

A mikroglia szerepe neurotróp vírusfertőzésben

Doktori tézis

Fekete Rebeka

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Dénes Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Környei Zsuzsanna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Kékesi Adrienna Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Jakus Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András Ph.D. habil., Dsc. professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kardos József, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Alpár Alán, Ph.D. habil., Dsc.

Budapest

2019

1. Bevezetés

A mikroglia a központi idegrendszer fő immunkompetens sejtípusa, amely fontos szerepet játszik számos fiziológiai folyamatban, köztük az agy fejlődésében, a szinaptikus plaszticitás és memória kialakulásában. A mikroglia működésében fellépő változások hozzájárulhatnak olyan közismert központi idegrendszeri kórképek kialakulásához, mint a stroke, epilepszia, az Alzheimer kór vagy a Parkinson kór. A sérült, vagy rosszul működő neuronok felismerése és elkülönítése az egészséges sejtektől kiemelten fontos mikroglialis funkció, amely nagyban hozzájárul az agyi neuronhálózatok integritásának fenntartásához és fiziológiai működésének megőrzéséhez. Ha ez a funkció sérül, az akut gyulladásos folyamatokat indíthat el vagy akár krónikus neurodegenerációhoz vezethet. A mikroglia-mint az agy kulcsfontosságú immunsejtje- meg kell hogy védje az idegszövetet az olyan patogénektől is, mint a baktériumok, paraziták vagy vírusok, amelyek képesek a központi idegrendszerbe jutni, ahol specializált immunsejtek hiányában pedig igen nagy fenyegetést jelentenének az idegrendszer számára. Ez különösen igaz számos olyan vírus törzsre (pl: herpes simplex vírus, HIV, Zika vírus, stb) amelyek képesek akut illetve krónikus gyulladást előidézni a központi idegrendszerben. Az idegrendszeri vírusfertőzések szerepét különböző neurodegeneratív kórképek kialakulásában számos új tanulmány hangsúlyozza. Továbbá friss kutatások jelzik, hogy a mikroglia-nak fontos szerepe van az anti-virális immunitásban. Ugyanakkor azok a pontos sejt szintű mechanizmusok, hogy hogyan képes a mikroglia érzékelni a fertőzött sejteket és izolálni őket a környezetüktől, még továbbra is megválaszolatlanok.

A mikroglia sejtek számos módon hozzájárulnak a központi idegrendszer egészséges működéséhez, többek között a sérült vagy feleslegessé vált idegsejtek és szinapszisok felismerésén és fagocitózisán keresztül. Ezen funkciójuk betöltéséhez számos olyan receptorral kell rendelkezniük, amelyek segítségével azonnal képesek érzékelni a különböző pro- és anti-inflammatórikus kemokinákat és citokineket, metalloproteinázokat, növekedési faktorokat, és extracelluláris nukleotidokat. Ezek közül a mediátorok közül is a legpotensebbek az olyan purinerg nukleotidok, mint az ATP vagy az ADP, amelyek a mikroglia sejtekben azonnali kemotaxist indukálnak. Ismert, hogy a mikroglialis purinerg receptorok hozzájárulnak a mikroglia aktivációhoz és migrációhoz akut vagy krónikus gyulladás esetén, ugyanakkor szerepük a központi idegrendszert érintő vírusfertőzések során kialakult gyulladásos folyamatokban nem ismert. Feltáratlanok azok a mechanizmusok is, amelyekkel a mikroglia felismeri és izolálja a vírusfertőzött neuronokat, beleértve a purinerg jelátvitelt.

Doktori értekezésem fő témájául a mikroglia viselkedésének tanulmányozását választottam neurotróp vírusfertőzés modellben *in vitro* és *in vivo*. Amellett, hogy a mikroglialis mechanizmusokat vizsgáltam ebben a modellben, különös figyelmet fordítottam a mikroglialis P2Y₁₂ purinerg receptor szerepére.

Ebből a célból választottam neurotróp vírusfertőzés modellemhez a genetikailag módosított Pseudorabies vírus törzset (PRV), amely az Alphaherpesvírusok családjába tartozik, hasonlóan a

humán Herpes simplex 1 vírushoz. A PRV-t neuroanatómiai pályatérképezésre már régóta alkalmazzák, valamint a neurotróp vírusfertőzés széles körben elfogadott modelljének számít. Perifériás autonóm beidegzésű szervekbe injektálva a rekombináns „Bartha-Dup” vírus törzsek kizárólag retrográd, transzsinaptikus úton jut el a központi idegrendszerbe az autonóm idegpályákon keresztül. A rekombináns vírus törzsek korai GFP expressziójának, valamint lassú és neuronspecifikus terjedésének köszönhetően lehetőség nyílik a fertőzés időbeni követésével párhuzamosan a mikroglia toborzódásának vizsgálatára. A modell sajátossága, hogy a mikroglia még *ex vivo* körülmények között sem fertőződik meg, ellentétben más vírusos modellekkel. Így kizárólag a fertőzött neuronokból felszabaduló gyulladáshoz vezető mediátorok által kiváltott mikroglialis választ és a mikroglialis P2Y₁₂ receptor szerepét tudom vizsgálni.

