

A szomatikus mikroglia-neuron kapcsolat szerepe az idegsejtek működésének szabályozásában

Doktori tézisek

Dr. Pósfai Balázs

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

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

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

Tagok: Prof. Dr. Réthelyi Miklós, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Schlett Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2022

1. Bevezetés

Az idegrendszeri betegségek kiemelt társadalmi-gazdasági problémát jelentenek világszerte. Ezt felismerve, az elmúlt évtizedben korábban soha nem tapasztalt mértékű anyagi és emberi erőforrásokat fordítottak a neurodegeneratív kórképek patofiziológiájának és lehetséges gyógymódjainak kutatására. Ezen vizsgálatok elsősorban, és szinte kizárólag az idegsejtekben (neuronokban) lezajló változásokra összpontosítottak, és ezeket próbálták megelőzni, vagy visszafordítani. Ez a neuron-centrikus hozzáállás azonban nem vezetett kielégítő eredményre: a preklinikai vizsgálatok során ígéretes, neuroprotektív célzó terápiás próbálkozások szinte kivétel nélkül buknak el a klinikai próbák során. Mindezen sikertelenség arra utal, hogy egy radikálisan új megközelítésre van szükség.

Az elmúlt évek kutatási eredményei feltárták, hogy az idegrendszeri megbetegedések kialakulásában fontos szerepet játszanak gyulladásos folyamatok, melyek legfontosabb sejtes mediátora a mikroglia, az agy veleszületett immunsejtje. A mikroglia feladata a szöveti homeosztázis fenntartása, működésük megváltozása lényegében minden neuropatológiai kórképben megfigyelhető az akut elváltozásoktól (pl. stroke, traumás sérülés) a krónikus megbetegedésekig (pl. Alzheimer-kór, szklerózis multiplex). A mikroglia patológias folyamatokban betöltött szerepének megértése kiemelt fontosságú és nagy terápiás potenciállal bír, azonban nem remélhetünk áttörést a mikroglia-manipulációtól idegrendszeri betegségek esetén, amíg nem térképeztük fel a mikroglia fiziológias körülmények között betöltött szerepét.

Az elmúlt bő másfél évtized kutatásai alapján tudjuk, hogy az agyban egyedülálló módon rendkívül dinamikus nyúlványrendszerrel bíró mikroglia alapvető fontosságú az egészséges idegrendszer fejlődése és működése szempontjából. A fejlődés során hatással van többek között a neuro-, a glio- valamint az angiogenezisre, az axonális növekedésre, az idegsejtek proliferációjára, differenciációjára, migrációjára és a programozott sejthalálra. A fejlett idegrendszerben a mikroglia közreműködik a szinapszisok keletkezésének, plaszticitásának, valamint eliminálásának, a dendritikus jelintegrációnak, az akciós potenciál kialakulásának szabályzásában, valamint olyan, a neuronális sejtesthez köthető folyamatokban, mint az idegsejtek metabolikus és genetikai szabályzása.

Magától értetődő, hogy ezen neuronális folyamatok szabályzása érdekében többértű kommunikációra van szükség a mikroglia és az idegsejtek között. Az intercelluláris kommunikáció összetettségét támasztja alá azon mikrogliális, illetve neuronális metabolitok nagy száma, melyek a másik sejten közvetett módon hatást tudnak kiváltani. A sejtek közti kommunikáció legprecízebb módja azonban a közvetlen membránkapcsolatokon keresztül valósulhat meg. Itt az információcseré térben és időben rendkívül pontosan szabályozható, ami a hatalmas számú sejt harmonikus együttműködése szempontjából elengedhetetlen. Így bár a közvetett mikroglia-neuron kölcsönhatások is mind fontos szerepet játszanak a két sejtípus kapcsolatában, a

legvalószínűbb, hogy a mikroglia által befolyásolt létfontosságú neuronális folyamatok szabályzásához közvetlen membrán-membrán kapcsolatnak kell kialakulnia a sejtek között. A szakirodalomban ismert jelenség, hogy a mikroglia-nyúlványok dendritikus vagy axonális struktúrákkal létesítenek kapcsolatot, azonban az idegsejtek magasszintű polarizáltságát figyelembe véve feltételezhető, hogy a szomatikus régióhoz köthető neuronális funkciók – pl. a sejtek viabilitásának, genetikai és metabolikus homeosztázisának szabályzása – a legjobban a sejttesttel kialakított kapcsolaton keresztül szabályozhatók. Egérben *in vivo* megfigyelések támasztják alá, hogy a mikroglia-nyúlványok fiziológiás körülmények között megközelítik az idegsejtek sejttestét, azonban ultrastrukturális bizonyíték korábban nem állt rendelkezésre arról, hogy közvetlen kapcsolat alakulna ki a neuronok sejttestével. Egy ilyen kapcsolat kulcsfontosságú szerepet tölthetne be az idegsejtek működésének szabályzásában.

A mikroglia az agy fő immunsejtjeként számos patológiás folyamatban játszik kiemelt szerepet, emellett azonban az egészséges idegrendszer működéséhez is elengedhetetlen. A sejttípus szelektív manipulációja hatalmas terápiás potenciállal bírhat, hiszen számos neuronális folyamat modulálásában részt vesz, azonban nehezen képzelhető el, hogy a mindehhez szükséges kommunikáció maradéktalanul végbe mehessen a már ismert mikroglia-neuron kapcsolatokon keresztül. Minden bizonnyal léteznie kell egy eddig fel nem tárt kapcsolati felszínnek a mikroglia nyúlványai és az idegsejtek sejtteste között, amelyen keresztül a mikroglia érzékelheti a neuronális eredetű szignalizációs molekulákat, illetve közvetlenül módosíthatja a neuronális szómában zajló folyamatokat, a homeosztázis fenntartásának érdekében. Doktori értekezésem fő témájául ezért a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatok előfordulásának, ultrastrukturájának és szerepének vizsgálatát választottam, melynek eredménye egy új morfofunkcionális kapcsolat karakterizálása.

2. Célkitűzések

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

7. Felelős lehet-e ez a kapcsolat a mikroglia neuronális fejlődésre gyakorolt hatásaiért?
8. Milyen hatással van a P2Y12 receptor akut gátlása, illetve genetikai hiánya a mikroglia fiziológiájára, valamint a mikroglia-neuron kapcsolatokra?

3. Módszerek

3.1. Etikai állásfoglalás

Minden kísérletet a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) Intézeti Etikai Kódexe és a kísérleti állatok védelméről szóló hatályos nemzeti és EU-s törvények alapján végeztük, melyek megfelelnek az Európai Közösség által 1986. november 24-én elfogadott irányelvekkel (86/609/EEC), az állatok védelméről és kíméletéről szóló hatályos magyar törvénnyel (1998; XXVIII, 243/1998) és az intézeti Munkahelyi Állatetikai Bizottság előírásaival.

