

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

Doktori tézisek

Tóth Krisztina

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: 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

1. Bevezetés

A központi idegrendszerben (KIR) a különböző inzultusok (pl. fertőzések, traumás sérülések, ischaemia, toxinok) hatására létrejövő gyulladáshoz vezető 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. A gyulladáshoz vezető mediátorok termelésében a KIR fő immunkompetens sejt típusaként számotartott mikroglia játsza a fő szerepet, de az asztroglia, a kapilláris endotélsejtek, valamint a vér-agy gát sérülése esetén a perifériáról infiltrálódó leukociták is hozzájárulnak.

A mikroglia sejtek a gyulladáshoz vezető mediátor termelésén kívül aktív résztvevői a KIR immunvédelméhez 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, 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. A felsorolt kórfolyamatokban többek között az extracelluláris káliumion koncentráció megnövekedését is megfigyelték, mely az idegi hálózatok fokozott, abnormális aktivitásához vezethet. Ismert, hogy a mikroglia sejtek képesek a neuronális aktivitás szabályozására, 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 aktivitás szabályozásában.

A központi idegrendszer számos sejt típusának membránjában megtalálható NKCC1 a kation-klorid kotranszporterek (CCC) családjába tartozik és Na⁺, K⁺ és Cl⁻ sejten belülről történő másodlagos aktív transzportjában tölt be központi szerepet. Az NKCC1, a szintén a CCC-k közé tartozó, a K⁺ és Cl⁻ ionok sejtől kívülről történő szállítását végző, K⁺-Cl⁻ kotranszporterek működésével összhangban vesz részt az intracelluláris Na⁺, K⁺ és Cl⁻ homeosztázis szabályozásában. Az NKCC1 és a kizárólag idegsejtekben expresszáldó KCC2 transzporter működése neuronokban széles körben tanulmányozott és jól ismert, miszerint a neuronális NKCC1 fontos szerepet játszik a GABA közvetítette hatásokban az idegrendszer fejlődése során. Az NKCC1 és/vagy a KCC2 expressziójában bekövetkező változások az intracelluláris Cl⁻ koncentráció szabályozás zavarához vezethetnek, melyet az olyan gyakori neurológiai és neuropszichiátriai betegségek kórfolyamatával is kapcsolatban hoztak, mint az újszülöttkori görcsrohamok, a temporális lebeny epilepszia, a stroke, a skizofrénia vagy

az autizmus spektrális zavar. Emiatt az NKCC1 potenciális terápiás célpontként tartják számon. Számos klinikai tanulmány vizsgálja az NKCC1 gátlószerének, az eredetileg kacsdiuretikumként alkalmazott bumetanidnak a hatásosságát az említett betegségek terápiájában. Az eredmények tekintetében a lezárt tanulmányok rendkívül ellentmondásosak. A megfigyelt jótékony hatásokat a bumetanid neuronális NKCC1-en kifejtett hatásának tulajdonítják, habár a bumetanid vér-agy gáton való gyenge penetrációs képessége és farmakokinetikai tulajdonságai miatt a szisztémásan alkalmazott dózis aligha érhetné el hatásos koncentrációban a neuronokat. Továbbá az NKCC1 az idegsejteken kívül, a vér-agy gát endotélsejtjein és egyéb nem-neuronális sejttípusokon (pl. asztroglán) is jelen van, mely felveti a bumetanid centrális hatásaiban e sejttípusok vizsgálatának is a jelentőségét.

Miközben a transzkriptomikai adatok a mikrogliaesetek esetén az NKCC1 magas expresszióját mutatják, a mikrogliaesetek működésében betöltött szerepét az eddigiekben nem vizsgálták. Mivel a mikrogliaesetek 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 gyulladáshoz való válaszokban betöltött szerepének vizsgálatát tűztem ki célul.

2. Célkitűzések

Munkám során a következő kérdésekre kerestem választ:

1. **Hogyan hat az NKCC1 szisztémás, illetve centrális úton történő farmakológiai gátlása az agyi gyulladáshoz kapcsolódó 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 mikrogliaesetek fiziológiás 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, nyúlványomotilitás, fagocitotikus aktivitás, citokin termelés és a sejtmembrán elektromos tulajdonságai) betöltött szerepét.