Mivel a PRV-Bartha variánssal fertőzött neuronok normális elektrofiziológiai paramétereket mutatnak, de aktivitásuk megnő, azt feltételeztem, hogy a mikroglia még az irreverzibilisen sérült állapot bekövetkezése előtt érzékeli az individuális idegsejtekben a vírusfertőzést. *In vivo* két-foton és *in vitro* timelapse imaging módszerekkel vizsgáltam a mikroglia gyors és irányított toborzódását a fertőzött neuronok körül, valamint tanulmányoztam, hogy a fertőzött sejtekből felszabaduló nukleotidok hogyan szabályozzák ezt a mechanizmust a mikroglialis P2Y₁₂ receptorokon keresztül. Szelektív mikroglia depléciós módszerünk segítségével azt is meg tudtam vizsgálni, hogy a mikroglia jelenléte hogyan befolyásolja a neurotróp vírusfertőzés terjedését és súlyosságát, valamint azt, hogy a hiánya milyen hatással van a vér-agy gát integritására és a perifériás immunsejtek agyi toborzódására.

2. Célkitűzések

- 1) Centrális gyulladáshoz vezető folyamatok és a mikroglia funkcionális szerepének vizsgálata egér neurotróp vírusfertőzés modellben
- 2) A mikroglialis P2Y₁₂ receptor szerepének vizsgálata neurotróp vírusfertőzés során
- 3) HSV1 encephalitist követően kialakuló centrális gyulladáshoz vezető folyamatok és a mikroglia vizsgálata post-mortem humán agyszövetben

3. Anyagok és módszerek

3.1 In vivo kísérletek

3.1.1. Egerek tartása és ellátása

Kísérleteimet 12-18 hetes C57BL/6J, P2Y12^{-/-}, P2RX7^{-/-}, Cx3Cr1^{GFP/+} és Cx3Cr1^{GFP/+} P2Y12^{-/-} egértörzseken végeztem. Minden kísérletet az Európai Parlament és Tanács 86/609 EEC irányelve szerint és a Magyar Állatjóléti Bizottság (1998; XXVIII, 243/1998 paragrafus) jóváhagyásával.

3.1.2. Szelektív mikroglia deplécio

Az egereket a PLX5622 (Plexxikon Inc. Berkeley, USA; 1200mg PLX5622 in 1kg chow) droggal kezeltem 3 héten keresztül, hogy a mikrogliait elimináljam az agyból.

3.1.3. Neurotróp herpeszvírus fertőzés

A kísérleti egereket randomizált csoportokba osztottam, majd intraperitoneálisan (i.p.) vagy közvetlenül az epididmális zsírszövetbe injektáltam PRV-Bartha-Dup-Green (BDG) genetikailag módosított PRV-Bartha törzset, amellyel retrográd, transzsinaptikus vírusfertőzést indukáltam. A mikroglia depléciós kísérletben résztvevő egereket a PLX5622 diéta 16. napján injektáltam BDG vírussal, hogy tanulmányozzam a mikroglia deplécio hatását a vírusfertőzés terjedésére. Az *in vivo* két-fotonos méréshez Cx3Cr1^{GFP/+} egereket használtam, amelyekbe PRV-Bartha-DupDsRed (BDR) vírust injektáltam, ezzel biztosítva a mikroglia és a vírusfertőzés egyidejű vizsgálatát. Az egerek a vírus beadása után 5-7 napig éltek túl, a kísérlet céljától függően. A túlélési idő alatt rendszeresen monitoroztam az esetleges neurológiai és viselkedési tüneteiket.

3.1.4. *In vivo* két-foton imaging

A mikroglia toborzódás vizsgálatának céljából Cx3Cr1^{GFP/+} riporter egereket fertőztem 10µl BDR vírus i.p. beadásával. A mérést 7 nappal az injektálás után kezdtem, mert ekkorra már megjelent a fertőzés a magasabb kortikális régiókban is. A kraniális ablak műtétet követően, a méréseket egy a Femto2D-DualScanhead mikroszkóppal (Femtonics Ltd., Hungary) összekötött Chameleon Ultra II lézerrel végeztük. Az adatelemzést a MES szoftver segítségével végeztem (Femtonics Ltd.). A két-foton mikroszkópos képsorozatokat a kiexportálásukat követően ImageJ program segítségével analizáltam.

3.1.5. Szövetfeldolgozás és immunfluoreszcens jelölés

Az egereket transzkardiális úton perfundáltam (fiziológiás sóoldatos mosást követően 4%-os PFA-val fixáltam). Ezt követően, az agykból 25 µm vastag szabadon úszó metszeteket készítettem. A metszeteket 2%-os normál szarummal blokkoltam, majd a megfelelő primer antitestekkel inkubáltam 4°C-on egy éjszakán keresztül. A következő napon, a metszeteket számos mosási lépést

követően a megfelelő másodlagos fluoreszcens antitestekkel inkubáltam szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. Ezután a metszeteket tárgylemezre húztam, majd lefedtem és Nikon Ni-E C2+ konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettem.

3.1.6. Immuno-elektron mikroszkópia

A kombinált immunogold-immunperoxidáz jelöléseket követően a metszeteket osmium tetroxiddal kezeltük, majd felszálló alkoholsorban dehidratáltuk, és epoxy gyantába ágyaztuk be. A dehidratálás folyamán a metszeteket uranil acetáttal kezeltük. A polimerizációt követően, 70 nm vastag metszeteket készítettünk ultramikrotóm segítségével. A mintákat formvar bevonatú szén gridekre helyeztük, majd egy Hitachi H-7100 típusú electron mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.1.7. Korrelált konfokális-, electron mikroszkópia és elektron tomográfia

A különböző immunfluoreszcens jelölést követően a metszeteket Nikon Eclipse Ti-E invertált mikroszkóp és egy A1R laser konfokális rendszer segítségével analizáltam. Ezt követően ugyanezeket a metszeteket visszaúsztottam, majd immunperoxidáz reakciót indítottunk rajtuk. Ezután elektron mikroszkópos, majd elektron tomográfias felvételeket készítettünk egy Tecnai T12 BioTwin elektron mikroszkóp segítségével. A mérésekből készített rekonstrukciót IMOD szoftver segítségével készítettük el.

