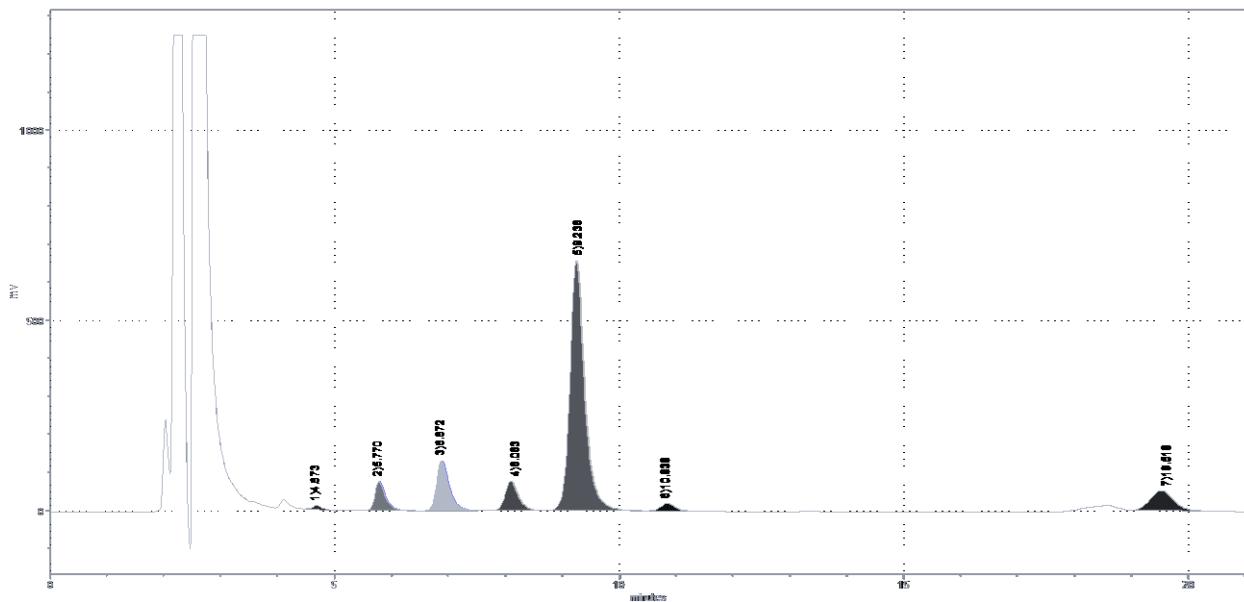


Figure 12. Example chromatogram of rat striatum with 7 separate peaks of individual substances separated by HPLC-ED and eluted at specific exit times. 1) noradrenaline, 2) DOPAC, 3) DHBA standard (internal control), 4) 5-HIAA, 5) dopamine, 6) HVA, 7) serotonin

In the cortex, we found no significant changes in the levels of dopamine and its metabolites, as well as serotonin and norepinephrine (Figure 13). Similarly, in the striatum, all parameters did not differ in the TAAR9 knockout and wild-type groups (Figure 14).

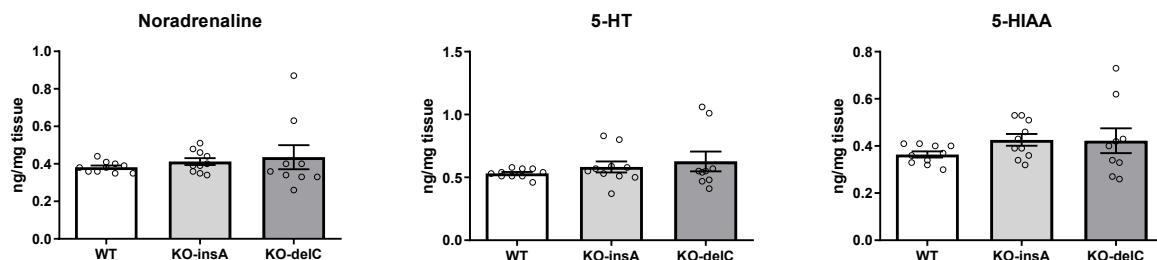


Figure 13. Assessment of serotonin and its metabolite 5-HIAA and norepinephrine content in the TAAR9-KO and WT groups in the cortex.

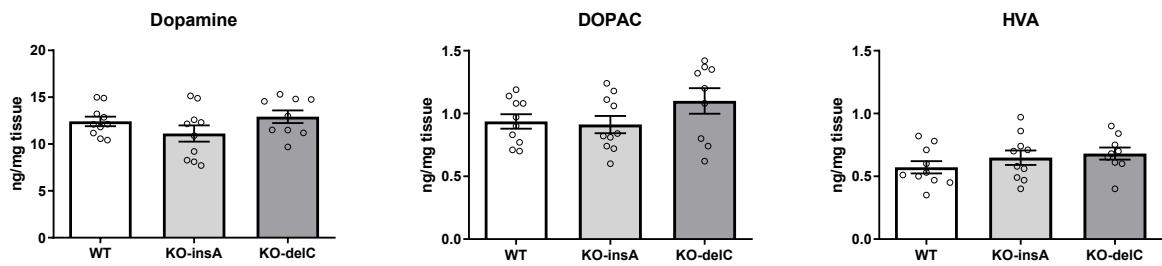


Figure 14: Assessment of the content of dopamine and its metabolites in the striatum of TAAR9-KO and WT rats.

4.2.3.3 *Assessment of daily food and water intake*

Interestingly, in both groups of animals with TAAR9 knockout, a comparative analysis of blood biochemistry revealed a significant decrease in total cholesterol and LDL cholesterol. These data were published in the article [93]. The non-random role of TAAR9 is indicated by a decrease in both lines with TAAR9 knockout. This discovery was unexpected because at present the involvement of TAAR in lipid metabolism is an unexplored area. We also made a comparative analysis of microbiota composition in wild-type and TAAR9-knockout animals [107], which revealed an increase in bacterial species diversity in TAAR9-KO, as well as the appearance of the genus *Saccharimonas*, which was absent in the wild-type. However, the question of what can be caused by the decrease in cholesterol levels when the TAAR9 gene is knocked out should be investigated in further works.

Considering lipid metabolism changes, in this work the amount of food and water intake in WT and one line of TAAR9-KO-delC was evaluated for four days. The weight of the animals did not differ, and the amount of food and water intake by the knockouts was slightly lower. However, when converted to animal weight, there was no difference

between the two groups, indicating that there was no change in food and water intake (Figure 15).

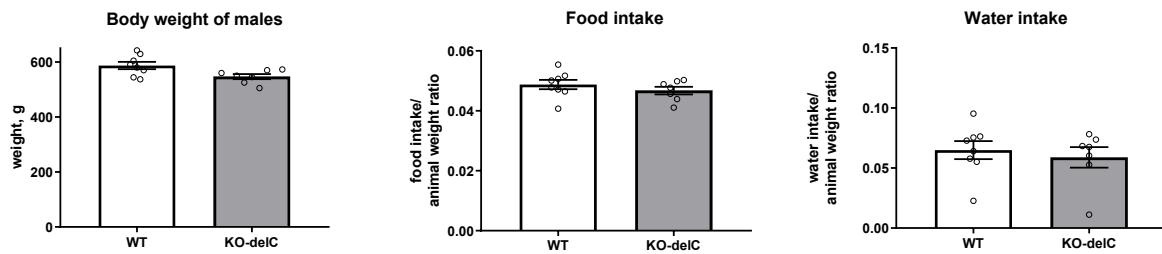


Figure 15. Analysis of daily food and water consumption in the wild-type and knockout groups revealed no differences. The weight of males in the knockout group was also comparable to that of the wild type

4.2.4 *Phenotyping TAAR9-KO after backcrossing*

After obtaining data on the evaluation of various parameters in the two lines with the Taar9 gene knockout described above, the backcrossing was continued and completed. The experiments were then repeated, and new ones were added in one line. At this time, only one TAAR9-KO-delC (hereafter designated as KO or TAAR9-KO), after 6-fold backcrossing was used. For behavioral, and neurochemical analyses, 3-4-month-old WT and KO male littermates were used ($n=8$).

4.2.4.1 TAAR9 gene knockout does not cause behavioral changes

The open field test again was used to analyze the locomotor activity of the rats. There were no differences in TAAR9-KO rats as in the previous step. (Figure 16). Other parameters, including time in the central zone, number of rears, and grooming duration

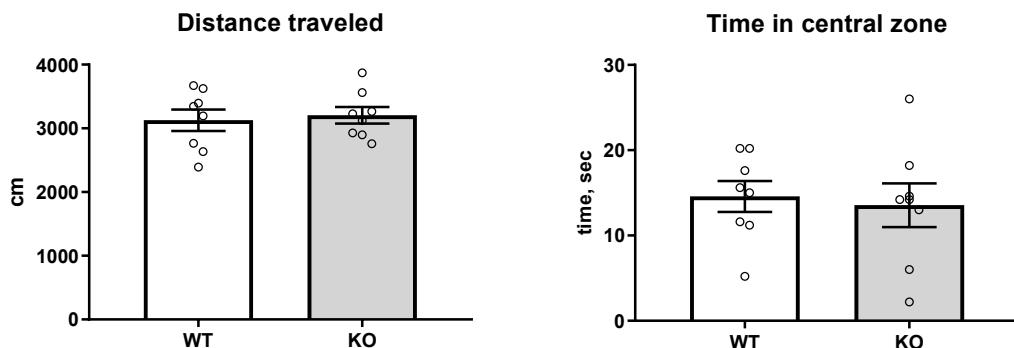


Figure 16. TAAR9-KO and WT parameters in the Open Field test. Distance traveled and time in the central zone (an indicator of anxiety-like behavior) did not differ. were comparable as well.

As previously, two tests were repeated to examine memory. The Open Field test with a novel object was used to investigate long-term memory function. Time spent in the area with a new object and time spent sniffing the object did not differ in TAAR9-KO rats (Figure 17). To measure short-term memory, a T-maze was used, in which there was also no significant difference between the two groups (Figure 17).

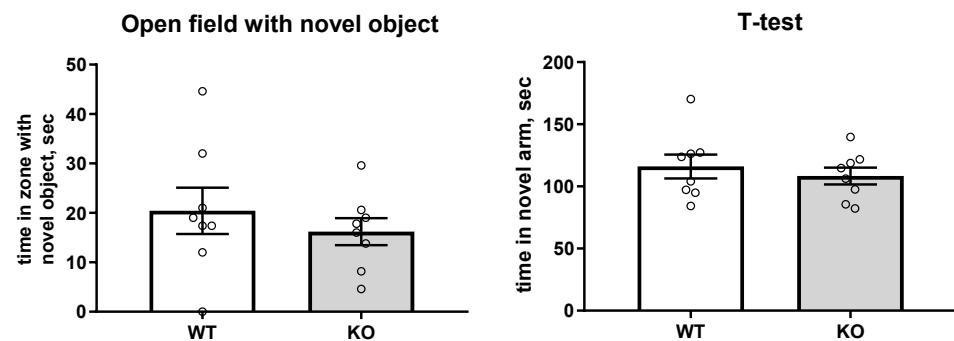


Figure 17. TAAR9-KO and WT parameters in memory tests: Open field test with novel object; T-test.

The EPM test was used to measure the level of anxiety. Distance traveled, time in closed sleeves, and a number of rears and head dips also did not differ in TAAR9-KO rats compared to WT rats (Figure 18).

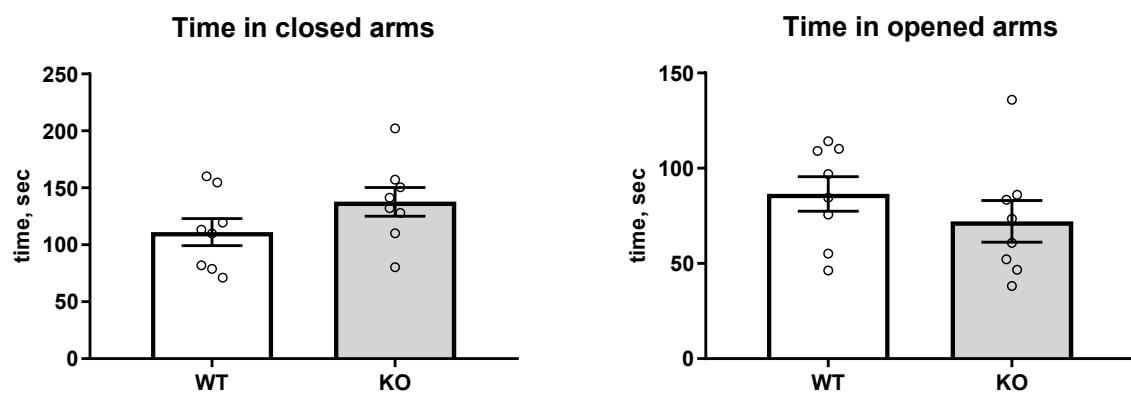


Figure 18. TAAR9-KO and WT parameters in the EPM test.

The forced swim test repeatedly showed no differences between the two groups. We compared freezing time, passive and active swimming time (Figure 19).

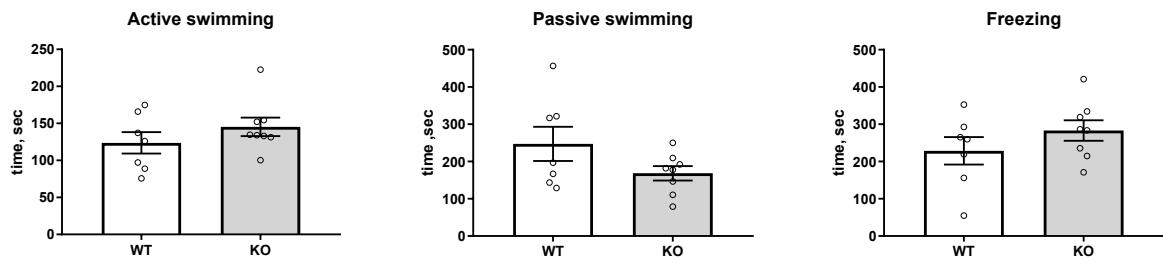


Figure 19. Comparative study of the two groups in the Forced swim test.

The stress-induced hyperthermia test revealed a decrease in ΔT (KO = 0.88 ± 0.10 versus WT = 1.3 ± 0.09 , $p < 0.05$) (Figure 20). We previously observed the same decrease in ΔT in animals of two KO lines, indicating the contribution of *Taar9* gene knockout to this effect.

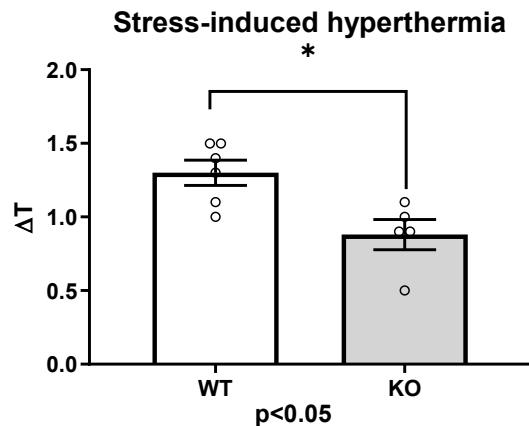


Figure 20. TAAR9-KO and WT parameters in stress-induced hyperthermia test. TAAR9 gene knockout reduces ΔT in stress-induced hyperthermia test.

4.2.4.2 Monoamine levels in the TAAR9-KO brain after backcrossing

Previously, when comparing monoamine levels in the striatum and cortex of the wild-type and two knockout groups, we found no significant differences. When repeating the analysis on the TAAR9-KO-delC group after backcrossing, we supplemented the structures with the hypothalamus. In the frontal cortex, the levels of dopamine and serotonin and their metabolites in the knockouts repeatedly did not differ from those of the wild type. From the data obtained, we can assume that TAAR9 knockout has no significant effect on the monoaminergic system in the cortex (Table 5).

Table 5. Content of monoamine neurotransmitters and their metabolites in the frontal cortex of wild-type and knockout rats.

	WT	\pm SEM	KO	\pm SEM
Dopamine	0.078	0.004	0.067	0.003
DOPAC	0.019	0.001	0.020	0.002
HVA	0.012	0.001	0.010	0.002
5-HT	0.572	0.030	0.607	0.024
5-HIAA	0.197	0.009	0.186	0.012
Noradrenaline	0.595	0.031	0.559	0.018

Data are presented as ng/mg tissue.

Similarly to the cortex in the striatum, the levels of norepinephrine, serotonin, and its metabolites, did not differ from those of the wild type (Figure 21). However, this time, the concentration of DOPAC, a dopamine metabolite, produced by the MAO-A enzyme, was slightly lower in Taar9 knockout animals (0.94 ± 0.07 ng/mg tissue in the KO group versus 1.19 ± 0.94 ng/mg tissue in the WT group). The levels of dopamine and another metabolite of HVA were nevertheless comparable to those of the wild type.

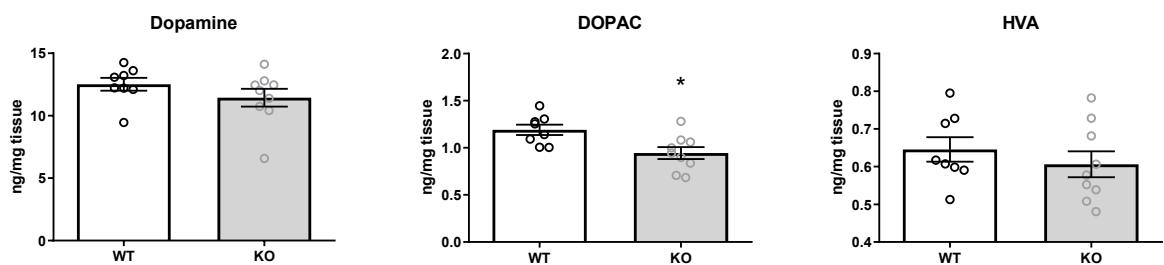


Figure 21. Determination of the concentration of dopamine and its metabolites in rat striatum. WT - wild type, KO - TAAR9 knockout. * $p < 0.05$

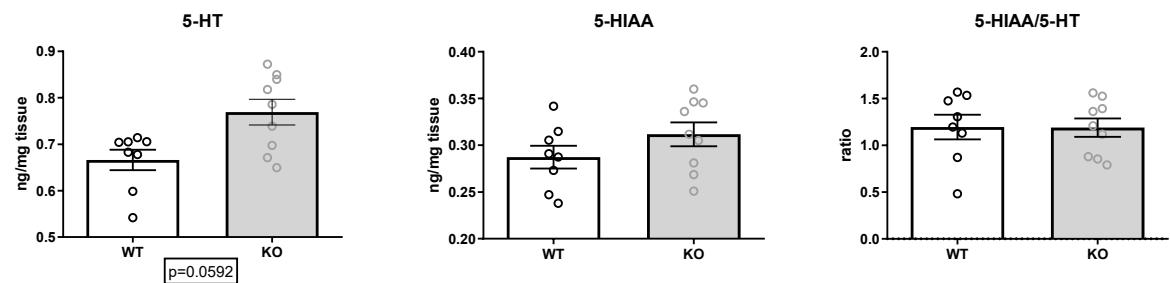


Figure 22. Determination of the concentration of serotonin and its metabolite 5-HIAA in rat hypothalamus.

In the hypothalamus, there were no significant changes in the content of serotonin and its metabolite 5-HIAA, although there was a slight increase in serotonin levels, it did not reach statistical significance (Figure 22).

However, there was a statistically significant increase in dopamine levels in TAAR9-KO animals (0.48 ± 0.04 ng/mg tissue in the KO group versus 0.33 ± 0.03 ng/mg tissue in the WT group, $p=0.023$) (Figure 23). Dopamine metabolites, DOPAC and HVA, were at the same level as in wild-type animals.

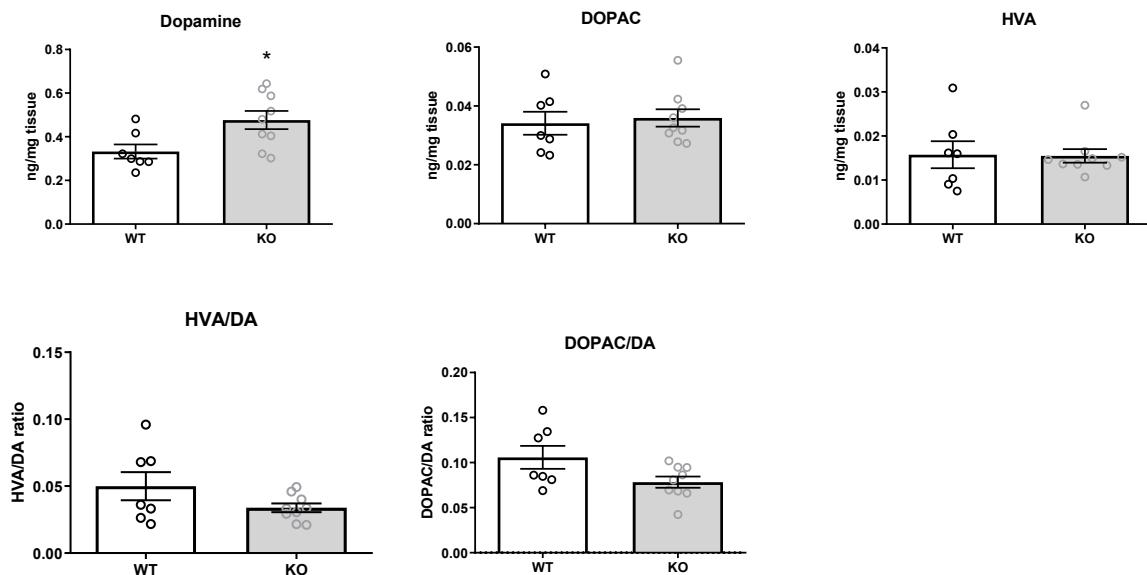


Figure 23: Determination of the concentration of dopamine and their metabolites in the rat hypothalamus. WT - wild type, KO - TAAR9 knockout.