3. **Milyen szerepet tölt be a mikroglialis NKCC1 az agyi gyulladásos folyamatokban?** Farmakológiai NKCC1 gátlás és kondicionális mikroglialis NKCC1 delécio segítségével megvizsgáltam, hogy hogyan vesz részt a mikroglialis NKCC1 a bakteriális lipopoliszacharid által, illetve kísérletes stroke segítségével kiváltott gyulladásos mechanizmusokban.

3. 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} ΔCx3CR1 (mikroglialis NKCC1 génkiütött) és CX3CR1^{+/GFP} P2Y12R^{-/-} (P2Y12 receptor génkiütött) egereket 12 órás fény/sötét ciklusban, 22±1 °C hőmérsékleten, valamint megfelelő páratartalom és *ad libitum* elérhető víz és táplálék mellett tartottuk. A mikroglia sejtek izolálásához 6-8 hetes, az *ex vivo* elektrofiziológiai mérésekhez 8-9 hetes, az *in vivo* kísérletekhez 12-15 hetes felnőtt állatokat áldoztunk 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} ΔCx3CR1), 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.

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 az újszülött (P0-1, hím és nőstény), felnőtt (P40-55, hím) C57Bl/6J, NKCC1^{fl/fl} (WT) vagy NKCC1^{fl/fl} ΔCx3CR1 (mikroglialis NKCC1 KO) egerekből mágneses sejtseparációs módszerrel, anti-CD11b mikrogyöngyök segítségével (Miltenyi Biotec) történt. Az állatok terminális altatását és jéghideg PBS (foszfát-pufferrel sóoldat) oldattal történő transzkardiális perfúzióját követően, az agyból kiperarált agykérgi területeket és hippocampusokat 30 percig, 37°C-on, gyengéd

rázatás mellett enzimatikusan emésztettem (Miltenyi Biotec). A felnőtt agyszövetek esetében a mielint MACS Myelin Removal Beads II segítségével (Miltenyi Biotec) távolítottam el. Az így kapott egycelt-szuszpenziót az anti-CD11b bevonatú mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotec) jelöltem 15 percre, 4 °C-on, majd az inkubációs idő letelte után MS mágnesoszlopok (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 szövetenyésztő inkubátorban, 10% FBS (fetal bovine serum, Biosera), 1% Pen/Strep (10000 U/ml; ThermoFisher Scientific) és 10 nM M-CSF (makrofág kolónia-stimuláló faktor; ThermoFisher Scientific) tartalmú DMEM/Glutamax (Gibco) tápoldatban 10 napig tenyésztettem.

3.4. Neuronális progenitor sejtek izolálása

A neuronális progenitor sejtek izolálásához 17 napos C57Bl/6J egérembriókat áldoztam fel. Az aseptikus körülmények között kipeparált hippocampusokat 0,05% tripszin-EDTA-t (Sigma-Aldrich) és 0,05% Dnáz I-et tartalmazó PBS oldatban inkubáltam 15 percre, 37 °C-on, majd a szűrési és centrifugálási lépések után az egycelt-szuszpenziót a későbbi RNS extrakcióhoz azonnal Qiazol lízis reagensben (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, Sigma-Aldrich) vagy LPS-sel és bumetaniddal (az NKCC1 inhibitora, 25 mg/kg, 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

Az agykéregbe illetve a ciszterna magnába történő anyagbeadásokat fentanyl mélyaltatás mellett, sztereotaxissal rögzített állatokon végeztem. A 90-110 napos, NKCC1^{fl/fl} állatok agykéregébe (bregmától anterior-posterior -2,5 mm-re, laterálisan +1,5 mm-re, dorso-ventrálisan -0,25 mm-re) fiziológiás sóoldatot, LPS-t vagy LPS-t és bumetanidot, míg a mikroglialis NKCC1 hiányos (NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1, KO: cre/+, fl/fl és WT: +/+, fl/fl) állatokéba fiziológiás sóoldatot vagy LPS-t injektáltam üveg kapillárisal. Az injektálás után 24 órával az egereket fiziológiás sóoldattal perfundáltam, majd az injektált agykéregi 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 fiziológiás 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, sejtterefogat szabályozásában és gyulladásos 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 5 μ g LPS-t injektáltam üvegkapillárisal, 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