3.1.8. Szuperrezolúciós (STORM) mikroszkópia

A fixált metszeteket az immunfluoreszcens jelölést követően #1.5 vastag boroszilikát üveglemezre húztam, majd közvetlenül a mérés előtt a megfelelő imaging médiummal fedtem le. A szuperrezolúciós mérést a P2Y12 receptorokon végeztük. A stimulálást 647 nm-es lézerrel Nikon N-STROM C2+ szuperrezolúciós mikroszkóp segítségével végeztük.

3.2. *In vitro* egér kísérletek

3.2.1. Primer sejt kultúrák

A primer neuronális sejt kultúrákat 15 napos egér embriókból származó kortikális szövetből. A mikroglia-asztroglia ko-kultúrákat pedig posztnatális, P0-1 napos újszülött teljes egér agyából állítottam elő. A mikroglia sejteket a 21-28 napos kevert kultúrákból izoláltam, gyenge rázatásos vagy enyhe tripszines emésztéses módszerrel. Time-lapse méréseinkhez a mikroglia sejteket később adtam asztroglia vagy neuronális kultúrához, 1000 sejt/cm² sűrűségben. A neuronális és asztroglia kultúrákat PRV-Bartha-Dup-Green (BDG) vírussal vagy PRV-Bartha-DupLac (BDL) törzzsel fertőztem 2.5x10⁵ PFU/ml titer mennyiséggel. A fertőzés multiplikálódása (MOI) ~0,17 PFU/sejt volt.

3.2.2. Time-lapse mikroszkópia és sejt motilitás analízis

A time-lapse felvételekhez egy számítógép vezérelt Leica DM IRB invertált fluoreszcens mikroszkópot használtunk, amellyel fázis kontraszt és epifluoreszcens képeket készítettünk folyamatosan 10 perces időközönként 48 órával a vírusfertőzést követően. A sejtek individuális követését egy custom-made követő program segítségével végeztem (G-track and Wintrack). Ez lehetővé tette számunkra a sejtek képenkénti pozíciójának lekövetését.

3.2.3. Citokin mérés sejt kultúrákból származó médiumból

Kontroll, vírusfertőzött, valamint LPS kezelt primer neuron, asztroglia és mikroglia kultúrák kondicionált médiumából mértem citometrikus bead array (CBA) segítségével IL-1 α , IL1 β , TNF α , IL-6, MCP-1, RANTES, G-CSF és CXCL1 citokin szinteket. A méréseket BD FACSVersé készüléssel készítettem, és az FCAP Array szoftver segítségével analizáltam. A citokin szinteket minden esetben a minták teljes fehérje szintjéhez normalizáltam a Bradford Protein Assay Kit segítségével.

3.2.4. Teljes RNS izolálás és kvantitatív RT-PCR

A teljes RNS izoláláshoz a sejt kultúrákat 500 μ l TRI reagensben homogenizáltuk. Az RNS izolálásához Tissue Total RNA Mini Kit-et használtunk. A real-time PCR reakcióhoz használt primereket Fast EvaGreen Qpcr Master Mixel egy StepOnePlus műszer segítségével mértük le. A gén expressziós vizsgálatot a StepOne 2.3 program segítségével végeztük. Az amplikonokat MeltCurve Analysis-el a StepOnePlus műszerek segítségével végeztük. A méréseinket a *gapdh* expressziójához normalizáltuk.

3.2.5. Extracelluláris nukleotidok kvantifikációja

Az extracelluláris nukleotidok (ATP, ADP, AMP), valamint adozin (Ado) szintjét a primer neuronális, asztroglia és mikroglia sejtekből és a sejt kultúrák kondicionált médiumából mértük meg HPLC módszerrel. Az általunk használt HPLC rendszer egy Shimadzu LC-20 AD Analytical & Measuring Instruments System készülék volt amely egy Agilent 1100 Series Variable Wavelength 252 nm hullámhosszon mérő detektorral volt összekötve.

3.2.6. ekto-ATPáz enzim aktivitás mérése enzim hisztokémiával

Cérium csapadék képző módszerrel, elektron mikroszkópos analízis segítségével detektáltuk az ekto-ATPáz enzim aktivitását. A szöveti blokkokat fixáltuk, dehidratáltuk majd Taab 812 típusú gyantába ágyaztuk be. Ezután a mintákból ultra vékony metszeteket készítettünk.

3.2.7. Agy, vér és lép minták áramlási citometriás vizsgálata

A fiziológiás sóoldattal átperfundált egér agyakat mechanikus aprítást követően, DNáz I és Collagenase/Dispase emésztő enzim mix segítségével izoláltam. A lépből mechanikus homogenizálás segítségével izoláltam a sejteket. A vérmintáinkat transzkardális perfúzóval, vénás vérből gyűjtöttem,

majd 3.8% Na-citrát anti-koagulánssal kezeltem. A mintákat a megfelelő fluoreszcens jelölést követően BD FACSVersé flow citométerrel mértem le. Adataimat FACSuite szoftver segítségével analizáltam. A teljes vér térfogatban lévő sejtszámot 15 µm poliszitirén mikrogyöngyök segítségével számoltam ki.

