

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Mina I. Perić

**NEURODEGENERATIVNE PROMENE U
ĆELIJAMA GLIJE, OLIGODENDROCITIMA I
MIKROGLIJI, U KIČMENOJ MOŽDINI NA
PACOVSKOM hSOD1^{G93A} MODELU
AMIOTROFIČNE LATERALNE SKLEROZE**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Mina I. Perić

**NEURODEGENERATIVE CHANGES IN GLIAL
CELLS, OLIGODENDROCYTES AND
MICROGLIA IN THE SPINAL CORD OF
hSOD1^{G93A} RAT MODEL OF AMYOTROPHIC
LATERAL SCLEROSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

Mentori:

dr Danijela Bataveljić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Pavle Andjus, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

akademik Milena Stevanović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo; redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Danijela Laketa, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Ljiljana Nikolić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Miloš Brkušanin, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Centru za lasersku mikroskopiju, Institut za fiziologiju i biohemiju „Ivan Đaja“, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. Ova doktorska disertacija je urađena uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u okviru plana i programa i ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada Biološkog fakulteta (451-03-9/2021-14/200178) i Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ (451-03-9/2021-14/200007).

*Posebnu zahvalnost želim da iskažem svojoj mentorki **dr Danijeli Bataveljić** koja je vodila izradu ove doktorske disertacije. Neizmerno sam joj zahvalna na istrajnosti, upornosti i ukazanom poverenju. Bilo je zadovoljstvo i privilegija sarađivati sa njom u prevazilaženju prepreka i u borbama sa izazovima. Hvala joj na posvećenosti i podršci koju mi je neizmerno i nesebično pružala. Ne mislim da reči mogu dočarati značaj stečenih iskustava, ali ću se potruditi da ta iskustva iskoristim i učinim da može ponosno da kaže da je ona oblikovala moj put kao što ja sa ponosom mogu da kažem da je upravo ona najzaslužnija za temelje i razvoj mojih znanja u svetu nauke.*

*Zahvalnost dugujem mentoru i profesoru **dr Pavlu Andjusu** na ukazanoj prilici da radim u njegovoj laboratoriji i učestvujem u dijapazonu naučnih tematika.*

*Dragoj **profesorki Mileni Stevanović** želim da se zahvalim na ukazanoj prilici. Hvala što je imala poverenje u mene i izdvojila vreme za moj rad.*

*Zahvalnost dugujem **dr Danijeli Laketi** za podršku i konstruktivne sugestije u pisanju ove teze.*

***Dr Ljiljani Nikolić** želim neizmerno da se zahvalim za sve sugestije u izradi i pisanju ove teze i uloženo vreme, upornost i trud u svim aspektima mog studijskog razvoja. Hvala joj na podršci i nesebičnom deljenju znanja i iskustava i doprinosu u svim našim saradnjama. Bilo je zadovoljstvo.*

*Posebno se zahvaljujem **dr Milošu Brkušaninu** na sugestijama u pisanju teze, izdvojenom vremenu, nesebičnoj pomoći i svim rečima podrške tokom svih ovih godina.*

Hvala svima.

„Jeder Mann hat gerade so viel Eitelkeit, als es ihm an Verstand fehlt.“ – Friedrich Wilhelm Nietzsche

Neurodegenerativne promene u ćelijama glije, oligodendrocitima i mikrogliji, u kičmenoj moždini na pacovskom hSOD1^{G93A} modelu amiotrofične lateralne skleroze

Sažetak

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativna bolest koju karakteriše smrt motornih neurona u kičmenoj moždini i mozgu. Iako su neuroni pogođeni u ALS, glijske ćelije imaju značajnu ulogu u nastanku i progresiji bolesti. Čelije glije doprinose održavanju homeostaze K⁺ u vanćelijskoj sredini, a posebno važnu ulogu ima ulazni ispravljajući kalijumov kanal Kir4.1 koji je u velikoj meri eksprimiran u astrocitima i oligodendrocitima. Prethodne studije su pokazale narušenu ekspresiju i funkciju Kir4.1 u astrocitima u ALS, a u ovoj studiji je ispitivana uloga Kir4.1 u oligodendrocitima na hSOD1^{G93A} modelu pacova primenom imunofluorescencije, konfokalne mikroskopije, Western blot-a i elektrofiziologije na deliću membrane. Rezultati ove studije pokazali su da je kod ALS životinja smanjena ekspresija Kir4.1 u oligodendrocitima u kičmenoj moždini, kao i u njenoj mijelinskoj frakciji. Nađeno je i da su u ALS oligodendrocitima u kulturi membranske biofizičke osobine narušene, a struje kroz Kir kanale smanjene, ukazujući na narušena funkcionalna svojstva ovih glijskih ćelija. Iako je ukupna ekspresija Kir4.1 smanjena u ALS, uočeni su izolovani regioni u ventralnim rogovima hSOD1^{G93A} kičmene moždine koji zadržavaju Kir4.1 imunoreaktivnost u okviru specifičnih klastera mikroglije. Zapaženo je da se Kir4.1⁺ klasteri mikroglije preklapaju sa regionima izraženog prisustva proteinskih agregata mutirane superoksid dismutaze 1, kao osnovnog obeležja ALS. Membranske biofizičke osobine neonatalne mikroglije i aktivnost Kir kanala nisu narušeni u ALS dok adultna ALS mikroglija u kulturi pokazuje smanjenje Kir struja. Promene u ekspresiji Kir4.1 ističu doprinos ovog kalijumovog kanala neurodegenerativnim procesima i ukazuju na njegov potencijalni značaj za ciljanu terapiju ALS.

Ključne reči: ALS, kičmena moždina, degeneracija, neuroinflamacija oligodendrociti, mikroglija, Kir4.1, elektrofiziologija, ćelijska kultura

Naučna oblast: Biološke nauke

Uža naučna oblast: Neurobiologija

Neurodegenerative changes in glial cells, oligodendrocytes and microglia, in the spinal cord of the hSOD1^{G93A} rat model of amyotrophic lateral sclerosis

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the death of motor neurons in the spinal cord and brain. Although neurons are affected in ALS, glial cells play an important role in the disease onset and progression. Glial cells contribute to the maintenance of extracellular K⁺ homeostasis through the inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 that is abundantly expressed in astrocytes and oligodendrocytes. Previous studies demonstrated impaired expression and function of Kir4.1 in astrocytes in ALS. Therefore, we first examined the role of Kir4.1 in spinal cord oligodendrocytes of the hSOD1^{G93A} rat model by employing immunofluorescence, confocal microscopy, Western blot, and patch-clamp. We show reduced expression of Kir4.1 in oligodendrocytes in the ALS spinal cord as well as in its myelin fraction. Oligodendrocytes in culture display impaired membrane biophysical properties and decreased Kir currents, indicating their compromised functional properties. Although the expression of Kir4.1 was diminished in ALS, we observed isolated regions retaining Kir4.1 immunoreactivity in ventral horns of the hSOD1^{G93A} spinal cord that contained cell clusters enriched in microglia. Our data show that Kir4.1⁺ clusters of microglia overlap with regions of pronounced presence of protein aggregates of mutated superoxide dismutase 1 that represent the hallmark of ALS. Membrane biophysical properties and Kir channel activity were not altered in neonatal ALS microglia while adult ALS microglia in culture displayed reduced Kir currents. Changes in the expression and function of Kir4.1 highlight the importance of this potassium channel in neurodegeneration suggesting Kir4.1 as a potential therapeutic target in ALS pathology.

Key words: ALS, spinal cord, degeneration, neuroinflammation, oligodendrocytes, microglia, Kir4.1, electrophysiology, cell culture

Scientific filed: Biological sciences

Narrow scientific field: Neurobiology

Lista skraćenica

[K⁺]_o – vanćelijski K⁺
AAV – adenoasocirani virus
AB – Alchajmerova bolest
AGN – angiogenin
ALS – amiotrofična lateralna skleroza
ALS2 – alsin 2
AMPA – α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropioniska kiselina
APS – amonijum persulfat
ATP – adenzin trifosfat
ATX2 – ataksin 2
AQP4 – akvaporin 4
BK – engl. *Big K channel*
BSA – goveđi serum albumin
C1q – komponenta komplementa 1q
C9ORF72 – hromozom 9 otvorenog okvira čitanja 72
CD11b – klaster diferencijacije 11b
CD11c – klaster diferencijacije 11c
CD14 – klaster diferencijacije 14
CD4 – klaster diferencijacije 4
CD34 – klaster diferencijacije 34
CD68 – klaster diferencijacije 68
CD8 – klaster diferencijacije 8
ChAT – holin acetiltransferaza
C_m – kapacitivnost membrane
CNPaza – 2', 3'-ciklični nukleotid 3'-fosfodiesteraza
CNS – centralni nervni sistem
DAM – engl. *Degeneration associated microglia*
DAMP – molekularni obrasci povezani sa oštećenjima
DMEM – Dulbekov modifikovanom Eagle medijum
DMEM+ – medijum za gajenje ćelija
DNK – dezoksiribonukelinska kiselina
EAAT1 – engl. *Excitatory aminoacid transporter 1*
EAAT2 – engl. *Excitatory aminoacid transporter 2*
ECS – vanćelijski rastvor
EDTA – etilen diamin tetra sirćetna kiselina
EGTA – etilen glikol-bis(β-aminoetil etar)-N,N,N',N'-tetra sirćetna kiselina
E_k – ravnotežni potencijal za K⁺
ER – endoplazmin retikulum
ERAD – degradacija proteina vezana za ER
E_{rev} – potencijala reverzije
fALS – familijalna ALS
FBS – fetalni goveđi serum
FUS – engl. *Fused in sarcoma*
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GLAST – engl. *Glutamate/aspartate transporter*
GLT-1 – engl. *Glutamate transporter 1*
H₂O₂ – vodonik peroksid
HBSS – Henkov balansirani rastvor soli
HB – Hantingtonova bolest
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina

HOE – Hoechst
hSOD1 – mutirana humana SOD1
Iba1 – jonizovani Ca^{2+} -vezujući adaptorski molekul 1
IFN- 1β – interferon 1β
IFN- γ – interferon γ
IGF-1 – insulinski faktor rasta 1
IL- 1β – interleukin 1β
IL-10 – interleukin 10
IL-18 – interleukin 18
IL-2 – interleukin 2
IL-4 – interleukin 4
IL-6 – interleukin 6
iRNK – informaciona RNK
JACoP – engl. *Just Another Colocalization Plugin*
 K_2p – K^+ dvoporni kanal
KA – kainatna kiselina
 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ – Ca^{2+} aktivirani K^+ kanal 3.1
Kir2.1 – ulazni ispravljački K^+ kanala 2.1
Kir4.1 – ulazni ispravljački K^+ kanala 4.1
Kir5.1 – ulazni ispravljački K^+ kanal 5.1
 $\text{Kv}1.3$ – voltažno zavisni K^+ kanal 1.3
LC – domeni niske kompleksnosti
LPS – lipopolisaharid
MBP – mijelinski bazni protein
MCT1 – transporter monokarboksilante kiseline 1
MS – multipla skleroza
mSOD1 – mutirana SOD1
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF- κB – nuklearni faktor κB
NG2 – engl. *neuron/glial antigen 2*
NGF – engl. *nerve growth factor*
NK – prirodne ćelije ubice
NLRP3 – engl. *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*
NMDA – N-metil-D-aspartat
NO – azot oksid
 $\text{O}_2^{\cdot-}$ – superoksid anjonskog radikala
OPC – prekursorke ćelije oligodendrocita
OPTN – optineurin
PAMP – molekularni obrasci povezani sa patogenima
PB – fosfatni puffer
PBS – fiziološki rastvor
PCR – lančana reakcija polimeraze
PB – Parkinsonova bolest
PFA – paraformaldehid
PGE2 – engl. *prostaglandin E2*
PLO – poli-L-ornitin
PLP – proteolipidni protein
pre-SOD1^{G93A} – presimptomatski SOD1^{G93A} pacovi
 R_m – otpor membrane
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – reaktivne vrste kiseonika
sALS – sporadična ALS

SDS – natrijum dodecil sulfat
shRNK – engl. *short hairpin RNA*
siRNK – engl. *small interfering RNA*
SOD1 – Cu/Zn superoksid dismutaza 1
SQSTM1 – sekvestozom 1
TARDBP – engl. *TAR DNA binding protein*
TBE – Tris-boratni-EDTA pufer
TBK1 – tank-vezujuća kinaza 1
TBST – Tris pufer soli sa 0.1% Tween-20
TDB – pufer za digestiju
TDP-43 – protein kodiran TARDBP genom
TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TGF- β – faktor rasta tumora β
TLR-2 – engl. *Toll like receptor 2*
TLR-4 – engl. *Toll like receptor 4*
TNF- α – faktor nekroze tumora α
TNIP1 – interagujući protein-1 sa TNF- α indukovanim proteinnom-3
Tris – Tris (hidroksimetil)-metilamin
TSPO – engl. *18 kDa translocator protein*
UPS – ubikvitinski-proteozomski sistem
VCP – protein koji sadrži valozin
V_m – membranski potencijal
WT – divlji soj

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Genetički faktori.....	1
1.1.1 SOD1.....	2
1.1.1.1 SOD1 animalni model.....	2
1.1.2 C9ORF72.....	3
1.1.3 TDP-43.....	3
1.1.4 FUS.....	4
1.2 Patofiziološki mehanizmi u ALS.....	4
1.2.1 Proteinski agregati i narušeni mehanizmi proteinske sinteze i razgradnje.....	4
1.2.2 Oksidativni stres.....	7
1.2.3 Neuroinflamacija.....	8
1.2.4 Mehanizam nezavisan od tipa ćelija.....	10
1.2.4.1 Mikroglia.....	11
1.2.4.1.1 Mikroglia u ALS.....	12
1.2.4.2 Astrociti.....	13
1.2.4.3 Karakteristična svojstva oligodendrocita.....	14
1.2.4.3.1 Oligodendrociti u ALS.....	16
1.3 Interakcija oligodendrocita i mikroglije u fiziološkim i patološkim uslovima.....	17
1.4 Ekscitotoksičnost i narušena homeostaza K^+	19
1.4.1 Uloga Kir4.1 kanala u održavanju K^+ homeostaze.....	21
2. Ciljevi istraživanja.....	24
3. Materijal i metode.....	25
3.1. Materijal.....	25
3.2 Eksperimentalne životinje.....	27
3.3 PCR reakcija za određivanje genotipa pacova.....	27
3.4 Priprema kulture oligodendrocita.....	28
3.5 Priprema kulture neonatalne mikroglije.....	29
3.6 Priprema kulture mikroglije i izolacija mijelina iz adultnih pacova.....	29
3.6.1 Priprema mijelinske frakcije za Western blot.....	29
3.7 Western blot.....	30
3.8 Imunofluorescencija.....	30
3.8.1 Priprema tkiva transkardijalnom perfuzijom.....	30
3.8.2 Imunofluorescentno obeležavanje preseka kičmene moždine.....	31
3.8.2.1 Protokol imunofluorescencije za bojenje oligodendrocita u tkivu.....	31
3.8.2.2 Protokol imunofluorescentnog obeležavanja mikroglije.....	31
3.8.6.3 Imunofluorescentno obeležavanje oligodendrocita u kulturi.....	32
3.9 Konfokalna mikroskopija i analiza mikrografija.....	32
3.9.1 Mikroskopija i analiza mikrografija oligodendrocita.....	32

3.9.2 Mikroskopija i analiza mikrografija mikroglije.....	33
3.10 Metoda nametanja voltaže na delić membrane u konfiguraciji „cela ćelija“	33
3.10.1 Merenje struja na oligodendrocitima u kulturi	33
3.10.2 Merenje struja na površinskoj neonatalnoj mikrogliji.....	34
3.10.3 Metod nametanja voltaže na neonatalnoj mikrogliji ispod sloja astrocita i mikrogliji izolovanoj iz adultnih pacova.....	34
3.10 Statistička analiza.....	34
4. Rezultati	36
4.1 Funkcionalne i degenerativne promene u oligodendrocitima u kičmenoj moždini pacovskog modela ALS.....	36
4.1.1 Smanjena ekspresija Kir4.1 u oligodendrocitima u kičmenoj moždini SOD1 ^{G93A} pacova.....	36
4.1.2 Izmenjena funkcionalna svojstva ALS oligodendrocita u kulturi	38
4.1.3 Kir struje su redukovane u ALS oligodendrocitima u kulturi	41
4.2 Morfološke i funkcionalne osobine mikroglije u kičmenoj moždini pacovskog modela ALS	43
4.2.1 Kir4.1 ⁺ klasteri u ventralnim rogovima kičmene moždine SOD1 ^{G93A} pacova	43
4.2.2 Izmenjena morfologija mikroglije u Kir4.1 ⁺ klasterima u ventralnim rogovima kičmene moždine SOD1 ^{G93A} pacova	44
4.2.3 CD34 ⁺ /Kir4.1 ⁺ klasteri u ventralnim rogovima ALS kičmene moždine	45
4.2.4 Kir4.1 ⁺ klasteri su regioni izražene ekspresije mSOD1 u ventralnim rogovima kičmene moždine ALS pacova	46
4.2.5 Povećanje ekspresije CD68 u Iba1 ⁺ /Kir4.1 ⁺ klasterima u ventralnim rogovima.....	48
4.2.6 Mikroglija iz kičmene moždine neonatalnih ALS životinja.....	50
4.2.7 Elektrofiziološke odlike mikroglije u kulturi izolovanoj iz kičmene moždine adultnog SOD1 ^{G93A} pacova.....	52
5. Diskusija.....	54
5.1 Značaj oligodendrocita u ALS	54
5.1.1 Degenerativne promene u ALS oligodendrocitima	55
5.1.2 Narušena funkcionalnost Kir4.1 u oligodendrocitima u ALS	56
5.2 Odlike mikroglije u ALS	57
5.2.1 Kir4.1 ⁺ klasteri mikroglije u ventralnim rogovima ALS	58
5.2.2 Lokalizacija mSOD1 u Kir4.1 ⁺ /Iba1 ⁺ klasterima.....	60
5.2.3 Funkcionalne karakteristike Kir4.1 ⁺ /Iba1 ⁺ klastera	61
5.2.4 K ⁺ homeostaza i ALS mikroglija.....	61
5.2.4.1 Elektrofiziološke odlike ALS mikroglije u kulturi.....	62
5.3 Značaj ispitivanja Kir4.1 i terapije u ALS	64
6. Zaključci	66
Literatura.....	67
Biografija	98

1. Uvod

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je neurodegenerativna bolest koju karakteriše progresivno umiranje motornih neurona u kičmenoj moždini i mozgu. ALS odlikuje degeneracija kortikospinalnih motornih neurona i silaznih nervnih puteva lateralnih rogova kičmene moždine - *lateralna skleroza* (Saber et al., 2015) i umiranje spinalnih motornih neurona praćeno denervacijom i atrofijom mišića (amiotrofija). ALS je prvi put opisana od strane neurologa Jean-Martin Charcot-a (Charcot & Joffroy, 1869) i poznata je i kao Lu Gerigova bolest (engl. *Lou Gehrig's disease*).

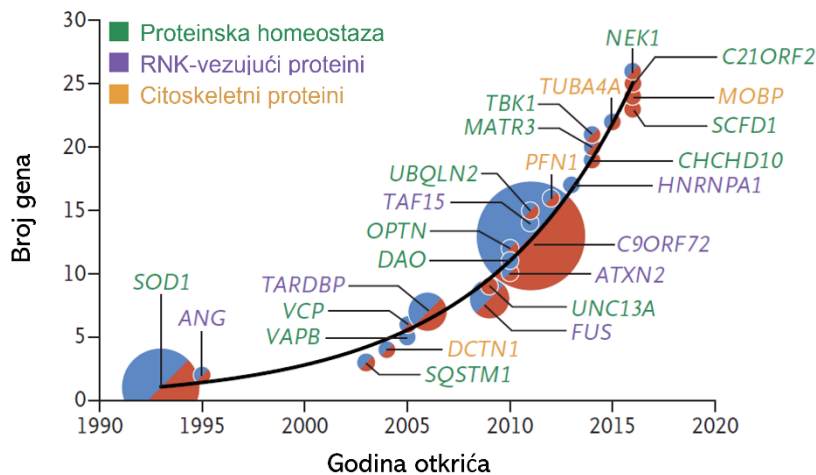
Simptomi ALS se uočavaju kod osoba prosečne starosti 54 godine i prosečni životni vek pacijenata je 2-5 godina nakon pojave prvih simptoma (Rothstein, 2017; Taylor et al., 2016). Učestalost pojave bolesti u Evropi je približno 2-3 osobe na 100000 na godišnjem nivou (C. A. Brown et al., 2021) sa većom učestalošću kod muškaraca nego kod žena (Logroscino et al., 2010).

Simptomi ALS se uočavaju kao slabost skeletnih mišića usled degeneracije motornih neurona. U zavisnosti od toga gde je uočen početak degenerativnih promena, razlikuju se spinalna i bulbarna forma ALS (Taylor et al., 2016). Početak degenerativnih promena je lokalizovan i degeneracija postepeno zahvata i ostale motorne regione. Simptomi ALS mogu biti vrlo heterogeni, često podsećaju na simptome drugih neurodegenerativnih bolesti (Filipi et al., 2020), a brzina progresije bolesti je individualna što zajedno daje kompleksnu kliničku sliku i otežava uspostavljanje dijagnoze. ALS se klinički manifestuje progresivnom mišićnom slabošću, atrofijom mišića praćenom paralizom, otežanim žvakanjem i gutanjem, dok u terminalnoj fazi dolazi do slabljenja disajnih mišića te do smrti dolazi najčešće usled asfiksije. Precizan mehanizam bolesti i dalje nije poznat iako postoji veliki broj predloženih mehanizama. ALS je terminalna bolest za koju ne postoji efektivna terapija. Do sada se u terapiji ALS koriste samo riluzol i u nekim zemljama edaravon (radikava), pri čemu oba leka produžuju životni vek za svega nekoliko meseci (Filipi et al., 2020).

1.1 Genetički faktori

Približno 10% dijagnostikovanih slučajeva ima poznatu porodičnu istoriju bolesti i definiše se kao familijalna ALS (fALS), dok je 90% slučajeva naizgled sporadično (sALS) (P. M. Andersen & Al-Chalabi, 2011; Chiò et al., 2014; Renton et al., 2014). Do sada je identifikovan veliki broj mutacija u više od 50 gena koje mogu da uzrokuju ALS, pri čemu je oko 50% fALS slučajeva posledica mutacija u genima *SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP* i *FUS* (Boylan, 2015), dok su mutacije u ovim genima odgovorne za 5.2% slučajeva sALS (Zou et al., 2017). Mutacije u genu *SOD1* i ekspanzija ponovaka GGGGCC u genu *C9ORF72* su najzastupljeniji uzročnici fALS (Philips & Rothstein, 2016). Mutacije u genu *SOD1* se javljaju u 15% fALS i 1.2% sALS slučajeva, dok ekspanzija u *C9ORF72* izaziva 33.7% fALS i 5.1% sALS slučajeva (Zou et al., 2017). Mutacije u genu *TARDBP* su uočene u 4.2 % slučajeva fALS i 0.8 % sALS, a mutacije u genu *FUS* dovode do pojave ALS kod 2.8% fALS i 0.3% sALS pacijenata (Zou et al., 2017).

Pored navedenih gena u kojima se učestalo uočavaju mutacije koje dovode do bolesti, identifikovane su i retke genetičke varijante (Beers & Appel, 2019; Mezzini et al., 2019) u sledećim genima uključenim u različite procese: optineurin (*OPTN*) – aktivacija nuklearnog faktora κB (engl. *Nuclear factor κB* ; NF- κB) i autofagija; tank-vezujuća kinaza 1 (*TBKI*) – autofagija i urođena imunost; sekvestozom 1 (*SQSTM1/p62*) – proteinska degradacija, autofagija i oksidativni stres; gen za interagujući protein-1 sa TNF- α indukovanim proteinom-3 (engl. *TNFAIP3 interacting protein 1*; *TNIP1*) – aktivacija NF- κB ; protein koji sadrži valozin (engl. *Valosin containing protein*; *VCP*) – proteinska degradacija; angiogenin (*AGN*) i ataksin 2 (*ATX2*) – obrada RNK; alsin 2 (*ALS2*) – transport i dinamika endozoma i rast neurita. Geni u kojima su uočene mutacije koje dovode do ALS i godine njihovog otkrića su prikazani na Slici 1.



Slika 1. Hronološki prikaz otkrivanja i zastupljenosti mutacija u genima uzročnicima ALS. Veličina svakog kruga predstavlja proporciju svih fALS slučajeva uzrokovanih mutacijama u navedenom genu. Plavi krugovi ukazuju na gene uzročnike fALS, crveni krugovi ukazuju na gene asocirane sa sALS, a krugovi sa obe boje ukazuju na uključenost datog gena u fALS i sALS. Mutacija u svakom od prikazanih gena je uočena u više od jednog fALS slučaja, odnosno u nekoliko slučajeva sALS. Preuzeto i izmenjeno iz (R. H. Brown & Al-Chalabi, 2017).

1.1.1 SOD1

Prva opisana mutacija u ALS je mutacija u genu za Cu/Zn superoksid dismutazu 1 (*SOD1*) (Rosen et al., 1993). Najveći broj detektovanih mutacija su tačkaste i prenose se autozomno dominantno izuzev mutacije D90A koja se prenosi autozomno-recesivno (P. M. Andersen et al., 1995). *SOD1* katalizuje konverziju visoko reaktivnih kiseoničnih vrsta nastalih tokom ćelijske respiracije u kiseonik i vodonik peroksid (H_2O_2). Do danas je opisano 217 mutacija u genu *SOD1* za koje je potvrđeno da uzrokuju ALS (<https://alsod.ac.uk/>). Različite mutacije u genu *SOD1* dovode do različite manifestacije ALS, kao što je starost pri uočavanju prvih simptoma bolesti, životni vek pacijenata i klinička slika (Gros-Louis et al., 2006). Najčešće mutacije u genu *SOD1* su D90A (zamena aspartatske kiseline alaninom na kodonu 90), A4V (zamena alanina valinom na kodonu 4), G37R (zamena glicina argininom na kodonu 37) i G93A (zamena glicina alaninom na kodonu 93) (Pansarasa et al., 2018). Mutacija A4V je načešće detektovana mutacija u genu *SOD1* u fALS slučajevima i izaziva najprogresivniju formu bolesti koja dovodi do smrti u roku od 1,2 godine od pojave prvih simptoma (Gros-Louis et al., 2006; Juneja et al., 1997). Mutacija G37R izaziva raniji početak bolesti ali i duže trajanje bolesti (Cudkowicz et al., 1997). Klinička slika fALS uzrokovane mutacijom G93A ne razlikuje se od kliničkih karakteristika sALS u pogledu mesta početka bolesti (u jednom od ekstremiteta u starosnom dobu od 55-63 godine), zatim progresije (koja zahvata i donje i gornje motorne neurone) i proseka trajanja bolesti (2-4 godine) (Synofzik et al., 2010). Mutacije u *SOD1* uzrokuju konformacione promene u okviru native strukture proteina, što dovodi do pojave novih toksičnih svojstava enzima (Gurney et al., 1994), a ne do smanjenja njegove aktivnosti (L. I. Bruijn et al., 1997; Taylor et al., 2016). Jedan broj studija ističe mogućnost da oksidacija nemutiranog *SOD1* proteina dovodi do nepravilnog pakovanja proteina koji može zadobiti vezujuća i toksična svojstva poput mutirane *SOD1* (m*SOD1*), sugerišući potencijalnu povezanost između sporadičnih i naslednih slučajeva ALS (Ezzi et al., 2007; Gruzman et al., 2007; Kabashi et al., 2007). Nekoliko različitih antitela je razvijeno u cilju specifičnog prepoznavanja ovih izmenjenih konformacija koje se kolektivno nazivaju nepravilno spakovana ili mutirana *SOD1* (Pickles et al., 2016).

1.1.1.1 SOD1 animalni model

Otkriće mutacija u genu *SOD1* u fALS bilo je značajno za razvoj transgenih animalnih modela za ispitivanje mehanizama ALS. Danas je dostupno preko deset mišjih i pacovskih modela koje karakteriše prekomerna ekspresija mutirane *SOD1* (Joyce et al., 2011; B. J. Turner & Talbot, 2008).

Najispitivaniji glodarski model je SOD1^{G93A}. Glodarski transgeni modeli koji konstitutivno eksprimiraju mutiranu humanu SOD1 (hSOD1) pokazuju simptome bolesti motornih neurona sa početkom u adultnom dobu sa 5-7 meseci starosti u hSOD1^{G93A} pacovskom modelu (Bataveljić et al., 2012), dok se u mišjem SOD1^{G93A} modelu simptomi pojavljuju sa oko 3-4 meseca (Gurney et al., 1994; B. J. Turner & Talbot, 2008). Odlikuje ih progresivna smrt motornih neurona, vakuolizacija mitohondrija, glutamatna ekscitotoksičnost, gubitak metaboličke potpore neurona, akumulacija nepravilno upakovanog proteina SOD1, astroglioza, mikroglioza i oštećenje oligodendrocita, što je u saglasnosti sa patološkim promenama uočenim kod ALS pacijenata (Howland et al., 2002; Komine & Yamanaka, 2016; Philips & Rothstein, 2014; B. J. Turner & Talbot, 2008). Eksprimiranje gena *SOD1* sa mutacijama G37R, G85R, G86R, H46R/H48Q ili H46R/H48Q/H63G/H120G kod miševa vodi razvoju ovih ALS simptoma koji su slični onima kod ALS pacijenata (Lucie I. Bruijn et al., 1998; Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995; J. Wang et al., 2002, 2003; Wong et al., 1995). Transgeni pacovi koji prekomerno eksprimiraju G93A ili H46R mutiranu SOD1 takođe razvijaju simptome slične onim kod ALS pacijenata (Howland et al., 2002; Nagai et al., 2001). Svaki glodarski model ALS je fenotipski konzistentan sa specifičnom mutacijom i varira sa početkom bolesti, progresijom i specifičnim histopatološkim odlikama, oponašajući heterogenu kliničku sliku koja se uočava kod ALS pacijenta (Gros-Louis et al., 2006).

1.1.2 C9ORF72

Ekspanzija heksanukleotidnog ponovka GGGGCC u intronu 1 gena *C9ORF72* je identifikovana kao uzročnik ALS i frontotemporalne demencije (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Normalan broj ponovaka GGGGCC u genu *C9ORF72* je 2-23, dok se u ALS sreće broj ponovaka >30, pa sve do nekoliko stotina ili hiljada (Taylor et al., 2016). Funkcija produkta *C9ORF72* nije u potpunosti jasna, ali se smatra da utiče na regulaciju endozomalnog transporta i autofagije, obradu RNK i iskrajanje introna (Farg et al., 2014; Nassif et al., 2017; Webster et al., 2016). Pokazano je da mutacije u genu *C9ORF72* dovode do smanjene ekspresije i gubitka funkcije proteina C9ORF72 kod ALS pacijenata (Taylor et al., 2016).

1.1.3 TDP-43

TDP-43 je DNK/RNK vezujući protein kodiran genom *TARDBP* (engl. *TAR DNA Binding protein*). TDP-43 je regulator genske ekspresije i uključen je u procese obrade RNK uključujući iskrajanje introna, regulaciju iRNK stabilnosti, iRNK transport, translaciju i regulaciju nekodirajućih RNK (Buratti & Baralle, 2010; Ratti & Buratti, 2016; Tollervey et al., 2011). Do sada je opisano preko 50 mutacija u *TARDBP* koje dovode do ALS (Buratti, 2015). Mutirana forma proteina TDP-43 dovodi do stvaranja proteinskih agregata, povećane lokalizacije TDP-43 u citoplazmi, izmenjene stabilnosti proteina, otpornosti na proteaze i modifikovanog vezivanja sa drugim proteinima (Buratti, 2015; Lattante et al., 2013). TDP-43 je glavna komponenta ubikvitinovanih proteinskih agregata u ALS (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Iako primarno lokalizovan u nukleusu, TDP-43 u ALS menja svoju lokalizaciju iz nukleusa u citoplazmu (Ayala et al., 2008; Buratti & Baralle, 2010). Prekomerna količina TDP-43 u citoplazmi može dovesti do formiranja inkluzionih tela koji dovode do narušavanja ćelijskih funkcija, dok uklanjanje iz nukleusa vodi narušavanju metabolizma iRNK (Colombrita et al., 2015; Highley et al., 2014; Klim et al., 2019). Studije su pokazale da je TDP-43 prisutan u citoplazmatskim agregatima većine ALS pacijenata uključujući i sporadične slučajeve bez mutacija u genu *TARDBP* kao i kod onih koji imaju heksanueklotidnu ekspanziju u *C9ORF72* (Giordana et al., 2010; Schipper et al., 2016; Takeuchi et al., 2016). Prisustvo TDP-43 u ubikvitin-pozitivnim citoplazmatskim inkluzijama u neuronima u mozgu i kičmenoj moždini smatra se patološkom odlikom ALS (Mejzini et al., 2019). Smatra se da mutirani TDP-43 gubi svoju normalnu funkciju u nukleusu ili zadobija toksičnu funkciju (Mejzini et al., 2019). Prekomerna ekspresija TDP-43, kako nemutiranih tako i mutiranih formi, u glodarskim modelima dovodila je do pojave neurodegenerativnog fenotipa (Stallings et al., 2010; Wils et al., 2010; Xu et al., 2011). Pored

abnormalne distribucije i agregacije TDP-43 u ALS, izvestan broj post-translacionih modifikacija je povezan sa patološkom formom TDP-43, uključujući ubikvitinaciju i fosforilaciju (Mejzini et al., 2019).

1.1.4 FUS

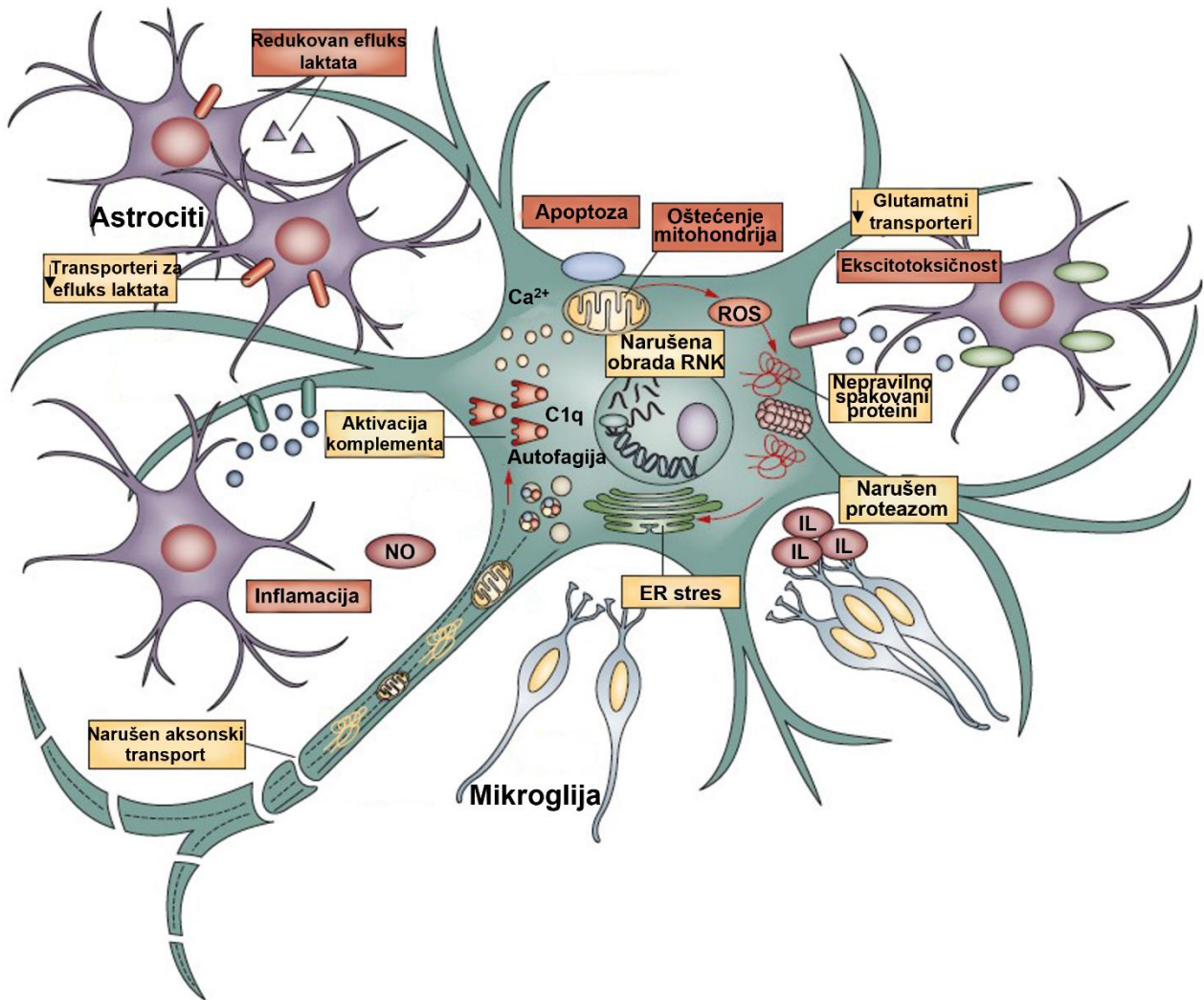
Mutacije u genu *FUS* (engl. *Fused in sarcoma*), koji kodira RNK-vezujući protein FUS, identifikovane su kod sALS i fALS pacijenata (Belzil et al., 2009, 2011). Mutacije u ovom genu su povezane sa ranim početkom bolesti i oblikom ALS koji se razvija kod mlađih osoba (Gromicho et al., 2017; Hübers et al., 2015; Zou et al., 2013). FUS-ALS je povezan sa patološkim FUS agregatima, za koje je do sada pokazano da se pojavljuju samo kod pacijenata koji imaju mutacije u genu *FUS*, ali ne i kod TDP-43 pacijenata (R. H. Tan et al., 2017; Vance et al., 2009). U normalnim fiziološkim uslovima FUS je lokalizovan u nukleusu, dok se u patološkim uslovima premešta u citoplazmu (Zinszner et al., 1997). FUS ima brojne slične fiziološke uloge kao TDP-43, uključen je u gensku ekspresiju, transkripciju, iskrajanje introna, transport RNK iz nukleusa u citoplazmu i regulaciju translacije (Ratti & Buratti, 2016). Iako imaju sličnosti, FUS i TDP-43 regulišu različite tipove RNK i specifično se vezuju za različite RNK sekvence (Colombrita et al., 2015; Lagier-Tourenne et al., 2010). Do sada je opisano preko 50 mutacija u genu *FUS* kod ALS pacijenata i većina dovodi do redistribucije FUS iz nukleusa u citoplazmu i povećava sklonost ovog proteina da formira agregate (Nomura et al., 2014; Vance et al., 2013). Smatra se da mutacije u genu *FUS* kod ALS pacijenata dovode ili do gubitka funkcije ili zadobijanje toksične funkcije mutiranog proteina FUS. Miševi koji ne ekspimiraju FUS kao i miševi kojima je selektivno uklonjen mutirani FUS iz motornih neurona ne pokazuju simptome ALS (Kino et al., 2015; Sharma et al., 2016)..

1.2 Patofiziološki mehanizmi u ALS

Geni u kojima su detektovane mutacije koje dovode do ALS su ekspimirani u velikom broju različitih tipova ćelija. Iako ALS karakteriše degeneracija motornih neurona istraživanja su pokazala da su glijske ćelije od izuzetnog značaja za početak i progresiju bolesti, što je ukazalo na prirodu bolesti zavisnu od ćelijskih interakcija, ali nezavisnu od posebnog ćelijskog tipa (engl. *non-cell autonomous mechanism*) (Lobsiger & Cleveland, 2007). Do sada su predloženi različiti mehanizmi koji dovode do ALS među kojima: akumulacija proteina usled izmenjene proteinske sinteze i razgradnje, ekscitotoksičnost, narušeni metabolizam RNK, narušena funkcionalnost mitohondrija, oksidativni stres, oštećenje aksonskog citoskeleta i vezikularnog transporta, neuroinflamacija, oštećenje oligodendrocita (Ferraiuolo, Kirby, et al., 2011; Taylor et al., 2016). Istraživanja pokazuju da najverovatnije više predloženih mehanizama dovodi do razvoja bolesti. Pregled predloženih molekularnih mehanizama u ALS prikazan je na Slici 2.

1.2.1 Proteinski agregati i narušeni mehanizmi proteinske sinteze i razgradnje

Mutacije u genu *SOD1* koje izazivaju ALS dovode do nepravilnog pakovanja proteina, što vodi akumulaciji proteina i predstavlja potencijalni izvor toksičnosti. Nepravilno upakovan mSOD1 protein formira ubikvitinovane citoplazmatske inkluzije koje se formiraju na početku bolesti i dodatno se akumuliraju sa razvojem bolesti (L. I. Bruijn et al., 1997). Proteinske inkluzije i agregati koji sadrže SOD1 uočavaju se u *post mortem* tkivima fALS pacijenata sa mutacijama u *SOD1* (Kato et al., 2000; Shibata, Asayama, et al., 1996; Shibata, Hirano, et al., 1996) kao i u nekim slučajevima sALS pacijenata (Chattopadhyay & Valentine, 2009; Kawamoto et al., 2010; Maier et al., 2018; Rakhit et al., 2004). Slično kao kod pacijenata, SOD1 agregati se uočavaju u tkivima glodarskih ALS modela, kao i ćelijama u *in vitro* uslovima (Benmohamed et al., 2011; Lucie I. Bruijn et al., 1998; Deng et al., 2006; Gros-Louis et al., 2010; Gurney et al., 1994; Higgins et al., 2003; Kabashi et al., 2004; H. N. Liu et al., 2012; Zhang & Zhu, 2006).



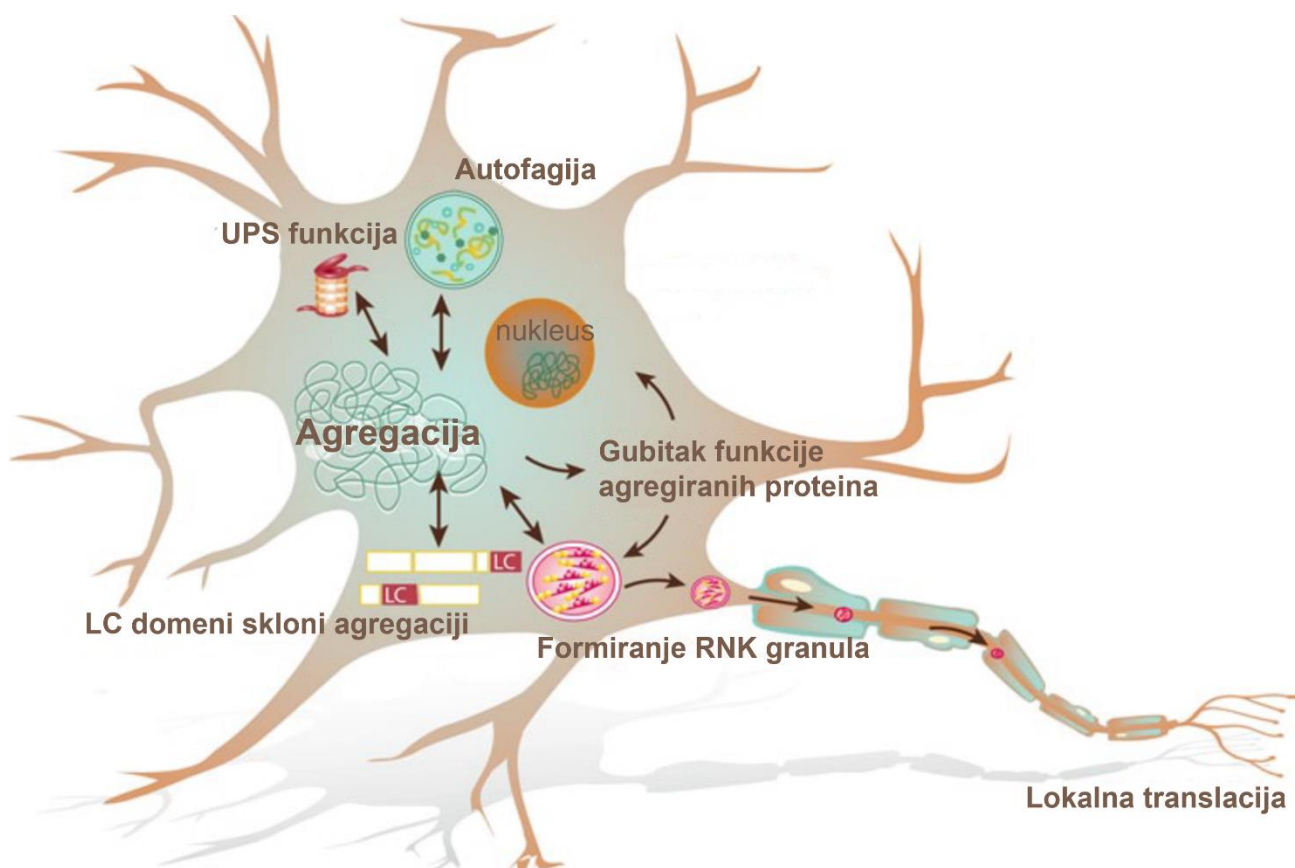
Slika 2. Molekularni mehanizmi oštećenja motornih neurona u ALS. ALS je kompleksna bolest koja uključuje aktivaciju različitih ćelijskih puteva u motornim neuronima i narušenu interakciju sa okolnim glijskim ćelijama. Mikroglia aktivira inflamacijsku kaskadu sekrecijom citokina. Astrociti doprinose oštećenju motornih neurona različitim mehanizmima uključujući oslobađanje medijatora inflamacije kao što je NO, narušene mehanizme uklanjanja glutamata usled redukovane ekspresije i aktivnosti EAAT2 transportera za preuzimanje glutamata, kao i redukovano oslobađanje laktata. Narušena regulacija transkripcije i obrade RNK u motornim neuronima, zajedno sa prekomernom proizvodnjom ROS, može doprineti nepravilnom pakovanju proteina. Aberantni proteini mogu formirati agregate, dovesti do oštećenja proteazoma i stresa ER, aktivacije autofagije i apoptotskih puteva. Oštećenje mitohondrija i narušena homeostaza Ca^{2+} su dve glavne komponente povrede motornih neurona koje mogu voditi aktivaciji apoptotske kaskade. Narušen aksonski transport može dovesti do oštećenja energetskog metabolizma u distalnim delovima aksona. Motorni neuroni mogu proizvoditi i oslobađati subjediniće komplekta koje su značajni signali ćelijskog stresa za okolne ćelije. EAAT2 – transporter 2 ekscitatornih aminokiselina; ER – endoplazmin retikulum; IL - interleukin; NO – azot oksid; ROS – reaktivne vrste kiseonika. Preuzeto i izmenjeno iz (Ferraiuolo, Kirby, et al., 2011).

U transgenom SOD1^{G93A} modelu, agregati mutirane SOD1 i ubikvitina pojavljuju se prvo u neuritima u presimptomatskoj fazi bolesti, dok se mSOD1 imunoreaktivnost povećava sa progresijom bolesti i uočava se i u telu motornih neurona, prvenstveno u blizini fragmentisanog Goldžijevog aparata (Stieber et al., 2000). Agregacija nepravilno upakovanih proteina smatra se potencijalno odbrambenim mehanizmom ćelije (S. B. M. Miller et al., 2015). Iako brojne studije povezuju agregaciju i neurodegeneraciju, još uvek nije jasno da li sam proces formiranja agregata vodi degeneraciji ili predstavlja protektivni mehanizam (Gill et al., 2019; J. Lee et al., 2016; Stieber et al., 2000). Nenativne forme nemutiranog SOD1 proteina uočene su u malim granularnim SOD1-imunoreaktivnim inkluzijama u motornim neuronima sALS pacijenata i kod pacijenata koji imaju ekspanziju u *C9ORF72* (Forsberg et al., 2019). Akumulacija aberantnih proteina pokazana je i u

drugim neurodegenerativnim bolestima, kao što su Alchajmerova bolest (AB), Parkinsonova bolest (PB) i Hantingtonova bolest (HB). Pored SOD1, mutacije u drugim genima asociranim sa ALS, poput *C9ORF72*, *TARDBP* i *FUS*, dovode do formiranja proteinskih agregata (Parakh & Atkin, 2016). TDP-43 je nađen u agregatima u motornim neuronima u kičmenoj moždini i hipokampusu kao i u neuronima i glijskim ćelijama frontalnog korteksa sALS pacijenata i velikog broja fALS pacijenata, sa izuzetkom onih koji imaju mutaciju u *SOD1* (Mackenzie et al., 2007; C. F. Tan et al., 2007). U više od 97% sALS slučajeva i preko 84% fALS slučajeva u neuronskim inkluzijama uočeno je prisustvo TDP-43 agregata u citoplazmi (R. H. Tan et al., 2017). Izuzetak su slučajevi sa SOD1 i FUS mutacijama gde su citoplazmatske inkluzije imunoreaktivne na SOD1 odnosno FUS, u zavisnosti od mutiranog gena, a ne pokazuju prisustvo TDP-43 (R. H. Tan et al., 2017; M. R. Turner et al., 2013). TDP-43 agregati se sastoje od aberantnog fosforilisanog i ubikvitinovanog TDP-43 pune dužine kao i od fragmenata C-terminusa ovog proteina dužine od 25 i 35 kDa (Arai et al., 2006; Mackenzie et al., 2007; Neumann et al., 2006). TDP-43 agregati uočeni su i u frontotemporalnoj degeneraciji, AB, bolesti Levijevih tela, kao i u kontrolnim pacijentima starijim od 65 godina (Arai et al., 2006; Geser et al., 2010; Neumann et al., 2006). TDP-43 i FUS, RNK-vezujuće proteine, odlikuje prisustvo domena niske kompleksnosti (LC domeni). Upravo ovi domeni su skloni agregaciji te mogu uticati na formiranje agregata u bolesti (Blokhuis et al., 2013; Portz et al., 2021). Produkti *TDP-43* i *FUS* učestvuju u formiranju RNK granula čiji je metabolizam narušen u ALS što se ispituje kao jedan od potencijalnih mehanizama bolesti (Y. R. Li et al., 2013; Portz et al., 2021).

Studije su ukazale na to da su u ALS narušena dva puta uklanjanja proteinskih agregata: autofagija i ubikvitinski-proteazomski sistem (UPS). Autofagija je unutarćelijski put koji je uključen u degradaciju i recikliranje iskorišćenih proteina i citoplazmatskih organela i neophodna je za održavanje homeostaze ćelija (Kelekar, 2006). U UPS putu, proteini koji su predviđeni za degradaciju bivaju obeleženi ubikvitinom, a potom prepoznati i degradovani od strane proteazoma (Finley, 2009). Geni *C9ORF72*, *OPTN*, *SQSTM1*, *VCP* i *UBQLN2* kodiraju proteine uključene u autofagiju ili UPS (Majcher et al., 2015; Nassif et al., 2017). Ubikvitinacija može biti ključni faktor u održavanju nivoa TDP-43 i drugih proteina u neuronima u fiziološkim koncentracijama, dok prisustvo ubikvitin-pozitivnih agregata ukazuje na narušenu funkcionalnost sistema za uklanjanje proteina (Mejzini et al., 2019). Ćelijski mehanizmi povezani sa formiranjem proteinskih agregata u ALS prikazani su na Slici 3.

Neppravilno upakovani proteini mogu biti formirani u različitim ćelijskim odeljcima uključujući citosol, nukleus ili endoplazmin retikulum (ER) (Parakh & Atkin, 2016). Smatra se da mutirana SOD1 dovodi do stresa ER. Akumulirani agregati mSOD1 inhibiraju degradaciju proteina vezanu za ER (engl. *ER associated degradation*; ERAD), odnosno proces eliminacije proteina koji su nepravilno spakovani unutar ER. Prvi korak u degradaciji vezanoj za ER jeste transport nepravilno spakovanih proteina iz ER lumena u citosol gde su potom obeleženi ubikvitinom za dalju degradaciju proteazomom. Ovaj proces uklanjanja nepravilno upakovanih proteina iz ER u citoplazmu je blokiran u prisustvu mSOD1, što izaziva stres ER (Nishitoh et al., 2008). Do nepravilnog pakovanja i posledične agregacije proteina mogu dovesti promene u oksidaciji proteina (Parakh et al., 2013) kao posledice oksidativnog stresa u ćelijama (Barber & Shaw, 2010). *In vitro* studije su pokazale da nemutirani SOD1 protein ima veću verovatnoću formiranja agregata u uslovima oksidativnog stresa (Bosco et al., 2010).



Slika 3. Ćelijski mehanizmi povezani sa agregacijom proteina u ALS. Mutacije povezane sa ALS dovode do promjenjene lokalizacije proteina u citoplazmi ili do povećane tendencije formiranja proteinskih agregata. Proteini koji sadže domene niske kompleksnosti (LC domene), slične prionu, kao što su FUS i TDP-43, podložni su agregaciji. Iako su primarno lokalizovani u nukleusu, u ALS je uočeno njihovo premeštanje u citoplazmu. Pored funkcija u translaciji, ovi proteini učestvuju u formiranju RNK granula. Mutacije povezane sa ALS izazivaju promene u formiranju RNK granula i utiču na lokalnu translaciju RNK. Izdvajanje proteina povezanih sa ALS i njihovih partnera u citoplazmatske agregate može za ishod imati gubitak funkcije proteina. Degradacija proteina od strane UPS i autofagijom je esencijalna za uklanjanje ubikvitinovanih proteina. U ALS, mutacije u genima koji kodiraju proteinske komponente u ovim putevima dovode do njihove narušene funkcionalnosti. Izmenjeno i preuzeto iz (Blokhuis et al., 2013).

1.2.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres je posledica disbalansa između produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species*; ROS) i sposobnosti sistema da ukloni ili popravi nastalo oštećenje i uspostavi potrebno redukujuće okruženje (Barber & Shaw, 2010). Ćelijski ROS se javljaju kao neželjeni produkti aerobnog metabolizma uglavnom zbog curenja elektrona iz mitohondrijalnog respiratornog lanca, rezultujući nepotpunom redukcijom molekula kiseonika tokom oksidativne fosforilacije i produkcijom superoksidnog anjonskog radikala ($O_2^{\cdot-}$) i H_2O_2 . Slobodni radikali kao što su superoksid i azot oksid (NO), takođe se oslobađaju i od strane imunskih ćelija. Svaki od nastalih ROS može da uđe u dalje reakcije koje dovode do nastajanja mnogo potentnijih oksidanasa, kao što su peroksinitrit i hidroksil radikal koji utiču na promenu konformacije proteina, narušavaju ćelijsku membranu i izazivaju oštećenja DNK i RNK (Barber & Shaw, 2010). Akumulacija oksidativnog stresa u neuronima tokom starenja mogla bi biti značajan faktor koji doprinosi smanjenoj mogućnosti neurona da reaguju na toksična oštećenja i dovodi do njihove smrti i početka neurodegeneracije (Ferraiuolo, Kirby, et al., 2011).

SOD1 je značajan protein sa antioksidativnom ulogom čija je funkcija često narušena u ALS usled mutacija u genu *SOD1*. U cerebrospinalnoj tečnosti, serumu i urinu pacijenata koji boluju od ALS pokazano je povećanje markera oštećenja izazvanih slobodnim radikalima (Mitsumoto et al., 2008; Simpson et al., 2004; Smith et al., 1998). U *post mortem* tkivu sALS i fALS pacijenata detektovana su oštećenja proteina, lipida, DNK i RNK (Y. Chang et al., 2008; Coppedè, 2011; Cunha-

Oliveira et al., 2020; Shaw, Ince, et al., 1995; Shibata et al., 2001). Povećanje vrednosti parametara oksidativnog stresa, nivoa nitrita, produkcije ROS i lipidne peroksidacije, kao i značajna redukcija aktivnosti SOD1 pokazani su u mozgu transgenog SOD1^{G93A} pacovskog modela ALS (Stamenković, Pavićević, et al., 2017). U transgenom modelu SOD1^{G93A} oksidacija iRNK je pokazana u motornim neuronima i oligodendrocitima u kičmenoj moždini u presimptomatskoj fazi bolesti i dovodi do redukovane ekspresije proteina kodiranih oksidovanom iRNK (Y. Chang et al., 2008). U istoj studiji je pokazano da su neke vrste iRNK osetljivije na oksidaciju, uključujući iRNK koje imaju ulogu u elektron transportnom lancu u mitohondrijama, biosintezi proteina, pakovanju proteina, degradacionim putevima i mijelinizaciji (Y. Chang et al., 2008). Prisustvo mSOD1 u mikrogliji povećava produkciju superoksida što je posledica povećane aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze (Harraz et al., 2008). Ekspresija gena *Nox2*, koji kodira subjedinicu 2 NADPH oksidaze, povećana je u mSOD1 mišjem modelu i u centralnom nervnom sistemu (CNS) ALS pacijenata i preživljavanje SOD1^{G93A} miševa je prolongirano delecijom gena *Nox1* i *Nox2* (Marden et al., 2007; D. C. Wu et al., 2006). Studije su pokazale da oksidativni stres potencijalno pojačava druge patofiziološke procese koji vode degeneraciji motornih neurona, uključujući ekscitotoksičnost, narušeno funkcionisanje mitohondrija, agregaciju proteina, stres ER i promene u signalizaciji između astrocita i mikroglije (Blackburn et al., 2009; Sargsyan et al., 2005). Gliške i infiltrirane imunske ćelije smatraju se najznačajnijim proizvođačima ROS i reaktivnih azotnih vrsta u patološkim stanjima u CNS (D'Ambrosi et al., 2018). Iako se ne smatra da su ROS primarni uzročnik ALS, smatra se da ubrzavaju progresiju bolesti (Obrador et al., 2020).