4.2.5 Continuous body temperature analysis of TAAR9-KO rats

Due to changes in the stress-induced hyperthermia test, daily temperature measurements were performed on a separate group of TAAR9-KO-delC ($n=6$) and WT ($n=8$) for several weeks. Using IButton temperature sensors implanted intraperitoneally, temperature data were recorded for each animal with a measurement frequency of every 3 minutes. As shown in Figure 24, rats exhibited a clear diurnal rhythm of body temperature with low values during the inactive light phase ($36.85 \pm 0.15^\circ\text{C}$ in the WT group;

$37.13 \pm 0.39^\circ\text{C}$ in the KO group) and high values during the active dark phase ($37.86 \pm 0.19^\circ\text{C}$ in the WT group; $38.18 \pm 0.37^\circ\text{C}$ in the KO group) in both animal groups (Figure 24). The graph shows that the average temperature of the animals of the TAAR9-KO genotype was higher.

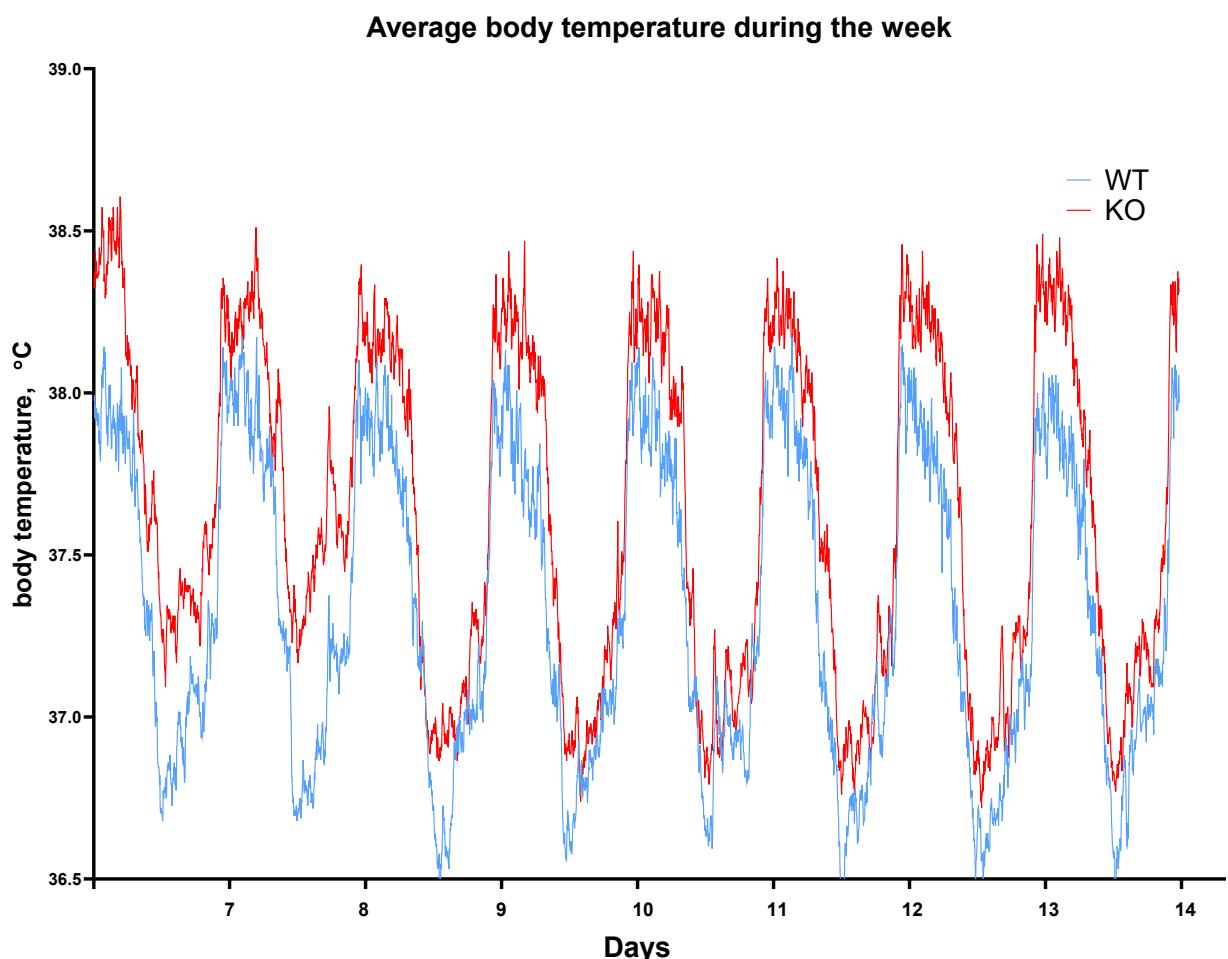


Figure 24. Dynamics of average body temperature in the group of wild-type and knockout animals during 8 days (Day 7 - Day 14). Data are presented as arithmetic mean. 1 division of the scale is 24 hours. A diurnal rhythm is seen, with temperature increasing during the active phase (night) and decreasing during the daytime period. The graph starts from the time 00:00 of day 7

Next, we compared the average temperature (average of 140 points obtained over 7 hours) of each animal during the daytime (12 to 19 hours) and nighttime (00 to 07 hours)

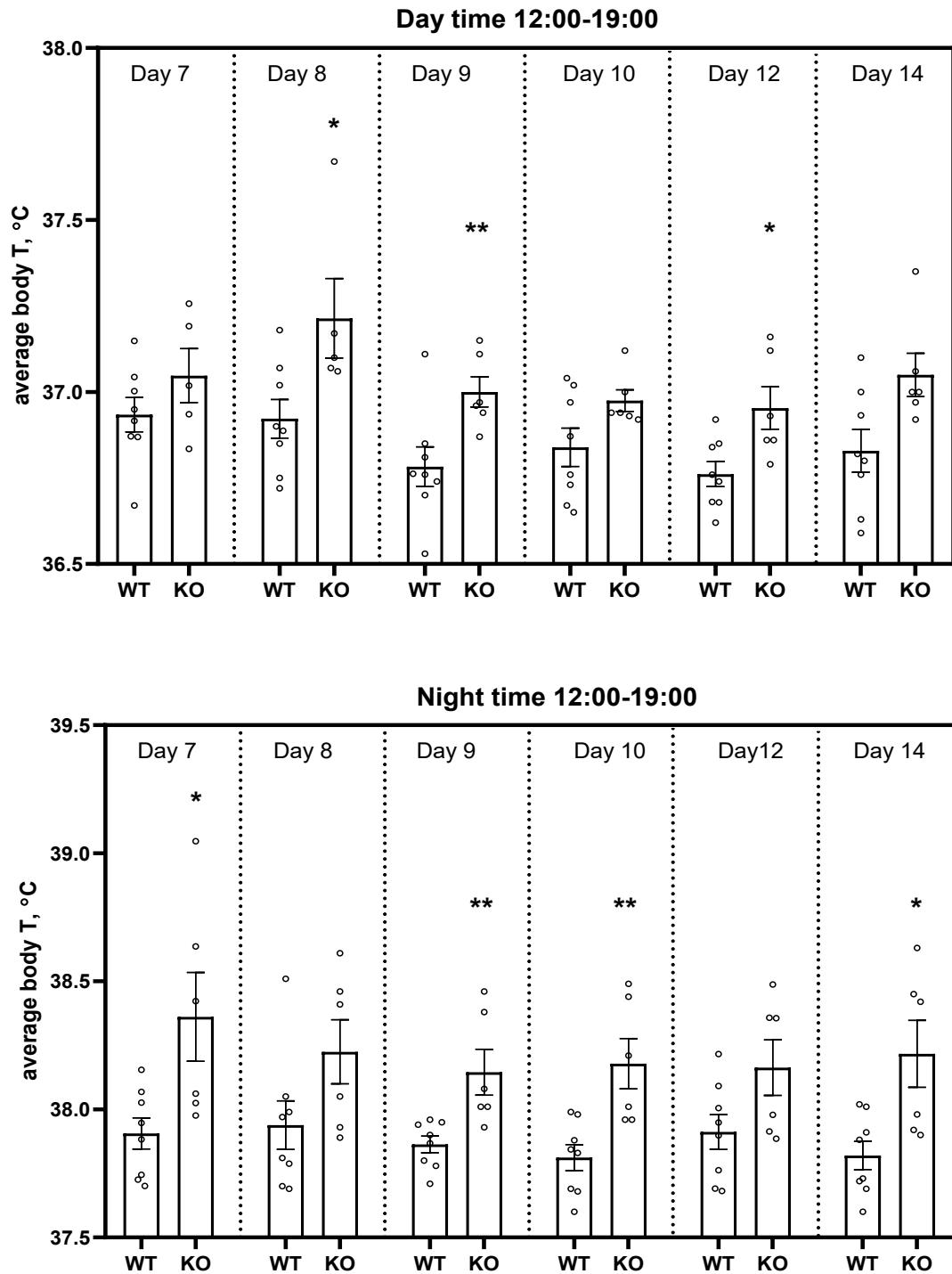


Figure 25. Comparison of the average temperature of each animal during the daytime (from 12 to 19 hours) and nighttime (from 00 to 07 hours) for several days. Almost all comparisons showed a statistically significant temperature increase, with a higher difference at night.

for several days. A statistically significant temperature increase was detected on almost all days, with a higher difference at night (Figure 25).

We further investigated the effect of exposure to heat and cold and immobilization stress on body temperature. Heating for 3 hours in the two subgroups could not be analyzed together due to the different duration of heating between the subgroups. Therefore, this effect should be investigated in future work. Immobilization stress according to our data revealed no differences in body temperature in the two groups (Figure 26).

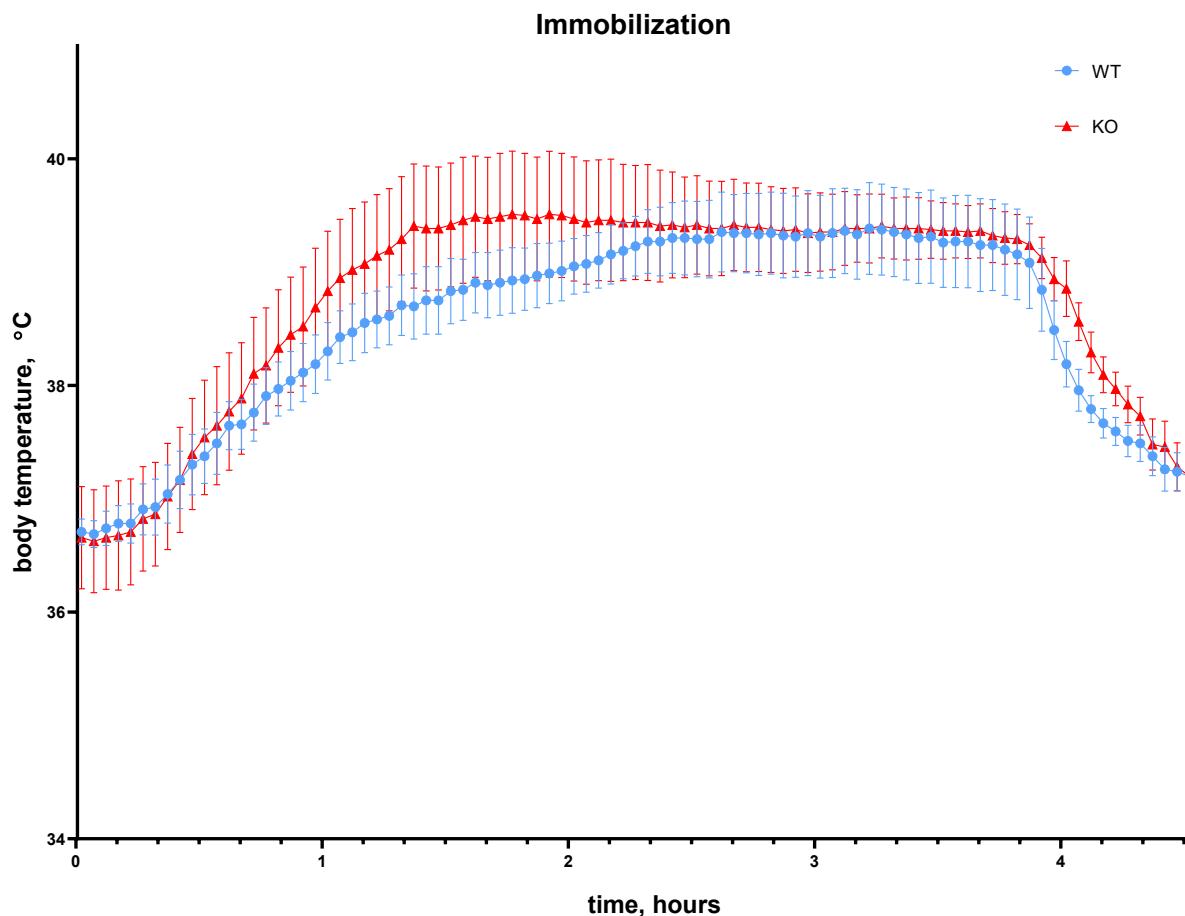


Figure 26. Effect of immobilization stress on the body temperature of TAAR9-KO and WT animals.

However, exposure to low temperatures revealed interesting changes. Animals were cooled in 17°C and 21°C water for 10 minutes. Experiments were performed several days apart. Next, temperature data from sensors obtained half an hour before exposure and for 4 hours afterward were analyzed. KO animals exhibited a decrease in body temperature at the same rate, but their temperature dropped lower compared to the wild type in both experiments, with a statistically significant difference at 17°C (Figure 27).

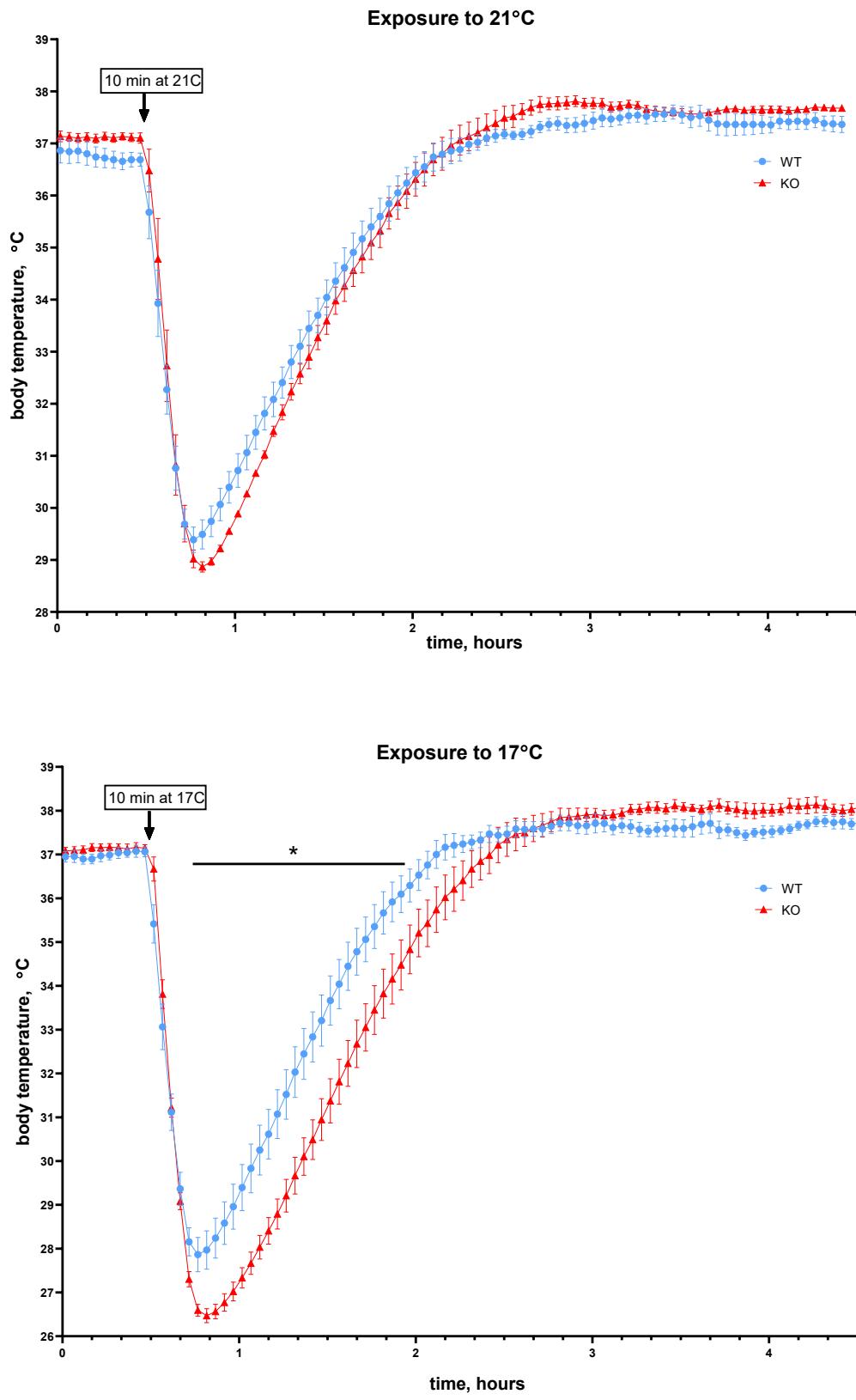


Figure 27. Effect of exposure to cold on body temperature of wild-type and TAAR9-KO animals.

4.2.6 Relative gene expression of key neuronal markers

Since *Taar9* gene expression was detected in several brain regions and leads to changes in monoamine levels, we decided to evaluate the level of gene expression of key proteins of the dopaminergic, glutamatergic, and serotoninergic systems in several brain structures after gene knockout in TAAR9-KO-delC and WT. The expression of genes of enzymes involved in neurotransmitter metabolism (TH, COMT, MAO-A, MAO-B, TPH2, Ache), dopamine receptors (D1DR, D2DR), neurotrophins (BDNF, CDNF) and transporters (DAT, GAT1) was assessed using real-time RT-PCR in the midbrain and medulla oblongata. Despite minimal differences, the level of all studied genes was comparable in both groups (Figure 28).

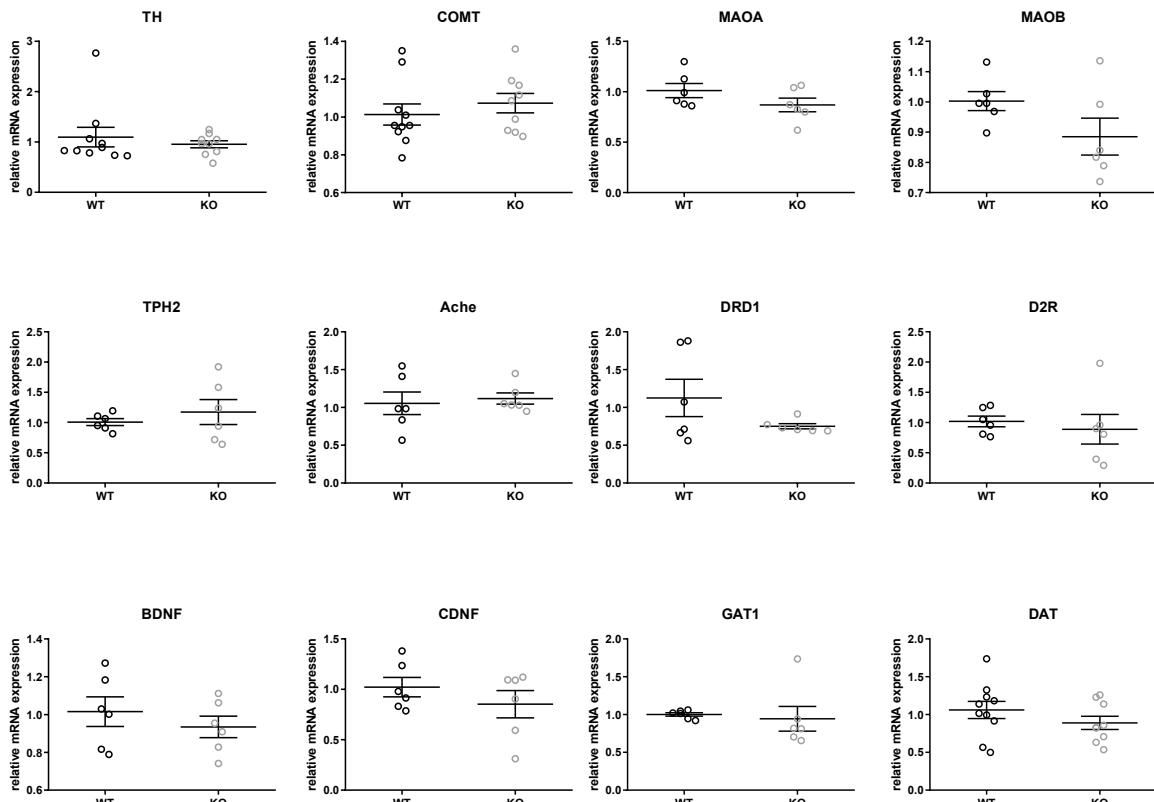


Figure 28. Comparative expression of genes of enzymes involved in neurotransmitter metabolism (TH, COMT, MAO-A, MAO-B, TPH2, Ache), neuronal receptors (D1DR, D2DR), neurotrophins (BDNF, CDNF) and transporters (DAT, GAT1) in the mid and medulla oblongata.