3.2.8. Statisztika

Minden kvantitativ mérést vakon végeztem a STAIR és ARRIVE irányelvek szerint. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7.0 szoftverrel végeztem. Két csoport összehasonlításához Student's t-testet alkalmaztam Welch's korrekcióval, vagy Mann-Whitney U teszt segítségével. Három vagy több csoport összehasonlítása esetén egyutas vagy kétutas ANOVA módszert alkalmaztam Tukey's, Sidak's vagy Dunnett's post hoc összehasonlítással. A $p < 0.05$ értéket statisztikailag szignifikánsnak vettem.

3.2. Humán minták

A neurotróp vírusfertőzés következtében fellépő mikroglia toborzódást paraffinba beágyazott post-mortem humán agymetszeteken vizsgáltuk. A minták 5 különböző 42-66 év közötti betegből származnak, akik HSV okozta agyvelőgyulladásban hunytak el. (etikai engedély ETT-TUKEB 62031/2015/EKU, 34/2016 és 31443/2011/EKU (518/PI/11)). A vizsgált minták közül két beteg szövetmintáit kontrollként használtuk, mert nem neurológiai eredetű betegségben hunytak el. A deparaffinálást követően, immunhisztokémiai módszerrel jelöltük és vizsgáltuk a mikroglia, leukocitákat és neuronokat. A reprezentatív képeket Nikon Ni-E C2+ mikroszkóppal készítettem.

4. Eredmények

4.1. A mikroglia kiemelt szerepet játszik a központi idegrendszer anti-virális immunitásában

A vírusfertőzés hatására kialakuló mikroglialis választ egy kizárólag retrográd, transszinaptikus úton terjedő, rekombináns Pseudorabies virus (PRV) törzssel, a Bartha-DupGreen (BDG) injektálásával vizsgáltam, amely perifériáról indítva a központi idegrendszer autonóm idegpályáit fertőzi meg. Vizsgálataimat a hipotalamusz paraventriculáris magjában (PVN) végeztem, amely mint fontos centrális autonóm terület, időben jól kiszámítható kinetikával fertőződik meg perifériás vírusinjektálást követően a paravertebrális dúc ganglionok, a gerincevelői intermediolaterális mag és az agytörzs autonóm központjainak fertőződése után. Megfigyeltem, hogy vírusfertőzés hatására ebben a magban a toborzódott Iba1 pozitív mikroglia sejtek száma háromszorosára nőtt a fertőzött neuronok körül, 6 nappal a vírus intraperitoneális (i.p.) beadása után. Ezt követően a mikroglia szerepét vizsgáltam a neurotróp vírusfertőzés kontrollálásában, amelyhez szelektív mikroglia depléciót alkalmaztam egy CSF1R antagonistá, a PLX5622 segítségével. A drog 3 hetes adagolását követően a mikroglia 96%-os

deplécióját eredményezte, amelyet az Iba-1 és P2Y12 mikroglialis markerek hiánya is igazolt. A mikroglia depléció hatására a vírusfertőzött neuronok száma hármoszorosra emelkedett a kontroll, fertőzött csoporthoz képest. A mikroglia hiányában különböző súlyosságú neurológiai tüneteket is megfigyeltem, a fertőzést követő 5. napon: nehézlégzést, izomgörcsöket, valamint epilepszia szerű rohamokat. Ezeket a tüneteket a kontroll, fertőzött csoportban sosem tapasztaltam.

Következő lépésként a sejtszintű interakciókat vizsgáltam a toborzódott mikroglia és a fertőzött neuronok között. Ehhez a vizsgálathoz szuperrezolúciós mikroszkópos módszert alkalmaztam amelyhez, a vírusfehérjéket anti-PRV antitesttel, a mikroglialis fagolizozómákat anti CD68-antitesttel jelöltem. Méréseimből kiderült, hogy a vad típusú fertőzött egerekben a mikroglia szorosán körbeölelte a fertőzött neuronokat, majd fagocitálni kezdte azokat. Ezt bizonyítja a CD68 pozitív fagolizozómán belül megfigyelt fertőzött neuronális törmelék is. A mikroglia depletált állatokban viszont nagy mennyiségű extracelluláris PRV-pozitív vírusfehérjét detektáltam. Ezt az eredményt további elektronmikroszkópos vizsgálatokkal is megerősítettük, valamint azt is megmutattuk, hogy a mikroglialis sejtmembrán és fertőzött neuron membránja között direkt membrán kapcsolat alakul ki. Elektronmikroszkópos mérések segítségével kimutattuk, hogy a mikrogliaiban fagoszómán kívül nem találhatóak sem korai fertőzési stádiumú GFP-pozitív, sem PRV-pozitív víruspartikulumok.

4.2. A mikroglia sejtek toborzódásának mechanizmusa a vírusfertőzött neuronokhoz

Miután bizonyítottam, hogy a mikroglia sejteknek kiemelten fontos szerepe van a neurotróp vírusfertőzés szabályozásában, megvizsgáltam, hogy a mikroglia toborzódása megtörténik-e abban a korai stádiumban amikor a fertőzött neuronok membránja még intakt állapotban van. Ehhez a vírus által kifejezett korai GFP expressziót használtam ki, amely lehetővé teszi a fertőzés időbeli monitorozását individuális sejtek szintjén. A fertőzés korai stádiumában a fertőzött neuronok csak a GFP markert fejezik ki. A fertőzés későbbi fázisaiban a GFP expresszió mellett a vírusfehérjék mennyisége is megnő, ezzel párhuzamosan pedig megfigyeltem, hogy a toborzódó mikroglia mennyisége is nőtt a késői fertőzöttségi stádiumban lévő, PRV-pozitív neuronok körül. A legnagyobb számban toborzódott mikroglia a késői fertőzési stádiumban lévő idegsejtek körül volt megfigyelhető, amelyekben már csak a virális fehérjék voltak kimutathatóak.

