

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2772.

TÓTH KRISZTINA

Neuromorfológia és sejtbiológia
című program

Programvezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

Témavezetők: Dr. Környei Zsuzsanna, tudományos főmunkatárs

Dr. Dénes Ádám, vezető kutató

A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ kotranszporter-1 (NKCC1) mikroglia-sejtek működésében és agyi gyulladásos mechanizmusaiban betöltött szerepének vizsgálata

Doktori értekezés

Tóth Krisztina

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Környei Zsuzsanna, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Dénes Ádám, Ph.D., vezető kutató

Hivatalos bírálók: Dr. Adorján István, Ph.D., egyetemi kutató
Dr. Krizbai István, D.Sc., tudományos tanácsadó

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Dobolyi Árpád, D.Sc., tudományos tanácsadó

Tagok: Dr. Csillag András, D.Sc., professor emeritus
Dr. Hájos Norbert, D.Sc., tudományos tanácsadó

Budapest
2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	9
1.1. A mikroglia fiziológias szerepe a központi idegrendszerben.....	10
1.1.1. A mikroglia eredete és szerepe az idegrendszer fejlődése során	10
1.1.2. A mikroglia szerepe a felnőtt agyban	14
1.2. A mikrogliasejtek aktivációs mechanizmusai és szerepük az agyi gyulladásos folyamatokban	16
1.2.1. Citokinek és kemokinek szerepe az agyi gyulladásos folyamatokban	18
1.2.2. Az inflammaszómák szerepe az agyi gyulladásos folyamatokban	20
1.3. A mikroglia nyúlványok alap motilitását és a nyúlvány mozgás dinamikáját meghatározó folyamatok	23
1.4. Az extracelluláris ionkörnyezet változásának hatása a mikroglialis működésre.....	27
1.5. A mikroglia főbb funkcióiban szerepet játszó ioncsatornák áttekintése	29
1.6. A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ kotranszporter-1 (NKCC1)	31
1.6.1. Az NKCC1 molekuláris felépítése és funkcionális jellemzése...	33
1.6.2. Az NKCC1 szerepe idegsejtekben.....	35
1.6.3. Az NKCC1 szerepe asztrogliasejtekben	37
1.6.4. Az NKCC1 lehetséges szerepe mikrogliasejtekben.....	38
1.7. Az NKCC1 antagonisták terápiás alkalmazási lehetőségei különböző agyi kórfolyamatokban	39
1.7.1. Agyi fejlődési rendellenességek	40
1.7.2. Neurodegeneratív kórképek	44
1.7.3. A bumetanid idegrendszeri betegségekben való alkalmazásának korlátai.....	45

2. Célkitűzések.....	49
3. Anyagok és Módszerek.....	50
3.1. Kísérleti állatok, etikai állásfoglalás.....	50
3.2. Mikroglialis NKCC1 génkiütött egérvonal létrehozása	50
3.3. Mikrogliasejtek izolálása és sejt kultúrák.....	52
3.4. Neuronális progenitor sejtek izolálása.....	52
3.5. Anyagbeadások.....	53
3.5.1. LPS és bumetanid szisztémás beadása.....	53
3.5.2. Intrakortikális és intraciszternális anyagbeadások.....	53
3.6. Citokin koncentrációk meghatározása.....	54
3.7. Az agy, lép és máj minták fluoreszcens áramlási citometriás vizsgálata	54
3.8. RNS izolálás és RT-qPCR.....	56
3.9. A mikroglialis nyúlványozás dinamikájának meghatározása in vivo két-foton mikroszkópiával.....	57
3.10. Elektrofiziológia.....	60
3.10.1. Hippokampális akut szeletek	60
3.10.2. Perforált patch-clamp.....	60
3.11. Mikrogliasejtek automatizált morfológiai analízise.....	62
3.12. Cerebrális ischaemia kiváltása az arteria cerebri media elzárása (MCAo) segítségével.....	62
3.13. Immunhisztokémia	64
3.13.1. Az NKCC1 mikroglialis jelenlétének immunhisztokémiai kimutatása	64
3.13.2. Az ischaemiás és az LPS-injektált szövetek immunhisztokémiai vizsgálata	65
3.14. Az adatok statisztikai elemzése.....	67
4. Eredmények.....	68
4.1. Az NKCC1 farmakológiai gátlásának hatása az agyi citokin termelésre.....	68
4.2. A centrális LPS kezelés hatására termelődő IL-1 α és IL-1 β fő forrása a mikroglia.....	73

4.3. Új kondicionális mutáns egérvonal létrehozása a mikroglialis NKCC1 vizsgálatára	75
4.4. Az NKCC1 mikroglialis deléciója megváltozott sejt morfológiát eredményez.....	79
4.5. A mikroglialis NKCC1 hiány nem befolyásolja a mikroglia fagocitotikus aktivitását.....	82
4.6. A centrális NKCC1 gátlás megváltoztatja a mikroglia nyúlványok motilitását	84
4.7. A mikroglialis NKCC1 hiány fokozza az NLRP3 expressziót és serkenti a proinflammatorikus citokinek termelődését az agyban.....	86
4.8. Az mikroglialis NKCC1 deléció hatására a mikroglialis membrán áramok megváltoznak.....	92
4.9. A mikroglialis NKCC1 hiány hatására fellépő kompenzációs mechanizmusok vizsgálata	96
4.10. A mikroglialis NKCC1 deléció nagyobb infarktus méretet és rosszabb neurológiai kimenetelt eredményez cerebrális ischaemiát követően	99
5. Megbeszélés	105
6. Következtetések.....	114
7. Összefoglalás	117
8. Summary	118
9. Irodalomjegyzék	119
10. Saját publikációk jegyzéke.....	144
11. Köszönetnyilvánítás	146

Rövidítések jegyzéke

ACSF	mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)
A β	amiloid béta (amiloid beta)
AD	Alzheimer-kór (Alzheimer's diseases)
ALS	amiotrófiás laterálszklerózis (amyotrophic lateral sclerosis)
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
AQP4	akvaporin-4 (aquaporin-4)
BDNF	agyi eredetű növekedési faktor (brain-derived neurotrophic factor)
CBA	citometrikus bead array (cytometric bead array)
CCC	kation-klorid kotranszporter (cation-chloride cotransporter)
CD	differenciálódási klaszter (cluster of differentiation)
CD11b	differenciálódási molekula klaszter 11b (cluster of differentiation molecule 11b)
CLIC	klorid intracelluláris ioncsatorna, (chloride intracellular channel)
CSF-1	kolónia stimuláló faktor 1 (colony-stimulating factor 1)
CSF-1R	kolónia stimuláló faktor 1 receptor (colony-stimulating factor 1 receptor)
CXCL	C-X-C motívumot tartalmazó kemokin ligand (C-X-C motif chemokine ligand 1)
CX3CL	C-X3-C motívumot tartalmazó kemokin ligand (C-X3-C motif chemokine ligand 1)
CX3CR1	C-X3-C motívumot tartalmazó kemokin receptor 1 (C-X3-C motif chemokine receptor 1)
DAMP	sérüléshez kapcsolt molekuláris mintázatú molekulák (damage-associated molecular patterns)

DF	hajtóerő (driving force)
EMR1(=F4/80)	EGF-szerű modult tartalmazó mucinszerű hormon receptor-szerű 1 (EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1)
Fcrls	Fc receptor-szerű S (Fc receptor-like S)
G-CSF	granulocita kolónia-stimuláló faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GFAP	glia fibrilláris savas protein (glial fibrillary acidic protein)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
Gpr34	G-fehérje -kapcsolt receptor 34 (G protein-coupled receptor 34)
Hexb	β -hexózaminidáz béta alegysége (beta-hexosaminidase subunit beta)
Hprt	hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)
Iba1	ionizált kalcium kötő adapter molekula 1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1)
IFN- γ	interferon gamma (interferon gamma)
IL	interleukin (interleukin)
KC	keratinocita kemoattraktáns (keratinocyte chemoattractant)
KCC	K^+ - Cl^- - kotranszporter (K^+ - Cl^- - cotransporter)
Kir	befelé egyenirányító kálium-csatorna (inwardly rectifying K^+ channel 2)
KIR	központi idegrendszer
Kv	feszültségfüggő kálium-csatorna (voltage-gated potassium channel)
LPS	lipopoliszacharid (lipopolysaccharide)
LTP	tartós hatékonyságnövekedés (long-term potentiation)
Ly6C	limfocita antigén 6 komplex C1 lókusza (lymphocyte antigen 6 complex, locus C1)

Ly6G	limfocita antigén 6 komplex G lókusza (lymphocyte antigen 6 complex, locus G)
MACS	mágnesesen-aktivált sejt szeparálás (magnetic-activated cell sorting)
MCAo	arteria cerebri media elzárása (middle cerebral artery occlusion)
MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
MHCII	fő hisztokompatibilitás komplex II (major histocompatibility complex)
NF- κ B	nukleáris faktor-kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NKCC1	Na^+ - K^+ -2 Cl^- kotranszporter-1 (Na^+ - K^+ -2 Cl^- cotransporter 1)
NLRP3	NOD-, LRR- és pirin domént tartalmazó protein 3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3)
Nox1	NADPH oxidáz 1 (NADPH oxidase 1)
OSR1	oxidatív stressz reszponzív 1 kináz (oxidative stress responsive kinase 1)
P2Y12R	P2Y12 receptor (P2Y12 receptor)
PAMPs	patogénhez kapcsolt molekuláris mintázatú molekulák (pathogen-associated molecular pattern)
PB	foszfát puffer (phosphate buffer)
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
RT-qPCR	valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció (quantitative real-time polymerase chain reaction)
RANTES	„regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted”
RNS	ribonukleinsav (ribonucleic acid)
ROS	reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species)

Sall1	Sal-like receptor 1 (Sal-like receptor 1)
SiglecH	sziálsav kötő Ig-szerű lektin H (sialic acid binding Ig like lectin 1)
SPAK	Ste20/SPS1-szerű prolinban és analinban gazdag kináz (STE20/SPS1-related proline-alanine-rich kinase)
TBI	traumás agysérülés (traumatic brain injury)
TGF- β	transzformáló növekedési faktor 1 béta (transforming growth factor-beta)
THIK-1	tandem ismétlődésű pórus doménnel rendelkező halotán-gátolható K^+ csatorna (tandem pore domain halothane inhibited K^+ channel)
TLRs	Toll-like receptorok (Toll-like receptors)
Tmem119	transzmembrán fehérje 119 (transmembrane protein 119)
TNF- α	tumor nekrozis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)
TRP	tranzients receptor potenciál (transient receptor potential)
TWIK-2	tandem ismétlődésű pórus doménnel rendelkező gyengén befelé rektifikáló K^+ csatorna (tandem of pore domains in a weak inward rectifying K^+ channel)
VRAC	térfogat által szabályozott anion csatornák (volume-regulated anion channels)
V_m	membrán potenciál (membrane potential)
WNK	lizin nélküli szerin-treonin kináz (with no lysine serine-threonine kinase)

1. Bevezetés

A központi idegrendszerben (KIR) a különböző inzultusok (pl. fertőzések, traumás sérülések, ischaemia, toxinok) hatására létrejövő gyulladással válaszreakciókat neuroinflammációnak nevezzük, melynek kialakulásában a KIR immunsejtjei által termelt citokinek (pl. IL-1 β , IL-6, TNF), kemokinek (pl. CXCL1), reaktív oxigénszármazékok (pl. NO) és másodlagos hírvivők által mediált folyamatok vesznek részt (DiSabato és mtsai., 2016; Leng és Edison, 2021). A gyulladással mediátorok termelésében a KIR fő immunkompetens sejt típusaként számoltatott mikroglia játssza a fő szerepet, de ahhoz az asztroglia, a kapilláris endotélsejtek, valamint a vér-agy gát sérülése esetén a perifériáról infiltrálódó leukociták is hozzájárulnak (DiSabato és mtsai., 2016; Leng és Edison, 2021).

A mikroglia sejtek a gyulladással mediátorok termelésén kívül aktív résztvevői a KIR immunvédelmének szolgáló komplex mechanizmusoknak. A mikroglia sejtek nyúlványaikkal folyamatosan monitorozzák a környezetüket, nemcsak az idegsejtekkel, hanem az asztroglia sejtekkel és az erek endotélsejtjeivel is kapcsolatban állnak (DiSabato és mtsai., 2016; Cserép és mtsai., 2020; Leng és Edison, 2021), ezért gyorsan és hatékonyan képesek reagálni a környezetükben bekövetkező változásokra. A neuroinflammáció és a mikroglia sejtek aktivitásának megváltozása a gyakori neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór), stroke, epilepszia és pszichiátriai kórképek patomechanizmusában intenzíven vizsgált folyamat (Salter és Stevens, 2017; Song és Colonna, 2018). A felsorolt kórfolyamatokban többek között az extracelluláris káliumion koncentráció megnövekedését is megfigyelték, mely az idegi hálózatok fokozott, abnormális aktivitásához vezethet (Ayata és Lauritzen, 2015; Szalay és mtsai., 2016). Ismert, hogy a mikroglia sejtek képesek a neuronális aktivitás szabályozására (Eyo és mtsai., 2014; Fekete és mtsai., 2018; Badimon és mtsai., 2020; Cserép és mtsai., 2020), de az még részleteiben nem tisztázott, hogy az extracellulárisan megváltozott ion-környezet, pl. a megnövekedett kálium szint helyreállításában is részt vehetnek-e. Bár a mikroglia sejtek által expresszált kálium ioncsatornák és transzporterek mikroglia funkciókat szabályozó jelentőségéről jelenleg még hiányosak az ismereteink, a THIK-1, a Kv1.3 és a Kir2.1 esetében már bebizonyosodott, hogy részt vesznek a

mikroglia aktiváció szabályozásában (Nguyen és mtsai., 2017; Madry és mtsai., 2018b). Miközben a transzkriptomikai adatok a mikroglia sejtek esetén az NKCC1 ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2 \text{Cl}^-$ kotranszporter) magas expresszióját mutatják (Zhang és mtsai., 2014; Bennett és mtsai., 2016), a mikroglia sejtek működésében betöltött szerepét az eddigiekben nem vizsgálták. Mivel a mikroglia sejtek aktiváltsági állapota fontos tényező az előbbi patológias folyamatok kimenetelében, a mikroglia aktivációban szerepet játszó molekuláris mechanizmusok feltárása folyamatosan aktív kutatási téma. A fentiek alapján kutatómunkám során a mikroglialis NKCC1 aktivitás fiziológiás, valamint gyulladásos válaszokban betöltött szerepének vizsgálatát tűztem ki célul.

1.1. A mikroglia fiziológiás szerepe a központi idegrendszerben

1.1.1. A mikroglia eredete és szerepe az idegrendszer fejlődése során

A mikroglia sejteket legtöbbször a központi idegrendszer rezidens immunsejtjeiként definiálja az irodalom. A modern molekuláris biológiai, farmakológiai és a nagyfelbontású képalkotó eljárások fejlődése segítségével mára már végképp bebizonyosodott, hogy a mikroglia sejtek meghatározóak a központi idegrendszer homeosztatis feladatainak ellátása során, ugyanakkor alapvető szerepet játszanak a különféle kórfolyamatok lefolyásában is. Az érett idegrendszer sejtjeinek mintegy 5-15%-át (rágcsálókban 5-12%, emberben 0,5-16,6%) agyterületenként eltérő denzitásban, a mikroglia sejtek képezik (Lawson és mtsai., 1990; Mittelbronn és mtsai., 2001; Masuda és mtsai., 2019; Spittau és mtsai., 2020). A különböző agyterületeken található mikroglia sejtek heterogén populációkat alkotnak, melyek a transzkriptomikai elemzések alapján jellemző molekuláris markerekkel rendelkeznek (Hammond és mtsai., 2019; Masuda és mtsai., 2020b). A központi idegrendszert alkotó sejtekre jellemző neuroektodermális származással ellentétben az ún. sors-térképező eljárások (fate mapping analysis) bizonyítják, hogy a mikroglia sejtek az extraembrionális szikzacskó eritromieolid eredetű progenitor sejtjeiből (EMP) származnak és az embrionális fejlődés korai szakaszában migrálnak az agyba (Ginhoux és mtsai., 2010). Az agyi parenchimában emberben a 4,5. gesztációs héten, egérben az embrionális fejlődés 9,5. napján, a neuronok és a többi gliasejt típus megjelenése előtt már jelen vannak (Tay és mtsai., 2017; Butovsky és Weiner, 2018). Az EMP sejtek migrációja és érése PU.1 (purin rich box-1) és IRF8 (interferon szabályozó faktor-8) transzkripciós faktor-függő módon történik (Kierdorf és

mtsai., 2013). Az agyi parenchimában a mikroglia sejtek továbbiéréséhez, proliferációjához az intrinsic transzkripciós faktorokon kívül, a mikroglia sejt felszíni receptorainak expressziója és az agyi mikrokörnyezetben a növekedési faktorok összehangolt termelődése szükséges. Bármilyen fellépő változás ezeknek a receptoroknak/ligandoknak az expressziós szabályozásában a mikroglia sejtek felnőtt korban manifesztálódó kóros működéséhez vezethet. Embrionális kortól a mikroglia sejtek proliferációjának szabályzásáért felelős egyik legfőbb sejt felszíni receptor a CSF-1R (kolónia stimuláló növekedési faktor 1 receptor), melynek fő ligandjai a neuronális eredetű CSF-1 (kolónia stimuláló faktor 1) és az IL-34 (interleukin 34). A CSF1-R dependens szignalizáció a mikroglia sejtek denzitását szabályozza és az élethosszig tartó stabil sejtpopuláció fenntartásáért felelős (Elmore és mtsai., 2014; Squarizoni és mtsai., 2015).

Számos, az RNS-szekvenálások eredményeit tárgyaló tanulmány részletezi a mikroglia sejteket a makrofág populációktól megkülönböztető transzkriptomikai mintázatokat (Gautiar és mtsai., 2012; Hickman és mtsai., 2013; Butovsky és mtsai., 2014; Zhang és mtsai., 2014; Butovsky és Weiner, 2018). A mikroglialis génexpressziós profil egérben a születést követő első héten stabilizálódik és megnövekszik mind a szöveti makrofágokkal közös markerek, mind az egyedi, mikroglia-specifikus molekulák expressziója (lásd 1. táblázat, (Kettenmann és mtsai., 2011)). Ilyen, az érett mikroglia jellemző markerei a Tmem119 (transzmembrán fehérje 119), a P2Y12R (P2Y12 receptor), a Sall1 (Sal-like receptor 1), a Hexb (β -hexózáminidáz béta alegysége), a Gpr34 (G-fehérje -kapcsolt receptor 34), Fcrls (Fc receptor-like S) és a SiglecH (sziálsav kötő Ig-like lektin H) (Butovsky és mtsai., 2014; Zhang és mtsai., 2014; Bennett és mtsai., 2016; Masuda és mtsai., 2020a). A korai posztnatális időszakban a TGF- β növekedési faktoron (transzformáló növekedési faktor- β) keresztüli szignalizáció létfontosságú az imént felsorolt mikroglia-specifikus génexpresszió indukálásához. A TGF- β hiányában a mikroglia érési folyamata zavart szenved, amely a sérült mikroglia funkciók miatt többek közt az oligodendroglia sejtekérésére és gátló kortikális interneuronok számának szabályozására is hatással van (Butovsky és mtsai., 2014; Spittau és mtsai., 2020).

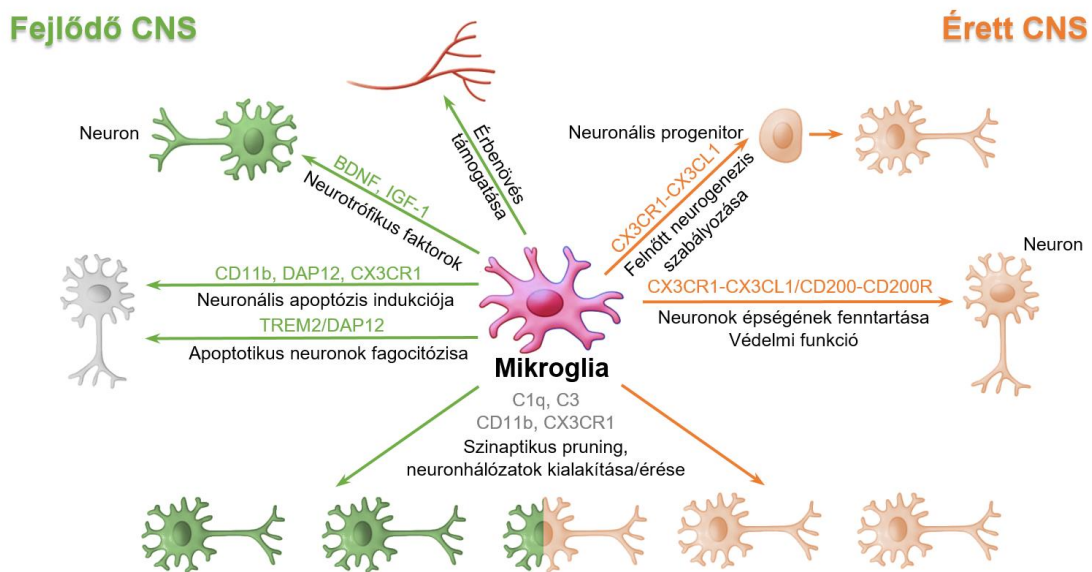
1. táblázat: A felnőtt mikroglia jellemző sejtfelszíni és intracelluláris markerek. A táblázatban a mieloid markereket kék, a mikroglia specifikus markereket zöld színnel jelöltem. (Kettenmann és mtsai., 2011 és Jurga és mtsai., 2020 nyomán, módosítva)

	Rövidítés	Név	Funkció	Referenciák
Sejtfelszíni	CX3CR1	CX3C kemokin receptor 1	szinaptikus pruning, neuogenezis szabályozása	Gautiar és mtsai., 2012, Zhang és mtsai., 2014, Hickman és mtsai., 2013, Butovsky és mtsai., 2014
	CD11b	cluster of differentiation molecule 11b	a komplement receptor alfa alegysége, szinaptikus pruning	Kettenmann és mtsai., 2011, Akiyama és mtsai., 1990
	CD68	cluster of differentiation 68 macrosialin	fagocitózis	Kettenmann és mtsai., 2011, Chen és mtsai., 2002
	CD45	cluster of differentiation 45 leukocyte common antigen	a T-sejt aktiváció pozitív regulátora	Kettenmann és mtsai., 2011 Jurga és mtsai., 2020
	F4/80	EGF-szerű modult tartalmazó mucinszerű hormon receptor	sejtfelszíni glikoprotein	Kettenmann és mtsai., 2011, Chen és mtsai., 2002
	MHC II	fő hisztokompatibilitási komplex II	antigén bemutatás	Kettenmann és mtsai., 2011 Jurga és mtsai., 2020
	CD200R	cluster of differentiation 200 receptor	neuronok monitorizása, immunosurveillance fenntartása	Kierdorf és Prinz, 2017
	C1R	komplement komponens 1 receptor	komplement aktiváció	Kierdorf és Prinz, 2017
	TLR-ok	toll-like receptorok	aktiváció	Kierdorf és Prinz, 2017
	DAP12	DNAX activation protein of 12 kDa	apoptotikus neuronok fagocitózisa	Kierdorf és Prinz, 2017
	TGF- β	transzformáló növekedési faktor β	mikroglia túlélés, differenciáció	Butovsky és mtsai., 2014 Spittau és mtsai., 2020
	Tmem119	transzmembrán fehérje 119	ismeretlen	Bennett és mtsai., 2016
	P2Y12R	P2Y12 receptor	mikroglia morfológia, motilitás, surveillance	Gautiar és mtsai., 2012, Zhang és mtsai., 2014, Hickman és mtsai., 2013, Butovsky és mtsai., 2014
	Fcrls	Fc receptor like S, scavenger receptor	mikroglia homeosztázis fenntartása	Gautiar és mtsai., 2012, Zhang és mtsai., 2014, Hickman és mtsai., 2013, Butovsky és mtsai., 2014
	Gpr34	G-fehérje kapcsolt receptor 34	fagocitózis	Gautiar és mtsai., 2012, Zhang és mtsai., 2014, Hickman és mtsai., 2013, Butovsky és mtsai., 2014
	SiglecH	sziálsav-kötő Ig-szerű lektin H	proinflammatorikus aktiváció, fagocitózis	Gautiar és mtsai., 2012, Zhang és mtsai., 2014, Hickman és mtsai., 2013, Butovsky és mtsai., 2014

1. táblázat (folytatás): A felnőtt mikroglia jellemző sejtfelszíni és intracelluláris markerek. A táblázatban a mieloid markereket kék, a mikroglia specifikus markereket zöld színnel jelöltem. (Kettenmann és mtsai., 2011 és Jurga és mtsai., 2020 nyomán, módosítva)

	Rövidítés	Név	Funkció	Referenciák
Intracelluláris	Iba1	ionizált kalcium kötő molekula 1	mikroglialis citoskeleton újraszervezése, fagocitózis	Hirasawa és mtsai., 2005
	HexB	β -hexozaminidáz béta alegysége	mikroglia sejtek önmegújítása	Masuda és mtsai., 2020, Gautiar és mtsai., 2012, Zhang és mtsai., 2014, Hickman és mtsai., 2013, Butovsky és mtsai., 2014
	Sall1	Sall-like receptor 1	mikroglia homeosztázis fenntartása	Gautiar és mtsai., 2012, Zhang és mtsai., 2014, Hickman és mtsai., 2013, Butovsky és mtsai., 2014

Az embrionális fejlődés alatt és a korai posztnatális időszakban a mikroglia sejtek magas proliferációs aktivitással rendelkeznek (Butovsky és Weiner, 2018). Emellett a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitásukkal szabályozzák a képződő idegsejtek számát, részt vesznek az idegsejtek axonjainak kötegelődésében (Tay és mtsai., 2017). A születés után a meglévő szinaptikus kapcsolatok megerősítésével, és az éretlen szinapszisok eltávolításával (szinaptikus metszés/pruning) járulnak hozzá az újonnan felépülő idegsejthálózatok kialakulásához (Paolicelli és mtsai., 2011) (1. ábra). A mikroglia sejteken jelen vannak a komplement rendszer fő komponensei, a komplement komponens C1q és a komplement receptor 3 és 5 (CR3, CR5, 1. ábra), melyek immunfunkción túl a központi idegrendszer fejlődése során a káros, felesleges szinapszisok eltávolításával vesznek részt a neuronhálózatok kialakításában (Schafer és mtsai., 2012). A gyenge, vagy valamilyen okból káros szinapszisokon a C1q és C3 nagyobb valószínűséggel fordul elő, jelként szolgálva a mikroglia sejteknek, melyek a CR3 receptoraikkal felismerik és fagocitotikus aktivitásukkal eltávolítják az így megjelölt szinapszisokat. A születést követő korai fejlődési időszakban a mikroglia által termelt inzulin-szerű növekedési faktor 1 (IGF-1) a szomatoszenzoros cortex V. rétegében található neuronok túlélését támogatja, ezenkívül az IGF-1 termeléssel az oligodendrocita prekursorok érésében is részt vesz (Prinz és mtsai., 2019).



1. ábra: Homeosztatis mikrogliák funkciók a fejlődő és az érett központi idegrendszerben. A mikroglia sejtek egyaránt részt vesznek az idegrendszer fejlődésének embrionális szakaszában a neurogenesisben, neuronális differenciációban, az aktivitás-függő szinaptikus metszésben (pruning), a szinapszis eliminációban valamint az érett idegrendszerben a felnőttkori neurogenesisben, az apoptotikus neuronok eltávolításában, a neuronhálózatok újrászervezésében is (Kierdorf és Prinz, 2017 nyomán, módosítva).

1.1.2. A mikroglia szerepe a felnőtt agyban

Az érett mikroglia sejtek a felnőtt, egészséges központi idegrendszerben agyterületenként eltérő eloszlásban, jellemzően a szürkeállományban tömegesebb jelenléttel, minden agyi régióban megtalálhatóak (Masuda és mtsai., 2020b). Morfológiájukat fiziológiás körülmények között a kis méretű sejttest, az abból elágazó nyúlványrendszer és lamellopodiumok jellemzik (Nimmerjahn és mtsai., 2005). Ahogy későbbiekben bemutatott két-foton mikroszkóppal készített time-lapse felvételek is mutatják a mikroglia sejtek nyúlványaik révén képesek környezetük folytonos monitorozására (Nimmerjahn és mtsai., 2005). Nyúlványrendszerükkel közvetlen, szolubilis faktorok termelésével közvetett kapcsolatot létesítenek az agyi parenchima számos sejt típusával, így gyorsan és érzékenyen reagálhatnak a környezetükben bekövetkező változásokra, ezáltal aktívan vesznek részt nemcsak az idegrendszer

fejlődésében és érésében, hanem a felnőtt élet és az öregedés alatti fiziológias folyamatok szabályozásában is (Kierdorf és Prinz, 2017; Tay és mtsai., 2017; Butovsky és Weiner, 2018). A mikroglia-neuron kommunikációban kiemelkedően fontos többek közt a CX3CR1/CX3CL1, a CD200/CD200R receptor-ligand kapcsolat, a purinerg és a különböző neurotrófikus faktorok (pl. BDNF, agy eredetű növekedési faktor) közvetítette szignalizáció zavartalan működése (1. ábra).

A születés után a neuronális hálózatok kialakításában szerepet játszó, mikroglia által indukált szinaptikus metszés, vagyis a megjelölt szinapszisok mikroglia sejtek által, fagocitózissal történő eltávolítása a felnőttkor és öregedés során is létfontosságú az idegsejtek közötti hálózati kapcsolatok aktivitás-függő szabályozása szempontjából. A felnőtt agyban a mikroglia sejtek részt vesznek az SVZ (szubventrikuláris zóna) és SGZ (szubgranuláris zóna) területén zajló neurogenesis során újonnan képződött, de valamilyen okból a neuronális hálózatba integrálódni nem képes, apoptotikus neuronok eltávolításában (Tay és mtsai., 2017). Továbbá Ribeiro Xavier és mtsai. megfigyelték, hogy az SVZ területén az újonnan képződött neuroblasztok túlélése és a bulbus olfactoriusba történő migrációja sérült, ha a mikroglia-t deplécióval eltávolították (Ribeiro Xavier és mtsai., 2015). A hippocampusban pedig megnövekedett a szinapszisok száma, ha a felnőtt egerek agyából genetikai (CSF-1R KO) vagy farmakológiai módszerekkel (CSF-1R inhibitorral) depletálták a mikroglia sejteket (Tay és mtsai., 2017). Mikroglia specifikus BDNF hiányos egérben a motoros tanulás során kisebb mértékű dendrittuske képződést figyeltek meg (Parkhurst és mtsai., 2013) valamint a DAP12, CD200R vagy a CX3CR1 funkcióvesztéses mutációja/delécioja során a hippocampális LTP (tartós hatékonyságnövekedés, long-term potentiation) változását figyelték meg (Roumier és mtsai., 2004; Costello és mtsai., 2011; Rogers és mtsai., 2011) (1. ábra). Mindezek alapján elmondható, hogy a mikroglia sejtek aktív résztvevők a szinapszisok strukturális felépítésében és a nem működő/hibásan működő szinapszist alkotó egységek eltávolításában egyaránt, a felnőtt idegrendszerben is.

A mikroglia sejtek nemcsak a szinaptikus kapcsolatokon keresztül képesek a neuronális működés szabályozására, nyúlványaik révén a neuronok sejttestjével és az axon iniciális szegmentumával is kommunikálnak. Munkacsoportunk nemrégiben a mikroglia sejtek nyúlványai és a neuronok sejttestjének ultrastrukturális és molekulárisan egyaránt jól karakterizált membrán doménje között kialakuló szomatikus

purinerg kapcsolatot írta le (Cserép és mtsai., 2020). A szomatikus purinerg junkciót neuronális oldalról a mitokondriumok, a mitokondrium-asszociált membránok, endoplazmatikus retikulum és a plazmamembrán közötti membránkapcsolódások alkotják, valamint a vezikula-szerű struktúrák, a vezikuláris nukleotid transzporter (vNUT), lizoszóma-asszociált membrán fehérje 1 (LAMP1) felhalmozódását és a feszültség-függő Kv2.1 K⁺-csatorna klasztereződését figyelték meg a mikroglianyúlvánnyal fedett membránszakaszok helyén (Cserép és mtsai., 2020). Emellett a junkcióban mikrogliasejtek membránjában a P2Y12 receptorok felhalmozódását írták le, mely jelzi, hogy a szomatikus kapcsolat kialakulása purinerg folyamatokon keresztül történik (Cserép és mtsai., 2020). A szomatikus purinerg junkción keresztül az egészséges neuronok működése során keletkező ATP és más szignál molekulákon keresztül a mikrogliasejtek folyamatosan értesülnek a neuronok „jól-létéről”. A neuronok sérülése következtében (pl. excitotoxicitás, energia depléción) extracelluláris ATP koncentráció megnövekszik és a mikroglianyúlványok toborzódása figyelhető meg a szomatikus junkcióban a purinerg szignalizáció következtében (Cserép és mtsai., 2020). Ezáltal megnövekszik a neuronok sejtestjének nyúlványborítottsága, tehát a mikrogliasejtek a haldokló neuronok izolálásán és eliminálásán túl, a szomatikus junkción keresztül feltételezhetően védelmező funkciót töltenek be a neuronális funkciók helyreállításában, jelenleg még feltáratlan mechanizmusokon keresztül (Cserép és mtsai., 2020). A mikrogliasejteknek az agy immunvédelmi rendszerének elemeként betöltött funkcióit a következő fejezetekben tárgyalom.

1.2. A mikrogliasejtek aktivációs mechanizmusai és szerepük az agyi gyulladásos folyamatokban

A normál, egészséges agyban, ahogyan azt fentebb is említettem, a mikrogliasejtek úgynevezett nyugalmi állapotban, a nyúlványaik folyamatos mozgásával gyűjtenek információt a környezetükből és tartják fenn homeosztatiszikus működésüket. Ebből a nyugalmi állapotból különböző külső, veszélyt jelző molekulák hatására, vagy a nyugalmi állapotot fenntartó jelátviteli folyamatokban bekövetkező zavar esetén morfológiai és molekuláris változások mennek keresztül, ún. aktivált állapotba kerülnek (Salter és Stevens, 2017; Butovsky és Weiner, 2018; Li és Barres, 2018; Jurga és mtsai., 2020). A mikroglia aktivációt kiváltó, veszélyt jelző molekulákat típusától függően a DAMP-ok

(sérülés-asszociált molekuláris mintázat) és a PAMP-ok (patogén-asszociált molekuláris mintázat) közé sorolhatjuk. A DAMP-ok és PAMP-ok felismerésében a mikroglia sejt felszíni és intracelluláris receptorai vesznek részt, ilyenek a Toll-like receptorok (TLR4, TLR1-2), a NOD-like receptorok (NLR-ek, NLRP3), a RIG-like receptorok (RLR-ek), az AIM2-like receptorok (ALR-ek, absent in melanoma 2-szerű receptorok), citokin- és kemokin receptorok, valamint a C-típusú lektinek (Kierdorf és Prinz, 2013; Jurga és mtsai., 2020). A mikroglia sejtek az apoptotikus sejtek fagocitotikus eltávolításában, valamint protein aggregátumok, opsonizált fehérje komplexumok endocitózisában is szerepet játszanak Fc és komplement receptoraik révén (Jurga és mtsai., 2020). A fentebb felsorolt receptorok aktivációjakor a mikroglia sejtek morfológiája gyorsan megváltozik, vékony nyúlványaikat visszahúzzák, sejttestjük megnövekszik és amöboid alakot vesznek fel, melyet az ún. aktivációs markerek expressziójának megnövekedése kísér (Jurga és mtsai., 2020). Hagyományosan az irodalom sokáig az aktivált állapotot a makrofágok hasonló, *in vitro* viselkedése alapján alkalmazott terminológia szerint M1 és M2 típusként különböztette meg és rendelt pro- illetve antiinflammatorikus funkciót az aktivált mikroglia sejtekhez. Az M1 fenotípusú mikroglia aktiváció során megnövekszik a proinflammatorikus faktorok termelődése és szekréciója (NO, citokinek: IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, TNF- α , IFN- γ , kemokinek: CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL9, CXCL10), valamint a CD16, CD32, CD40, CD86 és MHCII sejt felszíni receptor upregulálódik a mikroglia sejtek membránjában (Jurga és mtsai., 2020). Az M2 típusú aktivációt az antiinflammatorikus citokinek és kemokinek termelődésének és szekréciójának megnövekedése jellemzi (citokinek: IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , kemokinek: CCL2, CCL22, CCL17, CCL24), valamint upregulálódik a sejt felszíni CD163 és CD206 (Jurga és mtsai., 2020). Mára a kifinomult mikroglia izolációs technikák és RNS-szekvenálás segítségével bizonyított, hogy a lényegesen egyszerűsített, M1/M2-szerű mikroglia sejtaktiváció felosztás *in vivo* nem alkalmazható (Ransohoff, 2016). Pontosabb megközelítés a mikroglia aktiváció jellemzésére, amikor a mikroglia aktiváció állapotait egy spektrumon helyezzük el, miszerint a mikroglia sejtek különböző stimulusok hatására egyedi aktivációs profilt mutathatnak (Ransohoff, 2016).

Az agyi homeosztatisztikus állapotot megzavaró változások legtöbb esetben gyulladással változásokkal is együtt járnak. Ebben központi szerepe van a mikroglia megváltozott működésének. A mikroglia sejtek aktivációja az egyik legfőbb folyamat a

neuroinflammáció során, melyet a gliózis, immunmediátorok, gyulladáshoz kapcsolódó citokinek és reaktív oxigénszármazékok szintjének emelkedése jellemez (Salter és Stevens, 2017). A következő két alfejezetben a kísérleteimben is vizsgált, a neuroinflammáció folyamatában kulcsfontosságú szerepet betöltő citokineket és kemokineket (Zhang és An, 2007; Lambertsen és mtsai., 2012; Murray és mtsai., 2015; DiSabato és mtsai., 2016) valamint az inflammaszóma aktiváció jelentőségét ismertetem.

1.2.1. Citokinek és kemokinek szerepe az agyi gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban

A citokinek szolubilis, nem antigénspecifikus fehérjék vagy glikoproteinek, melyek receptoraikon keresztül hatva autokrin, parakrin és endokrin módon vesznek részt a sejtek közötti kommunikációban (Zhang és An, 2007; Kettenmann és mtsai., 2011). A citokinek redundáns aktivitásúak, vagyis különböző citokinek hasonló funkciókkal rendelkezhetnek, továbbá multifunkcionális hatású anyagok, termelésük általában kaskád-szerű folyamat, egymás hatását erősíthetik, illetve gátolhatják is, befolyásolva ezzel egymás hatékonyságát (Zhang és An, 2007). A citokinek egy része kemotaktikus tulajdonságokkal is rendelkezik, ezeket az alacsony molekulahatárú, a leukocita aktivációban és a sejtmigrációban szerepet játszó fehérjéket kemokineknek nevezik (Zhang és An, 2007). Az agyban a citokinek termelésében többféle sejtípus vesz részt, köztük az agyi sérülés során a vér-agy gáton keresztül infiltrálódó leukociták, kapilláris endotélsejtek, perivaszkuláris makrofágok, asztroglia-sejtek, de a fő forrásukként a KIR rezidens immunsejtjeit, a mikroglia-sejteket tartják számon (DiSabato és mtsai., 2016). A neuroinflammáció kialakulásához jellemzően néhány kulcsfontosságú proinflammatorikus citokin hatása járul hozzá, ezek az IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α és a CCL2/MCP-1 (kemokin ligand 2/monocita kemotaktikus protein 1), CCL5/RANTES (kemokin ligand 5/regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), CXCL1/KC (C-X-C kemokin ligand 1, keratinocita kemoattraktáns) kemokinek (Zhang és An, 2007; Lambertsen és mtsai., 2012; DiSabato és mtsai., 2016).

Az agyat ért sérülések következtében (pl. traumás sérülés, stroke) IL-1 családba tartozó IL-1 α és IL-1 β gyulladáshoz kapcsolódó citokinek mennyiségének emelkedését figyelték meg a sérülést követően leghamarabb a vérben és a cerebrospinális folyadékban (Lambertsen és mtsai., 2012; Alam és mtsai., 2020). A IL-1 α és IL-1 β egyaránt prekursor fehérje formájában termelődik. Míg az IL-1 β csak további hasítást követően válik biológiailag aktív molekulává és kötődik az IL-1R1 receptorhoz, az IL-1 α profehérjéje és érett formája

egyaránt aktív (Brough és Denes, 2015; Di Paolo és Shayakhmetov, 2016). További különbség a két fehérje között, hogy a pro-IL-1 β hasítása az inflammaszómális útvonalhoz kötött kaspáz-1 aktivitásától függ (az inflammaszóma aktiváció folyamatát részletesebben a következő fejezetben fejtem ki), míg érett IL-1 α ettől független útvonalon is létrejöhet. Az IL-1 α az agyi sérülés és a nekrotizáló sejtek miatt kialakuló steril inflammációnak¹ egy korai jelző molekulája (Brough és Denes, 2015; Di Paolo és Shayakhmetov, 2016). Az agyi sérülések esetén a fokozott IL-1 α és IL-1 β termelődés hatással a van a vér-agy gát átjárhatóságára, tovább növeli a gliasejtek citokin termelését és serkenti a perifériás immunsejtek toborzódását mindezzel súlyosbítva a gyulladás mértékét (DiSabato és mtsai., 2016).

A TNF- α -t szintén fontos résztvevőnek tartják a neuroinflammációs folyamatokban, agyi sérülés esetén termelődése az asztroglia sejtekben, az endotélsejtekben, a neuronokban és a mikroglia sejtekben is fokozódhat (A. Frankola és mtsai., 2011). A szolubilis, biológiailag aktív molekulává a membrán-kötött TNF- α -t a TNF- α konvertáz enzim alakítja át. A TNF- α aktiválja a leukocitákat és a leukocita-endotél interakciókban szerepet játszó adhéziós molekulák termelődését (ICAM-1/intracelluláris sejtadhéziós molekula, VCAM-1/vaszkuláris sejtadhéziós molekula, E-szelektin), ezáltal a vér-agy gáton keresztüli infiltrációjukat serkenti (A. Frankola és mtsai., 2011). A TNF- α fő forrásának kísérletes stroke esetén a sérülés korai szakaszában a mikroglia sejteket tartják, mRNS expressziós szintjének mikroglialis emelkedését számos tanulmányban kimutatták (Lambertsen és mtsai., 2012; Alam és mtsai., 2020).

Az IL-6 a glikoproteinek közé tartozó multifunkciós citokin. Az IL-6 termelésében a monociták/makrofágok, T- és B-sejtek, endotélsejtek, a KIR-ben pedig a mikroglia sejtek, asztroglia sejtek és a neuronok vesznek részt (Zhu és mtsai., 2022). Az IL-6 részt vesz a monociták és neutrofil granulociták toborzásában, a vaszkuláris adhéziós molekulák termelődésének fokozásában. Az IL-6 termelés szabályozásában bekövetkező zavar számos klinikai kórképhez társul, ischaemiás stroke esetén a betegség kimetenelésének egyik fontos jelző molekulája lehet, például emelkedett szintje magasabb kockázati tényező jelent a stroke kialakulására, valamint mennyisége az ischaemiás stroke lezajlása után a sérülés mértékével korrelálhat. Az IL-6 szintjének növekedésével

¹ Ha a szervezetet ért inzulturnem patogénekből származik, hanem a PRR-receptorok a környező sérült vagy nekrotikus sejtekből származó DAMP-okat ismerik fel, a rajtuk keresztüli jelátviteli mechanizmusok ún. steril inflammáció kialakulásához vezetnek.

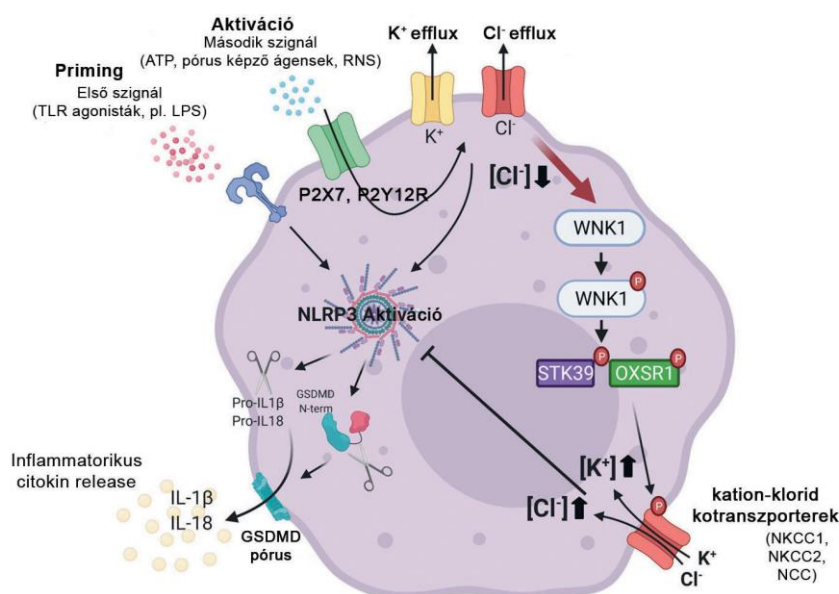
párhuzamosan a C-reaktív fehérje és a TNF- α szintjének növekedését figyelték meg (Zhu és mtsai., 2022).

A kemokinek a mikroglían is nagy számban expresszáldó kemokin receptoraikon keresztül hatnak, melyek expressziója fejlődés során (pl CXCL1/KC) és különböző patológiás folyamatokban megnövekszik (Kettenmann és mtsai., 2011). Például Alzheimer-kórban az CCL2/MCP-1, míg bakteriális fertőzés esetén a CCL5/RANTES, vírusfertőzésben pedig a CCL4/MIP-1 β mennyisége növekszik. A kemokinek neuroinflammáció során hozzájárulnak a mikroglia sejtek migrációjához, a citoskeletonjuk újraszervezéséhez és befolyásolják a citokin termelésüket is. Az MCP-1 a gyulladós sejttípusok, köztük a monociták sérülés helyére történő toborzódását is serkenti (Kettenmann és mtsai., 2011).