Similarly, expression was assessed in the striatum, olfactory bulb, and cortex (Appendix 4), where expression in the TAAR9-KO group was at the WT level. In the hypothalamus, we examined the expression level of dopamine receptors as well as the

enzymes tyrosine hydroxylase, MAO-A, and MAO-B, which did not differ in the two groups (Figure 29).

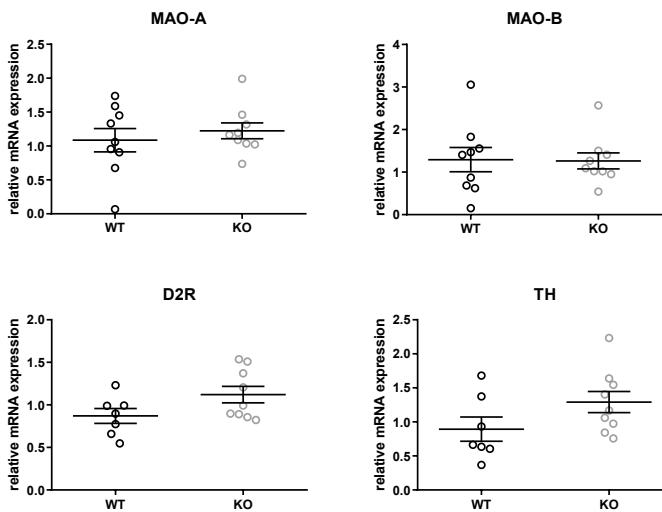


Figure 29. Gene expression levels in hypothalamic TAAR9-KO and WT.

Thus, the TAAR9 gene knockout does not cause significant changes in the expression of the studied genes.

4.2.7 Effects of TAAR9 agonists on olfaction

As will be shown below, we confirmed that the rat TAAR9 agonists are cadaverine and N-methylpiperidine. To assess possible changes in olfaction in animals with *Taar9* knockout when presented with TAAR9 agonists, an olfactory preference test was performed on wild type and TAAR9-KO-delC animals (Figure 30). According to the results, the investigation time of water and cadaverine (CAD) or N-methylpiperidine (PIP) was not different in the wild type group, as it was in the TAAR9-KO group. In the TAAR9-KO group, animals spent more time in the area with N-methylpiperidine than in the area with water, but the investigation time did not change. Thus, the olfactory test revealed no preference or aversion to the TAAR9 agonist in either wild type or TAAR9-KO group.

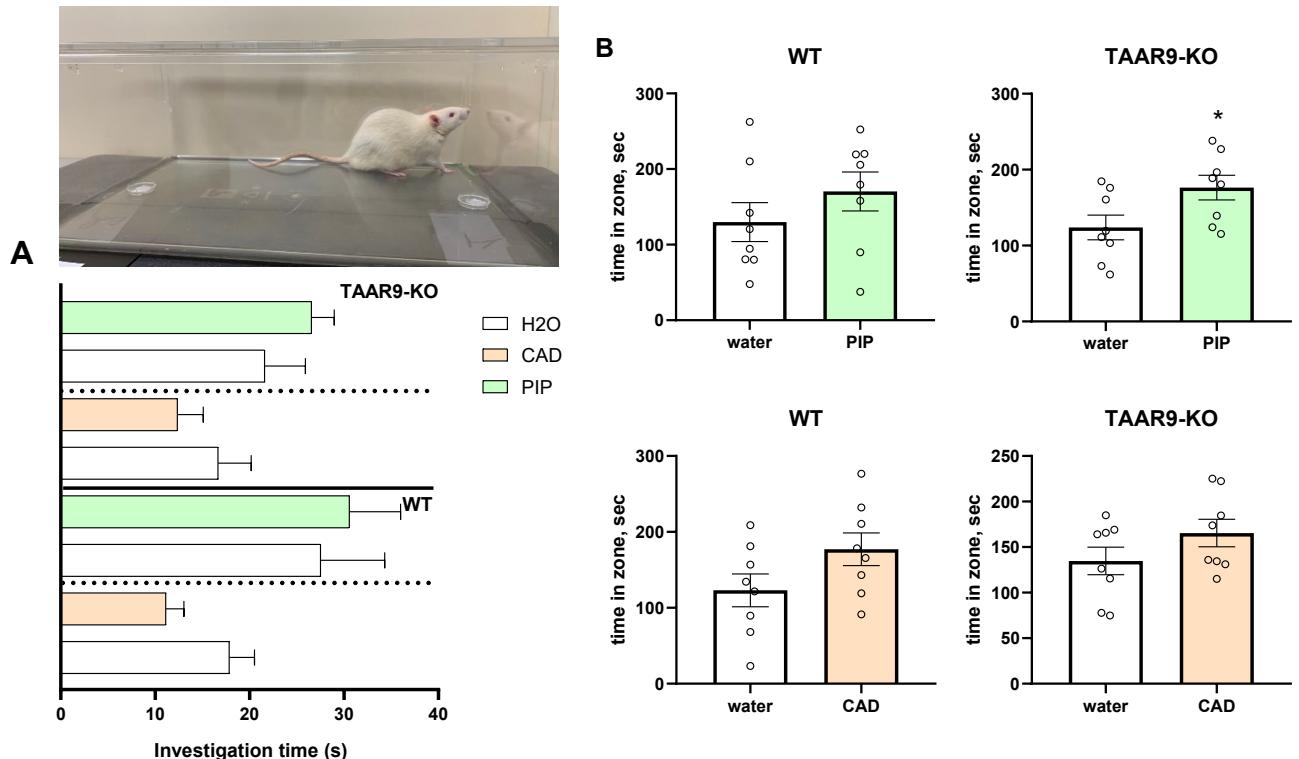


Figure 30. Animals without TAAR9 and wild type animals were tested in olfactory preference test to analyze preference or aversion when presented with odorants agonist rat TAAR9. For this purpose, animals were presented with two filter papers soaked in water or agonist and sniffing (investigation) time as well as time in the zone with the substance were measured. PIP-N-methylpiperidine, CAD-cadaverine.

4.3 Chapter 3. Study of TAAR9 in vitro

4.3.1 Heterologous TAAR9 expression

Another part of TAAR9 research was a development of a system for ligand screening. TAARs are known to be poorly expressed on the membrane in heterologous systems [20]. In this work, we used the approach of Barak et al. in which, after noticing the lack of glycosylation common in the GPCR rhodopsin family in TAAR1 when expressed in HEK293T, first 9 aa. of the β 2-adrenoreceptor were added to the N-end of the receptor, which allowed the protein to position itself on the membrane [82]. Here, we cloned rat TAAR9 receptor with an N-terminal tag into an expression vector. First, rat genomic DNA was cloned into the pJet cloning vector. Then pcDNA- β 2N9-rTAAR9 vector was cloned to express TAAR9 in HEK293T cells under the control of the CMV promoter. An N-terminal tag consisting of the first 9 amino acids of the β 2-adrenergic receptor (MCQPGNGSA) was added to enhance membrane expression. Also, a hemagglutinin tag in 3 repeats (3xYPYDVPDYA) was added to analyze localization using antibodies (Figure 32a). To study the localization of the protein in the cell, the pEGFP- β N9-rTAAR9 vector was cloned, which contains the Taar9 gene with the β 2N9_3HA tag fused to the GFP gene at the C-terminal, under the control of the CMV promoter (Figure 32b).

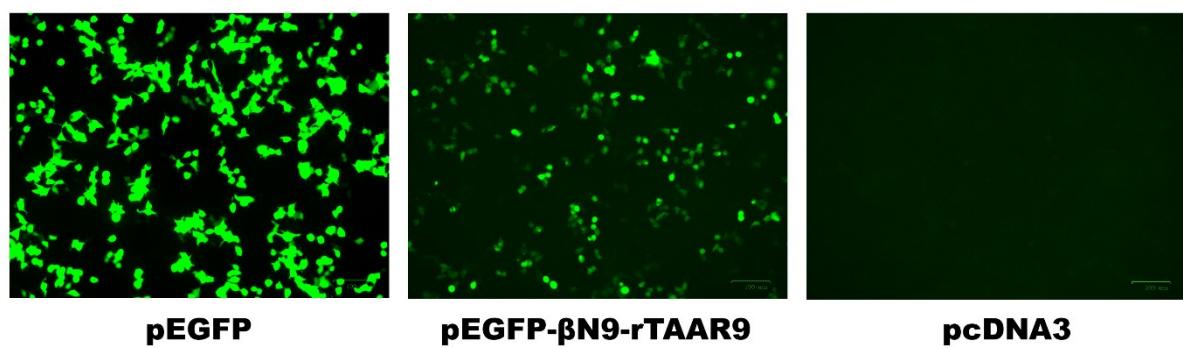


Figure 31. Live imaging of the TAAR9-GFP hybrid protein in HEK293T cells and comparison with cells transfected with the GFP gene alone and with the empty pcDNA3 vector as a negative control.

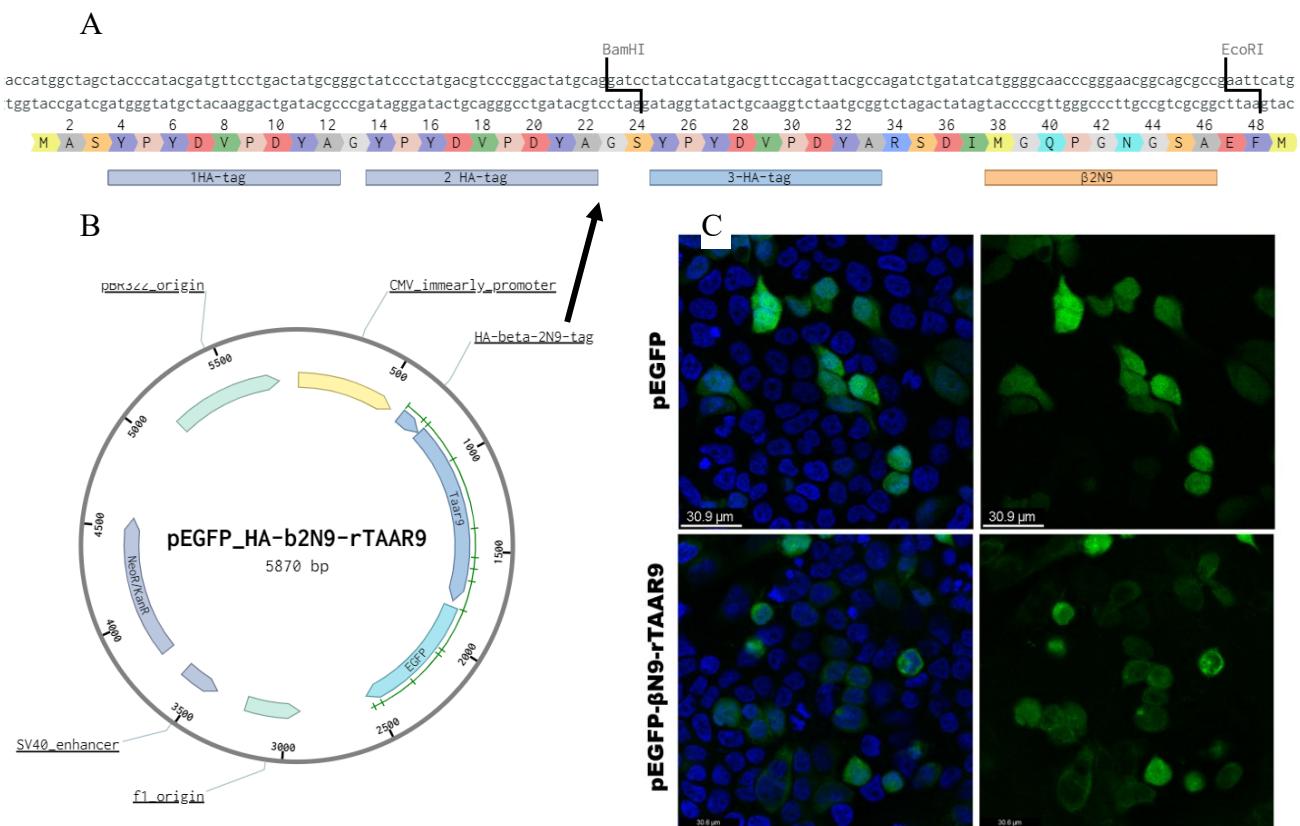


Figure 32. Heterologous expression of TAAR9 protein fused with EGFP in mammalian cells. A. Nucleotide and amino acid sequence of the N-terminal tag 3 repeat hemagglutinin + 9 first a.a. β 2-adrenergic receptor; B. Plasmid scheme for expression of the rTAAR9-GFP hybrid protein with N-terminal tag; C. Comparison of EGFP and rTAAR9-EGFP hybrid protein localization during transient transfection of HEK293T cell line. DAPI and GFP overlay on the left side, and GFP alone on the right side. When compared with EGFP, which is expressed cytoplasmically, the rTAAR9-GFP protein tends to be weakly localized to the membrane.

4.3.2 TAAR9 *in vitro* expression optimization

To study the localization of the receptor in the cell, we transfected the β 2N9-TAAR9 protein gene with EGFP at the end. As a control, GFP protein localization and transfection with the empty pcDNA3 vector were assessed in parallel (Figure 31). The confocal microscope showed that less than half of the cells expressed GFP. But when comparing GFP and TAAR9-GFP, we saw that in individual cells the hybrid was more often localized on the membrane in contrast to GFP in the cytoplasm, although in many cells with TAAR9-GFP, a diffuse distribution of the hybrid protein was visible (Figure 32c). However, immunofluorescence staining of paraformaldehyde-fixed cells transfected with β 2N9-TAAR9 without a permeabilization step indicated that in some cells the HA-tag at the N-terminus of the receptor was located on the outer side of the plasma membrane (Figure 33). Although the signal from GFP was very weak for interpretation.

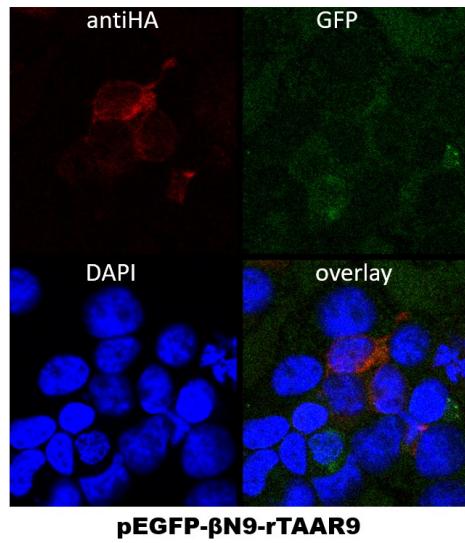


Figure 33. Immunofluorescence staining of fixed transfected HEK293T cells with murine anti-HA antibody followed by incubation with a second GAM-Alexa Fluor 555 antibody without permeabilization.

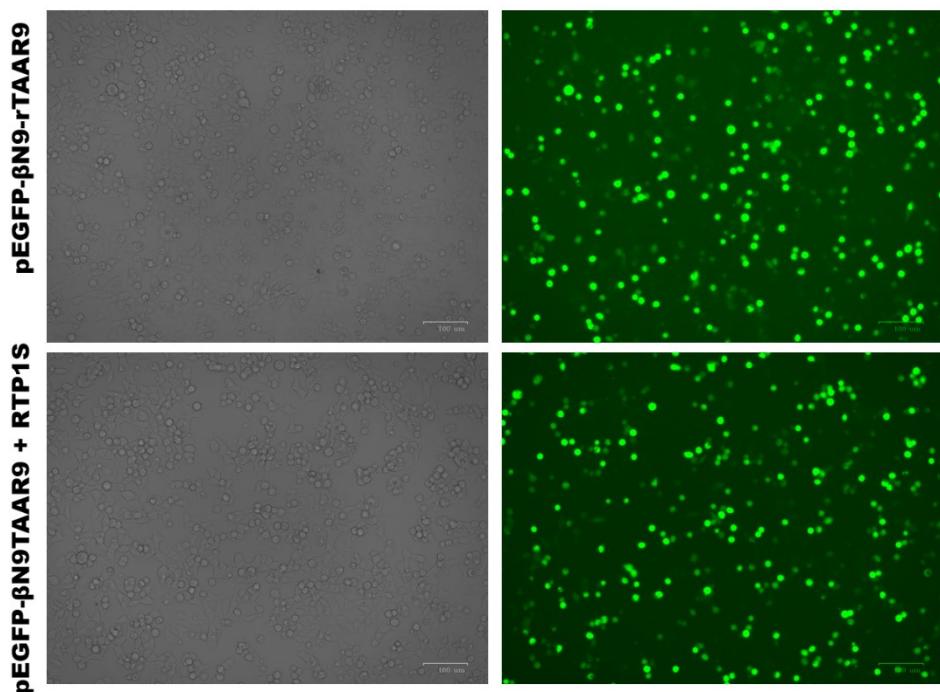


Figure 34. Live imaging of TAAR9-GFP protein in HEK293T cells and comparison of RTP1S chaperone co-transfection on the expression level of TAAR9. Top row - HEK293T cells expressing TAAR9-GFP in brightfield light and with GFP imaging. Bottom row – co-expression of TAAR9-GFP and RTP1S chaperone.

To increase membrane expression, we further used an approach often used in the deorphanization of ORs, that are also difficult to express in the heterologous system. Co-expression of OR with RTP1S significantly increased the membrane localization of the receptors. We performed RTP1S transfection with β 2N9-TAAR9-GFP in HEK293T cells (Figure 34). We did not observe differences in live images of both variants. We further labeled HA-tag at the N-terminus of the receptor by immunofluorescence staining without permeabilization. However, the RTP1S chaperone did not significantly contribute to the localization of the receptor, and without co-transfection, cells with TAAR9 had a similar pattern of membrane localization (Figure 35). Moreover, as will be shown below, co-transfection of RTP1S shifted the EC₅₀ of the TAAR9 agonist to the right, that is, it rather impaired the sensitivity of the system.

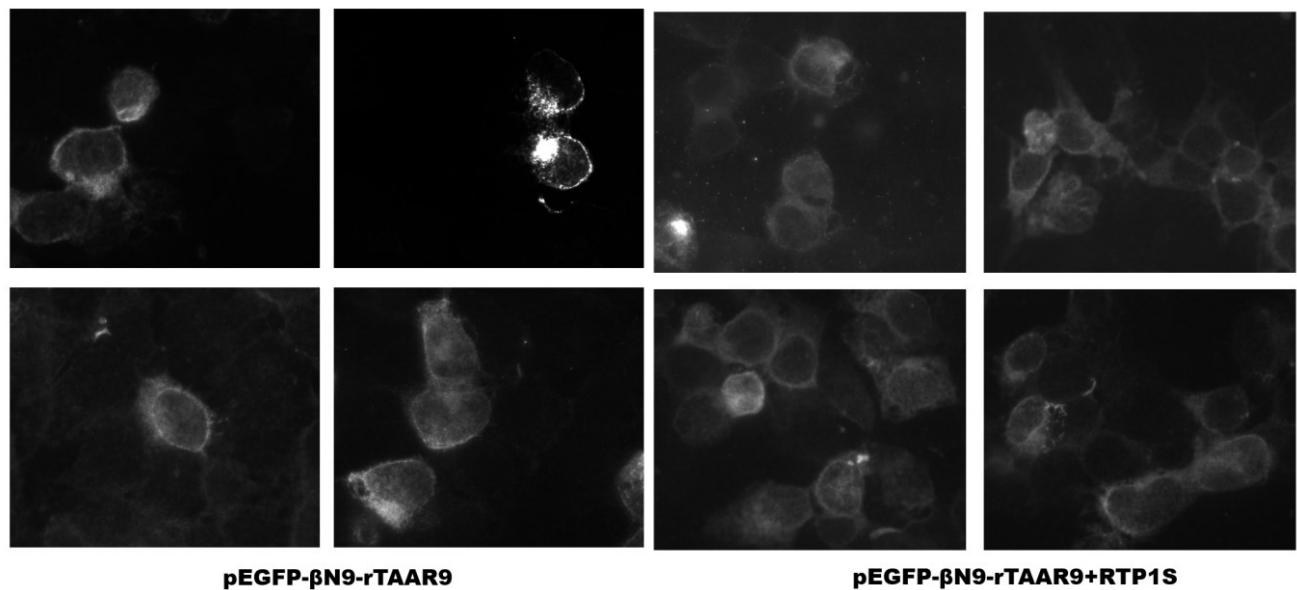


Figure 35. Immunofluorescence staining of fixed HEK293T cells with murine anti-HA antibody followed by incubation with a second GAM-Alexa Fluor 555 antibody without permeabilization. Effect of OR chaperone RTP1S on the localization of the rTAAR9-EGFP hybrid protein during transfection. Left half, transfection with rTAAR9-GFP alone; right half, transfection with rTAAR9-GFP and RTP1S. According to immunofluorescence staining, the RTP1S chaperone does not significantly contribute to the localization of the rTAAR9 receptor.