1.2.3 Neuroinflamacija

Neuroinflamacija je odbrambeni mehanizam CNS koji uklanjanjem ili inhibicijom različitih patogena ima ulogu u zaštiti nervnog sistema prilikom infekcije ili oštećenja (Wyss-Coray & Mucke, 2002). U odgovoru na oštećenje, rezidentne ćelije CNS oslobađaju medijatore inflamacije, uključujući inflamacijske citokine, prostaglandine, slobodne radikale i hemokine koji su signal za aktivaciju glijne i regrutovanje imunskih ćelija iz krvotoka (Moisse & Strong, 2006). Međutim, usled endogenih (genetičke mutacije i proteinski agregati) ili egzogenih faktora (infekcija, trauma ili lekovi) (Glass et al., 2010; Russo & McGavern, 2017) stimulacija inflamacijskog odgovora može biti produžena.

Produženi inflamacijski odgovor je štetan i inhibira regeneraciju CNS (Kempuraj et al., 2016; Russo & McGavern, 2017). Produžena neuroinflamacija, u kojoj ključnu ulogu imaju mikroglija i astrociti, može voditi oštećenju neurona (Stephenson et al., 2018) i nastanku i razvoju neurodegenerativnih bolesti (Kempuraj et al., 2016). U neuroinflamaciji u neurodegeneraciji dolazi do aktivacije mikroglije i astrocita, odnosno mikroglioze i astrogljoze, produkcije inflamacijskih citokina i neurotoksičnih ili neuroprotektivnih molekula i infiltracije T ćelija iz krvotoka (Komine & Yamanaka, 2016; Philips & Robberecht, 2011). Kroz kompleksne interakcije, reaktivna mikroglija i astrociti doprinose smrti motornih neurona. Diferencijalni imunski odgovori koji uključuju urođeni i adaptivni imunski sistem uočavaju se u različitim fazama neurodegenerativnih bolesti i ne samo da utiču na razvoj bolesti već bi mogli biti od značaja i u terapijskom pristupu (Chitnis & Weiner, 2017).

Mikroglija predstavlja prvu liniju odbrane CNS. Tokom mikrogljoze, aktiviranu mikrogliju odlikuju različite morfološke i funkcionalne karakteristike u zavisnosti od aktivirajućeg stimulusa i citokinskog miljea prisutnog u mikrosredini (Ajami et al., 2018; Hooten et al., 2015; Ransohoff, 2016). Aktivirana mikroglija može da oslobađa pro-inflamacijske molekule poput faktora nekroze tumora α (TNF- α), interferona 1β (IFN- 1β), interferona γ (IFN- γ) i ROS, i anti-inflamacijske faktore koji uklanjaju ili ograničavaju oštećenja, kao što su interleukin 4 i 10 (IL-4, IL-10) i insulinski faktor rasta 1 (IGF-1) (Hooten et al., 2015; Philips & Robberecht, 2011). Mikroglija ima heterogene programe aktivacije na koje utiču spoljašnje okruženje i infiltrirajući T limfociti (Lewis et al., 2012).

Astrociti pružaju trofičku potporu neuronima, regulišu krvotok, obezbeđuju homeostazu transmitera i jona u nervnom sistemu, a svojim stopalima naležu na endotelne ćelije krvnih kapilara

sa kojima uz pericite grade krvno-moždanu barijeru i na oštećenja CNS reaguju astrogliozom (L. E. Clarke & Barres, 2013; Guttenplan & Liddelow, 2019; Sofroniew & Vinters, 2010). U procesu reaktivne astroglioze dolazi do promene morfologije, genske ekspresije i ćelijskih funkcija, pri čemu se u odnosu na tip oštećenja razlikuju unutar- i vanćelijska signalizacija (Sofroniew & Vinters, 2010). Neuroinflamacija može indukovati toksični aktivacioni fenotip astrocita koji se odlikuje produkcijom pro-inflamacijskih citokina poput interleukina 1 β (IL-1 β), interleukina 6 (IL-6), TNF- α , kao i NO, ali i protektivni fenotip astrocita koji oslobađaju anti-inflamacijske faktore poput IL-6, IL-10 i faktora rasta tumora β (TGF- β) (Sofroniew, 2015).

Pored mikroglije i astrocita, i drugi ćelijski tipovi poput makrofaga, prirodnih ćelija ubica (NK), mastocita, ali i oligodendrocita i neurona doprinose imunskom odgovoru u CNS (Stephenson et al., 2018). Urođeni imunski odgovor predstavlja put za oporavak tkiva i obnavljanje homeostaze CNS (Amor et al., 2014). Produženi urođeni imunski odgovor može izazvati oštećenje i voditi daljoj aktivaciji mikroglije, astrocita ili oligodendrocita (Kierdorf & Prinz, 2013; Peferoen et al., 2014) kao i perifernih urođenih imunskih ćelija, uključujući NK, T ćelije, mastocite (Skaper et al., 2014).

Aktivacija mikroglije je povezana sa infiltracijom pomoćničkih CD4⁺ T ćelija i citotoksičnih CD8⁺ T ćelija kroz narušenu krvno-moždanu barijeru, kao što je slučaj u ALS (Abraham et al., 2019; Engelhardt et al., 1993; Garbuzova-Davis & Sanberg, 2014; Garofalo et al., 2020; Kakaroubas et al., 2019; Kawamata et al., 1992; Winkler et al., 2014). Zajedno sa povećanjem infiltracije encefalitogenih T ćelija, mikroglija u parenhimu dobija odlike antigen prezentujućih ćelija i kroz interakciju sa infiltriranim T ćelijama dovodi do njihove reaktivacije (Schettters et al., 2018). Citotoksične CD8⁺ T ćelije mogu indukovati apoptozu ćelija posredstvom Fas liganda i egzocitozom perforina i granzima (Melzer et al., 2009). CD8⁺ T ćelije oslobađaju TNF- α , IFN- γ i imaju ulogu u eliminaciji inficiranih ćelija (Lewis et al., 2012). U zavisnosti od aktivacionog fenotipa, CD4⁺ T ćelije mogu oslobađati TNF- α , IFN- γ , interleukin 2, (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10 i ostvarivati različite efektorske funkcije (Kipnis & Schwartz, 2005; Lewis et al., 2012). Na primer, regulatorne T ćelije (Treg) imaju ulogu supresije pro-inflamacijskog odgovora oslobađanjem IL-4, IL-10, TGF- β (Lewis et al., 2012). Kod ALS pacijenata i transgenih glodarskih modela u ranim fazama bolesti pokazana je infiltracija CD4⁺ ćelija u CNS zajedno sa aktivacijom mikroglije, dok se CD8⁺ ćelije infiltriraju u kasnijim fazama bolesti (Andjus et al., 2009; Bataveljić et al., 2009, 2011; Beers et al., 2008; Engelhardt et al., 1993).

Brojne studije su pokazale prisustvo aktivirane mikroglije i astrocita i infiltriranih T ćelija u *post mortem* tkivu ALS pacijenata kao i u kičmenoj moždini transgenih miševa koji ekspimiraju mSOD1 (Alexianu et al., 2001; Engelhardt et al., 1993; Kawamata et al., 1992; Philips & Robberecht, 2011). U ALS, astroglioza se dešava u motornom korteksu, motornim jedrima produžene moždine, duž kortikospinalnog trakta i u ventralnim rogovima kičmene moždine pacijenata (Corcia et al., 2012; Kawamata et al., 1992; M. R. Turner et al., 2004) kao i u tkivima glodarskih transgenih modela bolesti (Chiu et al., 2013; Liao et al., 2012; Ohgomori et al., 2016). U kičmenoj moždini ALS pacijenata, astroglioza nije ograničena samo na ventralne robove, već se uočava i u dorzalnim rogovima i na mestima gde kortikospinalni traktovi ulaze u sivu masu (Schiffer et al., 1996). U mozgu se astroglioza dešava u kortikalnoj sivoj masi, subkortikalnoj beloju masi i nije ograničena samo na motorni korteks (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994). Studija profila ekspresije gena mikroglije sa progresijom bolesti u SOD1^{G93A} mišjem modelu pokazala je promenu protektivnog fenotipa u toksični fenotip (Liao et al., 2012). Povećana ekspresija TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-10 i IFN- γ pokazana je u krvi ALS pacijenata (C.-H. Lu et al., 2016). Inhibicija IFN- γ je produžila životni vek motornih neurona u mSOD1 mišjem modelu i dovela je do promene genske ekspresije mikroglije iz neurotoksičnog u neuroprotektivni fenotip (Garofalo et al., 2020). Ekspresija neurotoksičnog citokina TNF- α je povećana kod pacijenata (Poloni et al., 2000) i u simptomatskoj fazi u mSOD1 mišjem modelu (Hensley et al., 2003).

1.2.4 Mehanizam nezavisan od tipa ćelija

Kako su motorni neuroni pogođeni u ALS, razumevanje mehanizma neurodegeneracije je najpre navelo na ispitivanje značaja različitih neuronskih mehanizama za početak i progresiju bolesti. Ekspresija SOD1 sa nekom od mutacija G37A, G93A ili G85R specifično samo u motornim neuronima, nije dovela do razvoja simptoma ALS kod transgenih miševa (Lino et al., 2002; Pramatarova et al., 2001). Međutim, kasnija ispitivanja na transgenom mišjem modelu koji prekomerno eksprimira SOD1^{G93A} samo u motornim neuronima su dovela do neurodegeneracije i paralize, ali sa izvesnim razlikama u odnosu na tipične karakteristike koje se uočavaju kod konstitutivnog transgenog SOD1^{G93A} mišjeg modela (Jaarsma et al., 2008). Zapravo, pojava simptoma je uočena kasnije sa izrazito varijabilnim vremenom početka bolesti, progresija bolesti je bila sporija i u motornim neuronima nisu uočene patološke promene kao što je vakuolizacija mitohondrija (Jaarsma et al., 2008). Uočene razlike u ispoljavanju simptoma su nagovestile da iako su u ALS prvenstveno pogođeni neuroni, glijske ćelije verovatno imaju značajnu ulogu u razvoju bolesti. Značaj glijskih ćelija u patologiji ALS istakle su studije selektivne ekspresije mSOD1 u pojedinačnim tipovima glije. Selektivna ekspresija mSOD1 samo u astrocitima (Gong et al., 2000), mikrogliji (Boillée et al., 2006) ili Švanovim ćelijama (B. J. Turner et al., 2010) nije dovela do pojave neurodegeneracije u glodarskim modelima ALS. Prekomerne ekspresije mutiranog TDP-43^{M337V} specifično u astrocitima dovela je do redukovane ekspresije glutamatnih transportera ovih ćelija, GLAST (engl. *Glutamate/aspartate transporter*; GLAST) i GLT-1 (engl. *Glutamate transporter 1*; GLT-1) kod čoveka poznatih kao EAAT1, odnosno EAAT2 (engl. *Excitatory amino acid transporter 1 i 2*), kao i do progresivnog umiranja motornih neurona, denervacije skeletnih mišića i progresivne paralize (J. Tong et al., 2013). Sa druge strane, selektivno smanjenje ekspresije mSOD1 specifično u astrocitima u mišjem SOD1^{G37A} transgenom modelu nije uticalo na početak bolesti, ali je značajno odložilo aktivaciju mikroglije i usporilo progresiju bolesti (Yamanaka, Chun, et al., 2008). Delecija TDP-43 takođe specifično u astrocitima je dovela do povećane ekspresije komponente komplekta C1q u mikrogliji, ali ne i do proliferacije astrocita i mikroglije i gubitka motornih neurona (Peng et al., 2020). Interesatno je da je u ovom modelu pokazano da dolazi do gubitka zrelih oligodendrocita dok broj prekursora oligodendrocita ostaje nepromenjen (Peng et al., 2020). Selektivno smanjenje ekspresije mSOD1 u oligodendrocitima u SOD1^{G37A} modelu je dovelo do odlaganja početka bolesti i smanjenja astroglioze i mikroglioze u kičmenoj moždini (Kang et al., 2013). Smanjenje ekspresije mSOD1 specifično u mikrogliji u transgenom mSOD1^{G37R} modelu ne dovodi do odlaganja početka bolesti, ali je progresija bolesti usporena (Boillee et al., 2006). Ekspresija nemutiranog SOD1 proteina specifično u mikrogliji u mSOD1^{G93A} transgenom modelu dovela je do odlaganja smrti neurona i produžila je preživljavanje (Beers et al., 2006). Ekspresija SOD1^{G37R} specifično u oligodendrocitima i motornim neuronima u kombinaciji sa ekspresijom nemutiranog SOD1 u drugim tipovima ćelija je dovela do odlaganja početka bolesti i ukazala na značaj glije za početak simptoma ALS (Yamanaka, Boillee, et al., 2008). Sasvim iznenađujuće, smanjenje ekspresije mSOD1 specifično u Švanovim ćelijama dovodi do ubrzane progresije bolesti, suprotno efektu koji ima manipulacija mSOD1 u drugim glijskim ćelijama (Lobsiger et al., 2009). Selektivna redukcija i ekspresija mSOD1 u različitim ćelijskim tipovima ukazuje na značaj glijskih ćelija u početku i progresiji ALS i sugeriše da se bolest razvija kroz mehanizme nezavisne od posebnog tipa ćelija, ali zavisne od interakcije različitih tipova ćelija (Lobsiger & Cleveland, 2007).

Reaktivna mikroglia i značajno povećana ekspresija jonizovanog Ca²⁺-vezujućeg adaptorskog molekula 1 (engl. *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*; Iba1) markera mikroglije uočeni su u ventralnim rogovima lumbalnog regiona *post mortem* tkiva svih ispitivanih pacijenata sa mutacijom u genu *SOD1*, nekih pacijenata sa mutacijom u genu *C9ORF72* i sALS pacijenata (Spiller et al., 2018). Analiza transkriptoma *post mortem* korteksa ALS pacijenata pokazala je aktivaciju glije u 19% slučajeva i to povećanu ekspresiju genskih markera mikroglije *IBA1* i *TREM2*, oligodendrocita, *MOG* i *OLIG2*, i astrocita, *CD44* i *GFAP* (Tam et al., 2019).

1.2.4.1 Mikroglia

Mikroglia je mezenhimalnog porekla i predstavlja rezidentne imunske ćelije CNS. Mikroglia ima ulogu u održavanju normalog funkcionisanja CNS, sinaptičkoj regulaciji i zaštiti neurona od infekcija ili povreda (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Schafer et al., 2013). Osobine mikroglije oblikuju se ontološki i pod uticajem lokalnih stimulusa u CNS (F. C. Bennett et al., 2018). Studije na pojedinačnim ćelijama pokazuju regionalnu heterogenost humane (Ajami et al., 2018; Böttcher et al., 2019; Hammond et al., 2019; Q. Li et al., 2019) i mišje (Grabert et al., 2016; Nikodemova et al., 2014) mikroglije ukazujući na značajan diverzitet u mladim i starim životinjama, kao i u bolesti u odnosu na normalno adultno doba.

U zdravom nervnom sistemu mikroglia je ramifikovana, odlikuje se malim ćelijskim telom i brojnim nastavcima koji se pružaju i povlače, kontinuirano „nadgledajući“ mikrosredinu. Na ovaj način mikroglia okružuje, preuzima i procesom fagocitoze uklanja mikroorganizme, štetne partikule i apoptotske ćelije održavajući tako homeostazu i štiteći CNS od oštećenja (Galloway et al., 2019; Vilalta & Brown, 2018; Wolf et al., 2017). U odgovoru na povrede i brojna oštećenja (Hanisch & Kettenmann, 2007; Philips & Robberecht, 2011), mikroglia hemotaksično usmerava nastavke ka mestu povrede (Madry & Attwell, 2015), ćelijsko telo se uvećava, zadobija ameboidnu morfologiju i prelazi u aktiviranu formu. U cilju uklanjanja ili ograničavanja neurodegenerativnih oštećenja, mikroglia može formirati ćelijske klastere. Formiranje neuroprotektivnih klastera mikroglije oko formiranih plaka amiloida β uočava se u modelu AB u ranim fazama bolesti (Paasila et al., 2019). U eksperimentalnom autoimunskom encefalomijelitisu, životinjskom modelu multiple skleroze (MS), aktivirana mikroglia formira perivaskularne klastere na mestima ulaska fibrinogena u tkivo kroz narušenu krvno-moždanu barijeru (Davalos et al., 2012). Aktiviranu mikrogliju odlikuje povećana ekspresija kako pan-mikroglijskih markera, CD11b i Iba1, tako i markera aktivirane mikroglije poput CD68 (Jurga et al., 2020). Mikroglia menja svoju morfologiju od takozvanog nadgledajućeg stanja, koje je karakterisano malim ćelijskim telom i tankim razgranatim nastavcima, u aktivirano stanje koje odlikuje uvećano ćelijsko telo, zadebljali i skraćeni nastavci. Tokom aktivacije, pored različitih nivoa morfoloških promena, mikroglia menja i gensku ekspresiju u odgovoru na povredu, infekciju ili neurodegenerativne promene (Ajami et al., 2018; Hammond et al., 2019; Haruwaka et al., 2019; Mathys et al., 2017; Szalay et al., 2016). Mikroglia ima ulogu antigen-prezentujućih ćelija i eksprimira receptore za prepoznavanje, CD14, TLR-2 i TLR-4 (engl. *Toll-like receptor-2, 4*), koji iniciraju imunski odgovor i signalni put preko NF- κ B. Aktivacija mikroglije sa lipopolisaharidom (LPS) i sa IFN- γ promoviše pro-inflamacijsku reakciju koja podstiče produkciju ostalih pro-inflamacijskih citokina, među kojima TNF- α , IL-1 β i IFN-1 β i NO dovode do neuroloških oštećenja, dok IL-4 indukuje anti-inflamacijski fenotip mikroglije koji pomaže oporavak tkiva (Nguyen et al., 2017).

Molekularne obrasce povezane sa patogenima (engl. *Patogen associated molecular pattern*; PAMP) kao i molekularne obrasce povezane sa oštećenjima (engl. *Damage associated molecular pattern*; DAMP) prepoznaju receptori na mikrogliji i pokreću imunski odgovor. Različiti PAMP i DAMP pokreću imunski odgovor mikroglije formiranjem intracelularnih kompleksa proteina koji se karakterišu aktiviranjem inflamatornih kaspaza (T. Liu et al., 2017). Ovi multiproteinski kompleksi čine inflamazom. Receptor za formiranje inflamazoma jeste NLRP3 (engl. *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*) unutarćelijski senzor koji učestvuje u formiranju i aktivaciji NLRP3 inflamazoma (Swanson et al., 2019). Naime, PAMP i DAMP signali izazivaju povećanje ekspresije NLRP3 i citokinskih prekursora što je praćeno formiranjem i aktivacijom inflamazoma, aktivacijom kaspaze 1 i oslobađanjem pro-inflamatornih IL-1 β i IL-18 (Deora et al., 2020). U nekim slučajevima, aktivacija inflamazoma može voditi piroptotskom tipu ćelijske smrti (Swanson et al., 2019).

Mikroglia *in vitro* eksprimira kalijumske jonske kanale od kojih su najzastupljeniji: ulazni ispravljački K⁺ kanal 2.1 (Kir2.1), voltažno zavisni K⁺ kanal 1.3 (Kv1.3), Ca²⁺ aktivirani K⁺ kanal 3.1 (K_{Ca}3.1) (Lively & Schlichter, 2018; Nguyen et al., 2017). Ovi K⁺ kanali imaju značajnu ulogu u osnovnim funkcijama mikroglije, kao što su proliferacija, migracija i fagocitoza, kao i u održavanju membranskog potencijala mikroglije (Izquierdo et al., 2019). Nakon izlaganja mikroglije u kulturi

inflatronim agensima, kao što su LPS ili pro-inflamatorni citokini IFN- γ i TNF- α , dolazi do njene aktivacije. Pri tom dolazi do promene ekspresije K⁺ kanala i aktiviranu mikrogliju odlikuje prisustvo ulazne i izlazne K⁺ provodljivosti (Boucein et al., 2000; Lively & Schlichter, 2018; Nörenberg et al., 1992). Fenotipske karakteristike mikroglije, ramifikacija i sposobnost nadgledanja sredine zavise od njenog membranskog potencijala (Izquierdo et al., 2019). Primarna kultura mišje mikroglije aktivirana sa LPS ili IFN- γ pokazuje povećanje Kv1.3 struja, ali ne i K_{Ca}3.1 i Kir2.1 struja (Nguyen et al., 2017). Promena Kir struja nije uočena u primarnoj kulturi pacovske mikroglije stimulisanom kombinacijom pro-inflamatornih IFN- γ i TNF- α , kao ni pri stimulaciji anti-inflamatornim IL-10, dok je smanjenje Kir struja uočeno stimulacijom anti-inflamatornim citokinom IL-4 (Lam & Schlichter, 2015). Povećanje izlazne Kv1.3 struje je uočeno nakon tretmana pro-inflamatornim faktorima INF- γ i TNF- α , kao i anti-inflamatornim faktorom IL-4 (Lam et al., 2017). Blokiranje Kv1.3 i K_{Ca}3.1 na mišjoj mikrogliji inhibiralo je produkciju pro-inflamatornih citokina ističući njihov značaj u aktivaciji ovih ćelija (Nguyen et al., 2017).

1.2.4.1.1 Mikroglija u ALS

Aktivacija mikroglije pokazana je kod ALS pacijenata (Corcia et al., 2012; M. R. Turner et al., 2004) i u transgenim glodarskim modelima bolesti (Chiu et al., 2013; Liao et al., 2012; Ohgomi et al., 2016). U *post mortem* tkivu ALS pacijenata mikroglia je uočena u motornim regionima mozga i u ventralnim rogovima kičmene moždine (Kawamata et al., 1992). Aktivacija mikroglije i povećana ekspresija CD68 i Iba1 markera su pokazani u kičmenoj moždini sALS pacijenata (Brettschneider et al., 2012). Izučavanje celokupnog transkriptoma ćelija ventralnih rogova lumbalnog regiona kičmene moždine sALS pacijenata pokazalo je povećanje ekspresije gena koji su poreklom iz ćelija glije i koji su uglavnom uključeni u neuroinflamaciju i ćelijsku smrt (D'Erchia et al., 2017). Analiza transkriptoma motornog korteksa sALS pacijenata pokazala je prisustvo podgrupe mikroglije koju karakteriše ekspresija gena specifičnih za bolest/degeneraciju (engl. *Degeneration associated microglia*; DAM) (Dols-Icardo et al., 2020). Ovu podgrupu mikroglije karakteriše između ostalog povećana ekspresija *Trem2*, *Tyrobp*, *Lpl* i *Cst7* gena, kao i redukovana ekspresija *P2yr12* i *Cx3cr1* (Keren-Shaul et al., 2017). Praćenje neuroinflamacije pozitron emisionom tomografijom upotrebom različitih TSPO liganada (engl. *18 kDa translocator protein*), kod ALS pacijenata pokazalo je prisustvo aktivirane mikroglije i reaktivnih astrocita u primarnom motornom, premotornom i temporalnom korteksu (Alshikho et al., 2019; Corcia et al., 2012; M. R. Turner et al., 2004). Aktivacija mikroglije uočena je na početku bolesti u mSOD1 mišjim modelima (Alexianu et al., 2001; Almer et al., 1999; Chiu et al., 2008). Povećana ekspresija CD11b uočena je u ventralnim rogovima kičmene moždine u ranoj presimptomatskoj fazi bolesti koja je praćena povećanjem ekspresije markera inflamacije sa progresijom bolesti (Alexianu et al., 2001; Saxena et al., 2009). Smatra se da je proliferacija mikroglije u ALS poreklom od rezidentne mikroglije, a ne od infiltracije i diferencijacije mijeloidnih ćelija iz krvotoka kroz krvno-moždanu barijeru (Ajami et al., 2007; Gowing et al., 2008; Solomon et al., 2006). Uklanjanje mSOD1 specifično iz mikroglije koja ekspresira CD11b nije uticalo na trenutak početka bolesti, ali je produžilo životni vek mišjeg modela, ukazujući na značaj mikroglije u progresiji bolesti (Boillee et al., 2006). Dok ranije studije pokazuju značaj mikroglije prevashodno u progresiji bolesti, ispitivanje transkriptoma kičmene moždine mSOD1 miša pokazalo je da promene u ekspresiji gena mikroglije i njene narušene funkcije nastupaju znatno pre degeneracije motornih neurona i aktivacije astrocita (Maniatis et al., 2019). Naime, u pomenutoj studiji je pokazana povećana ekspresija gena *Trem2* i *Tyrobp* u ventralnim rogovima i ventralnoj beloj masi kičmene moždine u presimptomatskoj fazi (Maniatis et al., 2019). Proteini koje kodiraju *Trem2* i *Tyrobp* formiraju kompleks koji pokreće fagocitozu i moduliše citokinsku signalizaciju u mikrogliji (Deczkowska et al., 2018; Evans & Holzbaur, 2019). Ovaj kompleks uključuje i produkte gena *ApoE* i *Lpl* i aktiviran je kad mikroglija fagocituje apoptotske neurone (Maniatis et al., 2019). Izlaganje mikroglije vanćelijskoj mSOD1 dovodi do njene aktivacije (Roberts et al., 2013). Pored toga, pokazano je da vanćelijska mSOD1 dovodi do smrti motornih neurona i da taj mehanizam uključuje toksični efekat mikroglije na neurone (Roberts et al., 2013; Zhao et al.,

2010). Prekomerna ekspresija mSOD1 u neonatalnoj mikrogliji deluje toksično na motorne neurone u kokulturi, a aktivacija mikroglije koja eksprimira mSOD1 tretmanom sa LPS dovodi do još izraženije smrtnosti neurona u kokulturi (Xiao et al., 2007). Studija Frakes i kolega (Frakes et al., 2014) je pokazala da adultna mikroglija, koja eksprimira SOD1^{G93A} dovodi do smrti motornih neurona u kokulturi preko NF-κB, dok kokultura motornih neurona sa neonatalnom mikroglijom koja eksprimira mSOD1 nije imala efekat na preživaljavanje motornih neurona. Transkripcioni faktor NF-κB ima značajnu ulogu u regulaciji inflamatornih odgovora i kod ALS pacijenata i kod mišjeg modela gde je uočena njegova povećana ekspresija (Frakes et al., 2014). Ista studija je pokazala povećanje aktivacije NF-κB u ALS vezano za mikrogliju, jer inhibicija NF-κB specifično u mikrogliji dovodi do smanjene smrtnosti motornih neurona i do produženja života mSOD1 miša.

Ispitivanje uloge *TARDBP*, *FUS* i *C9ORF72* u mikrogliji, ukazalo je na njena narušena svojstva u neurodegeneraciji u ALS. Aktivacija mikroglije uočena je kod miševa koji ekspimiraju aberantnu formu skraćenog proteina FUS koji je lokalizovan u citoplazmi i to pre i nakon početka ALS (Funikov et al., 2018), sugerišući da je promenjena lokalizacija FUS dovoljna da indukuje aktivaciju mikroglije (B. E. Clarke & Patani, 2020). Mikroglija koja ne eksprimira TDP-43 ima povećanu fagocitnu funkciju, posebno u uklanjanju proteinskih agregata (Paolicelli et al., 2017). Mikroglija koja ne eksprimira C9ORF72 može preći u aktiviranu formu, ali ne izaziva smrt motornih neurona (O'Rourke et al., 2016).

1.2.4.2 Astroцити

Astroцити су глијске ћелије CNS укључене у одржавање јонске хомеостазе, уклањање и катаболизам neurotransmitera, одржавање крвно-моždане баријере и регулацију метабoliчке хомеостазе синтезом гликогена и снабдевањем neurona енергетским супстратима (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Међу proteinima експримираним у astroцитима присутни су и улазни исправљачки K⁺ канал 4.1 (Kir4.1), аквaporin 4 (AQP4) и glutamatni transporteri GLT1 (EAAT2) и GLAST (EAAT1) (Higashi et al., 2001; Mahmoud et al., 2019; Nagelhus et al., 2004). Astroцитна stopala блиско окружују места pre- и postsinapse и учествују у формирању tripartitne sinapse (Araque et al., 1999). Након sinaptičке активности, astroцити преузимају преостали glutamat, док ванћелијски K⁺ ослобођен током sinaptičке активности регулишу Kir4.1 обезбеђујући несметано функционисање neurona и пренос сигнала (Kofuji & Newman, 2004; Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Pored regulacije sastava ванћелијске средине, astroцити пружају и трофичку потпору neuronima преузимањем глукозе из крви (Falkowska et al., 2015). Naime, astroцити имају могућност складиштења гликогена који током повећане активности neurona катаболишу и допремају laktat neuronima обезбеђујући енергетски супстрат за њихово функционисање (Falkowska et al., 2015). Astroцити заједно са mikroglijom представљају главни одбрамбени систем CNS и обликују имунски одговор у neuroinflamaciji и neurodegeneraciji (Sofroniew, 2020; Stephenson et al., 2018).

У neurodegenerativnim bolestima, као што је ALS, astroцити менјају морфолошка и функционална својства и постају реактивни у одговору на бројне стимулусе, међу којима су и растворливи фактори које ослобађа mikroglija (Liddelow et al., 2017). Реактивна astrogliоза је одговор astroцита на повреду или degenerativне промене у CNS. Реактивни astroцити менјају свој transkripcioni профил, посебно у вези са genima који су одговорни за синтезу ванћелијског матрикса и актинских filamenta у основи морфолошких промена, затим citokina и proteina за презентацију antigena и komplementa (Verkhatsky & Nedergaard, 2018). Ове промене у експресији gena погађају различите процесе и доводе до hipertrofije и proliferacije astroцита и ослобађања pro- и anti-inflamacijskih citokina, hemokina, interferona и фактора раста и компонената ванћелијског матрикса (Zamanian et al., 2012). Фактори IL-1α, TNF и C1q које ослобађа mikroglija индукују специфичан фенотип astroцита који имају тоksičan ефекат на kortikalне neurone, embrionalне spinalне motorne neurone и diferencirane oligodendrocite, али не и на oligodendrocitне прекурсоре (Liddelow et al., 2017). Показано је да код хроничне neurodegeneracije апликација pro-inflamacijskih фактора IL-1β и TNF-α у мозак животиња изазива повећану синтезу ових citokina у mikrogliji, док су astroцити показали повећану експресију NF-κB и интензивно ослобађање различитих hemokina у високој концентрацији (Hennessy et al., 2015). Astroцити

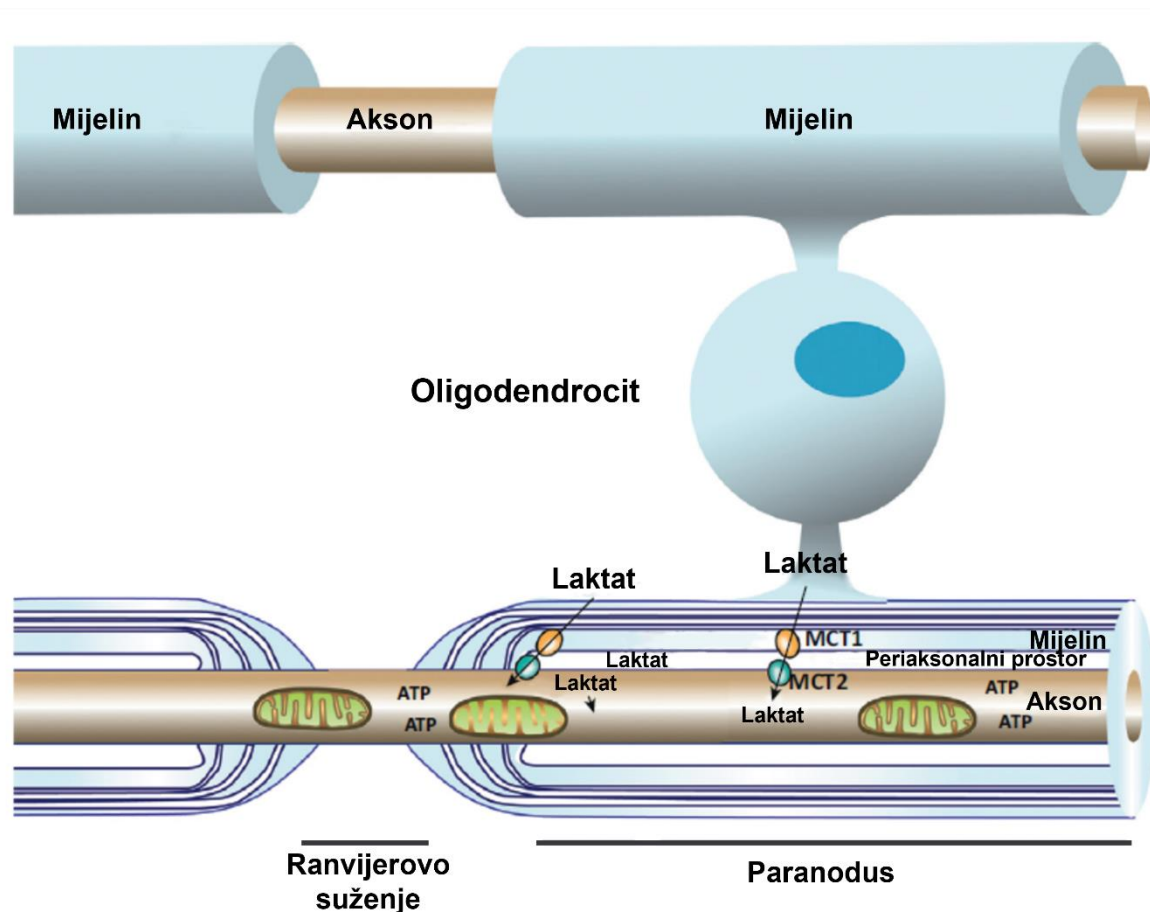
izolovani i diferencirani iz *post mortem* tkiva lumbalne kičmene moždine fALS i sALS pacijenata imaju toksični efekat na motorne neurone (Haidet-Phillips et al., 2011). Astrociti diferencirani iz humanih embrionalnih matičnih ćelija koji ekspimiraju SOD1^{G37R} aktiviraju inflamacijski odgovor i smanjuju preživljavanje motornih neurona u kokulturi (Marchetto et al., 2008). Slično, astrociti sa mutacijom R521G u genu *FUS* pokreću inflamacijski odgovor i oslobađaju TNF- α i dovode do degeneracije motornih neurona u kokulturi (Kia et al., 2018). Ove studije su zapravo pokazale da astrociti oslobađaju različite solubilne faktore koji utiču na preživljavanje motornih neurona u ALS.

1.2.4.3 Karakteristična svojstva oligodendrocita

Oligodendrociti su glijske ćelije čije su osnovne funkcije mijelinizacija aksona i pružanje trofičke i metaboličke potpore neuronima (Y. Lee et al., 2012; Nave, 2010). Oligodendrociti formiraju mijelinski omotač oko aksona i obezbeđuju brzo skokovito prostiranje signala. Kontakt aksona sa vanćelijskom sredinom je ograničen na mesta Ranvijerovih nodusa što naglašava značaj oligodendrocita u obezbeđivanju i transportu metabolita do aksona.

U mozgu i kičmenoj moždini se razlikuju potklase oligodendrocita koje imaju različito poreklo (Bradl & Lassmann, 2010). U mozgu razlikujemo tri linije nastanka oligodendrocita (Kessaris et al., 2006), dok u kičmenoj moždini oligodendrociti potiču iz specijalizovanih domena ventralne ventrikularne zone, odakle se prvo razvijaju prekursori motornih neurona, a potom prekursorske ćelije oligodendrocita (OPC). Od ventralnih OPC diferencira se 85-90% oligodendrocita (Q. R. Lu et al., 2002), dok ostatak potiče iz dorzalne kičmene moždine (Cai et al., 2005). Pre kraja prve postnatalne nedelje, javlja se populacija OPC ćelija koja se zadržava u adultnom dobu i predstavlja progenitore novih mijelinizujućih oligodendrocita u mozgu i kičmenoj moždini tokom ranog postnatalnog i odraslog doba (Kang et al., 2010; Psachoulia et al., 2009). Iz proliferišućih prekursorskih ćelija oligodendrocita (OPC ili NG2⁺) razvijaju se premijelinizujući oligodendrociti koji stupaju u kontakt sa aksonom i izgrađuju filamentozne mijelinske slojeve koji obavijaju akson (E. G. Hughes & Stockton, 2021; Kuhn et al., 2019). Oligodendrociti u ovoj fazi počinju da ekspimiraju citoplazmatski protein 2', 3'-ciklični nukleotid 3'-fosfodiesterazu (CNPaza) (Braun et al., 1988; Kuhn et al., 2019). CNPaza ima dve izoforme od 46 i 48 kDa i mijelinizujući oligodendrociti ekspimiraju obe izoforme (Scherer et al., 1994). Njena prevashodna uloga je u održavanju citoplazme i citoskeletnih elemenata oligodendrocita koji su unutarćelijska potpora za formiranje mijelina (Snaidero et al., 2017). Zreli diferencirani oligodendrociti mijelinizuju aksone i predominantno ekspimiraju mijelinski bazni protein (MBP) i proteolipidni protein (PLP) (Kuhn et al., 2019).

Oligodendrociti ostvaruju direktan kontakt sa aksonima i predstavljaju značajan izvor metabolita (Vandoorne et al., 2018). Oligodendrociti ekspimiraju transporter monokarboksilatne kiseline 1 (MCT1) (Y. Lee et al., 2012; Philips & Rothstein, 2017; Saab et al., 2016) koji transportuje laktat do aksona i na taj način pružaju metaboličku potporu neuronima u mehanizmu nezavisnom od mijelinizacije (Y. Lee et al., 2012). Inhibicija MCT1 u organotipskim presecima kičmene moždine u kulturi smanjuje preživljavanje neurona, dok direktno dodavanje laktata u medijum sprečava degeneraciju. U heterozigotnom mišjem modelu koji ne ekspimirira MCT1 došlo je do pojave aksonopatije i aktivacije glijskih ćelija u mozgu i kičmenoj moždini (Y. Lee et al., 2012). Studija delecije gena *Mct1* u prekursorskim ćelijama oligodendrocita i oligodendrocitima pokazala je da životinje koje ne ekspimiraju *Mct1* razvijaju aksonsku degeneraciju i hipomijelinizaciju tek tokom kasnijeg adultnog doba ističući značaj oligodendrocita u energetsom snabdevanju neurona (Philips et al., 2021). Šematski prikaz energetske snabdevanja neurona od strane oligodendrocita dat je na Slici 4.



Slika 4. Šematski prikaz oligodendrocita i aksonskih monokarboksilatnih transportera. Oligodendrociti transportuju laktat ili druge monokarboksilate u periaksonalni prostor preko monokarboksilatnog transportera 1 (MCT1). Iz ovog prostora, laktat može biti preuzet od strane aksona preko monokarboksilatnog transportera 2 (MCT2), preveden u piruvat aktivnošću laktatne dehidrogenaze, i uveden u mitohondrije u proces oksidativne fosforilacije i generacije ATP. Preuzeto i izmjenjeno iz (Morrison et al., 2014).

Studije delecije gena koji kodiraju mijelinske markere oligodendrocita, PLP i MBP, ukazale su na metaboličku ulogu koju oligodendrociti imaju u funkcionisanju neurona (Philips & Rothstein, 2017). U transgenom modelu miša u kome je uklonjen gen za mijelinski protein PLP formiran je kompaktan mijelin, međutim, uočeno je oticanje aksona i degeneracija (Griffiths et al., 1998; Rosenbluth et al., 2006). Smatra se da degeneraciji aksona doprinosi narušeni aksonski transporta što ističe neophodnost metaboličke podrške od strane oligodendrocita (Griffiths et al., 1998; Philips & Rothstein, 2017). Sa druge strane, u transgenom mišu koji ne eksprimira protein MBP, formirani mijelin nije kompaktan. Nije uočena degeneracija aksona, međutim životinje su imale spazam mišića ukazujući na narušenu genuzu akcionih potencijala (Philips & Rothstein, 2017). Fenotip životinjskih modela koji ne ekspimiraju MBP ili PLP ukazuje na to da oligodendrociti utiču na funkcionalnost neurona nezavisno od njihove sposobnosti da obezbede normalnu provodljivost aksona (Philips & Rothstein, 2017). Mišji model koji ne eksprimira CNPazu pokazuje progresivnu degeneraciju aksona posebno izraženu u lumbalnom regionu kičmene moždine, motorna oštećenja, aktivaciju mikroglije, što je dovelo do prerane smrti, ali nije uočena značajna narušenost kompaktnosti mijelina (Lappe-Siefke et al., 2003). CNPaza ima značajnu ulogu u organizaciji aktinskog citoskeleta i zajedno sa MBP utiče na organizaciju i kompaktnost mijelina i na formiranje mijelinskih nanokanala za transport malih molekula i metabolita (Saab et al., 2016; Snaidero et al., 2017; Zuchero et al., 2015). Mijelinski nanokanali su lokalizovani na unutrašnjoj strani mijelinskog paranodusa i orijentisani su prema aksonu sa ciljem obezbeđivanja energetske potpore, aktivnosti i integriteta aksona. Jedan od tako orijentisanih transportera jeste MCT1 transporter koji omogućava metaboličku potporu aksonima neurona u mehanizmu nezavisnom od mijelinizacije (Y. Lee et al., 2012).

Studije na glodarskim modelima ukazale su na značaj membranskih svojstava oligodendrocita tokom diferencijacije i sazrevanja (Schirmer et al., 2018). Zreli mijelinizujući oligodendrociti u optičkom nervu eksprimiraju Kir4.1 koji može biti u vidu homomera ili formirati heteromere sa unutrašnjim ispravljačkim K⁺ kanalom 5.1 (Kir5.1) (Brasko et al., 2017). Ekspresija Kir4.1 u oligodendrocitima pokazana je u telima perinodalnih oligodendrocita i na unutrašnjem mijelinskom jezičku lokalizovanom uz akson (Schirmer et al., 2018). Prisustvo Kir struja pokazano je i *in situ* u oligodendrocitima na presecima mozga (Gipson & Bordey, 2002). *In vitro* studije na animalnim oligodendrocitima i oligodendrocitima diferenciranim iz humanih pluripotentnih matičnih ćelija ukazale su na promene u membranskim svojstvima i ekspresiji kanala oligodendrocita tokom njihovog sazrevanja (Ferraiuolo et al., 2016). Nezreli oligodendrociti u kulturi eksprimiraju voltažno zavisne Na⁺ kanale, K⁺ zavisne izlazne ispravljačke kanale i A-tip K⁺ kanala, čija se ekspresija redukuje tokom diferencijacije u zrele oligodendrocite (Sontheimer et al., 1989). Nasuprot smanjenju ekspresije Na⁺ struja tokom diferencijacije oligodendrocita, povećava se ekspresija ulaznih Kir struja (Sontheimer et al., 1989). U oligodendrocitima je ekspimiran ulazni Kir4.1 (Kalsi et al., 2004; Poopalasundaram et al., 2000) čija se ekspresija povećava tokom sazrevanja i starenja (Schirmer et al., 2018). Smatra se da ovaj kanal doprinosi sazrevanju oligodendrocita, mijelinizaciji i održavanju membranskog potencijala mirovanja (Chang et al., 2000; De Biase et al., 2010; Livesey et al., 2016; Maldonado et al., 2013; C. Neusch, 2006; Ono et al., 2001; Sontheimer et al., 1989). Značaj Kir4.1 u razvoju oligodendrocita i mijelinizaciji pokazan je u kulturi oligodendrocita izolovanih iz miša koji ne eksprimiraju Kir4.1 (Kir4.1^{-/-}). Membranski potencijal Kir4.1^{-/-} oligodendrocita je depolarizovan ukazujući na značaj kanala za K⁺ u uspostavljanju potencijala mirovanja. Pored toga, Kir4.1^{-/-} oligodendrocite karakteriše manje telo i manji broj nastavaka, kao i značajno redukovana proizvodnja mijelina u odnosu na kontrolne oligodendrocite (Neusch et al., 2001). Kir4.1^{-/-} oligodendrociti sporije uklanjaju vanćelijski K⁺ i pokazuju usporen oporavak neurona nakon intenzivne stimulacije, što dovodi do povećane aktivnosti neurona (Larson et al., 2018).

1.2.4.3.1 Oligodendrociti u ALS

Narušena svojstva oligodendrocita, posebno metabolička potpora aksonima, su uočeni u više neurodegenerativnih oboljenja poput ALS, AB, PB i HB (Morrison et al., 2013). Nove studije pokazuju da su oligodendrociti uključeni u patofiziološke promene u ALS. Akumulacija agregata koji sadrže mutirane proteine, poput SOD1 (Ferraiuolo et al., 2016; Forsberg et al., 2011), TDP-43 i FUS (Nonneman et al., 2014; Traiffort et al., 2021), uočena je u oligodendrocitima ALS pacijenata. U motornom korteksu ALS pacijenata pokazana je smanjena ekspresija receptora MCT1 u oligodendrocitima (Y. Lee et al., 2012). Međutim, kod ovih pacijenata nije uočena promena ekspresije oligodendrocitnog markera CNPaze (Y. Lee et al., 2012). Slično, ekspresija CNPaze nije promenjena ni u transgenom SOD1^{G93A} mišu, ali je uočeno smanjenje ekspresije MBP (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). U kičmenoj moždini istog životinjskog modela u ranoj simptomatskoj fazi pokazana je smanjena ekspresija MCT1 kako na nivou iRNK, tako i na proteinskom nivou (Y. Lee et al., 2012). U SOD1^{G93A} ALS modelu detektovana je oksidovana iRNK koja kodira proteine uključene u mijelinizaciju i pakovanje proteina (Y. Chang et al., 2008). Kako oštećenja iRNK dovode do redukcije ekspresije proteina, ove promene bi mogle doprineti degeneraciji oligodendrocita koja se dešava u ALS (Nonneman et al., 2014).

Degeneracija oligodendrocita je uočena u sivoj masi ventralnih rogova kičmene moždine SOD1^{G93A} miša u presimptomatskoj fazi, dok su ove promene postajale izraženije sa progresijom bolesti (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Uprkos degeneraciji, broj oligodendrocita u terminalnoj fazi bolesti nije promenjen u odnosu na kontrolne životinje usled izražene proliferacije NG2⁺ prekursora oligodendrocita koja se uočava u ventralnim rogovima ALS transgenog modela (Kang et al., 2013). Iako OPC kompenzuju broj odumrlih oligodendrocita, one ne dostižu funkcionalnu zrelost oligodendrocita (Kang et al., 2010). Oligodendrociti koji vode poreklo od proliferišućih NG2⁺ prekursora često se uočavaju u blizini degenerišućih aksona i pokazuju redukovanu ekspresiju MCT1 i njihovi nastavci često ne kolokalizuju sa MBP, ukazujući na to da ne

dosežu nivo sazrevanja mijelinizujućih oligodendrocita (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Uporedo sa degeneracijom oligodendrocita uočena je i narušena mijelinska struktura oko degenerišućih aksona u mišjem modelu ALS (Kang et al., 2013). *In vitro* studije na oligodendrocitima iz ALS transgenih modela, kao i oligodendrocitima diferenciranim iz matičnih ćelija sALS pacijenata, pokazale su povećanu smrtnost motornih neurona u kokulturi (Ferraiuolo et al., 2016). U istoj studiji je pokazano da smanjenja ekspresija mSOD1 u oligodendrocitima sprečava smrt motornih neurona ukazujući na patofiziološki značaj prisustva mSOD1 u ALS oligodendrocitima. Za razliku od oligodendrocita koji su ekspimirali mSOD1, oligodendrociti diferencirani iz pluripotentnih matičnih ćelija pacijenata sa mutacijom u *C9ORF72* nisu pokazali narušenu diferencijaciju i sazrevanje (Ferraiuolo et al., 2016).

1.3 Interakcija oligodendrocita i mikroglije u fiziološkim i patološkim uslovima

Značaj interakcije mikroglije i oligodendrocita je uočen u ranim fazama mijelinizacije tokom razvića. Mikroglija ima bitnu ulogu u pravilnoj mijelinizaciji kroz proces fagocitoze prekursora oligodendrocita i premijelinizujućih oligodendrocita (Nemes-Baran et al., 2020). Jedna od studija je otkrila da aktivnost neurona reguliše fagocitozu mijelina od strane mikroglije (A. N. Hughes & Appel, 2020). Gajenje oligodendrocita i mikroglije u kokulturi pokazalo je da mikroglija stimuliše oligodendrocite da sintetišu mijelin-specifične proteine uključujući MBP i PLP (Hamilton & Rome, 1994). Miševi deficijentni za fraktalkinski receptor u mikrogliji imaju povećan broj oligodendrocita i formiraju mnogo tanji mijelin u korpus kalozumu (Nemes-Baran et al., 2020). Subpopulacija mikroglije koja eksprimira CD11c kodiran genom *Itgx* je odgovorna za pravilnu mijelinizaciju tokom razvića (Wlodarczyk et al., 2017). Ovi autori su pokazali da CD11c⁺ populacija mikroglije eksprimira specifičan set gena tokom neonatalnog razvića koji imaju veliki značaj za mijelinizaciju (Wlodarczyk et al., 2017). Ista studija je pokazala da je CD11c⁺ subpopulacija mikroglije prisutna i u adultnom mozgu i to u klasterima mikroglije koji se formiraju u toku repopulacije mikroglije nakon ablacije.

Patološke promene oligodendrocita su odlika ALS, MS tipa neuromielitis optica, ishemijske, AB, PB i drugih inflamatornih bolesti CNS (Peferoen et al., 2014). Značaj interakcije mikroglije i oligodendrocita je pokazan i u mišjem modelu mSOD1^{G93A} gde je uočeno da aktivirana mikroglija okružuje oligodendrocite u degeneraciji (Kang et al., 2013). Naime, pokazano je da oligodendrociti u ALS ekspimiraju isečenu kaspazu 3 koja je markere apoptoze (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Jedna od uloga mikroglije jeste upravo fagocitoza apoptotskih ćelija (Galloway et al., 2019) te je moguće da se aktivirana mikroglija okuplja oko apoptotskih oligodendrocita u ALS (Kang et al., 2013).

Progresivna neurodegeneracija motornih neurona u ALS može biti posledica zajedničkog delovanja osetljivosti motornih neurona na formiranje mSOD1 agregata i toksičnosti nezavisne od ćelijskog tipa koja potiče od okolnih ćelija (Brites & Vaz, 2014). Uklanjanje mSOD1 specifično iz oligodendrocita je dovelo do odlaganja početka bolesti i odlaganja aktivacije mikroglije (Kang et al., 2013). Sa druge strane, uklanjanje mSOD1 iz mikroglije ili zamena mikroglije koja eksprimira mSOD1 sa mikroglijom koja eksprimira nemutirani SOD1 u presimptomatskoj fazi bolesti, značajno usporava progresiju ali ne utiče na početak bolesti (Boillee et al., 2006; J. C. Lee et al., 2012). U SOD1^{G93A} modelu je pokazano značajno povećanje proliferacije NG2⁺ ćelija posebno u ventralnim rogovima lumbalnog regiona kičmene moždine počevši od presimptomatske faze bolesti (Gowing et al., 2008; Kang et al., 2010, 2013). NG2⁺ ćelije se u SOD1^{G93A} modelu diferenciraju u oligodendrocite (Kang et al., 2010, 2013), međutim pokazano je da oligodendrociti imaju narušeno sazrevanje i mijelinizaciju u terminalnoj fazi bolesti (Kang et al., 2013). Aktivirana mikroglija oslobađa različite pro-inflamacijske medijatore uključujući reaktivne kiseonične i azotne vrste, hemokine i citokine, na koje su oligodendrociti posebno osetljivi jer imaju nizak nivo anti-oksidativnih enzima (Peferoen et al., 2014; Thorburne & Juurlink, 1996). Povećana ekspresija pro-inflamacijskih citokina, između ostalih TNF- α , IL-1 β i INF- γ je pokazana u krvi ALS pacijenata (C.-H. Lu et al., 2016). Oksidativni

stres inhibira ekspresiju gena odgovornih za sazrevanje oligodendrocita (French et al., 2009). Aktivacija mikroglije aplikacijom LPS *in vivo* dovodi do povećanog oslobađanja IL-1 β što vodi inhibiciji diferencijacije OPC i hipomijelinizaciji (Pang et al., 2003). U *in vitro* uslovima, tretman sa LPS je doveo do smrti premijelinizujućih oligodendrocita gajenih u kokulturi sa mikroglijom i astrocitima (J. Li et al., 2008; Sherwin & Fern, 2005).

Studije selektivne delecije mSOD1, istakle su značaj i oligodendrocita i mikroglije u patologiji ALS, ali u različitim fazama bolesti. U prilog tome govori i studija ablacije 50% populacije proliferišuće mikroglije u lumbalnom regionu SOD1 transgenog miša u simptomatskoj fazi bolesti koja nije imala uticaj na preživljavanje transgenih miševa ali nije uticala ni na promenu broja NG2⁺ prekursora oligodendrocita (Gowing et al., 2008). Smatra se da mikroglija u ALS pokazuje neuroprotektivni fenotip na početku bolesti, međutim prelazi u neurotoksični odnosno pro-inflamacijski fenotip sa razvojem bolesti (Brites & Vaz, 2014) stvarajući toksično okruženje koje doprinosi razvoju bolesti.

Oligodendrociti su podložni oksidativnom stresu (R. L. Haynes et al., 2005) i glutamatnoj toksičnosti (Follett et al., 2004) što se smatra povezanim sa visokim bazalnim metabolizmom ovih ćelija aktivnih u sintezi lipida za mijelinsku biosintezu (Lane & Farlow, 2005). Degeneracija oligodendrocita ima značajnu ulogu u demijelinizujućim bolestima kao što je MS, u kojima su definisani neki od toksičnih faktora uključujući TNF- α oslobođen od strane mikroglije, slobodni radikali i glutamat (Matute et al., 2001). Dodatno, pokazano je da TNF- α potencira AMPA/kainatom - indukovanu ekscitotoksičnost u oligodendrocitima u optičkom nervu *in vitro* (B. A. Miller et al., 2005). Oligodendrociti izloženi stresu oslobađaju više medijatora koji mogu uticati na aktivaciju mikroglije i aktivno je regrutovati na mesto oštećenja (Balabanov et al., 2007; Ramesh et al., 2012). U MS se uočava redukovani broj oligodendrocita, fagocitoza apoptotskih oligodendrocita, oticanje ćelija i liza, praćene formiranjem klastera mikroglije u beloj masi, kao i prisustvom mikroglije i makrofaga u aktivnim lezijama i zonama remijelinizacije (Peferoen et al., 2014). Procesi remijelinizacije ispitivani su u cilju definisanja potencijalnih faktora koji doprinose obnavljanju mijelina. Mikroglija je uključena u demijelinizacionu i remijelinizacionu fazu MS (Pons & Rivest, 2020). Pro-inflamacijski citokini uključujući IL-1, TNF- α , IFN- γ detektovani su u demijelinizujućim lezijama (Benveniste, 1997). U modelu indukovane demijelinizacije dolazi do aktivacije mikroglije u odgovoru na leziju i uočeno je da mikroglija iz svog inicijalno pro-inflamacijskog stanja prelazi u anti-inflamacijski fenotip (Miron et al., 2013). Faktori koje oslobađa mikroglija u svom anti-inflamacijskom fenotipu uključujući različite faktore rasta, neophodni su za inicijaciju remijelinizacije i diferencijaciju i sazrevanje oligodendrocita u leziji (Lombardi et al., 2019; Miron et al., 2013). U procesu remijelinizacije nakon povrede uočena je aktivacija NF- κ B u mikrogliji i pokazano je da je oslobađanje TNF- α neophodno za indukciju fagocitoze i degradaciju mijelinskog otpada od strane mikroglije i indukciju novih premijelinizujućih oligodendrocita (Cunha et al., 2020). U kuprizonskom modelu demijelinizacije je pokazan značaj IL-1 β za oslobađanje faktora rasta neophodnih za promovisanje preživljavanja oligodendrocita (Mason et al., 2001). Kao i u ALS, fenotip aktivirane mikroglije i oslobađanje i uloge različitih citokina zavise od mikrosredine u kojoj se ćelije nalaze i predstavlja kompleksan kontinuum interakcija. U *post mortem* tkivima mozga MS pacijenata, uočena je povećana fagocitna funkcija mikroglije kao i prisustvo iRNK za mijelinske gene u mikrogliji, ukazujući da mikroglija fagocituje mijelin, a zatim i eksprimira njegovu iRNK (Schirmer et al., 2019).