A transzkardiális 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, Calbiochem) tartalmú Tris-HCl oldatban (pH:7,4), jégen homogenizáltam, majd 30 perc inkubálási idő letelte után 17000 g-n, 4°C-on, 20 percig centrifugáltam. A felülúszók fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay Kit-tel (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, KC, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , BD) segítségével határoztam meg BD FACSVese fluoreszcens áramlási citométerrel. Az eredmények kiértékeléséhez az FCAP Array programot használtam (BD).

Az agy, lép és máj minták fluoreszcens áramlási citometriás vizsgálata

A fluoreszcens áramlási citometriás vizsgálatokhoz az agyszövetet kollagenáz D (0,5 mg/ml, Roche), DNáz (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) és 10% FBS tartalmú DMEM (Sigma-Aldrich) oldatban emésztettem 37 °C-on 15 percig, majd a sejtszuspenziót 40 µm pórusátmérőjű szűrőn eresztettem át. Ezután a 40%-os Percoll oldatba felsuszpendált 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 lép- és májszöveteket 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 T-sejt, B-sejt/granulocita valamint monocita/granulocita populációk elkülönítésére alkalmas antitestek keverékével inkubáltam 30 percig, 4 °C-on. A nem élő sejteket propidium-jodidos jelölés segítségével zártam ki. A jelölt sejteket ezután BD FACSVese áramlási citométerrel mértem, majd az adatokat a FACSuite program segítségével analizáltam ki.

3.7. RNS izolálás és RT-qPCR

A RT-qPCR (valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció) mérésekhez a CD11b+ mágneselesen szeparált mikroglia sejteket és az embrionális neuronális progenitor sejteket QIAzol lízis reagensben (QIAGEN) szuszpendáltam azonnal az izolálás után vagy 10 nap tenyésztést követően. Az RNS izolálás Direct-zol™ RNA Miniprep Kit-tel (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 (ThermoFisher Scientific) segítségével, RNáz H inhibitor jelenlétében (Ambion).

Az *Slc12a2*, *Slc12a6*, *Slc8a1*, *Slc9a1*, *Clen3*, *Clic1*, *Kcnk6*, *Kcnj2*, *Kcna3*, *Lrrc8d*, *Sgk1*, *NLRP3*, *pro-IL-1β* 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. 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* referencia génre vonatkoztatva értendők.

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

A CX3CR1^{+/GFP} mikroglia-riporter egereket testsúlyukra vonatkoztatott mennyiségű fentanylal altattuk el, majd a kraniális ablak műtétet minden állatban a bal agyfélteke szomatoszenzoros kérgi területén a bregmától laterálisan 1,5 mm-re, és 1 mm-re posterior irányban 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.) a koponyához ragasztottunk. A méréseket Chameleon Discovery (Coherent) lézerekkel és Nikon 18X víz immerziós objektívvel felszerelt Femto2D-DualScanhead (Femtonics Ltd.) 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.

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.

3.9. Elektrofiziológia

3.9.1. Hippokampális akut szeletek

A hippocampális akut szeletek készítéséhez izofluránnal altatott, 56-65 napos hím mikroglialisan NKCC1 hiányos 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 hippocampális régiójából vibratóm segítségével 250 µm vastagságú horizontális szeleteket készítettünk. Ezt követően a szeleteket karbogenizált ACSF (mesterséges agy-gerincvelői folyadék; 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 izolektin B4 -et (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.