3.2. Állatok

Kísérleteinkhez minden esetben hím, C57Bl/6J egereket használtunk fel, az adott kísérletnek megfelelő korcsoportból. Fejlődéstani vizsgálatainkhoz embrionális fejlődésük 15. napján járó (E15) embriókat, születésük után 1 (P1), 8 (P8), ill. 15 napos (P15) fiatal egereket, valamint 90 napos (P90) felnőtt állatokat használtunk. A nem fejlődéstani kísérletekhez minden esetben 12-18 hetes, hím egereket használtunk. Számos mérésünkhöz végeztük mikroglia-riporter állatok segítségével, amelyekben a fraktalkin-receptort (CX3CR1) kódoló allélok közül az egyiket zöld fluoreszcens proteint kódoló szekvencia helyettesíti (CX3CR1^{GFP/+}, mely állatok nőstény C57Bl/6J és hím CX3CR1^{GFP/GFP} [B6.129P2(Cg)-Cx3cr1tm1Litt/J] egerek utódai; The Jackson Laboratory). A P2Y12 receptor krónikus hiányának hatásait vizsgáló méréseinkhez P2Y12 receptor génkiűtött, mikroglia-riporter állattörzset használtunk (CX3CR1^{GFP/+}/P2Y12^{-/-}, a P2Y12^{-/-} egerek forrása: [B6;129-P2ry12tm1Dgen/H] Deltagen Inc.). Az egerek szabadon fértek hozzá az ételhez és vízhez, tartásuk szabályozott fény-, páratartalom- és hőmérsékleti körülmények között történt.

3.3. Post mortem humán minták

A humán agyszöveten végzett kísérleteinkhez a kontroll mintát két nő (59 és 60 évesek), illetve egy férfi (73 éves), ismert neurológiai betegséggel nem rendelkező és agyi elváltozáshoz nem köthető okból elhunyt páciensből vételeztük. A stroke hatását olyan agyszöveten vizsgáltuk, amely két női (77 és 78 évesek), valamint egy férfi (66 éves), arteria cerebri media érintettségű ischemiás stroke-ot követően elhunyt páciensekből származik (etikai engedélyek: ETT-TUKEB 62031/2015/EKU, 34/2016 és 31443/2011/EKU [518/PI/11]). A szövetek kutatási célra történő felhasználása és a vizsgálatokhoz szükséges orvosi adatokhoz való hozzáférés tájékozott beleegyezés

alapján történt. A szövetminták kezelése és felhasználása a Helsinki Nyilatkozattal összhangban történt. A nem-neurológiai okból elhunyt páciensek agya 3-5 órával a halál beállta után került eltávolításra. Az arteria vertebralis, valamint az arteria carotis interna erek kanülálását követően az agyak perfúziója heparint tartalmazó fiziológiás sóoldattal, majd 4% paraformaldehidet, 0,05% glutáraldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó fixáló oldattal történt. A perfúziót követően az agykérgi és hippokampális régiókat tartalmazó szövetdarabok glutáraldehid-mentes fixáló oldatban voltak tartva további egy napig. A stroke-ban elhunyt páciensek agya 10-15 órával a halál beállta után került eltávolításra, majd immerziós fixálást alkalmaztunk, 4% paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal. Az érintett agykérgi területekből kivágott szövetdarabokat paraffinba ágyasztuk, majd száncás mikrotóm (SM2010R, Leica Biosystems) segítségével 6-8µm vastag metszeteket készítettünk

3.4. In vivo beavatkozások és mérések

3.4.1. A kísérletek során használt plazmidok

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

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

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

3.4.2. In utero elektroporáció

A vemhes nőstények hasüregét az embrionális fejlődés 14,5. napján izoflurán-anesztéziában megnyitottuk, a cornu uterit feltártuk. A bejuttatni kívánt expressziós pCAG-IRES-tD Tomato vektorból kb. 1µl-nyit (1µg/µl-es oldatból) endotoxin-mentes vízben feloldottunk, és Fast Green festékanyagot (1:10000) adtunk hozzá. Az így kapott oldatot üvegapilláris segítségével az embrionális oldalkamrákba juttattuk. A sebet az izomfalak és a bőr öltésével zártuk, majd az embriók természetes úton jöttek világra.

3.4.3. In vivo műtéti, farmakológiai és kemogenetikus kezelések

3.4.3.1. Experimentális stroke

Az egyoldali arteria cerebri media elzárást intraluminalis filamentum technikával hajtottuk végre. Az egereket izofluránnal altattuk, majd a nyaki régió kipreparálása után a bal oldali arteria carotis communison keresztül behelyeztünk egy szilikon-bevonatú monofilamentumot (210-230 μ m hegyátmérő, Doccol), majd az arteria carotis internán keresztül egészen az arteria cerebri mediaig vezetve elzártuk azt 30-45 percen keresztül.

3.4.3.2. Kraniális ablak műtét

Az egereket ehhez a beavatkozáshoz fentanylal (100-200 μ l) altattuk. A 3mm átmérőjű kraniális ablakot a bal agyfélteke primer szomatoszenzoros kérgi és szupplementer motoros kérgi területei felett nyitottuk, a dura matert intaktan hagyva. A koponyacsont egy részének eltávolítása után kör alakú, üveg fedőlemezt helyeztünk a dura mater felszínére, majd Vetbond (3M) szövetragasztóval rögzítettük. Ezután egy egyedi, fémből készült befogót (Femtonics Ltd.) erősítettünk az üveglemez köré.

3.4.3.3. Mikroglia depléción

A CSF1 receptor szelektív antagonistát, PLX5622-t tartalmazó tápot (Plexxikon Inc.) etetve C57Bl/6J egerekben 3 hét alatt a mikroglia körülbelül 96 százaléka eltűnik a központi idegrendszerből. A droggal etetett állatok nem depletált alomtársai ezalatt a 3 hét alatt összetételében azonos kontroll tápot kaptak.

3.4.3.4. Akut P2Y₁₂ receptor gátlás

Az egerek cisterna magna-jába üvegapillárisal juttattunk 0,6mg/ttkg dózisu, fiziológias sóoldatban oldott szelektív P2Y₁₂ receptor antagonistát, PSB0739-t (#3983 Tocris, R&D Systems), illetve a kontroll kísérletekben azonos térfogatú fiziológias sóoldatot. Az oldatok beadása a 2-foton mikroszkópos mérések kezdete előtt, a kemogenetikus mérések során pedig az intraperitoneális CNO-beadás előtt 15-20 perccel történtek. A P2Y₁₂ receptor-gátlás stroke-kimenetelre kifejtett hatását célzó mérések során a reperfüzió kezdetekor kapták az egerek a PSB0739-et.