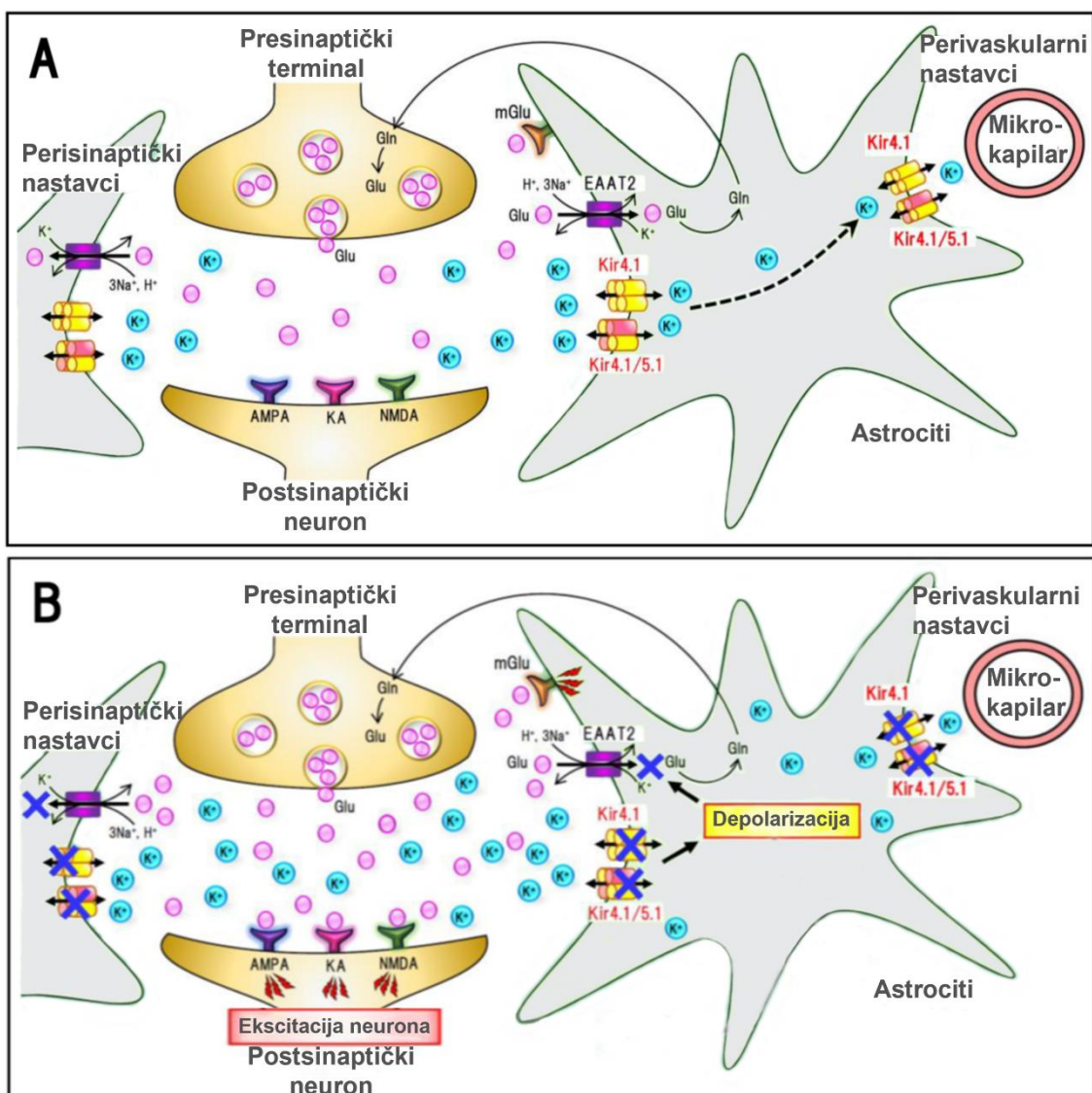
Fagocitoza mijelina u demijelinizaciji dovodi do stvaranja inflamacijskog okruženja (Goldstein et al., 2016; Lloyd & Miron, 2019; Rawji et al., 2016; Yong et al., 2019) neophodnog za uklanjanje ćelijskog otpada i omogućava otpočinjanje sledeće faze, odnosno remijelinizacije (Kotter, 2006). U kuprizonskom modelu demijelinizacije, pokazano je da uklanjanje ostataka mijelina od strane mikroglije zavisi od prisustva TREM2 na mikrogliji. Mikroglija koja ne eksprimira TREM2 ima smanjenu sposobnost fagocitoze oštećenog mijelina, što odlaže proces remijelinizacije (Geladaris et al., 2021; Kalafatakis & Karagogeos, 2021; Poliani et al., 2015). Narušena struktura mijelina, aktivacija mikroglije i remijelinizacija uočavaju se i u AB (Behrendt et al., 2013; Lloyd & Miron, 2019). Oštećenja oligodendrocita i mijelina povezuju se sa toksičnošću β -amiloida (Desai et al.,

2010). U AB se uočava proliferacija i diferencijacija prekursorskih ćelija oligodendrocita, ali je ekspresija MBP i broj zrelih oligodendrocita bio redukovan (Behrendt et al., 2013; Nasrabady et al., 2018), što je uočeno i u transgenom modelu ALS (Kang et al., 2013). U ishemiji, oslobođeni ATP oštećuje mijelin i oligodendrocite i dovodi do aktivacije mikroglije (Domercq et al., 2010; L. Yu et al., 2020). Faktori koje oslobađa mikroglija pokazali su se ključnim u proliferaciji i diferencijaciji nervnih progenitora u oligodendrocite (Deierborg et al., 2010).

1.4 Ekscitotoksičnost i narušena homeostaza K^+

Jedna od fundamentalnih funkcija astrocita jeste preuzimanje viška glutamata oslobođenog u sinaptički prostor nakon aktivnosti neurona, što je značajno za kontrolu funkcije neurona i sprečavanje glutamatne ekscitotoksičnosti koja vodi hiperekscitabilnosti i smrti ovih ćelija (Dong et al., 2009; Mahmoud et al., 2019). Nakon sinaptičkog oslobađanja, glutamat se vezuje za receptore na postsinaptičkim ćelijama i to za AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionatne), KA (kainatne) i NMDA (N-metil-D-aspartatne), što posledično vodi pokretanju signalnih puteva u postsinaptičkim neuronima, depolarizaciji membrane i oslobađanju K^+ u vanćelijsku sredinu. Višak glutamata tokom sinaptičke transmisije mora biti brzo uklonjen iz vanćelijskog prostora i upravo astrociti obavljaju ovu funkciju svojim glutamatnim transporterima (Anderson & Swanson, 2000). Astrociti ekspimiraju Na^+ -zavisne glutamatne transportere GLAST (EAAT1) i GLT-1 (EAAT2) preko kojih se obavlja preuzimanje 80-90% vanćelijskog glutamata u CNS (Mahmoud et al., 2019). Preuzimanje glutamata je energetski zahtevan proces u kome se sa svaka 2 glutamatna anjona u ćeliju unose 3 jona Na^+ i 1 jon H^+ a iz ćelije izlaze 2 jona K^+ , što proizvodi elektrogeni efekat u smislu depolarizacije (Bowman & Kimelberg, 1984). Preuzeti glutamat u astrocitima biva konvertovan u glutamin delovanjem glutamin sintetaze. Tako inaktiviran metabolit biva vraćen neuronima i ulazi u ciklus produkcije glutamata i neometanog snabdevanja neurotransmitera za presinaptičko oslobađanje. Nepotpuno uklanjanje oslobođenog glutamata dovodi do njegovog nagomilavanja, sprečava prenos signala i dovodi do hiperekscitabilnosti neurona (J. V. Andersen et al., 2021). Ekscitotoksičnost je posledica prekomerne stimulacije glutamatnih receptora usled povišene koncentracije vanćelijskog glutamata što dovodi do prekomerne potencijacije, ostećenja i degeneracije neurona (Dong et al., 2017) i šematski prikaz dat je na Slici 5. Smanjena ekspresija EAAT2 pokazana je kod ALS pacijenata (Fray et al., 1998; Maragakis et al., 2004; Rothstein et al., 1995; Sasaki et al., 2000), kao i u tkivima životinjskih modela ALS (Bendotti et al., 2001; L. I. Bruijn et al., 1997; Howland et al., 2002; Nagai et al., 2001). Redukovana ekspresija EAAT2 je uzrok nagomilavanja sinaptičkog glutamata u ALS, što dovodi do prekomerne stimulacije AMPA receptora na neuronima i intenzivnog ulaska Ca^{2+} u ćelije, stresa ER i mitohondrija i oslobađanja ROS (Taylor et al., 2016). Studije u kojima je izazvana inhibicija sinteze EAAT2 aplikacijom antisens oligonukleotida kod WT pacova dovele su do pojave karakteristika neurodegeneracije i progresivne paralize (Rothstein et al., 1996). SOD1^{G93A} miš koji ujedno prekomerno ekspimirira EAAT2, pokazao je produženo preživljavanje, odložen početak odumiranja motornih neurona i degenerativnih promena u aksonima (Guo et al., 2003). Riluzol, jedan od malobrojnih odobrenih lekova za ALS, upravo inhibira ekscitotoksični stres u neuronima tako što usporava oslobađanje glutamata i blokira AMPA receptore (Debono et al., 1993; Hubert et al., 1994; Sanger & Depoortere, 1998).

Tokom aktivnosti neurona oslobađanje glutamata praćeno je oslobađanjem K^+ iz repolarizujućih neurona kao i iz AMPA i NMDA receptora u sinaptičku pukotinu (Shih et al., 2013). Održavanje homeostaze K^+ u CNS je neophodno za održavanje membranskog potencijala neurona, prenos signala, sazrevanje ćelija i neometano funkcionisanje nervnog sistema. U normalnim fiziološkim uslovima koncentracija K^+ u vanćelijskoj sredini je niža u odnosu na unutarćelijsku sredinu. Tokom povećane aktivnosti neurona, vanćelijski K^+ se može povećati sa fizioloških 3 mM na 12 mM (Kofuji & Newman, 2004). Povećanje vanćelijske koncentracije K^+ ($[K^+]_o$) dovodi do depolarizacije ćelijske membrane što narušava ekscitabilnost i normalno funkcionisanje neurona (Rienecker et al., 2020) (Slika 4). Astrociti imaju značajnu ulogu u održavanju homeostaze vanćelijske koncentracije K^+ .



Slika 5. Šematski prikaz ekscitotoksičnosti i promene u funkciji Kir4.1 u tripartitnoj sinapsi. (A) Sinapse u fiziološkim uslovima. Stimulacija presinaptičkog neurona dovodi do oslobađanja glutamata i aktivacije AMPA, KA, i NMDA receptora na postsinaptičkom neuronu i oslobađanja K⁺. Glutamat i K⁺ iz sinaptičke pukotine bivaju uklonjeni posredstvom EAAT2 i Kir4.1, koji su eksprimirani na astrocitima. Prezeti glutamat astrociti prevode u glutamin koji dopremaju neuronima, dok prezeti K⁺ posredstvom Kir4.1 redistribuiraju u regione niske koncentracije K⁺. (B) Promene u sinaptičkoj funkciji u patološkim uslovima. Smanjena ekspresija i narušena funkcionalna svojstva Kir4.1 dovode do smanjenog uklanjanja K⁺ i povećanja njegove vanćelijske koncentracije. Smanjena funkcija Kir4.1 izaziva depolarizaciju astrocita što inhibira preuzimanje glutamata preko astrocitnog EAAT2 i nagomilavanja glutamata. Povećane koncentracije vanćelijskog K⁺ i glutamata izazivaju hiperekscitaciju neurona. Izmenjeno i preuzeto iz (Ohno et al., 2021).

Nekoliko K⁺ transporterata i kanala u membrani astrocita je uključeno u uklanjanje vanćelijskog K⁺. Najznačajniji je Kir4.1 koji je funkcionalno povezan sa glutamatnim transporterima GLT-1 i GLAST i kanalom za vodu AQP4 (Hibino et al., 2010; Kofuji & Newman, 2004; Kucheryavykh et al., 2007; Michelle L. Olsen & Sontheimer, 2008). Pored Kir4.1, u regulaciji vanćelijskog K⁺ učestvuju i dvoporni K⁺ kanali (K_{2P}) koji su eksprimirani u astrocitima, dok su subjedinice Na/K-ATPaze eksprimirane u astrocitima i neuronima (Bay & Butt, 2012; Kofuji & Newman, 2004; Sibille et al., 2015). Značaj uloge astrocitnih K⁺ kanala u neurotransmisiji ispitan je modelovanjem dinamike kalijumovih jona između neurona, astrocita i vanćelijskog prostora u zavisnosti od sinaptičke aktivnosti. Pokazano je da Kir4.1 igra izuzetnu ulogu ne samo u vanćelijskom uklanjanju K⁺ već i u dinamici promene membranskog potencijala astrocita i neurona posebno tokom stimulacije (Sibille et al., 2015). Pri manjoj frekvenciji aktivnosti neurona 1-10 Hz uklanjanje K⁺ iz vanćelijske sredine

je predominantno posredovano aksonskim i glijskim Na/K-ATPazama, dok pri velikoj frekvenciji neuronske aktivnosti Kir kanali imaju dominantnu ulogu u uklanjanju K⁺ (Bay & Butt, 2012).

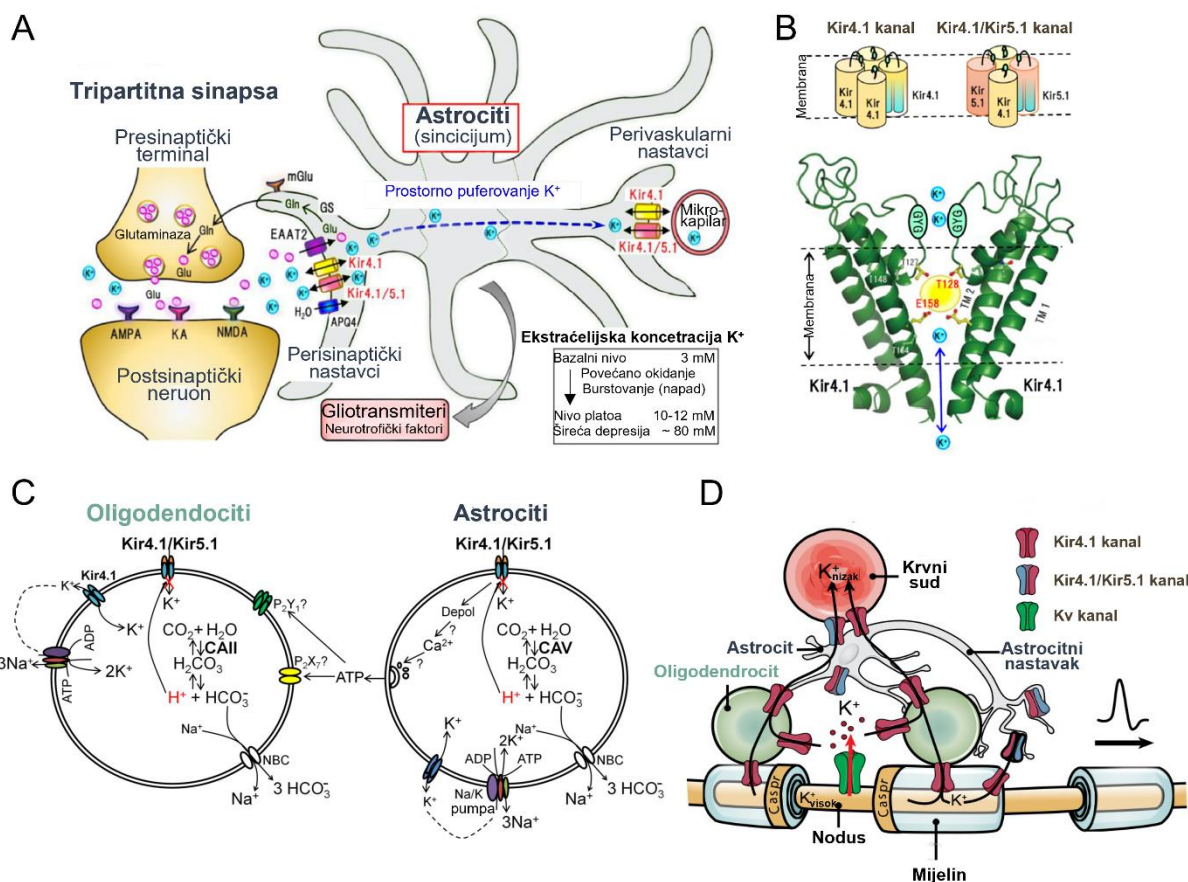
1.4.1 Uloga Kir4.1 kanala u održavanju K⁺ homeostaze

Kir4.1 kanal je eksprimiran u astrocitima i oligodendrocitima u CNS (Brasko et al., 2017; Higashi et al., 2001; Kalsi et al., 2004). Izražena ekspresija Kir4.1 je uočena u kičmenoj moždini, moždanom stablu, cerebelumu, regionima srednjeg mozga i olfaktornom bulbusu (Nwaobi et al., 2016). Pored regionalnih razlika, ekspresija Kir4.1 je regulisana tokom razvika i povećava se u svim moždanim regionima tokom ranog postnatalnog razvoja (Moroni et al., 2015; Nwaobi et al., 2016). U astrocitima se uočava izražena ekspresija Kir4.1 kanala, i to prvenstveno u astrocitnim stopalima koji okružuju sinapse ili krvne sudove (Kofuji & Newman, 2004) dok se kod oligodendrocita uočava predominantno na ćelijskom telu (Brasko et al., 2017). Kir4.1 subjedinice čine dva transmembranska domena i vanćelijska petlja koja formira poru sa K⁺ selektivnim filterom (Heginbotham et al., 1994). Funkcionalni Kir kanali su izgrađeni od četiri subjedinice i mogu biti homotetrameri, kada ih sačinjavaju četiri Kir4.1 subjedinice, ili heterotetrameri, kada ih sačinjavaju Kir4.1 i Kir5.1 subjedinice (Hibino et al., 2010) (Slika 5 i 6). U astrocitima i oligodendrocitima optičkog nerva pokazano je da Kir4.1 formira heteromere sa subjedinicama Kir2.1 (Brasko & Butt, 2018). Kir4.1 odlikuje velika provodljivosti za K⁺ i ima ulogu u održavanju hiperpolarizovanog stanja potencijala mirovanja astrocita i oligodendrocita koji je blizak vrednosti ravnotežnog potencijala za K⁺ (E_k) (Hibino et al., 2010). Hiperpolarizacija membrane usled razlike u van- i unutarćelijskoj koncentraciji dovodi do ulaska K⁺ u ćeliju kroz ove kanale i detektuje se kao ulazna struja, dok depolarizacija dovodi do pojave male izlazne struje (Hagiwara & Takahashi, 1974; Miyazaki et al., 1974; Noble, 1965; Sakmann & Trube, 1984). Kir4.1 igra značajnu ulogu u preuzimanju K⁺ nakon sinaptičke stimulacije neurona i na taj način značajno doprinosi održavanju vanćelijske homeostaze K⁺ (Nwaobi et al., 2016). Aktivnost neurona dovodi do značajnog povećanja [K⁺]_o u nivou sinapse i taj K⁺ mora biti efikasno uklonjen u cilju održavanja normalnog funkcionisanja neurona (Ge & Duan, 2007; Poolos et al., 1987; Shih et al., 2013). Preuzimanje K⁺ oslobođenog u vanćelijsku sredinu vrše astrociti. Prezeti K⁺ se redistribuiraju iz regiona visoke koncentracije K⁺ u regione niske koncentracije K⁺ kroz glijske ćelije povezane pukotinastim vezama procesom koji se naziva prostorno puferovanje (engl. *spatial buffering*) (Orkand et al., 1966) (Slike 5 i 6). Povećana koncentracija K⁺ u vanćelijskoj sredini, povećava vučnu silu i dovodi do ulaska K⁺ u astrocitu koji potom biva redistribuiran u druge regione astrocitnog sincicijuma preko pukotinastih veza (Walz, 2000). Narušeno preuzimanje oslobođenog K⁺ vodi depolarizaciji neurona i povećanom generisanju akcionih potencijala označenim kao hiperekscitabilnost (Neusch et al., 2007).

Narušena funkcionalnost i promene ekspresije Kir4.1 uočene su u različitim poremećajima i bolestima nervnog sistema. Biofizički značaj Kir4.1 istaknut je kroz studije na animalnim modelima u kojima je redukovana ili sasvim ukinuta ekspresija ovog proteina. Kir4.1-deficijentne mišje modele odlikuje pojava epileptičnih napada, paraliza zadnjih ekstremiteta i prerana smrt, dok se na ćelijskom i histološkom nivou uočava narušeno preuzimanje K⁺ i glutamata, depolarizacija astrocita i oligodendrocita, degeneracija aksona, vakuolizacija i hipomijelinizacija bele mase kičmene moždine (Djukic et al., 2007; Neusch et al., 2001). Studija inhibicije ekspresije Kir4.1 korišćenjem siRNK u astrocitima *in vitro* dovela je do depolarizacije membranskog potencijala astrocita, kao i do redukcije preuzimanja K⁺ i glutamata (Kucheryavykh et al., 2007). Selektivna delecija Kir4.1 u astrocitima je pokazala smanjenje veličine i gubitak F α tipa motornih neurona u adultnom dobu miševa u lumbalnom regionu kičmene moždine iako morfologija ostalih tipova motornih neurona nije bila narušena, ukazujući na značaj astrocitnog Kir4.1 u ventralnim rogovima za subtipove motornih neurona (Kelley et al., 2018).

Promene u ekspresiji i funkcionalnim osobinama Kir4.1 i narušena homeostaza K⁺ uočene su u različitim neurodegenerativnim bolestima. Smanjena ekspresija Kir4.1 uočena je u ventralnim rogovima SOD1^{G93A} mišjeg modela pre početka simptoma, dok je u završnoj fazi bolesti došlo do potpunog gubitka Kir4.1 imunoreaktivnosti (Kaiser et al., 2006). Slično, smanjena ekspresija Kir4.1

uočena je u astrocitima u terminalnoj fazi bolesti u motornom korteksu, facijalnom i trigeminalnom nukleusu SOD1^{G93A} pacovskog modela ALS (Bataveljić et al., 2012). Paralelno sa redukovanom ekspresijom Kir4.1 u ovoj studiji je pokazana i povećana ekspresija AQP4 koji je uključen u



Slika 6. Struktura i funkcionalne odlike Kir4.1 kanala u astrocitima i oligodendrocitima. A) Astroцити učestvuju u prostornom puferovanju K⁺ preko Kir4.1 i Kir4.1/Kir5.1 kanala i održavaju vanćelijskog K⁺ u koncentraciji 3-5 mM. Koncentracija vanćelijskog K⁺ dostiže maksimalni nivo od 10-12 mM tokom epileptičnih napada. Kir subjediniце Kir4.1 i Kir5.1 su specifično ekspimirane u astroцитima i kolokalizuju sa EAAT2 transporterima i AQP4 u perisinaptičkim nastavcima. Kada je narušena funkcija Kir4.1, vanćelijski nivo K⁺ se može značajno povećati i indukovati povećano generisanje akcionih potencijala u neuronima. B) Kir4.1 subjediniće se udružuju u funkcionalne tetramere formiranjem homotetramera i heterotetramera Kir4.1/Kir5.1. Kir4.1 subjediniće poseduju dva transmembranska (TM) regiona, TM1 i TM2 između kojih se nalazi jon-selektivni filter koji ima -G-Y-G- karakterističan motiv. Izmenjeno i preuzeto iz (Ohno et al., 2021). C) Ekspresija Kir4.1 u oligodendrocitima ukazuje na njihov značaj u preuzimanju viška oslobođenog K⁺ tokom generisanja akcionih potencijala. Oligodendrociti obavijaju aksone i izloženi su velikim jonskim i pH promenama tokom električne aktivnosti. Smatra se da su homomerni Kir4.1 i heteromerni Kir4.1/Kir5.1 značajni za održavanje negativnog potencijala membrane koji je neophodan za integritet oligodendrocita i mijelina. Izmenjeno i preuzeto iz (Brasko et al., 2017). D) Šematski prikaz predložene mehanizma puferovanja K⁺ iz aksona tokom saltatorne kondukcije, ka krvnim sudovima preko mreže aksonskih voltažno zavisnih K⁺ kanala (K_v) i glijskog Kir4.1 u astroцитima i oligodendrocitima. Preuzeto i izmenjeno iz (Schirmer et al., 2018).

održavanje vodenog balansa i koji je povezan sa prostornim puferovanjem K⁺ (Nagelhus et al., 1999). U ALS, kontinuirano povećanje koncentracije vanćelijskog K⁺ dovodi do depolarizacije neurona, povećanja Ca²⁺ influksa i smrti motornih neurona kao posledice jonske ekscitotoksičnosti (Neusch et al., 2007). Astroцити u kulturi izolovani iz korteksa SOD1^{G93A} pacova takođe su imali smanjenu ekspresiju Kir4.1, ali i izmenjena membranska svojstva, depolarizovan membranski potencijal i smanjene ulazne K⁺ struje što ukazuje na narušena funkcionalna svojstva Kir4.1 kanala u ALS (Bataveljić et al., 2012). Redukovana ekspresija Kir4.1 pokazana je i u astroцитima diferenciranim od indukovanih poluripotentnih matičnih ćelija ALS pacijenata sa SOD1^{D90A} mutacijom (Kelley et al., 2018). Selektivna delecija Kir4.1 specifično u astroцитima u SOD1^{G93A} modelu nije dovela do povećanog gubitka Fa tipa motornih neurona ukazujući na to da redukcija Kir4.1 u astroцитima nije

ključna za degeneraciju motornih neurona u ALS (Kelley et al., 2018) i na doprinos drugih ćelijskih tipova. Redukcija Kir4.1, BK kanala i AQP4 u astrocitima pokazana je u neurovaskularnoj jedinici u mišjem modelu AB i u mozgu pacijenata (Wilcock et al., 2009). Smanjena ekspresija i narušena funkcionalnost Kir4.1 pokazane su i u mišjem modelu HB (X. Tong et al., 2014). Naime, u ovoj studiji je pokazana redukcija Kir4.1 struja u astrocitima striatuma, povećanje $[K^+]_o$ i hiperekscitabilnost neurona. Međutim, povećanje Kir4.1 upotrebom adenovirusnog vektora (AAV-Kir4.1) je dovelo do povratka vanćelijske koncentracije K^+ na fiziološke vrednosti, smanjena je hiperekscitabilnost neurona i produženo preživljavanje transgenih HB miševa (X. Tong et al., 2014).

Smanjena ekspresija Kir4.1 je uočena u oligodendrocitima i astrocitima u subkortikalnim lezijama u belojoj masi pacijenata sa MS (Schirmer et al., 2014). Antitela na Kir4.1 detektovana su u serumu pacijenata obolelih od MS (Srivastava et al., 2012). Kir4.1 ima bitnu ulogu u epileptogenezi kod ljudi i u animalnim modelima epilepsije. Kir4.1 inhibicija mutacijom gena *Kcnj10* ili redukovana ekspresija povećavaju vanćelijsku koncentraciju K^+ i glutamata u sinapsama i dovode do hiperekscitabilnosti neurona (Kinboshi et al., 2020). Autizam praćen epilepsijom sa mutiranim Kir4.1 (mutacija p.R18Q) odlikuje se povećanom ekspresijom membranskog Kir4.1 i povećanom gustinom Kir struja (Sicca et al., 2016).

Sumarno, literaturni podaci jasno ukazuju na ključnu ulogu Kir4.1 u održavanju jonske homeostaze i normalnog funkcionisanja motornih neurona. U pogledu neurodegenerativnih patologija praćenih neuroinflamacijom, u animalnim modelima a posebno kod ALS pacijenata, smanjenje ekspresije Kir4.1 u glijskim ćelijama dodatno ukazuje na značaj ovog proteina u etiologiji neurodegeneracije.

2. Ciljevi istraživanja

Dosadašnja saznanja o fiziološkoj ulozi Kir4.1 kanala kod glijskih ćelija, kao i o promenama u ekspresiji i funkciji posebno kod astrocita u neurodegenerativnim patologijama praćenim neuroinflamacijom ukazuju na njihovu ključnu ulogu kako u homeostazi CNS, tako i u neuropatologiji. Uloga mikroglije u neuroinflamaciji je dobro definisana, a pokazano je da u pojedinim neuroinflamacijskim patologijama ona pokazuje tendenciju formiranja specifičnih ćelijskih klastera, čija uloga u patologiji kao i uzroci nastanka još uvek nisu u dovoljnoj meri poznati. Imajući to u vidu, formulisani su pojedinačni ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Ispitati ekspresiju Kir4.1 u oligodendrocitima u simptomatskoj fazi bolesti u kičmenoj moždini pacovskog hSOD1^{G93A} modela ALS
2. Ispitati morfološke promene oligodendrocita u kičmenoj moždini hSOD1^{G93A} pacova
3. Istražiti ekspresiju i funkcionalna svojstva Kir4.1 kanala u oligodendrocitima u kulturi
4. Ispitati morfološke promene mikroglije u ALS i njenu sklonost ka formiranju klastera ćelija u kičmenoj moždini hSOD1^{G93A} pacova
5. Ispitati prisutnost proteinskih markera ALS u klasterima mikroglije
6. Ispitati fagocitne markere u pojedinačnoj i mikrogliji grupisanoj u klasteru ćelija u kičmenoj moždini hSOD1^{G93A} pacova
7. Istražiti biofizičke karakteristike mikroglije u kulturi izolovane iz kičmene moždine hSOD1^{G93A} pacova

Iz pojedinačnih proizišli su opšti ciljevi ove doktorske disertacije koji se sastoje u sledećem: karakterizacija promena u oligodendrocitima i mikrogliji u ALS bi trebalo da doprinese boljem razumevanju uloge glijskih ćelija u degeneraciji motornih neurona. Dobijeni rezultati o ulozi Kir4.1 kanala eksprimiranog u oligodendrocitima u ALS bi doprineli razjašnjenju narušene regulacije vanćelijskog K⁺ u ALS. Novi podaci o formiranju klastera mikroglije, definisanje njihovih komponenata, kao i bolje razumevanje membranskih svojstava mikroglije u ALS bi ukazali na nove mehanizme značajne za početak i progresiju bolesti.

3. Materijal i metode

3.1. Tabela prikaz hemikalija, rastvora, pufera i medijuma

Tabela 1. Nazivi i proizvođači hemikalija

Naziv hemikalije	Proizvođač
NaCl - natrijum hlorid KCl - kalijum hlorid CaCl ₂ - kalcijum hlorid BaCl ₂ - barijum hlorid NaH ₂ PO ₄ - natrijum dihidrogen fosfat KH ₂ PO ₄ - kalijum dihidrogen fosfat NaHCO ₃ - natrijum hidrogen karbonat MgSO ₄ ·7H ₂ O - magnezijum sulfat heptahidrat MgCl ₂ - magnezijum hlorid MgCl ₂ ·6H ₂ O - magnezijum hlorid heksahidrat Borna kiselina Glukoza	Sigma-Aldrich, MO, SAD
EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina EGTA - etilen glikol-bis(β-aminoetil etar)-N,N,N',N'-tetra sirćetna kiselina HEPES 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina PFA - paraformaldehid Mowiol Glicerol SDS - natrijum dodecil sulfat Bromfenol plavo Tween 20 Triton X-100 Akrilamid TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin APS - amonijum persulfat Etidijum bromid Na-orto-vanadat	Sigma-Aldrich, MO, SAD
Na ₂ HPO ₄ - dinatrijum hidrogen fosfat Glicin Saharoza	Carl Roth GmbH, Nemačka
Tris baza, Tris (hidroksimetil)-metilamin	Fisher Scientific, VB
tri-Natrijum citrat dihidrat	Carlo Erba, Italija
Metanol	Zorka Pharm, SRB
DMEM - Dulbekov modifikovani Eagle medijum BSA - goveđi serum albumin Tripsin Na-piruvat L-glutamin PLO – poli-L-oritin (P4638)	Sigma-Aldrich, MO, SAD
Pen+Strep - Penicilin/Streptomicin FBS - fetalni goveđi serum	Gibco, ThermoFisher Scientific, MA, SAD
Normalni magareći serum	Sigma-Aldrich, MO, SAD
Normalni kozji serum	Life Technologies, MD, SAD

Tabela 2. Sastav rastvora, pufera i medijuma

Metoda	Rastvor	Sastav i koncentracije
PCR	TDB, pufer za digestiju pH 8,4	50 mM Tris pH 8.0 50 mM EDTA pH 8.0 0,5% SDS
	5x TBE, Tris-boratni-EDTA pufer	0,45 M Tris 0,45 M Borna kiselina 50 mM EDTA pH 8.0
Imunofluorescencija	0,2 M PB, fosfatni pufer pH 7,4	0,16 M Na ₂ HPO ₄ 0,04 M NaH ₂ PO ₄ ddH ₂ O
	4% PFA, paraformaldehid pH 7,4 (1M NaOH)	40 g PFA 500 ml ddH ₂ O 500 ml 0.1M PB
	0,01 M PBS, fiziološki rastvor	0.2 M PB 20x 147 mM NaCl ddH ₂ O
	Citratni pufer, pH 6,0	10 mM tri-Natrijum citrat dihidrat 0,05% Tween 20
	Tris pufer, pH 9,0	50 mM Tris baza 0,05% Tween 20
	Mowiol medijum	9,6% Mowiol 24% Glicerol 48% 0,2 M Tris pufer pH 8,5 24% ddH ₂ O
Ćelijska kultura	PBS, fosfatni pufer za ćelije pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
	HBSS bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺ , Henkov balansirani rastvor soli bez Ca ²⁺ i Mg ²⁺ pH 7,4	137 mM NaCl 5 mM KCl 440 μM KH ₂ PO ₄ 340 μM Na ₂ HPO ₄ 5,5 mM Glukoza 4 mM NaHCO ₃
	HBSS, Henkov balansirani rastvor soli pH 7,4	137 mM NaCl 5 mM KCl 1,3 mM CaCl ₂ 405 μM MgSO ₄ x7H ₂ O 491 μM MgCl ₂ x6H ₂ O 440 μM KH ₂ PO ₄ 5,5 mM Glukoza 4 mM NaHCO ₃
	DMEM+, medijum za gajenje ćelija	10% FBS 1% Pen+Strep, 1% Na-piruvat DMEM

Western blot	6x Leammli, pufer za nalivanje uzoraka	12% SDS 0,06% Bromfenol plavo 60% Glicerol 375 mM 1M Tris-HCl pH 6,8
	5x Pufer za elektroforezu (Running buffer)	124 mM Tris baza 0,96 M Glicin 17 mM SDS
	10x Transfer pufer	204 mM Tris baza 1,5 M Glicin
	1x Transfer pufer	Transfer pufer 10x 20% Metanol dd H ₂ O
	TBST, Tris pufer soli sa 0,1% Tween-20	20 mM Tris baza 150 mM NaCl 0,1% Tween-20

3.2 Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su rađeni na pacovima Sprague-Dawley soja, muškog pola, koji nose transgen za humanu mutiranu SOD1^{G93A} (002148-T, NTac: SD-Tg [SOD1G93A] L26H; Taconic, Hudson, NY, USA). Kao kontrole korišćeni su mužjaci iz istog okota kao ALS životinje, koji nisu nosioci transgena kao i mužjaci Sprague-Dawley divljeg soja (engl. *Wild type*; WT). Održavanje kolonije i genotipizacija životinja su urađene prema prethodno opisanom protokolu (Howland et al., 2002). Mužjaci, nosioci hSOD1^{G93A} transgena ukrštani su sa WT ženka i potomstvo je proveravano na prisustvo transgena lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*; PCR). Nosioci transgena praćeni su od 6. meseca starosti, merenjem telesne mase i proveravanjem pokretljivosti. Životinje su pokazivale prve simptome bolesti sa 7-8 meseci starosti. Prvi simptomi su uočavani kao sporadično otežano oslanjanje na jedan od zadnjih ekstremiteta i postepeni gubitak telesne mase. Tokom 10-14 dana od pojave prvih simptoma, dolazilo je do postepene paralize i potpune atrofije jednog, a potom i drugog zadnjeg ekstremiteta što je označeno kao završna faza bolesti. Simptomatski SOD1^{G93A} pacovi u završnoj fazi bolesti (SOD1^{G93A}) žrtvovani su kada su pokazali atrofiju oba zadnja ekstremiteta zajedno sa progresivnim gubitkom telesne mase. Presimptomatski SOD1^{G93A} pacovi, (pre-SOD1^{G93A}), koji ne pokazuju simptome bolesti bili su žrtvovani u trenutku kad su pokazali gubitak od 5% telesne težine u odnosu na prethodno dostignuti plato telesne težine. Kontrolni pacovi odgovarajućeg uzrasta žrtvovani su istovremeno sa pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} pacovima. Pacovi korišćeni za pripremu neonatalnih primarnih ćelijskih kultura bili su starosti 1-2 dana. Životinje su gajene u uslovima 12h-svetlost/12h-mrak i imale su *ad libitum* pristup hrani i vodi. Briga o životinjama i eksperimentalne procedure sprovedeni su u skladu sa Evropskom direktivom (200/63/EU) i bili su odobreni od strane Etičkog komiteta Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (#323-07-05120/2017-05).

3.3 PCR reakcija za određivanje genotipa pacova

Određivanje prisustva transgena hSOD1^{G93A} kod pacova urađeno je PCR reakcijom korišćenjem DNK izolovane iz repa ili uveta pacova. Pacovu je odsečen vršni deo repa dužine 5 mm ili vršni deo uveta i tkivo je potopljeno u 200 µl proteinaze K (Thermo Fisher Scientific, Nemačka; Kat. br. EO0492) rastvorene u TDB (Tabela 2) u finalnoj koncentraciji 1 mg/ml. Tkivo je inkubirano u termo bloku na 65°C 5-7 sati. Uzorci su centrifugirani na 14000 x g, 5 min. Skupljena DNK je razblažena 20x u sterilnoj ddH₂O i denaturisana na 95°C 15 min. Finalna zapremina reakcione smeše

za PCR je iznosila 25 μ l, dok su početne koncentracije i zapremine pojedinačnih komponenti po reakciji bile:

PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific, Nemačka; Kat br. KO172)	12,5 μ l
ddH ₂ O	9,5 μ l
uzvodni prajmer SODi3-f (5'-GTG-GCA-TCA-GCC-CTA-ATC-CA-3') (10 μ M)	1 μ l
nizvodni prajmer SODG4-r (5'-CAC-CAG-TGT-GCG-GCC-AAT-GA-3') (10 μ M)	1 μ l
DNK, razblažena i denaturisana	1 μ l

Pri svakoj genotipizaciji, pored uzoraka kod kojih je ispitivano prisustvo transgena, pripremani su i kontrolni uzorci:

1. pozitivna kontrola za hSOD1^{G93A} – ALS pacov koji je pokazao simptome i koji ima hSOD1^{G93A} transgen
2. pozitivna kontrola za odsustvo hSOD1^{G93A} transgena – pacov divljeg soja koji nema hSOD1^{G93A} transgen
3. negativna kontrola reakcije – sterilna H₂O umesto uzorka DNK

PCR reakcija je puštana na mašini ProFlex™ 3x32-Well PCR System (Thermo Fisher Scientific) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija u trajanju od 5 min na 95°C, praćena sa 35 ciklusa u kojima su se smenjivale faze denaturacije od 1 min na 95°C, hibridizacije prajmera od 1 min na 60°C i ekstenzije prajmera od 2 min na 72°C. Potom je sledila finalna elongacija od 5 min na 72°C, nakon čega su uzorci čuvani u mašini na +4°C do dalje analize.

Proizvodi PCR reakcije proveravani su elektroforezom u 1,3% agaroznom gelu (Lonza, ME, SAD; Kat. br. 50000) pripremljenom korišćenjem pufera 0,5x TBE (Tabela 2) sa 0,005% etidijum bromidom na 100 V, 20 min, a signal je vizuelizovan na Chemi DocIt gel/blot Imager (UVP systems, Nemačka).

3.4 Priprema kulture oligodendrocita

Primarne kulture oligodendrocita pripremane su prema prethodno opisanim protokolima (Marignier et al., 2010; Schulz et al., 2011). Čelijske kulture kontrolnih i SOD1^{G93A} životinja su pripremane iz kičmene moždine Sprague-Dawley pacova iz istog okota na sledeći način: za pripremu SOD1^{G93A} kultura korišćene su životinje koje eksprimiraju SOD1^{G93A} (N=3), dok su za pripremu kontrolnih kultura korišćeni pacovi koji nisu nosioci transgena (N=3). Ukratko, kičmene moždine su izolovane iz pacova starih 1 dan i mehanički disocirane u Leibovitz L-15 (Gibco, ThermoFisher Scientific, MA, SAD) medijumu u koji je dodat 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicilin, 0,1 mg/ml streptomycin i 0.1% BSA. Posle dva centrifugiranja od 2000 rpm po 5 minuta, ćelije su resuspendovane u DMEM u koji je dodat 10% FBS, zasejane su u Petri šolje i održavane na 37°C u atmosferi sa 92-95% vlažnosti i 5% CO₂. Posle 10-12 dana površinska mikroglija je mehanički uklonjena iz mešovite kulture trešenjem na šejkeru na 250 rpm 90 minuta, a potom je dodatno trešena na 250 rpm preko noći. Medijum sa odvojenim ćelijama je sakupljen i zasejan u Petri šolje kako bi se preostala mikroglija zalepila za podlogu. Posle 45 minuta, medijum sa preostalim ćelijama je zasejan na pokrovna stakla prevučena poli-L-lizinom (Sigma-Aldrich, MO, SAD; Kat. br. P1524) koncentracije 50 μ g/ml u sterilnom PBS (Tabela 2). Ove ćelije su gajene u kulturi 2-3 dana kada su pokazivale morfologiju sa malim ćelijskim telima i brojnim granatim nastavcima tipičnim za oligodendrocite u kulturi, a potom su korišćene za elektrofiziološka snimanja i imunocitohemiju.

3.5 Priprema kulture neonatalne mikroglije

Primarna kultura neonatalne mikroglije pripremana je iz kičmene moždine kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova starih 2 dana. Kičmene moždine su izolovane u hladnom, sterilnom PBS, uklonjene su ovojnice i tkivo je inkubirano u rastvoru koji sadrži 1 mg/ml tripsina u PBS, na 37°C, 15 min. Da bi se zaustavilo delovanje tripsina, dodat je DMEM+ (Tabela 2) i tkivo je centrifugirano na 500 x g 8 min. Talog je resuspendovan u 1 ml DMEM+ i ćelije su dodatno razdvojene propuštanjem suspenzije kroz igle dijametra 0,8 mm i 0,6 mm, po 4 puta, i zatim centrifugirane na 500 x g 8 min. Talog je resuspendovan u DMEM+ i ćelije su zasejane ili u Petri šolje ili direktno na pokrovna stakla prethodno obložena PLO koncentracije 50 µg/ml u sterilnom PBS. Medijum za gajenje je menjan svaka 3 dana tako što je 50% volumena postojećeg medijuma zamenjeno sveže pripremljenim DMEM+. Ćelije gajene na pokrovnim staklima su nakon 20-22 dana gajenja u kulturi inkubirane u rastvoru koji sadrži 0,08% tripsin, 0,2 mM EDTA u DMEM na 37°C tokom 30-45 min dok se površinski sloj ćelija potpuno ne odlepi u jednom sloju, a ispod preostane mikroglija koja je korišćena dalje za elektrofiziološka merenja. Nakon 10-14 dana mešovita kultura ćelija gajenih u Petri šolji je trešena na orbitalnom šejkeru na 250 rpm 90-120 min kako bi se mehanički uklonio površinski sloj mikroglije. Medijum sa odvojenim ćelijama je prikupljen i centrifugiran na 500 x g 8 min, a ćelije u talogu su resuspendovane u DMEM+ i propuštene kroz iglu dijametra 0,6 mm 4 puta u cilju dobijanja pojedinačnih ćelija koje su potom prebrojane i zasejane na pokrovna stakla prethodno prevučena PLO za dalja elektrofiziološka ispitivanja.

3.6 Priprema kulture mikroglije i izolacija mijelina iz adultnih pacova

Izolacija mikroglije iz kičmene moždine adultnih pacova je urađena prema prethodno opisanom protokolu (Bordt et al., 2020). Ukratko, kičmene moždine simptomatskih SOD1^{G93A} (N=5) i kontrolnih (N=5) pacova odgovarajuće starosti su izolovane u hladnom, sterilnom HBSS bez Ca²⁺ i Mg²⁺ (Tabela 2) i potom inkubirane u 5 ml Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc., Kat. Br. AM105) rastvora proteolitičkih i kolagenolitičkih enzima 45 min na 37°C u cilju digestije izolovanog tkiva, uz dodatnu mehaničku disocijaciju svakih 15 minuta. Suspenzija je propuštena kroz filter prečnika pore 70 µm za izolovanje ćelija manjeg dijametra i zatim centrifugirana na 300 x g, 10 min na +4°C. Talog je resuspendovan u 5 ml 30% Percoll (Sigma Aldrich, MO, SAD; Kat. br. P1644), a potom je ispod sloja 30% Percoll sa resuspendovanim ćelijama, naliveno 4 ml 70% Percoll. Uzorci su centrifugirani na 340 x g, 20 min na 22°C. Nakon centrifugiranja, uočeni su površinski sloj mijelina i sloj ćelija koji se nalazi između 30% i 70% Percoll. Oba sloja su sakupljena u posebne tube i resuspendovana u post-Percoll rastvoru koji sadrži 5% FBS, 10 µM HEPES u HBSS (Tabela 2). Uzorci su centrifugirani na 300 x g, 10 min na +4°C.

Ćelije u talogu su resuspendovane u 1ml DMEM+, određen je broj ćelija i zasejane su na pokrovna stakla obložena PLO i gajena u ploči sa 24 bunara na 37°C u atmosferi sa 92-95% vlažnosti i 5% CO₂. Elektrofiziološka merenja na mikrogliji u kulturi su rađena od 2. do 7. dana nakon zasejavanja. Aktivacija mikroglije je izazvana dodavanjem lipopolisaharida (LPS, Sigma Aldrich, MO, SAD; Kat. br. L4391). Mikroglija je inkubirana u 100 ng/ml LPS u DMEM+ 24h na 37°C u atmosferi sa 92-95% vlažnosti i 5% CO₂. Nakon toga određene su elektrofiziološke karakteristike mikroglije.

3.6.1 Priprema mijelinske frakcije za Western blot

Površinski mijelinski sloj formiran nakon razdvajanja u Percoll-u je resuspendovan u puferu za pripremu uzoraka za Western blot koji sadrži (u mM): 200 NaCl, 10 HEPES, 30 EDTA i 0,5% Triton X-100 sa dodatkom proteaznih inhibitora (Sigma Aldrich, MO, SAD; Kat. br. S8820) i Na-orto-vanadata. Uzorci su homogenizovani ručnim homogenizerom, centrifugirani na 15 000 rpm, 20 min na +4°C i prikupljen je supernatant i zamrznut na -80°C za dalju upotrebu.

3.7 Western blot

Koncentracija proteina u mijelinu izolovanom iz kičmene moždine određena je BCA Pirsovim proteinskim kitom (Thermo Fisher Scientific; Kat. br. 23225) prema uputstvima proizvođača. Uzorci su razblaženi u 6x Leammli puferu (Tabela 2) sa 5% β -merkaptu etanolom kao redukujućim agensom. Proteinski standard (Thermo Scientific, MA, SAD; Kat. br.26619) i jednaka količina proteina (30 μ g) iz svakog uzorka su nalivani u bunare 4% SDS-poliakrilamidnog gela za koncentrovanje (Tabela 3). Proteini su elektroforetski razdvajani na 8% SDS-poliakrilamidnom gelu (Tabela 3) u 1x puferu za elektroforezu (Tabela 2) na 120 V, 1,5 h. Nakon elektroforeze, proteini su vlažnim transferom, u 1x transfer puferu (Tabela 2) prenošeni na noseće membrane od polivinilfluorida sa porama prečnika 0,45 μ m (Immobilon-P, Millipore, Kat. br. IPVH00010). Transfer se odvijao na 100 V na +4°C u trajanju od 1,5 h. Membrane su blokirane u 5% nemasnom mleku (Santa Cruz, TX, SAD; Kat. br. sc2325) u prahu ili 5% BSA u TBST 1,5 h na sobnoj temperaturi. Primarna antitela, zečje anti-Kir4.1 (1:2000, Alomone Labs, Izrael), mišje anti-GAPDH (1:2000, Millipore, CA, SAD; Kat. br. MAB374) i mišje anti-CNPaza (1:10000, Calbiochem, Milipore, SAD) inkubirana su preko noći na +4°C. Nakon ispiranja u TBST, membrane su inkubirane u rastvoru sekundarnih antitela konjugovanih sa peroksidazom rena (HRP) 1,5 h na sobnoj temperaturi. Korišćena su sledeća sekundarna antitela: kozje anti-mišje (1:2000, Abcam, UK; Kat. br. ab205719) i kozje anti-zečje (1:2000, Abcam, UK; Kat. br. ab6721). Membrane su vizuelizovane upotrebom Clarity Western-ECL supstrata (Bio-Rad, kat. br. 170-5061) prema proizvođačkom uputstvu, na Chemi DocIt gel/blot Imager (UVP systems, Nemačka). Eksperimenti su urađeni u duplikatu, a analiza blotova je urađena korišćenjem Gel Analyzer opcije u ImageJ software (NIH, SAD).

Tabela 3. Sastav korišćenih SDS-poliakrilamidnih gelova

	4% gel za koncentrovanje	8% gel za razdvajanje
dH2O	1,487 ml	2,32 ml
30 % Akrilamid	0,337 ml	1,33 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,625 ml	1,25 ml
10 % SDS	25 ul	50 ul
10 % APS	25 ul	50 ul
TEMED	2,5 ul	5 ul

3.8 Imunofluorescencija

3.8.1 Priprema tkiva transkardijalnom perfuzijom

Presimptomatske životinje, pre-SOD1^{G93A} (N=4), simptomatske životinje u završnoj fazi bolesti, SOD1^{G93A} (N=5) i kontrolne životinje (N=9) odgovarajuće starosti anestetizirane su intraperitonealnom injekcijom koja sadrži ketamin (90 mg/kg) i ksilazin (8 mg/kg). Kada su životinje ušle u duboku anesteziju i pokazale odsustvo okularnog refleksa, otvoren je grudni koš životinje i igla kojom teče 0,9 % fiziološki rastvor je uvedena u levu komoru srca, a presečena je desna pretkomora srca. Kontinuirani protok rastvora je obezbeđen korišćenjem peristaltičke pumpe. Promena tamnocrvene boje jetre u bledebraon je uočena nakon protoka 150 ml fiziološkog rastvora i potom je nastavljena perfuzija rastvorom 4% PFA (Tabela 2) zapremine 200-300 ml. Izolovana je kičmena moždina i dodatno fiksirana u 4% PFA preko noći na +4°C. Tkivo je dehidratirano kroz rastuće koncentracije saharoze 10%, 20%, 30% u 0,1 M PB (Tabela 2) na +4°C i zamrznuto na -80°C do dalje upotrebe.

3.8.2 Imunofluorescentno obeležavanje preseka kičmene moždine

Koronalni preseki kičmene moždine debljine 30 μm napravljeni su na kriotomu (CM 1850, Leica, Nemačka) i skupljeni na mikroskopske pločice (Superfrost Plus, Menzel-Glasser, Nemačka) koje su čuvane na $+4^{\circ}\text{C}$. Tkivo je rehidratirano u 0,01M PBS (Tabela 2) i rađen je protokol oslobađanja epitopa upotrebom citratnog pufera pH 6,0 ili tris pufera pH 9,0.

3.8.2.1 Protokol imunofluorescencije za bojenje oligodendrocita u tkivu

Tris pufer koncentracije 50 mM i pH 9,0 (Tabela 2) zagrejan je do 75°C , kada su preseki na mikroskopskim pločicama stavljeni u zagrejani pufer i inkubirani 3 min na 75°C . Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, uzorci su isprani u 0,01 M PBS nekoliko puta i inkubirani sa 0,1% glicinom u 0,01 M PBS 10 minuta, a potom je nanošen rastvor za blokiranje koji se sastoji od 10 % normalnog kozjeg seruma, 2% BSA i 0,1% Triton X-100 u 0,01 M PBS. Posle 45 minuta u rastvoru za blokiranje, preseki su inkubirani u rastvoru primarnih antitela u 2% normalnom kozjem serumu i 1% BSA u 0,01 M PBS na $+4^{\circ}\text{C}$, preko noći.

Posle nekoliko ispiranja sa 0,01M PBS, nanošena su odgovarajuća sekundarna antitela rastvorena u 1% normalnom kozjem serumu u 0,01 M PBS i uzorci su inkubirani 2,5 h u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja nevezanog antitela ispiranjem u 0,01M PBS, preseki su inkubirani sa TO-PRO-3 nukleusnom bojom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom isprani u 0,01 M PBS i fiksirani Mowiol medijumom (Tabela 2). Razblaženja primarnih i sekundarnih antitela data su u Tabeli 4.

3.8.2.2 Protokol imunofluorescentnog obeležavanja mikroglije

Citratni pufer koncentracije 10 mM i pH 6,0 (Tabela 2) zagrevan je do 75°C , kada su stavljeni preseki na mikroskopskim pločicama i inkubirani 8 min na 75°C , zatim ostavljeni da se ohlade na sobnoj temperaturi. Uzorci su ispirani u 0,01 M PBS nekoliko puta i inkubirani u 0,1% glicinu u 0,01 M PBS 10 minuta. Preseki su potom inkubirani 45 min na sobnoj temperaturi u rastvoru za blokiranje koji sadrži 10% normalni magareći serum, 5% BSA i 0,1% Triton X-100 u 0,01 M PBS. Preseki su inkubirana preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$ u rastvoru primarnih antitela u 5% normalnom magarećem serumu, 2% BSA u 0,01 M PBS. Nakon nekoliko ispiranja u 0,01 M PBS, nanošen je rastvor sekundarnih antitela konjugovanih sa fluoroforom u 2% normalnom magarećem serumu, 1% BSA u 0,01 M PBS i preseki su inkubirani 2 h u mraku na sobnoj temperaturi. Višak nevezanog antitela je uklonjen ispiranjem u PBS, a preseki su inkubirani sa Hoechst nukleusnom bojom 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja u 0,01 M PBS, preseki su fiksirani Mowiol medijumom. Razblaženja korišćenih primarnih i sekundarnih antitela prikazana su u Tabeli 4.

Tabela 4. Lista primarnih i sekundarnih fluorescentno obeleženih antitela i boja

Antitelo	Razblaženje	Proizvođač	Kataloški broj
CNPaza, mišje anti-2'3'ciklični-nukleotid 3' fosfodiesteraza	1:3000	Calbiochem, Milipore, SAD	NE1020
Kir4.1, zečje anti-Kir4.1	1:400	Alomone Labs, Israel	APC-0165
β -III tubulin, zečje anti- β -III tubulin	1:800	Cell Signaling, SAD	D71G9
Iba1, kozje anti-jonizovani adaptorski Ca^{2+} vezujući molekul 1	1:200	Abcam, UK	ab5076
CD34, kozje anti-klastar diferencijacije 34	1:200	R&D Systems, MN, SAD	AF4117

CD68, mišje anti-pacovski klaster diferencijacije 68	1:50	AbD Serotec, UK	MCA341R
mSOD1, mišje anti-mutirana superoksid dismutaza 1, klon B8H10	1:400	MediMabs, Kanada	MM-0070-P
kozje anti-mišje Alexa Fluor IgG (H+L) 488	1:200	Life Technologies, OR, SAD	A11001
kozje anti-zečje Alexa Fluor IgG (H+L) 555	1:200	Life Technologies, OR, SAD	A21422
magareće anti-mišje Alexa Fluor IgG (H+L) 555	1:200	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, OR, SAD	A31570
magareće anti-zečje Alexa Fluor IgG (H+L) 488	1:200	Invitrogen, IL, SAD	A32790
magareće anti-kozje Alexa Fluor IgG (H+L) 643	1:200	Invitrogen, IL, SAD	A32849
magareće anti-zečje Alexa Fluor IgG (H+L) 555	1:200	Life Technologies, OR, SAD	A31572
TO-PRO-3	1:4000	Invitrogen, Molecular Probes, OR, SAD	1027459
Hoechst	1:4000	Thermo Scientific, IL, SAD	62249

3.8.2.3 Imunofluorescentno obeležavanje oligodendrocita u kulturi

Ćelije zasejane na pokrovna stakla isprane su u PBS a potom fiksirane u 4% PFA 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja PBS nekoliko puta, ćelije su inkubirane u blokirajućem rastvoru koji sadrži 10% normalnog kozjeg seruma, 1% BSA i 0,1% Tritona X-100 u PBS. Primarna antitela su rastvorena u 1% normalnom kozjem serumu i 1% BSA u PBS i ćelije su inkubirane preko noći, na +4°C. Nakon ispiranja nevezanih antitela u PBS, ćelije su inkubirane sa fluorescentno obeleženim sekundarnim antitelima u PBS, 2 h u mraku na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja uzorak je fiksiran Mowiol medijumom. Koršćena razblaženja antitela prikazana su u Tabeli 4.