1.2.2. Az inflammaszómák szerepe az agyi gyulladós folyamatokban

A veleszületett immunrendszer a szervezetet ért inzultusok (környezetből származó, illetve a steril inflammáció) hatására gyors és koordinált sejtvesztéses védelmező válaszreakcióval lép fel (Chen és Nuñez, 2010; Heneka és mtsai., 2018; Voet és mtsai., 2019). Ahogy az előző fejezetben említettem a PAMP-okat és DAMP-okat a PRR-receptorokon keresztül ismerik fel a KIR sejteket, köztük a mikroglia sejteket. A PRR-receptorok membrán-kötöttek (pl. TLR-ek) vagy intracellulárisak is lehetnek (NLR-ek és ALR-ek). Az inflammaszómák citoszolikus multiprotein komplexek, osztyályozásuk az őket aktiváló receptorok alapján történik. Az inflammaszómák összeszerelődése a proinflammatorikus kaszpáz-1 aktiválódásához szükséges, melynek következtében a végbemeleg az IL-1 β és IL-18 proinflammatorikus citokin érése és sejtvesztéses szekréciója (2. ábra) (Voet és mtsai., 2019). Továbbá az aktivált kaszpáz-1 hatására a sejtvesztéses proinflammatorikus típusa, a pyroptózis mehet végbe, mely korai sejtvesztéses sérülés következtében a sejtvesztéses szolubilis faktorok által súlyosbítja a gyulladást (Voet és mtsai., 2019). A pyroptózis során a sejtek duzzadása és ozmotikus lízise meglehetősen gyors. Pyroptózis során a kaszpáz-1 szubsztrátja, a gasdermin D játssza a fő szerepet a plazmamembránon történő pórusképzésben (Voet és mtsai., 2019). Az NLRP3 inflammaszómát vizsgálták elsőként a KIR-ben, mely főleg a mikroglia sejtekben található és egyik fő szabályzója a gyulladós folyamatoknak (Heneka és mtsai., 2018; Voet és mtsai., 2019). Szerepét széles körben vizsgálták különböző neurodegeneratív és

agyi gyulladásoos kórképekkel (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór, amiotrófiás laterálszklerózis, traumás agyi sérülés, stroke) valamint a KIR-t ért vírusfertőzésekkel kapcsolatban (pl. Zika-vírus, Herpes simplex vírus 1, Nyugat-Nílusi vírus) (Heneka és mtsai., 2018). Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja két lépésben történik (2. ábra). Az első lépésben egy ún. első szignál („priming signal”) hatására NF- κ B-(nukleáris faktor-kappa B) függő módon serkentődik az NLRP3 és pro-IL-1 β transzkripciója. Az aktiváció második lépésében egy második szignál hatására az NLRP3 oligomerizálódik és ezáltal aktiválódik (Voet és mtsai., 2019).



2. ábra: Az NLRP3 inflammaszóma aktivációt szabályozó folyamatok. A sejtet érő első szignál (pl. citokinek, PAMP-ok) a TLR útvonalon keresztül ún. priming folyamaton keresztül upregulálják az NLRP3 inflammaszóma összeszereléséhez szükséges komponenseket, majd egy második szignál hatására a K^+ és Cl^- ionok áramlanak ki a sejtéből, melynek következtében az NLRP3 inflammaszóma összeszerelődik, a kaszpáz-1 aktiválódik. A kaszpáz-1 a proprotein formájukból hasítja az aktív IL-1 β és IL-18 proinflammatorikus citokineket, valamint a gasdermin D hasításával pyroptózist indukál. A WNK kinázok az intracelluláris Cl^- koncentráció csökkenésére aktiválódnak, foszforilálják az STK39/OXSR1 kinázokat, melyek aktiválják a kation-klorid kotranszportereket. A kation-klorid kotranszporterek helyreállítják az intracelluláris ion koncentrációt a rajtuk keresztül

beáramló Cl^- és K^+ ionok segítségével, ezzel gátolják a további NLRP3 inflammaszóma aktivációt. OXSR1: oxidatív stressz rezponzív 1 kináz, STK39: szerin-threonin protein kináz 39, WNK1: lizin nélküli szerin-treonin kináz, GSDMD: gasdermin D. (Mayes-Hopfinger és mtsai, 2021 nyomán, módosítva).

Az összetett szabályozás alatt álló NLRP3 inflammaszóma aktiváció folyamatában a K^+ és/vagy Cl^- ionok kiáramlása szükséges (He és mtsai., 2016; Swanson és mtsai., 2019). K^+ -efflux a két pórus doménnal rendelkező TWIK-2 (tandem ismétlődésű pórus doménnal rendelkező gyengén befelé rektifikáló K^+ csatorna) és THIK (tandem ismétlődésű pórus doménnal rendelkező gyengén befelé rektifikáló K^+ csatorna) K^+ -csatornákon keresztül történik (Di és mtsai., 2018; Madry és mtsai., 2018b). Kimutatható, hogy mikrogliaiban THIK-1 deléciója során hippocampális szeletekben csökkent az ATP hatásra termelődő IL-1 β mennyisége (Madry és mtsai., 2018b). Továbbá mind a TWIK2, mind a THIK-1 működése purinerg (P2X7 valamint P2Y12) szabályozás alatt áll, az ATP stimulus által aktivált purinoceptoroktól downstream vesznek részt az NLRP3 inflammaszóma aktivációban (Di és mtsai., 2018; Madry és mtsai., 2018b).

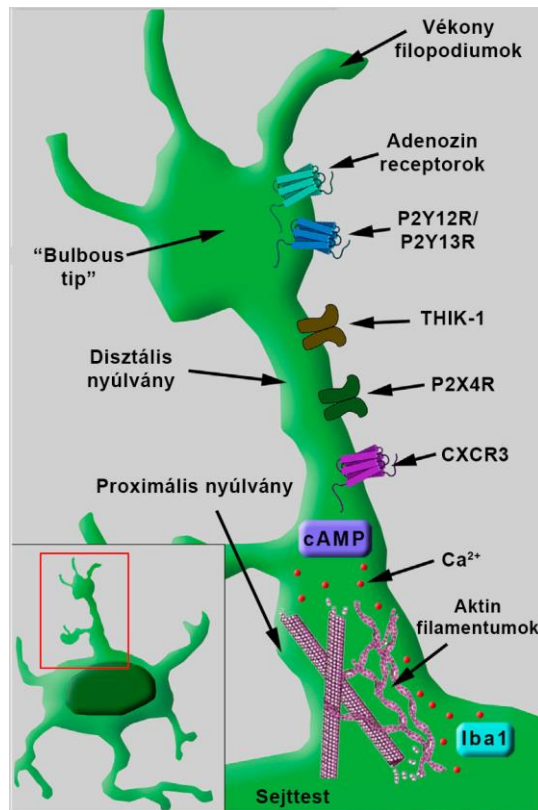
A K^+ -efflux mellett a Cl^- kiáramlásnak is hasonlóan fontos jelentőséget tulajdonítottak az NLRP3 inflammaszóma aktiváció folyamatában (Tang és mtsai., 2017; Green és mtsai., 2018; Mayes-Hopfinger és mtsai., 2021). A WNK kinázok érzékelik a hipotóniás ozmotikus stresszt vagy az alacsony intracelluláris Cl^- koncentrációt, és aktivált állapotukban effektor kinázaikat foszforilálva közvetett módon szabályozzák az SLC12 fehérjecsaldába tartozó kation- Cl^- kotranszportereket (2. ábra) (Mayes-Hopfinger és mtsai., 2021). Nemrégiben csontvelői eredetű makrofág sejtekben kimutatták, hogy a WNK1 gátlása vagy a WNK1 genetikai deléciója a kation-klorid kotranszporterek diszfunkcióját okozta, mely túlzott inflammaszóma aktivációhoz és az intracelluláris Cl^- és K^+ koncentráció diszregulációjához vezetett (Mayes-Hopfinger és mtsai., 2021). Továbbá az NLRP3 inflammaszóma útvonalat a hipoozmotikus stressz is aktiválhatja (Compan és mtsai., 2012), a regulátoros térfogat csökkenés folyamatában a WNK1 kináz aktivációját is leírták, melynek gátlásakor vagy hiányában megnövekedett kaszpáz-1 aktivációt és IL-1 β szekréciót figyeltek meg (Mayes-Hopfinger és mtsai., 2021).

1.3. A mikroglia nyúlványok alap motilitását és a nyúlvány mozgás dinamikáját meghatározó folyamatok

Az *in vivo* két-foton mikroszkópos technikát alkalmazó tanulmányokból tudjuk, hogy az agyi parenchimában a mikroglia sejtek nyúlványaikkal nemcsak véletlenszerűen monitorozzák az extracelluláris teret (Davalos és mtsai., 2005; Nimmerjahn és mtsai., 2005), hanem a neuronális aktivitástól függően teremtenek kapcsolatot az idegsejtek sejtestjével és szinapszisaival (Tremblay és mtsai., 2010; Eyo és mtsai., 2014; Szalay és mtsai., 2016; Badimon és mtsai., 2020; Cserép és mtsai., 2020). Az ún. figyelő, monitorozó aktivitás a sérült agyszövetben is fennmarad, agyi ischaemia vagy traumás agysérülés esetén is (Ohsawa és Kohsaka, 2011; Szalay és mtsai., 2016; Cserép és mtsai., 2021). A mikroglialis nyúlványmotilitásnak két, funkcionálisan és mechanizmusban is különböző típusát különböztetik meg, az ún. alap, nyugalmi/figyelő és nem-irányított nyúlvány mozgásokat és a veszélyt jelző üzemmódban, a mikroglialis kemotaxis során a nyúlványok a sérülés irányába történő irányított mozgását (Madry és Attwell, 2015). A mikroglia sejtekben nagy mennyiségben van jelen a sejt váz aktin komponense, melynek dinamikus polimerizációjának/depolimerizációjának szabályozásában a hozzá kapcsolódó, a mikrokörnyezet változásait érzékelő membránreceptorok vesznek részt (Madry és Attwell, 2015). Ezekhez a komplex folyamatokhoz különböző fehérjék összehangolt működésére van szükség (3. ábra). Az aktin kötegekbe rendeződésében, a sejtmembrán fodrozódásában az Iba1, az aktin membránhoz való kihorgonyzásában a β 1-integrin, a kemotaktikus szignálok érzékelésében a CX3CR1 és a purinerg receptorok (P2Y12R, P2X4R, P2Y13R), a mikroglia sejtek membránpotenciáljának és a receptorokon keresztüli szignalizáció szabályozásában pedig a THIK-1 ioncsatorna vesz részt (Haynes és mtsai., 2006; Madry és Attwell, 2015; Hristovska és Pascual, 2016; Madry és mtsai., 2018b; Cserép és mtsai., 2021). A mikroglia sejtek motilitásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok megismerését ma már jelentősen segíti, hogy lehetővé vált akár éber állatokban is a mikroglia sejtek mozgásának közvetlen monitorozása a különböző genetikai és farmakológiai módszerek kombinálásával.

A mikroglia sejtek alap nyúlványmotilitásának és a folyamatosan monitorozó állapotának fenntartása finoman szabályozott folyamat, bár a szabályozás mögött álló eddig leírt lehetséges mechanizmusok még megerősítést igényelnek. Az egészséges KIR-ben a mikroglia sejtek az agyi parenchimában a hosszú, vékony és elágazó nyúlványaikat

a sejttestjüktől 2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ átlagsebességgel nyújtják ki és húzzák vissza (Davalos és mtsai., 2005; Nimmerjahn és mtsai., 2005; Cserép és mtsai., 2020), míg a sejttesthez közelebbi, vastagabb nyúlványaik kevésbé mozgékonyak (3. ábra). A nyúlványokon megfigyelhető, hogy szintén motilis hagymagumó szerű („bulbos tip”) kitüremkedésekben végződnek (Madry és Attwell, 2015). A gyorsan mozgó nyúlványokkal ellentétben a mikroglia sejttestje általában szinte mozdulatlan, sebessége néhány $\mu\text{m}/\text{hét}$ (Hefendehl és mtsai., 2014).



3. ábra: A mikroglia nyúlványmotilitását meghatározó mechanizmusok molekuláris résztvevői. A környezetét folyamatosan monitorozó ún. ramifikált morfológiájú mikroglia sejteket kis átmérőjű sejttest, a belőle kiinduló vastagabb és kevésbé mozgékony proximális nyúlványok, valamint az ezekből elágazó gyorsabb, dinamikus mozgásra képes disztális nyúlványok, végeiken változó méretű kis kitüremkedésekkel („bulbos tip”) jellemzik. A nyúlványmotilitás dinamikus szabályozásához az aktin filamentumrendszer és ábrán jelzett sejt felszíni receptorok közötti összehangolt működésre van szükség (Cserép és mtsai, 2021 nyomán, módosítva).

A mikroglia nyugalmi nyúlványmotilitásának szabályozásában többek közt részt vesznek a purinerg, a fraktalkin és a noradrenerg receptorokon (Liu és mtsai., 2019; Stowell és mtsai., 2019) keresztül közvetített folyamatok, valamint egyre több tanulmány szép példákon keresztül bizonyítja a neuronális aktivitás modulátor szerepét is (Tremblay és mtsai., 2010; Li és mtsai., 2012; Umpierre és mtsai., 2020). Ismert, hogy a sérülés-indukálta mikroglia nyúlványtoborzódás a P2Y12 receptor aktiváción keresztül történik, melyhez elengedhetetlen a sérülés helyén felszabaduló ATP jelenléte (Haynes és mtsai., 2006). Ezzel ellentétben a nyugvó, a környezetét monitorozó mikrogliasejtekben a P2Y12 receptoron keresztüli szignalizáció hiánya nem befolyásolja a mikroglia nyúlványok alap motilitását (Haynes és mtsai., 2006; Sipe és mtsai., 2016; Madry és mtsai., 2018a), feltételezhetően a többi G-fehérjéhez kapcsolt receptoron keresztüli kompenzáció következtében. Genetikailag módosított egérben, melyben mikroglia specifikusan hiányzik a G_i fehérje, a sérülés irányába történő nyúlványmozgások megszűntek, valamint a mikroglia rövidebb és kevésbé elágazó nyúlványokkal rendelkezett, vagyis a G_i -fehérjék közvetítette útvonal gátlása mind a mikroglia nyúlványok alap motilitásában, mind a sérülés által kiváltott irányított motilitásban zavart okoz (Merlini és mtsai., 2021). Továbbá a tónusosan aktív THIK-1 kálium csatornáról bizonyosodott be, hogy a nyugalmi membránpotenciál és a mikroglia morfológia fenntartásán túl, monitorozó nyúlvány mozgások fenntartásában is szerepe van (Madry és mtsai., 2018b). THIK-1 gátlásakor csökkent a mikrogliasejtek környezetüket folyamatosan monitorozó ún. ramifikált állapota és a nyugalmi nyúlvány mozgás, viszont az ATP hatására bekövetkező irányított nyúlvány kinyúlást a THIK-1 gátlása nem befolyásolta (Madry és mtsai., 2018a). Madry és mtsai. tanulmányában leírt eredmények alapján tehát a nyúlványok irányított mozgásainak és a nyugalmi, monitorozó nyúlvány mozgások szabályozása mögött feltételezhetően más-más folyamatok állnak (Madry és mtsai., 2018b).

A mikroglia és a neuron közötti kommunikációban, a mikrogliasejtek nyugalmi állapotának fenntartásában fontos a CX3CR1-CX3CL1 szignalizációs útvonal. *Ex vivo* retina explantátum tenyészetekben a CX3CR1 hiánya a mikrogliasejtek alap nyúlványmotilitásának csökkenéséhez vezetett (Madry és Attwell, 2015). Stowell és mtsai. az egyik fő neurotranszmitternek, a noradrenalinak a hatását vizsgálta a mikroglia és a szinapszisok közötti interakcióban (Stowell és mtsai., 2019). Azt találták, hogy a mikrogliasejtek β 2-adrenoceptorain ható noradrenalin hatására a mikroglia nyúlványok

visszahúzódtak és a nyúlványok végein az ún. gumó szerű kitérkedések képződése is gátlódott (Stowell és mtsai., 2019). Ehhez hasonlóan Liu és mtsai. farmakológiai és kemogenetikai módszereket alkalmazva kísérleteik során kimutatták, hogy a noradrenalin hatás gátlása szükséges a mikroglia alap nyúlványmotilitásának fenntartásához (Liu és mtsai., 2019).

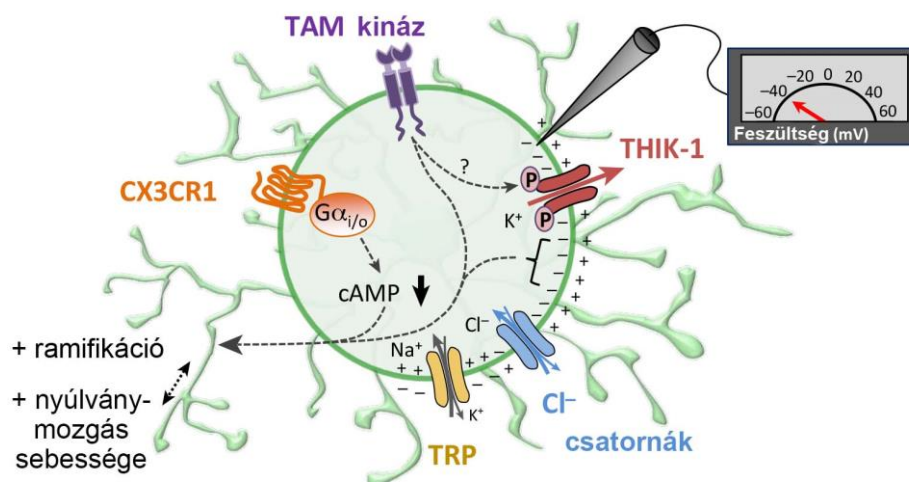
A purinerg szignalizáció szerepét az mikroglia motilitásban már korai tanulmányok leírták (Davalos és mtsai., 2005; Nimmerjahn és mtsai., 2005). Davalos és mtsai. kimutatták, hogy a P2Y receptorok gátlása mellett a sérülés irányába kinyúló nyúlványok számát és motilitását csökkentette, míg a P2X receptorok gátlása esetében nem figyeltek meg hasonlót (Davalos és mtsai., 2005). A P2Y₁₂ receptor az agyban szelektíven a mikroglia sejteken expresszálódik (Haynes és mtsai., 2006; Zhang és mtsai., 2014). A P2Y₁₂ receptor felhalmozódásával együtt a Rho (Ras homológ) GTPáz felhalmozódását figyelték meg a nyúlványok végein az ATP-indukálta nyúlvány kinyúlás során, melynek gátlásával a neuronális aktivitás függő nyúlvány -kinyúlás megszűnik (Li és mtsai., 2012). Az extracelluláris térben az ATP az ektonukleotidázok segítségével gyorsan metabolizálódik egyéb purin molekulákká. Az irányított nyúlványkinyúlásban és motilitásban az ATP és metabolitjai által létrehozott kemotaktikus grádiens is lényeges tényezőnek tartják (3. ábra). Megfigyelték, hogy a mikroglia nyúlványok kinyúlása gátlódott, ha az ATP ADP-vé történő bomlását apirázzal akadályozták meg (Davalos és mtsai., 2005), mely azt sugallja, hogy az ATP/ADP arány csökkenése szükséges a ramifikált állapot és a nyugalmi motilitás fenntartásához. P2Y₁₃ receptor szintén nagy mennyiségben expresszálódik a mikrogliaán, funkciójáról keveset tudunk. A P2Y₁₃ receptor hiány a mikroglia sejtek kevésbé ramifikált morfológiáját és rövidebb nyúlványokat eredményezett, valamint a sérülés irányába az irányított kemotaktikus motilitás lassabb volt, mint a receptor jelenlétében (Kyrargyri és mtsai., 2020).

Pozner és mtsai. a genetikailag kódolt fluoreszcens Ca²⁺-indikátor GCaMP5G segítségével az intracelluláris Ca²⁺ koncentrációt nyomon követve nem figyeltek meg mikroglia sejtekben spontán Ca²⁺ koncentráció növekedéseket, de az LPS hatására kiváltódó Ca²⁺ koncentráció emelkedések frekvenciája 8-szorosára növekedett. Továbbá a nyúlványok kinyúlásának/visszahúzásának sebessége csökkent azokban a sejtekben, amelyekben emelkedett az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció (Pozner és mtsai., 2015).

Összegezve a fentieket tehát a nyúlványmotilitás dinamikus szabályozásához mind az aktin filamentumrendszer, mind a mikroglia membánjában megtalálható sokféle sejtfelszíni receptor közötti összehangolt működésre van szükség.

1.4. Az extracelluláris ionkörnyezet változásának hatása a mikroglialis működésre

A mikrogliasejtek működését a membránpotenciáljuk és annak létrehozásában és szabályozásában szerepet játszó ioncsatornák és transzporterek összehangolt működése szabja meg. A mikroglia sejtmembránja *in situ* depolarizált állapotú, nyugalmi membránpotenciálja (V_m) -45 mV körüli érték, mely agyi régiótól, nemtől és kortól függően -20 mV és -60 mV között változhat (Kettenmann és mtsai., 2011). Jelenlegi tudásunk szerint fiziológias körülmények között, *in situ*, a tónusosan aktív két pórus doménnel rendelkező, halotánál gátolható 1-es típusú K^+ -csatorna (THIK-1) játssza a fő szerepet a negatív V_m fenntartásában, mely a mikroglia ramifikált állapotára jellemző funkciók (folyamatos monitorozó nyúlványmozgás, KIR szöveti homeosztázisának fenntartása) működéséhez elengedhetetlen (Madry és mtsai., 2018b; Izquierdo és mtsai., 2019). A mikroglia-membrán nyugalmi potenciáljának kialakításában a THIK-1 mellett még más, a K^+ megfordulási potenciáljánál (E_K : -90 mV) pozitívabb megfordulási potenciállal rendelkező ioncsatornák is részt vesznek, ilyenek például a térfogat által szabályozott Cl^- -csatornák (VRAC) vagy a tranziens receptor potenciál (TRP) kation csatornák (4. ábra). A V_m szabályozásában/finomhangolásában a feszültség-függő Ca^{2+} csatornák és a befelé rektifikáló K^+ csatornák is részt vesznek, melyeknek a mikroglia membránban *in situ*, fiziológias körülmények között csak alacsony szintű expresszióját írtak le, de öregedés során illetve különböző patológias folyamatokban, melyekben a mikrogliasejtek aktiválódnak, megnövekedett az expressziójuk (Izquierdo és mtsai., 2019).



4. ábra: A mikrogliasejtek nyugalmi membránpotenciálját szabályozó ionszatornák és receptorok. Nyugalmi állapotban a mikrogliasejtek negatív membránpotenciáljának kialakításában a fő szerepet a tónusosan aktív THIK-1 K^+ csatornák játsszák. A THIK-1 csatorna aktivitását a tirozin-kinázok általi foszforiláció szabályozza. A Cl^- csatornák és a nem szelektív TRPV1 és TRPM7 kationcsatornák szintén részt vesznek a membránpotenciál szabályozásában közreműködve a K^+ csatornák által kiváltott hiperpolarizációban. A nyúlványaival folyamatosan a környezetét monitorozó nyugvó mikroglia jellemző negatív membránpotenciál fenntartásában G_i -fehérjék által fenntartott alacsony cAMP szint (pl. a CX3CR1 receptorokon keresztüli jelátvitel) és a tirozin-kináz aktivitás is részt vesz. TRP: tranziens receptor potenciál kation csatornák, TAM kináz: Tyro3, Axl, MERTK receptor tirozin-kináz (Izquierdo és mtsai., 2019 nyomán)

A mikrogliasejtek ramifikált, a környezetet folyamatosan monitorozó állapotát tehát elsősorban a tónusosan aktív THIK-1 kálium csatorna által létrehozott nyugalmi membrán potenciál tartja fenn. Madry és mtsai leírták, hogy patkányból származó hippocampális akut szeleten mind a THIK-1 farmakológiai gátlása vagy a fehérjét kódoló génjének delécioja, mind pedig az extracelluláris káliumkoncentráció növelésével kiváltott depolarizáció csökkentette a ramifikált mikroglia állapotot (Izquierdo és mtsai., 2019). Az extracelluláris kálium koncentráció spreading depression (terjedő depolarizáció), migrénes rohamok, stroke, subarachnoideális vérzés és agysérülés esetén emelkedik akár 60 mM fölé is, míg kisebb extracelluláris kálium koncentráció emelkedés

fordul elő például az enyhébb epileptikus aktivitás alatt. Összhangban a fentiekkel, mindegyik esetben a mikroglia sejtek ramifikált állapotának csökkenését figyelték meg (Madry és mtsai., 2018a).

A negatív membránpotenciál és a ramifikált mikroglia állapot fenntartásához alacsony cAMP szint is szükséges, melyet a G_i -fehérjékhez kapcsolt receptorokon, úgymint a CX3CR1-en keresztül zajló jelátvitel biztosít (Kalla és mtsai., 2003) (4. ábra). Továbbá a ramifikált, folyamatos nyúlványmozgással járó állapotot elősegíti a tirozin kináz receptor aktivitás (pl. TAM kináz, Tyro3, Axl, MERTK receptor tirozin-kináz), mely receptorok főként a motilitás szabályozásában vesznek részt, valamint a nyugalmi potenciál kialakításában fő szerepet játszó THIK-1 szabályozását is végzik (Izquierdo és mtsai., 2019).

1.5. A mikroglia főbb funkcióiban szerepet játszó ioncsatornák áttekintése

Az intracelluláris ionhomeosztázis dinamikus fenntartása fontos a mikrogliasejteknek a dolgozatom előző fejezeteiben felsorolt funkcióiban (pl. aktiváció, proliferáció, citokin termelés, fagocitózis, migráció, nyúlványmotilitás). Ezen funkciók megvalósulásához transzporterek és ioncsatornák működése szükséges, melyek expressziója és aktivitása sok esetben a mikrogliasejt aktuális állapotától függ. A mikroglia működésében részt vevő ioncsatornák és transzporterek funkcionális megismerése mára már az *in situ* alkalmazható klasszikus elektrofiziológiai patch-clamp technikák mellett élősejtes képalkotó módszerekkel (live cell imaging) és sejt-specifikus transzkriptomikai vizsgálatokkal egészült ki, így egyre részletesebb képet kapunk fiziológiás és patofiziológiás működésükről, habár a mikrogliasejtek által expresszált ioncsatornák nagy részének mikrogliasejtekben betöltött funkciója még feltáratlan. Ebben a fejezetben a szakirodalomban eddig leírt mikroglia aktivációban és/vagy citokin termelésben, nyúlványmotilitásban részt vevő csatornák és transzporterek részletezésére fogok csak kitérni.

A mikroglia sejtmembrán hiperpolarizációjában és a térfogat szabályozásban a K^+ -csatornák fontos szerepet töltenek be. Hisztológiai és farmakológiai vizsgálatok igazolták, hogy a befelé rektifikáló K^+ -csatornák Kir2.1, a feszültség-függő K^+ -csatornák Kv1.3 és a Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornák KCa3.1 altípusa is megtalálható a mikroglia sejtmembránjában (Schilling és Eder, 2007; Nguyen és mtsai., 2017; Izquierdo és mtsai.,

2019). Nguyen és mtsai. a proinflammatorikus stimulusként alkalmazott bakteriális lipopoliszacharid (LPS) hatására a Kv1.3 csatorna, míg az antiinflammatorikus hatással rendelkező IL-4 esetében a Kir.2.1 csatorna expressziójának növekedését írták *in vitro* mikroglia sejtekben (Nguyen és mtsai., 2017). A Kv1.3-nak az aktivált mikroglia sejtek membránpotenciáljának szabályozásában és a citokintermelésben tulajdonítanak szerepet (Nguyen és mtsai., 2020), míg a Kir2.1 inkább a proliferáció és migráció szabályozásában vehet részt (Di Lucente és mtsai., 2018). Szintén a mikroglia aktivációval kapcsolatosan írták le, hogy az amiloid β plakkok közelében található mikroglia sejtekben megnövekedtek a Kir és Kv-csatornákon keresztül folyó áramok (Wendt és mtsai., 2017).

Ahogy korábban kifejtettem, az NLRP3 inflammaszóma aktivációhoz és IL-1 β termeléshez K⁺-efflux szükséges, mely a THIK-1 K⁺-csatornán, a Kv1.3 csatornán valamint az ATP hatására aktiválódó P2X7 csatornákon keresztül jöhet létre (Izquierdo és mtsai., 2019).

A mikroglia sejtek által expresszált klorid csatornákat a térfogat (vagy duzzadás) által szabályozott klorid csatornák (VRAC,) és a klorid intracelluláris ioncsatornák (CLIC) közé lehet sorolni (Kettenmann és mtsai., 2011; Luo és mtsai., 2021). A VRAC csatornák a sejtterefogat szabályozásában vesznek részt azáltal, hogy duzzadás által aktivált klorid áramot keltenek, mely a regulátoros térfogat csökkenés (RVD) fő komponense a sejtduzzadás során (Luo és mtsai., 2021). Megfigyelték, hogy a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitása során megnövekedett sejtterefogat szabályozását az aktivált VRAC csatornák végzik (Ducharme és mtsai., 2007; Luo és mtsai., 2021). A VRAC csatornák 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoésavval történő gátlása teljesen megszüntette a BV2 mikroglia sejtek (immortalizált sejt vonal) fagocitotikus aktivitását. A VRAC csatornák nemcsak az egész sejtre kiterjedő térfogat szabályozásban, hanem a pszeudopódiumok lokális kinyúlásában és retrakciójában is részt vesznek (Luo és mtsai., 2021). Harl és mtsai. a BV2 sejtek fagocitáló képességének csökkenését figyelte meg klorid mentes extracelluláris közegben valamint klorid csatorna blokkolókat alkalmazva a BV2 sejtek kevésbé nyújtották ki a pszeudopódiumaikat és ezáltal kevésbé kebelezték be a mikrogyöngyöket (Harl és mtsai., 2013). A mikroglialis VRAC csatornák agyi kórfolyamatokban betöltött szerepéről még kevés információ áll rendelkezésre. Agyszövetekben, lézer által kiváltott sérülés során a VRAC csatornák farmakológiai blokkolásával az ATP-indukálta kemotaktikus nyúlványmotilitás csökkenését figyelték

meg (Hines és mtsai., 2009). Az *in vitro* vizsgálatoknak részben ellentmondó eredményeket írtak le egy nemrégiben megjelent tanulmányban, ahol az LRRC8A (8A-t tartalmazó leucin gazdag ismétlődés, leucin-rich repeat containing 8A) alegységének hiányában vizsgálták a VRAC mikroglia-sejtekben betöltött funkcióját kondicionális mutáns LRRC8A KO egérvonal segítségével (Cook és mtsai., 2022). Cook és mtsai. azt találták, hogy a VRAC hiánya nem befolyásolja jelentősen a mikroglia-sejtek morfológiáját, transzkripcionális jellemzőit, fagocitotikus aktivitását, a P2Y12 receptoron keresztül kemotaktikus folyamatokat, valamint experimentális stroke során az infarktus nagyságát sem (Cook és mtsai., 2022).

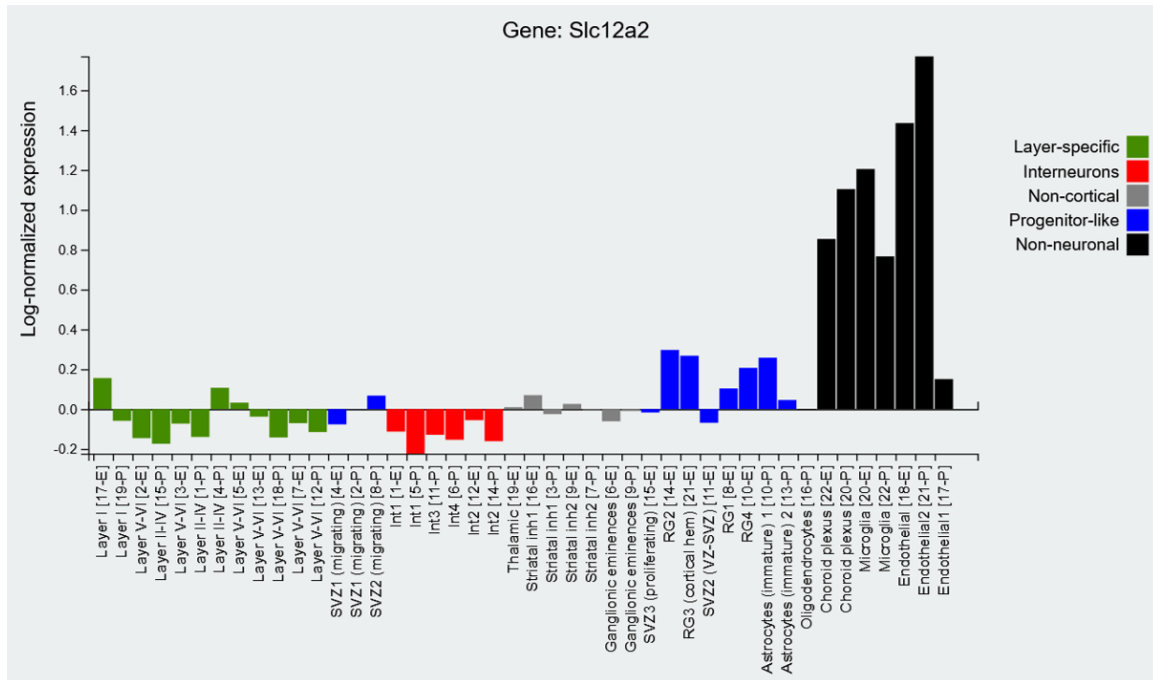
A CLIC1 csatorna citoplazmatikusan fordul elő, de konformáció változás során képes kihelyeződni a sejtmembránba (Kettenmann és mtsai., 2011). Aβ jelenlétében a CLIC1 a citoszolból a mikroglia sejtmembránjába való transzlokációját figyelték meg, mely az anion konduktancia és a NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)-oxidáz általi ROS képződés megnövekedését eredményezte (Kettenmann és mtsai., 2011; Luo és mtsai., 2021). A CLIC1 specifikus inhibitorával történt gátlása során mérséklődött a mikroglia-sejtek proliferációja és az Aβ-kezelt mikroglia-sejtek neurotoxicitásának mértéke is. Továbbá a CLIC1 csatorna inhibitorainak alkalmazása gátolta az IFN-γ-val stimulált BV2 sejtekben az iNOS expressziót és csökkentette a NO termelést (Luo és mtsai., 2021). A CLIC1 tehát többféle aspektusban is részt vehet az Alzheimer-kórban a mikroglia sejtek aktivációjában, ezért akár potenciális gyógyszer-célpont lehet (Skaper, 2011; Luo és mtsai., 2021). Megjegyzendő, hogy makrofágokban az IL-1β termelés és az NLRP3 inflammaszóma aktiváció folyamatában bizonyítottan szerepet játszik a CLIC1 csatorna (Tang és mtsai., 2017).

1.6. A $Na^+-K^+-2Cl^-$ kotranszporter-1 (NKCC1)

A kation-klorid kotranszportererek (CCC-k, SLC12 gén család tagjai) központi szerepet töltenek be az intracelluláris Na^+ , K^+ és Cl^- homeosztázis szabályozásában, ezáltal részt vesznek olyan fiziológiás folyamatokban, mint az idegsejtek ingerelhetőségének modulálása, a transzepitélialis só- és víztranszport vagy a sejtterefogat szabályozása (Russell, 2000; Gamba, 2005). Filogenetikai vizsgálatok alapján a CCC fehérjecsaldot működésük szerint Na^+ -függő és Na^+ -független alcsaldokra osztják. A Na^+ -függő CCC-k közé sorolják az $Na^+-K^+-2Cl^-$ kotranszporter-1-et és 2-t (NKCC1 és NKCC2) és a Na^+-Cl^- kotranszportert (NCC). Az NKCC1 és az NKCC2 a Na^+ , a K^+ és a

Cl⁻ ionokat egyirányban, 1:1:2 sztöchiometriai arányban szállítja, míg az NCC csak a Na⁺ és Cl⁻ egyirányú, 1:1 arányú transzportjéért felelős. Mindkettő elektroneutrális transzport. A Na⁺-független módon történő egyirányú K⁺ és Cl⁻ ion szállításban szintén az SLC12 gén családba tartozó KCC1-4 (K⁺-Cl⁻ kotranszporter-1-4) vesznek részt, melyek szintén 1:1 arányban szállítják a két iont (Russell, 2000; Gamba, 2005).

A CCC-k sejtspecifikus expressziójának leírásával sok tanulmány foglalkozik (Garneau és mtsai., 2020; Mahadevan és Woodin, 2020; Virtanen és mtsai., 2020; Löscher és Kaila, 2022), és egyre árnyaltabb kép rajzolódhat ki az expressziós mintázatokról az egyre bővülő egycelt RNS szekvenálások eredményeit összegyűjtő adatbázisokban megtalálható adatokból (<http://mousebrain.org>; <https://www.brainrnaseq.org>; <http://zylkalab.org/datamousecortex>; 5. ábra). Az NKCC2 és az NCC kizárólag a periférián található meg, főleg a vesében, ahol a só visszaszívásban játszanak szerepet (Garneau és mtsai., 2020; Löscher és Kaila, 2022). A többi CCC a KIR-ben a neuron és/vagy glia sejtekben expresszálódik, az idegrendszer fejlődésének különböző szakaszában legalább átmenetileg, továbbá az NKCC1 és a KCC3 a perifériás idegrendszerben is megtalálható (Garneau és mtsai., 2020; Mahadevan és Woodin, 2020; Löscher és Kaila, 2022). A KCC2-t idegsejt-specifikusként tartják számon, az idegsejtekben a K⁺ és Cl⁻ ionok sejtől kifelé történő szállítását végzi és az idegsejtek érése során mennyisége az NKCC1 expressziójának csökkenésével párhuzamosan upregulálódik, létrehozva ezzel az érett idegsejtekre jellemző alacsony intracelluláris Cl⁻ koncentrációt és a hiperpolarizáló GABA_Aerg hatást (Kahle és mtsai., 2008; Kaila és mtsai., 2014a). A jelenséget GABA-váltásnak („GABA switch”) nevezik, melyet részleteiben az *Az NKCC1 szerepe idegsejtekben* című alfejezetben fogok tárgyalni. Mivel az idegsejtekben a Cl⁻ koncentráció szabályozásában bekövetkező zavar megemelkedett intracelluláris Cl⁻ szinteket eredményez, amelyet kapcsolatba hoztak számos KIR-t érintő betegséggel (Ben-Ari, 2017; Savardi és mtsai., 2021), ezért az NKCC1 mint potenciális terápiás célpont a farmakológiai kutatásokban mintegy forró témává nőtte ki magát az elmúlt években (Brandt és mtsai., 2018; Luo és mtsai., 2020; Savardi és mtsai., 2020, 2021). Mindezek mellett az érett idegrendszerben az NKCC1 gliális és egyéb nem-neuronális expressziójának (5. ábra) is egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az elmúlt években, beleértve saját kutatásainkat is. E témát dolgozatom következő fejezeteiben részletesebben is ki fogom fejteni.



5. ábra: Az NKCC1-et kódoló, *Slc12a2* gén sejtszintű expressziója egér agyban.

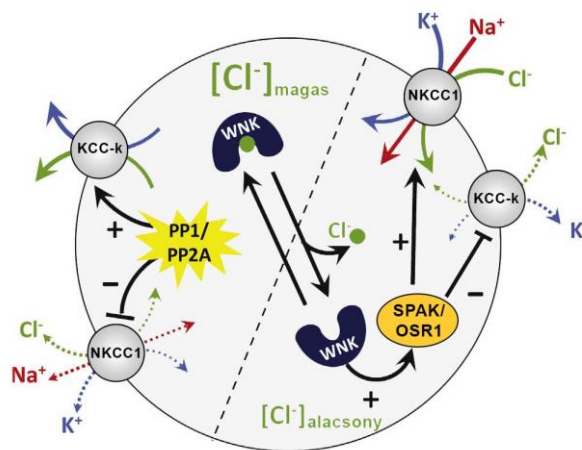
Zöld: neuronális expresszió, sejtréteg szerint; piros: interneuronális expresszió; szürke: kérgen kívüli expresszió; kék: expresszió a progenitor sejtekben; fekete: nem-neurális expresszió. Forrás: <http://zylkalab.org/datamousecortex>

1.6.1. Az NKCC1 molekuláris felépítése és funkcionális jellemzése

Habár az NKCC1 fehérjéket már közel harminc évvel ezelőtt klónozták a cápák sómirigyéből (Xu és mtsai., 1994), a funkció szempontjából fontos másodlagos és harmadlagos szerkezetének megismerése csak nemrégiben, zebradánióból klónozott NKCC1 fehérje nagyfelbontású krioelektromikroszkópiás vizsgálatával vált lehetővé (Chew és mtsai., 2019, 2021). A humán és a zebradánió NKCC1 fehérje szekvenciája között nagymértékű hasonlóságot találtak (Chew és mtsai., 2019; Zhang és mtsai., 2021). Az NKCC1 egy ~135 kDa molekulásúlyú fehérje, melynek működése homodimer formához kötött, monomerjei 12 hélixből álló transzmembrán doménből (TMD) és az intracellulárisan elhelyezkedő N-terminális (NTD) és C-terminális doménekből (CTD) állnak. A TMD és a CTD egy α -hélixből álló ún. linker régióval kapcsolódik össze (Chew és mtsai., 2019, 2021).

Az NKCC1 C- és N-terminális régióján számos potenciális foszforilációs hely található, melyek kulcsfontosságúak a transzportaktivitás szabályozása szempontjából

(Zhang és mtsai., 2021). Az NKCC1 működését az intracelluláris Cl^- koncentráció szabályozza a WNK/SPAK/OSR1 szignalizációs útvonalon keresztül (6. ábra). Az intracelluláris Cl^- koncentráció csökkenésekor a WNK kinázok aktiválódnak, melyek foszforilálják a SPAK/OSR1 kinázokat, melyek ezután közvetlen módon foszforilálják az inaktív NKCC1 N-terminális doménjének treonin oldalláncait. A foszforilált N-terminális domén a C-terminális doménnel interakcióba lépve fellazítja a homodimer kondenzált struktúráját, ezzel aktiválva a kotranszportert, mely végül a Na^+ és K^+ kotranszportja mellett a Cl^- ionok sejtbe történő beáramlását eredményezi (6. ábra) (Wilson és Mongin, 2019; Brown és mtsai., 2021; Chew és mtsai., 2021). Leírták, hogy az N-terminális domén foszforilációjával a transzporter membránból történő internalizációja is csökken, ezzel növelve a transzport hatékonyságát (Hartmann és Nothwang, 2015). Az NKCC1 és a KCC2 aktivitása ellentétes módon szabályozódik foszforiláció útján. Az intracelluláris Cl^- koncentráció szabályozásában az NKCC1 és a KCC-k másodlagos aktív transzportján kívül a feszültség- és ligand-függő klorid csatornák, valamint térfogat által szabályozott anion csatornák is részt vesznek (Wilson és Mongin, 2019).

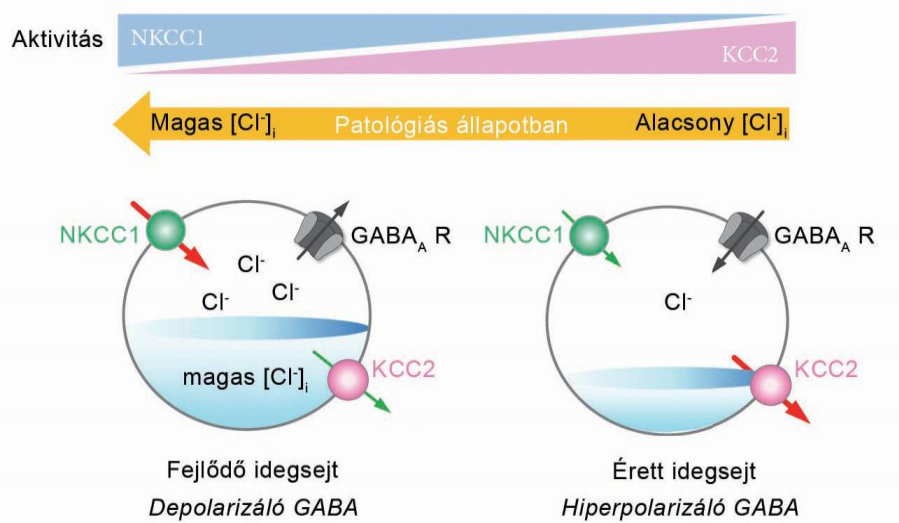


6. ábra: Az intracelluláris Cl^- koncentráció szabályozása neuronokban és glia sejtekben. A Cl^- koncentráció szabályozásában fontos szerepet töltenek be a KCC-k és az NKCC1 transzporterek, melyek a Na^+ , a K^+ és a Cl^- ionok szállítását a Na^+ - K^+ ATPáz által létrehozott koncentráció gradiens terhére végzik. A WNK kinázok érzékelik az intracelluláris Cl^- koncentrációt, ha csökken a sejtben belüli Cl^- szint, aktiválódnak és foszforilálják a SPAK/OSR1 kinázokat. A SPAK/OSR1 kinázok

foszforilációval aktiválják az NKCC1-t, ezzel egyidejűleg a KCC-eket gátolják. Az NKCC1 és a KCC-k defoszforilálását a szerin/treonin protein foszfatázok (PP1 és PP2) végzik. NKCC1: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ kotranszporter-1, KCC: $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ kotranszporter, SPAK: Ste20-szerű prolinban és analinban gazdag, OSR1: oxidatív stressz reszponzív 1 kináz, WNK: lizin nélküli szerin-treonin kináz (Wilson és Mongin, 2019 nyomán, módosítva).

1.6.2. Az NKCC1 szerepe idegsejtekben

Felnőtt korban, az érett idegrendszerben az agykéreg fő gátló neurotranszmittere a GABA. Az idegrendszer fejlődése során azonban a GABAerg neurotranszmisszió serkentő hatású, mely elengedhetetlen a neuronokéréséhez és a különböző neuronális hálózatokba való integrációjához (Ben-Ari, 2002; Kahle és mtsai., 2008). Embrionálisan és újszülött korban a kortikális és a gerincvelői neuronokon az NKCC1 működés túlsúlyos jellemző, a KCC2 aktivitása alacsony, ezért a $[\text{Cl}^-]_i$ (intracelluláris klorid koncentráció) magas (7. ábra). A GABA_A receptor aktiválódáskor a Cl^- az ioncsatornán keresztül kifelé áramlik az idegsejtből, ezáltal az idegsejtek depolarizációját és serkentését okozza. Az idegsejtekérés során az NKCC1 aktivitás csökken, míg a születést követően a KCC2 aktivitás megnövekszik, ezáltal a KCC2 működése alacsonyan tartja a $[\text{Cl}^-]_i$ -t, a Cl^- egyensúlyi potenciálja alacsonyabbá válik, mint a neuronok nyugalmi membránpotenciálja, így a GABA_A receptor aktivációja esetén a kloridionok befelé áramolnak a sejtbe, ami hiperpolarizációhoz és végeredményben az idegsejtek gátlásához vezet (Kahle és mtsai., 2008; Tillman és Zhang, 2019) (7. ábra).



7. ábra: Az idegsejtek intracelluláris Cl^- szintjének szabályozása és a GABA-váltás a posztnatális fejlődés során. Az éretlen, fejlődő idegsejtekben (balra) a magas NKCC1 aktivitás következtében a GABA_A -receptorok által kifelé irányuló Cl^- áramok keletkeznek, melyek depolarizáló hatásúak. Az érett idegsejtekben (jobbra) a megnövekedett KCC2 aktivitás következményeként alacsony intracelluláris Cl^- koncentráció alakul ki, ezért a GABA_A -receptorok aktiválása esetén hiperpolarizáció következik be. Patológias körülmények között az NKCC1/KCC2 relatív szintje és aktivitása megváltozik és a GABA_A -receptoron keresztül közvetített hatás ismét depolarizálóvá válik, ezzel a sejtek hiperexcitábilis állapotát hozhatja létre (Tillman és Zhang, 2019 nyomán, módosítva).