4.3.3 TAAR9 ligand screening optimization

For screening, we used the BRET method using the EPAC biosensor. The principle of BRET involves energy transfer between a donor (Renilla firefly luciferase, Rluc) and an acceptor (YFP) [32,82,108], although there are various donor-acceptor pairs [109]. It is based on the cAMP-dependent factor EPAC, which changes its conformation in response to cAMP molecule binding [110]. When the luciferase substrate, h-coelenterazine, is oxidized, Rluc emits light with a 475 nm peak. If the donor is nearby (about 10 nm), the energy emitted by Rluc excites YFP, which in turn emits light with a peak of 530 nm. The change in the ratio between Rluc and YFP emission reflects the change in the distance between these molecules. In the EPAC biosensor, Rluc and YFP are in close proximity to each other when the baseline concentration of cAMP is low, resulting in an increased BRET signal. And when EPAC binds to cAMP, a conformational change occurs and Rluc and YFP become distant leading to a decrease in the BRET ratio. For BRET, HEK293T cell culture was co-transfected with two expression vectors EPAC, which provides constitutive expression of the hybrid gene Rluc-EPAC-YFP, and TAAR9. A nonselective β 2-adrenergic receptor agonist, isoproterenol, at a concentration of 1 μ M, was used as a positive control. This receptor is present on the cytoplasmic membrane of HEK293T cells in the normal state and will give a positive signal from the EPAC biosensor.

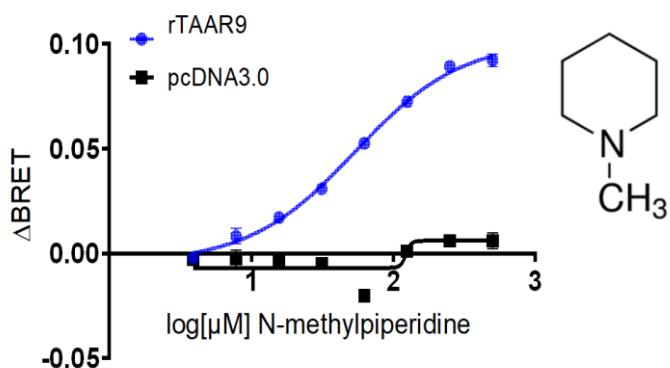


Figure 36. Specific dose-dependent response of TAAR9 to N-methylpiperidine. HEK293T cells were co-transfected with vectors encoding EPAC and rTAAR9 or EPAC and pcDNA3. Data are presented as mean Δ BRET relative to background \pm SEM. The measurement was performed in duplicates.

To evaluate the performance of the system, the only known rat TAAR9 agonist, N-methylpiperidine, was used. To exclude the intrinsic response of other cell receptors to the

ligand, the response level of cells transfected with the "empty" pcDNA3.0 vector was also measured. A specific positive response of the TAAR9 receptor to the N-methylpiperidine agonist was detected, and $EC_{50} = 87 \mu M$ was measured (Figure 36).

In order to increase the sensitivity of the system, we compared the duration of transfection: initially used 4-5 hours and overnight. However, the response level was not significantly affected by the duration of transfection (Figure 37), although the variant with overnight transfection provided a lower EC_{50} value, therefore further we chose overnight transfection.

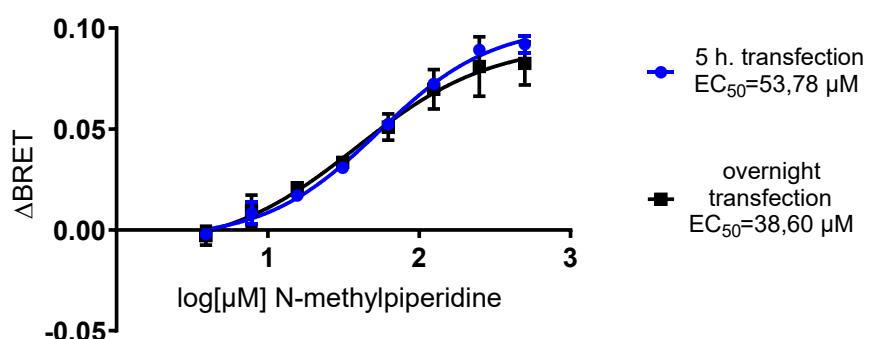


Figure 37. Comparison of the EC_{50} of the TAAR9 agonist as a function of the duration of TAAR9 transfection in HEK293T cells. The measurement was performed in duplicates.

We also compared the EC_{50} curve of the TAAR9 agonist N-methylpiperidine by BRET to evaluate the effect of the chaperone on system sensitivity. However, when the

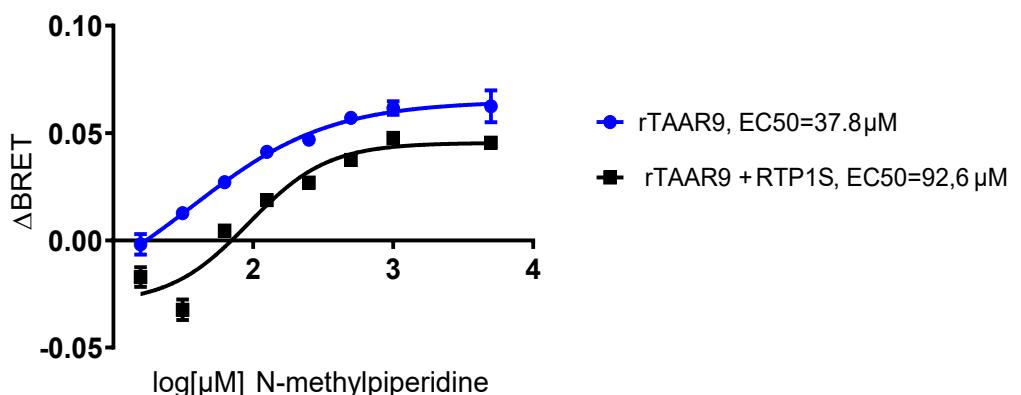


Figure 38. Effect of olfactory receptor chaperone RTP1S on the rTAAR9 receptor response to the agonist N-methylpiperidine. HEK293T cells were co-transfected with vectors encoding TAAR9, biosensor BRET without/with RTP1S chaperone, incubated with different concentrations of ligand, and reporter activity was assessed. With simultaneous expression of the receptor and chaperone, the signal from the G_{as} pathway becomes significantly weaker compared to expression without chaperone, EC_{50} increased threefold. The data are presented as duplicates \pm SEM.

receptor and chaperone were simultaneously expressed, the signal from the G_{as} pathway became weaker compared to expression without the RTP1S (Figure 38).

In further attempt of optimization, we changed the HEK293T host cell line for to the CHO-K1 line. Previously, TAAR1 receptor was successfully expressed in this line without the addition of the N-terminal tag [75,76]. However, we noticed a very high background during the transfection of the EPAC and TAAR9 into CHO-K1 cells, so the signal from the agonist did not reach threshold values relative to the background at either concentration. Although we observed a dose-dependent increase in signal, the HEK293T line originally chosen is the optimal option.

Thus, according to the results of the work, the optimal conditions for screening of TAAR9 agonists by the BRET method are transient transfection of TAAR9 with β2N9 tag in HEK293T cells overnight, further incubation for a day. Under these conditions, the EC50 for N-methylpiperidine is 38 μM. According to other groups, the EC50 of this agonist for rat TAAR9 was 18 μM [56] and 163 μM for murine TAAR9 [57].

4.3.4 TAAR9 agonists screening

Screening of agonists by BRET using HEK293T was performed in a 96-well plate format. Screening was performed at concentrations of 50, 100, and 250 μM. It is critical to use a low concentration of DMSO of 0.1 to 0.5%, as a higher concentration results in a high

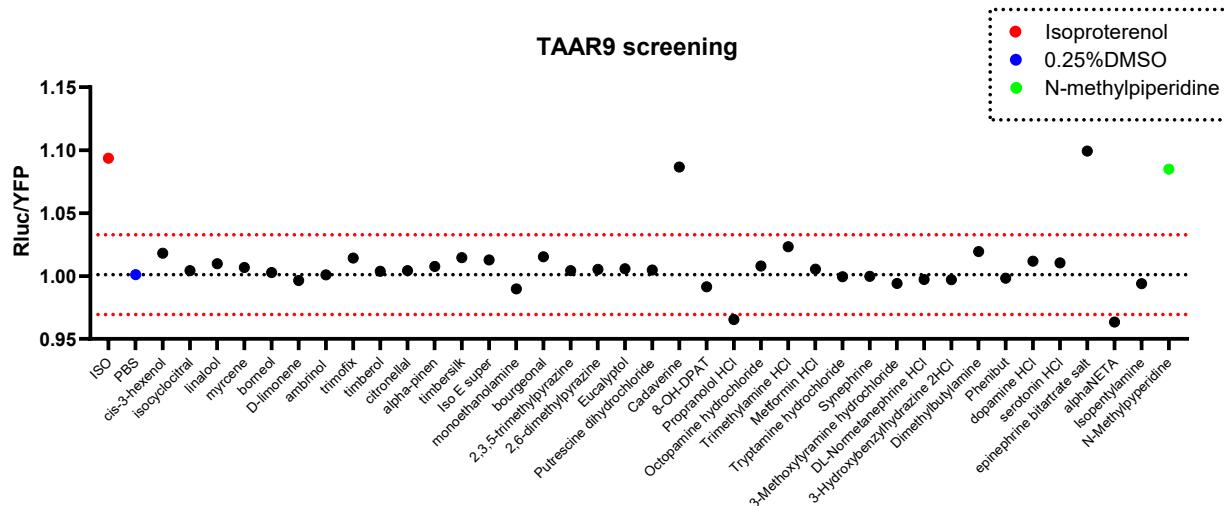


Figure 39. Screening of odorants, trace amines and neurotransmitters for TAAR9 agonism at a concentration of 250 μM. Black dashed line is mean background (0.25% DMSO) ± SD (red dashed lines). Controls are highlighted in color. A response of cadaverine as well as adrenaline was detected. Adrenaline was excluded from further analysis because of the nonspecific response.

background level and poor reproducibility. To determine EC50, the ligand was added in dilutions of 10 μ M to 1000 μ M.

In this work, 435 compounds were screened (Appendix 5). N-methylpiperidine, a TAAR9 agonist, was used as a control. Also, we included 20 μ M forskolin, which nonspecifically increases the concentration of cAMP, and isoproterenol as positive controls. In the first step, various trace amines, odorants, and neurotransmitters were examined (Figure 39).

Further, we analyzed 320 compounds from the FDA-approved pharmacologically active compound library, Sigma LOPAC 1280. For the library compounds, the concentration used was 50 μ M to keep the DMSO concentration below 1%. An example of SigmaLOPAC library screening results is shown in Figure 40. However, all of them were inactive against the TAAR9 receptor.

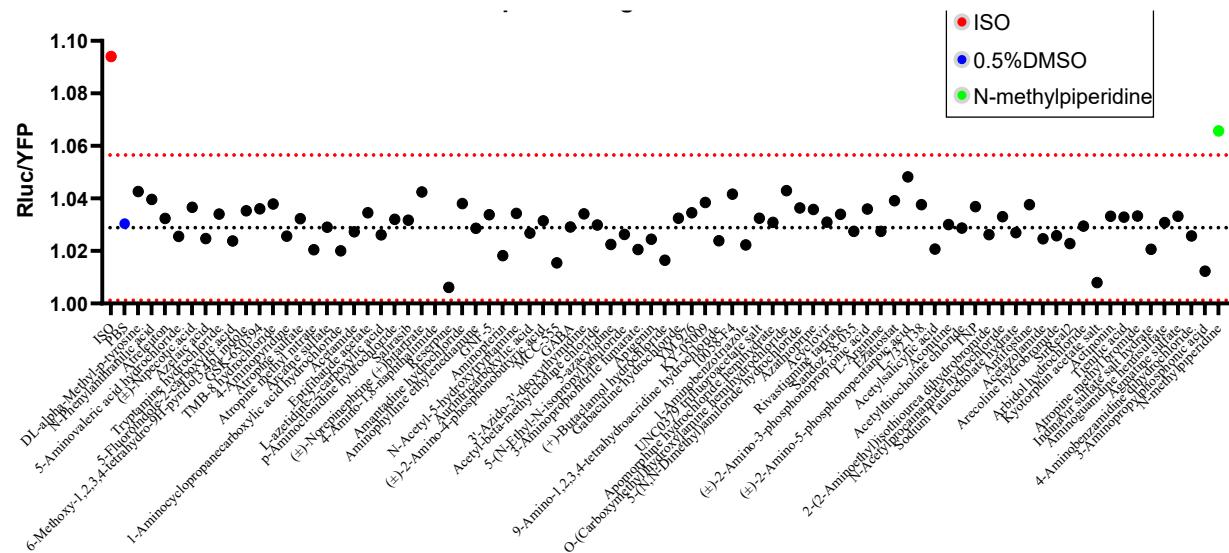


Figure 40. Example BRET screening of TAAR9 agonists. 80 compounds from SigmaLOPAC1280 library plate 1 were tested at a single concentration of 50 μ M. Measurements were taken 5 minutes after addition of the substances. The black dashed line is the mean background (0.5% DMSO) \pm SD (red dashed lines). Controls are highlighted in color.

The screening detected a cadaverine response to TAAR9 (Figure 41). Its EC50 was measured as 81 μ M. In addition to cadaverine, several compounds (2-aminophosphonopentanoic acid, 2-chloroadenosine, and noradrenaline) were found to increase the concentration of cAMP, but cells transfected with empty vector also yielded a response, suggesting a nonspecific response. In the case of noradrenaline, these are most likely endogenous adrenoreceptors of HEK293T, and 2-chloroadenosine is most likely

adenosine receptors [111]. None of the other trace amine compounds, as well as odorants, activated TAAR9.

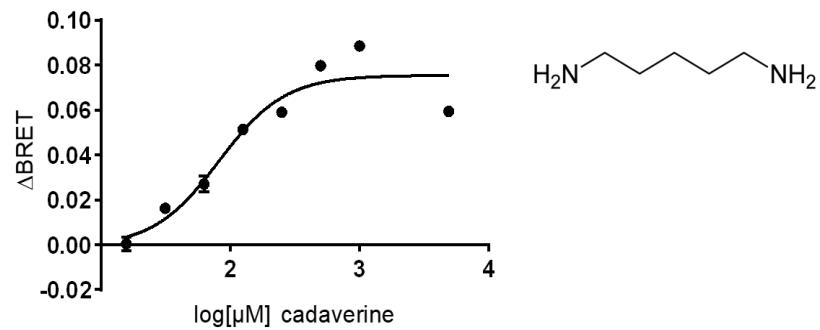


Figure 41. Dose-dependent curve of the TAAR9 agonist cadaverine. EC₅₀=81 μM

5 Discussion

In this work, the TAAR9 receptor was investigated. At the time of the beginning of this work, information on the role of TAAR9, except its involvement in olfaction, was practically absent. However, animal studies with a knockout of other TAAR1, TAAR2, and TAAR5 family members have shown their expression and possible function in the limbic system, neurogenesis, and cognitive processes [4,8,9,112,113]. Also, as the analysis of the *Taar9* expression pattern performed in this work showed, rats have a more diverse and pronounced expression in the CNS compared to mice. Therefore, rats in which *Taar9* gene knockout was performed were chosen as a model to study the role of TAAR9.

We generated two rat TAAR9-KO lines by CRISPR/Cas9-mediated gene editing in zygotes. A cytosine deletion or adenine insertion mutation was introduced into the gene, leading to an early stop codon in TAAR9 in the two lines, resulting in a drastic decrease of *Taar9* mRNA levels in the olfactory epithelium. Next, we set out to characterize TAAR9 outside the olfactory system using various approaches. The experiments performed in the study are the first attempt to characterize the effect of TAAR9 gene knockout on animal behavior.

Since the CRISPR/Cas9 method can cause off-target mutations, it was important to eliminate this effect. For this purpose, in the first step, to remove this effect, we evaluated two independent lines simultaneously, and then, after a process of backcrossing to get rid of possible unwanted mutations, we repeated the experiments on one line. When the studies were performed, we found that genetic deactivation of TAAR9 had no effect on general condition, locomotor activity, memory, and affective behavior in rats. However, we found reduced anxiety in rats without TAAR9 in the stress-induced hyperthermia test. It is worth noting that our results were demonstrated first on rats of two different knockout lines and then on animals after backcrossing, further indicating that the change detected was related specifically to TAAR9 deactivation. At the same time, however, in other behavioral tests, which were also aimed at assessing anxiety behavior, rats without TAAR9 did not differ from the wild type animals. Therefore, to better understand what caused this temperature change, the animals were implanted with sensors for continuous temperature monitoring. According to the results of the study, we show that TAAR9-KO rats are characterized by a constantly increased body temperature under normal conditions. At the same time,

exposure to low temperatures is accompanied by a greater decrease in body temperature in mutant animals than in wild type rats. Temperature change in animals with TAAR gene knockout has been demonstrated for the first time, although previously it was shown that in TAAR5-KO the hypothermic effect of the serotonin 5-HT1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, was more pronounced [7], and the TAAR1 agonist/TAAR5 antagonist, 3-iodothyronamine, a derivative of thyroid hormone, has a hypothermic effect on animals, although the mechanism of this is not yet clarified [6,114].

Taar9 gene expression was detected in the rat CNS, for the first time in the midbrain, namely in the VTA and substantia nigra, where dopaminergic neurons are located, as well as in the nucleus accumbens, where dopaminergic projections lay. *Taar9* mRNA was also found in the ventral hippocampus, hypothalamus, and medulla oblongata. In the mouse, according to previous studies, *Taar9* expression in the brain was limited to the olfactory bulb and cerebellum [5,40]. However, according to our meta-analysis of RNA-seq data in an open database on human and mouse CNS structures, weak expression of TAAR9 is detected in the human striatum caudate nucleus and certain fractions of neurons of the murine nucleus accumbens. This confirms the assumption that TAAR9, like other TAARs in the brain, is expressed in cells of certain types, so when whole structures are analyzed, their expression is most often below the detection limit [103,115]. The expression of TAAR9 in CNS, including the hypothalamus, is of some interest because our analysis of monoamine content revealed a slight increase in dopamine level in the hypothalamus, however, the expression level of enzymes involved in dopamine metabolism TH and MAO did not change in TAAR9-KO. It is also worth noting that the hypothalamus is a structure that is the center of thermoregulation in mammals [116]. Although we were unable to show the involvement of TAAR9 in CNS function, its expression in several brain structures may indirectly indicate the possible involvement of TAAR9. In addition to *Taar9*, the expression pattern of other *Taar* in the mouse brain was also studied. The expression of mouse *Taar2* and *Taar6* was confirmed in the olfactory epithelium and olfactory bulb. In the mouse, expression of *Taar2* was also found in the cortex, hypothalamus, and brainstem [9], *Taar5* – in the brainstem and cerebellum [92], *Taar6* – in the cortex [103]. These findings can be used for further more detailed study of the *Taar* gene expression pattern in the brain.

In the periphery, expression of rat *Taar9* was detected in the testes, which is interesting since sperm contains cadaverine, spermine, and spermidine, which, according to our data, are agonists of TAAR9, among others. The other TAARs as well as the OR are known to be expressed there as well [4,117], suggesting that these receptors may function in sperm chemotaxis, as has already been shown for the hOR17-4 OR [118]. It has been shown that ORs are expressed and may function outside the olfactory system [80,119,120]. For example, their involvement in glucose and lipid metabolism has been described [121], and reduced OR expression has been shown in the large hemisphere cortex in patients with Parkinson's disease [122], etc. Interestingly, in our laboratory, it was shown that TAAR9 knockout leads to a decrease in cholesterol and LDL concentrations in TAAR9-KO animals [93].

