

Válasz Dr. Illés Zsolt bírálatára

Tisztelt Professor Úr!

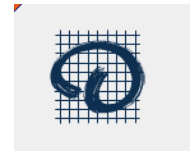
Nagyon köszönöm, hogy időt szánt doktori értekezésem elolvasására és gondos értékelésére. Külön köszönöm az építő kritikai megjegyzéseket és a feltett nagyszámú, releváns kérdést. A formai szempontokat érintő mindkét kritikai megjegyzéssel egyetértek. Valóban szerencsés lett volna pár összefoglaló ábrát, táblázatot tenni az eredmények fejezetbe, amelyek segítették volna a leírtak könnyebb megértését. Bennem is többször felmerült ennek igénye a dolgozat írása közben, de visszatartott az, hogy így önkényesen szemezgetnem kellett volna olyan komplex vizsgálatok eredményeiből, amelyek az eredeti közleményekben szereplő főábrák mellett esetenként több tíz oldalnyi támogató melléklettel lettek közölve. A dolgozat mellékletében szereplő cikkek anyagát, mint PDF csatolmányt így is rendkívül hosszúnak találtam, ezért is éreztem úgy, hogy talán jobb, ha nem emelek ezek közül vissza ábrákat az eredmények fejezetbe. Azzal is egyetértek, hogy érdemes lett volna a konklúziók végén pontokba szerve a főbb eredményeket felsorolni. Lehet, hogy itt túlzottan óvatos voltam, mivel úgy éreztem, felnagyítom a saját eredményeim súlyát, ha ezek újdonságának tényét önhatalmúlag megállapítom. Ezért is külön hálás vagyok a részletes bírálatért, amelyben Professor Úr a kutatási eredményeink jelentőségét nemzetközi összehasonlításban is megvizsgálta. Az alábbiakban megpróbálok lényegre törő válaszokat adni a felmerült kérdésekre, megjegyzésekre.

1. Bevezetés, 9. oldal: A CSF1R KO egér és patkány modell ismertetésénél kitér arra, hogy a manipuláció a szöveti makrofágokat is érinti, és a felnőttkori túlélés korlátozott. Van-e adat kondicionált és indukált KO modellel kapcsolatban (floxed, Cre modell), ahol a CSF1R csak a mikroglia populációt érinti indukált módon, azaz a túlélést a felnőttkorban nem befolyásolja.

2. Bevezetés, 10. oldal: Ismerteti a FIRE-deficiens (csfr1 locus superenhancer) modellt, ahol a neuronális, asztrocita és oligodendrocita transcriptome nem változik. Mi okozza ezt a különbséget a két modell között?

3. Ismerteti a koraszülöttek fejlődési deficitje és a mikroglia aktiváció korrelációját, valamint a mikroglia proliferációt (10. oldal). Van-e adat arra, hogy milyen e mikroglia populáció fenotípusa koraszülöttek fejlődési deficitjében, illetve van-e adat CSF1R túlexpresszió hatásra mikrogliaiban.

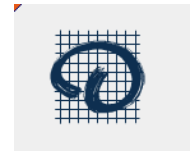
Válasz: A Bírációnak sikerült kiváló érzékkel a tématerület egyik legkomplexebb problémájára rávilágítani. Mivel funkcionálisan és módszertanilag is összetartozó kérdésekről van szó, szeretnék az első három kérdésre együttes választ adni – ezt indokolják a releváns irodalom ellentmondásos eredményei is. Fontos megemlíteni, hogy miközben az egér és a humán glia populációk nagyfokú hasonlóságot mutatnak, a sejtek nyúlványrendszere és intercelluláris kapcsolataik komplexitása az evolúciós skálán folyamatosan növekedett, amely a primátákban ugrásszerű változásokat eredményezett (1). Ezért, miközben az egér és humán CSF1R mikroglia sejtek és makrofágok élettanában betöltött szerepe hasonló, a rágcső modellek vélhetően alábecsülik a mikroglialis hatások jelentőségét a különböző neurológiai kórképekben. A CSF1R fejlődésneurológiai szerepe



vitathatatlan: mind emberben, mind rágcsálókban, a súlyos, homozigóta CSF1R mutációk következtében a mikroglia hiánya és számos perifériás makrofág populáció érintettsége is tapasztalható az egyedfejlődés korai stádiumától. Csecsemő-, gyermek- vagy fiatal felnőtt korban ezek a mutációk letálisak lehetnek, és csontfejlődési rendellenességek mellett számos strukturális agyi elváltozással járnak, mint az agyi ödéma, a neuronális progenitorok vagy a corpus callosum fejlődési zavara, amely tünetek gyermekkori epilepsziával, gyulladással változásokkal is társulhatnak (Pediatric-Onset Leukoencephalopathy) (2). Emellett, a heterozigóta, patogén CSF1R mutációk tipikusan az ún. „CSF1R-related adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP)” kórképet okozzák, amelyben a túlélés átlagosan 8 év, (2-30) és motoros zavarok, mentális problémák, epilepsziás rohamok, valamint a memória felgyorsult romlása jelentik a leggyakoribb tüneteket (3, 4). Fontos kiemelni, hogy e mutációk esetén megjelenő fehérállományi léziók, atrófia, kalcifikáció és más tünetek mellett nagyszámú monocita és makrofág is található perivaszkulárisan az agy számos területén. Közben jelenleg nem tisztázott, hogy a humán CSF1R mutációk esetén mi lehet a mikroglia és a perifériás makrofágok fajlagos szerepe a súlyos idegrendszeri tünetegyüttes kialakulásában, az egér modellek tanulságaiból jól ismert, hogy a megzavart mikroglialis niche-t a perifériás mieloid sejtek különböző populációi kolonizálni képesek, és részben mikroglialis funkciók átvétele is tapasztalható – ennek mértéke és fejlődéstani vonatkozásai emberben jelenleg tisztázatlanok.

Transzlációs szempontból további nehézséget okoz, hogy az egér CSF1R modellek tanulságainak értelmezését számos ellentmondás és a modellek nem kizárólagos sejt-specifitása is terheli. A CSF1R KO egér és patkány modellek mellett, amelyekben a mikroglia és számos perifériás makrofág populáció hiánya súlyos fejlődéstani rendellenességekkel is társul, elérhetővé váltak kondicionális KO modellek és a CSF1R rendszer elemeit vagy jelátviteli útvonalait érintő mutációk is. Ilyen a FIRE-deficiens (fms-intronic regulatory element, a highly conserved super-enhancer in the Csf1r locus) Csf1r Δ FIRE/ Δ FIRE egér is, amely leírói szerint normális fenotípust és neuronális, asztrocita- illetve oligodendrocita fenotípust mutat (5). Személyes, a témában számos vezető kollégával folytatott megbeszéléseim szerint ugyanakkor ezt a modellt is kellő óvatossággal kell kezelni. Bár a mikroglia sejtek valóban hiányoznak a központi idegrendszerből, a vonal C57BL/6 háttéren nem, csak kevert háttéren tartható fenn életképes formában és az agykérgi neuronális fejlődés is komoly változásokat mutat (nem publikált, személyes kommunikációk, ezért a forrás megjelölésétől tartózkodnék). Véleményem szerint az a modell önmagában nem képes a mikroglia fejlődéstani szerepének tisztázatlan voltát orvosolni. Saját adataink és egyéb vizsgálatok ugyanakkor azt is mutatják, hogy számos más „core” mikroglialis útvonal zavara – ilyen pl. a P2Y₁₂ receptor, amely a központi idegrendszerben mikroglia-specifikus – komoly fejlődésneurológiai következményekkel jár, kiemelten az agykéregben, a hatékony kompenzációs mechanizmusok ellenére (6, 7).

A CSF1R funkció vizsgálata azért is kiemelten fontos, mert a mikroglia felnőttkori szerepe mind az egészséges agyban, mind az idegrendszeri betegségekben nagymértékben kontextus- és betegség-függő. Ahogy a dolgozatban is tárgyaltam, a fiatal felnőtt korban kiváltott mikroglia-depléció önmagában nem okoz agyi patológiát és ez az állapot egérben több héten át fenntartható – ez utalhat az agyi gliális hálózat rendkívül fejlett kompenzatorikus szerepére is. Ugyanakkor vaszkuláris elváltozások már láthatók a depléciót követő 3-4 héten belül és számos asztrocita marker (pl. GFAP) expressziója is megváltozik. Ezzel párhuzamosan a CSF1R farmakológiai gátlása csak részleges mikroglia-depléciót okoz a felnőtt idegrendszerben és nem jár patológiás változásokkal (8, 9). Amennyiben viszont akut agyi sérülés vagy fertőzés következik be, a mikroglialis funkció hiányában a

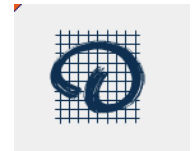


neurológiai kimenetel sokkal súlyosabbá válik, amely arra utal, hogy e sejtek kiemelten fontosak lehetnek az agyszövet ellenállóképességének fenntartásában pathológiás körülmények között. Megfigyeléseink szerint, a mikroglia depléciója vagy a P2Y12 receptor centrális gátlása experimentális stroke és más akut inzultusok esetén nagymértékben növeli a neuronális excitabilitást, fokozza a pathológiás hálózati aktivitást és a sejthalált, valamint gátolja a cerebrális hipoperfúzióhoz történő adaptációt (10-14). E folyamatokban a CSF1R szerepét csak részlegesen vizsgálták. Létezik CSF1R flox egérvonal, amely segítségével kondicionális deléció valósítható meg mikrogliaiban (és az agyi makrofágok egy részében) a kutatócsoportunk által is rutinszerűen használt tamoxifen-indukálható CX3CR1^{CreERT2} vonalakkal való keresztezést követően (8). Érdekes módon, megerősítve a mikroglia deplécióval és P2Y12 receptor gátlással kapott eredményeinket a mikroglia szerepére vonatkozólag a centrális neutrotrop vírus fertőzés gátlásában, a közelmúltban kondicionális mikroglialis CSF1R deléció hatására ugyancsak fokozott virális replikációt és mortalitást figyeltek meg egy egér HSV-1 enkefalitisz modellben (15).

A mikroglia-specifikus génkiütés terén komoly reményekkel kecsegtet egy új, kutatócsoportunk által is használt egérvonal, amely a Cre rekombináz két domainjének kifejeződését két promoter (CX3CR1 és Sall1) működéséhez köti, így floxolt egerekkel keresztezve megvalósítható mikroglia-szelektív rekombináció (16). Tudomásom szerint ezzel az egérvonallal még nem végeztek CSF1R deléciót. Sajnos a különböző Cre driver vonalak esetén a rekombinációs hatékonyság ugyancsak eltérő lehet *in vivo*, amely a kísérleti eredmények értelmezését is megnehezíti. A centrális CSF1R szerepének megértését tovább bonyolítja, hogy a CSF1 mellett a CSF1R-mediálta hatások terén a receptor egy másik agyi ligandja, az IL-34 szerepe is kiemelten fontos lehet, ráadásul adott agyterületeken különböző mértékben. Például, az IL-34 neuronális termelésének szelektív gátlása a striatumban közel 50%-os mikroglia depléciót okoz, és bár ez önmagában nem jár káros fenotípussal, nagymértékben megnöveli a neuronhálózat excitabilitását és fokozza a rohamok kialakulását experimentális epilepszia modellekben (17).

Tudomásom szerint jelenleg még nem ismert olyan, egysejt szekvenálás vizsgálatok eredménye, amely koraszülöttekben azonosította volna a CSF1R mutációkkal társuló mikroglialis fenotípus változások sejtszintű hatásait. Ismert ugyanakkor, hogy a sérült agyszövetekben vagy neurodegenerációs kórképekben a mikroglialis transzkriptom részben átfedő „Damage-associated microglia” (DAM) fenotípust mutat egér és humán agyszövetek esetén, bár különbségek is akadnak szép számmal (18, 19). A CSF1R túlexpresszió egerekben viszont igazolhatóan mikroglialis proliferációt és a mikroglia számok növekedését okozza, amely önmagában nem járt káros neuropathológiai következményekkel (20). A fenti példák alapján véleményem szerint a legfontosabb elvégzendő feladatok egyike a mikroglia fenotípus változásaiban szerepet játszó kulcsfontosságú útvonalak azonosítása, és ezek szerepének megértése lesz a különböző neurológiai kórképek esetén. Ennek egy fontos eleme a CSF1R-mediálta hatások fejlődéstani- és felnőttkori szerepének tisztázása.