3.4.3.5. Kemogenetikus kísérletek

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

intraperitoneális (ip) fiziológiás sóoldat- (kontroll), vagy CNO-injekciót (0,1 mg/ml) kaptak, amely aktiválja a bejuttatott receptorfehérjéket.

3.4.3.6. Diazoxid hatásának vizsgálata

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

3.4.3.7. Neuronális kalcium mérések

A vad típusú C57Bl/6J egerek agykérgébe 200nl-nyi AAV1.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 (#100837 Addgene) vektort injektáltunk üvegkapilláris segítségével, 200-300 μ m mélységben. A beadás a Bregmától számítva laterális irányban 1,5mm-re, és posterior irányban 1,2mm-re történt. A kraniális ablak műtetre, valamint a rezonáns módban készített 2-foton mikroszkópos képalkotásra a beadást követő 3. héten került sor.

3.4.4. *In vivo* 2-foton mikroszkópia

A méréseinkhez egy Femto2D-DualScanhead mikroszkópot (Femtonics Ltd.) és egy Chameleon Discovery hangolható lézerrendszert (Coherent) használtunk. A vizsgálatokhoz a lézert 920nm-es hullámhosszra állítottuk. A fluoreszcens jel detektálásához egy Nikon 18x víz-immériós objektívet használtunk, a képalkotást és exportálást a MES szoftverrel (Femtonics Ltd.) végeztük. A mérések során az állatok kontrollált anesztéziáját fentanylal végeztük.

3.4.4.1. Mikroglia-neuron kapcsolatok élettartamának mérése

A mikroglia-neuron kapcsolatok vizsgálatához *in utero* tdTomato elektroporált, CX3CR1^{GFP+} egerek agykérgi területeit figyeltük meg 2-foton mikroszkóp segítségével *in vivo*. A mikroszkóp segítségével, Galvano szkennelő használatával az agyfelszíntől 200 μ m mélységben, 25 μ m-es térfogatokról készítettünk felvételeket, 5 μ m-enként és két és fél percenként, 167nm/px felbontás mellett. Az elkészült képsorozatot a nyílt forráskódú Fiji szoftver (imagej.net/Fiji) Manual Tracking nevű pluginjével analizáltuk.

3.4.4.2. Neuronális kalcium-mérés

A penumbra régióban, ischemiás stroke-ot követő reperfúzió kezdetétől folyamatos felvételt készítettünk állatonként egyetlen rétegből, rezonáns módban, 32,75 Hz-es frekvenciával. A GCaMP6f-fel töltött sejtek intenzitásgörbéjét a MES szoftverrel exportáltuk, az adatelemzést saját függvények segítségével végeztük.

3.4.4.3. Mikroglia-nyúlványmotilitás mérés

Az anesztézia indukcióját követően az egerek nyaki régióját feltártuk, majd a cisterna magna-ba 6µl fiziológiás sóoldatot, vagy ugyanilyen térfogatú, 3mg/ml koncentrációjú PSB0739 tartalmú oldatot injektáltunk, a bőrmetszést bezártuk. A képkötés során 15µm vastag, 240x240µm alapterületű szöveti térfogatot vizsgáltunk, percenkénti mintavételezéssel, a képsíkok között 3µm lépéssel, 0,48µm/px felbontás mellett. Az elkészült 4 dimenziós képsorozatot a Fiji szoftver Manual Tracking nevű pluginjével analizáltuk, az adatelemzést saját függvények segítségével végeztük.

3.4.4.4. Mozgási index (surveillance score)

Az általam kidolgozott mozgási index egy olyan paraméter, amellyel a mikroglia-nyúlványok fiziológiás monitorozó mozgását jellemezhetjük. Számítása során figyelembe vettük az egyes nyúlványok által bejárt territórium nagyságát, a leghosszabb irányított (egy irányba történő folyamatos) mozgások alatt megtett távolságot, valamint azt, hogy a vizsgált időtartam mekkora hányadában mozogtak kiemelt sebességgel (50nm/s-nál gyorsabban).

3.5. Hisztológia

Az állatokat izoflurán belélegeztetésével elaltattuk, majd terminális anesztéziát indukáltunk a hasüregbe adott altató keverék befecskendezésével. Az egereket transzkardiálisan perfundáltuk egy percig fiziológiás sóoldattal, majd huszonöt-harminc percig 4% frissen beoldott paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal, ezt követően pedig 0,1 mólos foszfát-pufferrel (0,1M PB) tíz percen keresztül. A perfúzió után az agyakat eltávolítottuk, majd a primer szomatoszenzoros kérget tartalmazó szövetdarabokat vágunk ki. Ezekből koronális metszeteket készítettünk egy vibratóm segítségével (VT1200S, Leica), 0,1M PB-ben.

3.6. Lézió méretének meghatározása

Az ischemiás stroke által okozott lézió méretét koronális agymetszeteken, krezilibolya-festés alkalmazásával határoztuk meg. Az elhalt területek méretét állatonként 8 különböző koronális síkban mértük, majd ezeket összeadva kaptuk meg a lézió méretét.

3.7. Trifenil-tetrazolium-klorid (TTC) festés

Az ischemiás lézió és a penumbra meghatározásához fixálatlan agyszövetből 1mm-es metszeteket készítettünk, majd 1% 2,3,5-trifenil-tetrazolium-kloridot (Sigma-Aldrich) tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk 37°C-os vízfürdőben, 20 percen keresztül. A mintákat ezután 4% paraformaldehidet tartalmazó (0,1M PB) oldattal fixáltuk 24 órán át 4°C-on, majd vibratómmal újrametszettük.

3.8. Egér szöveten végzett immunhisztokémia

3.8.1. Szövetelőkészítés és fluoreszcens immunhisztokémia

A vibratómmal készített 50 μ m-es metszeteket 0,1M PB oldatban, majd tris-pufferelt fziológias sóoldatban (TBS) rázókészülékre helyeztük, az oldatokat legalább 5-ször cseréltük. Ezt követően a metszeteket egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os humán szérum albumin (HSA, Sigma-Aldrich) oldattal blokkoltuk. A blokkoló oldatba a HSA-n kívül 0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) detergenst is tettünk. Ezen lépéseket követően a metszeteket az elsődleges antitesteket tartalmazó TBS oldatban inkubáltuk 24 órán át szobahőmérsékleten, vagy 48 órán át 4°C-on. A nem kötődött elsődleges antitesteket ezután ötszöri TBS-mosással távolítottuk el. Fluoreszcens immunhisztokémiai jelölés esetén a másodlagos, fluorofórral ellátott antitesteket TBS oldatba helyeztük, majd ebben inkubáltuk a mintáinkat 24 órán keresztül. TBS, majd PB mosásokat követően amennyiben sejtmagjelölést is szeretnénk volna alkalmazni, a mintákat PB-ben oldott DAPI-val (Sigma-Aldrich) kezeltük, majd PB-mosások után vagy Aqua-Poly/Mount-tal (Polysciences Inc.) fedtük, vagy 0,1 M PB-ben tároltuk a pufferben történő képalkotásig.