Important information about the receptor function is its ligands. As part of this work, we attempted to find TAAR9 agonists. For this purpose, we optimized the system of heterologous expression of TAAR9. In the first studies of TAAR *in vitro* in HEK293 cells, it was shown that TAAR1 is localized in cytoplasm [2], however, membrane localization of GPCR is critical for receptor functioning. The reason for the incorrect localization may be the absence of a signal sequence as well as a glycosylation site at the N-terminus, which contribute to the GPCR processing in the endoplasmic reticulum and direction to the membrane [2,82]. Therefore, we used the sequence of the first nine amino acids of the β 2-adrenoreceptor as the N-terminal tag for TAAR9 expression in HEK293T cells [82]. We further showed that β 2N9-TAAR9 is localized on the membrane. The functionality of the receptor was evidenced by its activation on a known agonist. To increase the sensitivity of the system, we co-expressed the olfactory chaperone RTP1S, an approach to improve the membrane expression of the OR that is used by several groups engaged in TAAR deorphanization [78,83]. Under our conditions, RTP1S did not enhance the sensitivity of the method, which may indirectly indicate that it is not involved in directing TAAR to the membrane. However, whether TAAR has separate proteins for folding or transport to the membrane requires a separate study. Thus, we developed and optimized a system for heterologous expression of the TAAR9 gene in HEK293 cells using the β 2N9 tag, which we successfully used to screen TAAR9 agonists by BRET [108].

During the screening of 435 compounds, including TAs, odorants, pheromones, neurotransmitters, and pharmacologically active substances from the library of FDA-

approved substances, we were unable to detect new TAAR9 ligands, but we confirmed data from other groups on the agonism of N-methylpiperidine with EC₅₀=37 μM for rat TAAR9 [57,58] and also found agonism of cadaverine with EC₅₀=81 μM. At the time of this work, the possibility of rat TAAR9 activation by cadaverine was also discovered by Guo and colleagues, but no EC₅₀ data for this agonist were reported [58], while EC₅₀ of cadaverine for murine TAAR9 was 243 μM [57]. A rather high EC₅₀ value may indicate suboptimal receptor function in a heterologous system since the sensitivity of TAARs expressed in native conditions is much higher than has been shown *in vitro* [123]. We also found no differences in the olfactory preference test of cadaverine and N-methylpiperidine between TAAR9 knockout and wild type animals. Cadaverine is a decarboxylation product of the amino acid lysine, which along with putrescine is present in large quantities in decomposition products, and for humans has a repulsive odor and a signal of bacterial infection [11]. It was previously shown that *Danio rerio* exhibits an aversive behavior to cadaverine, and this behavior is provided by the TAAR13c receptor [71]. Wild type mice also show aversion to cadaverine and N-methylpiperidine at different concentrations, with low concentrations of these substances ceasing to induce aversion in mice with the TAAR2-TAAR9 cluster deletion [39]. Apparently, such aversion is species-specific and absent in rats. Interestingly, according to previous studies, rats were more likely to bury cadaverine-soaked objects compared to water-soaked ones [124,125]. Cadaverine is also found in the cerebrospinal fluid, and expression of *TAAR9*, along with other *TAAR* genes, has been shown in the choroid plexus of the brain ventricles, so it has been suggested that these receptors may be involved in controlling cerebrospinal fluid composition, providing an accurate concentration of substances [126,127].

The results of the experiments carried out in this work allowed demonstrating for the first time the physiological significance of TAAR9: it was shown that TAAR9 knockout leads to changes in thermoregulation in animals. Based on the above, it should be noted that the function of TAAR9 cannot be reduced to odor recognition alone. Thus, the results obtained provide an experimental rationale for the continuation of the search for selective TAAR9 ligands and further study of the role of TAAR9 in lipid metabolism and thermoregulation, including the use of knockout animals.

Conclusions

1. For the first time, expression of the TAAR9 gene was shown in the substantia nigra and VTA of the midbrain, nucleus accumbens and caudate nucleus of the striatum, hippocampus, and medulla oblongata;
2. Knockout of the *Taar9* gene leads to a reduced response in the stress-induced hyperthermia test, while in other behavioral tests, it has no significant effect on animal behavior;
3. Rats without TAAR9 are characterized by elevated body temperature under normal conditions, and exposure to cold is accompanied by a more significant decrease in body temperature
4. TAAR9 is expressed in the hypothalamus, and TAAR9 knockout leads to an increase in dopamine levels in this structure;
5. A system for *in vitro* screening of TAAR9 ligands was developed and validated, and the agonism of cadaverine and N-methylpiperidine of TAAR9 was confirmed.

Author's publications

List of articles published in journals indexed by WoS and Scopus:

1. Vaganova A.N., **Murtazina R.Z.**, Shemyakova, T.S., Prjibelski A.D., Katolikova, N. V., Gainetdinov, R.R. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets Analysis // Int. J. Mol. Sci. Int J Mol Sci, 2021. Vol. 22, № 16. P. 8802.
2. Kalinina D.S., Ptukha M.A., Goriaanova, A. V., Merkulyeva, N.S., Kozlova, A.A., **Murtazina, R.Z.**, Shemiakova T.S., Kuvarzin S.R., Vaganova A.N., Volnova A.B., Gainetdinov R.R., Musienko P.E. Role of the trace amine associated receptor 5 (TAAR5) in the sensorimotor functions // Scientific Reports. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 11, № 1. 23092 p.
3. **Murtazina R.Z.**, Zhukov I.S., Korenkova O.M., Popova E.A., Kuvarzin S.R., Efimova E.V., Kubarskaya L.G., Batotsyrenova E.G., Zolotoverkhaya E.A., Vaganova A.N., Apryatin S.A., Alenina N.V., Gainetdinov R.R. Genetic deletion of trace-amine associated receptor 9 (TAAR9) in rats leads to decreased blood cholesterol levels // Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2021. Vol. 22, № 6. P. 1–15.
4. Krasavin M., Peshkov A.A., Lukin A., Komarova K., Vinogradova L., Smirnova D., Kanov E. V., Kuvarzin S.R., **Murtazina R.Z.**, Efimova E. V., Gureev M., Onokhin K., Zakharov K., Gainetdinov R. R. Discovery and In Vivo Efficacy of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 4-(2-Aminoethyl)-N-(3,5-dimethylphenyl)piperidine-1-carboxamide Hydrochloride (AP163) for the Treatment of Psychotic Disorders // Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 23, № 19. P. 11579.
5. Vaganova A.N., Katolikova N.V., **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Gainetdinov R.R. Public Transcriptomic Data Meta-Analysis Demonstrates TAAR6 Expression in the Mental Disorder-Related Brain Areas in Human and Mouse Brain // Biomolecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022. Vol. 12, № 9. P. 1259.
6. Efimova E.V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., Katolikova N.V., Shemiakova T.S., Razenkova V., Ptukha M., Kozlova A.A., **Murtazina R.Z.**, Smirnova D., Veshchitskii A.A., Merkulyeva N.S., Volnova A.B., Musienko P.E., Korzhevskii D.E., Budygin E.A., Gainetdinov R.R. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis // Front. Behav. Neurosci. Frontiers Media SA, 2022. Vol. 16.
7. Zhukov I.S., Vaganova A.N., **Murtazina R.Z.**, Alferova L.S., Ermolenko E.I., Gainetdinov R.R. Gut Microbiota Alterations in Trace Amine-Associated Receptor 9 (TAAR9) Knockout Rats // Biomolecules. MDPI, 2022. Vol. 12, № 12. P. 1823.

Review article in a journal included in the Higher Attestation Committee list

8. **Murtazina R.Z.**, Gainetdinov R.R. Transgenic Animal Models in Experimental Pharmacology: Focus on Trace Amine-Associated Receptors // Russian Journal of Physiology. 2019. Vol. 105, № 11. P. 1373–1380.

Conferences:

1. **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Efimova E.V., Korenkova O.M., Alenina N.V., Gainetdinov R.R. Study of the functional role of the trace amine receptor TAAR9. Actual problems of translational biomedicine - **2019**, Leningrad region, Russia;
2. **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Zhukov I.S., Efimova E.V., Korenkova O.M., Alenina N.V., Gainetdinov R.R. P.059 Identifying the role of trace amine-associated receptor 9 in behavior, brain neurochemistry and blood biochemistry., 33rd ECNP Congress Hybrid, Virtual, 12 - 15 сентября **2020** (онлайн)
3. **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Zhukov I.S., Efimova E.V., Korenkova O.M., Alenina N.V., Gainetdinov R.R. Investigation of physiological functions of trace amine-associated receptor 9 (TAAR9). 27th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference “Stress and Behavior”. St. Petersburg, Russia, September 16-18, **2020**
4. **Murtazina R.Z.**, Kanov E.V., Kuvarzin S.R., Zhukov I.S., Gainetdinov R.R. Study of the function of the trace amine receptor TAAR9. International School-Conference for Young Scientists "Biology is the science of the XXI century", Pushchino, Russia, April 18-22, **2022**
5. **Murtazina R.Z.**, Kuvarzin S.R., Zhukov I.S., Gainetdinov R.R. Investigation of the role of the trace amine receptor TAAR9 in mammalian physiology. Actual problems of translational biomedicine - **2022**, Leningrad region, Russia, July 25-26, **2022**

Acknowledgments

First of all, I express my special gratitude to my supervisor, Raul Gainetdinov, for his guidance, for the opportunity to work in his laboratory, as well as for his unfailing faith in the result.

For the help in carrying out this work, for the friendly atmosphere, mutual assistance, and support I express my gratitude to the entire scientific staff of the Laboratory of Neurobiology and Molecular Pharmacology at the Institute of Translational Biomedicine, SPBU. Especially Evgeniia Efimova for organizing the work of the laboratory and helping and teaching to work with animals, as well as valuable advice in interpreting data, Savelii Kuvarzin for behavioral experiments and assistance in dissection, Mikael Mor for teaching and conducting experiments by HPLC, Evgenii Kanov for training in cell culture and BRET, Natalia Katolikova for her many valuable tips and help throughout the training, for teaching RNA isolation and reverse transcription, and for keeping the lab in order, Anastasia Vaganova for conducting the meta-analysis and teaching GEO. Employees of the St. Petersburg State University Resource Center Anna Romanovich and Alexey Masharsky for sequencing vectors and Nikolay Kostin for his help with the confocal microscope. Employees of the vivarium of St. Petersburg State University for care and maintenance of the animals and assistance in working with them. Yulia Sopova from the Center for Transgenesis and Genomic Editing at St. Petersburg State University for her helpful advice on vector design. Natalia Alenina and Elena Popova from the Michael Bader lab at the Max Delbrück Center for Molecular Medicine and Olga Korenkova from the ITBM SPBU for generating animals using CRISPR method. Professor Ali Salahpour from the University of Toronto for important advice on optimizing the BRET. To Ilya Mikhailovich Sukhanov, Head of the Behavioral Pharmacology Laboratory of the Waldman Institute of Pharmacology, Pavlov University, for valuable advice and reading this paper.

And to my family for their faith in me and unwavering support of my scientific career.

References

1. Pierce K.L., Premont R.T., Lefkowitz R.J. Seven-transmembrane receptors // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. Vol. 3, № 9. P. 639–650.
2. Bunzow J.R., Sonders M.S., Arttamangkul S., Harrison L.M., Zhang G., et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor // *Mol. Pharmacol.* 2001. Vol. 60, № 6. P. 1181–1188.
3. Borowsky B., Adham N., Jones K.A., Raddatz R., Artymyshyn R., et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98, № 16. P. 8966–8971.
4. Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Berry M.D. Trace amines and their receptors // *Pharmacol. Rev.* 2018. Vol. 70, № 3. P. 549–620.
5. Liberles S.D., Buck L.B. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium // *Nature*. 2006. Vol. 442, № 7103. P. 645–650.
6. Dinter J., Mühlhaus J., Wienchol C.L., Yi C.X., Nürnberg D., et al. Inverse agonistic action of 3-iodothyronamine at the human trace amine-associated receptor 5 // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 2. P. 1–19.
7. Espinoza S., Sukhanov I., Efimova E. V., Kozlova A., Antonova K.A., et al. Trace Amine-Associated Receptor 5 Provides Olfactory Input Into Limbic Brain Areas and Modulates Emotional Behaviors and Serotonin Transmission // *Front. Mol. Neurosci.* 2020. Vol. 13, № March. P. 1–10.
8. Efimova E. V., Kozlova A.A., Razenkova V., Katolikova N. V., Antonova K.A., et al. Increased dopamine transmission and adult neurogenesis in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knockout mice // *Neuropharmacology*. 2021. Vol. 182, № October 2020. P. 108373.
9. Efimova E. V., Kuvarzin S.R., Mor M.S., Katolikova N. V., Shemiakova T.S., et al. Trace Amine-Associated Receptor 2 Is Expressed in the Limbic Brain Areas and Is Involved in Dopamine Regulation and Adult Neurogenesis // *Front. Behav. Neurosci.* 2022. Vol. 16. P. 847410.
10. Harmeier A., Meyer C.A., Staempfli A., Casagrande F., Petrinovic M.M., et al. How female mice attract males: A urinary volatile amine activates a trace amine-associated receptor that induces male sexual interest // *Front. Pharmacol.* 2018. Vol. 9, № AUG. P. 1–18.
11. Xu Z., Li Q. TAAR Agonists // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2020. Vol. 40, № 2. P. 257–272.
12. Ferrero D.M., Lemon J.K., Fluegge D., Pashkovski S.L., Korzan W.J., et al. Detection and avoidance of a carnivore odor by prey // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Vol. 108, № 27. P. 11235–11240.
13. Berry M.D. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators // *Journal of Neurochemistry*. 2004. Vol. 90, № 2. P. 257–271.
14. Grandy D.K. Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast? // *Pharmacol. Ther.* 2007. Vol. 116, № 3. P. 355–390.
15. Lindemann L., Hoener M.C. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family // *Trends Pharmacol. Sci.* 2005. Vol. 26, № 5. P. 274–281.
16. Durden D.A., Philips S.R. Kinetic measurements of the turnover rates of phenylethylamine and tryptamine in vivo in the rat brain. // *J. Neurochem.* 1980.

- Vol. 34, № 6. P. 1725–1732.
17. Farooqui T., Farooqui A.A. Trace Amines and Their Relevance to Neurological Disorders: A Commentary // *Trace Amines and Neurological Disorders: Potential Mechanisms and Risk Factors*. 2016. 257–268 p.
 18. Regard J.B., Sato I.T., Coughlin S.R. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression // *Cell*. 2008. Vol. 135, № 3. P. 561–571.
 19. Zucchi R., Chiellini G., Scanlan T.S., Grandy D.K. Trace amine-associated receptors and their ligands // *Br. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 149, № 8. P. 967–978.
 20. Lindemann L., Ebeling M., Kratochwil N.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., et al. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors // *Genomics*. 2005. Vol. 85, № 3. P. 372–385.
 21. Eyun S. II, Moriyama H., Hoffmann F.G., Moriyama E.N. Molecular evolution and functional divergence of trace amine-associated receptors // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 3. P. 1–24.
 22. Суханов И.М., Звартай Э.Э., Гайнэтдинов Р.Р. Рецепторы, ассоциированные со следовыми аминами, 1-го подтипа как новая терапевтическая мишень в нейропсихофармакологии // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2019. Vol. 82, № 5. P. 3–7.
 23. Wolinsky T.D., Swanson C.J., Smith K.E., Zhong H., Borowsky B., et al. The Trace Amine 1 receptor knockout mouse: An animal model with relevance to schizophrenia // *Genes, Brain Behav.* 2007. Vol. 6, № 7. P. 628–639.
 24. Lindemann L., Meyer C.A., Jeanneau K., Bradaia A., Ozmen L., et al. Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008. Vol. 324, № 3. P. 948–956.
 25. Sotnikova T.D., Caron M.G., Gainetdinov R.R. Trace amine-associated receptors as emerging therapeutic targets // *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 76, № 2. P. 229–235.
 26. Espinoza S., Salahpour A., Masri B., Sotnikova T.D., Messa M., et al. Functional Interaction between Trace Amine-Associated Receptor 1 and Dopamine D2 Receptor // *Mol. Pharmacol.* 2011. Vol. 80, № 3. P. 416–425.
 27. Revel F.G., Moreau J.-L., Gainetdinov R.R., Ferragud A., Velázquez-Sánchez C., et al. Trace Amine-Associated Receptor 1 Partial Agonism Reveals Novel Paradigm for Neuropsychiatric Therapeutics // *Biol. Psychiatry*. 2012. Vol. 72, № 11. P. 934–942.
 28. Harmeier A., Obermueller S., Meyer C.A., Revel F.G., Buchy D., et al. Trace amine-associated receptor 1 activation silences GSK3β signaling of TAAR1 and D2R heteromers // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2015. Vol. 25, № 11. P. 2049–2061.
 29. Di Cara B., Maggio R., Aloisi G., Rivet J.-M., Lundius E.G., et al. Genetic Deletion of Trace Amine 1 Receptors Reveals Their Role in Auto-Inhibiting the Actions of Ecstasy (MDMA) // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 47. P. 16928–16940.
 30. Revel F.G., Moreau J.L., Gainetdinov R.R., Bradaia A., Sotnikova T.D., et al. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 20. P. 8485–8490.
 31. Berry, Gainetdinov R.R., Hoener M.C., Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges // *Pharmacol. Ther.* 2017. Vol. 180. P. 161–180.

32. Salahpour A., Espinoza S., Masri B., Lam V., Barak L.S., et al. BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2012. Vol. 3, № AUG. P. 105.
33. Heffernan M.L.R., Herman L.W., Brown S., Jones P.G., Shao L., et al. Ulotaront: A TAAR1 Agonist for the Treatment of Schizophrenia // *ACS Med. Chem. Lett.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 92–98.
34. Krasavin M., Peshkov A.A., Lukin A., Komarova K., Vinogradova L., et al. Discovery and In Vivo Efficacy of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 4-(2-Aminoethyl)-N-(3,5-dimethylphenyl)piperidine-1-carboxamide Hydrochloride (AP163) for the Treatment of Psychotic Disorders // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 19. P. 11579.
35. Krasavin M., Lukin A., Sukhanov I., Gerasimov A.S., Kuvarzin S., et al. Discovery of Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist 2-(5-(4'-Chloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)ethan-1-amine (LK00764) for the Treatment of Psychotic Disorders // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 11. P. 1650.
36. Koblan K.S., Kent J., Hopkins S.C., Krystal J.H., Cheng H., et al. A Non-D2-Receptor-Binding Drug for the Treatment of Schizophrenia. // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 382, № 16. P. 1497–1506.
37. Fleischer L.M., Somaiya R.D., Miller G.M. Review and meta-analyses of TAAR1 expression in the immune system and cancers // *Front. Pharmacol.* 2018. Vol. 9, № JUN.
38. Duan J., Martinez M., Sanders A.R., Hou C., Saitou N., et al. Polymorphisms in the trace amine receptor 4 (TRAR4) gene on chromosome 6q23.2 are associated with susceptibility to schizophrenia // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. Vol. 75, № 4. P. 624–638.
39. Dewan A., Pacifico R., Zhan R., Rinberg D., Bozza T. Non-redundant coding of aversive odours in the main olfactory pathway // *Nature*. 2013. Vol. 497, № 7450. P. 486–489.
40. Pacifico R., Dewan A., Cawley D., Guo C., Bozza T. An Olfactory Subsystem that Mediates High-Sensitivity Detection of Volatile Amines // *Cell Rep.* 2012. Vol. 2, № 1. P. 76–88.
41. Zeng Z., Fan P., Rand E., Kyaw H., Su K., et al. Cloning of a putative human neurotransmitter receptor expressed in skeletal muscle and brain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. Vol. 242, № 3. P. 575–578.
42. Муртазина Р.З., Гайнетдинов Р.Р. Трансгенные животные в экспериментальной фармакологии: фокус на рецепторах следовых аминов // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Vol. 105, № 11. P. 1373–1380.
43. Revel F.G., Meyer C.A., Bradaia A., Jeanneau K., Calcagno E., et al. Brain-Specific Overexpression of Trace Amine-Associated Receptor 1 Alters Monoaminergic Neurotransmission and Decreases Sensitivity to Amphetamine // *Neuropsychopharmacology*. 2012. Vol. 37, № 12. P. 2580–2592.
44. Li Q., Korzan W.J., Ferrero D.M., Chang R.B., Roy D.S., et al. Synchronous Evolution of an Odor Biosynthesis Pathway and Behavioral Response // *Curr. Biol.* 2013. Vol. 23, № 1. P. 11–20.
45. Vanti W.B., Muglia P., Nguyen T., Cheng R., Kennedy J.L., et al. Discovery of a null mutation in a human trace amine receptor gene // *Genomics*. 2003. Vol. 82, № 5. P. 531–536.
46. Müller D.J., Chiesa A., Mandelli L., Luca V. De, Ronchi D. De, et al. Correlation