3.9.2. 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 ozmolalítású, a hipotóniás közeget a 50%-osra hígított normotóniás karbogenizált ACSF oldattal biztosítottuk. A perforált patch eljárás során a membránt kationokra gramicidint és 120 mM KCl-t, 1 mM CaCl₂-t, 2 mM MgCl₂-t, 10 mM HEPES-t, 11 mM EGTA-t, valamint Alexa 488 fluoreszcens festéket tartalmazó intracelluláris pipettaoldat (pH 7,3, 280-300 mOsm) használatával tettük átjárhatóvá. 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 vizsgálatra a sejteket infravörös differenciál interferencia kontraszt, upright típusú mikroszkóp (BX61WI, Olympus) segítségével választottuk ki. Az értékelés során kizárásra kerültek azok a sejtek, melyekben az Alexa 488 jel intracellulárisan megjelent. Minden sejt esetében először -40 mV tartófeszültség mellett a membránpotenciált stabilan tartottuk és a soros ellenállás folyamatos monitorozásával határoztuk meg a perforáció létrejöttét. 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 hosszán, háromszori ismétléssel, az impulzus sorozatok között 2000 ms telt el. A mérést először normotóniás ACSF közegben végeztük el, majd a térfogatváltozás következtében

fellépő áramok vizsgálatához 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).

3.10. Mikrogliasejtek automatizált morfológiai analízise

Annak meghatározására, hogy a mikrogliális NKCC1 hiány okoz-e sejtmorfológiai változásokat, mikrogliálisan NKCC1 hiányos egerekből származó 100 µm vastag koronális agyszleteket használtunk, melyekben a mikrogliasejteket tengerimalacban termeltetett anti-Iba1 (Synaptic Systems) elsődleges ellenanyaggal és számban termeltetett anti-tengerimalac Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch) másodlagos ellenanyaggal jelöltük, DAPI sejtmagfestés mellett. A konfokális rétegfelvételeket CFI plánapokromát VC 60x vízimmerziós objektívvel rendelkező Nikon Eclipse Ti-E lézer konfokális mikroszkóppal (Nikon Instruments) készítettük. A rétegfelvételek készítése alatt a szletek 0,1 M foszfát pufferben voltak. A sejtek háromdimenziós morfológiai vizsgálatához a nyílt forráskódú, MATLAB alapú Microglia Morphology Quantification Tool (elérhető: <https://github.com/isdneuroimaging/mmq>) programot használtuk.

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

A mikrogliális 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 műtétet izoflurán altatás mellett végeztük. 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 MCAo okozta károsodás súlyosságának vizsgálatára pontrendszeren alapuló viselkedésteszteket (corner teszt, Bederson-féle szenzoros és motoros funkciókat végeztünk a 24 órás reperfüzió után. 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.

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. Az infarktus méretét minden agyból 8, neuroanatómiailag meghatározott koronális metszeten (a

bregmától rostrálisan +2 mm és kaudálisan -4 mm közre eső szeletek) lemértem, majd a mért értékeket az ödéma méretére korrigálva adtam meg.

3.12. Immunhisztokémia

3.12.1. Az NKCC1 mikroglialis jelenlétének immunhisztokémiai kimutatása

A ketamin-xilazin keverékével történő terminális altatás után az állatokat 0,9% NaCl-ot tartalmazó sóoldattal 1 percig, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M-os foszfát puffer (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 hippocampuszt 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, kontroll), NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 (mikroglialis NKCC1 KO) és NKCC1^{-/-} (teljes NKCC1 KO) állatokból származó agyszeleteket egyedi mintájú bevágás után együtt jelölődtek, hogy teljesen egyforma kísérleti körülményeket biztosítsunk. A szeleteket tris-pufferelt fiziogias sóoldatban (TBS) történő mosást követően Mouse-on-Mouse oldatban (MOM blokkoló, 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 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 antitestet, 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) mostuk a szeleteket, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagokat tartalmazó keverékbe áztattuk. TBS, majd 0,1 M PB mosást követően a szeleteket DAPI-val jelöltük, majd a tárgylemezeken Aquamount (Polysciences) oldat segítségével rögzítettük. Az immunfluoreszcens jel vizsgálatához CFI Plan Apochromat VC 60X olaj immerziós objektívvel felszerelt, AIR konfokális lézer-rendszerű, Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkópot (Nikon Instruments) 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 integrált denzitásként adtuk meg.