3.8.2. Elektronmikroszkópos immunhisztokémia

Az elsődleges antitestek oldatának TBS-sel történő cseréje után, TBS-ben történő ismételt mosásokat követően a metszeteket egy órán keresztül blokkoló oldattal (Gel-BS) kezeltük, mely 0,5% hidegvízi hal bőrből kivont zselatint (GE Healthcare) és 0,5% HSA-t tartalmaz, TBS-ben oldva. Ezután a metszeteket 24 órán keresztül az adott vizsgálatnak megfelelően biotinilált-, vagy aranyszemcse-konjugált másodlagos antitestek oldatával kezeltük, melyek Gel-BS-ben voltak hígítva. Az aranyszemcsék szövetbe rögzítése érdekében a mintáinkat 2% glutáraldehidet tartalmazó PB-vel kezeltük 15 percen keresztül, majd TBS-ben és az antitest-kötött aranyszemcsék intenzifikálását előkészítő oldattal kezeltük (ECS), és az immunarany jelölést ezüstözőoldat (SE-EM) segítségével erősítettük fel. Ezt követően TBS-ben hígított Elite ABC-vel (1:300) kezeltük a mintákat egy éjszakán keresztül. Ezután TBS-ben és 7,6 pH-jú Tris-pufferben (TB) mostuk azokat, majd az immunperoxidáz reakciót 3,3-diaminobenzidinnel (DAB, Sigma-Aldrich) jelenítettük meg. További mosások után a metszeteket 0,5%-os ozmium-tetroxid oldattal kezeltük 20 percen át, majd felszálló alkoholsorral, illetve acetonitrillel víztelenítettük, végül pedig epoxigyantába (Durcupan ACM, Fluka, Sigma-Aldrich) ágyaztuk azokat. A víztelenítés során a mintákat 1% uranil-acetátot tartalmazó 70%-os etil-alkohol oldattal kontrasztoltuk 20 percen át. Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a gyantával átitatott metszeteket alumíniumból készített öntőformákba helyeztük, gyantát rétegeztünk rájuk, egy éjszakát állni hagytuk, hogy a gyanta megfelelően átitathassa a szövetet, ezután tárgylemezre szedtük őket és lesúlyozva 56°C-on kisütöttük. A polimerizáció után hagyományos transzmissziós

elektronmikroszkópiához 70, elektrontomográfiához 150nm vastagságú metszeteket készítettünk egy EM UC6 ultramikrotóm segítségével (Leica), majd a metszeteket formvar-ral bevont, egynyílású réz mintatartókra (gridekre) vettük fel.

3.9. Konfokális mikroszkópia

3.9.1. Képkötés konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal

Mintáink konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos vizsgálatát egy Nikon Eclipse Ti-E fordított mikroszkóp (Nikon Instruments Europe B.V.) segítségével vizsgáltuk, melyhez A1R konfokális rendszert használtunk. A gerjesztésre használt lézerek 405, 488, 561 és 647nm hullámhosszúak (CVI Melles Griot). A felvételek rögzítését és kezelését NIS Elements AR szoftverrel (Nikon Instruments Europe B.V.) végeztük.

3.9.2. Szomatikus és szinaptikus kapcsolatprevalencia mérése

A neuronok sejttestére érkező mikroglialis kapcsolatok kvantálásához kettős immunjelöléssel ellátott minták konfokális felvételeit használtuk: az egyik csatornában az idegsejt markerének jelét, míg a másikban a mikroglia marker jelét láthattuk. A szisztematikus random módon kijelölt idegsejtek esetében a sejttestüket 3 dimenzióban, teljesen rekonstruálva megvizsgáltuk, hogy kap-e mikroglialis kontaktust.

A szinaptikus mikroglia-kontaktus gyakoriságának vizsgálatához háromszoros immunjelöléssel ellátott szövetmintákról készített konfokális felvételeket használtunk. Ezek a képek minden esetben tartalmaztak egy pre- és egy posztzinaptikus markert, valamint mikrogliajelölést. Mindkét méréstípushoz 50nm/pixel felbontású képsorozatot alkalmaztunk; a sejttest-mérés esetében Z-irányban 0,3 μ m-enként, a szinapszismérés esetén 0,25 μ m-enként vett képsíkokkal.

3.9.3. Kv2.1 és Kv2.2 fehérjék szintjének mérése

A Kv2.1 és Kv2.2 fehérjék relatív elhelyezkedését a mikroglialis kapcsolathoz képest konfokális felvételekből exportált képsorozatokon végeztük. Kizárólag az adott fehérjét jelölő markereket látva mérőnégyzeteket helyeztünk el véletlenszerűen az egyes piramisneuronok legnagyobb keresztmetszeti képén, és megmértük ezeken a területeken a Kv2.1 vagy Kv2.2 fluoreszcens intenzitásértékét. Ezt követően a mikroglialis jelet is tartalmazó képeken megállapítottuk, hogy melyik jelölőnégyzet esett mikroglialis kontaktus helyére.

3.9.4. Idegsejtek mikroglialis borítottságának mérése

A mikroglialis borítottság méréséhez olyan konfokális képsorozatot használtunk, amelyeken neuronális és mikroglia jel volt, az XY-irányú felbontás 50nm/pixel volt, a Z-irányú, képsíkok közti távolság 300nm. A mérni kívánt idegsejteket „vakon” választottuk ki, 3 dimenzióban, teljesen rekonstruáltuk, a sejttest területét minden képsíkon

megmértük. Ezután a mikroglialis jelet tartalmazó képeken szintén minden síkon megmértük, hogy mekkora felületen érintkezik a két sejt egymással.

3.9.5. cFos fehérje mennyiségének detektálása

A megnövekedett sejtaktivitást jelző cFos fehérje expressziójának a csúcsa 60-120 perc között van, így az állatokat 90 perccel az ip. CNO beadást követően perfundáltuk, majd FIJI szoftverrel mértük a cFos-jel integrált fluoreszcens intenzitását.