- of a set of gene variants, life events and personality features on adult ADHD severity // J. Psychiatr. Res. 2010. Vol. 44, № 9. P. 598–604.
47. Carnicelli V., Santoro A., Sellari-Franceschini S., Berrettini S., Zucchi R. Expression of trace amine-associated receptors in human nasal mucosa // Chemosens. Percept. 2010. Vol. 3, № 2. P. 99–107.
48. Ohta H., Takebe Y., Murakami Y., Takahama Y., Morimura S. Tyramine and β -phenylethylamine, from fermented food products, as agonists for the human trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1) in the stomach // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2017. Vol. 81, № 5. P. 1002–1006.
49. D'Andrea G., Terrazzino S., Fortin D., Farruggio A., Rinaldi L., et al. HPLC electrochemical detection of trace amines in human plasma and platelets and expression of mRNA transcripts of trace amine receptors in circulating leukocytes // Neurosci. Lett. 2003. Vol. 346, № 1–2. P. 89–92.
50. Babusyte A., Kotthoff M., Fiedler J., Krautwurst D. Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2 // J. Leukoc. Biol. 2013. Vol. 93, № 3. P. 387–394.
51. Ito J., Ito M., Nambu H., Fujikawa T., Tanaka K., et al. Anatomical and histological profiling of orphan G-protein-coupled receptor expression in gastrointestinal tract of C57BL/6J mice // Cell Tissue Res. 2009. Vol. 338, № 2. P. 257–269.
52. Gozal E.A., O'Neill B.E., Sawchuk M.A., Zhu H., Halder M., et al. Anatomical and functional evidence for trace amines as unique modulators of locomotor function in the mammalian spinal cord // Front. Neural Circuits. 2014. Vol. 8. P. 134.
53. Pronin A., Levay K., Velmeshev D., Faghihi M., Shestopalov V.I., et al. Expression of Olfactory Signaling Genes in the Eye // PLoS One / ed. Ljubimov A. V. 2014. Vol. 9, № 4. P. e96435.
54. Chiellini G., Erba P., Carnicelli V., Manfredi C., Frascarelli S., et al. Distribution of exogenous [125 I]-3-iodothyronamine in mouse *in vivo*: relationship with trace amine-associated receptors // J. Endocrinol. 2012. Vol. 213, № 3. P. 223–230.
55. Chiellini G., Frascarelli S., Ghelardoni S., Carnicelli V., Tobias S.C., et al. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function // FASEB J. 2007. Vol. 21, № 7. P. 1597–1608.
56. Ferrero D.M., Wacker D., Roque M.A., Baldwin M.W., Stevens R.C., et al. Agonists for 13 Trace Amine-Associated Receptors Provide Insight into the Molecular Basis of Odor Selectivity // ACS Chem. Biol. 2012. Vol. 7, № 7. P. 1184–1189.
57. Saraiva L.R., Kondoh K., Ye X., Yoon K.H., Hernandez M., et al. Combinatorial effects of odorants on mouse behavior // Proc. Natl. Acad. Sci. 2016. Vol. 113, № 23. P. E3300–E3306.
58. Guo L., Dai W., Xu Z., Liang Q., Miller E.T., et al. Evolution of Brain-Expressed Biogenic Amine Receptors into Olfactory Trace Amine-Associated Receptors // Mol. Biol. Evol. 2022. Vol. 39, № 3.
59. Taquet N., Philippe C., Reimund J.-M., D. C. Inflammatory Bowel Disease G-Prote in Coupled Receptors (GPCRs) Expression Profiling with Microfluidic Cards // Crohn's Disease. 2012.
60. Ruiz-Hernández A., Cabrera-Becerra S., Vera-Juárez G., Hong E., Fengyang H., et al. Diabetic nephropathy produces alterations in the tissue expression profile of the orphan receptors GPR149, GPR153, GPR176, TAAR3, TAAR5 and TAAR9 in

- Wistar rats // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2020. Vol. 39, № 8. P. 1150–1161.
61. Kovács T., Mikó E., Vida A., Sebő É., Toth J., et al. Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors // Sci. Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–14.
 62. Xu Z., Guo L., Qian X., Yu C., Li S., et al. Two entry tunnels in mouse TAAR9 suggest the possibility of multi-entry tunnels in olfactory receptors // Sci. Rep. 2022. Vol. 12, № 1. P. 2691.
 63. Jia L., Li S., Dai W., Guo L., Xu Z., et al. Convergent olfactory trace amine-associated receptors detect biogenic polyamines with distinct motifs via a conserved binding site // J. Biol. Chem. 2021. Vol. 297, № 5. P. 101268.
 64. Liberles S.D. Trace amine-associated receptors: Ligands, neural circuits, and behaviors // Current Opinion in Neurobiology. 2015. Vol. 34. P. 1–7.
 65. Fleischer J. Mammalian olfactory receptors // Front. Cell. Neurosci. 2009. Vol. 3, № AUG. P. 1–10.
 66. Johnson M.A., Tsai L., Roy D.S., Valenzuela D.H., Mosley C., et al. Neurons expressing trace amine-associated receptors project to discrete glomeruli and constitute an olfactory subsystem // Proc. Natl. Acad. Sci. 2012. Vol. 109, № 33. P. 13410–13415.
 67. Dewan A. Olfactory Signaling Via Trace Amine-Associated Receptors // Cell Tissue Res. 2021. Vol. 383, № 1. P. 395.
 68. Yoon K.H., Ragoczy T., Lu Z., Kondoh K., Kuang D., et al. Olfactory receptor genes expressed in distinct lineages are sequestered in different nuclear compartments // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. Vol. 112, № 18. P. E2403–E2409.
 69. Fei A., Wu W., Tan L., Tang C., Xu Z., et al. Coordination of two enhancers drives expression of olfactory trace amine-associated receptors // Nat. Commun. 2021. Vol. 12, № 1. P. 3798.
 70. Shah A., Ratkowski M., Rosa A., Feinstein P., Bozza T. Olfactory expression of trace amine-associated receptors requires cooperative cis-acting enhancers // Nat. Commun. 2021. Vol. 12, № 1.
 71. Hussain A., Saraiva L.R., Ferrero D.M., Ahuja G., Krishna V.S., et al. High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. Vol. 110, № 48. P. 19579–19584.
 72. Wettschureck N., Offermanns S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions // Physiol. Rev. 2005. Vol. 85, № 4. P. 1159–1204.
 73. Wise A., Gearing K., Rees S. Target validation of G-protein coupled receptors // Drug Discov. Today. 2002. Vol. 7, № 4. P. 235–246.
 74. Murtazina R.Z., Kuvarzin S.R., Gainetdinov R.R. TAARs and Neurodegenerative and Psychiatric Disorders // Handbook of Neurotoxicity. 2021. P. 1–18.
 75. Navarro H.A., Gilmour B.P., Lewin A.H. A Rapid Functional Assay for the Human Trace Amine–Associated Receptor 1 Based on the Mobilization of Internal Calcium // SLAS Discov. 2006. Vol. 11, № 6. P. 688–693.
 76. Decker A.M., Mathews K.M., Blough B.E., Gilmour B.P. Validation of a High-Throughput Calcium Mobilization Assay for the Human Trace Amine-Associated Receptor 1 // SLAS Discov. 2021. Vol. 26, № 1. P. 140–150.
 77. Underhill S.M., Hullihen P.D., Chen J., Fenollar-Ferrer C., Rizzo M.A., et al. Amphetamines signal through intracellular TAAR1 receptors coupled to Gα13 and GαS in discrete subcellular domains // Mol. Psychiatry. 2021. Vol. 26, № 4. P. 1208–1223.

78. Wallrabenstein I., Kuklan J., Weber L., Zborala S., Werner M., et al. Human Trace Amine-Associated Receptor TAAR5 Can Be Activated by Trimethylamine // PLoS One / ed. Matsunami H. 2013. Vol. 8, № 2. P. e54950.
79. Mühlhaus J., Dinter J., Nürnberg D., Rehders M., Depke M., et al. Analysis of Human TAAR8 and Murine Taar8b Mediated Signaling Pathways and Expression Profile // Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15, № 11. P. 20638.
80. Flegel C., Manteniotis S., Ostholt S., Hatt H., Gisselmann G. Expression Profile of Ectopic Olfactory Receptors Determined by Deep Sequencing // PLoS One / ed. Reisert J. 2013. Vol. 8, № 2. P. e55368.
81. Brady A.E., Limbird L.E. G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction // Cell. Signal. 2002. Vol. 14, № 4. P. 297–309.
82. Barak L.S., Salahpour A., Zhang X., Masri B., Sotnikova T.D., et al. Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor // Mol. Pharmacol. 2008. Vol. 74, № 3. P. 585–594.
83. Li Q. Deorphanization of Olfactory Trace Amine-Associated Receptors // Methods in Molecular Biology. 2018. Vol. 1820. P. 21–31.
84. Lu M., Echeverri F., Moyer B.D. Endoplasmic Reticulum Retention, Degradation, and Aggregation of Olfactory G-Protein Coupled Receptors // Traffic. 2003. Vol. 4, № 6. P. 416–433.
85. Saito H., Kubota M., Roberts R.W., Chi Q., Matsunami H. RTP Family Members Induce Functional Expression of Mammalian Odorant Receptors // Cell. 2004. Vol. 119, № 5. P. 679–691.
86. Zhuang H., Matsunami H. Synergism of Accessory Factors in Functional Expression of Mammalian Odorant Receptors // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, № 20. P. 15284–15293.
87. Miller G.M., Verrico C.D., Jassen A., Konar M., Yang H., et al. Primate trace amine receptor 1 modulation by the dopamine transporter // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. Vol. 313, № 3. P. 983–994.
88. Wainscott D.B., Little S.P., Yin T., Tu Y., Rocco V.P., et al. Pharmacologic Characterization of the Cloned Human Trace Amine-Associated Receptor1 (TAAR1) and Evidence for Species Differences with the Rat TAAR1 // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. Vol. 320, № 1. P. 475–485.
89. Stäubert C., Böselt I., Bohnekamp J., Römplер H., Enard W., et al. Structural and Functional Evolution of the Trace Amine-Associated Receptors TAAR3, TAAR4 and TAAR5 in Primates // PLoS One. 2010. Vol. 5, № 6. P. e11133.
90. Xie Z., Vallender E.J., Yu N., Kirstein S.L., Yang H., et al. Cloning, expression, and functional analysis of rhesus monkey trace amine-associated receptor 6: evidence for lack of monoaminergic association // J. Neurosci. Res. 2008. Vol. 86, № 15. P. 3435–3446.
91. Brody J.R., Kern S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis // Biotechniques. 2004. Vol. 36, № 2. P. 214–216.
92. Kalinina D.S., Ptukha M.A., Goriainova A. V., Merkulyeva N.S., Kozlova A.A., et al. Role of the trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) in the sensorimotor functions // Scientific Reports. 2021. Vol. 11, № 1. 23092 p.
93. Murtazina R.Z., Zhukov I.S., Korenkova O.M., Popova E.A., Kuvarzin S.R., et al. Genetic deletion of trace-amine associated receptor 9 (TAAR9) in rats leads to decreased blood cholesterol levels // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 6. P. 1–15.

94. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 26, № 1. P. 139–140.
95. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8, № 11. P. 2281–2308.
96. Popova E., Krivokharchenko A., Ganten D., Bader M. Efficiency of transgenic rat production is independent of transgene-construct and overnight embryo culture // *Theriogenology*. 2004. Vol. 61, № 7–8. P. 1441–1453.
97. Truett G.E., Heeger P., Mynatt R.L., Truett A.A., Walker J.A., et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) // *Biotechniques*. 2000. Vol. 29, № 1. P. 52–54.
98. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29, № 9. P. 45e – 45.
99. Inagaki S., Iwata R., Iwamoto M., Imai T. Widespread Inhibition, Antagonism, and Synergy in Mouse Olfactory Sensory Neurons In Vivo // *Cell Rep.* 2020. Vol. 31, № 13. P. 107814.
100. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids // *Gene*. 1990. Vol. 96, № 1. P. 23–28.
101. Kachkin D. V., Khorolskaya J.I., Ivanova J.S., Rubel A.A. An efficient method for isolation of plasmid DNA for transfection of mammalian cell cultures // *Methods Protoc.* 2020. Vol. 3, № 4. P. 1–9.
102. Timenetsky J., Santos L.M., Buzinhani M., Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR // *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2006. Vol. 39, № 7. P. 907–914.
103. Vaganova A.N., Katolikova N. V., Murtazina R.Z., Kuvarzin S.R., Gainetdinov R.R. Public Transcriptomic Data Meta-Analysis Demonstrates TAAR6 Expression in the Mental Disorder-Related Brain Areas in Human and Mouse Brain // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 9. P. 1259.
104. Yang H., Wang H., Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering // *Nat. Protoc.* 2014. Vol. 9, № 8. P. 1956–1968.
105. Leonova E.I., Gainetdinov R.R. CRISPR/Cas9 technology in translational biomedicine // *Cell. Physiol. Biochem.* 2020. Vol. 54, № 3. P. 354–370.
106. Popp M.W., Maquat L.E. Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine // *Cell*. 2016. Vol. 165, № 6. P. 1319–1322.
107. Zhukov I.S., Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Alferova L.S., Ermolenko E.I., et al. Gut Microbiota Alterations in Trace Amine-Associated Receptor 9 (TAAR9) Knockout Rats // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 12. P. 1823.
108. Espinoza S., Masri B., Salahpour A., Gainetdinov R.R. BRET Approaches to Characterize Dopamine and TAAR1 Receptor Pharmacology and Signaling // *Methods in Molecular Biology*. 2013. Vol. 964, № June 2015. P. 107–122.
109. Pfleger K.D.G., Seeber R.M., Eidne K.A. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 1. P. 337–345.
110. Jiang L.I., Collins J., Davis R., Lin K.M., DeCamp D., et al. Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 14. P. 10576–10584.
111. Cooper J., Hill S.J., Alexander S.P.H. An endogenous A 2B adenosine receptor

- coupled to cyclic AMP generation in human embryonic kidney (HEK 293) cells // Br. J. Pharmacol. 1997. Vol. 122, № 3. P. 546–550.
112. Lam V.M., Espinoza S., Gerasimov A.S., Gainetdinov R.R., Salahpour A. In-vivo pharmacology of Trace-Amine Associated Receptor 1 // Eur. J. Pharmacol. 2015. Vol. 763, № Pt B. P. 136–142.
113. Maggi S., Bon C., Gustincich S., Tucci V., Gainetdinov R.R., et al. Improved cognitive performance in trace amine-associated receptor 5 (TAAR5) knock-out mice // Sci. Reports 2022 121. 2022. Vol. 12, № 1. P. 1–12.
114. Scanlan T.S., Suchland K.L., Hart M.E., Chiellini G., Huang Y., et al. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone // Nat. Med. 2004. Vol. 10, № 6. P. 638–642.
115. Vaganova A.N., Murtazina R.Z., Shemyakova T.S., Prjibelski A.D., Katolikova N.V., et al. Pattern of TAAR5 Expression in the Human Brain Based on Transcriptome Datasets Analysis // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 16. P. 8802.
116. Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2011. Vol. 301, № 5. P. R1207–R1228.
117. Oh S.J. System-Wide Expression and Function of Olfactory Receptors in Mammals // Genomics Inform. 2018. Vol. 16, № 1. P. 2–9.
118. Spehr M., Gisselmann G., Poplawski A., Riffell J.A., Wetzel C.H., et al. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis // Science (80-.). 2003. Vol. 299, № 5615. P. 2054–2058.
119. Lee S.J., Depoortere I., Hatt H. Therapeutic potential of ectopic olfactory and taste receptors // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. Vol. 18, № 2. P. 116–138.
120. Feldmesser E., Olender T., Khen M., Yanai I., Ophir R., et al. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes // BMC Genomics. 2006. Vol. 7. P. 121.
121. Zhang S., Li L., Li H. Role of ectopic olfactory receptors in glucose and lipid metabolism // Br. J. Pharmacol. 2021. Vol. 178, № 24. P. 4792–4807.
122. Garcia-Esparcia P., Schlüter A., Carmona M., Moreno J., Ansoleaga B., et al. Functional genomics reveals dysregulation of cortical olfactory receptors in parkinson disease: Novel putative chemoreceptors in the human brain // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2013. Vol. 72, № 6. P. 524–539.
123. Zhang J., Pacifico R., Cawley D., Feinstein P., Bozza T. Ultrasensitive detection of amines by a trace amine-associated receptor // J. Neurosci. 2013. Vol. 33, № 7. P. 3228–3239.
124. Pinel J.P.J., Gorzalka B.B., Ladak F. Cadaverine and putrescine initiate the burial of dead conspecifics by rats // Physiol. Behav. 1981. Vol. 27, № 5. P. 819–824.
125. Montoya C.P., Sutherland R.J., Whishaw I.Q. Cadaverine and burying in the laboratory rat // Bull. Psychon. Soc. 1981. Vol. 18, № 3. P. 118–120.
126. Gonçalves I., Hubbard P.C., Tomás J., Quintela T., Tavares G., et al. ‘Smelling’ the cerebrospinal fluid: olfactory signaling molecules are expressed in and mediate chemosensory signaling from the choroid plexus // FEBS J. 2016. Vol. 283, № 9. P. 1748–1766.
127. Almeida-Santos D., Duarte A.C., Gonçalves I., Ferreira C.L., Ferrer I., et al. Cadaverine and Spermine Elicit Ca²⁺ Uptake in Human CP Cells via a Trace Amine-Associated Receptor 1 Dependent Pathway // J. Mol. Neurosci. 2021. Vol. 71, № 3. P. 625–637.
128. Jaubert A., Drutel G., Leste-Lasserre T., Ichas F., Bresson-Bepoldin L. Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression in lactotrophs from postlactating rats: Involvement in dopamine-induced apoptosis // Endocrinology. 2007. Vol.

- 148, № 6. P. 2698–2707.
- 129. Li X., Yu J., Wu Y., Li B. Effect on the dopaminergic metabolism induced by oral exposure to simazine during the prepubertal period in rats // Int. J. Mol. Med. 2018. Vol. 41, № 1. P. 421–429.
 - 130. Qian Z., Lin Y., Xing J., Qiu Y., Ren L. Expression and functions of glutamate and γ -aminobutyric acid transporters in ischemic models. // Mol. Med. Rep. 2018. Vol. 17, № 6. P. 8196–8202.
 - 131. Krawczyk M., Mason X., Debacker J., Sharma R., Normandea C.P., et al. D1 Dopamine Receptor-Mediated LTP at GABA Synapses Encodes Motivation to Self-Administer Cocaine in Rats. 2013. Vol. 33, № 29. P. 11960–11971.

Abbreviations

- 5-HIAA - 5-hydroxyindoleacetic acid
28S - 28S rRNA
Ache - acetylcholinesterase
BDNF - brain-derived neurotrophic factor
BRET - bioluminescence resonance energy transfer
cAMP – cyclic adenosine monophosphate
CDNF- brain dopamine neurotrophic factor
COMT- catechol-O-methyltransferase
D1R - dopamine receptor D1
D2R - dopamine receptor D2
DAT - dopamine transporter
DHBA - dihydroxybenzoic acid
DOPAC – dihydroxyphenilacetic acid
EPAC - exchange protein directly activated by cAMP
GAT1 - GABA type 1 transporter
GDNF - glial neurotrophic factor
GPCR – G-protein coupled receptor
HPRT - hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase
HVA – homovanillic acid
MAO - monoamine oxidase
MAO-A - monoamine oxidase A
MAO-B - monoamine oxidase B
NMDAR1 - glutamate receptor 1
RTP1S - receptor transporter protein, short
RT-PCR – polymerase chain reaction with reverse transcription
SEM - standard error of the mean
TA – trace amines
TAAR2-KO - TAAR2 knockout
TAAR5-KO - TAAR5 knockout
TAAR9-KO - TAAR9 knockout
TAARs - trace amine-associated receptors
TH - tyrosine hydroxylase
TPH2 - tryptophan hydroxylase type 2
VTA - ventral tegmental area
WT - wild type

Appendix

Appendix 1. Human transcriptomic GEO datasets meeting the inclusion criteria and included in the analysis.