Az éretlen neuronokhoz hasonlóan, sokféle KIR-t érintő betegség kórfolyamatát kapcsolatba hozták idegsejtekben a GABAerg neurotranszmisszió újra depolarizáló hatásúvá válásával. Ezt a hatást az intracelluláris Cl^- koncentráció szabályozásában bekövetkező zavarok okozzák, mely felléphet az NKCC1 és/vagy KCC2 transzporter aktivitását vagy expresszióját érintő változások következtében. Ezekben a kórképekben az ionegyensúly helyreállításának egyik lehetséges módja az NKCC1 transzporter aktivitásának gátlása. Főleg újszülöttkori és egyes felnőttkori epilepsziás kórképekben, agysérülések (TBI), agyi ödéma esetén terápiás céllal gyakran alkalmazzák az NKCC1 specifikus antagonistáját, a **bumetanidot** (Löscher és mtsai., 2013; Kaila és mtsai., 2014a; Hui és mtsai., 2016; Zhang és mtsai., 2017).

A fejlődő idegrendszerrel ellentétben jóval kevesebbet tudunk az NKCC1 neuronális funkciójáról felnőtt KIR-ben. Az NKCC1 tartja fenn a magas intracelluláris Cl⁻ koncentrációt a neuronális progenitor sejtekben is a szubventrikuláris zónában és a gyrus dentatusban felnőtt neurogenesis során (Ge és mtsai., 2006; Mejia-Gervacio és mtsai., 2011; Sun és mtsai., 2012). A felnőtt egér retina horizontális sejtrétegében szintén az NKCC1 tartja fenn a depolarizáló GABAerg hatáshoz szükséges ionviszonyokat (Grove és mtsai., 2019). A KIR-rel ellentétben a periférián a gerincvelő hátsó gyöki ganglion és a trigeminális ganglionokban is a depolarizáló GABAerg hatás marad fenn a születést követően is (Virtanen és mtsai., 2020).

1.6.3. Az NKCC1 szerepe asztroglia sejtekben

Asztroglia sejtekben a kation-klorid kotranszporterek jelentős szerepet töltenek be a sejttérfogat szabályozásában az ún. regulátoros térfogat növekedés (regulatory volume increase, RVI) és regulátoros térfogat csökkenés (regulatory volume decrease, RVD) mechanizmusokon keresztül (Kahle és mtsai., 2008). Hipertóniás körülmények között a sejtek zsugorodnak, melynek következtében az NKCC1 transzporterek aktiválódnak, rajtuk keresztül nátrium-, klorid- és káliumionok áramlanak be a sejt belsejébe, s passzív víz beáramlást indukálva segítenek helyreállítani a sejt normál térfogatát. Hipotóniás közegben KCC3 és egyéb duzzadás által aktivált klorid- és kálium csatornákon keresztül történik e két ion sejt belsejéből való távozása. Az NKCC1, KCC3 és a sejttérfogat szabályozásban részt vevő egyéb ioncsatornák és transzporterek (Na⁺-K⁺-ATPáz, AQP4, VRAC, TRPV4) nem megfelelő működésének következményeként ischaemiás és traumás agysérülések esetén, valamint neurodegenerációs kórképekben agyi ödéma alakul ki, mely többek közt az extracelluláris tér csökkentése, a normál agyi vérkeringés csökkenése, glutamát felhalmozódás miatt további súlyosbító tényező (Kahle és mtsai., 2008; Annunziato és mtsai., 2013).

A fent említett patológiás folyamatok mérséklésében az NKCC1 gátlószere, a bumetanid lehetséges terápiás szerként szerepelhet, melyet a rágcslókon végzett számos kísérletes eredmény alátámasztani látszik. Patkány MCAo stroke modellben az NKCC1 intravénás bumetanid kezeléssel történő farmakológiai gátlásakor mérséklődött a neuronok és az asztroglia sejtek duzzadása, kisebb volt az ödémás és az infarktusz agyterület (O'Donnell és mtsai., 2004). Zhang és mtsai. az asztroglia sejttérfogat szabályozásban az NKCC1 és az AQP4 között funkcionális interakciót írt le, melynek

főleg patológiás körülmények között van jelentősége (Zhang és mtsai., 2016). Tanulmányukban leírták, hogy a traumás agysérülés egér modelljében a kérgi asztrogliasejtekben egyaránt megnövekedett az NKCC1 és a vízmolekulák kétirányú szállításában szerepet játszó AQP4 expressziója (Zhang és mtsai., 2016), mely az ödéma méret csökkentésére használt antioxidáns és antiinflammatorikus szer, az astaxanthin hatására, csökkenést mutatott. Továbbá azt is megfigyelték, hogy az NKCC1 bumetaniddal történő gátlásával egyidejűleg az asztrogliasejtek AQP4 expressziója is csökkent, ezzel igazolva a két transzporter között feltételezett interakciót az ödéma kialakulás mechanizmusában (Zhang és mtsai., 2016).

Ischaemiát követő extracelluláris kálium szint növekedés hatására az asztrogliasejtek specifikus NKCC1 hiányos egerekben csökkent az asztroglialis glutamát release a vad típusban mérthez képest (Chen és Sun, 2005). Egér és patkány hippocampusz glutamát erg szinapszisaiban az LTP az asztrogliasejtek nyúlványainak NKCC1-függő visszahúzását váltja ki, melynek következtében megnövekszik az extraszinaptikus glutamát kilépés, ezáltal szinapszisok közötti kommunikáció is (Henneberger és mtsai., 2020).

1.6.4. Az NKCC1 lehetséges szerepe mikroglia-sejtekben

Az NKCC1 központi idegrendszerben betöltött szerepét főleg idegsejtek és asztroglia-sejtek vonatkozásában tárgyalja az irodalom, ahogyan azt a fentiekben bemutattam. A transzkriptomikai adatok (Zhang és mtsai., 2014; Bennett és mtsai., 2016) magas NKCC1 expressziót igazoltak a mikroglia-sejteken is (5. ábra), de jelenlegi ismereteink szerint a mikroglia-ban betöltött fiziológiai és patofiziológiai funkciójáról irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. Az NKCC1 aktivitás megváltozását ugyanakkor számos olyan gyakori KIR-t érintő betegségben leírták, melyeknek kórfolyamatához az alapvetően mikroglia által mediálta neuroinflammációs mechanizmusok szorosan kapcsolódnak (Kaila és mtsai., 2014a; Ben-Ari, 2017; Schulte és mtsai., 2018). Az NKCC1 centrális gyulladási folyamatokban betöltött szerepét eddig még senki nem vizsgálta, bár néhány tanulmány már igazolta az NKCC1 expresszió gyulladási stimulus (LPS, IL-1 β , TNF- α) hatására történő növekedését (Huang és mtsai., 2014; Pozdeev és mtsai., 2017; Weidenfeld és Kuebler, 2017).

A mikroglia-sejtekről ismert, hogy olyan patológiás folyamatokban is jelentős szerepet töltenek be, mint az ischaemiás és traumás agysérülések, az epilepszia-szerű görcsaktivitások, vagy különböző neurodegeneratív megbetegedések (Eyo és mtsai.,

2014; Szalay és mtsai., 2016; Salter és Stevens, 2017; Song és Colonna, 2018; Badimon és mtsai., 2020; Cserép és mtsai., 2020; Wu és mtsai., 2020). A felsorolt kórfolyamatok egyik közös jellemzője, hogy az extracelluláris térben a neuronális és asztroglialis diszfunkciók következtében megnövekszik a káliumion koncentrációja. Ismert az is, hogy a mikroglia sejtek környezetük folyamatos monitorozása révén képesek a neuronális aktivitás szabályozására, de az még részleteiben nem tisztázott, hogy az extracellulárisan megnövekedett kálium szint helyreállításában is részt vehetnek-e. A korábban részletezett példák (lásd az 1.5. fejezetben) jól mutatják a mikroglialis (kálium)ioncsatornák és iontranszporterek mikroglia funkciókban betöltött szerepének jelentőségét. Mivel a mikroglia sejtek nyugvó/aktivált állapotának egyensúlya megszabja a patológiás folyamatok kimenetelét, a mikroglia aktivációját potenciálisan befolyásoló molekuláris mechanizmusok különösen nagy érdeklődésre tartanak számot. Ezért munkám során a mikroglialis NKCC1 aktivitás fiziológiás, valamint gyulladásszerű válaszokban betöltött szerepének megismerését tűztem ki célul.

1.7. Az NKCC1 antagonisták terápiás alkalmazási lehetőségei különböző agyi kórfolyamatokban

Az NKCC1-2 antagonisták bumetanidot széles körben használják a klinikumban diuretikumként a vese- és szívelégtelenségekhez és egyes májbetegségekhez kapcsolódó ödémás tünetek kezelésére, a Henle-kacs felszálló szárában található, a víz visszaszívásában szerepet játszó NKCC2 gátlása révén (Löscher és Kaila, 2022).

Az irodalomban egyre növekvő számú közlemény számol be preklinikai és klinikai kutatások eredményeiről, melyekben megfigyelték az NKCC1 expresszió növekedését és/vagy a KCC2 expresszió csökkenését, számos, az idegrendszer fejlődéséhez és az agyat ért inzultusokhoz kapcsolódó neurológiai vagy neurodegeneratív betegségek kórfolyamatában (Ben-Ari, 2017; Kharod és mtsai., 2019; Savardi és mtsai., 2021). Az intracelluláris Cl⁻ koncentráció helyreállítására az NKCC1 nem-specifikus inhibitorának, a bumetanidnak az alkalmazása a kezdeti vizsgálatok során pozitív eredményeket hozott, mind különböző gyakori agyi kórképek állatkísérletes modelljeiben mind a klinikai vizsgálatokban részt vevő humán alanyok esetén. Ennek alapján az idegrendszeri NKCC1 ígéretes terápiás célpontnak ígérkezett (Ben-Ari, 2017; Kharod és mtsai., 2019; Savardi és mtsai., 2021). Továbbá szintén bizonyítékként szolgált az NKCC1-nek a skizofrénia

(Kim és mtsai., 2022), a Huntington-kór (Hsu és mtsai., 2019), a Down-szindróma (Parrini és mtsai., 2021) kórfolyamatában betöltött szerepéről a rágcsálókön végzett RNS interferencia kísérletek, melyekben az NKCC1 downregulációját követően javult a betegség kimenetele. Az NKCC1 farmakológiai gátlása azóta is a figyelem középpontjában áll a különféle neurológiai és neuropszichiátriai megbetegedések terápiájában, ezért a vér-agy gáton keresztül jobban penetráló és/vagy szelektívebb bumetanid analógok és származékok, prodrug-ok fejlesztése és tesztelése jelenleg is zajlik. A bumetanid és az újabban előállított származékainak előnyeit és hátrányait a fentebb említett betegségek terápiájában egy különálló alfejezetben részletezem. A klinikai tanulmányok részleteit és eredményeit a 2. táblázatban foglalom össze.

1.7.1. Agyi fejlődési rendellenességek

A serkentő és gátló kapcsolatok egyensúlyának felbomlása az agy kóros fejlődéséhez vezethet. Az idegrendszer fejlődéséhez köthető betegségek főképp viselkedésbeli abnormalitásokkal (például az autizmus spektrumzavarra jellemző szociális interakcióban mutatkozó nehézségekkel, repetitív viselkedési formákkal vagy a Down-szindrómára jellemző memória zavarral) jellemezhetőek. A változatos viselkedésbeli tünetek és a betegségek változatos etiológiája ellenére mindegyiknél gyakran előfordulnak alvászavarok, szorongásos zavarok és a görcskészségre való hajlam növekedése, melyek háttérben a GABAerg transzmisszióban bekövetkező változások állnak (Savardi és mtsai., 2021). Rágcsálókban a KCC2 downregulációját írtak le a prenatálisan valproát-indukált autizmus modellben, Rett-szindróma és fragilis X-szindróma egérmódeljeiben, valamint ezekben a modellekben a bumetanid kezelés hatására az autizmus főbb tüneteiben enyhülést mutattak ki (Savardi és mtsai., 2021). A KCC2 downregulációját figyelték meg autizmusban szenvedő humán alanyok posztmortem agyszöveteiben is (Savardi és mtsai., 2021). Ezekkel a preklinikai eredményekkel összhangban autisztikus tünetekkel rendelkező alanyoknál a bumetanid javította a betegség súlyosságának besorolására használt pontrendszerekben, a CARS-ban (Children Autism Rating Scale) és a SRS-ben (Social Response Scale) az összpontszámot, csökkentette az EEG-ben (elektroencefalogram) az abnormális alfa-oszcillációkat és növelte egyes agyi területek aktivációját fázis II. klinikai vizsgálatokban (Lemonnier és mtsai., 2012; Hadjikhani és mtsai., 2015, 2018; Ben-Ari, 2017; Kharod és mtsai., 2019; Zhang és mtsai., 2020b; Ben-Ari és Lemonnier, 2021; Sprengers és mtsai.,

2021), (2. táblázat). Jelenleg egy olyan fázis III. klinikai vizsgálat (NCT04766177) fut, amelyben a bumetanidnak az autizmus tüneteivel szembeni hatásosságát vizsgálják (2. táblázat).

Skizofréniában szenvedő betegek agyában a Brodmann 46. területen az NKCC1 mRNS expressziójában 7,6-szoros emelkedést tapasztaltak (Dean és mtsai., 2007). Az NKCC1 két splice variánsának vizsgálatakor ugyanakkor a Brodmann 9. és 46. területén az NKCC1b expressziós szintje csökkenést mutatott, míg az NKCC1a mRNS szintje nem változott a kontrollhoz viszonyítva (Morita és mtsai., 2014). Egy esettanulmányban (Lemonnier és mtsai., 2016) és egy előkísérletben jelentették (Rahmanzadeh és mtsai., 2017a), hogy bumetanid hatására kevesebb hallucinációról számoltak be a skizofrén betegek, habár a pszichiátriai állapotukat értékelő teszt alapján nem mutatott a bumetaniddal kezelt csoport szignifikáns különbséget a placebóval kezelttől (Rahmanzadeh és mtsai., 2017b), (2. táblázat).

2. táblázat: Különböző, központi idegrendszert érintő betegségekben a bumetanid hatását vizsgáló klinikai kutatások. A táblázatban szereplő CARS és CGI rövidítések az autizmus súlyosságának besorolására használt pontrendszereket jelölik. CARS: gyermekkori autizmus besorolási skála (Childhood Autism Rating Scale), CGI: klinikai globális összbemérés skála (Clinical Global Impression). Kharod és mtsai., 2019, Savardi és mtsai., 2021 nyomán

Betegség	A vizsgálat neve és azonosítója	Fázis	Státusz	Kezelés időtartama, dózis	Hatás	Referenciák
Autizmus	A Study of Bumetanide for the Treatment of Autism Spectrum Disorder (NCT03156153)	II	lezárt	3 hónap, 1 mg/nap, szájon át	CARS, CGI értékek javultak	Lemonnier és mtsai, 2012
	Role of Bumetanide in Treatment of Autism (NCT04766177)	III	aktív	1 mg/nap, szájon át		
	A Historical Control Study of the Efficiency of Bumetanide on Children with Autism Spectrum Disorder (ChiCTR-OPC-16008336)	IV	lezárt	3 hónap, 1 mg/nap, szájon át	CARS értékek javultak	Zhang és mtsai, 2020
	Bumetanide in Autism Medication and Biomarker study (BAMBI, EUCTR2014-001560-35-NL)	II	lezárt	3 hónap, 2 mg/nap, szájon át	Nem volt	Sprengers és mtsai, 2021
	Efficiency of Bumetanide in Autistic Children (BUMEA, NCT01078714)	II	lezárt	10 hónap, 1 mg/nap	Emóciók felismerése javult és az ehhez kapcsolatos agyterületek aktivitása nőtt, több szemkontaktus	Hadjikhani és mtsai, 2015, 2018
Skizofrénia	The Effect of Bumetanide on Schizophrenia Patients (IRCT2014012616374N1)	II	lezárt	3 hónap, 1-2 mg/nap, szájon át	Hallucinációk csökkentek	Rahmanzadeh és mtsai, 2017
Parkinson-kór	Bumetanide to Treat Parkinson Disease: A Report of 4 Cases	eset-tanulmány	lezárt	2 hónap, 5 mg/nap, szájon át	Motoros tünetek javultak	Damier és mtsai, 2016
	Evaluation of the Efficacy and Safety of Bumetanide in Parkinson's Disease (NCT03899324)	II	aktív	4 hónap, szájon át		
ALS	Evaluating the Effect of Bumetanide on Spasticity in Patients with ALS (RCT20201020049089N1)	II/III	lezárt	4 hónap, 2 mg/nap, szájon át	ALSFRS-R pontszám javult	Mehrabi és mtsai, 2021 (preprint)
Down-szindróma	Assessing the Efficacy of Bumetanide for the improvement of Cognitive Functions in Children and Adolescents with Down Syndrome (EudraCT 2015-005780-16)	II	aktív	3 hónap, 1 mg/nap, szájon át		

2. táblázat (folytatás): Különböző, központi idegrendszert érintő betegségekben a bumetanid hatását vizsgáló klinikai kutatások. A táblázatban szereplő CARS és CGI rövidítések az autizmus súlyosságának besorolására használt pontrendszereket jelölik. CARS: gyermekkori autizmus besorolási skála (Childhood Autism Rating Scale), CGI: klinikai globális összbenyomás skála (Clinical Global Impression). Kharod és mtsai., 2019, Savardi és mtsai., 2021 nyomán

Betegség	A vizsgálat neve és azonosítója	Fázis	Státusz	Kezelés időtartama, dózis	Hatás	Referenciák
Újszülöttkori epilepszia	NEMO1: Neonatal Seizure Using Medication Off-patent (NCT01434225)	I/II	megszakított	12 óránként, 4-szer, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 mg/kg, intravénásan	Antiepileptikus hatás nem volt, ototoxicitás	Pressler és mtsai, 2015; Ben-Ari és mtsai, 2016
	Decreased Seizure Activity in a Human Neonate Treated With Bumetanide, an Inhibitor of the Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ Cotransporter NKCC1	esettanulmány	lezárt	egyszeri dózis, 0,1 mg/kg, intravénásan	Csökkent a rohamok átlagos hossza és gyakorisága	Kahle és mtsai, 2009
Temporális lebeny epilepszia	The Effect of Bumetanide on Seizure Controlling in Patients with Drug Resistance Temporal Lobe Epilepsies Candidate for Surgery (IRCT201012115368N1)	I/II	lezárt	6 hónap, 2 mg/nap, szájon át	Csökkent a rohamok gyakorisága	Gharaylou és mtsai, 2019
	Bumetanide Reduces Seizure Frequency in Patients with Temporal Lobe Epilepsy	előtanulmány	lezárt	4 hónap, 2 mg/nap, szájon át	Csökkent a rohamok gyakorisága	Eftekhari és mtsai, 2013

Az epilepszia egyes típusai kísérőbetegségként gyakran együtt fordulnak elő az agyi fejlődési rendelleneségekkel. A prenatális fejlődés alatt kialakult kérgi fejlődési zavarok mint a fokális kortikális diszplázia (FCD) és polymikrogyria - következtében élethosszig tartó gyógyszerrezisztens epilepszia alakul ki (Blumcke és mtsai., 2021). Rágcsálókban a KCC2 downregulációját és az NKCC1 upregulációját figyelték meg a kortexben az FCD modelljében, fokális fagyasztásos léziót követően. Hasonló tendenciát figyeltek meg a két iontranszporter expressziójában a műtéti beavatkozás során eltávolított vagy posztmortem agyszöveti mintákban, melyek FCD-ben szenvedő alanyokból származtak (Liu és mtsai., 2020). Az NKCC1 expresszió növekedését az újszülöttkori epilepszia (hipoxiával vagy pentilén-tetrazollal/PTZ indukált roham) és temporális lebeny epilepszia (TLE) rágcsáló modelljeiben is leírták (Savardi és mtsai., 2021), habár TLE-

ben szenvedő humán alanyokból származó agyszövetben mások az ellentétes irányú ionmozgásokat kiváltó KCC2 expressziójának az emelkedését igazolták (Karlócai és mtsai., 2016). Az újszülöttkori epilepszia állatmodelljeiben a bumetanid hatásossága változó mértékűnek és modell-specifikusnak bizonyult (Dzhala és mtsai., 2005; Löscher és mtsai., 2013; Kharod és mtsai., 2019; Löscher és Kaila, 2022). Ebben több tényező is szerepet játszhat, mint például a vér-agy gát zártságának mértéke vagy a szoros kapcsolatok (tight junction) alkotásában részt vevő, nem-neurális sejtípusok (asztrocita, mikroglia) jelenléte (Kharod és mtsai., 2019; Löscher és Kaila, 2022). A hipoxiás-ischaemiás encephalopátiában (HIE) szenvedő újszülöttek epileptikus görcsrohamainak kezelésére alkalmazták először klinikai vizsgálatokban a bumetanidot az NKCC1 túlsúly következtében kialakult serkentő GABA hatás okozta kóros folyamatokban (Kahle és mtsai., 2009; Pressler és mtsai., 2015). A NEMO (NCT01434225) fázis I./II. klinikai vizsgálatban bumetanid terápiát alkalmaztak a fenobarbitál antiepileptikus hatásának fokozására (2. táblázat). A NEMO vizsgálatokat megszakították, mivel az újszülöttekben a bumetanid antiepileptikumként nem bizonyult hatásosnak, de az alkalmazott, biztonságosnak vélt dózisban súlyos halláskárosodást okozott (Pressler és mtsai., 2015; Ben-Ari és mtsai., 2016). A bumetanid alkalmazása felnőttkori temporális lebeny epilepsziában csökkentette a rohamok gyakoriságát, amely mögött az inhibitoros GABAerg aktivitás helyreállítását feltételezik (Eftekhari és mtsai., 2013; Gharaylou és mtsai., 2019).

Tehát a felsorolt klinikai vizsgálatokban és tanulmányokban az NKCC1/KCC2 expressziós szintek és/vagy aktivitását változását alapul vevő és ennek helyreállítását célzó bumetanid terápia során sokszor egymásnak ellentmondó vagy nem meggyőző eredmények születtek.

1.7.2. Neurodegeneratív kórképek

A neurodegeneratív kórképek közös jellemzője az idegsejtek progresszív pusztulása, mely végül mozgással kapcsolatos vagy mentális deficithez vezető tüneteket okoz. A Huntington betegség különböző rágsáló modelljeiben (R6/2, YAC128, Hdh^{150Q/7}) leírták az NKCC1 upregulációját és/vagy a KCC2 downregulációját (Savardi és mtsai., 2021). A bumetanid helyreállította a GABAerg neurotranszmissziót, javított a kognitív és motoros tüneteken az R6/2 egér modellben, valamint szintén a GABAerg transzmisszió helyreállítását és a motoros tünetekre való pozitív hatását figyelték meg a Parkinson-kór

6-OHDA (6-hidroxidopamin) egér modelljében (Savardi és mtsai., 2021). Ezekkel a preklinikai eredményekkel összhangban a Huntington betegségben szenvedő páciensekben az NKCC1 upregulációját írták le, valamint Parkinson-kórban szenvedő betegekben a bumetanid terápiás alkalmazása gyengítette a motoros tüneteket (Damier és mtsai., 2016; Savardi és mtsai., 2021). Ezenkívül egy ALS kezelését célzó klinikai vizsgálatban a bumetanid enyhítette az ALS tüneteit (Savardi és mtsai., 2021). A Parkinson-kór tüneti kezelésében a bumetanid hatékonyságának vizsgálatával kapcsolatban egy fázis II. vizsgálat folyik jelenleg is (NCT03899324, 2. táblázat).

Az említett neurológiai és neurodegeneratív kórállapotok különböző etiológiája ellenére a fenti tanulmányok alapján elmondható, hogy az NKCC1 és KCC2 megváltozott expressziója jellemző mechanizmus lehet az említett megbetegedések kialakulásában, bár a folyamat részletei, s az ok-okozati kapcsolatok még nagyrészt feltáratlanok. Megjegyzendő az is, hogy a felsorolt tanulmányokban a két transzporter mennyiségének meghatározása különböző módszerekkel (qPCR, Western blot, immunhisztokémia), más-más agyterületekből és rágcsáló modellekből történt, mely részben magyarázhatja a különböző tanulmányokban az egymásnak ellentmondó eredményeket (Savardi és mtsai., 2021).

1.7.3. A bumetanid idegrendszeri betegségekben való alkalmazásának korlátai

A bumetanid terápiás alkalmazásának az előző fejezetben felsorolt tanulmányokban említett ígéretes hatásai mellett néhány mellékhatásával is számolni kell. A bumetanid diuretikus tulajdonsága miatt a biztonságos alkalmazása korlátozott újszülött és gyermekkorban (Ben-Ari és mtsai., 2016), főleg az olyan betegségekben, mint például az autizmus, ahol a minél korábbi életkorban elkezdett és krónikus alkalmazása lehetne hatásos (Lemonnier és mtsai., 2012; Ben-Ari és mtsai., 2016; Kharod és mtsai., 2019). A bumetanid krónikus alkalmazás mellett a diuretikus hatás következtében hipokalémiát, hipoklorémiát, metabolikus alkalózist, hiperuricémiát is kiválthat, mely végül az ionegyensúly felborulása révén a görcsaktivitásra való hajlam fokozódásához vezet (Löscher és mtsai., 2013). Továbbá, a vese disztális egyenes csatornájára ható diuretikumok hosszú távú alkalmazása akut vesebetegséghez és akut intersticiális vesegyulladásához vezethet (Savardi és mtsai., 2021). E súlyos mellékhatások elkerülése végett a jelenleg még tartó fázis III. klinikai vizsgálatokban (NCT04766177, NCT03715153, NCT03715166, 2. táblázat) az autizmus spektrumzavarban szenvedő

pácienseknek a bumetanidot a szuboptimális dózisban adagolják (Crutel és mtsai., 2021). A bumetaniddal kezelt újszülöttek esetében ototoxikus, hallást és egyensúly érzékelési zavarokat okozó hatásáról is beszámoltak, az újszülöttkori epilepszia típusok kezelését célzó klinikai vizsgálatokban ezért vonták vissza a használatát (Ben-Ari és mtsai., 2016).

A bumetanid, kémiaileg egy viszonylag erős, fiziológiás pH körülmények között magas ionizációs rátával rendelkező karboxilsav, melynek következtében magas arányban (97-98%) kötődik a vérplazma fehérjéihez, ezért a vér-agy gáton csak kis mértékben penetrál. A bumetanid a vesében és a májban viszont felhalmozódik, mely megmagyarázza a szelektív diuretikus hatását és a gyors metabolikus inaktivációját (Löscher és mtsai., 2013). A bólusz injekció formájában bejuttatott bumetanid a vér-agy gáton keresztüli kis mértékű passzív diffúziója és aktív effluxa következtében az agyi parenchimában jóval kisebb koncentrációban volt jelen, mint más szövetekben (Donovan és mtsai., 2015; Römermann és mtsai., 2017). A bumetanid aktív effluxában az Oat1-4, (organikus anion-transzporterek) és MRP4 (multidrog rezisztencia fehérjék) vesznek részt, tovább csökkentve az agyi parenchimába való eloszlását (Römermann és mtsai., 2017). A bumetanid agyi eloszlásának modellezése során a farmakokinetika és farmakodinamikai vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az idegsejteken az NKCC1 gátlásához minimálisan szükséges koncentrációt (0,1-0,3 μM) csak a 2 mg/kg dózisok adagolásával lehet elérni (Puskarjov és mtsai., 2014). A diuretikus hatása miatt a bumetanidot szájon át vagy parenterális úton ennél jóval alacsonyabb dózisokban (újszülöttek, gyerekek: 0,01-0,3 mg/kg, felnőttek: 0,5-2 mg/kg) alkalmazzák a klinikai gyakorlatban, ezért a különböző KIR-t érintő kórfolyamatokban jelentett számos kedvező hatása e tekintetben nehezen értelmezhető (Löscher és Kaila, 2022).

A diuretikus hatás elkerüléséhez az alacsonyabb dózisok alkalmazhatóságát és a vér-agy gáton keresztüli penetrációs képességének javítását számos bumetanid prodrug és analóg előállításával próbálták elérni. A bumetanid penetrációját a vér-agy gáton való átjutást követően hidrolizáló töltés nélküli (amid, észter) csoportokkal segítik elő (Savardi és mtsai., 2021; Löscher és Kaila, 2022). Az így módosított prodrugok intravénás beadása esetében például a BUM1 (pivaloyoximetil-észter) és a BUM5 (N, N-dimetilaminoetil-észter) nagyobb agyi penetrációt értek el, valamint a BUM5 egér, felnőttkori epilepszia a modellben fenobarbitállal együtt adva a bumetanidnál hatásosabbnak bizonyult (Töllner és mtsai., 2014). A bumetanid ionizáltságának csökkentéséhez a karboxil csoport

eltávolításával vagy más csoportokkal történő helyettesítésével a bumetanidnál lipofílebb származékokat állítottak elő, mint a bumepamine, az azosemide vagy az STS66 (Savardi és mtsai., 2021). Prekilinikai vizsgálatokban a bumepamine a fenobarbitál antikonvulzáns hatását serkentette az amygdala kindling (Brandt és mtsai., 2018) és az aszfixia epilepszia (Johné és mtsai., 2021) patkány modelleiben. Az STS66, melyben a karboxilcsoportot trifluoroetil-metilamino csoporttal helyettesítették, egérben hatékonyabban csökkentette a kísérletes stroke következtében kialakult infarktusz és ödéma méretét, valamint mérsékelte a neurológiai tüneteket, mint a bumetanid (Huang és mtsai., 2019a). Továbbá az STS66 az NKCC1-mediált K^+ influx gátlásával csökkentette a gliómasejtek növekedését (Luo és mtsai., 2020). Egy újabb bumetanid analóg, a BUM97 hatásosnak bizonyult önmagában és fenobarbitállal együtt is TLE és kainát-indukálta epilepszia modellekben, valamint nem okozott diurézist (Auer és mtsai., 2020).

Újabban a NKCC1-re indirekt módon, a szignalizációs útvonalon upstream ható gátlószereket is alkalmaznak a KIR-t érintő betegségekben a $[Cl^-]_i$ helyreállítását célzó terápia lehetőségeként. Például az egyik fő szabályozó kináznak, a SPAK-nak az inhibitora, a ZT-1 (5-kloro-N-(5-kloro-4-((4-klorofenil)(ciano)metil)-2-metilfenil)-2-hidroxi-benzamid) a $^{86}Rb^+$ felvétel vizsgálat alapján gátolta az NKCC1-függő ion beáramlást és serkentette a KCC2 aktivitást (De Los Heros és mtsai., 2014). Posthaemorrhagiás hydrocephalus modellben az intracerebroventrikulárisan bejuttatott ZT-1 csökkentette a plexus choroideusban a KCC1, KCC3 és KCC4 gyulladás által kiváltott foszforilációját, ezáltal csökkentette a CSF túlzott termelését (Zhang és mtsai., 2020a).

A fenti példákban látható, hogy különböző megközelítéssel törekedtek a szelektívebb, jobban penetráló és diurézist nem okozó, hatásos NKCC1 gátló molekula fejlesztésére, melyek során például a jobb penetráció és a diurézis mérséklés tekintetében jelentős előrelépéseket értek el. Habár egyes bumetanid származékok, mint például a bumepamine esetében a megfigyelt hatások NKCC1 gátlástól függetlenek, ezért a specifikusabb gátlószerek létrehozásában létfontosságú a bumetanid és az NKCC1/NKCC2 közötti kölcsönhatások minél pontosabb ismerete. Ebben nagy előrelépést jelentett, hogy a nemrégiben történt krioelektromikroszkópiás vizsgálatokból egyre pontosabb információ áll rendelkezésre az NKCC1 szerkezetéről (Yang és mtsai., 2020; Zhang és mtsai., 2021; Zhao és mtsai., 2022), amely a jövőben elősegíti a

bumetanid hatásmechanizmusának alaposabb megértését és az új gyógyszerek szerkezet alapú tervezését is.

Emellett a bumetanid-tanulmányokból levonható nem konkluzív következtetések a gátlószer hatásosságáról azt sugallják, hogy a bumetanid és analógjai sejtspecifikus hatásának meghatározása és a megfigyelt hatásokban a nem-neuronális NKCC1-et expresszáló sejtípusok, mint például a mikroglia-sejt, szerepének felderítése is létfontosságú lenne. Pozzi és mtsai. egy nemrégiben megjelent tanulmányukban az inflammatorikus útvonalak szerepét tartja közös mozgatórugónak az NKCC1/KCC2 expresszióban bekövetkező változásokban (Pozzi és mtsai., 2020), ezzel a neuronközpontú ún. neuroarcheológiai elmélettől (Ben-Ari, 2014) kissé távolodva, más perspektívába helyezve a jelenlegi ismereteket. Dolgozatom egyik célja, a KIR fő immunsejtjének, a mikroglia szerepének tisztázása az NKCC1 hatásmechanizmusában bemutatott ellentmondásokban.

2. Célkitűzések

Munkám során a következő kérdésekre kerestem választ:

1. **Hogyan hat az NKCC1 szisztémás, illetve centrális úton történő farmakológiai gátlása az agyi gyulladási folyamatokra?** Itt az ellentmondásos irodalmi adatok ismeretében hiánypótló kísérleteket végeztem. A közvetlenül az agyba juttatott NKCC1 gátló (bumetanid) hatását elsőként vettem össze a perifériásan alkalmazott (de a vér-agy gáton át nem jutó) drog hatásaival.
2. **Milyen szerepet tölt be az NKCC1 a mikroglia sejtek fiziológiai működésében?** Az NKCC1 funkcionális szerepét mikroglia esetén kondicionális egér modellben korábban nem vizsgálták. Ezért az általunk előállított mikroglialis NKCC1-deficiens egértörzs felhasználásával megvizsgáltam az NKCC1 transzporter alapvető mikroglialis funkciókban (sejtmorfológia, nyúlánymotilitás, fagocitotikus aktivitás, citokin termelés és a sejtmembrán elektromos tulajdonságai) betöltött szerepét.
3. **Milyen szerepet tölt be a mikroglialis NKCC1 az agyi gyulladási folyamatokban?** Farmakológiai NKCC1 gátlás és kondicionális mikroglialis NKCC1 deléción segítségével megvizsgáltam, hogy hogyan vesz részt a mikroglialis NKCC1 a bakteriális lipopoliszacharid által, illetve kísérletes stroke segítségével kiváltott gyulladási mechanizmusokban.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Kísérleti állatok, etikai állásfoglalás

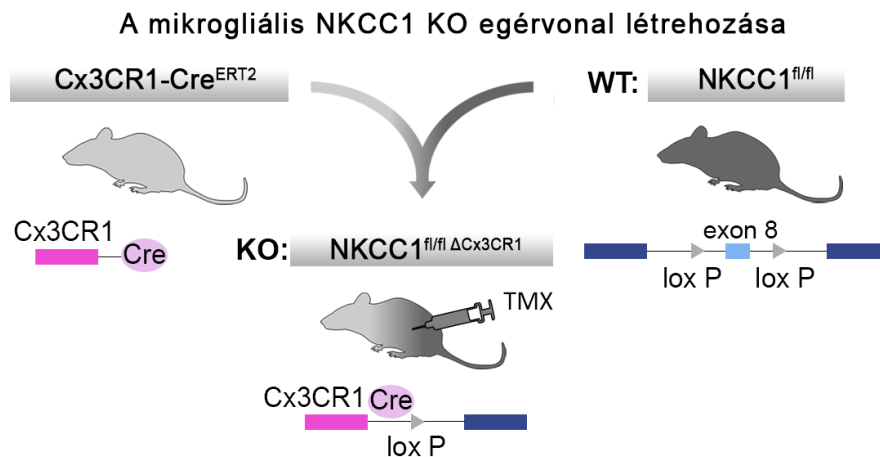
A kísérletekhez használt C57Bl/6J genetikai háttérrel rendelkező CX3CR1^{+GFP} mikroglia-riporter, NKCC1^{fl/fl} és NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 (mikroglialis NKCC1 génkiütött) és CX3CR1^{+GFP} P2Y12R^{-/-} egereket 12 órás fény/sötét ciklusban, 22±1 °C hőmérsékleten, valamint megfelelő páratartalom és *ad libitum* elérhető víz és táplálék mellett tartottuk a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) állatházában. A mikroglia sejtek izolálásához 6-8 hetes, az *ex vivo* elektrofiziológiai mérésekhez, 8-9 hetes, az *in vivo* kísérletekhez 12-15 hetes felnőtt állatokat áldoztam fel. A kísérletek kivitelezésekor minden esetben követtük a hatályos magyar és Európai Unió szabályokat és előírásokat (40/2013. (II.14) és 86/609 EEC). Az állatkísérleteket a KOKI Kutatásetikai Bizottsága, valamint a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági, Állategészségügyi, Növény-és Talajvédelmi Főosztály által jóváhagyott engedély birtokában végeztük el (PE/EA/1021- 7/2019).

3.2. Mikroglialis NKCC1 génkiütött egérvonal létrehozása

A mikroglialis NKCC1 hiányos (NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1), kondicionális mutáns transzgenikus egérvonalat munkacsoportunk állította először elő a tamoxifennel indukálható, Cre-rekombinázt expresszáló Cx3CR1-Cre^{ERT2} és NKCC1^{fl/fl} egértörzsek keresztezésével, melyekben a lox P hely az *Slc12a2* gén 7. és 10. exonja között található (8. ábra).

A Cx3CR1-Cre^{ERT2} egerek kereskedelmi forgalomban elérhetőek (B6.129P2(C)-CX3CR1tm2.1 (cre/ERT2)Jung/J mice (RRID:IMSR_JAX:020940JAX)). Az NKCC1^{fl/fl} egerek kereskedelmi forgalomban nem elérhetőek, kollaboráció keretében, Christian Hübnertől (Institut für Humangenetik, Jéna, Németország) származnak. A mikroglialis NKCC1 deléciónak eléréséhez, az anyaállattól elválasztható korú (3-4 hetes) állatok 48 órán belül kétszer ismételt intraperitoneális tamoxifen injekciót kaptak (100 μ l, 20mg/ml, kukoricaolajban oldva, #T5648, Sigma-Aldrich). Mivel a Cx3CR1 kemokin receptort a mikroglia sejteken kívül a perifériális mononukleáris fagocita sejtek is expresszálják (Yona és mtsai., 2013), ezért perifériáisan, a myeloid sejtekben esetlegesen előforduló

Cre-dependens rekombináció elkerüléséhez minden kísérletet legalább 3 héttel a második tamoxifen injekció után végeztünk el.



8. ábra: A mikroglialis NKCC1 KO egérvonal létrehozása sematikusán ábrázolva. A mikroglialis NKCC1 KO kondicionális mutáns egérvonalat az NKCC1^{fl/fl} (melyben a lox P helyek az *Slc12a2* gén 8. exonján találhatóak) és a tamoxifennel indukálható, Cre-rekombinázt expresszáló Cx3CR1-Cre^{ERT2} egértörzsek keresztezésével hoztuk létre. Cre: Cre-rekombináz, KO: mikroglialis NKCC1 KO, TMX: tamoxifen, WT: vad típus

A dolgozatban szereplő kísérletek leírásakor a kondicionális mutáns, Cre heterozigóta és NKCC1 flox homozigóta állatokat (cre/+, fl/fl) mikroglialis NKCC1 KO-ként (KO), valamint Cre-negatív és homozigóta flox (+/+, fl/fl) alomtársaikat vad típusú (WT) kontrollként említtem. A kondicionális mutáns mikroglialis NKCC1 KO állatok élet-és szaporodó képesek voltak, átlagos testmérettel rendelkeztek és sem küllemükben, sem viselkedésükben nem mutattak eltéréseket a vad típusú alomtársaiktól. Az újszülött állatok genotipizálása farokbiopsziát követően PCR-rel a következő primerek segítségével történt: 5'-GCAATTAAGTTTGGAGGTTTCCTT, 5'-CCAACAGTATGCAGACTCTC és 5'-CCAACAGTATGCAGACT; a vad típust 200 bázispárnyi, a floxot 260 bázispárnyi, a mikroglialis NKCC1 génhiányt 460 bázispárnyi hosszúságú szekvencia azonosítja.

3.3. Mikroglia sejtek izolálása és sejt kultúrák

A mikroglia sejtek izolálása Otxoa-de-Ametaga és mtsai. (Otxoa-de-Amezaga és mtsai., 2019) által leírtakat kisebb módosításokkal alkalmazva történt újszülött (P0-1, hím és nőstény), felnőtt (P40-55, hím) C57BL/6J, NKCC1^{fl/fl} (WT) vagy NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 (mikroglialis NKCC1 KO) egerekből mágneses sejtszeparációs módszerrel, anti-CD11b mikrogyöngyök segítségével (CD11b MicroBeads, #130-049-601, Miltenyi Biotec). Az állatok terminális altatását és jéghideg PBS (foszfát-pufferelt sóoldat) oldattal történő transzkardiális perfúzióját követően, az agyból kiperarált szöveteket (agykérgi területeket és hippokampuszokat) 30 percig, 37°C-on, gyengéd rázatás mellett enzimatikusan emésztettem (Neural Tissue Dissociation Kit-P, #130-092-628; Miltenyi Biotec). A felnőtt agyszövetek esetében a mielint MACS Myelin Removal Beads II segítségével (#130-096-733, Miltenyi Biotec) távolítottam el. Az így kapott egysejt-szuspenziót az anti-CD11b bevonatú mágneses gyöngyökkel (#130-093-634, Miltenyi Biotec) jelöltem 15 percig, 4°C-on, majd az inkubációs idő letelte után MS mágnesoszlopok (#130-042-201, Miltenyi Biotec) segítségével történt a CD11b pozitív sejtek szelekciója. Azokban a kísérletekben, ahol az így nyert CD11b pozitív sejtek nem kerültek azonnali felhasználásra, poli-L-lizinnel bevont felszínű 96 vagy 386 lyukú sejtenyésztő edényekbe 3×10^4 sejt/cm² sejtet ültettem ki és 37 °C-on, 5% CO₂ szint mellett szövettenyésztő inkubátorban, 10% FBS (fetal bovine serum, #FB-1090, Biosera), 1% Pen/Strep (10000 U/ml; #15140-122, ThermoFisher Scientific) és 10 nM M-CSF (makrofág kolónia-stimuláló faktor; #PMC2044, ThermoFisher Scientific) tartalmú DMEM/Glutamax (#31966-021, Gibco) tápoldatban 10 napig tenyésztettem.

3.4. Neuronális progenitor sejtek izolálása

A neuronális progenitor sejtek izolálásához 17 napos C57Bl/6J egémbriókat áldoztam fel. Az aseptikus körülmények között kiperarált hippokampuszokat 0,05% tripszin-EDTA-t (#T4549, Sigma-Aldrich) és 0,05% Dnáz I-et tartalmazó PBS oldatban inkubáltam 15 percig, 37 °C-on, majd a szűrési és centrifugálási lépések után az egysejt-szuspenziót a későbbi RNS extrakcióhoz azonnal Qiazol lízis reagensben (#79306, QIAGEN) homogenizáltam.

3.5. Anyagbeadások

3.5.1. LPS és bumetanid szisztémás beadása

Kísérleteim egy részében az NKCC1 farmakológiai gátlásának agyi citokin termelésre kifejtett hatásának vizsgálatához fiziológias sóoldattal, LPS-sel (*Escherichia coli*-ből származó lipopoliszacharid, O26:B6 szerotípus, 2 mg/kg; #L8274, Sigma-Aldrich) vagy LPS-sel és bumetaniddal (az NKCC1 inhibitora, 25 mg/kg; #3108, Tocris) intraperitoneális injekciókkal kezeltem felnőtt (90-110 napos), hím NKCC1^{fl/fl} (WT) egereket. A bumetanid injekciót kétszer ismételttem, az első kezelésre 15 perccel az intraperitoneális LPS beadás előtt, másodikkra az LPS beadás után 1 órával került sor. Az ismételt bumetanid injekcióra a bumetanid gyors felezési idejére való tekintettel a hatásos koncentráció elérése miatt volt szükség. A citokin szintek vizsgálatához és az áramlási citometriás mérésekhez az agy-, lép- és májszöveteket 24 órával a kezeléseket követően gyűjtöttem össze, fiziológias sóoldattal perfundált állatokból.

3.5.2. Intrakortikális és intraciszternális anyagbeadások

A 90-110 napos, fentanylal (0,05 mg/kg) altatott, sztereotaxisba rögzített NKCC1^{fl/fl} állatok agykérgébe (bregmától anterior-posterior -2,5 mm-re, laterálisan +1,5 mm-re, dorso-ventrálisan -0,25 mm-re) fiziológias sóoldatot, LPS-t vagy LPS-t és bumetanid-ot, míg a mikroglialisan NKCC1 hiányos (NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1, KO: cre/+, fl/fl és WT: +/+, fl/fl) állatokéba fiziológias sóoldatot vagy LPS-t injektáltam üveggapillárisal (Giles és mtsai., 2018). Az injektálás után 24 órával az egereket fiziológias sóoldattal perfundáltam, majd az injektált agykérgi régióból 0,5x0,5x0,5 cm-es blokkokat vágtam ki citokin szint meghatározásokhoz és áramlási citometriás vizsgálatokhoz. Az immunhisztokémiai vizsgálatokra szánt szöveteket az injektálás után 24 órával fiziológias sóoldattal, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal végzett transzkardiális perfúzióval fixáltam.

A mikroglialis NKCC1 hiány okozta esetleges kompenzációs mechanizmusok feltárására a mikroglia sejtek membránpotenciáljának kialakításában, ionhomeosztázisában, sejtterfogot szabályozásában és gyulladós folyamatokban szerepet játszó ioncsatornák és transzporterek expressziós szintjét RT-qPCR-rel vizsgáltuk (lásd később). Ezekben a kísérletekben a mikroglialis NKCC1 KO (NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1, KO: cre/+, fl/fl és WT: +/+, fl/fl) állatok ciszterna magna-jába injektáltam az

LPS-t (5 µg ACSF-ben oldva) üvegapillárisal, majd 24 óra elteltével sóoldattal transzkardiálisan perfundáltam az állatokat. Ezután a koponyából frissen kiemelt agyból mágneses sejtszeparációs módszerrel izoláltam a CD11b pozitív sejteket, melyekből az RNS izolálás az alább leírtak alapján történt.