3.9 Konfokalna mikroskopija i analiza mikrografija

Mikrografije su snimane na konfokalnom laserskom-skenirajućem mikroskopu (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Jena, Nemačka) koji ima argonsku lasersku liniju (488 nm) i dve helijum-neonske laserske linije (543 i 633 nm). Za snimanje fluorofora laserskim linijama 488 i 555, korišćeno je dihroičko ogledalo NFT 488/543, a potom filteri uskog opsega propuštanja (BP) 505-530 i BP565-610, redom. Za snimanje fluorofora pobuđivanih laserom 633 korišćeno je dihroičko ogledalo NFT 543/633 i filter širokog opsega propuštanja LP 650. Mikrografije su snimane upotrebom uljanih imerzionih objektivna uveličanja 40x sa numeričkom aperturom 1.3, (Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil; Carl Zeiss, Nemačka) i 63x sa numeričkom aperturom 1.4 (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC; Carl Zeiss, Nemačka). Parametri snimanja mikrografija bili su konstantni za kontrolne i ALS uzorke u svakom eksperimentu.

3.9.1 Mikroskopija i analiza mikrografija oligodendrocita

Objektivom Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil snimano je 4-5 mikrografija po koronalnom preseku lumbalnog i cervikalnog regiona kičmene moždine, a uzorkovano je 5-6 preseka po životinji. U primarnoj kulturi oligodendrocita snimano je 8-10 CNPaza+/Kir4.1+ oligodendrocita objektivom

Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC sa dodatnim uvećanjem za individualne ćelije. Analiza mikrografija rađena je u ImageJ programu (NIH, SAD). Intenzitet signala imunofluorescencije CNPaze i Kir4.1 dobijen je merenjem integrisane gustine signala u opciji Merenja (engl. *Measure*) u ImageJ programu. Kolokalizacija signala je analizirana korišćenjem dodatka programu Just Another Colocalization Plugin (JACoP) (Bolte & Cordelieres, 2006). Mandersov koeficijent kolokalizacije i Pirsonov koeficijent korelacije analizirani su JACoP dodatkom da bi se opisao preklap signala fluorescentno obeleženih signala Kir4.1 i CNPaze. Da bi se definisao oblik TO-PRO-3 obeleženih nukleusa, prvo je izmeren najduži dijametar nukleusa CNPaza⁺ oligodendrocita, a potom normalno na njega i najkraći dijametar. Odnos najdužeg i najkraćeg dijametra je izračunat i obeležen kao D odnos. D odnos nukleusa veći od 1,5 je ukazivao na oligodendrocite izduženog oblika nukleusa. Morfologija individualnih oligodendrocita u kulturi rekonstruisana je korišćenjem dodatka Simple Neurite Tracer u ImageJ. Sholl analiza je urađena kako bi se odredio broj nastavaka u odnosu na udaljenost od ćelijskog tela i definiše kompleksnost ćelijske razgranatosti.

3.9.2 Mikroskopija i analiza mikrografija mikroglije

Na presecima gde je ispitivana mikroglija snimani su ventralni rogovi lumbalnog regiona kičmene moždine objektivom Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Snimano je 3-5 preseka po životinji obeleženih različitim kombinacijama primarnih i sekundarnih antitela. U pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmenim moždinama snimani su z-stekovi (engl. *stack*) uočenih klastera ćelija objektivom 63x i sa dodatnim uvećanjem. Analiza ćelijskih klastera rađena je prema prethodno objavljenoj studiji (Monasor et al., 2020). Na osnovu signala Kir4.1 obeležen je region od interesa (engl. *region of interest*; ROI). U odabranom ROI merena je površina imunofluorescentnih signala različitih markera korišćenjem opcije Površina (engl. *Area*) u opciji Merenja u ImageJ (NIH, SAD). Odnos izmerenih površina različitih markera je izračunat kako bi se ispitala zastupljenost različitih proteina u ćelijskim klasterima u odnosu na pojedinačnu mikrogliju lokalizovanu na razdaljini 80-100 μm od klastera mikroglije. Rekonstrukcija razgranatosti pojedinačne mikroglije je rađena na osnovu Iba1 signala korišćenem Simple Neurite Tracer (SNT) dodatka u ImageJ programu. Sholl analiza je urađena na dobijenim rekonstrukcijama ćelija mikroglije. Broj analiziranih ćelija po grupi bio je: WT (N=42), pre-SOD1^{G93A} (N=33), SOD1^{G93A} (N=43). Broj životinja u svakoj grupi je bio 4.

3.10 Metoda nametanja voltaže na delić membrane u konfiguraciji „cela ćelija“

Oligodendrociti zasejani na pokrovna stakla snimani su u vanćelijskom rastvoru (ECS) koji sadrži (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 glukoza, 10 HEPES, pH 7,4 podešen dodavanjem NaOH i osmolarnost 300 mOsm. Pipete su izvlačene od borosilikatnog stakla sa filamentom (Science products, Nemačka, Kat. br. GB150F-10) na horizontalnom izvlačaču (P-97, Sutter Instruments, SAD) i imale su otpor 4-7 M Ω kada se napune unutarćelijskim rastvorom sastava (u mM): 144 KCl, 2 MgCl₂, 5 EGTA, 5 HEPES, pH 7,2 podešen dodavanjem KOH i osmolarnosti 290 mOsm.

3.10.1 Merenje struja na oligodendrocitima u kulturi

Metoda nametanja voltaže na delić membrane u konfiguraciji „cela ćelija“ rađen je na oligodendrocitima u kulturi na Olympus BH2 mikroskopu (Olympus, Center valley, PA, SAD). Struje su merene korišćenjem Tecella Pico 2 pojačivača sa integrisanim A/D konverterom (Tecella). Podaci su prikupljeni na frekvenciji uzorkovanja od 10 kHz i filtrirani su na 2 kHz. Registrovan signal struja je filtriran niskopropusnim filterom frekvencije 2 kHz i uzorkovan na frekvenciji od 10 kHz. Podaci su prikupljeni korišćenjem TecellaLab programa (Tecella, Foothill Ranch, CA, SAD). Otpor membrane (R_m), kapacitivnost membrane (C_m) i serijski otpor su mereni direktno sa pojačivača sa gornjom granicom za serijski otpor od 20 M Ω . Struje oligodendrocita u kulturi u konfiguraciji „cela

ćelija“ pobuđivane su stepenastim protokolom. Sa osnovnog potencijala od -50 mV, nametane su voltaže u rasponu od -150 do +70 mV sa stepenom povećanja od 20 mV. Kada je korišćen ECS koji sadrži 20 mM KCl, koncentracija NaCl je srazmerno snižena da bi osmolarnost ostala nepromenjena. Kir struje u oligodendrocitima su blokirane dodavanjem 100 μ M BaCl₂ u ECS. Ba²⁺-senzitivna struja je izolovana oduzimanjem struja dobijenih u prisustvu 100 μ M BaCl₂ od zapisa struja snimljenih u ECS. Za određivanje potencijala reverzije (E_{rev}), primenjen je ramp protokol napravljen kao linearni voltažni puls od -150 to +70 mV, sa osnovnim potencijalom na -50 mV. Svi vanćelijski rastvori su aplicirani gravitacionom perfuzijom i svi eksperimentni su rađeni na sobnoj temperaturi. Membranska svojstva oligodendrocita karakterišu membranska kapacitivnost >35 pF i otpor membrane <500M Ω i odsustvo Na⁺ struja (De Biase et al., 2010).

3.10.2 Merenje struja na površinskoj neonatalnoj mikrogliji

Stakla sa mikroglijom izolovanom iz kičmenih moždina neonatalnih pacova su postavljena u komoru fiksiranu na postolju Olympus BH2 mikroskopa (Olympus, Center valley, PA, SAD). Za razliku do konvencionalnih elektrofizioloških sistema, u korišćenom sistemu objektiv mikroskopa je fiksno pozicioniran, dok je fokusiranje uzorka postignuto pomeranjem platforme mikroskopa. Ukupne struje su merene korišćenjem Axopatch 2D pojačivača sa Digidata 1300B. Signal struja je filtriran niskopropusnim filterom frekvencije 5-6 kHz, uzorkovan na frekvenciji od 10 kHz i snimljen u Clampex 9 programu (Molecular Devices). Merena svojstva ćelijske membrane i primenjeni stepenasti protokol za merenje struja mikroglije, identični su kao uslovi primenjeni za merenje struja oligodendrocita u kulturi i detaljno su opisani u poglavlju 3.2.8.1. Gustine struja ćelija mikroglije dobijene su deljenjem struja cele ćelije sa vrednošću membranske kapacitivnosti na svakoj vrednosti nametnutog potencijala. Podaci su analizirani u Clampfit 11.0.3. programu (Molecular Devices).

3.10.3 Metod nametanja voltaže na neonatalnoj mikrogliji ispod sloja astrocita i mikrogliji izolovanoj iz adultnih pacova

Pokrovna stakla na kojima je zasejana mikroglija su postavljena u komoricu na invertovanom mikroskopu AxioObserver A1 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Nemačka) sa fiksiranom platformom i podesivom pozicijom objektiva, LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8NA (Carl Zeiss, Germany). Mikroskop je opremljen kamerom „evolve“-EM 512 Digital Camera System (Photometrics, SAD) povezanom sa VisiView programom (VisiChrome, Visitron Systems GmbH, Nemačka). Pipeta je pozicionirana pomoću motorizovanog mikromanipulatora HEKA MIM 4 (HEKA Elektronik GmbH, Nemačka). Sistem poseduje HEKA EPC 8 pojačivač sa LIH 1600 digitalnom jedinicom za snimanje signala (HEKA Elektronik). Signali struja su uzorkovani na frekvenciji od 10 kHz i filtrirani na 2 kHz i snimljeni PatchMaster programom (HEKA Elektronik). Otpor membrane je meren direktno sa pojačivača. Struje mikroglije u kulturi u konfiguraciji „cela ćelija“ pobuđivane su stepenastim protokolom. Sa osnovnog potencijala od -30 mV, nametane su voltaže od -160 do +40 mV sa stepenom povećanja od 20 mV. Kir struje u adultnoj i neonatalnoj mikrogliji ispod astrocita su blokirane dodavanjem 100 μ M BaCl₂. Ba²⁺-senzitivna komponenta je izolovana oduzimanjem struja dobijenih u prisustvu 100 μ M BaCl₂ od ukupnih struja dobijeni u ECS. Odgovor mikroglije na povećanu koncentraciju vanćelijskog K⁺, ispitan je registrovanjem struja pri promeni sa 4 na 12 mM K⁺. U mikrogliji u kulturi izolovanoj iz adultnog tkiva koja je tretirana LPS registrovani su strujni odgovori u ECS i u prisustvu 100 μ M BaCl₂.

3.11 Statistička analiza

Statistička analiza je rađena u Sigmaplot v12 programu (Systat Software Inc, CA, SAD) i GraphPad Prism V6.01 (GraphPad, Ca, SAD). U analizi podataka dobijenih iz imunohistohemijskih eksperimenata, srednja vrednost je izračunata za svaku životinju i na te vrednosti su primenjeni

statistički testovi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška, dok su rezultati na oligodendrocitima prikazani u vidu vertikalnih tačkastih plotova koji predstavljaju pojedinačne vrednosti za svaku životinju. N prikazuje broj životinja korišćenih u eksperimentu, dok u elektrofiziološkim eksperimentima N prikazuje broj analiziranih ćelija. Broj nezavisnih izolacija ćelija u kulturi je naznačen za svaki set eksperimenata u opisu slike. Za ispitivanje razlike između dve grupe podataka, korišćen je Studentov t-test kada je distribucija podataka bila normalna, a Mann-Whitney test je korišćen kada podaci nisu imali normalnu raspodelu. Paired Studentov t-test je primenjivan u analizi razlika dobijenih iz dva merenja sa iste ćelije. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa post-hoc Tukey's testom je korišćena za poređenje više od dve grupe podataka. Za statističku analizu razlika između podataka po grupama gde se ispituje uticaj više od jednog faktora upotrebljavana je Dvofaktorska ANOVA sa post-hoc Sidak testom. Sve razlike su smatrane značajnim ukoliko je dobijena P vrednost <0.05 . Veličina uzoraka, primenjeni testovi i dobijene P vrednosti naznačeni su u odeljku Rezultati i legendama slika.

4. Rezultati

4.1 Funkcionalne i degenerativne promene u oligodendrocitima u kičmenoj moždini pacovskog modela ALS

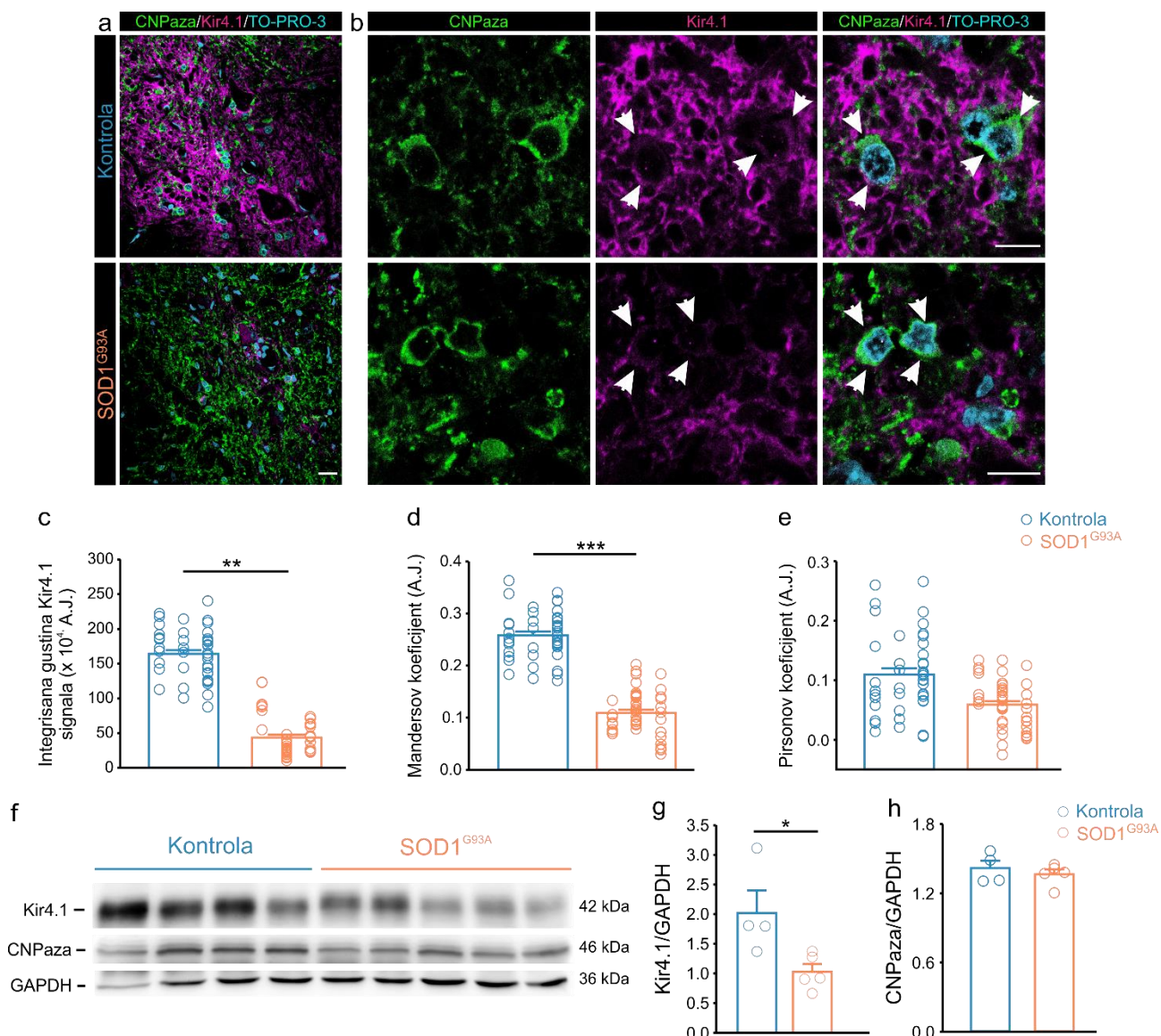
4.1.1 Smanjena ekspresija Kir4.1 u oligodendrocitima u kičmenoj moždini SOD1^{G93A} pacova

Oligodendrociti eksprimiraju ulazni ispravljajući kalijumov kanal Kir4.1 koji je od značaja za dostizanje njihove funkcionalne zrelosti (Livesey et al., 2016). U cilju ispitivanja svojstava Kir4.1 eksprimiranog u oligodendrocitima u ALS, najpre su imunofluorescentno obeleženi preseki kičmene moždine simptomatskih SOD1^{G93A} pacova. Korišćeni su CNPaza, marker specifičan za oligodendrocite i anti-Kir4.1 antitelo za obeležavanje ovog kalijumovog kanala. Ispitani su lumbalni i cervikalni region kičmene moždine koji su naročito pogođeni u ALS, a posebno ventralni rogovi ovih regiona, gde su lokalizovani motorni neuroni koji degenerišu u ALS (Gurney et al., 1994; Taylor et al., 2016). Izražena ekspresija Kir4.1 kanala je uočena u ventralnoj kičmenoj moždini kontrolnih pacova (Slika 7a), dok je imunofluorescentno obeležavanje kičmene moždine ALS pacova pokazalo značajnu redukciju ekspresije ovog kanala (Slika 7a). Rezultati pokazuju da je intenzitet signala imunofluorescencije Kir4.1 smanjen u lumbalnom regionu kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova (Slika 1a-c; P=0,006, Studentov t-test). Kvantifikacija kolokalizacije signala Kir4.1 i CNPaze pokazuje smanjenje Mandersovog koeficijenta u SOD1^{G93A} pacovima u poređenju sa kontrolom (Slika 7a,b,d; P<0,001, Studentov t-test), dok Pirsonov korelacioni koeficijent pokazuje tendenciju smanjenja u SOD1^{G93A} pacovima iako promena nije statistički značajna (Slika 7e; P=0,096, Studentov t-test). Isti trend promene je uočen u ventralnim rogovima cervikalnog regiona kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova (Slika 8). Nasuprot smanjenju u ventralnim rogovima, Kir4.1 ekspresija kao i kolokalizacija sa signalom CNPaze nisu promenjeni u dorzalnim rogovima simptomatskog SOD1^{G93A} pacova, u regionu u kome se ne nalaze degenerišući motorni neuroni (Slika 9) ukazujući na to da su uočene promene u ekspresiji Kir4.1 karakteristične za regione oštećenja motornih neurona u ALS.

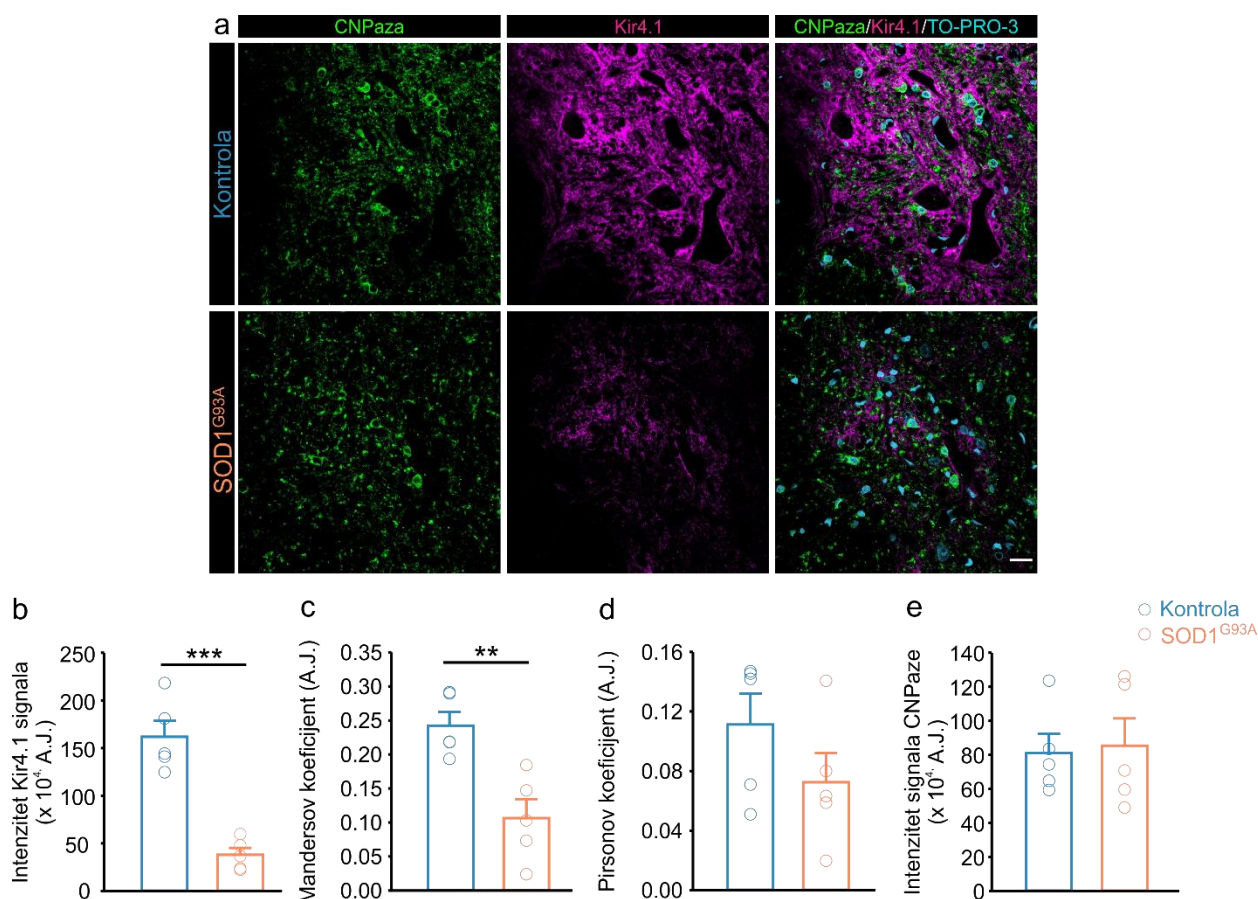
Kako oligodendrociti imaju bitnu ulogu u mijelinizaciji (Livesey et al., 2016; Neusch et al., 2001), ispitana je ekspresija Kir4.1 u mijelinskoj frakciji kičmene moždine. Primenom centrifugiranja na gradijentu Percoll-a, izolovan je mijelin iz kičmenih moždina simptomatskih SOD1^{G93A} i kontrolnih pacova i upoređen primenom Western blot metode. Dobijeni rezultati pokazuju da je ekspresija Kir4.1 značajno smanjena u mijelinu u SOD1^{G93A} pacovima u poređenju sa kontrolom (Slika 7f,g, P=0,029, Studentov t-test). Međutim, kvantifikacija ekspresije oligodendrocitnog markera CNPaze nije pokazala razliku između ALS i kontrolnih pacova (Slika 7f,h; P=0,494, Studentov t-test). Ovi rezultati su u saglasnosti sa nepromenjenim intenzitetom imunofluorescentnog signala CNPaze u lumbalnom regionu kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova u poređenju sa kontrolom (Slika 10 i Slika 11b,c; P=0,410; Studentov t-test). Takođe, dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno pokazanom nepromenjenom ekspresijom CNPaze u kičmenoj moždini SOD1^{G93A} miševa (Philips et al., 2013).

Nepromenjena ekspresija CNPaze u ventralnim rogovima može ukazati na sličan broj oligodendrocita obeleženih CNPazom (CNPaza⁺) u SOD1^{G93A} i kontrolnim pacovima (Slika 11c). Međutim, uočene su promene u morfologiji oligodendrocita u SOD1^{G93A} kičmenoj moždini, posebno onih lokalizovanih u blizini tela neurona (Slika 11a). Uočeno je da pojedini oligodendrociti imaju nepravilan i izdužen oblik nukleusa (Slika 11a,b) što je izraženo merenjem odnosa najdužeg i najkraćeg dijametara nukleusa CNPaze⁺ ćelija. Rezultati pokazuju da je odnos dijametara značajno povećan u SOD1^{G93A} oligodendrocitima u kičmenoj moždini u odnosu na kontrolne (Slika 11b,d; P=0,049, Studentov t-test). Broj oligodendrocita koji imaju izdužen oblik nukleusa značajno je veći u SOD1^{G93A} lumbalnom regionu kičmene moždine u odnosu na kontrolu (Slika 11b,e; P=0,018,

Studentov t-test). Dobijeni rezultati ukazuju da bi ovaj parametar mogao da predstavlja indikator degeneracije ovih glijskih ćelija.



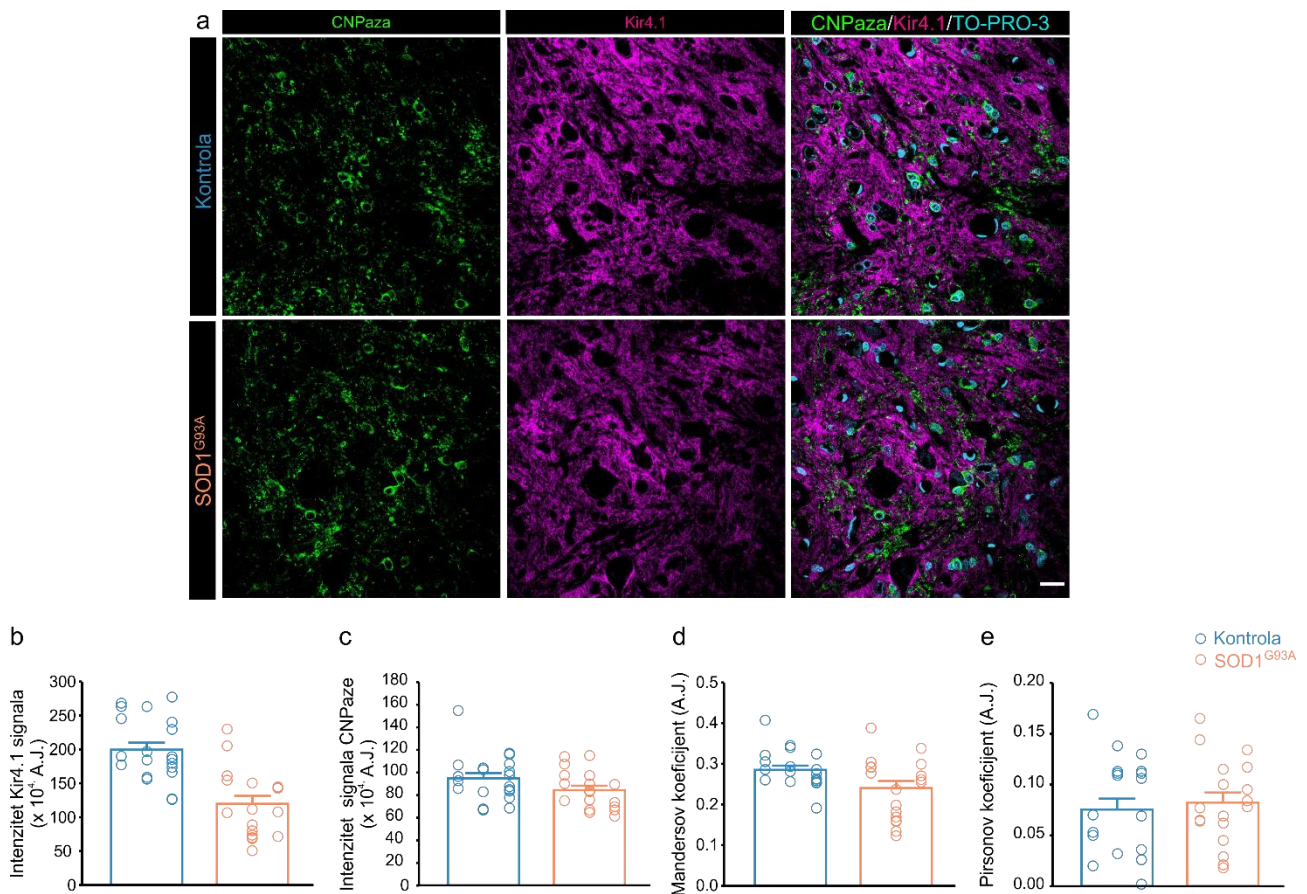
Slika 7. Smanjena ekspresija Kir4.1 kanala u oligodendrocitima u kičmenoj moždini SOD1^{G93A} pacova. (a) Reprerzentativne konfokalne mikrografije imunofluorescentno obeleženih oligodendrocita anti-CNPaza antitelom (zeleno), kalijumovog kanala Kir4.1 (magenta) i TO-PRO-3 boje za nukleuse (cijan) u ventralnim rogovima lumbalnog regiona kontrolne i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Skala 20 μ m. (b) Konfokalne mikrografije visoke rezolucije sa imunofluorescentno obeleženim CNPazom, Kir4.1 i TO-PRO-3 u lumbalnom regionu kontrolne i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Strelice pokazuju Kir4.1 signal u oligodendrocitima i kolokalizaciju sa signalom CNPaze. Skala 10 μ m. (c) Intenzitet imunofluorescentnog Kir4.1 signala je značajno smanjen u SOD1^{G93A} u poređenju sa kontrolnom kičmenom moždinom. Kvantifikacija kolokalizacije je pokazala smanjenje (d) Mandersovog koeficijenta u SOD1^{G93A} u poređenju sa kontrolnim pacovom, dok je (e) Pirsonov koeficijent korelacije nepromenjen. (f) Primeri Western blot-a pokazuju ekspresiju Kir4.1 (~42 kDa) i CNPaze (~46 kDa) u mijelinu izolovanom iz kičmenih moždina SOD1^{G93A} i kontrolnih pacova. GAPDH (~36 kDa) je korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka. (g) Ekspresija Kir4.1 je značajno smanjena u mijelinu izolovanom iz SOD1^{G93A} kičmenih moždina (N=5 pacova) u poređenju sa kontrolnim (N=4 pacova), dok je (h) ekspresija CNPaze nepromenjena. Inteziteti traka za signale Kir4.1 i CNPaze su normalizovani na intenzitet GAPDH signala. Broj životinja u kontrolnoj i SOD1^{G93A} grupi za panele c, d i e, bio je N=3 za svaku grupu. Svaki vertikalni niz tačaka predstavlja pojedinačne vrednosti za svaku životinju. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.



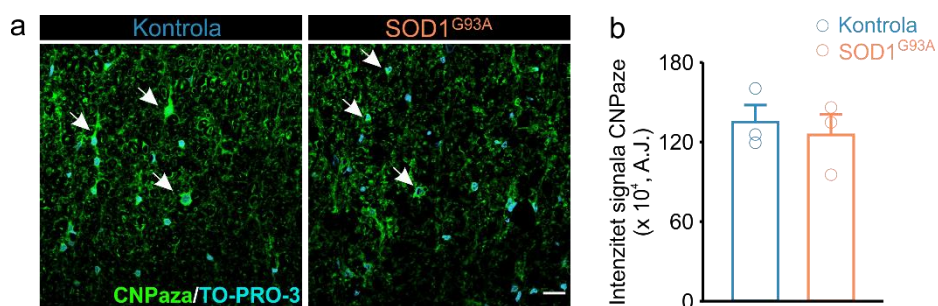
Slika 8. Smanjena ekspresija Kir4.1 u cervikalnom regionu kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije imunofluorescentno obeleženih oligodendrocita CNPazom (zeleno), kanala Kir4.1 (magenta) i nukleusa obeleženih TO-PRO-3 bojom (cijan) u cervikalnom regionu kontrolne i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Skala 20 μm . (b) Kvantifikacija ukupnog intenziteta Kir4.1 imunofluorescentnog signala pokazuje značajno smanjenje u cervikalnom regionu SOD1^{G93A} u poređenju sa kontrolnom kičmenom moždinom ($P < 0,001$, Studentov t-test). (c) Mandersov koeficijent kolokalizacije signala CNPaze i Kir4.1 je smanjen u SOD1^{G93A} u poređenju sa kontrolnom kičmenom moždinom ($P = 0,004$, Studentov t-test) dok je (d) Pirsonov koeficijent korelacije nepromenjen ($P = 0,213$, Studentov t-test). (e) Ukupni intenzitet imunofluorescencije CNPaze nije promenjen u ALS pacovskom modelu u poređenju sa kontrolom ($P = 0,833$, Studentov t-test). Broj životinja u kontrolnoj i SOD1^{G93A} grupi u panelima b-e bio je $N = 5$ za obe grupe. Tačke predstavljaju prosečnu vrednost za svaku životinju. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.1.2 Izmenjena funkcionalna svojstva ALS oligodendrocita u kulturi

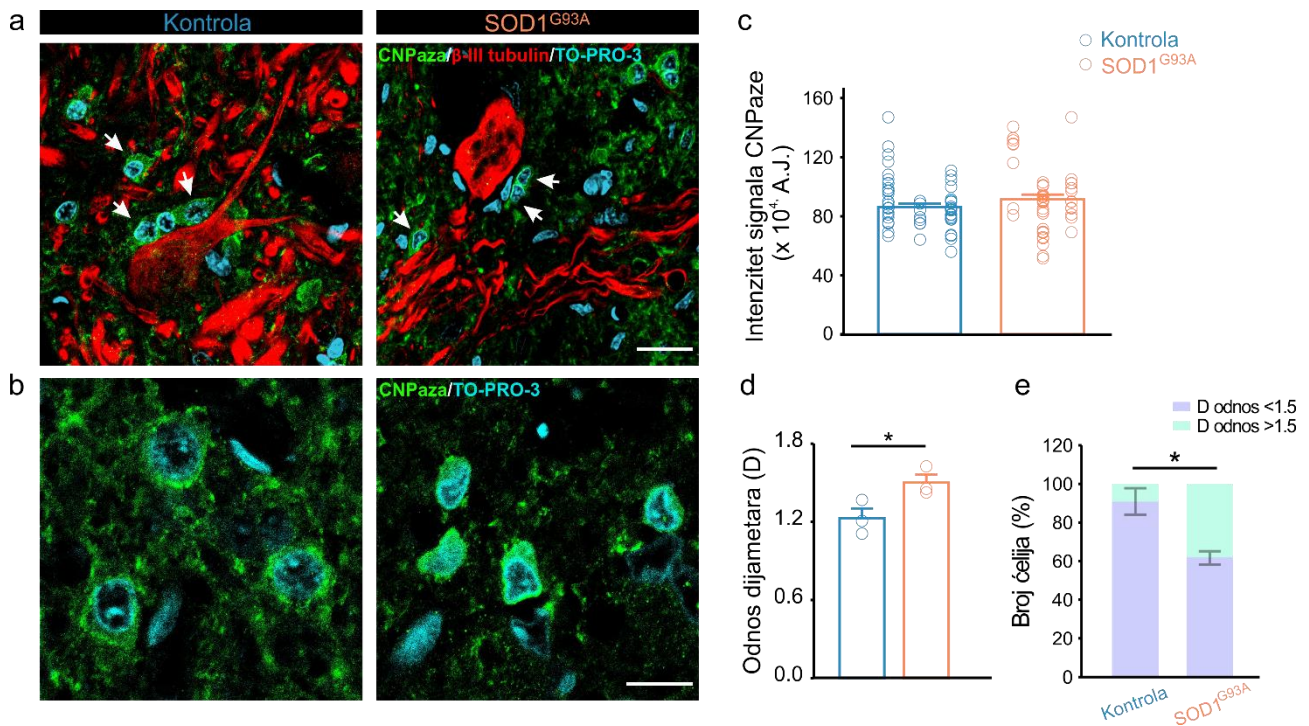
U cilju ispitivanja funkcionalnih svojstava oligodendrocita u ALS, pripremljena je primarna kultura oligodendrocita izolovanih iz kičmene moždine neonatalnih kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova. Iako oligodendrociti u kulturi nemaju mijelinizujuća svojstva, oni dostižu kasne faze diferencijacije na šta ukazuje njihova razgranatost, ekspresija CNPaze, prisustvo ulaznih K^+ i odsustvo izlaznih Na^+ struja (Knapp et al., 1988; Livesey et al., 2016; Sontheimer et al., 1989). Ekspresija Kir4.1 u oligodendrocitima u kulturi je ispitana nakon dvostrukog imunofluorescentnog obeležavanja CNPaze i Kir4.1. CNPaza⁺ oligodendrociti u kulturi imaju kompleksnu morfologiju koju karakteriše prisustvo brojnih grana i nastavaka i izražen signal obeleženog Kir4.1 u ćelijskom telu (Slika 12a). Kvantifikacija intenziteta Kir4.1 signala u CNPaza⁺ oligodendrocitima u kulturi pokazuje smanjenje Kir4.1 ekspresije u SOD1^{G93A} oligodendrocitima u odnosu na kontrolu (Slika 12a,b; $P = 0,032$, Studentov t-test). Rekonstrukcija morfologije individualnih oligodendrocita je urađena na osnovu signala CNPaze (Slika 12c) i kompleksnost ćelijske morfologije je analizirana Sholl analizom. Broj nastavaka u odnosu na udaljenost od ćelijskog tela oligodendrocita nije promenjen u SOD1^{G93A} oligodendrocitima u odnosu na kontrole (Slika 12d, $P = 0,598$, Dvofaktorska ANOVA sa post-hoc Sidak testom) ukazujući na njihovu sličnu razgranatost.



Slika 9. Ekspresija Kir4.1 i CNPaze je nepromenjena u dorzalnim rogovima lumbalnog regiona kičmene moždine u ALS. (a) Reprerzentativne konfokalne mikrografije imunofluorescentno obeležanih oligodendrocita CNPazom (zeleno), Kir4.1 kanala (magenta) i nukleusa TO-PRO-3 (cijan) u dorzalnim rogovima lumbalnog regiona kontrolne i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Skala 20 μ m. Ukupni intenzitet (b) Kir4.1 i (c) CNPaznog signala nije promenjen u dorzalnim rogovima SOD1^{G93A} pacova u poređenju sa kontrolom (P=0,051 odnosno P=0,324, Studentov t-test). (d) Mandersov i (e) Pirsonov koeficijent ne pokazuje razlike između SOD1^{G93A} i kontrolnih pacova (P=0,45 odnosno P=0,683, Studentov t-test). Broj životinja u kontrolnoj i SOD1^{G93A} grupi u panelima b-e je isti, N=3. Svaki vertikalni niz tačaka predstavlja posebne vrednosti za svaku životinju. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednosti \pm standardna greška.



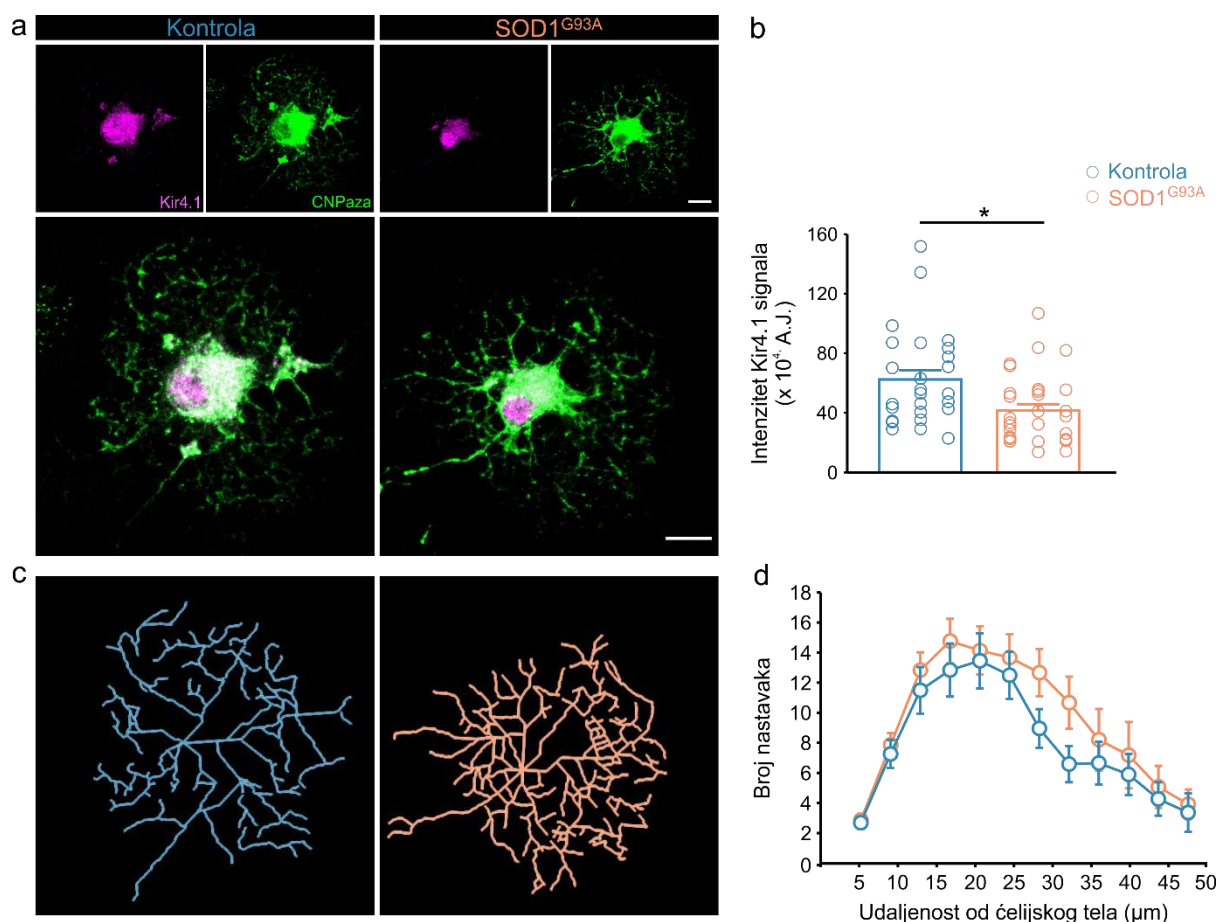
Slika 10. Ekspresija CNPaze u beloj masi lumbalnog regiona kičmene moždine nije promenjena u ALS. (a) Reprerzentativne mikrografije preseka kičmene moždine dobijene obeležavanjem antitela na CNPazu (zeleno) i TO-PRO-3 (cijan) u beloj masi kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova. Strelce pokazuju čelijska tela oligodendrocita. Skala 20 μ m. (b) Ukupni intenzitet imunofluorescentnog signala CNPaze je slične vrednosti u beloj masi lumbalnog regiona kontrolne i SOD1^{G93A} kičmene moždine (P=0,651, Studentov t-test). Broj životinja u kontrolnoj i SOD1^{G93A} grupi je isti, N=3. Tačke predstavljaju srednje vrednosti za svaku životinju.



Slika 11. Morfološke promene SOD1^{G93A} oligodendrocita. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije neurona obeleženih β -III tubulinom (crveno), oligodendrocita obeleženih CNPazom (zeleno) i nukleusa obeleženih TO-PRO-3 (cijan) u ventralnim rogovima kičmene moždine kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova. Oligodendrociti pozitivni na CNPazu imaju ovalan oblik i često su pozicionirani u blizini tela motornih neurona (strelica) u kontrolnim kičmenim moždinama, dok u SOD1^{G93A} kičmenoj moždini pokazuju promenjenu morfologiju i izdužen oblik (strelica). Skala 20 μ m. (b) Reprezentativne konfokalne mikrografije oligodendrocita obeleženih CNPazom (zeleno) i nukleusa obeleženih TO-PRO-3 (cijan) u kontrolnoj i SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. Skala 10 μ m. (c) Kvantifikacija intenziteta imunofluorescentnog signala CNPaze ne pokazuje razliku između kontrolnog i SOD1^{G93A} lumbalnog regiona kičmene moždine. Svaki vertikalni niz tačaka predstavlja posebne vrednosti za svaku životinju. (d) Odnos najdužeg i najkraćeg dijametra nukleusa oligodendrocita je povećan u SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolu. Tačke predstavljaju prosečne vrednosti za svaku životinju. (e) Broj oligodendrocita koji imaju izduženiji nukleus (D odnos > 1.5) značajno je veći u lumbalnom regionu ALS u poređenju sa kontrolnom kičmenom moždinom. Broj životinja u kontrolnoj i SOD1^{G93A} grupi u panelima c,d,e je isti, N=3. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednosti \pm standardna greška. *P < 0,05.

Funkcionalna svojstva oligodendrocita u kulturi izolovanih iz kičmene moždine (Slika 13a) su ispitana metodom nametanja voltaže na delić membrane u konfiguraciji „cela ćelija“ (Slika 13b). Rezultati pokazuju da su membranska svojstva oligodendrocita promenjena u ALS. Otpor membrane (R_m) je povećan u SOD1^{G93A} u poređenju sa kontrolnim oligodendrocitima (Slika 13c; P=0,004, Mann-Whitney Rank Sum test). Pored promene u otporu membrane, uočeno je pomeranje vrednosti potencijala reverzije (E_{rev}) ka pozitivnim vrednostima u SOD1^{G93A} oligodendrocitima (Slika 13d; P=0,022, Mann-Whitney Rank Sum test). Poređenje kapacitivnosti membrane (C_m) nije pokazalo razliku između kontrolnih i ALS oligodendrocita (Slika 13e; P=0,903, Studentov t-test) ukazujući na sličnu površinu ćelija. Krive zavisnosti struje od voltaže (I/V) se razlikuju između SOD1^{G93A} i kontrolnih oligodendrocita posebno u ulaznim strujama što se uočava kao značajano smanjenje gustine struja na -150 i -130 mV u SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolne oligodendrocite (Slika 13b,f; P=0,009 i P=0,019, Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa post-hoc Sidak testom). Strujni zapisi sa oligodendrocita u kulturi u konfiguraciji „cela ćelija“ pokazuju odsustvo izlaznih struja Na^+ , što je i karakteristično za oligodendrocite u kasnijim fazama diferencijacije (De Biase et al., 2010; Sontheimer et al., 1989). Povećanje koncentracije vanćelijskog K^+ ($[K^+]_o$) sa 4 na 20 mM dovodi do značajnog povećanja ulaznih struja na voltažama od -150, -130 i -110 mV i u kontrolnim i u SOD1^{G93A} oligodendrocitima (Slika 13g,h; P<0,001, P<0,001 i P=0,003, redom, Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa post-hoc Sidak testom). Povećanje ulaznih struja u 20 mM $[K^+]_o$ na voltaži od -130 mV je značajno manje u SOD1^{G93A} oligodendrocitima u odnosu na kontrolne (Slika 13h; P=0,025, Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa post-hoc Sidak testom).

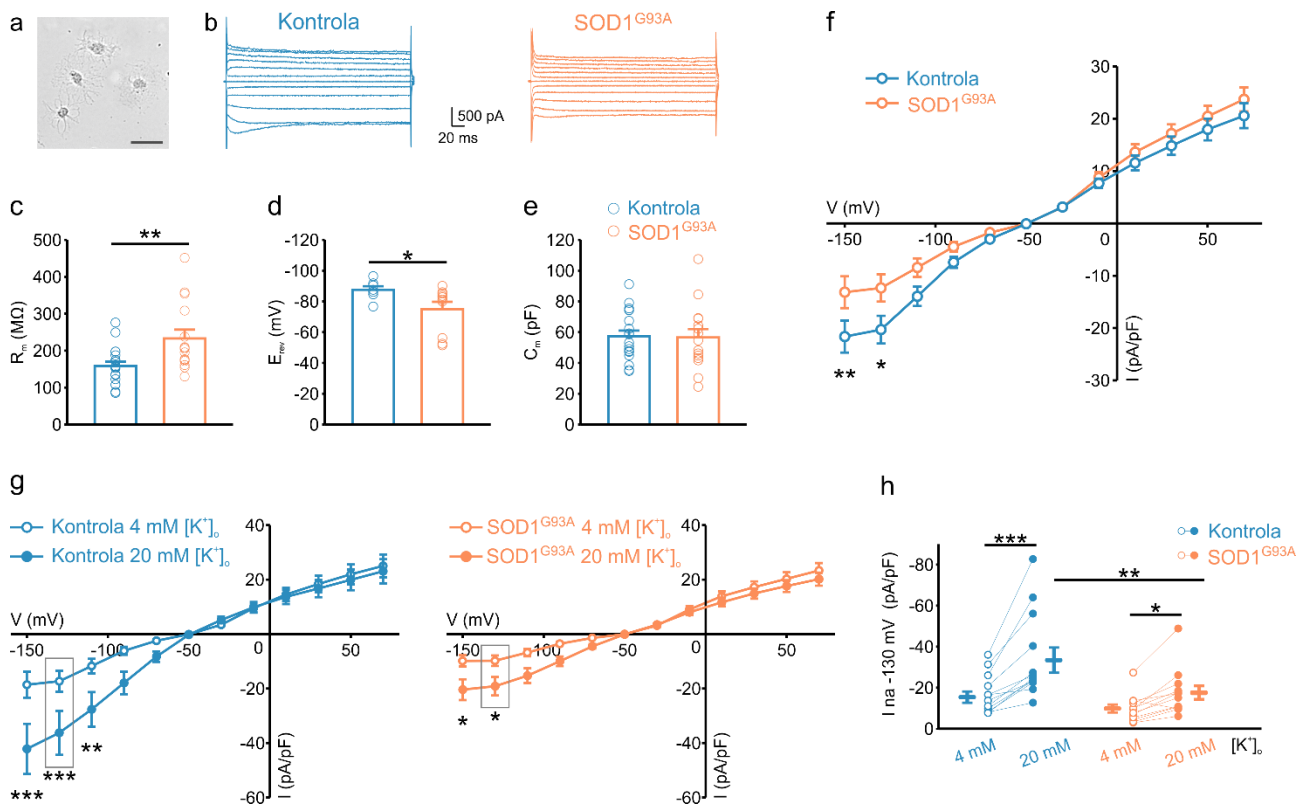
Predstavljeni rezultati pokazuju izmenjena membranska biofizička svojstva i ulazne struje u ALS oligodendrocitima ukazujući na značajne funkcionalne nedostatke ovih glijskih ćelija.



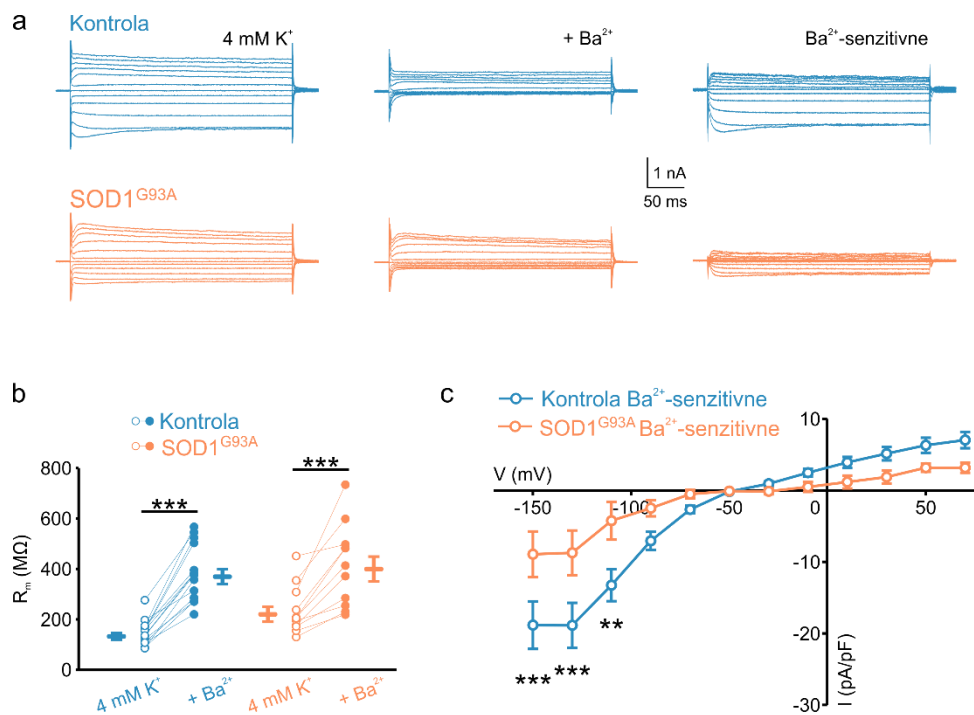
Slika 12. Smanjena ekspresija Kir4.1 u SOD1^{G93A} oligodendrocitima u kulturi. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije imunofluorescentno obeleženih oligodendrocita anti-CNPaza antitelom (zeleno) i kalijumovog kanala Kir4.1 (magenta) u kontrolnim i SOD1^{G93A} oligodendrocitima u kulturi. Skala 10 μm. (b) Intenzitet Kir4.1 imunofluorescentnog signala u ćelijama pozitivnim na CNPazu je značajno smanjen u SOD1^{G93A} u poređenju sa kontrolnim oligodendrocitima. Svaki vertikalni niz tačaka odgovara posebnim vrednostima dobijenim za pojedinačnu životinju. (c) Reprezentativni primeri morfologije kontrolnih i ALS oligodendrocita rekonstruisani na osnovu signala CNPaze. (d) Sholl-ova analiza kompleksnosti morfologije pokazuje sličnu razgranatost kontrolnih i SOD1^{G93A} oligodendrocita u kulturi. Broj životinja u kontrolnoj i SOD1^{G93A} grupi u panelima b i d je isti, N=3. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. *P < 0,05.

4.1.3 Kir struje su redukovane u ALS oligodendrocitima u kulturi

Kir komponenta ulaznih struja dobijenih u konfiguraciji „cela ćelija“ osetljiva je na prisustvo Ba²⁺ jona u vanćelijskom rastvoru (Ransom & Sontheimer, 1995). Dodavanje 100 μM BaCl₂ u standardni vanćelijski rastvor inhibira Kir ulazne struje i u kontroli i u SOD1^{G93A} oligodendrocitima (Slika 14a). Ba²⁺-senzitivna Kir komponenta struja je dobijena oduzimanjem zapisa struje u prisustvu 100 μM Ba²⁺ od zapisa struje u kontrolnom rastvoru sa 4 mM [K⁺]_o. Naši rezultati pokazuju da je Ba²⁺-senzitivna Kir struja smanjena u ALS u poređenju sa kontrolnim oligodendrocitima (Slika 14a). U prisustvu vanćelijskog Ba²⁺ pored inhibicije struja uočeno je i povećanje otpora membrane u kontrolnim (P<0,001, upareni t-test) i ALS oligodendrocitima (Slika 14b; P<0,001, upareni t-test). I/V kriva izolovane Ba²⁺-senzitivne Kir komponente pokazuje promenu u ulaznom profilu struja na -150, -130 i -110 mV u SOD1^{G93A} oligodendrocitima u odnosu na kontrolne (Slika 14c; P<0,001, P<0,001 i P=0,002, redom, Dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima sa post-hoc Sidak testom). Ovi rezultati pokazuju smanjene Kir struje u SOD1^{G93A} oligodendrocitima i ukazuju na značajan doprinos narušene funkcionalnosti Kir4.1 kanala u ALS patofiziologiji.