3.9.6. TOM20 és vNUT fehérjék fluoreszcens intenzitásának mérése

A mitokondriális TOM20 fehérje, valamint a vezikuláris nukleotid transzporter (vNUT) idegsejten belüli, mikroglialis kontaktushoz viszonyított relatív elhelyezkedését az egyes jelölések fluoreszcens intenzitásgörbéjének szemiautomatikus elemzésével vizsgáltuk. 0,1 μ m/pixel felbontású képeken a Kv2.1-jelölés mentén körberajzoltuk a sejttest membránját, majd Ezt a kontúrt ezután 0,5-0,5 μ m-rel szűkítettük, illetve tágítottuk: a mikroglialis jelölés fluoreszcens intenzitásgörbéjét az utóbbi, a TOM20 vagy a vNUT jelét az előbbi mentén exportáltuk ki a szoftverrel.

3.9.7. Stroke-os szöveten végzett anatómiai vizsgálatok

Az ischemiás stroke hatásait a szomatikus junctió morfológiájára olyan állatok agyszövetmintáin vizsgáltuk, amelyek 1 órás arteria cerebri media elzárását 4 órás reperfüziós időszak követte.

3.9.7.1. Mitokondrium fragmentáció mérése

A Kv2.1 jelölés segítségével azonosított piramis sejtek sejttesteinek legnagyobb keresztmetszetét tartalmazó képsíkon a sejtek membránjának körvonalát használtuk a vizsgálandó terület kijelölésére. Ezeken a területeken belül a FIJI szoftver „Analyze Particles” funkciójával automatikusan nagyszámú mitokondriumot vizsgálhattunk.

3.9.7.2. Kv2.1 klaszterek mérése

Az idegsejt körvonala mentén a Kv2.1 jel intenzitásgörbéjét FIJI szoftver használatával exportáltuk, majd saját függvények segítségével Microsoft Excel szoftverrel elemeztük. Akkor beszéltünk fehérjeklaszterről, amennyiben a fluoreszcens intenzitás legalább három szomszédos pixelen keresztül, legalább 25 szűrkeségértékkel meghaladta az adott sejtre jellemző átlagos fluoreszcens intenzitást.

3.9.8. Mikroglia 3 dimenziós morfológiai vizsgálata

A mikroglia 3 dimenziós morfológiai vizsgálatát egy nyílt forráskódú, MATLAB-alapú, automatikus analízist lehetővé tevő programcsomaggal végeztük (Microglia Morphology Quantification Tool). Az analízishez legalább 100 μ m vastag, kettős

immunjelöléssel (sejtmag és mikroglia, a méréseinkben DAPI és CX3CR1^{GFP/+} állatokban GFP jelölés) ellátott metszetek szükségesek, melyek képalkotását pufferoldatban végeztük.

3.9.9. Szatellita állapot és mikroglia sejtszám meghatározása

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

3.10. Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópia (STORM)

3.10.1. Mintaelőkészítés és képalkotás

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

3.10.2. P2Y12 receptor eloszlása szuperrezolúciós felvételeken

Az elkészült szuperrezolúciós felvételekről a specifikus jelként azonosított molekulák adatait exportáltuk, valamint a konfokális felvételeket dekonvolváltuk, és a két modalitás eredményét Photoshop CS6 (Adobe Systems) szoftverrel illesztettük, a mindkét képalkotásban felvett, 647nm-es csatorna alapján. A STORM lokalizációs pontok mikroglia-neuron kapcsolathoz viszonyított elhelyezkedését FIJI szoftverrel vizsgáltuk.

3.11. Elektronmikroszkópia

3.11.1. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A polimerizálódott gyantával átitatott metszetekből a kiválasztott, vizsgálni kívánt régiókat kivágtuk, Durcupan gyantából készült blokkokra ragasztottuk. Az ezen

mintákból ultramikrotómmal készített metszetsorozatokat tartalmazó grideket egy Hitachi H-7100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, 75kV gyorsítófeszültség mellett.

3.11.2. Elektromográfia

A metszeteket tartalmazó grideket 10% HSA-t tartalmazó TBS cseppekre helyeztük 10 percre. Ezután desztillált vízbe mártottuk őket, majd 10 percre 10nm-es arannyal konjugált Protein-A-t (Cytodiagnosics) tartalmazó desztillált víz (1:3) cseppekre helyeztük a grideket. Az elektromográfiai képalkotást egy Tecnai T12 BioTwin elektronmikroszkóppal végeztük, 120kV gyorsítófeszültség és 23000x nagyítás mellett. A felvételek rögzítését Xplore3D szoftverrel (FEI) hajtottuk végre. A kéttengelyes sorozatfelvételeket 2-fokként készítettük, -65 és +65 fokalértékek között.

3.11.3. 3 dimenziós rekonstrukció

A sorozatfelvételekből a rekonstrukciót az IMOD szoftvercsomaggal végeztük. Az elektromográfiai térfigatok esetén az izotropikus voxelek élhossza 0,49nm volt. A különböző sejtek, sejtalkotók szegmentálását manuálisan, a 3Dmod szoftverrel végeztük.

3.11.4. Elektromográfiai felvételeken végzett mérések

3.11.4.1. P2Y12 receptor sűrűsége a membránok mentén

Az IMOD szoftvercsomag segítségével az egyes membránszakaszok felszínét megmértük, valamint a membrán-asszociált (40nm-nél közelebbi) P2Y12 receptorokat jelölő aranyzemcséket hozzárendeltük a hozzájuk legközelebb eső membránszakaszhoz.

3.11.4.2. P2Y12 receptor mennyiségének és a kapcsolati rés szélességének összefüggése

A vizsgálathoz az IMOD szoftverrel kiexportált koordináták segítségével a mikroglialis membrán minden szomatikus kapcsolatot kialakító pontján megállapítottuk a legkisebb mikroglia-neuron távolságot, valamint a 40nm-es sugarú körben található P2Y12R aranyzemcsék számát.

3.12. In vitro technikák és mérések

3.12.1. Mikroglia izolálása

Az agyhártyák eltávolítása után a kinyert szövetdarabokat szobahőmérsékleten enzimatikusan kezeltük. Ezután a sejteket 5% CO₂-t tartalmazó, nedvesített környezetben, 37 °C-on Minimal Essential Mediumban (Thermo Fisher Sc.) neveltük, amelyhez 10% magzati marhaszérumot (Thermo Fisher Sc.), 4mM glutamint (Sigma-Aldrich), 40µg/ml gentamicint (Gentamicin Sandoz injekció) és 2,5µg/ml amfotericin B-

t (Sigma-Aldrich) adtunk. A primer mikroglia sejteket 21-28 napos kevert asztrogliá/mikroglia kultúrákból enyhe tripszinizálással izoláltuk.