Ezt követően a mikroglialis toborzódást *in vivo* is vizsgáltam két-foton mikroszkópos módszer segítségével. Ehhez először a kraniális ablak műtéti protokollunkat optimalizáltuk, mivel a mikroglia a legkisebb mechanikus sérülésre is azonnal aktiválódik. Ennek kiküszöbölésére a csont eltávolítását követően mindig sértetlenül hagytuk a dura matert. A vírusterjedés és a mikroglia toborzódás párhuzamos vizsgálatának céljából Cx3Cr1^{GFP/+} riporter egerekbe injektáltam Bartha-DupDsRed (BDR) vírust. Az állatok az injektálást követően 7 napot éltek túl. Ezzel a túlélési idővel biztosítottam azt, hogy a vírus magasabb kortikális területeken is kifejeződjön. Mérésem során a DsRed fluorophore expresszió

változást figyeltem meg a mikroglia toborzódásával egyidőben. A mérést követően a két-foton mikroszkópos technikával Z stackekből készített 3D rekonstrukciók megmutatták, hogy a toborzódott mikroglia sejtek teljesen elhatárolják a fertőzött neuront és számos ponton közvetlenül érintkeznek a fertőzött neuron sejttestjével. Emellett megfigyeltem, hogy a toborzódott sejtek nyúlványának sebessége nagyobb volt, mint a fertőzött sejtől távolabb eső mikroglia nyúlványaié, amelyből arra következtettem, hogy a mikroglia a fertőzött sejtek által kibocsájtott lokális szignálokra válaszol.

In vivo vizsgálataimat tovább validáltam korrelált elektron mikroszkópos valamint elektron tomográfias mérésekkel. Ehhez vírusfertőzött Cx3Cr1-es egerekben vizsgáltam individuális fertőzött neuronokat amelyek körül már látható volt a toborzódó mikroglia. Az ezekről készített 3D rekonstrukciók megmutatták, hogy a mikroglia számos ponton direkt kapcsolatot létesít a fertőzött neuron sejttestjével, dendritjeivel és axonjával mielőtt még az érett vírus fehérjék megjelenének a neuron citoplazmájában. Ebben a fertőzési stádiumban a sejt kromatin állománya teljesen ép volt a sejttagon belül, a membrán pedig intakt volt. Azok a mikroglialis nyúlványok amelyek a fertőzött neuron körül helyezkedtek el CD68 pozitívak voltak, amely a mikroglia fagocitotikus aktivitására enged következtetni. Az ezzel korreláló elektron tomográfias felvételek megmutatták a két sejtmembrán között kialakult közvetlen kapcsolatot.

4.3. A mikroglia toborzódása és fagocitotikus aktivitása vírusfertőzés hatására *in vitro*

A mikroglia toborzódását vírusfertőzés hatására *in vitro* környezetben is vizsgáltam. Ezért létrehoztam primer neuronokból és Cx3Cr1^{+GFP} pozitív mikrogliaiból álló ko-kultúrát, amelyen time lapse felvételeket készítettünk 48 órán keresztül. Méréseink során megfigyeltem, hogy a mikroglia a kontroll neuron sejt kultúrában folyamatosan monitorozza a neuronokat valamint közvetlen kapcsolatot is létesít a környező neuronok szómájával és dendritjeivel, fagocitotikus aktivitás nélkül. Ezzel ellentétben vírusfertőzött kultúrában a fertőzött neuronok körül mikroglia toborzódását és fagocitózist figyeltem meg.

Következő vizsgálataimban a mikroglia viselkedését akartam tanulmányozni, ezért primer asztroglia és mikroglia ko-kultúrát hoztam létre. Ezekhez a mérésekhez azért használtam asztroglia kultúrát, mert a sejtek szórványosabb elhelyezkedése lehetővé tette a mikroglia nagyobb távú migrációját. Az individuális mikroglia sejtek trajektóriái jól mutatják, hogy a kontroll kultúrában a mikroglia nagyobb távolságot tett meg, ellentétben a vírusfertőzött kultúrával, amelyben a migráció kisebb mértékű volt. Ez a jelenség összefügg a sejtek sebességének csökkenésével, a célirányos mozgásukkal valamint a fagocitotikus aktivitásukkal. Hasonló mikroglia viselkedést figyeltünk meg a vírusfertőzött neuron/mikroglia ko-kultúrákban is.

Fontos megjegyezni, hogy sem *in vivo* sem pedig *in vitro* nem detektáltunk produktív fertőzést a mikroglia citoplazmájában, még akkor sem, ha magas vírustiterű sejteket fagocitáltak. Ezt bizonyítja a korai GFP jel illetve a vírusfehérjék hiánya a fagoszómán kívül.