Slika 13. Izmenjena membranska biofizička svojstva i smanjene ulazne struje u SOD1^{G93A} oligodendrocitima u kulturi. (a) Mikrografija oligodendrocita iz kičmene moždine u kulturi snimljena svetlosnim mikroskopom pre elektrofiziolškog snimanja. Skala 50 μm. (b) Reprezentativni zapisi struja u konfiguraciji „cela ćelija“ u odgovoru na voltažni stepenasti protokol u kontrolnim (plavo) i SOD1^{G93A} (narandžasto) oligodendrocitima. (c) Otpor membrane (R_m) je povećan u SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolne oligodendrocite (N=15 odnosno 19 ćelija). (d) Potencijal reverzije (E_{rev}) pokazuje pomeranje ka pozitivnim vrednostima potencijala u SOD1^{G93A} (N=10 ćelija) u odnosu na kontrolne (N=7 ćelija) oligodendrocite, dok se u (e) ne uočava promena u kapacitetu membrane (C_m) (kontrola: N=19 ćelija, SOD1^{G93A}: N=15 ćelija). (f) I/V krive predstavljaju struje u konfiguraciji „cela ćelija“ u odnosu na nametnuti potencijal u kontrolnim i SOD1^{G93A} oligodendrocitima (N=19 odnosno 15 ćelija). Amplitude struja na -150 mV i -130 mV su značajno smanjene u SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolne oligodendrocite. (g) I/V krive pokazuju povećanje ulaznih struja kontrolnih kao i SOD1^{G93A} oligodendrocita (N=12 ćelija u obe grupe) u odgovoru na povećanje vanćelijske koncentracije kalijuma ([K⁺]_o) sa 4mM na 20 mM. (h) Gustina struja na -130 mV je značajno povećana u 20 mM [K⁺]_o u odnosu na standardni 4 mM [K⁺]_o u kontrolnim kao i u SOD1^{G93A} oligodendrocitima (N=12 ćelija u obe grupe). Gustina struja na -130 mV u 20 mM [K⁺]_o je značajno smanjena u SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolne oligodendrocite. Čelije u svakoj eksperimentalnoj grupi su dobijene iz tri nezavisne kulture. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

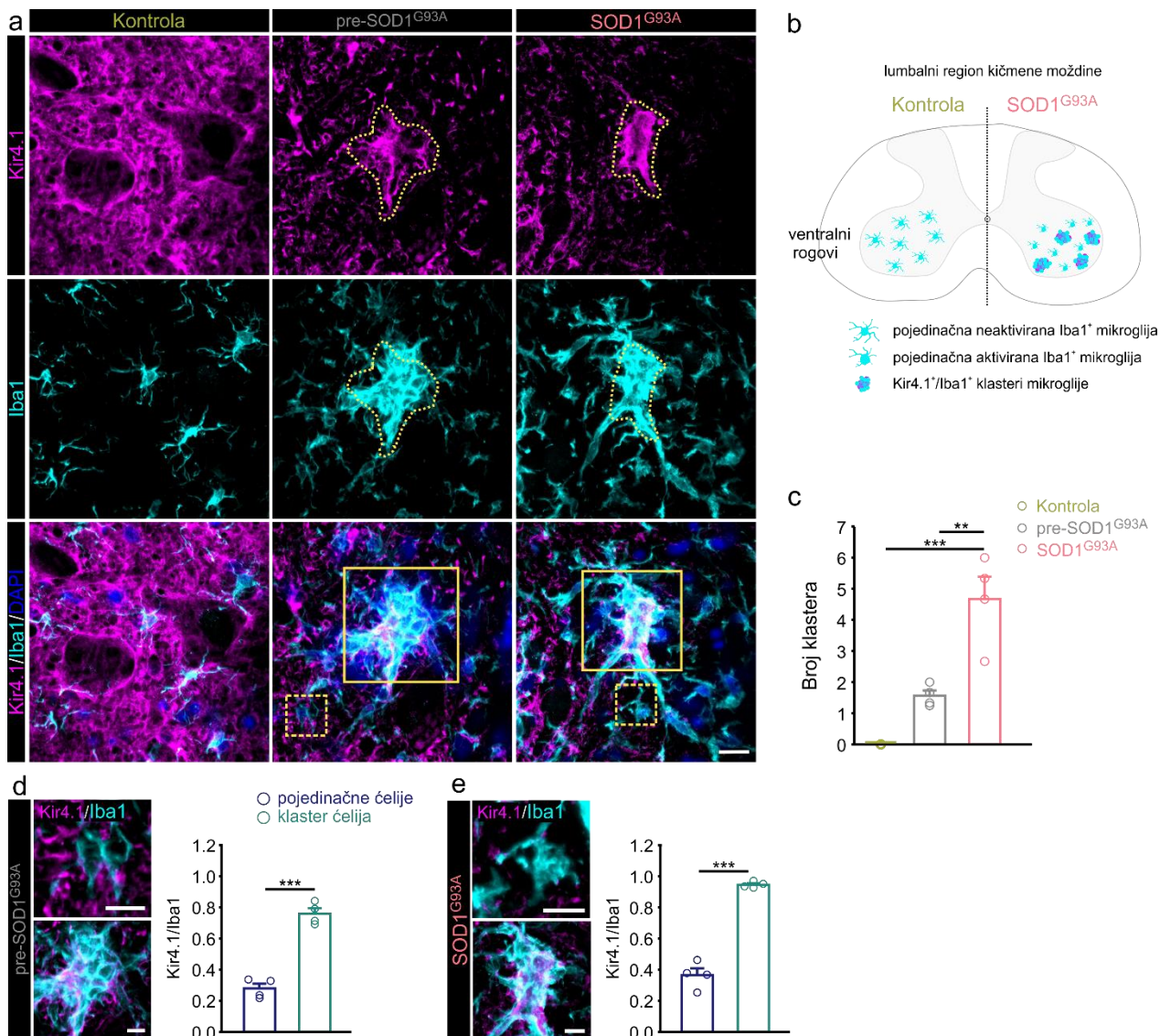


Slika 14. Ba²⁺-senzitivna Kir struja je smanjena u SOD1^{G93A} oligodendrocitima. (a) Reprezentativni zapisi struja iz kontrolnih (plavo) i SOD1^{G93A} (narandžasto) oligodendrocita u 4 mM [K⁺]_o, u prisustvu Ba²⁺ i izdvojene Ba²⁺-senzitivne struje. (b) Otpor membrane (R_m) je značajno povećan u prisustvu Ba²⁺ u poređenju sa 4 mM [K⁺]_o u kontrolnim kao i u SOD1^{G93A} oligodendrocitima. (c) I/V krive Ba²⁺-senzitivnih struja u odnosu na nametnuto voltažu pokazuju smanjenje ulaznih struja na -150, -130 i -110 mV u SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolne oligodendrocite. Broj ispitanih ćelija u kontroli (N=14 ćelija) i SOD1^{G93A} (N=11 ćelija) je isti za panele b i c. Ćelije u svakoj eksperimentalnoj grupi su dobijene iz tri nezavisne izolacije kulture. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. **P < 0,01, ***P < 0,001.

4.2 Morfološke i funkcionalne osobine mikroglije u kičmenoj moždini pacovskog modela ALS

4.2.1 Kir4.1⁺ klasteri u ventralnim rogovima kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova

Naši rezultati pokazuju da je ekspresija kalijumovog kanala Kir4.1 smanjena u ventralnim rogovima kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o redukciji ekspresije Kir4.1 u ventralnim rogovima kičmene moždine mišjeg modela ALS (Kaiser et al., 2006). Iako je ukupna ekspresija Kir4.1 smanjena, u ventralnim rogovima SOD1^{G93A} pacova su uočeni izolovani regioni koji zadržavaju Kir4.1 imunoreaktivnost (Slika 9a). Obeležavanjem bojom za nukleuse, Hoechst (HOE), pokazano je prisustvo velikog broj ćelijskih nukleusa u Kir4.1⁺ regionima, što ukazuje na to da se formiraju klasteri ćelija. Imunofluorescentnim obeležavanjem je pokazano da Kir4.1⁺ klasterne karakteriše izraženo prisustvo mikroglije pozitivne na Iba1 marker (Slika 15a,b,d,e). Obeležavanjem sa Iba1 i HOE može se uočiti da su tela mikroglije grupisana u centru, ali se uočavaju i na periferiji Kir4.1⁺ klastera (Slika 15a). Prisustvo Kir4.1⁺/Iba1⁺ klastera nije uočeno u kičmenim moždinama kontrolnih pacova. Broj Kir4.1⁺/Iba1⁺ ćelijskih klastera se povećava sa progresijom bolesti što je potvrđeno značajno povećanim brojem klastera u simptomatskoj ALS (SOD1^{G93A}) u odnosu na presimptomatsku ALS (pre-SOD1^{G93A}) i kontrolnu kičmenu moždinu (Slika 15c, P=0,0016, odnosno P<0,001, Jednofaktorska ANOVA sa post-hoc Tukey's testom). Analiza odnosa površina Kir4.1 i Iba1 signala (Kir4.1/Iba1) pokazuje njihovo povećano preklapanje u klasterima ćelija u odnosu na pojedinačno raspoređenu mikrogliju u ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} (Slika 15d, P<0,001, Studentov t-test) i SOD1^{G93A} pacova (Slika 15e, P<0,001, Studentov t-test).

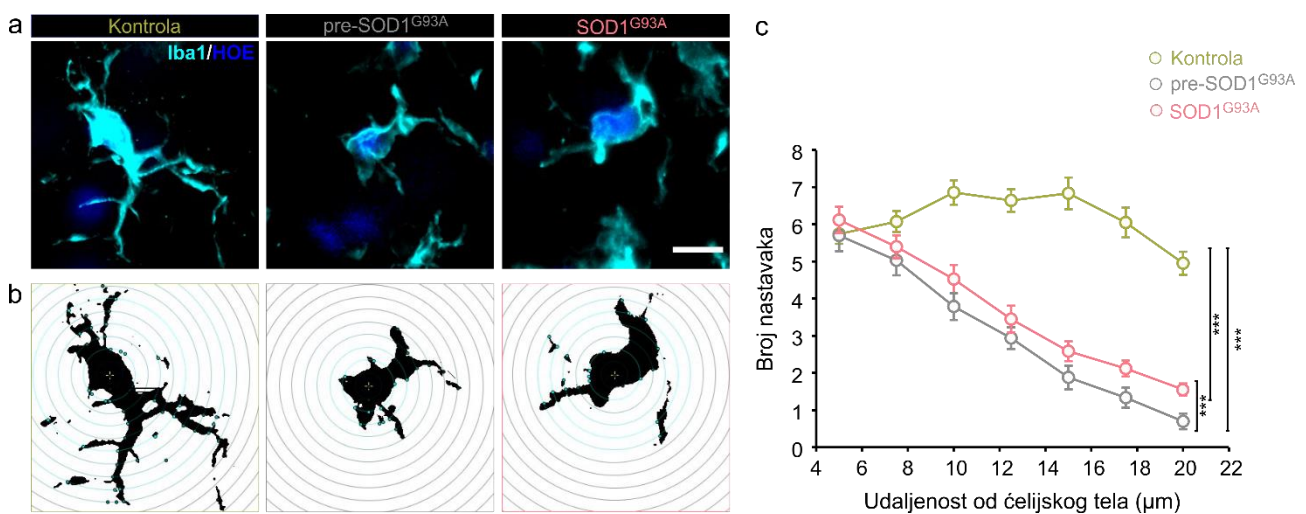


Slika 15. Grupisanje mikroglije u Kir4.1⁺ klasterima u ventralnim rogovima kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije imunofluorescentno obeleženog kalijumovog kanala Kir4.1 (magenta), mikroglije anti-Iba1 antitelom (cijan), i nukleusa obeleženih Hoechst bojom (HOE, plavo) u ventralnim rogovima kontrolne, pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Skala 20 μ m. Kir4.1⁺ regioni i Iba1⁺ mikroglija, oivičeni isprekidanom žutom linijom, preklapaju se u pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmemoj moždini. Kvadratima pune linije su obeleženi delovi klastera mikroglije, kvadrati isprekidane linije obeležavaju pojedinačno raspoređene ćelije aktivirane mikroglije. Skala 10 μ m. (b) Šema preseka kičmene moždine i prikaz lokalizacije klastera mikroglije u SOD1^{G93A} pacovu. Leva polovina lumbalnog regiona kičmene moždine (Kontrola) prikazuje razgranatu neaktiviranu mikrogliju u kontrolnom tkivu, dok desna polovina šeme (SOD1^{G93A}) prikazuje klaster mikroglije i pojedinačno raspoređenu aktiviranu mikrogliju u ventralnim rogovima. (c) Broj Kir4.1⁺/Iba1⁺ klastera po preseku značajno je veći u SOD1^{G93A} ventralnim rogovima u odnosu na pre-SOD1^{G93A} i kontrolnu kičmenu moždinu. (d,e) Odnos površina Kir4.1 i Iba1 signala Kir4.1/Iba1 u pojedinačnim ćelijama i klasterima mikroglije. Preklapanje Kir4.1/Iba1 signala je značajno povećano u klasterima mikroglije u odnosu na pojedinačne ćelije u lumbalnom regionu (d) pre-SOD1^{G93A} i (e) SOD1^{G93A} kičmemoj moždini. Broj životinja: kontrola (N=8), pre-SOD1^{G93A} (N=4) i SOD1^{G93A} (N=4). Vertikalni nizovi tačaka predstavljaju srednju vrednost za svaku životinju. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. **P < 0,01, ***P < 0,001.

4.2.2 Izmenjena morfologija mikroglije u Kir4.1⁺ klasterima u ventralnim rogovima kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova

U neuroinflamaciji dolazi do aktiviranja mikroglije što se uočava kao niz fenotipskih i morfoloških promena, nastavci se skraćuju i ćelijsko telo zadobija ameboidnu formu (Hanisch & Kettenmann, 2007; Helmut Kettenmann et al., 2013). Imunofluorescentnim obeležavanjem

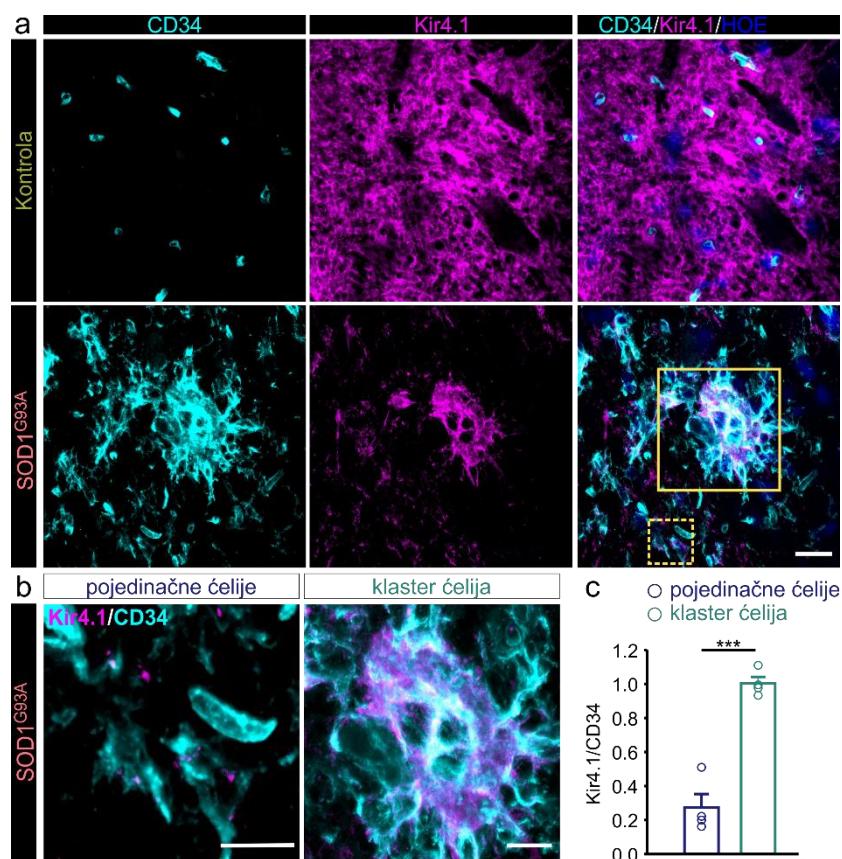
mikroglije Iba1 markerom uočavaju se morfološke promene ovih ćelija u ventralnim rogovima kičmene moždine ALS pacova (Slike 15 i 16). U ventralnim rogovima kontrolnih pacova, ćelije mikroglije su raspoređene pojedinačno, imaju malo telo i veliki broj dugačkih nastavaka (Slika 16a,b). U ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmenih moždina, Iba1⁺ mikroglija pokazuje karakteristike aktivirane mikroglije, uvećana ameboidna tela, mali broj kratkih nastavaka i često se grupiše u klastere (Slika 15a,b,d,e; Slika 16a,b). U cilju opisivanja razgranatosti mikroglije urađena je rekonstrukcija njihove morfologije na osnovu Iba1 signala u pojedinačnim ćelijama. Sholl analiza razgranatosti mikroglije pokazala je značajno smanjenje broja nastavaka u pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolne kičmene moždine ($P < 0,001$, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom). Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnom studijom na mišjem modelu ALS gde je pokazana promena morfologije mikroglije u vidu povlačenja i skraćivanja nastavaka i uvećanja ćelijskog tela sa progresijom bolesti u odnosu na razgranatu mikrogliju u kontrolnom tkivu (Ohgomori et al., 2016). Dobijeni rezultati pokazuju da mikroglija u ALS značajno menja svoju morfologiju i formira klastere u kojima je izražena imunoreaktivnost Kir4.1 u ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmenih moždina.



Slika 16. Smanjena razgranatost nastavaka mikroglije u ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmene moždine. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije pojedinačnih ćelija mikroglije obeleženih Iba1 markerom (cijan) i Hoechst bojom za obeležavanje nukleusa (HOE, plavo) i (b) rekonstrukcije njihove morfologije. (c) Sholl analiza morfologije pokazuje značajnu razliku između broja nastavaka pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} u odnosu na kontrolnu mikrogliju. Broj životinja: kontrola (N=8), pre-SOD1^{G93A} (N=4) i SOD1^{G93A} (N=4). *** $P < 0,001$.

4.2.3 CD34⁺/Kir4.1⁺ klasteri u ventralnim rogovima ALS kičmene moždine

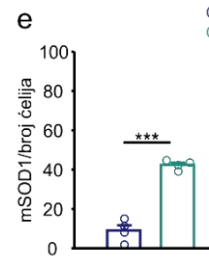
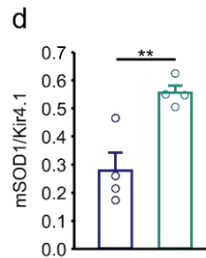
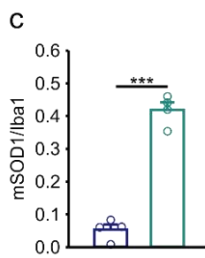
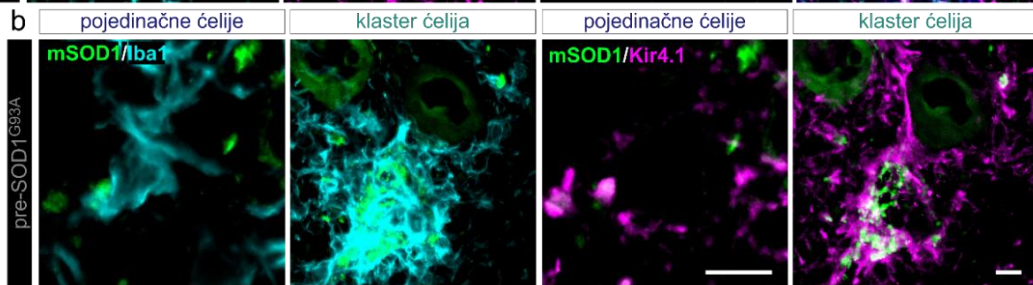
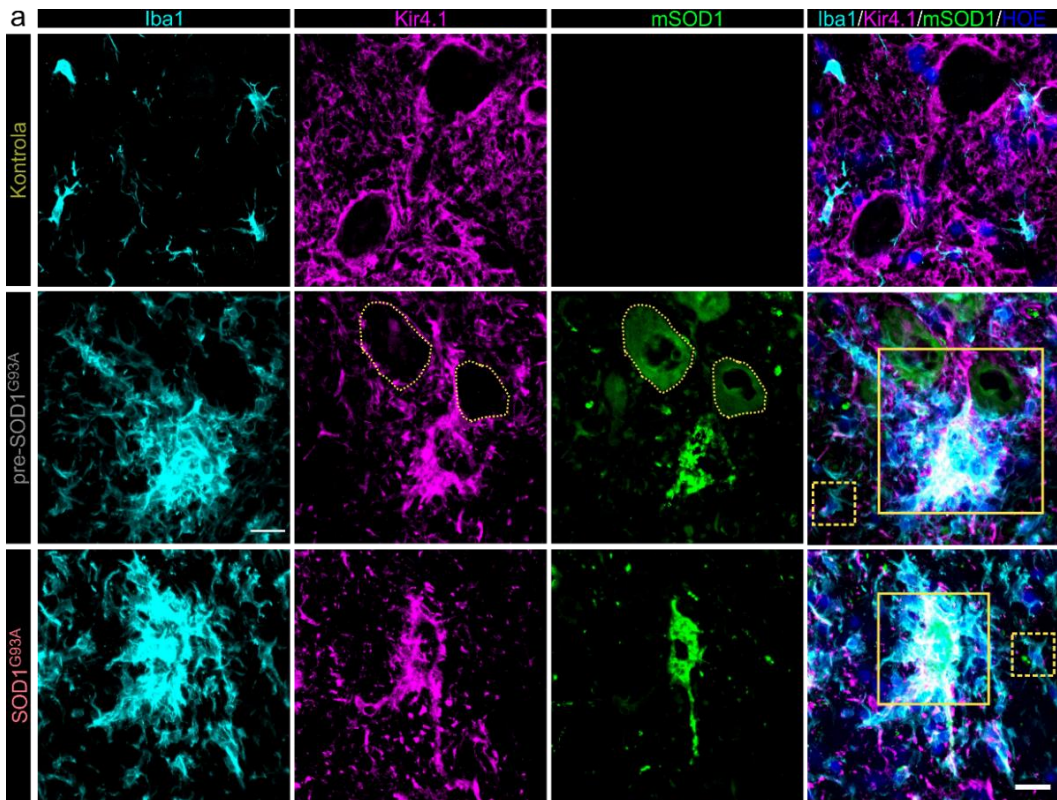
Skorašnja studija je pokazala da subpopulacije mikroglije koja je pozitivna na CD34, marker hematopoetskih matičnih i progenitorskih ćelija, formira klastere lokalizovane u ventralnim rogovima SOD1^{G93A} pacova (Kovacs et al., 2019). Kako bi se ispitalo da li je ova subpopulacija mikroglije prisutna i u Kir4.1⁺ klasterima, imunofluorescentno su obeleženi CD34 i Kir4.1. U kontrolnoj kičmenoj moždini, CD34 obeležava krvne sudove, a sporadično se mogu uočiti i pojedinačne CD34⁺ ćelije (Slika 17a). CD34 signal je povećan u ventralnim rogovima simptomatskih ALS pacova i uočava se u pojedinačnim ćelijama, ali i u Kir4.1⁺ klasterima (Slika 17a,b). Kvantifikacija Kir4.1 signala normalizovanog na CD34 signal (Kir4.1/CD34) je pokazala povećanje lokalizacije Kir4.1 i CD34 u klasterima mikroglije u odnosu na pojedinačne ćelije ($P < 0,001$, Studentov t-test), ukazujući na povećanu ekspresiju CD34 u Kir4.1⁺ klasterima.



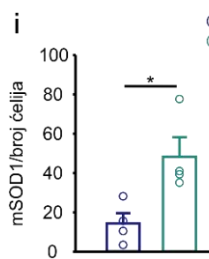
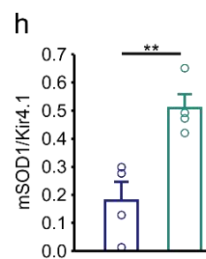
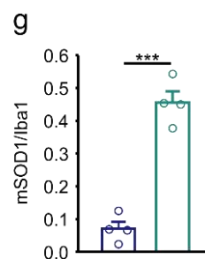
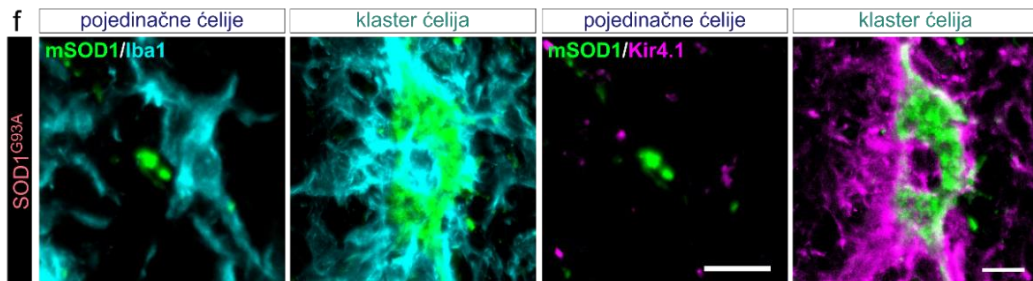
Slika 17. CD34⁺ mikroglija u Kir4.1⁺ klasterima u ventralnim rogovima lumbalnog regiona SOD1^{G93A} kičmene moždine. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije klastera diferencijacije 34 (CD34, cijan), Kir4.1 kanala (magenta), i Hoechst boje za nukleuse (HOE, plavo) u ventralnim rogovima lumbalnog regiona kičmene moždine u kontrolnoj i SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. Skala 20 μ m. Kvadrat isprekidane linije označava uveličane pojedinačno raspoređene ćelije, dok kvadrat pune linije označava uveličani deo klastera mikroglije prikazane u panelu b. (b) Preklap CD34 i Kir4.1 imunofluorescentnih signala u klasteru i pojedinačnim ćelijama. Skala 10 μ m. (c) Odnos površina Kir4.1 i CD34 signala, Kir4.1/CD34, je značajno povećan u ćelijskim klasterima u odnosu na pojedinačnu CD34⁺ mikrogliju u SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. Broj životinja u kontrolnoj i SOD1^{G93A} grupi je isti, N=4. Vertikalni nizovi tačaka predstavljaju srednju vrednost za svaku životinju. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. ***P < 0,001.

4.2.4 Kir4.1⁺ klasteri su regioni izražene ekspresije mSOD1 u ventralnim rogovima kičmene moždine ALS pacova

Kod ALS pacijenata i u animalnim modelima sa mutacijom u genu *SOD1* pokazano je da degenerišući motorni neuroni ekspimiraju mutiranu SOD1, koja se sa progresijom bolesti akumulira i formira agregate (Gurney et al., 1994; Rakhit et al., 2007; Saxena et al., 2013). Mikroglija formira klasterne oko degenerišućih motornih neurona u kičmenoj moždini ALS pacovskog modela (Sanagi et al., 2010). Da bismo ispitali da li Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasteri odgovaraju degenerišućim motornim neuronima u kojima su prisutni mSOD1 agregati, imunofluorescentno smo obeležili mSOD1, Kir4.1 i Iba1 na presecima lumbalnog regiona u kontrolnoj, pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. U kičmenoj moždini kontrolnih životinja nije uočeno prisustvo mSOD1 signala (Slika 18a). Ekspresija mSOD1 u vidu agregata je uočena u ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmene moždine, a posebno je izražena u Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasterima (Slika 18a,b,f) ukazujući na prisustvo degenerišućih motornih neurona na mestima Kir4.1⁺ klastera. Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasteri ćelija nisu uočeni oko neurona koji difuzno ekspimiraju mSOD1 u pre-SOD1^{G93A} kičmenoj moždini (Slika 18a). Kvantifikacija površine mSOD1 signala u odnosu na Iba1 signal (mSOD1/Iba1) pokazuje značajno povećanje mutirane SOD1 u klasterima mikroglije u odnosu na pojedinačne ćelije mikroglije u ventralnim rogovima u pre-SOD1^{G93A} (Slika 18c, P<0,001, Studentov t-test) i SOD1^{G93A} (Slika 18g, P<0,001, Studentov t-test) kičmenim moždinama. Odnos površine signala mSOD1 i



○ pojedinačne ćelije
○ klaster ćelija



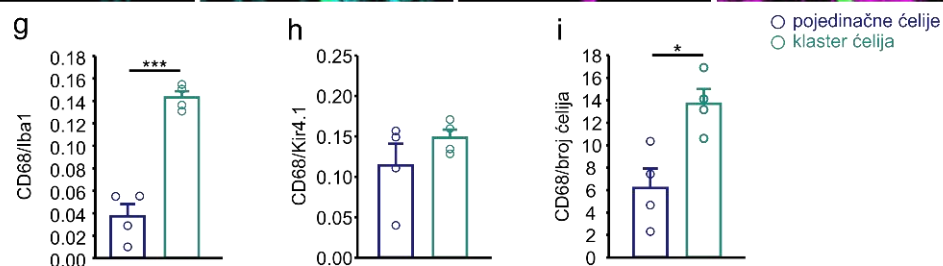
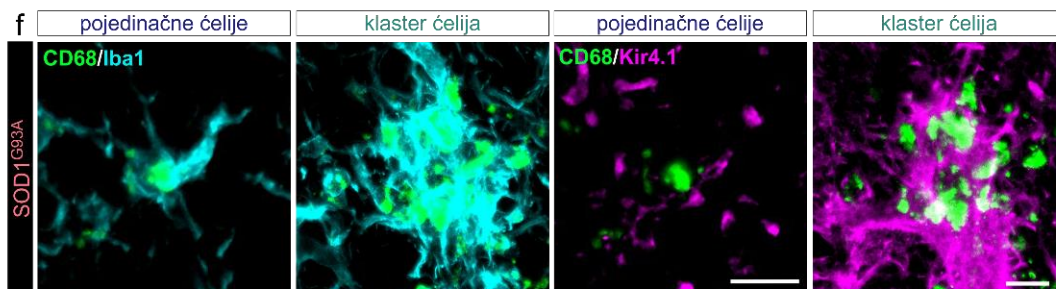
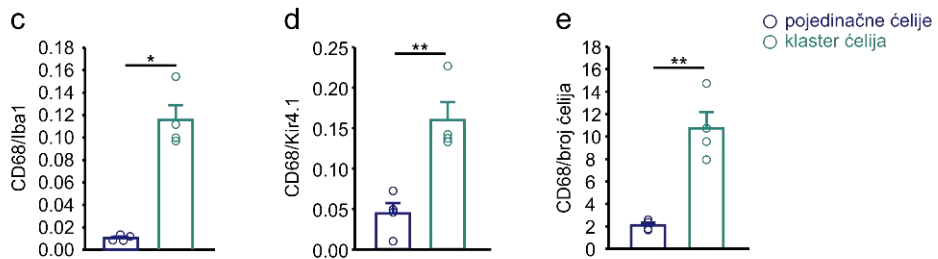
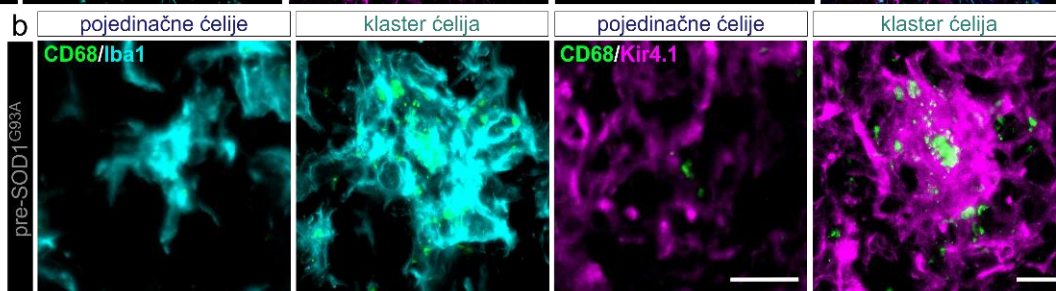
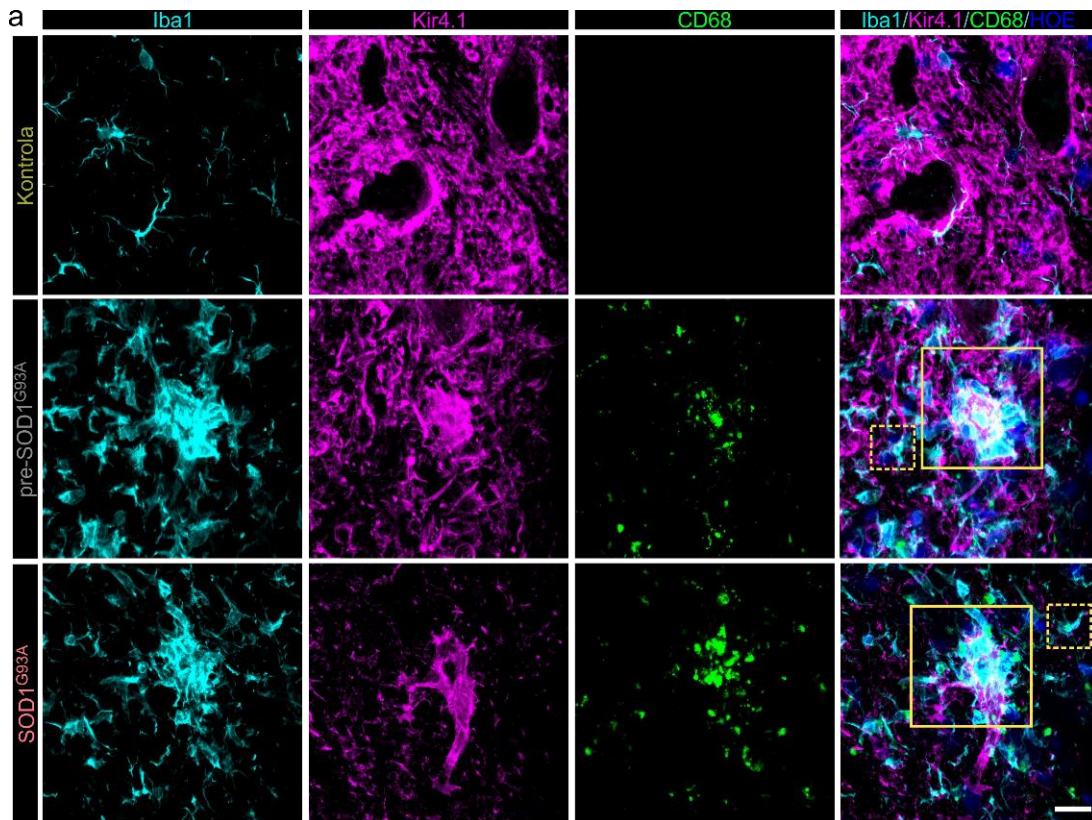
○ pojedinačne ćelije
○ klaster ćelija

Slika 18. mSOD1 je eksprimirana u Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasterima u ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmene moždine. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije imunofluorescentno obeležene mikroglije na Iba1 (cijan), Kir4.1 (magenta), mSOD1 (zeleno) i Hoechst marker nukleusa (HOE, plavo) u ventralnim rogovima lumbalnog regiona kontrolne, pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Skala 20 μ m. Isprekidanom linijom su oivičeni motorni neuroni koji difuzno eksprimiraju mSOD1 i nisu okruženi klasterima Kir4.1⁺. Kvadratima pune linije su obeleženi delovi klastera mikroglije, kvadrati isprekidane linije obeležavaju pojedinačno raspoređene ćelije aktivirane mikroglije uveličane u panelima b i f. (b,f) Preklap signala mSOD1/Iba1 i mSOD1/Kir4.1 u klasterima i pojedinačnim ćelijama u (b) pre-SOD1^{G93A} odnosno (f) SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. Skala 10 μ m. (c,g) Površina signala mSOD1 normalizovana na površinu Iba1 signala, mSOD1/Iba1, značajno je povećana u ćelijskim klasterima u odnosu na pojedinačne ćelije u ventralnim rogovima (c) pre-SOD1^{G93A} odnosno (g) SOD1^{G93A} kičmenih moždina. (d,h) Odnos površina mSOD1 i Kir4.1 signala, mSOD1/Kir4.1 je značajno povećan u ćelijskim klasterima mikroglije u poređenju sa pojedinačnim ćelijama u lumbalnom regionu (d) pre-SOD1^{G93A} i (h) SOD1^{G93A} kičmene moždine. (e,i) mSOD1 signal normalizovan na broj ćelija, mSOD1/broj ćelija, značajno je povećan u ćelijama koje formiraju klaster u odnosu na pojedinačne ćelije u (e) pre-SOD1^{G93A} odnosno SOD1^{G93A} ventralnim rogovima kičmene moždine. Broj životinja u kontrolnoj (N=8), pre-SOD1^{G93A} (N=4) i SOD1^{G93A} (N=4) grupi isti je za panele c-i. Vertikalni nizovi tačaka predstavljaju srednje vrednosti za svaku životinju. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Kir4.1 (mSOD1/Kir4.1) je značajno povećan u klasterima u odnosu na pojedinačne Iba1⁺ ćelije u pre-SOD1^{G93A} (Slika 18d, P=0,00705, Studentov t-test) i SOD1^{G93A} (Slika 18h, P=0,00753, Studentov t-test) kičmenim moždinama. Normalizacija mSOD1 signala na broj ćelija (mSOD1/broj ćelija) pokazuje da je ekspresija mSOD1 značajno veća po jednoj ćeliji klastera u odnosu na ćelije van klastera u pre-SOD1^{G93A} (Slika 18e, P<0,001, Studentov t-test) i SOD1^{G93A} (Slika 18i, P=0,0231, Studentov t-test) ventralnim rogovima kičmene moždine. Dobijeni rezultati pokazuju da se Kir4.1⁺ klasteri u kojima se grupiše mikroglija formiraju u regionima u kojima su prisutni mSOD1 agregati sugerišući lokalizaciju Kir4.1 i mutirane SOD1 u neuroinflamaciji u ALS.

4.2.5 Povećanje ekspresije CD68 u Iba1⁺/Kir4.1⁺ klasterima u ventralnim rogovima

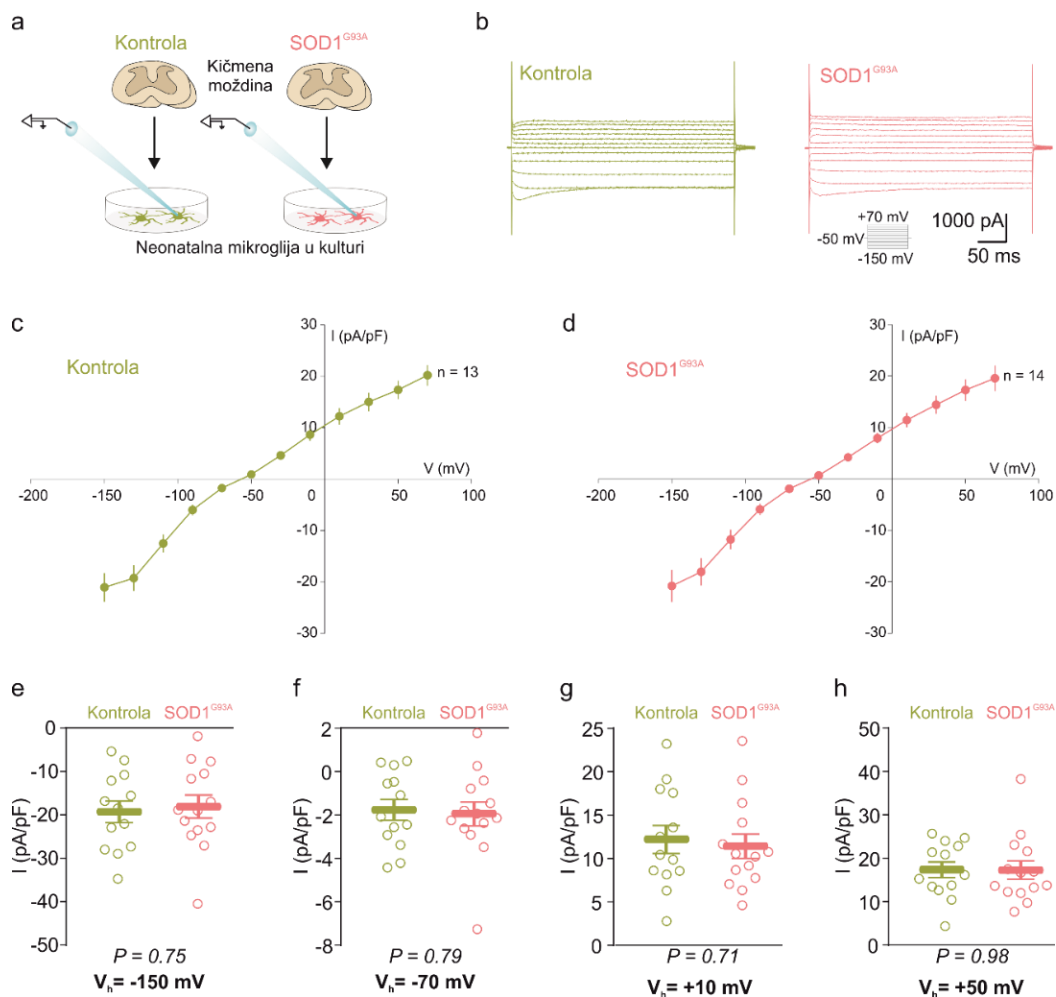
Jedna od osnovnih karakteristika aktivirane mikroglije jeste fagocitoza. Klasteri mikroglije koji se formiraju oko degenerišućih motornih neurona nakon izazvane povrede imaju povećanu fagocitnu aktivnost (Rotterman & Alvarez, 2020). U cilju ispitivanja funkcionalnih odlika mikroglije u Kir4.1⁺ klasterima i pojedinačnim ćelijama mikroglije imunofluorescentno smo obeležili ćelije za CD68 – marker aktivacije mikroglije i protein koji je uključen u njenu fagocitnu ulogu, Iba1 i Kir4.1 u kontrolnoj, pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmenoj moždini pacova (Slika 19a,b,g). Normalizacijom CD68 signala na površinu Iba1 signala (CD68/Iba1) pokazano je da je marker aktivacije i fagocitnih vezikula u ćelijskim klasterima mikroglije u odnosu na pojedinačne ćelije značajno povećan u pre-SOD1^{G93A} (Slika 19c, P=0,029, Mann Whitney Rank Sum test) i SOD1^{G93A} (P<0,001, Studentov t-test) ventralnim rogovima. Odnos površina CD68 i Kir4.1 (CD68/Kir4.1) takođe pokazuje značajno povećan preklap signala ovih markera u klasterima mikroglije u odnosu na pojedinačno raspoređene ćelije u pre-SOD1^{G93A} (Slika 19c, P=0,00423, Studentov t-test), dok lokalizacija nije statistički značajno promenjena u SOD1^{G93A} (Slika 19h, P=0,276, Studentov t-test) kičmenim moždinama. Normalizacija CD68 signala na broj ćelija (CD68/broj ćelija) ukazuje na to da su aktivacija i prisustvo fagocitnih vezikula u pojedinačnim ćelijama mikroglije u klasteru značajno povećani u odnosu na ćelija van klastera u pre-SOD1^{G93A} (Slika 19e, P=0,00106, Studentov t-test) i SOD1^{G93A} (Slika 19i, P=0,0135, Studentov t-test) kičmenoj moždini. Dobijeni rezultati ukazuju na povećano prisustvo fagocitnih vezikula u ćelijama mikroglije u okviru Kir4.1⁺ klastera u odnosu na pojedinačne ćelije u lumbalnom regionu kičmene moždine ALS pacova.



Slika 19. Povećana ekspresija markera aktivacije i fagocitnih vezikula u Iba1⁺/Kir4.1⁺ klasterima u ventralnim rogovima kičmene moždine pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} pacova. (a) Reprezentativne konfokalne mikrografije mikroglije imunofluorescentno obeležene na Iba1 (cijan), Kir4.1 kanal (magenta), marker fagocitoze CD68 (zeleno) i Hoechst marker nukleusa (HOE, plavo) u ventralnim rogovima lumbalnog regiona kontrolne, pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Skala 20 μ m. Regioni obeleženi kvadratima pune i isprekidane linije označavaju klasterne odnosno pojedinačne ćelije prikazane uveličano na panelima b i f. **(b, f)** Preklap Iba1, Kir4.1 i CD68 imunofluorescentnih signala u klasterima mikroglije i pojedinačnim ćelijama **(b)** pre-SOD1^{G93A} odnosno **(f)** SOD1^{G93A} kičmene moždine. Skala 10 μ m. **(c, g)** Odnos površina CD68 i Iba1 signala, CD68/Iba1, je značajno povećan u klasterima mikroglije u odnosu na pojedinačne ćelije u **(c)** pre-SOD1^{G93A} odnosno **(g)** SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. **(d)** Površina signala imunofluorescencije CD68 normalizovana na Kir4.1 signal, CD68/Kir4.1, je značajno povećana u klasterima mikroglije u odnosu na pojedinačne ćelije u ventralnim rogovima **(d)** pre-SOD1^{G93A} dok ta razlika nije statistički značajna u **(h)** SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. **(e,i)** Površina imunofluorescencije CD68 signala normalizovana na broj ćelija, CD68/broj ćelija, je povećana u ćelijama koje formiraju klasterne u odnosu na pojedinačno raspoređenu mikrogliju u **(e)** pre-SOD1^{G93A} odnosno **(i)** SOD1^{G93A} kičmenoj moždini. Broj životinja u kontrolnoj (N=8), pre-SOD1^{G93A} (N=4) i SOD1^{G93A} (N=4) grupi je isti za panele c-i. Vertikalni nizovi tačaka predstavljaju srednje vrednosti za svaku životinju. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

4.2.6 Jonske struje kod mikroglije u kulturi dobijenoj iz kičmene moždine neonatalnih ALS životinja

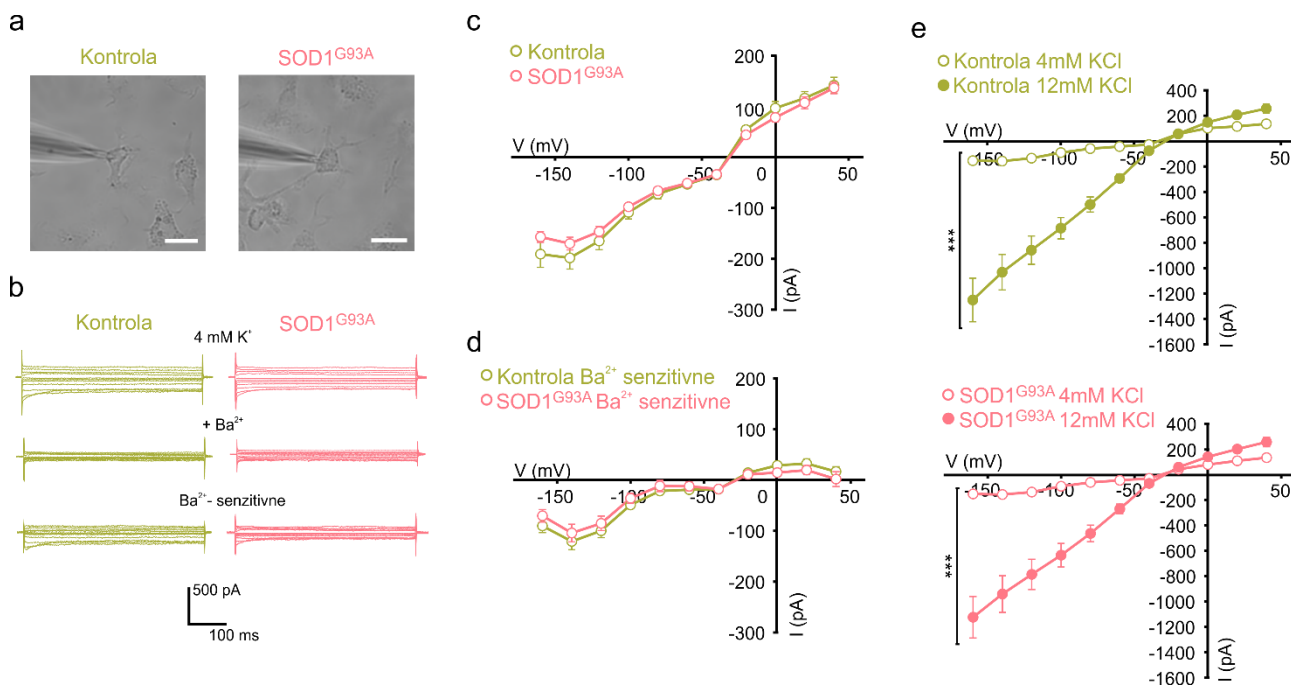
Aktivacija mikroglije dovodi do brojnih funkcionalnih promena koje se dešavaju preko kaskade vanćelijskih i unutarćelijskih događaja pri čemu se jonski kanali nalaze u osnovi ovih procesa (Cojocar et al., 2021). U neuroinflamaciji dolazi do promena u ekspresiji jonskih kanala u mikrogliji, koji su u osnovi ćelijskih procesa među kojima su i proliferacija, migracija i fagocitoza (Black et al., 2009; Cojocar et al., 2021; Gattlen et al., 2020). Kao što je pokazano, mikroglija se grupiše u Kir4.1⁺ klasterima u ventralnim rogovima ALS kičmene moždine i pokazuje povećanu fagocitnu aktivnost,



Slika 20. Elektrofiziološki zapisi dobijeni tehnikom nametanja voltaže na deliću membrane u konfiguraciji „cela ćelija“ iz mikroglije izolovane iz kičmenih moždina neonatalnih kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova na modifikovanom sistemu za elektrofiziološka merenja. (a) Šematski prikaz nametanja voltaže na delić membrane u konfiguraciji „cela ćelija“ na primarnoj kulturi mikroglije izolovanoj iz kičmenih moždina neonatalnih kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova. **(b)** Primeri zapisa gustine struja mikroglije iz kultura kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova u odgovoru na seriju stepenastih membranskih potencijala (protokol prikazan ispod zapisa). **(c, d)** I/V krive prikazuju prosečan odnos gustine struja u odnosu na nametnutu voltažu u **(c)** kontrolnoj i **(d)** SOD1^{G93A} mikrogliji. **(e-h)** Poređenje gustine struja između kontrolne i SOD1^{G93A} mikroglije na različitim nametnutim potencijalima naznačenim na dnu svakog panela. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. Prikazane su tačne P vrednosti, a primenjen je Studentov t-test.

što nas je navelo da ispitamo i membranska biofizička svojstva i profil struja u ALS mikrogliji.

Metodom nametanja voltaže na delić membrane u konfiguraciji „cela ćelija“ merene su struje u mikrogliji izolovane iz kičmenih moždina neonatalnih kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova (Slika 20c,d). Poređenjem gustina ulaznih struja na različitim voltažama -150, -70, +10 i +50 mV nije uočena razlika u ALS mikrogliji u odnosu na kontrolnu (Slika 20e,f,g,h). Naime, I/V profili struja kontrolne i ALS mikroglije pokazuju slična svojstva u ulaznim i izlaznim strujama (Slika 21b-gornji zapisi, 21c), a nije uočena ni razlika u izolovanim Ba²⁺-senzitivnim Kir komponentama između kontrolnih i SOD1^{G93A} ćelija (Slika 21b-donji zapisi, 21d). Povećanje koncentracije [K⁺]_o sa 4 na 12 mM dovelo je do značajnog povećanja u ulaznim strujama i u kontrolnoj (P<0,0001, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom) i u ALS neonatalnoj mikrogliji (P<0,0001, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom), ali ovo povećanje je bilo slično u kontrolnoj i ALS neonatalnoj mikrogliji (Slika 21e). Naši rezultati su u skladu sa skorašnjom studijom koja je pokazala sličan transkriptom neonatalne ALS i kontrolne mikroglije (Guttenplan et al., 2020). Takođe, druga studija je pokazala da neonatalna ALS mikroglija u kokulturi sa motornim neuronima ne dovodi do smrti motornih neurona, što nije bio slučaj sa adultnom mikroglijom (Frakes et al., 2014) ukazujući na različite odlike

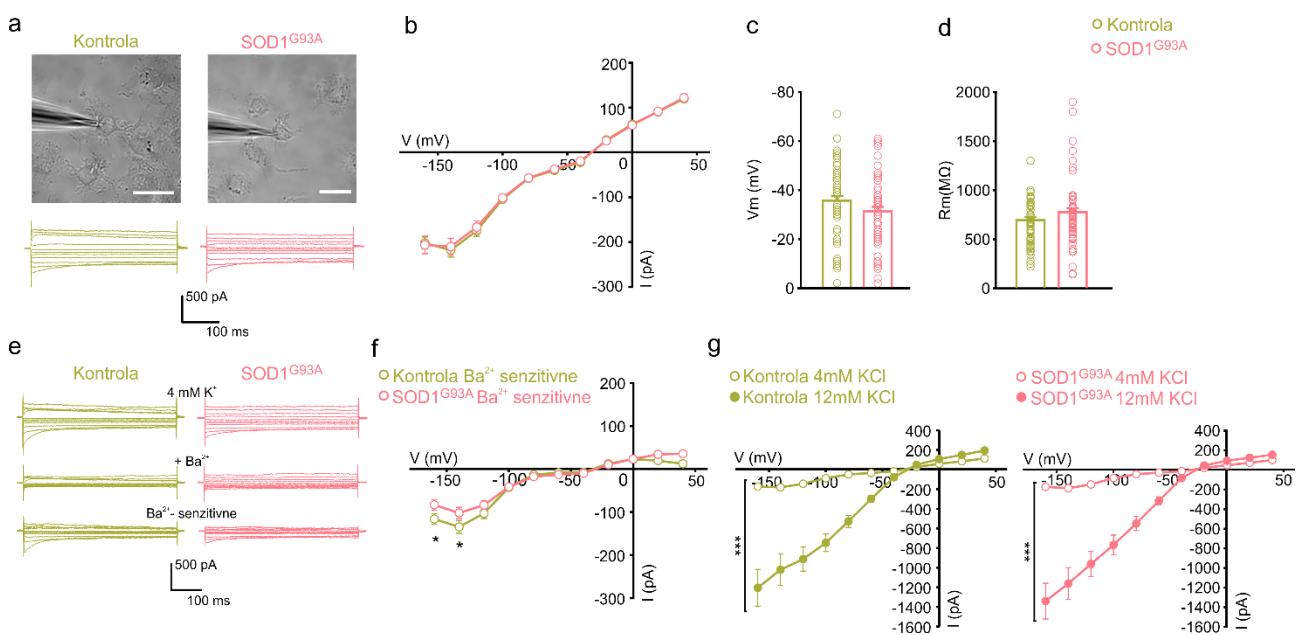


Slika 21. Biofizičke karakteristike mikroglije u kulturi izolovanoj iz kičmenih moždina neonatalnih kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova primenom standardnog sistema za elektrofiziološka merenja. (a) Reprezentativne mikrofotografije elektrofiziološke postavke sa ćelijama, snimljene svetlosnim mikroskopom i reprezentativni primeri zapisa struja u 4 mM [K⁺]_o u prisustvu Ba²⁺ i izolovane Ba²⁺-senzitivne struje u kontrolnoj (zeleno) i SOD1^{G93A} (crveno) neonatalnoj mikrogliji. Skala 100 μm. **(b)** I/V kriva predstavlja profil struja u konfiguraciji “cela ćelija” u odnosu na nametnutu voltažu u kontrolnoj (n=46 ćelija) i SOD1^{G93A} (n=41 ćelije) mikrogliji. **(c)** I/V kriva Ba²⁺-senzitivnih struja u kontrolnoj (n=16 ćelija) i SOD1^{G93A} (n=19 ćelija) neonatalnoj mikrogliji. **(d)** I/V krive pokazuju povećanje ulaznih struja u kontrolnoj (n=22 ćelija) i SOD1^{G93A} (n=22 ćelija) mikrogliji u odgovoru na povećanje [K⁺]_o sa 4 mM na 12 mM. Ćelije u svakoj eksperimentalnoj grupi su dobijene iz 3 nezavisne izolacije kulture. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. ***P < 0,001.

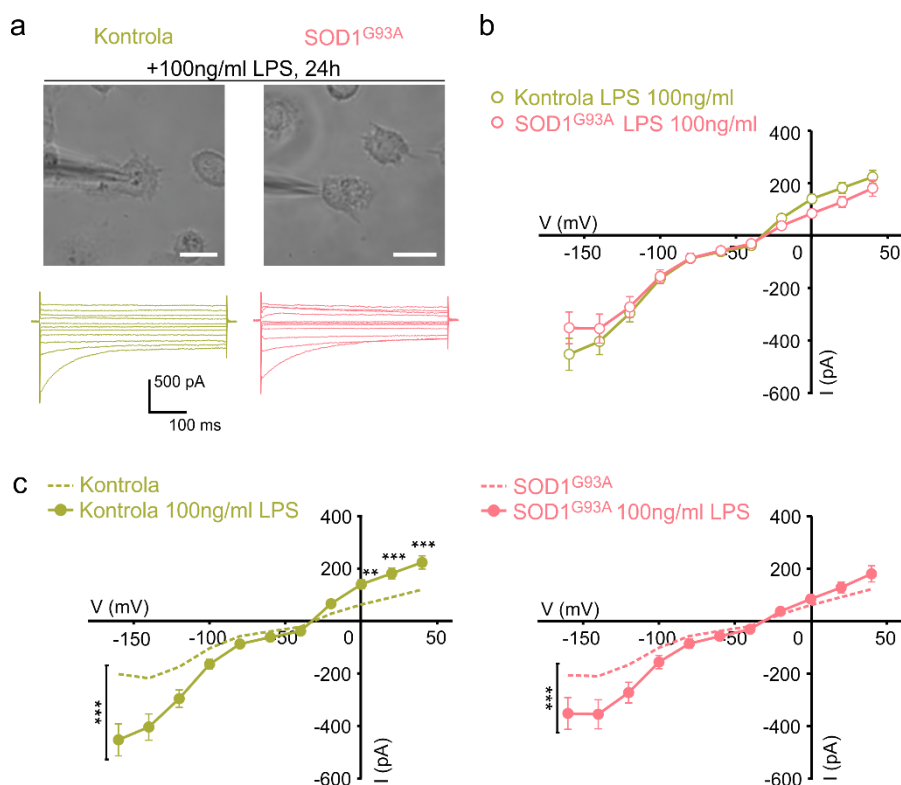
adultne i neonatalne ALS mikroglije. Naime, ispitivanje genske ekspresije je i pokazalo da mikroglija izolovana iz adultnih životinja ima specifičan set gena karakterističan i za druge neurodegenerativne bolesti (Holtman et al., 2015) te smo stoga dalju karakterizaciju elektrofizioloških osobina mikroglije ispitali na kulturi iz adultnih kontrolnih i ALS životinja.

4.2.7 Elektrofiziološke odlike mikroglije u kulturi izolovanoj iz kičmene moždine adultnog SOD1^{G93A} pacova

Primarna kultura mikroglije (Slika 22a) je izolovana iz kičmene moždine kontrolnog i simptomatskog ALS pacova, i ispitana su njena elektrofiziološka svojstva metodom nametanja voltaže na delić membrane. Profil I/V krive izmerenih struja u konfiguraciji „cela ćelija“ nije pokazao razliku između kontrolne i SOD1^{G93A} mikroglije (Slika 22a,b). Potencijal membrane (V_m) i otpor membrane (R_m) takođe su nepromenjeni u kontrolnim i SOD1^{G93A} ćelijama (Slika 22 c,d). Kir struje su osetljive na prisustvo jona Ba^{2+} u vanćelijaskom rastvoru (Ransom & Sontheimer, 1995). Struje su merene u 4 mM $[K^+]_o$ i u prisustvu $BaCl_2$ (Slika 22e). Ba^{2+} -senzitivne Kir struje su izolovane oduzimanjem zapisa dobijenih u prisustvu Ba^{2+} od zapisa u 4mM $[K^+]_o$ i uočeno je smanjenje Kir struja na voltadžama od -160 i -140 mV u ALS u odnosu na kontrolnu mikrogliju (Slika 22e,f, $P=0,0266$ odnosno $P=0,0397$, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom). Povećanje koncentracije $[K^+]_o$ sa 4 na 12 mM je dovelo do značajnog povećanja ulaznih struja jednako i u kontrolnoj i u ALS mikrogliji (Slika 22g, $P<0,0001$, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom). Sumirano, dobijeni podaci pokazuju da je Ba^{2+} -senzitivna komponenta Kir struja smanjena, dok su ostala bazična svojstva nepromenjena u ALS mikrogliji.