3.12.2. 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, számkamikrotóm segítségével vagy 100 µm vastagságúakat (a fagoszómák vizsgálata esetén) vibratómmal metszve.

Az immunfluoreszcens jelöléshez a szabadon úszó szeleteket először 5% normál számár szérumot tartalmazó TBS-ben blokkoltam, majd egy éjszakán át, 4°C-on elsődleges ellenanyagokkal inkubáltam. A TBS mosást követően a szeleteket 4 órán át, szobahőmérsékleten, gyengéden rázatva a megfelelő, fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagok oldatával kezeltem. Végül 3x10 perc TBS-es mosást követően a tárgylemezre felhúzott szeleteket Fluoromount-G-vel fedtem le (SouthernBiotech). Az ischaemiás agyszöveteken az IL-1α és IL-1β pozitív sejteket kvantitatív meghatározásához Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkóppal 20x Nikon CFI Plan objektívvel, widefield megvilágítással készítettem képeket. A kvantitatív elemzés során az IL-1α és IL-1β 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 LPS-injektált állatokból származó agyszöveteken a kvantitatív analízishez a szeletekről 1 µm-es lépésközökkel 15 µm 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 mikroglia sejteken belül található CD68 fluoreszcens jel integrált denzitását automatizált módon, CellProfiler szoftver segítségével határoztam meg.

3.13. 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-tesztel 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 tesztel történt. Az ábrázolt adatok minden esetben az átlag±SEM értéket jelölik, a $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 8.2 szoftverrel végeztem (GraphPad Software).

4. Eredmények

4.1. Az NKCC1 farmakológiai gátlásának hatása az agyi citokin termelésre

A mikroglia aktiváció monitorozására az egyik alkalmazott módszer a gyulladást okozó faktorok közé tartozó citokinek és kemokinek vizsgálata. A citokin szintek vizsgálatát a hatékony és nagy szenzitivitású citometrikus bead array-vel végeztem, mely lehetőséget ad egyszerre sok fehérje mennyiségének meghatározására. A kísérleteim során az LPS által kiváltott proinflammatorikus folyamatokat jól leíró, kulcsfontosságú citokinek a (G-CSF, KC, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1) mennyiségét vizsgáltam.

Az NKCC1 szisztémás gátlásának hatása az agyi citokin termelésre:

- A kortikális LPS kezeléseken átesett C57Bl6/J egerek agykérgéből származó homogenizátumokban az LPS hatására jelentősen megnövekedett a G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , KC termelés az agyban.
- Az intrakortikális LPS-indukálta citokin termelést (G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , KC) az agyban az intraperitoneális bumetanid kezelés csökkentette.
- Emellett kortikális LPS sem önmagában, sem a szisztémás bumetanid kezeléssel együtt nem okozott jelentős változást a perifériás szervek citokin termelésében.

Az NKCC1 centrális gátlásának hatása az agyi citokin termelésre:

- 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.
- A fluoreszcens áramlási citometriás méréseink igazolták, hogy a centrális bumetanid kezelés esetében az LPS-indukálta agyi citokin termelésen felüli szinteket nem az agyszövetbe infiltrálódó gyulladást okozó sejtpopulációk vagy a mikroglia sejtek számának emelkedése okozta.
- Az intrakortikális LPS kezelés nem volt hatással a lép és a máj citokin termelésére és az intrakortikálisan beadott bumetanid sem befolyásolta a perifériás szervek citokin termelését.

Tehát az NKCC1 szisztémás és centrális gátlása ellentétes hatást gyakorol az LPS-indukálta agyi citokin termelésre, ezáltal a gyulladást mértékére.

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

- *In vitro* és *in vivo* rendszerekben egyaránt igazoltuk a mikroglia sejtek magas citokintermelő kapacitását.