4.4. A fertőzött neuronokból felszabaduló nukleotidok stimulálják a mikroglia toborzódását és fagocitózisát a mikroglia P2Y12 receptoron keresztül

Kutatásom következő lépéseként megvizsgáltam, hogy a különböző purinerg nukleotidok, mint pl. az ATP, kemotaktikus szignálként hatnak rövid időn belül a mikroglia sejtekre. Kimutattuk, hogy már a vírusfertőzés korai stádiumában szabadul fel ATP a fertőzött neuronokból, amely összefüggésbe hozható a sejthomogenizátumokban mért, csökkent ATP, ADP, AMP és adenozin szintekkel. Ezt a nukleotid szint változást az NTDPáz1 enzim fokozott jelenléte is alátámasztotta. Kimutattam, hogy a jelenség nem a fertőzött sejtek nekrozisa vagy apoptozisa miatt történik, hiszen a korai GFP jelet kifejező fertőzött neuronok nem voltak pozitívak az életképességet mérő propidium jodidra (PI). A mikroglia membránfelszínén megfigyelt fokozott NTDPáz1 enzim expressziójából és aktivitásából arra következtettem, hogy a mikroglia toborzódását a fertőzött neuronokból nagyobb mértékben felszabaduló purinerg nukleotidok aktiválják.

Ezt követően a fertőzött sejtekből felszabaduló purinerg nukleotidok hatására bekövetkező mikroglia aktivációs mechanizmusait térképeztem fel, amelyet P2X7^{-/-} és P2Y12^{-/-} mikroglia és C57Bl6 vad típusú asztrogliá ko-kultúrákban vizsgáltunk. Hasonlóan a vad típusú mikroglia-asztrocita kokultúrában mért eredményeimhez, a P2X7^{-/-} mikroglia motilitása lecsökkent vírusfertőzött környezetben, amelyet az individuális sejtek trajektóriáinak elemzése is jól mutat. Ebből arra következtettem, hogy a P2X7 receptor hiánya nem akadályozza a mikroglia felismerését a fertőzött sejtek felismerésében és fagocitózisában. Ezzel ellentétben a P2Y12 KO mikroglia motilitása megnőtt a fertőzött sejtek környezetében. A vizsgált sejtek trajektóriái jól mutatják az ún. „random walk” viselkedést amelyből arra következtethetünk, hogy ezek a sejtek nem képesek a célirányos toborzódásra. Ezekben a kultúrákban szintén megfigyeltem, hogy a fertőzött kultúrákban a vad típusú és P2X7^{-/-} mikroglia fagocitotikus aktivitása megnőtt, ellentétben a P2Y12^{-/-} mikrogliaival amely alig mutatott fagocitotikus aktivitást. Ebből arra következtettem, hogy a P2Y12 receptor kiemelten fontos a mikroglia számára a fertőzött vagy sérült sejtek felismeréséhez és a fagocitózishoz *in vitro*.

4.5. A mikroglia a vírusfertőzött neuronokhoz való toborzódását és fagocitózist a P2Y12 receptorán keresztül szabályozza

A fertőzött neuronokból felszabaduló nukleotidok következtében toborzódó mikroglialis viselkedést *in vivo* is vizsgáltam. Megfigyeltem, hogy a fertőzött neuronok köré toborzódó mikroglia sejtek mind expresszálják a P2Y12 receptort, C57BL6 és Cx3Cr1^{+GFP} egerekben is. STORM szuperrezolúciós mikroszkóp technika lehetővé tette, hogy megvizsgáljuk a mikroglialis P2Y12 receptorok viselkedését. Méréseimben kimutattam, hogy ezeknek a receptoroknak a száma kétszeresére nőtt, azokon a területeken ahol a mikroglia közvetlen kapcsolatot létesített a fertőzött neuronnal, valamint ún. clustereket alkot azokon a területeken ahol a mikroglia közvetlen membrán-membrán kapcsolatot létesít a fertőzött neuronnal. Azokon a membrán felületeken ahol a mikroglia nem kerül direkt kapcsolatba a fertőzött neuronnal nem emelkedett a P2Y12 receptorok száma és cluster képződést sem figyeltünk meg. Ezekből az eredményekből tudjuk, hogy a mikroglia P2Y12 klasztereződése kontakt specifikus, és szerves részét képezheti a mikroglia monitorozó, információgyűjtő viselkedésének.

További kísérleteinkben a purinerg jelátvitel szerepét vizsgáltuk az antivirális immunitásban *in vivo*. Ehhez P2X7 és P2Y12 receptor knock out egerekbe injektáltam Bartha-DupGreen PRV variánst. Megfigyeltem, hogy azokban az egerekben, amelyekben nem fejeződött ki a P2Y12 receptor, a toborzódott mikroglia száma 50%-al csökkent a fertőzött sejtek körül a PVN régióban. A P2X7 deficiens egerekben nem volt kimutatható szignifikáns eltérés a toborzódás mértékében. A fertőzött, PRV-pozitív neuronok száma háromszorosára emelkedett, hasonlóan a mikroglia depletált állatokban tapasztaltakhoz, a PVN régióban a vad típusú és a P2X7^{-/-} csoportokhoz képest. Megfigyeltem, hogy a PRV-pozitív neuronok körül P2Y12^{-/-} mikroglia csoportosult, de fagocitotikus aktivitást nem mutatott. Ez arra enged következtetni, hogy a P2Y12 receptor hiánya nem blokkolja teljesen a mikroglia migrációját és motilitását, de a fagocitózist meggátolja. Ellentétben a mikroglia depletált, fertőzött állatokkal, a P2Y12^{-/-} állatokban nem figyeltünk meg semmilyen neuropatológias tünetet, amely arra utal, hogy a mikroglia depléciója idézheti elő ezeket a tüneteket, függetlenül a P2Y12 receptortól.