Slika 22. Membranska biofizička svojstva mikroglije u kulturi izolovanoj iz kičmene moždine adultnih kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova. (a) Reprerativne svetlosne mikrografije elektrofiziološke postavke sa ćelijama i primeri zapisa struja kontrolne (zeleno) i SOD1^{G93A} (crveno) mikroglije u kulturi. Skala 100 μ m. (b) I/V kriva predstavlja profil struja u konfiguraciji „cela ćelija“ u odnosu na nametnutu voltažu u kontrolnoj (n=65 ćelija) i SOD1^{G93A} (n=72 ćelije) mikrogliji. (c, d) Potencijal membrane (V_m) i otpor membrane (R_m) ćelija mikroglije u kontrolnoj (n=65 ćelija) i SOD1^{G93A} (n=72 ćelije) kulturi. (e) Reprerativni primeri zapisa struja u 4 mM $[K^+]_o$ u prisustvu Ba^{2+} i izolovane Ba^{2+} -senzitivne struje u kontrolnoj (zeleno) i SOD1^{G93A} (crveno) mikrogliji. (f) I/V kriva Ba^{2+} -senzitivnih struja pokazuje smanjenje ulaznih struja na voltadžama od -160 mV i -140 mV u SOD1^{G93A} (n=32 ćelije) u odnosu na kontrolnu (n=31 ćelija) mikrogliju. (g) I/V krive pokazuju povećanje ulaznih struja u kontrolnoj (n=25 ćelija) i SOD1^{G93A} (n=18 ćelija) mikrogliji u odgovoru na povećanje koncentracije $[K^+]_o$ sa 4 mM na 12 mM. Ćelije u svakoj eksperimentalnoj grupi su dobijene iz najmanje 4 nezavisne izolacije kulture. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.



Slika 23. Elektrofiziološke karakteristike mikroglije u kulturi izolovanoj iz kičmene moždine adultnih kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova nakon tretmana LPS. (a,b) Reprezentativne svetlosne mikrografije elektrofiziološke postavke sa ćelijama i reprezentativni primeri zapisa struja u 4 mM [K⁺]_o kontrolne (zeleno) i SOD1^{G93A} (crveno) mikroglije. Skala 100 μm. (b) I/V kriva predstavlja profil struja mikroglije u konfiguraciji “cela ćelija” 24h posle tretmana LPS u kontrolnoj (n=27 ćelija) i SOD1^{G93A} (n=24 ćelije) kulturi. (c) I/V kriva prikazuje profil struja kontrolne i SOD1^{G93A} mikroglije gajene u standardnom medijumu i tretirane 24h LPS. Amplituda ulaznih struja u mikrogliji se povećava nakon tretmana LPS u kontroli i SOD1^{G93A}. U kontrolnoj mikrogliji uočava se povećanje i izlaznih struja. Ćelije u svakoj eksperimentalnoj grupi su dobijene iz najmanje 3 nezavisne pripreme kulture. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna greška. **P < 0,01, ***P < 0,001.

S obzirom na to da se u neuroinflamaciji u ALS mikroglija aktivira, u cilju dalje karakterizacije mikroglije tretirali smo kontrolnu i SOD1^{G93A} mikrogliju u kulturi izolovanoj iz adultne kičmene moždine LPS u koncentraciji 100 ng/ml tokom 24h (Slika 23a). I/V krive ALS i kontrolne mikroglije su slične nakon tretmana LPS (Slika 23b). Dodavanje LPS je izazvalo značajno povećanje ulaznih struja i u kontrolnoj (P<0,0001, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom) i u SOD1^{G93A} mikrogliji tretiranoj LPS (P<0,0001, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom). U kontrolnoj mikrogliji je nakon tretmana LPS primećeno i povećanje izlaznih struja (P<0,0001, Dvofaktorska ANOVA sa Sidak post-hoc testom), dok u SOD1^{G93A} mikrogliji ovaj tretman nije izazvao promenu voltažne zavisnosti izlaznih struja sugerišući narušena svojstva jonskih kanala u osnovi ovih strujnih komponenta u aktiviranoj mikrogliji u ALS.

5. Diskusija

Održavanje homeostaze K^+ je neophodno za pravilno funkcionisanje CNS. Astrociti i oligodendrociti ekspimiraju kanal Kir4.1 koji ima značajnu ulogu u regulisanju vanćelijske koncentracije K^+ (Larsen & MacAulay, 2014; Sibille et al., 2015). Redukovana ekspresija Kir4.1 pokazana u astrocitima (Bataveljić et al., 2012; Kaiser et al., 2006), a u našoj studiji pokazana i u oligodendrocitima u ALS, ukazuje na narušenu homeostazu K^+ u ovoj bolesti. Povećana koncentracija vanćelijskog K^+ ne samo da dovodi do depolarizacije, hiperekscitabilnosti, smanjenja veličine tela i degeneracije neurona (Dong et al., 2009; Kelley et al., 2018; Mahmoud et al., 2019), već narušava i osnovne funkcionalne karakteristike glijskih ćelija (Djukic et al., 2007; Madry et al., 2018; X. Tong et al., 2014). Kir4.1 ima ulogu u sazrevanju oligodendrocita i njegova delecija specifično u ovom ćelijskom tipu dovodi do motornih oštećenja (Larson et al., 2018; Neusch et al., 2001). Povećana vanćelijska koncentracija K^+ dovodi i do aktivacije mikroglije (Ábrahám et al., 2001). Mikrogliju u ALS odlikuje aktivacija, oslobađanje inflamacijskih faktora i fagocitna aktivnost (B. E. Clarke & Patani, 2020). Iako se smatra da u početku mikroglija ima anti-inflamacijski fenotip, sa razvojem bolesti mikroglija u ALS pokazuje pro-inflamacijski i neurotoksični fenotip (B. E. Clarke & Patani, 2020; Michell-Robinson et al., 2015). Oligodendrociti su, usled izraženih metaboličkih potreba, posebno osetljivi na faktore inflamacije koje oslobađa mikroglija (Peferoen et al., 2014). Oligodendrociti pokazuju degenerativne promene u ALS, a novoformirani oligodendrociti ne dostižu zrelost i ne formiraju mijelin (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). U ovoj doktorskoj studiji pokazali smo ne samo morfološke promene ALS oligodendrocita, već i narušena svojstva Kir kanala i smanjenu mogućnost odgovora ALS oligodendrocita u kulturi na povećanu koncentraciju vanćelijskog K^+ . Sa druge strane, uočili smo i morfološke i fenotipske promene u mikrogliji u vidu formiranja klastera u ventralnim rogovima i povećane fagocitne aktivnosti. Izražena lokalizacija Kir4.1 i agregata mSOD1 u klasterima mikroglije na mestima degeneracije motornih neurona ukazuje na potencijalni značaj Kir4.1 proteina u patološkim promenama u ALS. Promene u ekspresiji Kir4.1 uočene su i u drugim neurodegeneracijama kao što su AB i HB, kao i u MS, ali i u epilepsiji i u autističnim poremećajima (Ohno et al., 2021; Schirmer et al., 2014; X. Tong et al., 2014; Wilcock et al., 2009). Precizna vremenska i prostorna interakcija oligodendrocita, mikroglije i astrocita ima za cilj održavanje homeostaze u vanćelijskoj sredini u cilju obezbeđivanja neometanog funkcionisanja neurona. Uočene promene ekspresije i funkcije Kir4.1 u oligodendrocitima, specifična redistribucija ekspresije ovog kanala u klasterima mikroglije u ALS, kao i promene njegove funkcionalnosti i ekspresije u drugim bolestima CNS, ukazuju na značaj Kir4.1 u mehanizmima neurodegeneracije.

5.1 Značaj oligodendrocita u ALS

Oligodendrociti su funkcionalno značajne ćelije CNS koje blisko interaguju sa aksonima i imaju posebnu ulogu u pružanju metaboličke potpore neuronima (Y. Lee et al., 2012; Nave, 2010; Saab et al., 2013). Oligodendrociti ekspimiraju jonske kanale, među kojima se posebno ističe ekspresija ulaznog ispravljačkog kalijumovog kanala Kir4.1 čija je značajna funkcija u održavanju homeostaze K^+ (Neusch et al., 2001; Poopalasundaram et al., 2000). Primenom različitih metoda ispitali smo promene na nivou Kir4.1 kanala u oligodendrocitima u ALS. Imunofluorescentnim obeležavanjem pokazano je značajno smanjenje ekspresije Kir4.1 u oligodendrocitima u ventralnim rogovima lumbalnog i cervikalnog regiona kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova. Ekspresija Kir4.1 je redukovana i u mijelinskoj frakciji izolovanoj iz kičmene moždine istog ALS modela. U kičmenoj moždini ALS pacova uočen je povećan broj oligodendrocita izmenjene morfologije. Ispitivanje elektrofizioloških svojstava primarnih oligodendrocita u kulturi iz kičmenih moždina kontrolnih i SOD1^{G93A} pacova je ukazalo na izmenjena membranska svojstva i redukciju ulaznih struja u ALS oligodendrocitima. Ba²⁺-senzitivne Kir struje su značajno redukovane u SOD1^{G93A} oligodendrocitima. Takođe, uočeno je da je ulazna struja SOD1^{G93A} oligodendrocita manje senzitivna na povećanje vanćelijskog K^+ . Svi ovi rezultati zajedno ukazuju na narušenu funkcionalnost Kir4.1

kanala u oligodendrocitima i ističu jedan aspekt značaja oligodendrocita u patofiziologiji ALS (Slika 24).

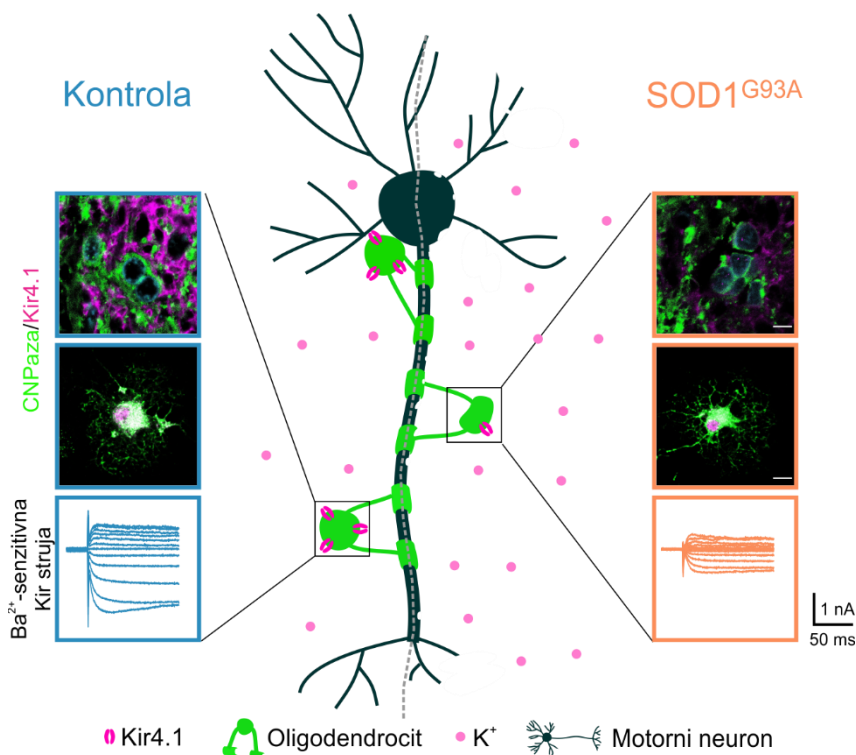
5.1.1 Degenerativne promene u ALS oligodendrocitima

Inicijalna indikacija uključenosti oligodendrocita u ALS patologiju je bila detekcija proteinskih agregata u ovim ćelijama u nekoliko zahvaćenih regiona CNS (Lorente Pons et al., 2020; Philips et al., 2013; Stieber et al., 2000). Značajni nivo mutirane SOD1 detektovan je i u oligodendrocitima kičmene moždine miša u ALS modelu (Sun et al., 2015). Studije su ukazale da oligodendrociti koji eksprimiraju mutirane forme proteina uključenih u ALS, dovode do povećanog umiranja motornih neurona (Ferraiuolo et al., 2016; Kim et al., 2019). Naime, pokazano je da oligodendrociti diferencirani iz pluripotentnih matičnih ćelija ALS pacijenata ili SOD1^{G93A} pacova dovode do smrti motornih neurona *in vitro* (Ferraiuolo et al., 2016). Takođe, selektivna ekspresija mutirane SOD1 u oligodendrocitima je izazvala gubitak motornih neurona i narušenu organizaciju mijelina (Kim et al., 2019). Poremećena mijelinizacija u ALS je povezana sa promenama ekspresije nekoliko gena koji su bitni za sastav i funkciju mijelina, kao što su *Cnp1*, *Mbp*, *Mog*, *Mag* i *Sox10* (Scekic-Zahirovic et al., 2017; Sun et al., 2015). Rezultati ove studije su pokazali da kod SOD1^{G93A} oligodendrocita dolazi do specifičnih morfoloških promena koje su odlikuju izduženim oblikom nukleusa u ventralnim rogovima kičmene moždine. Broj oligodendrocita koji imaju izmenjenu morfologiju je povećan u ventralnoj sivoj masi ALS pacova. Uočena promena bi mogla predstavljati novi novi indikator ćelijske degeneracije pored već pokazane fragmentacije, promene u volumenu, izdužene reaktivne morfologije i drugih degenerativnih promena uočenih kod ALS pacijenata, kao i u mišjim modelima bolesti (Kang et al., 2013; Nonneman et al., 2014; Philips et al., 2013). Studije su ukazale na prisustvo promena u morfologiji oligodendrocita u mišjem SOD1^{G93A} modelu pre početka bolesti, a sa progresijom bolesti ove promene su postajale izraženije (Philips et al., 2013). Pored toga, određeni broj oligodendrocita izmenjene morfologije je bio pozitivan na aktiviranu kaspazu-3, ukazujući na pojavu apoptoze oligodendrocita u ovoj patologiji (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Iako oligodendrociti degenerišu u ALS, ukupan broj oligodendrocita tokom progresije bolesti nije se menjao, što se može objasniti konstantnim dopunjavanjem proliferišućim prekursorskim ćelijama oligodendrocita (Kang et al., 2010, 2013; Philips et al., 2013). U skladu sa literaturnim podacima je i rezultat ove studije koji pokazuje nepromenjeni nivo ekspresije CNPaze u SOD1^{G93A} transgenom pacovu, ukazujući time na približno isto prisustvo CNPaza⁺ oligodendrocita u kontrolnoj i ALS kičmenoj moždini pacova. Kang i saradnici (Kang et al., 2013) su pokazali da oligodendrociti diferencirani iz prekursorskih ćelija nisu mogli da ostvare funkcije zrelih oligodendrocita i dosegnu očekivani nivo mijelinizacije u transgenom ALS modelu miša. U tom smislu, ispitivanje oligodendrocita u kulturi koji dosežu razgranatu morfologiju, ali ne formiraju mijelin, omogućava ispitivanje ovih ćelija upravo u fazi pre početka mijelinizacije. Oligodendrociti u kulturi izolovani iz kičmene moždine kontrolnih i ALS neonatalnih pacova nisu pokazali morfološke razlike u ovom istraživanju. Naime, kontrolni i ALS oligodendrociti su imali slično grananje nastavaka i ćelijsku površinu, što je potvrđeno i sličnim električnim kapacitetom membrane. Jedna od pretpostavki jeste da oligodendrociti prolaze degenerativne promene usled promena u mikrosredini zahvaćenog tkiva kod ALS, a koje su rezultat interakcije različitih ćelijskih tipova u tkivu (Domingues et al., 2016), a što zapravo nedostaje u ćelijskoj kulturi. Oligodendrociti su posebno osetljivi na prisustvo inflamacijskih metabolita koje proizvodi aktivirana mikroglia (Peferoen et al., 2014). Reaktivni astrociti oslobađaju toksične faktore koji takođe imaju štetan efekat na oligodendrocite i dovode do njihove smrti (Liddelow & Barres, 2017). Smatra se da je početak degeneracije oligodendrocita najverovatnije nezavisan od smrti motornih neurona (Nonneman et al., 2014). Međutim, motorni neuroni koji umiru u simptomatskoj fazi bolesti mogli bi uticati na formiranje mikrosredine koja dalje promovise degeneraciju oligodendrocita (Nonneman et al., 2014).

5.1.2 Narušena funkcionalnost Kir4.1 u oligodendrocitima u ALS

Prethodne studije su pokazale da je ulazni ispravljački kalijumov kanal Kir4.1 eksprimiran u oligodendrocitima, posebno u ćelijskom telu (Ilieva et al., 2009; C.-H. Lu et al., 2016; Nwaobi et al., 2016). Progresivno povećanje ekspresije Kir4.1 i povećanje u ulaznim ispravljačkim K^+ strujama u oligodendrocitima je neophodno za njihovu diferencijaciju i sposobnost mijelinizacije (Livesey et al., 2016; Neusch et al., 2001). Povećanje ekspresije Kir4.1 u oligodendrocitima tokom sazrevanja je povezano sa većim zahtevima za održavanje koncentracije K^+ u blizini aksona (Schirmer et al., 2018). U ovoj studiji smo pokazali smanjenu ekspresiju Kir4.1 u mijelinskoj frakciji izolovanoj iz kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova, što pored prethodno pokazane smanjene ekspresije MCT1 ukazuje na izmenjena svojstva mijelina koji formiraju ALS oligodendrociti (Kang et al., 2013; Philips et al., 2013). Pokazali smo da je ekspresija Kir4.1 redukovana u kičmenoj moždini SOD1^{G93A} pacova, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima na mišjem modelu ALS (Kaiser et al., 2006). Analiza kolokalizacije markera oligodendrocita CNPaze i Kir4.1 je pokazala redukciju ekspresije Kir4.1 u oligodendrocitima u kičmenoj moždini SOD1^{G93A} pacova. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenom studijom na SOD1^{G93A} pacovskom modelu ALS koja ukazuje na to da se redukcija Kir4.1 dešava velikim delom u astrocitima, glijskim ćelijama koje su posebno značajne u regulaciji K^+ (Bataveljić et al., 2012). Promene koje smo uočili u oligodendrocitima su bile specifične za ventralne rogove u kojima su lokalizovani motorni neuroni koji degenerišu u ALS, dok u dorzalnim rogovima u kojima su zastupljeni drugačiji mehanizmi za održavanje homeostaze K^+ (M. L. Olsen et al., 2007) ove promene nisu uočene. Prikazani rezultati potkrepljuju povezanost funkcionalnih i morfoloških promena oligodendrocita i degeneracije motornih neurona, iako precizan redosled događaja nije još uvek razjašnjen. Ove promene su uočene u završnoj fazi bolesti i ne možemo isključiti da smrt motornih neurona u stvari doprinosi procesu degeneracije oligodendrocita. Dalja ispitivanje Kir4.1 u gornjim motornim centrima kao i u presimptomatskoj fazi bolesti pružila bi detaljan uvid u ulogu ovog K^+ kanala u ALS patogenezi. Neusch i saradnici (Neusch et al., 2001) su pokazali da oligodendrociti u kulturi izolovanoj iz kičmene moždine takođe eksprimiraju Kir4.1 i pokazuju ulaznu struju, te smo dalje ispitali funkcionalna svojstva oligodendrocita izolovanih iz kontrolne i SOD1^{G93A} kičmene moždine. Uočeno smanjenje ekspresije Kir4.1 u ALS oligodendrocitima u kulturi u skladu je sa rezultatima koje smo dobili u tkivnim presecima SOD1^{G93A} kičmene moždine. Pored redukovane ekspresije Kir4.1, uočili smo i promene u elektrofiziološkim svojstvima ALS oligodendrocita. Ove glijske ćelije imaju narušena biofizička svojstva membrane, što se uočava na osnovu povećanog otpora membrane i pozitivnijeg potencijala reverzije u ALS. Ulazne struje su smanjene i manje senzitivne na povećanje $[K^+]_o$, Ba^{2+} -senzitivne Kir struje su smanjene u SOD1^{G93A} oligodendrocitima, sugerišući njihovu narušenu sposobnost da detektuju promene u vanćelijskoj koncentraciji K^+ . Iako pokazuju narušena funkcionalna svojstva, SOD1^{G93A} oligodendrociti u kulturi imaju sličnu morfologiju kao kontrolni oligodendrociti, što ukazuje na to da se funkcionalni nedostaci ovih ćelija dešavaju pre anatomskih promena koje detektujemo u adultnim SOD1^{G93A} pacovima. Ovu hipotezu potkrepljuju i literaturni podaci da oligodendrociti u kulturi iz kičmene moždine miša koji ne eksprimira Kir4.1 (Kir4.1^{-/-}) imaju značajno narušena funkcionalna svojstva uključujući depolarizaciju ćelijske membrane i potpuni nedostatak ulazne ispravljačke K^+ struje (Neusch et al., 2001). Kir4.1^{-/-} miševi imaju izražena oštećenja ćelija koja vode hipomijelinizaciji i oštećenju aksona u kičmenoj moždini (Neusch et al., 2001). Ove ćelijske promene vode paralizi zadnjih udova, narušenosti motorike i smanjenom preživljavanju Kir4.1^{-/-} miševa (Neusch et al., 2001). Skorašnje studije su pokazale da miševi sa delecijom Kir4.1 specifično u oligodendrocitima imaju smanjenu stopu preživljavanja, gubitak telesne mase i izražene nedostatke u motorici (Larson et al., 2018; Schirmer et al., 2018). Ovaj fenotip je sličan simptomima ALS i zajedno sa dobijenim rezultatima o narušenoj funkciji oligodendrocita u kulturi ovo sugerise da je Kir4.1 u oligodendrocitima uključen u patofiziologiju ALS. U oligodendrocitima, i Kir4.1 i MCT1 su eksprimirani u blizini aksona i najverovatnije deluju zajedno u potpori aksonske aktivnosti (Schirmer et al., 2018). Redukovan nivo laktata je detektovan u kičmenoj moždini SOD1^{G93A} miša (Ferraiuolo, Higginbottom, et al., 2011), što bi moglo biti povezano sa smanjenom ekspresijom

MCT1 u oligodendrocitima, kako je i uočeno kod ALS pacijenata i miševa (Y. Lee et al., 2012). Ovi nalazi upućuju na još jednu karakteristiku narušene funkcije oligodendrocita u ALS. Kir4.1 u oligodendrocitima je protein od interesa u nekoliko neuroloških bolesti i poremećaja. Nedostatak Kir4.1 pokazan je u prekursorskim ćelijama oligodendrocita u mišjem modelu tranzijentne ishemije (Song et al., 2018). Ispitivanja sprovedena u istoj studiji pokazala su da ova narušena funkcionalna ekspresija Kir4.1 doprinosi gubitku mijelina posle ishemije. Multipla skleroza se karakteriše oštećenjem oligodendrocita i izraženom demijelinizacijom u CNS (Lassmann et al., 2012; Reich et al., 2018). Od posebnog značaja je nalaz o prisustvu Kir4.1 autoantitela u jednoj grupi MS pacijenata, čime se naglašava uloga ovog kalijumovog kanala i u ovoj patologiji (Srivastava et al., 2012). Značajna redukcija Kir4.1 pokazana je u aktivnim lezijama u MS, posebno pokazujući smanjenje ekspresije Kir4.1 u oligodendrocitima koji ograničavaju lezije (Schirmer et al., 2018). Rezultati ove studije pokazuju narušenu ekspresiju i funkciju Kir4.1 u ALS. Ovi nalazi potkrepljuju mogućnost da narušavanje aktivnosti Kir4.1 može uticati na sposobnost oligodendrocita da dosegnu funkcionalnu zrelost u ALS. Stoga se Kir4.1 može razmatrati kao bitan činilac koji doprinosi ALS patofiziologiji.



Slika 24. Šematski prikaz patoloških promena u oligodendrocitima u ALS dobijenih u ovoj studiji. Ekspresija Kir4.1 je smanjena u oligodendrocitima obeleženi CNPazom u ventralnim rogovima kičmene moždine ALS pacova. Redukovana ekspresija Kir4.1 uočava se i u ALS oligodendrocitima u kulturi zajedno sa redukcijom ulazne Ba^{2+} -senzitivne Kir struje. Narušena svojstva Kir4.1 u ALS oligodendrocitima dovode do smanjenog uklanjanja K^+ iz vanćelijske sredine, što vodi oštećenju i degeneraciji motornih neurona u ALS.

5.2 Odlike mikroglije u ALS

Mikroglia predstavlja tip glijskih ćelija sa ulogom u nadgledanju i održavanju homeostaze CNS kroz interakciju sa drugim ćelijama, fagocitozu i kontrolisanu imunsku reakciju u odgovoru na izmenjene fiziološke uslove i povrede. Ispitivani su različiti mehanizmi njenog delovanja u neuroinflamaciji tokom neurodegeneracije. Povreda ili ulazak patogena u CNS dovodi do inflamacijske reakcije mikroglije, koja uključuje njihovu mobilizaciju do mesta aktivacije pri čemu dolazi do povlačenja protoplazmatskih nastavaka ka ćelijskom telu i zadobijanja ameboidne morfologije. Takođe dolazi i do ekspresije NF- κ B-zavisnih inflamacijskih gena koji uključuju receptore fagocitoze, kao i do oslobađanja citokina (Butler et al., 2021). U ovom radu, imunofluorescentnim obeležavanjem mikroglije Iba1 markerom ispitali smo fenotipske promene ovih

ćelija glije u lumbalnom regionu kičmene moždine presimptomatskih i simptomatskih SOD1^{G93A} pacova. Uočeno je da se Iba1⁺ mikroglia aktivira u ALS, što je karakterisano povlačenjem nastavaka i zadobijanjem ameboidne forme što je uočeno u različitim životinjskim modelima neuroinflamacije (Fernández-Arjona et al., 2017; Heindl et al., 2018). Slične promene u morfologiji mikroglie se uočavaju u uslovima lokalnog povećanja [K⁺]_o (Madry et al., 2018). Elektrofiziološka svojstva primarne mikroglie u kulturi izolovane iz neonatalnih i adultnih kičmenih moždina su slična u kontrolnim i SOD1^{G93A} ćelijama. Dobijeni rezultati ukazuju da odlike ALS mikroglie nisu promenjene i da najverovatnije faktori u izmenjenoj mikrosredini u ALS imaju uticaj na promene u karakteristikama mikroglie. U prilog tome govore i klasteri aktivirane mikroglie koje smo uočili u ventralnim rogovima SOD1^{G93A} pacova, regionu gde su lokalizovani motorni neuroni koji degenerišu u ALS. Naime, ćelije u apoptozi oslobađaju K⁺ u vanćelijsku sredinu (Remillard & Yuan, 2004; S. P. Yu, 2003). Povećana koncentracija K⁺ tokom umiranja motornih neurona mogla bi biti signal za grupisanje mikroglie, za koju je pokazano da se aktivira u odgovoru na povećanje koncentracije vanćelijskog K⁺ (Ábrahám et al., 2001). Uočeni klasteri mikroglie su pokazali imunoreaktivnost na Kir4.1. Kir4.1 ima ulogu u održavanju K⁺ homeostaze u spoljašnjoj sredini te bi njegova ekspresija u lokalizovanim regionima mogla biti u cilju uklanjanja nagomilanog K⁺ kao potencijalni mehanizam kontrole nastalog oštećenja. Akumulacija Kir4.1 uočena je u kuprizonskom modelu demijelizacije (Nakajima et al., 2013). Naime, u ovom modelu je pokazano da dolazi do redistribucija Kir4.1 oko krvnih sudova mozga u inflamatornim uslovima (Nakajima et al., 2013). U našoj studiji smo pokazali da Kir4.1 imunoreaktivne Iba1⁺ klasterne mikroglie odlikuje izražena ekspresija mutirane SOD1 koja je uočena u motornim neuronima koji degenerišu u ALS (Gurney et al., 1994; Pickles et al., 2016). Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasterne odlikuje povećano prisustvo CD68 markera fagocitnih vezikula, što bi moglo ukazati da mikroglia fagocituje agregiranu mSOD1. Iako ova potencijalna uloga klastera mikroglie zahteva dodatna ispitivanja, dobijeni rezultati ukazuju na fenotipske i funkcionalne odlike mikroglie u klasterima u ALS. Redukcija Ba²⁺-senzitivnih Kir struja je uočena u mikroglie izolovanoj iz adultnih ALS životinja. LPS aktivirana ALS mikroglia izolovana iz adultnih životinja ne pokazuje povećanje izlaznih struja, za razliku od jednako tretirane mikroglie izolovane iz kontrolnih životinja ukazujući na izmenjena funkcionalna svojstva ALS mikroglie. Ovaj rezultat naglašava značaj uticaja faktora spoljašnje sredine na odlike mikroglie i ističe značaj kompleksnog odnosa mikroglie i drugih ćelijskih tipova u neuroinflamaciji u neruodegeneraciji u ALS. Dobijeni rezultati pružaju uvid u specifična morfološka i funkcionalna svojstva aktivirane mikroglie u razvoju patologije ALS.

5.2.1 Kir4.1⁺ klasteri mikroglie u ventralnim rogovima ALS

Redukovana ekspresija i funkcionalnost Kir4.1 je pokazana u različitim patološkim stanjima, kao što su epilepsija, AB i HB (Kinboshi et al., 2020; Kitaura et al., 2018; X. Tong et al., 2014; Wilcock et al., 2009). Smanjena ekspresija uočava se prevashodno u astrocitima u različitim patofiziologijama (Kitaura et al., 2018; X. Tong et al., 2014), kao i u motornim centrima ALS transgenog mišjeg i pacovskog modela (Bataveljić et al., 2012; Kaiser et al., 2006). Ova doktorska studija na oligodendrocitima koje karakteriše velika zastupljenost Kir4.1 kanala je pokazala smanjenu ekspresiju Kir4.1 u oligodendrocitima u ventralnim rogovima SOD1^{G93A} pacova. Međutim, iako je ekspresija Kir4.1 smanjena u ALS, uočeno je postojanje lokalizovanih Kir4.1 imunoreaktivnih klastera u ventralnim rogovima kičmenih moždina pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} pacova. Naši rezultati su pokazali da su na mestima Kir4.1⁺ klastera prisutne grupacije ćelija pozitivnih na Iba1 marker mikroglie. Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasteri su uočeni u ventralnim rogovima kičmene moždine, gde su lokalizovani motorni neuroni koji degenerišu u ALS. Prethodne studije su pokazale prisustvo klastera mikroglie u kičmenoj moždini i perifernom nervu u presimptomatskoj fazi bolesti ALS pacovskog modela (Graber et al., 2010; Sanagi et al., 2010), kao i u produženoj moždini i crvenom nukleusu srednjeg mozga na početku razvoja simptoma (Fendrick et al., 2007). Klasteri mikroglie su uočeni i oko degenerišućih motornih neurona nakon presecanja aksona u ventralnim rogovima kičmene moždine (Rotterman & Alvarez, 2020). U transgenom ALS modelu, mikroglia formira klasterne u blizini motornih neurona koji imaju smanjenu imunoreaktivnost na holin acetiltransferazu (ChAT) i

pokazuju znake degeneracije (Sanagi et al., 2010). U ovoj doktorskoj studiji, broj Kir4.1⁺/Iba1⁺ klastera je značajno veći u lumbalnom regionu kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova u odnosu na pre-SOD1^{G93A}, što može biti posledica progresije bolesti i sve izraženije degeneracije motornih neurona (Feeney et al., 2001). U studiji ispitivanja aktivacije mikroglije u procesu degeneracije motornih neurona nakon isecanja aksona, pokazano je da do formiranja klastera dolazi samo oko tela nekih degenerišućih motornih neurona i da su u klasterima prisutni i CD8⁺ limfociti (Rotterman & Alvarez, 2020). Formiranje klastera mikroglije je uočeno i u procesu obnavljanja mikroglije nakon indukovanja njene ablacije (Bruttger et al., 2015). U pomenutoj studiji, klasteri mikroglije su uočeni u svim regionima CNS i to sedam dana nakon izazivanja ablacije i činile su ih rezidentne ćelije mikroglije u proliferaciji. Ovu proliferišuću mikrogliju karakteriše visoka ekspresija receptora za IL-1 i smatra se da upravo IL-1 signalizacija reguliše ovaj proces ponovnog naseljavanja mikroglije (Bruttger et al., 2015). Paasila i saradnici (Paasila et al., 2020) su pokazali da je klasterovanje mikroglije najizraženije u ranim fazama AB patologije sa potencijalno neuroprotektivnom ulogom. U PB, mikroglija formira klasterne oko spinalnih motornih neurona i dopaminergičkih neurona u substantia nigra pars compacta, odnosno regionima u kojima se dešava neurodegeneracija (Gu et al., 2010). Klasteri mikroglije uočavaju se i kod MS u beloj masi pacijenata lokalizovani u blizini aktivnih demijelinizujućih lezija (van Horssen et al., 2012). Mikroglija u klasterima u ovim lezijama eksprimira IL-10 i TNF- α , kao i NADPH oksidazu-2, ključni enzim u produkciji slobodnih radikala (Lassmann et al., 2012). Ističući pokazanu anti-inflamatornu ulogu TNF- α (Caminero et al., 2011; Masli & Turpie, 2009) autori sugerišu da ravnoteža između prisustva TNF- α i IL-10 i ROS ukazuje na pokušaj regulacije inflamacije u ovim lezijama i da može predstavljati odlučujući faktor u daljem razvoju lezija u demijelinizujuće (van Horssen et al., 2012).

Kod ALS pacijenata i u transgenim mSOD1 glodarskim modelima pokazane su morfološke promene aktivirane mikroglije (Engelhardt & Appel, 1990; Hall et al., 1998; Henkel et al., 2004, 2006; Schiffer et al., 1996; Troost et al., 1989). Reaktivnost mikroglije je detektovana pre početka simptoma (Brites & Vaz, 2014; Tang & Le, 2016), uporedo sa gubitkom nervno-mišićne sinapse (Gerber et al., 2012) i sa ranom degeneracijom motornih neurona (Alexianu et al., 2001). Pored uočenih klastera mikroglije u ventralnim rogovima, ovde smo uočili i promene u morfologiji pojedinačnih ćelija mikroglije van klastera u sivoj masi lumbalnog regiona kičmene moždine pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} pacova. Smanjena razgranatost pojedinačne mikroglije izraženija je u pre-SOD1^{G93A} u odnosu na SOD1^{G93A} kičmenu moždinu. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenom studijom na kičmenoj moždini transgenog SOD1^{G93A} miša (Ohgomori et al., 2016). Naime, autori su pokazali da mikroglija u ranim fazama aktivacije ima malo telo sa skraćenim i negranatim nastavcima, dok u simptomatskoj fazi bolesti mikrogliju odlikuje uvećano telo i dodatno skraćeni nastavci. Na istom modelu, pokazana je smanjena razgranatost mikroglije na početku pojave simptoma u sloju V motornog korteksa, gde su smešteni gornji motorni neuroni koji su zahvaćeni u ALS (Migliarini et al., 2021).

Skorašnja studija je pokazala da CD34⁺ populacija mikroglije proliferiše i formira klasterne u ventralnim rogovima kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova (Kovacs et al., 2019). CD34 je marker hematopoetskih progenitorskih i matičnih ćelija i vaskularnog endotela (AbuSamra et al., 2017; Krause et al., 1994). U ovoj studiji smo pokazali da su Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasteri imunoreaktivni na CD34 u ventralnim rogovima lumbalnog regiona kičmene moždine SOD1^{G93A} pacova. U ventralnim rogovima kontrolnih životinja uočili smo pojedinačne CD34⁺ ćelije i imunoreaktivne CD34⁺ endotelne ćelije krvnih sudova, dok je u ALS tkivu došlo do proliferacije CD34⁺ ćelija i do njihovog grupisanja u klasterne. Prethodne studije su pokazale da lezija izazvana akutnom povredom nerva dovodi do povećanja ekspresije CD34 na rano aktiviranoj rezidentnoj mikrogliji (Ladeby et al., 2005). Slične promene se uočavaju u endotelnim ćelijama i CD11⁺ makrofagama/mikrogliji nakon lezije kičmene moždine (Graumann et al., 2010). Kovacs i saradnici (Kovacs et al., 2019) su pokazali da ćelije na periferiji CD34⁺ klastera ekspimiraju i Iba1 ili CD11b markere. Autori sugerišu da se process diferencijacije subpopulacije CD34⁺ ćelija u klasteru odvija u smeru centar-periferija (Kovacs et al., 2019). Prisustvo CD34⁺ klastera je uočeno oko mSOD1 pozitivnih motornih neurona (Kovacs et al., 2019). Međutim, primećeno je da CD34⁺ klasteri nisu uočeni oko svih neurona koji

eksprimiraju mSOD1, sugerišući prostorno specifičnu proliferaciju CD34⁺ ćelija i verovatno postojanje specifičnog faktora koji je neophodan za formiranje klastera ovih ćelija (Kovacs et al., 2019). U našem ispitivanju uočili smo da su Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasteri ćelija lokalizovani na mestima izražene ekspresije mSOD1 koja karakteriše degenerišuće motorne neurone (Forsberg et al., 2019; Gurney et al., 1994; Jacobsson et al., 2001; Kato et al., 2000; Pickles et al., 2016; Shibata, Asayama, et al., 1996). Razumevanje pojave grupisanja ćelija u klastere, kao i prepoznavanje tipova ćelija i markera koji učestvuju u formiranju klastera, mogli bi pružiti detaljan uvid u sekvencu događaja u aktivaciji mikroglije u ALS i mnogim drugim patološkim stanjima.

5.2.2 Lokalizacija mSOD1 u Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasterima

Agregati mutirane SOD1 se uočavaju u degenerišućim motornim neuronima ALS pacijenata sa mutacijom u genu *SOD1* i transgenih mSOD1 glodarskih modela (Forsberg et al., 2019; Gurney et al., 1994; Jonsson et al., 2004; Kato et al., 2000; Pickles et al., 2016; Shibata, Asayama, et al., 1996). Imunofluorescentnim obeležavanjem uočili smo ekspresiju mSOD1 u motornim neuronima ventralnih rogova pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} pacova, što je u skladu sa prethodno objavljenim podacima (Pickles et al., 2016). Imunoreaktivnost mutirane SOD1 uočava se kao disperzni signal u pojedinim neuronima ili kao koncentrisani, lokalizovani signal u preostalim neuronima. Razlike u distribuciji imunoreaktivnog mSOD1 signala su uočene kao izraženi lokalizovani signal u agregatima ili kao slabiji, manje koncentrisan signal u motornim neuronima SOD1^{G93A} i SOD1^{G85R} mišjih transgenih ALS modela i smatraju se posledicom različite zastupljenosti proteinskih agregata u motornim neuronima (Lucie I. Bruijn et al., 1998; de Araújo Brasil et al., 2019). Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasteri mikroglije uočeni su na mestima gde je detektovano izraženo prisustvo mSOD1 agregata u ventralnim rogovima lumbalnog regiona kičmene moždine pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} pacova. Formiranje klastera mikroglije oko proteinskih agregata pokazano je i u tkivima pacijenata i transgenih modela AB (Paasila et al., 2020; Ransohoff & Perry, 2009; Serrano-Pozo et al., 2016). Naime, mikroglija se vezuje za solubilne oligomere i fibrile β-amiloida u AB, što se smatra procesom inflamacije u ovoj bolesti (Heneka et al., 2018). Značaj mikroglije u uklanjanju proteinskih agregata pokazan je u modelu AB, gde usled narušenih funkcija mikroglije dolazi do smanjenog uklanjanja β-amiloida (Hickman et al., 2008). Naime, u ovoj studiji je pokazana redukovana ekspresija mikroglijalnih receptora za vezivanje β-amiloida i smanjena sinteza enzima za degradaciju β-amiloida, dok paralelno dolazi do povećanja pro-inflamatornih IL-1β i TNF-α koji doprinose degeneraciji (Hickman et al., 2008).

Aplikacija homogenata kičmene moždine simptomatskih ALS miševa sa fluorescentno obeležnim mSOD1 u išijadični nerv SOD1^{G85R} miševa pokazala je da se nepravilno upakovan mSOD1 prenosi trans-sinaptički (Ayers et al., 2016). Druga studija je pokazala da mSOD1 može biti oslobođen iz motornih neurona posredstvom hromogranina (Urushitani et al., 2006) koji predstavlja komponentu neurosekretornih vezikula (Appel et al., 2011) i tako dovesti do aktivacije mikroglije i smrti motornih neurona (Urushitani et al., 2006). *In vitro* studije na ćelijskim linijama neurona su pokazale da mutirana SOD1 može biti oslobođena u vanćelijsku sredinu i prenositi se dalje na susedne ćelije (McAlary et al., 2019; Mondola et al., 2016; Münch et al., 2011; B. J. Turner et al., 2005; Urushitani et al., 2006). Postoji mogućnost da je oslobođena mSOD1 u tkivu signal koji aktivira mikrogliju, jer je pokazano da dodavanje egzogene mSOD1^{G93A} i mSOD1^{G85R} dovodi do aktivacije mikroglije u kulturi i povećane produkcije pro-inflamatornih faktora (Zhao et al., 2010). Tretman kokultura motornih neurona i mikroglije mutiranom SOD1 je doveo do oštećenja motornih neurona, ali mehanizmom koji uključuje prethodnu aktivaciju mikroglije (Zhao et al., 2010). Toksični efekat mSOD1 na mikrogliju je pokazan i u drugoj studiji gde je ispitan efekat dodavanja agregata mSOD1 (Roberts et al., 2013). Tretman mutiranom SOD1 u formi agregata izaziva aktivaciju primarne mikroglije i značajno povećanje TNF-α (Roberts et al., 2013). Aplikacija medijuma iz kulture mSOD1 aktivirane mikroglije na ćelijske linije motornih neurona dovodi do značajnog smanjenja njihovog preživljavanja (Roberts et al., 2013).

5.2.3 Funkcionalne karakteristike Kir4.1⁺/Iba1⁺ klastera

Jedno od osnovnih svojstava aktivirane mikroglije jeste fagocitoza, odnosno uklanjanje proteinskih agregata i ćelijskih ostataka (Galloway et al., 2019). Obeležavanjem markera aktivacije i fagocitoze, CD68, pokazali smo prisustvo fagocitnih vezikula u aktiviranoj mikrogliji u Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasterima u ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} i SOD1^{G93A} pacova. Studija na SOD1^{H46R} transgenom pacovu je pokazala da se klasteri aktivirane mikroglije formiraju uz motorne neurone još u presimptomatskoj fazi i da pored povećane ekspresije citokina TNF- α , nju karakteriše i povećana fagocitarna aktivnost što je potvrđeno povećanom imunoreaktivnošću na CD68 marker (Sanagi et al., 2010). Izražena fagocitarna aktivnost mikroglije uočena je i u drugim patološkim stanjima u CNS. Tako je nakon presecanja aksona uočeno grupisanje mikroglije u klasterne oko degenerišućih motornih neurona, koja potom zadobija fagocitarnu funkciju (Rotterman & Alvarez, 2020). Ispitivanjem transkriptoma adultne mikroglije izolovane iz SOD1^{G93A} miša pokazana je povećanje ekspresije gena uključenih u fagocitozu, proliferaciju i aktivaciju mikroglije, poput *Itgax*, *Clec7a*, *Axl*, *Csfl*, *ApoE* i smanjena ekspresija homeostatskih gena mikroglije *P2ry12* i *Tmem119* (Krasemann et al., 2017). Slične promene u genskoj ekspresiji aktivirane mikroglije pokazane su i u neurodegenerativnim procesima u modelu AB. Naime, studija je pokazala da mikroglija koja aktivno uklanja β -amiloid ima povećanu fagocitnu aktivnost i eksprimira gene uključene u ove procese poput *Cd68*, *ApoE* i *Trem2* (Grubman et al., 2021). Sa druge strane, mikroglija koja ne učestvuje u preuzimanju β -amiloida eksprimira homeostatske gene, poput *P2ry12* i *Tmem119* (Grubman et al., 2021) što naglašava razlike u svojstvima aktivirane mikroglije u zavisnosti od faktora sredine. Injektovanje apoptotskih neurona u korteks i hipokampus miša dovelo je do promene morfologije rezidentne mikroglije u fagocitarnu formu u blizinu mesta injektiranja i do povećane ekspresije *ApoE*, što je ukazalo na sličnost sa promenama uočnim u neurodegeneraciji (Krasemann et al., 2017).

Iako mehanizam umiranja motornih neurona u ALS i dalje nije razjašnjen, ranije *in vitro* studije sugerišu da je mSOD1 proapoptotski faktor koji indukuje apoptotsku smrt neurona (Durham et al., 1997; Ghadge et al., 1997; Rabizadeh et al., 1995). ATP se oslobađa iz apoptotskih ili ćelija izloženih stresu preko paneksin-1 kanala (Chekeni et al., 2010; Yamaguchi et al., 2014) i predstavlja jedan od najčešćih signala za prepoznavanje oštećenja od strane mikroglije (Ravichandran, 2010). Oslobođanje ATP iz neurona dovodi do aktivacije P2Y12 receptora na mikrogliji, do migracije mikroglije i ostvarivanja kontakta između njenih nastavaka i tela neurona (Cserép et al., 2019; Glass et al., 2010; S. E. Haynes et al., 2006). Nedavno je pokazano da oslobođanje ATP u epilepsiji dovodi do ekstenzije nastavaka mikroglije (Eyo et al., 2014, 2017) koje je posredovano aktivacijom P2Y12 receptora (S. E. Haynes et al., 2006; L.-J. Wu et al., 2007). U modelu PB je pokazano da su agregati α -sinukleina odgovorni za usmeravanje mikroglije ka mestu oštećenja (S. Wang et al., 2015). Smatra se da u ALS, oslobođanje agregata mSOD1 i ATP iz umirućih neurona dovode do aktivacije mikroglije (Glass et al., 2010). Interesantno je da je u studiji na NSC-34 liniji motornih neurona pokazano da depolarizacija njihove membrane usled povećane koncentracije vanćelijskog K⁺ dovodi do oslobođanja SOD1 u medijum (Petrozziello et al., 2017). To bi moglo objasniti oslobođanje mSOD1 u ALS usled povećane [K⁺]_o i efekta mSOD1 na aktivaciju mikroglije i smrt motornih neurona (Roberts et al., 2013; Zhao et al., 2010).

5.2.4 K⁺ homeostaza i ALS mikroglija

Regulacija influksa i efluksa jona, održavanje koncentracije jona u citoplazmi i organelama, kontrola ćelijskog volumena i održavanje potencijala membrane su od ključnog značaja za fundamentalne ćelijske procese (Kondratsky et al., 2015). K⁺ je najzastupljeniji jon unutar ćelije i uključen i u održavanje membranskog potencijala i ćelijske proliferacije (Kondratsky et al., 2015; Z. Wang, 2004). U transgenim modelima SOD1^{G93A} pokazana je redukovana ekspresija Kir4.1 kalijumovog kanala u motornim centrima mozga i kičmenoj moždini (Bataveljić et al., 2012; Kaiser et al., 2006), kao i narušena funkcionalnost Kir4.1 u ALS astrocitima u kulturi (Bataveljić et al., 2012). Sa druge strane, smatra se da su prekomerni efluks i smanjenje koncentracije unutarćelijskog

K⁺ rane naznake apoptoze (S. P. Yu, 2003). U ventralnim rogovima pre-SOD1^{G93A} miša uočena je redukovana aktivnost $\alpha 3$ subjedinice Na⁺/K⁺ATPaze pretežno eksprimirane na alfa motornim neuronima koji degenerišu u ALS (Ruegsegger et al., 2016). Redukovana ekspresija Na⁺/K⁺ATPaze- $\alpha 3$ pokazana je i u *post mortem* tkivima sALS pacijenata kao i slučajevima fALS koji su nosioci mutacija u genima *C9ORF72* i *FUS* (Ruegsegger et al., 2016). S obzirom da su Kir4.1 i Na⁺/K⁺-ATPaza neophodni za održavanje jonske homeostaze K⁺, narušena ekspresija oba proteina može ukazati na narušavanje K⁺ ravnoteže u ALS što za posledice ima hiperekscitabilnost motornih neurona i degeneraciju (Park et al., 2017). Visoka koncentracija [K⁺]_o takođe smanjuje elektrogeno preuzimanje glutamata tako što depolarizuje membranu glijjskih ćelija i povećava zadržavanje K⁺ u vanćelijskoj sredini vodeći prekomernoj ekscitabilnosti neurona (Barbour et al., 1988) kao i aktivaciji mikroglije (Ábrahám et al., 2001). Lokalno povećanje koncentracije [K⁺]_o dovodi do depolarizacije membranskog potencijala mikroglije i smanjenja razgranatosti usled povlačenja njenih nastavaka (Madry et al., 2018). U ovoj doktorskoj studiji smo pokazali da u odgovoru na povećanje [K⁺]_o dolazi do povećanja ulaznih K⁺ struja u kulturi mikroglije iz adultne kičmene moždine pacova. ALS i kontrolna mikroglija pokazale su sličan odgovor na povećanu vanćelijsku koncentraciju K⁺. Amplituda ulazne komponente je značajno povećana, ukazujući na to da adultna mikroglija izolovana iz kontrolnih i ALS životinja može da odgovori na trenutno povećanje [K⁺]_o sa 4 na 12 mM. Dobijeni rezultat je u skladu sa studijama na mikrogliji gde je uočeno povećanje ulaznih struja u mikrogliji u kulturi izloženoj povećanoj vanćelijskoj koncentraciji K⁺ (Eder et al., 1995; Gattlen et al., 2020). Za razumevanje elektrofizioloških svojstava mikroglije u ALS, bilo bi od značaja ispitati njen odgovor u uslovima dugoročno povećane koncentracije vanćelijskog K⁺, kojoj su ove ćelije izložene u uslovima narušene homeostaze K⁺ u ALS.

Provodljivost za K⁺ membrane mikroglije je od značaja za pokretljivost mikroglije u bazalnim uslovima, ali i u uslovima oštećene funkcije neurona, poput hiperekscitabilnosti (Umpierre & Wu, 2021). Pokazano je da grupisanje mikroglije oko hiperekscitabilnih neurona može dovesti do normalizacije njihove ekscitabilnosti (Umpierre & Wu, 2021). Povećanje hiperekscitabilnosti korteksa sa progresijom bolesti je pokazano kod ALS pacijenata (Menon et al., 2020), kao i u motornim neuronima izolovanim iz ALS pacijenata i transgenih mSOD1 miševa (Buskila et al., 2019), te bi se regrutovanje mikroglije blizu neurona moglo funkcionalno povezati sa redukovanjem neuronske hiperekscitabilnosti (Umpierre & Wu, 2021).

5.2.4.1 Elektrofiziološke odlike ALS mikroglije u kulturi

Mikroglija eksprimira Na⁺ i H⁺ kanale, voltažno-zavisne Ca²⁺ i Cl⁻ kanale, kao i različite K⁺ kanale (Eder, 2005). Mikroglija u kulturi eksprimira jedinstven set K⁺ jonskih membranskih kanala, uključujući voltažno zavisne, ulazno ispravljачke K⁺ kanale (H. Kettenmann et al., 1990), među kojima su najznačajniji Kv1.3, ulazno ispravljачki kanal Kir2.1, Ca²⁺ aktivirani kanal K_{Ca}3.1 (Nguyen et al., 2017) i THIK-1, koji je tonično aktivni dvoporni K⁺ kanal ekspimiran u mikrogliji *in situ* (Madry et al., 2018). U održavanju V_m bitnu ulogu imaju THIK-1 kanali (Madry et al., 2018), ali i ulazno ispravljачki, voltažno- i Ca²⁺-zavisni K⁺ kanali (Izquierdo et al., 2019). Mi smo pokazali da mikroglija izolovana iz adultnih kičmenih moždina simptomatskih SOD1^{G93A} pacova ima sličan membranski potencijal, otpor membrane i profil struja kao i kontrolna mikroglija. Aplikacija vanćelijskog Ba²⁺, koji je blokator Kir kanala, dovela je do redukcije ulazne Kir komponente struje u ALS mikrogliji. Kir2.1 je najzastupljeniji Kir kanal ekspimiran u pacovskoj i mišjoj mikrogliji (Lam et al., 2017). Pokazano je da blokiranje Kir2.1 kanala povećava proliferaciju i migraciju nestimulisane mikroglije u kulturi i ima značajnu ulogu u Ca²⁺ signalizaciji u ovim ćelijama (Lam & Schlichter, 2015). Takođe, studija merenja Kir2.1 struja u mikrogliji u kulturi tretiranoj pro- ili anti-inflamatornim agensima pokazala je da se Kir2.1 struje menjaju u zavisnosti od agensa (Lam et al., 2017). Naime, u pomenutoj studiji nije uočena promena ulaznih struja mikroglije nakon stimulacije pro-inflamacijskim faktorima IFN- γ i TNF- α , dok je tretman anti-inflamacijskim faktorom IL-10 doveo do značajnog smanjenja ulaznih struja (Lam et al., 2017). Studija u kojoj je pacovska mikroglija u kulturi tretirana sa LPS je pokazala povećanu ekspresiju iRNK za *Kcnj2* koji kodira

Kir2.1 (Lively & Schlichter, 2018), međutim nije uočena promena amplitude ulaznih Kir struja (Caggiano & Kraig, 1998; Nguyen et al., 2017; Visentin et al., 1995). Ispitivana mikroglia u kulturi u ovim studijama je izolovana iz neonatalnih miševa ili pacova što može biti razlog drugačijeg odgovora Kir struja prilikom aktivacije LPS u odnosu na adultnu mikroglia u kulturi ispitivanu u našoj studiji. Adultna mikroglia izolovana je iz simptomatskih ALS životinja u kojima se već uočavaju patološke promene. Ranije studije su pokazale da odlike mikroglie zavise od faktora mikrosredine (Ajami et al., 2018; Hooten et al., 2015). Uslovima narušene mikrosredine poput je izložena narušenoj homeostazi K^+ , oslobođenoj mSOD1 i ATP je izložena mikroglia u simptomatskim ALS životinjama (Glass et al., 2010; Urushitani et al., 2006), što može značajno uticati na fenotipske i funkcionalne odlike izolovane mikroglie u kulturi. Ekspresija K^+ kanala mikroglie ukazuje da je mikrosredina od značaja za funkcionalno stanje mikroglie, čemu u prilog govori i studija u kojoj je *in situ* pokazano povećanje Kir struja u mikrogliji starih životinja u odnosu na mikroglia mladih životinja (Schilling & Eder, 2015).

U skladu sa rezultatima na neonatalnoj mikrogliji, gde je LPS tretman doveo do izraženog povećanja izlaznih struja (Caggiano & Kraig, 1998; Nguyen et al., 2017; Visentin et al., 1995), uočili smo povećanje izlaznih struja i u kontrolnoj adultnoj mikrogliji. Međutim, u SOD1^{G93A} mikrogliji nije uočeno povećanje izlaznih struja, sugerišući narušenost ekspresije ili funkcije K^+ kanala i njihovih izlaznih struja u aktivaciji ALS mikroglie. Studije na neonatalnoj mikrogliji su pokazale da nakon stimulacije sa LPS, mikroglia prelazi u reaktivno stanje koje se elektrofiziološki karakteriše ekspresijom K^+ - izlaznih struja (Nörenberg et al., 1992) i produkcijom visokih nivoa pro-inflamacijskih citokina IL-1 β , TNF- α , IL-12 i IL-6 i NO (Nguyen et al., 2017) uz povećanu gustinu Kv1.3 struja (Nguyen et al., 2017). Aplikacija blokatora izlaznih struja K^+ kanala, Kv1.3 i K_{Ca}3.1 na LPS-aktiviranu mikroglia dovela je do redukovane ekspresije i oslobođanja IL-1 β i TNF- α (Di Lucente et al., 2018; Nguyen et al., 2017; Rangaraju et al., 2017). Produkcija IL-1 β nakon aktivacije mikroglie sa LPS biva značajno redukovana inhibicijom izlaznih struja primenom blokatora Kv kanala (Caggiano & Kraig, 1998) što sugerise da je prisustvo izlaznih struja neophodno za potpunu aktivaciju mikroglie (Caggiano & Kraig, 1998).