3.6. *Citokin koncentrációk meghatározása*

Az injektált állatokból származó agy, lép és máj mintákból a gyulladásos citokin és kemokin szinteket a korábban leírtak szerint határoztam meg (Denes és mtsai., 2015). A szíven át történő fiziológiás sóoldatos perfúziót követően az összegyűjtött kortex darabokat (az injektált oldalról kivágott blokkok), valamint a perifériás szerveket (lép, máj) TritonX-100 és proteáz inhibitor (1:100, #539131, Calbiochem) tartalmú Tris-HCl oldatban (pH:7,4), jégen homogenizáltam, majd az inkubálási idő (30 perc) letelte után 17000 g-n, 4°C-on, 20 percig centrifugáltam. A felülúszók fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay Kit-tel (#23225, ThermoFisher Scientific) határoztam meg a gyártó utasításai szerint és a mért citokin értékeket minden esetben az összfehérje koncentrációra normalizáltam. A citokin és kemokin koncentrációkat BD Cytometric Bead Array-jel (CBA) és a következő BD CBA Flex Set-ek (G-CSF: #560152, KC: #558340, IL-1 α : #560157, IL-1 β : #560232, IL-6: #558301, TNF- α : #558299, BD, Becton, Dickinson and Company) segítségével határoztam meg BD FACSVersé fluoreszcens áramlási citométerrel (BD, Becton, Dickinson and Company). Az eredmények kiértékeléséhez az FCAP Array programot használtam (BD, Becton, Dickinson and Company).

3.7. *Az agy, lép és máj minták fluoreszcens áramlási citometriás vizsgálata*

A fluoreszcens áramlási citometriás vizsgálatokhoz az agyszövetből kollagenáz D (0,5 mg/ml, #11088866001, Roche), DNáz (10 µg/ml, #DN25, Sigma-Aldrich) és 10% FBS tartalmú DMEM (#6546, Sigma-Aldrich) oldatban emésztettem a sejteket 37 °C-on 15 percig, majd a sejtuszpenziót 40 µm pórusátmérőjű szűrőn (Corning) eresztettem át. Ezután a 40%-os Percoll oldatba felszuszpendált sejteket óvatosan 70%-os Percoll oldatra rétegeztem, majd a gradiens centrifugálást követően a 40% és 70%-os Percoll réteg interfázisáról összegyűjtöttem a mononukleáris sejteket.

A lépet és a májat homogenizáltam, majd a vörösvértesteket centrifugálással távolítottam el. Az agyból, lépből és májból izolált sejteket FACS pufferben anti-egér

CD16/32-al inkubáltam az Fc receptorok blokkolása céljából. Ezután a sejteket a 3. táblázatban megadott antitestek keverékével inkubáltam 30 percig, 4 °C-on. A nem élő sejteket propídium-jodidos jelölés segítségével zártam ki (3 µM; #P1304MP, ThermoFisher). A jelölt sejteket ezután BD FACSVersé áramlási citométerrel mértem, majd az adatokat a FACSuite program segítségével analizáltam ki. A pontos sejtszámok meghatározásához minden kóktélhoz 15 µm-es polisztirén mikrogöngyöt is adtam (#18328-5, Polysciences).

3. táblázat: Az immunsejt populációk fluoreszcens áramlási citometriás vizsgálatához használt ellenanyagok.

	Antigén	Konjugálva	Milyen állat ellen van termeltetve?	Hígítás	Katalógus szám
T-sejt kóktél	CD8a	PE	egér	1:200	#12-0081-82, eBioscience
	CD3, 17a2 klón	APC	egér	1:200	#17-0032-80, eBioScience
	CD4	FITC	egér	1:200	#11-0043-82, eBioscience
	CD45	PerCP/Cy5.5	egér	1:200	#11-0193-81, eBioScience
B-sejt/granulocita kóktél	CD-19	FITC	egér	1:200	#11-0193-81, eBioScience
	Ly-6C	PE-Cy7	egér	1:500	#25-5932-80, eBioScience
	Ly-6G	APC	egér	1:500	#127613, BioLegend
Monocita/granulocita kóktél	CD11b	FITC	egér	1:200	#11-0112-81, eBioscience
	Ly-6C	PE-Cy7	egér	1:500	#25-5932-80, eBioScience
	Ly-6G	APC	egér	1:500	#127613, BioLegend

3.8. RNS izolálás és RT-qPCR

A RT-qPCR (valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció) mérésekhez a CD11b+ mágneselesen szeparált mikroglia sejteket és az embrionális neuronális progenitor sejteket QIAzol lízis reagensben (#79306, QIAGEN) szuszpendáltam azonnal az izolálás után vagy 10 nap tenyésztést követően. Az RNS izolálás Direct-zol™ RNA Miniprep Kit-tel (#R2052, Zymo Research) történt a gyártó utasításait követve. Az RNS-minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop ND-100 (Nanodrop Technologies) spektrofotométerrel ellenőriztük. Ezt követően minden esetben standardizált mennyiségű RNS átírása történt cDNS-sé SuperScript™ II First-strand Reverse Transcriptase System (#18064014, ThermoFisher Scientific) segítségével, RNáz H inhibitor jelenlétében (#AM2682, Ambion).

Az NKCC1 és az alább felsorolt ioncsatornák és transzporterek génexpressziós szintjeit valós-idejű kvantitatív PCR segítségével QuantStudio12K Flex qPCR készüléket (Applied Biosystems) és a megfelelő TaqMan génexpressziós próbákat használva határoztuk meg. Minden esetben a ThermoFischer Scientific által forgalmazott TaqMan próbát alkalmaztunk, melyek a következők voltak: *Slc12a2* (Mm01265951_m1, exon 1-10); (Mm00436546_m1, exon 8-10, a mikroglia sepcifikus NKCC1 deléció validálására, lásd (16. ábra, A), *Hprt* (Mm03024075_m1), *Slc12a6* (Mm01334052_m1), *Slc8a1* (Mm01232254_m1), *Slc9a1* (Mm00444270_m1), *Cln3* (Mm01348786_m1), *Clic1* (Mm00446336_m1), *Kcnk6* (Mm01176312_g1), *Kcnj2* (Mm00434616_m1), *Kcna3* (Mm00434599_s1), *Lrrc8d* (Mm01207167_m1), *Sgk1* (Mm00441380_m1), *NLRP3* (Mm00840904_m1), *pro-IL-1 β* (Mm00434228_m1). Az amplifikáció 95 °C-on, 10 percig, majd ezt követően negyven ciklus 95 °C-on, 10 percig és 60 °C-on 1 percig történt. A relatív mRNS expressziós változásokat komparatív Ct módszerrel számoltuk, a dolgozatban szereplő értékek minden transzkriptum esetében a *Hprt* (hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz) referencia génre vonatkoztatva értendőek. Az RNS izolálást és a RT-qPCR méréseket Ahmad Alathsan végezte (Debreceni Egyetem), a minták előállítását és az adatok elemzését magam végeztem el.

3.9. *A mikroglialis nyúlványozgás dinamikájának meghatározása in vivo két-foton mikroszkópiával*

A CX3CR1^{+/GFP} mikroglia riporter egereket testsúlyukra vonatkoztatott mennyiségű fentanylal altattuk el, melyről tudjuk, hogy nem befolyásolja a mikroglia nyúlványok motilitását (Cserép és mtsai., 2020). A kraniális ablak műtétet minden állatban a bal agyfélteke szomatoszenzoros kérgi területén a bregmától lateralisán 1,5 mm-re, és 1 mm-re posterior irányban, az itt röviden leírtak szerint végeztük el. A koponyacsont eltávolítása után egy 3 mm és egy 5 mm méretű dupla fedőlemezt Vetbond (3M) szövetragasztóval a dura materhez rögzítettünk, majd ehhez fogorvosi cementtel egy egyedi-tervezésű fém fejbefogót (Femtonics Ltd., Budapest, Magyarország) a koponyához ragasztottunk. A méréseket Chameleon Discovery (Coherent, Santa Clara, USA) lézerekkel és Nikon 18X víz immerziós objektívvel felszerelt Femto2D-DualScanhead (Femtonics Ltd., Budapest, Magyarország) mikroszkóppal végeztük el. A méréshez MATLAB alapú MES szoftvert (Femtonics Ltd.) használtunk. A galvano motoros tükrökkel történő pásztázással percenként 8 képből álló z-stack-eket vettünk fel (500x500 pixel, 0,65 µm/pixel pixelméret, 3 µm-es rétegvastagság, a piális felszíntől 100-125 µm mélységben). Az így készült két-foton time lapse felvételeket a MES programból való exportálás után FIJI pluginek segítségével analizáltam.

A mikroglia nyúlványok alap motilitási sebességének (a ciszterna magnába injektált bumetanid kezelés előtti illetve utáni) meghatározásához a mozgási korrekciót végeztünk, majd minden állat esetében ugyanabból a rétegből származó felvételeken olyan nyúlványokat követtem nyomon a FIJI Manual Tracking pluginja segítségével, melyeknek végződése legalább 10 percig jól kivehető volt.

Annak meghatározására, hogy az agyszövetben bekövetkező sérülés hatására hogyan változik meg a mikroglia nyúlványok motilitása (a ciszterna magnába injektált bumetanid kezelés előtti illetve utáni), lézer nyaláb segítségével fokális sérülést hoztunk létre a kortexben. A fokális léziót 1000 ms időtartamú, 1040 nm hullámhosszúságú, 300 mW teljesítményű lézer megvilágítással hoztuk létre, mely a fókuszponttól számítva körülbelül 7,5-12,5 µm sugarú területet érintett. A mérés során a sértés előtti, alap nyúlvány motilitást 30 percig monitoroztuk, majd a nyúlványoknak a sérülés irányába történő toborzódásáról 45 percig készítettünk felvételt. Ezután 15 perccel az inraciszternális bumetanid beadást (0,3 mg/testsúly kg 5 µl térfogatban) követően

ugyanabban az állatban az előző sértéstől 200-300 μm -rel távolabbi kortikális területen megismételtük a folyamatot.

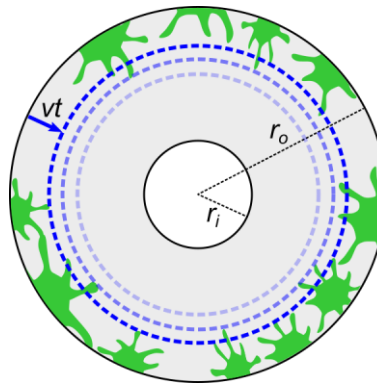
Egy Davalos és munkatársai által kidolgozott eljárás ötletét alapul véve (Davalos és mtsai., 2005) egy automatizált képfeldolgozó eljárást hoztunk létre a CellProfiler (McQuin és mtsai., 2018) alkalmazásban, amely a bemenetére adott képsorozatban meghatározza a mikroglia sejtek által lefedett terület arányának időbeli változását. A felvételeken két koncentrikus kört jelöltünk ki úgy, hogy a nagyobb átmérőjű kör a lézió egészét tartalmazza, a lézersugár fókusza pedig a kisebb átmérőjű körbe essen. A két kör átmérője minden adatsor esetén egyező volt, a középpontjuk helyzetét azonban a lézer fókuszpontja alapján határoztuk meg. A körök átmérőit tapasztalati úton 25 μm -nek és 130 μm -nek választottuk. A mérés során csak azokat a képpontokat vettük figyelembe egy adott felvételen, amelyek a nagyobb körön belül helyezkedtek el, kizártuk azonban a kisebb körön belüli képpontokat, mivel ezek gyakran csak a lézióképzési eljárás eredményeként előálló autofluoreszcens műterméket ábrázolták, amelyeket tévesen sejtekként azonosítana a szoftver. A képen látható sejtek detektálásához az eljárás első lépésben egy intenzitás alapú küszöbértéket választ, majd a küszöbintenzitásnál világosabb részleteket sejtekként, egyébként háttérként jelöli. Tapasztalati úton a képenkénti medián intenzitásérték bizonyult megfelelő választásnak a küszöbértékre. Ezt követően az eljárás meghatározza az ún. lefedettségi értéket (C), amely a sejtekként azonosított részek képpontban mért összterületének aránya a régió teljes területéhez viszonyítva. A lefedettségi értékek az alapállapotú fázisok során stabil értéket mutattak, a mérésből adódó zaj elhanyagolható volt minden képsorozat esetén.

A rögzített adatok alapján egy egyszerű modellt dolgozunk ki a lefedettségi érték időbeli változásának leírására. A modell az alábbi feltételezésekkel él: C az alapállapotú értékről a lézióképzést követően gyorsan csökken, és elér egy minimális Q_{\min} értéket a t_s időpontban. Ekkor a mikrogliasejtek nyúlványai a régió pereme felől egyenletes v sebességgel a lézió fókuszának irányába kezdenek megnyúlni. Ez a kijelölt régió belül a lefedettségi érték növekedését okozza, végül a belső régió elérésekor a lefedettség Q_{\max} értéken szaturálódik. A modell az alábbi egyenlettel írható le (1. egyenlet):

$$C(t) = (Q_{max} - Q_{min}) \frac{r_o^2 - (r_o - v(t - t_s))^2}{r_o^2 - r_i^2} + Q_{min}$$

1. egyenlet: A modellt leíró egyenlet.

Az egyenletben r_i és r_o jelölik a koncentrikus körök által definiált gyűrű alakú régió belső és külső sugarait (1. egyenlet és 9. ábra). Az egyenletben szereplő paramétereket részben az adott képsorozat felvételeinek kiértékelésével (Q_{min} , r_i és r_o), részben becsléssel határoztuk meg. A paraméterbecslés (illesztés) során olyan v , t_s és Q_{max} értékeket választottunk (1. egyenlet, 9. ábra), amelyek minimalizálják a képsorozat feldolgozásával kapott tapasztalati lefedettségi görbe, valamint a modell által jósolt lefedettségi görbe adatpontjai közötti átlagos négyzetes hibát. A paraméterek becsléséhez rácsalapú optimalizáló eljárást (grid search) alkalmaztunk.



9. ábra: A mikroglia sejtek sérülés utáni nyúlványtoborzódásának sebességét leíró matematikai modell sematikus vázlata. r_i : belső sugár, r_o : külső sugár, v_t : a nyúlvány kinyúlás sebessége.

A rendelkezésre álló képsorozatok feldolgozását követően megállapítottam, hogy a modell minden adatsor esetén megfelelően illeszthető volt, a paraméterbecsléssel kapott v érték (amely a mikroglia sejtek nyúlványainak motilitásával hozható összefüggésbe) pedig jó kvantitatív egyezést mutatott a manuális kiértékeléssel kapott processzus-mozgékonyosság eredményeivel.

Az *in vivo* két-foton mikroszkópiás mérésekhez a kraniális ablak műtéteket és a mérést Fekete Rebeka végezte, az akut sérülés utáni nyúlványmotilitás jellemzéséhez a matematikai modell pipeline-ját CellProfiler környezethez Kiss Dániel írta. Mind a két-foton mérésekben, mint a matematika modell optimalizálásában teljes mértékben részt vettem.

3.10. Elektrofiziológia

3.10.1. Hippokampális akut szeletek

A hipokampális akut szeletek készítéséhez izofluránnal altatott, 56-65 napos hím $NKCC1^{fl/fl} \Delta Cx3CR1$ egereket dekapituláltunk, majd a koponyából eltávolított agyakat jéghideg, karbogenizált (95% O₂, 5% CO₂) vágó oldatba tettük. A vágó oldat 205 mM szukrózt, 2,5 mM KCl-t, 26 mM NaHCO₃-t, 0,5 mM CaCl₂-t, 5 mM MgCl₂-t, 1,25 mM NaH₂PO₄, 10 mM glükózt tartalmazott. Az agy hipokampális régiójából vibratóm segítségével 250 µm vastagságú horizontális szeleteket készítettünk. Ezt követően a szeleteket karbogenizált ACSF (126 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1,25 mM NaH₂PO₄, 10 mM glükóz) oldattal feltöltött inkubációs kamrában tároltuk kezdetben 35 °C-on, majd fokozatosan szobahőmérsékletűre hűtöttük. A mikroglia sejtek könnyebb azonosításához, fluoreszcens jelölést alkalmaztunk, mely során az inkubáció kezdetén 25 µM/ml Alexa 594-gyel konjugált izolektin B4-et (I21413, ThermoFisher) tartalmazó ACSF oldatban (15 ml/szelet) 1 órán át, sötétben inkubáltuk a szeleteket. Minden mérés a szeletek elkészítésétől számított 4 órán belül történt meg.

3.10.2. Perforált patch-clamp

A legalább 1 óra inkubáció elteltével a szeleteket egyenként, alámerülő-típusú mérőkamrába helyeztük, melyben a karbogenizált ACSF-t állandó, 3-3,5 ml/min sebességgel perisztaltikus pumpa áramoltatta, a mérések szobahőmérsékleten történtek. A normotóniás körülményeket a 305 mOsm ozmolalitású, a hipotóniás közeget a 50%-osra hígított normotóniás karbogenizált ACSF oldattal biztosítottuk. A perforált patch eljárás során a membránt kationokra gramicidin tartalmú pipettaoldat használatával tettük átjárhatóvá. Minden méréshez frissen húzott boroszilikát üvegpipettákat és frissen elkészített gramicidin oldatot (100 µg/ml) használtunk. A pipettákat a következő

összetételű gramicidint és Alexa 488 fluoreszcens festéket is tartalmazó intracelluláris oldattal töltöttük fel: 120 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 11 mM EGTA (pH 7,3), az oldat ozmolalitása 280-300 mOsm között volt. A feltöltött patch pipetta rezisztenciája 3-6 MΩ volt. Mérés minden kísérletben a szeletek felszínétől 15-20 μm mélységben található, izolektin B4 pozitív sejtekből történt. Az elektromos működés vizsgálatára a sejteket infravörös differenciál interferencia kontraszt, upright típusú mikroszkóp (BX61WI, Olympus) segítségével választottuk ki. A mérés közben az Alexa 488 jel segítségével folyamatosan monitoroztuk azt, hogy a sejtmembránon a gramicidinnel töltött patch pipettával valóban csak pórusokat sikerült-e létrehozunk, vagyis nem történt-e meg a membrán teljes átszakítása. Az értékelés során kizárásra kerültek azok a sejtek, melyekben az Alexa 488 jel intracellulárisan megjelent. Minden sejt esetében először feszültség-zár módban, -40 mV tartófeszültség mellett a membránpotenciált stabilan tartottuk. A soros ellenállás folyamatos monitorozásával határoztuk meg a perforáció létrejöttét. A sejtmembrán perforációja általában 25-30 perccel a gigaseal kialakulását követően következett be, melyet az ellenállás 50 MΩ-ról 35 MΩ-ra esése jelzett. A perforált patch clamp konfigurációt követően a nyugalmi membránpotenciált 2-5 másodpercig fenntartott 0 pA áramerősség mellett határoztuk meg. Ezt követően a feszültség impulzus sorozatra adott áramokat feszültség-zár módban rögzítettük -40 mV tartófeszültség mellett. -140 mV-60 mV közötti feszültség impulzussorozatot alkalmaztunk, 20 mV-os léptékkel, 100 ms hosszan, háromszori ismétléssel, az impulzus sorozatok között 2000 ms telt el. A térfogatváltozás következtében fellépő áramok vizsgálatához a mérést először normotóniás ACSF közegben végeztük el. Ezt követően a szeleteket 5 percig hipotóniás ACSF oldattal perfundáltuk és a mérést hipotóniás közegben is megismételtük. Az elektromos jelek erősítéséhez Multiclamp 700B (Molecular Devices) erősítőt használtunk, az adatok digitalizálásához a mintavételezés 10 kHz-en DAQ board és egy, a KOKI Agykéreg Kutatócsoportja által készített C#.NET és VB.NET alapú programkód segítségével történt (National Instruments, USB-6353). Az adatokat minden feszültség-lépés utolsó 40 ms-jából nyertük ki, mely szakasz alatt az áram válaszok egyensúlyi állapotban voltak. Az adatok elemzése Delphi és Python környezetben fejlesztett szoftver segítségével történt. A sejtek bemenő ellenállását az áramerősség-feszültség görbék -40 mV és 0 mV

feszültség lépések közötti meredekségével határoztuk meg. Az elektrofiziológiai méréseket és az adatok analízisét Berki Péter végezte.

3.11. Mikrogliasejtek automatizált morfológiai analízise

Annak meghatározására, hogy a mikroglialis NKCC1 hiány okoz-e sejtmorfológiai változásokat, mikroglíalisan NKCC1 hiányos egerekből származó 100 µm vastag koronális agyszeleteket használtunk, melyekben a mikrogliasejteket tengerimalacban termeltetett anti-Iba1 (1:500; #234004, Synaptic Systems) elsődleges ellenanyaggal és számarban termeltetett anti-tengerimalac Alexa 647 (1:500; #706-606-148, Jackson ImmunoResearch) másodlagos ellenanyaggal jelöltük, DAPI sejtmagfestés mellett. A konfokális rétegfelvételeket CFI plánapokromát VC 60x vízimmerziós objektívvel (numerikus apertúra: 1,2) rendelkező Nikon Eclipse Ti-E lézer konfokális mikroszkóppal (Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, The Netherlands) készítettük. A rétegfelvételek készítése alatt a szeletek 0.1 M foszfát pufferben (PB) voltak. A sejtek háromdimenziós morfológiai vizsgálatához a nyílt forráskódú, MATLAB alapú Microglia Morphology Quantification Tool (elérhető: <https://github.com/isdneuroimaging/mmqt>) programot használtuk. A program a mikroglia morfológiát 59 paramétert (sejttest térfogata, nyúlványok térfogata, az összes elágazási pont száma, az elágazások szöge stb., lásd Heindl és mtsai., 2018) megvizsgálva írja le. Az analízis főbb lépései a következők: a program az Iba1 és DAPI festések alapján azonosítja a mikroglia sejtek sejtmagját, sejtestét és nyúlványrendszerét, melyeket elkülönítve a háttértől 3D-s mikroglia vázat rajzol ki, majd watershed szegmentáció és szegregáció után az így felismert egyedi sejteken méri le az egyes paramétereket (Heindl és mtsai., 2018). A rétegfelvételek és automatizált analízis Pósfai Balázs segítségével készültek el, az adatok feldolgozását és a statisztikai analízist én végeztem el.

3.12. Cerebrális ischaemia kiváltása az arteria cerebri media elzárása (MCAo) segítségével

A mikroglialis NKCC1 ischaemiás agyi sérülésekben betöltött szerepének meghatározásához kísérleti úton fokális agyi ischaemiát váltottunk ki az állatok arteria

cerebri mediájának szilikonnal bevont filamenttel történő ideiglenes (45 perc) elzárásával a korábban leírtak szerint (Dénes és mtsai., 2010). A műtétet izoflurán altatás mellett végeztük (1,5% izoflurán 30% O₂ és 70% N₂O keverékében), az állatok testhőmérsékletét folyamatosan ellenőriztük és fűtőpaddal 37 ±0,5 °C-on tartottuk a beavatkozás alatt. Az okklúziók sikerességét lézer Doppler véráramlásméréssel ellenőriztük. A műtét során középen a nyak ventrális részén bemetszést ejtettünk majd a jobboldali arteria carotis communis elkülönítettük és a bal arteria carotis externán és az arteria carotis internán keresztül felvezetett filamentum segítségével zártuk el az arteria cerebri mediát. Az állatokat ezután posztoperatív megfigyelés céljából 26-28 °C hőmérsékleten tartottuk. Az MCAo okozta károsodás súlyosságának vizsgálatára pontrendszeren alapuló viselkedésteszteket (corner teszt, Bederson-féle szenzoros és motoros funkciókat vizsgáló teszt) végeztünk a 24 órás reperfüzió után (Bederson és mtsai., 1986; Iadecola és mtsai., 1997; Schaar és mtsai., 2010). A funkcióvesztés mértékét komplex, neurológiai funkciókat figyelembe vevő pontrendszerrel állapítottuk meg és a tesztek eredményét összegezve egy kompozit pontszámot adtunk meg, amely leírja az állat neurológiai állapotát (Orsini és mtsai., 2012). A kompozit pontszám 0 (egészséges egér) és 56 (a legsúlyosabb kimenetel) közötti lehet és a következő részpontokból adódik össze: szörzet állapota (0-2), fülek (0-2), szemek (0-2), testtartás (0-4), spontán aktivitás (0-4), epileptikus aktivitásra jellemző viselkedés (0-12), test szimmetria (0-4), mászás 45°-os felületen (0-4), körözés (0-4), mellső végtag szimmetria (0-4), kényszeres körözés (0-4), bajuszteszt (0-4).

Az arteria cerebri media elzárása következtében a vérellátásból kiesett agyterület méretét (infarktus méret) és az ödéma nagyságát a beavatkozást követően 24 órát túlélt állatok agyának koronális metszetein krezil-ibolya festés segítségével határoztam meg, 4% paraformaldehidet tartalmazó fixálószerrel való perfúziót követően (McColl és mtsai., 2007). Az infarktus méretét minden agyból 8, neuroanatómiailag meghatározott koronális metszeten (a bregmától rostrálisan +2 mm és kaudálisan -4 mm közé eső szeletek) lemértem, majd a mért értékeket az ödéma méretére korrigálva adtam meg. Az MCAo műtéteket Lénárt Nikolett hajtotta végre, a krezil-ibolya festést és az infarktus méret meghatározását magam végeztem el.

3.13. Immunhisztokémia

3.13.1. Az NKCC1 mikroglialis jelenlétének immunhisztokémiai kimutatása

A ketamin-xilazin keverékével (100 mg/kg-10 mg/kg) történő terminális altatás után az állatokat 0,9% NaCl-ot tartalmazó sóoldattal 1 percig, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M-os PB oldattal 40 percig, majd a fixálószer kimosása céljából 0,1 M-os PB-vel 10 percig transzkardiálisan perfundáltuk. Ezt követően vibratóm segítségével (VT1200S, Leica) a primer szenzoros kérget és a dorsalis hippokampuszt magukba foglaló 50 μ m vastagságú koronális szeleteket készítettünk. A szeleteket 0,1 M-os PB-ben történő mosást követően 3 órán keresztül 10% szukrózt, majd 12 órán keresztül 30% szukrózt tartalmazó 0,1 M-os PB-ben inkubáltuk. Az immunhisztokémiai jelölést szabadon úszó szeleteken végeztük el. Az NKCC1^{fl/fl} (WT), NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 (mikroglialis NKCC1 KO) és NKCC1^{-/-} (teljes NKCC1 KO) állatokból származó agyszeleteket egyedi mintájú bevágás után együtt jelölték, hogy teljesen egyforma kísérleti körülményeket biztosítsunk. A szeleteket tris-pufferelt fiziológiai sóoldatban (TBS) mosást követően Mouse-on-Mouse oldatban (MOM blokkoló, #BMK-2202, Vectorlabs) blokkoltuk 1 órán át, majd 2x5 percig TBS-ben, illetve 2x5 percig a MOM blokkoló oldószerében mostuk. Azért, hogy az aspecifikus immunoglobulin kötődés valószínűségét csökkentjük, az NKCC1^{fl/fl} állatokból származó agyszeleteket kihígított anti-NKCC1 primer antitesttel (nyúlban termeltetett anti-NKCC1: 1:4000, #13884-1-AP, Proteintech, egérben termeltetett anti-NKCC1: 1:2000, MOM-hígítóban hígítva; DSHB) 48 órán keresztül, 4 °C-on, gyengéd rázatás mellett előinkubáltuk. Ezután az NKCC1^{fl/fl} szeleteket eltávolítottuk és anti-Iba1 ellenanyag hozzáadását követően 1:1000 végső koncentrációra hígítottuk ki az NKCC1 elleni antitesteket, majd ezzel a primer antitest keverékkel további 48 óra hosszan, 4 °C-on, gyengéd rázatás mellett inkubáltuk a mintákat. Az inkubációs idő letelte után TBS-sel (4x15 perc) a nem kötődő elsődleges ellenanyagokat kimostuk a szeletekből és 24 órán keresztül a szeleteket a megfelelő másodlagos ellenanyagokat tartalmazó keverékbe áztattuk (anti-egér Alexa 647, 1:1000, #715-605-150; anti-nyúl Alexa 488, 1:1000, #711-546-152; anti-tengerimalac Alexa 594, 1:1000, #706-586-148; Jackson ImmunoResearch; mindegyik számarban termeltetett, a végső koncentráció eléréséhez TBS-ben hígítva). TBS, majd 0,1 M PB mosást követően a szeleteket DAPI-val jelöltük, majd a tárgylemezeken Aquamount (#18606-5,

Polysciences) oldat segítségével rögzítettük. Az immunfluoreszcens jel vizsgálatához CFI Plan APOCHROMAT VC 60X olaj immerziós objektívvel felszerelt (numerikus apertúra: 1,4), A1R konfokális lézer-rendszerű, Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkópot (Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, The Netherlands) használtunk. A gerjesztéshez 405, 488, 561 és 647 nm hullámhosszúságú lézereket használtunk (CVI Melles Griot), a konfokális pásztázás soronkénti csatornaváltással történt. Az ND2 formátumú felvételekből csatornánként exportáltuk a képeket, melyeken az Iba1 jelölés alapján körberajzoltuk a mikroglia sejteket és az NKCC1 fluoreszcencia szintjét az így kapott ROI-kon belüli intergált denzitásként adtuk meg. A konfokális felvételeket Szabadits Eszter készítette, az immunfluoreszcens festéseket és az analízist Szabadits Eszterrel közösen végeztem.

3.13.2. *Az ischaemiás és az LPS-injektált szövetek immunhisztokémiai vizsgálata*

Ketamin-xilazin keverékkel történő terminális altatás után az állatokat 0,9% NaCl-ot tartalmazó sóoldattal, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal transzkardiálisan perfundáltam. Krioprotekció céljából a fixált agyakat a metszés előtt 10% szukrózt tartalmazó 4%-os PFA oldatban inkubáltam egy éjszakán át, majd további 2 órás 10% szukrózt tartalmazó PBS inkubálást követően 25 µm vastagságú metszeteket készítettem, szánkamikrotóm segítségével.

Az immunfluoreszcens jelöléshez az MCAo-n átesett NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 állatokból származó szabadon úszó szeleteket először 5% normál szamár szérumot tartalmazó TBS-ben blokkoltam, majd egy éjszakán át, 4°C-on a következő elsődleges ellenanyagokkal inkubáltam: kecskében termeltetett anti-IL-1β/ILF2 (1:250; #AF-401-NA, R&D Systems), patkányban termeltetett anti-CD45 (1:250; #MCA1388, AbD Serotec), nyúlban termeltetett anti-P2Y12R (1:500; #55043AS, AnaSpec). A TBS mosást követően a szeleteket 4 órán át, szobahőmérsékleten, gyengéden rázatva szamárban termeltetett anti-kecske CF568 (1:1000; #20106, Biotium), anti-nyúl Alexa 647 (1:1000; #711-605-152, Jackson ImmunoResearch), anti-patkány Alexa 488 (1:1000; #712-546-153, Jackson ImmunoResearch) másodlagos ellenanyagok oldatával kezeltem. Végül 3x10 perc TBS-es mosást követően a tárgylemezekre felhúzott szeleteket Fluoromount-G-vel fedtem le (#0100-01, SouthernBiotech). A dolgozatban szereplő reprezentatív képek Plan Apo VC 20x objektívvel (numerikus apertúra: 0,75) A1R konfokális lézer-rendszerű, Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkóppal készültek. A kvantitatív analízist Nikon Eclipse Ti-E

inverz mikroszkóppal 20x Nikon CFI Plan objektívvel (numerikus apertúra: 0,4), widefield megvilágítással készített képeken végeztem el. A kvantitatív elemzés során az IL-1 α és IL-1 β pozitív sejteket a penumbális régióban, a P2Y12R pozitív és a CD45 pozitív sejteket a teljes cortex területén minden állatból az anatómiailag megfelelő agyterületekből származó 3-3 koronális szeletben számláltam meg.

Az MCAo-n átesett állatok agyszövetei esetében a GFAP és az AQP4 jelölésekhez a következő ellenanyagokat használtam: csirkében termeltetett anti-GFAP, tengerimalacban termeltetett anti-AQP4 elsődleges, valamint számarban termeltetett anti-csirke A594 (1:500, #703-586-155, Jackson ImmunoResearch) és anti-tengerimalac A647 (1:500, #706-606-148, Jackson ImmunoResearch). A kvantitatív analízishez fluoreszcens tárgylemez szkennelővel, 20x Plan-Apochromat objektívvel (Panoramic MIDI 3D HISTECH) nagy felbontású képeket készítettem a szeletek teljes területéről. Minden szelet esetében a striatum területén kijelölt ROI-kban a GFAP és az AQP4 jel integrált denzitását mértem le, melyből az állatonként számolt átlagértékeket használtam fel a statisztikai elemzéshez.

Az LPS-injektált állatokból származó vibratómmal készített 100 μ m vastag szabadon úszó agyszeleteket 5% normál szamár szérumot tartalmazó TBS-ben blokkoltam, majd patkányban termeltetett anti-egér CD68 (1:250, #NCL-L-CD68, Leica) és számarban termeltetett anti-kecske Iba1 (1:200, #NB100-1028, Novusbio) elsődleges ellenanyagok TBS-ben kihígított oldatában inkubáltam. A TBS-sel történő mosási lépéseket követően a megfelelő másodlagos ellenanyagokkal szobahőmérsékleten, gyengéd ráztatás mellett 4 órán keresztül inkubáltam a szeleteket, majd újabb TBS-sel történő mosást követően a tárgylemezre húzott szeleteket Fluoromount G-vel fedtem le. A kvantitatív analízishez a szeletekről 1 μ m-es lépésközökkel 15 μ m rétegvastagságú felvételeket készítettem CFI Plan Apochromat VC 60X olaj immerziós objektívvel felszerelt A1R konfokális lézer-rendszerű, Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkóppal. A konfokális rétegfelvételeken a Iba1 pozitív mikrogliasejteken belül található CD68 fluoreszcens jel integrált denzitását automatizált módon, CellProfiler szoftver segítségével határoztam meg.

3.14. Az adatok statisztikai elemzése

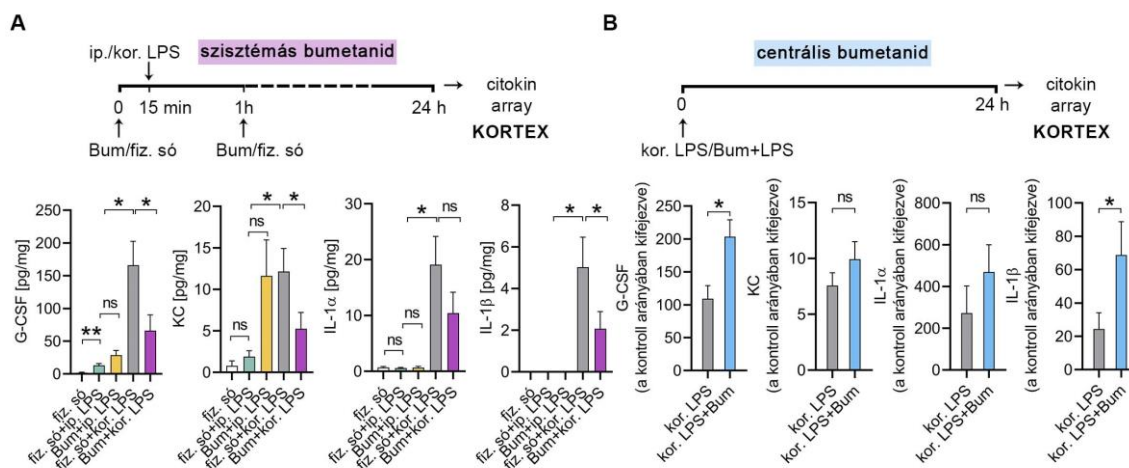
A kvantitatív mérések minden esetben véletlenszerűen kiválasztott mintákon történtek és az adatok típusától, valamint a populációk eloszlásától függően a megfelelő statisztikai próbákat alkalmaztam. Az adatok normalitásvizsgálata Shapiro-Wilk teszttel történt. Két független csoportból származó adatsor összehasonlítása kétmintás t-teszttel vagy Mann-Whitney U-teszttel, három vagy annál több független mintasor esetében egyutas ANOVA tesztet követő Tukey-féle vagy a Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn-féle *post hoc* teszttel történt. Az ábrázolt adatok minden esetben az $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ értéket jelölik, a $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 8.2 szoftverrel végeztem (GraphPad Software, San Diego, California USA).

Az értekezésben közölt eredmények, úgymint a kísérletek előkészítése és megtervezése, a módszerek kidolgozása, az *in vitro* kísérletek, az *in vivo* kezelések, az állatok perfúziója, az immunhisztokémiai festések, a fluoreszcens áramlási citometriás mérések, a konfokális mikroszkópos képalkotás és az adatok kiértékelése a témavezetőim szakmai irányítása mellett, önállóan elvégzett munka eredményeként jöttek létre. A dolgozatban felsorolt azon módszerek esetében, amelyek kivitelezésében kutatócsoportunkon kívüli vagy laboratóriumunkon belüli segítséget kaptam, az adott módszer leírásánál megjelöltem kollégáim szerepét.

4. Eredmények

4.1. Az NKCC1 farmakológiai gátlásának hatása az agyi citokin termelésre

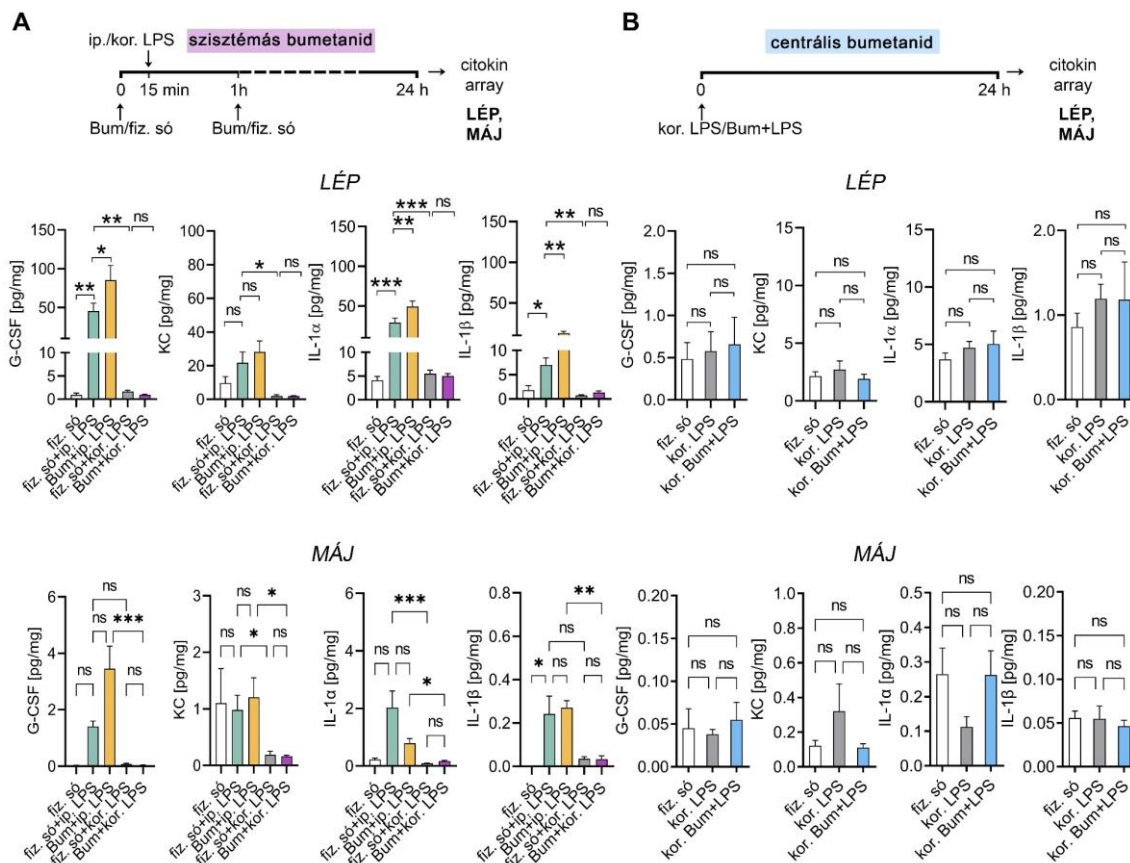
Annak vizsgálatára, hogy az NKCC1 *szisztémás* úton történő farmakológiai gátlása, befolyásolja-e az agyi gyulladós reakciókat, intraperitoneális bumetanid (ip., 2 mg/kg) injekciókkal kezeltük az egereket, melyekben intrakortikálisan vagy intraperitoneálisan (a bumetanid beadást követően 15 perccel) injektált bakteriális lipopoliszachariddal (LPS) váltottunk ki gyulladást (a kísérleti felállást lásd még 10. ábra, A és 11. ábra, A idővonalán, illetve az *Anyagok és Módszerek* 3.5. fejezetében). Kísérleteinkben 24 óra elteltével követtük nyomon a gyulladós citokinek és kemokinek szintjét az agyban (10. ábra, A), illetve a lépben és a májban és (11. ábra, A). Az LPS intraperitoneális beadása esetében a tipikus akut fázis reakció során fellépő citokin/kemokin választ (Giles és mtsai., 2015) láttuk a vizsgált perifériás szervekben (a lépben és a májban egyaránt), vagyis mind a G-CSF (granulocita kolónia-stimuláló faktor), a KC (keratinocita kemoattraktáns), az IL-1 α és IL-1 β szintje megnövekedett (11. ábra, A, fehér vs. zöld oszlopok). Az agyban a citokinek és kemokinek alapvetően alacsony szintjét a perifériás LPS adás nem befolyásolta számottevően (10. ábra, A) és ehhez képest az ip bumetanid kezelés sem okozott változást (10. ábra, A, zöld vs. sárga oszlopok). Ezzel szemben, a közvetlenül a kortexbe injektált LPS nagy mennyiségű gyulladós citokin/kemokin felszabadulást eredményezett az agyban (10. ábra, A, zöld vs. szürke oszlopok), mely az ip. bumetanid kezelés hatására jelentősen mérséklődött (10. ábra, A, szürke vs. lila oszlopok). Az agyból származó mintákban a G-CSF 39,8%-ra, KC 43%-ra, IL-1 α 54,6%-ra, IL-1 β 41%-ra csökkent (10. ábra, A, szürke vs. lila oszlopok). Azonban ezzel egyidejűleg a perifériás szervekben nem változott a gyulladás mértéke az NKCC1 szisztémás gátlásának hatására (11. ábra, A, szürke vs. lila oszlopok).



10. ábra: Az NKCC1 farmakológiai gátlásának hatása az agyi citokín termelésre. A: A kortikális LPS beadás hatására jelentősen megnövekedett a G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , KC termelés az agyban, míg az ip. LPS injekció esetében mindezek csak alacsony koncentrációban voltak jelen (zöld vs. szürke oszlopok). Az intrakortikális LPS-indukálta citokintermelést az agyban az ip. bumetanid kezelés csökkentette. (szürke vs. lila oszlopok; egyutas ANOVA-t követően Tukey-féle *post hoc* teszt; * $p < 0,05$; N=6 állat/csoport, átlag \pm SEM) **B:** A centrális, intrakortikális bumetanid kezeléssel történő NKCC1 gátlás mellett az intrakortikális LPS injekcióval kiváltott agyi G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , KC termelés megnövekedett (Kétmintás t-próba; * $p < 0,05$; N=9 állat/csoport, átlag \pm SEM; Az oszlopdiagramok két független kísérletből összevont adatokat mutatják. Az oszlopok a kontrollként szolgáló fiziológiás sóoldattal történt injektálás során kapott citokín koncentráció arányában kifejezett értékeket jelölik.). Rövidítések: Bum: bumetanid, G-CSF: granulocita kolónia-stimuláló faktor, KC: keratinocita kemoattraktáns, IL-1 α : interleukin-1 α , IL-1 β : interleukin-1 β , fiz. só: fiziológiás sóoldat, ip: intraperitoneális, kor.: intrakortikális, LPS: lipopoliszacharid, ns: nem szignifikáns

A következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy hogyan hat a *centrális* NKCC1 gátlás az LPS-indukálta agyi citokín-, és kemokintermelésre, ezért az egerek agyába egyidejűleg LPS és bumetanid keverékét injektáltuk (10. ábra, B és 11. ábra, B). Az agykéregbe beadott LPS hatására a vártan megfelelően 20-50-szeres növekedés volt kimutatható a citokín és kemokín szintekben a kontrollként szolgáló fiziológiás sóoldat

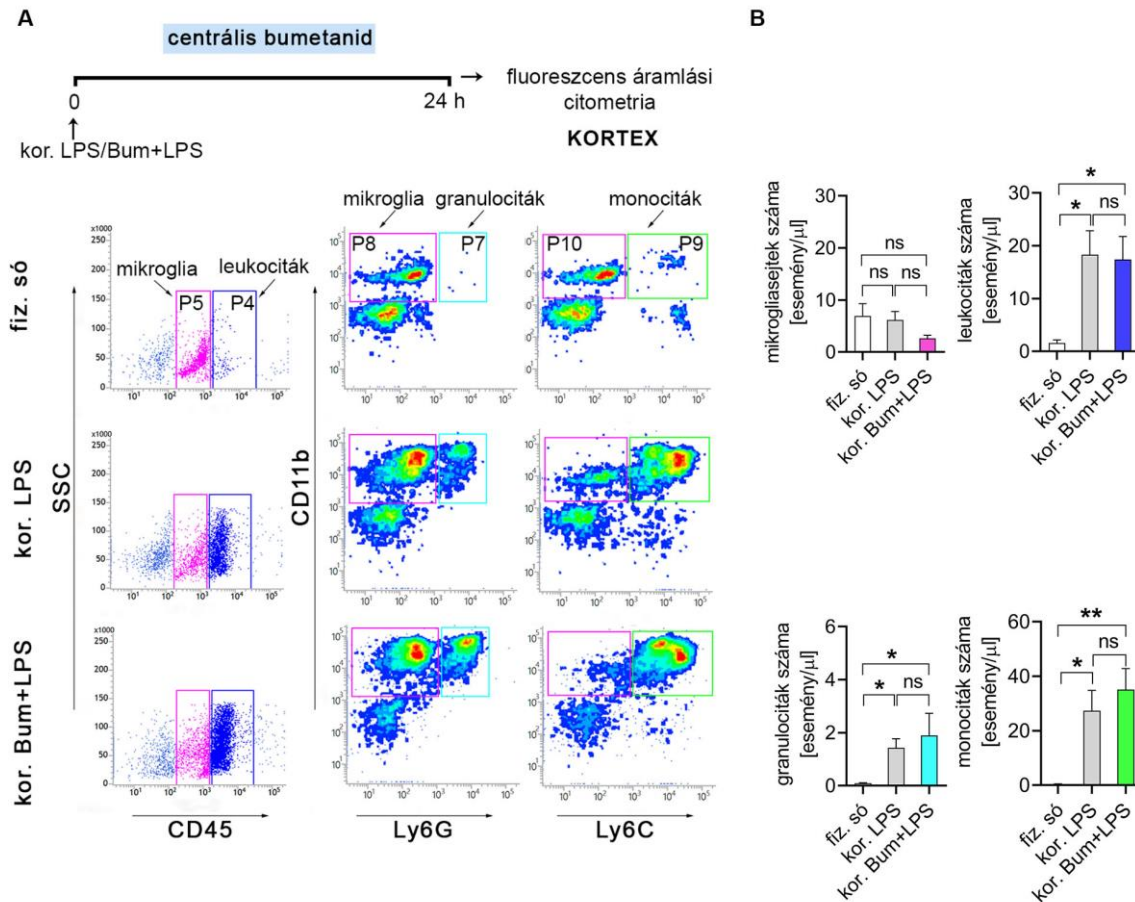
beadás mellett mértékhez képest (az ábrán nincs bemutatva; az oszlopdiagramok a fízioiógias sóoldat által kiváltott, nagyon alacsony, a mérési határt megközelítő citokín szintekhez viszonyítva értendők). A kortexbe beadott bumetanid tovább növelte az LPS-által kiváltott G-CSF (86,1%-kal), KC (31,2%-kal), IL-1 β (82,5%-kal) és IL-1 α (72,4%-kal) termelést (10. ábra, B; a százalékban megadott emelkedések a szürke oszlopokkal jelölt kortikális LPS szintekhez képest értendők). A perifériás szervek citokín termelésére az intrakortikális bumetanid kezelés nem volt hatással (11. ábra, B). Vagyis az NKCC1 szisztémás és centrális gátlása ellentétes hatást gyakorol az LPS-indukálta agyi citokín termelésre, ezáltal a gyulladás mértékére.