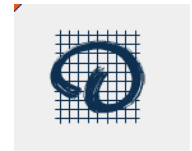
4. A disszertáció egyik fontos témája a szisztémás sérülés hatása a mikrogliaira, amelyet a bevezetésben is ismerttet (12. oldal). Vizsgálták-e, hogy a különböző szisztémás hatások (infekció, trauma, metabolikus zavar, gyulladás) azonos vagy különböző mikroglia fenotípust eredményeznek (pl. transcriptome, proteome, metabolome, epigenetika)? Az LPS modellt specifikusan említi – de eltérő hatása lehet-e olyan szisztémás változásoknak, amelyek a véragyagát működését nem befolyásolják?



Válasz: Ismert, hogy a mikroglia rendkívül érzékeny mikrokozonyzetének megváltozására, beleértve a sérülések, fertőzések hatásait, az ionegyensúly, pH, oxigén koncentráció változásait, valamint metabolitok, purinok, neurotranszmitterek, citokinek, alarminok, intracelluláris fehérjék, plazmafehérjék és sérülés- vagy patogén asszociált molekulák jelenlétét. Ezzel párhuzamosan, számos megfigyelés mutatja, hogy az agyi mikrokozonyzet megváltozásának hatására kialakuló mikroglialis fenotípus változások nagy átfedést mutatnak különböző akut stimulusok esetén és az ezt kísérő korai, celluláris változások (pl. intracelluláris kalcium szint növekedése, proinflammatorikus kaszkádok aktiválódása, proteázok, reaktív oxigéngyökök termelése), vagy az ezzel társuló populációs szintű változások (mikroglialis proliferáció, megnövekedett fagocitotikus aktivitás, stb) többféle gyulladós stimulus hatására is kialakulhatnak mind centrális, mind szisztémás eredetű inzulturn esetén. Ismert, hogy intraperitoneális LPS (rutinszerűen használt gyulladós stimulus, Gram-negatív baktériumok sejtfal komponense) hatására élethosszon át tartó epigenetikai és transzkriptomikai változások tapasztalhatók a mikroglia sejtekben (21). Miközben az LPS hatásának közvetítésében a Toll-like receptor 4 (TLR4) játszik kulcsszerepet, az LPS hatással részben átfedő változásokat okoz a mikroglialis transzkriptomban a Poly(I:C) (szintetikus, dupla szálú RNS), amelyet a sejtek TLR3-on keresztül érzékelnek több más receptor mellett (22). A részben átfedő transzkriptomikai változásoknak különböző szisztémás gyulladós stimulusok esetén az is lehet az oka, hogy a keringésben indukálódó proinflammatorikus kaszkádok és mediátorok között is komoly átfedés tapasztalható. Mindemellett, rendkívül nehéz a szisztémás inzulturn mikrogliaóra gyakorolt hatásait elválasztani az ezekkel járó stressz hatásaitól (vegetatív idegrendszer, HPA tengely aktiválódása, akut fázis válasz kialakulása, stb), amelyek ugyancsak hosszútávú hatással lehetnek a mikroglialis fenotípus és transzkriptom változásaira (23, 24). Annyi bizonyos, hogy mind a korai élepszakaszban, mind felnőtt állatokban nagymértékű transzkriptom- és proteom-szintű, gyakran proinflammatorikus kaszkádok aktiválódását mutató változások tapasztalhatók perifériás fertőzések hatására is, és e változások is részben átfednek a különböző stimulusok esetén. Nem könnyű ugyanakkor a szisztémás gyulladós stimulusok, vagy infekciók esetén a centrális érintettség mértékét megítélni, ezért a mikrogliaóra gyakorolt hatások értelmezésének tekintetében is komoly óvatosságra van szükség. Számos esetben a mikroglia betegség- vagy sérülés-asszociált transzkriptomikai, proteomikai változásai a különböző, (elsődlegesen centrális eredetű) neurológiai kondíciók esetén is nagymértékű átfedéseket mutatnak. Különösen nagy nehézséget okoz, hogy krónikus kondíciók esetén a mikroglialis fenotípus változások rendkívül heterogének még a rágcsló modellekben is, amely tovább árnyalja a pontosabb, adott inzulturnra jellemző mikroglialis fenotípus azonosítását, nem beszélve a humán mikrogliaóráról és a szerteágazó komorbiditások hatásairól az egyes agyi régiók mikroglia populációira (19, 25-28). Sajnos átfogó, célirányos összehasonlító vizsgálat jelenleg még rágcsló modellekben sem ismert, amit az eredmények értelmezésekor figyelembe kell venni.

5. A TGF β szerepét viszonylag részletesen taglalja, és említi a Tgfbr2 deléció hatását az agyi homeostasisra és a mikroglia primingra (13. oldal). Sclerosis multiplex agyi léziókban a tgfb és a Tgfbr2 expresszió a remyelinizációval asszociálódik, és elsősorban asztrocitára jellemző, így a mikroglia indirekt módon is érintett lehet. Tud-e kondicionált, mikroglia-specifikus Tgfbr2 modellről, illetve asztrocita-mikroglia interakciókról e vonatkozásban?

Válasz: Az elérhető kutatási adatok szerint a TGF β az egyik kulcsfontosságú immunmodulátor, amely a mikroglia sejtek aktivitását, túlélését és gyulladós folyamatait szabályozza. A TGF β 1 és TGF β 2 ligandok rendkívül komplex, több receptor (TGF β R1-3) együttes hatását, eltérő affinitását és



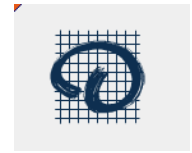
különböző celluláris expresszióját magába foglaló jelátviteli útvonalakon fejtik ki hatásukat, miközben a kondicionális KO egérmodellek esetén az irodalmi adatok hiányosak és sok közöttük az ellentmondás. TGF β 1-deficiens egerekben nem találhatóak mikroglia sejtek, és a Tgfr2 mikroglialis deléciója nagymértékű morfológiai és transzkriptomikai változásokat okoz a mikroglia sejtekben, eltelve sejtek fenotípusát egy proinflammatorikusabb állapot irányába (29, 30). Bár ismert, hogy a mikroglia sejtek komoly szereppel bírnak a reaktív asztrocita fenotípus szabályozásában (31), az asztrocita-mikroglia interakciók szerepét célirányosan mikroglialis Tgfr2 egerekben tudomásom szerint nem vizsgálták. Számos elérhető adat mutatja ugyanakkor a retina Müller-sejtjeinek (GFAP-pozitív, radiális glia) neurotoxikus transzformációját a mikroglialis Tgfr2 hiányában, amely neuronális apoptózist, csökkent retinális neovaszkularizációt okoz és növeli a retina sérülékenységet (32). Feltételezhető, hogy a mikroglialis Tgfr2 hiánya következtében kialakuló „neurodegeneratív” mikroglia fenotípus káros hatásait részben a megváltozott mikroglia-asztrocita interakciók révén fejtik ki. Ugyanakkor a centrális leukocita infiltrációval együtt járó neurológiai betegségek esetén - mint a Sclerosis multiplex, vagy elfogadott egér modellje az experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) – a mikroglia mellett infiltrálódó monociták és dendritikus sejtek is kifejezhetik a Tgfr2-t (33). Ezért ezekben a vizsgálatokban az alkalmazott Cre rekombinázt kifejező egérvonal esetén a mikroglia-specifikus deléció meglétét kellő kritikai érzéssel szükséges értelmezni.

6. Kimutatja, hogy emberből generált iPSC-mikroglia transzplantációja integrálódik az egér kiméra agyba, és megtartja az identitását (19. oldal). Megváltoztatja-e a transzplantált humán mikroglia az egér neuronok aktivitását és funkcióját, és történik-e interakció purinerg junctionban a humán mikroglia és az egér neuron között?

Válasz: A kutatócsoportunk által leírt purinerg junctionokat tudásunk szerint humán mikroglia xenograftok esetén egér agyban még nem vizsgálták. Elérhetőek ugyanakkor olyan adatok, amelyek szerint a humán iPSC-mikroglia az egér agyban képes a neuronális sérülés érzékelésére és hatással bír a neuronális aktivitás változásaira. Például, az iPSC eredetű mikroglia érzékeli a cuprizone-indukálta demielinizációt, megváltoztatva transzkriptomikai állapotát, amely ugyanakkor eredetére is jellemző marad (34). Hasonlóképpen képes a humán iPSC eredetű mikroglia az egér agyban szisztémás gyulladásszerű stimulusra is válaszolni (35). Ismert sejtkulturákban az iPSC eredetű mikroglia és neuronok interakciója is (36), ezért remélhetőleg a közeljövőben elérhető válnak *in vivo* iPSC mikroglia-neuron interakciós vizsgálatok eredményei.

7. Említi, hogy egyetlen, akut szisztémás gyulladásszerű stimulus megváltoztatja a mikroglia epigenetikai programját (20. oldal). Vizsgálták-e szisztémás stimulus hatását egyes sejt szinten: azaz generál-e a szisztémás stimulus specifikus, erre jellemző mikroglia alcsoportot vagy alcsoportokat (cluster) speciális transcriptome mintázattal, azaz fenotípussal?

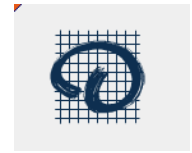
Válasz: Ismert, hogy a mikroglia sejtek az egészséges agyszövetben is nagymértékű regionális heterogenitást mutatnak, amely lehetővé teszi elkülöníthető mikroglialis klaszterek azonosítását. Ezek a különbségek részben magyarázhatók az eltérő neurokémiai környezettel, és az egyes agyterületek



öregedéssel kapcsolatos váltoásaival is összefüggést mutatnak (37). A szisztémás LPS kezelés hatására kialakuló jellegzetes mikroglialis „molekuláris ujjlenyomat” mellett a mikroglialis transzkriptom változásai nagy heterogenitás mutatnak az egyes mikroglia sejtek esetén. Érdekes módon, intraperitoneális LPS kezelés után az agyból izolált mikroglia sejtek transzkripciós heterogenitása is megnő a homeosztatikus állapotban tapasztalható mikroglialis heterogenitáshoz képest (38). Ezek a változások jellemzően a homeosztatikus mikroglialis gének (P2Y12R, Tmem119, Siglech, stb), expressziójának csökkenését és a „klasszikus” proinflammatorikus kaszkádok különböző mértékű aktivációját mutatják az egyes mikroglialis klaszterek esetén. Valószínűsíthető, hogy a mikroglia alcsoportok közötti különbség az egyes mikroglia populációk eltérő érzékenységéből adódik szisztémás gyulladással stimulálva. Érdekes módon, azonosíthatók az LPS indukálta változásokhoz képest eltérő mikroglialis ujjlenyomatok gyulladással neurologiai betegség modellek esetén is, például a SOD1^{G93A} amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) egér modellben, ahol szintén több, ALS-re jellemző mikroglialis klaszter különíthető el (28, 39). Véleményem szerint a szövethomogenizátumokból izolált mikroglia „omics” vizsgálatai esetén óvatosságra int, hogy a kutatásaink által kiemelten fontosnak látszó térbeli információ (adott mikroglia sejtek pontos lokalizációja, erekhez, neuronokhoz való térbeli viszonya, nyúlványaik kapcsolatrendszere, stb) elveszik. Ezért fontos lenne a közelmúltban nagy fejlődésen átment térbeli transzkriptomikai, proteomikai módszerek felhasználásával átfogó vizsgálatokat végezni a mikroglialis heterogenitás megértésére az adott agyi régiók anatómiai, neurokémiai viszonyai és az egyes mikroglia sejtek celluláris mikrokozonyzatának figyelembevételével.