GEO number	Publication	Structure	n ¹
GSE110716	RNA-seq of brain tissue from Parkinson's disease patients [coding exome RNA-seq]	Cingulate gyrus	8
GSE122649	Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia	Motor cortex	6
		Frontal cortex	5
		Parietal cortex	5
GSE123496	Human brain tissues from healthy controls and multiple sclerosis patients	Hippocampus	5
		Corpus callosum	5
		Internal capsule	5
GSE135036	Hemispheric asymmetry in the human brain and in Parkinson's disease is linked to divergent epigenetic patterns in neurons	Prefrontal cortex	5
GSE135838	Transcriptomic Profiles of Sepsis in the Human Brain	Parietal cortex	5
GSE138614	Next-generation sequencing study in multiple sclerosis white matter brain lesions	White matter	25
GSE160521	Diurnal rhythms across the human dorsal and ventral striatum	Nucleus accumbens	59
		Nucleus caudatus	59
		Putamen	59
GSE53239	RNA-sequencing of the brain transcriptome implicates dysregulation of neuroplasticity, circadian rhythms, and GTPase binding in bipolar disorder	Dorsolateral prefrontal cortex	11
GSE53697	RNAseq in Alzheimer's Disease patients	Prefrontal cortex	8
GSE57152	Alternative poly(A) in Alzheimer's disease	medial temporalis gyrus	8
GSE68719	mRNA-Seq expression and MS3 proteomics profiling of human post-mortem BA9 brain tissue for Parkinson Disease and neurologically normal individuals	Prefrontal cortex	73
GSE79666	Transcriptome sequencing reveals aberrant alternative splicing in Huntington's disease	Motor cortex	7
		Nucleus accumbens	22
GSE80655	RNA-sequencing of human post-mortem brain tissues	Dorsolateral prefrontal cortex	24
		Anterior cingulate cortex	24

¹ n- number of samples from control subjects included in the meta-analysis.

Appendix 2. Murine transcriptomic GEO datasets meeting the inclusion criteria and included in the analysis

GEO number	Publication	Structure	n ¹
GSE107183	RNA changes in hippocampus of transgenic murine model of tauopathy (rTg4510 mice) compared to controls at asymptomatic stage (2 months) of neurodegeneration as determined by mRNA deep sequencing.	Hippocampus	6
GSE112575	Frontal cortex transcriptomic analysis of a TDP-43 Q331K knock-in mouse [20month]	Frontal cortex	8
GSE116752	Striatal transcriptome of a mouse model of ADHD reveals a pattern of synaptic remodeling	Striatum	5
GSE126814	Quantitative Analysis of Wild Type and Neat1 -/- Cerebral Frontal Cortex Transcriptomes	Frontal cortex	5
GSE130254	Expression profiling by high throughput sequencing	Cerebellum Nucleus accumbens Prefrontal cortex	48 47 48
GSE136869	Transcriptome analysis using RNA sequencing of the hippocampus of aged LPAR2-/- versus wildtype control mice	Hippocampus	7
GSE147842	Adult mouse hippocampal transcriptome changes associated with long-term behavioral and metabolic effects of gestational air pollution toxicity	Hippocampus	5
GSE148075	Wild mice with different social network sizes vary in brain gene expression	Frontal cortex Hippocampus Hypothalamus	29 29 28
GSE166831	Altered hippocampal transcriptome dynamics following sleep deprivation	Hippocampus	9
GSE79666	Transcriptome sequencing reveals aberrant alternative splicing in Huntington's disease	BA4	7
GSE170997	Transcriptomics data of blood and brain from the YAC128 Huntington's disease mouse model [brain]	Brainstem Cerebellum Cortex Striatum	8 8 8 8
GSE64452	RNA-SEQ profiling of dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area regions of the mouse mid-brain	dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons from the ventral tegmental area	6
GSE84503	Activity-Dependent Regulation of Alternative Cleavage and Polyadenylation (APA) During Hippocampal Long-Term Potentiation (LTP) [RNA-Seq]	Hippocampus	6
GSE94559	Hippocampus CA1 pyramidal cells Transcriptomic profile in WT and Fmr1 KO mice, using Wfs1-CreERT2:RiboTag:Fmr1 knockout and wildtype mice	Hippocampus	6
GSE99353	Frontal cortex transcriptomic analysis of a TDP-43 Q331K knock-in mouse [5month]	Frontal cortex	6
GSE130376	Next-generation sequencing of cholinergic interneurons in the nucleus accumbens of cocaine-addicted and non-addicted mice	cholinergic interneurons in the nucleus accumbens	9
GSE121199	Biology and Bias in Cell Type-Specific RNAseq of Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons	Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons (D1) Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons (D2)	9 7

GSE146628	Identification of Natural Antisense Transcripts in Mouse Brain and Their Association with Autism Spectrum Disorder Risk Genes	Prefrontal cortex	5
		Striatum	5

¹ n- number of samples from wild-type or control animals included in the meta-analysis.

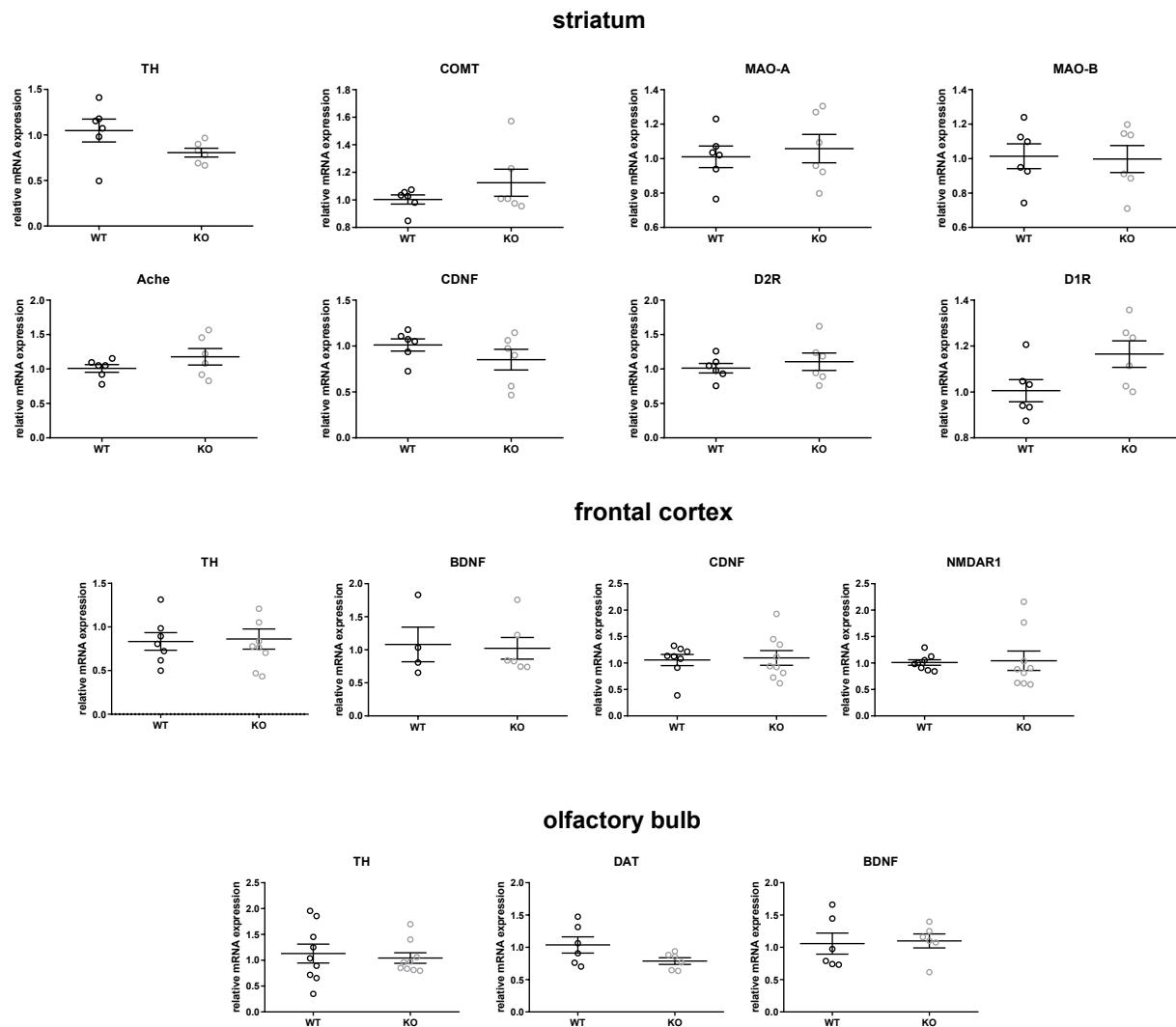
Appendix 3. Primers for relative expression by RT-qPCR.

Gene	Short name	Primer name	Primer sequence 5'-3'	Product size
Tyrosine hydroxylase	TH	rTH F	CCTTCCAGTACAAGCACGGT	109
		rTH R	TGGGTAGCATAGAGGCCCTT	
Dopamine transporter	DAT [128]	rDAT F	AGACACCAGTGGAGGCTCAAGA	71
		rDAT R	GCCGATGACTGATAGCAGGAA	
Catechol-O-methyltransferase	COMT	rCOMT F	GCCTTAGGCGGTTAGGGCT	93
		rCOMT R	AGCCAACGGCATCTCCTCAA	
Monoaminoxidase A	MAOA [129]	rMAOA F	TTCGCCAGCCAGTAGGTAGGAT	116
		rMAOA R	ATTCAACACCTCTCTAGCTGCTCG	
Monoaminoxidase B	MAOB	rMAOB F	ATCTGTGGATGTCCCAGCAAG	137
		rMAOB R	TTTTGTGGGCCAGGAAACCA	
Tryptophan hydroxylase 2	TPH2	rTPH2_fw1	CCTTGCAAGCAAGAACGGTC	154
		rTPH2_rev1	TTGGAAGGTGGTATTAGGC	
GABA transporter 1	GAT1 [130]	rGAT1 F	GCAATCGCCGTGAACCTCTTC	168
		rGAT1 R	AGGAAATGGAGACACACTCAAAGA	
Acetylcholinesterase	Ache	rAche F	ACGTGAGCCTGAACCTGAAG	116
		rAche R	CTCGTCCAGCGTGTCTGTG	
Brain-derived neurotrophic factor	BDNF	rBDNF F	TACCTGGATGCCGAAACAT	104
		rBDNF R	GCTGTGACCCACTCGCTAAT	
Cerebral dopamine neurotrophic factor	CDNF	rCDNF F	AGAAAACGCCTGTGCTATT	103
		rCDNF R	CTTCACCGTGGGCATGTGTA	
Glial cell line-derived neurotrophic factor	GDNF	rGDNF 2F	GAAGACCCTCCCTCGGC	79
		rGDNF 2R	GGTCAGGATAATCTCGGGCA	
Glutamate receptor 1	NMDAR1	NMDAR1 F	ATGCACCTGCTGACATTG	142
		NMDAR1 R	TATTGGCCTGGTTACTGCCT	
Dopamine receptor D1	D1R [131]	rD1R F	CGCGTAGACTCTGAGATTCTGAATT	77
		rD1R R	GAGTTAAGGAGCCACCATCAGT	
Dopamine receptor D1	D2R	rDRD2 F	TGCCCTTCATCGTCACTCTG	138
		rDRD2 R	GGGTACAGTTGCCCTTGAGT	

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	HPRT	ratHPRT- RT F	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	123
		ratHPRT- RT R	GCAGGGTCAGCAAAGAACCTTATAGC C	
28S rRNA gene	28S	rat28S_F	GCAAGGTGTTCTTCACCACAAA	79
		rat28S_R	CAGTTTCTTACGGCGTCTGTGAT	

References are given for primer sequences taken from previously published works

Appendix 4. Relative expression of genes of enzymes involved in neurotransmitter metabolism (TH, COMT, MAO-A, MAO-B, TPH2, Ache), neuronal receptors (D1DR, D2DR, NMDAR1), neurotrophins (BDNF, CDNF) and transporters (DAT, GAT1) in striatum, frontal cortex and olfactory bulb of TAAR9-KO-delC and wild type WT. Data are presented as mean \pm SEM



Appendix 5. Compounds tested for TAAR9 agonism.

N	COMPOUND	SUPPLIER	ACTION	SELECTIVITY
1	Dexmedetomidine hydrochloride	Sigma	Sedatives	
2	Putrescine dihydrochloride	Sigma	Trace amine	
3	Cadaverine	Sigma	Trace amine	
4	N,N-Methylpiperidine	Sigma	TAAR agonist	TAAR9
5	8-OH-DPAT	Sigma	5-HT1A receptor agonist	
6	Haloperidol	Sigma	Antipsychotic	
7	R-(-)-deprenyl hydrochloride/Selegiline	Sigma	MAO-B inhibitor	
8	Tyramine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
9	β -phenylethylamine	Sigma	Trace amine	
10	Isoniazid	Sigma	Antibiotic	
11	Phenylpiracetam	Sigma	Nootropic	
12	RO5263397H	Roche	TAAR1 agonist	TAAR1
13	Mefloquine hydrochloride	Sigma	Antimalarial	
14	5-Hydroxy-L-tryptophan	Sigma	Amino acid	
15	2-Bromo-alpha-ergocryptine methanesulfonate salt	Sigma	D2, D3 agonist	
16	N-methyl-1-phenylethanamine	Sigma	Natural product found in Vachellia rigidula	
17	Dimethylbutylamine	Sigma	Amine	
18	Acetyl-L-Carnitine	NOW	Dietary supplement	
19	Carnitine	NOW	Involved in metabolism	
20	LK00281	Krasavin lab*	Synthesized as TAAR1 agonist	
21	LK00445	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	
22	LK00386	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	
23	LK00764	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	TAAR1
24	LK00760	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	
25	LK00761	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	
26	LK00334	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	
27	LK00725	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	
28	LK00424	Krasavin lab	Synthesized as TAAR1 agonist	
29	Cis-3-hexenol	Sigma	Odorant	
30	Isocyclocitral	Sigma	Odorant	
31	Linalool	Sigma	Odorant	
32	Myrcene	Sigma	Odorant	
33	Borneol	Sigma	Odorant	
34	D-limonene	Sigma	Odorant	
35	Ambrinol 10% DPG (propyleneglycol)	Sigma	Odorant	

36	Trimofix 50%	Sigma	Odorant	
37	Timberol	Sigma	Odorant	
38	Citronellal	Sigma	Odorant	
39	Alpha-pinene	Sigma	Odorant	
40	Timbersilk	Sigma	Odorant	
41	Iso E super	Sigma	Odorant	
42	Monoethanolamine	Sigma	Odorant	
43	Bourgeonal 50%	Sigma	Odorant	
44	2,3,5-trimethylpyrazine	Sigma	Odorant	
45	2,6-dimethylpyrazine	Sigma	Odorant	
46	Eukalyptol	Sigma	Odorant	
47	Trimethylamine hydrochloride	Sigma	TAAR5 agonist	TAAR5
48	Metformin hydrochloride	Sigma	Antidiabetic	
49	Tryptamine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
50	Synephrine	Sigma	Trace amine	
51	3-Methoxytyramine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
52	DL-Normetanephrine hydrochloride	Sigma	Trace amine	
53	3-Hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride	Sigma	L-AADC inhibitor	L-AADC
54	Phenibut	Sigma	GABA receptor agonist	GABA
55	Dopamine hydrochloride	Sigma	Neurotransmitter	DA
56	Serotonin hydrochloride	Sigma	Neurotransmitter	5-HT
57	Epinephrine bitartrate salt	Fluka	Neurotransmitter	
58	AlphaNETA	Sigma	TAAR5 agonist	TAAR5
59	Isopentylamine	Sigma	TAAR agonist	
60	2,5-lutidine (2,5-Dimethylpyridine)	Sigma	Pheromone	
61	2,3-dimethyl pyrazine	Sigma	Pheromone	
62	2,5-dimethyl pyrazine	Sigma	Pheromone	
63	2,5-pyrazinedicarboxylic acid dihydrate	Sigma	Pheromone	
64	5-methyl,2-pyrazine carboxylic acid	Sigma	Pheromone	
65	Farnesene, mixture of isomers	Sigma	Pheromone	
66	DMAA (Methylhexanamine)	NOW		
67	DMHA (Dimethylhexylamine)	NOW		
68	Agmatine sulfate salt	Sigma	Trace amine	
69	SU 4312	Sigma	Inhibitor	KDR
70	SR 59230A oxalate	Sigma	Antagonist	beta3
71	rac BHFF	Sigma	modulator	GABA-B
72	Zofenopril calcium	Sigma	Inhibitor	ACE
73	SIB 1757	Sigma	Antagonist	mGluR5
74	SIB 1893	Sigma	Antagonist	mGluR5
75	Danshensu sodium salt	Sigma	Cardioprotectant	
76	Ketanserin tartrate	Sigma	Antagonist	5-HT2
77	1-(2-Methoxyphenyl)piperazine hydrochloride	Sigma	Agonist	5-HT1 > 5-HT2
78	PAPP	Sigma	Agonist	5-HT1A

79	Dolasetron mesylate hydrate	Sigma	Antagonist	5-HT3
80	SR-95531	Sigma	Antagonist	GABA-A
81	(±)-6-Chloro-PB hydrobromide	Sigma	Agonist	D1
82	L-Beta-threo-benzyl-aspartate	Sigma	Antagonist	EAAT3
83	Suramin sodium salt	Sigma	Antagonist	P2X, P2Y
84	SQ 22536	Sigma	Inhibitor	Adenylyl cyclase
85	Sepiapterin	Sigma	Cofactor	NOS
86	Amisulpride	Sigma	Antagonist	D2/D3
87	(±)-SKF 38393, N-allyl-, hydrobromide	Sigma	Agonist	D1
88	SDZ-205,557 hydrochloride	Sigma	Antagonist	5-HT4
89	SB 206553 hydrochloride	Sigma	Antagonist	5-HT2C/5-HT2B
90	Granisetron hydrochloride	Sigma	Antagonist	5-HT3
91	L-Tryptophan	Sigma	Precursor	
92	Tranilast	Sigma	Inhibitor	LTC4
93	Tiapride hydrochloride	Sigma	Antagonist	D2/D3
94	Taurine	Sigma	Agonist	
95	FAUC 213	Sigma	Antagonist	D4
96	Tolbutamide	Sigma	Releaser	Insulin
97	Tetraethylthiuram disulfide	Sigma	Inhibitor	Alcohol Dehydrogenase
98	TCPOBOP	Sigma	Agonist	CAR
99	Tetraisopropyl pyrophosphoramido	Sigma	Inhibitor	Butyrylcholinesterase
100	Tetramisole hydrochloride	Sigma	Inhibitor	Phosphatase
101	Trihexyphenidyl hydrochloride	Sigma	Antagonist	Muscarinic
102	Theophylline	Sigma	Antagonist	A1 > A2
103	(E)-4-amino-2-butenoic acid	Sigma	Agonist	GABA-C
104	Tetradecylthioacetic acid	Sigma	Agonist	PPAR-alpha
105	Abiraterone acetate	Sigma	Inhibitor	CYP17A1
106	Tyrphostin AG 879	Sigma	Inhibitor	TrkA
107	Tetraethylammonium chloride	Sigma	Antagonist	Nicotinic
108	Tolazamide	Sigma	Releaser	Insulin
109	Terbutaline hemisulfate	Sigma	Agonist	beta
110	4-Hydroxyphenethylamine hydrochloride	Sigma	Agonist	
111	Triflupromazine hydrochloride	Sigma	Antagonist	D2
112	Trimipramine maleate	Sigma	Inhibitor	Reuptake
113	Oltipraz metabolite M2	Sigma	Inhibitor	LXRa
114	TTNPB	Sigma	Ligand	RAR-alpha, beta, gamma
115	Lubeluzole dihydrochloride	Sigma	Antagonist	NMDA
116	Triamterene	Sigma	Blocker	
117	DL-alpha-Methyl-p-tyrosine	Sigma	Inhibitor	Tyrosine hydroxylase
118	6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-9H-pyrido[3,4b] indole	Sigma	Inhibitor	MAO
119	Acetamide	Sigma	Inhibitor	Carbonic anhydrase
120	Amantadine hydrochloride	Sigma	Releaser	