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

A transzfekcióhoz használt ko-kultúrákban a HEK293 sejteket $2,5 \times 10^4$ sejt/cm² sűrűségben ültettük ki, ezek tetejére pedig mikroglia sejteket ültettünk ugyanilyen sűrűségben a transzfekció előtt egy nappal. A transzfekciót 1µg Kv2.1-GFP, vagy DNKv2.1-YFP plazmid DNS-sel, Lipofectamine 3000 reagens (Thermo Fisher Sc.) és Opti-MEM szérum médium (Thermo Fisher Sc.) használatával végeztük. A génexpressziót a transzfekciót követő napon értékeltük. A mikroglia jelöléséhez 5 µg/ml izolektin B4-Alexa 488 vagy 594 (Thermo Fisher Sc.) konjugátumot alkalmaztunk.

3.12.3. Primer neuronális sejt kultúra készítése

A primer hippokampális neuronkultúrákat 18 napos C57BL/6J embriókból készítettük el. A sejteket poli-L-lizinnel bevont műanyag sejt kultúra tálakra vagy lamininnel bevont üveg fedőlemezekre ültettük 1×10^5 sejt/cm² sűrűségben, majd NeuroBasal táptalajon (Thermo Fisher Sc.) növesztettük, melyhez 5% magzati marhaszérumot, B-27 kiegészítőt (ThermoFisher Sc.), 0,5mM GlutaMax kiegészítőt (Thermo Fisher Sc.), 40µg/ml gentamicint, 2,5µg/ml amfotericin B-t adtunk. A gliasejtek növekedésének gátlása érdekében az inkubálás 24-120. órája között 10µM citozin-arabino-furanozidot (CAR, Sigma-Aldrich) adtunk a tenyészetekhez.

3.12.4. Neuronális ATP-felszabadulás mérése

A vezikuláris ATP-felszabadulás megfigyeléséhez neuronális kultúrákat inkubáltunk 20µM quinacrine-dihidrokloriddal (Sigma-Aldrich) 20 percen keresztül, 37 °C-on. A képkalkotás HEPES pufferelt ACSF-ben (124,5mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM glükóz, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 8mM NaHCO₃, 20mM HEPES) szobahőmérsékleten, Nikon A1R konfokális mikroszkópon történt, 60x-os nagyítással (Plan Apo VC).

3.12.5. Extracelluláris ATP mérése

Az ATP mennyiségét az inkubációs médiumban nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel határoztuk meg. A primer neuronális sejt kultúrák felülűszóját az in vitro inkubálás 7. napján gyűjtöttük, 5 percig tartó 40 mM KCl-dal való kezelést követően, amelyet 20 perces inkubációs időszak előzött meg a következő drogok kombinációjával: 20µM Nimodipin (Alomone Labs), 10µM klodronát-dinátrium (Sigma-Aldrich), 100nM omega-Agatoxin IVA (Alomone Labs), 1µM omega-Conotoxin GVIA (Alomone Labs). A vizsgálni kívánt médiumokból 400µl-nyit 50µl homogenizáló oldatot (10 µM teofillint tartalmazó 0,1M perklórsav-oldat) tartalmazó hűtött Eppendorf-csővekbe mértünk, majd a perklóratot a felülűszóból 1M

kálium-hidroxiddal precipitáltuk, a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk. Az adeninnukleotidok és az adenzin mennyiségét a vizsgált médiumban oszlopceres szeparációval határoztuk meg.

3.13. Statisztika

Az adatok típusának és eloszlásuknak megfelelően (a normalitásvizsgálatot Shapiro-Wilks W teszttel végeztük) választottunk statisztikai próbát: a normál eloszlású mintákon 2 csoport esetén párosított vagy kétmintás t-tesztet, több csoport esetén egyutas ANOVA próbát (Tukey-teszttel kiegészítve) hajtottunk végre, míg nem parametrikus vizsgálati módszerek közül 2 csoportnyi, egymással kapcsolatban lévő minta esetén Wilcoxon próbát, független csoportok esetén Mann-Whitney U tesztet, míg több csoport esetén Kruskal-Wallis (és Dunn) tesztet végeztünk. A dolgozat során a szignifikanciaszintet minden esetben $\alpha=0,05$ -ben határoztuk meg. A statisztikai analízishez Statistica 13.4.0.14 szoftvert (TIBCO Software) használtunk.

4. Eredmények

4.1. A szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatok rendkívül gyakoriak az agykéregben

- Konfokális mikroszkópia és többszörös immunhisztokémiai jelölés segítségével megfigyeltük, hogy mind az egér, mind a humán agykéreg principális sejtjei rendkívül nagy arányban rendelkeznek a sejttestükre érkező mikroglialis kapcsolattal. A jelenség a parvalbumin-, illetve a vezikuláris glutamát transzporter-3-pozitív interneuronok esetében is igaznak bizonyult, és az érintett idegsejtek aránya nagyságrenddel nagyobb, mint a mikroglialis kapcsolattal rendelkező szinaptikus profilok aránya.
- Elektronmikroszkópos képalkotással és mikroglialis célpontokat jelölő immunaranyreakció segítségével igazoltuk, hogy a mikroglia-nyúlványok valóban közvetlen membránkapcsolatot alakítanak ki az idegsejtek sejttestével mind az egér, mind a humán agyszövetben.
- *In vivo* két-foton mikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy a mikroglia-nyúlványok által az egér agykérgi principális sejtek sejttestével kialakított átmeneti kapcsolatok időtartama átlagosan háromszor hosszabb, mint a dendritekkel kialakított kapcsolatoké. Szintén megfigyeltük, hogy a nyúlványok többször visszatérnek a sejttest ugyanazon pontjára.

4.2. A mikroglia-neuron szomatikus junkció speciális ultrastruktúrával rendelkezik

- Konfokális mikroszkópia és többszörös immunhisztokémiai jelölés segítségével kimutattuk, hogy a szomatikus kapcsolatok neuronális Kv2.1 és/vagy Kv2.2 fehérjeklaszterek területén jönnek létre.

- *In vitro* kísérletsorozatainkban megfigyeltük, hogy a Kv2.1 fehérjeklaszterek jelenléte indukálja az intercelluláris mikroglialis kapcsolatok kialakulását.
- Konfokális mikroszkópia segítségével bebizonyítottuk, hogy a neuronális citoplazmában a szomatikus junkció közvetlen környezetében feldúsulnak a mitokondriumok, a vezikuláris nukleotid transzportert (vNUT) kifejező vezikulumok, valamint a Lamp1-pozitív lizoszómák.
- Elektronmikroszkóppal megfigyeltük a szomatikus junkció neuronális oldalának speciális ultrastruktúráját, melyekre a korábbiakon felül jellemző endoplazmás retikulumszakaszok membránhoz horgonyzódása, valamint mitokondrium-eredetű vezikulumok felszabadulása.

