

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2748.

PÓSFAI BALÁZS

Neuromorfológia és sejtbiológia
című program

Programvezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár
Témavezetők: Dr. Cserép Csaba, tudományos főmunkatárs
Dr. Dénes Ádám, vezető kutató

A szomatikus mikroglia-neuron kapcsolat szerepe az idegsejtek működésének szabályozásában

Doktori értekezés

Dr. Pósfai Balázs

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Cserép Csaba, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Dénes Ádám, Ph.D., vezető kutató

Hivatalos bírálók: Dr. Németh Tamás, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Wittner Lucia, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

Tagok: Dr. Réthelyi Miklós, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Schlett Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2022

„The more I study nature, the more I stand amazed at the work of the Creator. Science brings men nearer to God.”

„Minél többet tanulmányozom a természetet, annál inkább lenyűgöz a Teremtő munkája. A tudomány közelebb viszi az embert Istenhez.”

Louis Pasteur

„Every one who is seriously involved in the pursuit of science becomes convinced that a spirit is manifest in the laws of the Universe – a spirit vastly superior to that of man, and one in the face of which we with our modest powers must feel humble.”

„Bárki, aki tudományos kutatásba fog, nem kerülheti el azt a meggyőződést, hogy abban, amit mi természettörvénynek nevezünk, valamilyen szellem nyilvánul meg – mérhetetlenül kiválóbb szellem ez, mint az emberi értelem, s az embernek a maga szerény képességével alázatot kell érezni előtte.”

Albert Einstein

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
I. BEVEZETÉS	9
I.1. A mikroglia felfedezése	11
I.2. A mikroglia eredete	12
I.3. A mikroglia szerepe a fejlődő idegrendszerben	14
I.3.1. A mikroglia hatása az erek és a gliasejtek fejlődésére	14
I.3.2. A mikroglia hatása az idegsejtek fejlődésére	15
I.4. A mikroglia szerepe a felnőtt idegrendszerben	16
I.4.1. Mikroglia szerepe fiziológias körülmények között	16
I.4.2. Mikroglia szerepe patológias körülmények között	18
I.5. A mikroglia-neuron kommunikáció formái	19
I.5.1. A mikroglia és az idegsejtek közti közvetett interakciók	20
I.5.2. A mikroglia és az idegsejtek közti közvetlen interakciók, membrán-membrán kapcsolatok	22
I.6. A P2Y₁₂ receptor kiemelt jelentősége a mikroglialis fiziológiában	27
I.7. Neuronális sejtalkotók a mikroglia-idegsejt kommunikáció fényében	29
I.7.1. Exo- és endocitotikus apparátus	29
I.7.2. Mitokondriumok	30
II. CÉLKITŰZÉSEK	33
III. MÓDSZEREK	34
III.1. Etikai állásfoglalás	34
III.2. Állatok	34
III.3. Post mortem humán minták	34
III.4. In vivo beavatkozások és mérések	36
III.4.1. A kísérletek során használt plazmidok	36
III.4.2. In utero elektroporáció	36
III.4.3. In vivo műtéti, farmakológiai és kemogenetikus kezelések	37
III.4.3.1. <i>Experimentális stroke</i>	37
III.4.3.2. <i>Kraniális ablak műtét</i>	37
III.4.3.3. <i>Mikroglia deplécio</i>	38

III.4.3.4. Akut P2Y ₁₂ receptor gátlás	38
III.4.3.5. Kemogenetikus kísérletek.....	38
III.4.3.6. Diazoxid hatásának vizsgálata	39
III.4.3.7. Neuronális kalcium mérések	39
III.4.4. In vivo 2-foton mikroszkópia.....	39
III.4.4.1. Mikroglia-neuron kapcsolatok élettartamának mérése	40
III.4.4.2. Neuronális kalcium-mérés	40
III.4.4.3. Mikroglia-nyúlványmotilitás mérés	40
III.4.4.4. Mozgási index (surveillance score)	41
III.5. Hisztológia	41
III.6. Lézió méretének meghatározása.....	41
III.7. Trifenil-tetrazolium-klorid (TTC) festés	42
III.8. Egér szöveten végzett immunhisztokémia	42
III.8.1. Szövetelőkészítés és fluoreszcens immunhisztokémia.....	42
III.8.2. Elektronmikroszkópos immunhisztokémia	45
III.9. Konfokális mikroszkópia.....	46
III.9.1. Képpalkotás konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal.....	46
III.9.2. Szomatikus és szinaptikus kapcsolatprevalencia mérése.....	46
III.9.3. Kv2.1 és Kv2.2 fehérjék szintjének mérése.....	47
III.9.4. Idegsejtek mikroglialis borítottságának mérése.....	47
III.9.5. cFos fehérje mennyiségének detektálása	48
III.9.6. TOM20 és vNUT fehérjék fluoreszcens intenzitásának mérése.....	48
III.9.7. Stroke-os szöveten végzett anatómiai vizsgálatok.....	49
III.9.7.1. Mitokondrium fragmentáció mérése	49
III.9.7.2. Kv2.1 klaszterek mérése	49
III.9.8. Mikroglia 3 dimenziós morfológiai vizsgálata	49
III.9.9. Szatellita állapot és mikroglia sejtszám meghatározása	50
III.10. Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópia (STORM).....	50
III.10.1. Mintaelőkészítés és képpalkotás.....	50
III.10.2. P2Y ₁₂ receptor eloszlása szuperrezolúciós felvételeken	51
III.11. Elektronmikroszkópia	51
III.11.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	51

III.11.2. Elektrontomográfia	51
III.11.3. 3 dimenziós rekonstrukció	52
III.11.4. Elektrontomográfias felvételeken végzett mérések	52
III.11.4.1. P2Y12 receptor sűrűsége a membránok mentén.....	52
III.11.4.2. P2Y12 receptor mennyiségének és a kapcsolati rés szélességének összefüggése.....	53
III.12. In vitro technikák és mérések	53
III.12.1. Mikroglia izolálása	53
III.12.2. HEK-mikroglia ko-kultúra és a Kv2.1-konstruktok transzfektálása	53
III.12.3. Primer neuronális sejt kultúra készítése	54
III.12.4. Neuronális ATP-felszabadulás mérése	54
III.12.5. Extracelluláris ATP mérése	55
III.13. Statisztika.....	55
IV. EREDMÉNYEK.....	57
IV.1. Mikroglia-neuron kapcsolatok az agykéregben	57
IV.1.1. A mikroglia-nyúlványok kapcsolatot létesítenek a neuronok sejttestével	57
IV.1.2. A szomatikus mikroglia-neuron közvetlen membránkapcsolat bizonyítása elektronmikroszkópia segítségével.....	59
IV.1.3. Mikroglia-neuron kapcsolatok kialakulása és dinamikája <i>in vivo</i>	60
IV.2. A mikroglia-neuron szomatikus junkció neuronális alkotóelemei	62
IV.2.1. A Kv2.1 és Kv2.2 fehérje-klaszterek szerepe a mikroglialis szomatikus kapcsolatok kialakulásában	62
IV.2.2. A mikroglia-neuron szomatikus junkció elsősorban membránhoz közeli mitokondriumok területén alakul ki.....	65
IV.2.3. Vezikulák és lizoszómák feldúsulása a szomatikus junkció területén	65
IV.2.4. Mitokondrium-asszociált membrán és endoplazmás retikulum a szomatikus junkció területén	66
IV.3. A mikroglia a szomatikus junkción keresztül érzékeli és befolyásolja az idegsejtek állapotát	68
IV.3.1. A neuronok sejttestéből ATP szabadul fel a mikroglia-nyúlványok irányába 68	
IV.3.2. A megnövekedett neuronális aktivitás mikroglialis választ vált ki	70

IV.4. A mikroglia-neuron információcsere P2Y12R-függő a szomatikus junkció területén	72
IV.4.1. A mikroglia-specifikus purinerg P2Y12 receptorok szelektíven felhalmozódnak a szomatikus junkciók területén.....	72
IV.4.2. A P2Y12R gátlása esetén rövidül a szomatikus junkciók fennállásának időtartama	76
IV.4.3. Funkcionális P2Y12R hiányában a mikroglia-nyúlványok nem képesek reagálni a fiziológias idegsejtaktivitás növekedésére	77
IV.5. A P2Y12 receptor szerepe a mikroglia motilitás és morfológia szabályozásában	79
IV.5.1. A P2Y12 receptor genetikus deléciója megváltoztatja a mikroglialis sejtszámot és a szatellita sejtek arányát az agykéregben	79
IV.5.2. Funkcionális P2Y12R hiányában megváltozik a mikroglia morfológiája	81
IV.5.3. A P2Y12 receptor fiziológias körülmények között is szabályozza a mikroglialis nyúlványmotilitást <i>in vivo</i>	83
IV.6. A szomatikus junkció funkcionális jelentősége	87
IV.6.1. A szomatikus junkció jelen van az éretlen neuronokon is	87
IV.6.2. A mikroglialis P2Y12 receptor kapcsolat-függő módon feldúsul a fejlődő idegsejtekre érkező szomatikus junkciókban.....	89
IV.6.3. Akut neuronális sérülés hatása a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatokra kísérletes stroke-ot követően	90
IV.6.4. A mikroglia neuroprotektív hatása P2Y12 receptor-függő	92
V. MEGBESZÉLÉS	95
V.1. A szomatikus junkció kitüntetett szereppel bír a mikroglia-neuron kommunikációban	96
V.2. A Kv-fehérjék extraszinaptikus exocitózisra és ionáramokra gyakorolt hatása	99
V.3. A mitokondriumok mint a neuronális aktivitás és sérülés központi integrátorai	101
V.4. A purinerg jelátvitel összetett szerepe az intercelluláris kommunikációban	102

V.5. A P2Y₁₂ receptor szerepe a mikroglialis fiziológiában, valamint a szomatikus junkcióban	105
V.6. Az eredmények klinikai jelentősége	108
VI. KÖVETKEZTETÉSEK	111
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	113
VIII. SUMMARY	114
IX. IRODALOMJEGYZÉK	115
X. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	147
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	149

Rövidítések jegyzéke

ACSF	Mesterséges cerebrospinális folyadék
ADP	Adenozin-difoszfát
ALSP	Felnőttkori leukoenkefalopátia (Adult-Onset Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids and Pigmented Glia)
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)-propánsav
ATP	Adenozin-trifoszfát
BDNF	Agyi eredetű növekedési faktor (Brain-derived neurotrophic factor)
C1q	Komplementrendszer komponens 1q
C3	Komplementrendszer komponens 3
CA1	Hippokampus cornu Ammonis 1 régiója
CAR	Citozin-arabino-furanozid
CLO	Klodronát
CNO	Clozapine-N-oxid
CX3CL1	Kemokin (C-X3-C motívum) ligand 1 (fraktalkin)
CX3CR1	Kemokin (C-X3-C motívum) receptor 1 (fraktalkin receptor)
CSF-1	Kolónia stimuláló faktor 1
CSF1R	Kolónia stimuláló faktor 1 receptor
DCX	Doublecortin
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EGFP	Erősített zöld fluoreszcens fehérje (enhanced green fluorescent protein)
ER	Endoplazmás retikulum
GABA	γ -aminovajsav
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje
HEK	Humán embrionális vesesejtek
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HPLC	Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
Iba1	Ionizált kalciumkötő adapter molekula 1
IL	Interleukin
ip	Intraperitoneális
Kv	Feszültség-függő kálium csatorna

Lamp1	Lizoszóma-asszociált membrán fehérje 1
LTP	Hosszú távú potenciáció (long-term potentiation)
MAM	Mitokondrium-asszociált membrán
MHC-I	Fő hisztokompatibilitási komplex I
mtDNS	Mitokondriális DNS
NIM	Nimodipin
NMDA	N-metil-d-aszparaginsav
NT5E	Ekto-5'-nukleotidáz
NTPDase1	Nukleozid-trifoszfát-difoszfahidroláz 1
P2Y12R	P2Y12 receptor
PB	Foszfát puffer
PBS	Foszfát pufferelt sóoldat
PSB	PSB0739, szelektív P2Y12 receptor antagonist
Pu.1	Purin-gazdag Box-1 transzkripciós faktor
SC	Szinaptikus koktél (ω -agatoxin és ω -conotoxin keveréke)
SEM	Standard hiba (standard error of the mean)
STORM	Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópia
TAM	Tirozin-kináz receptorok családja (Tyro3, Axl, és MerTK receptorok)
TBS	Tris-pufferelt sóoldat
TGF- β	Transzformáló növekedési faktor β
Thy1	Thymocyt differenciációs antigén 1, sejtfelszíni glikoprotein
TNF- α	Tumor nekrosis faktor alfa
TOM20	Mitokondriális külső membrán transzlokáz 20
TREM2	Myeloid sejteken kifejeződő kiváltó receptor 2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)
TTC	2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium-klorid
vGAT	Vezikuláris GABA transzporter
vGluT1	Vezikuláris glutamát transzporter 1
vNUT	Vezikuláris nukleotid transzporter
YFP	Sárga fluoreszcens fehérje

I. Bevezetés

Az emberek évezredek óta – bőven a tudomány ma használt klasszikus fogalmának kialakulása előtti időktől kezdődően – feltekintenek a csillagos égboltra, és vonzza őket az ismeretlen, a nem értett, mégis érzékelt rendezettség a csodálatos összetettség mögött. Már az ókori egyiptomiakat elkezdte azonban izgatni egy fizikailag közelebbi, ám talán még bonyolultabb rendszer, az agy. Az emberi idegrendszer méltán nevezhető az evolúció csúcsának: becslések szerint mintegy 86 milliárd idegsejt végez szabályozott, harmonikus, célzott munkát, melyek mellett nagyjából ugyanekkorára tehető a gliasejtek, szöveti makrofágok, valamint az agyi vér- és folyadéktereket határoló sejtek száma is (Herculano-Houzel, 2009). Figyelembe véve az egyes sejteken belül zajló folyamatok sokaságát, valamint a sejtek közötti kapcsolatok milliárdjait (Pakkenberg, 2003; Schüz és Palm, 1989), az idegrendszeri folyamatok megértése rendkívüli feladat elé állítja a kutatókat. Ugyan az agy mindössze az átlagos emberi szervezet testsúlyának mintegy 2%-át teszi ki, az itt lejátszódó összetett folyamatok energiaigényének fedezésére percenként mintegy 50 ml oxigént (Rink és Khanna, 2011), valamint 80 mg glükózt (Mergenthaler és mtsai, 2013) használunk el, ami mindkét esetben nagyjából a teljes készlet 20%-ának ráfordítását jelenti, mind ébrenlét, mind pedig alvás során. Létfonosságú élettani szerepe és hatalmas energiaigénye miatt is egészségünk záloga, hogy agyi folyamataink zavartalanul folyhassanak, így az idegrendszer fiziológiás működésének megőrzése az egészségügy kiemelt feladata. Ennek ellenére a legfrissebb tanulmányok szerint világszerte az elvesztett évek számának, illetve a betegséggel leélt évek számának legfőbb, míg a halálesetek számának második leggyakoribb oka neurológiai betegséghez köthető (Feigin és mtsai, 2019). Az elmúlt évtizedekben az idegrendszeri megbetegedések gyakoriságának növekedésével jelentős társadalmi érdeké vált, hogy célzottan keressük a különböző patológiás elváltozások okát, következményét és lehetséges megoldását. Ez azonban nem lehetséges az agy fiziológiás működésének megértése nélkül, így kiemelt fontosságú az agy homeosztatisz folyamatainak kutatása. Csak akkor remélhetünk ugyanis érdemi javulást elérni a különböző betegségekkel szemben bevetett terápiás eljárásoktól, amennyiben tisztában vagyunk azon állapot mibenlétével, amelyhez vissza kívánunk térni a gyógymódok segítségével.

A 2010-es évek elejére pusztán Európában évente több mint 800 milliárd eurós költségvonzattal jártak az idegrendszeri megbetegedések (Olesen és mtsai, 2012). A

hasonló tanulmányok ráadásul nem képesek számszerűsíteni a betegségben szenvedők és környezetük személyes megpróbáltatásait és nehézségeit, a kórképek társadalmi vonzatait: belátható, milyen elképesztő mértékű szocio-ökonómiai problémát jelentenek ezek a betegségek (Pritchard és mtsai, 2013). Ezt felismerve, az elmúlt években korábban soha nem tapasztalt mértékű anyagi és emberi erőforrás lett a neurodegeneratív kórképek patofiziológiájának és lehetséges gyógymódjának kutatására fordítva. Ezen vizsgálatok elsősorban, és szinte kizárólag az idegsejtekben (neuronokban) lezajló változásokra összpontosítottak, és ezeket próbálták megelőzni, vagy visszafordítani. Ez a neuron-centrikus hozzáállás azonban olybá tűnik, hogy nem vezet eredményre: a preklinikai vizsgálatok során ígéretes, neuroprotektív célzó terápiás próbálkozások szinte kivétel nélkül buknak el a klinikai próbák során olyan betegségek esetén, mint a stroke, vagy az Alzheimer-kór (Anderson és mtsai, 2017; Hoyte és mtsai, 2004). Mindezen sikertelenség arra utal, hogy egy radikálisan új megközelítésre van szükség.

Az elmúlt évek kutatási eredményei feltárták, hogy az idegrendszeri megbetegedések kialakulásában fontos szerepet játszanak gyulladási folyamatok (Ransohoff, 2016a). A gyulladás szervezetünk azonnali válasza a káros elváltozásokra, mely védi a szöveteket és megteremti a gyógyulás megfelelő körülményeit. A szervezet többi részétől a vér-agy gát által elzárt központi idegrendszer gyulladási folyamatainak legfontosabb szabályozója a mikroglia (Ransohoff, 2016a; Streit és mtsai, 2004), amely az agy veleszületett immunsejtjeként a káros behatások elleni védekezés elsődleges „bástyája”. A mikroglia feladata a szöveti homeosztázis fenntartása (Li és Barres, 2018), működésük megváltozása lényegében minden neuropatológiai kórképben megfigyelhető az akut elváltozásoktól (pl. stroke, traumás sérülés) a krónikus megbetegedésekig (pl. Alzheimer-kór, szklerózis multiplex) (Depboylu és mtsai, 2012; Hong és mtsai, 2016; Karve és mtsai, 2016; Luo és mtsai, 2017; De Picker és mtsai, 2017; Salter és Stevens, 2017; Sandvig és mtsai, 2018; Singhal és Baune, 2017; Wohleb, 2016; Zhao és mtsai, 2018a).

A szervezet veleszületett immunrendszerének támogatása sikeresnek bizonyult az onkológiában, ugyanis az aktív immunoterápia – mely során a daganatos sejtek immunsejtjei általi felismerését és elpusztítását segítjük – valódi áttörést jelentett a daganatterápiában (Morgan és mtsai, 2006; Restifo és mtsai, 2012). Meggyőződésem tehát, hogy az agyi immunfolyamatok, illetve a mikroglia-idegsejt kapcsolatok alaposabb

megismerése közelebb vihet minket az idegrendszeri betegségek eredményes kezeléséhez és megelőzéséhez.

I.1. A mikroglia felfedezése

Az agy kutatásának pionírjai közül az egyik legnagyobb hatást kétségtelenül Santiago Ramón y Cajal munkássága keltette. A spanyol patológus az olasz Camillo Golgival egyetemben feltárta, hogy az idegrendszert bonyolult és sajátos egységek, sejtek építik fel – különböző idegsejtekről készített illusztrációi mind a mai napig tananyagként szolgálnak (de Castro, 2019). A gliasejtekről szóló ismereteink szülőatyja azonban nem ő, hanem kései munkatársa, egy másik spanyol patológus, Pío del Río-Hortega, aki egy addig ismeretlen – bár mások által is dokumentált, de pontosan elkülöníteni nem tudott – sejtípust azonosított a központi idegrendszerből készített mintáin alkalmazott, ezüst-karbonát módszerrel (Sierra és mtsai, 2019). Az új sejtípust elnevezte mikroglíának, és az 1910-es és '20-as években közölt tanulmányaiban a következő megfigyeléseket dokumentálta: (1) a mikroglia sejtek a fejlődés korai szakaszában jelennek meg az agyban, (2) ekkor amőboid alakjuk van, (3) mesodermális eredetűek és (4) a fejlődő erek és fehérállományi struktúrák mentén az agy minden régiójába eljutnak. A felnőtt agyban megfigyelte, hogy (5) a teljes központi idegrendszert benépesítik, nagyjából homogén eloszlásban, (6) minden egyes sejtnek látszólag saját territóriumuk van, (7) morfológiájukra ekkor már kis sejttest és számtalan hosszú, vékony és elágazó nyúlvány jellemző, amely azonban (8) patológiás körülmények között megváltozik, és ismét amőboid formát ölt. Szintén az ő munkájából sejthető, hogy ezek a sejtek képesek vándorolni, osztódni és fagocitálni is (Kettenmann és mtsai, 2011; Sierra és mtsai, 2016, 2019). Bár ezen pontok többségét az évtizedek során számos kutató és tanulmány vont kétségbe, megfigyelései jelenlegi tudásunk szerint mégis rendkívül pontosak és mind a mai napig megállják a helyüket. Sőt, olyannyira megelőzte a korát ezekkel a leírásokkal, hogy a mikroglia-kutatás következő jelentős mérföldkövéig nagyjából nyolcvan évnek kellett elteltie. Az *in vivo* képalkotó eljárások elterjedésének köszönhetően, 2005-ben két kutatócsoport is egymástól függetlenül megmutatta, hogy a mikroglia sejtek a központi idegrendszer sejtjei közül egyedülálló módon nem statikusak, hanem nyúlványaik folyamatosan mozgásban vannak, lényegében „tapogatják” a környezetüket (Davalos és mtsai, 2005; Nimmerjahn és mtsai, 2005). Az is bebizonyosodott, hogy a mikroglia-

nyúlványok célzott mozgásra is képesek, ugyanis az idegsejtekből általános veszélyjelzésként („danger signal”) felszabaduló ATP-re (Rodrigues és mtsai, 2015) rendkívül érzékenyen reagálnak, és ez a molekula kemoattraktánsként vonzza a mikroglia-nyúlványokat (Davalos és mtsai, 2005).

A következő alfejezetekben szeretném részletesen bemutatni a mikroglia eredetét, a fejlődő és érett idegrendszerben betöltött szerepét mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között, valamint az idegsejtekkel történő kommunikációjának strukturális és funkcionális alapjait.

I.2. A mikroglia eredete

A mikroglia fejlődéstani eredetének tisztázása hosszú utat bejárva ért vissza a kiindulóponttra: mivel az idegrendszer egyéb sejtjes elemei az idegsejtektől a neuroendokrin sejteken át a gliasejtekig a külső csíralemezből, vagyis az ektodermából eredeztethetőek (Stiles és Jernigan, 2010), ezért kézenfekvőnek tűnt a gondolat, hogy ez igaz kell legyen a mikrogliaira is. Hiába írta Pío del Río-Hortega, hogy az általa megfigyelt gliasejtek mesodermális eredetűek, éveken keresztül élt az a tévhit, hogy a mikroglia sejtek szintén a neuroektodermából származnak (Fedoroff és mtsai, 1997). A tudományos eszköztár fejlődésével azonban sikerült mára minden kétséget kizáróan bizonyítani, hogy a mikroglia a többi makrofág funkcióval rendelkező sejthez hasonlóan valóban extraembrionális mezoderma eredetű (Ginhoux és mtsai, 2010; Gomez Perdiguero és mtsai, 2015). Az erythro-myeloid sejtvonalhoz tartozást erősítik azok a megfigyelések is, melyeket Pu.1 génkiütött egerekben végeztek: a Pu.1 a hemopoetikus sejtek differenciációjához elengedhetetlen transzkripciós faktor (Kastner és Chan, 2008), amelynek hiányában testszerte hiányoznak a monocyták valamint a szöveti makrofágok, köztük a mikroglia is (Goldmann és mtsai, 2016; Kierdorf és mtsai, 2013; Schulz és mtsai, 2012).

A fejlődő idegrendszer területét a mikroglia az egyedfejlődés nagyon korai fázisában kolonizálja: egérben az embrionális 9. napon már megtalálhatóak az agyban ezek a sejtek, míg embereknél az 5. gesztációs héten jelennek meg (Ginhoux és mtsai, 2010; Verney és mtsai, 2010). Korai jelenlétükből adódóan a formálódó idegrendszerben irányítják és szabályozzák a különböző progenitor sejtek osztódását, vándorlását és funkcióját, kivétel nélkül hozzájárulva a neuro-, a glio- és az angiogenezis folyamataihoz (Bilimoria és

Stevens, 2015; Erblich és mtsai, 2011; Mosser és mtsai, 2017; Reemst és mtsai, 2016; Rymo és mtsai, 2011; Shigemoto-Mogami és mtsai, 2014). Az erekből kilépő, amőboid mikroglia sejtek a fejlődés korai szakaszában tangenciális, majd radiális irányban mozognak, és intenzív proliferáció során az embrionális fejlődés befejezte előtt elérik a felnőtt egyedekben jellemző sejtszámot és elhelyezkedést (Monier és mtsai, 2007; Navascués és mtsai, 2000; Nikodemova és mtsai, 2015; Verney és mtsai, 2010). Agyterülettől függően a mikroglia sejtek nagyfokú heterogenitást mutatnak: mind az idegsejtekhez viszonyított arányuk, mind a transzkriptomikai profiljuk eltérő régióként – ez utóbbit nagyrészt az egyes sejtek mikrokönyezete alakítja ki (Böttcher és mtsai, 2019; Grabert és mtsai, 2016; Hammond és mtsai, 2019; Sankowski és mtsai, 2019). A szervezet egyéb szöveti makrofágjaitól eltérő módon, abban a vér-agy gát által elzárt különleges környezetben, amit a központi idegrendszer jelent, a mikroglia populációja önfenntartó és nem kap utánpótlást a vérkeringésben jelenlévő immunsejtektől. A nagyjából állandó sejtszámot a mikroglia proliferációs és apoptotikus egyensúlya tartja fent (Askew és mtsai, 2017; Huang és mtsai, 2018). Ebben a folyamatban kiemelt szerepet kap a CSF-1 receptor (CSF1R): ez a fehérje a központi idegrendszerben kizárólag a mikrogliaán található meg (Erblich és mtsai, 2011), és konstitutív aktivációja elengedhetetlen a mikroglialis populáció fenntartásához (Elmore és mtsai, 2014; Gómez-Nicola és mtsai, 2013; Olmos-Alonso és mtsai, 2016). Ennek ékes bizonyítékeként a CSF1R farmakológiai gátlása (PLX3397 vagy PLX5622 segítségével, Plexxikon Inc.) három hét alatt az agyi mikroglia 98 százalékának eltűnésével jár (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020; Szalay és mtsai, 2016). További bizonyítékként a homozigóta CSF1R-mutáns zebraalak és rágcsálók nem rendelkeznek mikrogliaival (Oosterhof és mtsai, 2019). A CSF1R működési zavarának hatását emberben is megfigyelték: a biallélikus CSF1R-mutációval rendelkező csecsemő komoly agyi fejlődési zavarokkal jött világra, és 1 éves kora előtt elhunyt. A post mortem vizsgálatok a mikroglia teljes hiányát mutatták ki az agyában (Oosterhof és mtsai, 2019). Szintén CSF1R mutáció eredménye egy progresszív neurológiai kórkép, a felnőttkori leukoencefalopátia (ALSP), amely során fokális léziók alakulnak ki az agyban, melyet mikroglialis működési zavar és funkcióvesztés kísér (Kempthorne és mtsai, 2020; Oyanagi és mtsai, 2017).

I.3. A mikroglia szerepe a fejlődő idegrendszerben

Az egészséges és funkcionálni képes központi idegrendszer komplexitását még megbecsülni is nehéz, ha tudjuk, hogy az emberi agyban becslések szerint körülbelül 85 milliárd idegsejt van (Herculano-Houzel, 2009), melyek mindegyike akár több ezer szinapszist létesít más sejtekkel (a szinapszisok becsült száma 10^{14} nagyságrendű), egyes sejtek dendrithálózata pedig akár a sejttest átmérőjének ötszázszorosát meghaladó távolságra is kiterjedhet, sejtípustól függően többszáz elágazással (Brown és mtsai, 2008). A gliasejtek száma nagyjából a neuronok számával egyenlő (Herculano-Houzel, 2009), és ezt a rengeteg sejtet hatékonyan ellátni képes érhálózatra is szükség van. Könnyen belátható, hogy ez az összetett rendszer csak szigorúan szabályozott keretek között alakulhat ki, és a kutatási eredmények alapján ebben kiemelt szerepe van a mikrogliónak.

I.3.1. A mikroglia hatása az erek és a gliasejtek fejlődésére

Ahogy az előző fejezetben említettem, a mikroglia a központi idegrendszer sejtjes elemei közül elsőként kolonizálja a fejlődő agy területét, ahol mind az érhálózat kialakulásában, mind a sejtek közti megfelelő összeköttetések létrejöttében, mind az ideg- és gliasejtek számának és elhelyezkedésének szabályozásában kiemelt szerepet tölt be. Az előbbire fontos bizonyítékul szolgáltak azok a vizsgálatok, amelyekben szoros összefüggést figyeltek meg a mikroglia intrauterin fejlődés során végzett vándorlási útvonala, és az érsarjadzás között (Monier és mtsai, 2007; Rigato és mtsai, 2011). Ez a kapcsolat szintén megfigyelhető a korai posztnatális időszakban, az agykéreg felsőbb rétegeiben (Arnoux és mtsai, 2013). Szintén a mikroglia érfejlődésre gyakorolt hatását bizonyítja, hogy *in vitro* kísérletekben mikroglia sejtek, vagy mikroglialis eredetű mediátorokat tartalmazó médium hozzáadása értenyészetekhez fokozza az új erek képződését (Rymo és mtsai, 2011). Továbbá ha a mikroglia sejtek száma zavart szenved a fejlődő idegrendszerben (pl. Pu.1 génkiütött állatokban, ahol teljesen hiányoznak a szöveti makrofágok), az egerek agyi érrendszere alulfejlett marad (Arnold és Betsholtz, 2013; Mosser és mtsai, 2017).

A gliogenezisre is jelentős hatást gyakorol a mikroglia: a közel teljes mikroglia-hiányt okozó CSF1R génkiütött egerekben megnövekedett számú asztrocita, ellenben lecsökkent mennyiségű oligodendrocita sejt található az agykéregben (Erblich és mtsai, 2011), míg ezzel összhangban egy másik tanulmányban azt is bizonyították, hogy korai

posztinatális korban a mikroglia serkenti az oligodendroglionogenezist a szubventrikuláris zónában (Shigemoto-Mogami és mtsai, 2014). A mikroglia jelenlétének serkentő hatását az asztrociták keletkezésére sejt kultúrában igazolták (Reemst és mtsai, 2016).

I.3.2. A mikroglia hatása az idegsejtek fejlődésére

Az idegrendszer fejlődésének korai szakaszában az idegsejtek dendritjei és axonjai a sejtestből kezdenek kinyúlni, majd ezt követően meghatározott irányban növekszenek, hogy végül ezen nyúlványokon keresztül, szinapszisok segítségével kommunikálni legyenek képesek egymással a neuronok (Bystron és mtsai, 2008; Huttenlocher és Dabholkar, 1997). Az axonok növekedésének irányításában aktívan részt vesz a mikroglia, hiszen nagy mennyiségben figyelhető meg az axonális nyúlványelágazásoknál (Squarizoni és mtsai, 2014), mikroglia hiányában pedig az agyféltekék közti kommunikáció legfontosabb fehérállományi útvonala, a corpus callosum fejlődése is zavart szenved (Pont-Lezica és mtsai, 2014). A károsodott, vagy hibásan kifejlődött axonok eltávolítása és reorganizációja is mikroglialis feladat (Dalmau és mtsai, 1998), és a gyors ingerületvezetést lehetővé tevő myelinizáció hibátlan működése is mikroglialis ellenőrzés alatt áll (Lloyd és mtsai, 2017).

A mikroglia fejlődésben betöltött funkciói közül a legnagyobb tudományos irodalma kétségtelenül a szinaptikus kapcsolatok kialakulására, plaszticitására és számuk szabályzására gyakorolt hatásnak van (Wu és mtsai, 2015). A fejlődés során a felnőtt agyban megfigyelhető szinapszismennyiségnél lényegesen több szinaptikus kapcsolat jön létre a fejlődő idegsejtek között, amelyek közül a hibás, vagy nem használt szinapszisok eliminációra kerülnek (Craik és Bialystok, 2006). Ezen folyamatok szabályzásában is központi szerepet játszik a mikroglia: mind az új szinapszisok keletkezésében (Lim és mtsai, 2013), mind a létszámon felüli szinapszisok aktivitás-függő eliminációjában zavar következik be (Schafer és mtsai, 2012) a mikroglia működésének defektusa esetén. A közvetlen, szinaptikus profilokat érintő mikroglia-neuron kapcsolat létrejötte a fejlődő egér primer szomatoszenzoros kéregben szinapszisok kialakulását indukálja a kapcsolat helyén, miközben a mikroglia genetikai módszerekkel történő depléciójának eredményeképpen kevesebb dendrittüske és kevesebb funkcionálni képes serkentő szinapszis alakul ki a fejlődés során, valamint szelektíven csökken az agykérgi sejtrétegek közötti konnektivitás (Miyamoto és mtsai, 2016).

Az egészségesen fejlődő idegrendszerben az idegsejtek végső számának kialakulása nagyrészt a születő és a programozott sejthalálon áteső neuronok számától és arányától függ. A mikroglia hozzájárul a prekursor sejtek megfelelő migrációjához, differenciációjához és proliferációjához (Aarum és mtsai, 2003), emellett jelenlétük támogatja a fejlődő neuronok túlélését (Bilimoria és Stevens, 2015). Ez utóbbi feladatuk a korai posztnatális fejlődés során is kiemelt jelentőségű, ugyanis az agykéreg ötödik rétegében található idegsejteknek szükségük van a mikroglia jelenlétére a túléléshez (Ueno és mtsai, 2013). A fejlődés során lejátszódó programozott idegsejthalál folyamatának mikroglia-függőségét számos fajban és agyterületen kimutatták már, így csirke retinában, patkány gerincvelőben, patkány, valamint egér kisagyban, hippocampusban és kéregben is (Erblich és mtsai, 2011; Frade és Barde, 1998; Marín-Teva és mtsai, 2004; Perez-Pouchoulen és mtsai, 2015; Sedel, 2004; Wakselman és mtsai, 2008).

Ezekből is látható, hogy a mikroglia jóval több, mint egy immunsejt – a fejlődés során betöltött komplex szabályzó szerepe felnőttkorban további elemekkel bővül.

I.4. A mikroglia szerepe a felnőtt idegrendszerben

I.4.1. Mikroglia szerepe fiziológias körülmények között

A 20. században a mikrogliaira vonatkozó megfigyelések szinte kivétel nélkül a patológias körülmények között megváltozott – reaktív („activated”) állapotnak nevezett – morfológiára fókuszáltak. Specifikus mikroglia-markerek és célzott, sejtszintű manipulációs technikák hiányában nem derült fény arra, hogy a mikroglia fiziológias körülmények között is fontos szereppel bír. Ebből a szempontból az áttörést az élő állatokban 2-foton mikroszkóppal tett megfigyelések jelentették, amelyek feltárták, hogy az addig „nyugvó”-ként jellemzett, fiziológias mikroglia vékony nyúlványai folyamatos mozgásban vannak, látszólag a környezetükben lévő sejteket és érszakaszokat „tapogatják” (Nimmerjahn és mtsai, 2005). Ezzel összhangban fény derült rá, hogy a szöveti sérülés, és az akár ennek hatására, akár külső beavatkozásra a sejtközi térben megjelenő nagy mennyiségű ATP magához vonzza a mikroglia-nyúlványokat (Davalos és mtsai, 2005). A nyúlványok mozgékonyaságán túl arra is van bizonyíték, hogy a mikroglia sejtek körülbelül 10%-ának a sejtteste is folyamatos, lassú mozgásban van (Eyo és mtsai, 2018). A kétféle mozgás sebességében azonban több nagyságrendbeli különbség

figyelhető meg, ugyanis míg a nyúlványok percenként átlagosan 10-20 μm -t – kivételes esetben akár 80 μm -t is – megtesznek, addig a sejttetek fiziológiai körülmények között mindössze körülbelül napi 1 μm -t vándorolnak (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020; Eyo és mtsai, 2018; Sipe és mtsai, 2016).

A mindezidáig kvázi állandónak, sejtszintű változásra csak nagyon korlátozottan képesnek gondolt idegrendszerben egy dinamikus mozgó sejt jelentette újdonság értelemszerűen nagyfokú érdeklődésre tartott számot, és a mikrogliaval kapcsolatos ismereteink sebesen bővültek. Az elmúlt másfél évtized kutatásai rávilágítottak, hogy a mikroglia – a zebrahalaktól a főemlősökig – fontos homeosztatisz szerepe van a központi idegrendszerben, és feladatainak sora messze túlmutat a patológiai ágensekkel szembeni védekezésen (Kierdorf és Prinz, 2017; Pósfai és mtsai, 2019).

A fejlődő idegrendszerhez hasonlóan a mikroglia a felnőtt egyedekben is hozzájárul a neurogenesis elősegítéséhez, szabályozásához és fenntartásához. *In vitro* kísérletek során megfigyelték, hogy a mikroglia sejt kultúráról gyűjtött felülúszó serkenti az őssejtek proliferációját és neuronális differenciációját (Walton és mtsai, 2006). A hippocampusban zajló felnőttkori neurogenesis serkentése szintén mikroglia-függőnek bizonyult (Ziv és mtsai, 2006), mint ahogy az itt születő sejtek túlélése, integrációja a neuronális hálózatba, valamint a születés után apoptotizáló, számfeletti idegsejtek szövetből történő eltávolítása is (Sierra és mtsai, 2010; Song és mtsai, 2012). Ez utóbbi folyamattal kapcsolatban a mikroglia még egy fontos szabályzó szerepe is van, ugyanis a fagocitáló mikrogliaiból szekretált anyagok lassítják az új sejtek keletkezését, azaz jelzik a szervezetnek, hogy már így is keletkeztek létszámfeletti idegsejtek (Diaz-Aparicio és mtsai, 2020).

Az újonnan születő sejtek modulációján túl a mikroglia szintén képes befolyásolni az idegsejtek közti információátadást, mégpedig a szinaptikus kapcsolatok modulációjával. A szinapszisok körülményekhez alkalmazkodó keletkezése és eltűnése, méretüknek és receptortartalmuknak a dinamikus változása – az ún. szinaptikus plaszticitás – az idegi folyamatok hibátlan működésének alappillére, a magasabb kognitív folyamatok elengedhetetlen feltétele (Citri és Malenka, 2008). A mikroglia fontos szerepet játszik a felnőttkori reaktív szinaptogenesisben (Bessis és mtsai, 2007), valamint a nem használt, vagy hibás szinapszisok eliminációjában (Jung és Chung, 2018; Tremblay és mtsai, 2010) – ez utóbbi folyamatot leginkább a preszinaptikus idegvégződések trogocitózissal történő

bekebelezésével hajtják végre (Weinhard és mtsai, 2018). A memórianyomok rögzülésének alapjául szolgáló szinaptikus plaszticitás szabályzásában is kiemelt szerepe van a mikroglának, hiszen a hippokampális hosszútávú potenciáció (long-term potentiation, LTP) folyamata során is megfigyelték a mikroglia dinamikájának és morfológiájának a megváltozását (Pfeiffer és mtsai, 2016). Mikroglialis mediátorok szükségesek a homeosztatikus szinaptikus súlyozás (synaptic scaling) zavartalan működéséhez (Stellwagen és Malenka, 2006), képesek a glutamaterg jelátvitelben kiemelt szerepet betöltő NMDA receptorok működését nagymértékben meghatározó glicin-kötő alegységének modulálására (Hayashi és mtsai, 2006), a szinaptikus AMPA receptorok számának befolyásolására (Beattie és mtsai, 2002), valamint a neuronális Cl⁻grádiens befolyásolására is (Coull és mtsai, 2005; Tsuda és mtsai, 2010), amely az idegsejtek ingerelhetőségét határozza meg.

I.4.2. Mikroglia szerepe patológiás körülmények között

Ha pusztán azt figyelembe vesszük, hogy milyen alapvető élettani folyamatokat szabályoz a mikroglia az egészséges idegrendszerben, cseppet sem meglepő, hogy szerepét kiemelt figyelem övezi neuropatológiás folyamatokban is. Káros behatást észlelve a mikroglia transzkripciós és morfológiai változáson megy keresztül: a fiziológiai körülmények között kis sejttesttel és számos hosszú, vékony nyúlvánnyal jellemezhető sejtek lekerekednek, nyúlványaik visszahúzódnak és megduzzadnak, a sejt összességében egy amöboid formát vesz fel (Davalos és mtsai, 2005; Kreutzberg, 1996). Ezt a patológiás körülmények között megjelenő morfológiát már del Río Hortega is megfigyelte (Sierra és mtsai, 2016). Ebben az állapotban a mikroglának megnő a fagocitotikus kapacitása is, és gyulladáshoz vezető faktorok termelésébe kezd (Gehrmann és mtsai, 1995; Neumann és mtsai, 2008). A mikroglia morfológiai változásával párhuzamosan a transzkriptóm változása is megfigyelhető mind akut-, mind pedig krónikus patológiás körülmények között, illetve az öregedés során is (Gonzalez-Pena és mtsai, 2016; McCarthy és mtsai, 2018; Pan és mtsai, 2020; Sousa és mtsai, 2018).

Immunsejtként a mikroglia számos veleszületett és adaptív receptorral rendelkezik, így mintázatfelismerő receptorokkal, komplement receptorokkal, Fc receptorokkal, stb., melyek segítségével a környezetében megjelenő patogének, molekulák és metabolitok rendkívül hatékony érzékelése válik lehetővé (Fuller és mtsai, 2014; Kigerl és mtsai,

2014; Schmid és mtsai, 2002; Veerhuis és mtsai, 2011). A körülményektől függően a mikroglia képes pro- (pl. interleukin-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), illetve anti-inflammatorikus (pl. TGF- β , IL-10, IL-1Ra) citokinek szekréciójára, melyek kölcsönösen precíz szabályozása szükséges a gyulladás kontrollált keretek között tartásához (Cherry és mtsai, 2014; Kim és Joh, 2006). A folyamatok egyensúlyának megbomlása, vagy a gyulladást kiváltó faktor perzisztáló jelenléte krónikus gyulladáshoz vezethet, amely az agyi homeosztázis zavarát váltja ki.

A központi idegrendszerben zajló gyulladásos folyamatok szerepe a leggyakoribb neuropatológiai kórképekben az utóbbi évek során bizonyítást nyert (Chen és mtsai, 2016; Guzman-Martinez és mtsai, 2019; Salter és Stevens, 2017). Az agyi gyulladásos folyamatok, és a neuroinflammáció legfontosabb sejtes mediátorának számító mikroglia transzkripciós és/vagy morfológiai változása megfigyelhető fertőzőes eredetű kórképekben (pl. encephalitisben, meningitisben, prionbetegségben), neurodegeneratív betegségekben (pl. Alzheimer-kórban, Parkinson-kórban, szklerózis multiplexben, amiotrófiás laterálszklerózisban), valamint traumás agysérülésben és stroke-ot követően is (Aguzzi és Zhu, 2017; Doens és Fernández, 2014; Geloso és mtsai, 2017; Loane és Byrnes, 2010; Long-Smith és mtsai, 2009; Napoli és Neumann, 2010; Prokop és mtsai, 2013; Rock és mtsai, 2004; Sargsyan és mtsai, 2005; Thameem Dheen és mtsai, 2007; Yenari és mtsai, 2010). A legtöbb kórképben azonban nem tisztázott, hogy a mikroglialis változás egy reakció a bekövetkező patológiás folyamatokra, avagy részben éppen annak okozója.

I.5. A mikroglia-neuron kommunikáció formái

A mikroglia fiziológiás állapotban, illetve patológiás folyamatok során is képes számtalan modulátoros anyag szekréciójára, amelyek befolyásolják a környezetükben lévő sejtek működését, a sejtközi térben, illetve a liquorba jutva hatásukat a szekréció helyétől nagyobb távolságra is képesek kifejteni. Mindemellett a mikroglia számos neurotranszmitterre és neuromodulátoros anyagra érzékeny a membránjában található receptorai segítségével – többek között glutamát-, GABA-, acetyl-kolin-, purin-, catekolamin-, opioid- és hisztamin-receptorokkal is rendelkezik (Biber és mtsai, 2001; Dobrenis és mtsai, 1995; Ferreira és mtsai, 2012; Gottlieb és Matute, 1997; James és Butt, 2002; Kuhn és mtsai, 2004; Pocock és Kettenmann, 2007; Shytle és mtsai, 2004; Tanaka

és mtsai, 2002). Ezáltal a mikroglia és a neuronok több különböző útvonalon képesek befolyásolni egymás működését, mind közvetett, mind közvetlen módon, membrán-membrán kapcsolatokon keresztül.

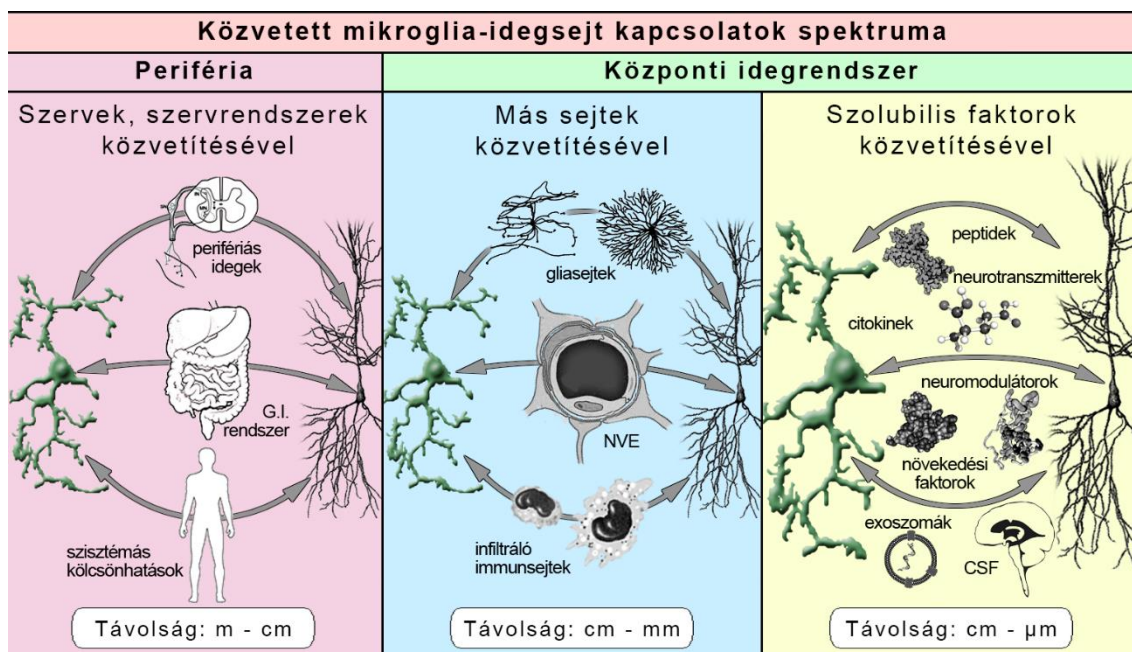
I.5.1. A mikroglia és az idegsejtek közti közvetett interakciók

A mikroglia és a neuronok más sejteken, vagy akár szerveken, szervrendszereken kifejtett hatásukkal is közvetlen módon befolyásolják egymás működését (1. ábra). Így például a perifériás idegek fiziológiáját nagyban meg tudják változtatni mind a mikroglia által szabályozott humorális-, mind neuronális eredetű metabolitok, miközben a perifériás idegek és a gerincvelői neuronok szabályozzák a mikroglia működését (Benakis és mtsai, 2020; Sharon és mtsai, 2016; Thion és mtsai, 2018). Az agyi érhálózat működésének változása – amelynek fontos szabályzója a mikroglia (Császár és mtsai, 2022) – és a mikroglia magasabb aktivitása is zavarokat okozhat a bélflórában, amely változások befolyásolják a központi idegrendszer neuronjainak működését (Ma és mtsai, 2019; Sharma és mtsai, 2019; Singh és mtsai, 2016). Ugyanígy a gasztrointesztinális dysbiosis hatással van a szervezetben lejátszódó gyulladásos folyamatokra, amelyek közismerten befolyásolják a mikroglia működését (Dantzer és mtsai, 2008; Gyoneva és mtsai, 2014; Streit és mtsai, 2004).

A központi idegrendszer sejtjes elemei is szerepet játszhatnak közvetítőként a mikroglia-neuron kölcsönhatásban (1. ábra). Az asztrocita sejtek például szorosan együttműködnek mind neuronokkal, mind mikrogliaival, és egymás működését kölcsönösen befolyásolják: a neuronok metabolitokat cserélnek asztrocitákkal (Roman és mtsai, 2021; Roosterman és S. Cottrell, 2020; Zulfiqar és mtsai, 2019), miközben a mikroglia-asztrocita kapcsolat kiemelten fontos mind fejlődésben (Vainchtein és Molofsky, 2020), mind a szinaptikus működés szabályzásában (Schafer és mtsai, 2013). Az asztrocita is képes befolyásolni a másik két sejtípust, többek között az ion-háztartás szabályozásával (Allen és Eroglu, 2017; Matejuk és Ransohoff, 2020). A neurovaszkuláris egységben idegsejtek, mikro- és makroglia-sejtek, periciták, simaizomsejtek és endothel sejtek szabályozzák szoros együttműködésben az agyi ereket, és összetett módon egymást is (Haruwaka és mtsai, 2019; Zhao és mtsai, 2018b). Patológias körülmények között a központi idegrendszer parenchymájában perifériás immunsejtek jelennek meg, amelyeknek mind a beáramlását, mind a működését a mikroglia szabályozza (Fekete és mtsai, 2018; Otxoa-de-Amezaga

és mtsai, 2019; Unger és mtsai, 2018), miközben az immunsejtek által kiválasztott mediátorok (pl. citokinek) nagymértékben befolyásolják az idegsejtek működését (Filiano és mtsai, 2017; Gadani és mtsai, 2015; Ortega és mtsai, 2020).