121	GABA	Sigma	Agonist	
122	Gabaculine hydrochloride	Sigma	Inhibitor	GABA transaminase
123	O-(Carboxymethyl)hydroxylamine hemihydrochloride	Sigma	Inhibitor	Aminotransferase
124	Ezatiostat	Sigma	Inhibitor	GSTP1-1
125	N-Acetylprocainamide hydrochloride	Sigma	Blocker	
126	Actinonin	Sigma	Inhibitor	Leucine aminopeptidase
127	N-Phenylanthranilic acid	Sigma	Blocker	
128	GSK-650394	Sigma	Antagonist	SGK1
129	Eptifibatide acetate	Sigma	Inhibitor	GPIIb/IIIa
130	Aminophylline ethylenediamine	Sigma	Antagonist	A1/A2
131	3'-Azido-3'-deoxythymidine	Sigma	Inhibitor	Reverse transcriptase
132	YM 976	Sigma	Inhibitor	PDE 4
133	5-(N,N-Dimethyl)amiloride hydrochloride	Sigma	Blocker	Na+/H+ Antiporter
134	(±)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid	Sigma	Antagonist	NMDA
135	Sodium Taurocholate hydrate	Sigma	Modulator	Conjugate Pathway
136	Tienilic acid	Sigma	Inhibitor	P450
137	Atreleuton	Sigma	Inhibitor	5-lipoxygenase
138	TMB-8 hydrochloride	Sigma	Antagonist	
139	L-azetidine-2-carboxylic acid	Sigma	Inhibitor	Collagen
140	GNF-5	Sigma	Inhibitor	BRC-Abl
141	Acetyl-beta-methylcholine chloride	Sigma	Agonist	M1
142	KY-05009	Sigma	Inhibitor	TNIK
143	Azathioprine	Sigma	Inhibitor	Purine synthesis
144	L-732,138	Sigma	Antagonist	NK1 > NK2, NK3
145	Amifostine	Sigma	Inhibitor	Cytoprotectant
146	Atropine methyl bromide	Sigma	Antagonist	Muscarinic
147	5-Aminovaleric acid hydrochloride	Sigma	Antagonist	GABA-B
148	4-Aminopyridine	Sigma	Blocker	A-type
149	p-Aminoclonidine hydrochloride	Sigma	Agonist	alpha2
150	Aminopterin	Sigma	Inhibitor	Dihydrofolate reductase
151	5-azacytidine	Sigma	Inhibitor	DNA methyltransferase
152	9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride	Sigma	Inhibitor	Cholinesterase
153	Acyclovir	Sigma	Inhibitor	Viral DNA synthesis
154	Acetylsalicylic acid	Sigma	Inhibitor	COX-3 > COX-1 > COX-2
155	Acetazolamide	Sigma	Inhibitor	Carbonic anhydrase
156	Indinavir sulfate salt hydrate	Sigma	inhibitor	HIV
157	(±)-Nipecotic acid	Sigma	Inhibitor	Uptake
158	Atropine sulfate	Sigma	Antagonist	Muscarinic
159	Salirasib	Sigma	Inhibitor	RAS
160	N-Acetyl-5-hydroxytryptamine	Sigma	Precursor	
161	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride	Sigma	Blocker	Na+/H+ Antiporter

162	10058-F4	Sigma	Inhibitor	c-Myc
163	Rivastigmine tartrate	Sigma	Inhibitor	cholinesterase
164	Aconitine	Sigma	Blocker	Na+/H+ Antiporter
165	Arecoline hydrobromide	Sigma	Agonist	
166	Aminoguanidine hemisulfate	Sigma	Inhibitor	NOS
167	Azelaic acid	Sigma	Inhibitor	
168	Atropine methyl nitrate	Sigma	Antagonist	Muscarinic
169	(±)-Norepinephrine (+)bitartrate	Sigma	Agonist	
170	Aurintricarboxylic acid	Sigma	Inhibitor	TopoII
171	3-Aminopropionitrile fumarate	Sigma	Substrate	CYP450
172	1-Aminobenzotriazole	Sigma	Inhibitor	CYP450, chloroperoxidase
173	Sandoz 58-035	Sigma	Inhibitor	ACAT
174	Acetylthiocholine chloride	Sigma	Agonist	Nicotinic
175	SirReal2	Sigma	Inhibitor	Sirt2
176	Tryptamine hydrochloride	Sigma	Ligand	
177	Arcaine sulfate	Sigma	Antagonist	NMDA-Polyamine
178	4-Amino-1,8-naphthalimide	Sigma	Inhibitor	PARP
179	(±)-2-Amino-4-phosphonobutyric acid	Sigma	Antagonist	NMDA
180	Apigenin	Sigma	Inhibitor	
181	UNC0379 trifluoroacetate salt	Sigma	Inhibitor	SETD8
182	(±)-2-Amino-3-phosphonopropionic acid	Sigma	Antagonist	NMDA
183	TNP	Sigma	Inhibitor	IP3K
184	Arbidol hydrochloride	Sigma	Inhibitor	
185	4-Aminobenzamidine dihydrochloride	Sigma	Inhibitor	Trypsin
186	5-Fluoroindole-2-carboxylic acid	Sigma	Antagonist	NMDA-Glycine
187	1-Aminocyclopropanecarboxylic acid hydrochloride	Sigma	Agonist	NMDA-Glycine
188	Reserpine	Sigma	Inhibitor	Uptake
189	MCC-555	Sigma	Inhibitor	
190	(+)-Butaclamol hydrochloride	Sigma	Antagonist	
191	Apomorphine hydrochloride hemihydrate	Sigma	Agonist	
192	L-Arginine	Sigma	Precursor	
193	2-(2-Aminoethyl)isothiourea dihydrobromide	Sigma	Inhibitor	NOS
194	Kyotorphin acetate salt	Sigma		
195	3-Aminopropylphosphonic acid	Sigma	Agonist	GABA-B
196	AubipyOMe	Sigma	Phosphorylation	TRAP/ACP5
197	Cyclosporin A	Sigma	Phosphorylation	Calcineurin phosphatase
198	Carbachol	Sigma	Cholinergic	
199	Cephalexin hydrate	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
200	Roscovitine	Sigma	Phosphorylation	CDK
201	Cyproheptadine hydrochloride	Sigma	Serotonergics	5-HT2
202	3-Morpholinosydnonimine hydrochloride	Sigma	Nitric Oxide	

203	Cantharidin	Sigma	Phosphorylation	PP2A
204	Chlorpromazine hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	
205	Centrophenoxine hydrochloride	Sigma	Nootropic	
206	Tirapazamine	Sigma	Apoptosis	
207	D-Cycloserine	Sigma	Glutamatergics	NMDA-Glycine
208	Chlorzoxazone	Sigma	Nitric Oxide	iNOS
209	Chlorothiazide	Sigma	Biochemistry	Carbonic anhydrase
210	SB 204741	Sigma	Serotonergics	5-HT2B
211	GR 79236X	Sigma	Adenosine	A1
212	Cefaclor	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
213	Citalopram hydrobromide	Sigma	Serotonergics	Reuptake
214	Cefsulodin sodium salt hydrate	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
215	Clemastine fumarate	Sigma	Histaminergics	H1
216	(±)-Chlorpheniramine maleate	Sigma	Histaminergics	H1
217	8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP sodium	Sigma	Cyclic Nucleotides	
218	L-Cysteinesulfinic Acid	Sigma	Glutamatergics	
219	(+)-Chlorpheniramine maleate	Sigma	Histaminergics	H1
220	Ceftriaxone sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
221	Cefmetazole sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
222	DL-Cycloserine	Sigma	Sphingolipid	Ketosphinganine synthase, Alanine aminotransferase
223	Clonidine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2
224	Caffeic acid phenethyl ester	Sigma	Cell Cycle	NFkB
225	Lumefantrine	Sigma	Immunomodulators and Antibiotics	
226	Cortisone 21-acetate	Sigma	Hormone	Cortisol
227	Calmidazolium chloride	Sigma	Intracellular Calcium	Ca2+ATPase
228	9-cyclopentyladenine	Sigma	Cyclic Nucleotides	Adenylyl cyclase
229	Cefazolin sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
230	L-798106	Sigma	Lipids	EP3
231	Clozapine	Sigma	Dopaminergics	D4 > D2,D3
232	McN-A-343	Sigma	Cholinergic	M1
233	Cefotaxime sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
234	Imipenem monohydrate	Sigma	Antibiotic	
235	Pyrocatechol	Sigma	Cell Cycle	
236	Cephalosporin C zinc salt	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
237	GR 113808	Sigma	Serotonergics	5-HT4
238	Cephalothin sodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
239	Clemizole hydrochloride	Sigma	Histaminergics	H1
240	(-)-Cotinine	Sigma	Cholinergic	Nicotinic
241	(±)-p-Chlorophenylalanine	Sigma	Neurotransmission	Tryptophan hydroxylase
242	Canrenone	Sigma	Cell Signaling	
243	Cilostamide	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE III
244	Cephradine	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis

245	ML277	Sigma	Ion Channels	KCNQ1 > KCNQ2, KCNQ4
246	Nestorone	Sigma	Lipid Signaling	Progesterone receptor
247	Carbamazepine	Sigma	Anticonvulsant	
248	Cimetidine	Sigma	Histaminergics	H2
249	2-Chloroadenosine	Sigma	Adenosine	A1 > A2
250	DMH4	Sigma	Kinase/Phosphotase	VEGF
251	Chloroquine diphosphate	Sigma	DNA	DNA
252	Cystamine dihydrochloride	Sigma	Glutamatergics	Transglutaminase
253	Chelidamic acid	Sigma	Glutamatergics	L-glutamic decarboxylase
254	Artemether	Sigma	Immunomodulators and Antib	
255	Argatroban monohydrate	Sigma	Cell signaling	Thrombin
256	Cyproterone acetate	Sigma	Hormone	Androgen
257	Captopril	Sigma	Neurotransmission	ACE
258	Cyclobenzaprine hydrochloride	Sigma	Serotonergics	5-HT2
259	Bethanechol chloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
260	Cinepazide maleate	Sigma	Ca2+ Channel	A2
261	Clofibrate	Sigma	Lipid	Lipoprotein lipase
262	Clomipramine hydrochloride	Sigma	Serotonergics	Reuptake
263	1G244	Sigma	Protease	DPP8/DPP9
264	Cinoxacin	Sigma	Antibiotic	
265	Colchicine	Sigma	Cytoskeleton and ECM	Tubulin
266	DL-p-Chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride	Sigma	Neurotransmission	Tryptophan hydroxylase
267	CNS-1102	Sigma	Glutamatergics	NMDA
268	AR-R17779 Hydrochloride	Sigma	Cholinergic	alpha7 nACh
269	Cinnarizine	Sigma	Ca2+ Channel	
270	Clotrimazole	Sigma	K+ Channel	Ca2+-activated K+ channel
271	Cytosine-1-beta-D-arabinofuranoside hydrochloride	Sigma	DNA Metabolism	
272	Calcimycin	Sigma	Intracellular Calcium	Ca2+
273	SJ000291942	Sigma	Cytokines	BMP
274	Droxinostat	Sigma	Gene Regulation	HDAC3, HDAC6, and HDAC8
275	L-Canavanine sulfate	Sigma	Nitric Oxide	iNOS
276	Nitrendipine	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
277	SDZ 220-581 hydrochloride	Sigma	Neurotransmission	NMDA
278	Lamotrigine isethionate	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	
279	Orphenadrine hydrochloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
280	(±)-Octoclohepin maleate	Sigma	Dopaminergics	D2
281	O-Phospho-L-serine	Sigma	Glutamatergics	NMDA
282	Pancuronium bromide	Sigma	Cholinergic	
283	CID 11210285 hydrochloride	Sigma	Gene Regulation	Wnt
284	Valproic acid sodium	Sigma	Anticonvulsant	
285	Pyrilamine maleate	Sigma	Histaminergics	H1

286	Nimodipine	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
287	NS-1619	Sigma	K+ Channel	Ca2+ activated
288	Oleic Acid	Sigma	Phosphorylation	PKC
289	AZ191	Sigma	Cell Cycle	DYRK1B
290	Progesterone	Sigma	Hormone	Progesterone
291	(±)-Propranolol hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	beta
292	3-alpha,21-Dihydroxy-5-alpha-pregnan-20-one	Sigma	GABAergics	GABA-A
293	1-Phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea	Sigma	Dopaminergics	beta-Hydroxylase
294	Promethazine hydrochloride	Sigma	Histaminergics	H1
295	Piroxicam	Sigma	Prostaglandin	COX
296	Nisoxetine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	Reuptake
297	HA155	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	autotaxin
298	Oxymetazoline hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2A
299	Ofloxacin	Sigma	Antibiotic	DNA Synthesis
300	Topotecan hydrochloride hydrate	Sigma	Apoptosis	topoisomerase I
301	SKF-525A hydrochloride	Sigma	Multi-Drug Resistance	Microsomal oxidation
302	Pirfenidone	Sigma	Immune System	
303	Mitiglinide calcium	Sigma	Ion channels	KATP
304	Praziquantel	Sigma	Antibiotic	Ca2+ Ionophore
305	Atglistatin	Sigma	Lipids	ATGL
306	Nyldrin hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	beta
307	NBQX disodium	Sigma	Glutamatergics	AMPA/kainate
308	Sodium Oxamate	Sigma	Biochemistry	Lactate Dehydrogenase
309	Oxotremorine sesquifumarate salt	Sigma	Cholinergic	M2
310	Piceatannol	Sigma	Phosphorylation	Syk / Lck
311	Picrotoxin	Sigma	GABAergics	GABA-C
312	1,3-Dimethyl-8-phenylxanthine	Sigma	Adenosine	A1
313	Cisplatin	Sigma	DNA	
314	Propafenone hydrochloride	Sigma	K+ Channel	hKv1.5
315	Phenylephrine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha1
316	JW55	Sigma	Gene Regulation	TNKS1/2
317	NSC405020	Sigma	Extracellular Matrix	MT1-MMP
318	Oxybutynin Chloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
319	SC-514	Sigma	Phosphorylation	IKK-2
320	Pentamidine isethionate	Sigma	Glutamatergics	NMDA
321	LP44	Sigma	Serotonergics	5-HT7
322	PRE-084	Sigma	Opioid	sigma1
323	Podophyllotoxin	Sigma	Cytoskeleton and ECM	
324	CPCCOEt	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	mGluR1
325	Perphenazine	Sigma	Dopaminergics	D2
326	Terutroban	Sigma	Cell Signaling and Neuroscience	TPr
327	(±)-Octopamine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha

328	Oxiracetam	Sigma	Nootropic	
329	SB 216763	Sigma	Phosphorylation	GSK-3
330	Pemetrexed disodium heptahydrate	Sigma	Apoptosis	
331	Pentoxifylline	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE
332	NAV-2729	Sigma	G protein	ARF6
333	LDN-27219	Sigma	Neurobiology	TG2
334	PNU-282987	Sigma	Cholinergic	Nicotinic alpha7
335	Pentylenetetrazole	Sigma	Neurotransmission	CNS
336	Naftopidil dihydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha1
337	N-Oleoylethanolamine	Sigma	Sphingolipid	Ceramidase
338	Ouabain	Sigma	Ion Pump	Na+/K+ ATPase
339	Suprafenacine	Sigma	Apoptosis	
340	Parthenolide	Sigma	Serotonergics	
341	Pimozone	Sigma	Dopaminergics	D2
342	GSK180736A	Sigma	Phosphorylation	ROCK1/GRK
343	Palmitoyl-DL-Carnitine chloride	Sigma	Phosphorylation	PKC
344	Piracetam	Sigma	Glutamatergics	AMPA
345	(+)-Pilocarpine hydrochloride	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
346	Bisoprolol hemifumarate salt	Sigma	Adrenoceptor	Beta1
347	Oxolinic acid	Sigma	Antibiotic	DNA Gyrase
348	ODQ	Sigma	Cyclic Nucleotides	NO-sensitive guanylyl cyclase
349	Oxotremorine methiodide	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
350	Nanchangmycin	Sigma	Antiviral	Viral Entry
351	L-Glutamic acid, N-phthaloyl-	Sigma	Glutamatergics	NMDA
352	Papaverine hydrochloride	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE
353	R(-)-N6-(2-Phenylisopropyl)adenosine	Sigma	Adenosine	A1
354	Phosphomycin disodium	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
355	Pilocarpine nitrate	Sigma	Cholinergic	Muscarinic
356	Dofetilide fumarate	Sigma	Mulit-Drug Resistance	MDR-1
357	Tomoxetine	Sigma	Adrenoceptor	Reuptake
358	Tamoxifen citrate	Sigma	Phosphorylation	PKC
359	Telenzepine dihydrochloride	Sigma	Cholinergic	M1
360	Uridine 5'-diphosphate sodium	Sigma	P2 Receptor	P2Y
361	U-69593	Sigma	Opioid	kappa
362	U-99194A maleate	Sigma	Dopaminergics	D3
363	Vincristine sulfate	Sigma	Cytoskeleton and ECM	Tubulin
364	WIN 62,577	Sigma	Tachykinin	NK1
365	Yohimbine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2
366	Tetracaine hydrochloride	Sigma	Na+ Channel	
367	Brinzolamide	Sigma	Carbonic anydrase	anydrase II
368	Terfenadine	Sigma	Histaminergics	H1
369	Thioperamide maleate	Sigma	Histaminergics	H3
370	U-74389G maleate	Sigma	Cell Stress	
371	UK 14,304	Sigma	Adrenoceptor	alpha2

372	U0126	Sigma	Phosphorylation	MEK1/MEK2
373	AMG 9810	Sigma	Ion Channels	TRPV1
374	Ara-G hydrate	Sigma	Apoptosis	
375	YS-035 hydrochloride	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
376	Remodelin hydrobromide	Sigma	Gene Regulation	NAT10
377	4-DAMP	Sigma	Cholinergic	M3
378	Tropicamide	Sigma	Cholinergic	M4
379	(±)-Thalidomide	Sigma	Cytoskeleton and ECM	TNFalpha
380	CCT007093	Sigma	Apoptosis	PPM1D
381	U-62066	Sigma	Opioid	kappa
382	SID 3712249	Sigma	Gene Regulation	MiR-544
383	CP466722	Sigma	Kinase/Phosphatase	ATM
384	WAY-100635 maleate	Sigma	Serotonergics	5-HT1A
385	YC-1	Sigma	Cyclic Nucleotides	Guanlyl cyclase
386	Tyrphostin 51	Sigma	Phosphorylation	EGFR
387	Trifluoperazine dihydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1/D2
388	THIP hydrochloride	Sigma	GABAergics	GABA-A
389	A-68930 hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1
390	L2-b	Sigma	Cell Biology	
391	Erdosteine	Sigma	Antioxidants and Cytoprotectants	
392	(±)-Verapamil hydrochloride	Sigma	Ca2+ Channel	L-type
393	L-Mimosine from Koa hoale seeds	Sigma	Apoptosis	
394	TDFA trifluoroacetate salt	Sigma	Gene Regulation	PAD4 or PADI4
395	Zaprinast	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE V
396	RN-9893	Sigma	Ca2+ Channel	TRPV4
397	D-609 potassium	Sigma	Lipid	PIPLC
398	Trifluperidol hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1/D2
399	5HPP-33	Sigma	Cytoskeleton and ECM	microtubules
400	Zibotentan	Sigma	Endothelin	ET(A)
401	CCT137690	Sigma	Kinase/Phosphatase Biology	Aurora A, B and C
402	Galloflavin potassium	Sigma	Cell Stress	LDN-A/B
403	Wortmannin from Penicillium funiculosum	Sigma	Phosphorylation	PI3K
404	Xylazine hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha2
405	Zonisamide sodium	Sigma	Anticonvulsant	
406	Bropririmine	Sigma	Immunomodulators	
407	Thioridazine hydrochloride	Sigma	Dopaminergics	D1/D2
408	3-Tropanyl-indole-3-carboxylate hydrochloride	Sigma	Serotonergics	5-HT3
409	CIQ	Sigma	Neurotransmission	NR2C/NR2D
410	4-Imidazoleacrylic acid	Sigma	Histaminergics	Histidine ammonia-lyase/ decarboxylase
411	Wiskostatin	Sigma	Actin	N-WASP
412	Vinpocetine	Sigma	Cyclic Nucleotides	PDE I
413	EMPA	Sigma	Orexin	OXR2

414	SCH 58261	Sigma	Purinoceptor	alpha2A
415	Caroverine hydrochloride	Sigma	Glutamatergics	NMDA/AMPA
416	Tyrphostin AG 538	Sigma	Apoptosis	Pin-1
417	Furamidine dihydrochloride	Sigma	Apoptosis	kDNA / Tdp1
418	XCT790	Sigma	Gene Regulation	ERRalpha
419	TPMPA	Sigma	GABAergics	GABA-C
420	Urapidil hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha1
421	(-)-trans-(1S,2S)-U-50488 hydrochloride	Sigma	Opioid	kappa
422	Vancomycin hydrochloride from Streptomyces orientalis	Sigma	Antibiotic	Cell wall synthesis
423	Acepromazine maleate	Sigma	Neurotransmission	
424	Xylometazoline hydrochloride	Sigma	Adrenoceptor	alpha
425	Olprinone hydrochloride	Sigma	Phosphodiesterase	PDE3
426	Trimethoprim	Sigma	Antibiotic	Dihydrofolate reductase
427	IPA-3	Sigma	Phosphorylation	Pak1
428	Lorcainide hydrochloride	Sigma	Ion Channel Modulator	Nav1.5
429	Tipiracil hydrochloride	Sigma	Neuroscience	p53
430	Urapidil, 5-Methyl-	Sigma	Adrenoceptor	alpha1A
431	U-101958 maleate	Sigma	Dopaminergics	D4
432	(±)-gamma-Vinyl GABA	Sigma	GABAergics	Transaminase
433	Darglitzzone sodium salt	Sigma	Gene Regulation	PPAR/RXR
434	Roslin 2	Sigma	Phosphorylation	p53/FAK
435	Zimelidine dihydrochloride	Sigma	Serotonergics	Reuptake

Compounds from 69 to 435 are from Sigma LOPAC1280 library.

* Krasavin lab – compounds were synthesized by the Krasavin group at the Institute of Chemistry (organic chemistry division) of Saint Petersburg State University.