Annak érdekében, hogy a P2Y12 receptor szerepét a vírusfertőzés terjedésében és a neuropatológias tünetek kialakulásában szerepet játszó mechanizmusokat jobban megértsük, egy komplex kísérletben együtt vizsgáltunk vad típusú, mikroglia depletált és P2Y12^{-/-} vírusfertőzött állatokat. Vizsgálataimban összehasonlítotam az extracelluláris vírusfehérjék mennyiségét az alábbi kísérleti csoportokban. Eredményeim megmutatják, hogy az extracelluláris vírusfehérjék mennyisége szignifikánsan megnőtt a mikroglia depletált és P2Y12^{-/-} állatokban. A mikroglia fagocitotikus aktivitását a CD68 fagoszóma marker segítségével hasonlítottam össze a vad típusú és P2Y12 deficiens állatokban. Méréseimből kiderül, hogy a P2Y12^{-/-} mikroglia alig tartalmaz CD68 pozitív fagoszómát a vad típusú sejtekhez képest.

4.6. A vírusfertőzés hatására infiltrálódó leukocitákat a mikroglia toborozza az agyba, függetlenül a P2Y12 jelátviteltől

Kutatásomat a fertőzés során az agyszövetbe infiltrálódó perifériás immunsejtekre is kiterjesztettem. Megvizsgáltam, hogy a leukociták toborzódását befolyásolja-e a mikroglia és a folyamat P2Y12 receptor függő-e. Az agyi parenchimába toborzódott perifériás immunsejteket a magas CD45 expressziójuk és mikrogliait pedig a mikroglia/makrofág specifikus Iba1 és mikroglia specifikus P2Y12 markerekkel jelöltem. Immunfluoreszcens és flow citometriás (FACS) mérésekkel megmutattam, hogy vad típusú és P2Y12 knock out vírusfertőzött agyban a leukocita infiltráció azonos mértékű volt. Ebből arra következtettünk, hogy habár a P2Y12 által szabályozott mechanizmusok hatással vannak a fertőzés terjedésére, a leukocita toborzódást nem befolyásolják vírusfertőzött agyban.

Immunfluoreszcens méréseinket elvégeztem mikroglia depletált és kontroll fertőzött egerken is, és azt tapasztaltam, hogy a leukocita infiltráció a mikroglia depletált állatokban a szignifikánsan nagyobb mennyiségű fertőzött neuron szám ellenére is minimális volt. Ezt a megfigyelésemet vizsgáltam tovább FACS módszer segítségével, amely kimutatta, hogy az összes toborzódott CD45 pozitív sejtpopulációból a CD45^{high}, Cx3Cr1+, CD11b+, Ly6C^{high} monocita populáció nem került be az agyszövetbe mikroglia depletált, fertőzött állatokban. További méréseimből kiderítettem, hogy a depletált csoportban a nagyobb mértékű vírusfertőzés hatására a periférián a granulocita válasz nagyobb volt a kontroll csoporthoz képest, ami arra enged következtetni, hogy a gyulladásra képesek az immunsejtek reagálni, de az agyi parenchimában nem tudnak toborzódni a mikroglia hiánya miatt. További kísérletekben ennek a jelenségnek a hátterét próbáltam feltérképezni. Ezért alkalmaztam az Intracellular Adhesion Molecule 1 (ICAM) vaszkuláris aktivációt jelző markert, amely az aktivált erek endotéliumát jelöli gyulladás hatására, valamint IgG festést a vér-agy gát sérülés mértékének megállapítására. Meglepő módon nem találtam szignifikáns eltérést a kontroll és mikroglia depletált állatok vaszkuláris aktivációjában, sem pedig vér-agy gát sérülése között.

4.7. A P2Y12 pozitív mikroglia toborzódása és a leukociták infiltrációja megfigyelhető humán herpes simplex vírus fertőzött agyszövetben is

A mikroglia toborzódását és gyulladás következtében kialakuló aktivált állapotait a humán agyban is vizsgáltuk, Herpes simplex 1-es típusú (HSV-1) encefalitiszes mintákon. Hasonló módon a PRV-vel fertőzött eger agyhoz, a humán HSV-1 és HSV-2 pozitív neuronok körül is megfigyeltük a P2Y12 pozitív mikroglia sejtek toborzódását. Ezt egy másik mikroglia specifikus marker, a Tmem119 jelöléssel is bizonyítottuk. Eredményeink azt is megmutatták, hogy a fertőzött neuronok köré átlagosan 1-3 mikroglia (átlagosan 1.5 mikroglia/HSV1+ sejt) toborzódik. CD68 fagoszóma jelöléssel megállapítottuk, hogy a toborzódott sejtek aktív fagocitózist folytatnak a fertőzött területeken. A mikroglia a humán mintákban is negatív eredményt adott HSV antigénre, tehát kijelenthetjük, hogy a

humán mikroglia sem fertőződik a HSV által. CD45 immunhisztokémiával és Giemsa festéssel azonosítottuk a toborzódott perifériás immunsejteket a HSV-1-pozitív neuronok körül. Az infiltrálódott leukocitákat és a toborzódott mikrogliait a Tmem119 és P2Y12 mikroglia specifikus markerek segítségével különítettük el. Érdekes módon, erős korrelációt figyeltünk meg a toborzódott leukociták száma és a HSV-1 fertőzött neuronok száma között.