8. Vizsgálták a mikroglia változását akut stroke kapcsán, ami megelőzi a makrofágok invázióját mind a primer sérülés és a peri-infarktus szövetben is (25. oldal). Eltérő-e a szimultán mikroglia fenotípus a két helyen (primer sérülés vs peri-infarktus szövet)?

Válasz: A primer sérülés területén, ahol az agyi vérkeringés zavara a legsúlyosabb a nagymértékű idegsejtpusztulás és vér-agy-gát sérülés együtt jár a mikroglia sejtek gyors fenotípus változásával, amelyet a sejtek egy részének pusztulása is kísér. A nagymértékű ATP felszabadulás és sejttermelés miatt a mikroglia az infarktus területén először gyors proinflammatorikus transzformációba megy keresztül, majd intenzív fagocitotikus aktivitást mutat és a sejtek zöme 24-48 órán belül amóbooid formát vesz fel, miközben nyúlványaik lerövidülnek és térfogatuk is megnő. A sejtek gyors fenotípus változása együtt jár a sejttest diszlokációjával és a sejtek migrációjával, majd megnövekedett proliferációs aktivitásával is, valamint számos aktivitás marker, adhéziós molekula, proteáz, és proinflammatorikus mediátor kaszkádszerű expressziójával. Ezzel szemben, az infarktus határzónájában a hipoxiás állapotot és metabolikus zavart egyébként alternatív metabolikus útvonalakkal jól kompenzáló mikroglia sejtek csak részleges morfológiai transzformációt mutatnak, migrációjuk korlátozott és *in vivo* két-foton mikroszkópiás vizsgálataink szerint nyúlványaikkal körülölelik a sérült, magas intracelluláris kalcium szintet mutató idegsejteket és a vaszkuláris struktúrákat is. Érdekes módon, a mikroglialis interleukin-1 termelődése is fokozottan az evolválódó infarktus határzónájában figyelhető meg (40, 41). A stroke akut fázisát követően a proliferáció platózik (72 óra és 1 hét között) mind az infarktus core, mind a határzóna területén, amelyet a sejtek több stádiumban megvalósuló transzkriptomikai és proteomikai transzformációja kísér egy pro-regeneratív fenotípus irányába, miközben egy vastagodó proliferatív asztrocita réteg (scar) nagyszámú



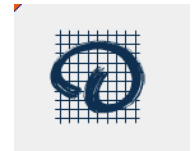
mikrogliaával együtt körbefogja és fokozatosan izolálja az infarktus területét. Egysejt transzkriptomikai vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy cerebrális iszkiémiát követően az agykéregben több mikroglialis fenotípus is elkülöníthető az infarktushoz viszonyított lokalizációjuk függvényében és a különböző, infarktus utáni stádiumokban (42, 43). Fontos ugyanakkor megemlíteni, hogy jelenleg hiányoznak azok az átfogó transzkriptomikai és proteomikai vizsgálatok, amelyek az iszkiémiás károsodás által különböző mértékben érintett zónákban összevetik a mikroglialis fenotípus változásait a pontos anatómiai lokalizációval és funkcionális adatokkal a stroke-ot követő akut, késői és regenerációs fázisokban.

9. Milyen mechanizmus okozza a mikroglia észlelt pusztulását a stroke akut fázisában (25. oldal)?

Válasz: Stroke során az elérhető adatok szerint a sejthalál több típusának keverékét látjuk mikroglia esetén is. Bár általánosan a mikroglia és asztroglia érzékenysége az iszkiémiás károsodásra az idegsejtekhez képest kisebb, az infarktus „core”-ban, ahol a perfúziós deficit a legsúlyosabb, kialakulhat a mikroglia nekrotikus sejthalála, hasonlóan ahhoz, ami idegsejtek és más glia sejtek esetén is tapasztalható (44-46). Ugyanakkor, egyre több adat áll rendelkezésre, hogy a sejthalál egy gyulladással asszociált formája, a piroptózis, amely sérülés, fertőzés, hipoxia és egyéb stimulusok hatására kialakuló, caspase-1 enzim aktivitásától függő folyamat, nagyszámú mikroglia sejtet érinthet a különböző neurológiai állapotokban, beleértve a stroke-ot is. Piroptózis során az érett interleukin-1 β termelődéséhez szükséges caspase-1 aktivitás az IL-1 β és IL-18 propeptidok hasítása mellett a citoplazmán pórusokat képző gasdermin D fehérjét is érinti, amely folyamat együtt járhat tartós membrán sérüléssel és sejthalállal is, tipikusan IL-1 β -t termelő sejtek (makrofágok, monociták, mikroglia) esetén (47). Mivel a caspase-1 gátlása csökkenti a stroke-ot követő agyi sérülés mértékét, ezeket a hatásokat nehéz elválasztani specifikusan a mikroglia sejteket érintő piroptotikus folyamatok hatásaitól. Ugyanakkor *ex vivo* vizsgálatok szerint az IL-1 β termelődéséhez szükséges inflammaszóma aktivációt, amely különböző stimulusok hatására elindítja a pro-IL-1 β / Gasdermin D caspase-1 általi hasítását és az érett IL-1 β szekrécióját, a mikroglia/makrofág sejtek egy részének pusztulása kíséri. Ezért *in vivo* vizsgálatainkban az IL-1 β immunpozitivitást mutató mikroglia sejtek esetén (40, 41, 44, 48) számottevő lehet a piroptózis mértéke is.

10. Elemzi, hogy a DAMPs a priming stimulus nélkül is gyulladós választ generál mikrogliaiban IL-6 és CXCL1 termeléssel (26. oldal). Ismert, hogy a CXCL1 egér liquorban korrelál a polymorphonuclear myeloid-eredetű szuppresszor sejtek (PMN-MDSCs) megjelenésével az EAE konvaleszcens fázisában (Knier, Nat Immunol 2018). Van-e adat stroke-ban e sejtek szerepére, és vajon szerepet játszhat-e mikroglia által termelt CXCL1 e folyamatban?

Válasz: Ismert, hogy mind agyi gyulladás során centrálisan, mind a stroke hatására kialakuló szisztémás neutrofil mobilizálásban fontos szerepet játszik a CXCL1. Saját vizsgálataink szerint a stroke-ot követő akut fázis válasz egyik korai eseménye a CXCL1 termelődése: a fehérje emelkedett szintje a keringésben már fél órával az inzultus után tapasztalható, és pár óra alatt sok százszoros koncentrációt is elérhet, amely jól korrelál a csontvelői neutrofilek mobilizációjával. A CXCL1

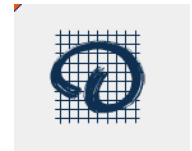


termelődése a sérült agyszövetben is korai gyulladásos markernek számít stroke-ot és más akut inzultusokat követően, megelőzve a neutrofil granulociták toborzását (49-52). Eredményeink szerint a szisztémás gyulladás káros centrális hatásainak közvetítésében fontos szerepet játszanak a neutrofilek, közreműködve a vér-agy-gát sérülés, gliális proinflammatorikus válaszok és neurotoxikus folyamatok kialakulásában is. A PMN-MDSC sejtek szerepe ezzel ellentétben a proinflammatorikus folyamatok gátlása, részben a T limfociták gyulladásos folyamatainak gátlása révén. Bár a T sejtek kiemelt közreműködők a cerebrális iszkémia pathofiziológiájában (52, 53), a PMN-MDSC szerepét eddig kevés tanulmány vizsgálta. Ismert ugyanakkor, hogy a PMN-MDSC sejtek iszkémiás stroke-ot követően 72 órán belül megjelennek a csontvelőben és az agyszövetben is, miközben 24 órán belül kimutathatók a lépben (54). Tudomásom szerint experimentális stroke modellben nem alkalmaztak PMN-MDSC-specifikus intervenciót, csak általános neutrofil depléciót anti-Ly6G ellenanyag segítségével (55).

11. A donor leukocyták meningealis infiltrációját észlelték stroke után 24 órával (27. oldal). Bár véreredetűnek említi, de lehetséges-e, hogy a calvaria csontvelőből származtak? Újabb adatok felvetik, hogy a calvaria csontvelői sejtek fenotípusa specifikus lehet, és stroke-ban szerepük lehet (Kolabas et al, 2021 December 25, <https://doi.org/10.1101/2021.12.24.473988>).

Válasz: Köszönöm a Bírálónak ezt az érdekes felvetést. A stroke során infiltrálódó mieloid sejtek forrása régóta vitatott, és a megértést nehezíti, hogy nem csak az infiltrálódó sejtpopulációk heterogének, de ezek különböző szövetekből is bejuthatnak a központi-idegrendszer területére. A toborzott sejtek egy populációja igazoltan a keringés felől, az agyi erek falán át kerül be az agyi parenchymába, vagy az agyhártyák közti térbe, és esetükben a csontvelő vagy a lép is lehetséges forrás. A calvaria csontvelőből az agyhártyák terébe vezető csatornákon át monociták igazoltan képesek bejutni a meningeális kompartmentekbe. Rendkívül érdekes eredményeket hoztak azok a vizsgálatok, amelyek a calvaria csontvelőben más csontokban található sejtektől eltérő, speciális transzkripciós fenotípust mutató neutrofil granulocitákat azonosítottak, amelyek toborzódhatnak a sérült agyszövetbe. Ezen felül, humán TSPO-PET vizsgálatok stroke-ot követően a kérgi lézióhoz közeli koponyacsontban csökkent radioligand felvételt mutattak ki, miközben növekedést tapasztaltak AD betegek calvaria vizsgálata során (a transzlokátor protein, TSPO, kifejeződik a mikroglia/makrofág sejteken és mennyisége jól korrelál neuroinflammatorikus változásokkal). Ezek az eredmények utalhatnak a calvaria sejtek toborzására a sérült agyszövetbe a bíráló által hivatkozott preprint alapján, amely publikáció a Cell-ben lett közzéve a közelmúltban (56). Ezt a felvetést egér stroke modellekben végzett vizsgálatok is támogatják (57). Véleményem szerint a következő évek egyik fontos feladata lesz, hogy a calvaria sejtek relatív közreműködését megállapítsa a különböző neurológiai betegségek során tapasztalható centrális leukocita akkumulációban, hiszen ez lehetőséget adna célzott intervenciók kifejlesztésére is egy eléggé jól definiált és potenciálisan számos módon célzottan targetálható (pl. ultrahang, infravörös- vagy röntgen irradiáció) területen az agyi mikrokörnyezet direkt megzavarása nélkül.

12. Kísérleteiben az NLRC4 és AIM2 inflammaszoma deficiencia javította a neurológiai végpontokat, de NLRP3 deficiencia nem (27. oldal). Mi lehet ennek az oka? NLRP3 az egyik legfontosabb

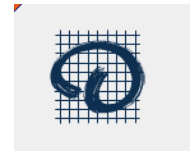


gyulladásos inflammaszoma, DAMP és endoszomalis TLR is aktiválja az NF- κ B útvonalon keresztül, és fontos szerepet játszik az IL-1 és IL-18 termelésében a caspase-1 aktivitáson keresztül.