11. ábra: A szisztémás vs. a centrális NKCC1 gátlás hatása az LPS által kiváltott citokínválaszokra a perifériás szervekben. A: Az intraperitoneális (ip.) bumetanid kezelés tovább növelte az ip. LPS által kiváltott G-CSF és IL-1 β termelést a lépben és a májban (zöld vs. sárga oszlopok), míg az intrakortikális LPS sem önmagában, sem bumetanid kezeléssel együtt nem okozott jelentős változást a

perifériás citokintermelésben (szürke vs. lila oszlopok). **B:** Az intrakortikális (kor.) LPS kezelés nem volt hatással a lép és a máj citokin termelésére és az intrakortikálisan beadott bumetanid sem befolyásolta a perifériás szervek citokin termelését. (Egyutas ANOVA-t követően Tukey-féle *post hoc* teszt; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; A: N=6 állat/csoport; B: N=9 állat/csoport, átlag \pm SEM). Rövidítések: Bum: bumetanid, G-CSF: granulocita kolónia-stimuláló faktor, KC: keratinocita kemoattraktáns, IL-1 α : interleukin-1 α , IL-1 β : interleukin-1 β , fiz. só: fiziológias sóoldat, ip: intraperitoneális, kor.: intrakortikális, LPS: lipopoliszacharid, ns: nem szignifikáns

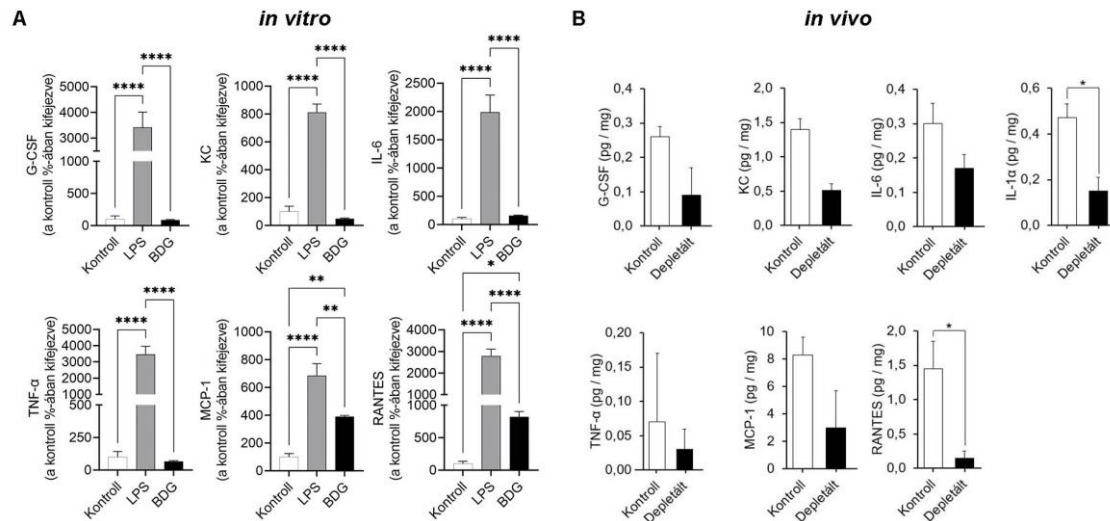
Annak vizsgálatára, hogy a centrális bumetanid beadás mellett megfigyelt megnövekedett citokin termelést vajon a fokozott leukocita toborzódás okozhatta-e, T-sejt, B-sejt/granulocita valamint monocita/granulocita markerekkel jelöltük a sejteket és a populációk elkülönítésére fluoreszcens áramlási citometriás módszert alkalmaztunk (lásd még 3. táblázat). Az LPS-sel injektált agymintákban megnövekedett az infiltrálódó CD45^{high} (CD45 markert nagy mennyiségben expresszáló) leukociták száma, melyek egy részét a CD11b⁺, Ly6G^{high} granulociták (12. ábra, A, P7 kapu), egy másik populációt pedig a CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C^{high} monociták alkották (12. ábra, A, P9 kapu). Az intrakortikális bumetanid kezelés hatására azonban az infiltrálódó leukociták számában sem a sejtpopulációk összetételében nem történt változás (12. ábra). Ezzel egyidejűleg a CD45^{int} (CD45-öt közepesen expresszáló) és CD11b⁺ mikroglia sejtek száma sem változott meg bumetanid hatására az intrakortikálisan LPS-sel kezelt mintákhoz képest (12. ábra). Mindez azt sugallja, hogy a centrális bumetanid kezelés esetében az LPS-indukálta agyi citokin termelésen felüli szinteket nem az agyszövetbe infiltrálódó gyulladáshoz vezető sejtpopulációk vagy a mikroglia sejtek számának emelkedése okozta. Ez utóbbit a kísérlet rövid (24 h) időtartama sem valószínűsítette.



12. ábra: Az NKCC1 centrális farmakológiai gátlásának hatása az agyszöveti gyulladásosejtpopulációkra. A-B: Az áramlási citometriás mérés denzitás képei (density plot, balra) és felhőképei (dot plot, jobbra) (A) valamint az oszlopgrafikonok (B) a mikroglia számot (lásd a P5 kapuval jelölt CD45^{int} sejtpopulációt) és a leukocita populációk méretét mutatják intrakortikális fiziológiás sóoldat, LPS vagy LPS+Bum kezelések esetén. Mikroglia/P5 kapu: CD45^{int} sejtpopuláció, leukociták/P4 kapu: CD45^{high} sejtpopuláció, granulociták/P7 kapu: CD11b⁺, Ly6G^{high} sejtpopuláció, monociták/P9 kapu: CD11b⁺, Ly6C^{high} sejtpopuláció. A statisztikai szignifikanciaszintet egyutas ANOVA-t követő Tukey-féle *post hoc* teszttel határoztuk meg, * $p < 0,05$; N=4 NKCC1^{fl/fl} egér/csoport, átlag±SEM. Rövidítések: Bum: bumetanid, fiz. só: fiziológiás sóoldat, kor.: intrakortikális, LPS: lipopoliszacharid, ns: nem szignifikáns, SSC: side scatter, oldalra szórt fényjel, Ly6C: limfocita antigén 6 komplex C1 lókusza, Ly6G: limfocita antigén 6 komplex G lókusza

4.2. *A centrális LPS kezelés hatására termelődő IL-1 α és IL-1 β fő forrása a mikroglia*

A következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk meg, hogy a centrális NKCC1 gátlás következtében megemelkedett citokin termelésében melyik agyi sejtípus játssza a fő szerepet. Számos neuropatológiai kórképben a citokineknek nagy szerepet tulajdonítanak a gyulladásos folyamatok kialakulásában, és a citokinek fő forrásának a mikroglia sejteket tekintik. A mikroglia sejtek termelik legnagyobb mennyiségben az IL-1 α és IL-1 β -t, mely az agyi citokinhálózat legfontosabb proinflammatorikus szabályozó fehérjéje (Allan és mtsai., 2005; Heneka és mtsai., 2014). Korábbi *in vitro* méréseink esetén (Fekete és mtsai., 2018) LPS-sel kezelt tiszta mikroglia tenyészetek esetében hasonlóan nagy mértékű növekedést kaptunk a vizsgált citokin szintekben mint az *in vivo* kísérleteinkben az intrakortikális LPS kezelése során (10. ábra, B vs. 13. ábra, A). A mikroglia sejtekben bizonyos citokinek (MCP-1, RANTES) termelése pseudorabies vírus (Bartha-DupGreen, BDG) vírus fertőzéssel is kiváltható volt (13. ábra, A) (Fekete és mtsai., 2018). Emellett a BDG vírussal fertőzött mikroglia depletált állatok hipotalamuszából készített homogenizátumban a mikroglia depléciónak hatására csökkent a szolubilis gyulladásos faktorok szintje (13. ábra, B). A mikroglia sejtek magas citokintermelő kapacitását tehát sikerült igazolnunk *in vitro* és *in vivo* rendszerekben egyaránt.

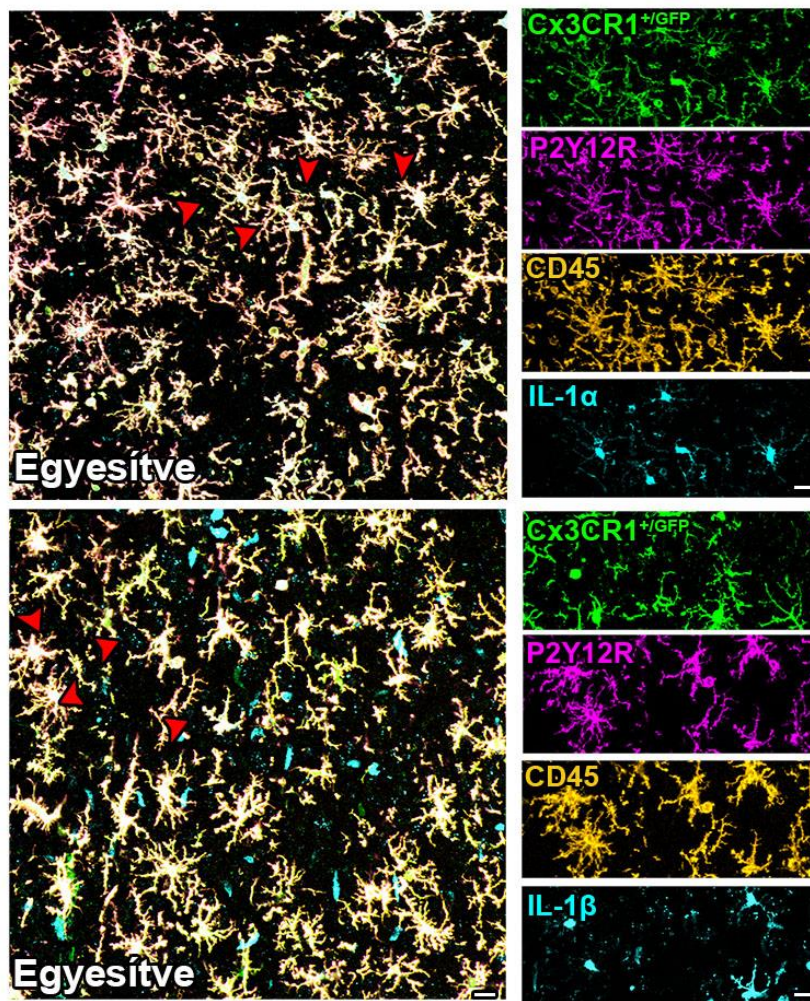


13. ábra: Az LPS illetve a BDG vírusfertőzés hatása a citokin termelésre.

A: Az *in vitro* 24 órán át, LPS illetve BDG kezelésnek kitett mikroglia sejtek kondicionált médiumából meghatározott citokin- és a kemokin szintek (Egyutas ANOVA, átlag±SEM). **B:** A kontroll és a mikroglia depletált vírusfertőzött (BDG) állatok hipotalamuszából származó homogenizátumban meghatározott citokin- és kemokin koncentrációkat ábrázolják a grafikonok (Mann-Whitney, átlag±SEM).

A-B: Fekete és mtsai., 2018, módosítva.

Annak vizsgálatára, hogy a 4.1 fejezetben leírt vizsgálatainkban az IL-1 α és IL-1 β termelődést legnagyobb részt valóban a mikrogliaának tulajdoníthatjuk-e, CX3CR1^{+/GFP} mikroglia-riporter transzgen egerek agykérgébe LPS-t injektáltunk. A fixált agyszöveteken négy színű fluoreszcens jelöléssel kimutattuk, hogy a CX3CR1-GFP és P2Y12R⁺ mikroglia sejtek nemcsak az aktivált mikroglia jellemező CD45 markert expresszálják, hanem citoplazmájukban az IL-1 α és IL-1 β jel is jelen van (14. ábra). Mindezek azt sugallják, hogy a 4.1 fejezetben leírt gyulladásos folyamatokban a centrálisan alkalmazott bumetanid nagy valószínűséggel a mikroglia sejteken keresztül fejt ki hatását.

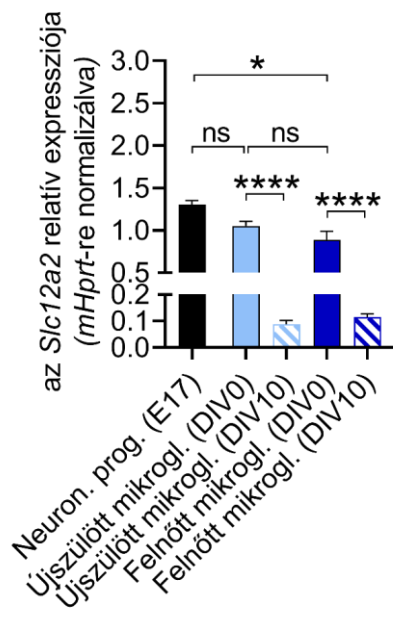


14. ábra: Az IL-1 α és IL-1 β fő forrásai az agyban a mikroglia-sejtek. A konfokális mikroszkóppal készült képek a CX3CR1^{+/GFP} állatokból származó fixált és fluoreszcensen jelölt agyszeleteken mutatják az IL-1 α -CD45-P2Y12R pozitív mikroglia-sejteket (lásd felül, piros nyilakkal jelölve) és az IL-1 β -CD45-P2Y12R pozitív mikroglia-sejteket (lásd alul, piros nyilakkal jelölve). Lépték: 25 μ m

4.3. Új kondicionális mutáns egérvonal létrehozása a mikroglialis NKCC1 vizsgálatára

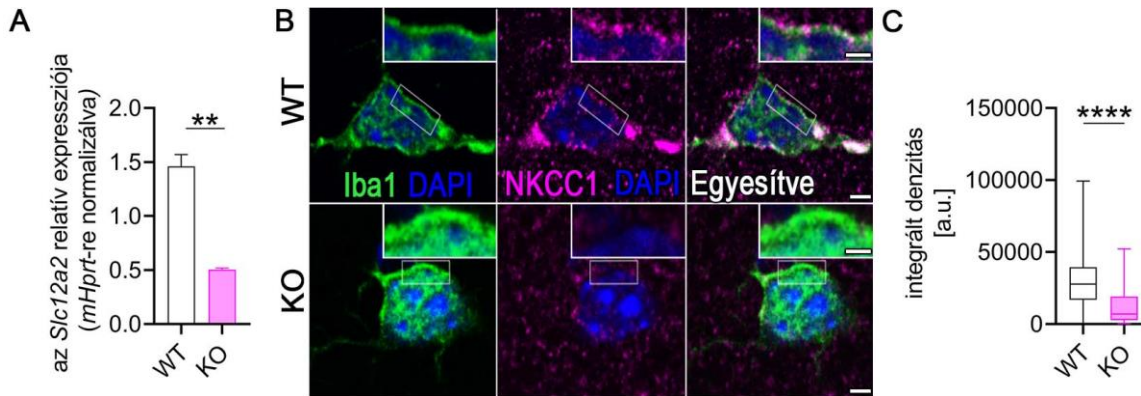
Ahogy azt a fenti eredmények is mutatták, az NKCC1 befolyásolja az agyi citokin termelést, melyben a mikroglia-sejtek szerepét kísérleteinkkel igazoltuk. Ezért a soron következő kísérleteinkben az NKCC1 szerepét mikroglia specifikusan kívántuk vizsgálni. Ahogy az elérhető transzkriptomikai adatok is mutatják (5. ábra), a mikroglia-sejtek

expresszálják az NKCC1 fehérjét kódoló, *Slc12a2* gént (Zhang és mtsai., 2014; Bennett és mtsai., 2016), bár a mikroglia működésében betöltött szerepét ezidáig nem vizsgálták. Az NKCC1 mRNS szintjét mi is megmértük újszülött és felnőtt C57BL/6J egerekből izolált mikroglia sejteken qPCR segítségével. Adataink azt mutatják, hogy a mikroglia sejtek az *Slc12a2*-t embrionális neuronális progenitorokkal összevethető mértékben expresszálják (újszülött mikroglia: $1,052 \pm 0,054$; felnőtt mikroglia: $0,89 \pm 0,098$; neuronális progenitor: $1,30 \pm 0,05$; átlag \pm SEM, 15. ábra). Ugyanakkor, ha akár újszülött, akár felnőtt eredetű izolált mikroglia sejteket kultúrában tartottuk 10 napon keresztül, az NKCC1 mRNS expressziós szintjében jelentős mértékű csökkenés volt megfigyelhető (15. ábra), amely munkánk során korlátozta az *in vitro* módszerek használatát az NKCC1 fehérje funkcionális vizsgálatában.



15. ábra: Az NKCC1 mRNS expressziós szintje neuronális progenitor sejtekben, valamint újszülött és felnőtt egerek agyából származó mikroglia sejtekben. Az újszülött és a felnőtt egerágyból izolált mikroglia sejtekben az NKCC1 mRNS expresszió összehasonlítható mértékű a 17 napos egérembriók hippokampuszából izolált neuronális progenitor sejtekben mért expresszióval. Mind az újszülött, mind a felnőtt állatokból izolált mikroglia sejteket kultúrában tartva 10 napig, az NKCC1 mRNS expresszió nagy mértékben csökken. (Egyutas ANOVA, Holm-Sidak post hoc, ****: $p < 0,0001$, átlag \pm SEM). Rövidítések: Neuron. prog.: neuronális progenitor, mikrogl.: mikroglia, DIV: a sejttenyészetben töltött napok száma (days in vitro), mHprt: egér hipoxantin-guanin foszforibozil-transzferáz, ns: nem szignifikáns.

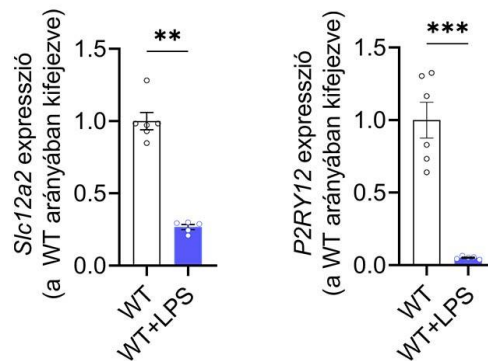
A mikroglialis NKCC1 funkcióját ezért elsősorban *in vivo* rendszerekben kívántuk a továbbiakban vizsgálni. Erre a célra munkacsoportunk létrehozott egy olyan transzgenikus egérvonalat, melyben az NKCC1 gén deléciója specifikusan a mikroglia-sejtekben történik meg (8. ábra; a transzgenetikus egérvonal létrehozásáról a pontos leírást az *Anyagok és Módszerek* rész 3.2. fejezete tartalmazza). A deléció sikerességének vizsgálatára az *Slc12a2* expressziós szinteket qPCR méréssel validáltuk, melynek eredményeként azt kaptuk, hogy a tamoxifen-indukálható mikroglialis NKCC1 KO állatokból izolált mikroglia-sejtekben markánsan csökken az mRNS szint a kontroll, vad típusú alomtársakból származó sejtekben mértékhez képest (WT: $1,46 \pm 0,11$; KO: $0,50 \pm 0,016$; átlag \pm SEM, 16. ábra, A). Fixált, anti-Iba1-el (mikroglia-sejtek azonosítására használt intracelluláris marker) és anti-NKCC1-gyel fluoreszcensen jelölt agyszövetről konfokális felvételeket készítettünk, majd a felvételeken véletlenszerűen kiválasztott Iba1 pozitív mikroglia-sejtekben meghatároztuk az NKCC1 fluoreszcens jelének integrált denzitását (16. ábra, B). Az NKCC1 jel denzitometrálation során az NKCC1 expresszióban fehérje szinten is hasonló mértékű csökkenést tapasztaltunk, mint az NKCC1 mRNS-e esetében (16. ábra, B és C). A konfokális felvételeken a WT (16. ábra, B, felül) az anti-Iba1-el jelölt mikroglia-sejtek (zöld jel) sejtmembránjában jól látható diszkrét, pontszerű fluoreszcens jelet ad az NKCC1 elleni immunreakció (magenta jel), míg a KO (16. ábra, B, alul) mikroglia-sejtekben eltűnt a jel.



16. ábra: A mikroglialis NKCC1 deléció ellenőrzése mRNS- és fehérjeexpresszió szintjén. A: Az $NKCC1^{fl/fl \Delta Cx3CR1}$ állatokból izolált NKCC1 KO mikroglia sejtekben harmadára csökkent az *Slc12a2* mRNS expressziója a WT mikroglia sejtekben mérthez képest (Mann-Whitney teszt, $N=3$ állat/csoport, **: $p<0,01$, átlag \pm SEM). **B:** Az anti-Iba1-el (zöld), anti-NKCC1-el (magenta) és DAPI-val (kék) jelölt WT és mikroglialis NKCC1 KO agyszövetekről készült konfokális felvételek. Az inzertek az NKCC1 lokalizációját mutatják a sejtmembránban. (Lépték: $2 \mu\text{m}$, az inzertekben: $1 \mu\text{m}$) **C:** Az NKCC1 fluoreszcens jelének integrált denzitása az NKCC1 KO mikroglia sejtekben nagy mértékű, szignifikáns csökkenést mutatott a WT típusú mikroglia sejtekben mérthez képest (Mann-Whitney teszt, $N_{WT}=142$ sejt 2 egérből, $N_{KO}=83$ sejt 1 egérből, ****: $p<0,0001$, átlag \pm SEM). mHprt: egér hipoxantin-guanin foszforibozil-transzferáz, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, Iba1: ionizált kalcium-kötő adapter molekula 1, WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO

A 4.2. fejezetben bemutattam, hogy a centrális LPS okozta gyulladáshoz vezető citokinek fő forrása a mikroglia. Az agyszövetből mágnesgyöngyös izolációs módszerrel szeparált tiszta mikroglia populáción (lásd az *Anyagok és Módszerek* 3.3. fejezetét) qPCR segítségével meghatároztuk azt is, hogy a centrális LPS beadás hatására a kéregben szignifikánsan csökkent az NKCC1 mRNS szintje (17. ábra, balra), és hasonló csökkenés figyelhető meg a mikroglia homeosztatikus működéséért, és sérülés esetén az aktivációért felelős fő purinerg receptor, a P2Y₁₂R mRNS (17. ábra, jobbra) szintjében is (Davalos és mtsai., 2005; Nimmerjahn és mtsai., 2005; Fekete és mtsai., 2018; Cserép és mtsai.,

2020). Mindez azt sugallja, hogy a mikrogliás NKCC1 transzporter csökkent termelődése vagy hiánya összefügg az agyi gyulladásos folyamatok eszkalálódásával.

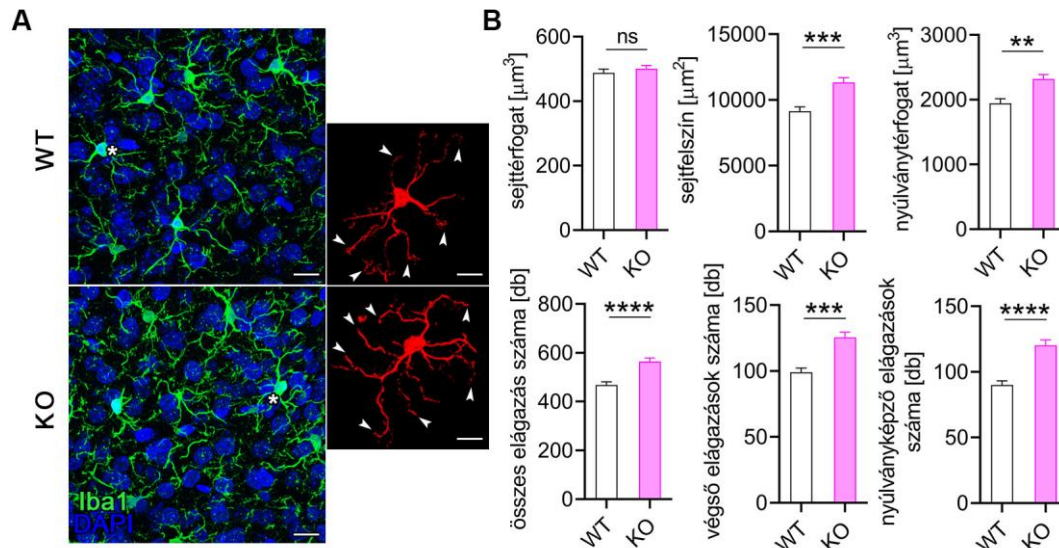


17. ábra: Az NKCC1 és a P2Y12R mRNS-e a mikrogliasejtekben downregulálódik LPS hatására. A felnőtt állatok agyából mágnesgyönggyel izolált mikrogliasejtekben 24 órával a ciszterna magnális LPS beadást követően szignifikánsan csökkent az *Slc12a2* és *P2RY12* gének expressziója (kétmintás t-próba, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $N_{WT}=6$, $N_{WT+LPS}=5$ állat, átlag \pm SEM).

4.4. Az NKCC1 mikrogliális deléciója megváltozott sejtmorfológiát eredményez

Ismert, hogy a mikrogliasejtek mind a fiziológiás körülmények megváltozása során, mind patológiás folyamatokban gyors és jellegzetes morfológiai átalakulással reagálnak (Heindl és mtsai., 2018), emellett az NKCC1-et korábbi tanulmányok kulcsfontosságúnak tulajdonították számos sejttípus sejttérfogat szabályozási folyamataiban (Russell, 2000; Kahle és mtsai., 2015). Annak feltárására, hogy az NKCC1 szerepet játszhat-e a mikrogliasejtek alakjának/sejttérfogatának szabályozásában, automatizált morfológiai elemzést végeztünk a mikroglia-specifikus NKCC1 KO és vad típusú (kontroll), felnőtt állatokból származó fixált agyszöveteken (lásd *Anyagok és Módszerek*, 3.11.). Először arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a mikrogliális NKCC1 hiány befolyásolhatja-e az alap sejtmorfológiát, vagyis a nyugalmi állapotban lévő sejtek alakját. Eredményeink alapján az NKCC1-hiányos mikrogliasejtek 23,8%-kal nagyobb sejtfelszínnel, 19%-kal nagyobb nyúlványtérfogattal és 33,5%-kal több nyúlvánnyal rendelkeznek, mint a vad

típusú sejtek (18. ábra, A-B), míg a sejtterfogatukban nem találtunk eltérést (18. ábra, B). Ezek alapján az NKCC1 valószínűleg szerepet játszik a mikroglia nyugalmi sejt morfológiájának kialakításában és az NKCC1 hiány nagyobb méretű és nyúlványosabb mikroglia sejt fenotípusát eredményez.

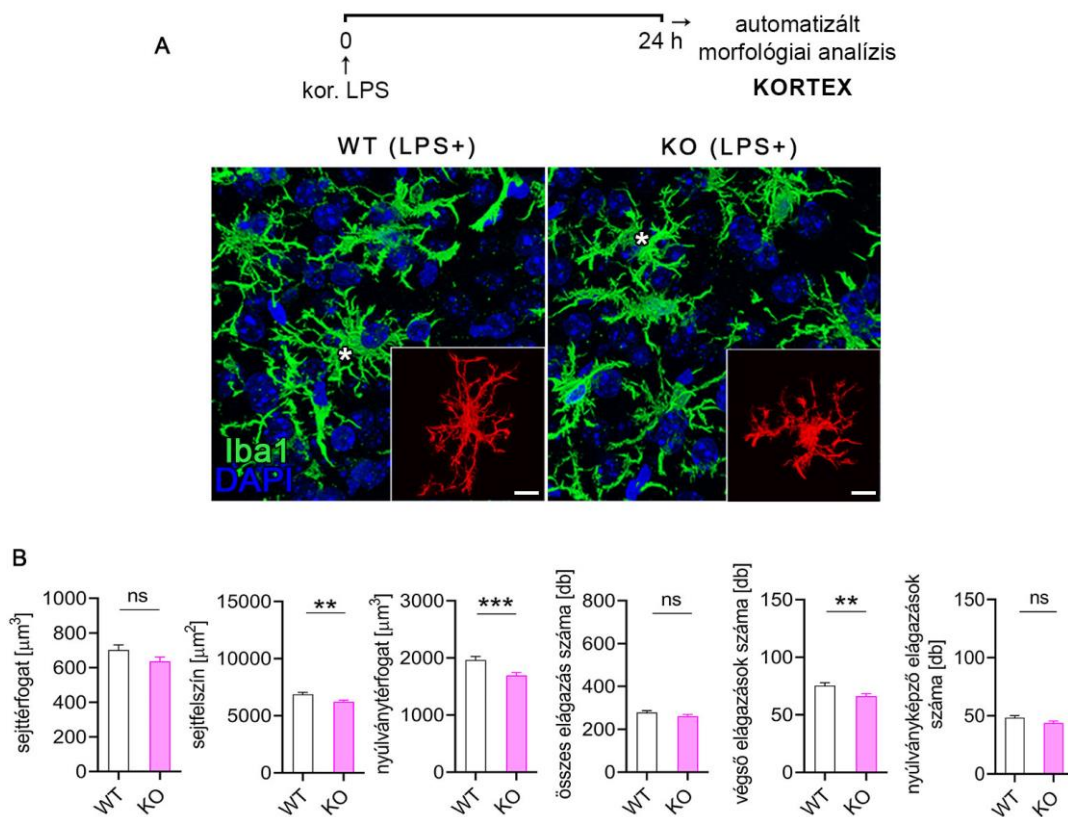


18. ábra: A NKCC1 deléció hatása a nyugalmi sejt morfológiájára.

A: A mikroglialis NKCC1 KO és WT agyszövet konfokális rétegfelvételekből készített MIP (maximum intensity projection) képeken a fehér csillaggal megjelölt Iba1 pozitív mikroglia sejtet mutatják az inzerterek. Az inzerteken a fehér nyílhegyek a WT (felül) és a KO (alul) mikroglia nyúlványstruktúrája közötti különbségeket jelzik. (Lépték: 25 μm) **B:** Az automatizált morfológiai analízis során a WT és a KO mikroglia a grafikonokon jelölt tulajdonságokban szignifikánsan különböztek (Mann-Whitney teszt, $N_{\text{WT}}=162$ sejt 3 állatból, $N_{\text{KO}}=281$ sejt 5 állatból, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$, átlag \pm SEM). Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, Iba1: ionizált kalcium-kötő adapter molekula 1 ns: nem szignifikáns.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a már aktivált, LPS hatásnak kitett mikroglia a stimulusra válaszként adott jellemző morfológiai átalakulásban (Wendeln és mtsai., 2018) mutat-e hasonló különbségeket a vad típushoz képest. Az automatizált morfológiai analízis eredményei szerint, mind a vad típusú, mind az NKCC1 KO mikroglia sejt

drasztikus morfológiai átalakulással válaszoltak a kortexbe injektált LPS-re (lásd 19. ábra, A vs. 18. ábra, A). Mindemellett az NKCC1 hiányában szignifikánsan kisebb mérettel, 10%-kal kisebb sejtfelszínnel, 12,5%-kal kisebb sejtterfoggal és 13,7%-kal kisebb nyúlvány térfogattal rendelkeztek a WT sejtekhez képest (19. ábra, B). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az NKCC1 az aktivált mikroglia sejtek morfológiájának kialakításában és az inflammatorikus hatások következtében változó sejtterfogat szabályozásában is részt vesz.



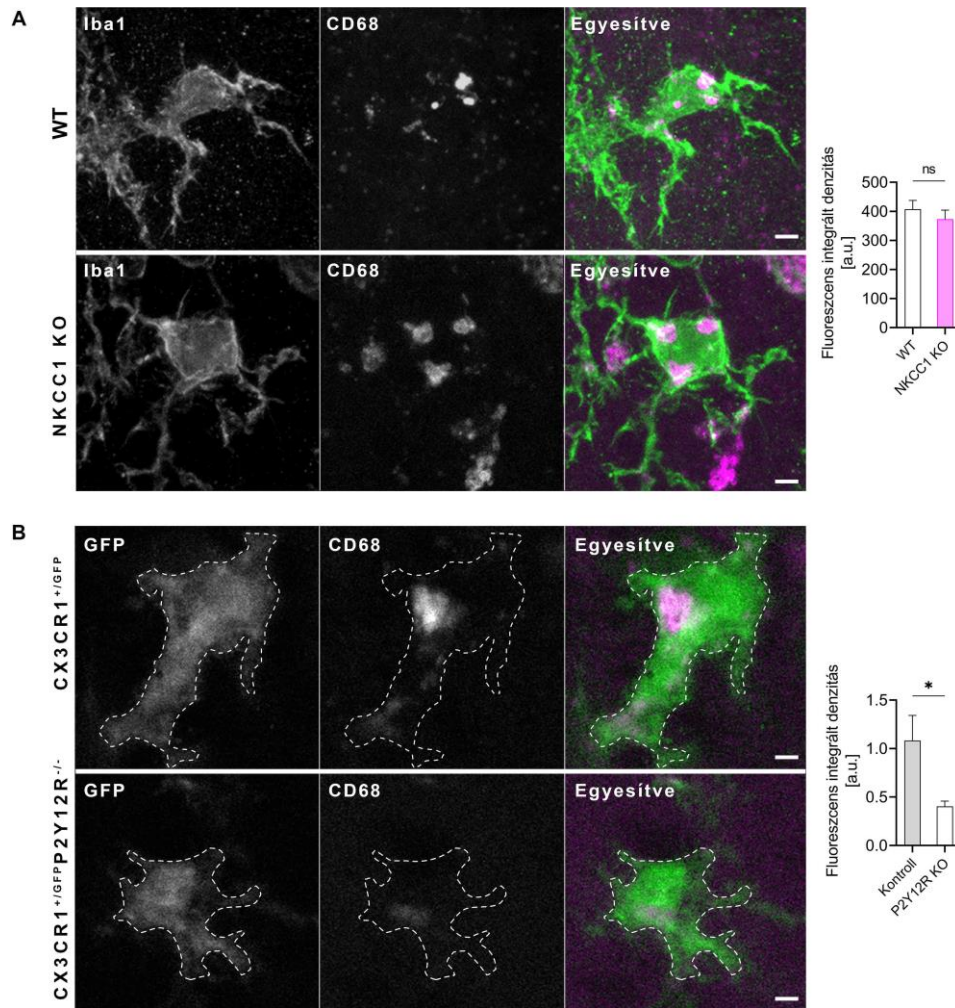
19. ábra: Az NKCC1 deléció hatása az aktivált mikroglia morfológiára.

A: Az NKCC1 KO és a WT mikroglia sejtek egyaránt drasztikus morfológiai változással reagáltak az intrakortikálisan bejuttatott LPS stimulusra. Az inzertek a fehér csillaggal megjelölt Iba1 pozitív mikroglia sejteket mutatják. Lépték: 25 μm

B: Az automatizált morfológiai analízis eredményei azt mutatják, hogy az NKCC1 KO mikroglia kis mértékben kisebb, mint a WT mikroglia (Mann-Whitney teszt, $N_{WT}=108$ sejt 6 állatból, $N_{KO}=92$ sejt 4 állatból, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, átlag \pm SEM). Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, kor.: intrakortikális, LPS: lipopoliszacharid, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, Iba1: ionizált kalcium-kötő adapter molekula 1, ns: nem szignifikáns.

4.5. A mikroglialis NKCC1 hiány nem befolyásolja a mikroglia fagocitotikus aktivitását

Mivel a mikroglia aktivációt a morfológiai változáson kívül a megváltozott citokin termelés és a megnövekedett fagocitotikus kapacitás is jellemzi, ezért megvizsgáltuk, hogy az intrakortikális LPS kezelés hatására történik-e változás az NKCC1 hiányos mikroglia fagocitotikus aktivitásában. 24 órás LPS hatást követően a mikroglialis NKCC1 KO és WT állatokból származó fixált agyszöveteken fluoreszcens immunhisztokémiai jelölést követően az Iba1 pozitív mikroglia sejtekben kvantifikáltuk a CD68 pozitív fagocitózómákat. Azt találtuk, hogy a mikroglialis NKCC1 deléciónak nem befolyásolta a CD68 pozitív fagocitózómák számát a mikroglialis NKCC1 KO sejtekben (20. ábra, A).

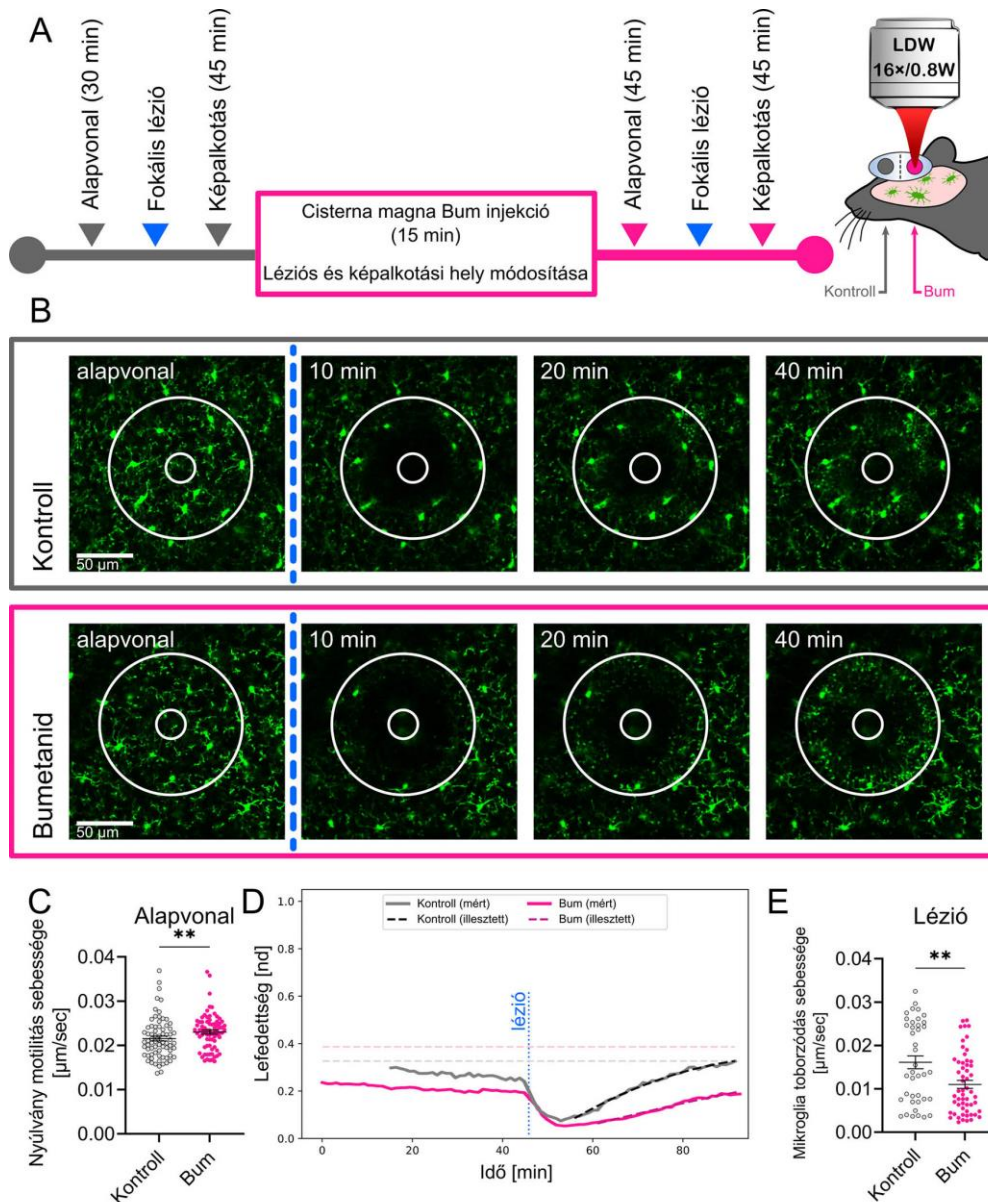


20. ábra: A mikroglialis NKCC1 és P2Y12R deléció hatása a mikroglia sejtek fagocitotikus kapacitására. A: A CD68 fluoreszcens integrált denzitás (magenta) az Iba1 pozitív (zöld) az NKCC1 KO és a WT mikroglia sejtekben nem mutatott különbséget ($N_{WT}=62$, $N_{NKCC1\ KO}=56$ sejt 4-4 állatból, Mann-Whitney próba, $p=0,4004$, lépték: 2 μm). **B:** A konfokális felvételeken a kontroll (CX3CR1^{+/GFP}) és a P2Y12 receptor hiányos mikroglia sejtekben (CX3CR1^{+/GFP} P2Y12R^{-/-}) a CD68 pozitív fagoszómák (magenta) láthatóak. A P2Y12 receptor hiányában a mikroglia fagocitotikus aktivitása jelentősen sérül, a P2Y12R KO mikroglia sejtekben szignifikánsan csökkent a CD68 fluoreszcens jel integrált denzitása a kontroll sejtekben mértékhez képest ($N=35$ sejt/csoport, Mann-Whitney teszt, átlag \pm SEM, lépték: 2 μm). Rövidítések: WT: vad típus, NKCC1 KO: mikroglialis NKCC1 KO, Iba1: ionizált kalcium-kötő adapter molekula 1, GFP: zöld fluoreszcens fehérje, CD68: differenciálódási molekula klaszter 68, ns: nem szignifikáns. **A:** Publikálatlan adatok, **B:** Fekete és mtsai., 2018, módosítva

Ezzel ellentétben, a BDG vírussal fertőzött, P2Y12 receptor hiányos CX3CR1^{+GFP} P2Y12R^{-/-} egerekben vizsgálva a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitását jelentős mértékű csökkenést találtunk a CD68 pozitív fagocitómák számában a kontroll, CX3CR1^{+GFP}-ben mértekhez képest (20. ábra, B). Ez az eredmény azt mutatja, hogy BDG vírussal fertőzött, haldokló neuronok fagocitózisában a mikroglia sejtek P2Y12-receptor függő módon vesznek részt.

4.6. *A centrális NKCC1 gátlás megváltoztatja a mikroglia nyúlványok motilitását*

Ahogy a dolgozat bevezetőjében is részleteztem a mikroglia sejtek nyúlványaikkal folyamatosan monitorozzák a környezetüket, ezáltal gyorsan és érzékenyen képesek reagálni az extracelluláris térből és a környező sejtekből érkező változásokra. A mikroglia sejtek 1.3. fejezetben ismertetett sejt felszíni receptorairól tudjuk, hogy bizonyítottan szerepet játszanak a nyúlványmozgás gyors szabályozásában. Annak meghatározására, hogy az NKCC1 részt vesz-e nyugalmi nyúlvány motilitás dinamikájának szabályozásában, illetve a sérülésre adott mikroglialis válaszreakciókban, a mikroglia motilitást két-foton mikroszkóppal, *in vivo* vizsgáltuk mikroglia-riporter CX3CR1^{+GFP} egerekben, bumetanid kezelés mellett (21. ábra). (Ezt a vizsgálatot azért volt szükséges CX3CR1^{+GFP} egerekben elvégezni farmakológiai módszer alkalmazása mellett, mert nem rendelkezünk olyan mikroglia-riporter egértörzsszel, amelyben egyidejűleg az NKCC1 mikroglialis deléciója is megoldható lett volna.) A vizsgálat során az agyfelszíntől 100-125 µm mély rétegekben a szomatoszenzoros kéregben time-lapse rétegfelvételeket készítettünk egyrészt az alap nyúlvány motilitásról, másrészt a lézer segítségével létrehozott fokális léziót követő nyúlvány motilitásról. Ezt követően az állatok *ciszterna magna*-jába NKCC1 antagonistá bumetanidot injektáltunk, és egy, az előzőtől eltérő agykérgi területen megismételtük a mérést (21. ábra, A-B, a mérési protokollt részletesebben lásd az *Anyagok és Módszerek* 3.9. fejezetében). Az alapvonal esetében a nyúlvány motilitás sebességét a Fiji Manual Tracking pluginja segítségével határoztuk meg. Bumetanid hatására a mikroglia nyúlványok nyugalmi motilitásában, kicsi, de szignifikáns mértékű növekedést (7%) tapasztaltunk (21. ábra, C).