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

- *In vitro* sejt kultúrában mikroszkópos felvételen, valamint nagy teljesítményű folyadékromatográfiás módszerrel is megmutattuk, hogy az idegsejtek sejttestéből depolarizáció hatására ATP szabadul fel. Az extracelluláris médiumban megjelenő purinerg metabolitok túlnyomó része a sejttestből származik, ugyanis a szinaptikus Ca^{2+} -csatornákat gátló „szinaptikus koktél” (SC, ω -agatoxin és ω -conotoxin keveréke) alkalmazása nem csökkenti jelentősen a felszabaduló ATP mennyiségét, míg a szomatikus excitációban szerepet játszó L-típusú Ca^{2+} -csatornákat gátló nimodipin, vagy a vNUT működését gátló klodronát megelőzi a depolarizáció hatására történő ATP-felszabadulást.
- Konfokális felvételeinken megfigyeltük, hogy a szomatikus junkciót kialakító mikroglia-nyúlványok végén az ATP enzimatis bontására alkalmas NTPDase1 fehérje jelen van.
- *In vivo* kemogenetikai módszerrel ingerelt idegsejtek esetén megfigyeltük, hogy a megnövekedett aktivitású idegsejtek felszínén megnő a mikroglia-nyúlványok által beborított felszín aránya, vagyis a mikroglia képes reagálni az idegsejtekben bekövetkező változásra.

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

- Elektromográfiai módszerrel kimutattuk, hogy a központi idegrendszerben mikroglia-specifikus, purinerg P2Y12 receptor szelektíven felhalmozódik a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolatokban. A receptor sűrűsége jelentősen nagyobb azokon a mikroglialis membránszakaszokon, amelyek neuronális sejttestekkel alakítanak ki közvetlen kapcsolatot.
- Szintén elektromográfiai képalkotást követően kimutattuk, hogy a kapcsolat kialakító mikroglialis membránszakaszon összefüggés figyelhető meg a membránok

távolsága és a P2Y₁₂ receptor sűrűsége között: ahol közelebb ér a mikroglia-nyúlvány a neuronális membránhoz, ott nagyobb a receptor sűrűsége.

- *In vivo* két-foton mikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy az egérnek centrálisan, közvetlenül a cisterna magnájába juttatott PSB0739, a P2Y₁₂ receptor szelektív gátlószere (mikroglia-specifikus intervenció) jelentősen megrövidíti a szomatikus kapcsolatok időtartamát.
- *In vivo* kemogenetikus módszerrel ingerelt idegsejtek esetén szintén megfigyeltük, hogy mind a P2Y₁₂ receptor centrálisan adott PSB0739-cel történő akut gátlása, mind a receptor géntünetű állatokban tapasztalható krónikus hiánya megszünteti a megnövekedett neuronális aktivitásra adott mikroglialis választ, azaz a borítottságnövekedést.

4.5. A P2Y₁₂ receptornak alapvető szerepe van a fiziológiás mikroglia motilitás és morfológia szabályozásában

- P2Y₁₂ receptor géntünetű egerek primer szomatoszenzoros kérgében konfokális mikroszkóp segítségével megfigyeltük, hogy a receptor hiányában megnövekszik a szatellita mikroglia aránya, valamint csökken a neuron/mikroglia arány.
- Fixált agyszövetről készített nagyfelbontású konfokális felvételeken futtatott automatikus 3 dimenziós morfológiai analízisünk feltárta, hogy a P2Y₁₂ receptor működésének hiánya jelentős morfológiai változásokat okoz a mikrogliaiban. A géntünetű állatban lecsökken a sejtestek térfogata, és megnövekszik a mikroglia-nyúlványok száma. Az akut, centrális PSB0739-cel történő P2Y₁₂ receptor gátlás hasonló változásokat indukál, drasztikusabb növekedéssel a nyúlványok számában.
- Nagy tér- és időbeli felbontással készített *in vivo* két-foton mikroszkópos felvételeinken megfigyelhettük, hogy a P2Y₁₂ receptor működésének hiánya jelentősen befolyásolja a mikroglia-nyúlványok fiziológiás mozgását. A receptor akut gátlása csökkenti a nyúlványok átlagos és maximális sebességét, míg mind az akut, mind a krónikus receptoműködési zavar jelentősen csökkenti a nyúlványok irányított mozgását és az egyes nyúlványok által ellenőrzött territórium méretét.

4.6. A szomatikus junkció jelentős szerepet játszik a fejlődés során és akut stroke esetén

- Különböző életkorú egerek agyszövetének vizsgálata során kimutattuk, hogy a szomatikus junkció jelen van az éretlen, poszt-mitotikus neuronok felszínén is: 15 napos embrióban és újszülött egerekben a neuronok mintegy egyharmada, 8 napos állatokban a neuronok körülbelül hatvan százaléka, míg 15 napos és idősebb egerekben szinte az összes idegsejt részben szomatikus mikroglialis kapcsolatban.
- STORM szuperrezolúciós képalkotás során megfigyeltük, hogy a P2Y₁₂ receptor kapcsolat-függő feldúsulása jelen van már az embrionális fejlődéstől kezdve minden

általunk vizsgált életkorú egér éretlen, poszt-mitotikus idegsejtjeinek szomatikus juncióiban.

- Konfokális mikroszkópos felvételeinken megfigyeltük, hogy ischemiás stroke penumbájában megváltozik a szomatikus junció szerkezete: a neuronális Kv2.1 fehérjeklaszterek eltűnnek, a szomatikus neuronális mitokondriumok fragmentálódnak, az idegsejtek sejttestén pedig jelentősen megnövekszik a mikroglialis borítottság. Ez utóbbi jelenséget ischemias stroke-ban elhunyt emberek penumbájában is megfigyeltük.
- Az ischemias penumbában megfigyelhető mikroglialis borítottságnövekedés létrejöttéhez funkcionális P2Y₁₂ receptorokra, valamint mitokondriális sérülésre van szükség, ugyanis mind a P2Y₁₂ akut centrális gátlása, mind a mitokondriális K_{ATP}-csatorna agonista diazoxiddal történő kezelés megakadályozza a jelenség kialakulását.
- A mikroglia ischemias károsodás során mutatott neuroprotektív szerepében is alapvető fontosságú a P2Y₁₂ receptor: *in vivo* két-foton mikroszkóppal készített felvételeinken fluoreszcens kalcium-szenzor felhasználásával megfigyeltük, hogy a P2Y₁₂ receptor akut centrális gátlása esetén a neuronális Ca²⁺-szint patológiásan megemelkedik a reperfüzió alatt. Továbbá szintén megfigyeltük, hogy a PSB0739-cel kezelt egerek ischemias stroke-ját követően lényegesen nagyobb lézió alakul ki, mind a funkcionális P2Y₁₂ receptorral rendelkező kontroll állatokban.