Válasz: Ez az eredmény bennünket is meglepett, ezért a kísérletet két különálló kohorton is elvégeztük – azonos eredménnyel. Különösen elgondolkodtatók ezek a megfigyelések annak ismeretében, hogy az NLRP3 az IL-1 β termelésében is fontos szerepet játszik, amely adataink és mások eredményei szerint is nagymértékben közreműködik a stroke pathofiziológiájában. Azóta ezeket az eredményeket filament MCAo és thromboembolikus stroke modellben is megerősítették (58, 59), miközben kimutattak NLRP3-függő protekciót az NLRP3 antagonistá MCC950 alkalmazásával (60, 61). Rekurrens stroke során is felmerült az NLRP3 lehetséges szerepe (62). Véleményem szerint az adott kísérleti eredmények értelmezésekor fontos figyelembe venni, hogy a különböző experimentális modellek, és még adott modellek technikai kivitelezése is eltérő az egyes laboratóriumokban, miközben a proinflammatorikus folyamatok kinetikája és hatása az infarktus evolúciójára ugyancsak nagymértékben modell-függő. Ismert, hogy a különböző KO egér modellekben (különösen a germline, full KO egerekben) kompenzációs mechanizmusok is kialakulhatnak, amelyek befolyásolhatják a vizsgálatok eredményét. Másrészt, eredményeink szerint az AIM2 és NLRC4 inflammaszómák gátlásának eredményessége (48) felveti annak lehetőségét, hogy a sérült sejtekből felszabaduló DNS (AIM2 aktivátor), a mikrobióta eredetű flagellin (NLRC4 aktivátor) vagy egy, jelenleg ismeretlen endogén NLRC4 ligand játszik meghatározó szerepet a stroke-ot kísérő szöveti sérülés hatására indukálódó IL-1 termelés és gyulladás pathofiziológiás hatásainak közvetítésében. Véleményem szerint ezért rendkívül fontos kondicionális NLRP3, AIM2 és NLRC4 KO egerekben megvizsgálni a különböző gyulladásos útvonalak sejtspecifikus hatásait a stroke kimenetelére.

13. IL-1 receptor antagonist (Anakinra) a SCIL-STROKE tanulmányban csökkentette az IL-6 szintet, de növelte a rosszabb funkcionális végpont esélyét 3 hónapnál. Ezt érdemes lett volna diszkutálni.

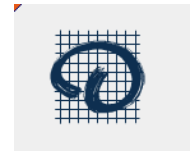
Válasz: Egyetértve a Bírálóval, az Anakinra hatásait iszkémiás stroke során vizsgáló klinikai próba kimenetelének megvitatása segíthette volna a dolgozatban bemutatott mechanizmusok értelmezését. Fontos kiemelni, hogy az IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) Anakinra nem csak biztonságosnak bizonyult a SCIL-STROKE és más klinikai vizsgálatok során is, de a proinflammatorikus biomarkerek (CRP, IL-6) mennyiségét is hatékonyan csökkentette (63, 64). Komoly problémát okozott ugyanakkor annak eldöntése, hogy az alkalmazott dózis, a kezelés időzítése és esetleges interferenciája adott kórfolyamatokkal, komorbiditásokkal vagy gyógyszervegyületekkel milyen módon befolyásolta az adott vizsgálatban kijelölt klinikai végpontok alakulását. Valószínűsíthető (és ezt jelenleg publikálás alatt álló experimentális vizsgálatok is támogatják), hogy a SCIL-STROKE tanulmány során a betegek egy részénél a klinikai protokoll szerint thrombolízis céljából elvégzett plazminogén aktivátor kezelés interferálhatott az IL-1RA hatásaival. Sajnos a vizsgálatba bevont résztvevők száma nem volt alkalmas ennek statisztikai értékeléséhez. Miközben az Anakinra valóban mutatott tendenciát rosszabb funkcionális végpont irányába a teljes kohort esetén, azoknál a betegeknél, akinél a keringésben kimutatható volt a kezdeti magas IL-6 szint csökkenése Anakinra hatására, jobb kimenetel volt tapasztalható a módosított Rankin skála alapján. Ez utalhat arra, hogy az IL-1RA hatékonyságát az iszkémiás károsodás hatásainak mérséklésében több, jelenleg nem ismert tényező is befolyásolhatja,



és ezt csak jóval nagyobb betegpopuláció bevonásával lehetne hatékonyan vizsgálni. Érdekes módon, egy Nature Medicine-ben publikált vizsgálatban a magas szolubilis urokináz plazminogén receptor (suPAR) plazma szintek alapján várhatóan nagyfokú légzési elégtelenséget mutató COVID-19 betegek esetén az Anakinra nemcsak a keringésben mért CRP és IL-6 szinteket csökkentette szignifikánsan, de hatékonyan gátolta a súlyos tünetek kialakulását, csökkentette a mortalitást, és lerövidítette a kórházban töltött időt is (65). Ennél a klinikai vizsgálatnál a betegek várható állapotának korai előjelzése hatékonyan bizonyult a megfelelő részvevők kiválasztásában. Véleményem szerint további vizsgálatok szükségesek iszkémiás- vagy vérzéses stroke esetén, hogy megfelelő biomarkerekkel ki lehessen választani azokat a betegeket, amelyekben az Anakinra által gátolt proinflammatorikus válasz különösen nagymértékben működik közre a szöveti károsodás és a maradandó neurológiai tünetek kialakulásában, miközben megvalósítható lenne az Anakinra hatásait várhatóan csökkentő gyógyszerek és komorbiditások feltérképezése, indikátorként a kezelés megkezdésére.

14. Említi az NLRC4-ligand bakteriális flagellin és a bél mikrobiota részvételét az akut agyi sérülésben. Hogyan képzelhető el a bél mikrobiota ilyen gyors hatása, és milyen útvonalakon keresztül? Flagellin direkt hatása a központi idegrendszerben? Flagellin perifériás hatása? Bakteriális proteinek, metabolitok, transzkriptok kimutathatók az agyban.

Válasz: Utalva a fenti válaszomra az NLRC4-el kapcsolatban, több lehetőséget is elképzelhetőnek tartok. A mintázatfelismerő Toll-like vagy Nod-like receptorok szerepének megértését nehezíti, hogy az ezeket aktiváló, infektív ágensekből származó patogén asszociált molekuláris patternek (PAMP-ok) mellett az adott receptor által felismert endogén, sérülés asszociált molekuláris patternek (DAMP-ok) nem mindig ismertek. Számos esetben derült ki, hogy mind PAMP, mind DAMP felismerése megtörténik ugyanazon receptor által. Jó példa erre a mind patogén-, mind a host eredetű DNS-t felismerő AIM2, a patogén- és host RNS-t is felismerő RIG1 és TLR3, vagy a bakteriális LPS-t felismerő TLR4, amely ligandként a sérült sejtekből felszabaduló DAMP-ot, a HMGB1-et is felismeri (66-68). Az NLRC4 ismert ligandja a bakteriális flagellin. Amennyiben kutatásaink során az NLRC4-et aktiváló ligand bakteriális eredetű, elképzelhető, hogy a stroke hatására kialakuló bél-barrier sérülés során kikerülhet megfelelő mennyiségű flagellin a keringésbe, amely a sérült vér-agy-gáton át eljuthat az agyi NLRC4-et expresszáló sejtekhez. Ugyanakkor, elképzelhető, hogy a flagellin nem a központi idegrendszerben, hanem a béltraktusban, vagy más perifériás szervben hat az NLRC4-re (pl. befolyásolva a vegetatív idegrendszer működését vagy a szisztémás gyulladás kialakulását). Kutatásaink kimutatták, hogy a stroke-ot követően a belek barrier funkciójának megváltozása egerekben két órán belül megtörténik (69), miközben arra is vannak adatok, hogy a mikrobióta eredetű mediátorok pleiotróp gyulladáshatásokat közvetíthetnek az agy irányba, beleértve a mikroglia sejteket ért hatásokat (70). További lehetőség az NLRC4 esetén egy jelenleg ismeretlen, endogén ligand megléte, amely azonosításra vár. E lehetőségek figyelembevételével mindenképpen szükséges további experimentális és klinikai vizsgálatokat végezni, hogy a stroke-ot követően fellépő centrális és szisztémás változások során azonosítani lehessen a terápiás potenciállal bíró NLR-ek, TLR-ek és inflammaszoma-mediálta hatások körét, beleértve a kulcsfontosságú DAMP-ok és PAMP-ok azonosítását is, amelyek számottevő mértékben befolyásolhatják a stroke kimenetelét.



15. *Az IL-1 R 1 fl/fl Il Sicolcl egérben (28. oldal) csak a cerebrovascularis endothel érintett?*

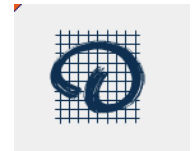
Válasz: A solute carrier organic anion transporter 1c1 (Slco1c1, Oatp14) kifejeződését specifikusan agyi endothel sejtekben és a choroid plexusban írták le, miközben perifériás szervek endothel sejtjeiben nem találtak expressziót (71). Az Slco1c1-CreERT2 egérmodellt leíró publikációban ezeket az adatokat megerősítették (72) és más, Cre dependens egérvonalakkal történt keresztezés után is kimutattak gén deléciót a cerebrovaszkuláris endotheliumban (73). Saját vizsgálatainkban nem teszteltük, hogy az Slco1c1-CreERT2 mediálta riporter fehérjét kifejező egerekben perifériális endothel sejtek esetén megfigyelhető-e rekombináció, ugyanakkor megmuttuk, hogy a cerebrális endothel sejtekben igen. Tapasztalataim szerint számos Cre dependens egér modell mutathat nem várt rekombinációt, hiszen nagyon kevés olyan marker gén létezik, amely csak egy adott sejttypusban fejeződik ki és ez élethosszon át állandó marad. Ezért nem kizárható, hogy a központi idegrendszeren kívül is megvalósul IL-1R1 deléció a saját modellünkben is. Ezt további kísérletek során érdemes lesz megvizsgálni.

16. *Vizsgálták-e a NETs-re adott mikroglia reakciót (28. oldal)? Lehetséges-e, hogy a több alkalommal említett mikroglia pusztulás stroke kapcsán a NETS-re adott válasszal, vagy a neutrophil fagocitózissal függhet össze?*

Válasz: Köszönöm a felvetést. Kutatásaink során a neutrophil extracellular trap (NET)-ek funkcionális szerepét a mikroglia sejthalál kialakulásában nem vizsgáltuk és nincs tudomásom meggyőző irodalmi adatokról erre vonatkozóan. Ugyanakkor elképzelhető, hogy nagyszámú neutrofil granulocita fagocitózisa okozhat mikroglia sejthalált. Számos megfigyelést tettünk egy *in vitro* neurotróp vírusfertőzés modellben, amelyek szerint az intenzív fagocitotikus aktivitás együtt járhat a mikroglia sejtek pusztulásával. Ebben a modellben a mikroglia sejtek akár 10-12 fertőzött neuront is képesek voltak fagocitálni 24-48 óra alatt, miközben sejt méretük és fagoszómaik száma megnőtt és ez számos esetben a megfigyelt mikroglia sejt halálával végződött (13). Mivel a NET-ek DNS tartalma AIM2 és NLRP3 inflammaszóma aktivációt is okozhat mikrogliaiban, érdemes lenne célzott kísérletekben megvizsgálni, együtt jár-e NETosis-t mutató neutrofil granulociták fagocitózisa piroptotikus sejthalállal.

17. *Megállapítja, hogy a migráló neutrofilek neurotoxicitása proteáz termeléssel függött össze (28. oldal). Ugyanakkor csak inhibitor koktél védett a neurotoxicitás ellen, az egyes inhibitorok nem. Mi ennek az oka? Lehetséges-e, hogy specifikus neutrofil fenotípusok eltérő proteáz tenmeléssel rendelkeznek (Rubio-Pnce, Curr Opin Immunol 2021 68:41)?*

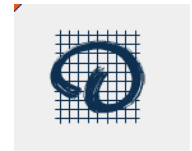
Válasz: Véleményem szerint is elképzelhető, hogy a heterogén neutrofil populációk degranulációja vagy NETosis során különböző proteázok kerülnek a nukleáris vagy mitokondriális DNS-el együtt az extracelluláris térbe. Ennek hátterében állhat az izolált neutrofil populáció heterogenitása, és eltérő proteáz termelése is. Az is elképzelhető, hogy vizsgálataink során az izolált neutrofilek - amelyek „naiv” alakjai endotheliális transzmigráció vagy megfelelő gyulladásoos stimulus nélkül 24 óránál



kisebb átlagos élettartammal rendelkeznek – eltérő kora, differenciáltsága, vagy aktivitási állapota is okozhatta egy eltérő granulom- és mediátor készlet meglétét (74).