21. ábra: A centrális NKCC1 gátlás hatása a mikroglia nyúlványok motilitására. **A:** A CX3CR1^{+/GFP} mikroglia-riporter állatokon elvégzett, *in vivo* két-foton mikroszkópiás kísérletek vázlatja **B:** A két-foton mikroszkópos time-lapse felvételekből származó reprezentatív képek a képzalkotás, 0., 10., 20. és 40. percében (Lépték: 50 µm). A fehér körvonalak jelzik a sértés területét, melyből az ablációs zóna (a belső körvonal) az analízis során kizárásra került. **C:** A nyúlványmotilitás sebessége az alapvonal esetében. A bumetanid kezelés hatására 7%-os növekedést tapasztaltunk a mikroglia nyúlványok mozgási sebességében (Mann-Whitney próba, $N_{\text{Kontroll}}=73$, $N_{\text{Bum}}=76$ nyúlvány 5 állatból, **: $p < 0,01$, átlag±SEM). **D:** A sérülést követő nyúlvány-toborzódás sebességét matematikai

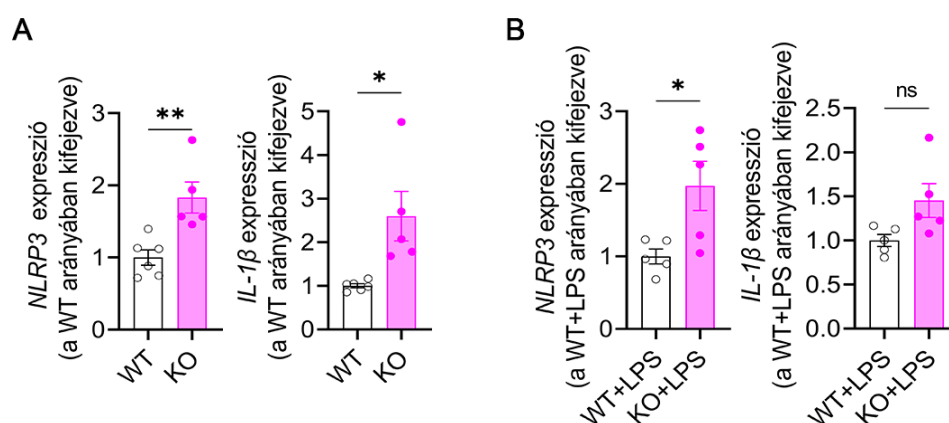
modell illesztéssel becsültük. A szürke és a rózsaszín görbék a mikroglia (GFP szignál) által lefedett terület arányát mutatják. A szaggatott vonalak a mérési adatokra legjobban illeszkedő görbékből számított lefedettségi értékeket mutatják. A szaggatott szürke és rózsaszín vízszintes vonalak a modell által jósolt telítődési értékekhez tartoznak, a kék színű függőleges vonal a lézió időpontját jelöli. **E:** A léziót követő mikroglia toborzódás becsült sebessége az automatikus képelemzést és a modell illesztést követően. Az adatok alapján jelentős, 31,7%-os csökkenés mutatható ki a mikroglia toborzódás átlagos sebességében a bumetanid kezelést követően (Mann-Whitney próba, $N_{\text{Kontroll}}=40$, $N_{\text{Bum}}=56$ illesztett érték 5, illetve 7 állatból, **: $p < 0,01$, átlag \pm SEM). Rövidítések: Bum: bumetanid, nd: nincs dimenziója

A lézer-indukált léziót követően azt, hogy a mikroglia nyúlványok milyen gyorsan toborzódnak a sérült terület irányába, egy saját, CellProfilerben készített képelemző eljárással, illetve egy modell illesztést végző szkripttel becsültük meg (21. ábra, D; a modell részleteit lásd az *Anyagok és Módszerek* 3.9. fejezetében). A sérülés hatására bekövetkező, a sérülés irányába történő nyúlvány toborzódás sebessége bumetanid hatására jelentősen, 31,7%-kal csökkent (21. ábra, D-E). Tehát elmondható, hogy az NKCC1 nemcsak a mikroglia sejtek nyugalmi/aktivált sejt morfológiájának kialakításában, hanem az olyan dinamikus folyamatok szabályozásában is részt vesz, mint a nyúlványmotilitás - mind fiziológias, mind patológias körülmények között.

4.7. A mikroglialis NKCC1 hiány fokozza az NLRP3 expressziót és serkenti a proinflammatorikus citokinek termelődését az agyban

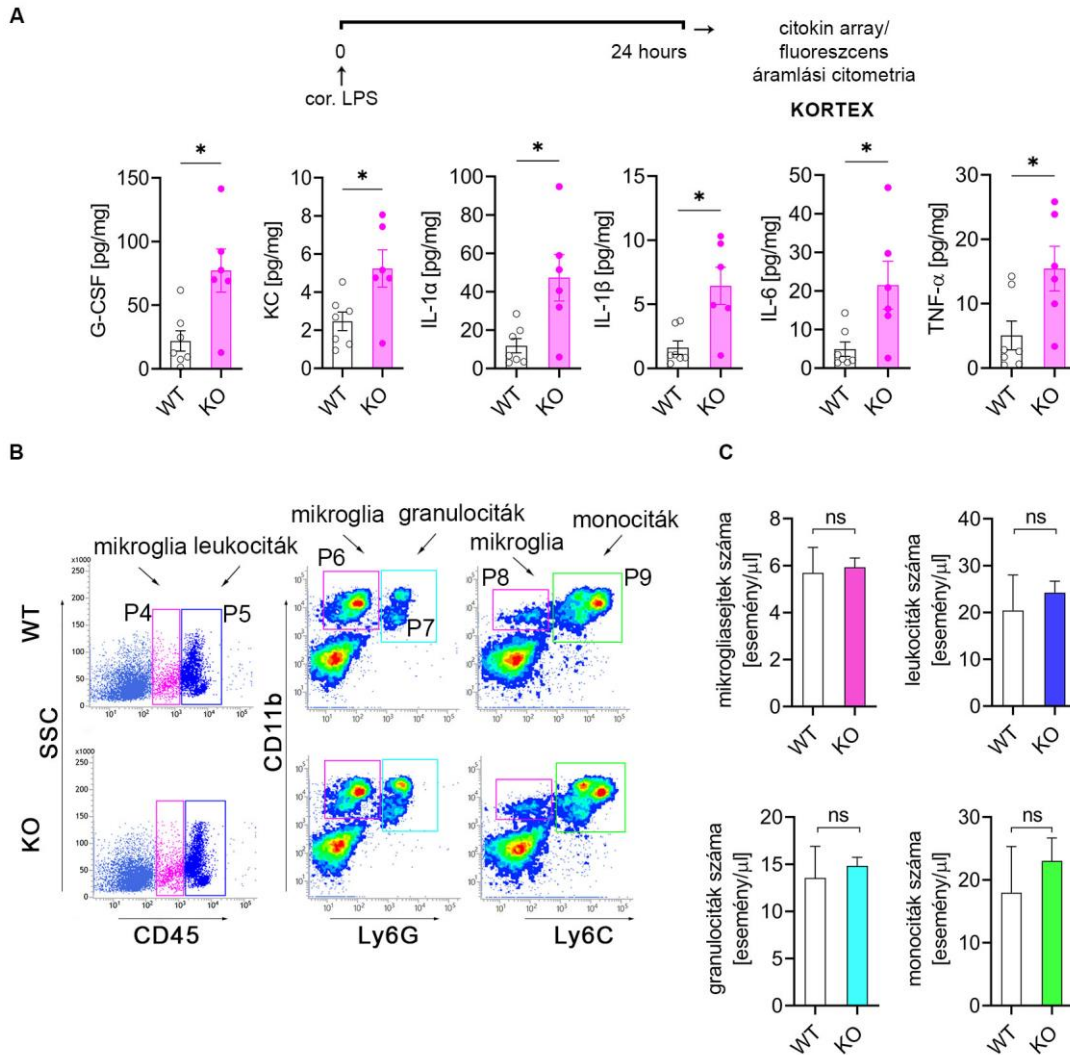
A mikroglia sejtekben és a makrofágokban az NLRP3 inflammaszóma komplexum összeszerelődése az egyik fő lépés a pro-IL-1 β kaspáz-1 által történő hasításában, ezáltal az érett IL-1 β termelésében (2. ábra) (Heneka és mtsai., 2018; Swanson és mtsai., 2019). A továbbiakban, hogy felderítsük, hogy az NKCC1 deléción hogyan befolyásolja a mikroglia inflammatorikus állapotát, felnőtt egeragyból izolált mikroglia sejtekben megvizsgáltuk az IL-1 β és NLRP3 mRNS expresszió mértékét. Érdekes módon qPCR

adataink már inflammatorikus stimulus hiányában is megemelkedett IL-1 β és NLRP3 mRNA expressziót mutattak az NKCC1 KO mikroglia-sejtekben (22. ábra, A). Megvizsgáltuk továbbá ennek a két génnek az expressziós szintjét 24 órával az intraciszternális LPS kezeléseket követően is. NKCC1 hiányában szignifikánsan (2-szeresére) növekedett a mikroglialis NLRP3 mRNA szintje a vad típusú kontroll sejtekhez képest, míg az IL-1 β mRNA expresszió esetében is hasonló irányú, bár nem szignifikáns változás (1,5-szeres növekedés) volt megfigyelhető (22. ábra, B). Ezen eredmények összhangban vannak a 4.1. fejezetben az NKCC1 centrális bumetanid gátlással kapcsolatban leírtakkal, miszerint a NKCC1 farmakológiai gátlása tovább fokozta a gyulladáshoz vezető körülmények közötti citokin termelést, valamint a fokozott IL-1 β termelésben valószínűsíthető az NLRP3 inflammaszóma szerepe. Eredményeinkből úgy tűnik, a mikroglialis NKCC1 hiánya vagy diszfunkciója a mikroglia-sejteket egy elő-aktivált („primed”) állapot felé tolja.



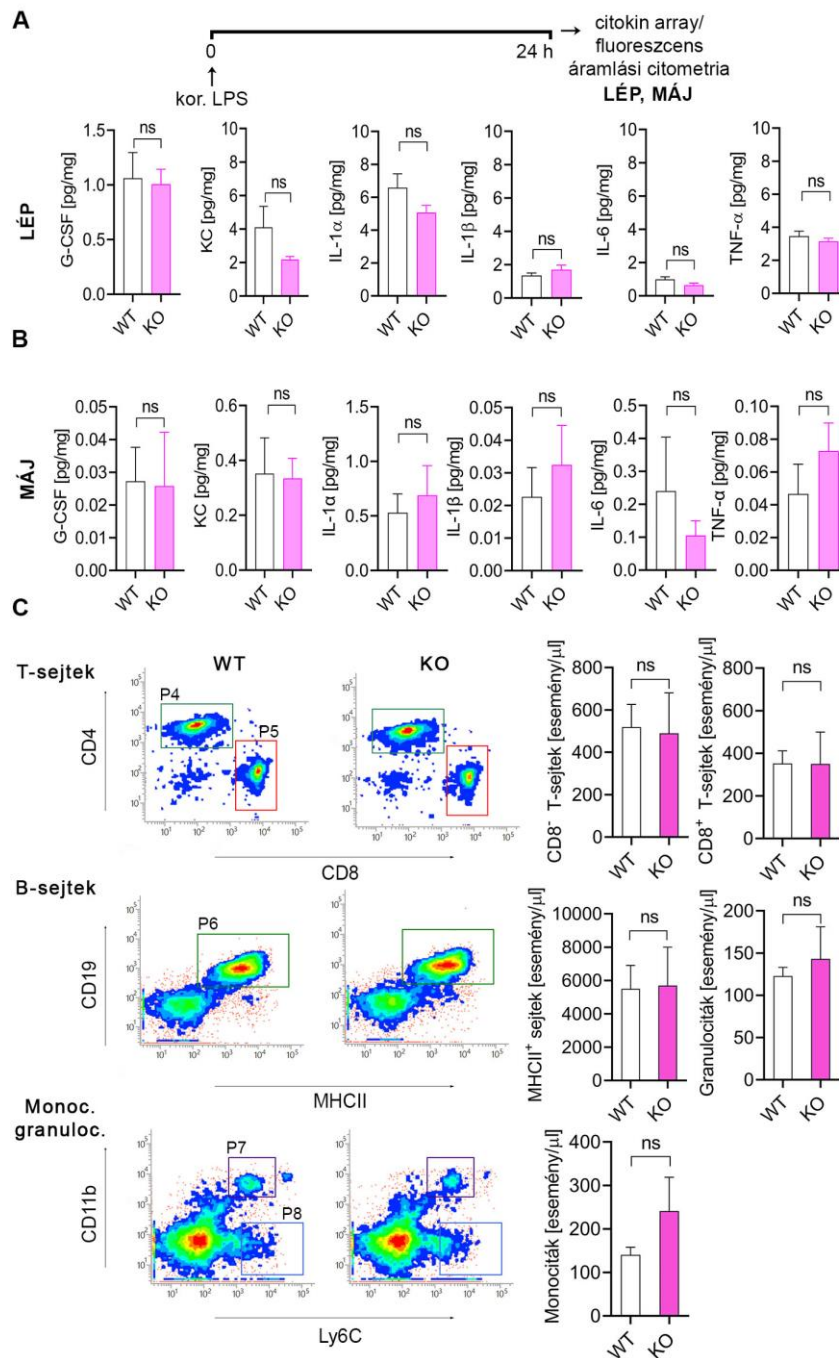
22. ábra: A mikroglialis NKCC1 hiány hatása az NLRP3 és IL-1 β mRNA expresszióra. A: Az izolált NKCC1 KO mikrogliaiban megnövekedett az NLRP3 és az IL-1 β mRNA expressziója a WT mikrogliaéhoz képest (kétmintás t-próba; * p <0,05, ** p <0,01; N_{WT} =6 állat, N_{KO} =5 állat, átlag \pm SEM) **B:** A megnövekedett NLRP3 és IL-1 β mRNA expresszió a KO mikroglia-sejtekben fennmaradt a cisztorna magnába bejuttatott LPS hatására is (kétmintás t-próba; * p <0,05; N_{WT} =5 állat, N_{KO} =5 állat, átlag \pm SEM). Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, LPS: lipopoliszacharid, NLRP3: NOD-, LRR- és pirin domént tartalmazó protein 3, IL-1 β : interleukin-1 β , ns: nem szignifikáns

Ezek után megvizsgáltuk a mikroglialis NKCC1 hiány gyulladásos faktor termelésre kifejtett hatását. A vad típusú és mikroglialis NKCC1 KO egerek intrakortikális LPS injektálása után 24 órával később az injektálás helyéről származó (0,5x0,5x0,5 cm méretű) szövetdarab homogenizátumában meghatároztuk a citokin- és kemokin szinteket. Kimutattuk, hogy a mikroglialis NKCC1 hiány még tovább fokozta az LPS által kiváltott citokin termelés mértékét a WT, szintén LPS kezelt kontrollokhoz képest, méghozzá igen jelentős citokin szint emelkedéseket okozva (G-CSF: 3,53-szoros, KC: 2,12-szeres, IL-1 α : 3,98-szoros, IL-1 β : 3,96-szoros, IL-6: 4,35-szörös, TNF- α : 3-szoros növekedés; 23. ábra, A). A mikroglialis NKCC1 hiány nem volt hatással az agyban megtalálható, gyulladásra reagáló sejtpopulációk számára, vagyis sem a CD11b⁺ CD45^{int} mikroglia mennyiségét, sem a csontvelői eredetű CD11b⁺ CD45^{high} leukociták, CD11b⁺ Ly6C^{high} monociták vagy CD11b⁺ Ly6G^{high} granulociták mennyiségét nem változtatta meg a vad típushoz képest (23. ábra, B-C). Ugyanakkor az intrakortikális LPS kezelés nem befolyásolta a vizsgált perifériás szervekben (lég, máj) sem a citokin-, kemokintermelés mértékét (24. ábra, A-B), sem a T-sejtek, B-sejtek, monociták vagy granulociták számát (24. ábra, C). A mikroglialis NKCC1 hiánya tehát úgy tűnik, hasonlóan az NKCC1 farmakológiailag, intrakortikális bumetaniddal történő gátlása esetében tapasztaltakhoz, jelentős mértékben fokozza az LPS indukálta agyi gyulladásos folyamatokat, nagy valószínűséggel sejt autonóm módon.



23. ábra: Az NKCC1 hiánya a mikrogliaiban serkenti az inflammatorikus citokinek termelődését az agyban. A: Az NKCC1 KO állatokban az intrakortikális LPS-kezelés hatására szignifikánsan megnövekedett az agyi citokin termelés a WT állatokban mértékhez képest (Mann-Whitney teszt, *: $p < 0,05$; $N_{WT}=7$, $N_{KO}=6$, átlag \pm SEM). **B-C:** Az intrakortikális LPS kezelést követően végzett áramlási citometriás mérés denzitás képei (density plot, balra) és felhőképei (dot plot, jobbra) (B) valamint az oszlopgrafikonok (C) azt mutatják, hogy a mikroglialis NKCC1 deléció nem befolyásolta sem a mikroglia számot, sem a toborzódó leukocita populációk méretét. Mikroglia/P5 kapu: CD45^{int} sejtpopuláció, leukociták/P4 kapu: CD45^{high} sejtpopuláció, granulociták/P7 kapu: CD11b⁺, Ly6G^{high} sejtpopuláció, monociták/P9 kapu: CD11b⁺, Ly6C^{high} sejtpopuláció. (Kétmintás t-próba, $N_{WT}=4$, $N_{KO}=4$, átlag \pm SEM). Rövidítések: kor.:

intrakortikális, WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, LPS: lipopoliszacharid, G-CSF: granulocita kolónia-stimuláló faktor, KC: keratinocita kemoattraktáns, IL-1 α : interleukin-1 α , IL-1 β : interleukin-1 β , IL-6: interleukin-6, TNF- α : tumornekrózis faktor- α , SSC: side scatter, oldalra szórt fényjel, Ly6C: limfocita antigén 6 komplex C1 lókusza, Ly6G: limfocita antigén 6 komplex G lókusza, ns: nem szignifikáns.



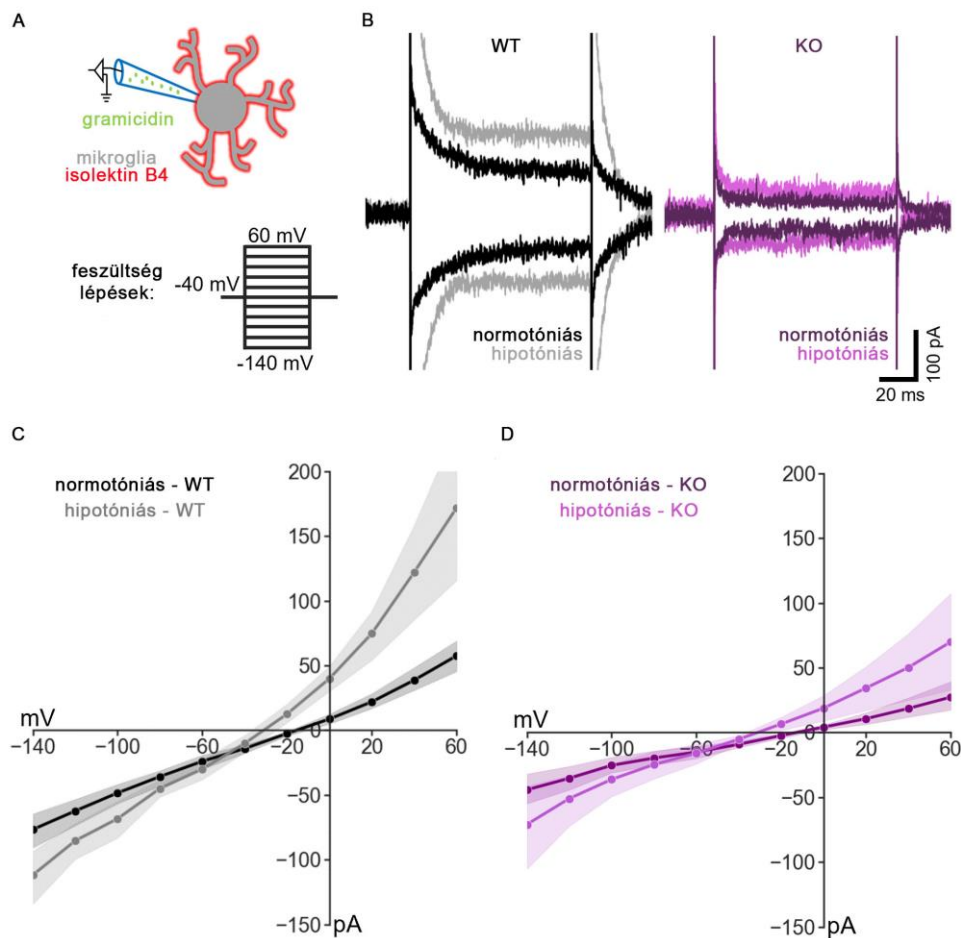
24. ábra: A mikroglialis NKCC1 hiány hatása a periférián, centrális gyulladás mellett. A és B: Az intrakortikális LPS stimulust követően a mikroglialis NKCC1 hiány nem befolyásolja a lép és a máj citokin termelését (Mann-Whitney teszt, $N_{WT}=7$, $N_{KO}=6$, átlag \pm SEM) **C:** A CD4⁺ (P4 kapu), a CD8⁺ (P5 kapu) T-sejtek, a CD19⁺ MHCII⁺ B-sejtek (P6 kapu) száma nem különbözik a WT és mikroglialis NKCC1 KO állatokban. Továbbá a mikroglialis NKCC1 hiány nem befolyásolja a monocita és granulocita populációk arányát sem (kétmintás t-próba, $N_{WT}=4$,

$N_{KO}=4$, átlag \pm SEM). Rövidítések: kor.: intrakortikális, WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, LPS: lipopoliszacharid, G-CSF: granulocita kolóniasztimuláló faktor, KC: keratinocita kemoattraktáns, IL-1 α : interleukin-1 α , IL-1 β : interleukin-1 β , IL-6: interleukin-6, TNF- α : tumornekrózis faktor- α , CD4/8/19/11b: differenciálódási klaszter 4/8/19/11b, Ly6C: limfocita antigén 6 komplex C1 lókusza, MHCII: fő hisztokompatibilitási komplex II, ns: nem szignifikáns

4.8. Az mikroglialis NKCC1 deléció hatására a mikroglialis membrán áramok megváltoznak

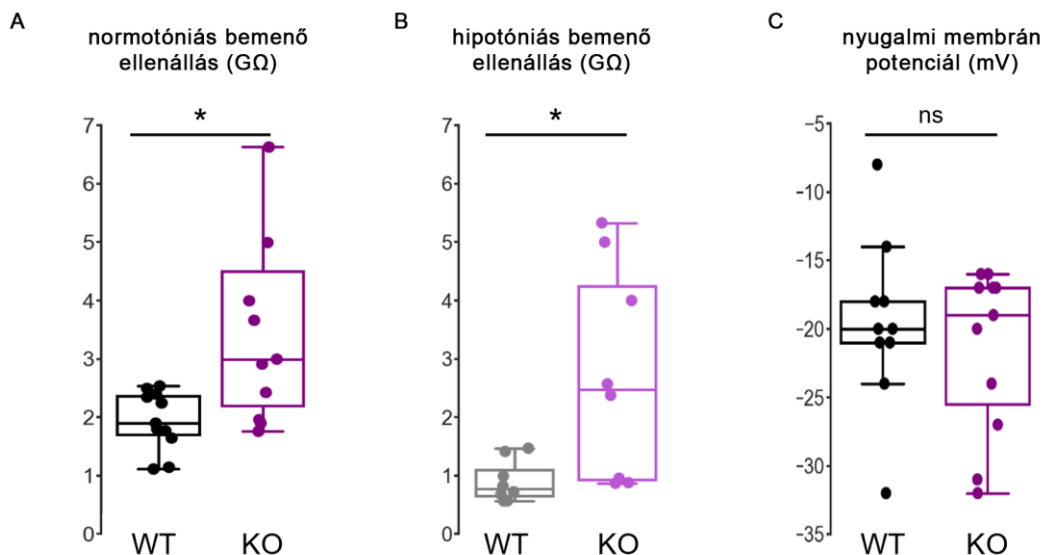
Az NKCC1 hiány mikroglialis ion-forgalomra és a membrán áramok szabályozására való hatásának vizsgálatához perforált patch-clamp technikával mértük meg a vad típusú és NKCC1 KO mikroglia sejtek membrán áramait 56-65 napos egerekből származó, akut hippocampális szeletekben (25. ábra). Mivel az NKCC1 a Cl⁻ (Na⁺ és K⁺ melletti) befelé irányuló transzportját végzi, ezért hiányának a Cl⁻ áramokra kifejtett hatását vizsgáltuk a gramicidin perforált patch-clamp módszer segítségével (25. ábra, A). Az intracelluláris Cl⁻ koncentrációt nem befolyásolja a pipettában található oldat, ugyanis a gramicidin a sejtmembránt csak a monovalens kationokra és a kis méretű, töltés nélküli molekulákra teszi átjárhatóvá, Cl⁻-ra inpermeábilis marad. Hipotóniás extracelluláris közegben a létrejövő ozmotikus sejtduzzadás hatására a K⁺- és Cl⁻ -csatornák aktiválódása következtében kifelé rektifikáló membrán áramok keletkeznek. Ilyen csatornák a Cl⁻ -ra permeábilis, térfogat által szabályozott anioncsatornák (VRAC) (Eder és mtsai., 1998; Ducharme és mtsai., 2007; Schlichter és mtsai., 2011). A kifelé rektifikáló membrán áramok méréséhez a szeleteket a mérőkamrában hipotóniás ACSF oldattal (a normotóniás oldat 50%-os hígítása) perfundáltuk 5 percig. A térfogat változás hatására létrejövő ionmozgások áram válaszait -40 mV tartófeszültség mellett, a feszültség lépéseket 100 ms hosszan, 20 mV-onkénti növeléssel (-140) - 60 mV között alkalmazva rögzítettük (lásd még *Anyagok és Módszerek* 3.10.2. fejezetét). A vad típusú mikroglia sejtek esetében normotóniás és a hipotóniás közegben egyaránt hasonló eredményeket kaptunk (25. ábra, B), mint amit a sejtek elektromos tulajdonságairól a térfogat változás hatására korábban akut szeletben leírtak (Murana és mtsai., 2017). Az áramerősség-feszültség görbék azt mutatják, hogy főleg a magasabb feszültség értékek esetében a KO sejtek ellenállása jóval

magasabb volt (vagyis kisebb áramerősség értékek tartoznak hozzájuk) normotóniás és hipotóniás közegben egyaránt, mint a vad típusú sejteké (25. ábra, C-D).



25. ábra: Az NKCC1 mikroglialis deléciója megváltoztatta a mikroglialis membrán áramokat. A: Az akut hippocampális szeleteken történt gramicidin perforált patch-clamp mérés sematikus vázlatja. A térfogatváltozás hatására fellépő ionáramokat mértük. **B:** WT (fekete: normotóniás, szürke: hipotóniás ACSF) és KO (sötét lila: normotóniás, világos lila: hipotóniás ACSF) mikroglia sejtekből -40 mV tartó feszültség mellett elvezetett reprezentatív mérési görbék. **C:** A WT típusú mikroglia sejtek áramerősség-feszültség görbéinek átlaga normotóniás (N= 11 sejt, fekete, átlag±SEM) és hipotóniás (N=8 sejt, szürke, átlag±SEM) körülmények között. **D:** A KO mikroglia sejtek áramerősség-feszültség görbéinek átlaga normotóniás (N= 11 sejt, sötét lila, átlag±SEM) és hipotóniás (N=8 sejt, világos lila, átlag±SEM) körülmények között. Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO.

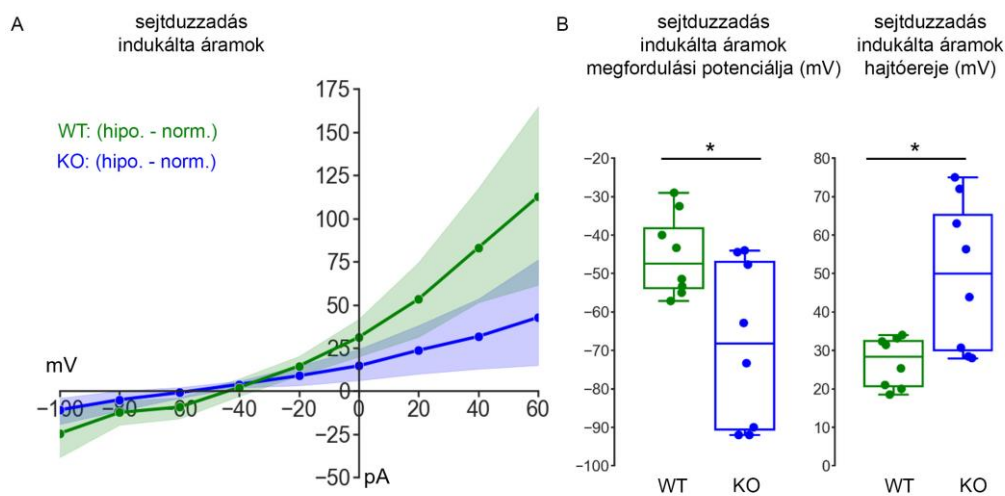
A normotóniás és a hipotóniás közegben felvett görbék meredeksége egyaránt azt mutatja, hogy -40 mV - 0 mV között a KO mikroglia sejtek bemenő ellenállása szignifikánsan nagyobb volt vad a típushoz képest (normotónia, WT: $1,91$ G Ω , q1: $1,71$, q3: $2,38$ vs. KO: $3,00$ G Ω , q1: $2,20$, q3: $4,50$; Mann–Whitney, $p < 0,05$, q1: alsó kvartilis, q3: felső kvartilis); hipotónia, WT típus: $0,78$ G Ω , q1: $0,66$, q3: $1,11$ vs. KO: $2,47$ G Ω , q1: $0,94$, q3: $4,25$; Mann–Whitney, $p < 0,05$; 26. ábra, A-B). A vad típusú és a KO mikroglia sejtek nyugalmi membránpotenciáljában azonban nem találtunk szignifikáns különbséget (WT: -20 mV, q1: -21 , q3: -18 vs. KO: -19 mV, q1: -26 , q3: -17 ; Mann–Whitney, nem szignifikáns, q: kvartilisek; 26. ábra, C).



26. ábra: NKCC1 hiány hatására a mikroglia sejtek bemenő ellenállása megnövekedett, míg a sejtmembrán nyugalmi potenciálja változatlan maradt.

A: A WT és a KO mikroglia sejtek bemenő ellenállása normotóniás körülmények között ($N_{WT} = 11$ sejt, 8 állatból; $N_{KO} = 11$ sejt, 7 állatból; Mann-Whitney teszt, *: $p < 0,05$). **B:** A WT és a KO mikroglia sejtek bemenő ellenállása hipotóniás körülmények között ($N_{WT} = 8$ sejt, 6 állatból; $N_{KO} = 8$ sejt, 5 állatból; Mann-Whitney teszt, *: $p < 0,05$). **C:** A WT és a KO mikroglia sejtek nyugalmi membránpotenciálja normotóniás körülmények között 0 pA áramerősség mellett mérve ($N_{WT} = 10$ sejt, 8 állatból; $N_{KO} = 11$ sejt, 7 állatból; Mann-Whitney teszt, a box plotok a median értékeket és a kvartiliseket ábrázolják). Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO

Hogy el tudjuk választani, hogy melyek a duzzadás által indukált áramkomponensek, a hipotóniás áramerősség értékekből kivontuk a normotóniás körülmények között mért áramerősség értékeket (27. ábra, A). Az így kapott áramerősség- feszültség görbék azt mutatják, hogy a megfordulási potenciál (E_{swell} , a Cl^- egyensúlyi potenciáljának durva becslése) jóval negatívabb a KO sejtekben (WT: -47 mV, q1: -53 , q3: -38 vs. KO: -68 mV, q1: -91 , q3: -46 ; Mann–Whitney, $p < 0,05$; 27. ábra, B). Mivel a megfordulási és a nyugalmi membránpotenciálok esetében az egyedi mérési pontok nagyon variábilisek voltak, ún. hajtóerőt (driving force, $\text{DF} = V_{\text{rest}} - E_{\text{swell}}$, V_{rest} : nyugalmi membránpotenciál) számoltunk (27. ábra, B), mely jobban jellemzi az ionáramlás irányát mint a megfordulási potenciál (Kaila és mtsai., 2014a). Azt találtuk, hogy a hajtóerő a mikroglialis NKCC1 KO sejtek esetében szignifikánsan nagyobb, mint a vad típusban (vad típus: 28 mV, q1: 21 , q3: 33 vs. KO: 50 mV, q1: 30 , q3: 65 ; Mann–Whitney, $p < 0,05$; 27. ábra, B), melyet a KO sejtek alacsonyabb intracelluláris Cl^- koncentrációja támaszthat alá.



27. ábra: A mikroglialis NKCC1 deléció a sejtduzzadás által indukált áramok megfordulását hiperpolarizált irányba tolta el.

A: A sejtduzzadás által indukált áramokat az áramerősség-feszültség görbék ábrázolják, melyeket a hipotóniás körülmények között mért értékekből a normotóniás értékeket kivonva kaptunk (átlag \pm SEM). **B:** A sejtduzzadás által indukált áramok mért megfordulási potenciálja és hajtóereje vad típusú (zöld) és a KO (kék) mikroglia sejtekben. (N=8-8 sejt, Mann-Whitney, a box plotok a median értékeket és a kvartiliseket ábrázolják). Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, norm.: normotóniás, hipo.: hipotóniás

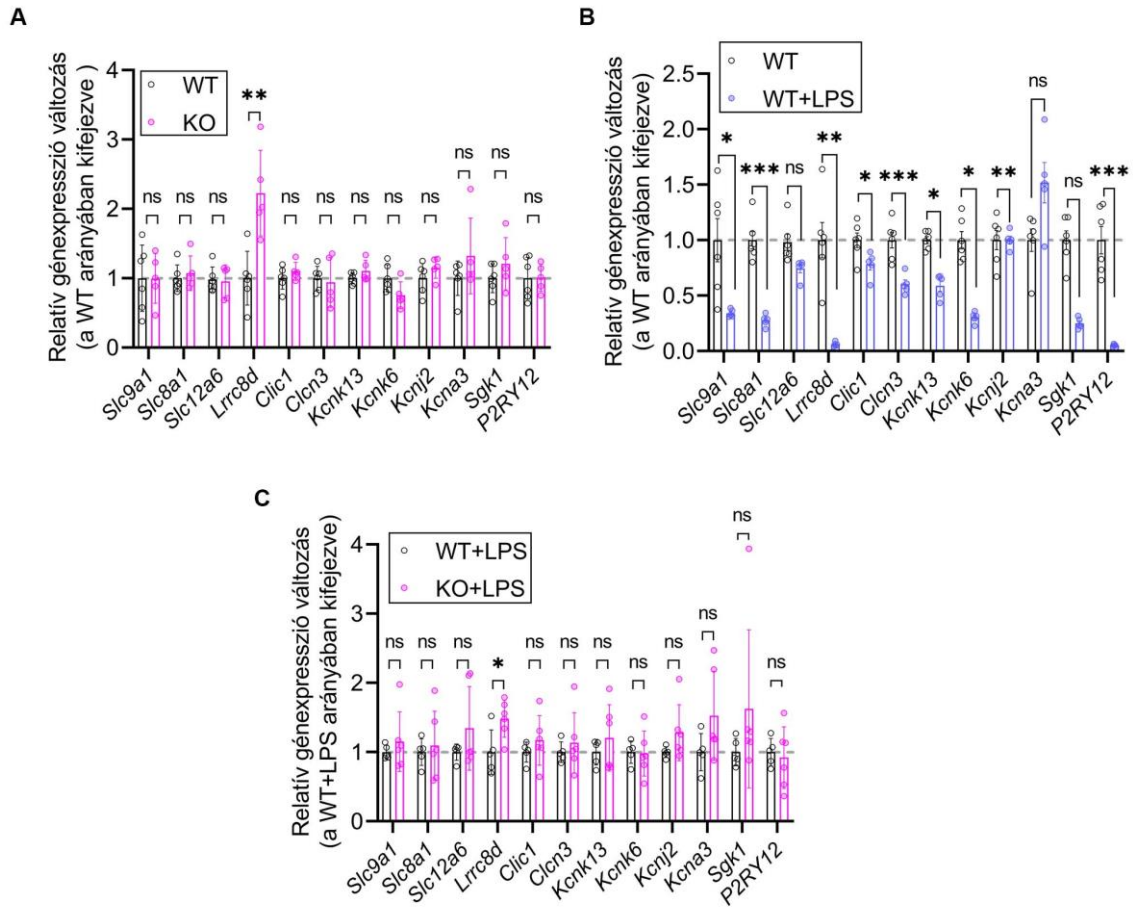
4.9. A mikroglialis NKCC1 hiány hatására fellépő kompenzációs mechanizmusok vizsgálata

Annak felderítésére, hogy az NKCC1 hiány hatására fellépnek-e kompenzációs mechanizmusok, megvizsgáltuk számos, a mikroglia sejtek által expresszált és az intracelluláris ionkoncentrációk szabályozásában, a membránpotenciál kialakításában vagy az ozmotikus stresszre adott válaszokban részt vevő gén expresszióját (lásd 4. táblázat), felnőtt agyból akután izolált mikroglia sejtekben (mágnegyöngyös mikroglia szeparáció, lásd, mint korábban; 28. ábra). A vizsgált gének mRNS-ei közül az *Slc9a1*, *Slc8a1*, *Slc12a6*, *Clic1*, *Cln3*, *Kcnk13*, *Kcnk6*, *Kcnj2*, *Kcna3*, és *Sgk1* (a kódolt fehérje nevét és funkcióját lásd a 4. táblázatban) expressziójában nem találtunk különbséget a vad típusú és az NKCC1 KO mikroglia sejtek között, viszont az *Lrrc8d* (a térfogat által szabályozott VRAC anioncsatorna D alegysége) szintje kétszeresére nőtt NKCC1 deléció hatására (28. ábra, A).

Mindezek mellett fontos megjegyezni, hogy intraciszternális LPS kezelés hatására jelentős csökkenést tapasztaltunk az NKCC1 és a P2Y12R mRNS szintekben (17. ábra), és hasonló downregulációt figyeltünk meg intraciszternális LPS kezelés hatására a vad típusú mikroglia sejtekben a *Slc9a1*, *Slc8a1*, *Lrrc8d*, *Clic1*, *Cln3*, *Kcnk13*, *Kcnk6*, *Kcnj2*, *Sgk1* gének esetében is (28. ábra, B). Ezen gének közül az *Slc9a1*, *Clic1*, *Kcna3*, *Kcnj2*, *Kcnk13* fiziológiai körülmények között a ramifikált mikroglia morfológia és a nyugalmi állapot fenntartásában játszanak szerepet (Tang és mtsai., 2017; Madry és mtsai., 2018b; Izquierdo és mtsai., 2019; Luo és mtsai., 2021). Továbbá nem találtunk különbséget a vad típusú és a KO sejtekben a vizsgált gének expressziójában LPS kezelést követően sem, habár az *Lrrc8d* expressziója KO mikrogliaiban szintén magasabb volt a vad típushoz képest (28. ábra, C). Az LRRC8D a VRAC csatorna egyik alegysége, melyről leírták, hogy számos, töltéssel nem rendelkező ozmolit transzportját mediálja (Chen és mtsai., 2020). Ez a funkció releváns lehet olyan sejtek esetében, melyeknek alternatív sejttérfogat-szabályozási megoldásokra van szükségük a kiesett ion-transzport mechanizmusok kompenzálására.

4. táblázat: A vizsgált gének és funkciójuk. A mikroglialis NKCC1 hiány kompenzációs mechanizmusainak feltárása céljából a táblázatban szereplő, mikroglia sejtek által expresszált, az intracelluláris ionkoncentrációk szabályozásában, a membránpotenciál kialakításában és az ozmotikus térfogatszabályozásban szerepet játszó gének mRNS szintjét vizsgáltuk meg.

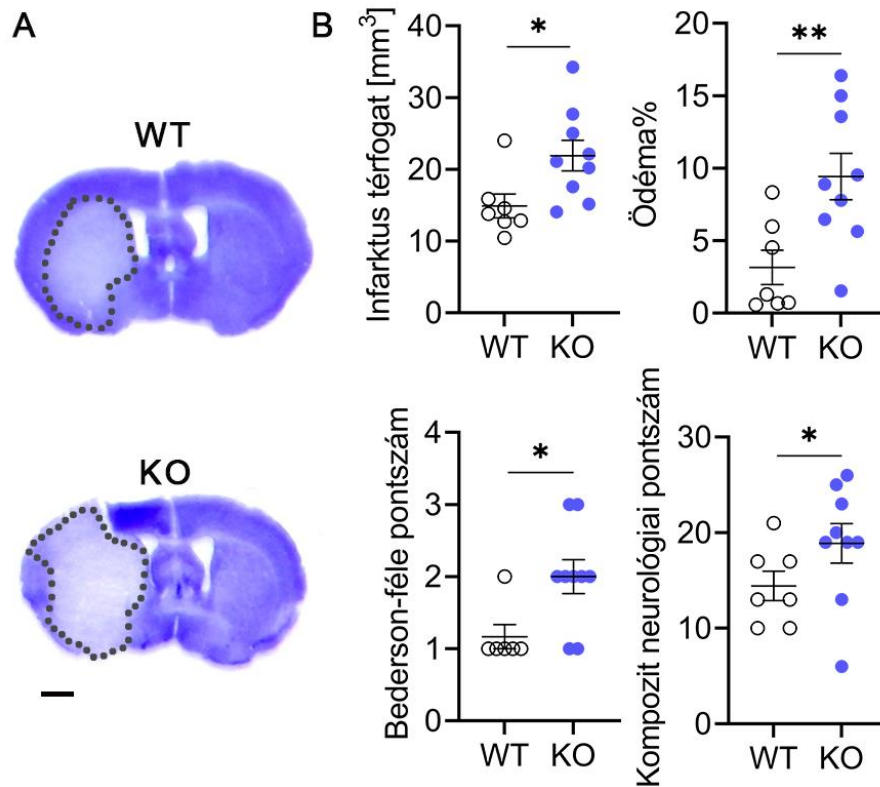
Gén	Név és funkció	Hivatkozások
<i>Slc9a1</i>	NH1E, Na ⁺ /H ⁺ exchanger, Na ⁺ /H ⁺ ioncserélő	(Bennett et al, 2016, Luo et al, 2021)
<i>Slc8a1</i>	NCX1, Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger, Na ⁺ /Ca ²⁺ ioncserélő	(Bennett et al, 2016, Luo et al, 2021)
<i>Slc12a6</i>	KCC3, K ⁺ -Cl ⁻ kotranszporter, klorid transzmembrán transzport	(Bennett et al 2016, Huang et al, 2019,)
<i>Lrrc8d</i>	VRAC D alegység, térfogat-szenzitív anion csatorna aktivitás	(Chen et al, 2020, Luo et al, 2021)
<i>Clic1</i>	intracelluláris klorid csatorna 1, plazmamembrán konduktancia	(Tang et al, 2017, Luo et al, 2021)
<i>Cln3</i>	H ⁺ /Cl ⁻ exchange transporter 3, feszültségfüggő kloridcsatorna aktivitás	(Zhang et al, 2014, Bennett et al, 2016)
<i>Kcnk13</i>	THIK-1, két pórusdoménnel rendelkező káliumcsatorna	(Madry et al, 2017, Izquierdo et al, 2018)
<i>Kcnk6</i>	TWIK-2, két pórusdoménnel rendelkező káliumcsatorna	(Madry et al, 2017, Izquierdo et al, 2018)
<i>Kcnj2</i>	Kir2.1, befelé rektifikáló káliumcsatorna aktivitás	(Nguyen et al, 2017, Izquierdo et al, 2018)
<i>Kcna3</i>	Kv1.3, feszültségfüggő káliumcsatorna aktivitás	(Nguyen et al, 2017, Izquierdo et al, 2018)
<i>Sgk1</i>	serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1, szerin-treonin kináz, sejtterefogat szabályozás	(Zhang et al, 2014, Bennett et al, 2016)
<i>P2RY12</i>	G-fehérje kapcsolt purinerg receptor	(Madry et al, 2017, Izquierdo et al, 2018, Luo et al, 2020)



28. ábra: A mikroglialis NKCC1 hiány és az LPS kezelés hatása a vizsgált ioncsatornák, transzporterek és ion kicserélők mRNA expressziós szintjére. A: A 4. táblázatban felsorolt, vizsgált csatornák és transzporterek mRNA expressziós szintje nem változott meg az NKCC1 KO mikrogliaiban. Ugyanakkor, az *Lrrc8d* mRNA szintje kétszeres növekedést mutatott az NKCC1 KO mikrogliaisejtekben (kétmintás t-próba, $N_{WT}=6$, $N_{KO}=5$, **: $p<0,01$, átlag \pm SEM). **B:** A WT típusú mikrogliaiban az *Slc9a1*, *Slc8a1*, *Lrrc8d*, *Clic1*, *Clcn3*, *Kcnk13*, *Kcnk6*, *Kcnj2*, *Sgk1* gének mRNA expressziója szignifikánsan csökkent 24 órával a ciszterna magnális LPS kezelést követően (kétmintás t-próba, $N_{WT}=6$, $N_{WT+LPS}=5$, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, *** $p<0,001$, átlag \pm SEM). **C:** A WT és az NKCC1 KO mikroglia a vizsgált gének mRNA expressziójában nem mutatott különbséget LPS kezelést követően (kétmintás t-próba $N_{WT+LPS}=5$, $N_{KO+LPS}=6$, *: $p<0,05$, átlag \pm SEM). Rövidítések: kor.: intrakortikális, WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, LPS: lipopoliszacharid, ns: nem szignifikáns. Az ábrán szereplő gének által kódolt fehérjék nevét és funkcióját a 4. táblázat tartalmazza.

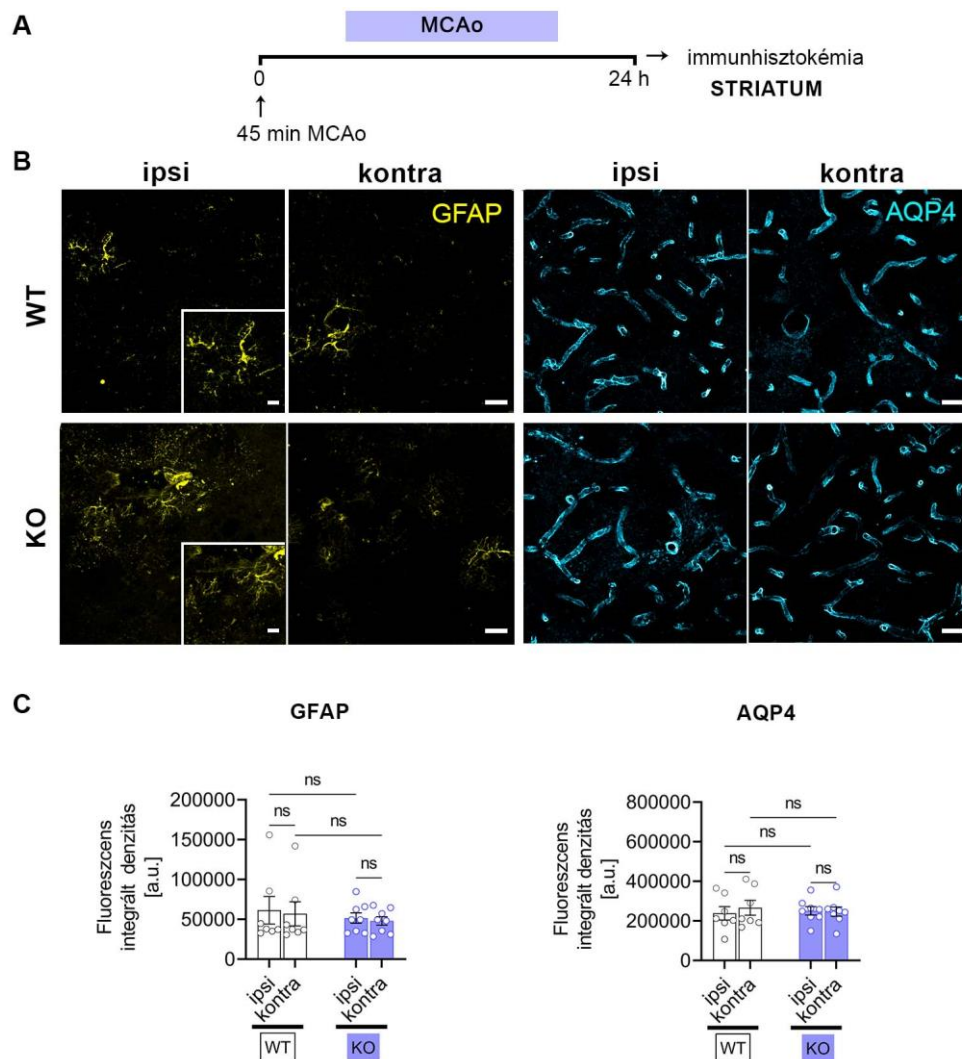
4.10.A mikrogliális NKCC1 deléció nagyobb infarktus méretet és rosszabb neurológiai kimenetelt eredményez cerebrális ischaemiát követően

Ismert, hogy a Na⁺-kapcsolt Cl⁻ transzporterek és az őket upstream szabályozó szerin-treonin kinázok (a WNK/lizin nélküli kinázok, a SPAK/Ste20-szerű prolinban és alaninban gazdag kináz, és az OXSR1/oxidatív stresszre aktiválódó kináz 1), részt vesznek az intracelluláris ionhomeosztázis fenntartásában és a sejttérfogot szabályozásában (Russell, 2000; Huang és mtsai., 2019b). Ennek megfelelően a Na⁺-Cl⁻ kotranszporterek potenciális terápiás célpontokként kerültek előtérbe olyan kórképek esetében, melyekben az agyi ödéma az egyik legfőbb súlyosbító tényező. Ilyenek például az ischaemiás stroke és más akut agyi sérülések (pl. traumás agysérülés, subarachnoideális vérzés) (Russell, 2000; Huang és mtsai., 2019b). Ezért a következőekben megvizsgáltuk, hogy a mikrogliális NKCC1 hiány hogyan befolyásolja a kísérletesen kiváltott stroke súlyosságát az ideiglenes (45 perc) arteria cerebri media elzárást (MCAo) követően. MCAo-n átesett egerek agyából származó krezil-ibolyával jelölt koronális agyszeletekből határoztuk meg az infarktus kiterjedését és a kialakult agyi ödéma méretét (29. ábra, A). A KO állatokban jóval nagyobb agyi ödémát és 47%-kal nagyobb infarktus méretet figyeltünk meg, melyekhez súlyosabb neurológiai állapot is társult (29. ábra, B; Bederson teszt pontszáma: WT: 1,17±0,17, KO: 2,0±0,24; Kompozit neurológiai teszt pontszáma: WT: 14,9±1,65, KO: 21,9±2,12, átlag±SEM). A mikrogliális NKCC1 tehát a direkt agyi gyulladáson (LPS) stimulusra adott válaszreakció nagymértékű befolyásolása mellett komoly szabályozó hatást fejt ki kísérletes stroke esetén is, s hiánya jelentős állapotromláshoz vezet.