5. Következtetések

A mikroglia az agy rezidens immunsejtjeként a központi idegrendszer elsődleges védvonalát jelenti patológiás behatások esetén. Emellett számos idegrendszeri folyamat szabályzásában is részt vesz, azonban a szakirodalomban fellelhető adatok alapján ismert közvetlen, valamint közvetett mikroglia-idegsejt kommunikációs útvonalak nem szolgálnak kielégítő magyarázattal a mikroglia idegsejtekre gyakorolt precíz és szoros kontrolljára. Kísérleteink során feltártuk, hogy a sokszínű mikroglia-neuron kommunikációban létezik egy, a szinaptikus profilokat érintő közvetlen mikroglialis kapcsolatoknál robusztusabb beavatkozásra lehetőséget adó interakciós felszín, mely a mikroglia dinamikusan mozgó nyúlványai és az idegsejtek sejtteste között alakul ki. *In vivo* méréseink szerint ezek a kapcsolatok lényegesen hosszabb ideig állnak fent, mint az idegsejtek neuritjait érintő mikroglialis kapcsolatok, és adott időpillanatban – mind egérben, mind emberi idegszövetben, fenotípustól függetlenül – az agykérgi idegsejtek mintegy 90%-án jelen vannak, és már a fejlődő idegrendszerben, a poszt-mitotikus neuronok felszínén is megtalálhatóak. A szomatikus juncióknak a neuronális oldalát speciális ultrastruktúra jellemzi: a principális sejtekben az exo-, illetve endocitózis helyét biztosító Kv-fehérjeklaszterek, membránhoz horgonyzott endoplazmás retikulum szakaszok, purinerg metabolitot tartalmazó, valamint lizoszomális vezikulumok, illetve a szomatikus mitokondriumok közeli jelenléte figyelhető meg. A kapcsolatot kialakító

mikroglia-nyúlványok membránjában a purinerg P2Y12 receptor kapcsolat-függő feldúsulását is megmutattuk, csakúgy, mint a purinerg metabolitok extracelluláris bontását biztosító ektonukleotidázok jelenlétét. A P2Y12 receptorok akut gátlása a szomatikus junkció fennállásának idejét lerövidíti, a mikroglia P2Y12 receptor-függő módon reagál az idegsejtek megnövekedett aktivitására, továbbá akut ischémiás stroke-ot követő neuroprotektív hatásához is elengedhetetlen ez a receptor. Érdekes új eredmény továbbá, hogy a P2Y12 receptor a mikroglia-neuron kommunikációban betöltött kiemelt szerepén túl a mikroglialis fiziológiára is alapvető hatással bír, akut gátlása ugyanis nagymértékben csökkenti a nyúlványmozgások irányítottóságát, valamint mind az akut, mind a krónikus receptorfunkció-hiány növeli a mikroglia-nyúlványok számát. A receptor krónikus hiányában megfigyelhető kompenzációs mechanizmusok – több mikroglia az agykéregben, valamint a szatellita mikroglia arányának növekedése – tovább erősítik a P2Y12R fiziológias szerepének fontosságát.

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

6. Publikációk listája

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

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

*Megosztott első szerzők

C. Cserép, **B. Pósfai**, Á. Dénes. *Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions.* **NEURON** 109(2):222-240 (2021). doi: 10.1016/j.neuron.2020.11.007 **IF: 18,688**

B. Pósfai*, C. Cserép*, B. Orsolits, Á. Dénes. *New Insights into Microglia-Neuron Interactions: A Neuron's Perspective.* **NEUROSCIENCE** 405:103-117 (2019). doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.04.046 **IF: 3,056**

*Megosztott első szerzők

További publikációk:

E. Császár, N. Lénárt, C. Cserép, Z. Környei, R. Fekete, **B. Pósfai**, D. Balázsfi, B. Hangya, AD. Schwarcz, E. Szabadits, D. Szöllősi, K. Szigeti, D. Máthé, BL. West, K. Sviatkó, AR. Brás, JC. Mariani, A. Kliewer, Z. Lenkei, L. Hricisák, Z. Benyó, M. Baranyi, B. Sperlág, Á. Menyhárt, E. Farkas, Á. Dénes. *Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions.* **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 219(3):e20211071 (2022). doi: 10.1084/jem.20211071 (várható) **IF: 17,579**

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

DP. Varga, Á. Menyhárt, **B. Pósfai**, E. Császár, N. Lénárt, C. Cserép, B. Orsolits, B. Martinecz, T. Szlepák, F. Bari, E. Farkas, Á. Dénes. *Microglia alter the threshold of spreading depolarization and related potassium uptake in the mouse brain.* **JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM** 40(1_suppl):S67-S80 (2020). doi: 10.1177/0271678X19900097 **IF: 6,200**

A. Szőnyi, KE. Sós, R. Nyilas, D. Schlingloff, A. Domonkos, VT. Takács, **B. Pósfai**, P. Hegedüs, J. Priestley, A. Gundlach, AI. Gulyás, V. Varga, A. Losonczy, TF. Freund, G. Nyiri. *Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation.* **SCIENCE** 364(6442):eaaw0445 (2019). doi: 10.1126/science.aaw0445 **IF: 41,846**

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

VT. Takács, C. Cserép, D. Schlingloff, **B. Pósfai**, A. Szőnyi, KE. Sós, Z. Környei, Á. Dénes, AI. Gulyás, TF. Freund, G. Nyiri. *Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states.* **NATURE COMMUNICATIONS** 9(1):2848 (2018). doi: 10.1038/s41467-018-05136-1 **IF: 11,878**

B. Pósfai*, C. Cserép*, P. Hegedüs, E. Szabadits, DM. Otte, A. Zimmer, M. Watanabe, TF. Freund, G. Nyiri. *Synaptic és cellular changes induced by the schizophrenia susceptibility gene G72 are rescued by N-acetylcysteine treatment.* **TRANSLATIONAL PSYCHIATRY** 6(5):e807 (2016). doi: 10.1038/tp.2016.74 **IF: 4,730**

*Megosztott első szerzők