18. Polymorphonuclearis neutrophilok (PMNs) részt vesznek a post-ischemiás remodelingben is (jótékony hatás), és randomizált klinikai tanulmányokban migrációs molekulák (ICAM1, CD11/CD18 integrin, VLA4) gátlása a stroke kimenetelt nem, vagy inverz módon befolyásolták. Ezt érdemes lett volna elemezni.

Válasz: Ez ugyancsak egy rendkívül fontos terület, tele ellentmondásos adatokkal és megfigyelésekkel, amelyet valóban érdemes lett volna bővebben kifejteni a dolgozatban. Az elérhető experimentális vizsgálatok szerint a neutrofil granulociták szerepe a stroke akut fázisában káros, különösképpen a szisztémás gyulladás vagy gyakori stroke komorbiditások (fertőzés, érelmeszesedés, obesitas, diabetes) állatmodelljeiben (52, 53, 75). A dolgozatban bemutatott vizsgálatokon túl igényes kutatásokban kimutatták például, hogy a szisztémás IL-1 beadást követő akut stroke során a neutrofil granulociták nagymértékben közreműködnek a vér-agy-gát sérülés kialakulásában, és ez neutrofil deplécióval, vagy MMP9 gátlással visszafordítható (76, 77). Ugyanakkor nagyon ellentmondásosak azok a vizsgálati eredmények, amelyek az agyi transzendotheliális neutrofil migrációt próbálták gátolni, hiszen nem tisztázott, hogy az infiltráció szükséges-e a neutrofilek káros hatásaihoz, és gátlása milyen mellékhatásokkal jár. Fontos megemlíteni, hogy a korai vizsgálatokról, amelyek KO egér modellek esetén jobb kimenetelt találtak experimentális stroke-ot követően, számos esetben derült ki, hogy a géniütés nem volt megfelelő, nagymértékű off target hatásokat okozott, vagy az elvégzett vizsgálatok kivitelezése alacsony színvonalú volt. Érdekes módon, a korábban pozitív kimenetelű ICAM-1 KO kísérleteket megismételve *Icam1^{tm1Alb}* C57BL/6 mutánsokban, ahol specifikus és hatékony ICAM-1 deléció sikerült megvalósítani, nem csökkent a centrális neutrofil toborzás, vagy az iszkémiás károsodás mértéke (78). Ez támogatja a humán ICAM-1 próba negatív eredményét is. Hasonló ellentmondások nehezítik a $\alpha 4\beta 1$ integrin (VLA-4, CD49D/CD29) monoklonális antitesttel (pl. Natalizumab) történő gátlását célzó, negatív klinikai vizsgálatok (79) értelmezését iszkémiás stroke betegekben az experimentális vizsgálatok fényében. Miközben a stroke-ot kísérő centrális leukocita toborzás kinetikája komplex és heterogén populációkat érint, az egerekben végzett vizsgálatok sem minden esetben mutattak ki eredményt VLA-4 gátlást követően, és adataink utalnak arra is, hogy az immunterápia hatékonyságát olyan tényezők is nehezíthetik, mint a poszt-iszkémiás agyszövetben tapasztalható T sejt proliferáció, amely Natalizumab kezeléssel nem gátolható hatékonyan (80, 81). A Bírálóval egyetértve az is elképzelhető, hogy emberben a még oly sikeres neutrofil intervenciók is gátolhatják a regeneráció során betöltött pozitív hatásait. Ezért szerintem rendkívül fontos a megfelelő terápiás időablak megállapítása hatékony intervenciók tervezéséhez. Azt is fontos kiemelni, hogy miközben az egérben 15% alatt van a neutrofilek aránya a teljes leukocita populáción belül, ez emberben 35-55 %, trauma esetén pedig akár a keringő sejtek 90%-át is elérheti. Mivel a neutrofilek kiemelten fontosak a fertőzések – köztük az opportunista patogének – elleni védekezéshez, és a stroke-ot követő immunszuppresszió gyakran társul súlyos kimenetelű poszt-stroke infekciókkal (53, 82), valószínű, hogy stroke betegekben nem szerencsés a neutrofilek általános depléciója vagy gátlása már csak a szisztémás védekező mechanizmusok fontossága miatt sem. A gyulladásos folyamatok diszregulációja nagymértékben ronthatja a stroke-ot követő regenerációt is. Annyi bizonyos, hogy számos meg nem értett mechanizmus szorul tisztázásra, hogy megvalósítható legyen az egyes



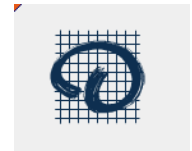
leukocita populációk által közvetített kórfolyamatok szelektív gátlása. A hatékony intervenciók várhatóan igénylik majd érzékeny, prediktív biomarkerek alkalmazását is a stroke betegek rendkívül heterogén immunológiai hátterének ismeretében.

19. A szisztémás gyulladás szerepét két rendszerben is vizsgálta: LPS és anaphylaxia során (31. oldal). Mindkettő a vér-agy-gát sérülését okozza. Lehetséges-e olyan szisztémás gyulladás hatásának vizsgálata, mely nem jár a vér-agy-gát sérülésével?

Válasz: Nem könnyű a kérdés, hiszen bármilyen gyulladásozó stimulus, amely változásokat okoz az agyi erek állapotában közreműködhet a vér-agy-gát funkciók megváltozásában is. Mind szisztémás LPS, mind anafilaxia esetén 24 órán belül kimutatható a cerebrovaszkuláris gyulladás, többek között az endotheliális ICAM-1 és VCAM-1 adhéziós molekulák expressziójának növekedésével (52). Nem mindegy ugyanakkor a szisztémás gyulladás mértéke és időtartama. Vizsgálataink szerint még nagy dózisú LPS kezelés esetén sem egyértelmű a barrier funkció csökkenés, amelyet többek között a keringésben lévő IgG, a keringésbe injektált fluoreszcens dextrán konjugátumok, valamint gadolinium MRI alkalmazásával is megvizsgáltunk. Mindemmel, a mikroglialis fenotípus változásai (morfológia, intercelluláris interakciók, transzkriptom, gyulladásozó mediátorok termelése) egyértelműen jelzik az agyi mikrokörnyezet megváltozását ezekben a modellekben. Publikálatlan adataink szerint, még a 3 dózisban, 24 órás időközönként megismételt szubkrónikus LPS beadás modellben is minimális gadolinium szignál tapasztalható az agyszövetben, miközben itt már látható a perivaszkuláris asztrocita végtalpak sérülése és leukociták transzendotheliális migrációja is. Ez mindenképpen utal arra, hogy az agyi barrier struktúra nem intakt, miközben az endothelium nagyobb molekulák számára átjárhatatlan marad. Véleményem szerint a szisztémás gyulladás a proinflammatorikus mediátorok szintjétől / típusától függő mértékben befolyásolja a vér-agy-gát integritását, és rendkívül kontextus függő, hogy a neurovaszkuláris egység különböző sejtjeinek válaszreakcióját milyen kritériumok alapján ítéljük vér-agy-gát sérülésnek. Ezért szükséges lesz különböző szisztémás gyulladásozó stimulusok cerebrovaszkuláris hatásait tovább vizsgálni és azonosítani azokat a mediátorokat, amelyek intakt barrier funkciók mellett is közvetítik a szisztémás gyulladás centrális hatásait.

20. Említi, hogy kísérletes stroke emelkedett T sejt számmal járt a csontvelőben (33. oldal). Vizsgálták a T sejtek fenotípusát (pl. Th, Te, Treg, stb.)?

Válasz: Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az experimentális stroke az inzultust követő 24 órán belül emelkedett CD8 T sejt számokat eredményezett a csontvelőben, miközben a CD4-pozitív T sejtek száma 72 órával reperfüziót követően mutatott emelkedést. Feltártuk ugyanakkor, hogy a csontvelőben a stroke okozta változásokhoz nagyon hasonló, emelkedett CD4- és CD8-pozitív T sejt számokat okoz a műtéti stressz, és az izoflurán anesztézia is (83, 84). Ezért valószínű, hogy hasonló változások számos különböző inzultusokat- vagy gyulladásozó stimulusokat követően is kialakulhatnak a csontvelőben (és más immunsejt populációk esetén, illetve immunszervekben, például granulociták vagy B-sejtek esetén a csontvelőben és lépben is), valószínűleg a vegetatív idegrendszer



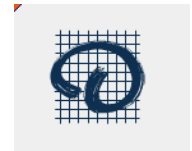
közvetítésével. A Treg sejtek változásait a csontvelőben e kutatások során nem vizsgáltuk, de fontos funkcionális szerepük ismeretében (50, 85) mindenképpen érdemes lenne.

21. HMPAO- és 99mTc-DTPA-SPECT kísérletes stroke-ban a tüdő és a bél perfúziós változását mutatta órákon belül (34. oldal). Történt-e hasonló megfigyelés human stroke-ban, és érdemes lenne-e ennek vizsgálata a stroke klinikai végpontokkal összefüggésben?

Válasz: Ismert, hogy a stroke emberben is megváltoztatja a bél barrier állapotát, a mikrobióta összetételét, csökkenti a perisztaltikát és gyulladásos mediátorok, immunsejtek aktiválódásához is vezet, amely folyamatok hátterében a vegetatív idegrendszer és a gyulladásos folyamatok szabályozásának zavara fontos tényezőnek látszik (86). Miközben a stroke után kialakuló paralitikus ileusz és más enterális komplikációk klinikai jelentősége számottevő (87), tudomásom szerint prospektív CT- vagy MRI képalkotó vizsgálatot a stroke-ot követő akut fázistól a tünetek megjelenéséig nem végeztek. A pneumonia stroke betegek esetén rendkívül gyakori, és a betegek állapotát nagymértékben súlyosbító komplikáció, amely vélhetően a stroke okozta szisztémás immunszuppresszív állapot közreműködésével alakul ki (53, 82, 88). A klinikai képalkotó vizsgálatok elérhetősége e téren ugyancsak limitált, valószínűleg azért, mert a stroke-ot követő korai időszakban ezekre csak akkor kerül sor, ha tüdőgyulladás gyanúja merül fel. A tüdőgyulladás korai kialakulásának vizsgálatára végeztek összehasonlító röntgen, ultrahang és CT vizsgálatokat stroke betegekben (89). Pneumóniával nem diagnosztizált betegek esetén CT vizsgálattal a stroke-ot követő átlagosan 2.5 órával végzett CT a betegek 15%-ban mutatott ki tüdő érintettséget, és a radiológiailag diagnosztizált betegekben később nagyobb valószínűséggel alakult ki pneumonia, miközben a mortalitás is magasabb volt (90). Véleményem szerint ezen a téren átfogó, prospektív klinikai képalkotó vizsgálatok kivitelezése hiánypótló lenne és nagymértékben elősegíthetné a stroke-ot követő szisztémás komplikációk mechanizmusainak megértését.

22. Transzfer kísérleteikben CRPS (komplex regionális fájdalom szindróma) betegektől nyert IgG kísérletes modellben (talp sértés) fokozta a mikroglia IL-1b termelését a gerincvelőben, és tartós hyperalgesiát eredményezett (34. oldal). Mi ennek a mechanisztikus magyarázata, okozott az IgG transzfer mikroglia aktivációt kontroll egérben is illetve egyéb kísérletes modellben? Azaz specifikus-e a krónikus fájdalom szindrómás betegektől izolált IgG hatása a fájdalom modellben? Ha igen, miért? Hogyan jut be a peritonealisan adagolt IgG a központi idegrendszerbe, tekintve hogy az ellenanyagok <1 %-a lép át az intakt vér-agyagáton?