29. ábra: A mikroglialis NKCC1 deléció esetében az MCAo nagyobb agyi sérülést, agyi ödémát és súlyosabb neurológia tüneteket eredményezett. **A:** A WT és KO MCAo-n átesett egerek agyából származó krezil-ibolyával jelölt koronális agyszeleteken a pontozott vonalak a sérült, vérrellátásból kiesett területet jelölik. Lépték: 1 mm **B:** Az infarktus és ödéma mérete a KO állatokban szignifikánsan nagyobb a WT-hoz viszonyítva, valamint az MCAo súlyosságát vizsgáló neurológiai tesztek alapján a mikroglialis NKCC1 hiány esetében súlyosabb neurológiai tüneteket mutattak az állatok (kétmintás t-próba, $N_{WT}=7$, $N_{KO}=9$, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, átlag \pm SEM). Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, MCAo: arteria cerebri media elzárása

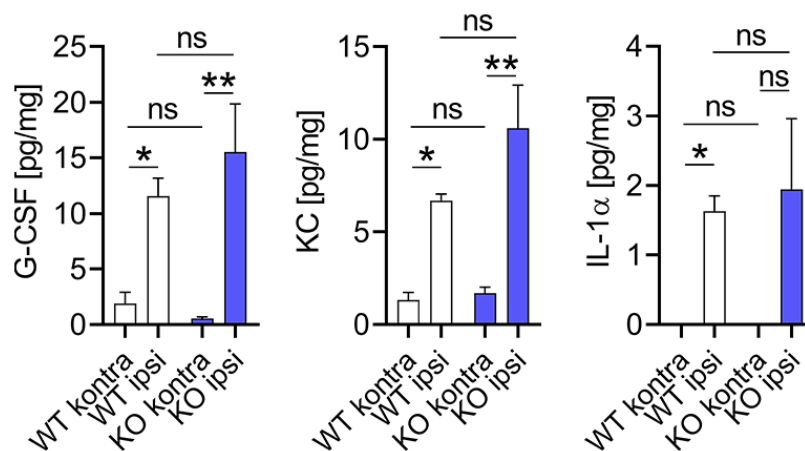
A reperfüzió után 24 óra múlva fixált agyszöveteken a mikroglialis NKCC1 hiány mellett nem figyeltünk meg szembetűnő eltérést sem az asztroglialis GFAP (glia fibrilláris savas protein) fluoreszcens jelben, sem a perivaszkuláris asztrociták végtalpainak jelölésére szolgáló AQP4 (akvaporin-4) jelben a WT kontroll szövetekhez képest, mely irodalmi adatokkal összhangban jelezte, hogy ebben a korai időpontban a reaktív gliózis még nem meghatározó eleme az agyi sérülésnek (Begum és mtsai., 2018; Rakers és mtsai., 2019) (30. ábra).



30. ábra: A mikroglialis NKCC1 deléció nem befolyásolta a GFAP és az AQP4 kifejeződést az asztrogliaiban illetve a perivaszkuláris asztroglia végtalpakban.

A-B: A konfokális képeken az asztroglialis GFAP (sárga) és az asztroglia végtalpakban az AQP4 (cián) expressziója látható az ipsilaterális illetve a kontralaterális agykérgi területeken 24 órával az MCAo-t követően (Lépték: 25

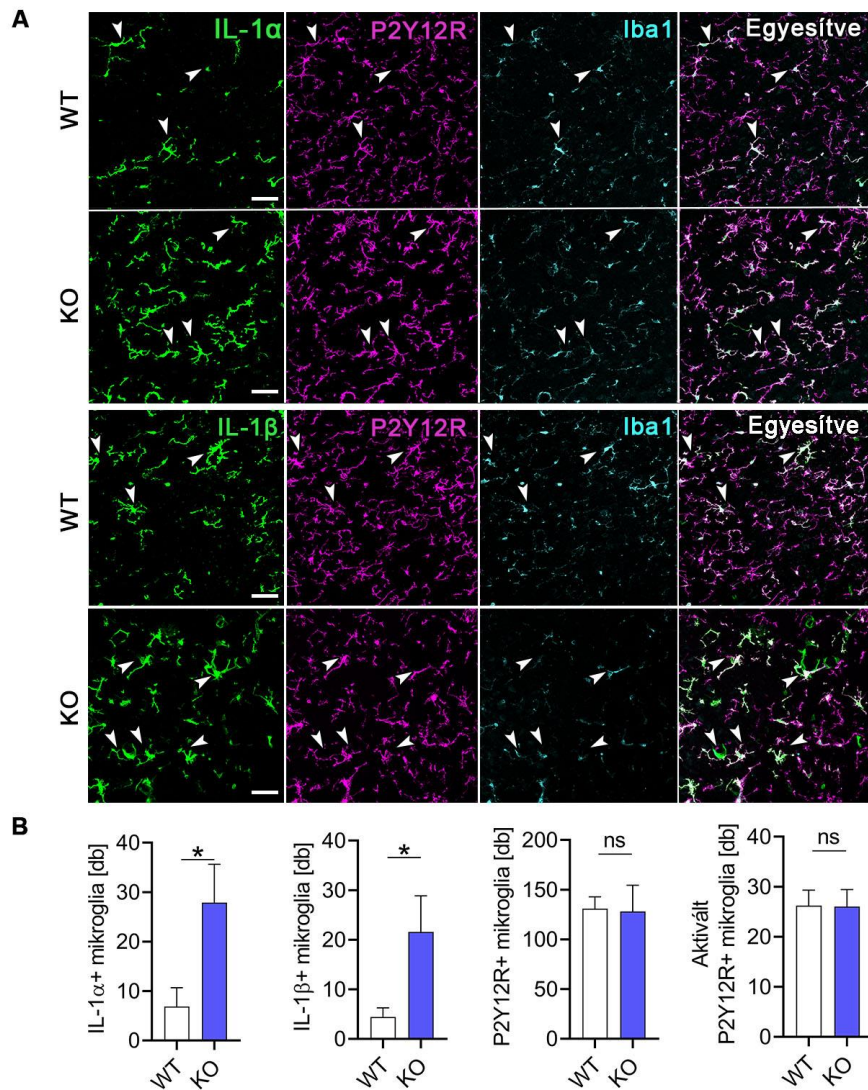
μm). **C:** A fluoreszcens jel integrál denzitása nem mutatott szignifikáns különbséget sem az GFAP, sem az AQP4 esetében (Egyutas-ANOVA-t követően Holm-Sidak féle *post hoc* tesztet alkalmaztunk a statisztikai szignifikanciaszint meghatározására; $N_{\text{WT}}=7$ $N_{\text{KO}}=8$ egér, 3-3 szelet/állat, átlag \pm SEM). Rövidítések: AQP4: akvaporin-4, GFAP: glia fibrilláris savas protein, kontra: kontralaterális, ipsi: ipsilaterális, WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, MCAo: arteria cerebri media elzárása, ns: nem szignifikáns.



31. ábra: A mikroglialis NKCC1 deléció hatása az agyi citokin termelésre MCAo-t követő 8 órás reperfúzió esetében. A statisztikai szignifikancia szintet Kruskal-Wallis próbát követő Dunn-féle *post hoc* teszt segítségével állapítottuk meg, $N=6$ állat/csoport, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, átlag \pm SEM. Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, G-CSF: granulocita kolónia-stimuláló faktor, KC: keratinocita kemoattraktáns. IL-1 α : interleukin-1 α , kontra: kontralaterális, ipsi: ipsilaterális, ns: nem szignifikáns.

További méréseinkben megvizsgáltuk az IL-1 α és IL-1 β termelés mértékét az MCAo utáni korai (8 órás) időpontban. A 8 órás túlélést követően az agyhomogenizátumokból citometrikus bead array segítségével végzett mérés eredménye nem mutatott különbséget a citokin szintekben a mikroglialis NKCC1 KO és vad típusú állatok ipsilaterális striátumából származó mintáiban (31. ábra), míg az MCAo hatására megnövekedett citokin termelés mind a vad típusú mind a KO állatok esetében szignifikánsan különbözik

az ipsilaterális vs. kontralaterális mintákban (31. ábra). Ugyanakkor 24 órával a kísérletes stroke után az IL-1 α - illetve IL-1 β - termelő mikroglia sejtek száma jelentősen megnövekedett a mikroglialis NKCC1 KO állatokban (4-szeres ill. 4,8-szoros emelkedés), míg az átlagos mikroglia denzitás (P2Y12R pozitív mikroglia sejtek száma) és az aktivált mikroglia sejtek mennyisége nem különbözött a vad típustól (32. ábra, A-B). A mikroglialis NKCC1 hiány egyik következménye tehát a kísérletes stroke hatására bekövetkező fokozott interleukin termelés, mely hozzájárul az ischaemiás stroke extrém súlyosságához és rossz kimeneteléhez a mikroglialis NKCC1 KO állatokban.



32. ábra: A mikroglialis NKCC1 deléció megnövekedett IL-1 α és IL-1 β termelést eredményezett a mikroglia sejtekben 24 órával az MCAo után. A: A KO és a WT alomtestvér, MCAo-n átesett egerek agyszeleteiről készült konfokális felvételeken az IL-1 α (lásd a felső két sorban) és IL-1 β pozitív (lásd az alsó két sorban) mikroglia sejteket jelölik a fehér nyílhegyek (Lépték:50 μ m). **B:** A mikroglialis NKCC1 deléció hatására az MCAo-t követően 24 órával megnövekedett az IL-1 α és IL-1 β pozitív mikroglia sejtek száma (db/látótér), míg sem az összes, sem az aktivált mikroglia mennyiségében (db/látótér) nem történt változás a WT-hoz képest (Mann-Whitney-próba, *: $p < 0,05$; $N_{WT}=7$, $N_{KO}=9$, átlag \pm SEM). Rövidítések: WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, Iba1: ionizált kalcium kötő adapter molekula 1, IL-1 α : interleukin-1 α , IL-1 β : interleukin-1 β , ns: nem szignifikáns.

5. Megbeszélés

Az NKCC1 kation-klorid transzportert a központi idegrendszer számos sejtje expresszálja, idegsejtekben és nem-neurális sejtekben (asztroglóban, oligodendroglóban, ér endotélben) egyaránt megtalálható. A transzporter egyre inkább az érdeklődés középpontjába került olyan gyakori, a központi idegrendszert érintő betegségek kutatásában, mint a különböző neuropszichiátriai kórképek, az epilepszia, a stroke vagy a demencia (Huberfeld és mtsai., 2007; Kaila és mtsai., 2014a, 2014b; Shekarabi és mtsai., 2017; Schulte és mtsai., 2018; Huang és mtsai., 2019b). Ezeknek a tanulmányoknak egy jelentős részében az NKCC1 mRNS és fehérje expresszió növekedését és az NKCC1 működésével kapcsolatos megfigyeléseket a sérült idegsejtekhez kapcsolódóan írták le, és potenciális neurofarmakológiai célpontként kezdték azonosítani különböző neuropatológiai kórképek vonatkozásában (Ben-Ari, 2017; Kharod és mtsai., 2019; Savardi és mtsai., 2021). Az NKCC1 gátlószereként a leggyakrabban a széles körben elterjedt, eredetileg kacsdiuretikum bumetanidot és analógjait szisztémás úton alkalmazzák az újszülöttkori görcsrohamok, temporális lebeny epilepszia, autizmus spektrum zavar, skizofrénia és traumatikus vagy hipoxiás/ischaemiás agyi sérülések okozta ödéma kezelésével kapcsolatos preklinikai és klinikai kutatásokban (Lemonnier és mtsai., 2012; Löscher és mtsai., 2013; Töllner és mtsai., 2015; Kaila és mtsai., 2014a, 2014b; Puskarjov és mtsai., 2014; Töllner és mtsai., 2014; Ben-Ari, 2017; Römermann és mtsai., 2017; Huang és mtsai., 2019b; Kharod és mtsai., 2019). Ahogy azt a Bevezetés *Az NKCC1 antagonisták terápiás alkalmazási lehetőségei különböző agyi kórfolyamatokban* című fejezetében részleteztem, a bumetanid farmakodinamikai és farmakokinetikai tulajdonságainak ismeretében *in vivo* centrális hatása kapcsán számos kérdés felvetődik, habár a legtöbb tanulmány a bumetanid terápiás hatását arra a feltételezésre alapozza, hogy a szisztémásan bejuttatott bumetanid közvetlenül az idegsejteken gátolja az NKCC1-et. Ismert, hogy a bumetanid a vér-agy gáton keresztül csak igen kis mértékben penetrál az agyi parenchimába, ezért a klinikai vizsgálatokban alkalmazott dózis nem éri el az agyi sejteket olyan koncentrációban, amely kísérletesen hatásosnak bizonyult (Puskarjov és mtsai., 2014; Töllner és mtsai., 2015; Römermann és mtsai., 2017). Továbbá a bumetanid centrális

hatásának vizsgálatakor fontos tényező az is, hogy az NKCC1 a fejlődő és az érett idegrendszerben egyaránt nagy mennyiségben expresszálódik nem-neuronális sejttípusokon is (Virtanen és mtsai., 2020), mint például az oligodendroglán és prekursorain (Wang és mtsai., 2003; Yu és mtsai., 2018), ependima sejteken és asztroglán (Su és mtsai., 2002; Zhang és mtsai., 2014; Noor és mtsai., 2019; Henneberger és mtsai., 2020), ezért a szisztémásan alkalmazott NKCC1 inhibitorok idegsejt-specifikus hatásáról pontos következtetéseket nem lehet levonni.

Az NKCC1 farmakológiai gátlásának gyulladással járó folyamatokra kifejtett centrális és perifériás hatása vizsgálatához bakteriális endotoxin (LPS) indukálta citokin válaszokat követtük nyomon. Az LPS által indukált agyi gyulladással járó citokinek/kemokinek termelődését a szisztémásan (intraperitoneálisan) bejuttatott bumetanid csökkentette. Hung és mtsai. bumetanid jelenlétében hasonló csökkenést tapasztaltak a gyulladással járó faktorok szintjében az LPS által aktivált tüdő makrofágok esetében is (Hung és mtsai., 2020). A szisztémás bumetanid kezelésekből kapott eredményünk alapján az NKCC1 farmakológiai gátlásának jótékony hatása jelenik meg gyulladással járó körülmények mellett, mely egybecseng számos KIR-t érintő betegség NKCC1 antagonistával történő kezelése során megfigyelt terápiás hatásaival (Löschner és mtsai., 2013; Kaila és mtsai., 2014a; Puskarjov és mtsai., 2014; Töllner és mtsai., 2014; Lemonnier és mtsai., 2016; Ben-Ari, 2017; Römermann és mtsai., 2017; Kharod és mtsai., 2019). Fontos megjegyezni, hogy a bumetanid centrális (intrakortikális) alkalmazásakor a szisztémás beadásnál megfigyelt csökkenéshez képest ellenkező irányú változást, növekedést tapasztaltunk a proinflammatorikus citokin/kemokin szintekben. A szisztémás és centrális bumetanid hatás éles ellentéte jól mutatja azt, hogy az NKCC1 analógok terápiás szerként való alkalmazásának hatásosságára mindaddig nehéz pontos választ adni, amíg *in vivo* adatok nem állnak rendelkezésre az NKCC1 sejtspecifikus gátlásának hatásairól, akár perifériásan, akár a központi idegrendszeren belül.

Ismert, hogy a gyakori neurológiai kórképek egyik közös jellemzője a gyulladás, ezeknek a kórképeknek egy részében az NKCC1 aktivitás változását is leírták (Kaila és mtsai., 2014a; Ben-Ari, 2017; Schulte és mtsai., 2018). Mivel a gyulladással járó faktorok fő forrása az agyban a mikroglia, szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a mikroglialis NKCC1 működés befolyásolható-e az aktivált mikroglia sejtekre jellemző citokin termeléssel. Az NKCC1 mRNS expresszióját mikrogliaiban transzkriptomikai elemzések leírják, de a

fehérje jelenléte, az NKCC1 fiziológias és patofiziológias működése és élettani szerepe e sejttypusban ezidáig feltáratlanok maradtak. Az NKCC1 expresszió növekedése és a mikroglia-sejtek aktivációja/citokin termelése közötti kapcsolatról kevés információ áll a rendelkezésünkre, habár néhányan az NKCC1 nem sejt-specifikus upregulációját írták le az agyban különböző gyulladásos stimulusok (LPS, IL-1 β , TNF- α) hatására (Huang és mtsai., 2014; Pozdeev és mtsai., 2017; Weidenfeld és Kuebler, 2017). A génexpressziós vizsgálatainkból megállapítottuk, hogy mind az újszülött, mind a felnőtt egér agyból izolált mikroglia-sejtekben az *Slc12a2* szintje összevethető a neuronális progenitor sejteken mért szintekkel, mely eredményeket a korábbi transzkriptomikai vizsgálatokból származó adatok is megerősítik. Továbbá a kérgi mikroglia-sejtek membránjában az NKCC1 fehérjét immunfluoreszcensen is azonosítottuk. Eredményeinket támogatja, hogy az NKCC1 jelenlétét korábban Javdani és mtsai. patkány gerincvelő hátsó szarvának szuperficiális rétegének mikroglia-sejtjein kimutatták (Javdani és mtsai., 2020). Megmutattuk, hogy LPS stimulus hatására mikroglia-sejtekben az NKCC1 expresszió jelentős mértékben csökken, és hasonló csökkenést kaptunk a mikroglia sejt-sejt kapcsolatainak szabályozásában fiziológias és patológias körülmények között egyaránt fontos purinerg receptor, a P2Y₁₂R esetében is, valamint több, az ion-homeosztázis fenntartásában szerepet játszó iocsatorna/transzporter esetében is. Mindezekből arra következtethetünk, hogy az NKCC1 aktivitás csökkenése része a mikroglia funkcionális modalitás váltásának (Koizumi és mtsai., 2013) és szükséges a mikroglia-sejtek sérülésre vagy gyulladásos stimulusokra adandó válaszreakcióihoz.

Az új, mikroglialis NKCC1 KO transzgen egérvonal létrehozásával lehetőségünk nyílt az NKCC1 mikroglialis működésben (morfológia, aktiváció, citokin termelés, nyúlvány motilitás, fagocitózis) betöltött szerepének vizsgálatára. Megvizsgáltuk, hogy az NKCC1 hiány befolyásolja-e mikroglia-sejtek morfológiáját, és azt találtuk, hogy a NKCC1 hiány esetében nyugalmi állapotban a mikroglia-sejtek több nyúlvánnyal rendelkeztek, mint a vad típusú kontroll sejtek. Emellett *in vivo* két-foton mikroszkópiás vizsgálatok során kimutattuk, hogy a mikroglia-nyúlványok nyugalmi motilitása megemelkedett, valamint a nyúlványoknak sérülést követően a lézió irányába történő kinyújtása markánsan csökkent az intraciszternálisan alkalmazott bumetanid gátlás alatt. A mikroglia kemotaktikus és fagocitotikus aktivitása során a sérülés irányába történő nyúlvány és sejttest elmozdulásban a P2Y₁₂R szerepe jól ismert (Davalos és mtsai., 2005;

Nimmerjahn és mtsai., 2005), valamint az is, hogy a nyugalmi nyúlvány motilitás fenntartásában a tónusosan aktív THIK-1 vesz részt (Madry és mtsai., 2018b), továbbá a P2Y13R hiánya a ramifikált állapotot és a nyugalmi nyúlvány motilitást csökkenti (Kyrargyri és mtsai., 2020). Eredményeink azt sugallják, hogy az NKCC1 transzporter szintén részt vesz a mikroglia nyúlványok irányított növekedésének és kinyúlásának szabályozásában. Ugyancsak alátámasztják ezt a lehetőséget azok az adatok, mely szerint az NKCC1 Cofilin-1-en és a RhoGTPáz-on keresztül részt vesz a migrációt meghatározó aktin citoskeleton dinamika szabályozásában, glioblastóma sejtekben (Schiapparelli és mtsai., 2017; Ma és mtsai., 2019). Mindent összevetve, ahogy az korábban is felmerült, a bumetanid centrálisan a mikroglia kívül más NKCC1-et expresszáló sejtekre (pl. neuronokra, asztroglia) is hathat, így a motilitás vizsgálati kísérletek esetében nem zárhatjuk ki, hogy az NKCC1 gátlásnak a mikroglia sejteken indirekt hatásai is vannak. A kérdést fluoreszcensen jelölt NKCC1 KO mikroglia sejtek motilitási vizsgálatai segíthetnének tisztázni.

Fontos kihangsúlyozni, hogy eredményeink alapján a mikroglia sejtek NKCC1 hiányában még gyulladási stimulus nélkül is magasabb NLRP3 és IL-1 β mRNS expressziót mutattak, mint a kontroll sejtek. Jól ismert a jelentősége a mikroglia sejtek membránpotenciáljának és a membránon keresztüli áramok változásának a térfogat szabályozásban, a nyúlványmozgás dinamikájában és a mikroglia sejtek gyulladási válaszreakcióiban. Madry és mtsai. leírták, hogy a THIK-1 K⁺-csatorna gátlása vagy genetikai deléciója membrán depolarizációt, valamint a ramifikált állapot és nyúlványrendszer elágazásának csökkenését okozta (Madry és mtsai., 2018b, 2018a), míg a kálium- vagy kloridionok kiáramlása az NLRP3 inflammaszóma aktivációjához és az érett IL-1 β termeléséhez szükséges (He és mtsai., 2016; Swanson és mtsai., 2019). Az inflammaszóma aktiváció folyamat nagyon összetett, sok tényezős folyamat. Tüdő makrofágokban a TWIK2 két pórus doménnel rendelkező K⁺ csatornán keresztül a K⁺ kiáramlását írták le, mely az NLRP3 aktivációjához elengedhetetlen (Di és mtsai., 2018). Továbbá a THIK-1 K⁺ csatornát a mikroglia membránpotenciáljának kialakításában a legfontosabb résztvevőnek azonosították (Madry és mtsai., 2018b), habár a THIK-1 mellett a TWIK2 magas expresszióját is leírták a mikroglia sejteken (Zhang és mtsai., 2014; Bennett és mtsai., 2016). Mindezzel összhangban kimutatták, hogy a THIK-1

gátlása az IL-1 β felszabadulást gátolja a mikroglia-sejtekből, melyből az következik, hogy a K⁺ kiáramlás szükséges az inflammaszóma aktivációhoz (Madry és mtsai., 2018b).

Az NLRP3 inflammaszómák elő-aktiválásában (priming) az NKCC1 hiány szerepének meghatározása és az esetlegesen fellépő kompenzációs mechanizmusok feltárása céljából megvizsgáltuk a mikroglialis ion-és térfogatszabályozásban és citokin termelésben részt vevő ioncsatornák és transzporterek expressziójának változását (a releváns hivatkozásokat lásd a 4. táblázatban). Az imént említett, inflammaszóma aktivációban szerepet játszó THIK-1 és TWIK-2 mRNS szintjében nem találtunk változást az NKCC1 hiányos mikrogliaiban, de a térfogat szabályozás szempontjából fontos VRAC D alegysége (*Lrrcd8*) megnövekedett expressziót mutatott. A D alegységnek a töltés nélküli ozmolitek transzportjában tulajdonítanak szerepet (Chen és mtsai., 2020). A D alegység a térfogat csökkentésében vesz részt anélkül, hogy az intracelluláris ionkoncentráció csökkenne (Chen és mtsai., 2020), mely fontos lehet az NKCC1 hiányának következtében valószínűsíthető alacsonyabb intracelluláris anion koncentráció miatt. A VRAC ioncsatornákat alkotó egyéb alegységek szintén fontos szerepet tölthetnek be a mikroglia-sejtek által indukált gyulladási folyamatokban. Az erek simaizomsejtjeiben az LRRC8A alegységet tartalmazó VRAC anioncsatornák például a Nox1-hez (NADPH oxidáz 1) kapcsolódva a szuperoxid képződés szabályozásában és a TNF- α termelésében (Chen és mtsai., 2020; Choi és mtsai., 2021) vesznek részt. Ezek alapján az NKCC1 hiány hatása a mikroglialis ROS képződésre további vizsgálatok tárgyát képezheti.

Az NKCC1 deléció mikroglialis membránpotenciálra kifejtett hatását perforált patch clamp segítségével vizsgáltuk a WT és a mikroglialis NKCC1 KO állatok agyából készített akut hippokampális szeleteken. Azt találtuk, hogy az NKCC1 KO mikroglia-sejtek bemeneti ellenállása mind hipotóniás mind normotóniás körülmények között csaknem kétszerese a WT sejtekben mérthez képest. Továbbá megvizsgáltuk a WT és KO mikroglia-sejtek duzzadás-indukálta áramát is, mely kialakulása főleg a Cl⁻-ra nagy mértékben permeábilis VRAC csatornák működésének tulajdonítanak (Eder és mtsai., 1998; Ducharme és mtsai., 2007; Liu és mtsai., 2013). Az NKCC1 deléció hatására várhatóan csökkenő celluláris Cl⁻ felvétellel (Kaila és mtsai., 2014a) összhangban az E_{swell} szignifikánsan negatívabb volt a KO-ban, mint a WT mikrogliaiban. Ezt a megfigyelést még inkább alátámasztotta az egyes sejtekben a sejtduzzadás által kiváltott áramok

hajtóerejének összehasonlítása, ami magasabb értékeket eredményezett a KO sejtekben. Habár a nyugalmi V_m hajtóereje pozitív (kifelé irányuló áram) volt mindkét genotípus összes sejtjében, ami azt jelzi, hogy az NKCC1 és VRAC mellett valószínűleg egy aktív Cl^- -extruder is jelen van a mikroglia-sejtekben. Adatainkból a megfigyeltekért felelős Cl^- -extrudert azonosítani nem tudjuk, de ismert, hogy a K^+ - Cl^- -kotranszporter (KCC) izoformák, mint például a térfogató-érzékeny KCC1, expresszálódnak a mikroglia-sejtekben (Bhandage és mtsai., 2019). Megjegyzendő, hogy számos sejt-típusban az NKCC1 és a KCC egyidejűleg vesz részt a Cl^- koncentráció szabályozásában (Gillen és Forbush, 1999). Adataink azt mutatják, hogy az NKCC1 KO mikroglia-ban megnövekedett bemeneti ellenállás párhuzamba állítható a duzzadás okozta áram csökkenésével. Sajnos erre a megfigyelt két hatásra mechanisztikus magyarázatunk jelenlegi eredményeink alapján nincs, de feltételezhetően a mikroglia-sejtek NKCC1 delécióhoz történő adaptációját tükrözik, mely kompenzációs változásokat a qPCR vizsgálataink nem tárták fel. Egy ilyen összehangolt adaptív válasz lehet többek között a VRAC-ok és/vagy a K^+ -csatornák downregulációja. Az NKCC1 KO mikroglia-sejtekben VRAC D alegységének upregulációja a károsodott VRAC funkcióra adott kompenzációs válasz lehet, ahogy ezt a KO sejtekben a duzzadással összefüggő vezetőképesség csökkenés sugallja.

A már inflammatorikus stimulus hiányában is magasabb NLRP3 és IL-1 β mRNS szintekkel összhangban az LPS stimulus tovább potenciózta az NLRP3 mRNS szintet a KO mikroglia-sejtekben. Mindemellett az NKCC1 KO állatok cortexében az LPS kezelést követően 24 órával az IL-1 β és más citokinek mennyisége is nagyobb volt, mint a kontroll állatokéban. Fontos megjegyezni, hogy mikroglialis NKCC1 deléció esetében az agykérgi citokin szintekben ugyanazt a hatást tapasztaltuk, mint az NKCC1 bumetaniddal történő farmakológiai gátlásakor. Tehát a bumetanid centrálisan leírt hatásainak jelentős komponense lehet a mikroglialis NKCC1 által mediált válasz.

Az agyat ért akut sérülések során, mint a traumás agysérülés vagy a stroke, a kialakuló gyulladási folyamatokban meghatározó szerepe van a proinflammatorikus citokineknek, legfőképp az IL-1 α és IL-1 β által mediált szignalizációs útvonalaknak (Brough és mtsai., 2011; Lambertsen és mtsai., 2012; Wofford és mtsai., 2019). Kísérletes stroke műtétet követően a mikroglialis NKCC1 KO állatok agyában szignifikánsan (47 %-kal) nagyobb méretű sérülést és az ödéma méretében csaknem háromszoros

növekedést találtunk, mint a vad típusúakban. A mikrogliális NKCC1 hiányában kialakult infarktus méret összevethető a mikroglia eliminációt követően megfigyelt 60%-os infarktus méret növekedéssel (Szalay és mtsai., 2016), mely jól mutatja a mikrogliális NKCC1 funkcionális jelentőségét. A mikrogliasejtek agykéregből történő szelektív eliminációja a neuronális hálózati aktivitás szabályozásának zavarát okozta, mely feltételezhetően a neuroprotektív szerepet betöltő szomatikus purinerg mikroglia-neuron kapcsolatok megszűnésének következménye (Cserép és mtsai., 2020). Eredményeink alapján a továbbiakban érdekes lehet megvizsgálni azt, hogy az eredményeink alapján fontos mikrogliális funkciókban részt vevő NKCC1 mikrogliális hiánya befolyásolja-e a mikroglia-neuron interakciókat, melyekről ismert, hogy a neuronokat ért sérülés esetén a neuronális aktivitás fontos szabályzó (Eyo és mtsai., 2014; Szalay és mtsai., 2016; Badimon és mtsai., 2020; Wu és mtsai., 2020). Eredményeink szerint a mikrogliális NKCC1 hiány hozzájárulhat a súlyosabb neuronális sérülés kialakulásához a megnövekedett IL-1 α és IL-1 β termelés következtében, ahogy az IL-1-által mediált folyamatok jelentőségét korábban már az irodalomban különböző agyi sérülések patofiziológiájával kapcsolatban leírták (Denes és mtsai., 2010; Lambertsen és mtsai., 2012; Brough és mtsai., 2015; Di Paolo és Shayakhmetov, 2016). A citokin szinteket megvizsgálva 24 óra reperfüziót követően jelentős mértékű IL-1 α és IL-1 β expressziót figyelhettünk meg az NKCC1 KO mikrogliasejtekben. Az agyat ért sérülés hatására az NLRP3 inflammaszómális útvonalon, valamint a veleszületett és az adaptív immunválaszban egyaránt fontos NF- κ B-n keresztül történő jelátvitel útján a mikrogliasejtek proinflammatorikus citokin (IL- β , IL-6, TNF- α) termelődése és szekréciója, a reaktív oxigén származékok képződése megnövekszik, amely végső soron neurotoxikus, az idegsejtek apoptózisát idézi elő (Irrera és mtsai., 2020; O'Brien és mtsai., 2020). Gong és mtsai a mikrogliális citokin termelés és az NKCC1 közötti kapcsolatot vizsgálva azt találták, hogy a mikrogliasejtekben agysérülést követően a foszforilált NKCC1 és a foszforilált NF- κ B mennyiségének növekedésével párhuzamosan az IL-1 β , IL-6 és TNF- α termelődése is megnövekedett, és ezt növekedést a bumetanid kezelés mérsékelte (Gong és mtsai., 2021). Összességében ezek az adatok alátámasztják az agyi sérülés hatására bekövetkező inflammáció kialakulásában az NKCC1 jelentőségét, bár a citokin termelésben szerepet játszó pontos mechanizmus még részleteiben nem ismert, feltárása további vizsgálatokat igényel.

A stroke állatkísérletes modelljeiből és humán klinikai esetekből egyaránt ismert jelenség, hogy a sérült agyszövetben a sejtek megduzzadnak és ödéma képződik, mivel stroke-ot követően a sejtek térfogat szabályozása zavart szenved. A folyamat jellemzően a sérülést követő első 24 órában tetőződik (Battey és mtsai., 2014; Yao és mtsai., 2020). Különböző agyi sejttípusokban leírták, hogy agyi ödéma esetén a SPAK/OSR1 kináz útvonal foszforilációja és ezáltal az NKCC1 aktivációja megnövekedett (Russell, 2000; Kahle és mtsai., 2015; Huang és mtsai., 2019b; Wang és mtsai., 2022), és a SPAK kináz inhibitorok, mint a ZT-1 alkalmazása csökkentette a stroke következtében kialakult ödéma méretét (Zhang és mtsai., 2020a). Továbbá ismert, hogy az NKCC1 részt vesz a sejtek térfogatának homeosztatikus szabályozásában (Russell, 2000), ezért bumetaniddal és egyéb antagonistáival történő farmakológiai gátlását potenciális terápiás célpontnak tekintik az ödémával járó ischaemiás vagy traumás agysérülések kezelésében (Huang és mtsai., 2019b). Ischaemiás agysérülést követően az NKCC1 genetikai ablációjának illetve farmakológiai gátlásának protektív hatását figyelték meg neuronokban, asztrogliaiban és az erek endotélsejtjeiben (Kahle és mtsai., 2010). Patkányokon végzett MCAo után a kérgi neuronokban az NKCC1 mennyiség mRNS és fehérje szintű növekedését is leírták (Yan és mtsai., 2001), valamint a NKCC1 nullmutáns egerekben tranzienst ischaemiát követően 40%-kal csökkent a sérült agyféltekében az ödéma mérete a kontrollokéhoz képest (Chen és mtsai., 2005). MCAo után alkalmazott, az NKCC1 inhibitoraival, bumetaniddal, STS5-el vagy STS66-al történő intraperitoneális kezelés egerekben csökkentette az infarktus és az ödéma méretét és a neurológiai tünetek súlyosságát (Huang és mtsai., 2019a). Az ischaemia kezdeti szakaszában a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPáz működés zavarának következtében az idegsejtben excitotikus folyamatok mennek végbe, mellyel párhuzamosan az extracelluláris térben a $[\text{K}^+]_e$ szintje megemelkedik, majd az ischaemiás állapot előrehaladtával a 60 mM-os koncentrációt is elérheti. Magas extracelluláris K^+ koncentráció esetén az asztroglia sejtek a térbeli puffereléssel részt vesznek a kálium felvételében az NKCC1 aktivitásának fokozódása révén és a sejtbe történő K^+ , Na^+ és Cl^- beáramlás mellett víz molekulák beáramlás is történik, mely a sejtek duzzadását okozza (Macvicar és mtsai., 2002; Larsen és mtsai., 2014). Eredményeink azt mutatják, hogy NKCC1 hiány esetében a mikroglia sejtek térfogat szabályozása zavart szenvedett, valamint a citokin termelés jelentősen megnövekedett. Mindezek tükrében a mikroglialis NKCC1 jelentős szerepet tölt be az agyi sérülések során bekövetkező

patofiziológiai folyamatokban, ezért a mikroglialis NKCC1-et és a működéséhez kapcsolódó szignalizációs útvonalakat célzó vizsgálatoknak kiemelkedő klinikai relevanciája is lehet.

6. Következtetések

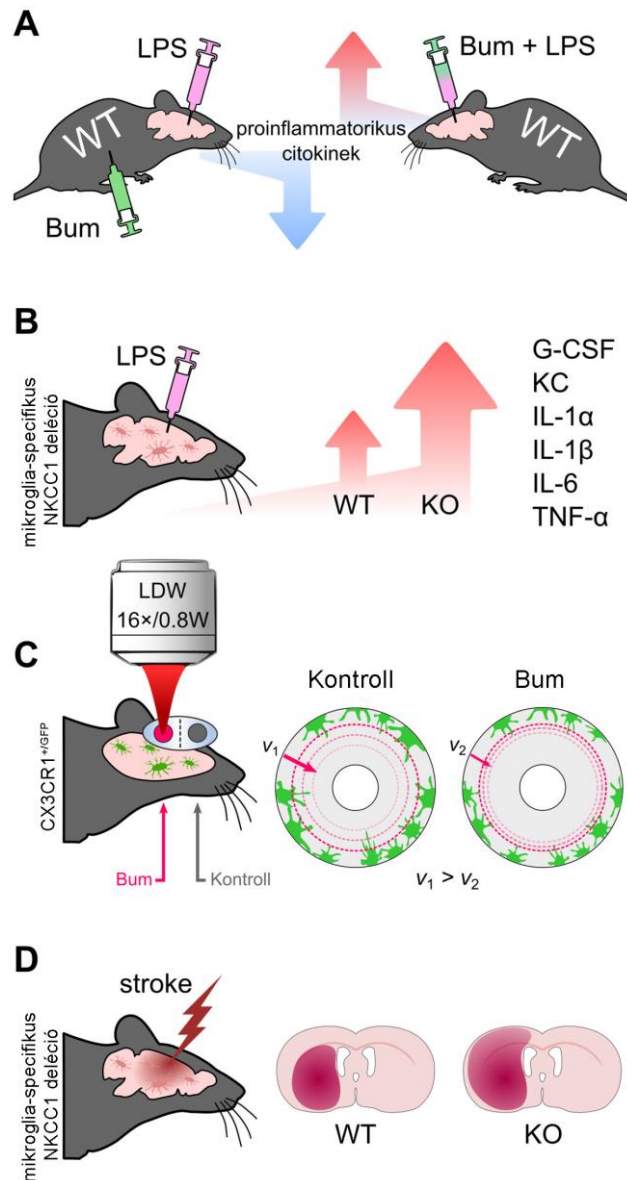
A kísérletek eredményeiből a célkitűzések tükrében levonható főbb következtetéseket az alábbi pontokban szeretném kiemelni:

1. Az NKCC1 a szisztémásan (intraperitoneálisan) vagy centrálisan (intrakortikálisan) bejuttatott bumetaniddal történő farmakológiai gátlása az agykéregbe adott LPS injekcióval kiváltott agyi proinflammatorikus citokinek termelődését ellenkező irányba módosította (33. ábra, A): centrálisan a citokinek termelését növelte, míg szisztémásan csökkentette. Ez az éles ellentét részben magyarázatot adhat a bumetanid terápiás szerként való alkalmazásával kapcsolatban az irodalomban egymásnak ellentmondó és nem konkluzív centrális bumetanid hatásokról. Ezért a bumetanid (és továbbfejlesztett analógjai) terápiás hatásosságának és biztonságosságának megítéléséhez további sejtspecifikus vizsgálatok szükségesek.
2. Az NKCC1 mikrogliaiban betöltött funkciójának vizsgálatára létrehoztunk egy transzgénikus egérvonalat. Az NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 egérben génexpressziós és immunhisztokémiai módszerekkel fehérje szinten is igazoltuk a mikroglia-specifikus NKCC1 deléció sikerességét. Az NKCC1 mikrogliális deléciója megváltozott nyugalmi és aktivált sejt morfológiát, valamint az NLRP3 és a pro-IL-1 β génexpressziós szintjének emelkedését okozta, a mikrogliasejteket egy elő-aktivált („primed”) állapot felé tolta el. Tehát az NKCC1 aktivitás csökkenése vagy hiánya része a mikroglia funkcionális modalitás váltásának és szükséges a mikrogliasejtek sérülésre vagy gyulladáshoz adandó válaszreakcióihoz.
3. Továbbá a mikrogliális NKCC1 hiánya jelentős mértékben potenciózza az LPS indukálta agyi gyulladáshoz vezető folyamatokat, nagy valószínűséggel sejt autonóm módon (33. ábra, B). Tehát a bumetanid centrálisan leírt hatásai között a mikrogliális NKCC1-en kifejtett hatások is megjelennek, melyek különösen fontosak gyulladáshoz vezető folyamatokkal járó körképek esetén.
4. Az NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 és WT alomtársaikból származó akut szeleteken történt perforált patch-clamp mérések eredménye alapján az NKCC1 deléció a

mikroglia membrán megnövekedett bemeneti ellenállását okozta, valamint hiperpolarizáltabb irányba tolta el a duzzadás-indukálta áramok megfordulását. Ezek a megfigyelések valószínűleg a mikroglia sejtek NKCC1 delécióhoz történő adaptációját tükrözik, habár a mögöttük álló pontos mechanizmust nem sikerült feltárnunk.

5. Az NKCC1 centrális gátlása megváltoztatta a mikroglia nyúlványok mozgási dinamikáját, valamint a sérülés által kiváltott, a sérülés irányába történő nyúlványtoborzódás sebességét jelentősen csökkentette (33. ábra, C). Tehát, az NKCC1 nemcsak a mikroglia sejtek nyugalmi morfológiájának kialakításában, hanem az olyan dinamikus folyamatok szabályozásában is részt vesz, mint a nyúlványmotilitás.
6. A mikroglialis NKCC1 hiány következtében a kísérletes stroke hatására fokozott interleukin-1 termelés következik be, mely hozzájárulhat a súlyosabb kimenetelű ischaemiás stroke (nagyobb agyi ödéma, agyi sérülés és rosszabb neurológiai állapot) kialakulásához a mikroglialis NKCC1 KO állatokban (33. ábra, D).

Összegzésként elmondható, hogy az NKCC1 a mikroglia sejtek ionhomeosztázisában, gyulladásos válaszreakcióiban, a mikroglia fenotípus formálásában fontos résztvevő, ezáltal hatással van a mikroglia sejtek agyi sérülésekben betöltött szerepére, bár az ezen folyamatok mögött álló jelátviteli útvonal feltérképezése még további kutatásokat igényel. Eredményeim alapján az NKCC1 inhibitorok centrális hatásainak értelmezésekor a mikroglialis NKCC1-et potenciális célpontként mindenképp érdemes figyelembe venni, főleg a gyulladással járó agyi kórfolyamatokban.



33. ábra: A mikroglialis NKCC1 szerepe az agyi gyulladós folyamatokban.

Az NKCC1 sejt-autonóm módon szabályozza a mikroglia sejtek gyulladós válaszreakcióit. A mikroglialis NKCC1 farmakológiai gátlása vagy genetikai deléciója a morfológiai és a membrán konduktanciában bekövetkező változásokon túl (nincs ábrázolva) megváltoztatja a mikroglia sejtek citokin termelését (A-B), befolyásolja a mikroglia nyúlványok toborzódását sérülés során (C), valamint az ischaemiás stroke extrém súlyosságához és rossz kimeneteléhez vezet (D). Rövidítések: Bum: bumetanid, LPS: lipopoliszacharid, WT: vad típus, KO: mikroglialis NKCC1 KO, G-CSF: granulocita kolónia-stimuláló faktor, KC: keratinocita kemoattraktáns, IL-1 α : interleukin-1 α , IL-1 β : interleukin-1 β , IL-6: interleukin-6, TNF- α : tumornekrózis faktor- α

7. Összefoglalás

Az NKCC1 kotranszporterrel az irodalom számos, a központi idegrendszert érintő betegség kialakulásával kapcsolatban foglalkozik, de a mikrogliaiban, mint a központi idegrendszer fő immunsejtében betöltött szerepe ezidáig tisztázatlan maradt. PhD munkám során eddigi ismereteink szerint először rendeltünk funkciót a mikrogliaiban is nagy mennyiségben expresszálandó NKCC1-hez, miszerint a felnőtt egér agyban részt vesz mind a nyugalmi, mind az aktivált mikroglia sejtekre jellemző válaszok és sejt-morfológia kialakításában. Megmutattuk, hogy az NKCC1 sejt-autonóm módon szabályozza a mikroglia sejtmembránjának konduktanciáját és a sejtduzzadás okozta térfogatváltozáshoz való alkalmazkodást. Feltártuk, hogy az NKCC1 hiány egy, a már előzetesen aktivált, ún. prime-olt mikrogliahoz hasonló állapotot hoz létre, melyet a megemelkedett NLRP3 és IL-1 β szintek is alátámasztanak. Az NKCC1 szisztémás gátlása csökkentette az LPS által kiváltott gyulladás mértékét az agyban, míg az NKCC1 centrális farmakológiai gátlása vagy az NKCC1 mikroglialis delécióna a gyulladásos citokin szintek növekedésén keresztül erősítette a gyulladás mértékét. Az NKCC1 mikroglialis hiánya kísérletes stroke során nagyobb sérülést és ödéma méretet, a gyulladás mértékének növekedését, valamint súlyosabb neurológiai tüneteket eredményezett. Ezen eredményeink alapján a mikroglialis NKCC1 az agyi gyulladásos folyamatok egyik fontos szabályozó elemének tekinthető. Egy új, a mikroglialis NKCC1 kotranszporterrel keresztüli szabályozó mechanizmus leírásán túl a további vizsgálatoknak fontos klinikai relevanciája is lehet különböző idegrendszeri betegségekben, mint az epilepszia, a stroke, vagy a neonatális aszfixiát követő rohamok és görcsök.