Szolubilis faktorok útján, közvetítő sejtek és közvetlen membránkapcsolat nélkül is létrejöhet mikroglia-neuron kommunikáció (1. ábra). Ez a fajta információátvitel nagyobb távolságra lévő és nagyobb számú célsejtre lehet hatással, cserébe mind térben, mind időben kevésbé precízen szabályozható, mint a közvetlen membránkapcsolatokon keresztül zajló kommunikáció. A neuronális működést bizonyítottan szabályozzák olyan mikroglialis eredetű metabolitok, mint az agyi eredetű növekedési faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), az interleukin (IL)-10, az IL-1 β , és a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α) (Beattie és mtsai, 2002; Coull és mtsai, 2005; Hewett és mtsai, 2012; Huang és mtsai, 2011; Lim és mtsai, 2013; Olmos és Lladó, 2014; Parkhurst és mtsai, 2013; Pereira és mtsai, 2015). A másik irányú kommunikációt például az idegsejtekből származó purin-származékok és a glutamát biztosítja, amelyek a mikroglia befolyásolják (Davalos és mtsai, 2005; Dissing-Olesen és mtsai, 2014; Eyo és mtsai, 2014; Fontainhas és mtsai, 2011). Természetesen ily módon kialakulhatnak visszacsatolási körök: a közelmúltban derült fény rá, hogy a neuronokból felszabaduló ATP hatására a mikroglia adenzint termel, amely visszahat a neuronális aktivitásra (Badimon és mtsai, 2020). Ezek a felsorolt kommunikációs útvonalak természetesen egymással ötvözve, összetett módon befolyásolhatják populációs szinten mind az idegsejtek, mind a mikroglia működését.



1. Ábra. Az idegsejtek és a mikroglia közti kétirányú kommunikáció közvetett módjai. Az információcsere a mikroglia és az idegsejtek között számos közvetett módon történhet meg: perifériás szervek és szervrendszerek közvetítésével, a központi idegrendszer más sejtjes elemein keresztül, vagy szolubilis faktorok segítségével. [Átdolgozva: (Cserép és mtsai, 2021a)]

I.5.2. A mikroglia és az idegsejtek közti közvetlen interakciók, membrán-membrán kapcsolatok

Az élő szervezetben a sejtek közti kommunikáció legprecízebb módja a közvetlen membránkapcsolatokon keresztül valósulhat meg. Itt az információcsere térben és időben rendkívüli módon szabályozható, ami a hatalmas számú sejt harmonikus együttműködése szempontjából elengedhetetlen. Így bár az eddig felsorolt mikroglia-neuron kölcsönhatások is mind fontos szerepet játszanak a két sejtípus kapcsolatában, a legvalószínűbb, hogy a mikroglia által befolyásolt létfontosságú neuronális folyamatok szabályzásához közvetlen membrán-membrán kapcsolatnak kell kialakulnia a sejtek között, amelyben ingerületátvivő anyagok, ionok, membránkötött receptorok vagy egyéb integráns membránfehérjék segítségével fejthetik ki egymásra gyakorolt hatásukat a sejtek.

A neuronok a leginkább összetett morfológiával rendelkező sejtek, amelyeket nagymértékű polarizáció és komplex nyúlványrendszer jellemez (Misgeld és Schwarz, 2017). Bár széleskörben megszokott az idegsejtekre mint merev, állandó egységekre

gondolni, a sejtek egyes alegységei nagyfokú funkcionális autonómiával működnek, és a sejttest kivételével a neuron részei plasztikusak (Donato és mtsai, 2019). A fehérjék translációja nem csak a szomatikus régióban történhet meg, hanem a távolabb lévő dendritekben és axonvégződéseken is (Biever és mtsai, 2019; Cioni és mtsai, 2018). Ez a jelenség – együtt a nyúlványokban található mitokondriumok plaszticitásával (Cogliati és mtsai, 2016; Cserép és mtsai, 2018; Misgeld és Schwarz, 2017) – lehetővé teszi, hogy az idegsejtek egyes kompartmentumai gyorsan és függetlenül tudjanak alkalmazkodni a lokálisan változó körülményekhez.

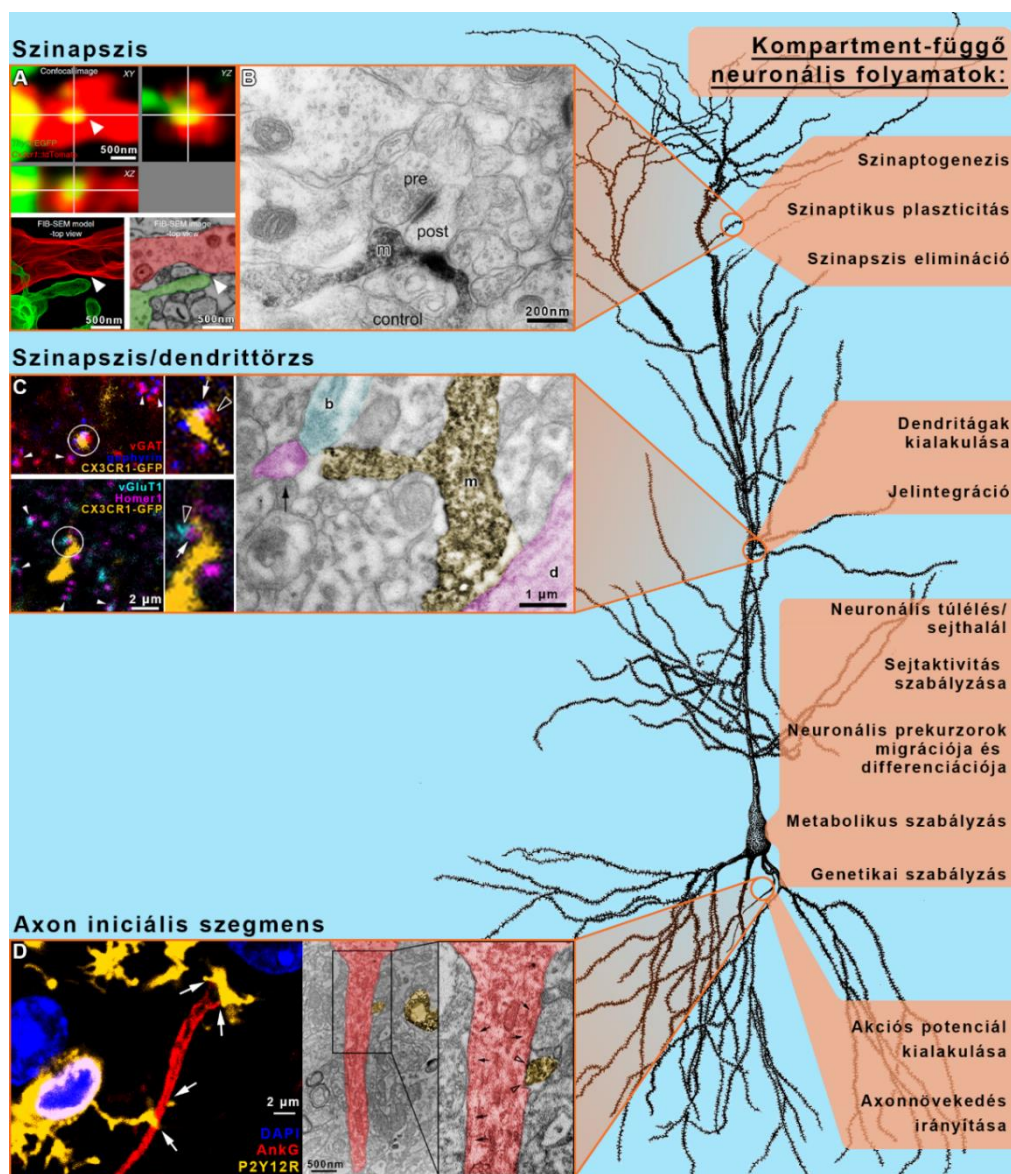
A polarizált idegsejt egyes részei más-más feladatok elvégzésére specializálódtak. A szinapszisok és a dendritágak dinamikusan képesek változni a környezetükből érkező behatásokra reagálva – a szinaptikus plaszticitás, az új dendritágak képződése, vagy akár a dendrittüskék alaki változásának révén –, miközben ezen struktúrák morfológiája alapvetően határozza meg az információ terjedését (Harnett és mtsai, 2012; Holderith és mtsai, 2012). A beérkező információ optimális zajszűrése, integrálása és a sejt központi része felé történő továbbítása mind a dendritek feladata (Bourne és Harris, 2008; Higley és Sabatini, 2008; Rose és Call, 1992; Terenzio és mtsai, 2017). Eközben olyan folyamatok, amelyek transzkripciós változásokat igényelhetnek, mint például a differenciáció, a migráció, a metabolikus szabályzás és a túlélés/sejthalál döntések a sejtmag elhelyezkedése miatt a sejttesthez köthetőek (Aarum és mtsai, 2003; Hobert és mtsai, 2010; Marín-Teva és mtsai, 2011; Sierra és mtsai, 2014; Ueno és mtsai, 2013). Az információ továbbítása, az akciós potenciál generálása és az ingerületvezetés az axon iniciális szegmentum és az axon feladata (Bender és Trussell, 2012; Clark és mtsai, 2009; Debanne és mtsai, 2011; Huang és Rasband, 2018; Letierrier, 2018; Salzer, 2003; Suminaite és mtsai, 2019).

Mivel az itt felsorolt neuronális funkciók közül kivétel nélkül mindről bebizonyosodott már, hogy a mikroglia valamilyen módon hatással van rá, így kézenfekvőnek tűnik a gondolat, hogy az adott folyamatot lokálisan, az adott idegsejt-kompartimentummal kialakított kapcsolaton keresztül szabályozzák a mikroglia-nyúlványok (2. ábra). Ezzel összhangban nagyjából egy évtizeddel ezelőtt leírásra került a mikroglia-nyúlványok és a szinapszisokat kialakító axonterminálisok, valamint poszt-szinaptikus struktúrák közti közvetlen membrán-membrán kapcsolat (Tremblay és mtsai, 2010; Wake és mtsai, 2009). Nagyon fontos kiemelni, hogy a fénymikroszkóppal közvetlen kapcsolatnak látszó

appozíciók nem minden esetben jelentik azt, hogy a membránok érintkeznek is, ahogy az egy 2018-as tanulmányban éppen a mikroglia-szinapszis kapcsolat esetében elegáns bizonyítást nyert (Weinhard és mtsai, 2018). A mikroglia-nyúlványok és a dendritek közti kapcsolat *in vivo* két-foton mikroszkóppal vizsgálva 5-10 percig figyelhető meg (Wake és mtsai, 2009), kialakulásuk függ az adott szinapszis aktivitásától (Akiyoshi és mtsai, 2018), és a mikroglia-nyúlványok a dendriteket érintve új dendrittüskék kialakulását indukálják (Miyamoto és mtsai, 2016). Számos molekula szerepe felvetődött ebben a típusú kapcsolatban, azonban a legtöbb esetben nem áll rendelkezésre nagyfelbontású anatómiai bizonyíték ezeknek a kapcsolatban való elhelyezkedésére. Az idegsejtek membránjában található annexin V és foszfatidil-szerin biztosan szerepet játszik a fejlődés során a mikroglia által végzett szinapszis eltávolításban (Scott-Hewitt és mtsai, 2020), ahogyan a fraktalkin-fraktalkin receptor (CX3CL1-CX3CR1) tengely és a komplementrendszer egyes tagjai (C1q, C3) is (Hoshiko és mtsai, 2012; Paolicelli és mtsai, 2011; Schafer és mtsai, 2012; Zhan és mtsai, 2014). Fontos szerep jut továbbá a szinapszisok szabályozásában a mikroglia membránban található integrineknek és TAM receptoroknak (Nonaka és Nakanishi, 2019), valamint az ugyancsak membránkötött, szinapszisok közelében elhelyezkedő (Shatz, 2009) MHC-I szekvenciák is valószínűleg az őket felismerni képes mikroglia közbenjárásával szabályozzák a szinaptikus plaszticitást és eliminációt (Elmer és mtsai, 2013; Goddard és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2014). Szintén komoly funkcionális hatása van a szinaptikus működésekre – pl. a szinaptikus plaszticitásra és a posztzinaptikus potenciálváltozásokra – olyan mikroglialis mediátoroknak, mint a BDNF, a TNF- α , az IL-1 β és az IL-33, amelyek nem membránkötöttek, de elképzelhető, hogy specifikusan, lokálisan szabadulnak fel a közvetlen kapcsolat létrejöttét követően (Clark és mtsai, 2015; Nguyen és mtsai, 2020; Pascual és mtsai, 2012; Stellwagen és Malenka, 2006; Zhou és mtsai, 2019).

Az idegvégződés mellett a mikroglia-nyúlványok az axonok más szakaszaival is képesek kapcsolatot kialakítani, így például az axon iniciális szegmens régióval (2. ábra) (Baalman és mtsai, 2015). Ez a speciális ioncsatorna-összetétellel jellemezhető része az idegsejteknek felelős az akciós potenciál kialakításáért (Bender és Trussell, 2012; Kole és mtsai, 2008). A mikroglia-nyúlványok közvetlenül befolyásolják az axonok élettanát a fejlődés kezdetétől a kifejlett idegrendszeren keresztül egészen a patológiás állapotokig: a közvetlen mikroglialis kontaktus gátolja a fejlődő axonok növekedését (Kitayama és

mtsai, 2011), irányítja a növekedését (Squarzoni és mtsai, 2014), a már fejlett, hiperaktív axonok repolarizációját segíti (Kato és mtsai, 2016), és hozzájárul a sérült axonok remyelinizációjához, vagy eltávolításához (Lloyd és Miron, 2019; Neumann és mtsai, 2008). Mind felnőtt, egészséges egerek agyában (Cserép és mtsai, 2021a), mind traumás behatást követően (Benusa és Lafrenaye, 2020) rendelkezésre áll elektronmikroszkópos bizonyíték a közvetlen membrán-membrán kapcsolatról mikroglia-nyúlványok és neuronális axonok között, azonban a sejtek közti interakcióban szerepet játszó molekulák nem ismertek.



2. Ábra. Kompartment-függő neuronális folyamatok és a szakirodalomból ismert közvetlen mikroglia-idegsejt membránkapcsolatok. Az ábra jobb oldalán olyan,

neuronális kompartmentekhez köthető folyamatok vannak felsorolva, melyek szabályzásában a mikroglia részt vesz. **A**, Konfokális felvételen egy mikroglia-nyúlvány (CX3CR1:tdTomato, piros) kapcsolata látható egy neuron dendritjével (Thy1:EGFP, zöld), azonban az elektronmikroszkópos kép bizonyítja, hogy közvetlen kapcsolat nem jött létre – ezek a felvételek bizonyítják, hogy a membránkapcsolat létrejötte kizárólag elektronmikroszkópos képalkotással igazolható. **B**, Transzmissziós elektronmikroszkóppal készült képen egy olyan mikroglia-nyúlvány látható (m – Iba1, sötét DAB-csapadék), amely egy szinapszis mind pre-, mind poszt-szinaptikus oldalához közvetlenül hozzáér. **C**, Konfokális felvételeken mikroglia-nyúlványokat (CX3CR1-GFP, okker) figyelhetünk meg pre- és posztszinaptikus markerek által azonosított GABA-erg (vezikuláris GABA transzporter – piros, gephyrin – kék), valamint glutamaterg (vezikuláris glutamát transzporter-1 – ciánkék, Homer1 – magenta) szinapszisok közvetlen szomszédságában. Az elektronmikroszkópos felvételen a sötét DAB-csapadékkal jelölt mikroglia-nyúlvány (Iba1, m) közvetlen kapcsolatot alakít ki egy dendrittörzzsel (d, magenta álszínezés), valamint egy preszinaptikus idegsejtvégződéssel (b, ciánkék álszínezés). **D**, Konfokális felvételen mikroglia-nyúlványok (P2Y12R, sárga) figyelhetőek meg, amelyek egy neuron axon iniciális szegmensét (Ankyrin-G, piros) veszik körül. A nyilak potenciális kapcsolódási pontokra mutatnak. A transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken látható a közvetlen kapcsolat, ami egy mikroglia-nyúlvány (Iba1-DAB-csapadék, sárga álszínezés) és az axon iniciális szegmens (piros álszínezés) között alakul ki. A fekete nyilak az AIS-re jellemző membrán-alatti megnövekedett denzitásra mutatnak. [Átdolgozva: (Cserép és mtsai, 2021a)]

A szomatikus régióhoz köthető neuronális funkciók a legjobban a sejttessel kialakított kapcsolaton keresztül szabályozhatók. Egérben *in vivo* megfigyelések támasztják alá, hogy a mikroglia-nyúlványok fiziológias körülmények között megközelítik az idegsejtek sejttestét (Nimmerjahn és mtsai, 2005). Ugyan patológias körülmények között ismert, hogy a mikroglia-nyúlványok eltávolítják a neuronok sejttestére érkező, főként hiperpolarizáló hatású idegsejtvégződéseket (Kettenmann és mtsai, 2013; Trapp és mtsai, 2007; Tremblay és mtsai, 2010), ez nem magyarázza meg, hogy az egészséges idegrendszerben miért közelíti meg a mikroglia az idegsejtek szomatikus régióját. Egér akut agyszeletekben és élő zebrahalak idegrendszerében az is megfigyelhető, hogy azt követően, hogy mikroglia-nyúlványok közelítenek meg egy hiperaktív neuron sejttestet, azoknak csökken az aktivitása (Eyo és mtsai, 2014; Li és mtsai, 2012), és ehhez a hatáshoz funkcionális NMDA receptorokra van szükség (Dissing-Olesen és mtsai, 2014; Eyo és mtsai, 2014). A mikroglia teljes eliminálása, vagy egyes mikrogliális receptorok (CX3CR1, P2Y12R) szelektív manipulálása olyan sejttesthez köthető neuronális folyamatokban idéz elő változást a fejlődő idegrendszerben mint a sejt differenciáció, - migráció, apoptózis, felnőttkorban pedig a születő neuronok integrációja az idegsejthálózatba, az ischémiát, illetve krónikus neuropathiát követő neuronális aktivitás,

illetve a rohamok indukálta neurogenézis (Aarum és mtsai, 2003; Bilimoria és Stevens, 2015; Erblich és mtsai, 2011; Gu és mtsai, 2016; Kettenmann és mtsai, 2013; Mo és mtsai, 2019; Sellner és mtsai, 2016; Sierra és mtsai, 2010; Szalay és mtsai, 2016; Ueno és mtsai, 2013; VanRyzin és mtsai, 2019). Annak ellenére azonban, hogy ennyi alapvető folyamatban lehető fel a mikroglia és az idegsejtek szomatikus régiójának összehangolt működése, az egyetlen elektronmikroszkópos bizonyíték a közvetlen membránkapcsolatra a zebrahal köztiagyának egy kis részletéből származik: a zebrahalak vizuális ingereket feldolgozó agyi régiójában a mikroglia szorosan körbe van véve idegi sejtestekkel, így a mikroglia-nyúlványok – akár okkal, akár véletlenül – a neuronokhoz szorosan hozzásimulva futnak (Li és mtsai, 2012).

I.6. A P2Y12 receptor kiemelt jelentősége a mikroglialis fiziológiában

A purinerg nukleotidok és azok származékai jól ismert energiaraktározói funkciójuk mellett fontos hírvivő szerepet is betöltenek a szervezetben (Burnstock, 2020; Huang és mtsai, 2021). A központi idegrendszerben ezen metabolitokat érzékelni képes receptorfehérjéket klasszikusan két nagy csoportba szokás sorolni: a P1 receptorok fő aktivátora az extracelluláris adenzin, míg a P2 receptorok az adenin- és uracil-nukleotidokra érzékenyebbek (Burnstock, 2018). Az utóbbi csoportba tartozó fehérjéket tovább lehet osztani kétfelé aszerint, hogy ioncsatorna funkcióval rendelkeznek, vagy G-fehérje kapcsolt módon fejtik ki hatásukat. Így beszélhetünk P2X ionotróp-, és P2Y metabotróp receptorcsaládokról (Jacobson és mtsai, 2020; Jarvis és Khakh, 2009). Az emlősök szervezetében 8 különböző P2Y receptor található meg (von Kügelgen, 2021), melyek közül a mikrogliaiban nagy mennyiségben a P2Y2, P2Y6, P2Y12 és P2Y13 receptorok fejeződnek ki (Kettenmann és mtsai, 2011). A P2Y12 receptor (P2Y12R) terápiás szempontból kiemelt jelentőséggel bírhat, mivel a központi idegrendszerben kizárólag a mikrogliaiban találhatóak meg (Butovsky és mtsai, 2014; Zhang és mtsai, 2014). Emellett ez a receptor egyértelműen megkülönbözteti a mikrogliait a szervezet egyéb makrofág-funkcióval bíró immunsejtjeitől, agyi régiótól függetlenül, homogén módon fejeződik ki a mikrogliaiban és evolúciósan konzervált, hiszen a rágcsálóktól kezdve az emberekig megfigyelhető az expressziója (Mildner és mtsai, 2017; Sasaki és mtsai, 2003).

A P2Y₁₂R egy 7 transzmembrán szakasszal rendelkező fehérje, melynek agonista-kötése után az intracelluláris oldalon a G_i-fehérjéhez kapcsolódó szignalizációs kaszkád indul be (Jacobson és mtsai, 2020). Az emberi szervezetben a legismertebb funkciója, hogy a vérelemek aggregációjához elengedhetetlen a P2Y₁₂R aktivitása, így számos gyógyszer van forgalomban, amely a P2Y₁₂R gátlásával kívánja megelőzni a thrombotikus eseményeket, például koszorúér-elzáródást követően. A leggyakrabban használt P2Y₁₂R antagonisták (pl. clopidogrel, ticagrelor, prasugrel) irreverzibilis módon gátolják a receptor működését (Schilling és mtsai, 2020). Ezek a hatóanyagok ép vér-agy gát mellett nem kerülnek kapcsolatba a mikroglialis P2Y₁₂R fehérjével, azonban megmutatják, hogy a receptor hatásosan és szelektíven manipulálható terápiás céllal.

A központi idegrendszerben a P2Y₁₂R fő agonistája – a perifériához hasonlóan – a sejtekből felszabaduló ATP-ből szöveti nukleotidázok hatására képződő ADP (Hollopeter és mtsai, 2001). ATP kis mennyiségben a neuronok fiziológiás aktivitása során is kerül az extracelluláris térbe membráncsatornákon (connexineken, pannexineken) keresztül, vagy vezikuláris úton (Abbracchio és mtsai, 2009; Dahl, 2015; Kato és mtsai, 2016; Moriyama és mtsai, 2017; Zimmermann és mtsai, 2012), ennél azonban nagyságrendekkel több szabadul fel neuronális sérülés során (Faroqi és mtsai, 2021; Volonte és mtsai, 2003). Bár ellentmondásosnak tűnhet, hogy vészhelyzetben az idegsejtek az egyébként energiaforrásként szolgáló molekulát használják jelzésre, azonban ez gazdaságosabb a sejt szempontjából, mint másféle transzmittermolekulákat szintetizálni, és emellett szignalizációs célra a sejt teljes ATP-készletének csupán elhanyagolható töredékét használják fel (Dowdall és mtsai, 1974; Verkhratsky és Burnstock, 2014).

A mikrogliaiban számos jól dokumentált szereppel bír ez a receptor. Idegszöveti (pl. lézer indukálta, traumás) sérülés esetén a mikroglia-nyúlványok célzott mozgást végeznek a sérülés színhelyére, amelynek feltétele az intakt P2Y₁₂R funkció (Davalos és mtsai, 2005; Haynes és mtsai, 2006). Fiziológiás körülmények között ezen receptor működése szabályozza a dendritekkel való kapcsolat kialakulását (Eyo és mtsai, 2015), és a mikroglia szinaptikus plaszticitásra gyakorolt hatását (Sipe és mtsai, 2016). Bár egyes tanulmányok szerint fiziológiás körülmények között sem a mikroglia morfológiájára, sem a nyúlványok mozgására nincsen hatással a receptor hiánya (Madry és mtsai, 2018a; Sipe

és mtsai, 2016), a patológiás körülmények között bekövetkező mikroglialis morfológiai változás, valamint a pro-inflammatorikus citokinek termelése (a reaktív állapotba kerülés) nem következik be funkcionális P2Y₁₂R nélkül (Gu és mtsai, 2016; Jing és mtsai, 2019). Ez a receptor szintén kulcsfontosságúnak bizonyult a mikroglia neuroprotektív szerepének betöltésében számos patológiás folyamatban, így például stroke-ot követően, neurotróp vírusfertőzés esetén, vagy komplex rohamokban (Fekete és mtsai, 2018; Lou és mtsai, 2016; Wan és mtsai, 2020; Zrzavy és mtsai, 2018). Mivel a receptor expressziós szintje a legtöbb patológiás esetben gyorsan csökken (Haynes és mtsai, 2006; Walker és mtsai, 2020), és a P2Y₁₂R génkiütött állatok viselkedésbeli eltéréseket mutatnak (Lowery és mtsai, 2021; Peng és mtsai, 2019), mégis az tűnik a legvalószínűbbnek, hogy ezek a receptorfehérjék alapvetően határozzák meg a mikroglia működését és homeosztatis feladatának ellátását fiziológiai körülmények között is. A P2Y₁₂R funkciójának megértése a mikroglia fiziológiai folyamataiban elengedhetetlen ahhoz, hogy terápiás célpontként tekinthessünk erre a fehérjére különböző neurológiai kórképekben.

I.7. Neuronális sejtalkotók a mikroglia-idegsejt kommunikáció fényében

Bár a mikroglia-nyúlványok és az idegsejtek szomatikus régiója közti kommunikáció módja nem ismert, a mikroglialis szabályzás alatt állónak bizonyult neuronális folyamatok természetéből következtethetünk néhány olyan sejtorganelumra és fehérjére, amelyek az idegsejtek oldaláról részt vehetnek a kétféle sejtípus közti kétirányú információcserében.

I.7.1. Exo- és endocitotikus apparátus

Mint már korábban említettem, a mikroglia mozgó nyúlványai és megújuló populációja kiválóan alkalmas arra, hogy a helyhez kötött, osztódásra képtelen neuronok nem kívánatos anyagcsere-végtermékeit felvegye és elszállítsa. Az idegsejtekben az endocitózissal felvett anyagok, a fagoszómákon keresztül a lebontásra ítélt anyagok, valamint a szekrécióra szánt metabolitok mind a lizoszómában gyűlnek fel, ahonnan a neuronban le nem bontott anyagok exocitózis útján szabadulhatnak fel (Ferguson, 2019). Ezen folyamat során a lizoszomális, vagy egyéb (pl. mitokondriális) eredetű vezikulumok a sejtmembránhoz kötött SNARE fehérjék rendszerének segítségével az extracelluláris

térbe ürítik tartalmukat (Buratta és mtsai, 2020; Rao és mtsai, 2004). Az agykérgi pramissejtek esetén ezeket a fehérjekomplexeket a sejtmembrán kitüntetett szakaszain találhatjuk meg, amelyekre jellemző a Kv2.1 és Kv2.2 fehérjék klasztereződése (Feinsreiber és mtsai, 2009; Johnson és mtsai, 2019). Ezek a fehérjék a membránban egyesével helyezkedve feszültségfüggő K^+ -csatornaként a sejtek excitabilitásáért felelősek, klaszterekben helyezkedve azonban elveszítik K^+ -csatorna funkciójukat (Justice és mtsai, 2017). Ezen Kv-klaszterek rendkívül fontos membránrégiókat jelölnek ki: a sejtek által újonnan szintetizált integráns membránfehérjék ezeken a területeken érik el a sejtmembránt (Deutsch és mtsai, 2012), az exocitotikus apparátusba tartozó syntaxin fehérje kötésével kijelölik az exocitózis helyszínét a membránban (Feinsreiber és mtsai, 2009; Singer-Lahat és mtsai, 2007), miközben a clathrin-függő endocitózis túlnyomó többsége is a Kv-klaszterek mentén zajlik le (Deutsch és mtsai, 2012). Mindezen folyamatok alapján elmondható, hogy a Kv-klaszterek rendkívül fontos „csomópontot” jelölnek az idegsejtek membránjában, hiszen a sejtet elhagyó, a membránba beépülő és a sejtbe endocitózissal bejutó molekulák jelentős hányada keresztülmennek ezen membránszakaszokon, így ezen régió megfigyelésével értékes információ nyerhető az idegsejtek aktuális metabolikus állapotáról, amely kulcsfontosságú a neuronális homeosztázis fenntartásához.

I.7.2. Mitokondriumok

A mitokondriumok kettős membránnal határolt sejtorganellumok. A belső, invaginációkkal rendelkező membránjukban található fehérjék segítségével az oxidatív foszforiláció folyamatán keresztül a biológiai folyamatok elsődleges energiahordozójának, az ATP-nek a termelését végzik (Valiente-Pallejà és mtsai, 2022). A mitokondriumok dinamikus módon tudnak alkalmazkodni a sejtek energiaigényéhez, többek között az ATP-termelésben részt vevő fehérjék expressziós szintjének módosításával (Devin és Rigoulet, 2007), illetve az egyes mitokondriumok morfológiájának változtatásával (Liesa és Shirihai, 2013). Ezen utóbbi folyamat magában foglalja az egyes sejtorganellumok fúzióját, illetve hasadását (fisszióját), amelyet nagyban befolyásol a sejt tápanyagellátottsága: bőség esetén a mitokondriumok hasadása dominál, míg az éhezés és tápanyaghiány a fúziós folyamatokat indukálja, amely

hatékonyabb energiatermelést tesz lehetővé (Liesa és Shirihai, 2013; Rossignol és mtsai, 2004; Tondera és mtsai, 2009).

Kevésbé ismert azonban, hogy ezen sejtalkotók funkciója lényegesen sokrétűbb, mintsem hogy kizárólag „erőművekként” gondoljunk rájuk: számos jelátviteli és homeosztatikus folyamat szabályzása történik a mitokondriumok által, mint például az intracelluláris kalcium-áramok modulálása, a sejtek proliferációjának, morfológiájának és viabilitásának regulálása (Chandel, 2014; Whelan és Zuckerbraun, 2013) – olyan folyamatok, melyek a neuronok esetén legalább részben mikroglialis befolyásolás alá esnek. Emellett a mitokondriumok szintén kulcsfontosságúak lehetnek a mikroglia, mint immunsejt felé történő kommunikációban, ugyanis számos olyan metabolit termelése zajlik ezekben a sejtorganelumokban, amelyet a mikroglia érzékelni képes, mint például reaktív oxigéngyökök, ATP, vagy proapoptotikus ágensek (Murphy, 2009; Ruprecht és mtsai, 2019; Wang és Youle, 2009).

A sejtorganelumok közül a mitokondriumok funkcionális függetlenségükkel is kiemelkednek, ugyanis részben saját örökítőanyaggal, mitokondriális DNS-sel rendelkeznek (Taanman, 1999; Wang és Bogenhagen, 2006), ezáltal a sejteket érő külső behatáshoz gyorsabban képesek adaptálódni.

Számos neurológiai kórképben mutatható ki már a korai szakaszban a neuronális mitokondriumok megváltozott működése, így például Alzheimer-kórban, Parkinson-kórban, ALS-ben, valamint neuropszichiátriai betegségekben is (Cabral-Costa és Kowaltowski, 2020; Mattson és mtsai, 2008). A mitokondriális diszfunkció kóroki szerepei között felmerülhet a mitokondriális membránok megváltozott áteresztőképessége, az intracelluláris ionháztartás zavara, a pro-apoptotikus kaszkád beindítása, oxidatív stressz indukálása, az energiatermelés zavara, illetve a mitofágia beindulása is (Norat és mtsai, 2020). Ezen folyamatokért leggyakrabban a mitokondriális genomban bekövetkező mutációk felelősek, melyek az öregedés során gyakrabban figyelhetők meg (Keogh és Chinnery, 2015; Taylor és Turnbull, 2005). A mitokondriumok megváltozott működése patológiás folyamatoknak, illetve a neuronok károsodásának korai indikátora lehet, melyet a homeosztázis fenntartására törekvő mikroglia érzékelhet a mitokondriális eredetű metabolitok közvetítésével.

Összességében elmondható, hogy a központi idegrendszerben a neuronok működéséhez elengedhetetlenek a gliasejtek. A mikroglia az agy fő immunsejtjeként számos patológias folyamatban játszik kiemelt szerepet, emellett azonban a közelmúlt kutatásai rámutattak, hogy az egészséges idegrendszer működéséhez is elengedhetetlenek. Az agyban egyedülállóan dinamikus mozgást végző mikroglia-nyúlványok az idegsejtek számos alegységével közvetlen membránkapcsolatot létesítenek, melyek révén különböző neuronális folyamatokat ellenőriznek és módosítanak. Ahhoz azonban, hogy hatékonyan és precízen tudjanak beavatkozni a neuronok működésébe, léteznie kell egy eddig fel nem tárt kapcsolati felszínnek a mikroglia nyúlványai és az idegsejtek sejtteste között, amelyen keresztül a mikroglia érzékelheti a neuronális eredetű szignalizációs molekulákat, illetve közvetlenül módosíthatja a neuronális szómában zajló folyamatokat. Továbbá érdemes lehet közelebbről megvizsgálni az egészséges idegrendszerben a mikroglia-specifikus P2Y₁₂ receptor manipulációjának következményeit, ugyanis erős ellentmondás áll fent a receptor fiziológias körülmények között megfigyelt nagymértékű expressziós szintje, a patológias ingerekre adott korai mikroglialis válaszokban betöltött kiemelt szerepe, valamint azon tudományos közlemények következtetése között, amelyek szerint a fiziológias agyban a P2Y₁₂ receptor nincs hatással a mikroglia működésére.

II. Célkitűzések

A mikroglia a központi idegrendszer rezidens immunsejtje, amely a gyakori neurológiai kórképek nagyon korai stádiumában megváltozott működést mutat. Állapotuk jól korrelál az agy gyulladással és a neuropatológiai kórképek súlyosságával, ezért működésük megértésével és az idegi folyamatokra gyakorolt hatásaik feltárásával új terápiás távlatok nyílnak meg. A mikroglia szerepe a neuronális folyamatok szabályozásában az utóbbi évek során egyre szélesebb körű bizonyítást nyert, és bár a szakirodalom ismer közvetett és közvetlen kommunikációs útvonalakat is mikroglia és neuronok között, ezek nem adnak kielégítő választ számos, idegsejtekben lejátszó folyamat mikroglialis szabályozásának hátterére.

Kísérleteinkben ezért az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Létezik-e közvetlen membrán-membrán kapcsolat a mikroglia gyorsan mozgó nyúlványai, valamint az idegsejtek központi, szomatikus kompartmentje között?
2. Milyen gyakori ez a szomatikus kapcsolat az egér, valamint a humán agykéregben?
3. Különbözik-e ez a kapcsolat a korábban megfigyelt mikroglia-neuron kapcsolatoktól?
4. Milyen a strukturális felépítése ezen kapcsolatoknak?
5. Milyen metabolitok útján folyhat a szomatikus kapcsolaton keresztüli kommunikáció?
6. Mi lehet ezen kapcsolat szerepe fiziológiai körülmények között, valamint akut agyi sérülést követően?
7. Felelős lehet-e ez a kapcsolat a mikroglia neuronális fejlődésre gyakorolt hatásaiért?

A purinerg P2Y₁₂ receptor a központi idegrendszerben kizárólag a mikrogliaiban fejeződik ki, miközben szisztémásan a vérlemezkék aggregációjában tölt be központi szerepet. Mivel a klinikumban számos farmakon elérhető, mely a P2Y₁₂ receptort gátolja, ezért szintén vizsgálni kívántuk,

8. Milyen hatással van a P2Y₁₂ receptor akut gátlása, illetve genetikai hiánya a mikroglia fiziológiájára, valamint a mikroglia-neuron kapcsolatokra?

III. Módszerek

III.1. Etikai állásfoglalás

Minden kísérletet a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) Intézeti Etikai Kódexe és a kísérleti állatok védelméről szóló hatályos nemzeti és EU-s törvények alapján végeztük, melyek megfelelnek az Európai Közösség által 1986. november 24-én elfogadott irányelvekkel (86/609/EEC), az állatok védelméről és kíméletéről szóló hatályos magyar törvénnyel (1998; XXVIII, 243/1998) és az intézeti Munkahelyi Állatetikai Bizottság előírásaival. A KOKI Állatkísérleti Bizottsága, az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács és a Pest Megyei Kormányhivatal a kísérleteket a PE/EA/1021-7/2019, PE/EA/673-7/2019 számokon engedélyezte.

III.2. Állatok

Kísérleteinkhez minden esetben hím, C57Bl/6J egereket használtunk fel, az adott kísérletnek megfelelő korcsoportból. Fejlődéstani vizsgálatainkhoz embrionális fejlődésük 15. napján járó (E15) embriókat, születésük után 1 (P1), 8 (P8), ill. 15 napos (P15) fiatal egereket, valamint 90 napos (P90) felnőtt állatokat használtunk.

A nem fejlődéstani kísérletekhez minden esetben 12-18 hetes, hím egereket használtunk. Számos mérésünket végeztük mikroglia-riporter állatok segítségével, amelyekben a fraktalkin-receptort kódoló allélok közül az egyiket zöld fluoreszcens proteint kódoló szekvencia helyettesíti (CX3CR1^{GFP/+}, mely állatok nőtény C57Bl/6J [RRID:IMSR_JAX:000664] és hím CX3CR1^{GFP/GFP} [B6.129P2(Cg)-Cx3cr1tm1Litt/J, RRID:IMSR_JAX:005582] egerek utódai; The Jackson Laboratory Bar Harbor, ME, USA). A P2Y12 receptor krónikus hiányának hatásait vizsgáló méréseinkhez P2Y12 receptor génkiütött, mikroglia-riporter állattörzset használtunk (CX3CR1^{GFP/+}/P2Y12^{-/-}, a P2Y12^{-/-} egerek forrása: [B6;129-P2ry12^{tm1Dgen}/H] Deltagen Inc., San Matteo, CA, USA). Az egerek szabadon fértek hozzá az ételhez és vízhez, tartásuk szabályozott fény-, páratartalom- és hőmérsékleti körülmények között történt.

III.3. Post mortem humán minták

A humán agyszöveten végzett kísérleteinkhez a kontroll mintát két nő (59 és 60 évesek), illetve egy férfi (73 éves), ismert neurológiai betegséggel nem rendelkező és agyi

elváltozáshoz nem köthető okból elhunyt páciensből vételeztük. A stroke hatását olyan agyszöveten vizsgáltuk, amely két női (77 és 78 évesek), valamint egy férfi (66 éves), arteria cerebri media érintettségű ischémias stroke-ot követően elhunyt páciensekből származik (etikai engedélyek: ETT-TUKEB 62031/2015/EKU, 34/2016 és 31443/2011/EKU [518/PI/11]). A páciensek adatait az 1. Táblázat foglalja össze. A szövetek kutatási célra történő felhasználása és a vizsgálatokhoz szükséges orvosi adatokhoz való hozzáférés tájékozott beleegyezés alapján történt. A szövetminták kezelése és felhasználása a Helsinkai Nyilatkozattal összhangban történt.

1. Táblázat. A tanulmányban szereplő humán páciensek adatai

Páciens azonosítója	Nem	Életkor	Stroke-ot követő túlélés	Ismert komorbiditások	A halál oka
2011/0092	nő	77 év	2 nap	artériás hypertonia, T2DM, hyperthyreosis	stroke
2003/0029	férfi	66 év	1 nap	artériás hypertonia	stroke
2014/0050	nő	78 év	1 nap	ismeretlen	stroke
SKO3	nő	59 év	nem alkalmazható	ischémias kardiomyopathia	kardiogén sokk
SKO13	nő	60 év	nem alkalmazható	krónikus bronchitis	légzésleállás
SKO16	férfi	73 év	nem alkalmazható	atherosclerosis, tüdőgyulladás	légzésleállás

A nem-neurológiai okból elhunyt páciensek agya 3-5 órával a halál beállta után került eltávolításra. Az arteria vertebralis, valamint az arteria carotis interna erek kanülálását követően az agyak perfúziója heparint tartalmazó fiziológiás sóoldattal (kb. 1,5l oldat 30 perc alatt), majd 4% paraformaldehidet, 0,05% glutáraldehidet és 0,2% pikrinsavat

tartalmazó fixáló oldattal (4-5l oldat 1,5-2 óra alatt) történt. A perfúziót követően az agykérgi és hippokampális régiókat tartalmazó szövetdarabok glutáraldehid-mentes fixáló oldatban voltak tartva további egy napig, majd 50 μ m vastag metszeteket készítettünk egy vibratóm segítségével (VT1200S, Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA).

A stroke-ban elhunyt páciensek agya 10-15 órával a halál beállta után került eltávolításra, majd immerziós fixálást alkalmaztunk, 4% paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal. Az érintett agykérgi területekből kivágott szövetdarabokat paraffinba ágyasztuk, majd szánkás mikrotóm (SM2010R, Leica Biosystems) segítségével 6-8 μ m vastag metszeteket készítettünk.

III.4. *In vivo* beavatkozások és mérések

III.4.1. A kísérletek során használt plazmidok

pCAG-IRES-tD_{Tomato}: A pCAGIG plazmid (#11159 Addgene, Watertown, MA, USA) GFP-polyA szakaszát kicseréltük tD_{Tomato}-polyA (Balla Gyula ajándéka, KOKI) szakaszra, tompa végű ligációval (pCAGIG:PstI-BstXI, pcDNA3 – tD_{Tomato}: HindIII-PvuII), az egyes szakaszok végén a tompa végek létrehozása Klenow emésztéssel/feltöltéssel történt.

Kv2.1-GFP: A citomegalovírus promótere mögé helyezett, teljes humán Kv2.1, valamint zöld fluoreszcens proteint kódoló szekvenciákat hordozó plazmidot Federico Sesti készítette (CMV-hKv2.1-pEGFP-C1, #111538 Addgene) (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020).

DN-Kv2.1: Citomegalovírus promóter mögé helyezett sárga fluoreszcens fehérjével és myc epitóppal ellátott Kv2.1 domináns negatív konstrukció (CMV-DNKv2.1-YFP). A patkány Kv2.1 1-218. aminosavának megfelelő, a fehérje N-terminális és első transzmembrán régióját kódoló szekvencia 3'-végéhez a myc epitóp lett hozzáadva, majd ezt a konstrukciót a pEYFP-C1 polylinker BamHI-XbaI régiójába illesztve a kapott plazmid által kódolt peptid a Kv2.1 fehérje fragmentált formáját fejezi ki, az N-végéhez fuzionált YFP és a C-végéhez fuzionált myc epitóppal (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020).

III.4.2. In utero elektroporáció

Nőstény C57Bl/6J (RRID: IMSR_JAX:000664) egereket hím homozigóta CX3CR1^{GFP/GFP} (B6.129P2(Cg)-Cx3cr1tm1Litt/J, RRID:IMSR_JAX:005582) (Jung és

mtsai, 2000) egerekkel kereszteztünk, majd a vemhes nőstények hasüregét az embrionális fejlődés 14.5. napján izoflurán-anesztéziában megnyitottuk, a cornu uterit feltártuk. A bejuttatni kívánt expressziós pCAG-IRES-tD_{Tomato} vektorból kb. 1µl-nyit (1µg/µl-es oldatból) endotoxin-mentes vízben feloldottunk, és Fast Green festékanyagot (1:10000) adtunk hozzá. Az így kapott oldatot üvegkapilláris segítségével az embrionális oldalkamrákba juttattuk. Az elektroporációhoz az In Utero Electroporator SP-3c (Supertech, London, Egyesült Királyság) eszköz segítségével 5x50V pulzusokat alkalmaztunk, egyenként 50ms ideig, 950ms-os intervallumokkal. Az elektroporáció után a cornu uterit visszahelyeztük a hasüregbe, a sebet az izomfalak és a bőr öltésével zártuk, majd az embriók természetes úton jöttek világra.

III.4.3. In vivo műtéti, farmakológiai és kemogenetikus kezelések

III.4.3.1. Experimentális stroke

Az egyoldali arteria cerebri media elzárást intraluminalis filamentum technikával hajtottuk végre (Denes és mtsai, 2010). Az egereket izofluránnal altattuk, majd a nyaki régió kiperarálása után a bal oldali arteria carotis communison keresztül behelyeztünk egy szilikon-bevonatú monofilamentumot (210-230µm hegyátmérő, Docol, Sharon, MA, USA), majd az arteria carotis internán keresztül egészen az arteria cerebri mediaig vezetve elzártuk azt 30-45 percen keresztül. A sikeres okklúziót lézer Doppler (Moor Instruments, Axminster, Egyesült Királyság) segítségével igazoltuk. A műtét során az állatok maghőmérsékletét végig 37±0,5 °C-on tartottuk egy melegítőpad segítségével. A vizsgálatba bevonás során a következő kizárási kritériumokat alkalmaztuk: kevesebb mint 70%-os keringéscsökkenés, vérzés, 24 órán belüli elhalálozás.

III.4.3.2. Kraniális ablak műtét

Az egereket ehhez a beavatkozáshoz fentanylal (100-200µl) altattuk. A 3mm átmérőjű kraniális ablakot a bal agyfélteke primer szomatoszenzoros kérgi és szupplementer motoros kérgi területei felett nyitottuk (az ablak középpontja a Bregmától számítva laterális irányban 3mm-re, posterior irányban 2mm-re volt), a dura matert intaktan hagyva. A koponyacsont egy részének eltávolítása után egy 3-, illetve egy 5mm átmérőjű kör alakú, egymáshoz ragasztott üveg fedőlemezt helyeztünk a dura mater felszínére, majd Vetbond (3M, Two Harbors, MN, USA) szövetragasztóval rögzítettük. Ezután egy

egyedi, fémből készült befogót (Femtonics Ltd., Budapest) erősítettünk az üveglemez köré orvosi cement felhasználásával.

III.4.3.3. Mikroglia depléción

A szelektív és szinte teljeskörű mikroglia eliminációt a mikroglia fennmaradásához elengedhetetlen CSF1 receptor szelektív antagonistájával érhetjük el. PLX5622-t tartalmazó tápot (Plexxikon Inc., South San Francisco, CA, USA; 1200mg PLX5622 1kg tápban) etetve C57Bl/6J egerekben 3 hét alatt a mikroglia körülbelül 96 százaléka eltűnik a központi idegrendszerből (Fekete és mtsai, 2018; Szalay és mtsai, 2016). A droggal etetett állatok nem depletált alomtársai ezalatt a 3 hét alatt összetételében azonos kontroll tápot kaptak.

III.4.3.4. Akut P2Y12 receptor gátlás

A P2Y12 receptor akut centrális gátlásának hatását célzó vizsgálatainkban az egerek cisterna magna-jába üvegkapillárisal juttattunk 0,6mg/tnkg dózisú (törzsoldat 3mg/ml), fiziológiás sóoldatban oldott szelektív P2Y12 receptor antagonistát, PSB0739-t (#3983 Tocris, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (Hoffmann és mtsai, 2009), illetve a kontroll kísérletekben azonos térfogatú fiziológiás sóoldatot. A beadott oldatok agyi diffúzióját vitális festékek beadásával ellenőriztük. Az oldatok beadása a 2-foton mikroszkópos mérések kezdete előtt, a kemogenetikus mérések során pedig az intraperitoneális CNO-beadás előtt 15-20 perccel történtek. A P2Y12 receptor-gátlás stroke-kimenetelre kifejtett hatását célzó mérések során a reperfüzió kezdetekor kapták az egerek a PSB0739-et.

III.4.3.5. Kemogenetikus kísérletek

Az idegsejtek kemogenetikus aktivációs kísérleteihez CX3CR1^{GFP/+} egerek neokortexébe 0,1µl-nyi AVV8-pAAV-hSyn-HA-hM3D(Gq)-MCherry (#50474 Addgene) konstrukciót injektáltunk. Az adeno-asszociált vírus alapú vektor hatására azokban az idegsejtekben, amelyekbe bejutott a kemogenetikus konstrukció, piros fluoreszcens fehérje (mCherry) termelődött, valamint egy G_q fehérje-kapcsolt, 7-transzmembrán szakasszal rendelkező, speciális droggal (clozapin-N-oxid, CNO) aktiválható receptor fejeződött ki (Armbruster és mtsai, 2007). 3 héttel a vektor beadása után az egerek intraperitoneális (ip) fiziológiás

sóoldat- (kontroll), vagy CNO-injekciót (0,1 mg/ml) kaptak, amely aktiválja a bejuttatott receptorfehérjéket. Az egerek perfúziójára az ip injekciót követően másfél órával került sor, hogy a megnövekedett sejtaktivitás hatására termelődött cFos fehérje szintje elérhesse a maximumot.

III.4.3.6. Diazoxid hatásának vizsgálata

A diazoxid mitokondriumok membránjában található ATP-szenzitív kálium-csatornák megnyitásával csökkenti az ischemiás mitokondrium-károsodás mértékét (Korge és mtsai, 2002; Ozcan és mtsai, 2001). Megvizsgáltuk a hatását ischemiás stroke-ot követően: az okklúziót követően, közvetlenül az arteria cerebri media újbóli szabaddá tétele, vagyis a reperfúzió megkezdése előtt az egerek egy adagban, 10mg/ttkg ip injekcióban kaptak diazoxidot (#D9035 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 0,4% DMSO-ba és 0,01 M NaOH-oldatba beoldva).