U studiji na AB modelu pokazano je povećanje ulaznih i izlaznih K^+ struja u aktiviranoj mikrogliji koja se nalazi uz agregate β -amiloida (Plescher et al., 2018). Povećana ekspresija iRNK za Kir2.1, povećana amplituda Ba²⁺-senzitivnih Kir struja, kao i ekspresija Kv1.3 kanala, pokazani su u subpopulaciji aktivirane mikroglie koja se nalazi uz amiloidne ploče (Maezawa et al., 2018; Plescher et al., 2018). Povećanje ulaznih i izlaznih struja uočeno je i u aktiviranoj mikrogliji u modelu epilepsije izazvane injektiranjem kainata (Avignone et al., 2008). Nezavisna studija je pokazala da tretman mikroglie u kulturi oligomerom amiloida- β dovodi do povećanja Kv1.3 - i Kir2.1 struja (Maezawa et al., 2018). Blokiranje Kv1.3 kanala specifičnim blokatorom smanjilo je inflamaciju i nakupljanje amiloida i dovelo je do normalizacije promena u ponašanju AB životinja (Maezawa et al., 2018). Kukulutra adultne mikroglie izolovane iz SOD1^{G93A} modela i motornih neurona dovela je do povećane smrti motornih neurona (Frakes et al., 2014). Sa druge strane, neonatalna mikroglia izolovana iz istog ALS modela nije uticala na preživaljavanje motornih neurona u kokulturi (Frakes et al., 2014) ukazujući na razlike u odlikama kulture mikroglie izolovane iz adultnih i neonatalnih ALS životinja. Štaviše, transkriptom mikroglie pokazao je da neonatalna mikroglia ne eksprimira neke od homeostatskih gena uočenih u adultnoj mikrogliji (M. L. Bennett et al., 2016). U ovoj doktorskoj studiji profil struja i biofizičke membranske karakteristike neonatalne ALS mikroglie nisu se razlikovale od kontrolne mikroglie. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnom studijom koja je pokazala da su transkriptom neonatalne SOD1^{G93A} i kontrolne mikroglie vrlo slični u bazalnim uslovima i u uslovima aktivacije sa LPS (Guttenplan et al., 2020). Odlike mikroglie razlikuju se i u zavisnosti od načina pripreme ćelija, tj. da li se ispituje akutno izolovana mikroglia ili mikroglia koja je bila izložena uslovima gajenja u kulturi (Bohlen et al., 2017). Naime, pokazano je da mikroglia koja je gajena u kulturi ima povećanu ekspresiju gena uključenih u inflamaciju i rano razviće, dok je ekspresija markera zrelosti izražena u akutno izolovanoj mikrogliji (Bohlen et al., 2017). Izražene promene u ekspresiji gena uočene su u nivoima ekspresije homeostatskih gena mikroglie *Tmem119* i *P2y12* koji su znatno povećani u akutnoj mikrogliji, međutim njihova

ekspresija je značajno redukovana u mikrogliji u kulturi (Bohlen et al., 2017). Naime, pokazano je da mikroglija u *in vitro* uslovima gubi svoju fiziološku gensku ekspresiju (Bohlen et al., 2017). Mišja SOD1^{G93A} mikroglija u kulturi nije pokazala ekspresiju prethodno pokazanog seta gena specifičnog za neurodegeneraciju u ALS koji uključuje *Igf1*, *Trem2*, *Tnfa*, *Il1b*, *Cybb* (Chiu et al., 2013), a koji su uočeni u akutno izolovanoj mikrogliji. Razlike u genskoj ekspresiji akutno izolovane mikroglije i mikroglije gajene u kulturi pokazane su i na humanoj mikrogliji (Gosselin et al., 2017) ukazujući na značaj mikrosredine za fenotip mikroglije. U skladu sa tim su i rezultati studije u kojoj je apliciranje mikroglije gajene *in vitro* u zdrav CNS dovelo je do brzog uspostavljanja očekivane genske ekspresije u mikrogliji ukazujući na značaj sredine na fiziološka svojstva, gensku ekspresiju i aktivaciju (F. C. Bennett et al., 2018; Bohlen et al., 2017). Pokazane promene u osobinama mikroglije u kulturi moraju se uzeti u obzir pri razmatranju naših rezultata dobijenih na mikrogliji *in vitro* izolovanoj iz adultnih i neonatalnih ALS životinja. Moguće je da su nakon izolacije i SOD1^{G93A} i kontrolna mikroglija izgubile karakteristike specifične za njihovu funkciju u tkivu i da je to razlog sličnih strujnih odgovora i membranskih karakteristika. Dodatna ispitivanja u *ex vivo* ili *in vivo* uslovima bi značajno pomogla u boljem razumevanju funkcionalnih svojstava ovih ćelija u ALS.

5.3 Značaj ispitivanja Kir4.1 i terapije ALS

Uspostavljanje dijagnoze ALS je otežano usled heterogene kliničke slike kod pacijenata, pa bi pronalaženje biomarkera bilo od značaja za razumevanje mehanizama bolesti i rano uspostavljanje dijagnoze i početak tretmana. Riluzol je prvi lek koji je odobren za korišćenje u tretmanu ALS (Saitoh & Takahashi, 2020). Skorašnja analiza delovanja riluzola ukazuje na to da njegova primena produžava životni vek 6-19 meseci (Andrews et al., 2020). Riluzol je odobren kao tretman 1995. godine i tek nedavno, 2017. godine, odobrena je upotreba drugog leka za ALS koji se zove edaravaon (radikava ili radikat) koji takođe produžava životni vek ALS pacijenata (Okada et al., 2018).

Glijske ćelije u ALS prolaze brojne promene i postaju štetne za motorne neurone i doprinose njihovoj degeneraciji. ALS je kompleksna i multifaktorska bolest i smatra se da interakcija različitih ćelijskih tipova doprinosi umiranju motornih neurona. Aktivirana mikroglija može dovesti do proinlamijske aktivacije astrocita i smrti motornih neurona i oligodendrocita (Liddelov et al., 2017). Oligodendrociti pokazuju degenerativne promene u završnim fazama bolesti i iako su njihovi prekursori regurtovani da bi nadomestili njihov broj, novoformirani oligodendrociti ne pokazuju karakteristike zrelih oligodendrocita i nemaju sposobnost mijelinizacije (Kang et al., 2013). Preklinička istraživanja u ALS fokusirana na glijske ćelije uglavnom su usmerena na glutamatno preuzimanje u astrocitima, pojavu astroglioze i mikroglioze, sa posebnim istraživanjem proinlamijskog fenotipa mikroglije (Filipi et al., 2020).

Pokazane patofiziološke promene u oligodendrocitima i mikrogliji u SOD1^{G93A} transgenom modelu ističu značaj glijskih ćelija u patofiziologiji ALS. Glijske ćelije, oligodendrociti i mikroglija imaju bitne uloge u održavanju homeostaze i normalnog funkcionisanja CNS. Karakteristike ovih glijskih ćelija u kontekstu neurodegeneracije ispitivane su u različitim bolestima i poremećajima CNS. Oligodendrociti su metabolički izuzetno zahtevne ćelije zbog svojih uloga u propagaciji akcionih potencijala duž aksona i metaboličkoj potpori neophodnoj za pravilno funkcionisanje neurona. Sa druge strane, mikroglija održava ekvilibrijum nervnog sistema i reaguje na promene oslobađanjem različitih faktora koji mogu imati protektivno, ali i toksično dejstvo na okolinu. Precizno i balansirano funkcionisanje mikroglije neophodno je za odvijanje svih procesa u CNS.

Među ispitivanim potencijalnim terapijama za ALS su terapije bazirane na aplikaciji matičnih ćelija, genska terapija, kao i delovanje na imunski sistem, prvenstveno Treg ćelije koje su narušene u ALS (Filipi et al., 2020). Nekoliko kliničkih studija aplikacije astrocita ili nervnih progenitora su u toku, sa ciljem obogaćivanja CNS zdravim astrocitima i benefitarnim faktorima koje oslobađaju (Filipi et al., 2020). Tretmani matičnim ćelijama imaju za cilj modulaciju neuroinlamijske u ALS (Beers & Appel, 2019). Subpijalna aplikacija shRNK (engl. *short hairpin RNA*) za SOD1 sprečava agregaciju mSOD1, smanjuje mikrogliozu i astrogliozu u kičmenoj moždini ALS modela i utiče na preživljavanje spinalnih α -motornih neurona (Bravo-Hernandez et al., 2020). Dodatni vid

potencijalnog terapijskog delovanja jeste modulacija mikroRNK. Mikroglia proizvodi mikroRNK koje utiču na translaciju gena (Filipowicz et al., 2008) vezujući se za komplementarnu iRNK sekvencu (Bartel, 2009). U ALS modelima i pacijentima pokazana je povećana ekspresija 29 mikroRNK u mikrogliji koje mogu delovati na gene uključene u dinamiku citoskeleta, oksidativni stres, inflamaciju, RNK regulaciju i transport organela (Christoforidou et al., 2020). Modulacija mikroRNK smatra se potencijalnim terapijskim pristupom. Redukcija ekspresije Kir4.1 na proteinskom i iRNK nivou uključena je u patologiju različitih bolesti povezanih sa hiperekscitabilnošću i narušenom neuronskom funkcionalnošću. Pored ALS, narušena funkcionalnost i redukovana ekspresija Kir4.1 u astrocitima uočena je i u HB, koja se javlja u adultnom dobu i odlikuje je motorni deficit (X. Tong et al., 2014). Degenerativne promene uočene u HB mogu biti ublažene viralnim dopremanjem i povećanjem ekspresije Kir4.1, što dovodi do uspostavljanja homeostaze vanćelijskog K^+ , smanjenja hiperekscitabilnosti neurona i poboljšanja motornih funkcija (X. Tong et al., 2014). U MS, koja se takođe javlja u srednjem dobu i odlikuje je hipomijelinizacija i motorna disfunkcija, dolazi do redukovane ekspresije Kir4.1, a jedna od studija ukazuje i na postojanje autoantitela na Kir4.1 protein u serumu pacijenata (Srivastava et al., 2012). U modelima epilepsije i povrede kičmene moždine, koje se odlikuju akutnom i hroničnom redukcijom ekspresije Kir4.1 na nivou proteina i iRNK, pokazana je hipermetilacija promotora gena *Kcnj10* koji kodira Kir4.1, ukazujući na potencijalno mesto za terapijsko delovanje na povećanje ekspresije Kir4.1 u bolestima koje karakteriše njegova redukcija (Boni et al., 2020). Pokazano je da povećanje ekspresije Kir4.1 tokom razvika takođe zavisi od stepena metilacije promotora *Kcnj10* koja je neophodna za povećanje transkripcije ovog gena (Nwaobi et al., 2014).

Jedan od načina delovanja na uočene promene u ekspresiji Kir4.1 u ALS jeste modulisanje njegove ekspresije. Viralno dopremanje Kir4.1 i nadomešćivanje redukovane ekspresije specifično u oligodendrocitima, astrocitima, kao i u oba glijska tipa istovremeno, u *SOD1^{G93A}* modelu u presimptomatskoj i simptomatskoj fazi bolesti pružilo bi nove uvide u ulogu ovih ćelija u početku i progresiji bolesti. Povratak homeostatskih funkcija oligodendrocita i astrocita normalizacijom ekspresije Kir4.1 moglo bi razjasniti značaj vanćelijskog K^+ u hiperekscitabilnosti motornih neurona i njihovom umiranju u ALS. Aplikacija diferenciranih matičnih ćelija u narušeno okruženje prisutno u bolesti, potencijalno bi mogla povratiti neke od redukovanih funkcija glijskih ćelija i uticati na neuroinflamaciju u ALS. Uloga Kir4.1 u klasterima mikroglije posebno je od interesa za fenotipske promene aktivacije ovih ćelija u progresiji bolesti. Razjašnjenju odnosa Kir4.1 i mutirane *SOD1* u klasterima mikroglije moglo bi se pristupiti utišavanjem m*SOD1* specifično unutar klastera mikroglije, što bi pružilo uvid u značaj lokalizovane Kir4.1 imunoreaktivnosti u patologiji ALS. Povećana ekspresija i aktivnost Kir4.1 smatra se da može efektivno antagonizovati autofagiju i apoptozu preko različitih mehanizama (X. Li et al., 2021; Milton & Smith, 2018). Naime, nakon ishemije i povećanja vanćelijske koncentracije K^+ predloženo je da dolazi do aktivacije Kir4.1 koji sprečava autofagiju i omogućava preživljavanje ćelija (Milton & Smith, 2018). Uočena imunoreaktivnost Kir4.1 u klasterima mikroglije otvara pitanje dodatnih funkcija koje ovaj protein može imati u patofiziologiji ALS.

6. Zaključci

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih eksperimentalnih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Oligodendrociti u kičmenoj moždini ALS pacova imaju izmenjenu morfologiju koju odlikuje izdužen oblik nukleusa. Iako ALS nije primarno demijelinizujuća bolest, naši nalazi pokazuju da postoje degenerativne promene i u ovim ćelijama glije, te da specifična izmenjena forma nukleusa može predstavljati novi potencijalni indikator degeneracije oligodendrocita.
2. Redukovana ekspresija Kir4.1 kanala u ventralnim rogovima i mijelinu kičmene moždine, zajedno sa narušenom funkcijom ovog kanala u oligodendrocitima, ukazuje na narušeno uklanjanje K^+ nakon aktivnosti neurona što potencijalno doprinosi degeneraciji motornih neurona u ALS.
3. U ventralnim rogovima lumbalnog regiona kičmene moždine formiraju se klasteri ćelija koji zadržavaju Kir4.1 imunoreaktivnost u presimptomatskoj i simptomatskoj fazi ALS uprkos redukciji ekspresije Kir4.1 u ostatku sive mase.
4. Kir4.1 pozitivne klasterne odlikuje izraženo prisustvo mikroglije. Ovaj nalaz ukazuje na specifičnu redistribuciju ekspresije Kir4.1 u procesu neuroinflamacije u ALS.
5. U presimptomatskoj i simptomatskoj fazi bolesti u ventralnim rogovima ALS kičmene moždine u Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasterima su prisutni agregati mutirane SOD1 što može ukazati da se Kir4.1⁺/Iba1⁺ klasteri formiraju na mestima odumiranja motornih neurona.
6. Kulturu mikroglije izolovanu iz neonatalnih ALS i kontrolnih životinja odlikuju slična elektrofiziološka svojstva, dok se ćelije mikroglije izolovane iz adultne kičmene moždine simptomatskih ALS pacova odlikuju redukovanim Kir strujama.

Na osnovu izvedenih pojedinačnih zaključaka, kao i dobijenih rezultata, može se izvesti opšti zaključak:

Ćelije glije, oligodendrociti i mikroglija, odlikuju promenjena svojstva u procesima neurodegeneracije u ALS, ukazujući na njihove uloge u kompleksnim interakcijama u razvoju i progresiji bolesti. Promene ekspresije Kir4.1 i njegov značaj u fiziološkim i patološkim procesima, ističu ovaj protein kao potencijalno mesto ispitivanja i delovanja u cilju razumevanje mehanizama u osnovi patofizioloških promena u amiotrofičnoj lateralnoj sklerozi.

Literatura

- Ábrahám, H., Losonczy, A., Czéh, G., & Lázár, G. (2001). Rapid activation of microglial cells by hypoxia, kainic acid, and potassium ions in slice preparations of the rat hippocampus. *Brain Research*, *906*(1–2), 115–126.
- Abrahamo, A., Meng, Y., Llinas, M., Huang, Y., Hamani, C., Mainprize, T., Aubert, I., Heyn, C., Black, S. E., Hynynen, K., Lipsman, N., & Zinman, L. (2019). First-in-human trial of blood–brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound. *Nature Communications*, *10*(1), 1–9.
- AbuSamra, D. B., Aleisa, F. A., Al-Amoodi, A. S., Ahmed, H. M. J., Chin, C. J., Abuelela, A. F., Bergam, P., Sougrat, R., & Merzaban, J. S. (2017). Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood Advances*, *1*(27), 2799–2816.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, *10*(12), 1538–1543.
- Ajami, B., Samusik, N., Wieghofer, P., Ho, P. P., Crotti, A., Bjornson, Z., Prinz, M., Fantl, W. J., Nolan, G. P., & Steinman, L. (2018). Single-cell mass cytometry reveals distinct populations of brain myeloid cells in mouse neuroinflammation and neurodegeneration models. *Nature Neuroscience*, *21*(4), 541–551.
- Alexianu, M. E., Kozovska, M., & Appel, S. H. (2001). Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*, *57*(7), 1282–1289.
- Almer, G., Vukosavic, S., Romero, N., & Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, *72*(6), 2415–2425.
- Alshikho, M. J., Zürcher, N. R., Loggia, M. L., Cernasov, P., Reynolds, B., Pijanowski, O., Chonde, D. B., Garcia, D. I., Mainero, C., Catana, C., Chan, J., Babu, S., Paganoni, S., Hooker, J. M., & Atassi, N. (2019). Integrated MRI and [11C]-PBR28 PET Imaging in Amyotrophic Lateral sclerosis. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148.
- Amor, S., Peferoen, L. A. N., Vogel, D. Y. S., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., & Van Noort, J. M. (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. *Immunology*, *142*(2), 151–166.
- Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: What do we really know? *Nature Reviews Neurology*, *7*(11), 603–615.
- Andersen, P. M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keränen, M. L., Tarvainen, I., Haltia, T., Nilsson, L., Binzer, M., Forsgren, L., & Marklund, S. L. (1995). Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nature Genetics*, *10*(1), 61–66.
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, *196*(April), 108719.
- Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, *32*(1), 1–14.
- Andjus, P. R., Bataveljić, D., Vanhoutte, G., Mitrećić, D., Pizzolante, F., Djogo, N., Nicaise, C., Kengne, F. G., Gangitano, C., Michetti, F., Van Der Linden, A., Pochet, R., & Bačić, G. (2009). In vivo morphological changes in animal models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer’s-like disease: MRI approach. *Anatomical Record*, *292*(12), 1882–1892.
- Andrews, J. A., Jackson, C. E., Heiman-Patterson, T. D., Bettica, P., Brooks, B. R., & Piro, E. P. (2020). Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *21*(7–8), 509–518.
- Appel, S. H., Zhao, W., Beers, D. R., & Henkel, J. S. (2011). The microglial-motoneuron dialogue in

ALS. *Acta Myologica*, 30(JUNE), 4–8.

- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., & Oda, T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), 602–611.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215.
- Avignone, E., Ulmann, L., Levavasseur, F., Rassendren, F., & Audinat, E. (2008). Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. *Journal of Neuroscience*, 28(37), 9133–9144.
- Ayala, Y. M., Zago, P., D'Ambrogio, A., Xu, Y. F., Petrucelli, L., Buratti, E., & Baralle, F. E. (2008). Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *Journal of Cell Science*, 121(22), 3778–3785.
- Ayers, J. I., Fromholt, S. E., O'Neal, V. M., Diamond, J. H., & Borchelt, D. R. (2016). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathologica*, 131(1), 103–114.
- Balabanov, R., Strand, K., Goswami, R., McMahon, E., Begolka, W., Miller, S. D., & Popko, B. (2007). Interferon- γ -oligodendrocyte interactions in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience*, 27(8), 2013–2024.
- Barber, S. C., & Shaw, P. J. (2010). Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(5), 629–641.
- Barbour, B., Brew, H., & Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature*, 8–10.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233.
- Bataveljić, D., Djogo, N., Župunski, L., Bajić, A., Nicaise, C., Pochet, R., Bačić, G., & Andjus, P. R. (2009). Live monitoring of brain damage in the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *General Physiology and Biophysics*, 28(Special Issue), 212–218.
- Bataveljić, D., Nikolić, L., Milosević, M., Todorović, N., & Andjus, P. R. (2012). Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1G93A rat model. *Glia*, 60(12), 1991–2003.
- Bataveljić, D., Stamenković, S., Bačić, G., & Andjus, P. R. (2011). Imaging cellular markers of neuroinflammation in the brain of the rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Physiologica Hungarica*, 98(1), 27–31.
- Bay, V., & Butt, A. M. (2012). Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: A role for glial Kir4.1 channels. *Glia*, 60(4), 651–660.
- Beers, D. R., & Appel, S. H. (2019). Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *The Lancet Neurology*, 18(2), 211–220. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30394-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30394-6)
- Beers, D. R., Henkel, J. S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A. A., Siklos, L., Mckercher, S. R., & Appel, S. H. (2006). *Wild-type microglia extend survival in PU . 1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis*. 103(43), 16021–16026.
- Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., & Appel, S. H. (2008). CD4+ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15558–15563.
- Behrendt, G., Baer, K., Buffo, A., Curtis, M. A., Faull, R. L., Rees, M. I., Götz, M., & Dimou, L. (2013). Dynamic changes in myelin aberrations and oligodendrocyte generation in chronic amyloidosis in mice and men. *Glia*, 61(2), 273–286.
- Belzil, V. V., Daoud, H., St-Onge, J., Desjarlais, A., Bouchard, J. P., Dupre, N., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P. F., Meininger, V., Camu, W., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2011). Identification of novel FUS mutations in sporadic cases of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 12(2), 113–117.

- Belzil, V. V., Valdmanis, P. N., Dion, P. A., Daoud, H., Kabashi, E., Noreau, A., Gauthier, J., Hince, P., Desjarlais, A., Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Salachas, F., Pradat, P. F., Camu, W., Meininger, V., Dupré, N., & Rouleau, G. A. (2009). Mutations in FUS cause FALS and SALS in French and French Canadian populations. *Neurology*, *73*(15), 1176–1179.
- Bendotti, C., Tortarolo, M., Suchak, S. K., Calvaresi, N., Carvelli, L., Bastone, A., Rizzi, M., Rattray, M., & Mennini, T. (2001). Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *Journal of Neurochemistry*, *79*(4), 737–746.
- Benmohamed, R., Arvanites, A. C., Kim, J., Ferrante, R. J., Silverman, R. B., Morimoto, R. I., & Kirsch, D. R. (2011). Identification of compounds protective against G93A-SOD1 toxicity for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, *12*(2), 87–96.
- Bennett, F. C., Bennett, M. L., Yaqoob, F., Mulinyawe, S. B., Grant, G. A., Hayden Gephart, M., Plowey, E. D., & Barres, B. A. (2018). A Combination of Ontogeny and CNS Environment Establishes Microglial Identity. *Neuron*, *98*(6), 1170–1183.e8.
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Mulinyawe, S. B., Bohlen, C. J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I. L., Chang, E. F., Li, G., Grant, G. A., Hayden Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(12), E1738–E1746.
- Benveniste, E. N. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Molecular Medicine*, *75*(3), 165–173.
- Black, J. A., Liu, S., & Waxman, S. G. (2009). Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*, *57*(10), 1072–1081.
- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N., & Shaw, P. J. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: A future therapeutic target? *Glia*, *57*(12), 1251–1264.
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., Van Den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *125*(6), 777–794.
- Bohlen, C. J., Bennett, F. C., Tucker, A. F., Collins, H. Y., Mulinyawe, S. B., & Barres, B. A. (2017). Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron*, *94*(4), 759–773.e8.
- Boillée, S., Vande Velde, C., & Cleveland, D. . (2006). ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron*, *52*(1), 39–59.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., Kollias, G., & Cleveland, D. W. (2006). Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science*, *312*(5778), 1389–1392.
- Bolte, S., & Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalisation analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, *224*(3), 13–32.
- Boni, J. L., Kahanovitch, U., Nwaobi, S. E., Floyd, C. L., & Olsen, M. L. (2020). DNA methylation: A mechanism for sustained alteration of KIR4.1 expression following central nervous system insult. *Glia*, *68*(7), 1495–1512.
- Bordt, E. A., Block, C. L., Petrozziello, T., Sadri-Vakili, G., Smith, C. J., Edlow, A. G., & Bilbo, S. D. (2020). Isolation of Microglia from Mouse or Human Tissue. *STAR Protocols*, *1*(1), 100035.
- Bosco, D. A., Morfini, G., Karabacak, N. M., Song, Y., Gros-Louis, F., Pasinelli, P., Goolsby, H., Fontaine, B. A., Lemay, N., McKenna-Yasek, D., Frosch, M. P., Agar, J. N., Julien, J. P., Brady, S. T., & Brown, R. H. (2010). Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nature Neuroscience*, *13*(11), 1396–1403.
- Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneeboer, M. A. M., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., Fidzinski, P., Kraus, L., Snijders, G. J. L., Kahn, R. S., Schulz, A. R., Mei, H. E., Hol, E. M., Siegmund, B., Glaubien, R., Spruth, E. J., de Witte, L. D., & Priller, J. (2019). Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nature Neuroscience*, *22*(1), 78–90.
- Boucsein, C., Kettenmann, H., & Nolte, C. (2000). Electrophysiological properties of microglial cells

- in normal and pathologic rat brain slices. *Eur J Neurosci*, 12(6), 2049–2058.
- Bowman, C. L., & Kimelberg, H. K. (1984). Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*, 13(3), 576.
- Boylan, K. (2015). Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurologic Clinics*, 33(4), 807–830.
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 37–53.
- Brasko, C., & Butt, A. (2018). Expression of Kir2.1 Inward Rectifying Potassium Channels in Optic Nerve Glia: Evidence for Heteromeric Association with Kir4.1 and Kir5.1. *Neuroglia*, 1(1), 176–187.
- Brasko, C., Hawkins, V., De La Rocha, I. C., & Butt, A. M. (2017). Expression of Kir4.1 and Kir5.1 inwardly rectifying potassium channels in oligodendrocytes, the myelinating cells of the CNS. *Brain Structure and Function*, 222(1), 41–59.
- Braun, P. E., Sandillon, F., Edwards, A., Matthieu, J. M., & Privat, A. (1988). Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *Journal of Neuroscience*, 8(8), 3057–3066.
- Bravo-Hernandez, M., Tadokoro, T., Navarro, M. R., Platoshyn, O., Kobayashi, Y., Marsala, S., Miyano-hara, A., Juhas, S., Juhasova, J., Skalnikova, H., Tomori, Z., Vanicky, I., Studenovska, H., Proks, V., Chen, P. X., Govea-Perez, N., Ditsworth, D., Ciacci, J. D., Gao, S., ... Marsala, M. (2020). Spinal subpial delivery of AAV9 enables widespread gene silencing and blocks motoneuron degeneration in ALS. *Nature Medicine*, 26(1), 118–130.
- Brettschneider, J., Toledo, J. B., van Deerlin, V. M., Elman, L., McCluskey, L., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2012). Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 7(6), 13–15.
- Brites, D., & Vaz, A. R. (2014). Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(May), 1–24.
- Brown, C. A., Lally, C., Kupelian, V., & Flanders, W. D. (2021). Estimated Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *Neuroepidemiology*, 55(5), 342–353.
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The England Journal of Medicine*, 1–20.
- Brujin, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Sisodia, S. S., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Cleveland, D. W. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18(2), 327–338.
- Brujin, Lucie I., Houseweart, M. K., Kato, S., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Ohama, E., Reaume, A. G., Scott, R. W., & Cleveland, D. W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, 281(5384), 1851–1854.
- Bruttger, J., Karram, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., Klein, M., Blank, T., Yona, S., Wolf, Y., Mack, M., Pinteaux, E., Müller, W., Zipp, F., Binder, H., Bopp, T., Prinz, M., Jung, S., & Waisman, A. (2015). Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*, 43(1), 92–106.
- Buratti, E. (2015). Functional Significance of TDP-43 Mutations in Disease. *Advances in Genetics*, 91, 1–53.
- Buratti, E., & Baralle, F. E. (2009). Chapter 1 The Molecular Links Between TDP-43 Dysfunction and Neurodegeneration. In *Advances in Genetics* (1st ed., Vol. 66, Issue 09, pp. 1–34). Elsevier Inc.
- Buskila, Y., Kékesi, O., Bellot-Saez, A., Seah, W., Berg, T., Trpceski, M., Yerbury, J. J., & Ooi, L. (2019). Dynamic interplay between H-current and M-current controls motoneuron hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death and Disease*, 10(4).
- Butler, C. A., Popescu, A. S., Kitchener, E. J. A., Allendorf, D. H., Puigdellívol, M., & Brown, G. C. (2021). Microglial phagocytosis of neurons in neurodegeneration, and its regulation. *Journal of*

Neurochemistry, 158(3), 621–639.

- Caggiano, A. O., & Kraig, R. P. (1998). Prostaglandin E2 and 4-aminopyridine prevent the lipopolysaccharide- induced outwardly rectifying potassium current and interleukin-1 β production in cultured rat microglia. *Journal of Neurochemistry*, 70(6), 2357–2368.
- Cai, J., Qi, Y., Hu, X., Tan, M., Liu, Z., Zhang, J., Li, Q., Sander, M., & Qiu, M. (2005). Generation of oligodendrocyte precursor cells from mouse dorsal spinal cord independent of Nkx6 regulation and Shh signaling. *Neuron*, 45(1), 41–53.
- Caminero, A., Comabella, M., & Montalban, X. (2011). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti-TNF- α and demyelination revisited: An ongoing story. *Journal of Neuroimmunology*, 234(1–2), 1–6.
- Chang, A., Nishiyama, A., Peterson, J., Prineas, J., & Trapp, B. D. (2000). NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *The Journal of Neuroscience*, 20(17), 6404–6412.
- Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D. W., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Wong, P. C., & Lin, C. L. G. (2008). Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS ONE*, 3(8).
- Charcot, J., & Joffroy, A. (1869). Deux cas atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch. Physiol. Neurol. Pathol.*, 744–754.
- Chattopadhyay, M., & Valentine, J. S. (2009). Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 11, Issue 7, pp. 1603–1614).
- Chiò, A., Battistini, S., Calvo, A., Caponnetto, C., Conforti, F. L., Corbo, M., Giannini, F., Mandrioli, J., Mora, G., Sabatelli, M., Ajmone, C., Mastro, E., Pain, D., Mandich, P., Penco, S., Restagno, G., Zollino, M., Surbone, A., Monsurrò, M. R., ... Tanel, R. (2014). Genetic counselling in ALS: Facts, uncertainties and clinical suggestions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 85(5), 478–485.
- Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2017). CNS inflammation and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 127(14), 1–11.
- Chiu, I. M., Chen, A., Zheng, Y., Kosaras, B., Tsiftoglou, S. A., Vartanian, T. K., Brown, R. H., & Carroll, M. C. (2008). T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17913–17918.
- Chiu, I. M., Morimoto, E. T. A., Goodarzi, H., Liao, J. T., O’Keeffe, S., Phatnani, H. P., Muratet, M., Carroll, M. C., Levy, S., Tavazoie, S., Myers, R. M., & Maniatis, T. (2013). A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Reports*, 4(2), 385–401.
- Christoforidou, E., Joilin, G., & Hafezparast, M. (2020). Potential of activated microglia as a source of dysregulated extracellular microRNAs contributing to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–15.
- Clarke, B. E., & Patani, R. (2020). The microglial component of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 143(12), 3526–3539.
- Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(5), 311–321.
- Cojocaru, A., Burada, E., Bălșeanu, A.-T., Deftu, A.-F., Cătălin, B., Popa-Wagner, A., & Osiac, E. (2021). Roles of Microglial Ion Channel in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 10(6), 1239.
- Colombrita, C., Onesto, E., Buratti, E., de la Grange, P., Gumina, V., Baralle, F. E., Silani, V., & Ratti, A. (2015). From transcriptomic to protein level changes in TDP-43 and FUS loss-of-function cell models. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(12), 1398–1410.
- Coppedè, F. (2011). An overview of DNA repair in amyotrophic lateral sclerosis.

- Corcia, P., Tauber, C., Vercoullie, J., Arlicot, N., Prunier, C., Praline, J., Nicolas, G., Venel, Y., Hommet, C., Baulieu, J. L., Cottier, J. P., Roussel, C., Kassiou, M., Guilloteau, D., & Ribeiro, M. J. (2012). Molecular Imaging of Microglial Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, 7(12), 6–12.
- Cserép, C., Pósfai, B., Lénárt, N., Fekete, R., László, Z. I., Lele, Z., Orsolits, B., Molnár, G., Heindl, S., Schwarcz, A. D., Ujvári, K., Környei, Z., Tóth, K., Szabadits, E., Sperlágh, B., Baranyi, M., Csiba, L., Hortobágyi, T., Maglóczky, Z., ... Dénes, Á. (2019). *Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions*. 6752(December).
- Cudkovicz, M. E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. E., Chin, W., Geller, B., Hayden, D. L., Schoenfeld, D. A., Hosler, B. A., Horvitz, H. R., & Brown, R. H. (1997). Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 41(2), 210–221.
- Cunha-Oliveira, T., Montezinho, L., Mendes, C., Firuzi, O., Saso, L., Oliveira, P. J., & Silva, F. S. G. (2020). Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Cunha, M. I., Su, M., Cantuti-Castelvetri, L., Müller, S. A., Schifferer, M., Djannatian, M., Alexopoulos, I., van der Meer, F., Winkler, A., van Ham, T. J., Schmid, B., Lichtenthaler, S. F., Stadelmann, C., & Simons, M. (2020). Pro-inflammatory activation following demyelination is required for myelin clearance and oligodendrogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(5).
- D'Ambrosi, N., Cozzolino, M., & Carri, M. T. (2018). Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Role of Redox (dys)Regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 29(1), 15–36.
- D'Erchia, A. M., Gallo, A., Manzari, C., Raho, S., Horner, D. S., Chiara, M., Valletti, A., Aiello, I., Mastropasqua, F., Ciaccia, L., Locatelli, F., Pisani, F., Nicchia, G. P., Svelto, M., Pesole, G., & Picardi, E. (2017). Massive transcriptome sequencing of human spinal cord tissues provides new insights into motor neuron degeneration in ALS. *Scientific Reports*, 7(1), 1–20.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758.
- Davalos, D., Kyu Ryu, J., Merlini, M., Baeten, K. M., Le Moan, N., Petersen, M. A., Deerinck, T. J., Smirnov, D. S., Bedard, C., Hakozaki, H., Gonias Murray, S., Ling, J. B., Lassmann, H., Degen, J. L., Ellisman, M. H., & Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nature Communications*, 3, 1227.
- de Araújo Brasil, A., de Carvalho, M. D. C., Gerhardt, E., Queiroz, D. D., Pereira, M. D., Outeiro, T. F., & Eleutherio, E. C. A. (2019). Characterization of the activity, aggregation, and toxicity of heterodimers of WT and ALS-associated mutant Sod1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(51), 25991–26000.
- De Biase, L. M., Nishiyama, A., & Bergles, D. E. (2010). Excitability and synaptic communication within the oligodendrocyte lineage. *Journal of Neuroscience*, 30(10), 3600–3611.
- Debono, M. W., Le Guern, J., Canton, T., Doble, A., & Pradier, L. (1993). Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology*, 235(2–3), 283–289.
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 173(5), 1073–1081.
- Deierborg, T., Roybon, L., Inacio, A. R., Pesic, J., & Brundin, P. (2010). Brain injury activates microglia that induce neural stem cell proliferation ex vivo and promote differentiation of neurosphere-derived cells into neurons and oligodendrocytes. *Neuroscience*, 171(4), 1386–1396.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J.,

- Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., ... Graff-radford, N. R. (2011). Article Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245–256.
- Deng, H., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G. H., Khan, M. S., Hung, W., Bigio, E. H., Lukas, T., Canto, M. C. D., Halloran, T. V. O., & Siddique, T. (2006). Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(18), 7142–7147.
- Deora, V., Lee, J. D., Albornoz, E. A., McAlary, L., Jagaraj, C. J., Robertson, A. A. B., Atkin, J. D., Cooper, M. A., Schroder, K., Yerbury, J. J., Gordon, R., & Woodruff, T. M. (2020). The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *Glia*, 68(2), 407–421.
- Desai, M. K., Mastrangelo, M. A., Ryan, D. A., Sudol, K. L., Narrow, W. C., & Bowers, W. J. (2010). Early oligodendrocyte/myelin pathology in Alzheimer's disease mice constitutes a novel therapeutic target. *American Journal of Pathology*, 177(3), 1422–1435.
- Di Lucente, J., Nguyen, H. M., Wulff, H., Jin, L. W., & Maezawa, I. (2018). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is required for microglial pro-inflammatory activation in vivo. *Glia*, 66(9), 1881–1895.
- Djukic, B., Casper, K. B., Philpot, B. D., Chin, L.-S., & McCarthy, K. D. (2007). Conditional Knock-Out of Kir4.1 Leads to Glial Membrane Depolarization, Inhibition of Potassium and Glutamate Uptake, and Enhanced Short-Term Synaptic Potentiation. *Journal of Neuroscience*, 27(42), 11354–11365.
- Dols-Icardo, O., Montal, V., Sirisi, S., López-Pernas, G., Cervera-Carles, L., Querol-Vilaseca, M., Muñoz, L., Belbin, O., Alcolea, D., Molina-Porcel, L., Pegueroles, J., Turón-Sans, J., Blesa, R., Lleó, A., Fortea, J., Rojas-García, R., & Clarimón, J. (2020). Motor cortex transcriptome reveals microglial key events in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 7(5), 1–12.
- Domercq, M., Perez-Samartin, A., Aparicio, D., Alberdi, E., Pampliega, O., & Matute, C. (2010). P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia*, 58(6), 730–740.
- Domingues, H. S., Portugal, C. C., Socodato, R., & Relvas, J. B. (2016). Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(June), 1–16.
- Dong, X. X., Wang, Y., & Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387.
- Durham, H. D., Roy, J., Dong, L., & Figlewicz, d. A. (1997). Aggregation of Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase Proteins in a Culture Model of ALS. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(5), 523–530.
- Eder, C. (2005). Ion channels in microglia (brain macrophages). *Environmental Pollution*, 138(3), 1008–1018.
- Eder, C., Fischer, H. G., Hadding, U., & Heinemann, U. (1995). Properties of voltage-gated currents of microglia developed using macrophage colony-stimulating factor. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 430(4), 526–533.
- Engelhardt, J. I., & Appel, S. H. (1990). Igg Reactivity in the Spinal Cord and Motor Cortex in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology*, 47(11), 1210–1216.
- Engelhardt, J. I., Tajti, J., & Appel, S. H. (1993). Lymphocytic Infiltrates in the Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Archives of Neurology*, 50(1), 30–36.
- Evans, C. S., & Holzbaur, E. L. F. (2019). Autophagy and mitophagy in ALS. *Neurobiology of Disease*, 122(February 2018), 35–40.
- Eyo, U. B., Murugan, M., & Wu, L. J. (2017). Microglia–Neuron Communication in Epilepsy. *Glia*, 65(1), 5–18.
- Eyo, U. B., 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. *Journal of Neuroscience*, *34*(32), 10528–10540.
- Ezzi, S. A., Urushitani, M., & Julien, J. P. (2007). Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *Journal of Neurochemistry*, *102*(1), 170–178.
- Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2015). Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(11), 25959–25981.
- Farg, M. A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J. M., Yang, S., Atkinson, R. A. K., Levina, V., Halloran, M. A., Gleeson, P. A., Blair, I. P., Soo, K. Y., King, A. E., & Atkin, J. D. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics*, *23*(13), 3579–3595.
- Feeney, S. J., McKelvie, P. A., Austin, L., Bernadette Jean-Francois, M. J., Kapsa, R., Tombs, S. M., & Byrne, E. (2001). Presymptomatic motor neuron loss and reactive astrocytosis in the sod1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, *24*(11), 1510–1519.
- Fendrick, S. E., Xue, Q. S., & Streit, W. J. (2007). Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Journal of Neuroinflammation*, *4*, 1–12.
- Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(August), 1–22.
- Ferraiuolo, L., Higginbottom, A., Heath, P. R., Barber, S., Greenald, D., Kirby, J., & Shaw, P. J. (2011). Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, *134*(9), 2627–2641.
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., & Shaw, P. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, *7*(11), 616–630.
- Ferraiuolo, L., Meyer, K., Sherwood, T. W., Vick, J., Likhite, S., Frakes, A., Miranda, C. J., Braun, L., Heath, P. R., Pineda, R., Beattie, C. E., Shaw, P. J., Askwith, C. C., McTigue, D., & Kaspar, B. K. (2016). Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(42), E6496–E6505.
- Filipi, T., Hermanova, Z., Tureckova, J., Vanatko, O., & Anderova, M. (2020). Glial Cells—The Strategic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis Treatment. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(1).
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, *9*(2), 102–114.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, *78*, 477–513.
- Follett, P. L., Deng, W., Dai, W., Talos, D. M., Massillon, L. J., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J., & Jensen, F. E. (2004). Glutamate Receptor-Mediated Oligodendrocyte Toxicity in Periventricular Leukomalacia: A Protective Role for Topiramate. *Journal of Neuroscience*, *24*(18), 4412–4420.
- Forsberg, K., Andersen, P. M., Marklund, S. L., & Brännström, T. (2011). Glial nuclear aggregates of superoxide dismutase-1 are regularly present in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *121*(5), 623–634.
- Forsberg, K., Graffmo, K., Pakkenberg, B., Weber, M., Nielsen, M., Marklund, S., Brännström, T., & Andersen, P. M. (2019). Misfolded SOD1 inclusions in patients with mutations in C9orf72 and other ALS/FTD-associated genes. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *861*–869.
- Frakes, A. E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A. M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C. J., Ladner, K. J., Bevan, A. K., Foust, K. D., Godbout, J. P., Popovich, P. G., Guttridge, D. C., & Kaspar,

- B. K. (2014). Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, 81(5), 1009–1023.
- Fray, A. E., Ince, P. G., Banner, S. J., Milton, I. D., Usher, P. A., Cookson, M. R., & Shaw, P. J. (1998). The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: An immunohistochemical study. *European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2481–2489.
- French, H. M., Reid, M., Mamontov, P., Simmons, R. A., & Grinspan, J. B. (2009). Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *Journal of Neuroscience Research*, 87(14), 3076–3087.
- Funikov, S. Y., Rezykh, A. P., Mazin, P. V., Morozov, A. V., Maltsev, A. V., Chicheva, M. M., Vikhareva, E. A., Evgen'ev, M. B., & Ustyugov, A. A. (2018). FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics*, 19(3), 189–204.
- Galloway, D. A., Phillips, A. E. M., Owen, D. R. J., & Moore, C. S. (2019). Phagocytosis in the brain: Homeostasis and disease. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–15.
- Garbuzova-Davis, S., & Sanberg, P. R. (2014). Blood-CNS Barrier Impairment in ALS patients versus an animal model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(February), 1–9.
- Garofalo, S., Coccozza, G., Porzia, A., Inghilleri, M., Raspa, M., Scavizzi, F., Aronica, E., Bernardini, G., Peng, L., Ransohoff, R. M., Santoni, A., & Limatola, C. (2020). Natural killer cells modulate motor neuron-immune cell cross talk in models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nature Communications*, 11(1).
- Gattlen, C., Deftu, A. F., Tonello, R., Ling, Y., Berta, T., Ristoiu, V., & Suter, M. R. (2020). The inhibition of Kir2.1 potassium channels depolarizes spinal microglial cells, reduces their proliferation, and attenuates neuropathic pain. *Glia*, 68(10), 2119–2135.
- Ge, W. P., & Duan, S. (2007). Persistent enhancement of neuron-glia signaling mediated by increased extracellular K⁺ accompanying long-term synaptic potentiation. *Journal of Neurophysiology*, 97(3), 2564–2569.
- Geladaris, A., Häusler, D., & Weber, M. S. (2021). Microglia: The missing link to decipher and therapeutically control MS progression? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7).
- Gerber, Y. N., Sabourin, J.-C., Rabano, M., Vivanco, M. d M., & Perrin, F. E. (2012). Early Functional Deficit and Microglial Disturbances in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, 7(4), e36000.
- Geser, F., Robinson, J. L., Malunda, J. A., Xie, S. X., Clark, C. M., Kwong, L. K., Moberg, P. J., Moore, E. M., Van Deerlin, V. M., Lee, V. M. Y., Arnold, S. E., & Trojanowski, J. Q. (2010). Pathological 43-kDa transactivation response DNA-binding protein in older adults with and without severe mental illness. *Archives of Neurology*, 67(10), 1238–1250.
- Ghadge, G. D., Lee, J. P., Bindokas, V. P., Jordan, J., Ma, L., Miller, R. J., & Roos, R. P. (1997). Mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis: Molecular mechanisms of neuronal death and protection. *Journal of Neuroscience*, 17(22), 8756–8766.
- Gill, C., Phelan, J. P., Hatzipetros, T., Kidd, J. D., Tassinari, V. R., Levine, B., Wang, M. Z., Moreno, A., Thompson, K., Maier, M., Grimm, J., Gill, A., & Vieira, F. G. (2019). SOD1-positive aggregate accumulation in the CNS predicts slower disease progression and increased longevity in a mutant SOD1 mouse model of ALS. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.
- Giordana, M. T., Piccinini, M., Grifoni, S., De Marco, G., Vercellino, M., Magistrello, M., Pellerino, A., Buccinnà, B., Lupino, E., & Rinaudo, M. T. (2010). TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathology*, 20(2), 351–360.
- Gipson, K., & Bordey, A. (2002). Analysis of the K⁺ current profile of mature rat oligodendrocytes in situ. *Journal of Membrane Biology*.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934.
- Goldstein, E. Z., Church, J. S., Hesp, Z. C., Popovich, P. G., & McTigue, D. M. (2016). A silver lining of neuroinflammation: Beneficial effects on myelination. *Experimental Neurology*, 283, 550–559.
- Gong, Y. H., Parsadanian, A. S., Andreeva, A., Snider, W. D., & Elliott, J. L. (2000). Restricted

- expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 20(2), 660–665.
- Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N. G., Holtman, I. R., Schlachetzki, J. C. M., Sajti, E., Jaeger, B. N., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Pasillas, M. P., Pena, M., Adair, A., Gonda, D. D., Levy, M. L., Ransohoff, R. M., Gage, F. H., & Glass, C. K. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science*, 356(6344), 1248–1259.
- Gowing, G., Philips, T., Van Wijmeersch, B., Audet, J.-N., Dewil, M., Van Den Bosch, L., Billiau, A. D., Robberecht, W., & Julien, J.-P. (2008). Ablation of Proliferating Microglia Does Not Affect Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis Caused by Mutant Superoxide Dismutase. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10234–10244.
- Graber, D. J., Hickey, W. F., & Harris, B. T. (2010). Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 1–12.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Kenneth Baillie, J., Stevens, M. P., Freeman, T. C., Summers, K. M., & McColl, B. W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, 19(3), 504–516.
- Graumann, U., Ritz, M.-F., Gutierrez Rivero, B., & Hausmann, O. (2010). CD133 Expressing Pericytes and Relationship to SDF-1 and CXCR4 in Spinal Cord Injury. *Current Neurovascular Research*, 7(2), 144–154.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M. H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N., & Nave, K. A. (1998). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*, 280(5369), 1610–1613.
- Gromicho, M., Oliveira Santos, M., Pinto, A., Pronto-Laborinho, A., & De Carvalho, M. (2017). Young-onset rapidly progressive ALS associated with heterozygous FUS mutation. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18(5–6), 451–453.
- Gros-Louis, F., Gaspar, C., & Rouleau, G. A. (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(11–12), 956–972.
- Gros-Louis, F., Soucy, G., Larivière, R., & Julien, J. P. (2010). Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *Journal of Neurochemistry*, 113(5), 1188–1199.
- Grubman, A., Choo, X. Y., Chew, G., Ouyang, J. F., Sun, G., Croft, N. P., Rossello, F. J., Simmons, R., Buckberry, S., Landin, D. V., Pflueger, J., Vandekolk, T. H., Abay, Z., Zhou, Y., Liu, X., Chen, J., Larcombe, M., Haynes, J. M., McLean, C., ... Polo, J. M. (2021). Transcriptional signature in microglia associated with A β plaque phagocytosis. *Nature Communications*, 12(1).
- Guzman, A., Wood, W. L., Alpert, E., Prasad, M. D., Miller, R. G., Rothstein, J. D., Bowser, R., Hamilton, R., Wood, T. D., Cleveland, D. W., Lingappa, V. R., & Liu, J. (2007). Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), 12524–12529.
- Gu, X. L., Long, C. X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., & Cai, H. (2010). Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T -synuclein causes neurodegeneration in mice. *Molecular Brain*, 3(1), 1–16.
- Guo, H., Lai, L., Butchbach E.R., M. E. R., Stockinger, M. P., Shan, X., Bishop, G. A., & Lin, C. L. G. (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human Molecular Genetics*, 12(19), 2519–2532.
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R. L., & Siddique, T. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772–1775.
- Guttenplan, K. A., & Liddelow, S. A. (2019). Astrocytes and microglia: Models and tools. *Journal*

of *Experimental Medicine*, 216(1), 71–83.

- Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Adler, D. I., Couthouis, J., Liddelow, S. A., Gitler, A. D., & Barres, B. A. (2020). Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nature Communications*, 11(1), 1–9.
- Hagiwara, S., & Takahashi, K. (1974). The Anomalous Rectification and Cation Selectivity of the Membrane of a Starfish Egg Cell. *The Journal of Membrane Biology*, 18(1), 61–80.
- Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M. J., Foust, K. D., Rao, M., Eagle, A., Kammesheidt, A., Christensen, A., Mendell, J. R., Burghes, A. H. M., & Kaspar, B. K. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*, 29(9), 824–828.
- Hall, E. D., Oostveen, J. A., & Gurney, M. E. (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*, 23(3), 249–256.
- Hamilton, S. P., & Rome, L. H. (1994). Stimulation of in vitro myelin synthesis by microglia. *Glia*, 11(4), 326–335.
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A., & 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(1), 253-271.e6.
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394.
- Harras, M. M., Marden, J. J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V. S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schöneich, C., & Engelhardt, J. F. (2008). SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 659–670.
- Haruwaka, K., Ikegami, A., Tachibana, Y., Ohno, N., Konishi, H., Hashimoto, A., Matsumoto, M., Kato, D., Ono, R., Kiyama, H., Moorhouse, A. J., Nabekura, J., & Wake, H. (2019). Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nature Communications*, 10(1), 1–17.
- Haynes, R. L., Baud, O., Li, J., Kinney, H. C., Volpe, J. J., & Folkerth, R. D. (2005). Oxidative and Nitrate Injury in Periventricular Leukomalacia. *Brain Pathology*, 225–233.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., & Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1512–1519.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal*, 66(4), 1061–1067.
- Heindl, S., Gesierich, B., Benakis, C., Llovera, G., Duering, M., & Liesz, A. (2018). Automated morphological analysis of microglia after stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(April), 1–11.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Gary, E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-coray, T., Vitorica, J., & Ransohoff, R. M. (2018). HHS Public Access Neuroinflammation in Alzheimer ' s Disease. *Lancet Neurol*, 14(4), 388–405.
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Siklós, L., & Appel, S. H. (2006). The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(3), 427–437.
- Henkel, J. S., Engelhardt, J. I., Siklos, L., Simpson, E. P., Kim, S. H., Pan, T., Goodman, J. C., Siddique, T., Beers, D. R., & Appel, S. H. (2004). Presence of Dendritic Cells, MCP-1, and Activated Microglia/Macrophages in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord Tissue. *Annals of Neurology*, 55(2), 221–235.
- Hennessy, E., Griffin, E. W., & Cunningham, C. (2015). Astrocytes are primed by chronic neurodegeneration to produce exaggerated chemokine and cell infiltration responses to acute

- stimulation with the cytokines IL-1 β and TNF- α . *Journal of Neuroscience*, 35(22), 8411–8422.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiology Reviews*, 90(1), 291–366.
- Hickman, S. E., Allison, E. K., & El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroscience*, 28(33), 8354–8360.
- Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T., & Kurachi, Y. (2001). An inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281(3), C922–C931.
- Higgins, C. M. J., Jung, C., & Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neuroscience*, 4, 1–14.
- Highley, J. R., Kirby, J., Jansweijer, J. A., Webb, P. S., Hewamadduma, C. A., Heath, P. R., Higginbottom, A., Raman, R., Ferraiuolo, L., Cooper-Knock, J., Mcdermott, C. J., Wharton, S. B., Shaw, P. J., & Ince, P. G. (2014). Loss of nuclear TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) causes altered expression of splicing machinery and widespread dysregulation of RNA splicing in motor neurones. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(6), 670–685.
- Holtman, I. R., Raj, D. D., Miller, J. A., Schaafsma, W., Yin, Z., Brouwer, N., Wes, P. D., Möller, T., Orre, M., Kamphuis, W., Hol, E. M., Boddeke, E. W. G. M., & Eggen, B. J. L. (2015). Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 31.
- Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W., & Appel, S. H. (2015). Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 12(2), 364–375.
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., DeGennaro, L. J., Cleveland, D. W., & Rothstein, J. D. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1604–1609.
- Hübbers, A., Just, W., Rosenbohm, A., Müller, K., Marroquin, N., Goebel, I., Högel, J., Thiele, H., Altmüller, J., Nürnberg, P., Weishaupt, J. H., Kubisch, C., Ludolph, A. C., & Volk, A. E. (2015). De novo FUS mutations are the most frequent genetic cause in early-onset German ALS patients. *Neurobiology of Aging*, 36(11), 3117.e1-3117.e6.
- Hubert, J. P., Delumeau, J. C., Glowinski, J., Prémont, J., & Doble, A. (1994). Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action. *British Journal of Pharmacology*, 113(1), 261–267.
- Hughes, A. N., & Appel, B. (2020). Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination. *Nature Neuroscience*, 23(9), 1055–1066.
- Hughes, E. G., & Stockton, M. E. (2021). Premyelinating Oligodendrocytes: Mechanisms Underlying Cell Survival and Integration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(July), 1–17.
- Ilieva, H., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology*, 187(6), 761–772.
- Izquierdo, P., Attwell, D., & Madry, C. (2019). Ion Channels and Receptors as Determinants of Microglial Function. *Trends in Neurosciences*, 42(4), 278–292.
- Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E. D., De Zeeuw, C. I., & Hoogenraad, C. C. (2008). Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase Is Sufficient to Induce Amyotrophic Lateral Sclerosis in Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*, 28(9), 2075–2088.
- Jacobsson, J., Jonsson, P. A., Andersen, P. M., Forsgren, L., & Marklund, S. L. (2001). Superoxide dismutase in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients with and without CuZn-superoxide dismutase mutations. *Brain*, 124(7), 1461–1466.
- Jonsson, P. A., Ernhill, K., Andersen, P. M., Bergemalm, D., Brännström, T., Gredal, O., Nilsson, P., & Marklund, S. L. (2004). Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 127(1), 73–88.