- Konfokális mikroszkópia és többszörös immunhisztokémiai jelölés segítségével kimutattuk, hogy centrális LPS kezelést követően a P2Y₁₂ receptor pozitív mikroglia-sejtek expresszálják az IL-1 α -t és IL-1 β -t is.

Mindezek azt sugallják, hogy a 4.1 alatt leírt gyulladási folyamatokban a centrálisan alkalmazott bumetanid nagy valószínűséggel a mikroglia-sejteken keresztül fejt ki hatását.

4.3. Új kondicionális mutáns egérvonal létrehozása a mikroglialis NKCC1 vizsgálatára

- Az NKCC1 mikroglia-specifikus vizsgálatára a tamoxifennel indukálható, Cre-rekombinázt expresszáló Cx3CR1-Cre^{ERT2} és NKCC1^{fl/fl} egértörzsek keresztezésével egy új, kondicionális mutáns egérvonalat hoztunk létre, melyben az NKCC1 gén deléciója mikroglia-specifikusan történik (NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1).
- RT-qPCR méréssel megállapítottuk, hogy a mikroglialis NKCC1 KO állatokból izolált mikroglia-sejtekben az NKCC1 mRNS szintje markánsan csökkent a vad típusú alomtársakból származó sejtekben mértekhez képest.
- Konfokális mikroszkópia és többszörös immunhisztokémiai jelölés segítségével kimutattuk, hogy az NKCC1 expresszió fehérje szinten is hasonló mértékű csökkenést mutat, mint az NKCC1 mRNS-e esetében.

Sikeresen létrehoztunk tehát egy olyan új egértörzset, mely segítségével tisztázható a mikroglia-specifikus NKCC1 iontranszporter funkcionális jelentősége.

4.4. Az NKCC1 mikroglialis deléciója megváltozott sejtmorfológiát eredményez

- Az NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 egerek fixált agyszövetéről készített konfokális mikroszkópiás felvételeken történt automatizált morfológiai analízis eredményei megmutatták, hogy az NKCC1 hiányos mikroglia-sejtek nagyobb sejtfelszínnel, nagyobb nyúlványtérfoggal és több nyúlvánnyal rendelkeznek, mint a vad típusú mikroglia-sejtek.
- Az intrakortikálisan bejuttatott LPS stimulusra a vad típusú és az NKCC1 KO mikroglia-sejtek egyaránt drasztikus morfológiai változással reagáltak. Mindemellett a mikroglia-sejtek az NKCC1 hiányában kisebb sejtfelszínnel és nyúlványtérfoggal rendelkeznek a vad típusú sejtekhez képest.

Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy az NKCC1 az aktivált mikroglia-sejtek morfológiájának kialakításában és az inflammatorikus hatások következtében változó sejttér fogat szabályozásában is részt vesz.

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

- Konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy 24 órás LPS hatást követően a mikroglialis NKCC1 KO és WT állatokból származó agyseletekben a mikroglialis NKCC1 deléció nem befolyásolta a CD68 pozitív fagoszómák számát a mikroglialis NKCC1 KO sejtekben.
- Ezzel ellentétben, a Bartha-DupGreen vírussal fertőzött, P2Y12-receptor hiányos CX3CR1^{+GFP} P2Y12R^{-/-} egerekben vizsgálva a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitását jelentős mértékű csökkenést találtunk a CD68 pozitív fagoszómák számában a kontroll, CX3CR1^{+GFP}-ben mértekhez képest.

Adataink szerint az NKCC1 iontranszporter nem vesz részt a mikroglia sejtek fagocitotikus aktivitásának szabályozásában.

4.6. A centrális NKCC1 gátlás megváltoztatja a mikroglia nyúlványok motilitását

- *In vivo* két-foton mikroszkóp segítségével készült time-lapse felvételeken megfigyeltük, hogy a CX3CR1^{+GFP} mikroglia-riporter egerekben a mikroglia nyúlványok nyugalmi motilitásának sebessége kis mértékű növekedést mutat az NKCC1 bumetaniddal történő gátlásának hatására.
- Lézer segítségével létrehozott fokális léziót követő mikroglia toborzódás sebességét automatikus képelemzés és modell illesztés segítségével becsültük meg. Az adatok alapján jelentős csökkenés mutatható ki a mikroglia toborzódás átlagos sebességében a bumetanid kezelést követően.