III.4.3.7. Neuronális kalcium mérések

Az idegsejtek aktivitását stroke-ot követő reperfúzió során in vivo 2-foton mikroszkóppal végeztük, fluoreszcens Ca^{2+} -szenzor segítségével. Ehhez a kísérletsorozathoz a vad típusú C57Bl/6J egerek agykérgébe 200nl-nyi AAV1.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 (#100837 Addgene) vektort injektáltunk üvegkapilláris segítségével, 200-300 μ m mélységben. A beadás a Bregmától számítva laterális irányban 1,5mm-re, és posterior irányban 1,2mm-re történt. A kraniális ablak műtétre, valamint a rezonáns módban készített 2-foton mikroszkópos képalkotásra a beadást követő 3. héten került sor.

III.4.4. In vivo 2-foton mikroszkópia

A méréseinkhez egy Femto2D-DualScanhead mikroszkópot (Femtonics Ltd.) és egy Chameleon Discovery hangolható lézerrendszert (Coherent, Santa Clara, CA, USA) használtunk. A vizsgálatokhoz a lézert 920nm-es hullámhosszra állítottuk, mely egyidejűleg képes gerjeszteni mindegyik általunk megfigyelni kívánt fluoreszcens fehérjét (GFP, GCaMP6f, tdTomato). A fluoreszcens jel detektálásához egy Nikon 18x víz-immériós objektívet használtunk, a képalkotást és exportálást a MES szoftverrel (Femtonics Ltd.) végeztük. A mérések során az állatok kontrollált anesztéziáját

fentanyllal végeztük, amely nincs szignifikáns hatással a mikroglialis nyúlványdinamikára (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020).

III.4.4.1. Mikroglia-neuron kapcsolatok élettartamának mérése

A mikroglia-neuron kapcsolatok vizsgálatához *in utero* tdTomato elektroporált, CX3CR1^{GFP/+} egerek agykérgi területeit figyeltük meg 2-foton mikroszkóp segítségével *in vivo* – ezekben az állatokban a tdTomato-pozitív idegsejteket piros, a mikrogliaát zöld tartományba eső fotonok segítségével észlelhetjük. A mikroszkóp segítségével, Galvano szkennert használatával az agyfelszíntől 200µm mélységben, 25µm-es térfogatokról készítettünk felvételeket, 5µm-enként és két és fél percenként, 167nm/px felbontás mellett. Az elkészült 4 dimenziós képsorozatot a nyílt forráskódú Fiji szoftver (imagej.net/Fiji) Manual Tracking nevű pluginjével analizáltuk.

III.4.4.2. Neuronális kalcium-mérés

A penumbra régióban, ischémiás stroke-ot követő reperfüzió során bekövetkező neuronális Ca-változásokat GCaMP6f és *in vivo* 2-foton mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A reperfüzió kezdetétől folyamatos felvételt készítettünk állatonként egyetlen rétegből, rezonáns módban, 32,75 Hz-es frekvenciával. A GCaMP6f-fel töltött sejtek intenzitásgörbéjét a MES szoftverrel exportáltuk, az adatelemzést saját függvények segítségével Microsoft Excel szoftverrel végeztük.

III.4.4.3. Mikroglia-nyúlványmotilitás mérése

A P2Y12 receptor mikroglia-nyúlványmotilitásban betöltött szerepét P2Y12 kompetens, mikroglia riporter CX3CR1^{GFP/+} és P2Y12 génkiütött, CX3CR1^{GFP/+} x P2Y12^{-/-} mikroglia riporter egerek segítségével, *in vivo* 2-foton mikroszkópiával vizsgáltuk. Az anesztézia indukcióját követően az egerek nyaki régióját feltártuk, majd a cisterna magna-ba 6µl fiziológiás sóoldatot, vagy ugyanilyen térfogatú, 3mg/ml koncentrációjú PSB0739 tartalmú oldatot injektáltunk, a bőrmetszést bezártuk. A képkészítés során 15µm vastag, 240x240µm alapterületű szöveti térfogatot vizsgáltunk, percenkénti mintavételezéssel, a képsíkok között 3µm lépéssel, 0,48µm/px felbontás mellett. Az elkészült 4 dimenziós képsorozatot a Fiji szoftver Manual Tracking nevű pluginjével analizáltuk, az adatelemzést saját függvények segítségével Microsoft Excel szoftverrel végeztük. A

mérésből kizártuk azokat a nyúlványokat, amelyeket nem tudtunk legalább 30 percen keresztül követni.

III.4.4.4. Mozgási index (surveillance score)

A mozgási index egy olyan paraméter, amellyel a mikroglia-nyúlványok fiziológiás monitorozó mozgását jellemezhetjük, 0-3 közti intervallumon tetszőleges pontértéket vehet fel. Számítása során figyelembe vettük az egyes nyúlványok által bejárt terület nagyságát, a leghosszabb irányított (egy irányba történő folyamatos) mozgásuk alatt megtett távolságot, valamint azt, hogy a vizsgált időtartam mekkora hányadában mozogtak kiemelt sebességgel (50nm/s-nál gyorsabban). Mindhárom paramétert normalizáltuk a mérés során kapott maximális értékekre, így mindegyik paraméter esetében 0-1 pont közti értéket kapott egy-egy nyúlvány.

III.5. Hisztológia

Az állatokat izoflurán belélegeztetésével elaltattuk, majd terminális anesztéziát indukáltunk a hasüregbe adott altató keverék befecskendezésével (0,1-0,2ml), mely 20mg/ml ketamint, 4mg/ml xylazin-hidrokloridot tartalmazott fiziológiás sóoldatban. Az egereket transzkardiálisan perfundáltuk egy percig fiziológiás sóoldattal, majd huszonöt-harminc percig 4% frissen beoldott paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal, ezt követően pedig 0,1 mólos foszfát-pufferrel (0,1M PB) tíz percen keresztül. A perfúzió után az agyakat eltávolítottuk, majd a primer szomatoszenzoros kérget tartalmazó szövetdarabokat vágunk ki. Ezekből koronális metszeteket készítettünk egy vibratóm segítségével (VT1200S, Leica), 0,1M PB-ben. A metszeteket puffer oldatban, 4°C-on tároltuk, ha rövid időn belül felhasználásra kerültek, és 30%-os szacharóz-oldatban, -80°C-on, ha hosszabb tárolásra volt szükség.

III.6. Lézió méretének meghatározása

Az ischemiás stroke által okozott lézió méretét koronális agymetszeteken, krezilibolyafestés alkalmazásával határoztuk meg, 24 órás reperfüziós időt követően. A nem festődő, azaz elhalt területek méretét állatonként 8 különböző koronális síkban mértük (a Bregmától számítva rostralis 2,9mm és caudalis 4,9mm között), majd ezeket összeadva kaptuk meg a lézió méretét, amelyet a létrejött ödéma méretével korrigáltunk.

III.7. Trifenil-tetrazolium-klorid (TTC) festés

Az ischemiás lézió és a penumbra meghatározásához fixálatlan agyszövetből 1mm-es metszeteket készítettünk, majd 1% 2,3,5-trifenil-tetrazolium-kloridot (TTC, Sigma-Aldrich) tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk 37°C-os vízfürdőben, 20 percen keresztül. A TTC az aktív mitokondriális aktivitással bíró szövetrészekon vörös színű trifenil-formazánná redukálódik, mely színreakció lehetővé teszi az élő és az elhalt szöveti részek szabad szemmel történő elkülönítését (Goldlust és mtsai, 1996). A mintákat ezután 4% paraformaldehidet tartalmazó (0,1M PB) oldattal fixáltuk 24 órán át 4°C-on, majd vibratómmal újrametszettük.

III.8. Egér szöveten végzett immunhisztokémia

III.8.1. Szövetelőkészítés és fluoreszcens immunhisztokémia

A vibratómmal készített 50µm-es agymetszeteket 0,1M PB oldatban, majd tris-pufferelt fiziológiás sóoldatban (TBS) rázókészülékre helyeztük, az oldatokat legalább 5-ször cseréltük, és legalább egy órán keresztül mostuk át velük a szövetmintákat. Ezt követően a metszeteket egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os humán szérum albumin (HSA, Sigma-Aldrich) oldattal blokkoltuk az aspecifikus antitestkötődés csökkentése érdekében. A blokkoló oldatba a HSA-n kívül 0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) detergenst is tettünk, hogy segítsük az antitest szöveti penetrációját. Ezen lépéseket követően a metszeteket az elsődleges antitesteket tartalmazó TBS oldatban inkubáltuk 24 órán át szobahőmérsékleten, vagy 48 órán át 4°C-on. A nem kötődött elsődleges antitesteket ezután ötszöri TBS-mosással távolítottuk el. A használt elsődleges antitesteket a 2. Táblázat, a másodlagos antitesteket a 3. Táblázat tartalmazza.

Fluoreszcens immunhisztokémiai jelölés esetén a másodlagos, fluorofórral ellátott antitesteket TBS oldatba helyeztük, majd ebben inkubáltuk a mintáinkat 24 órán keresztül. TBS, majd PB mosásokat követően amennyiben sejtmagjelölést is szeretnénk volna alkalmazni, a mintákat PB-ben oldott DAPI-val (Sigma-Aldrich) kezeltük, majd PB-mosások után vagy Aqua-Poly/Mount-tal (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) fedtük, vagy 0,1 M PB-ben tároltuk a pufferben történő képalkotásig.

2. Táblázat. A kísérletekhez használt elsődleges antitestek listája.

Antigén	Gazdaállat	Koncentráció	Forgalmazó	Katalógusszám
c-fos	tengerimalac	1:500	Synaptic Systems	226 004
CD206	patkány	1:200	AbD Serotec	MCA2235
DCX	egér	1:1000	Santa Cruz	sc-271390
Gephyrin	egér	1:500	Synaptic Systems	147 021
GFAP	csirke	1:1000	Synaptic Systems	173 006
GFP	csirke	1:2000	Invitrogen	A10262
Homer1	nyúl	1:500	Synaptic Systems	160 003
Iba1	kecske	1:500	Novusbio	NB100-1028
Iba1	nyúl	1:500	Wako Chemicals	019-19741
Iba1	tengerimalac	1:500	Synaptic Systems	234 004
Kv2.1	egér	1:500	NeuroMab	75-014
Kv2.1	nyúl	1:500	Synaptic Systems	231 002
Kv2.2	nyúl	1:500	Synaptic Systems	231 103
Lamp1	nyúl	1:500	Abcam	ab24170
NTPDase1	nyúl	1:500	Labome	rN1-6L
P2Y12R	nyúl	1:2000	Anaspec	AS-55042A
P2Y12R	nyúl	1:2000	Anaspec	AS-55043A
PV	kecske	1:2000	Swant	PVG 213
PDGFR-β	kecske	1:500	R&D Systems	AF1042
PECAM	patkány	1:500	BioLegend	102 501
RFP	patkány	1:1000	ChromoTek	5f8-100
SMA	egér	1:500	Abcam	ab7817
SMI32	egér	1:500	Covance	SMI-32P
TOM20	nyúl	1:1000	Santa Cruz	sc-11415
vGAT	tengerimalac	1:500	Synaptic Systems	131 004
vGluT1	tengerimalac	1:1000	Millipore	AB5905
vGluT3	tengerimalac	1:1000	Synaptic Systems	135 204
vNUT	tengerimalac	1:500	Millipore	ABN83

3. Táblázat. A kísérletekhez használt másodlagos antitestek listája.

Antitest	Gazdaállat	Koncentráció	Forgalmazó	Katalógusszám
1.4 nm Nanogold®-Fab' anti rabbit IgG	kecske	1:100	Nanoprobes	2004
biotinilált anti-rabbit	szamár	1:500	BioRad	644008
DyLight 405 anti-mouse	szamár	1:500	Jackson	715-475-150
DyLight 405 anti-rabbit	szamár	1:500	Jackson	711-475-152
DyLight 405 anti-rat	szamár	1:500	Jackson	712-476-150
Alexa 488 anti-chicken	szamár	1:500	Jackson	703-546-155
Alexa 488 anti-guinea pig	szamár	1:500	Jackson	706-546-148
Alexa 488 anti-goat	szamár	1:500	Jackson	705-546-147
Alexa 488 anti-rabbit	szamár	1:500	Jackson	711-546-152
CF568 anti-mouse	szamár	1:500	Biotium	20802
Alexa 594 anti-goat	szamár	1:500	LifeTech	A11058
Alexa 594 anti-guinea pig	kecske	1:500	LifeTech	A11076
Alexa 594 anti-mouse	szamár	1:500	LifeTech	A21203
Alexa 594 anti-rabbit	szamár	1:500	LifeTech	A21207
Alexa 594 anti-rat	szamár	1:500	Jackson	712-585-150
Alexa 647 anti-goat	szamár	1:500	Jackson	705-606-147

Antitest	Gazdaállat	Koncentráció	Forgalmazó	Katalógusszám
Alexa 647 anti-guinea pig	szamár	1:500	Jackson	706-606-148
Alexa 647 anti-mouse	szamár	1:500	Jackson	715-605-150
Alexa 647 anti-rabbit	szamár	1:500	Jackson	711-605-152

III.8.2. Elektronmikroszkópos immunhisztokémia

Az elsődleges antitestek oldatának TBS-sel történő cseréje után, TBS-ben történő ismételt mosásokat követően a metszeteket egy órán keresztül blokkoló oldattal (Gel-BS) kezeltük, mely 0,5% hidegvízi hal bőrből kivont zselatint (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) és 0,5% HSA-t tartalmaz, TBS-ben oldva. Ezután a metszeteket 24 órán keresztül az adott vizsgálatnak megfelelően biotinilált-, vagy aranszemcse-konjugált másodlagos antitestek oldatával kezeltük, melyek Gel-BS-ben voltak hígítva. Alapos TBS-ben és PB-ben történt mosások után az aranszemcsék szövetbe rögzítése érdekében a mintáinkat 2% glutáraldehidet tartalmazó PB-vel kezeltük 15 percen keresztül. A metszeteket pufferoldatokkal mostuk át, majd TBS-ben és az antitest-kötött aranszemcsék intenzifikálását előkészítő oldattal kezeltük (ECS, Aurion, Wageningen, Hollandia), majd az immunarany jelölést ezüstözőoldat (SE-EM, Aurion) segítségével erősítettük fel 40-60 percen keresztül, szobahőmérsékleten. Ezt követően TBS-ben hígított Elite ABC-vel (1:300, Vector Laboratories, Burlingame, Egyesült Királyság) kezeltük a mintákat egy éjszakán keresztül. Ezután TBS-ben és 7,6 pH-jú Tris-pufferben (TB) mostuk azokat, majd az immunperoxidáz reakciót 3,3-diaminobenzidinnel (DAB, Sigma-Aldrich) jelenítettük meg. Ez a lépés addig tartott, amíg fénymikroszkóppal látható módon meg nem jelent a DAB a vizsgálni kívánt struktúrákban. További mosások után a metszeteket 0,5%-os ozmium-tetroxid oldattal kezeltük 20 percen át, majd felszálló alkoholsorral, illetve acetitrillel víztelenítettük, végül pedig epoxigyantába (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich) ágyasztuk azokat. A víztelenítés során a mintákat 1% uranil-acetátot tartalmazó 70%-os etil-alkohol oldattal kontrasztoltuk 20 percen át. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a gyantával átitatott metszeteket alumíniumból készített öntőformákba helyeztük, gyantát rétegeztünk rájuk, egy éjszakát állni hagytuk, hogy a gyanta megfelelően átitathassa a szövetet, ezután tárgylemezre szedtük őket és

lesúlyozva 56°C-on kisütöttük. A polimerizáció után hagyományos transzmissziós elektronmikroszkópiához 70, elektrontomográfiához 150nm vastagságú metszeteket készítettünk egy EM UC6 ultramikrotóm segítségével (Leica), majd a metszeteket formvar-ral bevont, egynyílású réz mintatartókra (gridekre) vettük fel.

III.9. Konfokális mikroszkópia

III.9.1. Képkészítés konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal

A fluorofór-konjugált másodlagos antitestekkel kezelt mintáink konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos vizsgálatát egy Nikon Eclipse Ti-E fordított mikroszkóp (Nikon Instruments Europe B.V., Amszterdam, Hollandia) segítségével vizsgáltuk. A nagyfelbontású képkészítéshez CFI Plan Achromat VC 60x olaj immerziós (numerikus apertúra: 1,4) vagy CFI Plan Achromat VC 60x víz immerziós (numerikus apertúra: 1,2) objektívet és A1R konfokális rendszert használtunk. A gerjesztésre használt lézerek 405, 488, 561 és 647nm hullámhosszúak (CVI Melles Griot, Albuquerque, NM, USA). A felvételek rögzítését és kezelését NIS Elements AR szoftverrel (Nikon Instruments Europe B.V.), dekonvolúcióját Huygens Professional szoftverrel (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Hollandia) végeztük. Az esetleges torzítás elkerülése végett, a képek kiértékelését minden esetben vak kísérlet útján végeztük, azaz a mérést végző személy nem ismerte, hogy az adott kép mely csoportba tartozó egyedhez tartozott, illetve a mérendő populáció kiválasztásakor nem látta a mérni kívánt paraméterre vonatkozó információt (pl. mikroglialis borítottság mérése esetén a mérendő neuronok kiválasztása a mikroglialis jelölést tartalmazó csatorna hiányában történt) .

III.9.2. Szomatikus és szinaptikus kapcsolatprevalencia mérése

A neuronok sejttestére érkező mikroglialis kapcsolatok kvantálásához kettős immunjelöléssel ellátott minták konfokális felvételeit használtuk: az egyik csatornában az idegsejt markerének jelét (Kv2.1, PV, vGluT3, SMI32), míg a másikban a mikroglia marker jelét láthattuk. Az állatonként/páciensenként legalább három különböző agykérgi területről készült felvételeken kizárólag a neuronális jelet vizsgálva szisztematikus random módon kijelöltük a vizsgálni kívánt idegsejteket, majd a mikroglia-csatornát bekapcsolva minden kijelölt idegsejt esetében 3 dimenzióban, az idegsejt sejttestét teljesen rekonstruálva megvizsgáltuk, hogy kap-e mikroglialis kontaktust. A vizsgálat

során „kontaktusként” jelöltük meg azokat az eseteket, amikor a mikroglia-nyúlvány legalább $0,5\mu\text{m}$ hosszan hozzáért az idegsejt sejttestéhez, vagyis nem volt megfigyelhető rés a két sejttípus között. Az idegsejtek akkor kerülhettek be a mérésbe, amennyiben a sejttestük a tér minden irányában teljesen látható volt a vizsgált térfogathelyzetben.

A szinaptikus mikroglia-kontaktus gyakoriságának vizsgálatához háromszoros immunjelöléssel ellátott szövetmintákról készített konfokális felvételeket használtunk. Ezek a képek minden esetben tartalmaztak egy pre- (vGluT1, vGAT) és egy posztszinaptikus (Homer1, gephyrin) markert, valamint mikrogliajelölést. Minden állatban szisztematikus random módon kiválasztottuk a vizsgálni kívánt szinapszisokat – vagyis olyan kapcsolatokat, ahol a pre- és posztszinaptikus markerek egyértelműen hézag nélkül voltak láthatóak egymás mellett –, majd a mikroglialis jelet bekapcsolva 3 dimenziós vizsgálatot végeztünk, hogy megállapítsuk, a mikroglia-nyúlványok megérintik-e a szinapszist.

Mindkét méréstípushoz $50\text{nm}/\text{pixel}$ felbontású képsorozatokot alkalmaztunk; a sejttest-mérés esetében Z-irányban $0,3\mu\text{m}$ -enként, a szinapszismérés esetén $0,25\mu\text{m}$ -enként vett képsíkokkal.

III.9.3. Kv2.1 és Kv2.2 fehérjék szintjének mérése

A Kv2.1 és Kv2.2 fehérjék relatív elhelyezkedését a mikroglialis kapcsolathoz képest konfokális felvételekből exportált képsorozatokon végeztük. Kizárólag az adott fehérjét jelölő markereket látva FIJI szoftverben egyforma méretű ($1,32\mu\text{m}^2$) mérőnégyzeteket helyeztünk el véletlenszerűen az egyes piramissejtek legnagyobb keresztmetszeti képén, és megmértük ezeken a területeken a Kv2.1 vagy Kv2.2 fluoreszcens intenzitásértékét. Ezután a mikroglialis jelet is tartalmazó képeken megállapítottuk, hogy melyik jelölőnégyzet esett mikroglialis kontaktus helyére (kontakt csoport), és ezeket az értékeket összehasonlítottuk a többi mérőnégyzetben talált értékkel (non-kontakt csoport).

III.9.4. Idegsejtek mikroglialis borítottságának mérése

A mikroglialis borítottság méréséhez olyan konfokális képsorozatokot használtunk, amelyeken neuronális és mikroglia jel volt, az XY-irányú felbontás $50\text{nm}/\text{pixel}$ volt, a Z-irányú, képsíkok közti távolság 300nm . A mérni kívánt idegsejteket „vakon” választottuk

ki, figyelve arra, hogy azok sejtteste hiánytalanul látszódjon a mikroszkópos felvételeken. A sejttesteket 3 dimenzióban, teljesen rekonstruáltuk, a sejttest területét minden képsíkon megmértük. Ezután a mikroglialis jelet tartalmazó képeken szintén minden síkon megmértük, hogy mekkora felületen érintkezik a két sejt egymással. A borítottságot ezután – az esetleges metszetek közti zsugorodásbeli különbséget kiküszöbölendő – az adott sejttest méretének százalékos arányában adtuk meg.

III.9.5. cFos fehérje mennyiségének detektálása

A cFos fehérje mennyisége megnövekszik, amennyiben egy sejt aktivitása magasabb. A kemogenetikus módon kiváltott megnövekedett sejtaktivitás létrejöttét a cFos szintjének detektálásával szeretnénk volna ellenőrizni: a fehérje expressziójának a csúcsa 60-120 perc között van, így az állatokat 90 perccel az ip. CNO beadást követően perfundáltuk. A sejtaktivitásnövekedés ellenőrzéséhez a kontroll és a CNO-kezelt állatokat teljes mértékben azonos körülmények (közös immunreakció, azonos lézerintenzitás és mikroszkópbeállítások) között vizsgáltuk, a képeken a sejtek intracelluláris terében FIJI szoftverrel mértük a cFos-jel integrált fluoreszcens intenzitását.

III.9.6. TOM20 és vNUT fehérjék fluoreszcens intenzitásának mérése

A mitokondriális TOM20 fehérje, valamint a vezikuláris nukleotid transzporter (vNUT) idegsejten belüli, mikroglialis kontaktushoz viszonyított relatív elhelyezkedését az egyes jelölések fluoreszcens intenzitásgörbéjének szemiautomatikus elemzésével vizsgáltuk. Hármass immunjelöléssel (mikroglia, neuron, TOM20/vNUT) ellátott mintákról konfokális felvételeket készítettünk (0,1 μ m/pixel felbontás mellett). Az egyes neuronok esetén kiválasztottuk azt a képsíkot, amelyiken a sejttest legnagyobb keresztmetszete és rajta mikroglialis szomatikus kontaktus volt látható, majd ezen a képsíkon a Kv2.1-jelölés mentén körberajzoltuk a sejttest membránját a FIJI szoftverben. Ezt a kontúrt ezután 0,5-0,5 μ m-rel szűkítettük, illetve tágítottuk: a mikroglialis jelölés fluoreszcens intenzitásgörbéjét az utóbbi, a TOM20 vagy a vNUT jelét az előbbi mentén exportáltuk ki a szoftverrel (7. Ábra B, E). Ezeket a görbéket a fluoreszcens jelek maximumára normalizáltuk, a hosszukat arányosan változtattuk. A szomatikus mikroglia kapcsolatot azokon a helyeken határoztuk meg, ahol a mikroglialis jel intenzitása meghaladta a detektált maximális intenzitásérték 20%-át. A kapcsolat határait mindkét irányba 500nm-

rel megnöveltük, majd az erre a szakaszra eső (kontakt) TOM20/vNUT intenzitásértékeket hasonlítottuk össze a többi szakasz (non-kontakt) intenzitásértékeivel.

III.9.7. Stroke-os szöveten végzett anatómiai vizsgálatok

Az ischémias stroke hatásait a szomatikus junkció morfológiájára olyan állatok agyszövetmintáin vizsgáltuk, amelyek 1 óras arteria cerebri media elzárását 4 óras reperfüziós időszak követte.

III.9.7.1. Mitokondrium fragmentáció mérése

A mitokondriális fragmentáció vizsgálatához kettős fluoreszcens immunjelöléssel (Kv2.1, TOM20) ellátott metszeteket használtunk. A képsorozatokot a penumbrából, illetve az annak megfelelő ellenoldali (kontralateralis), stroke által nem érintett régióból vettük (kontroll). A Kv2.1 jelölés segítségével azonosított piramis sejtek legnagyobb keresztmetszetét tartalmazó képsíkon a sejtek membránjának körvonalát használtuk vizsgálandó területként. Ezekben a területeken belül a FIJI szoftver „Analyze Particles” funkciójával automatikusan nagyszámú mitokondriumot azonosíthattunk a TOM20 jelölést használva, és a program az azonosított mitokondriumok területét, valamint leghosszabb átmérőjét is képes automatikusan megadni.

III.9.7.2. Kv2.1 klaszterek mérése

A Kv2.1 klaszterek analíziséhez szintén azokat a képsíkokat használtuk, amelyeken az adott, vizsgálni kívánt piramis sejtek legnagyobb átmetszete volt látható. A sejt körvonalamentén a Kv2.1 jel intenzitás görbét FIJI szoftver használatával exportáltuk, majd saját függvények segítségével Microsoft Excel szoftverrel elemeztük. Akkor beszélünk fehérjeklaszterről, amennyiben a fluoreszcens intenzitás legalább három szomszédos pixelen keresztül, legalább 25 szűrkeségértékkel (egy 8-bites kép intenzitástartományának 10%-a) meghaladta az adott sejtre jellemző átlagos fluoreszcens intenzitást.

III.9.8. Mikroglia 3 dimenziós morfológiai vizsgálata

A mikroglia 3 dimenziós morfológiai vizsgálatát egy nyílt forráskódú, MATLAB-alapú, automatikus analízist lehetővé tevő programcsomaggal végeztük (Microglia Morphology

Quantification Tool (Heindl és mtsai, 2018)). Az analízishez legalább 100 μ m vastag, kettős immunjelöléssel (sejtmag és mikroglia, a méréseinkben DAPI és CX3CR1^{GFP/+} állatokban GFP jelölés) ellátott metszetek szükségesek, melyeket pufferoldatban helyeztünk a mikroszkópba, hogy elkerüljük a konvencionális lefedőanyagok által okozott szövetzsugorodás torzító hatását. A készített képsorozatok felbontása 0,2 μ m/pixel volt, a síkok között 0,4 μ m-nyi távolság volt. A két immunjelölés segítségével a szoftver azonosítja az egyes sejtek sejtmagját, sejttestét, vastag ágait és vékony nyúlványait, majd a szegmentációt követően azokat a mikroglia-jelöléssel ellátott szakaszokat elemzi, amelyeket egyértelműen és hézagmentesen hozzá tud kapcsolni egy mikroglia sejttesthez. Az így létrejött mikroglia-vázak és a fluoreszcens jel segítségével minden egyes sejt 59 különböző morfológiai paraméterét képes megadni.

III.9.9. Szatellita állapot és mikroglia sejtszám meghatározása

A mikroglia számát, illetve a neuronok sejttestéhez való viszonyát olyan 100 μ m vastagságú agykérgi metszeteken végeztük, amelyen a mikroglia (CX3CR1-GFP), a neuronok (Kv2.1) és a sejtmagok (DAPI) is meg voltak jelölve. A mikrogliaszámot állatonként több különböző régióból készített felvételeken, 50x50 μ m-es számolókeret segítségével, sztereológiai módszerekkel határoztuk meg. A szatellita sejtek arányának meghatározásához a mikroglia- és sejtmag jelek felhasználásával kijelöltük a konfokális felvételeken a teljesen, a tér minden irányába látható mikroglia sejttesteket, majd a neuron jelölés csatornájának bekapcsolásával megvizsgáltuk, hogy az egyes mikroglia sejttestek – 3 dimenzióban vizsgálva – piramissejtek sejttestéhez hozzáérve (szatellita), vagy tőlük távolabb (különálló) helyezkednek-e el.

III.10. Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópia (STORM)

III.10.1. Mintaelőkészítés és képalkotás

A fluoreszcens immunjelöléssel ellátott mintáinkat közvetlenül a képalkotás előtt #1,5 boroszilikát fedőlemezekre helyeztük, majd speciális, a szuperrezolúciós képalkotást lehetővé tevő oldattal fedtük le. Ez az oldat 5% glükózt, 0,1 M merkaptotilamint, 1 mg/ml glükóz-oxidáz enzimet és 1500U/ml kataláz enzimet tartalmazó Dulbecco PBS (Sigma-Aldrich). A vizsgálatokhoz a Nikon N-STORM C2+ szuperrezolúciós rendszert használtuk, amely a Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópiát kombinálja

egy Nikon Eclipse Ti fordított mikroszkóppal. A szuperrezolúciós képalkotás laterális felbontása 20nm, Z-irányú felbontása pedig 50nm. A STORM képalkotáshoz Alexa647-konjugált másodlagos antitestet és 15000 képalkotási ciklust használtunk.

III.10.2. P2Y12 receptor eloszlása szuperrezolúciós felvételeken

Az elkészült szuperrezolúciós felvételekről a specifikus jelként azonosított molekulák (fotonszám több mint 2000, sűrűségfilter: legalább 10 molekula 150nm-en belül, Z-filter: ± 300 nm a fókuszsíktól) adatait exportáltuk, valamint a konfokális felvételeket dekonvolváltuk, és a két modalitás eredményét Photoshop CS6 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) szoftverrel illesztettük, a mindkét képalkotásban felvett, 647nm-es csatorna alapján. A STORM lokalizációs pontok mikroglia-neuron kapcsolathoz viszonyított elhelyezkedését FIJI szoftverrel vizsgáltuk: az idegsejtet érintő mikroglia-nyúlvány vastagságát 4 egyenlő szélességű régióra osztottuk a kapcsolattal párhuzamosan, majd az egyes régiókra eső lokalizációs pontokat kvantáltuk.

III.11. Elektronmikroszkópia

III.11.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A polimerizálódott gyantával átitatott metszetekből a kiválasztott, vizsgálni kívánt régiókat kivágtuk, Durcupan gyantából készült blokkokra ragasztottuk. Az ezen mintákból ultramikrotómmal készített metszetsorozatokat tartalmazó grideket egy Veleta CCD kamerával (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Németország) felszerelt Hitachi H-7100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, 75kV gyorsítófeszültség mellett.

III.11.2. Elektrontomográfia

Az elektrontomográfiai felvételek előtt a vizsgálni kívánt régiókat kiválasztottuk a Hitachi H-7100 mikroszkóppal. Ezt követően a metszeteket tartalmazó grideket 10% HSA-t tartalmazó TBS cseppekre helyeztük 10 percre. Ezután desztillált vízbe mártottuk őket, majd 10 percre 10nm-es arannyal konjugált Protein-A-t (#AC-10-05 Cytodiagnosics, Burlington, Kanada) tartalmazó desztillált víz (1:3) cseppekre helyeztük a grideket – ezeknek a felszínen megtapadó aranyzemcséknek köszönhetően vagyunk képesek illeszteni a többirányú felvételeket. Desztillált vízben történő intenzív mosást követően 5nm-nyi (11 réteg) szén adszorbeáltattunk a gridek felszínén. Az

elektrontomográfiás képalkotást egy komputer-kontrollált precíziós tárgyasztallal (CompuStage, FEI, Hillsboro, OR, USA) felszerelt Tecnai T12 BioTwin elektronmikroszkóppal végeztük, 120kV gyorsítófeszültség és 23000x nagyítás mellett. A felvételek rögzítését Xplore3D szoftverrel (FEI) hajtottuk végre. A képalkotás közbeni zsugorodást megelőzendő, a felvétel előtt a vizsgálni kívánt területeket 4-6 percen át besugároztuk. A kéttengelyes sorozatfelvételeket 2-fokként készítettük, -65 és +65 fokos szélsőértékek között.

III.11.3. 3 dimenziós rekonstrukció

A sorozatfelvételekből a rekonstrukciót az IMOD szoftvercsomaggal (Kremer és mtsai, 1996) végeztük. Az elektrontomográfiás térfogatok esetén az izotropikus voxelek élhossza 0,49nm volt. A különböző sejtek, sejtalkotók szegmentálását manuálisan, a 3Dmod szoftverrel végeztük, a kvantitatív méréseinket az így készített 3D modelleken hajtottuk végre.

III.11.4. Elektrontomográfiás felvételeken végzett mérések

III.11.4.1. P2Y12 receptor sűrűsége a membránok mentén

A mérés első lépéseként a rekonstruált, 3D modelleken megállapítottuk, hogy melyik mikroglia membránszakaszok milyen, egyértelműen azonosítható neuronális sejtszakasszal állnak közvetlen kapcsolatban (vagyis a membránok egymás mentén, párhuzamosan futnak, és nincsen köztük más sejt membránja). Ez alapján a membránszakaszokat két csoportra osztottuk: nem-szomatikusra és szomatikusra, amely utóbbi azt jelentette, hogy az adott mikroglialis membránszakasz egyértelműen egy idegsejt sejttestével létesít közvetlen kapcsolatot. Az IMOD szoftvercsomag segítségével az egyes membránszakaszok felszínét megmértük, valamint a membrán-asszociált (40nm-nél közelebb lévő) P2Y12 receptorokat jelölő aranyszemcséket hozzárendeltük a hozzájuk legközelebb eső membránszakaszhoz. Ezek számát a felszínnel elosztva számítottuk ki az adott membránszakaszra vonatkozó receptorsűrűséget. Az eltérő reakciókból és penetrációs különbségekből kialakuló eltérések elkerülése érdekében párosított összehasonlításokat végeztünk az azonos mikroglia-nyúlványokon belül.

III.11.4.2. P2Y12 receptor mennyiségének és a kapcsolati rés szélességének összefüggése

A P2Y12 receptor sűrűségének mikroglia-idegsejt membrántávolsággal való kapcsolatát szintén a szegmentált és rekonstruált 3D modelleken végeztük. A vizsgálathoz az IMOD szoftverrel kiexportált koordináták segítségével a mikrogliális membrán minden szomatikus kapcsolatot kialakító pontján megállapítottuk a legkisebb mikroglia-neuron távolságot, valamint a 40nm-es sugarú körben található P2Y12R arany szemcsék számát. Mindkét számítást egyedi algoritmusokkal végeztük az R szoftverrel (The R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria). Mivel a mikroglia-nyúlványok által kialakított kapcsolatok dinamikusak és gyorsan változnak, erős lineáris korreláció nem várható el, ezért a membrántávolság alapján két csoportot hoztunk létre: mivel az általunk vizsgált tomogramokban az átlagos mikroglia-neuron sejttest membrántávolság 13,06nm volt, ezért ezt az értéket használtuk a két csoportra osztás küszöbértékeként.

III.12. In vitro technikák és mérések

III.12.1. Mikroglia izolálása

Az agyhártyák eltávolítása után a kinyert szövetdarabokat szobahőmérsékleten enzimatikusan kezeltük 0,05%-os tripszin és 0,05%-os DNáz alkalmazásával, 10 percen keresztül. Ezután a sejteket poli-L-lizinnel bevont műanyag sejt kultúra tálakra ültettük, majd 5% CO₂-t tartalmazó, nedvesített környezetben, 37 °C-on Minimal Essential Mediumban (#21090-055 Thermo Fisher Sc., Waltham, MA, USA) neveltük, amelyhez 10% magzati marhaszérumot (#16000-044 Thermo Fisher Sc.), 4mM glutamint (#G3126 Sigma-Aldrich), 40µg/ml gentamicint (Gentamicin Sandoz, 80 mg/ml injekció) és 2,5µg/ml amfotericin B-t (#A2411 Sigma-Aldrich) adtunk. Az inkubációs médiumot az első két napon, majd ezt követően minden harmadik napon cseréltük. A primer mikroglia sejteket 21-28 napos kevert asztroglia/mikroglia kultúrákból enyhe tripszinizálással izoláltuk (Fekete és mtsai, 2018).

III.12.2. HEK-mikroglia ko-kultúra és a Kv2.1-konstruktok transzfektálása

A transzfekcióhoz használt ko-kultúrákban a HEK293 sejteket $2,5 \times 10^4$ sejt/cm² sűrűségben ültettük ki, ezek tetejére pedig mikroglia sejteket ültettünk ugyanilyen

sűrűségben a transzfekció előtt egy nappal. A transzfekciót 1µg Kv2.1-GFP, vagy DNKv2.1-YFP plazmid DNS-sel, Lipofectamine 3000 reagens (#L3000001 Thermo Fisher Sc.) és Opti-MEM szérum médium (#31985-062 Thermo Fisher Sc.) használatával végeztük: 1,5µl Lipofectamine 3000 reagenst 25µl Opti-MEM-hez kevertünk, valamint 1µg plazmid DNS-t 1µl P-3000 reagenssel (a Lipofectamine-készlet egyik reagense) és 25µl Opti-MEM-mel kevertünk össze. Az így elkészült két oldatot összeöntöttük, 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a keveréket a sejtekhez adtuk. A génexpressziót a transzfekciót követő napon értékeltük. A mikroglia jelöléséhez 5 µg/ml izolektin B4-Alexa 488 vagy 594 (#I21411 és #I21413 Thermo Fisher Sc.) konjugátumot alkalmaztunk. A képalkotás HEPES pufferelt ACSF-ben (124,5mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM glükóz, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 8mM NaHCO₃, 20mM HEPES) szobahőmérsékleten, Nikon A1R konfokális mikroszkópon történt, 60×-os nagyítással (Plan Apo VC). A képeket a NIS-Elements AR szoftver segítségével elemeztük.

III.12.3. Primer neuronális sejt kultúra készítése

A primer hippocampális neuron kultúrákat 18 napos C57BL/6J embriókból készítettük el (Fekete és mtsai, 2018). A sejteket poli-L-lizinnel bevont műanyag sejt kultúra tálakra vagy lamininnel bevont üveg fedőlemezekre ültettük 1×10^5 sejt/cm² sűrűségben, majd NeuroBasal táptalajon (#21103-049 Thermo Fisher Sc.) növesztettük, melyhez 5% magzati marhaszérumot, B-27 kiegészítőt (50×) (#17504-044 ThermoFisher Sc.), 0,5mM GlutaMax kiegészítőt (#35050061 Thermo Fisher Sc.), 40µg/ml gentamicint, 2,5µg/ml amfotericin B-t adtunk. A gliasejtek növekedésének gátlása érdekében az inkubálás 24-120. órája között 10µM citozin-arabino-furanozidot (CAR, #C1768 Sigma-Aldrich) adtunk a tenyészetekhez. 48 órával a CAR-kezelés után a táptalaj felét BrainPhys-SM1 táptalajra (#05792 Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) cseréltük, majd a táptalajcserét ezt követően 3-4 naponta megismételtük. A primer neuronális kultúrákat 7-14 napig inkubáltuk 5% CO₂-t tartalmazó, nedvesített környezetben, 37 °C-on.

III.12.4. Neuronális ATP-felszabadulás mérése

A vezikuláris ATP-felszabadulás megfigyeléséhez neuronális kultúrákat inkubáltunk 20µM quinacrine-dihidrokloriddal (#Q3251 Sigma-Aldrich) 20 percen keresztül, 37 °C-on. A képalkotás HEPES pufferelt ACSF-ben (124,5mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM

glükóz, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 8mM NaHCO₃, 20mM HEPES) szobahőmérsékleten, Nikon A1R konfokális mikroszkópon történt, 60×-os nagyítással (Plan Apo VC).

III.12.5. Extracelluláris ATP mérése

Az ATP mennyiségét az inkubációs médiumban nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel határoztuk meg. A primer neuronális sejt kultúrák felülúszóját az in vitro inkubálás 7. napján gyűjtöttük, 5 percig tartó 40 mM KCl-dal való kezelést követően, amelyet 20 perces inkubációs időszak előzött meg a következő drogok kombinációjával: 20µM Nimodipin (#N-150 Alomone Labs, Jeruzsálem, Izrael), 10µM klodronát-dinátrium (#D4434 Sigma-Aldrich), 100nM omega-Agatoxin IVA (#STA-500 Alomone Labs), 1µM omega-Conotoxin GVIA (#SNX-124 Alomone Labs). A vizsgálni kívánt médiumokból 400µl-nyit 50µl homogenizáló oldatot (10 µM teofillint tartalmazó 0,1M perklórsav-oldat) tartalmazó hűtött Eppendorf-csővekbe mértünk, majd a perklorátot a felülúszóból 1M kálium-hidroxiddal precipitáltuk, a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk. Az adenin-nukleotidok és az adenzin mennyiségét a vizsgált médiumban oszlopcserés szeparációval határoztuk meg, Discovery HS C18 50 x 2 mm-es és 150 x 2 mm-es oszlopok segítségével. A vizsgálatokhoz használt HPLC rendszer egy Shimadzu LC-20 AD analitikai és mérőrendszer volt, Agilent 1100 sorozatú, 253 nm-re állított változó hullámhosszú detektorral. Az oldatokban jelenlévő koncentrációkat kétpontos kalibrációs görbe segítségével számítottuk ki.

III.13. Statisztika

Minden kvantitatív mérésünket vak módszerrel és ahol lehet, előzetes power analízissel végeztük. Az adatok típusának és eloszlásuknak megfelelően (a normalitásvizsgálatot Shapiro-Wilks W teszttel végeztük) választottunk statisztikai próbát: a normál eloszlású mintákon 2 csoport esetén párosított vagy kétmintás t-tesztet, több csoport esetén egyutas ANOVA próbát (Tukey-teszttel kiegészítve) hajtottunk végre, míg nem parametrikus vizsgálati módszerek közül 2 csoportnyi, egymással kapcsolatban lévő minta esetén Wilcoxon próbát, független csoportok esetén Mann-Whitney U tesztet, míg több csoport esetén Kruskal-Wallis (és Dunn) tesztet végeztünk. A dolgozat során a szignifikanciaszintet minden esetben $\alpha=0,05$ -ben határoztuk meg. A statisztikai

analízishez Statistica 13.4.0.14 szoftvert (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA) használtunk.

A dolgozat ábráin a szignifikanciaszint alatti p értékek jelölése a következő módon történt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A felsorolt kísérleti módszerek közül a plazmidok előállításában, az *in utero* elektroporációban, a folyadékkromatográfiás kísérletekben és a humán minták előkészítésében kutatócsoporton kívüli segítséget kaptam, míg az *in vivo* kezeléseket és képközpontozást, valamint az *in vitro* kísérletsorozatokat a kutatócsoportunk tagjai végezték. A dolgozatban bemutatott eredmények közül kiemelt szerepem volt a kísérletek megtervezésében, az állatok perfúziójában, a minták előkészítésében, a mikroszkópos képközpontozásban (konfokális mikroszkópia, STORM, elektronmikroszkópia és -tomográfia), a képek és az adatok analízisében, a mérési módszerek kidolgozásában és a 3 dimenziós rekonstrukciókban.

A dolgozatban szereplő ábrák és eredmények az alábbi publikációkból származnak:

1-2. Ábra: C. Cserép, B. Pósfai, Á. Dénes. (2021) Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron* 109(2):222-240. (Cserép és mtsai, 2021a)

3-13., 19-20. Ábra, 4-8., 14-15. Táblázat: C. Cserép, B. Pósfai és mtsai (2020) Microglia monitor és protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science* 367(6477):528-537. (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)

14-16. Ábra, 9-12. Táblázat: B. Pósfai és mtsai, publikálatlan adatok.

17-18. Ábra, 13. Táblázat: C. Cserép és mtsai (Elfogadott kézirat) Somatic junctions connect microglia és developing neurons. *Cell Reports* (Cserép és mtsai, 2021b)

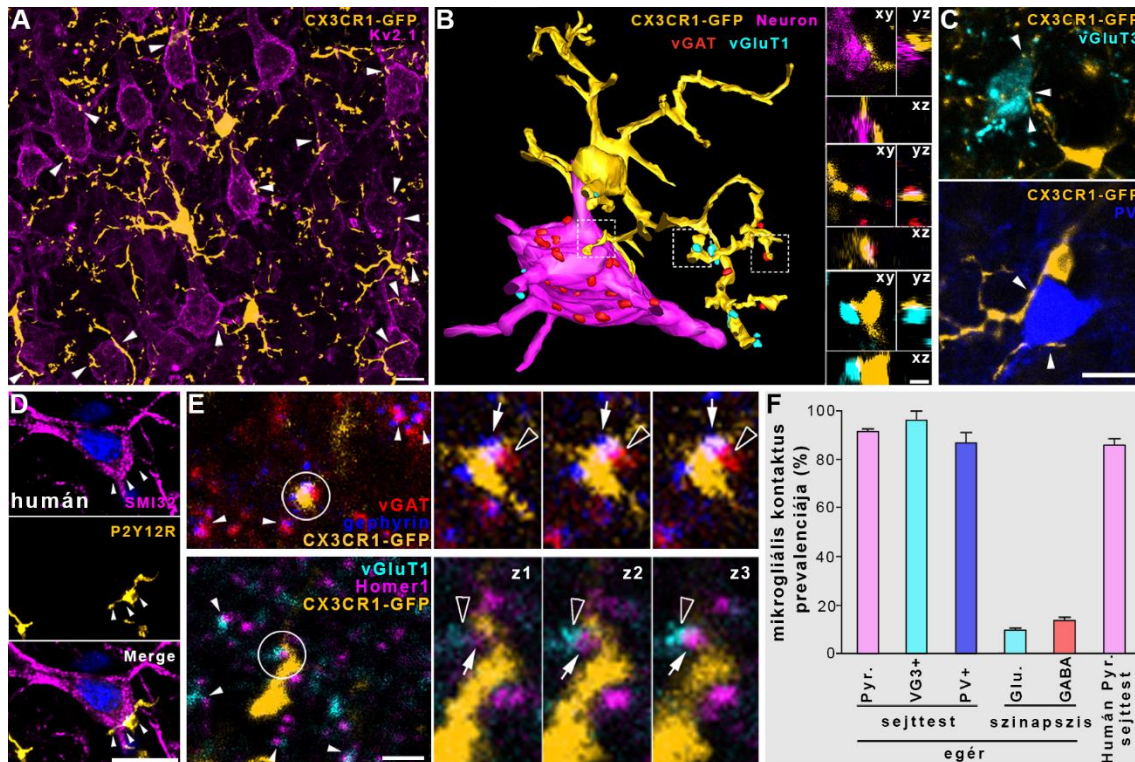
IV. Eredmények

IV.1. Mikroglia-neuron kapcsolatok az agykéregben

IV.1.1. A mikroglia-nyúlványok kapcsolatot létesítenek a neuronok sejttestével

A neuronális folyamatok azon széles palettáját figyelve, amelyekre a mikroglia hatással van, úgy gondoltuk, hogy az irodalomban ismert mikroglia-szinapszis kapcsolatok nem nyújthatnak kizárólagos alapot a két sejtípus között zajló összetett információcserére. Feltételeztük, hogy léteznie kell egy kapcsolati felszínnek, amely lehetővé teszi a mikroglia-nyúlványoknak az idegsejtek központi, szomatikus régiójának közvetlen ellenőrzését. Ennek vizsgálata érdekében többszörös immunfluoreszcens jelöléseket alkalmaztunk paraformaldehid-fixált agyszöveten, majd az így elkészített mintáinkat konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. Egerek szomatoszenzoros agykérgének 2/3. rétegében, illetve a hippokampuszban végzett méréseink során térfogati felvételek segítségével 3 dimenzióban rekonstruáltuk a vizsgálni kívánt sejteket, és azt találtuk, hogy az idegsejtek túlnyomó többsége, körülbelül 90 százaléka kapott a sejttestére bemenetet mikroglia nyúlványoktól, és ez az arány független volt az idegsejtek neurokémiai fenotípusától: mind a piramisidősejtek, mind a periszomatikus kosársejtek két nagy populációjának esetében igaz volt (3. Ábra A-C, F, 4. Táblázat). Annak bizonyítékeként, hogy a mikroglia számos funkciójához hasonlóan az újonnan megfigyelt szomatikus mikroglia-neuron kapcsolat is evolúciósan konzervált, ismert neurológiai betegséggel nem rendelkező személyek post-mortem agyszövetmintáin is hasonló arányban ($86,9 \pm 2,6\%$) figyeltük meg az agykérgi piramisidősejtek felszínén ezt a kapcsolatot (3. Ábra D, F, 4. Táblázat).

Hasonló módszerrel megvizsgáltuk, hogy a szakirodalomban jól ismert mikroglia-szinapszis kapcsolatok mennyire gyakran fordulnak elő az egér agykéregben. Szemben az idegsejteknel és interneuronoknál tapasztalt körülbelül 90 százalékos prevalenciával, az egyidejűleg pre- és posztzinaptikus markerekkel is azonosított szinapszisoknak mindössze 9,25-14,0 százaléka rendelkezett mikrogliális bemenettel (3. Ábra E-F, 4. Táblázat). Ez a nagyságrendi különbség arra enged következtetni, hogy az idegsejtek sejttesteiben lezajló folyamatok monitorozása szorosabb mikrogliális kontrollt igényelhet az agyszövetben fiziológias körülmények között.