8. Summary

The NKCC1 ion transporter contributes to the pathophysiology of common neurological disorders, but its function in microglia, the main inflammatory cells of the brain, has remained unclear to date. To the best of our knowledge, for the first time, a specific function was related to NKCC1 which is also highly expressed in microglia. We showed that microglial NKCC1 shapes both baseline and reactive microglia morphology, process recruitment to the site of injury, and adaptation to changes in cellular volume in a cell-autonomous manner via regulating membrane conductance. In addition, microglial NKCC1 deficiency results in NLRP3 inflammasome priming and increased production of interleukin-1 β (IL-1 β), rendering microglia prone to exaggerated inflammatory responses. In line with this, central (intracortical) administration of the NKCC1 blocker, bumetanide, potentiated intracortical lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokine levels. In contrast, systemic bumetanide application decreased inflammation in the brain. Microglial NKCC1 KO animals exposed to experimental stroke showed significantly increased brain injury, inflammation, cerebral edema and worse neurological outcome. Taken together, we describe a novel regulatory mechanism via the microglial NKCC1 cotransporter. Further studies will be required to understand the relevance of these mechanisms in common neurological diseases such as epilepsy, stroke, or seizures and convulsions following neonatal asphyxia.

9. Irodalomjegyzék

- A. Frankola K, H. Greig N, Luo W és Tweedie D (2011) Targeting TNF-Alpha to Elucidate and Ameliorate Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* 10:391–403.
- Alam A, Thelin EP, Tajsic T, Khan DZ, Khellaf A, Patani R és Helmy A (2020) Cellular infiltration in traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 17:1–17.
- Allan SM, Tyrrell PJ és Rothwell NJ (2005) Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5:629–640.
- Annunziato L, Boscia F és Pignataro G (2013) Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:969–982.
- Auer T, Schreppel P, Erker T és Schwarzer C (2020) Functional characterization of novel bumetanide derivatives for epilepsy treatment. *Neuropharmacology* 162:107754.
- Ayata C és Lauritzen M (2015) Spreading depression, spreading depolarizations, and the cerebral vasculature. *Physiol Rev* 95:953–993.
- Badimon A és mtsai. (2020) Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature* 586:417–423.
- Batthey TWK, Karki M, Singhal AB, Wu O, Sadaghiani S, Campbell BCV, Davis SM, Donnan GA, Sheth KN és Kimberly WT (2014) Brain edema predicts outcome after nonlacunar ischemic stroke. *Stroke* 45:3643–3648.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL és Bartkowski H (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17:472–476.
- Begum G, Song S, Wang S, Zhao H, Bhuiyan MIH, Li E, Nepomuceno R, Ye Q, Sun M, Calderon MJ, Stolz DB, St. Croix C, Watkins SC, Chen Y, He P, Shull GE és Sun

- D (2018) Selective knockout of astrocytic Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 reduces astrogliosis, BBB damage, infarction, and improves neurological function after ischemic stroke. *Glia* 66:126–144.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728–739.
- Ben-Ari Y (2017) NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. *Trends Neurosci* 40:536–554.
- Ben-Ari Y, Damier P és Lemonnier E (2016) Failure of the Nemo Trial: Bumetanide Is a Promising Agent to Treat Many Brain Disorders but Not Newborn Seizures. *Front Cell Neurosci* 10:90.
- Ben-Ari Y és Lemonnier E (2021) Using bumetanide to treat autism appears promising but further clinical trials are needed to confirm this approach. *Acta Paediatr* 110:1395–1397.
- Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG és Barres BA (2016) New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E1738–E1746.
- Bhandage AK, Kanatani S és Barragan A (2019) Toxoplasma-Induced Hypermigration of Primary Cortical Microglia Implicates GABAergic Signaling. *Front Cell Infect Microbiol* 9:73.
- Blumcke I, Budday S, Poduri A, Lal D, Kobow K és Baulac S (2021) Neocortical development and epilepsy: insights from focal cortical dysplasia and brain tumours. *Lancet Neurol* 20:943–955.
- Brandt C, Seja P, Töllner K, Römermann K, Hampel P, Kalesse M, Kipper A, Feit PW, Lykke K, Toft-Bertelsen TL, Paavilainen P, Spoljaric I, Puskarjov M, MacAulay N, Kaila K és Löscher W (2018) Bumepamine, a brain-permeant benzylamine derivative of bumetanide, does not inhibit NKCC1 but is more potent to enhance phenobarbital's anti-seizure efficacy. *Neuropharmacology* 143:186–204.

- Brough D és Denes A (2015) Interleukin-1 α and brain inflammation. *IUBMB Life* 67:323–330.
- Brough D, Rothwell NJ és Allan SM (2015) Interleukin-1 as a pharmacological target in acute brain injury. *Exp Physiol* 100:1488–1494.
- Brough D, Tyrrell PJ és Allan SM (2011) Regulation of interleukin-1 in acute brain injury. *Trends Pharmacol Sci* 32:617–622.
- Brown A, Meor Azlan NF, Wu Z és Zhang J (2021) WNK-SPAK/OSR1-NCC kinase signaling pathway as a novel target for the treatment of salt-sensitive hypertension. *Acta Pharmacol Sin* 42:508–517.
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel JP és Weiner HL (2014) Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17:131–143.
- Butovsky O és Weiner HL (2018) Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 19:622–635.
- Chen GY és Nuñez G (2010) Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10:826–837.
- Chen H, Luo J, Kintner DB, Shull GE és Sun D (2005) Na⁺-dependent chloride transporter (NKCC1)-null mice exhibit less gray and white matter damage after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:54–66.
- Chen H és Sun D (2005) The role of Na–K–Cl co–transporter in cerebral ischemia. *Neurol Res* 27:280–286.
- Chen L, König B, Liu T, Pervaiz S, Razzaque YS és Stauber T (2020) More than just a pressure relief valve: Physiological roles of volume-regulated LRRC8 anion channels. *Biol Chem* 400:1481–1496.

- Chew TA, Orlando BJ, Zhang J, Latorraca NR, Wang A, Hollingsworth SA, Chen DH, Dror RO, Liao M és Feng L (2019) Structure and mechanism of the cation–chloride cotransporter NKCC1. *Nature* 572:488–492.
- Chew TA, Zhang J és Feng L (2021) High-Resolution Views and Transport Mechanisms of the NKCC1 and KCC Transporters. *J Mol Biol* 433:167056.
- Choi H, Rohrbough JC, Nguyen HN, Dikalova A és Lamb FS (2021) Oxidant-resistant LRRC8A/C anion channels support superoxide production by NADPH oxidase 1. *J Physiol* 599:3013–3036.
- Compan V, Baroja-Mazo A, López-Castejón G, Gomez AI, Martínez CM, Angosto D, Montero MT, Herranz AS, Bazán E, Reimers D, Mulero V és Pelegrín P (2012) Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* 37:487–500.
- Cook JR, Gray AL, Lemarchand E, Schiessl I, Green JP, Newland MC, Dyer DP, Brough D és Lawrence CB (2022) LRRC8A is dispensable for a variety of microglial functions and response to acute stroke. *Glia* 70:1068–1083.
- Costello DA, Lyons A, Denieffe S, Browne TC, Cox FF és Lynch MA (2011) Long term potentiation is impaired in membrane glycoprotein CD200-deficient mice: A role for toll-like receptor activation. *J Biol Chem* 286:34722–34732.
- Crutel V, Lambert E, Penelaud PF, Albarrán Severo C, Fuentes J, Rosier A, Hervás A, Marret S, Oliveira G, Parellada M, Kyaga S, Gouttefangeas S, Bertrand M, Ravel D és Falissard B (2021) Bumetanide Oral Liquid Formulation for the Treatment of Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder: Design of Two Phase III Studies (SIGN Trials). *J Autism Dev Disord* 51:2959–2972.
- Cserép C, Pósfai B, Lénárt N, Fekete R, László ZI, Lele Z, Orsolits B, Molnár G, Heindl S, Schwarcz AD, Ujvári K, Környei Z, Tóth K, Szabadits E, Sperlágh B, Baranyi M, Csiba L, Hortobágyi T, Maglóczky Z, Martinecz B, Szabó G, Erdélyi F, Szipőcs R, Tamkun MM, Gesierich B, Duering M, Katona I, Liesz A, Tamás G és Dénes Á (2020) Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic

purinergic junctions. *Science* 367:528–537.

Cserép C, Pósfai B és Dénes Á (2021) Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron* 109:222–240.

Damier P, Hammond C és Ben-Ari Y (2016) Bumetanide to Treat Parkinson Disease. *Clin Neuropharmacol* 39:57–59.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V., Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML és Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752–758.

De Los Heros P, Alessi DR, Gourlay R, Campbell DG, Deak M, Macartney TJ, Kahle KT és Zhang J (2014) The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺ -Cl⁻ co-transporters. *Biochem J* 458:559–573.

Dean B, Keriakous D, Scarr E és Thomas EA (2007) Gene expression profiling in Brodmann's area 46 from subjects with schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry* 41:308–320.

Denes A, Coutts G, Lénárt N, Cruickshank SM, Pelegrin P, Skinner J, Rothwell N, Allan SM és Brough D (2015) AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:4050–4055.

Dénes Á, Humphreys N, Lane TE, Grecis R és Rothwell N (2010) Chronic systemic infection exacerbates ischemic brain damage via a CCL5 (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)-mediated proinflammatory response in mice. *J Neurosci* 30:10086–10095.

Denes A, Thornton P, Rothwell NJ és Allan SM (2010) Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* 24:708–723.

Di A, Xiong S, Ye Z, Malireddi RKS, Kometani S, Zhong M, Mittal M, Hong Z, Kanneganti TD, Rehman J és Malik AB (2018) The TWIK2 Potassium Efflux

Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity* 49:56-65.e4.

Di Lucente J, Nguyen HM, Wulff H, Jin LW és Maezawa I (2018) The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is required for microglial pro-inflammatory activation in vivo. *Glia* 66:1881–1895.

Di Paolo NC és Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17:906–913.

DiSabato DJ, Quan N és Godbout JP (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem* 139:136–153.

Donovan MD, O'Brien FE, Boylan GB, Cryan JF és Griffin BT (2015) The effect of organic anion transporter 3 inhibitor probenecid on bumetanide levels in the brain: an integrated *in vivo* microdialysis study in the rat. *J Pharm Pharmacol* 67:501–510.

Ducharme G, Newell EW, Pinto C és Schlichter LC (2007) Small-conductance Cl⁻ channels contribute to volume regulation and phagocytosis in microglia. *Eur J Neurosci* 26:2119–2130.

Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE és Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205–1213.

Eder C, Klee R és Heinemann U (1998) Involvement of stretch-activated Cl⁻ channels in ramification of murine microglia. *J Neurosci* 18:7127–7137.

Eftekhari S, Mehvari Habibabadi J, Najafi Ziarani M, Hashemi Fesharaki SS, Gharakhani M, Mostafavi H, Joghataei MT, Beladimoghadam N, Rahimian E és Hadjighassem MR (2013) Bumetanide reduces seizure frequency in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 54:e9-12.

Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL és Green KN (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia

progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380–397.

Eyo UB, Peng J, Swiatkowski P, Mukherjee A, Bispo A és Wu L-J (2014) Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y₁₂ receptors after status epilepticus. *J Neurosci* 34:10528–10540.

Fekete R és mtsai. (2018) Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y₁₂ signalling and recruit monocytes through P2Y₁₂-independent mechanisms. *Acta Neuropathol* 136:461–482.

Gamba G (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 85:423–493.

Garneau AP, Slimani S, Fiola MJ, Tremblay LE és Isenring P (2020) Multiple Facets and Roles of Na⁺ -K⁺ -Cl⁻ Cotransport: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Physiology* 35:415–429.

Gautiar EL és mtsai. (2012) Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* 13:1118–1128.

Ge S, Goh ELK, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL és Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589–593.

Gharaylou Z, Tafakhori A, Agah E, Aghamollai V, Kebriaeezadeh A és Hadjighassem M (2019) A Preliminary Study Evaluating the Safety and Efficacy of Bumetanide, an NKCC1 Inhibitor, in Patients with Drug-Resistant Epilepsy. *CNS Drugs* 33:283–291.

Giles JA, Greenhalgh AD, Davies CL, Denes A, Shaw T, Coutts G, Rothwell NJ, Mccoll BW és Allan SM (2015) Requirement for interleukin-1 to drive brain inflammation reveals tissue-specific mechanisms of innate immunity. *Eur J Immunol* 45:525–530.

Giles JA, Greenhalgh AD, Denes A, Nieswandt B, Coutts G, McColl BW és Allan SM (2018) Neutrophil infiltration to the brain is platelet-dependent, and is reversed by

blockade of platelet GPIIb/IIIa. *Immunology* 154:322–328.

Gillen CM és Forbush B (1999) Functional interaction of the K-Cl cotransporter (KCC1) with the Na-K-Cl cotransporter in HEK-293 cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 276:C328-36.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM és Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841–845.

Gong Y, Wu M, Shen J, Tang J, Li J, Xu J, Dang B és Chen G (2021) Inhibition of the NKCC1/NF- κ B Signaling Pathway Decreases Inflammation and Improves Brain Edema and Nerve Cell Apoptosis in an SBI Rat Model. *Front Mol Neurosci* 14:47.

Green JP, Yu S, Martín-Sánchez F, Pelegrin P, Lopez-Castejon G, Lawrence CB és Brough D (2018) Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E9371–E9380.

Grove JCR, Hirano AA, de Los Santos J, McHugh CF, Purohit S, Field GD, Brecha NC és Barnes S (2019) Novel hybrid action of GABA mediates inhibitory feedback in the mammalian retina. *PLoS Biol* 17:e3000200.

Hadjikhani N, Åsberg Johnels J, Lassalle A, Zürcher NR, Hippolyte L, Gillberg C, Lemonnier E és Ben-Ari Y (2018) Bumetanide for autism: More eye contact, less amygdala activation. *Sci Rep* 8:1–8.

Hadjikhani N, Zürcher NR, Rogier O, Ruest T, Hippolyte L, Ben-Ari Y és Lemonnier E (2015) Improving emotional face perception in autism with diuretic bumetanide: A proof-of-concept behavioral and functional brain imaging pilot study. *Autism* 19:149–157.

Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, Walker AJ, Gergits F, Segel M, Nemesh J, Marsh SE, Saunders A, Macosko E, Ginhoux F, Chen J, Franklin RJM, Piao X, McCarroll SA és Stevens B (2019) Single-Cell RNA

- Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity* 50:253-271.e6.
- Harl B, Schmölzer J, Jakab M, Ritter M és Kerschbaum HH (2013) Chloride Channel Blockers Suppress Formation of Engulfment Pseudopodia in Microglial Cells. *Cell Physiol Biochem* 31:319–337.
- Hartmann AM és Nothwang HG (2015) Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. *Front Cell Neurosci* 8:1–14.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB és Julius D (2006) The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 9:1512–1519.
- He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B és Núñez G (2016) NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530:354–357.
- Hefendehl JK, Neher JJ, Sühs RB, Kohsaka S, Skodras A és Jucker M (2014) Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell* 13:60–69.
- Heindl S, Gesierich B, Benakis C, Llovera G, Duering M és Liesz A (2018) Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. *Front Cell Neurosci* 12:106..
- Heneka MT, Kummer MP és Latz E (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 14:463–477.
- Heneka MT, McManus RM és Latz E (2018) Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 19:610–621.
- Henneberger C és mtsai. (2020) LTP Induction Boosts Glutamate Spillover by Driving Withdrawal of Perisynaptic Astroglia. *Neuron* 108:919-936.e11.
- Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK és El Khoury J (2013) The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat*

Neurosci 16:1896–1905.

Hines DJ, Hines RM, Mulligan SJ és Macvicar BA (2009) Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57:1610–1618.

Hristovska I és Pascual O (2016) Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Front Integr Neurosci* 9:73.

Hsu Y, Chang Y, Liu Y, Wang K, Chen H, Lee D, Yang S, Tsai C, Lien C és Chern Y (2019) Enhanced $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -2\text{Cl}^-$ cotransporter 1 underlies motor dysfunction in huntington's disease. *Mov Disord* 34:845–857.

Huang H, Bhuiyan MIH, Jiang T, Song S, Shankar S, Taheri T, Li E, Schreppel P, Hintersteiner M, Yang S Sen, Lin SH, Molyneaux BJ, Zhang Z, Erker T és Sun D (2019a) A Novel $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -\text{Cl}^-$ Cotransporter 1 Inhibitor STS66* Reduces Brain Damage in Mice After Ischemic Stroke. *Stroke* 50:1021–1025.

Huang H, Song S, Banerjee S, Jiang T, Zhang J, Kahle KT, Sun D és Zhang Z (2019b) The WNK-SPAK/OSR1 Kinases and the Cation-Chloride Cotransporters as Therapeutic Targets for Neurological Diseases. *Aging Dis* 10:626.

Huang LQ, Zhu GF, Deng YY, Jiang WQ, Fang M, Chen CB, Cao W, Wen MY, Han YL és Zeng HK (2014) Hypertonic saline alleviates cerebral edema by inhibiting microglia-derived $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ -induced Na-K-Cl Cotransporter up-regulation. *J Neuroinflammation* 11:102.

Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R és Rivera C (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866–9873.

Hui H, Rao W, Zhang L, Xie Z, Peng C, Su N, Wang K, Wang L, Luo P, Hao Y, Zhang S és Fei Z (2016) Inhibition of $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -2\text{Cl}^-$ Cotransporter-1 attenuates traumatic brain injury-induced neuronal apoptosis via regulation of Erk signaling. *Neurochem Int* 94:23–31.

- Hung CM, Peng CK, Yang S Sen, Shui HA és Huang KL (2020) WNK4–SPAK modulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *Biochem Pharmacol* 171:113738.
- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M és Elizabeth Ross M (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17:9157–9164.
- Irrera N, Russo M, Pallio G, Bitto A, Mannino F, Minutoli L, Altavilla D és Squadrito F (2020) The role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Int J Mol Sci* 21:1–18.
- Izquierdo P, Attwell D és Madry C (2019) Ion Channels and Receptors as Determinants of Microglial Function. *Trends Neurosci* 42:278–292.
- Javdani F, Hegedűs K, Miranda CO, Hegyi Z, Holló K és Antal M (2020) Differential expression of Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter 1 in neurons and glial cells within the superficial spinal dorsal horn of rodents. *Sci Rep* 10:11715.
- Johne M, Käufer C, Römermann K, Gailus B, Gericke B és Löscher W (2021) A combination of phenobarbital and the bumetanide derivative bumepamine prevents neonatal seizures and subsequent hippocampal neurodegeneration in a rat model of birth asphyxia. *Epilepsia* 62:1460–1471.
- Jurga AM, Paleczna M és Kuter KZ (2020) Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 14:198.
- Kahle KT, Barnett SM, Sassower KC és Staley KJ (2009) Decreased seizure activity in a human neonate treated with bumetanide, an inhibitor of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1. *J Child Neurol* 24:572–576.
- Kahle KT, Gerzanich V és Simard JM (2010) Molecular Mechanisms of Microvascular Failure in CNS Injury-Synergistic Roles of NKCC1 and SUR1/TRPM4 The clinical problem of traumatic brain injury (TBI) NIH Public Access. *J Neurosurg* 113:622–629.

- Kahle KT, Khanna AR, Alper SL, Adragna NC, Lauf PK, Sun D és Delpire E (2015) K-Cl cotransporters, cell volume homeostasis, and neurological disease. *Trends Mol Med* 21:513–523.
- Kahle KT, Staley KJ, Nahed B V, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP és Mount DB (2008) Roles of the cation–chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4:490–503.
- Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M és Voipio J (2014a) Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 15:637–654.
- Kaila K, Ruusuvuori E, Seja P, Voipio J és Puskarjov M (2014b) GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. *Curr Opin Neurobiol* 26:34–41.
- Kalla R, Bohatschek M, Kloss CUA, Krol J, Von Maltzan X és Raivich G (2003) Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: Involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems. *Glia* 41:50–63.
- Karlócai MR, Wittner L, Tóth K, Maglóczy Z, Katarova Z, Rásonyi G, Eröss L, Czirják S, Halász P, Szabó G, Payne JA, Kaila K és Freund TF (2016) Enhanced expression of potassium-chloride cotransporter KCC2 in human temporal lobe epilepsy. *Brain Struct Funct* 221:3601–3615.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M és Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461–553.
- Kharod SC, Kang SK és Kadam SD (2019) Off-Label Use of Bumetanide for Brain Disorders: An Overview. *Front Neurosci* 13:310.
- Kierdorf K és Imitola J. (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16:273–280.
- Kierdorf K és Prinz M (2013) Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci* 7:44.

- Kierdorf K és Prinz M (2017) Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127:3201–3209.
- Kim HR, Rajagopal L, Meltzer HY és Martina M (2022) Depolarizing GABAA current in the prefrontal cortex is linked with cognitive impairment in a mouse model relevant for schizophrenia. *Sci Adv* 7:eaba5032.
- Koizumi S, Ohsawa K, Inoue K és Kohsaka S (2013) Purinergic receptors in microglia: Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61:47–54.
- Kyrargyri V, Madry C, Rifat A, Arancibia-Carcamo IL, Jones SP, Chan VTT, Xu Y, Robaye B és Attwell D (2020) P2Y₁₃ receptors regulate microglial morphology, surveillance, and resting levels of interleukin 1 β release. *Glia* 68:328–344.
- Lambertsen KL, Biber K és Finsen B (2012) Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1677–1698.
- Larsen BR, Assentoft M, Cotrina ML, Hua SZ, Nedergaard M, Kaila K, Voipio J és Macaulay N (2014) Contributions of the Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K⁺ clearance and volume responses. *Glia* 62:608–622.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P és Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151–170.
- Lemonnier E, Degrez C, Phelep M, Tyzio R, Josse F, Grandgeorge M, Hadjikhani N és Ben-Ari Y (2012) A randomised controlled trial of bumetanide in the treatment of autism in children. *Transl Psychiatry* 2:e202.
- Lemonnier E, Lazartigues A és Ben-Ari Y (2016) Treating schizophrenia with the diuretic bumetanide: A case report. *Clin Neuropharmacol* 39:115–117.
- Leng F és Edison P (2021) Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* 17:157–172.
- Li Q és Barres BA (2018) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease.

Nat Rev Immunol 18:225–242.

Li Y, Du X-F, Liu C-S, Wen Z-L és Du J-L (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* 23:1189–1202.

Liu B-S, Ferreira R, Lively S és Schlichter LC (2013) Microglial SK3 and SK4 currents and activation state are modulated by the neuroprotective drug, riluzole. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:227–237.

Liu R, Wang J, Liang S, Zhang G és Yang X (2020) Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Front Neurol* 10:1407.

Liu YU, Ying Y, Li Y, Eyo UB, Chen T, Zheng J, Umpierre AD, Zhu J, Bosco DB, Dong H és Wu LJ (2019) Neuronal network activity controls microglial process surveillance in awake mice via norepinephrine signaling. *Nat Neurosci* 22:1771–1781.

Löscher W és Kaila K (2022) CNS pharmacology of NKCC1 inhibitors. *Neuropharmacology* 205:108910.

Löscher W, Puskarjov M és Kaila K (2013) Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology* 69:62–74.

Luo L, Song S, Ezenwukwa CC, Jalali S, Sun B és Sun D (2021) Ion channels and transporters in microglial function in physiology and brain diseases. *Neurochem Int* 142:104925.

Luo L, Wang J, Ding D, Hasan MN, Yang S-S, Lin S-H, Schreppel P, Sun B, Yin Y, Erker T és Sun D (2020) Role of NKCC1 Activity in Glioma K(+) Homeostasis and Cell Growth: New Insights With the Bumetanide-Derivative STS66. *Front Physiol* 11:911.

Ma H, Li T, Tao Z, Hai L, Tong L, Yi L, Abeysekera IR, Liu P, Xie Y, Li J, Yuan F, Zhang C, Yang Y, Ming H, Yu S és Yang X (2019) NKCC1 promotes EMT-like process in GBM via RhoA and Rac1 signaling pathways. *J Cell Physiol* 234:1630–

1642.

Macvicar BA, Feighan D, Brown A és Ransom B (2002) Intrinsic optical signals in the rat optic nerve: Role for K⁺ uptake via NKCC1 and swelling of astrocytes. *Glia* 37:114–123.

Madry C, Arancibia-Cárcamo IL, Kyrargyri V, Chan VTT, Hamilton NB és Attwell D (2018a) Effects of the ecto-ATPase apyrase on microglial ramification and surveillance reflect cell depolarization, not ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1608–E1617.

Madry C és Attwell D (2015) Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying microglial dynamics. *J Biol Chem* 290:12443–12450.

Madry C, Kyrargyri V, Arancibia-Cárcamo IL, Jolivet R, Kohsaka S, Bryan RM és Attwell D (2018b) Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺ Channel THIK-1. *Neuron* 97:299-312.e6.

Mahadevan V és Woodin MA (2020) A historical overview of chloride transporter research. In: *Neuronal Chloride Transporters in Health and Disease*, pp 1–17. Elsevier.

Masuda T, Amann L, Sankowski R, Staszewski O, Lenz M, d'Errico P, Snaidero N, Costa Jordão MJ, Böttcher C, Kierdorf K, Jung S, Priller J, Misgeld T, Vlachos A, Luehmann MM, Knobloch KP és Prinz M (2020a) Novel Hexb-based tools for studying microglia in the CNS. *Nat Immunol* 21:802–815.

Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Sagar, Scheiwe C, Nessler S, Kunz P, van Loo G, Coenen VA, Reinacher PC, Michel A, Sure U, Gold R, Grün D, Priller J, Stadelmann C és Prinz M (2019) Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566:388–392.

Masuda T, Sankowski R, Staszewski O és Prinz M (2020b) Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep* 30:1271–1281.

- Mayes-Hopfinger L, Enache A, Xie J, Huang CL, Köchl R, Tybulewicz VLJ, Fernandes-Alnemri T és Alnemri ES (2021) Chloride sensing by WNK1 regulates NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis. *Nat Commun* 12:4546.
- McColl BW, Rothwell NJ és Allan SM (2007) Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *J Neurosci* 27:4403–4412.
- McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kametsky L, Cimini BA, Karhohs KW, Doan M, Ding L, Rafelski SM, Thirstrup D, Wiegraebe W, Singh S, Becker T, Caicedo JC és Carpenter AE (2018) CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol* 16:e2005970.
- Mejia-Gervacio S, Murray K és Lledo P-M (2011) NKCC1 controls GABAergic signaling and neuroblast migration in the postnatal forebrain. *Neural Dev* 6:4.
- Merlini M, Rafalski VA, Ma K, Kim KY, Bushong EA, Rios Coronado PE, Yan Z, Mendiola AS, Sozmen EG, Ryu JK, Haberl MG, Madany M, Sampson DN, Petersen MA, Bardehle S, Tognatta R, Dean T Jr, Acevedo RM, Cabriga B, Thomas R, Coughlin SR, Ellisman MH, Palop JJ, Akassoglou K (2021) Microglial Gi-dependent dynamics regulate brain network hyperexcitability. *Nat Neurosci* 24:19–23.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ és Meyermann R (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 101:249–255.
- Morita Y, Callicott JH, Testa LR, Mighdoll MI, Dickinson D, Chen Q, Tao R, Lipska BK, Kolachana B, Law AJ, Ye T, Straub RE, Weinberger DR, Kleinman JE és Hyde TM (2014) Characteristics of the cation cotransporter NKCC1 in human brain: Alternate transcripts, expression in development, and potential relationships to brain function and Schizophrenia. *J Neurosci* 34:4929–4940.
- Murana E, Pagani F, Basilico B, Sundukova M, Batti L, Di Angelantonio S, Cortese B,

- Grimaldi A, Francioso A, Heppenstall P, Bregestovski P, Limatola C és Ragozzino D (2017) ATP release during cell swelling activates a Ca^{2+} -dependent Cl^- current by autocrine mechanism in mouse hippocampal microglia. *Sci Rep* 7:4184.
- Murray KN, Parry-Jones AR és Allan SM (2015) Interleukin-1 and acute brain injury. *Front Cell Neurosci* 9:18.
- Nguyen HM, di Lucente J, Chen YJ, Cui Y, Ibrahim RH, Pennington MW, Jin LW, Maezawa I és Wulff H (2020) Biophysical basis for Kv1.3 regulation of membrane potential changes induced by P2X4-mediated calcium entry in microglia. *Glia* 68:2377–2394.
- Nguyen HM, Grössinger EM, Horiuchi M, Davis KW, Jin L-W, Maezawa I és Wulff H (2017) Differential Kv1.3, KCa3.1, and Kir2.1 expression in “classically” and “alternatively” activated microglia. *Glia* 65:106–121.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F és Helmchen F (2005) Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (80-) 308:1314–1318.
- Noor ZN, Deitmer JW és Theparambil SM (2019) Cytosolic sodium regulation in mouse cortical astrocytes and its dependence on potassium and bicarbonate. *J Cell Physiol* 234:89–99.
- O’Brien WT, Pham L, Symons GF, Monif M, Shultz SR és McDonald SJ (2020) The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: potential as a biomarker and therapeutic target. *J Neuroinflammation* 17:104.
- Ohsawa K és Kohsaka S (2011) Dynamic motility of microglia: Purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *Glia* 59:1793–1799.
- Orsini F, Villa P, Parrella S, Zangari R, Zanier ER, Gesuete R, Stravalaci M, Fumagalli S, Ottria R, Reina JJ, Paladini A, Micotti E, Ribeiro-Viana R, Rojo J, Pavlov VI, Stahl GL, Bernardi A, Gobbi M és De Simoni MG (2012) Targeting mannose-binding lectin confers long-lasting protection with a surprisingly wide therapeutic window in cerebral ischemia. *Circulation* 126:1484–1494.

- Otxoa-de-Amezaga A, Miró-Mur F, Pedragosa J, Gallizioli M, Justicia C, Gaja-Capdevila N, Ruíz-Jaen F, Salas-Perdomo A, Bosch A, Calvo M, Márquez-Kisinousky L, Denes A, Gunzer M és Planas AM (2019) Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation. *Acta Neuropathol* 137:321–341.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D és Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456–1458.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR és Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155:1596–1609.
- Parrini M, Naskar S, Alberti M, Colombi I, Morelli G, Rocchi A, Nanni M, Piccardi F, Charles S, Ronzitti G, Mingozzi F, Contestabile A és Cancedda L (2021) Restoring neuronal chloride homeostasis with anti-NKCC1 gene therapy rescues cognitive deficits in a mouse model of Down syndrome. *Mol Ther* 29:3072–3092.
- Pozdeev VI, Lang E, Görg B, Bidmon HJ, Shinde P V., Kircheis G, Herebian D, Pfeffer K, Lang F, Häussinger D, Lang KS és Lang PA (2017) TNF α induced up-regulation of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in hepatic ammonia clearance and cerebral ammonia toxicity. *Sci Rep* 7:7938.
- Pozner A, Xu B, Palumbos S, Gee JM, Tvrdik P és Capecchi MR (2015) Intracellular calcium dynamics in cortical microglia responding to focal laser injury in the PC::G5-tdT reporter mouse. *Front Mol Neurosci* 8:12.
- Pressler RM és mtsai. (2015) Bumetanide for the treatment of seizures in newborn babies with hypoxic ischaemic encephalopathy (NEMO): an open-label, dose finding, and feasibility phase 1/2 trial. *Lancet Neurol* 14:469–477.
- Prinz M, Jung S és Priller J (2019) Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 179:292–311.
- Puskarjov M, Kahle KT, Ruusuvoori E és Kaila K (2014) Pharmacotherapeutic targeting

of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures. *Epilepsia* 55:806–818.

Rahmanzadeh R, Eftekhari S, Shahbazi A, Khodaei Ardakani M reza, Rahmanzade R, Mehrabi S, Barati M és Joghataei MT (2017a) Effect of bumetanide, a selective NKCC1 inhibitor, on hallucinations of schizophrenic patients; a double-blind randomized clinical trial. *Schizophr Res* 184:145–146.

Rahmanzadeh R, Shahbazi A, Ardakani M reza K, Mehrabi S, Rahmanzade R és Joghataei MT (2017b) Lack of the effect of bumetanide, a selective NKCC1 inhibitor, in patients with schizophrenia: A double-blind randomized trial. *Psychiatry Clin Neurosci* 71:72–73.

Rakers C, Schleif M, Blank N, Matušková H, Ulas T, Händler K, Torres SV, Schumacher T, Tai K, Schultze JL, Jackson WS és Petzold GC (2019) Stroke target identification guided by astrocyte transcriptome analysis. *Glia* 67:619–633.

Ransohoff RM (2016) A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nat Neurosci* 19:987–991.

Ribeiro Xavier AL, Kress BT, Goldman SA, De Lacerda Menezes JR és Nedergaard M (2015) A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone. *J Neurosci* 35:11848–11861.

Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC és Gemma C (2011) CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci* 31:16241–16250.

Römermann K, Fedrowitz M, Hampel P, Kaczmarek E, Töllner K, Erker T, Sweet DH és Löscher W (2017) Multiple blood-brain barrier transport mechanisms limit bumetanide accumulation, and therapeutic potential, in the mammalian brain. *Neuropharmacology* 117:182–194.

Roumier A, Béchade C, Poncer JC, Smalla KH, Tomasello E, Vivier E, Gundelfinger ED, Triller A és Bessis A (2004) Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci* 24:11421–11428.

- Russell JM (2000) Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 80:211–276.
- Salter MW és Stevens B (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23:1018–1027.
- Savardi A, Borgogno M, De Vivo M és Cancedda L (2021) Pharmacological tools to target NKCC1 in brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 42:1009–1034.
- Savardi A, Borgogno M, Narducci R, La Sala G, Ortega JA, Summa M, Armirotti A, Bertorelli R, Contestabile A, De Vivo M és Cancedda L (2020) Discovery of a Small Molecule Drug Candidate for Selective NKCC1 Inhibition in Brain Disorders. *Chem* 6:2073–2096.
- Schaar KL, Brenneman MM és Savitz SI (2010) Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* 2:13.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA és Stevens B (2012) Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74:691–705.
- Schiapparelli P, Guerrero-Cazares H, Magaña-Maldonado R, Hamilla SM, Ganaha S, Goulin Lippi Fernandes E, Huang CH, Aranda-Espinoza H, Devreotes P és Quinones-Hinojosa A (2017) NKCC1 Regulates Migration Ability of Glioblastoma Cells by Modulation of Actin Dynamics and Interacting with Cofilin. *EBioMedicine* 21:94–103.
- Schilling T és Eder C (2007) Ion channel expression in resting and activated microglia of hippocampal slices from juvenile mice. *Brain Res* 1186:21–28.
- Schlichter LC, Mertens T és Liu B (2011) Swelling activated Cl⁻ channels in microglia: Biophysics, pharmacology and role in glutamate release. *Channels* 5:128–137.
- Schulte JT, Wierenga CJ és Bruining H (2018) Chloride transporters and GABA polarity in developmental, neurological and psychiatric conditions. *Neurosci Biobehav Rev* 90:260–271.

- Shekarabi M, Zhang J, Khanna AR, Ellison DH, Delpire E és Kahle KT (2017) WNK Kinase Signaling in Ion Homeostasis and Human Disease. *Cell Metab* 25:285–299.
- Sipe GO, Lowery R. L., Tremblay M-È, Kelly EA, Lamantia CE és Majewska AK (2016) Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat Commun* 7:10905.
- Skaper SD (2011) Ion channels on microglia: therapeutic targets for neuroprotection. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:44–56.
- Song WM és Colonna M (2018) The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nat Immunol* 19:1048–1058.
- Spittau B, Dokalis N és Prinz M (2020) The Role of TGF β Signaling in Microglia Maturation and Activation. *Trends Immunol* 41:836–848.
- Sprengers JJ, van AnDEL DM, Zuithoff NPA, Keijzer-Veen MG, Schulp AJA, Scheepers FE, Lilien MR, Oranje B és Bruining H (2021) Bumetanide for Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder (BAMBI): A Single Center, Double-Blinded, Participant-Randomized, Placebo-Controlled, Phase-2 Superiority Trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 60:865–876.
- Squarzoni P, Thion MS és Garel S (2015) Neuronal and microglial regulators of cortical wiring: usual and novel guideposts. *Front Neurosci* 9:248.
- Stowell RD, Sipe GO, Dawes RP, Batchelor HN, Lordy KA, Whitelaw BS, Stoessel MB, Bidlack JM, Brown E, Sur M és Majewska AK (2019) Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Nat Neurosci* 22:1782–1792.
- Su G, Kintner DB, Flagella M, Shull GE és Sun D (2002) Astrocytes from Na⁺-K⁺-Cl⁻-cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *Am J Physiol - Cell Physiol* 282 :C1147-60.
- Sun L, Yu Z, Wang W és Liu X (2012) Both NKCC1 and anion exchangers contribute to Cl⁻ accumulation in postnatal forebrain neuronal progenitors. *Eur J Neurosci*

35:661–672.

Swanson K V., Deng M és Ting JPY (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 19:477–489.

Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, Császár E, Fekete R, West BL, Katona G, Rózsa B és Dénes Á (2016) Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun* 7:11499.

Tang T, Lang X, Xu C, Wang X, Gong T, Yang Y, Cui J, Bai L, Wang J, Jiang W és Zhou R (2017) CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* 8:202.

Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K és Tremblay M-È (2017) Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol* 595:1929–1945.

Tillman L és Zhang J (2019) Crossing the chloride channel: The current and potential therapeutic value of the neuronal K⁺-Cl⁻ Cotransporter KCC2. *Biomed Res Int* 2019:8941046.

Töllner K, Brandt C, Römermann K és Löscher W (2015) The organic anion transport inhibitor probenecid increases brain concentrations of the NKCC1 inhibitor bumetanide. *Eur J Pharmacol* 746:167–173.

Töllner K, Brandt C, Töpfer M, Brunhofer G, Erker T, Gabriel M, Feit PW, Lindfors J, Kaila K és Löscher W (2014) A novel prodrug-based strategy to increase effects of bumetanide in epilepsy. *Ann Neurol* 75:550–562.

Tremblay M-È, Lowery RL és Majewska AK (2010) Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLOS Biol* 8:e1000527.

Umpierre AD, Bystrom LL, Ying Y, Liu YU, Worrell G és Wu LJ (2020) Microglial calcium signaling is attuned to neuronal activity in awake mice. *Elife* 9:1–24.

- Virtanen MA, Uvarov P, Hübner CA és Kaila K (2020) NKCC1, an Elusive Molecular Target in Brain Development: Making Sense of the Existing Data. *Cells* 9:2607.
- Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M és Loo G (2019) Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med* 11:e10248.
- Wang H, Yan Y, Kintner DB, Lytle C és Sun D (2003) GABA-mediated trophic effect on oligodendrocytes requires Na-K-2Cl cotransport activity. *J Neurophysiol* 90:1257–1265.
- Wang J, Liu R, Hasan MN, Fischer S, Chen Y, Como M, Fiesler VM, Bhuiyan MIH, Dong S, Li E, Kahle KT, Zhang J, Deng X, Subramanya AR, Begum G, Yin Y és Sun D (2022) Role of SPAK–NKCC1 signaling cascade in the choroid plexus blood–CSF barrier damage after stroke. *J Neuroinflammation* 19:91.
- Weidenfeld S és Kuebler WM (2017) Cytokine-regulation of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 1 and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-potential role in pulmonary inflammation and edema formation. *Front Immunol* 8:393.
- Wendeln AC és mtsai. (2018) Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* 556:332–338.
- Wendt S, Maricos M, Vana N, Meyer N, Guneykaya D, Semtner M és Kettenmann H (2017) Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 58:41–53.
- Wilson CS és Mongin AA (2019) The signaling role for chloride in the bidirectional communication between neurons and astrocytes. *Neurosci Lett* 689:33–44.
- Wofford KL, Loane DJ és Cullen DK (2019) Acute drivers of neuroinflammation in traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 14:1481–1489.
- Wu W, Li Y, Wei Y, Bosco DB, Xie M, Zhao MG, Richardson JR és Wu LJ (2020) Microglial depletion aggravates the severity of acute and chronic seizures in mice. *Brain Behav Immun* 89:245–255.

- Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E és Forbush B (1994) Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2201–2205.
- Yan Y, Dempsey RJ és Sun D (2001) Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in rat focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:711–721.
- Yang X, Wang Q és Cao E (2020) Structure of the human cation–chloride cotransporter NKCC1 determined by single-particle electron cryo-microscopy. *Nat Commun* 11:1–11.
- Yao Y, Zhang Y, Liao X, Yang R, Lei Y és Luo J (2020) Potential Therapies for Cerebral Edema After Ischemic Stroke: A Mini Review. *Front Aging Neurosci* 12:618819.
- Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillemins M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E és Jung S (2013) Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38:79–91.
- Yu Y, Fu P, Yu Z, Xie M, Wang W és Luo X (2018) NKCC1 Inhibition Attenuates Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced White Matter Lesions by Enhancing Progenitor Cells of Oligodendrocyte Proliferation. *J Mol Neurosci* 64:449–458.
- Zhang J és mtsai. (2020a) Modulation of brain cation-Cl⁻ cotransport via the SPAK kinase inhibitor ZT-1a. *Nat Commun* 11:78.
- Zhang J, Pu H, Zhang H, Wei Z, Jiang X, Xu M, Zhang L, Zhang W, Liu J, Meng H, Stetler RA, Sun D, Chen J, Gao Y és Chen L (2017) Inhibition of Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransporter attenuates blood-brain-barrier disruption in a mouse model of traumatic brain injury. *Neurochem Int* 111:23–31.
- Zhang JM és An J (2007) Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45:27–37.
- Zhang L, Huang CC, Dai Y, Luo Q, Ji Y, Wang K, Deng S, Yu J, Xu M, Du X, Tang Y, Shen C, Feng J, Sahakian BJ, Lin CP és Li F (2020b) Symptom improvement in

children with autism spectrum disorder following bumetanide administration is associated with decreased GABA/glutamate ratios. *Transl Psychiatry* 10:1–12.

Zhang M, Cui Z, Cui H, Cao Y, Zhong C és Wang Y (2016) Astaxanthin alleviates cerebral edema by modulating NKCC1 and AQP4 expression after traumatic brain injury in mice. *BMC Neurosci* 17:60.

Zhang S, Zhou J, Zhang Y, Liu T, Friedel P, Zhuo W, Somasekharan S, Roy K, Zhang L, Liu Y, Meng X, Deng H, Zeng W, Li G, Forbush B és Yang M (2021) The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2. *Commun Biol* 4:226.

Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O’Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA és Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 34:11929–11947.

Zhao Y, Roy K, Vidossich P, Cancedda L, De Vivo M, Forbush B és Cao E (2022) Structural basis for inhibition of the Cation-chloride cotransporter NKCC1 by the diuretic drug bumetanide. *Nat Commun* 13:2747.

Zhu H, Hu S, Li Y, Sun Y, Xiong X, Hu X, Chen J és Qiu S (2022) Interleukins and Ischemic Stroke. *Front Immunol* 13:828447.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

K. Tóth, N. Lénárt, P. Berki, R. Fekete, E. Szabadits, B. Pósfai, C. Cserép, A. Alatschan, Sz. Benkő, D. Kiss, Ch. A. Hübner, A. Gulyás, K. Kaila, Zs. Környei and Á. Dénes. (2022) *The NKCC1 ion transporter modulates microglial phenotype and inflammatory response to brain injury in a cell-autonomous manner*. **PLOS BIOLOGY** 20(1): e3001526. doi: 10.1371/journal.pbio.3001526 **IF: 9,593**

R. Fekete, C. Cserép, N. Lénárt, **K. Tóth**, B. Orsolits, B. Martinecz, E. Méhes, B. Szabó, V. Németh, B. Gönci, B. Sperlágh, Z. Boldogkői, Á. Kittel, M. Baranyi, Sz. Ferenczi, K. Kovács, G. Szalay, B. Rózsa, C. Webb, GG. Kovács, T. Hortobágyi, B. L. West, Z. Környei and Á. Dénes. (2018) *Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms*. **ACTA NEUROPATHOLOGICA** 136, 461–482. doi: 10.1007/s00401-018-1885-0 **IF: 18,174**

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények

C. Cserép, B. Pósfai, B. Orsolits, G. Molnár, S. Heindl, N. Lénárt, R. Fekete, ZI. László, Z. Lele, AD. Schwarz, K. Ujvári, Z. Környei, **K. Tóth**, E. Szabadits, B. Sperlágh, M. Baranyi, L. Csiba, T. Hortobágyi, Z. Maglóczky, B. Martinecz, G. Szabó, F. Erdélyi, R. Szipőcs, B. Gesierich, M. Duering, I. Katona, A. Liesz, G. Tamás, Á. Dénes. (2020) *Microglia monitor and protect neuronal function via specialized purinergic junctions*. **SCIENCE** 367:6477 pp. 528-537. doi: 10.1126/science.aax6752 **IF: 47,728**

Z. Helyes, V. Tékus, N. Szentes, K. Pohóczky, B. Botz, T. Kiss, Á. Kemény, Z. Környei, **K. Tóth**, N. Lénárt, H. Ábrahám, E. Pinteaux, S. Francis, S. Sensi, Á. Dénes, and A. Goebel. (2019) *Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms*. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA** 116:13067-13076. doi: 10.1073/pnas.1820168116 **IF: 9,412**

G. Kovács, Z. Környei, **K. Tóth**, M. Baranyi, M. Brunner, M. Neubrandt, Á. Dénes, B. Sperlág. (2018) *Modulation of P2X7 purinergic receptor activity by extracellular Zn²⁺ in cultured mouse hippocampal astroglia*. **CELL CALCIUM** 75:1-13. doi: 10.1016/j.ceca.2018.07.010 **IF: 3,932**

F. Orsini, S. Fumagalli, E. Császár, **K. Tóth**, D. De Blasio, R. Zangari, N. Lénárt, Á. Dénes, MG. De Simoni. (2018) *Mannose-binding lectin drives platelet inflammatory phenotype and vascular damage after cerebral ischemia in mice via IL (Interleukin)-1 α* . **ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY** 38:2678-2690. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311058 **IF: 6,618**

A megjelent első és társszerzős publikációim összesített impakt faktora: 95,457

A disszertációhoz kapcsolódó megjelent publikációk összesített impakt faktora: 27,767

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Dénes Ádámnak, a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Neuroimmunológia Kutatócsoport vezetőjének a szakmai támogatásért, valamint a lehetőségért, hogy csatlakozhattam a kutatócsoport munkájához. Szintén köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Környei Zsuzsannának, a munkám során kapott iránymutatásért és az értekezés elkészítésében nyújtott segítségével.

Hálás vagyok Dr. Cserépné Dr. Szabadits Eszternek és Dr. Cserép Csabának mindazért a szakmai támogatásért, az ösztönzésért és bizalomért, amit az elmúlt évek során tőlük kaptam. Köszönöm Dr. Fekete Rebekának az *in vivo* technikák elsajátításában nyújtott segítségét. Köszönöm nekik, továbbá Dr. Pósfai Balázsnak a közös ebédeket és az inspiráló beszélgetéseket.

Hálás vagyok családomnak a sok éves türelemért, megértésért és áldozatvállalásért, amellyel lehetővé tették az értekezésem elkészítését. Külön köszönöm barátaimnak, Edinának, Anikónak és Zolinak a szívből jövő támogatást és az energiával feltöltő közös programokat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Daninak, hogy a nehéz pillanatokban mellettem állt, és segített, hogy az értekezés elkészülhessen.