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 nyúlvány motilitás - mind fiziológiás, mind patológiai körülmények között.

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

- RT-qPCR segítségével történt vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az izolált NKCC1 KO mikrogliaiban megnövekedett az NLRP3 és az IL-1 β mRNS expressziója a vad típusú mikrogliahoz képest. A megnövekedett NLRP3 és IL-1 β mRNS expresszió a KO mikroglia sejtekben fennmaradt a ciszterna magnába bejuttatott LPS hatására is.
- Citometrikus bead array segítségével kimutattuk, hogy NKCC1 KO állatokban az intrakortikális LPS-kezelés hatására megnövekedett az agyi citokin termelés a WT állatokban mértekhez képest, míg a perifériás szervek citokin termelését

nem befolyásolta. Fluoreszcens áramlási citometriás kísérleteink eredménye alapján a mikroglialis NKCC1 deléciónem befolyásolta sem a mikroglia számát, sem a toborzó leukocita populációk méretét és összetételét.

A mikroglialis NKCC1 hiánya tehát úgy tűnik, hasonlóan az NKCC1 farmakológialag, intrakortikális bumetaniddal történő gátlása esetében tapasztaltakhoz, jelentős mértékben potenciózza az LPS indukálta agyi gyulladásos folyamatokat, nagy valószínűséggel sejt autonóm módon. A mikroglialis NKCC1 hiánya a mikroglia sejteket egy elő-aktivált („primed”) állapot felé tolja.

4.8. A mikroglialis NKCC1 deléciónem hatására a mikroglialis membrán áramok megváltoznak

- Az NKCC1^{fl/fl} Δ Cx3CR1 egerekből származó akut szeleteken végzett gramicidin perforált patch-clamp méréseink során megállapítottuk, hogy a mikroglialis NKCC1 KO sejtek membránjának a bemenő ellenállása jóval magasabb mind normotóniás, mind hipotóniás közegben, mint a vad típusú sejteké. Azonban a nyugalmi membránpotenciáljukban nem találtunk szignifikáns különbséget.
- A mikroglialis NKCC1 deléciónem hiperpolarizáltabb irányba tolta el a duzzadás-indukálta áramok megfordulását, mely háttérében feltehetően a KO sejtek alacsonyabb intracelluláris Cl⁻ koncentrációja áll.

4.9. A mikroglialis NKCC1 hiány hatására fellépő kompenzációs mechanizmusok vizsgálata

- RT-qPCR segítségével az irodalmi adatok alapján a mikrogliaiban jelen lévő és az intracelluláris ion koncentrációk szabályozásában, a membránpotenciál kialakításában vagy az ozmotikus stresszre adott válaszokban részt vevő gének expresszióját megvizsgálva a legtöbb gén esetében nem találtunk különbséget a vad típusú és a mikroglialis NKCC1 KO mikroglia sejtek között, viszont az *Lrrc8d* (a térfogat által szabályozott VRAC anioncsatorna D alegysége) szintje kétszeresére nőtt NKCC1 deléciónem hatására.
- Az intraciszternális LPS kezelés hatására jelentős csökkenést tapasztaltunk az NKCC1 és a P2Y12R mRNS szintekben, 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.
- 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 típusúhoz képest.

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

- A mikroglialis NKCC1 deléció mellett az ischaemiás stroke nagyobb sérülést, nagyobb agyi ödémát és súlyosabb neurológiai tüneteket eredményezett a vad típusú állatokban megfigyeltékhez képest.
- A 8 órás túlélést követően az aghomogenizátumokból 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.
- Ugyanakkor 24 órával a kísérletes stroke után a fixált agyszöveteken történt többszörös immunhisztokémiai jelölés alapján az IL-1 α - illetve IL-1 β - termelő mikroglia sejtek száma jelentősen megnövekedett a mikroglialis NKCC1 KO állatokban, míg az átlagos mikroglia denzitás (P2Y12R pozitív mikroglia sejtek száma) és az aktivált mikroglia sejtek mennyisége nem különbözött a vad típustól.