3. Ábra. Az idegsejtek túlnyomó többsége kap szomatikus mikroglialis bemenetet.

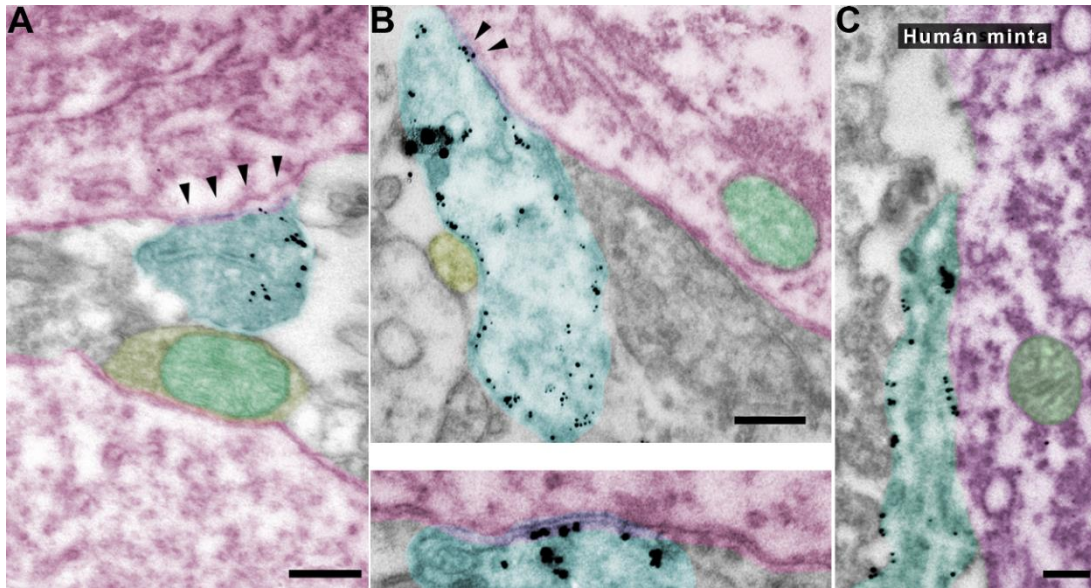
A, Az egér primer szomatoszenzoros kérgéről készült konfokális felvételen számos piramisneuron (Kv2.1, magenta) sejttestén figyelhetünk meg mikroglia-nyúlvány (CX3CR1-GFP, okker) által kialakított kapcsolatot. A fehér nyílhegyek ilyen szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatokra mutatnak. **B**, Konfokális térfigatfelvételtől készített 3 dimenziós rekonstrukció, amelyen egy piramisneuron (magenta), néhány GABAerg (piros) illetve glutamaterg (ciánkék) preszinaptikus terminális, és egy mikroglia (okker) látható, amelynek nyúlványai a szinapszist és a neuron sejttestét is érintik. A szaggatott négyzetekkel jelölt területek a jobb oldali kis képeken a tér 3 irányából láthatóak. **C**, A mikroglia nyúlványok kapcsolatokat (nyílhegyek) alakítanak ki vGluT3 (ciánkék, fent) és parvalbumin (kék, lent) pozitív kosársejt sejttestével is. **D**, Post mortem humán agyszöveten szintén megfigyelhető a mikroglia-idegsejt szomatikus kapcsolat. **E**, A mikroglia-nyúlványok kapcsolatokat alakítanak ki a preszinaptikus- (fekete nyílhegyek, vGAT-piros, vGluT1-ciánkék) és poszt-szinaptikus (fehér nyilak, gephyrin-kék, Homer1-magenta) markerekkel azonosított szinapszistok egy részével. **F**, A vizsgált idegsejtek és szinapszistok közül azok aránya, amelyek mikroglialis bemenetben részesülnek, a pontos értékeket a 4. Táblázat tartalmazza. Mércse: 10µm az A panelen, 1µm a B, 15µm a C, 20µm a D és 2µm az E panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

4. Táblázat. A mikroglia sejtek rendkívül gyakran alakítanak ki közvetlen kapcsolatot az idegsejtek és az interneuronok sejttestével. Az értékek a mikrogliális kapcsolattal rendelkező profilok arányát mutatják a teljes vizsgált mintán belül. N=155 sejt (57 Pyr, 36 VG3+, 62 PV+) és 800 szinapszis (400 Glu., 400 GABA) két egérből és N=89 sejt két páciens post mortem mintájából.

	Egér agykéreg					Humán agykéreg
	Pyr sejttest	VG3+ sejttest	PV+ sejttest	Glu. szinapszis	GABA szinapszis	Pyr sejttest
Mikrogliális kapcsolat prevalenciája (átlag±szórás)	91,32 ±0,99%	96,15 ±3,85%	86,66 ±4,52%	9,25 ±0,75%	14,0 ±1,0%	86,90 ±2,60%

IV.1.2. A szomatikus mikroglia-neuron közvetlen membránkapcsolat bizonyítása elektronmikroszkópia segítségével

A fénymikroszkópos technikák természetéből fakadóan a kezdeti megfigyeléseink arra nem voltak alkalmasak, hogy teljes bizonyossággal kijelenthessük, hogy a mikroglia nyúlványai valóban közvetlen kapcsolatot alakítanak ki az idegsejtek sejttestével, ezért kísérleteink következő fázisában elektronmikroszkóppal vizsgáltuk meg ezen szomatikus kapcsolatokat. Mind egér, mind humán szöveten immunarany reakciót végeztünk egy-egy mikrogliális fehérje, Iba1 vagy P2Y12 receptor ellen, majd az ultravékony metszeteket transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a mikroglia nyúlványai valóban képesek közvetlen membrán-membrán kapcsolatot kialakítani neuronok sejttestével (4. Ábra).

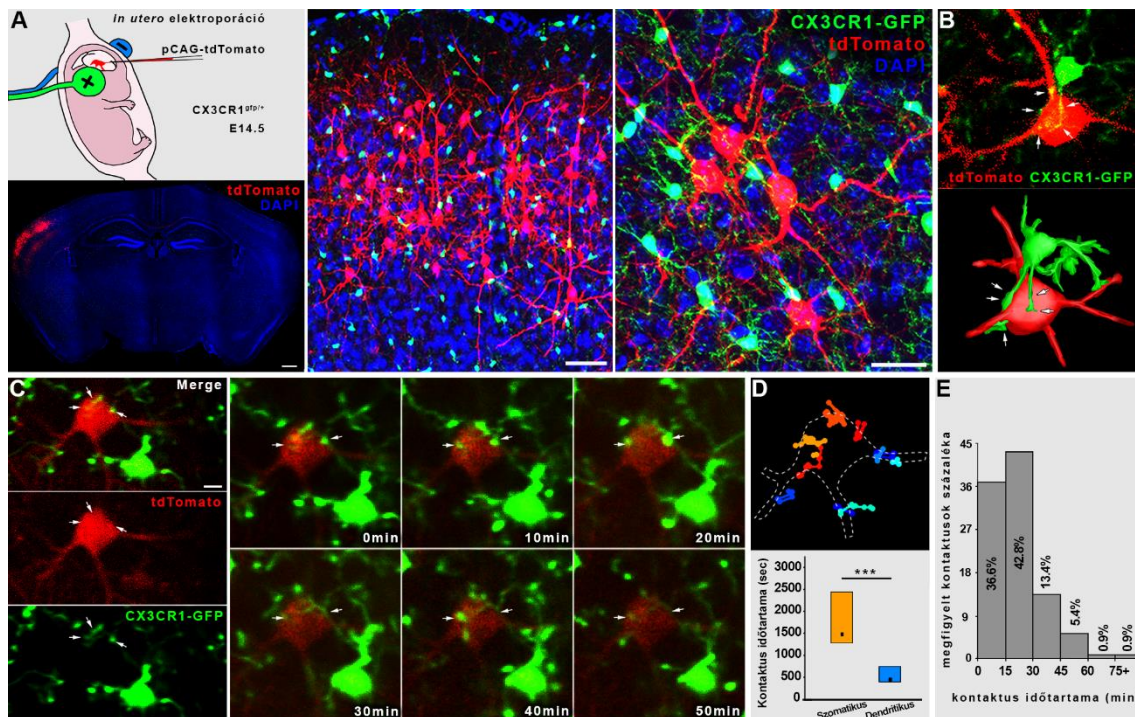


4. Ábra. A mikroglia-nyúlványok közvetlen membrán-membrán kapcsolatot létesítenek a neuronok sejttestével. A-B, Egér agykérgi mintáján végzett Iba1 (A) vagy P2Y12 receptor (B) ellenes immunaranyreakcióval azonosított mikroglia-nyúlványok (ciánkék álszínezés) közvetlenül érintik a neuronok sejttestét (magenta álszínezés). Sárga álszínezéssel olyan neuritszakaszok láthatóak, melyeket szintén érint a nyúlvány, zöld álszínezéssel a mitokondriumok vannak jelölve. **C,** A jelenség post-mortem humán agyszövetben is megfigyelhető (P2Y12 receptor ellenes immunaranyreakció). Mércé: 300nm. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

IV.1.3. Mikroglia-neuron kapcsolatok kialakulása és dinamikája *in vivo*

Ahhoz, hogy élő állat központi idegrendszerében megfigyelhessük a mikroglia és az idegsejtek kapcsolatait, *in vivo* 2-foton mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk olyan egerek agykérgében, amelyek mikrogliai zöld fluoreszcens fehérjét fejeznek ki. A felhasznált transzgenikus (B6.129P2(Cg)-Cx3cr1^{tm1Litt}/J (IMSR_JAX:005582) egértörzs a fraktalkin-receptor (CX3CR1) promótere mögé helyezett GFP-kódoló szekvenciával rendelkezik, így láthatóvá téve a központi idegrendszerben a speciális morfológiájukról és gyorsan mozgó nyúlványaikról is megismerhető mikrogliait. A neuronok sejttestének és vastagabb dendritjeinek láthatóvá tételéhez *in utero* elektroporáció segítségével fejztettünk ki piros fluoreszcens fehérjét pCAG-IRES-tDTomato plazmid transzfekciójával agykérgi neuronokba (5. Ábra A-B). Felnőtt (12-18 hetes) egerek agykérgét 2-foton mikroszkóppal vizsgálva megfigyelhettük, hogy a mikroglia gyorsan mozgó vékony nyúlványai – az irodalmi adatokkal összecsengően – kapcsolatba kerülnek az idegsejtek dendritjeivel – feltételezhetően az azokon található szinaptikus kapcsolatokkal, amelyeket itt nem jelöltünk. Ugyanakkor a fixált szöveten végzett

vizsgálataink eredményével összhangban azt is megfigyelhettük, hogy miközben a mikroglia nyúlványok a neuronok sejttestét is megközelítik, kapcsolatot alakítanak ki az idegsejtek központi régiójával is. Ezen felül a nyúlványok a sejttestet nem véletlenszerűen, hanem a szoma specifikus területein többször ugyanott is megérintették, arra utalva, hogy ezek a mikroglia-neuron kommunikáció szempontjából kitüntetett régiók lehetnek. Támogatva ezeket a megfigyeléseket, a kísérlet során azt találtuk, hogy ezek a sejttestre érkező (szomatikus) kapcsolatok átlagosan háromszor annyi ideig állnak fenn, mint a mikroglia-dendrit kontaktusok (5. Ábra C-D; szomatikus: medián 1485s (alsó-felső kvartilis: 1282,5-2430s), dendritikus: 450s (405-750s); N=26 kontaktus, 3 állatból; $p=0,0004$, Mann-Whitney U teszt). A szomatikus kapcsolatok némelyike rendkívül hosszan megfigyelhető volt, esetenként 60 percnél is tovább (5. Ábra E). A lényegesen gyakoribb előfordulás és hosszabb időtartam feltételezi, hogy a szomatikus régióval kialakított kapcsolaton keresztül más jellegű információcsere zajlik a két sejt között, mint a szinapszissokkal való kapcsolatokon keresztül, így a két kapcsolattípus egyértelmű elkülönítése érdekében az előbbit szomatikus mikroglia-neuron junkciónak neveztük el.



5. Ábra. A mikroglia nyúlványai kapcsolatot létesítenek az idegsejtek sejttestének speciális területeivel *in vivo*. A, In utero elektroporáció sematikus ábrázolása. Kísérleteinkhez CX3CR1^{GFP/+} mikroglia-riporter állatokat használtunk, melyekbe

elektroporáció segítségével pCAG-IRES-tdTomato konstrukciót juttattunk. Az agykérgi piramis sejtek egy csoportja az elektroporáció hatására kifejezi a tdTomato fehérjét (piros), amely így *in vivo* körülmények között is vizsgálható. A konfokális mikroszkópos felvételeken a mikroglia zöld színnel (CX3CR1-GFP), a sejtmagok kék színnel (DAPI) láthatóak. **B**, *In vivo* 2-foton mikroszkóppal készült pillanatképfelvétel (fent) és 3 dimenziós rekonstrukció (lent), amelyeken megfigyelhető, ahogy egy mikroglia (zöld) nyúlványaival egy idegsejt (piros) szomatikus régiójával létesít kapcsolatokat. **C**, *In vivo* 2-foton mikroszkóppal készült sorozatképfelvételeken látható, ahogy egy idegsejt több, időben változóan jelen lévő mikroglialis bemenetet is kap a sejtestére (nyílak). **D**, Mikroglia-nyúlványok időfüggő mozgásának rekonstrukciója. A szaggatott vonal egy idegsejt körvonala. Meleg színekkel a szomatikus kapcsolatot létesítő mikroglia-nyúlványok útvonala, hideg színekkel a dendritikus kapcsolatot létesítőké került ábrázolásra. A szomatikus kontaktusok időtartama szignifikánsan hosszabb, mint a dendritikusaké. N=26 kontaktus, 3 állatból; szomatikus: medián 1485s (alsó-felső kvartilis: 1282,5-2430s), dendritikus: 450s (405-750s); p=0,0004, Mann-Whitney U teszt. **E**, A szomatikus kapcsolatok időtartamának eloszlása (N=112 kontaktus, 2 állatból). Mércse: 500µm az A bal alsó panelén, 50µm az A középső panelén, 25µm az A jobb oldali panelén, 5µm a C panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

IV.2. A mikroglia-neuron szomatikus junkció neuronális alkotóelemei

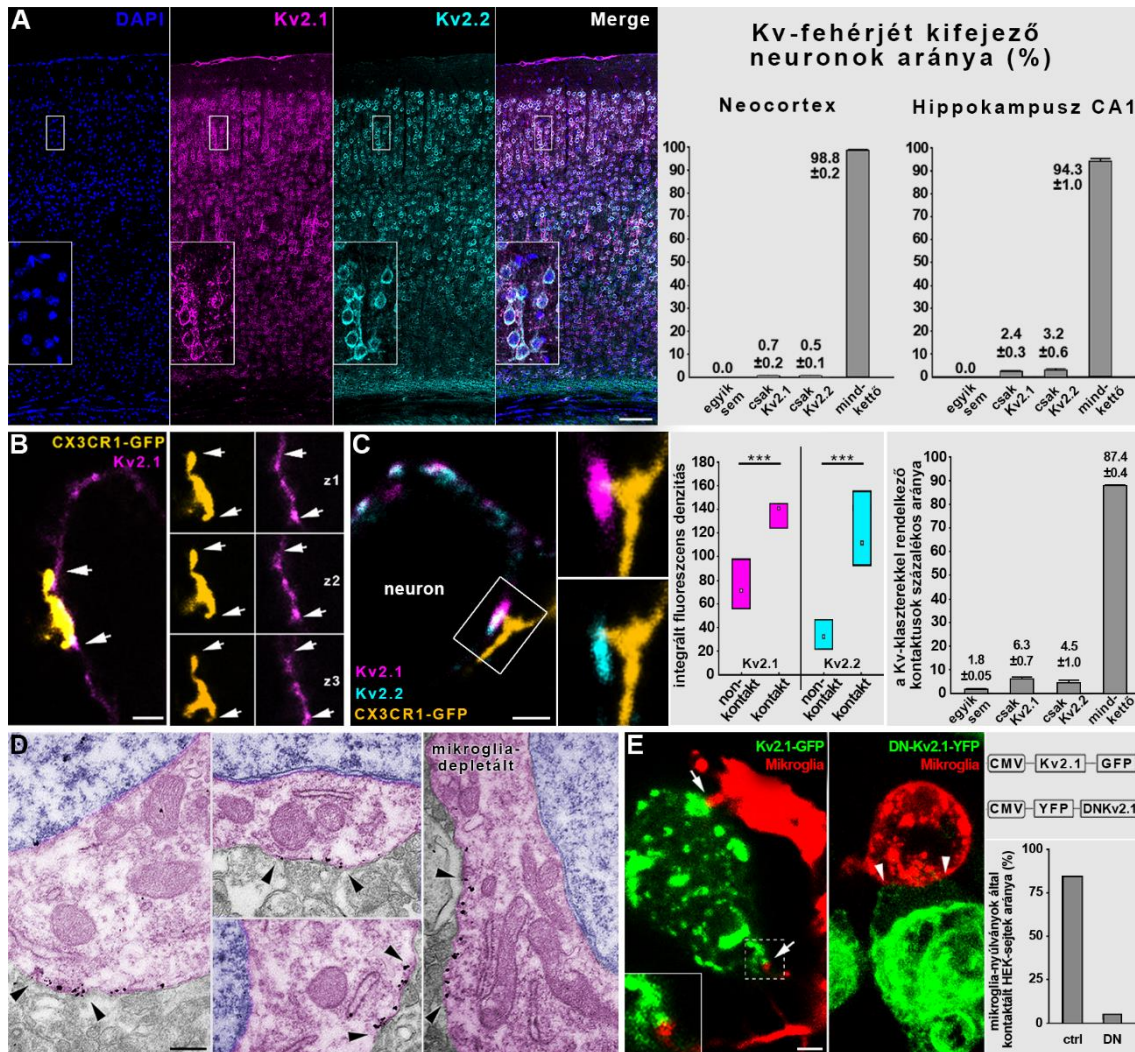
IV.2.1. A Kv2.1 és Kv2.2 fehérje-klaszterek szerepe a mikroglialis szomatikus kapcsolatok kialakulásában

Megfigyelhettük az *in vivo* képképzés során, hogy a mikroglia-nyúlványok szemmel láthatóan nem véletlenszerűen érnek hozzá a neuronok sejtestéhez, hanem bizonyos membránszakaszokra rendszeresen visszatérnek. Feltételezhető tehát, hogy léteznek az idegsejtek szomatikus membránjában olyan specifikus területek, amelyek kapcsolódási pontként szolgálhatnak a szomatikus junkcióhoz. Az agykérgi piramis sejtek membránjában található Kv2.1 feszültségfüggő K⁺-csatornák eloszlása nem egyenletes a membrán minden területén, és funkciója is attól függ, hogy egyesével, vagy fehérjeklaszterekben tömörülve helyezkednek el. Előbbi esetben kifelé irányított K⁺-konduktanciával rendelkeznek, klaszterezett formájában azonban a fehérje elveszíti K⁺-áteresztő képességét, és feladata az exocitotikus apparátus számos fehérjéjének, valamint az endoplazmás retikulum membránhoz történő kihorgonyozása ((Deutsch és mtsai, 2012; Fox és mtsai, 2015; Justice és mtsai, 2017), bővebben a bevezetésben). A mikroglia számára fontos információforrásul szolgálhat a neuronok állapotáról az itt, exocitotikus módon felszabaduló metabolitok minősége és mennyisége, így megvizsgáltuk a Kv2.1 és Kv2.2 fehérje elhelyezkedését a piramis sejtek membránjában.

Többszörös immunhisztokémiai jelölést követően konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal való képalkotásunk során azt figyeltük meg, hogy az egerek primer szomatoszenzoros agykérgének 2/3 rétegében, és a hippocampusz CA1 régiójában az összes piramisesejt kifejezi a Kv2.1 és Kv2.2 fehérjéket – az agykérgi piramisesejtek 98,8±0,2%-a, míg a hippocampális piramisesejtek 94,3±1%-a mindkét fehérjét tartalmazza (6. Ábra A). Nagyobb felbontású felvételeinken azt találtuk, hogy a mikroglia-nyúlványok preferenciálisan azokon a membránszakaszokon alakítanak ki kapcsolatot az idegsejtek sejttestével, ahol magas a Kv2.1-jelölés intenzitása, vagyis ahol fehérjeklaszterek találhatóak, és hasonló jelenséget figyelhettünk meg a Kv2.2 fehérje esetében is. Összességében a mikroglia-nyúlványok által kialakított szomatikus kapcsolatok több mint 98 százalékában figyeltük meg a Kv2.1 és/vagy a Kv2.2 fehérjék felhalmozódását (6. Ábra B-C).

Funkcionális szempontból fontos kérdés, hogy a Kv fehérjék felhalmozódása a membránban a mikroglialis kapcsolat hatására történik-e meg, vagy ez a klasztereződés a neuronok belső (intrinsic) tulajdonsága. Ennek eldöntésére transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a Kv2.1 fehérje eloszlását az agykérgi neuronok membránjában vad típusú, illetve CSF-1 receptor gátló drog, PLX5622 segítségével mikroglia-depletált állatokban (Spangenberg és mtsai, 2019). Ezekben az állatokban 3 héttel a PLX5622-tápra való átállás után a mikroglia sejtszáma körülbelül 96 százalékkal csökken (Fekete és mtsai, 2018). Azt tapasztaltuk, hogy a Kv2.1 fehérjeklaszterek a mikroglia-depletált állatokban is megtalálhatóak, így jelenlétük nem függ a mikroglia jelenlététől, illetve a szomatikus junkció kialakulásától (6. Ábra D).

Azt is sikeresen megmutattuk, hogy a Kv2.1 fehérjeklaszterek elégséges feltételei a szomatikus junkció kialakulásának. HEK-sejtekbe – amely sejtekben endogén módon nem található Kv2.1 fehérje (Jiang és mtsai, 2002) – juttattunk kétféle plazmidot: az egyik csoport sejtbe zöld fluoreszcens fehérjével kapcsolt teljes Kv2.1-szekvenciát tartalmazó plazmidot (Kv2.1-GFP), míg a másikba egy rövidebb, a membránba kihelyeződni képtelen Kv2.1 szekvenciát tartalmazó (DN-Kv2.1) plazmidot juttattunk. Az így kapott HEK-mikroglia kokultúrákban a módosított Kv2.1 fehérjét tartalmazó HEK-sejteknek mindössze 5,4%-a kapott szomatikus mikroglia-bemenetet a vizsgált időtartam alatt, míg a Kv2.1 klasztereket kifejező HEK-sejtek 84%-a, ráadásul ezek a kapcsolatok 97%-ban a Kv2.1 klaszterekkel rendelkező membránszakaszokon jöttek létre (6. Ábra E).



6. Ábra. A szomatikus mikroglia-neuron kapcsolat Kv2.1 és/vagy Kv2.2 fehérjeklaszterek területén alakul ki. A, Az egér primer szomatoszenzoros kérgének 2/3 rétegében, valamint a hippocampusz CA1 régiójának stratum pyramidale-jában minden principális sejt tartalmaz Kv2.1 (magenta) és/vagy Kv2.2 (ciánkék) fehérjét (N=410 agykérgi és 370 hippocampális piramisest, 2 állatból). **B,** Egy szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat konfokális rétegfelvételein jól látható, hogy a mikroglia-nyúlvány (okker) által kialakított kapcsolat területén (nyilak által határolt membránszakasz) Kv2.1 felhalmozódás van az idegsejt membránjában. **C,** A mikroglia-nyúlványok preferenciálisan Kv2.1 vagy Kv2.2 klasztereknél alakítanak ki szomatikus kapcsolatot az idegsejtekkel, amit jól mutat, hogy az említett fehérjék átlagos fluoreszcens intenzitása szignifikánsan nagyobb ezeken a területeken, mint az idegsejt membránjának más területein. Kv2.1: N=114 mérés, 3 állatból, non-kontakt: medián 72 intenzitás egység (alsó-felső kvartilis: 55,9-96,1); kontakt: 141 (127,3-144,7); $p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt; Kv2.2: N=107 mérés, 2 állatból, non-kontakt: medián 32,4 intenzitás egység (alsó-felső kvartilis: 21,1-47,0); kontakt: 111,4 (91,4-155,7); $p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt. Jobb panel: N=111 kapcsolat 2 állatból. **D,** A Kv2.1 fehérje felhalmozódása (klasztereződése, a nyílhegyek közti szakaszokon) megfigyelhető elektronmikroszkóppal is, és ez független a mikroglia jelenlététől, ugyanis mikroglia-depletált állatokban is kialakul (jobb oldali panel). A képeken az idegsejtek sejtmagja

kék, citoplazmájuk magenta álszínezést kapott. **E**, HEK-mikroglia kokultúráról készített felvételeken megfigyelhető, hogy a Kv2.1 fehérje (zöld) klasztereket képez a Kv2.1-GFP plazmida transzfektált HEK sejtek membránjában (bal panel), míg a klaszterképződésre alkalmatlan DN-Kv2.1 fehérjével transzfektált HEK sejteknél a jel nagyrészt homogén (jobb panel). A mikroglia-nyúlványok (lektin-tomato – piros) a Kv2.1 klaszterekkel rendelkező membránszakaszokon megérintik a HEK sejteket. Mércse: 100µm az A panelen, 2µm a B, C és E, 300nm a D panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

IV.2.2. A mikroglia-neuron szomatikus junkció elsősorban membránhoz közeli mitokondriumok területén alakul ki.

A mikroglia immunsejtként fontos homeosztatisz szereppel is bír a központi idegrendszerben. A szomatikus junkció gyakorisága és központi elhelyezkedése alapján feltételeztük, hogy ezen a kapcsolaton keresztül a mikroglia információt szerezhet az idegsejtek aktuális állapotáról, működéséről, energiaháztartásáról. A neuronok sejtestében elhelyezkedő mitokondriumok állapota és a belőlük kiválasztódó mediátorok jól tükrözik az idegsejt általános állapotát (Murali Mahadevan és mtsai, 2021; Sugiura és mtsai, 2014). Megvizsgáltuk ezért, hogy a mitokondriumok eloszlása a neuronok citoplazmájában milyen viszonyban áll a mikroglialis kapcsolatokkal és azt találtuk, hogy a szomatikus junkciók olyan területeken alakulnak ki az idegsejtek felszínén, amelynek közelében mitokondrium található. A mitokondriális külső membránban található TOM20 fehérje immunfluoreszcens módszerrel történő megjelölése felfedte, hogy a mikroglia kapcsolatokkal rendelkező neuronális membránszakaszok mentén a TOM20 intenzitása több mint 5-szöröse ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt) a szomatikus membrán egyéb szakaszain detektálhatónak (7. Ábra, A-B), így feltételeztük, hogy a sejtekből felszabaduló mitokondriális metabolitok közvetlenül eljuthatnak a mikroglia-nyúlványok közelségébe.

IV.2.3. Vezikulák és lizoszómák feldúsulása a szomatikus junkció területén

A mitokondriumok közelsége a mikroglia-neuron kapcsolatokhoz valószínűsítette, hogy mitokondriális eredetű molekulák is információként szolgálhatnak a mikroglia-nyúlványok számára. A mitokondrium-eredetű vezikulák (mitochondrion derived vesicles) membránjában megtalálható a mitokondriális TOM20 membránfehérje. Transzmissziós elektronmikroszkópia segítségével bizonyítékot találtunk rá, hogy ezek a

vezikulák képesek a sejtmembránnal történő fúzió útján az extracelluláris térbe üríteni a tartalmukat, adott esetben egy mikroglia-nyúlvány jelenlétében is (7. Ábra C-D).

A neuronok szomatikus kompartmentjéből exocitózissal ürülő molekulák fontos információforrást jelenthetnek a monitorozó mikroglia-nyúlványoknak. Ilyen mediátorok lehetnek például a purinszármazékok, amelyek közül az ATP-ről ismert, hogy szöveti sérülés esetén (az extracelluláris térben ADP-vé bomolva) kemoattraktánsként szolgál a mikroglia-nyúlványok számára (Davalos és mtsai, 2005; Haynes és mtsai, 2006). Azonban fiziológias körülmények között is, az idegsejtek képesek vezikulába csomagoltan ATP-t tárolni a citoplazmájukban, amely vezikulák felszínén megtalálható a vezikuláris nukleotid transzporter (vNUT) enzim (Ho és mtsai, 2015; Moriyama és mtsai, 2017). Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a vNUT-pozitivitást mutató vezikulák koncentrációja jelentősen magasabb a szomatikus junkció neuronális oldalán, mint a neuronális membrán más szakaszain: a vNUT-jelölés intenzitása a kapcsolat területén majdnem háromszorosa a más területeken megfigyelhetőnek ($p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt) (7. Ábra E).

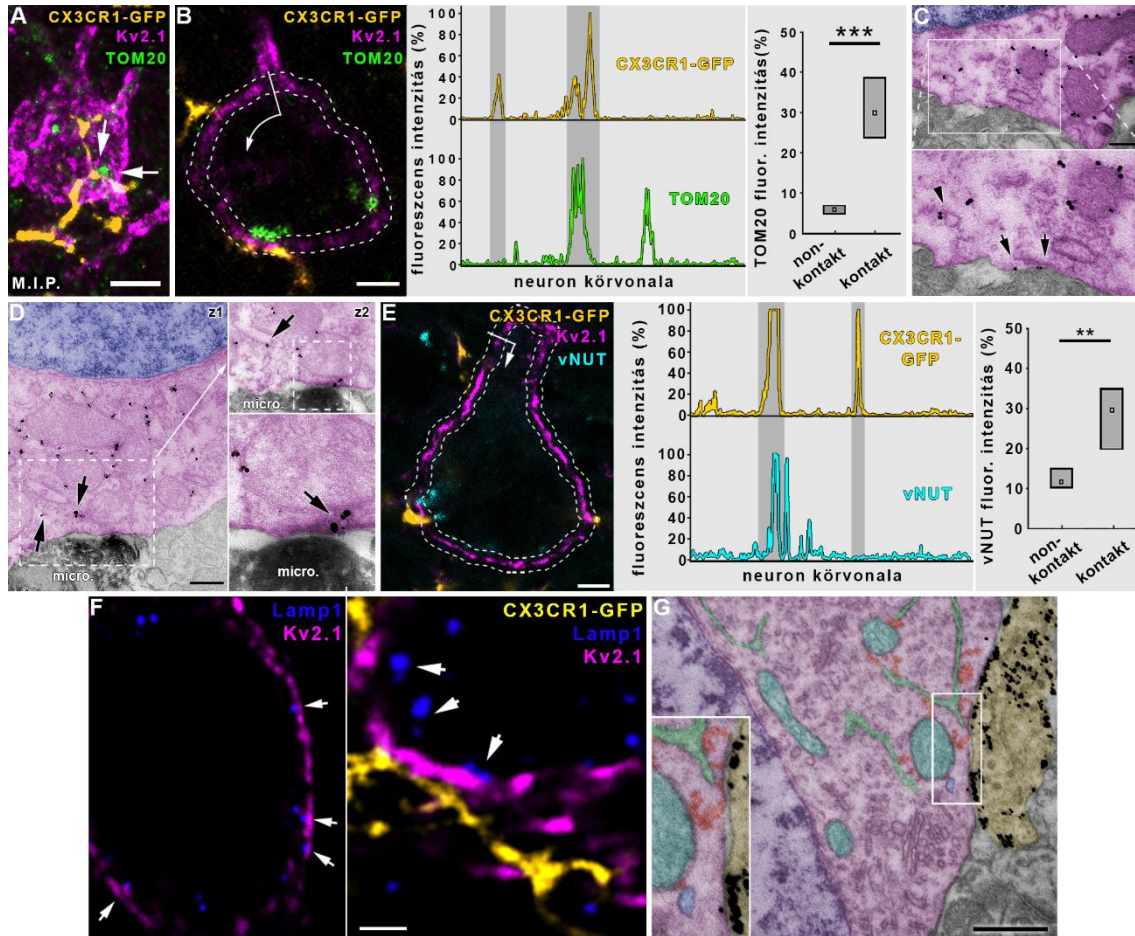
Az idegsejtekből felszabaduló mediátorok egy része a lizoszomális útvonalon keresztül jut el az extracelluláris térbe. Ezért konfokális mikroszkópiával és immunhisztokémiai jelölés segítségével megvizsgáltuk egy lizoszomális marker, a Lamp1 sejtben belüli eloszlását is. Azt találtuk, hogy a Lamp1 jel túlnyomó többsége asszociációt mutat a Kv2.1 fehérjeklaszterekkel, amelyek a vizsgált szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatok 83,3%-ában megtalálhatóak (7. Ábra F).

IV.2.4. Mitokondrium-asszociált membrán és endoplazmás retikulum a szomatikus junkció területén

Az idegsejtek Ca^{2+} -homeosztázisának szempontjából kiemelt jelentőségű sejtorganellum a mitokondrium-asszociált membrán (MAM), valamint az endoplazmás retikulum (ER) (Csordás és mtsai, 2018; Karagas és Venkatachalam, 2019). Utóbbinak sejtmembránhoz történő rögzítése a Kv2.1 fehérjeklaszterek feladata, így jelenlétük – amelyet elektronmikroszkópos képeinken megfigyelhettünk (7. Ábra G) – a sejtestre érkező mikroglialis bemenet közvetlen közelében nem meglepő. A junkcióhoz közeli mitokondriumot a neuronális sejtmembránnal „összekötő” retikuláris sejtorganellumok

(MAM és ER) lehetővé teszik, hogy a mikroglia-neuron junkción keresztüli információcsere közvetlenül hathasson a neuronális Ca^{2+} -áramokra.

Összességében megfigyeltük, hogy a szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatok a neuronális oldalon specifikus ultrastruktúrával rendelkeznek, amely anatómiai szempontból lehetővé teszi, hogy az idegsejt általános állapotát tükröző mediátorok célzottan, exocitózis útján a sejtközi térbe ürüljenek.



7. Ábra. A szomatikus junkció neuronális alkotóelemei. **A**, Konfokális rétegfelvétel szummációs képén (maximum intensity projection - M.I.P.) megfigyelhető a neuron (Kv2.1 magenta) sejttestét érintő mikroglia-nyúlvány (CX3CR1-GFP, okker) közelében egy neuronális mitokondrium (TOM20, zöld, nyilakkal jelölve). **B**, A mitokondriális TOM20-jel átlagos intenzitása szignifikánsan nagyobb a mikroglialis kontakt helyszínén, mint a neuronális membrán egyéb szakaszain. N=10 sejt, 2 állatból; non-kontakt: medián 5,81 intenzitás egység (alsó-felső kvartilis: 4,97-6,68), kontakt: 30,01 (23,8-38,75); $p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt. **C**, Elektronmikroszkópos felvételeken a mitokondriális membránfehérje, a TOM20 (fekete arany szemcsék) eloszlása figyelhető meg egy neuron sejttestében. A TOM20-immunarány jelölés nem csak a mitokondriumok felszínén volt megfigyelhető, hanem citoplazmatikus vezikulákon is (nyílhegy), valamint a sejtmembrán bizonyos pontjain is (nyilak). Ezen felvételek bizonyítják, hogy

mitokondrium eredetű vezikulák képesek tartalmukat az extracelluláris térbe üríteni. **D**, Kombinált immunperoxidáz-immunarány reakció segítségével megfigyelhető egy szomatikus mikroglia (micro., sötét csapadék) - neuron (magenta álszínezés) kapcsolat, amelynek közvetlen közelében TOM20-jelölés (fekete arany szemcsék) látható intracelluláris vezikulák, valamint az idegsejtmembrán felszínén (nyilak). **E**, A vezikuláris nukleotid transzporter (vNUT, ciánkék) citoplazmatikus elhelyezkedése is preferenciát mutat a mikroglia-nyúlványok által érintett membránszakaszok felé. N=10 sejt, 2 állatból; non-kontakt: medián 11,67 intenzitás egység (alsó-felső kvartilis: 10,63-14,21), kontakt: 29,38 (19,94-33,72); $p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt. **F**, A neuronok sejttestében a lizoszómák (Lamp1, kék) főként Kv2.1 klaszterek közelében figyelhetőek meg, így exocitózissal való ürülésük során a tartalmuk éppen a mikroglia-nyúlványokkal találkozhat. **G**, Egy szomatikus mikroglia-neuron junkció elektronmikroszkópos képen megfigyelhető a mikroglialis P2Y₁₂ receptor (fekete arany szemcsék) nagy mennyisége a kapcsolatban, valamint a speciális, kapcsolat-asszociált neuronális ultrastruktúra. Színek: mikroglia - sárga, neuronális citoplazma - magenta, sejtmag - lila, mitokondrium - türkiz, MAM és ER - zöld, intracelluláris vezikulum - kék, kapcsolófehérjék - piros. Mércse: 5µm az A panelen, 3µm a B és E, 300nm a C és D, 1µm az F és 500nm a G panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

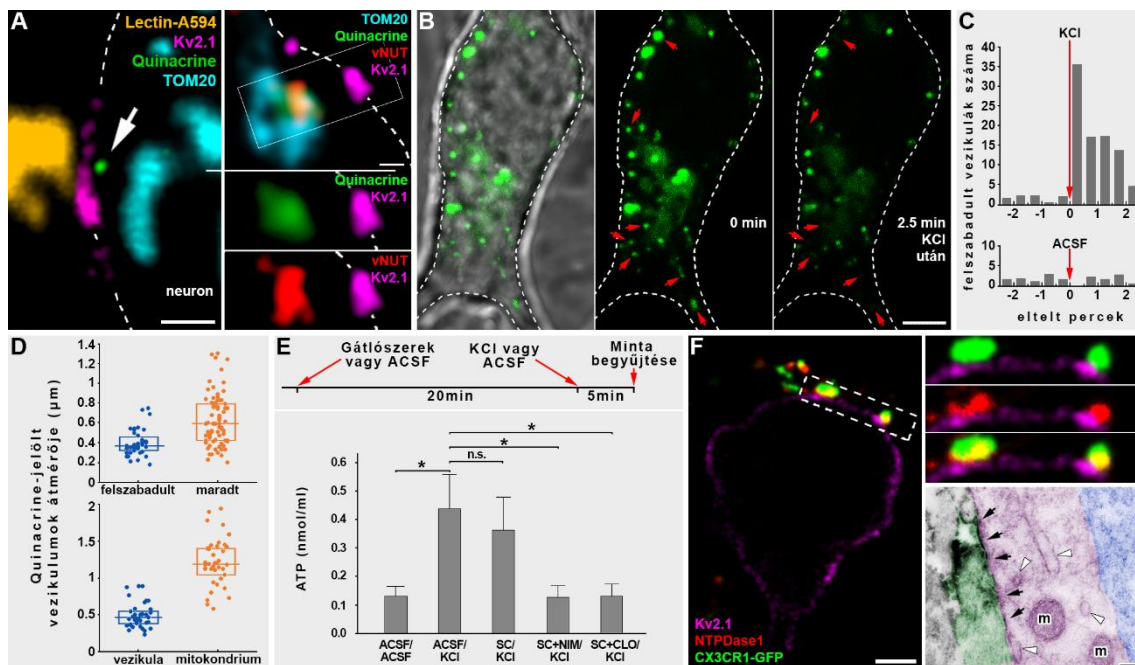
IV.3. A mikroglia a szomatikus junkción keresztül érzékeli és befolyásolja az idegsejtek állapotát

A szomatikus junkció struktúrájának részletes megismerése után kíváncsiak voltunk arra, milyen úton cserélhet információt egymással ez a két sejt, valamint milyen szerepet játszhat ez az újonnan felfedezett kommunikációs forma a mikroglia-neuron szabályozásban, ezért számos funkcionális kísérletet végeztünk.

IV.3.1. A neuronok sejttestéből ATP szabadul fel a mikroglia-nyúlványok irányába

Elsőként arra voltunk kíváncsiak, vajon valóban képesek-e az idegsejtek a szomatikus régiójukban tárolt ATP-tartalmú vezikulák gyors és célirányos ürítésére. Ehhez *in vitro* mikroglia-neuron kokultúrákat vizsgáltunk: az ATP tartalmú vezikulákat fluoreszcens tulajdonságú quinacrine-hidrokloriddal, a mikroglia-sejteket izolektinnel jelöltük. Mivel a quinacrine az intracelluláris purinerg nukleotidokhoz képes kötődni, így az ATP tartalmú vezikulák mellett a neuronális mitokondriumok is jelölést kaptak, azonban a méretbeli különbségek alapján könnyedén szétválasztható egymástól a két populáció. Azt találtuk, hogy – a spontán felszabaduló 1-2 vezikulán túl – az idegsejteket azonnal depolarizáló KCl-oldat hatására jelentősen csökken a kisméretű, quinacrine-jelölt struktúrák száma, ami az ATP-tartalmú szomatikus vezikulák nagy mennyiségű felszabadulását jelzi (8. Ábra A-D). Ezt követően a sejtközi térben található ATP

mennyiségét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC-vel) vizsgáltuk: a KCl indukálta extracelluláris ATP-szint emelkedés megelőzhető volt a vNUT működését gátló klodronáttal, vagy a neuronális sejttesteken jelenlévő L-típusú Ca^{2+} -csatornákat gátló nimodipinnel előkezelve. Ezzel ellentétben, a szinaptikus vezikulafelszabadulást lehetővé tevő Ca^{2+} -csatornákat gátló ω -agatoxin és ω -conotoxin nem befolyásolta szignifikánsan a felszabadult ATP mennyiségét, bizonyítva ezzel az extracelluláris ATP túlnyomórészt szomatikus eredetét (8. Ábra E). Az intracelluláris vezikulákból felszabaduló ATP a mikroglia-nyúlványokon nagy mennyiségben található meg a purinerg nukleotidokat defoszforizáló ektonukleotidáz, az NTPDase1 (8. Ábra F).



8. Ábra. Az idegsejtek depolarizációjának hatására ATP szabadul fel a neuronok sejttestéből. **A**, Konfokális rétegfelvételen megfigyelhető egy neuronális Kv2.1 fehérjeklaszterrel (magenta) érintkező mikroglia-nyúlvány (okker), a neuron citoplazmájában pedig egy membránközelben ATP-tartalmú vezikula (quinacrine, zöld) és szomatikus mitokondriumok (TOM20, ciánkék). A kis képeken megfigyelhető, hogy a quinacrine-jelölés átfed a TOM20 és a vNUT (piros) fluoreszcens jelekkel. **B**, In vitro készített sorozatfelvételeken kivehető egy neuron körvonala (szaggatott) és megfigyelhető, hogy KCl-oldat hozzáadása után számos quinacrine-jelölt (zöld), ATP tartalmú vezikulum kiürül a sejtéből (piros nyilak). **C**, A KCl, illetve ACSF hatására felszabadult quinacrine-jelölt vezikulák száma az idő függvényében. **D**, A quinacrine-jelölt vezikulák méreti eloszlása, illetve az immunhisztokémiával azonosított vNUT-tartalmú vezikulák és TOM20-pozitív mitokondriumok méreti eloszlása. Fent: N=118 quinacrine-pozitív objektum, a KCl hatására felszabadult vezikulák medián átmérője

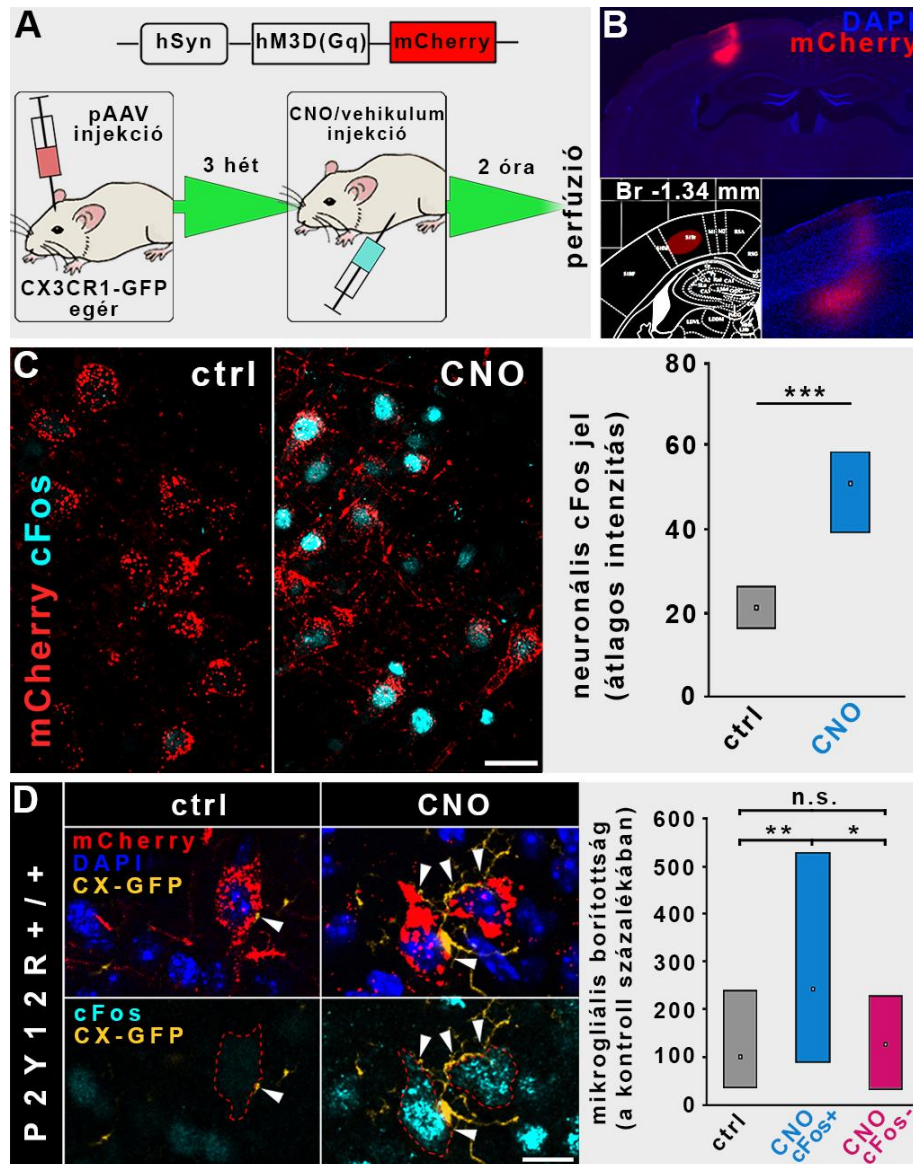
0,37 μ m, a megmaradtaké 0,59 μ m. Lent: N=83 karakterizált quinacrine-jelölt objektum: a vNUT-pozitív vezikulák medián átmérője 0,45 μ m, a mitokondriumoké 1,2 μ m. **E**, KCl hatására nagymértékű extracelluláris ATP-szint emelkedés figyelhető meg HPLC-vel, amely kontrolloldat (ACSF) hatására nem következik be. A KCl hatására felszabaduló ATP nem szinaptikus eredetű, ugyanis a szinaptikus Ca²⁺-csatornákat gátló „szinaptikus koktél” (SC, ω -agatoxin és ω -conotoxin keveréke) nincs hatással rá. Ezzel szemben a szomatikus exocitózisban szerepet játszó L-típusú Ca²⁺-csatornákat gátló nimodipin (NIM), vagy a vNUT működését gátló klodronát (CLO) jelenlétében nem figyelhető meg megnövekedett ATP-felszabadulás a neuronokból. ACSF/KCl vs. ACSF/ACSF p=0,0218, Mann-Whitney U teszt, N=11 mérés; SC/KCl vs. ACSF/KCl p=0,6532, N=11; SC+NIM/KCl vs. ACSF/KCl p=0,0271, N=10; SC+CLO/KCl vs. ACSF/KCl p=0,0284, N=10. **F**, Konfokális fény-, illetve elektronmikroszkópos felvételeken megfigyelhető a szöveti ektonuleotidáz, az NTPDase1 (piros a fénymikroszkópos, sötét csapadék az elektronmikroszkópos képen) nagy mennyiségű jelenléte a mikroglia-nyúlványok (zöld) neuronokkal (Kv2.1, magenta) közvetlenül érintkező felszínén. Az elektronmikroszkópos felvételen megfigyelhető a kapcsolat (fekete nyílak) közvetlen környezetében két mitokondrium (m), vezikulumok és retikuláris struktúrák (fehér nyílhegyek). Mércse: 500nm az A panelen, 3 μ m a B, 2 μ m az F fénymikroszkópos és 200nm az F elektronmikroszkópos panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

IV.3.2. A megnövekedett neuronális aktivitás mikroglialis választ vált ki

Irodalmi adatokból ismert, hogy az aktív idegsejtek sejttestéből ATP szabadul fel, és hogy a nagyobb sejtaktivitást mutató neuronok környezetében több mikroglia-nyúlvány figyelhető meg (Eyo és mtsai, 2014; Fields, 2011; Li és mtsai, 2012). Hogy megvizsgálhassuk, vajon az intenzív idegsejt-aktivitás befolyásolja-e a szomatikus mikroglia-neuron junkciót, virális vektorral egy olyan konstrukciót (AVV8-pAAV-hSyn-HA-hM3D(Gq)-MCherry) juttattunk az egerek szomatoszenzoros kérgébe, amely kemogenetikusan aktiválható G_q-fehérje kapcsolt receptorfehérje kifejeződését indukálta az idegsejtek egy alpopulációjában. A konstrukció tartalmazott egy piros fluoreszcens fehérjét (mCherry) is, így a vektort felvevő, és ezáltal a G_q-fehérje kapcsolt receptort kifejező sejteket könnyen azonosítani tudtuk. 3 hét inkubációs idő után az egerek egyik csoportja a receptor szelektív agonistáját, clozapine-N-oxidot (CNO) tartalmazó intraperitoneális injekciót kapott, míg a másik csoport fiziológiás sóoldatot (9. Ábra A-B).