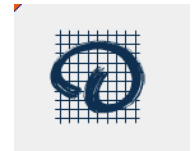
Válasz: A patogén autoantitestek szerepe a CRPS kialakulásában általánosan elfogadott, de a pontos betegségmechanizmusok nem ismertek. Az alkalmazott szérumsztransfer modellt Tékus és munkatársai 2014-ben közzölték (91). A mikroglia szerepét a centrális szenzitizáció kialakulásában ugyanakkor ebben a modellben korábban nem vizsgálták. Megfigyelték ugyanakkor, hogy a talp sértést követően ebben az egérmodellben a hiperalgészia és a végtag duzzanat is súlyosabb humán autoantitestek transzferét követően, megnövekedett substance P immunreaktivitás mellett. Ezek az adatok arra utalhatnak, hogy a humán autoantitestek okozta neurogén gyulladás fokozódott, és a



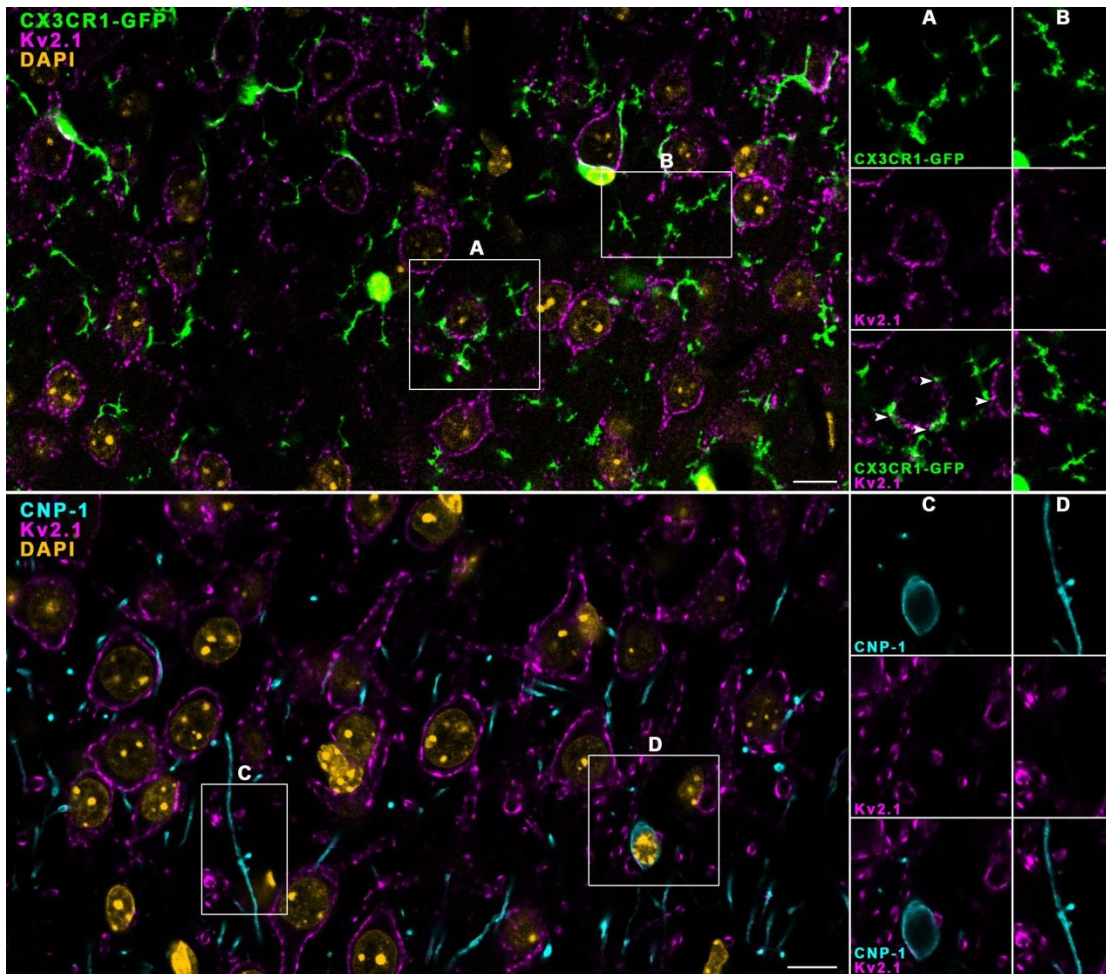
primer hatás nem a központi idegszerben, hanem a periférián következhet be. Bár a mikroglia sejteken érzékeny immunreakcióval naiv egerekben is kimutatható kis mennyiségű IgG jelenléte (IgG-like immunoreactivity), amely patológiás állapotokban megnő, azaz kis mennyiségben a keringő IgG vélhetően bejut a központi idegrendszer területére (92, 93), véleményem szerint a CRPS modellben sem lehet szó nagymértékű centrális IgG akkumulációról. A mikrogliális vizsgálatokra vonatkozólag, nagyobb mértékű mikroglia reaktivitást és IL-1 termelést csak a CRPS autoantitest beadását követően tudtunk kimutatni, kontroll IgG hatására nem. Ez utalhat arra, hogy a centrális gyulladás a perifériás gyulladás hatására alakul ki ebben a modellben, amely jelenleg ismeretlen (de IL-1 függő) mechanizmusok révén a mikroglia állapotát és a fájdalomérzékelést is befolyásolja. Nagyon érdekes lenne a CRPS autoantitestek közvetítette centrális gyulladás kialakulásában szerepet játszó szisztémás- és centrális gyulladáshoz vezető mediátorokat megismerni, hiszen elképzelhető, hogy célzott intervencióval megelőzhető lenne a centrális szenzitivizáció kialakulása. Eredményeink és klinikai vizsgálatok szerint ugyanis a mikroglia nagyobb mértékű aktivitás változása inzultust vagy gyulladáshoz vezető stimulust követően mind kísérleti állatokban, mind betegekben hetekig – hónapokig kimutatható, és jelenleg nem létezik hatékony stratégia a mikrogliális fenotípus homeosztatikus állapot irányába történő visszaalakítására mikroglia depléció és az azt követő repopuláció nélkül.

23. A szerző csoportja írta le a szomatikus purinerg junctiont, a mikroglia P2Y₁₂ dúsulását a neuron membrán Kv2.1 clusterével szemben, mely alapvető a neuronális aktivitás, mitokondriális funkció és sérülés felismerésében és a neuronsérülés limitálásában (37-38. oldal). Sclerosis multiplex agyi léziókban a Kv2.1 és Kv2.2 expresszió krónikus aktív léziókban fokozott (Boscia et al, 2021), és oligodendrociták is expresszálják (Marques et al., 2016). Vajon elképzelhető-e, hogy szomatikus purinerg junction létrejön mikroglia és oligodendrocita között is? Továbbá, a szürkeállományban vizsgált purinerg junction szerepet játszhat-e a fehérállományi neuron aktivitás és funkció modulálásában is? Ezek interneuronok, amelyek a neurovascularis unit részeként a vaszkuláris tónus szabályozásában vesznek részt, azaz ugyanazon mechanizmus a szürke- és fehérállományban más szabályozásban játszhat szerepet. Ilyen vonatkozásban különösen érdekes az 5. ábrán jelzett felismerés is, ahol a mikroglia szimultán lép kapcsolatba a neuronokkal és a mikroerekkel a kéregben. Hasonló kapcsolat a fehérállományi interneuronok interakciójával más módon is szabályozná a perfúziót a fehérállományban (és a kéregben), melynek diszfunkciója számos agyi betegséggel asszociálódik.

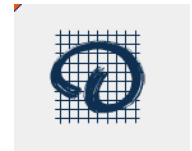
Válasz: Nagyon köszönöm ezeket az építő gondolatokat. Publikálatlan eredményeink azt mutatják, hogy a mikrogliális P2Y₁₂R közvetítésével a mikroglia nyúlványok és oligodendrociták között is kialakul hasonló kapcsolat, mint amelyet neuronokkal és erekkel kialakított interakcióik során megfigyeltünk. A mikrogliális P2Y₁₂R farmakológiai gátlása a mikroglia-oligodendrocita kontaktusok megváltozásával jár. E kapcsolatoknál, és a mikroglia-interneuron kapcsolatoknál is jelenleg eldöntetlen kérdés, hogy milyen sejtmembrán fehérjék léphetnek kapcsolatba a mikrogliális P2Y₁₂R-el. Mivel interneuronok esetén nem találtunk Kv2.1 és Kv2.2 expressziót, feltételezzük, hogy részben más módon, egyéb fehérjék közvetítésével történhet purinerg interakciók kialakítása a mikroglia nyúlványokkal. Rendkívül érdekesnek találtam, hogy a Sclerosis multiplex léziókban megjelenhet oligodendrocitán a Kv2.1 és Kv2.1 expresszió. Bár kutatásaink során SM betegekből vagy az EAE egér modelltől származó agyszöveteket nem vizsgáltunk, a Bíráló felvetésére elvégeztük a Kv2.1 immunfestést mikroglia



riporter CX3CR1-GFP egerek agyszövetén, és CNP-1 markerrel megjelöltük az oligodendrocitákat is. Miközben mikroglia nyúlványok és Kv2.1 között asszociációt csak a junkciók területén látunk (A és B inzertek mutatják, hogy a Kv2.1 immunjel elkülönül a GFP-pozitív mikroglia nyúlványoktól, nyílheggyel a szomatikus interakciók területét jelöltük), a CNP-1-el jelölt sejtek esetén nem tapasztaltunk átfedést a Kv2.1 szignállal (C és D inzertek). Külön köszönöm Vida Sára és Pósfai Balázs kollégáimnak az immunfestés és a képek elkészítését.



Azt is nagyon fontos gondolatnak tartom, hogy a fehérállományban kialakuló mikroglia-ér-interneuron kapcsolatok az általunk azonosított útvonalakon át, esetleg ettől részben eltérő módon szabályozhatnák a lokális perfúziót, illetve feltételezhetően egyéb folyamatokat is. Bár a fehérállomány mikroglialis folyamatait nem vizsgáltuk funkcionális kísérletek során, az anatómiai viszonyok ismeretében feltételezhető, hogy kialakulnak az agykéreghez hasonló lokális „mikrodomének”, ahol egy mikroglia sejt egyszerre több más sejtrel lép kapcsolatba és modulálja ezek interakcióit. Eredményeink szerint a mikroglia nyúlványok funkcionális függetlensége a sejttesttől elég nagymértékű (például kalcium aktivitás, irányított mozgás, filopodium képzés, intercelluláris kapcsolatok kialakítása tekintetében), ezért a fehérállományban is kialakulhatnak lokális szabályozó körök, amelyek akár a perfúziót, neuronális aktivitást, ingerületvezetést, vagy oligodendrocita maturációt / sejthalált is modulálhatják. Ezeket a felvetéseket támogathatja például, hogy a Ranvier-befűződések területén is kialakulnak specifikus mikroglia nyúlvány kapcsolatok (94). E folyamatok



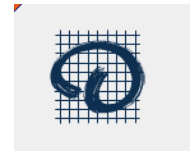
megértéséhez az elkövetkező időszakban a fehérállományi mikroglialis kapcsolatok molekuláris anatómiáját és főbb funkcionális hatásait részletesen meg kell vizsgálni.