A mikroglialis NKCC1 tehát a direkt agyi gyulladáshoz (LPS) stimulusra adott válaszreakció nagymértékű befolyásolása mellett komoly szabályozó hatást fejt ki kísérletes stroke esetén is, s hiánya jelentős állapotromláshoz vezet.

5. Következtetések

Az NKCC1 kotranszporter az irodalmi adatok alapján számos központi idegrendszert érintő betegség kialakulásában rész vesz, de szerepe a mikroglia sejtekben, amelyek a központi idegrendszer fő immunsejtjei, ezidáig tisztázatlan maradt. PhD munkám során feltártuk a mikrogliaiban is nagy mennyiségben expresszálódó NKCC1 alapvető szerepét a mikroglia sejtek működésében, morfológiájában és gyulladáshoz való válaszreakcióiban, az egér agyban. 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. Tehát az NKCC1 aktivitás fontos szerepet játszik a mikroglia fiziológiás működésében és szükséges a mikroglia sejtek sérülésre vagy gyulladáshoz való válaszreakcióihoz is. Az NKCC1 szisztémás gátlása csökkentette az LPS által kiváltott gyulladáshoz való választ, míg az NKCC1 centrális farmakológiai gátlása vagy az NKCC1 mikroglialis deléciója a gyulladáshoz való választ növekedésén keresztül erősítette a gyulladáshoz való választ. Tehát a bumetanid centrálisan leírt hatásai között a mikroglialis NKCC1-en kifejtett hatások is megjelennek, melyek különösen fontosak gyulladáshoz való válaszreakciókkal járó kórképek esetén. Ezért a bumetanid (és továbbfejlesztett analógjai) terápiás hatásosságának és biztonságosságának megítéléséhez további sejt-specifikus vizsgálatok

szükségesek. 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.

Ezen eredményeink alapján a mikroglialis NKCC1 az agyi gyulladásos folyamatok egyik fontos szabályozó elemének tekinthető. Egy új, a mikroglialis NKCC1 kotranszporterén 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. Továbbá az NKCC1 inhibitorok centrális hatásainak értelmezésekor a mikroglialis NKCC1-et potenciális célpontként mindenképp érdemes figyelembe venni, főleg a gyulladással járó agyi kórfolyamatokban.

6. Publikációk listája

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

K. Tóth, N. Lénárt, P. Berki, R. Fekete, E. Szabadits, B. Pósfai, C. Cserép, A. Alatshan, Sz. Benkő, D. Kiss, Ch. A. Hübner, A. Gulyás, K. Kaila, Zs. Környei and Á. Dénes. *The NKCC1 ion transporter modulates microglial phenotype and inflammatory response to brain injury in a cell-autonomous manner*. **PLOS BIOLOGY** 20(1): e3001526 (2022). 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. Sperlág, 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. *Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms*. **ACTA NEUROPATHOLOGICA** 136, 461–482 (2018). doi: 10.1007/s00401-018-1885-0 **IF: 18,174**

További publikációk:

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. Sperlág, 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. *Microglia monitor and protect neuronal function via specialized purinergic junctions*. **SCIENCE** 367:6477 pp. 528-537. (2020). 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. *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 (2019). doi: 10.1073/pnas.1820168116 **IF: 9,412**

G. Kovács, Z. Környei, **K. Tóth**, M. Baranyi, M. Brunner, M. Neubrandt, Á. Dénes, B. Sperlágh. *Modulation of P2X7 purinergic receptor activity by extracellular Zn²⁺ in cultured mouse hippocampal astroglia.* **CELL CALCIUM** 75:1-13 (2018). 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. *Mannose-binding lectin drives platelet inflammatory phenotype and vascular damage after cerebral ischemia in mice via IL (Interleukin)-1α.* **ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY** 38:2678-2690 (2018). doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311058 **IF: 6,618**