Az intraperitoneális CNO beadás eléri a központi idegrendszert, és tartósan megemeli az érintett idegsejtek intracelluláris Ca²⁺-szintjét (tónikus aktiváció). A sejtek megemelkedett aktivitását egy „immediate early” gén termékének, a cFos megemelkedett szintjének kimutatásával detektáltuk (9. Ábra C; Kontroll: medián 21,88 fluor. intenzitás

érték (alsó-felső kvartilis: 16,70-26,49), CNO: 51,26 (39,23-58,36); $p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt). Eredményeink alapján elmondható, hogy a neuronok aktivitásának növekedésére válaszul a sejtestük mikroglialis borítottsága jelentősen megnő. Ez a hatás nem magyarázható pusztán a virális vektor jelenlétével, mivel a jelenség a piros fluoreszcens fehérjét kifejező, de megnövekedett cFos-szinttel nem rendelkező sejteken nem volt megfigyelhető (9. Ábra D, 5. Táblázat).



9. Ábra. A mikroglia reagál a neuronok megnövekedett aktivitására a szomatikus kapcsolatok területén. **A**, A kísérlet sematikus ábrázolása. **B**, Egy példa a vírusinjektálás (mCherry, piros) helyére. **C**, A vírust felvett sejtek jól azonosíthatók a bennük kifejeződő fluoreszcens fehérje (mCherry, piros) segítségével. A kemogenetikusan aktiválható Gq-fehérje a receptor agonista (CNO) hatására megnöveli ezen sejtek

aktivitását, amelyet a cFos fehérje (ciánkék) szintjének növekedésével detektálhatunk. N=100 sejt (50 kontroll, 50 CNO). Kontroll: medián 21,88 fluor. intenzitás (alsó-felső kvartilis: 16,70-26,49), CNO: 51,26 (39,23-58,36); $p < 0,0001$, Mann-Whitney U teszt. **D**, A megnövekedett aktivitású sejteken szignifikánsan növekszik a mikroglialis borítottság (okker) mértéke. Ezt biztosan nem az ektópiás fehérjék kifejezése, vagy a CNO beadás okozza, ugyanis a vírust felvett, fluoreszcens fehérjét kifejező, megnövekedett aktivitást mégsem mutató sejtek mikroglialis borítottsága mind vivóanyag, mind CNO beadást követően szignifikánsan alacsonyabb. A D panelhez tartozó pontos értékeket az 5. Táblázat tartalmazza. Mércse: 20 μ m a C és 8 μ m a D panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

5. Táblázat. A mikroglia reagál a neuronok megnövekedett aktivitására a szomatikus kapcsolatok területén. Az értékek a kontroll borítottság százalékában vannak megadva. N=101 sejt, 8 állatból (4 kontroll, 4 CNO); Kruskal-Wallis és Dunn próba. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

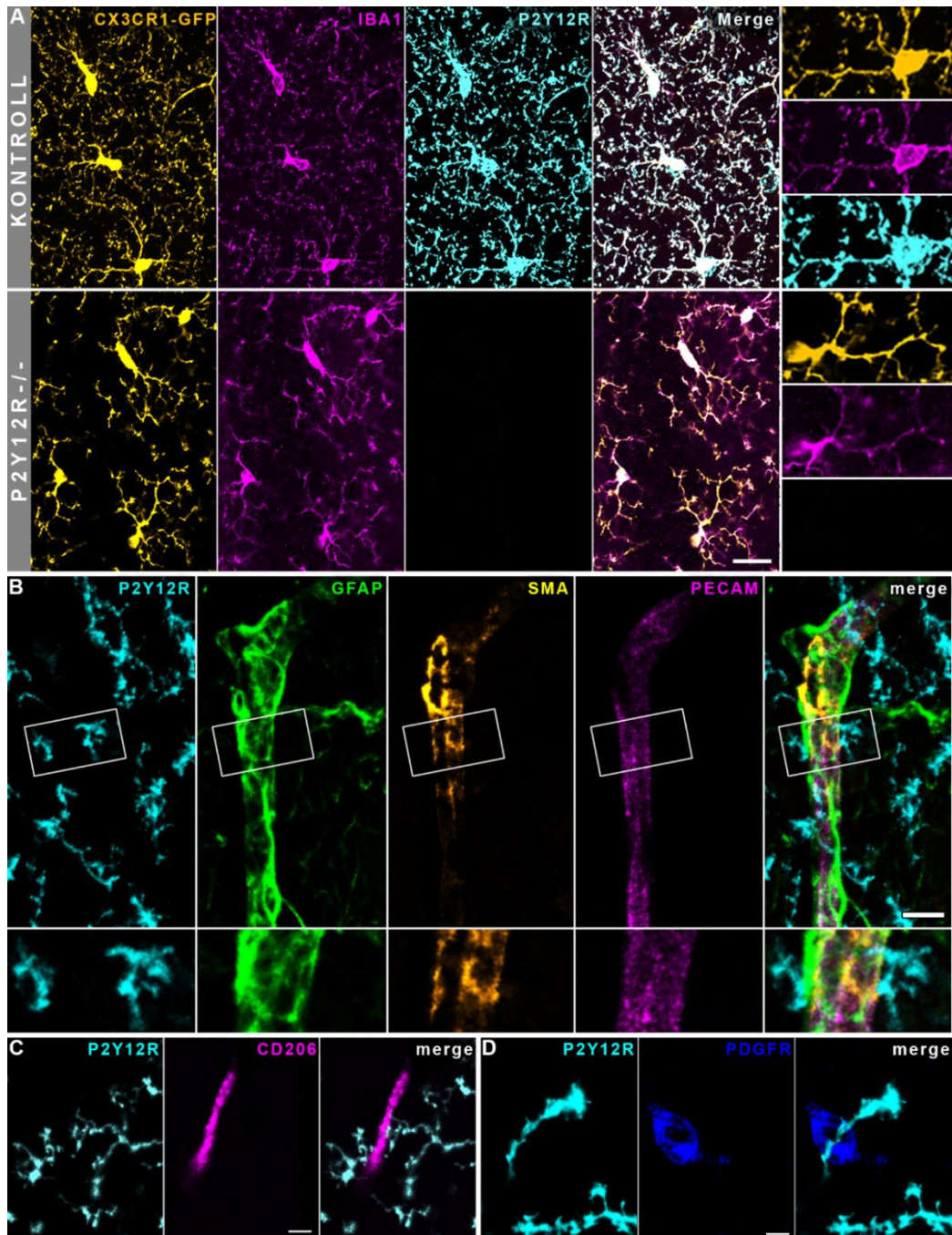
Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	ctrl vs. Cc+	ctrl vs. Cc-	Cc+ vs. Cc-
Mikroglialis borítottság	Kontroll	37,67	100	238,90	p=0,0055	p=0,8083	p=0,0426
	CNO cFos+	86,96	242,85	529,62			
	CNO cFos-	32,53	125,89	227,79			

IV.4. A mikroglia-neuron információcsere P2Y12R-függő a szomatikus junkció területén

IV.4.1. A mikroglia-specifikus purinerg P2Y12 receptorok szelektíven felhalmozódnak a szomatikus junkciók területén

Mivel a neuronális oldalon kimutattuk ATP-t tartalmazó vezikulák feldúsulását, valamint aktivitás-függő felszabadulását a szomatikus junkció területén (7. Ábra E, 8. Ábra B-D), és láthattuk, hogy a mikroglia reagál a nagyobb szomatikus ATP-felszabadulást kiváltó megnövekedett neuronális aktivitásra (9. Ábra D), ezért megvizsgáltuk, hogy milyen purinerg receptor lehet jelen ezekben a kapcsolatokban a mikroglia-nyúlványok membránjában, amely képes lehet a neuronális ATP-t érzékelni. Ismert, hogy a mikroglia nyúlványok célzott toborzásáért patológiás körülmények között (pl. szöveti sérülés helyére) egy G_i -fehérje kapcsolt purinerg receptor, a P2Y12 receptor (P2Y12R) felelős

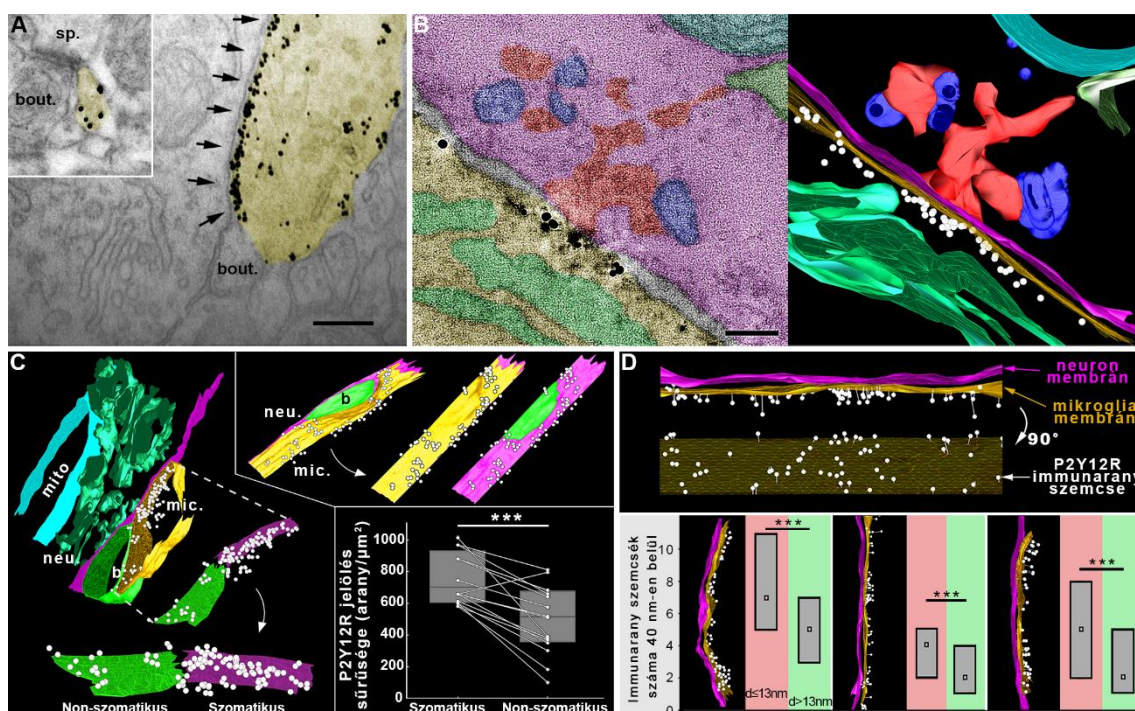
(Haynes és mtsai, 2006). A P2Y12R fő ligandja az extracellulárisan sérülést jelző ATP-ből keletkező ADP (Hollopeter és mtsai, 2001; Liverani és mtsai, 2016), és transzkriptomikai tanulmányok szerint a központi idegrendszerben kizárólag a mikrogliaiban található meg (Butovsky és mtsai, 2014; Zhang és mtsai, 2014), amelyet anatómiai vizsgálataink is megerősítenek (10. Ábra).



10. Ábra. A purinerg P2Y12 receptor a központi idegrendszerben kizárólag a mikrogliaiban található meg. A, A P2Y12 receptor (P2Y12R, ciánkék) kolokalizál

mikroglialis markerekkel (CX3CR1, okker és Iba1, magenta), és a receptorjelölés teljes mértékben hiányzik a P2Y12R génkiütött egerekben (P2Y12R^{-/-}). **B-D**, A P2Y12R (ciánkék) nem található meg sem asztrocitákban (GFAP, zöld), sem simaizomsejtekben (SMA, okker), sem endothel sejtekben (PECAM, magenta [B]), sem perivaszkuláris makrofágokban (CD206, magenta, [C]), sem pedig pericitákban (PDGFR, kék). Mércé: 20 μ m az A panelen, 10 μ m a B, 5 μ m a C és 3 μ m a D panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

Megvizsgáltuk, hogy a mikroglia membránjában hogyan helyezkedik el a P2Y12 receptor. A pontos szubcelluláris eloszlás érdekében 3 dimenziós rekonstrukciókat készítettünk elektron-tomográfiai módszerrel szomatikus junkciókról, P2Y12 receptor-ellenes immunarany jelölést követően. Megállapítottuk, hogy a P2Y12 receptor szelektíven feldúsul a mikroglia membránjának azon szakaszán, amelyik az idegsejt sejttestével áll közvetlen kapcsolatban (11. Ábra A-C, 6. Táblázat). Az idegsejt sejtteste felé néző mikroglia membránban pedig megfigyelhető, hogy a neuron szómájához közvetlenül hozzáérő membránszakaszokon nagyobb a receptorsűrűség, mint az attól pár nanométerrel távolabb található régiókban (11. Ábra D, 6. Táblázat).



11. Ábra. A P2Y12 receptor szelektíven felhalmozódik a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatban. A, Elektronmikroszkópos képeken megfigyelhető a P2Y12 receptor (fekete immunarany szemcsék) felhalmozódása a mikroglialis membrán azon szakaszán, amelyik a neuronok sejttestével közvetlenül érintkezik (nyílak). Ugyanazon nyúlvány (sárga álszínezés) más membránszakaszain, illetve a szinapszisokkal

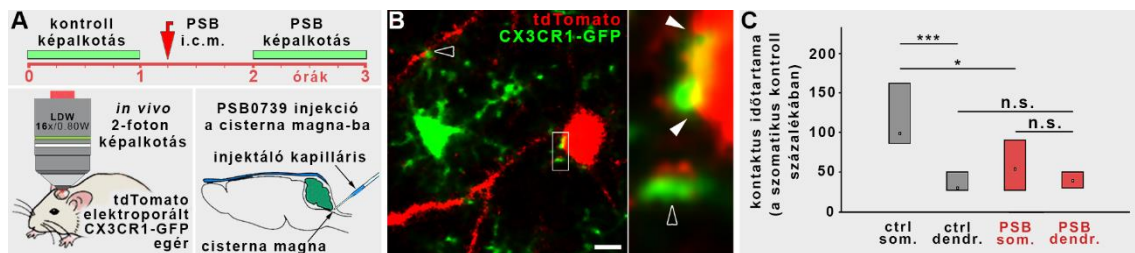
kapcsolatba kerülő mikroglia-nyúlványon (kis kép) nem figyelhető meg ez a fehérje-felszaporodás. **B**, Elektromográfiaival készült térfogatfelvétel egyetlen, 0.5 nm vastag virtuális metszete (bal) és a képkalkotás után elkészített 3 dimenziós modell (jobb), amely egy mikroglia-nyúlvány (sárga) és egy idegsejt sejtteste (magenta) között létrejött kapcsolat ultrastruktúráját mutatja be. A kapcsolat alkotóelemei jól megfigyelhetőek: mikroglialis oldalról a P2Y12 receptor (fekete immunarany szemcsék, illetve a modellen fehér gömbök), retikuláris intracelluláris membránstruktúrák (zöld), a neuron oldalán mitokondrium (türkiz), vezikuláris elemek (kék) és membrándenitások (piros). **C**, A P2Y12 receptor mennyisége jelentősen nagyobb a mikroglia-nyúlvány azon membránszakaszán, amelyik az idegsejt sejttestével érintkezik (magenta), mint amelyik más idegsejtszakaszokkal (axonokkal, terminálisokkal) (zöld). **D**, A szomatikus kapcsolatot létrehozó mikroglialis membránszakaszon belül megfigyelhető, hogy a P2Y12 receptor mennyisége nagyobb azokon a területeken, amelyek közelebb vannak az idegsejt membránjához. A C és D panelhez tartozó pontos értékeket a 6. Táblázat tartalmazza. Mércse: 250nm az A és 100nm a B panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

6. Táblázat. A P2Y12 receptor szelektíven felhalmozódik a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatokban. Elektromográfias felvételeinken megfigyelhető, hogy a P2Y12R mennyisége jelentősen nagyobb a mikroglia-nyúlvány azon membránszakaszán, amelyik az idegsejt sejttestével érintkezik; N=24 membránrészlet, párosított mintás Wilcoxon-próba. A szomatikus kapcsolatokon belül pedig jellemző tendencia, hogy a mikroglialis membránszakaszon belül a P2Y12R mennyisége nagyobb azokon a területeken, amelyek közelebb vannak az idegsejt membránjához. N=3 szomatikus kapcsolat. 1.: N=4414 membránrészlet, 2.: N=915 membránrészlet, 3.: N=7726 membránrészlet; Mann-Whitney U teszt. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	p érték
P2Y12R jelölés sűrűsége (db/ μm^2)	Szomatikus	607,98	703,13	926,89	p=0,0012
	Non-szomatikus	361,61	516,35	672,87	
Immunarany szemcsék száma 40nm-en belül	1. d < 13nm	5	7	11	p<0,0001
	1. d > 13nm	3	5	7	
	2. d < 13nm	2	4	5	p<0,0001
	2. d > 13nm	1	2	4	
	3. d < 13nm	2	5	8	p<0,0001
	3. d > 13nm	1	2	5	

IV.4.2. A P2Y₁₂R gátlása esetén rövidül a szomatikus junkciók fennállásának időtartama

Korábban 2-foton mikroszkópiával megfigyeltük, hogy a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatok időtartama *in vivo* átlagosan körülbelül háromszor annyi, mint a mikroglia-nyúlványok kapcsolata az idegsejtek dendritikus régiójával. Feltételezhető, hogy ez egy összetettebb, hosszabb időt igénylő kommunikáció miatt van így a sejttest esetén, amely kapcsolatban láthattuk, hogy a központi idegrendszerben mikroglia-specifikus P2Y₁₂ receptor szelektíven felhalmozódik. Kísérletesen igazoltuk, hogy a szomatikus mikroglia-neuron kommunikációban fontos szerepet töltenek be az ezen területeken felhalmozódó P2Y₁₂ receptorfehérjék. PSB0739-nek (PSB), a P2Y₁₂ receptor szelektív gátlószerének ciszterna magna-ba történő beadásával a mikroglialis P2Y₁₂ receptorok szelektíven gátolhatók. Azt találtuk, hogy a PSB-kezelés hatására a szomatikus kontaktusok időtartama jelentősen, 45%-kal lecsökken, míg a dendritekkel (szinapszisokkal) való kapcsolatok időtartama nem változik szignifikánsan (12. Ábra, 7. Táblázat).



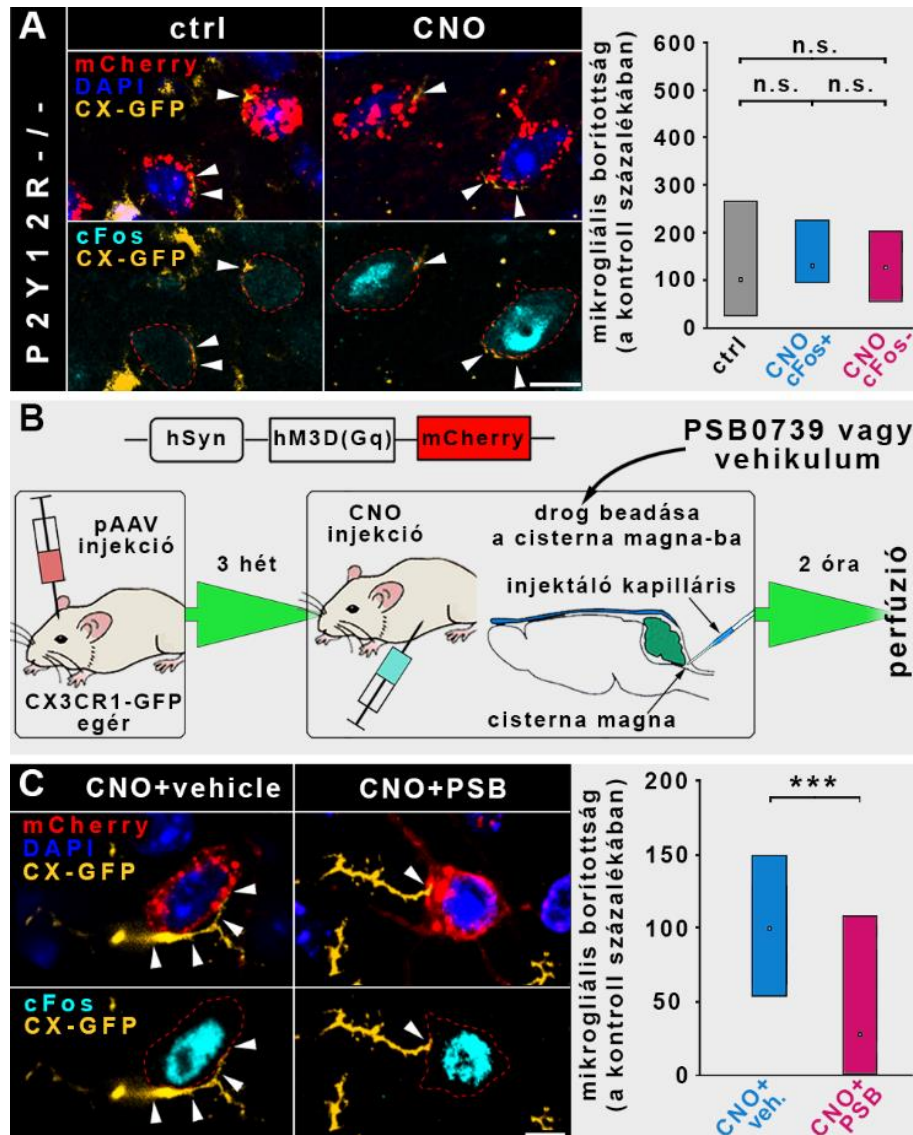
12. Ábra. Akut P2Y₁₂ receptor gátlás hatására megváltozik a szomatikus mikroglia-neuron kommunikáció **A**, A kísérlet sematikus ábrázolása. 1 órával kontroll 2-foton mikroszkópiás mérés (alpvonal) után a CX3CR1GFP/+ mikroglia-riporter, tdTomatoval elektroporált egerek cisterna magna-jába PSB0739-et injektáltunk, majd ismét 2-foton mikroszkópiás képalkotás következett. **B**, A konfokális felvételen megfigyelhető ezen egerekben is a mikroglia-nyúlványok (CX3CR1-GFP, zöld) kapcsolata az idegsejtek (tdTomato, piros) sejttestével (fehér nyílhegyek), valamint dendritjeivel (fekete nyílhegyek). **C**, Az akut, centrális P2Y₁₂ receptor gátlás eredményeképpen szignifikánsan megrövidül a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatok időtartama, miközben a dendritekkel kialakult kapcsolatok időtartama nem változik számottevően. A pontos értékeket a 7. Táblázat tartalmazza. Mércse: 5µm a B panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

7. Táblázat. A P2Y12 receptor szelektív akut gátlása hatására a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatok időtartama lecsökken, míg a dendritikus kapcsolatoké változatlan. Az értékek a kontroll szomatikus kapcsolatok időtartamának százalékában vannak megadva. N=54 kapcsolat, 6 állatból (3 kontroll, 3 PSB), Mann-Whitney U teszt. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis

Típus	LQ	medián	UQ	ctrl som vs. ctrl dendr	ctrl som vs. PSB som	ctrl dendr vs PSB dendr	PSB som vs PSB dendr
Kontroll szomatikus	86,36	100	163,64	p=0,0004	p=0,0332	p=0,4067	p=0,3210
Kontroll dendritikus	27,27	30,30	50,51				
PSB szomatikus	27,27	54,55	90,91				
PSB dendritikus	30,30	40,40	50,51				

IV.4.3. Funkcionális P2Y12R hiányában a mikroglia-nyúlványok nem képesek reagálni a fiziológias idegsejtaktivitás növekedésére

További kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a kemogenetikus módszerrel kiváltott neuronális aktivitás-indukálta mikroglialis borítottság növekedés is P2Y12 receptor függő-módon zajlik. Azt találtuk, hogy mind a receptor teljes hiánya (P2Y12R génkiütött állatban), mind a receptor működésének akut centrális (PSB0739-cel történő) gátlása megakadályozta a mikroglialis reakciót, vagyis a megnövekedett borítottságot a szomatikus kapcsolatok területén (13. Ábra, 8. Táblázat). Ezen eredmények azt mutatják, hogy a P2Y12 receptor alapvető szerepet játszik a fiziológias mikroglia-neuron kommunikációban.



13. Ábra. Funkcionális P2Y12 receptor hiányában a mikroglia nem képes reagálni a megnövekedett neuronális aktivitásra. **A**, CNO beadás hatására a kemogenetikus konstrukciót kifejező neuronok (mCherry, piros) nagy részében megnövekszik a sejtaktivitás (cFos, ciánkék), amely azonban a P2Y12 receptor génkiütött egerekben nem vált ki megnövekedett mikroglialis borítottságot (CX3CR1-GFP, okker, a szomatikus kapcsolatokat nyílhegyek jelzik) a vivőanyagot kapott kontroll állatokhoz képest. **B**, Az akut P2Y12 receptor gátlásra irányuló kísérlet sematikus ábrázolása. Az intraperitoneális CNO beadás után közvetlenül az egerek cisterna magnájába PSB0739, vagy vivőanyag (kontroll) került beadásra. **C**, A PSB-vel injektált állatokban a magasabb aktivitást mutató (cFos, ciánkék), kemogenetikus ingerelhető receptort kifejező neuronok (mCherry, piros) sejttestén szignifikánsan kisebb a mikroglialis borítottság, mint a vivőanyaggal (veh.) injektált egerek esetében. Az A és C panelhez tartozó pontos értékeket a 8. Táblázat tartalmazza. Mércse: 8µm az A és 5µm a C panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

8. Táblázat. Funkcionális P2Y12 receptor hiányában a mikroglia nem képes reagálni a megnövekedett neuronális aktivitásra. Az értékek a kontroll százalékában vannak megadva. P2Y12 KO egerek vizsgálata: N=85 sejt, 6 állatból (3 kontroll, 3 CNO), Kruskal-Wallis és Dunn próba; PSB hatás vizsgálata: N=124 sejt 5 állatból (2 vivőanyag, 3 PSB), Mann-Whitney U teszt. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	ctrl vs. Cc+	ctrl vs. Cc-	Cc+ vs. Cc-
mikroglialis borítottság (P2Y12 KO)	Kontroll	26,53	100	265,50	p=0,7497	p=1	p=1
	CNO cFos+	97,72	133,06	224,69			
	CNO cFos-	53,58	127,70	197,69			
mikroglialis borítottság (PSB0739)	CNO + vivőanyag	53,92	100	154,17	p=0,0001		
	CNO + PSB	0	27,66	108,89			

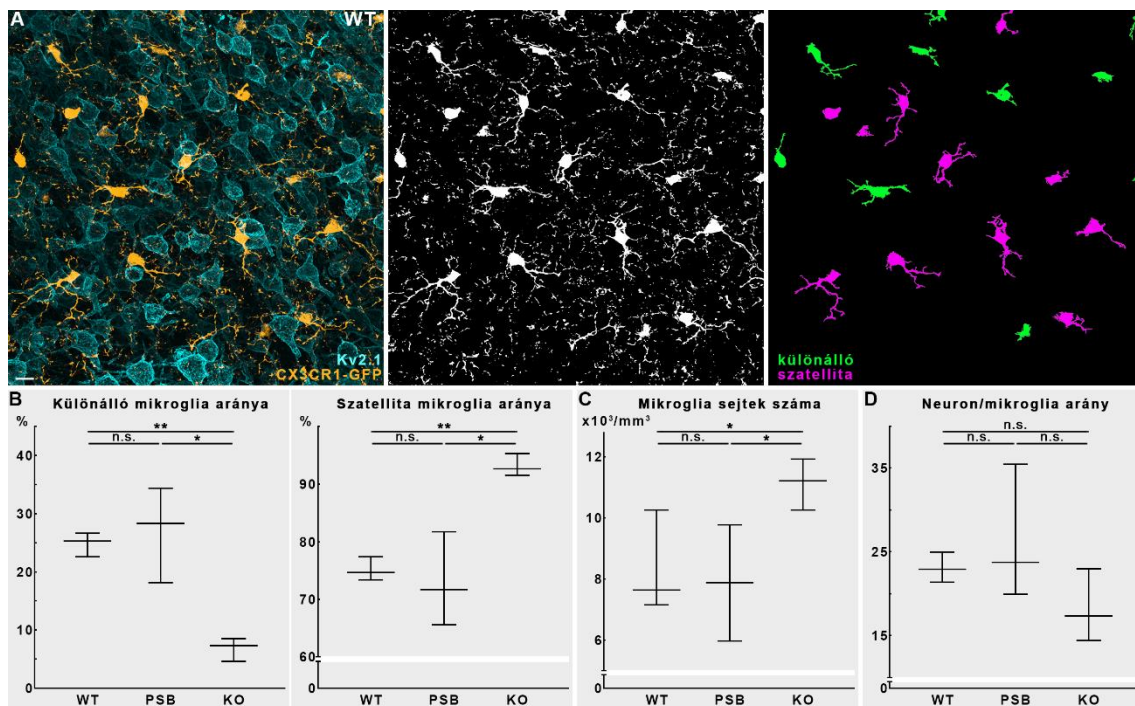
IV.5. A P2Y12 receptor szerepe a mikroglia motilitás és morfológia szabályozásában

Eddigi eredményeinkből jól látszik, hogy a purinerg P2Y12 receptor alapvető szerepet játszik a fiziológiai mikroglia-neuron kommunikációban. Felmerült azonban a kérdés, vajon milyen szerepet tölt be ez a receptor a mikroglialis fiziológiában, amelyre vonatkozóan nem rendelkezünk ismeretekkel. Ennek érdekében megvizsgáltuk egerekben a receptor farmakológiai és genetikus blokkolásának hatását a mikroglia alapvető tulajdonságaira. Az akut farmakológiai gátlás hatásait centrálisan adagolt PSB-vel vizsgáltuk, míg a krónikus receptorfunkció hiánya okozta változások megfigyeléséhez P2Y12 receptor génkiütött egereket használtunk.

IV.5.1. A P2Y12 receptor genetikus deléciója megváltoztatja a mikroglialis sejtszámot és a szatellita sejtek arányát az agykéregben

Mint a korábbi eredményeinkből láthattuk, a mikroglia-nyúlványok által kialakított szomatikus junkción keresztül zajló kommunikációban kiemelt szerep jut a P2Y12 receptornak. Ezzel a módszerrel egy-egy mikroglia a számos nyúlványán keresztül nagyszámú idegsejttel kommunikálhat egy időben. Amennyiben azonban a receptor nem

áll rendelkezésre, a mikroglia-nyúlványokon keresztül zajló információcsere zavart szenvedhet, és az akut gátlás esetén rövid, illetve a krónikus deléción esetén hosszabb távon érvényesülő kompenzatorikus mechanizmusok léphetnek életbe. A P2Y12 génkiütött egerek szomatoszenzoros kérgében azt figyeltük meg, hogy a mikroglia sejtek kapcsolatai megváltoznak, és nagyobb arányban (WT: 74,71%, KO: 92,68%; $p=0,0076$, Kruskal-Wallis és Dunn próba) helyezkednek úgy a szövetben, hogy sejttestükkel érintkeznek egy, vagy több idegsejt szómájával (14. Ábra A-B, 9. Táblázat). Belátható azonban, hogy ily módon egy-egy mikroglia lényegesen kevesebb idegsejtet tud egyidejűleg ellenőrzése alatt tartani, mint a nyúlványain keresztül, így nem meglepő módon azt találtuk, hogy a P2Y12 receptor krónikus hiányát úgy próbálja kompenzálni a génkiütött állat szervezete, hogy 47%-kal több mikroglia van az agykéregben, csökkentve ezzel a neuron/mikroglia arányt (14. Ábra C-D, 9. Táblázat).



14. Ábra. A P2Y12 receptor genetikus deléciónja kompenzatorikus folyamatokkal jár. **A,** A konfokális rétegfelvételeken a mikroglia (CX3CR1-GFP, okker) idegsejtekhez (Kv2.1, ciánkék) viszonyított elhelyezkedését 3 dimenzióban vizsgálhattuk – ez alapján megállapíthatjuk, hogy a mikroglia sejttestek hozzáérnek-e neuronok sejttestéhez (szatellita, magenta szín a jobb panelen), vagy nem (különálló, zöld szín a jobb panelen). **B,** A P2Y12 KO állatokban a szatellita mikroglia aránya jelentősen nagyobb, mint a receptorral rendelkező állatokban. **C,** A P2Y12 receptor krónikus hiánya magasabb mikroglia sejtszámot eredményez. **D,** A mikroglia sejtszám növekedésével párhuzamosan a P2Y12 KO egerekben alacsonyabb az egy mikrogliaára jutó idegsejtek átlagos száma. A

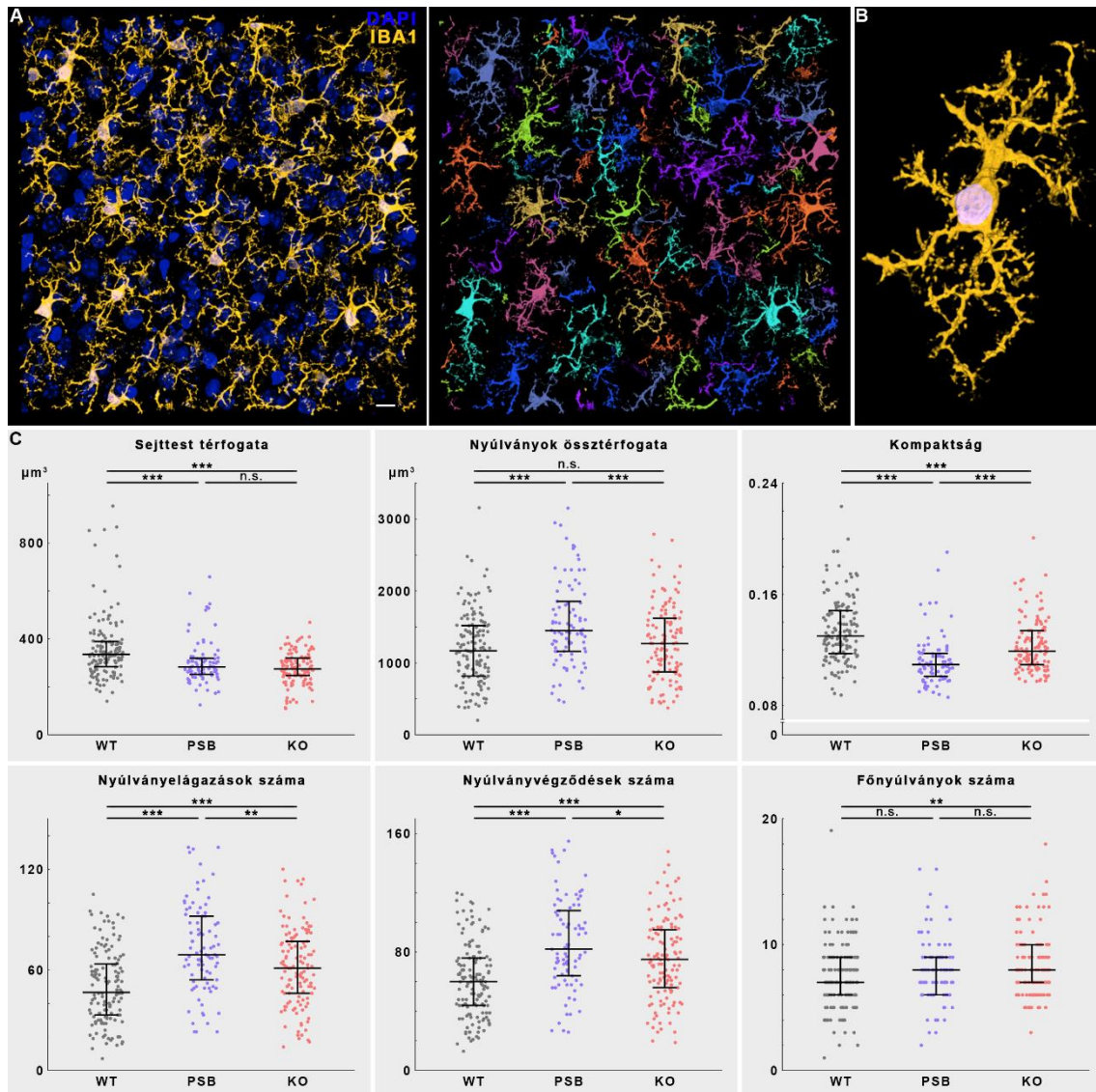
B-D panelhez tartozó pontos értékeket a 9. Táblázat tartalmazza. Mércse: 10 μ m az A panelen. [Publikálatlan adatok].

9. Táblázat. A P2Y12 receptor krónikus hiánya megváltoztatja a mikroglialis sejtszámot és a szatellita sejtek arányát az agykéregben. N=898 vizsgált mikroglia és N=1196 vizsgált neuron, 14 állatból (4 WT, 5 PSB, 5 KO), Kruskal-Wallis és Dunn próba. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	WT vs. PSB	WT vs. KO	PSB vs. KO
Különálló mikroglia aránya (%)	WT	22,58	25,29	26,67	p=1	p=0,0076	p=0,0311
	PSB	18,18	28,30	34,38			
	KO	4,65	7,32	8,51			
Szatellita mikroglia aránya (%)	WT	73,33	74,71	77,42			
	PSB	65,62	71,70	81,82			
	KO	91,49	92,68	95,35			
Mikroglia sejtek száma (x 10 ³ /mm ³)	WT	7,153	7,629	10,252	p=0,9015	p=0,0418	p=0,0418
	PSB	5,960	7,868	9,775			
	KO	10,252	11,206	11,921			
Neuron/ mikroglia arány	WT	21,33	22,93	25,00	p=1	p=0,1447	p=0,0712
	PSB	19,90	23,76	35,50			
	KO	14,40	17,36	23,02			

IV.5.2. Funkcionális P2Y12R hiányában megváltozik a mikroglia morfológiája

A mikroglia morfológiája dinamikusan képes változni és szoros összefüggést mutat a sejtek citokinprofiljával (Althammer és mtsai, 2020; Cogut és mtsai, 2018; Smith és mtsai, 2013). Azt találtuk, hogy a P2Y12 receptor működésének hiánya befolyásolja a mikroglia morfológiáját: a receptort akutan és szelektíven gátló PSB hatására az egyes sejtek nyúlványtérfogata megnő. Emellett a receptor akut vagy krónikus zavarának hatására lecsökken a sejttestek térfogata, és megnő ezekben az állatokban a nyúlványelágazások és a nyúlványvégződések száma (15. Ábra, 10. Táblázat), vagyis az egészséges egérhez képest a P2Y12 receptor-deficiens sejtek kiterjedtebb nyúlványrendszert tartanak fent.



15. Ábra. A P2Y12 receptor működésének hiánya befolyásolja a mikroglia morfológiáját. **A**, A bal oldali panelen egy 100 μm vastag szövetdarab konfokális felvételének projekciós képe látható (a mikroglia (Iba1) okker, a sejtmagok (DAPI) kék színnel), a jobb oldali panelen pedig ugyanezen térfogatban az analízis során azonosított mikroglia sejttestek és nyúlványok. A különböző sejtek különböző színekkel jelennek meg. **B**, Egy mikroglia sejt 3 dimenziós rekonstrukciója. **C**, A P2Y12 receptor működésének hiánya jelentős morfológiai változásokat okoz a mikrogliaiban. A pontos értékeket a 10. Táblázat tartalmazza. Mércé: 10 μm az A panelen. [Publikálatlan adatok].

10. Táblázat. A 3 dimenziós morfológiai vizsgálat eredményei. N=352 sejt, 14 állatból (4 WT, 5 PSB, 5 KO); Kruskal-Wallis és Dunn próba. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	WT vs. PSB	WT vs. KO	PSB vs. KO
Sejttest térfogata (μm^3)	WT	284,01	335,57	389,33	p<0,0001	p<0,0001	p=0,2609
	PSB	252,29	283,30	319,30			
	KO	246,87	274,63	320,02			
Nyúlványok össztérfogata (μm^3)	WT	989,05	1170,10	1520,80	p<0,0001	p=0,2457	p=0,0009
	PSB	1160,16	1450,45	1856,01			
	KO	876,97	1269,72	1621,95			
Kompaktság	WT	0,117	0,130	0,148	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
	PSB	0,101	0,109	0,118			
	KO	0,109	0,119	0,134			
Nyúlvány- elágazások száma	WT	33	46,5	63,5	p<0,0001	p=0,0001	p=0,0019
	PSB	54	69	92			
	KO	46	61	77			
Nyúlvány- végződés száma	WT	44	60	76	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0132
	PSB	64	82	108			
	KO	56	75	95			
Főnyúlványok száma	WT	6	7	9	p=0,2289	p=0,0056	p=0,2036
	PSB	6	8	9			
	KO	7	8	10			

IV.5.3. A P2Y12 receptor fiziológiás körülmények között is szabályozza a mikroglialis nyúlványmotilitást *in vivo*

Két korábbi tanulmány foglalkozott korábban a P2Y12 receptor hiányának hatásával a mikroglia-nyúlványok mozgására. Mindkét vizsgálat arra a következtetésre jutott, hogy a génkiütött egerek agyszövetében nem változik meg a mikroglia-nyúlványok mozgása a vad típusú állatokkal összehasonlítva (Madry és mtsai, 2018a; Sipe és mtsai, 2016). Figyelembe véve azonban az általunk megfigyelt változásokat a mikroglia nyúlványrendszerében és elhelyezkedésében a P2Y12R génkiütött állatokban, valamint a receptor kiemelt szerepét a mikroglia-neuron kommunikációban, nehezen képzelhető el,

hogy a receptor akut és/vagy krónikus funkcióvesztése ne lenne hatással a mikroglia-nyúlványok fiziológiás körülmények között mutatott mozgásmintázatára.

Célunk tehát az volt, hogy nagy idő- és térbeli felbontással megvizsgáljuk a három kísérleti csoportban a mikroglia-nyúlványok mozgását *in vivo*, 2-foton mikroszkópiával. Ehhez percenként készítettünk 3 dimenziós térfogathelyképeket élő egerek szomatoszenzoros kérgi területeiről. Azt találtuk, hogy az akutan P2Y12 receptor gátolt egerekben szignifikánsan csökken mind a nyúlványok átlagos, mind pedig a maximális sebessége (11. Táblázat, 16. Ábra A-C).

11. Táblázat. Akut P2Y12 receptor funkcióvesztés esetén csökken a mikroglia-nyúlványok átlagos és maximális sebessége *in vivo*. N=247 nyúlvány, 14 állatból (4 WT, 5 PSB, 5 KO); Kruskal-Wallis és Dunn próba. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	WT vs. PSB	WT vs. KO	PSB vs. KO
Átlagos sebesség (nm/s)	WT	24,64	27,32	30,39	p<0,0001	p=0,1333	p=0,0001
	PSB	21,55	23,79	26,33			
	KO	23,66	26,36	28,7			
Maximális sebesség (nm/s)	WT	66,00	80,00	90,88	p<0,0001	p=0,1226	p=0,0002
	PSB	59,90	66,00	75,50			
	KO	65,23	73,76	85,05			

Részletesebben megvizsgálva a vad típusú állatban a nyúlványok mozgását, az irodalomban eddig ismeretlen heterogenitást figyelhettünk meg. Az egyes nyúlványok által bejárt terület nagysága alapján kétfelé választhattuk a nyúlványokat: a megfigyelt nyúlványok 70,8 százaléka egy kisebb területen végezte „örjáratát”, azonban a nyúlványok majdnem 30 százaléka 20µm-nél nagyobb átmérőjű területen mozgott a vizsgált időtartam alatt. Ez utóbbi irányított nyúlványtoborzásra utalhat, amely a fenti, mikroglia-neuron szomatikus kapcsolatokat tárgyaló eredményeink alapján lokális ATP (ADP) források esetén biztosíthatja a mikroglia-nyúlvány kemotaxisát. Figyelemreméltó, hogy ez a mozgásforma markánsan gátolt volt a P2Y12 krónikus és akut gátlása esetén is (16. Ábra D; P2Y12 KO, a nyúlványok 11,27%-a, PSB, 4,60%, N=247 nyúlvány, 14 állatból [4 WT, 5 PSB, 5 KO]). Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a fiziológiás agyban is vannak olyan szolubilis hírvivő molekulák, amelyek a P2Y12

receptoron keresztül képesek nagyobb távolságú, irányított mozgásra ösztönözni a mikroglia-nyúlványokat.

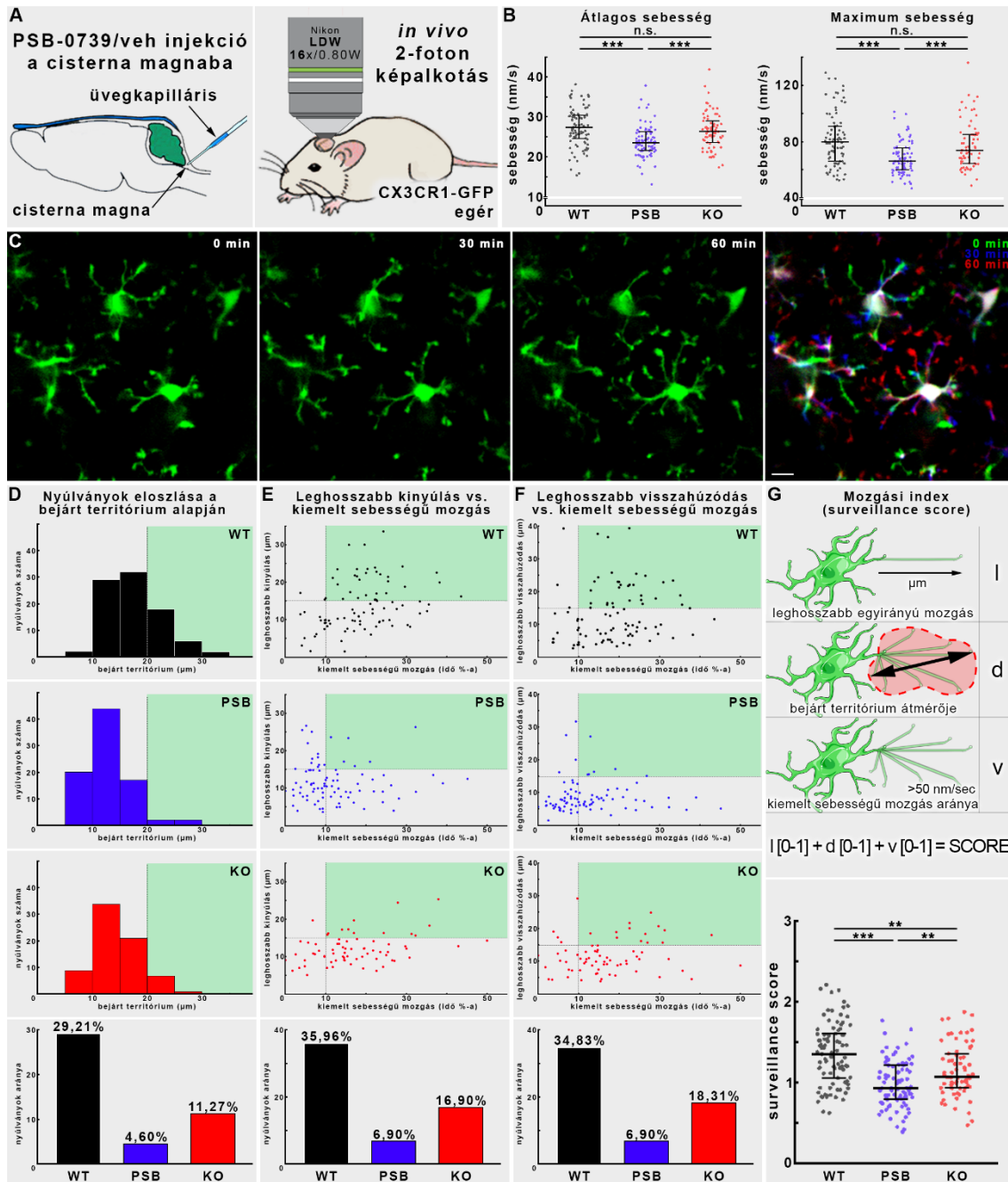
Tovább erősíti ezt a hipotézist, hogy azok a nyúlványok, amelyek a vizsgált időtartam legalább 10 százalékában kiemelten nagy sebességgel (több mint 50 nm/s) mozogtak, a P2Y12 receptor-kompetens állatokban lényegesen gyakrabban végeztek hosszútávú, egy irányba végzett, feltehetőleg célzott mozgást (16. Ábra E-F; WT: a vizsgált nyúlványok átlagosan 35,4%-a, PSB: 6,9%, KO: 17,6%).

Vizsgálataink során létrehoztunk egy ún. mozgási indexet (surveillance score), amely azt írja le minden egyes mikroglia-nyúlvány esetében, hogy mennyire végez lokális mozgást, sok irányváltással, kis sebességgel (alacsony pontszám), illetve célzott kinyúlást, nagyobb távolságra és sebességgel (magasabb pontszám). A vad típusú állatokban a vizsgált nyúlványok 38,20 százalékának pontszáma a 0-3-ig terjedő skálán meghaladta az 1,5-öt, vagyis nagy mennyiségben találhatóak olyan mikroglia-nyúlványok ezekben az egerekben, amelyek ezt a célzott mozgást végzik. Az akut P2Y12 receptor funkcióvesztés hatására ez a mozgás szinte teljesen eltűnik, és a receptor krónikus hiánya is azt eredményezi, hogy az ebbe a csoportba tartozó nyúlványok aránya kevesebb, mint a felére esik (12. Táblázat, 16. Ábra G).