- Joyce, P. I., Fratta, P., Fisher, E. M. C., & Acevedo-Arozena, A. (2011). SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: Recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mammalian Genome*, 22(7–8), 420–448.
- Juneja, T., Pericak-Vance, M. A., Laing, N. G., Dave, S., & Siddique, T. (1997). Prognosis in familial amyotrophic lateral sclerosis: Progression and survival in patients with glu100gly and ala4val mutations in Cu,Zn superoxide dismutase. *Neurology*, 48(1), 55–57.
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(August), 1–18.
- Kabashi, E., Agar, J. N., Taylor, D. M., Minotti, S., & Durham, H. D. (2004). Focal dysfunction of the proteasome: A pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 89(6), 1325–1335.
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., & Rouleau, G. A. (2007). Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: The cause of all amyotrophic lateral sclerosis? *Annals of Neurology*, 62(6), 553–559.
- Kaiser, M., Maletzki, I., Hülsmann, S., Holtmann, B., Schulz-Schaeffer, W., Kirchhoff, F., Bähr, M., & Neusch, C. (2006). Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 99(3), 900–912.
- Kakaroubas, N., Brennan, S., Keon, M., & Saksena, N. K. (2019). Pathomechanisms of Blood-Brain Barrier Disruption in ALS. *Neuroscience Journal*, 2019, 1–16.
- Kalafatakis, I., & Karagogeos, D. (2021). Oligodendrocytes and microglia: Key players in myelin development, damage and repair. *Biomolecules*, 11(7).
- Kalsi, Greenwood, Wilkin, Butt, Kalsi, A. S., Greenwood, K., Wilkin, G., & Butt, A. M. (2004). Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: A developmental study in the rat optic nerve. *Journal of Anatomy*, 204(6), 475–485.
- Kang, S. H., Fukaya, M., Yang, J. K., Rothstein, J. D., & Bergles, D. E. (2010). NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron*, 68(4), 668–681.
- Kang, S. H., Li, Y., Fukaya, M., Lorenzini, I., Cleveland, D. W., Ostrow, L. W., Rothstein, J. D., & Bergles, D. E. (2013). Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 16(5), 571–579.
- Kato, S., Takikawa, M., Nakashima, K., Hirano, A., Cleveland, D. W., Kusaka, H., Shibata, N., Kato, M., Nakano, I., & Ohama, E. (2000). New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: Inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. In *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (Vol. 1, Issue 3, pp. 163–184).
- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., & McGeer, P. L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *American Journal of Pathology*, 140(3), 691–707.
- Kawamoto, Y., Ito, H., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Akiguchi, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Kusaka, H., Hirano, A., & Takahashi, R. (2010). HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn of patients with sporadic and Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutant amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(4), 331–344.
- Kelekar, A. (2006). Autophagy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066, 259–271.
- Kelley, K. W., Ben Haim, L., Schirmer, L., Tyzack, G. E., Tolman, M., Miller, J. G., Tsai, H. H., Chang, S. M., Molofsky, A. V., Yang, Y., Patani, R., Lakatos, A., Ullian, E. M., & Rowitch, D. H. (2018). Kir4.1-Dependent Astrocyte-Fast Motor Neuron Interactions Are Required for Peak Strength. *Neuron*, 98(2), 306-319.e7.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P. A., Selvakumar, G. P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S. S., & Zaheer, A. (2016). Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine*, 1(1), 1–15.
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K.,

- David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, *169*(7), 1276-1290.e17.
- Kessarlis, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, *9*(2), 173-179.
- Kettenmann, H., Hoppe, D., Gottmann, K., Banati, R., & Kreutzberg, G. (1990). Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *Journal of Neuroscience Research*, *26*(3), 278-287.
- Kettenmann, Helmut, Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, *77*(1), 10-18.
- Kia, A., McAvoy, K., Krishnamurthy, K., Trotti, D., & Pasinelli, P. (2018). Astrocytes expressing ALS-linked mutant FUS induce motor neuron death through release of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, *66*(5), 1016-1033.
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(MAR), 1-8.
- Kim, S., Chung, A. Y., Na, J. E., Lee, S. J., Jeong, S. H., Kim, E., Sun, W., Rhyu, I. J., & Park, H. C. (2019). Myelin degeneration induced by mutant superoxide dismutase 1 accumulation promotes amyotrophic lateral sclerosis. *GLIA*, 1-12.
- Kinboshi, M., Ikeda, A., & Ohno, Y. (2020). Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. *Frontiers in Neurology*, *11*(December), 1-10.
- Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Akagi, T., Hashikawa, T., Doi, H., Takumi, T., Hicks, G. G., Hattori, N., Shimogori, T., & Nukina, N. (2015). FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, *3*, 24.
- Kipnis, J., & Schwartz, M. (2005). Controlled Autoimmunity in CNS Maintenance and Repair at the Crossroads of Health and Disease Some Autoimmune T-Cells Serve. *NeuroMolecular Medicine*, *7*(3), 197-206.
- Kitaura, H., Shirozu, H., Masuda, H., Fukuda, M., Fujii, Y., & Kakita, A. (2018). Pathophysiological Characteristics Associated With Epileptogenesis in Human Hippocampal Sclerosis. *EBioMedicine*, *29*, 38-46.
- Klim, J. R., Williams, L. A., Limone, F., Guerra San Juan, I., Davis-Dusenbery, B. N., Mordes, D. A., Burberry, A., Steinbaugh, M. J., Gamage, K. K., Kirchner, R., Moccia, R., Cassel, S. H., Chen, K., Wainger, B. J., Woolf, C. J., & Eggan, K. (2019). ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STMN2, a mediator of motor neuron growth and repair. *Nature Neuroscience*, *22*(2), 167-179.
- Knapp, P. E., Skoff, R. P., & Sprinkle, T. J. (1988). Differential expression of galactocerebroside, myelin basic protein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase during development of oligodendrocytes in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, *21*(2-4), 249-259.
- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, *129*(4), 1043-1054.
- Komine, O., & Yamanaka, K. (2016). Neuroinflammation in motor neuron disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, *7*(2), 126-138.
- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(10), 2532-2546.
- Kotter, M. R. (2006). Myelin Impairs CNS Remyelination by Inhibiting Oligodendrocyte Precursor Cell Differentiation. *Journal of Neuroscience*, *26*(1), 328-332.
- Kovacs, M., Trias, E., Varela, V., Ibarburu, S., Beckman, J. S., Moura, I. C., Hermine, O., King, P. H., Si, Y., Kwon, Y., & Barbeito, L. (2019). CD34 Identifies a Subset of Proliferating Microglial Cells Associated with Degenerating Motor Neurons in ALS. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 3880.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L.,

- O’Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., ... Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, *47*(3), 566-581.e9.
- Krause, D., Ito, T., Fackler, M., Smith, O., Collector, M., Sharkis, S., & May, W. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, *84*(3), 691–701.
- Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Maldonado, H. M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S. N., & Eaton, M. J. (2007). Downregulation of Kir4.1 Inward Rectifying Potassium Channel Subunits by RNAi Impairs Potassium Transfer and Glutamate Uptake by Cultured Cortical Astrocytes. *Glia*, *281*(14), 274–281.
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, *29*(1), ix.
- Kushner, P. D., Stephenson, B. A., & Wright, S. (1991). Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of Amyotrophic Lateral Sclerosis Brain. *Journal of Neurophathology and Experimental Neurology*, *50*(3), 263–277.
- Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Dalmau, I., Gregersen, R., García-Ovejero, D., Babcock, A., Owens, T., & Finsen, B. (2005). Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury. *Glia*, *50*(2), 121–131.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2010). TDP-43 and FUS/TLS: Emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, *19*(R1), 46–64.
- Lam, D., Lively, S., & Schlichter, L. C. (2017). Responses of rat and mouse primary microglia to pro- and anti-inflammatory stimuli: Molecular profiles, K⁺ channels and migration. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 14, Issue 1). Journal of Neuroinflammation.
- Lam, D., & Schlichter, L. C. (2015). Expression and contributions of the Kir2.1 inward-rectifier K⁺ channel to proliferation, migration and chemotaxis of microglia in unstimulated and anti-inflammatory states. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*(MAY), 1–12.
- Lane, R. M., & Farlow, M. R. (2005). Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer’s disease. *Journal of Lipid Research*, *46*(5), 949–968.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R., & Nave, K. A. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nature Genetics*, *33*(3), 366–374.
- Larsen, B. R., & MacAulay, N. (2014). Kir4.1-mediated spatial buffering of K⁺: Experimental challenges in determination of its temporal and quantitative contribution to K⁺ clearance in the brain. *Channels*, *8*(6), 544–550.
- Larson, V. A., Mironova, Y., Vanderpool, K. G., Waisman, A., Rash, J. E., Agarwal, A., & Bergles, D. E. (2018). Oligodendrocytes control potassium accumulation in white matter and seizure susceptibility. *ELife*, *7*, e34829.
- Lassmann, H., van Horssen, J., & Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: Pathology and pathogenesis. *Nature Reviews Neurology*, *8*(11), 647–656.
- Lattante, S., Rouleau, G. A., & Kabashi, E. (2013). TARDBP and FUS Mutations Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Summary and Update. *Human Mutation*, *34*(6), 812–826.
- Lee, J. C., Seong, J., Kim, S. H., Lee, S. J., Cho, Y. J., An, J., Nam, D. H., Joo, K. M., & Cha, C. I. (2012). Replacement of microglial cells using Clodronate liposome and bone marrow transplantation in the central nervous system of SOD1G93A transgenic mice as an in vivo model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *418*(2), 359–365.
- Lee, J., Kawaguchi, Y., Li, M., Kapur, M., Choi, S. J., Kim, J., Park, S., Zhu, H., & Yao, T. (2016). Uncoupling of protein aggregation and neurodegeneration in a mouse ALS model. *Neurodegenerative Diseases*, *15*(6), 339–349.
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A.,

- Jin, L., Zhang, P. W., Pellerin, L., Magistretti, P. J., & Rothstein, J. D. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, *487*(7408), 443–448.
- Lewis, C. A., Manning, J., Rossi, F., & Krieger, C. (2012). The neuroinflammatory response in ALS: The roles of microglia and T cells. *Neurology Research International*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/803701>
- Li, J., Ramenaden, E. R., Peng, J., Koito, H., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2008). Tumor necrosis factor α mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *Journal of Neuroscience*, *28*(20), 5321–5330.
- Li, Q., Cheng, Z., Zhou, L., Darmanis, S., Neff, N. F., Okamoto, J., Gulati, G., Bennett, M. L., Sun, L. O., Clarke, L. E., Marschallinger, J., Yu, G., Quake, S. R., Wyss-Coray, T., & Barres, B. A. (2019). Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron*, *101*(2), 207–223.e10.
- Li, X., Lv, J., Li, J., & Ren, X. (2021). Kir4.1 may represent a novel therapeutic target for diabetic retinopathy (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *22*(3), 1–10.
- Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., & Gitler, A. D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *Journal of Cell Biology*, *201*(3), 361–372.
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology*, *237*(1), 147–152.
- Liddelw, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, *46*(6), 957–967.
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487.
- Lino, M. M., Schneider, C., & Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 Mutants in Postnatal Motoneurons Does Not Cause Motoneuron Pathology or Motoneuron Disease. *Journal of Neuroscience*, *22*(12), 4825–4832.
- Liu, H. N., Tjostheim, S., da Silva, K., Taylor, D., Zhao, B., Rakhit, R., Brown, M., Chakrabarty, A., McLaurin, J., & Robertson, J. (2012). Targeting of monomer/misfolded SOD1 as a therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, *32*(26), 8791–8799.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *2*(March).
- Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia responses to pro-inflammatory stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and reprogramming by resolving cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(July), 1–19.
- Livesey, M. R., Magnani, D., Cleary, E. M., Vasistha, N. A., James, O. T., Selvaraj, B. T., Burr, K., Story, D., Shaw, C. E., Kind, P. C., Hardinham, G. E., Wyllie, D. J. A., Chandran, S., Hardinham, G. E., Wyllie, D. J. A., Chandran, S., Hardinham, G. E., Wyllie, D. J. A., Chandran, S., ... Chandran, S. (2016). Maturation and Electrophysiological Properties of Human Pluripotent Stem Cell-Derived. *Stem Cells*, *34*(4), 1040–1053.
- Lloyd, A. F., & Miron, V. E. (2019). The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. *Nature Reviews Neurology*, *15*(8), 447–458.
- Lobsiger, C. S., Boillee, S., McAlonis-Downes, M., Khan, A. M., Feltri, M. L., Yamanaka, K., & Cleveland, D. W. (2009). Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4465–4470.
- Lobsiger, C. S., & Cleveland, D. W. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1355–1360.
- Logroscino, G., Traynor, B. J., Hardiman, O., Chió, A., Mitchell, D., Swingler, R. J., Millul, A., Benn, E., & Beghi, E. (2010). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of*

Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 81(4), 385–390.

- Lombardi, M., Parolisi, R., Scaroni, F., Bonfanti, E., Gualerzi, A., Gabrielli, M., Kerlero de Rosbo, N., Uccelli, A., Giussani, P., Viani, P., Garlanda, C., Abbracchio, M. P., Chaabane, L., Buffo, A., Fumagalli, M., & Verderio, C. (2019). Detrimental and protective action of microglial extracellular vesicles on myelin lesions: astrocyte involvement in remyelination failure. *Acta Neuropathologica*, 138(6), 987–1012.
- Lorente Pons, A., Higginbottom, A., Cooper-Knock, J., Alrafiah, A., Alofi, E., Kirby, J., Shaw, P. J., Wood, J. D., Highley, J. R., Cooper-Knock, J., Alrafiah, A., Alofi, E., Kirby, J., Shaw, P. J., Wood, J. D., & Highley, J. R. (2020). Oligodendrocyte pathology exceeds axonal pathology in white matter in human amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Pathology*, 251(3), 262–271.
- Lu, C.-H., Allen, K., Oei, F., Leoni, E., Kuhle, J., Tree, T., Fratta, P., Sharma, N., Sidle, K., Howard, R., Orrell, R., Fish, M., Greensmith, L., Pearce, N., Gallo, V., & Malaspina, A. (2016). Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 3(4), e244.
- Lu, Q. R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C. D., & Rowitch, D. H. (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell*, 109(1), 75–86.
- Mackenzie, I. R. A., Bigio, E. H., Ince, P. G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N. J., Kwong, L. K., Forman, M. S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretzschmar, H. A., Monoranu, C. M., Highley, J. R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P. J., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology*, 61(5), 427–434.
- Madry, C., & Attwell, D. (2015). Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying Microglial dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), 12443–12450.
- Madry, C., Kyrargyri, V., Arancibia-Cárcamo, I. L., Jolivet, R., Kohsaka, S., Bryan, R. M., & Attwell, D. (2018). Microglial Ramification, Surveillance, and Interleukin-1 β Release Are Regulated by the Two-Pore Domain K⁺ Channel THIK-1. *Neuron*, 97(2), 299–312.e6.
- Maezawa, I., Nguyen, H. M., Di Lucente, J., Jenkins, D. P., Singh, V., Hilt, S., Kim, K., Rangaraju, S., Levey, A. I., Wulff, H., & Jin, L. W. (2018). Kv1.3 inhibition as a potential microglia-Targeted therapy for Alzheimer's disease: Preclinical proof of concept. *Brain*, 141(2), 596–612.
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*, 8(2), 184.
- Maier, M., Welt, T., Wirth, F., Montrasio, F., Preisig, D., McAfoose, J., Vieira, F. G., Kulic, L., Späni, C., Stehle, T., Perrin, S., Weber, M., Hock, C., Nitsch, R. M., & Grimm, J. (2018). A human-derived antibody targets misfolded SOD1 and ameliorates motor symptoms in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Science Translational Medicine*, 10(470).
- Majcher, V., Goode, A., James, V., & Layfield, R. (2015). Autophagy receptor defects and ALS-FTLD. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 66(PA), 43–52.
- Maldonado, P. P., Velez-Fort, M., Levavasseur, F., & Angulo, M. C. (2013). Oligodendrocyte Precursor Cells Are Accurate Sensors of Local K⁺ in Mature Gray Matter. *Journal of Neuroscience*, 33(6), 2432–2442.
- Maniatis, S., Äijö, T., Vickovic, S., Braine, C., Kang, K., Mollbrink, A., Fagegaltier, D., Andrusivová, Ž., Saarenpää, S., Saiz-Castro, G., Cuevas, M., Watters, A., Lundberg, J., Bonneau, R., & Phatnani, H. (2019). Spatiotemporal dynamics of molecular pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 364(6435), 89–93.
- Maragakis, N. J., Dykes-Hoberg, M., & Rothstein, J. D. (2004). Altered Expression of the Glutamate Transporter EAAT2b in Neurological Disease. *Annals of Neurology*, 55(4), 469–477.
- Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Mu, Y., Smith, A. M., Cezar, G. G., & Gage, F. H. (2008). Non-Cell-Autonomous Effect of Human SOD1G37R Astrocytes on Motor Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3(6), 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.001>

- Marden, J. J., Harraz, M. M., Williams, A. J., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., & Engelhardt, J. F. (2007). Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(10), 2913–2919.
- Marignier, R., Nicolle, A., Watrin, C., Touret, M., Cavagna, S., Varrin-Doyer, M., Cavillon, G., Rogemond, V., Confavreux, C., Honnorat, J., & Giraudon, P. (2010). Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain*, *133*(9), 2578–2591.
- Masli, S., & Turpie, B. (2009). Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)- α are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor- β -treated antigen-presenting cells. *Immunology*, *127*(1), 62–72.
- Mason, J. L., Suzuki, K., Chaplin, D. D., & Matsushima, G. K. (2001). Interleukin-1 β promotes repair of the CNS. *Journal of Neuroscience*, *21*(18), 7046–7052.
- Mathys, H., AdaiKAN, C., Gao, F., Young, J. Z., Manet, E., Hemberg, M., De Jager, P. L., Ransohoff, R. M., Regev, A., & Tsai, L. H. (2017). Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Reports*, *21*(2), 366–380.
- Matute, C., Alberdi, E., Domercq, M., Pérez-Cerdá, F., Pérez-Samartín, A., & Sánchez-Gómez, M. V. (2001). The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends in Neurosciences*, *24*(4), 224–230.
- McAlary, L., Plotkin, S. S., Yerbury, J. J., & Cashman, N. R. (2019). Prion-Like Propagation of Protein Misfolding and Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*(November), 1–21.
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., & Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience*, *13*(December), 1–27.
- Melzer, N., Meuth, S. G., & Wiendl, H. (2009). CD8+ T cells and neuronal damage: Direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *FASEB Journal*, *23*(11), 3659–3673.
- Menon, P., Higashihara, M., van den Bos, M., Geevasinga, N., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2020). Cortical hyperexcitability evolves with disease progression in ALS. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *7*(5), 733–741.
- Michell-Robinson, M. A., Touil, H., Healy, L. M., Owen, D. R., Durafourt, B. A., Bar-Or, A., Antel, J. P., & Moore, C. S. (2015). Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*, *138*(5), 1138–1159.
- Migliarini, S., Scaricamazza, S., Valle, C., Ferri, A., Pasqualetti, M., & Ferraro, E. (2021). Microglia morphological changes in the motor cortex of hsd1g93a transgenic als mice. *Brain Sciences*, *11*(6).
- Miller, B. A., Sun, F., Christensen, R. N., Ferguson, A. R., Bresnahan, J. C., & Beattie, M. S. (2005). A sublethal dose of TNF α potentiates kainate-induced excitotoxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Neurochemical Research*, *30*(6–7), 867–875.
- Miller, S. B. M., Mogk, A., & Bukau, B. (2015). Spatially organized aggregation of misfolded proteins as cellular stress defense strategy. *Journal of Molecular Biology*, *427*(7), 1564–1574.
- Milton, M., & Smith, P. D. (2018). It's all about timing: The involvement of kir4.1 channel regulation in acute ischemic stroke pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(February), 1–6.
- Miron, V. E., Boyd, A., Zhao, J.-W. W., Yuen, T. J., Ruckh, J. M., Shadrach, J. L., van Wijngaarden, P., Wagers, A. J., Williams, A., Franklin, R. J. M. M., Ffrench-Constant, C., Wijngaarden, P., Van, Wagers, A. J., Williams, A., van Wijngaarden, P., Wagers, A. J., Williams, A., Franklin, R. J. M. M., & Ffrench-Constant, C. (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nature Neuroscience*, *16*(9), 1211–1218.
- Mitsumoto, H., Santella, R., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H. C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., Gordon, P. H., Hornig, M., Mehrazin, M., Naini, A., Flint Beal, M., & Factor-Litvak, P. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotrophic Lateral*

Sclerosis, 9(3), 177–183.

- Miyazaki, S. -I, Takahashi, K., Tsuda, K., & Yoshii, M. (1974). Analysis of non-linearity observed in the current—voltage relation of the tunicate embryo. *The Journal of Physiology*, 238(1), 55–77.
- Moisse, K., & Strong, M. J. (2006). Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(11–12), 1083–1093.
- Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A., & Santillo, M. (2016). The Cu, Zn superoxide dismutase: Not only a dismutase enzyme. *Frontiers in Physiology*, 7(NOV), 1–8.
- Moroni, R. F., Inverardi, F., Regondi, M. C., Pennacchio, P., & Frassoni, C. (2015). Developmental expression of Kir4.1 in astrocytes and oligodendrocytes of rat somatosensory cortex and hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 47, 198–205.
- Morrison, B. M., Lee, Y., & Rothstein, J. D. (2013). Oligodendroglia: Metabolic supporters of axons. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 644–651.
- Morrison, B. M., Lee, Y., & Rothstein, J. D. (2014). Oligodendroglia metabolically support axons and maintain structural integrity. *Stem Cells*, 23(12), 1–17.
- Münch, C., O'Brien, J., & Bertolotti, A. (2011). Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3548–3553.
- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown, J., & Itoyama, Y. (2001). Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: Associated mutations develop motor neuron disease. *Journal of Neuroscience*, 21(23), 9246–9254.
- Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., Kuhachi, Y., & Ottersen, O. P. (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26(1), 47–54.
- Nagelhus, E. A., Mathiesen, T. M., & Ottersen, O. P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, 129(4), 905–913.
- Nagy, D., Kato, T., & Kushner, P. D. (1994). Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, 38(3), 336–347.
- Nakajima, M., Kawamura, T., Tokui, R., Furuta, K., Sugino, M., Nakanishi, M., Okuyama, S., & Furukawa, Y. (2013). Enhanced accumulation of Kir4.1 protein, but not mRNA, in a murine model of cuprizone-induced demyelination. *Brain Research*, 1537, 340–349.
- Nasrabady, S. E., Rizvi, B., Goldman, J. E., & Brickman, A. M. (2018). White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 22.
- Nassif, M., Woehlbier, U., & Manque, P. A. (2017). The enigmatic role of C9ORF72 in autophagy. *Frontiers in Neuroscience*, 11(AUG), 1–10.
- Nave, K. A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 468(7321), 244–252.
- Nemes-Baran, A. D., White, D. R., & DeSilva, T. M. (2020). Fractalkine-Dependent Microglial Pruning of Viable Oligodendrocyte Progenitor Cells Regulates Myelination. *Cell Reports*, 32(7), 108047.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133.
- Neusch, C., Bähr, M., & Schneider-Gold, C. (2007). Glia cells in amyotrophic lateral sclerosis: new clues to understanding an old disease? *Muscle and Nerve*, 35(6), 712–724.
- Neusch, C., Papadopoulos, N., Muller, M., Maletzki, I., Winter, S. M., Hirrlinger, J., Handschuh, M.,

- Bahr, M., Richter, D. W., Kirchhoff, F., & Hulsmann, S. (2006). Lack of the Kir4.1 Channel Subunit Abolishes K⁺ Buffering Properties of Astrocytes in the Ventral Respiratory Group: Impact on Extracellular K⁺ Regulation. *Journal of Neurophysiology*, *95*(3), 1843–1852.
- Neusch, C., Rozenfurt, N., Jacobs, R. E., Lester, H. A., & Kofuji, P. (2001). Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *The Journal of Neuroscience*, *21*(15), 5429–5438.
- Nguyen, H. M., Grössinger, E. M., Horiuchi, M., Davis, K. W., Jin, L. W., Maezawa, I., & Wulff, H. (2017). Differential Kv1.3, KCa3.1, and Kir2.1 expression in “classically” and “alternatively” activated microglia. *Glia*, *65*(1), 106–121.
- Nikodemova, M., Small, A. L., Smith, S. M. C., Mitchell, G. S., & Watters, J. J. (2014). Spinal but not cortical microglia acquire an atypical phenotype with high VEGF, galectin-3 and osteopontin, and blunted inflammatory responses in ALS rats. *Neurobiology of Disease*, *69*, 43–53.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, *308*(5726), 1314–1318.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., & Ichijo, H. (2008). ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes and Development*, *22*(11), 1451–1464.
- Noble, D. (1965). Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward going (anomalous) rectification. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, *66*(S2), 127–135.
- Nomura, T., Watanabe, S., Kaneko, K., Yamanaka, K., Nukina, N., & Furukawa, Y. (2014). Intranuclear aggregation of mutant FUS/TLS as a molecular pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(2), 1192–1202.
- Nonneman, A., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2014). The role of oligodendroglial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Disease Management*, *4*(3), 223–239.
- Nörenberg, W., Gebicke-Haerter, P. J., & Illes, P. (1992). Inflammatory stimuli induce a new K⁺ outward current in cultured rat microglia. *Neuroscience Letters*, *147*(2), 171–174.
- Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathologica*, *132*(1), 1–21.
- Nwaobi, S. E., Erica Lin, S. R. P., Olsen, M. L., Lin, E., Peramsetty, S. R., & Olsen, M. L. (2014). DNA methylation functions as a critical regulator of Kir4.1 expression during CNS development. *Glia*, *62*(3), 411–427.
- O’Rourke, J. G., Bogdanik, L., Yáñez, A., Lall, D., Wolf, A. J., Muhammad, A. K. M. G., Ho, R., Carmona, S., Vit, J. P., Zarrow, J., Kim, K. J., Bell, S., Harms, M. B., Miller, T. M., Dangler, C. A., Underhill, D. M., Goodridge, H. S., Lutz, C. M., & Baloh, R. H. (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*, *351*(6279), 1324–1329.
- Obrador, E., Salvador, R., Estrela, J. M., López-Blanch, R., Jihad-Jebbar, A., & Vallés, S. L. (2020). Oxidative stress, neuroinflammation and mitochondria in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants*, *9*(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox9090901>
- Ohgomori, T., Yamada, J., Takeuchi, H., Kadomatsu, K., & Jinno, S. (2016). Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, *43*(10), 1340–1351.
- Ohno, Y., Kunisawa, N., & Shimizu, S. (2021). Emerging roles of astrocyte Kir4.1 channels in the pathogenesis and treatment of brain diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), 1–17.
- Okada, M., Yamashita, S., Ueyama, H., Ishizaki, M., Maeda, Y., & Ando, Y. (2018). Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *ENeurologicalSci*, *11*(May), 11–14.
- Olsen, M. L., Campbell, S. L., & Sontheimer, H. (2007). Differential Distribution of Kir4.1 in Spinal

- Cord Astrocytes Suggests Regional Differences in K⁺ Homeostasis. *Journal of Neurophysiology*, 98(2), 786–793.
- Olsen, Michelle L., & Sontheimer, H. (2008). Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: From K⁺ buffering to cell differentiation. *Journal of Neurochemistry*, 107(3), 589–601.
- Ono, K., Kagawa, T., Tsumori, T., Yokota, S., & Yasui, Y. (2001). Morphological changes and cellular dynamics of oligodendrocyte lineage cells in the developing vertebrate central nervous system. *Developmental Neuroscience*, 23(4–5), 346–355.
- Orkand, R. K., Nicholls, J. G., & Kuffler, S. W. (1966). Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *Journal of Neurophysiology*, 29(4), 788–806.
- Paasila, P. J., Davies, D. S., Kril, J. J., Goldsbury, C., & Sutherland, G. T. (2019). The relationship between the morphological subtypes of microglia and Alzheimer’s disease neuropathology. *Brain Pathology*, 29(6), 726–740.
- Paasila, P. J., Jarmo Paasila, P., Davies, D. S., Sutherland, G. T., & Goldsbury, C. (2020). Clustering of activated microglia occurs before the formation of dystrophic neurites in the evolution of A β plaques in Alzheimer’s disease. *Free Neuropathology*, 1(0), 20.
- Pang, Y., Cai, Z., & Rhodes, P. G. (2003). Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Developmental Brain Research*, 140(2), 205–214.
- Pansarasa, O., Bordoni, M., Diamanti, L., Sproviero, D., Gagliardi, S., & Cereda, C. (2018). Sod1 in amyotrophic lateral sclerosis: “ambivalent” behavior connected to the disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1–13.
- Paolicelli, R. C., Jawaid, A., Henstridge, C. M., Valeri, A., Merlini, M., Robinson, J. L., Lee, E. B., Rose, J., Appel, S., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Spires-Jones, T., Schulz, P. E., & Rajendran, L. (2017). TDP-43 Depletion in Microglia Promotes Amyloid Clearance but Also Induces Synapse Loss. *Neuron*, 95(2), 297–308.e6.
- Parakh, S., & Atkin, J. D. (2016). Protein folding alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, 1648, 633–649.
- Parakh, S., Spencer, D. M., Halloran, M. A., Soo, K. Y., & Atkin, J. D. (2013). Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
- Park, S. B., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2017). Axonal Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Axonal Excitability in ALS. *Neurotherapeutics*, 14(1), 78–90.
- Peferoen, L., Kipp, M., van der Valk, P., van Noort, J. M., & Amor, S. (2014). Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*, 141(3), 302–313.
- Peng, A. Y. T., Agrawal, I., Ho, W. Y., Yen, Y. C., Pinter, A. J., Liu, J., Phua, Q. X. C., Koh, K. B., Chang, J. C., Sanford, E., Man, J. H. K., Wong, P., Gutmann, D. H., Tucker-Kellogg, G., & Ling, S. C. (2020). Loss of TDP-43 in astrocytes leads to motor deficits by triggering A1-like reactive phenotype and triglial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(46), 29101–29112.
- Petrozziello, T., Secondo, A., Tedeschi, V., Esposito, A., Sisalli, M. J., Scorziello, A., Renzo, G. Di, & Annunziato, L. (2017). ApoSOD1 lacking dismutase activity neuroprotects motor neurons exposed to beta-methylamino-L-alanine through the Ca²⁺/Akt/ERK1/2 prosurvival pathway. *Cell Death and Differentiation*, 24(3), 511–522.
- Philips, T., Bento-Abreu, A., Nonneman, A., Haeck, W., Staats, K., Geelen, V., Hersmus, N., Küsters, B., Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Richardson, W. D., & Robberecht, W. (2013). Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 136(2), 471–482.
- Philips, T., Mironova, Y. A., Jouroukhin, Y., Chew, J., Vidensky, S., Farah, M. H., Pletnikov, M. V., Bergles, D. E., Morrison, B. M., & Rothstein, J. D. (2021). MCT1 Deletion in Oligodendrocyte Lineage Cells Causes Late-Onset Hypomyelination and Axonal Degeneration. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106.

- Philips, T., & Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet Neurology*, *10*(3), 253–263.
- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2014). Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, *262*(Part B), 111–120.
- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2016). Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*, *2015*, 5.67.1–5.67.21.
- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2017). Oligodendroglia: Metabolic supporters of neurons. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(9), 3271–3280.
- Pickles, S., Semmler, S., Broom, H. R., Destroismaisons, L., Legroux, L., Arbour, N., Meiering, E., Cashman, N. R., & Vande Velde, C. (2016). ALS-linked misfolded SOD1 species have divergent impacts on mitochondria. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 43.
- Plescher, M., Seifert, G., Hansen, J. N., Bedner, P., Steinhäuser, C., & Halle, A. (2018). Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, *66*(7), 1464–1480.
- Poliani, P. L., Wang, Y., Fontana, E., Robinette, M. L., Yamanishi, Y., Gilfillan, S., & Colonna, M. (2015). TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(5), 2161–2170.
- Poloni, M., Facchetti, D., Mai, R., Micheli, A., Agnoletti, L., Francolini, G., Mora, G., Camana, C., Mazzini, L., & Bachetti, T. (2000). Circulating levels of tumour necrosis factor- α and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, *287*(3), 211–214.
- Pons, V., & Rivest, S. (2020). Beneficial Roles of Microglia and Growth Factors in MS, a Brief Review. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*(September), 1–7.
- Poolos, N. P., Mauk, M. D., & Kocsis, J. D. (1987). Activity-evoked increases in extracellular potassium modulate presynaptic excitability in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, *58*(2), 404–416.
- Poopalasundaram, S., Knott, C., Shamotienko, O. G., Foran, P. G., Dolly, J. O., Ghiani, C. A., Gallo, V., & Wilkin, G. P. (2000). Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia*, *30*(4), 362–372.
- Portz, B., Lee, B. L., & Shorter, J. (2021). FUS and TDP-43 Phases in Health and Disease. *Trends in Biochemical Sciences*, *46*(7), 550–563.
- Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., & Rouleau, G. A. (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *Journal of Neuroscience*, *21*(10), 3369–3374.
- Psachoulia, K., Jamen, F., Young, K. M., & Richardson, W. D. (2009). Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing mouse brain. *Neuron Glia Biology*, *5*(3–4), 57–67.
- Rabizadeh, S., Gralla, E. B., Borchelt, D. R., Gwinn, R., Valentine, J. S., Sisodia, S., Wong, P., Lee, M., Hahn, H., & Bredesen, D. E. (1995). Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: Studies in yeast and neural cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(7), 3024–3028.
- Rakhit, R., Crow, J. P., Lepock, J. R., Kondejewski, L. H., Cashman, N. R., & Chakrabartty, A. (2004). Monomeric Cu,Zn-superoxide Dismutase Is a Common Misfolding Intermediate in the Oxidation Models of Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(15), 15499–15504.
- Rakhit, R., Robertson, J., Velde, C. Vande, Horne, P., Ruth, D. M., Griffin, J., Cleveland, D. W., Cashman, N. R., & Chakrabartty, A. (2007). An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. *Nature Medicine*, *13*(6), 754–759.
- Ramesh, G., Benge, S., Pahar, B., & Philipp, M. T. (2012). A possible role for inflammation in mediating apoptosis of oligodendrocytes as induced by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 1–15.
- Rangaraju, S., Raza, S. A., Pennati, A., Deng, Q., Dammer, E. B., Duong, D., Pennington, M. W.,

- Tansey, M. G., Lah, J. J., Betarbet, R., Seyfried, N. T., & Levey, A. I. (2017). A systems pharmacology-based approach to identify novel Kv1.3 channel-dependent mechanisms in microglial activation. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 1–20.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nature Neuroscience*, *19*(8), 987–991.
- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, *27*, 119–145.
- Ransom, C. B., & Sontheimer, H. (1995). Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes. *Journal of Neurophysiology*, *73*(1), 333–346.
- Ratti, A., & Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *Journal of Neurochemistry*, *138*, 95–111.
- Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: Progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(9), 1807–1817.
- Rawji, K. S., Mishra, M. K., & Yong, V. W. (2016). Regenerative capacity of macrophages for remyelination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*(MAY).
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, *378*(2), 169–180.
- Remillard, C. V., & Yuan, J. X. J. (2004). Activation of K⁺ channels: An essential pathway in programmed cell death. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, *286*(1 30-1).
- Renton, A. E., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 17–23.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, *72*(2), 257–268.
- Rienecker, K. D. A., Poston, R. G., & Saha, R. N. (2020). Merits and Limitations of Studying Neuronal Depolarization-Dependent Processes Using Elevated External Potassium. *ASN Neuro*, *12*.
- Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., & Gordon, J. W. (1995). Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(3), 689–693.
- Roberts, K., Zeineddine, R., Corcoran, L., Li, W., Campbell, I. L., & Yerbury, J. J. (2013). Extracellular aggregated Cu/Zn superoxide dismutase activates microglia to give a cytotoxic phenotype. *Glia*, *61*(3), 409–419.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X. X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., ... Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *362*(6415), 59–62.
- Rosenbluth, J., Nave, K. A., Mierzwa, A., & Schiff, R. (2006). Subtle myelin defects in PLP-null mice. *Glia*, *54*(3), 172–182.
- Rothstein, J. D. (2017). Edaravone: A new drug approved for ALS. *Cell*, *171*(4), 725.
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., & Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, *16*(3), 675–686.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., & Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*,

38(1), 73–84.

- Rotterman, T. M., & Alvarez, F. J. (2020). Microglia Dynamics and Interactions with Motoneurons Axotomized After Nerve Injuries Revealed By Two-Photon Imaging. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–22.
- Ruegsegger, C., Maharjan, N., Goswami, A., Filézac de L'Etang, A., Weis, J., Troost, D., Heller, M., Gut, H., & Saxena, S. (2016). Aberrant association of misfolded SOD1 with Na⁺/K⁺ATPase- α 3 impairs its activity and contributes to motor neuron vulnerability in ALS. *Acta Neuropathologica*, *131*(3), 427–451.
- Russo, M. V., & McGavern, D. B. (2017). Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148.
- Saab, A. S., Tzvetanova, I. D., & Nave, K.-A. A. (2013). The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(6), 1065–1072.
- Saab, A. S., Tzvetavona, I. D., Trevisiol, A., Baltan, S., Dibaj, P., Kusch, K., Möbius, W., Goetze, B., Jahn, H. M., Huang, W., Steffens, H., Schomburg, E. D., Pérez-Samartín, A., Pérez-Cerdá, F., Bakhtiari, D., Matute, C., Löwel, S., Griesinger, C., Hirrlinger, J., ... Nave, K.-A. A. (2016). Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron*, *91*(1), 119–132.
- Saberi, S., Stauffer, J. E., Schulte, D. J., & Ravits, J. (2015). Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurologic Clinics*, *33*(4), 855–876.
- Saitoh, Y., & Takahashi, Y. (2020). Riluzole for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Disease Management*, *10*(6), 343–355.
- Sakmann, B., & Trube, G. (1984). Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *The Journal of Physiology*, *347*(1), 641–657.
- Sanagi, T., Yuasa, S., Nakamura, Y., Suzuki, E., Aoki, M., Warita, H., Itoyama, Y., Uchino, S., Kohsaka, S., & Ohsawa, K. (2010). Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(12), 2736–2746.
- Sanger, D. J., & Depoortere, H. (1998). The pharmacology and mechanism of action of zolpidem. *CNS Drug Reviews*, *4*(4), 323–340.
- Sargsyan, S. A., Monk, P. N., & Shaw, P. J. (2005). Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, *51*(4), 241–253.
- Sasaki, S., Komori, T., & Iwata, M. (2000). Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, *100*(2), 138–144.
- Saxena, S., Cabuy, E., & Caroni, P. (2009). A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature Neuroscience*, *12*(5), 627–636.
- Saxena, S., Roselli, F., Singh, K., Leptien, K., Julien, J. P., Gros-Louis, F., & Caroni, P. (2013). Neuroprotection through Excitability and mTOR Required in ALS Motoneurons to Delay Disease and Extend Survival. *Neuron*, *80*(1), 80–96.
- Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H. El, Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., René, F., Dormann, D., Haass, C., Ludolph, A. C., Lagier-Tourenne, C., Storkebaum, E., & Dupuis, L. (2017). Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., & Stevens, B. (2013). The “quad-partite” synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*, *61*(1), 24–36.
- Scherer, S. S., Braun, P. E., Grinspan, J., Collarini, E., Wang, D. y., & Kamholz, J. (1994). Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development. *Neuron*, *12*(6), 1363–1375.
- Schettters, S. T. T., Gomez-Nicola, D., Garcia-Vallejo, J. J., & Van Kooyk, Y. (2018). Neuroinflammation: Microglia and T cells get ready to tango. *Frontiers in Immunology*, *8*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01905>

- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., & Migheli, A. (1996). Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 139(SUPPL.), 27–33.
- Schilling, T., & Eder, C. (2015). Microglial K⁺ channel expression in young adult and aged mice. *Glia*, 63(4), 664–672.
- Schipper, L. J., Raaphorst, J., Aronica, E., Baas, F., de Haan, R., de Visser, M., & Troost, D. (2016). Prevalence of brain and spinal cord inclusions, including dipeptide repeat proteins, in patients with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: a systematic neuropathological review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(6), 547–560.
- Schirmer, L., Möbius, W., Zhao, C., Cruz-Herranz, A., Ben Haim, L., Cordano, C., Shiow, L. R., Kelley, K. W., Sadowski, B., Timmons, G., Pröbstel, A. K., Wright, J. N., Sin, J. H., Devereux, M., Morrison, D. E., Chang, S. M., Sabeur, K., Green, A. J., Nave, K. A., ... Rowitch, D. H. (2018). Oligodendrocyte-encoded kir4.1 function is required for axonal integrity. *ELife*, 7, 1–21.
- Schirmer, L., Srivastava, R., Kalluri, S. R., Böttinger, S., Herwerth, M., Carassiti, D., Srivastava, B., Gempt, J., Schlegel, J., Kuhlmann, T., Korn, T., Reynolds, R., & Hemmer, B. (2014). Differential loss of KIR4.1 immunoreactivity in multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 75(6), 810–828.
- Schulz, K., Vulpe, C. D., Harris, L. Z., & David, S. (2011). Iron Efflux from Oligodendrocytes Is Differentially Regulated in Gray and White Matter. *Journal of Neuroscience*, 31(37), 13301–13311.
- Sebastian Monasor, L., Müller, S. A., Colombo, A. V., Tanrioever, G., König, J., Roth, S., Liesz, A., Berghofer, A., Piechotta, A., Prestel, M., Saito, T., Saido, T. C., Herms, J., Willem, M., Haass, C., Lichtenthaler, S. F., & Tahirovic, S. (2020). Fibrillar A β triggers microglial proteome alterations and dysfunction in Alzheimer mouse models. *ELife*, 9, 1–33.
- Serrano-Pozo, A., Betensky, R. A., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2016). Plaque-associated local toxicity increases over the clinical course of Alzheimer disease. *American Journal of Pathology*, 186(2), 375–384.
- Sharma, A., Lyashchenko, A. K., Lu, L., Nasrabady, S. E., Elmaleh, M., Mendelsohn, M., Nemes, A., Tapia, J. C., Mentis, G. Z., & Shneider, N. A. (2016). ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nature Communications*, 7.
- Shaw, P. J., Forrest, V., Ince, P. G., Richardson, J. P., & Wastell, H. J. (1995). CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: Elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration*, 4(2), 209–216.
- Shaw, P. J., Ince, P. G., Falkous, G., & Mantle, D. (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Annals of Neurology*, 38(4), 691–695.
- Sherwin, C., & Fern, R. (2005). Acute Lipopolysaccharide-Mediated Injury in Neonatal White Matter Glia: Role of TNF- α , IL-1 β , and Calcium. *The Journal of Immunology*, 175(1), 155–161.
- Shibata, N., Asayama, K., H \ddot{u} ratio, A., & Kobayashi, M. (1996). Immunohistochemical Study on Superoxide Dismutases in Spinal Cords from Autopsied Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Developmental Neuroscience*.
- Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.-X., Hung, W.-Y., Kato, T., & Asayama, K. (1996). Intense Superoxide Dismutase-1 Immunoreactivity in Intracytoplasmic Hyaline Inclusions of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with Posterior Column Involvement. *Journal Of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(4), 481–490.
- Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., & Kobayashi, M. (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Research*, 917(1), 97–104.
- Shih, P. Y., Savtchenko, L. P., Kamasawa, N., Dembitskaya, Y., McHugh, T. J., Rusakov, D. A., Shigemoto, R., & Semyanov, A. (2013). Retrograde Synaptic Signaling Mediated by K⁺ Efflux through Postsynaptic NMDA Receptors. *Cell Reports*, 5(4), 941–951.
- Sibille, J., Dao Duc, K., Holcman, D., & Rouach, N. (2015). The Neuroglial Potassium Cycle during

- Neurotransmission: Role of Kir4.1 Channels. *PLoS Computational Biology*, *11*(3), 1–22.
- Sicca, F., Ambrosini, E., Marchese, M., Sforna, L., Servettini, I., Valvo, G., Brignone, M. S., Lanciotti, A., Moro, F., Grottesi, A., Catacuzzeno, L., Baldini, S., Hasan, S., D'adamo, M. C., Franciolini, F., Molinari, P., Santorelli, F. M., & Pessia, M. (2016). Gain-of-function defects of astrocytic Kir4.1 channels in children with autism spectrum disorders and epilepsy. *Scientific Reports*, *6*(September), 1–15.
- Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G., & Appel, S. H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: A potential biomarker of disease burden. *Neurology*, *62*(10), 1758–1765.
- Skaper, S. D., Facci, L., & Giusti, P. (2014). Mast cells, glia and neuroinflammation: Partners in crime? *Immunology*, *141*(3), 314–327.
- Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P., & Appel, S. H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, *44*(4), 696–699.
- Snaidero, N., Velte, C., Myllykoski, M., Raasakka, A., Ignatev, A., Werner, H. B., Erwig, M. S., Möbius, W., Kursula, P., Nave, K. A., & Simons, M. (2017). Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Reports*, *18*(2), 314–323.
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(5), 249–263.
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends in Immunology*, *41*(9), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35.
- Solomon, J. N., Lewis, C.-A. B., Ajami, B., Corbel, S. Y., Rossi, F. M. V., & Krieger, C. (2006). Origin and Distribution of Bone Marrow-Derived Cells in the Central Nervous System in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sixth Report on the World Nutrition Situation Geneva*, *53*, 744–753.
- Song, F., Hong, X., Cao, J., Ma, G., Han, Y., Cepeda, C., Kang, Z., Xu, T., Duan, S., Wan, J., & Tong, X. (2018). Kir4.1 channels in NG2-glia play a role in development, potassium signaling, and ischemia-related myelin loss. *Communications Biology*, *1*(1), 80.
- Sontheimer, H., Trotter, J., Schachner, M., & Kettenmann, H. (1989). Channel expression correlates with differentiation stage during the development of Oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron*, *2*(2), 1135–1145.
- Spiller, K. J., Restrepo, C. R., Khan, T., Dominique, M. A., Fang, T. C., Canter, R. G., Roberts, C. J., Miller, K. R., Ransohoff, R. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2018). Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nature Neuroscience*, *21*(3), 329–340.
- Srivastava, R., Aslam, M., Kalluri, S. R., Schirmer, L., Buck, D., Tackenberg, B., Rothhammer, V., Chan, A., Gold, R., Berthele, A., Bennett, J. L., Korn, T., & Hemmer, B. (2012). Potassium Channel KIR4.1 as an Immune Target in Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, *367*(2), 115–123.
- Stallings, N. R., Puttaparthi, K., Luther, C. M., Burns, D. K., & Elliott, J. L. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiology of Disease*, *40*(2), 404–414.
- Stamenković, S., Dučić, T., Stamenković, V., Kranz, A., & Andjus, P. R. (2017). Imaging of glial cell morphology, SOD1 distribution and elemental composition in the brainstem and hippocampus of the ALS hSOD1G93A rat. *Neuroscience*, *357*, 37–55.
- Stamenković, S., Pavićević, A., Mojović, M., Popović-Bijelić, A., Selaković, V., Andjus, P., & Bačić, G. (2017). In vivo EPR pharmacokinetic evaluation of the redox status and the blood brain barrier permeability in the SOD1G93A ALS rat model. *Free Radical Biology and Medicine*, *108*, 258–269.
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS

- neurodegenerative diseases. *Immunology*, *154*(2), 204–219. <https://doi.org/10.1111/imm.12922>
- Stieber, A., Gonatas, J. O., & Gonatas, N. K. (2000). Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1G93A mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *177*(2), 114–123.
- Sun, S., Sun, Y., Ling, S.-C. C., Ferraiuolo, L., McAlonis-Downes, M., Zou, Y., Drenner, K., Wang, Y., Ditsworth, D., Tokunaga, S., Kopelevich, A., Kaspar, B. K., Lagier-Tourenne, C., & Cleveland, D. W. (2015). Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant sod1-mediated ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(50), E6993–E7002.
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, *19*(8), 477–489.
- Synofzik, M., Fernández-Santiago, R., Maetzler, W., Schöls, L., & Andersen, P. M. (2010). The human G93A SOD1 phenotype closely resembles sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *81*(7), 764–767.
- Szalay, G., Martinecz, B., Lénárt, N., Környei, Z., Orsolits, B., Judák, L., Császár, E., Fekete, R., West, B. L., Katona, G., Rózsa, B., & Dénes, Á. (2016). Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature Communications*, *7*(May).
- Takeuchi, R., Tada, M., Shiga, A., Toyoshima, Y., Konno, T., Sato, T., Nozaki, H., Kato, T., Horie, M., Shimizu, H., Takebayashi, H., Onodera, O., Nishizawa, M., Kakita, A., & Takahashi, H. (2016). Heterogeneity of cerebral TDP-43 pathology in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Evidence for clinico-pathologic subtypes. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 61.
- Tam, O. H., Rozhkov, N. V., Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., Propp, N., Phatnani, H., Kwan, J., Sareen, D., Broach, J. R., Simmons, Z., Arcila-Londono, X., Lee, E. B., Van Deerlin, V. M., Shneider, N. A., Fraenkel, E., Ostrow, L. W., Baas, F., ... Gale Hammell, M. (2019). Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. *Cell Reports*, *29*(5), 1164-1177.e5.
- Tan, C. F., Eguchi, H., Tagawa, A., Onodera, O., Iwasaki, T., Tsujino, A., Nishizawa, M., Kakita, A., & Takahashi, H. (2007). TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without SOD1 gene mutation. *Acta Neuropathologica*, *113*(5), 535–542.
- Tan, R. H., Ke, Y. D., Ittner, L. M., & Halliday, G. M. (2017). ALS/FTLD: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, *133*(2), 177–196.
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *53*(2), 1181–1194.
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, *539*(7628), 197–206.
- Thorburne, S. K., & Juurlink, B. H. J. (1996). Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, *67*(3), 1014–1022.
- Tollervey, J. R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., König, J., Hortobágyi, T., Nishimura, A. L., Župunski, V., Patani, R., Chandran, S., Rot, G., Zupan, B., Shaw, C. E., & Ule, J. (2011). Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nature Neuroscience*, *14*(4), 452–458.
- Tong, J., Huang, C., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Liu, X., Li, F., Zhou, H., & Xia, X. G. (2013). Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *EMBO Journal*, *32*(13), 1917–1926.
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G. C., Nwaobi, S. E., Xu, J., Hausteiner, M. D., Anderson, M. A., Mody, I., Olsen, M. L., Sofroniew, M. V., & Khakh, B. S. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington’s disease model mice. *Nature Neuroscience*, *17*(5), 694–703.
- Traiffort, E., Morisset-Lopez, S., Moussaed, M., & Zahaf, A. (2021). Defective oligodendroglial

- lineage and demyelination in amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 1–27.
- Troost, D., Van den Oord, J. J., De Jong, J. M. B. V., & Swaab, D. F. (1989). Lymphocytic infiltration in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. In *Clinical Neuropathology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 289–294).
- Turner, B. J., Ackerley, S., Davies, K. E., & Talbot, K. (2010). Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice. *Human Molecular Genetics*, 19(5), 815–824.
- Turner, B. J., Atkin, J. D., Farg, M. A., Da, W. Z., Rembach, A., Lopes, E. C., Patch, J. D., Hill, A. F., & Cheema, S. S. (2005). Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 25(1), 108–117.
- Turner, B. J., & Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 85, Issue 1, pp. 94–134).
- Turner, M. R., Cagnin, A., Turkheimer, F. E., Miller, C. C. J., Shaw, C. E., Brooks, D. J., Leigh, P. N., & Banati, R. B. (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: An [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiology of Disease*, 15(3), 601–609.
- Turner, M. R., Hardiman, O., Benatar, M., Brooks, B. R., Chio, A., De Carvalho, M., Ince, P. G., Lin, C., Miller, R. G., Mitsumoto, H., Nicholson, G., Ravits, J., Shaw, P. J., Swash, M., Talbot, K., Traynor, B. J., Van Den Berg, L. H., Veldink, J. H., Vucic, S., & Kiernan, M. C. (2013). Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*, 12(3), 310–322.
- Umpierre, A. D., & Wu, L. J. (2021). How microglia sense and regulate neuronal activity. *Glia*, 69(7), 1637–1653.
- Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., & Julien, J. P. (2006). Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 9(1), 108–118.
- van Horssen, J., Singh, S., van der Pol, S., Kipp, M., Lim, J. L., Peferoen, L., Gerritsen, W., Kooi, E. J., Witte, M. E., Geurts, J. J. G., de Vries, H. E., Peferoen-Baert, R., van den Elsen, P. J., van der Valk, P., & Amor, S. (2012). Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 1.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., De Belleruche, J., ... Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 323(5918), 1208–1211.
- Vance, C., Scotter, E. L., Nishimura, A. L., Troakes, C., Mitchell, J. C., Kathe, C., Urwin, H., Manser, C., Miller, C. C., Hortobágyi, T., Dragunow, M., Rogelj, B., & Shaw, C. E. (2013). ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2676–2688.
- Vandoorne, T., De Bock, K., & Van Den Bosch, L. (2018). Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? *Acta Neuropathologica*, 135(4), 489–509.
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389.
- Vilalta, A., & Brown, G. C. (2018). Neurophagy, the phagocytosis of live neurons and synapses by glia, contributes to brain development and disease. *FEBS Journal*, 285(19), 3566–3575.
- Visentin, S., Agresti, C., Patrizio, M., & Levi, G. (1995). Ion channels in rat microglia and their different sensitivity to lipopolysaccharide and interferon- γ . *Journal of Neuroscience Research*, 42(4), 439–451.
- Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochemistry International*, 36(4–5), 291–300.

- Wang, J., Slunt, H., Gonzales, V., Fromholt, D., Coonfield, M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Borchelt, D. R. (2003). Copper-binding-site-null SOD1 causes ALS in transgenic mice: Aggregates of non-native SOD1 delineate a common feature. *Human Molecular Genetics*, *12*(21), 2753–2764.
- Wang, J., Xu, G., Gonzales, V., Coonfield, M., Fromholt, D., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Borchelt, D. R. (2002). Fibrillar inclusions and motor neuron degeneration in transgenic mice expressing superoxide dismutase 1 with a disrupted copper-binding site. *Neurobiology of Disease*, *10*(2), 128–138.
- Wang, S., Chu, C. H., Stewart, T., Gingham, C., Wang, Y., Nie, H., Guo, M., Wilson, B., Hong, J. S., & Zhang, J. (2015). α -Synuclein, a chemoattractant, directs microglial migration via H₂O₂-dependent Lyn phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(15), E1926–E1935.
- Wang, Z. (2004). Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *448*(3), 274–286.
- Webster, C. P., Smith, E. F., Bauer, C. S., Moller, A., Hautbergue, G. M., Ferraiuolo, L., Myszczyńska, M. A., Higginbottom, A., Walsh, M. J., Whitworth, A. J., Kaspar, B. K., Meyer, K., Shaw, P. J., Grierson, A. J., & De Vos, K. J. (2016). The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK 1 complex to regulate initiation of autophagy. *The EMBO Journal*, *35*(15), 1656–1676.
- Wilcock, D. M., Vitek, M. P., & Colton, C. A. (2009). Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *159*(3), 1055–1069.
- Wils, H., Kleinberger, G., Janssens, J., Pereson, S., Joris, G., Cuijt, I., Smits, V., Ceuterick-De Groote, C., Van Broeckhoven, C., & Kumar-Singh, S. (2010). TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(8), 3858–3863.
- Winkler, E. A., Sengillo, J. D., Sagare, A. P., Zhao, Z., Ma, Q., Zuniga, E., Wang, Y., Zhong, Z., Sullivan, J. S., Griffin, J. H., Cleveland, D. W., & Zlokovic, B. V. (2014). Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(11), E1035–E1042.
- Wlodarczyk, A., Holtman, I. R., Krueger, M., Yogev, N., Bruttger, J., Khoroshii, R., Benmamar-Badel, A., Boer-Bergsma, J. J., Martin, N. A., Karram, K., Kramer, I., Boddeke, E. W., Waisman, A., Eggen, B. J., & Owens, T. (2017). A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *The EMBO Journal*, *36*(22), 3292–3308.
- Wolf, S. A., Boddeke, H. W. G. M., & Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*, *79*(November 2016), 619–643.
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W., & Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, *14*(6), 1105–1116.
- Wu, D. C., Ré, D. B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S. (2006). The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degradation in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(32), 12132–12137.
- Wu, L.-J., Vadakkan, K. I., & Zhuo, M. (2007). ATP-Induced Chemotaxis of Microglial Processes Requires P2Y Receptor-Activated Initiation of Outward Potassium Currents. *Glia*, *55*(March), 810–821.
- Wyss-Coray, T., & Mucke, L. (2002). Inflammation in Neurodegenerative Disease—A Double-Edged Sword. *Neuron*, *35*, 419–432.
- Xiao, Q., Zhao, W., Beers, D. R., Yen, A. A., Xie, W., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2007). Mutant SOD1G93A microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *Journal of*

- Neurochemistry*, 102(6), 2008–2019.
- Xu, Y.-F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., Cao, X., Stetler, C., Dickson, D. W., Lewis, J., & Petrucelli, L. (2011). Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 73.
- Yamanaka, K., Boillee, S., Roberts, E. A., Garcia, M. L., McAlonis-Downes, M., Mikse, O. R., Cleveland, D. W., & Goldstein, L. S. B. B. (2008). Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21), 7594–7599.
- Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., Takahashi, R., Misawa, H., & Cleveland, D. W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 11(3), 251–253.
- Yong, H. Y. F., Rawji, K. S., Ghorbani, S., Xue, M., & Yong, V. W. (2019). The benefits of neuroinflammation for the repair of the injured central nervous system. *Cellular and Molecular Immunology*, 16(6), 540–546.
- Yu, L., Su, X., Li, S., Zhao, F., Mu, D., & Qu, Y. (2020). Microglia and Their Promising Role in Ischemic Brain Injuries: An Update. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(July), 1–9.
- Yu, S. P. (2003). Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Progress in Neurobiology*, 70(4), 363–386.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391–6410.
- Zhang, F., & Zhu, H. (2006). Intracellular conformational alterations of mutant SOD1 and the implications for fALS-associated SOD1 mutant induced motor neuron cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(3), 404–414.
- Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhang, W., Urushitani, M., Julien, P., Appel, S. H., Julien, J. P., & Appel, S. H. (2010). Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia*, 58(2), 231–243.
- Zinszner, H., Sok, J., Immanuel, D., Yin, Y., & Ron, D. (1997). TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *Journal of Cell Science*, 110(15), 1741–1750.
- Zou, Z. Y., Cui, L. Y., Sun, Q., Li, X. G., Liu, M. S., Xu, Y., Zhou, Y., & Yang, X. Z. (2013). De novo FUS gene mutations are associated with juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis in China. *Neurobiology of Aging*, 34(4), 1312.e1-1312.e8.
- Zou, Z. Y., Zhou, Z. R., Che, C. H., Liu, C. Y., He, R. L., & Huang, H. P. (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 88(7), 540–549.
- Zuchero, J. B., Fu, M. meng, Sloan, S. A., Ibrahim, A., Olson, A., Zaremba, A., Dugas, J. C., Wienbar, S., Caprariello, A. V., Kantor, C., Leonoudakus, D., Lariosa-Willingham, K., Kronenberg, G., Gertz, K., Soderling, S. H., Miller, R. H., & Barres, B. A. (2015). CNS Myelin Wrapping Is Driven by Actin Disassembly. *Developmental Cell*, 34(2), 152–167.

Biografija

Mina Perić je rođena 10.8.1989. godine u Kninu, Hrvatska. Završila je osnovne studije na Biološkom fakultetu u Beogradu 2013. godine, a 2014. godine i master studije, modul Biologija, podmodul Biofizika. Doktorske studije, program Biologija, modul Neurobiologija, podmodul Neurofiziologija: od ćelije do ponašanja, je upisala 2014. godine, i eksperimentalni deo teze je radila u Centru za lasersku mikroskopiju na Biološkom fakultetu. Bila je angažovana na 1 nacionalnom i 5 međunarodnih projekta u okviru kojih je išla na naučne boravke u Nemačku, Norvešku, Sloveniju i SAD. U okviru doktorske disertacije publikovala je dva naučna rada. Autor i koautor je 12 naučnih publikacija.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Мина И. Перић

Број индекса Б3022/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији, у кичменој моздини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мина И. Перић

Број индекса Б3022/2014

Студијски програм Биологија

Наслов рада Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији у кичменој моздини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе

Ментори Др Данијела Батавељић

Др Павле Анђус

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Неуродегенеративне промене у ћелијама глије, олигодендроцитима и микроглији, у кичменој мождини на пацовском hSOD1^{G93A} моделу амиотрофичне латералне склерозе

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.