24. *A neuron-mikroglia interakció szabályozása megváltozik-e, ha nem primer neuron sérülés (pl. stroke, trauma, migraine), hanem primeren gyulladásos mikroglia aktiváció van? Vizsgálható-e ez in vitro modellben pl. LPS mikroglia aktivációt követően vagy IL-1 KO modellekben?*

Válasz: Kutatásaink során számos több esetben vizsgáltuk a mikroglia-neuron interakciók változásait különböző gyulladásos állapotokban direkt agyi inzultus hiányában, és jelenleg is számos ilyen vizsgálat van folyamatban (publikálatlan adatok). Eredményeink szerint a szisztémás akut vagy krónikus LPS kezelés hatására kialakuló mikroglialis anatómiai, gyulladásos és funkcionális változások együtt járnak a megváltozott mikroglia-neuron és mikroglia-ér interakciókkal, és ennek funkcionális szerepe is igazolható a neuronális aktivitás és az agyi perfúzió vonatkozásaiban. Például, a laboratóriumban előállított DREADD receptort mikroglia sejteken kifejező MicroDREADD egerekben megvalósítható a mikroglia szelektív kemogenetikus „primingja”, amely a sejtek depolarizációját is nyúlvány motilitásuk markáns csökkenését eredményezi (10). Ez a nagyon hatékony kemogenetikus módszer lehetővé teszi, hogy a mikroglialis aktivitás hatásait az agyi mikrokörnyezet megzavarása nélkül, relatíve izoláltan vizsgáljuk. Kemogenetikus priming hatására a mikroglia érzékenysége a lokális extracelluláris ATP-re nagymértékben lecsökken, és tapasztalható a neurovaszkuláris csatolás megváltozása is szomatoszenzoros stimulus hatására. Hasonlóképpen, a krónikus LPS kezelés hatására megváltozott mikroglialis intercelluláris interakciók mellett csökkent mértékű hiperkapnia-indukálta vazodilatáció, és megváltozott neuronális kalcium aktivitás tapasztalható (publikálatlan adatok). Törekedni szoktunk arra, hogy amennyiben lehetséges, ezeket a vizsgálatokat *in vivo* végezzük, mert az agyi mikrokörnyezetből eltávolított mikroglia nagymértékben megváltoztatja molekuláris markereit (például ilyen a P2Y₁₂ receptor gyors, órák alatt bekövetkező downregulációja) és válaszreakcióit különböző stimulusok hatására. Bár az *in vitro* vizsgálatok nem megkerülhetők, és kutatásaink során is alkalmazzuk ezeket, véleményem szerint eredményeik értelmezésével a mikroglialis hatások tekintetében óvatosan kell bánni, és *in vivo* validáció is minden esetben szükséges. Ugyanakkor eredményeink arra utalnak, hogy a mikroglia-neuron interakciók *ex vivo* modelljeiben (például mikroglia-neuron kokultúrák, akut agyseletek, vagy organotipikus szeletek esetén) is kimutathatók nagymértékű változások LPS kezelés, vagy egyéb gyulladásos stimulusok hatására és KO modellekben is (pl. P2Y₁₂R KO, vagy CX3CR1 KO mikroglia esetén) is tapasztalhatók változások a neuronokkal való interakciók során, még akkor is, ha a „core” mikroglialis markerek expressziójának nagymértékű megváltozása ezekben a modellekben nem megkerülhető.

25. *Ahogy említi, a mikroglia a komplement rendszeren keresztül is részt vesz a neuron modulációban. Független ez a szomatikus purinerg junkció aktivitástól?*

Válasz: A mikroglia-szinapszis interakciók vizsgálata során számos tanulmány igazolta a komplement rendszer kiemelten fontos szerepét. Ilyen például a komplement fehérjék C1q, C3, vagy a komplement receptor C3R szerepének azonosítása a mikroglia által történő szinapszis eltávolítás (synaptic pruning)

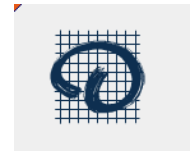


során. Arra is sok adat van, hogy a komplement rendszer fontos fehérjéinek gátlása részben a mikroglia-szinapszis interakciók befolyásolása révén képes különféle neurológiai betegségmodellek (AD, Huntington, stb) esetén a szinapszis vesztés, memóriefunkciók és viselkedési zavarok enyhítésére (95-97). Kutatásaink során komplement mediálta hatásokat a mikroglia-neuron purinerg junkciók tekintetében nem vizsgáltunk. Érdekes módon, a C1q fehérje, amelynek gátlása a szinapszis-mikroglia interakciók nagymértékű megváltozását eredményezi, nagy mennyiségben található meg a mikroglia sejtekben (immunfluoreszcencia, saját, publikálatlan adatok), ezért a jelenlegi mikroglia-szinapszis kutatások nem adnak választ arra, hogyan alakulhat ki e fehérje közvetítésével specifikus, lokális mintázat az eltávolítandó szinapszisok azonosítására. Ettől függetlenül tervezzük a komplement fehérjék lokalizációjának vizsgálatát szuperrezolúciós mikroszkópiával a különböző mikroglialis kompartmentekben, beleértve a szomatikus junkciók területét is.

26. A Kihívásoknál és a terápiás kitekintésnél esetleg érdemes lett volna megemlíteni, hogy a központi idegrendszeri betegségek kezelésének egyik lehetősége a kombináció, azaz a gyulladás és a degeneratív folyamatok egyidejű gátlása, valamint a regeneráció szimultán elősegítése. A lokális ősi immunválasz és a szöveti rezidens T és B sejtek befolyásolása további terápiás kihívást jelent a penetráció alacsony szintje miatt pl. monoklonális ellenanyag terápiák esetében, így az IL-1 antagonizálás során is. Egy másik lehetőség olyan kis molekulák alkalmazása, melyek penetrálnak a központi idegrendszerbe, és a szisztémás valamint a lokális adaptív és ősi immunválaszra is hatnak, így a mikroglia funkcióra is. Ilyen potenciális terápiás lehetőség lehet a BTK inhibitorok alkalmazása.

Válasz: Teljesen egyetértek a fenti felvetésekkel, javaslatokkal. A dolgozat utolsó, összefoglaló részének írásakor nagyon sok gondolat a tollamban maradt, miközben igyekeztem néhány, az értekezésben tárgyalt kutatási irány esetén jövőbeli kitekintést tenni a teljesség igénye nélkül. Véleményem szerint is nagy kihívást jelent effektív, adott gyulladásos folyamatokra specifikus, a központi idegrendszerbe megfelelő koncentrációban és farmakokinetikai szempontból is kedvező karakterisztikával rendelkező gyógyszermolekulák bejuttatása. Ez annál is inkább problémát jelent, mert a központi idegrendszer zavarai számára jelentőséggel bíró neuro-immun interakciók különböző időskálákon és kompartmentekben zajlanak. Ezek egy része szisztémás, miközben számos citokint, gyulladásos mediátort, de neurotranszmittert vagy ezek receptorait is mind centrálisan, mind perifériásan számos sejtípus kifejezi, és használja sokszor meglehetősen eltérő fiziológiás vagy patológiás folyamatok irányítására. Jó lehetőségnek tartom a BTK inhibitorok centrális, mikroglialis hatásainak tesztelését, és ezek közül az effektív molekulák használatát a centrális immunválasz modulálására. Szerencsére ezek növekvő klinikai alkalmazása miatt egyre több lehetőség nyílik majd arra, hogy immunmoduláns gyógyszermolekulák hatásait humán klinikai képalkotással (pl. TSPO PET), vagy poszt-mortem agyszövetekben is megvizsgáljuk. Különösen nagy jelentősége lehet átfogó biomarker vizsgálatoknak is az adott gyógyszerjelöltek várható hatásainak előjelzésére és az adott neurológiai kondíciók esetén várhatóan eredményesen kezelhető betegek kiválasztására. Például, iszkémiás stroke esetén ilyen lehet a szisztémás gyulladást mutató betegek azonosítása vér biomarkerek segítségével, vagy az endovaszkuláris trombektómia után kiváló reperfüziót mutató betegek immunmoduláns kezelése és esetlegesen hatékony neuroprotektív szerek együttes alkalmazása kombinációs terápiák formájában.

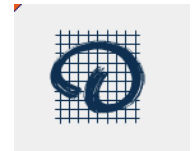
Dr. Adam Denes
Laboratory of Neuroimmunology
Institute of Experimental Medicine
1083 Budapest, Szigony u. 43 Hungary



Még egyszer szeretném megköszönni Professzor Úr részletes bírálatát, építő kritikai megjegyzéseit és támogatását az MTA doktora cím elnyerésére.

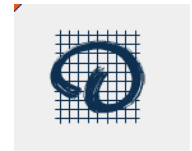
Budapest, 2023. 12. 03.

Dr. Dénes Ádám

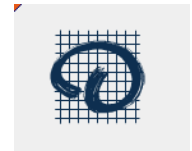


Referenciák:

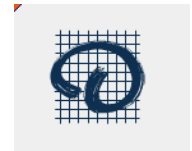
1. A. Verkhratsky, A. M. Arranz, K. Ciuba, A. Pekowska, Evolution of neuroglia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1518**, 120 (Dec, 2022).
2. N. Oosterhof *et al.*, Homozygous Mutations in CSF1R Cause a Pediatric-Onset Leukoencephalopathy and Can Result in Congenital Absence of Microglia. *American journal of human genetics* **104**, 936 (May 2, 2019).
3. R. Rademakers *et al.*, Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nature genetics* **44**, 200 (Dec 25, 2011).
4. T. Konno *et al.*, Diagnostic criteria for adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia due to CSF1R mutation. *European journal of neurology* **25**, 142 (Jan, 2018).
5. R. Rojo *et al.*, Deletion of a Csf1r enhancer selectively impacts CSF1R expression and development of tissue macrophage populations. *Nature communications* **10**, 3215 (Jul 19, 2019).
6. C. Cserep *et al.*, Microglial control of neuronal development via somatic purinergic junctions. *Cell reports* **40**, 111369 (Sep 20, 2022).
7. M. S. Thion, F. Ginhoux, S. Garel, Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science* **362**, 185 (Oct 12, 2018).
8. K. N. Green, J. D. Crapser, L. A. Hohsfield, To Kill a Microglia: A Case for CSF1R Inhibitors. *Trends in immunology* **41**, 771 (Sep, 2020).
9. M. R. Elmore *et al.*, Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82**, 380 (Apr 16, 2014).
10. E. Cszaszar *et al.*, Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions. *The Journal of experimental medicine* **219**, (Mar 7, 2022).
11. C. Cserep, B. Posfai, A. Denes, Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron* **109**, 222 (Jan 20, 2021).
12. C. Cserep *et al.*, Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions. *Science* **367**, 528 (Jan 31, 2020).
13. R. Fekete *et al.*, Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms. *Acta neuropathologica* **136**, 461 (Sep, 2018).
14. G. Szalay *et al.*, Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature communications* **7**, 11499 (May 3, 2016).
15. O. Uyar *et al.*, An Early Microglial Response Is Needed To Efficiently Control Herpes Simplex Virus Encephalitis. *Journal of virology* **94**, (Nov 9, 2020).
16. J. S. Kim *et al.*, A Binary Cre Transgenic Approach Dissects Microglia and CNS Border-Associated Macrophages. *Immunity* **54**, 176 (Jan 12, 2021).
17. A. Badimon *et al.*, Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature* **586**, 417 (Oct, 2020).
18. A. Deczkowska *et al.*, Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell* **173**, 1073 (May 17, 2018).
19. E. Gerrits, Y. Heng, E. Boddeke, B. J. L. Eggen, Transcriptional profiling of microglia; current state of the art and future perspectives. *Glia* **68**, 740 (Apr, 2020).