12. Táblázat. A vad típusú állatban a mikroglia-nyúlványok mozgási indexe magasabb, mint a P2Y12R-deficiens egerekben. N=247 nyúlvány, 14 állatból (4 WT, 5 PSB, 5 KO); Kruskal-Wallis és Dunn próba. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	WT vs. PSB	WT vs. KO	PSB vs. KO
Mozgási index	WT	1,06	1,36	1,61	p<0,0001	p=0,0050	p=0,0072
	PSB	0,79	0,93	1,22			
	KO	0,93	1,07	1,36			

Összességében elmondhatjuk, hogy fiziológias körülmények között a mikroglia nyúlványai heterogén mozgást végeznek: egy kisebb területen, lokálisan végzett monitorozó mozgást, valamint egy nagyobb hatótávolságú, irányított mozgást, amely feltehetően lehetővé teszi nekik a távolabb helyezkedő sejtek működésében bekövetkező változásokra történő reagálást. Ez az utóbbi mozgás szinte teljesen elveszik a P2Y12 receptorok gátlásával.



16. Ábra. A P2Y12 receptor fontos szerepet tölt be a mikroglia-nyúlványok fiziológias mozgásában. **A**, A kísérlet sematikus ábrázolása. **B**, A P2Y12 receptor akut centrális gátlása szignifikánsan csökkenti a mikroglia-nyúlványok átlagos és maximális sebességét is. A panelhez tartozó pontos értékeket a 11. Táblázat tartalmazza. **C**, Ugyanazon optikai sík pillanatfelvétele három különböző időpontban (0-30-60 percnél), illetve egymásra vetítve. A képeken jól megfigyelhető a mikroglia-nyúlványok helyzetének dinamikus változása. **D**, A P2Y12 receptor krónikus és akut funkcióvesztése is az egyes nyúlványok által bejárt terület csökkenéséhez vezet. Az alsó panelen a három felső panelen zöld színnel jelölt területnek (20µm-nél nagyobb területtel rendelkező mikroglia-nyúlványok) megfelelő arányok kerültek megjelenítésre. **E-F**, A P2Y12 receptor hiányában csökken a mikroglia-nyúlványok célzott és gyors mozgásának aránya.

Az ábrákon az egyes nyúlványok által összefüggően (megszakítás nélkül egy irányba történő) megtett legnagyobb kinyúlás (E) és legnagyobb visszahúzódás (F) van ábrázolva az 50nm/s-nál gyorsabban történő mozgással töltött idő (kiemelt sebességű mozgás) hányadának függvényében. Az alsó panelen a három felső panelen zöld színnel jelölt területnek (15µm-nél nagyobb kinyúlás/visszahúzódás és a vizsgált időtartam legalább 10%-ában kiemelt sebességű mozgás) megfelelő arányok kerültek megjelenítésre. G, A nyúlványok által bejárt territóriumából, a leghosszabb egyirányú (célzott) mozgásból és a kiemelt sebességgel történő mozgásból képzett mozgási index értéke szignifikánsan alacsonyabb mind a P2Y12R génkiütött, mind a PSB-vel kezelt állatokban. A panelhez tartozó pontos értékeket a 12. Táblázat tartalmazza. Mércse: 10µm a C panelen. [Publikálatlan adatok].

Összefoglalva az eredményeinket kijelenthető, hogy a központi idegrendszerben mikroglia-specifikus purinerg P2Y12 receptor alapvető szereppel bír mind a mikroglia fiziológiai működésében, mind pedig az idegsejtekkel folytatott kommunikációban.

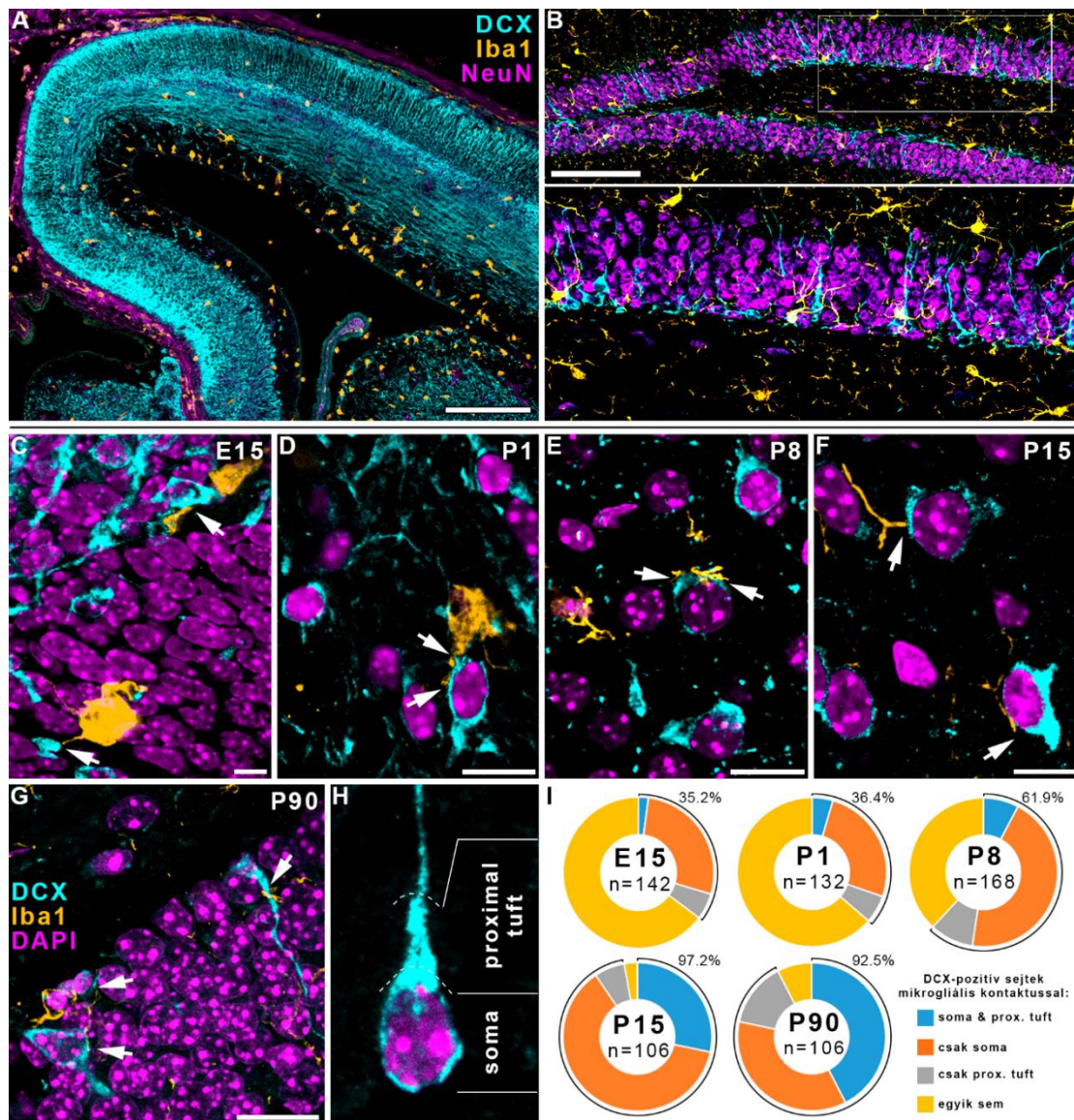
IV.6. A szomatikus junkció funkcionális jelentősége

A szomatikus junkció közvetlen kapcsolatot teremt a mikroglia-nyúlványok és az idegsejtek általános működése szempontjából legfontosabb régiója, azok sejtteste között. Ez az interakció kiváló alapot nyújthat a mikroglia számára, hogy befolyásolja a neuronok sorsát az idegrendszer fejlődése során, ahogy arra is lehetőség nyílik a szomatikus kapcsolaton keresztül, hogy az idegsejteket érő káros behatások okozta elváltozásokat érzékelje a mikroglia patológiai körülmények között. Megvizsgáltuk ezért, hogy a szomatikus junkció megtalálható-e a posztmitotikus, még éretlen neuronokon, illetve azt is, hogyan változik ez a speciális kapcsolat akut idegrendszeri patológia során.

IV.6.1. A szomatikus junkció jelen van az éretlen neuronokon is

A fejlődő idegrendszerben a mikroglia számos olyan folyamatért felel, amelyek nem magyarázhatók meg az irodalomban eddig ismert mikroglia-szinapszis kapcsolatokkal. Ilyen folyamatok például a neuronális differenciáció és migráció, vagy a programozott sejthalál szabályozása, amelyet a mikroglia végez (Mosser és mtsai, 2017). Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, a fejlődő idegsejtek kapnak-e szomatikus mikroglia bemenetet, többszörös fluoreszcens immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk, mely során a posztmitotikus, éretlen idegsejtekben kifejeződő mikrotubulus-asszociált fehérjét, a doublecortint (DCX) is megjelöltük (Gleeson és mtsai, 1999). Mivel az új idegsejtek születése és differenciációja folyamatos, ezért embrionális kortól fiatal állatokon

keresztül felnőtt, érett egerekig öt különböző korcsoportból gyűjtöttünk agyszövetet, minden korban a legintenzívebb neurogenézissel jellemezhető területet vizsgálva. A poszt-mitotikus neuronok felszínén a korrallal előre haladva egyre nagyobb arányban találtunk szomatikus mikroglialis kapcsolatot (17. Ábra, N=654 sejt, 10 állatból (csoportonként 2), szomatikus, vagy proximális dendritre érkező mikroglialis kapcsolattal rendelkező DCX-pozitív sejtek aránya: E15 – 35,2%, P1 – 36,4%, P8 – 61,9%, P15 – 97,2%, P90 – 92,5%).

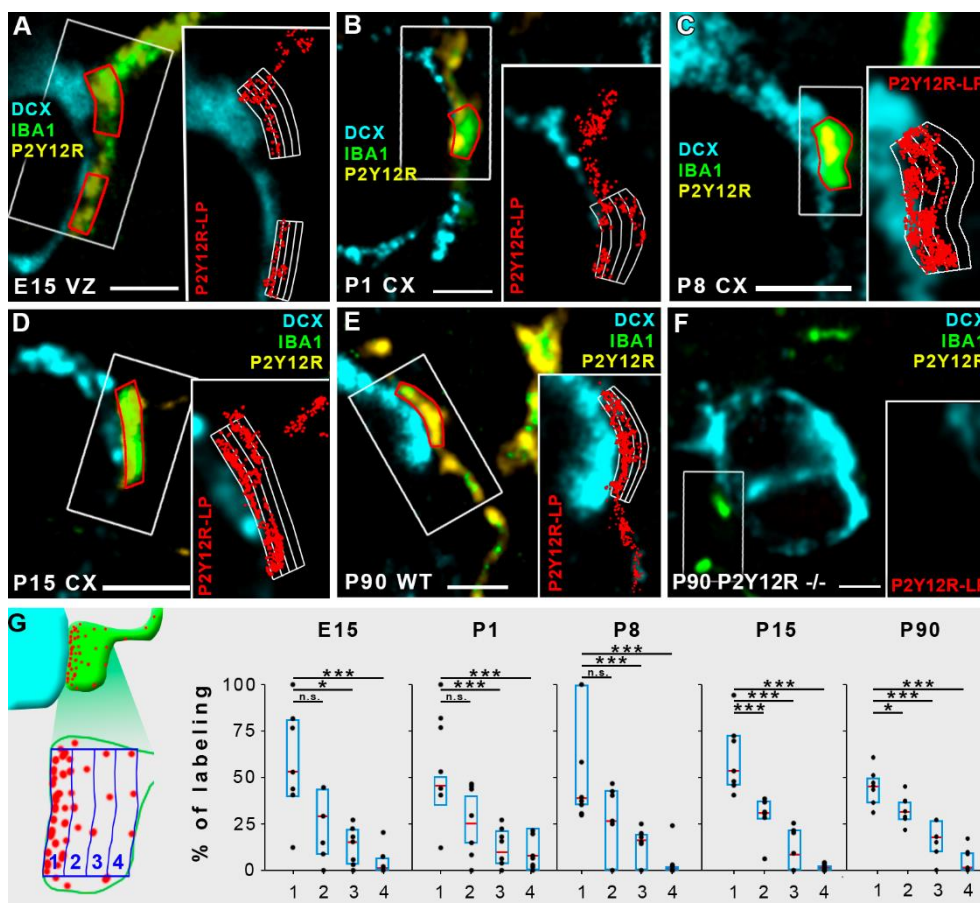


17. Ábra. A mikroglia-nyúlványok kapcsolatot létesítenek fejlődő neuronok sejtestével is. A, A konfokális mikroszkóppal készült felvételen a mikroglia sejtek (Iba1, okker) eloszlása figyelhető meg az intenzív neurogenézist mutató (DCX, ciánkék) embrionális (E15) palliumban. A mikroglia sejtek főleg a mélyebb rétegekben

helyezkednek el. **B**, Felnőtt egérben a gyrus dentatus subgranuláris zónájában fejlődő neuronok közelében is megfigyelhetők mikroglia sejtek. **C-G**, A különböző korú állatokban mind megfigyelhetők mikroglia-kapcsolatok a fejlődő idegsejtek sejttestén, illetve a proximális, vastag dendritszakaszaikon (proximal tuft). **H**, A sejttest és a proximális dendrit (proximal tuft) egy fejlődő idegsejt esetén. **I**, Az adott időpillanatban mikroglialis bemenetet kapó fejlődő idegsejtek aránya az állat korával együtt folyamatosan nő, 15 napos egérben már hasonló az arány a fejlődő idegsejtek esetében is, mint az érett neuronok esetében. Mércse: 200 μ m az A panelen, 100 μ m a B, 15 μ m a C, az E és a G, 10 μ m a D és F panelen. [Átdolgozva: (Cserép és mtsai, 2021b)].

IV.6.2. A mikroglialis P2Y₁₂ receptor kapcsolat-függő módon feldúsul a fejlődő idegsejtekre érkező szomatikus junciókban

A fejlődő idegsejtekre érkező szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatokban szintén megfigyelhető a mikroglia oldalán a purinerg P2Y₁₂ receptor kontaktus-függő felhalmozódása, amely jól látható a szuperrezolúciós felvételeken (18. Ábra, 13. Táblázat; N=35 kontaktus, 5 állatból).



18. Ábra. A mikroglialis P2Y₁₂ receptor kapcsolat-függő módon feldúsul. A-E, Korrelált konfokális és szuperrezolúciós képeken mindegyik vizsgált korú mintán

megfigyelhető, hogy a fejlődő idegsejtek (DCX, ciánkék) sejttestével kapcsolatot kialakító mikroglia-nyúlványokban (Iba1, zöld) a P2Y12 receptorok (konfokális jel – sárga, STORM szuperrezolúciós lokalizációs pontok – piros) nagy mennyiségben találhatóak meg a kapcsolatot létesítő membránszakaszokon. **F**, A P2Y12 receptor-jelölés specifikusságát génkiütött állat szövetén végzett reakcióval igazoltuk. **G**, Mindegyik vizsgált korcsoportban szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen a P2Y12 receptor a mikroglia-nyúlványok kapcsolatot kialakító felszínén, mint ugyanezen nyúlványok más területein. A panelhez tartozó pontos értékeket a 13. Táblázat tartalmazza. Mércse: 2µm az A-F paneleken. [Átdolgozva: (Cserép és mtsai, 2021b)].

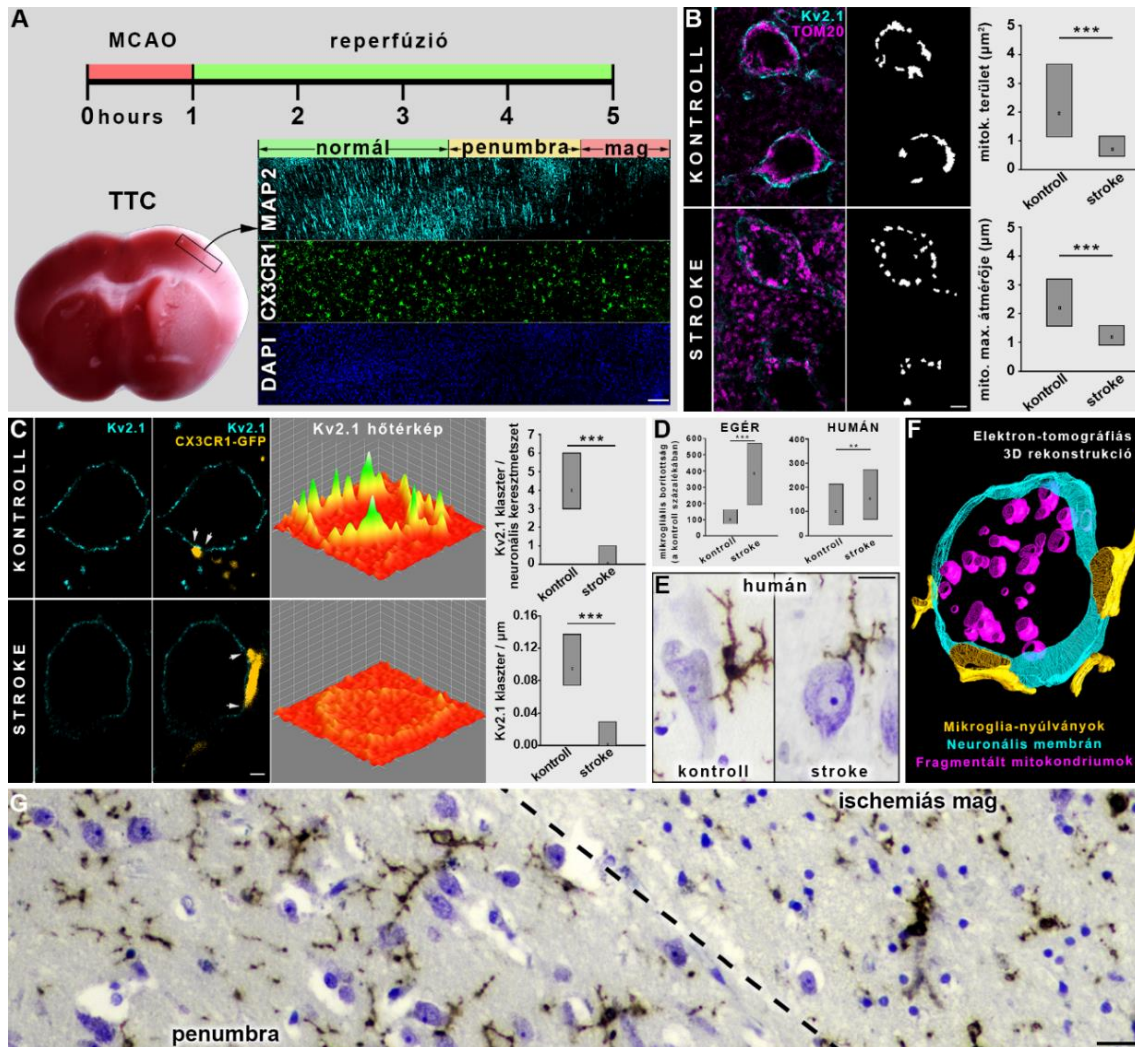
13. Táblázat. A mikroglialis P2Y12 receptor kapcsolat-függő módon feldúsul. Szuperrezolúciós vizsgálatunkban a P2Y12R eloszlását vizsgáltuk a mikroglia-nyúlványok keresztmetszete mentén (az 1-es régió a kapcsolathoz legközelebbi membránterület, a 4-es a legtávolabbi). A táblázatban szereplő értékek a P2Y12R lokalizációs pontok eloszlásának százalékos értékét mutatják. N=35 kontaktus, 5 állatból. LQ – alsó kvartilis, M – medián, UQ – felső kvartilis.

	1-es régió			2-es régió			3-as régió			4-es régió		
	LQ	M	UQ	LQ	M	UQ	LQ	M	UQ	LQ	M	UQ
E15	39,4	52,5	81,2	8,1	28,7	43,6	2,9	15,0	21,9	0	0	6,5
P1	34,0	44,0	49,6	14,0	24,3	39,4	3,5	9,2	21,1	0	7,5	22,1
P8	35,7	38,2	100	0	26,3	42,4	0	15,8	18,9	0	0,4	16,6
P15	45,7	53,4	72,0	27,3	30,3	36,4	0	8,3	21,2	0,2	0,4	1,9
P90	36,5	45,7	51,3	27,8	32,0	37,6	10,0	18,2	27,1	0	1,1	9,5

IV.6.3. Akut neuronális sérülés hatása a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatokra kísérletes stroke-ot követően

A mikroglia neuroprotektív tulajdonsága ischémias stroke-ot követően ismert (Szalay és mtsai, 2016), azonban ennek mechanizmusa ezidáig felderítetlen. Mivel a sejtek sorsát (túlélés vagy sejthalál) befolyásoló mechanizmusok zömmel a neuronok sejttestében zajlanak, ezért úgy gondoltuk, hogy a szomatikus junkció kiváló strukturális alapot biztosíthat a mikroglia számára, hogy értesüljenek ezen idegsejti folyamatokról, és adott esetben befolyásolni is tudják azokat. Kísérletesen előidézett ischémias stroke hatására megfigyeltük, hogy az elhalt agyterületek határzónájában (penumbra) – ahol a sérült, de potenciálisan még menthető idegsejtek találhatóak – megváltozik a szomatikus junkció felépítése: az idegsejtek membránjában eltűnnek a Kv2.1 csoportosulások, citoplazmájukban a mitokondriumok fragmentálódnak, a sejttest felszínén pedig közel négyszeresére nő a mikroglialis borítottság. Ez az utóbbi jelenség megfigyelhető stroke-

ban elhunyt páciensek post mortem agyszöveti mintáin is (19. Ábra, 14. Táblázat). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a mikroglia aktívan reagál az idegsejtekben ischemia hatására bekövetkező változásokra.



19. Ábra. Ischemiás stroke penumbrájában megváltozik a szomatikus junkció szerkezete A, A kísérlet sematikus ábrázolása: 1 órás egyoldali arteria cerebri media elzárást követően 4 óra reperfüziós időszak következett, majd az egerek perfúziója. TTC festéssel fehér régióként tűnik fel az elhalt agyterület. Többszörös immunhisztokémiai jelöléssel a stroke határzónájában megfigyelhető az ischemiás mag, az átmeneti zóna (penumbra) és az egészséges agyterület. B, A penumbra régióban a mitokondriumok (TOM20, magenta) fragmentációja figyelhető meg. C, A penumbrában a piramisisejtek membránjában eltűnnek a Kv2.1 (ciánkék) klaszterek, ahogy az a konfokális felvételeken és a neuronok keresztmetszeti képeről készült, a Kv2.1-jel intenzitását bemutató hőtérképeken is megfigyelhető. D-E, A penumbrában található neuronok sejtestének felszínén mind egérben (C panelen látható, a mikroglia jelölés okker színben), mind humánban (E) megnövekszik a mikroglialis borítottság. F, Egér agyszövetben a penumbráról készült elektrontomográfias felvételtől készített 3 dimenziós

rekonstrukción egy neuron sejtteste látható (ciánkék), amelyben a mitokondriumok (magenta) fragmentáltak, és a sejt felszínének nagy részét mikroglia-nyúlványok borítják. **G**, Post mortem humán agyszöveten megfigyelhető az ischemiás mag és a penumbra határa: a mag régióban az elpusztult neuronok piknotikus sejtmagjai és a mikroglia szinte teljes hiánya szembeötlő. A B-D panelekhez tartozó pontos értékeket a 14. Táblázat tartalmazza. Mércé: 100 μ m az A panelen, 4 μ m a B, 2 μ m a C, 8 μ m az E és 12 μ m a G panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

14. Táblázat. Akut ischemiás stroke penumbra régiójában bekövetkező változások. N=189 mitokondrium (2 állatból), Kv2.1 méréshez N=58 neuron (2 állatból), borítottság méréshez N=36 neuron (2 egérből) és N=249 neuron (6 páciensből). A mikroglialis borítottság értékek a kontroll százalékában vannak megadva; Mann-Whitney U teszt.. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	kontroll vs. stroke
Mitokondrium területe (μm^2)	Kontroll	1,14	1,97	3,67	p<0,0001
	Stroke	0,46	0,71	1,16	
Mitokondrium legnagyobb átmérője (μm)	Kontroll	1,58	2,19	3,16	p<0,0001
	Stroke	0,91	1,18	1,58	
Kv2.1 klaszter / keresztmetszet	Kontroll	3	4	6	p<0,0001
	Stroke	0	0	1	
Kv2.1 klaszter/ μm	Kontroll	0,0743	0,0947	0,1365	p<0,0001
	Stroke	0	0	0,0296	
Mikroglialis borítottság (egér, %)	Kontroll	74,85	100	163,27	p<0,0001
	Stroke	186,95	384,10	567,68	
Mikroglialis borítottság (humán, %)	Kontroll	44,78	100	213,11	p<0,0001
	Stroke	66,99	153,16	273,38	

IV.6.4. A mikroglia neuroprotektív hatása P2Y₁₂ receptor-függő

Az akut neuronális károsodás kialakulásának gátlásában kísérletes stroke-ot követően fontos szerepet játszik a mikroglia, amit kutatócsoportunk korábbi kísérletei szelektív mikroglia deplációval igazoltak (Szalay és mtsai, 2016). Ezért megvizsgáltuk, hogy a neuroprotektív hatások kialakulásában szerepet játszik-e az újonnan felfedezett szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat és specifikusan, a junkciókban szelektíven

felhalmozódó P2Y12 receptor. Annak érdekében, hogy a P2Y12 receptort szelektíven csak a központi idegrendszerben befolyásoljuk, a receptor szelektív gátlószerét, PSB0739-et a ciszterna magnába juttattuk a stroke indukálását megelőzően.

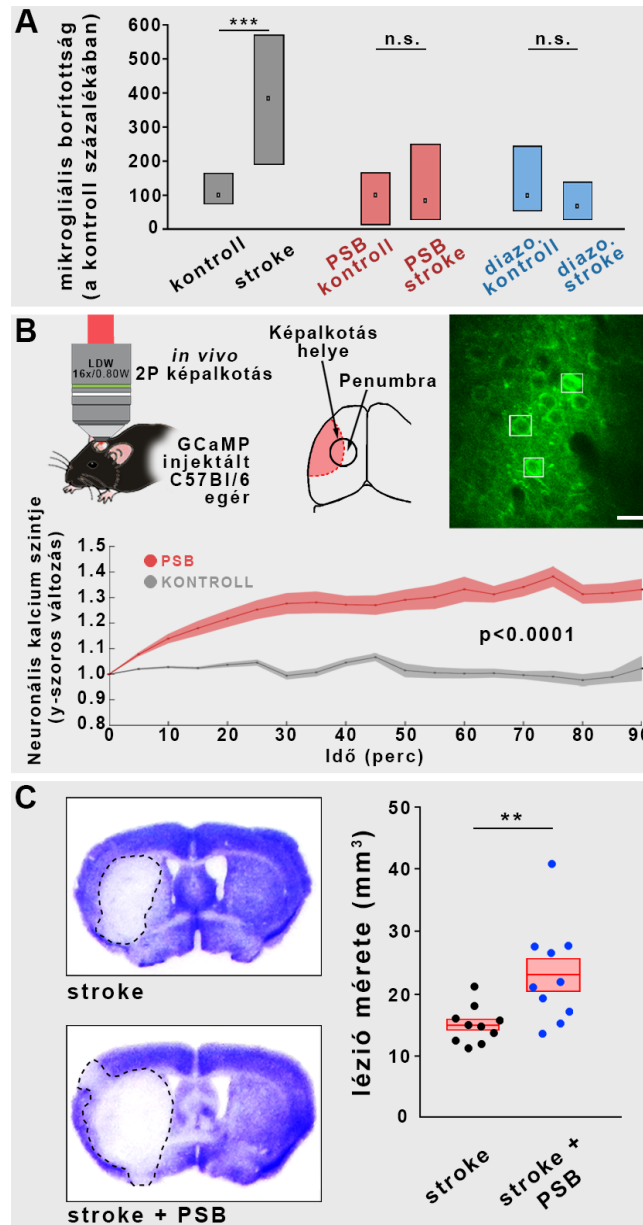
Fentebbi eredményeinkben már láthattuk, hogy ischemiás stroke-ot követően a sérült, de morfológiailag intakt idegsejtek felszínén az infarktus határzónájában növekszik a mikroglialis borítottság (19. Ábra C-E). Ez a válasz P2Y12 receptor-függő folyamatnak bizonyult: a receptor akut gátlását követően nem figyelhető meg a borítottság növekedés hypoxia hatására (15. Táblázat, 20. Ábra A). Érdekes módon szintén nem következett be a borítottság növekedés, ha a stroke-ot megelőzően a mitokondriumokat azok membránjában található ATP-szenzitív kálium-csatornák megnyitásával védő diazoxiddal (Korge és mtsai, 2002; Ozcan és mtsai, 2001) kezeltük az egereket, vagyis a mikroglíanak közvetített neuronális információ fontos eleme lehet a mitokondriális sérülés is (15. Táblázat, 20. Ábra A).

15. Táblázat. PSB0739 vagy diazoxid alkalmazása mellett nem tapasztalható mikroglialis reakció a stroke penumbra régiójában. N=31 sejt, 2 állatból (PSB) és 88 sejt, 3 állatból (diazoxid). Az értékek a kontroll százalékában vannak megadva; Mann-Whitney U teszt. LQ – alsó kvartilis, UQ – felső kvartilis.

Paraméter	Típus	LQ	medián	UQ	PSB vs. KO
Mikroglialis borítottság (PSB0739)	Kontroll	12,71	100	168,02	p=0,7952
	Stroke	27,94	84,37	249,82	
Mikroglialis borítottság (diazoxid)	Kontroll	54,41	100	242,26	p=0,0529
	Stroke	27,11	68,60	137,99	

További bizonyítékként a mikroglia P2Y12R-függő neuroprotektív szerepének megfigyeltük, hogy a PSB-kezelt, azaz P2Y12R-deficiens egerek penumbrájában a neuronális Ca^{2+} -szint patológiás módon megemelkedik a stroke-ot követő reperfüzió során (20. Ábra B). Mindezeket túl pedig azt is kimutattuk, hogy a mikroglialis P2Y12R-gátlás hatására arteria cerebri media elzárást követően körülbelül másfélszer nagyobb lézióméret alakul ki egerekben (20. Ábra C).

Ez az eredmény sor jól mutatja, hogy a P2Y12 receptornak kiemelt szerepe van a patológiás körülmények között megfigyelhető mikroglialis neuroprotekción is.



20 Ábra. A P2Y12 receptor az ischemiás stroke-ot követő mikroglialis neuroprotekciónak fontos mediátora. **A**, A penumbra régióban megfigyelt mikroglia-borítottság növekedés a neuronok felszínén nem következik be, ha a mikroglialis P2Y12 receptort akutan gátoljuk, vagy ha a mitokondriumokat védő, K_{ATP}-csatorna agonista diazoxiddal kezeljük az egereket. A panelhez tartozó pontos értékeket a 15. Táblázat tartalmazza. **B**, GCaMP6f-injektált egerek penumbrájáról készített *in vivo* 2-foton mikroszkópiás felvételeken megfigyelhető, hogy a reperfüzió során az idegsejtek Ca²⁺-szintje kórosan emelkedik a mikroglialis P2Y12 receptor gátlása esetén. N=96 sejt, 6 állatból (3 kontroll, 3 PSB); p<0,0001, Kruskal-Wallis próba. **C**, A P2Y12 receptor akut, centrális gátlása esetén az egyoldali arteria cerebri media okklúzió szignifikánsan nagyobb területen okoz sérülést, mint a funkcionális P2Y12 receptorral rendelkező kontroll egerekben. N=20 állat (10 kontroll, 10 PSB); stroke: 14,96±0,95mm³ (átlag±SEM), stroke+PSB: 23,06±2,52mm³; p=0,008, kétmintás t-próba. Mércse: 20µm a B panelen. [Átdolgozva: (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020)].

V. Megbeszélés

A mikroglia a központi idegrendszer fő rezidens immunsejtjeként kiemelt szereppel bír nemcsak a legtöbb idegrendszeri kórfolyamatban, de a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában is. Számos olyan neuronális folyamatra vannak hatással, amelyek az idegsejtek általános állapotának ismeretét, illetve esetenként az idegsejtekben zajló transzkripció és fehérjeszintézis befolyásolását igénylik. A szakirodalomban széles körben ismert, szinaptikus profilokat érintő mikroglia-nyúlványokon keresztül azonban kevésbé valószínű, hogy ezek a folyamatok lejátszódhatnak, hiszen a sejtek központja, ahol a beérkező információk összegződnek, és a neuronok sorsa szempontjából kulcsfontosságú döntések születnek, az a sejttest. Kutatómunkánk során feltártuk, hogy valóban létezik közvetlen membránkapcsolat a mikroglia-nyúlványok és a neuronok sejtteste között, amely ráadásul sejttípustól függetlenül rendkívül gyakori jelenség mind az egér, mind a humán agykéregben, emellett pedig a posztmitotikus neuronok felszínén is megtalálható. Ezen szomatikus kapcsolatok sajátos ultrastruktúrával rendelkeznek, amely kétirányú kommunikációt tesz lehetővé a sejtek között: az idegsejtek oldalán a kapcsolat közelében mitokondriumok, purinerg metabolitokat tartalmazó vezikulumok és membránhoz kihorgonyozott endoplazmás retikulum szakaszok találhatóak, a neuronális membránban a szomatikus junkció területén Kv2.1 és Kv2.2 fehérjék, míg a mikrogliális membránban P2Y12 receptorok felhalmozódása figyelhető meg. A kapcsolat kiemelt jelentőséggel bírhat a mikroglia-neuron kommunikációban mind fiziológiás-, mind patológiás körülmények között, ugyanis a mikroglia egyaránt reagál a neuronális aktivitás növekedésére, valamint az idegsejtek sérülésére is. A mikrogliális válasz mindkét esetben P2Y12 receptorfüggőnek bizonyult, amely fehérje mikroglia-specifikussága és szomatikus junkciókban megfigyelhető szelektív felhalmozódása miatt ideális terápiás célpont lehet újfajta kezelések kidolgozásánál. Nem szabad ugyanakkor figyelmen kívül hagyni azt sem, hogy a P2Y12 receptor kiemelt szerepet játszik a mikroglia fiziológiás működésében is, befolyásolva a sejtek morfológiáját és nyúlványaik mozgási mintázatát.

V.1. A szomatikus junkció kitüntetett szereppel bír a mikroglia-neuron kommunikációban

A neuronok rendkívül polarizált sejtek, amelyekben az egyes feladatok sokszor térben és időben is távol egymástól, kompartment-függő módon szabályzódnak (Misgeld és Schwarz, 2017). Amennyiben feltételezzük, hogy a mikroglia az agyi homeosztázis fenntartása során ellenőrzi, valamint szabályozza az idegsejtek működését, kézenfekvőnek tűnik a gondolat, hogy a neuronok különböző részeivel külön-külön alakítson ki kapcsolatokat, amelyek célzottan az adott kompartmentben lezajló folyamatok szabályzását teszik lehetővé (Cserép és mtsai, 2021a). Egy-egy idegsejtnél több ezer afferens és ugyanennyi efferens szinaptikus kapcsolata lehet. Ezek a szinapszisok sok esetben nagy távolságra találhatóak a sejttesttől, rendkívül rugalmasan képesek változtatni méretüket és receptortartalmukat az aktuális igényeknek megfelelően, és adott esetben feleslegessé válhatnak, eltűnhetnek (Brown és mtsai, 2008; Citri és Malenka, 2008). A mikroglia képes befolyásolni az idegsejtek közötti szinaptikus összeköttetések keletkezését, eliminációját, plaszticitását és receptorkészletét, amelyhez a szinapszist alkotó profilokkal alakítanak ki kapcsolatot a mikroglia-nyúlványok (Ji és mtsai, 2013). Ugyanakkor a teljes idegsejt általános állapotáról nem adhat teljes képet egy-egy szinapszisének működése, és ugyanígy az idegsejt működésének modulálása sem lehet hatékony valamely szinaptikus profilján keresztül. A szomatikus régiót érintő mikroglia-nyúlványok alkalmasak lehetnek a sejt transzkripciós profiljának, energetikai állapotának vagy anyagcsere-végtermékeinek érzékelésére, melyekből a sejtek általános állapotát leszűrhetik, patológiás esetekben pedig a sérülés mértékére következtethetnek. A szomatikus kapcsolat kiváló lehetőséget teremt a mikroglia számára arra, hogy beavatkozzon a neuronok élettani folyamataiba. A homeosztázis fenntartásához szükséges folyamatokon túl nyilvánvalóan patológiás körülmények között is szükséges a mikroglialis beavatkozás, azonban az, hogy ez előnyös, vagy hátrányos az idegsejtek számára, komoly vita tárgyát képezi. Rangos tanulmányok születtek, melyek eredményeit felületesen szemlélve a mikroglia kártékonynak tűnhet: Alzheimer-kór modellállatokban például mikroglialis jelátviteli útvonalak gátlása csökkenti a szinapszisvesztés és a mikroglialis fagocitózis mértékét (Hong és mtsai, 2016), valamint a mikroglia farmakológiai úton történő depléciója megelőzi a betegségre jellemző perineuronális háló elvesztést (Crapser és mtsai, 2020), az idegsejtszám-csökkenést (Spangenberg és mtsai,

2016), továbbá jobb funkcionális kimenetelt eredményez agyállományi vérzést követően (Li és mtsai, 2017). Eközben – ahogy többek között a mi eredményeink is jelzik – a mikroglia számos patológiás folyamatban neuroprotektív szereppel bír (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020; Fekete és mtsai, 2018; Szalay és mtsai, 2016). A mikroglia ezen heterogén hatásainak hátterében rendkívüli transzkripciós flexibilitása állhat: körülményektől függően mind pro-, mind anti-inflammatorikus mediátorok termelésére képes (Franco és Fernández-Suárez, 2015). A mikroglia transzkriptomikai profilja nagyfokú idő- és térbeli heterogenitást mutat az agyban fiziológias körülmények között is, és a legtöbb mikroglialis fehérje expressziós szintje a sejteket érő környezeti ingerek alapján változik (Masuda és mtsai, 2020). Korábban a túlnyomóan pro-inflammatorikus citokineket – mint az IL-1, az IL-6 vagy a TNF- α – termelő mikroglia sejteket a makrofág szakirodalomban meghonosodott kategóriák alapján M1, az anti-inflammatorikus (pl. IL-4, IL-13) mediátorokat szekretáló mikroglia sejteket M2 elnevezéssel illették (Orihuela és mtsai, 2016; Tang és Le, 2016). Ez a rugalmatlan, bináris kategorizálás azonban – hasonlóan az évtizedek folyamán történelmileg berögzült, mikroglialis állapotokra használt reaktív („activated”), illetve nyugvó („resting”) elnevezésekhez, melyek hamisan inaktívnak láttatják a fiziológias sejteket (Kierdorf és Prinz, 2017) – félrevezető, és elfedi annak a spektrumnak a valós szélességét, amelyen a mikroglia transzkriptomikai szempontból elhelyezkedhet (Ransohoff, 2016b). Az egészséges idegrendszer fenntartásának kulcsa kétségtelenül a megfelelő, jól szabályozott egyensúly megléte, mely esetben a mikroglia bizonyosan protektív funkcióval rendelkezik. Krónikus gyulladás fennállása esetén azonban, ha a gyulladást kiváltó tényezők perzisztálnak – például folyamatosan keletkező fehérjeaggregátumok, plakkok formájában – a mikroglia szabályozása is zavart szenvedhet, és ördögi körbe ragadva ráerősíthet a gyulladás negatív következményeire (Sarlus és Heneka, 2017). Ebből azonban hiba lenne azt a következtetést levonni, hogy a mikroglia káros lenne az idegrendszer számára, mert akut sérülés, pl. vírusfertőzés vagy stroke esetén megmutatkozik a mikroglia neuroprotektív természete. Ezeknél a kórképeknél közös jellemző, hogy nem globális, nagy neuronpopulációt érintő általános működési zavarról beszélhetünk, hanem lokálisan izolálható az érintett terület. A szomatikus junkció az idegsejtek fiziológias állapotának helyreállításán túl kiváló alapot jelent a mikroglia számára ahhoz is, hogy a súlyosan sérült sejteket azonosítsa, és terminális esetben ebből a kapcsolódási pontból indítva

fagocitálja. Ezt az elméletet szintén alátámasztja az a közelmúltbeli felfedezés, miszerint a pusztuló neuronok fagocitózisát a mikroglia és az asztrociták összehangoltan végzik olyan módon, hogy a mikroglia felelős a sejttetek fagocitózisáért, míg az asztrociták az idegsejtek nyúlványait kebelezik be (Damisah és mtsai, 2020). A neurodegeneratív betegségek lehetséges terápiájának kulcsa és az intervencióra legalkalmasabb időpont ezek alapján az az állapot lehet, amikor még csak elszórtan találhatók zavart szenvedett idegsejtek.

A szomatikus illetve a szinaptikus régiókban létrejövő mikroglia-neuron kapcsolatok egymástól eltérő funkciójára következtethetünk *in vivo* megfigyeléseinkből is: a szomatikus kapcsolatok fennállásának időtartama átlagosan háromszor olyan hosszú, mint a szinaptikusoké. A hosszabb kapcsolat alapján feltételezhető, hogy összetettebb kommunikáció is kialakulhat a sejtek között, és a néhány esetben két óránál hosszabban is megfigyelt szomatikus junkciókon keresztül komoly beavatkozás is történhet az idegsejtek működésébe. A kapcsolaton keresztül ionok, molekulák cserélődhetnek, de a közvetlen membrán-membrán kontaktus kialakítása után akár lizoszomális, vagy egyéb vezikulába csomagolt tartalmak is átadásra kerülhetnek a sejtek között, patológias körülmények között pedig akár sejtorganellumok cseréje is szóba jöhet, ahogy azt más sejtek esetén már felvetették (Hayakawa és mtsai, 2016; Spees és mtsai, 2006).

Szintén a szomatikus junkció kiemelt szerepére utalhat az a tény, hogy a vizsgált agyterületeken sejttípustól függetlenül volt megtalálható adott pillanatban a neuronok és interneuronok körülbelül 90%-a sejttetének felszínén. Hasonló arányt találtunk a post mortem humán mintákban is, amely – figyelembe véve a szakirodalomban különféle fajokban leírt azonos mikroglialis funkciókat (Pósfai és mtsai, 2019) – a szomatikus junkció evolúciós megőrzöttségére utal. Az evolúció során egyre komplexebbé, és ezzel párhuzamosan egyre energiahatékonyabbá váló központi idegrendszerben egy sejtek közti kapcsolat csakis úgy maradhatott meg, ha haszna meghaladja energiaigényét. A szomatikus mikroglia-neuron kapcsolat eddig feltárt ultrastruktúrája ezzel összhangban azt mutatja, hogy bár dinamikusan létrejövő és eltűnő kapcsolatokról beszélünk, azok kialakulása nem véletlenszerűen történik. Már hosszabb idejű *in vivo* felvételeinken is megfigyelhető volt, hogy egyes, neuronok sejttetét megérintő mikroglia-nyúlványok többször is pontosan ugyanarra a pontra nyúlnak vissza az idegsejtek membránján, majd anatómiai vizsgálataink megerősítették a kapcsolat kitüntetett morfológiáját. A neuronok

oldalán az exocitotikus apparátus – a Kv2.1 és Kv2.2 fehérjeklaszterek, vezikulák – jelenléte, a kalcium-homeosztázis szempontjából kulcsfontosságú endoplazmás retikulum szakaszok sejtmembránhoz történő kihorgonyzódása, valamint a szomatikus mitokondriumok közelsége mind arra mutatnak, hogy a mikroglia-nyúlványok „tudatosan” ezeket a kapcsolódási pontokat keresik a neuronok felszínén.

A szomatikus junkció kiváló lehetőséget teremt a mikroglia számára, hogy információt nyerjen a neuronok aktuális állapotáról. A Kv-klaszterek mentén szabadulnak fel az idegsejtekből az exocitózissal kiválasztódó anyagok (Feinshreiber és mtsai, 2009; Singer-Lahat és mtsai, 2007), amelyeket azonnal érzékelhet, vagy akár fel is vehet a közelben tartózkodó mikroglia-nyúlvány. A felszabaduló anyagok között lehetnek anyagcsere-termékek, nem kívánatos fehérjék, mitokondriális metabolitok, vagy akár patogén ágensek (Ibata & Yuzaki 2021), amelyek jelenlétéből és arányából fontos információkat tudhatunk meg az azokat leadó idegsejtekről. Az így kapott kép alapján a mikroglia sejtek intervencióra is képesek lehetnek, mellyel segítik a neuronális homeosztázis megtartását, visszaállítását. Ezt erősíti az a megfigyelésünk, hogy a mikroglia-nyúlvány érintése után megváltozik az idegsejtek szomatikus régiójában a kontaktus közelében elhelyezkedő mitokondrium aktivitása (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020). Hipotézisünk szerint minden neuronban léteznek ilyen „kapcsolódási pontok”, amelyeket a mikroglia-nyúlványok „járőrözés” közben megtalálnak, és amelyeken keresztül az idegsejtek megszabadulhatnak felesleges vagy káros tartalmuktól, amit aztán a mikroglia érzékel, és azok hatására beavatkozhat a neuronális folyamatokba. A speciális ultrastruktúrájú kapcsolódási pontok mikroglia-kapcsolattól való függetlenségének bizonyítéka, hogy mikroglia-depletált állatokban is megmaradnak az idegsejtek felszínén a Kv-klaszterek, valamint a hozzájuk lehorgonyzott intracelluláris retikuláris sejtalkotók (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020).

V.2. A Kv-fehérjék extraszinaptikus excitózisra és ionáramokra gyakorolt hatása

A szomatikus junkció molekuláris alkotóelemei közül érdekes lehet megvizsgálunk a Kv-fehérjék potenciális jelentőségét. Ezek a fehérjék a neuronális sejtmembránban elsősorban helyezkedve a rektifikáló K^+ -áramokért felelnek az idegrendszer fiziológiás működése során (Murakoshi és Trimmer, 1999). Ezen felül, a principális sejtek membránjában klasztereket is formálnak, amelyekben elhelyezkedve K^+ -

konduktanciájukat elvesztik, és leginkább strukturális feladatuk van: az endoplazmás retikulum részeit saját foszforilációs állapotuk függvényében horgonyozzák ki a sejtmembránhoz, valamint a SNARE-fehérjék kötőpartnereiként szolgálva a neuronális sejttestből történő exocitózis színhelyét biztosítják (Deutsch és mtsai, 2012; Fox és mtsai, 2015; O’Connell és mtsai, 2010; Singer-Lahat és mtsai, 2007). Az idegsejtek működésében bekövetkező változások – például kórosan megnövekedett aktivitás, hypoxia stb. – hatására a Kv-fehérjék defoszforilációja következik be, a klaszterek megszűnnek, a fehérje homogén módon oszlik el a sejtmembránban és a sejtekből történő K^+ -kiáramlás Kv2.1-függő módon megnövekszik (Misonou és mtsai, 2006; Mulholland és mtsai, 2008; Shah és mtsai, 2014; Yeh és mtsai, 2017). A Kv2.1 fehérjeklaszterek további két funkciója is fontos szerepet játszhat a szomatikus junkcióban: egér agykérgi principális sejteken kimutatták, hogy a Kv2.1 fehérjekomplex része az AMIGO elnevezésű neuronális adhéziós fehérje (Peltola és mtsai, 2011), emellett az idegsejtek szomatikus membránjában megtalálható clathrin fehérjék mintegy 75%-a is Kv2.1-klaszterekkel asszociálódik (Deutsch és mtsai, 2012), vagyis ezek a molekuláris komplexek a transzcelluláris kapcsolat stabilizálásában, valamint a szomatikus endocitózisban, azaz a neuronokba juttatandó metabolitok transzportjában is kiemelt jelentőségűek. Azzal, hogy a szomatikus junkciók éppen a Kv-klaszterek területén alakulnak ki, a mikroglia nyúlványai könnyedén ellenőrzés alatt tarthatják az idegsejtek endo- és exocitotikus folyamatait, illetve észlelhetik a Kv-fehérjék eloszlásának változását. Érdekes kérdés lehet, hogy a neuronális aktivitás megnövekedésére, valamint az oxigénhiányos állapotra megfigyelt mikroglialis borítottságnövekedés közvetlen kiváltó oka lehet-e a Kv-klaszterek eltűnése, és amennyiben igen, vajon ez pusztán anatómiai információként szolgál a mikroglia számára, esetleg az exocitózis megszűnése, a sejtadhéziós molekulák eltűnése, vagy egyéb neuron-eredetű faktorok vesznek-e részt a kommunikációban.