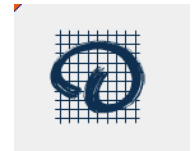
20. I. De *et al.*, CSF1 overexpression has pleiotropic effects on microglia in vivo. *Glia* **62**, 1955 (Dec, 2014).
21. A. C. Wendeln *et al.*, Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature* **556**, 332 (Apr, 2018).
22. P. Bathini *et al.*, Systemic Inflammation Causes Microglial Dysfunction With a Vascular AD phenotype. *Brain, behavior, & immunity - health* **28**, 100568 (Mar, 2023).
23. K. Reemst *et al.*, Early-life stress lastingly impacts microglial transcriptome and function under basal and immune-challenged conditions. *Translational psychiatry* **12**, 507 (Dec 8, 2022).
24. Y. Zhang *et al.*, Microglia-specific transcriptional repression of interferon-regulated genes after prolonged stress in mice. *Neurobiology of stress* **21**, 100495 (Nov, 2022).
25. G. Gravina *et al.*, Transcriptome network analysis links perinatal *Staphylococcus epidermidis* infection to microglia reprogramming in the immature hippocampus. *Glia* **71**, 2234 (Sep, 2023).
26. A. Denes *et al.*, *Streptococcus pneumoniae* worsens cerebral ischemia via interleukin 1 and platelet glycoprotein Ibalph. *Annals of neurology* **75**, 670 (May, 2014).
27. H. Wang *et al.*, Increased hypothalamic microglial activation after viral-induced pneumococcal lung infection is associated with excess serum amyloid A production. *Journal of neuroinflammation* **15**, 200 (Jul 6, 2018).
28. H. Hirbec, F. Rassendren, E. Audinat, Microglia Reactivity: Heterogeneous Pathological Phenotypes. *Methods Mol Biol* **2034**, 41 (2019).
29. T. Zoller *et al.*, Silencing of TGFbeta signalling in microglia results in impaired homeostasis. *Nature communications* **9**, 4011 (Oct 1, 2018).
30. O. Butovsky *et al.*, Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature neuroscience* **17**, 131 (Jan, 2014).
31. S. A. Liddelow *et al.*, Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481 (Jan 26, 2017).
32. W. Ma *et al.*, Absence of TGFbeta signaling in retinal microglia induces retinal degeneration and exacerbates choroidal neovascularization. *eLife* **8**, (Jan 22, 2019).
33. R. Parsa *et al.*, TGFbeta regulates persistent neuroinflammation by controlling Th1 polarization and ROS production via monocyte-derived dendritic cells. *Glia* **64**, 1925 (Nov, 2016).
34. R. Xu *et al.*, Human iPSC-derived mature microglia retain their identity and functionally integrate in the chimeric mouse brain. *Nature communications* **11**, 1577 (Mar 27, 2020).
35. J. P. Chadarevian *et al.*, Engineering an inhibitor-resistant human CSF1R variant for microglia replacement. *The Journal of experimental medicine* **220**, (Mar 6, 2023).
36. B. F. Vahsen *et al.*, Human iPSC co-culture model to investigate the interaction between microglia and motor neurons. *Sci Rep-Uk* **12**, 12606 (Jul 23, 2022).
37. K. Grabert *et al.*, Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature neuroscience* **19**, 504 (Mar, 2016).
38. C. Sousa *et al.*, Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO reports* **19**, (Nov, 2018).
39. I. M. Chiu *et al.*, A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell reports* **4**, 385 (Jul 25, 2013).
40. A. Denes *et al.*, Central and haematopoietic interleukin-1 both contribute to ischaemic brain injury in mice. *Disease models & mechanisms* **6**, 1043 (Jul, 2013).
41. N. M. Luheshi, K. J. Kovacs, G. Lopez-Castejon, D. Brough, A. Denes, Interleukin-1alpha expression precedes IL-1beta after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues. *Journal of neuroinflammation* **8**, 186 (Dec 29, 2011).



42. K. Zheng *et al.*, Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape in ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **42**, 56 (Jan, 2022).
43. P. Androvic *et al.*, Decoding the Transcriptional Response to Ischemic Stroke in Young and Aged Mouse Brain. *Cell reports* **31**, 107777 (Jun 16, 2020).
44. A. Denes *et al.*, Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **27**, 1941 (Dec, 2007).
45. A. Otxoa-de-Amezaga *et al.*, Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation. *Acta neuropathologica* **137**, 321 (Feb, 2019).
46. L. Garcia-Pupo, E. Van San, R. Delgado-Hernandez, T. Vanden Berghe, W. Vanden Berghe, Emerging immune and cell death mechanisms in stroke: Saponins as therapeutic candidates. *Brain, behavior, & immunity - health* **9**, 100152 (Dec, 2020).
47. X. Wu *et al.*, Microglia Pyroptosis: A Candidate Target for Neurological Diseases Treatment. *Frontiers in neuroscience* **16**, 922331 (2022).
48. A. Denes *et al.*, AIM2 and NLRC4 inflammasomes contribute with ASC to acute brain injury independently of NLRP3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 4050 (Mar 31, 2015).
49. K. Z. Chapman *et al.*, A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **29**, 1764 (Nov, 2009).
50. A. Denes, N. Humphreys, T. E. Lane, R. Grecis, N. Rothwell, Chronic systemic infection exacerbates ischemic brain damage via a CCL5 (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)-mediated proinflammatory response in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 10086 (Jul 28, 2010).
51. A. Denes *et al.*, Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **31**, 1036 (Apr, 2011).
52. A. Denes, P. Thornton, N. J. Rothwell, S. M. Allan, Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain, behavior, and immunity* **24**, 708 (Jul, 2010).
53. C. Iadecola, M. S. Buckwalter, J. Anrather, Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *The Journal of clinical investigation* **130**, 2777 (Jun 1, 2020).
54. T. Kawano *et al.*, Temporal and spatial profile of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs) in ischemic stroke in mice. *PloS one* **14**, e0215482 (2019).
55. H. Yan *et al.*, Role of Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cells and Neutrophils in Ischemic Stroke. *Journal of the American Heart Association* **12**, e028125 (Mar 21, 2023).
56. Z. I. Kolabas *et al.*, Distinct molecular profiles of skull bone marrow in health and neurological disorders. *Cell* **186**, 3706 (Aug 17, 2023).
57. F. Herisson *et al.*, Direct vascular channels connect skull bone marrow and the brain surface enabling myeloid cell migration. *Nature neuroscience* **21**, 1209 (Sep, 2018).
58. E. Lemarchand *et al.*, Extent of Ischemic Brain Injury After Thrombotic Stroke Is Independent of the NLRP3 (NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3) Inflammasome. *Stroke* **50**, 1232 (May, 2019).
59. A. Palomino-Antolin *et al.*, Time-dependent dual effect of NLRP3 inflammasome in brain ischaemia. *British journal of pharmacology* **179**, 1395 (Apr, 2022).



60. M. Bellut *et al.*, Delayed NLRP3 inflammasome inhibition ameliorates subacute stroke progression in mice. *Journal of neuroinflammation* **20**, 4 (Jan 4, 2023).
61. S. Ismael, L. Zhao, S. Nasoohi, T. Ishrat, Inhibition of the NLRP3-inflammasome as a potential approach for neuroprotection after stroke. *Sci Rep-Uk* **8**, 5971 (Apr 13, 2018).
62. X. F. He *et al.*, Extracellular ASC exacerbated the recurrent ischemic stroke in an NLRP3-dependent manner. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **40**, 1048 (May, 2020).
63. S. K. McCann, F. Cramond, M. R. Macleod, E. S. Sena, Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Animal Models of Stroke: an Update. *Translational stroke research* **7**, 395 (Oct, 2016).
64. C. J. Smith *et al.*, SCIL-STROKE (Subcutaneous Interleukin-1 Receptor Antagonist in Ischemic Stroke): A Randomized Controlled Phase 2 Trial. *Stroke* **49**, 1210 (May, 2018).
65. E. Kyriazopoulou *et al.*, Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. *Nature medicine* **27**, 1752 (Oct, 2021).
66. J. M. Platnich, D. A. Muruve, NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of biochemistry and biophysics* **670**, 4 (Jul 30, 2019).
67. K. A. Fitzgerald, J. C. Kagan, Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* **180**, 1044 (Mar 19, 2020).
68. J. Rehwinkel, M. U. Gack, RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature reviews. Immunology* **20**, 537 (Sep, 2020).
69. K. Szigeti *et al.*, A novel SPECT-based approach reveals early mechanisms of central and peripheral inflammation after cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **35**, 1921 (Dec, 2015).
70. J. Cook, M. Prinz, Regulation of microglial physiology by the microbiota. *Gut microbes* **14**, 2125739 (Jan-Dec, 2022).
71. L. M. Roberts *et al.*, Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* **149**, 6251 (Dec, 2008).
72. D. A. Ridder *et al.*, TAK1 in brain endothelial cells mediates fever and lethargy. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2615 (Dec 19, 2011).
73. D. A. Ridder *et al.*, Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit. *The Journal of experimental medicine* **212**, 1529 (Sep 21, 2015).
74. J. M. McCracken, L. A. Allen, Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *Journal of cell death* **7**, 15 (2014).
75. A. Denes, E. Pinteaux, N. J. Rothwell, S. M. Allan, Interleukin-1 and stroke: biomarker, harbinger of damage, and therapeutic target. *Cerebrovasc Dis* **32**, 517 (2011).
76. B. W. McColl, N. J. Rothwell, S. M. Allan, Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 4403 (Apr 18, 2007).
77. B. W. McColl, N. J. Rothwell, S. M. Allan, Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 9451 (Sep 17, 2008).
78. G. U. Enzmann, S. Pavlidou, M. Vaas, J. Klohs, B. Engelhardt, ICAM-1(null) C57BL/6 Mice Are Not Protected from Experimental Ischemic Stroke. *Translational stroke research* **9**, 608 (Dec, 2018).



79. M. S. V. Elkind *et al.*, Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II): A randomized, placebo-controlled trial. *Neurology* **95**, e1091 (Aug 25, 2020).
80. F. Langhauser *et al.*, Blocking of alpha4 integrin does not protect from acute ischemic stroke in mice. *Stroke* **45**, 1799 (Jun, 2014).
81. S. Heindl *et al.*, Chronic T cell proliferation in brains after stroke could interfere with the efficacy of immunotherapies. *The Journal of experimental medicine* **218**, (Aug 2, 2021).
82. W. F. Westendorp, C. Dames, P. J. Nederkoorn, A. Meisel, Immunodepression, Infections, and Functional Outcome in Ischemic Stroke. *Stroke* **53**, 1438 (May, 2022).
83. A. Denes *et al.*, Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. *Neuroscience* **134**, 947 (2005).
84. A. Denes *et al.*, Surgical manipulation compromises leukocyte mobilization responses and inflammation after experimental cerebral ischemia in mice. *Frontiers in neuroscience* **7**, 271 (2013).
85. A. Liesz *et al.*, Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature medicine* **15**, 192 (Feb, 2009).
86. C. Benakis, A. Liesz, The gut-brain axis in ischemic stroke: its relevance in pathology and as a therapeutic target. *Neurological research and practice* **4**, 57 (Nov 14, 2022).
87. A. A. Tuz, A. Hasenberg, D. M. Hermann, M. Gunzer, V. Singh, Ischemic stroke and concomitant gastrointestinal complications- a fatal combination for patient recovery. *Frontiers in immunology* **13**, 1037330 (2022).
88. K. Prass *et al.*, Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *The Journal of experimental medicine* **198**, 725 (Sep 1, 2003).
89. C. Busti *et al.*, Lung ultrasound in the diagnosis of stroke-associated pneumonia. *Internal and emergency medicine* **9**, 173 (Mar, 2014).
90. J. C. de Jonge *et al.*, Signs of Pulmonary Infection on Admission Chest Computed Tomography Are Associated With Pneumonia or Death in Patients With Acute Stroke. *Stroke* **51**, 1690 (Jun, 2020).
91. V. Tekus *et al.*, A CRPS-IgG-transfer-trauma model reproducing inflammatory and positive sensory signs associated with complex regional pain syndrome. *Pain* **155**, 299 (Feb, 2014).
92. N. S. Peress, H. B. Fleit, E. Perillo, R. Kuljis, C. Pezzullo, Identification of Fc gamma RI, II and III on normal human brain ramified microglia and on microglia in senile plaques in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology* **48**, 71 (Oct, 1993).
93. C. X. Yi, M. H. Tschop, S. C. Woods, S. M. Hofmann, High-fat-diet exposure induces IgG accumulation in hypothalamic microglia. *Disease models & mechanisms* **5**, 686 (Sep, 2012).
94. R. Ronzano *et al.*, Microglia-neuron interaction at nodes of Ranvier depends on neuronal activity through potassium release and contributes to remyelination. *Nature communications* **12**, 5219 (Sep 1, 2021).
95. D. K. Wilton *et al.*, Microglia and complement mediate early corticostriatal synapse loss and cognitive dysfunction in Huntington's disease. *Nature medicine* **29**, 2866 (Nov, 2023).
96. S. Hong *et al.*, Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* **352**, 712 (May 6, 2016).
97. A. H. Stephan, B. A. Barres, B. Stevens, The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annual review of neuroscience* **35**, 369 (2012).