Nem tisztázott továbbá, hogy a korábbi klasztereket alkotó, a membránban a megváltozott körülmények hatására egyesével elhelyezkedő Kv-fehérjék visszanyerik-e K^+ -áteresztő képességüket. Az idegsejtek apoptózissal történő elpusztulásához összetett molekuláris kaszkád vezet, melynek folyamán megnövekszik a K^+ -kiáramlás a sejtekből (Yu és mtsai, 1997). Ezen folyamat legfőbb mediátorai a Kv2.1-csatornafehérjék (Pal és mtsai, 2003; Yao és mtsai, 2009), melyeknek megnövekszik a mennyisége a sejtmembránban a

proapoptotikus fázisban, és ezen csatornák farmakológiai, vagy genetikai gátlása meggátolja a neuronok apoptózist (Zaks-Makhina és mtsai, 2004). Bár bizonyított, hogy a megnövekedett Kv2.1-fehérje mennyiségéhez hozzájárul új csatornák sejtmembránba való kihelyezése (Pal és mtsai, 2006), a klaszterekből „kiszabaduló” fehérjék konduktanciája sem zárható ki. A neuroprotekciónak célja az apoptózis késleltetése lehet, melynek egyik kulcsa a sejtek K^+ -vesztésének lassítása, megakadályozása, márpedig a mikroglia aktívan szabályozza az extracelluláris tér K^+ -koncentrációját patológiás körülmények között: mikroglia-depletált állatokban az extracelluláris K^+ -szint csökkenése figyelhető meg terjedő depolarizációt (spreading depolarization-t) követően (Varga és mtsai, 2020). Mint láttuk, a mikroglia nyúlványai neuroprotektív feladatuk ellátása közben nagyobb felszínen érintkeznek az idegsejtek sejttestével, mint fiziológiai körülmények között. Feltételezésem szerint akár kétféle mechanizmus is elképzelhető, amelyen keresztül a mikroglia befolyással lehet a neuronális K^+ -vesztésre patológiás körülmények között: egyrészt elképzelhetőnek tartom, hogy a megnövekedett érintkezési felszín mentén lokálisan olyan magas K^+ -koncentrációt hoz létre saját intracelluláris ionjainak kiengedésével a mikroglia, amely az iongradiens módosításával megfordítja a neuronális K^+ -áramlás irányát, másrészt a környezetében lévő Kv-fehérjék foszforilációjával elveheti azok K^+ -áteresztőképességét. Ezen mechanizmusok megfejtése rendkívül fontos a neuroprotektív folyamatok megértése szempontjából.

V.3. A mitokondriumok mint a neuronális aktivitás és sérülés központi integrátorai

A mitokondriumok több szempontból különleges szerepet töltenek be az intracelluláris sejtorganellumok között. A legismertebb feladatukon – a sejtek számára szükséges energiaforrás biztosításán – túl számos létfontosságú folyamatért felelnek, így például a sejtek kalcium-homeosztázisának szabályzásáért, a sejtproliferációért, a migrációért, a sejt morfológia alakításáért, valamint a viabilitásért és az apoptotikus folyamatok beindításáért (Chandel, 2014; Whelan és Zuckerbraun, 2013). Konszenzusos vélemények szerint az eukarióta sejtekben található mitokondriumok évmilliárdokkal ezelőtt bakteriális forrásból endoszimbiózissal váltak a sejtjeink állandó organellumaivá (Martijn és mtsai, 2018; Roger és mtsai, 2017). A bakteriális eredet miatt a veleszületett immunrendszernek ki kellett alakítania egyfajta toleranciát a mitokondriumokkal

szemben (Rongvaux, 2018), azonban számos jel mutat arra, hogy az immunsejtjeink mind a mai napig kitüntetett figyelemben részesítik ezeket a sejtroganellumokat (Breda és mtsai, 2019; Jin és mtsai, 2017; Soltys és Gupta, 1999). Az immunológiai szempontokon túlmenően, a mikroglia, mint az agy rezidens immunkompetens sejtje, számos mitokondriális működéssel szoros összefüggésben termelődő metabolitot képes érzékelni, melyek neuronális stresszre utalhatnak, például ATP-t, proapoptotikus szignálokat és reaktív oxigéngyököket. Ezeken túl bizonyítottan módosítják a mikroglialis nyúlványok mozgását olyan mitokondriális eredetű molekulák is, mint a citokró-m-c vagy mtDNS fragmensek (Bajwa és mtsai, 2019; Davalos és mtsai, 2005; Eyo és mtsai, 2014; Galluzzi és mtsai, 2012; Gouveia és mtsai, 2017; Gülke és mtsai, 2018). Figyelembe véve ezen információforrásul szolgáló metabolitok széles spektrumát, a mitokondriumok központi szerepét a sejtek működésében, a sejtek aktuális állapotát hűen tükröző működésüket (Gao és Zhang, 2018; Sugiura és mtsai, 2014), központi szerepüket a patológiás változások beindításában és jelzésében, megváltozott működésüket a leggyakoribb neuropatológiai kórképekben (Norat és mtsai, 2020), valamint az immunsejtek kitüntetett figyelmét a mitokondriumok iránt, magától értetődőnek tűnik, hogy a szomatikus junkciók a neuronális mitokondriumok közvetlen közelében alakulnak ki. *In vitro* eredményeink alapján a mikroglia egy-egy szomatikus junkció kialakítását követően P2Y12 receptor-függő módon képes módosítani a neuronális mitokondriumok működését (Cserép, Pósfai és mtsai, 2020), márpedig a mitokondriumok aktivitásukkal olyan alapvető neuronális tulajdonságokat is képesek befolyásolni, mint a depolarizációs küszöb (Styr és mtsai, 2019), így a mikroglia-mitokondrium párbeszéd finom részleteinek megértése kulcsfontosságú lehet a fiziológiás és a patológiás idegrendszeri folyamatok megismeréséhez.

V.4. A purinerg jelátvitel összetett szerepe az intercelluláris kommunikációban

Az egyik legizgalmasabb felderítetlen kérdés jelenleg, hogy a mikroglia-nyúlványok hogyan találják meg ezeket a specifikus kapcsolódási pontokat. Azt a gondolatot, hogy a nyúlványok mozgása véletlenszerű lenne, gyorsan elvethetjük, hiszen a rendszer ilyenén szabályozatlansága rengeteg felesleges energiát emésztene fel és adataink is irányított, kommunikáción alapuló nyúlványmozgásra utalnak. A mikroglia-nyúlványok egy rendkívül sűrű extracelluláris térben mozognak, ahol az extracelluláris mátrix elemeit

feltehetően folyamatosan emészteniük kell maguk előtt (Barros és mtsai, 2011). A mikroglia-nyúlványok bizonyítottan képesek egy kémiai grádiens mentén irányított mozgásra, hiszen a sejtekből sérülés esetén felszabaduló ATP hatására nagy távolságról is gyorsan a sérülés helyére nyúlnak (Davalos és mtsai, 2005). Ezen kemotaxis nem jön létre a mikroglialis P2Y₁₂ receptor hiányában (Haynes és mtsai, 2006), amely, mint eredményeinkből láthattuk, a szomatikus junkción keresztül megvalósuló mikroglia-neuron kommunikációban is esszenciális szereppel bír: funkcionális P2Y₁₂ receptor hiányában rövidebb lett a szomatikus junkció időtartama, valamint sérült a mikroglialis válasz is a neuronális változásokra. Azonban a szomatikus junkció kialakulásában a P2Y₁₂ receptor bizonyosan nem tölt be kizárólagos szerepet, ugyanis a P2Y₁₂ génkiütött állatokban is megfigyelhettünk ilyen kapcsolatokat. A lerövidült időtartamú kapcsolatokról, valamint a neuronális változásokra adott mikroglialis reakciók sérüléséből sokkal inkább arra következtethetünk, hogy a P2Y₁₂ receptor a megfelelő sejtek közti kommunikáció létrejöttében játszik fontos szerepet.

Az eukarióta sejtek számára a purinerg metabolitok nélkülözhetetlenek a fennmaradáshoz. Az adenzin, valamint az adenin-nukleotidok fontos hírvivő molekulák mind intra-, mind intercelluláris kommunikáció során, az ATP pedig a biológiai oxidáció során keletkezve a sejtekben lejátszódó folyamatok legfőbb energiahordozója (Bonora és mtsai, 2012). Az ATP, illetve bomlástermékei közül az adenzin modulátoros szerepet töltenek be a szinaptikus jelátvitelben (Evans és mtsai, 1992; Sebastiao és Ribeiro, 2009), valamint a neuron-glia kommunikációban is részt vesznek: a mikroglia nyúlványainak kemotaxisát az extracelluláris ATP irányítja (Davalos és mtsai, 2005; Haynes és mtsai, 2006), míg az adenzinnak a mikroglia neuronális aktivitást moduláló hatásában lehet központi szerepe (Badimon és mtsai, 2020). Emellett főként káros behatásra, mintegy vészjelzésként nő meg mind az ATP, mind az adenzin mennyisége az extracelluláris térben (Latini és Pedata, 2008; Rodrigues és mtsai, 2015), nem feltétlenül egymástól függetlenül, hiszen a nagy mennyiségben megjelenő ATP-t a sejtközi térben nukleotidáz enzimek ADP-, és AMP-n keresztül adenzinná alakíthatják (Zimmermann, 2000).

Első pillantásra az ATP jelátviteli célra történő használata – különösen patológiás, energiahányos állapotok közepette, mint „veszély szignál” – felesleges energiapazarlásnak tűnhet, azonban bármilyen más neurotranszmitter molekula szintetizálása többszörös energiabefektetéssel jár a neuronok számára, mint a már

eredetileg is rendelkezésre álló ATP használata ilyen célokra. Példának okáért a központi idegrendszer leggyakoribb neurotranszmitterének, a glutamátnek a létrehozásához nagyjából 9 ATP molekula szintetizálásának energiaigényét kell befektetni (Agostinho és mtsai, 2020). Az intracellulárisan található ATP szintje nagyjából állandó, és a teljes ATP készletből elhanyagolható mennyiséget – számítások szerint megközelítőleg annak $1/10^{12}$ részét – raktároznak az idegsejtek vezikulákban, felszabadításra készenlétben (Dowdall és mtsai, 1974). Mivel az extracelluláris térben az intracelluláris ATP-koncentrációhoz (3-10 mM) képest 7-8 nagyságrenddel kisebb az ATP-szint (Agostinho és mtsai, 2020; Verkhratsky és Burnstock, 2014), így a sejtekből felszabaduló ATP robusztus hatást idézhet elő. Az ATP felszabadítására többféle metódus is kifejlődött az evolúció során az idegsejtekben: történhet membráncsatornákon keresztül, és vezikuláris úton is. Előbbire különböző anion csatornákon (pl. térfogat-regulált anion csatornán), pannexin, vagy connexin hemicsatornákon keresztül van lehetőség, míg utóbbi csoportba tartozhat a lizoszomális-, szekretoros-, vagy szinaptikus vezikulákba csomagolt ATP sejtközi térbe ürülése (Verkhratsky és Burnstock, 2014). Ezen utóbbi formája az ATP-felszabadulásnak nagy valószínűséggel szerepet játszik a szomatikus junkción keresztül zajló mikroglia-neruon kommunikációban, ahogy arra eredményeink következtetni engednek.

A purinerg metabolitok által a mikrogliaira kifejtett hatás többrétű lehet. Egyik oldalról a kiváltott hatás sokszínűségét a mikroglia által kifejezett számos, purinerg ligandokra érzékeny receptortípus biztosítja: megtalálhatóak ezekben a sejtekben főként adenzinra érzékeny metabotrop receptorok, valamint elsősorban adenin-nukleotidokra érzékeny ligand-függő ioncsatornák és G-fehérje kapcsolt receptorok (Kettenmann és mtsai, 2011). Ezek a receptorfehérjék nem csak az általuk beindított intracelluláris kaszkádokban különböznek, hanem expressziós szintjük is nagyfokú heterogenitást mutat mind agyterülettől-, mind pedig állapottól függő módon – a P2X4 receptor kifejeződése például jelentősen megnő idegi sérüléseket követően, míg a P2Y12 receptor szintje mikroglia-aktiváció során erősen lecsökken (Lin és mtsai, 2020; Masuda és mtsai, 2020). Ezen túl az adenin-nukleotidokra is eltérő érzékenységgel reagálnak: a P2X7 és a P2Y2 receptorok fő agonistája az ATP, míg a P2Y12 receptoré az ADP, mi több, az ATP jelenléte gyengíti a receptoraktiváció hatásait (Kauffenstein és mtsai, 2004; von Kügelgen, 2021; Rodrigues és mtsai, 2015). Mivel a mikroglia-nyúlványok felszínén kimutattuk az NTPDase1 enzim (korábbi elnevezése CD39) jelenlétét, amely az ATP, valamint az ADP hidrolízisét végzi,

könnyen elképzelhető, hogy a fiziológias neuron aktivitás során szabályozottan felszabaduló, kisebb mennyiségű ATP (Fields, 2011; Menéndez-Méndez és mtsai, 2017) eltérő hatást vált ki a mikroglían, mint a patológias állapotban felszabaduló nagymennyiségű ATP (Rodrigues és mtsai, 2015). A kétféle – fiziológias és patológias – ATP-jel mikrogliaóra gyakorolt hatása között az lehet a lényegi különbség, hogy a kis koncentrációban megjelenő ATP-t a mikroglia felszínén megtalálható nukleotidázok – NTPDase1 és CD73 (NT5E) – rendkívül gyorsan és hatékonyan képesek ADP-vé alakítani (Matyash és mtsai, 2017; Rahmaninejad és mtsai, 2020), míg ha nagyobb mennyiségben van jelen ATP, akkor annak hatása érvényesül. Erre enged következtetni a patológias ATP-koncentráció jelenlétében megfigyelhető P2Y12 receptor fehérjemennyiség csökkenése (Walker és mtsai, 2020), valamint a mikrogliaiban beinduló pro-inflammatorikus folyamatok, melyek a P2X7 receptoron keresztül ható ATP eredményei (Rodrigues és mtsai, 2015).

V.5. A P2Y12 receptor szerepe a mikroglialis fiziológiában, valamint a szomatikus junkcióban

A központi idegrendszerben található több mint 150 milliárd sejt, a köztük kialakuló kapcsolatok milliárdjai, valamint az agy kiemelkedő energiafogyasztása megköveteli a hatékony működést – azaz nehezen képzelhető el, hogy olyan folyamatok maradtak fenn az evolúció során, melyek energetikailag ne „érnék meg” a szervezetnek. A mikroglia nyúlványainak folyamatos mozgása, a sejtek nyúlványrendszerének dinamikus átépülése első ránézésre hatalmas energiaigénnyel rendelkezik, így feltételezhetően ezen folyamatok rendkívüli haszonnal is járnak – ezt bizonyítja az is, hogy korlátozott energiahozzáférés mellett, például agyi ischemia esetén vagy traumás sérülést követően is megmarad a mikroglia nyúlványainak mozgása (Ohsawa és Kohsaka, 2011; Szalay és mtsai, 2016).

A nyúlványok mozgásának alapját az aktin citoskeleton-elemek folyamatos átépülése adja (Franco-Bocanegra és mtsai, 2019). Ezt számos olyan fehérje befolyásolja, amelyek összességében a mikroglialis ion-áramokra, membránpotenciálra és jelátviteli folyamatokra gyakorolnak hatást. Így például bizonyítottan kisebb-nagyobb szerepet játszanak a nyúlványmotilitásban purinerg receptorok (P2X4R, P2Y12R, P2Y13R, adenosin receptorok), ioncsatornák (pl. THIK-1), kalciumkötő fehérjék (Iba1), kemokin

receptorok (CX3CR1), valamint horgonyzó fehérjék (β 1-integrin) (Haynes és mtsai, 2006; Hristovska és Pascual, 2016; Madry és mtsai, 2018a). Bár *ex vivo* vizsgálatok alapján felvetődött, hogy a purinerg metabolitoknak nincsen szabályozó szerepe a nyugalmi nyúlványmozgásokra (Madry és mtsai, 2018b), az egyértelmű, hogy a patológiásan felszaporodó extracelluláris ATP irányította mikroglialis kemotaxis fő mediátora a P2Y12R (Haynes és mtsai, 2006). Ezen receptor kiemelt figyelmet érdemelt ki a tudományos közösségtől, ugyanis a központi idegrendszerben kizárólag a mikrogliaiban található meg (Butovsky és mtsai, 2014; Zhang és mtsai, 2014), valamint azért is, mert a klinikai mindennapokban rutinszerűen alkalmaznak ezen receptorokat gátló farmakológiai készítményeket véralvadási profilaxis céljából (Damman és mtsai, 2012; Saito és Kobayashi, 2020). Mindezeket túl szelektív felhalmozódása a mikroglia-neuron kapcsolatok között kiemelkedő szerepet betölteni látszó szomatikus junkcióban tovább erősíti a P2Y12 receptor funkcionális jelentőségét az idegrendszeri folyamatokban. Vagyis ezen receptorok szelektív módosítása jelentős és – más szóba jöhető célpontokkal összehasonlítva – gyors transzlációs potenciállal rendelkezik.

Kimondottan ezen receptornak a „nyugalmi” nyúlványmozgásokra gyakorolt hatásával ezidáig két tanulmány foglalkozott, mindkettő arra a következtetésre jutva, hogy fiziológias körülmények között a P2Y12 receptor gátlása nem okoz változást a nyúlványok motilitásában (Madry és mtsai, 2018a; Sipe és mtsai, 2016). Azonban mindkét tanulmány esetén elhamarkodott ezen következtetés levonása, ugyanis az egyik tanulmány nem használt elegendően nagy időbeli felbontást a mozgás pontos követéséhez, hiszen 5 percenként készítettek képeket az agyszövegről (Sipe és mtsai, 2016), a másik pedig *ex vivo* akut agyszeletekben vizsgálta a nyúlványmotilitást (Madry és mtsai, 2018a), amely egy olyan, környezeti behatásokra rendkívül érzékeny sejt esetén, mint a mikroglia, semmiképpen sem nevezhető fiziológias állapotnak (Berki és mtsai, 2022). Ezen kísérletekhez képest az általunk végzett vizsgálatok *in vivo* készültek, 3-dimenzióban, nagyobb idő- és térbeli felbontással, és egyértelműen kimutatták, hogy a receptor akut gátlása, illetve krónikus hiánya alapvetően módosítja a mikroglia-nyúlványok mozgási mintázatát, amely minden bizonnyal negatív hatással van a homeosztatis, finomhangolt mikroglialis ellenőrzésre.

Energetikai szempontból szintén hátrányt jelenthet a receptor gátlására bekövetkező morfológiai változás a mikroglia nyúlványrendszerében. Az idegsejtek esetén széleskörű

ismereteink vannak arról, hogy a dendritfa morfológiája határozza meg például az ingerületvezetés és jelfeldolgozás folyamatait (Aizenman és mtsai, 2003; Zhu és mtsai, 2016). A mikroglialis nyúlványrendszer esetén egy sokkal dinamikusabban átépülő rendszerről beszélünk, mégis a fentebb taglalt energetikai szempontból nyilvánvalónak látszik, hogy a mikroglialis morfológiának van egy ideális formája, ahol a nyúlványok által végzett munkából fakadó haszon felülmúlja a sejt aktuális alakjának fenntartásához szükséges befektetett energiát. Az akut P2Y₁₂ receptor gátlás hatására bekövetkező nyúlványelágazódások és nyúlványvégződés számában is megfigyelhető növekedés feltehetően egy gyors kompenzációs válasz a mikroglia részéről. Mint láttuk, funkcionális P2Y₁₂ receptorok hiányában a mikroglia nem képes reagálni a neuronális fiziológiás és patológias változásokra, továbbá a nyúlványok mozgása is véletlenszerűbbé, kevésbé célzottá válik – a képi hasonlaltal élve „megvakult” mikroglia sejtek azon igyekeztükben, hogy homeosztatis funkciójukat ellátva továbbra is minél több sejtet tudjanak nyúlványaikkal megérinteni, hirtelen megnövelik a nyúlványok számát. Ez azonban olyan energiaigény növekedéssel járhat, mely hosszabb távon nyilvánvalóan nem fenntartható.

Ezzel összhangban a receptor krónikus hiányával létező génkiütött egerek eltérő kompenzációt mutatnak. A P2Y₁₂ receptor hiányában sérül a mikroglia-nyúlványokon keresztül megvalósuló kommunikáció, egy-egy mikroglia kevésbé hatékonyan képes nagyszámú idegsejt ellenőrzésére, így ezekben az egerekben a kérgi részeken megnövekedett számú mikroglia sejtet, ezzel együtt lecsökkent neuron/mikroglia arányt figyeltünk meg. Ezzel párhuzamosan gyakoribbá vált azon mikroglia-neuronális sejttest kapcsolatok aránya, ahol a mikroglia sejttestével érinti az idegsejtek szomatikus régióját. Ezek a szakirodalomban szatellita sejteknek nevezett mikroglia sejtek – amellet, hogy könnyen beláthatóan kevesebb idegsejtet tarthatnak ellenőrzésük alatt a sejttest-sejttest kapcsolatokon keresztül, mint a számos nyúlványuk segítségével – eltérő elektromos tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a nem-szatellita társaik (Wogram és mtsai, 2016), és evolúciós szempontból egy ősbib, kevésbé hatékony kommunikációs formát képviselnek a közvetlen sejttest-sejttest kapcsolattal. Hasonló szatellita gliasejtek gyakran figyelhetőek meg a gerincvelői gyökerekben (Zhang és mtsai, 2007), valamint a perifériás idegrendszerben (Rozanski és mtsai, 2013), ahol a megfigyelt kapcsolatok időben késedelmet szenvedő és zajos információcserét tesznek csupán lehetővé.

Ezen eltérések, amelyek funkcionális P2Y₁₂ receptor hiányában a mikroglialis fiziológiában, a mikroglia-neuron kapcsolatokban, valamint a stroke-ot követő mikroglialis válaszban bekövetkeznek egyértelműen bizonyítják ezen fehérje alapvető fontosságát az idegrendszeri folyamatokban. Az ischémias stroke-ot követő neuroprotektív mikroglialis folyamatok sérülésének komoly klinikai relevanciája lehet, ugyanis az érelzáródást követően (Bernardo-Castro és mtsai, 2020; Nian és mtsai, 2020), vagy bármilyen egyéb okból áteresztővé váló vér-agy gát (Profaci és mtsai, 2020) legfőbb funkcióját nem tudja ellátni, és a szisztémásan alkalmazott farmakonok bejuthatnak az idegszövetbe. Példának okáért a P2Y₁₂ receptort gátló antithrombotikus szerek, amelyeket éppen vaszkuláris katasztrófákat követően alkalmaznak profilaktikus szándékkal, a sérült vér-agy gáton keresztül negatív hatást fejthetnek ki a mikroglialis működésre, többek között rontva a stroke hosszútávú kimenetelét – erre utalnak legalábbis a penumbrában tett megfigyeléseink. Ezeket a szempontokat a jövőben a klinikai döntéshozás során ajánlott lenne figyelembe venni.

V.6. Az eredmények klinikai jelentősége

Mint alapkutatási kísérletsorozat, munkánk talán legégetőbb kérdése, hogy miként tudna hasznosulni a megszerzett tudás a mindennapi gyógyászatban. Az idegrendszer rendkívül specifikus, a szervezet többi részétől elzárt környezet, melyben a legkisebb változás is komoly következménnyel járhat. A neuronok a szervezet számos sejtjével ellentétben csak minimális változásokon mennek keresztül az egyed élete során, helyhez kötöttek, nem osztódnak és a felnőttkori neurogenesis is elhanyagolható mértékű az idegsejtek számához viszonyítottan, így a dinamikusan mozgó nyúlványokkal rendelkező, folyamatosan megújuló mikroglia-populáció a homeosztázist fenntartó feladatok elvégzésére lényegesen alkalmasabb. Az idegsejtek pótlása, újonnan születő neuronok hálózatba való integrálása egy-két speciális esettől eltekintve nem lehetséges, így a gliasejtek esszenciális feladata a neuronok támogatása, potenciálisan káros anyagcsere-végtermékeinek átvétele, elszállítása. A mikroglia különösen alkalmas erre a feladatra három tulajdonsága: folyamatosan megújuló populációja, magas fagocitotikus aktivitása, valamint rugalmas metabolikus képessége. A mikroglia sejtek körülbelül 28%-a minden évben lecserélődik (Réu és mtsai, 2017), és a központi idegrendszer egyéb sejtjeitől eltérően kevésbé érzékenyek a biológiai oxidáció feltételeinek megszűnésére,

ugyanis glutamint is képesek felhasználni energiaigényük fedezésére (Bernier és mtsai, 2020), amely pedig az agyban leggyakoribb ingerületátvivő anyagból, a glutamátból előállítható, így gyakorlatilag kifogyhatatlan utánpótlással rendelkezik (Zhou és Danbolt, 2014). Ezáltal az általunk is vizsgált stroke-ot követő környezetben a mikroglia tartalékai kimerüléséig képes lehet támogatni a neuronok életben maradását, akár azon az áron is, hogy magát „feláldozza”. Hasonló elven működhet a mikroglialis fagocitózis fertőzések (Fekete és mtsai, 2018), vagy apoptotikus neuronok esetében (Sierra és mtsai, 2010): a mikroglia begyűjti a sejtörmelékét, amely a sejtközi térben maradványokká gyulladást okozna, majd fagoszómáiban lebontja azokat (Villani és mtsai, 2019). Amennyiben egyidejűleg nagymennyiségű örmelékkel kell megbirkóznia egy-egy mikroglia-nak, szintén választhatja az önfeláldozást. Mindkét esetben a kulcs a mikroglia sejtek gyors pótlása, amelynek sebességére következtethetünk azokból a tanulmányokból, melyekben CSF1R-gátlószer adagolásával a mikroglia majdnem teljes deplécióját követően a drog elhagyása után két héten belül ismét a fiziológiás számú és térbeli elrendeződésű mikroglia található az agyban (Elmore és mtsai, 2015). Krónikus idegrendszeri betegségek esetén terápiás szempontból megfontolandónak tűnik az a megközelítés, melyben a kóros gyulladással állapotot fenntartó, vagy egyéb módon káros folyamatokat stimuláló mikroglia megfékezésére a szinte teljes mikroglia deplécióval járó CSF1R gátlást vetjük be – ehhez számtalan, a vér-agy gáton átjutni képes gátlószer van jelen a kutatási gyakorlatban, mint például a PLX3397, PLX5622, BLZ945, GW2850, Ki20227 vagy a JN1-40346527 (Beckmann és mtsai, 2018; Du és mtsai, 2020; Gerber és mtsai, 2018; Liu és mtsai, 2019; Mancuso és mtsai, 2019; Zhang és mtsai, 2020). A mikroglia-depletált rágcsálókban kísérletek során nem figyelhető meg nagymértékű, irreverzibilis elváltozás a kognitív funkciókban, sem viselkedési vizsgálatok során (Elmore és mtsai, 2015). A depléció drog megvonását követően napok alatt helyreáll az eredeti sejtszám, illetve a mikroglia eloszlása is az eredetihez hasonlóvá válik (Elmore és mtsai, 2015, 2018).

Elsősorban olyan neurológiai kórképekben lehet opció a mikroglia teljes eltávolítása, amelyek patofiziológiájában a sejtek egyértelműen káros aktorként szerepelnek: ilyen a Nasu-Hakola betegség, vagy a CSF1R-függő leukoencefalopátia (Konno és mtsai, 2018; Neumann és Takahashi, 2007). Ezekben a kórképekben túl is biztató eredményeket mutat ez a terápiás megközelítés: idős egerekben a repopulációt követően megnőtt a hippocampális neurogenesis és a szinaptogenesis mértéke, emellett javult az állatok

térbeli tanulóképessége is (Elmore és mtsai, 2018). *Ex vivo* agyszeletben van rá bizonyíték, hogy a mesterségesen indukált proinflammatorikus környezet mikrogliá depléció és repopuláció hatására normalizálódik (Barnett és mtsai, 2021). A repopuláció forrásául a CSF1R gátlását túlélő rezidens mikrogliá sejtek szolgálnak, keringő myeloid sejtek a korábban gondoltakkal ellentétben nem vesznek részt ebben (Huang és mtsai, 2018). Ebből fakadóan, amennyiben ezek a rezidens sejtek is hordoznak valamilyen genetikai mutációt, úgy nem várható javulás a depléciós terápiától, azonban ezekben az esetekben a repopuláció történhet külső forrásból is: elképzelhető lenne heterológ donor-mikrogliá bevitele, vagy akár pluripotens őssejtekből differenciáltatott sejtek használata is. Természetesen ezek a kutatások kezdeti fázisban tartanak, és alkalmazásuk széleskörű körültekintést fog igényelni, kiemelt figyelemmel a depléció idegrendszeri következményeire. Szintén kiemelt jelentőségű a depléció időzítése, ugyanis közvetlenül traumás agysérülést követően patkányokon végzett depléciós-repopulációs beavatkozás rontotta a kognitív kimenetelt (Hanlon és mtsai, 2019).

A teljes idegrendszerre kiterjedő mikrogliá-depléciónál szofisztikáltabb terápiás lehetőséget kínálhat a lokális beavatkozás. Ennek egy rendkívül fontos lépése lehet a jelen dolgozatban bemutatott kutatásunkban feltárt szomatikus mikrogliá-neuron kapcsolat, amely kiemelkedő kommunikációs felszínnek bizonyult a neuronális szabályzásban. Természetesen hosszú út vezet még a szomatikus junkciót érintő ismereteink transzlációs hasznosulásáig – többek között az agykérgen és a hippocampuson túl a többi agyi régióban is szükséges megvizsgálni ezen kapcsolatokat –, azonban a jelátviteli útvonalak feltárása, valamint a neurológiai kórképekben történő változások feltérképezése a személyre szabott, célzott terápia ígéretét hordozza.

VI. Következtetések

A mikroglia az agy rezidens immunsejtjeként a központi idegrendszer elsődleges védvonalát jelenti patológias behatások esetén. Emellett számos idegrendszeri folyamat szabályzásában is részt vesz, azonban a szakirodalomban fellelhető adatok alapján ismert közvetlen, valamint közvetett mikroglia-idegsejt kommunikációs útvonalak nem szolgálnak kielégítő magyarázattal a mikroglia idegsejtekre gyakorolt precíz és szoros kontrolljára. Kísérleteink során feltártuk, hogy a sokszínű mikroglia-neuron kommunikációban létezik egy, a szinaptikus profilokat érintő közvetlen mikrogliális kapcsolatoknál robusztusabb beavatkozásra lehetőséget adó interakciós felszín, mely a mikroglia dinamikusan mozgó nyúlványai és az idegsejtek sejtteste között alakul ki. *In vivo* méréseink szerint ezek a kapcsolatok lényegesen hosszabb ideig állnak fent, mint az idegsejtek neuritjait érintő mikrogliális kapcsolatok, és adott időpillanatban – mind egérben, mind emberi idegszövetben, fenotípustól függetlenül – az agykérgi idegsejtek mintegy 90%-án jelen vannak, és már a fejlődő idegrendszerben, a poszt-mitotikus neuronok felszínén is megtalálhatóak. A szomatikus junkciónak a neuronális oldalát speciális ultrastruktúra jellemzi: a principális sejtekben az exo-, illetve endocitózis helyét biztosító Kv-fehérjeklaszterek, membránhoz horgonyzott endoplazmás retikulum szakaszok, purinerg metabolitot tartalmazó, valamint lizoszomális vezikulumok, illetve a szomatikus mitokondriumok közeli jelenléte figyelhető meg. A kapcsolatot kialakító mikroglia-nyúlványok membránjában a purinerg P2Y12 receptor kapcsolat-függő feldúsulását is megmutattuk, csakúgy, mint a purinerg metabolitok extracelluláris bontását biztosító ektonukleotidázok jelenlétét. A P2Y12 receptorok akut gátlása a szomatikus junkció fennállásának idejét lerövidíti, a mikroglia P2Y12 receptor-függő módon reagál az idegsejtek megnövekedett aktivitására, továbbá akut ischémiás stroke-ot követő neuroprotektív hatásához is elengedhetetlen ez a receptor. Érdekes új eredmény továbbá, hogy a P2Y12 receptor a mikroglia-neuron kommunikációban betöltött kiemelt szerepén túl a mikrogliális fiziológiára is alapvető hatással bír, akut gátlása ugyanis nagymértékben csökkenti a nyúlványmozgások irányítottságát, valamint mind az akut, mind a krónikus receptorfunkció-hiány növeli a mikroglia-nyúlványok számát. A receptor krónikus hiányában megfigyelhető kompenzációs mechanizmusok – több

mikroglia az agykéregben, valamint a szatellita mikroglia arányának növekedése – tovább erősítik a P2Y₁₂R fiziológiai szerepét.

Összességében ez a rendkívül gyakori, emberben is megtalálható közvetlen kapcsolat a mikroglia és az idegsejtek legfontosabb szabályzó régiója között alapvető fontosságúnak tűnik az idegrendszeri folyamatok szabályozásában. A neurodegeneratív betegségekben ismert mikrogliális érintettséget figyelembe véve a közeljövő kutatásainak legfontosabb kérdése, hogy változnak-e ezek a kapcsolatok a különböző patológiás állapotokban, és amennyiben igen, úgy az adott változás egy reakció a kóros folyamatokra, vagy éppen a kórfolyamatok beindulásának fontos eleme.

VII. Összefoglalás

Az elmúlt években robbanásszerűen bővültek ismereteink a mikroglia, a központi idegrendszer rezidens immunsejtjeinek fiziológiás idegrendszeri folyamatokra gyakorolt hatásáról. Ezek a funkciók az idegsejtek feletti szoros mikroglialis kontrollt feltételeznek, azonban a szakirodalomban fellelhető közvetett, valamint szinaptikus struktúrákat érintő közvetlen mikroglia-neuron kapcsolatok nem alkalmasak ennek megvalósítására.

Munkánk során feltártunk egy eddig ismeretlen kapcsolatot a mikroglia dinamikus mozgó nyúlványai és az idegsejtek sejtteste között. Ezen kapcsolatok lényegesen hosszabb ideig állnak fenn, mint a szinaptikus profilokat érintő mikroglia-nyúlványok esetén, és mind emberben, mind egerekben az agykérgi idegsejtek mintegy 90%-án megtalálhatóak adott időpillanatban. A szomatikus junkciónak nevezett kapcsolat sajátos ultrastruktúrával bír, mely lehetővé teszi a kétirányú kommunikációt a mikroglia és az idegsejtek között, valamint lehetőséget nyújt a mikroglia számára, hogy közvetlenül monitorozza a neuronokban lezajló aktuális történéseket. Kísérleteink során azt is bebizonyítottuk, hogy a mikroglia képes érzékelni a neuronok megnövekedett aktivitását, és akut agyi keringési zavart követően neuroprotektív szerepet tölt be ezen kapcsolatokon keresztül. A szomatikus junkción keresztül megvalósuló intercelluláris kommunikáció a mikroglia idegrendszeri fejlődésre gyakorolt hatásaiért is felelős lehet, ugyanis a posztmitotikus idegsejteken is megtalálható.

A központi idegrendszerben mikroglia-specifikus P2Y₁₂ receptor célzottan felhalmozódik a szomatikus junkcióban, és a neuronális változásokra adott mikroglialis reakció fontos regulátorának bizonyult. Emiatt ezen fehérje manipulálása terápiás potenciállal bírhat, azonban rendkívül körültekintően kell eljárni, ugyanis megmutattuk, hogy a P2Y₁₂ receptor akut és krónikus gátlása alapvetően befolyásolja a mikroglia-nyúlványok mozgását, a sejtek morfológiáját, valamint a mikroglia-idegsejt kapcsolatokat is, változatos kompenzációs mechanizmusokat kiváltva.

Összességében munkánk során feltártunk egy olyan speciális kommunikációs felszínt, melyen keresztül a mikroglia mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között befolyásolhatja az idegsejteket. A kapcsolat megértése új frontot nyithat az idegrendszeri rendellenességek terápiás megközelítésében.

VIII. Summary

In recent years, our knowledge about the effect of microglia, the resident immune cells of the brain on physiological neuronal processes increased explosively. These require a strict microglial control of neuronal functions, however, formerly discovered indirect, and synaptic profile-related direct microglia-neuron interactions do not provide sufficient basis for these actions.

During our work we uncovered a formerly unknown contact type, established between rapidly moving microglial processes and the cell body of neurons. These connections exist for a substantially longer time, than those established by microglial processes on synaptic profiles, and are present on about 90% of cortical neurons at a given moment of time in both human and mice. These contact sites, termed somatic junctions, possess a specific ultrastructure that enables bidirectional communication between microglia and neurons, and provides the opportunity for microglia to directly monitor ongoing neuronal processes and actions. Our experiments also proved that microglia are able to sense increased neuronal activity, and exert neuroprotective roles through these contacts following acute cerebral ischemia. Intercellular communication at somatic junctions might also serve as the basis for microglial influence on the developing nervous system, as these type of contacts are also present on post-mitotic neurons.

P2Y₁₂ receptors are microglia-specific in the central nervous system, and were found to accumulate in somatic junctions, where they mediate microglial modulatory responses on neurons. Therefore, manipulation of this protein may carry therapeutic potential, but should be used prudently, since we showed that acute and chronic inhibition of P2Y₁₂ receptors fundamentally alters the movement of microglial processes, the morphology of these cells, and microglia-neuron interactions itself, triggering diverse compensatory mechanisms.

In summary, our research uncovered a specific communication site, through which microglia are able to modify neuronal activity and responses under both physiological and pathological conditions. A better understanding of these contacts may facilitate the identification of novel therapeutic targets for common neurological disorders.

IX. Irodalomjegyzék

- Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SLB, Persson MA (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15983–15988.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19–29.
- Agostinho P, Madeira D, Dias L, Simões AP, Cunha RA, Canas PM (2020) Purinergic signaling orchestrating neuron-glia communication. *Pharmacol Res* 162:105253.
- Aguzzi A, Zhu C (2017) Microglia in prion diseases. *J Clin Invest* 127:3230–3239.
- Aizenman CD, Huang EJ, Linden DJ (2003) Morphological Correlates of Intrinsic Electrical Excitability in Neurons of the Deep Cerebellar Nuclei. *J Neurophysiol* 89:1738–1747.
- Akiyoshi R, Wake H, Kato D, Horiuchi H, Ono R, Ikegami A, Haruwaka K, Omori T, Tachibana Y, Moorhouse AJ, Nabekura J (2018) Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization. *eneuro* 5:ENEURO.0088-18.2018.
- Allen NJ, Eroglu C (2017) Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96:697–708.
- Althammer F, Ferreira-Neto HC, Rubaharan M, Roy RK, Patel AA, Murphy A, Cox DN, Stern JE (2020) Three-dimensional morphometric analysis reveals time-dependent structural changes in microglia and astrocytes in the central amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus of heart failure rats. *J Neuroinflammation* 17:221.
- Anderson RM, Hadjichrysanthou C, Evans S, Wong MM (2017) Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer’s disease fail? *Lancet (London, England)* 390:2327–2329.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci* 104:5163–5168.
- Arnold T, Betsholtz C (2013) The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell* 5:4.
- Arnoux I, Hoshiko M, Mandavy L, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2013) Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of

- the somatosensory “Barrel” cortex. *Glia* 61:1582–1594.
- Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, Sierra A, Molnár Z, Cragg MS, Garaschuk O, Perry VH, Gomez-Nicola D (2017) Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep* 18:391–405.
- Baalman K, Marin MA, Ho TS-Y, Godoy M, Cherian L, Robertson C, Rasband MN (2015) Axon Initial Segment-Associated Microglia. *J Neurosci* 35:2283–2292.
- Badimon A, Strasburger HJ, Ayata P, Chen X, Nair A, Ikegami A, Hwang P, Chan AT, Graves SM, Uweru JO, Ledderose C, Kutlu MG, Wheeler MA, Kahan A, Ishikawa M, Wang Y-C, Loh Y-HE, Jiang JX, Surmeier DJ, Robson SC, Junger WG, Sebra R, Calipari ES, Kenny PJ, Eyo UB, Colonna M, Quintana FJ, Wake H, Gradinaru V, Schaefer A. (2020) Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature* 586:417–423.
- Bajwa E, Pointer CB, Klegeris A (2019) The Role of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Chronic Neuroinflammation. *Mediators Inflamm* 2019:1–11.
- Barnett A, Crews F, Coleman L (2021) Microglial depletion and repopulation: a new era of regenerative medicine? *Neural Regen Res* 16:1204.
- Barros CS, Franco SJ, Muller U (2011) Extracellular Matrix: Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a005108–a005108.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of Synaptic Strength by Glial TNF α . *Science* (80-) 295:2282–2285.
- Beckmann N, Giorgetti E, Neuhaus A, Zurbrugg S, Accart N, Smith P, Perdoux J, Perrot L, Nash M, Desrayaud S, Wipfli P, Frieauff W, Shimshek DR (2018) Brain region-specific enhancement of remyelination and prevention of demyelination by the CSF1R kinase inhibitor BLZ945. *Acta Neuropathol Commun* 6:9.
- Benakis C, Martin-Gallausiaux C, Trezzi J-P, Melton P, Liesz A, Wilmes P (2020) The microbiome-gut-brain axis in acute and chronic brain diseases. *Curr Opin Neurobiol* 61:1–9.
- Bender KJ, Trussell LO (2012) The Physiology of the Axon Initial Segment. *Annu Rev Neurosci* 35:249–265.
- Benusa SD, Lafrenaye AD (2020) Microglial process convergence on axonal segments in health and disease. *Neuroimmunol neuroinflammation* 7:23–39.
- Berki P, Cserép C, Pósfai B, Szabadits E, Környei Z, Kellermayer A, Nyerges M, Gulyás

- AI, Dénes Á (2022) Rapid microglial phenotype changes modulate neuronal networks and sharp wave-ripple activity in acute slice preparations. *bioRxiv*:2022.04.12.487998.
- Bernardo-Castro S, Sousa JA, Brás A, Cecília C, Rodrigues B, Almendra L, Machado C, Santo G, Silva F, Ferreira L, Santana I, Sargento-Freitas J (2020) Pathophysiology of Blood–Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Front Neurol* 11.
- Bernier L-P, York EM, Kamyabi A, Choi HB, Weilinger NL, MacVicar BA (2020) Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma. *Nat Commun* 11:1559.
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233–238.
- Biber K, Laurie DJ, Berthele A, Sommer B, Tölle TR, Gebicke-Härter P-J, Van Calker D, Boddeke HWGM (2001) Expression and Signaling of Group I Metabotropic Glutamate Receptors in Astrocytes and Microglia. *J Neurochem* 72:1671–1680.
- Biever A, Donlin-Asp PG, Schuman EM (2019) Local translation in neuronal processes. *Curr Opin Neurobiol* 57:141–148.
- Bilimoria PM, Stevens B (2015) Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res* 1617:7–17.
- Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, De Marchi E, Suski JM, Bononi A, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Wieckowski MR, Pinton P (2012) ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* 8:343–357.
- Böttcher C, Schlickeiser S, Sneeboer MAM, Kunkel D, Knop A, Paza E, Fidzinski P, Kraus L, Snijders GJL, Kahn RS, Schulz AR, Mei HE, Hol EM, Siegmund B, Glaubien R, Spruth EJ, de Witte LD, Priller J (2019) Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci* 22:78–90.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47–67.
- Breda CN de S, Davanzo GG, Basso PJ, Saraiva Câmara NO, Moraes-Vieira PMM (2019) Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox Biol* 26:101255.
- Brown KM, Gillette TA, Ascoli GA (2008) Quantifying neuronal size: summing up trees and splitting the branch difference. *Semin Cell Dev Biol* 19:485–493.

- Buratta S, Tancini B, Sagini K, Delo F, Chiaradia E, Urbanelli L, Emiliani C (2020) Lysosomal Exocytosis, Exosome Release and Secretory Autophagy: The Autophagic- and Endo-Lysosomal Systems Go Extracellular. *Int J Mol Sci* 21:2576.
- Burnstock G (2018) Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv* 2:2398212818817494.
- Burnstock G (2020) Introduction to Purinergic Signaling. In: *Methods in Molecular Biology*, pp 1–15.
- 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, Weiner HL (2014) Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17:131–143.
- Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9:110–122.
- Cabral-Costa J V, Kowaltowski AJ (2020) Neurological disorders and mitochondria. *Mol Aspects Med* 71:100826.
- Chandel NS (2014) Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol* 12:34.
- Chen WW, Zhang X, Huang WJ (2016) Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep* 13:3391–3396.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11:98.
- Cioni J-M, Koppers M, Holt CE (2018) Molecular control of local translation in axon development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol* 51:86–94.
- Citri A, Malenka RC (2008) Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:18–41.
- Clark AK, Gruber-Schoffnegger D, Drdla-Schutting R, Gerhold KJ, Malcangio M, Sandkuhler J (2015) Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength. *J Neurosci* 35:4552–4570.
- Clark BD, Goldberg EM, Rudy B (2009) Electrogenic Tuning of the Axon Initial Segment. *Neurosci* 15:651–668.
- Cogliati S, Enriquez JA, Scorrano L (2016) Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci* 41:261–273.
- Cogut V, Brintjes JJ, Eggen BJL, van der Zee EA, Henning RH (2018) Brain inflammatory cytokines and microglia morphology changes throughout hibernation

- phases in Syrian hamster. *Brain Behav Immun* 68:17–22.
- Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017–1021.
- Craik FIM, Bialystok E (2006) Cognition through the lifespan: mechanisms of change. *Trends Cogn Sci* 10:131–138.
- Crapser JD, Spangenberg EE, Barahona RA, Arreola MA, Hohsfield LA, Green KN (2020) Microglia facilitate loss of perineuronal nets in the Alzheimer's disease brain. *EBioMedicine* 58:102919.
- Császár E, Lénárt N, Cserép C, Környei Z, Fekete R, Pósfai B, Balázsfői D, Hangya B, Schwarcz AD, Szabadits E, Szöllősi D, Szigeti K, Máthé D, West BL, Sviatkó K, Brás AR, Mariani J-C, Kliewer A, Lenkei Z, Hricisák L, Benyó Z, Baranyi M, Sperlágh B, Menyhárt Á, Farkas E, Dénes Á (2022) Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. *J Exp Med* 219.
- 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, Dénes Á (2020) Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science* 367:528–537.
- Cserép C, Pósfai B, Dénes Á (2021a) Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron* 109:222–240.
- Cserép C, Pósfai B, Schwarcz AD, Dénes Á (2018) Mitochondrial Ultrastructure Is Coupled to Synaptic Performance at Axonal Release Sites. *neuro* 5:ENEURO.0390-17.2018.
- Cserép C, Schwarcz AD, Pósfai B, László ZI, Kellermayer A, Nyerges M, Lele Z, Katona I, Dénes Á (2021b) Somatic junctions connect microglia and developing neurons. *bioRxiv*:2021.03.25.436920.
- Csordás G, Weaver D, Hajnóczky G (2018) Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends Cell Biol* 28:523–540.
- Dahl G (2015) ATP release through pannexon channels. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 370:20140191.
- Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, González B, Castellano B (1998) Development of

- microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8:458–474.
- Damisah EC, Hill RA, Rai A, Chen F, Rothlin C V., Ghosh S, Grutzendler J (2020) Astrocytes and microglia play orchestrated roles and respect phagocytic territories during neuronal corpse removal in vivo. *Sci Adv* 6.
- Damman P, Woudstra P, Kuijt WJ, de Winter RJ, James SK (2012) P2Y12 platelet inhibition in clinical practice. *J Thromb Thrombolysis* 33:143–153.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9:46–56.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V., Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W-B (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752–758.
- de Castro F (2019) Cajal and the Spanish Neurological School: Neuroscience Would Have Been a Different Story Without Them. *Front Cell Neurosci* 13.
- De Picker LJ, Morrens M, Chance SA, Boche D (2017) Microglia and Brain Plasticity in Acute Psychosis and Schizophrenia Illness Course: A Meta-Review. *Front Psychiatry* 8.
- Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon Physiology. *Physiol Rev* 91:555–602.
- Denes A, Humphreys N, Lane TE, Grecis R, 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.
- Depboylu C, Stricker S, Ghobril J-P, Oertel WH, Priller J, Höglinger GU (2012) Brain-resident microglia predominate over infiltrating myeloid cells in activation, phagocytosis and interaction with T-lymphocytes in the MPTP mouse model of Parkinson disease. *Exp Neurol* 238:183–191.
- Deutsch E, Weigel A V., Akin EJ, Fox P, Hansen G, Haberkorn CJ, Loftus R, Krapf D, Tamkun MM (2012) Kv2.1 cell surface clusters are insertion platforms for ion channel delivery to the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 23:2917–2929.
- Devin A, Rigoulet M (2007) Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am J Physiol Physiol* 292:C52–C58.
- Diaz-Aparicio I, Paris I, Sierra-Torre V, Plaza-Zabala A, Rodríguez-Iglesias N, Márquez-Ropero M, Beccari S, Huguet P, Abiega O, Alberdi E, Matute C, Bernales I, Schulz

- A, Otrókocsi L, Sperlagh B, Happonen KE, Lemke G, Maletic-Savatic M, Valero J, Sierra A (2020) Microglia Actively Remodel Adult Hippocampal Neurogenesis through the Phagocytosis Secretome. *J Neurosci* 40:1453–1482.
- Dissing-Olesen L, LeDue JM, Rungta RL, Hefendehl JK, Choi HB, MacVicar BA (2014) Activation of Neuronal NMDA Receptors Triggers Transient ATP-Mediated Microglial Process Outgrowth. *J Neurosci* 34:10511–10527.
- Dobrenis K, Makman MH, Stefano GB (1995) Occurrence of the opiate alkaloid-selective μ_3 receptor in mammalian microglia, astrocytes and Kupffer cells. *Brain Res* 686:239–248.
- Doens D, Fernández PL (2014) Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* 11:48.
- Donato A, Kagias K, Zhang Y, Hilliard MA (2019) Neuronal sub-compartmentalization: a strategy to optimize neuronal function. *Biol Rev* 94:1023–1037.
- Dowdall MJ, Boyne AF, Whittaker VP (1974) Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J* 140:1–12.
- Du X, Xu Y, Chen S, Fang M (2020) Inhibited CSF1R Alleviates Ischemia Injury via Inhibition of Microglia M1 Polarization and NLRP3 Pathway. *Neural Plast* 2020:1–11.
- Elmer BM, Estes ML, Barrow SL, McAllister AK (2013) MHCI Requires MEF2 Transcription Factors to Negatively Regulate Synapse Density during Development and in Disease. *J Neurosci* 33:13791–13804.
- Elmore MRP, Hohsfield LA, Kramár EA, Soreq L, Lee RJ, Pham ST, Najafi AR, Spangenberg EE, Wood MA, West BL, Green KN (2018) Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell* 17:e12832.
- Elmore MRP, Lee RJ, West BL, Green KN (2015) Characterizing Newly Repopulated Microglia in the Adult Mouse: Impacts on Animal Behavior, Cell Morphology, and Neuroinflammation Langmann T, ed. *PLoS One* 10:e0122912.
- Elmore MRP, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, 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.
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of Colony Stimulation Factor-1 Receptor Results in Loss of Microglia, Disrupted Brain

- Development and Olfactory Deficits Meisel A, ed. PLoS One 6:e26317.
- Evans RJ, Derkach V, Surprenant A (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357:503–505.
- Eyo UB, Gu N, De S, Dong H, Richardson JR, Wu L-J (2015) Modulation of Microglial Process Convergence Toward Neuronal Dendrites by Extracellular Calcium. *J Neurosci* 35:2417–2422.
- Eyo UB, Mo M, Yi M-H, Murugan M, Liu J, Yarlagadda R, Margolis DJ, Xu P, Wu L-J (2018) P2Y₁₂R-Dependent Translocation Mechanisms Gate the Changing Microglial Landscape. *Cell Rep* 23:959–966.
- Eyo UB, Peng J, Swiatkowski P, Mukherjee A, Bispo A, 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.
- Faroqi AH, Lim MJ, Kee EC, Lee JH, Burgess JD, Chen R, Di Virgilio F, Delenclos M, McLean PJ (2021) In Vivo Detection of Extracellular Adenosine Triphosphate in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 38:655–664.
- Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50:477–486.
- Feigin VL, Nichols E, GBD 2016 Neurology Collaborators, Naghavi M, Murray CJL, Vos T (2019) Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 18:459–480.
- Feinshreiber L, Singer-Lahat D, Ashery U, Lotan I (2009) Voltage-gated Potassium Channel as a Facilitator of Exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 1152:87–92.
- Fekete R, Cserép C, Lénárt N, Tóth K, Orsolits B, Martinecz B, Méhes E, Szabó B, Németh V, Gönci B, Sperlág B, Boldogkői Z, Kittel Á, Baranyi M, Ferenczi S, Kovács K, Szalay G, Rózsa B, Webb C, Kovacs GG, Hortobágyi T, West BL, Környei Z, Dénes Á (2018) Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y₁₂ signalling and recruit monocytes through P2Y₁₂-independent mechanisms. *Acta Neuropathol* 136:461–482.
- Ferguson SM (2019) Neuronal lysosomes. *Neurosci Lett* 697:1–9.
- Ferreira R, Santos T, Gonçalves J, Baltazar G, Ferreira L, Agasse F, Bernardino L (2012) Histamine modulates microglia function. *J Neuroinflammation* 9:90.
- Fields RD (2011) Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling. *Semin Cell Dev Biol* 22:214–219.

- Filiano AJ, Gadani SP, Kipnis J (2017) How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain? *Nat Rev Neurosci* 18:375–384.
- Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT (2011) Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Iontropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission Block M, ed. *PLoS One* 6:e15973.
- Fox PD, Haberkorn CJ, Akin EJ, Seel PJ, Krapf D, Tamkun MM (2015) Induction of stable ER-plasma-membrane junctions by Kv2.1 potassium channels. *J Cell Sci* 128:2096–2105.
- Frade JM, Barde Y-A (1998) Microglia-Derived Nerve Growth Factor Causes Cell Death in the Developing Retina. *Neuron* 20:35–41.
- Franco-Bocanegra, McAuley, Nicoll, Boche (2019) Molecular Mechanisms of Microglial Motility: Changes in Ageing and Alzheimer’s Disease. *Cells* 8:639.
- Franco R, Fernández-Suárez D (2015) Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 131:65–86.
- Fuller JP, Stavenhagen JB, Teeling JL (2014) New roles for Fc receptors in neurodegeneration-the impact on Immunotherapy for Alzheimer’s Disease. *Front Neurosci* 8.
- Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J (2015) Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron* 87:47–62.
- Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G (2012) Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:780–788.
- Gao F, Zhang J (2018) Mitochondrial quality control and neurodegenerative diseases. *Neuronal Signal* 2.
- Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: Intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Rev* 20:269–287.
- Geloso MC, Corvino V, Marchese E, Serrano A, Michetti F, D’Ambrosi N (2017) The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Aging Neurosci* 9.
- Gerber YN, Saint-Martin GP, Bringuier CM, Bartolami S, Goze-Bac C, Noristani HN, Perrin FE (2018) CSF1R Inhibition Reduces Microglia Proliferation, Promotes Tissue Preservation and Improves Motor Recovery After Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci* 12.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ,

- Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* (80-) 330:841–845.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin Is a Microtubule-Associated Protein and Is Expressed Widely by Migrating Neurons. *Neuron* 23:257–271.
- Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ (2007) Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci* 104:6828–6833.
- Goldlust EJ, Paczynski RP, He YY, Hsu CY, Goldberg MP (1996) Automated Measurement of Infarct Size With Scanned Images of Triphenyltetrazolium Chloride–Stained Rat Brains. *Stroke* 27:1657–1662.
- Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Epelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FM V, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M (2016) Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* 17:797–805.
- Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH (2013) Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* 33:2481–2493.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald H-R (2015) Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518:547–551.
- Gonzalez-Pena D, Nixon SE, O'Connor JC, Southey BR, Lawson MA, McCusker RH, Borrás T, Machuca D, Hernandez AG, Dantzer R, Kelley KW, Rodriguez-Zas SL (2016) Microglia Transcriptome Changes in a Model of Depressive Behavior after Immune Challenge Ahuja SK, ed. *PLoS One* 11:e0150858.
- Gottlieb M, Matute C (1997) Expression of Iontropic Glutamate Receptor Subunits in Glial Cells of the Hippocampal CA1 Area following Transient Forebrain Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:290–300.
- Gouveia A, Bajwa E, Klegeris A (2017) Extracellular cytochrome c as an intercellular signaling molecule regulating microglial functions. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1861:2274–2281.
- Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, McColl BW (2016) Microglial brain region–dependent diversity and

- selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* 19:504–516.
- Gu N, Eyo UB, Murugan M, Peng J, Matta S, Dong H, Wu L-J (2016) Microglial P2Y₁₂ receptors regulate microglial activation and surveillance during neuropathic pain. *Brain Behav Immun* 55:82–92.
- Gülke E, Gelderblom M, Magnus T (2018) Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther Adv Neurol Disord* 11:175628641877425.
- Guzman-Martinez L, Maccioni RB, Andrade V, Navarrete LP, Pastor MG, Ramos-Escobar N (2019) Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. *Front Pharmacol* 10.
- Gyoneva S, Davalos D, Biswas D, Swanger SA, Garnier-Amblard E, Loth F, Akassoglou K, Traynelis SF (2014) Systemic inflammation regulates microglial responses to tissue damage in vivo. *Glia* 62:1345–1360.
- 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, 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.
- Hanlon LA, Raghupathi R, Huh JW (2019) Depletion of microglia immediately following traumatic brain injury in the pediatric rat: Implications for cellular and behavioral pathology. *Exp Neurol* 316:39–51.
- Harnett MT, Makara JK, Spruston N, Kath WL, Magee JC (2012) Synaptic amplification by dendritic spines enhances input cooperativity. *Nature* 491:599–602.
- Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J, Wake H (2019) Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun* 10:5816.
- Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, Ji X, Lo EH (2016) Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535:551–555.
- Hayashi Y, Ishibashi H, Hashimoto K, Nakanishi H (2006) Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia* 53:660–668.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan W-B, Julius D (2006) The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat*

- Neurosci 9:1512–1519.
- Heindl S, Gesierich B, Benakis C, Llovera G, Duering M, Liesz A (2018) Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. *Front Cell Neurosci* 12:106.
- Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* 3.
- Hewett SJ, Jackman NA, Claycomb RJ (2012) Interleukin-1 β in Central Nervous System Injury and Repair. *Eur J Neurodegener Dis* 1:195–211.
- Higley MJ, Sabatini BL (2008) Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron* 59:902–913.
- Ho T, Jobling AI, Greferath U, Chuang T, Ramesh A, Fletcher EL, Vessey KA (2015) Vesicular expression and release of ATP from dopaminergic neurons of the mouse retina and midbrain. *Front Cell Neurosci* 9:389.
- Hobert O, Carrera I, Stefanakis N (2010) The molecular and gene regulatory signature of a neuron. *Trends Neurosci* 33:435–445.
- Hoffmann K, Baqi Y, Morena MS, Glänzel M, Müller CE, von Kügelgen I (2009) Interaction of New, Very Potent Non-Nucleotide Antagonists with Arg256 of the Human Platelet P2Y₁₂ Receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 331:648–655.
- Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rózsa B, Kulik A, Watanabe M, Nusser Z (2012) Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat Neurosci* 15:988–997.
- Hollopeter G, Jantzen H-M, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang R-B, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202–207.
- Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, Lemere CA, Selkoe DJ, Stevens B (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* (80-) 352:712–716.
- Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012) Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *J Neurosci* 32:15106–15111.
- Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD (2004) The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med* 4:131–136.
- Hristovska I, Pascual O (2016) Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Front Integr Neurosci* 9.

- Huang CY-M, Rasband MN (2018) Axon initial segments: structure, function, and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1420:46–61.
- Huang Y, Smith DE, Ibanez-Sandoval O, Sims JE, Friedman WJ (2011) Neuron-Specific Effects of Interleukin-1 Are Mediated by a Novel Isoform of the IL-1 Receptor Accessory Protein. *J Neurosci* 31:18048–18059.
- Huang Y, Xu Z, Xiong S, Sun F, Qin G, Hu G, Wang J, Zhao L, Liang Y-X, Wu T, Lu Z, Humayun MS, So K-F, Pan Y, Li N, Yuan T-F, Rao Y, Peng B (2018) Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat Neurosci* 21:530–540.
- Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, Verkhatsky A, Sperlagh B, Yu S-G, Huang C, Tang Y (2021) From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6:162.
- Huttenlocher PR, Dabholkar AS (1997) Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 387:167–178.
- Jacobson KA, Delicado EG, Gachet C, Kennedy C, Kügelgen I, Li B, Miras-Portugal MT, Novak I, Schöneberg T, Perez-Sen R, Thor D, Wu B, Yang Z, Müller CE (2020) Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol* 177:2413–2433.
- James G, Butt AM (2002) P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca²⁺ signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 447:247–260.
- Jarvis MF, Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56:208–215.
- Ji K, Miyauchi J, Tsirka SE (2013) Microglia: An Active Player in the Regulation of Synaptic Activity. *Neural Plast* 2013:1–9.
- Jiang B, Sun X, Cao K, Wang R (2002) Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Mol Cell Biochem* 238:69–79.
- Jin HS, Suh H-W, Kim S-J, Jo E-K (2017) Mitochondrial Control of Innate Immunity and Inflammation. *Immune Netw* 17:77.
- Jing F, Zhang Y, Long T, He W, Qin G, Zhang D, Chen L, Zhou J (2019) P2Y₁₂ receptor mediates microglial activation via RhoA/ROCK pathway in the trigeminal nucleus caudalis in a mouse model of chronic migraine. *J Neuroinflammation* 16:217.
- Johnson B, Leek AN, Tamkun MM (2019) Kv2 channels create endoplasmic reticulum / plasma membrane junctions: a brief history of Kv2 channel subcellular localization. *Channels* 13:88–101.

- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106–4114.
- Jung Y-J, Chung W-S (2018) Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomol Ther (Seoul)* 26:350–357.
- Justice JA, Schulien AJ, He K, Hartnett KA, Aizenman E, Shah NH (2017) Disruption of Kv2.1 somato-dendritic clusters prevents the apoptogenic increase of potassium currents. *Neuroscience* 354:158–167.
- Karagas NE, Venkatachalam K (2019) Roles for the Endoplasmic Reticulum in Regulation of Neuronal Calcium Homeostasis. *Cells* 8:1232.
- Karve IP, Taylor JM, Crack PJ (2016) The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 173:692–702.
- Kastner P, Chan S (2008) PU.1: A crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* 40:22–27.
- Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman AM, Nabekura J (2016) Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. *eneuro* 3:ENEURO.0004-16.2016.
- Kauffmanstein G, Hechler B, Cazenave J-P, Gachet C (2004) Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y₁₂ receptor. *J Thromb Haemost* 2:1980–1988.
- Kemphorne L, Yoon H, Madore C, Smith S, Wszolek ZK, Rademakers R, Kim J, Butovsky O, Dickson DW (2020) Loss of homeostatic microglial phenotype in CSF1R-related Leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol Commun* 8:72.
- Keogh MJ, Chinnery PF (2015) Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1847:1401–1411.
- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of Microglia. *Physiol Rev* 91:461–553.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* 77:10–18.
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors

- via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16:273–280.
- Kierdorf K, Prinz M (2017) Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127:3201–3209.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol* 258:5–16.
- Kim YS, Joh TH (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* 38:333–347.
- Kitayama M, Ueno M, Itakura T, Yamashita T (2011) Activated Microglia Inhibit Axonal Growth through RGMa Minami M, ed. *PLoS One* 6:e25234.
- Kole MHP, Ilschner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, Stuart GJ (2008) Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* 11:178–186.
- Konno T, Kasanuki K, Ikeuchi T, Dickson DW, Wszolek ZK (2018) CSF1R -related leukoencephalopathy. *Neurology* 91:1092–1104.
- Korge P, Honda HM, Weiss JN (2002) Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: Implications for ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci* 99:3312–3317.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312–318.
- Kuhn SA, van Landeghem FK., Zacharias R, Färber K, Rappert A, Pavlovic S, Hoffmann A, Nolte C, Kettenmann H (2004) Microglia express GABA B receptors to modulate interleukin release. *Mol Cell Neurosci* 25:312–322.
- Latini S, Pedata F (2008) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79:463–484.
- Lee H, Brott BK, Kirkby LA, Adelson JD, Cheng S, Feller MB, Datwani A, Shatz CJ (2014) Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db. *Nature* 509:195–200.
- Leterrier C (2018) The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *J Neurosci* 38:2135–2145.
- Li M, Li Z, Ren H, Jin W-N, Wood K, Liu Q, Sheth KN, Shi F-D (2017) Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:2383–2395.
- Li Q, Barres BA (2018) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 18:225–242.
- Li Y, Du X, Liu C-S, Wen Z-L, Du J-L (2012) Reciprocal Regulation between Resting

- Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev Cell* 23:1189–1202.
- Liesa M, Shirihai OS (2013) Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metab* 17:491–506.
- Lim S-H, Park E, You B, Jung Y, Park A-R, Park SG, Lee J-R (2013) Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. *PLoS One* 8:e81218.
- Lin S-S, Tang Y, Illes P, Verkhratsky A (2020) The Safeguarding Microglia: Central Role for P2Y₁₂ Receptors. *Front Pharmacol* 11:627760.
- Liu Y, Given KS, Dickson EL, Owens GP, Macklin WB, Bennett JL (2019) Concentration-dependent effects of CSF1R inhibitors on oligodendrocyte progenitor cells ex vivo and in vivo. *Exp Neurol* 318:32–41.
- Liverani E, Rico MC, Tsygankov AY, Kilpatrick LE, Kunapuli SP (2016) P2Y₁₂ Receptor Modulates Sepsis-Induced Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:961–971.
- Lloyd AF, Davies CL, Miron VE (2017) Microglia: origins, homeostasis, and roles in myelin repair. *Curr Opin Neurobiol* 47:113–120.
- Lloyd AF, Miron VE (2019) The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. *Nat Rev Neurol* 15:447–458.
- Loane DJ, Byrnes KR (2010) Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7:366–377.
- Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM (2009) The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 89:277–287.
- Lou N, Takano T, Pei Y, Xavier AL, Goldman SA, Nedergaard M (2016) Purinergic receptor P2RY₁₂-dependent microglial closure of the injured blood–brain barrier. *Proc Natl Acad Sci* 113:1074–1079.
- Lowery RL, Mendes MS, Sanders BT, Murphy AJ, Whitelaw BS, Lamantia CE, Majewska AK (2021) Loss of P2Y₁₂ Has Behavioral Effects in the Adult Mouse. *Int J Mol Sci* 22:1868.
- Luo C, Jian C, Liao Y, Huang Q, Wu Y, Liu X, Zou D, Wu Y (2017) The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat Volume* 13:1661–1667.
- Ma Q, Xing C, Long W, Wang HY, Liu Q, Wang R-F (2019) Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis. *J Neuroinflammation* 16:53.
- Madry C, Arancibia-Cárcamo IL, Kyrargyri V, Chan VTT, Hamilton NB, Attwell D (2018a) Effects of the ecto-ATPase apyrase on microglial ramification and

- surveillance reflect cell depolarization, not ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci* 115:E1608–E1617.
- Madry C, Kyrargyri V, Arancibia-Cárcamo IL, Jolivet R, Kohsaka S, Bryan RM, 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.
- Mancuso R, Fryatt G, Cleal M, Obst J, Pipi E, Monzón-Sandoval J, Ribe E, Winchester L, Webber C, Nevado A, Jacobs T, Austin N, Theunis C, Grauwen K, Daniela Ruiz E, Mudher A, Vicente-Rodriguez M, Parker CA, Simmons C, Cash D, Richardson J, NIMA Consortium, Jones DNC, Lovestone S, Gómez-Nicola D, Perry VH (2019) CSF1R inhibitor JNJ-40346527 attenuates microglial proliferation and neurodegeneration in P301S mice. *Brain* 142:3243–3264.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J (2011) Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 7:25–40.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron* 41:535–547.
- Martijn J, Vosseberg J, Guy L, Offre P, Ettema TJG (2018) Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature* 557:101–105.
- Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M (2020) Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep* 30:1271–1281.
- Matejuk A, Ransohoff RM (2020) Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front Immunol* 11.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A (2008) Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron* 60:748–766.
- Matyash M, Zabiegalov O, Wendt S, Matyash V, Kettenmann H (2017) The adenosine generating enzymes CD39/CD73 control microglial processes ramification in the mouse brain. Block ML, ed. *PLoS One* 12:e0175012.
- McCarthy GM, Farris SP, Blednov YA, Harris RA, Mayfield RD (2018) Microglial-specific transcriptome changes following chronic alcohol consumption. *Neuropharmacology* 128:416–424.
- Menéndez-Méndez A, Díaz-Hernández JI, Ortega F, Gualix J, Gómez-Villafuertes R, Miras-Portugal MT (2017) Specific Temporal Distribution and Subcellular Localization of a Functional Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in Cerebellar Granule Neurons. *Front Pharmacol* 8:951.
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: the role of

- glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36:587–597.
- Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J (2017) P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* 65:375–387.
- Misgeld T, Schwarz TL (2017) Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron* 96:651–666.
- Misonou H, Menegola M, Mohapatra DP, Guy LK, Park K-S, Trimmer JS (2006) Bidirectional Activity-Dependent Regulation of Neuronal Ion Channel Phosphorylation. *J Neurosci* 26:13505–13514.
- Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J (2016) Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun* 7:12540.
- Mo M, Eyo UB, Xie M, Peng J, Bosco DB, Umpierre AD, Zhu X, Tian D-S, Xu P, Wu L-J (2019) Microglial P2Y₁₂ Receptor Regulates Seizure-Induced Neurogenesis and Immature Neuronal Projections. *J Neurosci* 39:9453–9464.
- Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide A-L, Evrard P, Gressens P, Verney C (2007) Entry and Distribution of Microglial Cells in Human Embryonic and Fetal Cerebral Cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:372–382.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006) Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science* (80-) 314:126–129.
- Moriyama Y, Hiasa M, Sakamoto S, Omote H, Nomura M (2017) Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal* 13:387–404.
- Mosser C-A, Baptista S, Arnoux I, Audinat E (2017) Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog Neurobiol* 149–150:1–20.
- Mulholland PJ, Carpenter-Hyland EP, Hearing MC, Becker HC, Woodward JJ, Chandler LJ (2008) Glutamate Transporters Regulate Extrasynaptic NMDA Receptor Modulation of Kv2.1 Potassium Channels. *J Neurosci* 28:8801–8809.
- Murakoshi H, Trimmer JS (1999) Identification of the Kv2.1 K⁺ Channel as a Major Component of the Delayed Rectifier K⁺ Current in Rat Hippocampal Neurons. *J*

- Neurosci 19:1728–1735.
- Murali Mahadevan H, Hashemiaghdam A, Ashrafi G, Harbauer AB (2021) Mitochondria in Neuronal Health: From Energy Metabolism to Parkinson’s Disease. *Adv Biol* 5:e2100663.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1–13.
- Napoli I, Neumann H (2010) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp Neurol* 225:24–28.
- Navascués J, Calvente R, Marín-Teva JL, Cuadros MA (2000) Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 72:91–102.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJM (2008) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288–295.
- Neumann H, Takahashi K (2007) Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J Neuroimmunol* 184:92–99.
- Nguyen PT, Dorman LC, Pan S, Vainchtein ID, Han RT, Nakao-Inoue H, Taloma SE, Barron JJ, Molofsky AB, Kheirbek MA, Molofsky A V. (2020) Microglial Remodeling of the Extracellular Matrix Promotes Synapse Plasticity. *Cell* 182:388-403.e15.
- Nian K, Harding IC, Herman IM, Ebong EE (2020) Blood-Brain Barrier Damage in Ischemic Stroke and Its Regulation by Endothelial Mechanotransduction. *Front Physiol* 11.
- Nikodemova M, Kimyon RS, De I, Small AL, Collier LS, Watters JJ (2015) Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. *J Neuroimmunol* 278:280–288.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* (80-) 308:1314–1318.
- Nonaka S, Nakanishi H (2019) Microglial clearance of focal apoptotic synapses. *Neurosci Lett* 707:134317.
- Norat P, Soldozy S, Sokolowski JD, Gorick CM, Kumar JS, Chae Y, Yağmurlu K, Prada F, Walker M, Levitt MR, Price RJ, Tvrdik P, Kalani MYS (2020) Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial transplantation. *npj Regen Med* 5:22.

- O'Connell KMS, Loftus R, Tamkun MM (2010) Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci* 107:12351–12356.
- Ohsawa K, Kohsaka S (2011) Dynamic motility of microglia: Purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *Glia* 59:1793–1799.
- Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jönsson B (2012) The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol* 19:155–162.
- Olmos-Alonso A, Schettters STT, Sri S, Askew K, Mancuso R, Vargas-Caballero M, Holscher C, Perry VH, Gomez-Nicola D (2016) Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain* 139:891–907.
- Olmos G, Lladó J (2014) Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014:1–12.
- Oosterhof N, Chang IJ, Karimiani EG, Kuil LE, Jensen DM, Daza R, Young E, Astle L, van der Linde HC, Shivaram GM, Demmers J, Latimer CS, Keene CD, Loter E, Maroofian R, van Ham TJ, Hevner RF, Bennett JT (2019) Homozygous Mutations in CSF1R Cause a Pediatric-Onset Leukoencephalopathy and Can Result in Congenital Absence of Microglia. *Am J Hum Genet* 104:936–947.
- Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 173:649–665.
- Ortega SB, Torres VO, Latchney SE, Whoolery CW, Noorbhai IZ, Poinssatte K, Selvaraj UM, Benson MA, Meeuwissen AJM, Plautz EJ, Kong X, Ramirez DM, Ajay AD, Meeks JP, Goldberg MP, Monson NL, Eisch AJ, Stowe AM (2020) B cells migrate into remote brain areas and support neurogenesis and functional recovery after focal stroke in mice. *Proc Natl Acad Sci* 117:4983–4993.
- 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, Planas AM (2019) Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation. *Acta Neuropathol* 137:321–341.
- Oyanagi K, Kinoshita M, Suzuki-Kouyama E, Inoue T, Nakahara A, Tokiwai M, Arai N, Satoh J, Aoki N, Jinnai K, Yazawa I, Arai K, Ishihara K, Kawamura M, Ishizawa K, Hasegawa K, Yagisita S, Amano N, Yoshida K, Terada S, Yoshida M, Akiyama H, Mitsuyama Y, Ikeda SI (2017) Adult onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP) and Nasu-Hakola disease: lesion staging and dynamic changes of axons and microglial subsets. *Brain Pathol* 27:748–769.

- Ozcan C, Holmuamedov EL, Jahangir A, Terzic A (2001) Diazoxide protects mitochondria from anoxic injury: Implications for myopreservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121:298–306.
- Pakkenberg B (2003) Aging and the human neocortex. *Exp Gerontol* 38:95–99.
- Pal S, Hartnett KA, Nerbonne JM, Levitan ES, Aizenman E (2003) Mediation of Neuronal Apoptosis by Kv2.1-Encoded Potassium Channels. *J Neurosci* 23:4798–4802.
- Pal SK, Takimoto K, Aizenman E, Levitan ES (2006) Apoptotic surface delivery of K⁺ channels. *Cell Death Differ* 13:661–667.
- Pan J, Ma N, Yu B, Zhang W, Wan J (2020) Transcriptomic profiling of microglia and astrocytes throughout aging. *J Neuroinflammation* 17:97.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, 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, Gan W (2013) Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155:1596–1609.
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci* 109:E197-205.
- Peltola MA, Kuja-Panula J, Lauri SE, Taira T, Rauvala H (2011) AMIGO is an auxiliary subunit of the Kv2.1 potassium channel. *EMBO Rep* 12:1293–1299.
- Peng J, Liu Y, Umpierre AD, Xie M, Tian D-S, Richardson JR, Wu L-J (2019) Microglial P2Y₁₂ receptor regulates ventral hippocampal CA1 neuronal excitability and innate fear in mice. *Mol Brain* 12:71.
- Pereira L, Font-Nieves M, Van den Haute C, Baekelandt V, Planas AM, Pozas E (2015) IL-10 regulates adult neurogenesis by modulating ERK and STAT3 activity. *Front Cell Neurosci* 9.
- Perez-Pouchoulen M, VanRyzin JW, McCarthy MM (2015) Morphological and Phagocytic Profile of Microglia in the Developing Rat Cerebellum. *eneuro* 2:ENEURO.0036-15.2015.
- Pfeiffer T, Avignone E, Nägerl UV (2016) Induction of hippocampal long-term potentiation increases the morphological dynamics of microglial processes and prolongs their contacts with dendritic spines. *Sci Rep* 6:32422.

- Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 30:527–535.
- Pont-Lezica L, Beumer W, Colasse S, Drexhage H, Versnel M, Bessis A (2014) Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *Eur J Neurosci* 39:1551–1557.
- Pósfai B, Cserép C, Orsolits B, Dénes Á (2019) New Insights into Microglia–Neuron Interactions: A Neuron’s Perspective. *Neuroscience* 405:103–117.
- Pritchard C, Mayers A, Baldwin D (2013) Changing patterns of neurological mortality in the 10 major developed countries – 1979–2010. *Public Health* 127:357–368.
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R (2020) The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med* 217.
- Prokop S, Miller KR, Heppner FL (2013) Microglia actions in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol* 126:461–477.
- Rahmaninejad H, Pace T, Bhatt S, Sun B, Kekenos-Huskey P (2020) Co-localization and confinement of ecto-nucleotidases modulate extracellular adenosine nucleotide distributions Briggs JM, ed. *PLOS Comput Biol* 16:e1007903.
- Ransohoff RM (2016a) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* (80-) 353:777–783.
- Ransohoff RM (2016b) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 19:987–991.
- Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW (2004) Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis. *J Biol Chem* 279:20471–20479.
- Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM (2016) The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front Hum Neurosci* 10:566.
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 12:269–281.
- Réu P, Khosravi A, Bernard S, Mold JE, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J (2017) The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep* 20:779–784.
- Rigato C, Buckinx R, Le-Corronc H, Rigo JM, Legendre P (2011) Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 59:675–695.
- Rink C, Khanna S (2011) Significance of Brain Tissue Oxygenation and the Arachidonic

- Acid Cascade in Stroke. *Antioxid Redox Signal* 14:1889–1903.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004) Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clin Microbiol Rev* 17:942–964.
- Rodrigues RJ, Tomé AR, Cunha RA (2015) ATP as a multi-target danger signal in the brain. *Front Neurosci* 9.
- Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R (2017) The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol* 27:R1177–R1192.
- Roman C, Egert L, Di Benedetto B (2021) Astrocytic-neuronal crosstalk gets jammed: Alternative perspectives on the onset of neuropsychiatric disorders. *Eur J Neurosci* 54:5717–5729.
- Rongvaux A (2018) Innate immunity and tolerance toward mitochondria. *Mitochondrion* 41:14–20.
- Roosterman D, S. Cottrell G (2020) Astrocytes and neurons communicate via a monocarboxylic acid shuttle. *AIMS Neurosci* 7:94–106.
- Rose GJ, Call SJ (1992) Evidence for the role of dendritic spines in the temporal filtering properties of neurons: the decoding problem and beyond. *Proc Natl Acad Sci* 89:9662–9665.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA (2004) Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Res* 64:985–993.
- Rozanski GM, Li Q, Stanley EF (2013) Transglial transmission at the dorsal root ganglion sandwich synapse: glial cell to postsynaptic neuron communication. *Eur J Neurosci* 37:1221–1228.
- Ruprecht JJ, King MS, Zögg T, Aleksandrova AA, Pardon E, Crichton PG, Steyaert J, Kunji ERS (2019) The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Cell* 176:435–447.e15.
- Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, Lang R, Uv A, Betsholtz C (2011) A Two-Way Communication between Microglial Cells and Angiogenic Sprouts Regulates Angiogenesis in Aortic Ring Cultures Karl MO, ed. *PLoS One* 6:e15846.
- Saito Y, Kobayashi Y (2020) Update on Antithrombotic Therapy after Percutaneous Coronary Intervention. *Intern Med* 59:311–321.
- Salter MW, Stevens B (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23:1018–1027.

- Salzer JL (2003) Polarized Domains of Myelinated Axons. *Neuron* 40:297–318.
- Sandvig I, Augestad IL, Håberg AK, Sandvig A (2018) Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks. *Eur J Neurosci* 47:1414–1428.
- Sankowski R, Böttcher C, Masuda T, Geirsdottir L, Sagar, Sindram E, Seredenina T, Muhs A, Scheiwe C, Shah MJ, Heiland DH, Schnell O, Grün D, Priller J, Prinz M (2019) Mapping microglia states in the human brain through the integration of high-dimensional techniques. *Nat Neurosci* 22:2098–2110.
- Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ (2005) Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 51:241–253.
- Sarlus H, Heneka MT (2017) Microglia in Alzheimer’s disease. *J Clin Invest* 127:3240–3249.
- Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, Kohsaka S (2003) Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia* 44:242–250.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691–705.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B (2013) The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61:24–36.
- Schilling U, Dingemans J, Ufer M (2020) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Approved and Investigational P2Y₁₂ Receptor Antagonists. *Clin Pharmacokinet* 59:545–566.
- Schmid CD, Sautkulis LN, Danielson PE, Cooper J, Hasel KW, Hilbush BS, Sutcliffe JG, Carson MJ (2002) Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J Neurochem* 83:1309–1320.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SEW, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336:86–90.
- Schüz A, Palm G (1989) Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 286:442–455.
- Scott-Hewitt N, Perrucci F, Morini R, Erreni M, Mahoney M, Witkowska A, Carey A,

- Faggiani E, Schuetz LT, Mason S, Tamborini M, Bizzotto M, Passoni L, Filipello F, Jahn R, Stevens B, Matteoli M (2020) Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia. *EMBO J* 39.
- Sebastiao A, Ribeiro J (2009) Tuning and Fine-Tuning of Synapses with Adenosine. *Curr Neuropharmacol* 7:180–194.
- Sedel F (2004) Macrophage-Derived Tumor Necrosis Factor , an Early Developmental Signal for Motoneuron Death. *J Neurosci* 24:2236–2246.
- Sellner S, Paricio-Montesinos R, Spieß A, Masuch A, Erny D, Harsan LA, Elverfeldt D V., Schwabenland M, Biber K, Staszewski O, Lira S, Jung S, Prinz M, Blank T (2016) Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt 1/p65 signaling independent of CX3CL1. *Acta Neuropathol Commun* 4:102.
- Shah NH, Schulien AJ, Clemens K, Aizenman TD, Hageman TM, Wills ZP, Aizenman E (2014) Cyclin E1 Regulates Kv2.1 Channel Phosphorylation and Localization in Neuronal Ischemia. *J Neurosci* 34:4326–4331.
- Sharma S, Awasthi A, Singh S (2019) Altered gut microbiota and intestinal permeability in Parkinson’s disease: Pathological highlight to management. *Neurosci Lett* 712:134516.
- Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK (2016) The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* 167:915–932.
- Shatz CJ (2009) MHC Class I: An Unexpected Role in Neuronal Plasticity. *Neuron* 64:40–45.
- Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K (2014) Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. *J Neurosci* 34:2231–2243.
- Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J (2004) Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Neurochem* 89:337–343.
- Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay M-È (2014) Surveillance, Phagocytosis, and Inflammation: How Never-Resting Microglia Influence Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neural Plast* 2014:1–15.
- Sierra A, de Castro F, del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H (2016) The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64:1801–1840.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS,

- Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483–495.
- Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H (2019) Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research. *Trends Neurosci* 42:778–792.
- Singer-Lahat D, Sheinin A, Chikvashvili D, Tsuk S, Greitzer D, Friedrich R, Feinshreiber L, Ashery U, Benveniste M, Levitan ES, Lotan I (2007) K⁺ Channel Facilitation of Exocytosis by Dynamic Interaction with Syntaxin. *J Neurosci* 27:1651–1658.
- Singh V, Roth S, Llovera G, Sadler R, Garzetti D, Stecher B, Dichgans M, Liesz A (2016) Microbiota Dysbiosis Controls the Neuroinflammatory Response after Stroke. *J Neurosci* 36:7428–7440.
- Singhal G, Baune BT (2017) Microglia: An Interface between the Loss of Neuroplasticity and Depression. *Front Cell Neurosci* 11.
- Sipe GO, Lowery RL, Tremblay M-È, Kelly EA, Lamantia CE, Majewska AK (2016) Microglial P2Y₁₂ is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat Commun* 7:10905.
- Smith AM, Gibbons HM, Oldfield RL, Bergin PM, Mee EW, Curtis MA, Faull RLM, Dragunow M (2013) M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J Neuroinflammation* 10:859.
- Soltys BJ, Gupta RS (1999) Mitochondrial Proteins at Unexpected Cellular Locations: Export of Proteins from Mitochondria from an Evolutionary Perspective. In: *International Review of Cytology*, pp 133–196.
- Song J, M. Christian K, Ming G, Song H (2012) Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev Neurobiol* 72:1032–1043.
- Sousa C, Golebiewska A, Poovathingal SK, Kaoma T, Pires-Afonso Y, Martina S, Coowar D, Azuaje F, Skupin A, Balling R, Biber K, Niclou SP, Michelucci A (2018) Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO Rep* 19.
- Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA, Zhang Y, Spevak W, Lin J, Phan NY, Habets G, Rymar A, Tsang G, Walters J, Nespi M, Singh P, Broome S, Ibrahim P, Zhang C, Bollag G, West BL, Green KN (2019) Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer’s disease model. *Nat Commun* 10:3758.
- Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, West BL,

- Green KN (2016) Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain* 139:1265–1281.
- Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ (2006) Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci* 103:1283–1288.
- Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S (2014) Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Rep* 8:1271–1279.
- Stellwagen D, Malenka RC (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* 440:1054–1059.
- Stiles J, Jernigan TL (2010) The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev* 20:327–348.
- Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1:14.
- Styr B, Gonen N, Zarhin D, Ruggiero A, Atsmon R, Gazit N, Braun G, Frere S, Vertkin I, Shapira I, Harel M, Heim LR, Katsenelson M, Rechnitz O, Fadila S, Derdikman D, Rubinstein M, Geiger T, Ruppin E, Slutsky I (2019) Mitochondrial Regulation of the Hippocampal Firing Rate Set Point and Seizure Susceptibility. *Neuron* 102:1009-1024.e8.
- Sugiura A, McLelland G-L, Fon EA, McBride HM (2014) A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J* 33:2142–2156.
- Suminaite D, Lyons DA, Livesey MR (2019) Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. *Glia* 67:2050–2062.
- Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, Császár E, Fekete R, West BL, Katona G, Rózsa B, Dénes Á (2016) Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun* 7:11499.
- Taanman J-W (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1410:103–123.
- Tanaka KF, Kashima H, Suzuki H, Ono K, Sawada M (2002) Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci Res* 70:232–237.
- Tang Y, Le W (2016) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53:1181–1194.
- Taylor RW, Turnbull DM (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat*

- Rev Genet 6:389–402.
- Terenzio M, Schiavo G, Fainzilber M (2017) Compartmentalized Signaling in Neurons: From Cell Biology to Neuroscience. *Neuron* 96:667–679.
- Thameem Dheen S, Kaur C, Ling E-A (2007) Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Curr Med Chem* 14:1189–1197.
- Thion MS, Low D, Silvin A, Chen J, Grisel P, Schulte-Schrepping J, Blecher R, Ulas T, Squarzoni P, Hoeffel G, Couplier F, Siopi E, David FS, Scholz C, Shihui F, Lum J, Amoyo AA, Larbi A, Poidinger M, Buttgereit A, Lledo P-M, Greter M, Chan JKY, Amit I, Beyer M, Schultze JL, Schlitzer A, Pettersson S, Ginhoux F, Garel S (2018) Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell* 172:500-516.e16.
- Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P, Raschke I, Merkwirth C, Ehse S, Krause F, Chan DC, Alexander C, Bauer C, Youle R, Langer T, Martinou J-C (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28:1589–1600.
- Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R (2007) Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55:360–368.
- Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience Dalva M, ed. *PLoS Biol* 8:e1000527.
- Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2010) Pain and purinergic signaling. *Brain Res Rev* 63:222–232.
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16:543–551.
- Unger MS, Scherthaner P, Marschallinger J, Mrowetz H, Aigner L (2018) Microglia prevent peripheral immune cell invasion and promote an anti-inflammatory environment in the brain of APP-PS1 transgenic mice. *J Neuroinflammation* 15:274.
- Vainchtein ID, Molofsky A V. (2020) Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci* 43:144–154.
- Valiente-Pallejà A, Tortajada J, Bulduk BK, Vilella E, Garrabou G, Muntané G, Martorell L (2022) Comprehensive summary of mitochondrial DNA alterations in the postmortem human brain: A systematic review. *eBioMedicine* 76:103815.
- VanRyzin JW, Marquardt AE, Argue KJ, Vecchiarelli HA, Ashton SE, Arambula SE, Hill MN, McCarthy MM (2019) Microglial Phagocytosis of Newborn Cells Is

- Induced by Endocannabinoids and Sculpted Sex Differences in Juvenile Rat Social Play. *Neuron* 102:435-449.e6.
- Varga DP, Menyhárt Á, Pósfai B, Császár E, Lénárt N, Cserép C, Orsolits B, Martinecz B, Szlepák T, Bari F, Farkas E, Dénes Á (2020) Microglia alter the threshold of spreading depolarization and related potassium uptake in the mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 40:S67–S80.
- Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ (2011) Complement in the brain. *Mol Immunol* 48:1592–1603.
- Verkhratsky A, Burnstock G (2014) Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *BioEssays* 36:697–705.
- Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P (2010) Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat* 217:436–448.
- Villani A, Benjaminsen J, Moritz C, Henke K, Hartmann J, Norlin N, Richter K, Schieber NL, Franke T, Schwab Y, Peri F (2019) Clearance by Microglia Depends on Packaging of Phagosomes into a Unique Cellular Compartment. *Dev Cell* 49:77-88.e7.
- Volonte C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G (2003) Extracellular ATP and Neurodegeneration. *Curr Drug Target -CNS Neurol Disord* 2:403–412.
- von Kügelgen I (2021) Molecular pharmacology of P2Y receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 187:114361.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J Neurosci* 29:3974–3980.
- Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (2008) Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor. *J Neurosci* 28:8138–8143.
- Walker DG, Tang TM, Mendsaikhan A, Tooyama I, Serrano GE, Sue LI, Beach TG, Lue L-F (2020) Patterns of Expression of Purinergic Receptor P2RY12, a Putative Marker for Non-Activated Microglia, in Aged and Alzheimer's Disease Brains. *Int J Mol Sci* 21:678.
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, Scheffler

- B, Steindler DA (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54:815–825.
- Wan Y, Feng B, You Y, Yu J, Xu C, Dai H, Trapp BD, Shi P, Chen Z, Hu W (2020) Microglial Displacement of GABAergic Synapses Is a Protective Event during Complex Febrile Seizures. *Cell Rep* 33:108346.
- Wang C, Youle RJ (2009) The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet* 43:95–118.
- Wang Y, Bogenhagen DF (2006) Human Mitochondrial DNA Nucleoids Are Linked to Protein Folding Machinery and Metabolic Enzymes at the Mitochondrial Inner Membrane. *J Biol Chem* 281:25791–25802.
- Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, Exiga M, Vadisiute A, Raggioli A, Schertel A, Schwab Y, Gross CT (2018) Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun* 9:1228.
- Whelan SP, Zuckerbraun BS (2013) Mitochondrial Signaling: Forwards, Backwards, and In Between. *Oxid Med Cell Longev* 2013:1–10.
- Wogram E, Wendt S, Matyash M, Pivneva T, Draguhn A, Kettenmann H (2016) Satellite microglia show spontaneous electrical activity that is uncorrelated with activity of the attached neuron Bolam P, ed. *Eur J Neurosci* 43:1523–1534.
- Wohleb ES (2016) Neuron–Microglia Interactions in Mental Health Disorders: “For Better, and For Worse.” *Front Immunol* 7.
- Wu Y, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B (2015) Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol* 36:605–613.
- Yao H, Zhou K, Yan D, Li M, Wang Y (2009) The Kv2.1 channels mediate neuronal apoptosis induced by excitotoxicity. *J Neurochem* 108:909–919.
- Yeh C-Y, Bulas AM, Moutal A, Saloman JL, Hartnett KA, Anderson CT, Tzounopoulos T, Sun D, Khanna R, Aizenman E (2017) Targeting a Potassium Channel/Syntaxin Interaction Ameliorates Cell Death in Ischemic Stroke. *J Neurosci* 37:5648–5658.
- Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA (2010) Microglial activation in stroke: Therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7:378–391.
- Yu SP, Yeh C-H, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LMT, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi DW (1997) Mediation of Neuronal Apoptosis by Enhancement of Outward Potassium Current. *Science* (80-) 278:114–117.
- Zaks-Makhina E, Kim Y, Aizenman E, Levitan ES (2004) Novel Neuroprotective K +

- Channel Inhibitor Identified by High-Throughput Screening in Yeast. *Mol Pharmacol* 65:214–219.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 17:400–406.
- Zhang L-Y, Pan J, Mamtilahun M, Zhu Y, Wang L, Venkatesh A, Shi R, Tu X, Jin K, Wang Y, Zhang Z, Yang G-Y (2020) Microglia exacerbate white matter injury via complement C3/C3aR pathway after hypoperfusion. *Theranostics* 10:74–90.
- Zhang X, Chen Y, Wang C, Huang L-YM (2007) Neuronal somatic ATP release triggers neuron–satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci* 104:9864–9869.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O’Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, 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 X, Eyo UB, Murugan M, Wu L-J (2018a) Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology. *Dev Neurobiol* 78:604–617.
- Zhao X, Liao Y, Morgan S, Mathur R, Feustel P, Mazurkiewicz J, Qian J, Chang J, Mathern GW, Adamo MA, Ritaccio AL, Gruenthal M, Zhu X, Huang Y (2018b) Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. *Cell Rep* 22:2080–2093.
- Zhou L-J, Peng J, Xu Y-N, Zeng W-J, Zhang J, Wei X, Mai C-L, Lin Z-J, Liu Y, Murugan M, Eyo UB, Umpierre AD, Xin W-J, Chen T, Li M, Wang H, Richardson JR, Tan Z, Liu X-G, Wu L-J (2019) Microglia Are Indispensable for Synaptic Plasticity in the Spinal Dorsal Horn and Chronic Pain. *Cell Rep* 27:3844–3859.e6.
- Zhou Y, Danbolt NC (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm* 121:799–817.
- Zhu G, Du L, Jin L, Offenhäusser A (2016) Effects of Morphology Constraint on Electrophysiological Properties of Cortical Neurons. *Sci Rep* 6:23086.
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:299–309.
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure

of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9:268–275.

Zrzavy T, Machado-Santos J, Christine S, Baumgartner C, Weiner HL, Butovsky O, Lassmann H (2018) Dominant role of microglial and macrophage innate immune responses in human ischemic infarcts. *Brain Pathol* 28:791–805.

Zulfiqar S, Garg P, Nieweg K (2019) Contribution of astrocytes to metabolic dysfunction in the Alzheimer's disease brain. *Biol Chem* 400:1113–1127.

X. Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

C. Cserép, **B. Pósfai**, Á. Dénes. (2021) Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. **Neuron** 109(2):222-240.

DOI: 10.1016/j.neuron.2020.11.007

C. Cserép*, **B. Pósfai***, N. Lénárt, R. Fekete, ZI. László, Z. Lele, B. Orsolits, G. Molnár, S. Heindl, AD. Schwarcz, 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, MM. Tamkun, B. Gesierich, M. Duering, I. Katona, A. Liesz, G. Tamás, Á. Dénes. (2020) Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. **Science** 367(6477):528-537.

DOI: 10.1126/science.aax6752

* megosztott elsőszerzőség

B. Pósfai*, C. Cserép*, B. Orsolits, Á. Dénes. (2019) New Insights into Microglia–Neuron Interactions: A Neuron’s Perspective. **Neuroscience** 405:103-117.

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.04.046

* megosztott elsőszerzőség

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények:

E. Császár, N. Lénárt, C. Cserép, Z. Környei, R. Fekete, **B. Pósfai**, D. Balázsfi, B. Hangya, AD. Schwarcz, E. Szabadits, D. Szöllősi, K. Szigeti, D. Máthé, BL. West, K. Sviatkó, AR. Brás, JC. Mariani, A. Kliwer, Z. Lenkei, L. Hricisák, Z. Benyó, M. Baranyi, B. Sperlág, Á. Menyhárt, E. Farkas, Á. Dénes. (2022) Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. **Journal of Experimental Medicine** 219(3):e20211071. DOI: 10.1084/jem.20211071

K. Tóth, N. Lénárt, P. Berki, R. Fekete, E. Szabadits, **B. Pósfai**, C. Cserép, A. Alatshan, S. Benkő, D. Kiss, CA. Hübner, AI. Gulyás, K. Kaila, Z. Környei, 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

DP. Varga, Á. Menyhárt, **B. Pósfai**, E. Császár, N. Lénárt, C. Cserép, B. Orsolits, B. Martinecz, T. Szlepák, F. Bari, E. Farkas, Á. Dénes. (2020) Microglia alter the threshold of spreading depolarization and related potassium uptake in the mouse brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism** 40(1_suppl):S67-S80.

DOI: 10.1177/0271678X19900097

A. Szőnyi, KE. Sós, R. Nyilas, D. Schlingloff, A. Domonkos, VT. Takács, **B. Pósfai**, P. Hegedüs, J. Priestley, A. Gundlach, AI. Gulyás, V. Varga, A. Losonczy, TF. Freund, G. Nyiri. (2019) Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation. **Science** 364(6442):eaaw0445. DOI: 10.1126/science.aaw0445

C. Cserép, **B. Pósfai**, AD. Schwarcz, Á. Dénes. (2018) Mitochondrial Ultrastructure Is Coupled to Synaptic Performance at Axonal Release Sites. **eNeuro** 5(1):ENEURO.0390-17.2018. DOI: 10.1523/ENEURO.0390-17.2018

VT. Takács, C. Cserép, D. Schlingloff, **B. Pósfai**, A. Szőnyi, KE. Sós, Z. Környei, Á. Dénes, AI. Gulyás, TF. Freund, G. Nyiri (2018) Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. **Nature Communications** 9(1):2848.

DOI: 10.1038/s41467-018-05136-1

B. Pósfai*, C. Cserép*, P. Hegedüs, E. Szabadits, DM. Otte, A. Zimmer, M. Watanabe, TF. Freund, G. Nyiri (2016) Synaptic and cellular changes induced by the schizophrenia susceptibility gene G72 are rescued by N-acetylcysteine treatment. **Translational Psychiatry** 6(5):e807. DOI: 10.1038/tp.2016.74

* megosztott elsőszerezőség

XI. Köszönetnyilvánítás

Szeretném legmélyebb hálámat kifejezni Szüleim és Testvéreim felé, akik inspiráló példát állítottak elém, felkeltették természettudományok iránti érdeklődésemet, és áldozatkész erőfeszítéseikkel minden lehetőséget megteremtettek számomra, hogy elindulhassak ezen a csodálatos pályán. Hasonlóan végtelenül hálás vagyok Feleségemnek, hogy a biztos háttér megteremtése mellett szüntelenül támogatja a szakmai pályafutásomat, és a Fiammal és a kutyánkkal hármásban a legnehezebb időkben is mellettem áll. Velük együtt köszönöm minden családtagomnak és barátomnak, akik nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka.

Szakmai oldalról első helyre kívánkozik Cserép Csaba, akitől az első laborban töltött naptól kezdve rengeteget tanulhattam, és mind kutatóként, mind emberként nagy hatást gyakorolt rám az elmúlt több mint 10 évben. Hálásan köszönöm Dénes Ádámnak, hogy tárt karokkal fogadott a csoportjában, és olyan kérdéskörrel ismertetett meg, amely visszaadta, és azóta is táplálja a motivációm. Köszönöm korábbi mentoraimnak, Freund Tamásnak és Nyiri Gábornak, hogy bevezettek engem a neurobiológiai kutatások világába és lehetőséget adtak nekem szárnyaim bontogatására, valamint Solt Anna Tanárnőnek, hogy megismertetett engem ezzel a lehetőséggel. Végül szeretném megköszönni minden jelenlegi és korábbi munkatársamnak, a Neuroimmunológia és az Agykéreg kutatócsoport tagjainak, hogy egy szakmailag magas színvonalú, egyszersmind jó hangulatú környezetben dolgozhatok napról napra.