Méréseinkben megállapítottuk, hogy a mérsékelt HSV-1 fertőzés (kevesebb, mint 50 HSV-1 pozitív sejt/mm²) leginkább a mikroglia aktiválódását okozta. Ezeken a területeken megfigyeltünk nyugalmi vagy amoeboid morfológiájú CD68-pozitív sejteket egyaránt. Előrehaladott állapotú HSV-1 fertőzés esetén (50-500 HSV-1 pozitív sejt/mm²) számos CD45-pozitív sejtet számoltunk a fertőzött területeken, amelyek mellett jelentős mennyiségben voltak CD68-pozitív makrofág sejtek is (mikroglia és véreredetű sejtek egyaránt). Ezt alátámasztja az a megfigyelésünk is, amely szerint a teljes P2Y12 vagy Tmem119 pozitív sejtek száma lecsökkent.

5. Diskusszió

A neurotróp vírusherpeszések súlyos problémákat okoznak világszerte. A neurotróp vírusok képesek évekig lappangó, látens fertőzést kialakítani, valamint olyan súlyos betegségeket okozni, mint az agyvelőgyulladás. Emellett hozzájárulnak különböző krónikus neurodegeneratív betegségek kialakulásához.

A gyulladáshoz vezető folyamatok következtében aktiválódó mikroglia és az agyi parenchimába toborzódott perifériás immunsejtek által kiváltott anti- és proinflammatorikus immun mechanizmusok gyakran visszafordíthatatlanul károsíthatják a központi idegrendszert, ezzel gyakran hozzájárulva a súlyos, hosszantartó neurodegenerációhoz vagy akár a beteg halálához. Korábbi kutatások megmutatták, hogy a mikroglia az elsők között reagál bármilyen, a központi idegrendszert érő ártalmas hatásra, és szerepe felmerült az antivirális immunitás folyamataiban is. Ennek ellenére, azok a sejtszintű mechanizmusok amelyekkel a neurotróp vírusherpeszést az agy immunkompetens sejtjei érzékelik feltáratlanok maradtak. Ezért doktori értekezésem fő témája a központi idegrendszer (mikroglia) és a perifériás (toborzódó leukociták) immunsejtek reakciójának tanulmányozása volt egy neurotróp vírusherpeszést modellben. Fő célom azoknak a mikroglialis mechanizmusoknak a felderítése volt, amelyek segítségével a mikroglia sejtek képesek a vírusherpeszött neuronokat felismerni és izolálni környezetüktől.

Ebből a célból vizsgálataimhoz egy genetikailag módosított neurotróp herpeszvírus törzset és egy jól beállított fertőzés modellt alkalmaztam. A kísérleteimhez használt PRV-Bartha törzs sajátossága, hogy ez a vírus variáns attenuált, valamint kizárólag retrográd, transzsinaptikus módon terjed. Modellem nagy előnye, hogy a vírus beadása nem igényel semmilyen *in situ* agyi manipulációt, így kizárólag a mikroglia fertőzéséből eredő gyulladásra adott válaszait tudom vizsgálni. A vírus genomjába inzertált immediate early GFP markernek köszönhetően, a vírusherpeszést különböző fázisait a mikroglia

toborzódásával párhuzamosan tudjuk követni. A modell segítségével demonstrálni tudtam, hogy a mikroglia a fertőzött neuronok köré pár órán belül odatoborzódik és a fertőzést még a korai stádiumban érzékeli, amikor az érintett neuronok sejtmembránja még ép.

Neurotróp vírusfertőzés modellünk szelektív mikroglia depléciós módszerrel és specifikus P2Y12 receptor knock out állatok felhasználásával kombinálva lehetővé tette, hogy a mikroglia és a purinerg jelátvitel szerepét tanulmányozzam. *In vivo* és *in vitro* mérésekből származó eredményeim megmutatják, hogy a mikroglia toborzódásához a fertőzött neuronok körül, valamint azok eliminálásához mindenképpen szükséges a mikroglialis P2Y12 receptor. Eredményeim azt is megmutatják, hogy specifikus CSF1R blokkolással elért szelektív mikroglia depléció hatására a vírusfertőzés mértéke szignifikánsan megnő, az extracelluláris térbe kerülő víruspartikulumok mennyiségének növekedésével együtt. Ez a folyamat viszont a P2Y12 receptor jelenlététől teljesen függetlenül megy végbe. Ezt a felfedezésünket alátámasztják ugyanezt a mikroglia depléciós módszert, de más vírustörzseket (egér hepatitisz vírust, West-Nile vírust) alkalmazó kutatások is, amelyekben a mikroglia depléció hatására megnőtt a vírusfertőzés és ezzel a mortalitás mértéke is. Viszont ezekkel a kutatásokkal ellentétben, a mikroglia hiányában a vírusfertőzött állataink különböző neuropatológias tüneteket mutattak. A mikroglia hiányában a vírus nem szinaptikus úton is képes volt fertőzést kialakítani, ezúton jelentős fertőzést okozni a magasabb agyi kortikális területeken is. Ebből arra következtettem, hogy a fertőzött neuronok mikroglia általi eliminálása esszenciális a vírusfertőzés kontrollálásában, valamint a nem szinaptikus kontakt útján történő fertőzés kialakulásának gátlásában. Megfigyeltem, hogy amíg a mikroglia depletált állatokban a fertőzött neuronok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a P2Y12 deficiens állatokban, az extracelluláris vírusfehérjék mennyisége nem különbözött a két csoportban. Ebből arra következtettem, hogy a mikroglialis P2Y12 receptor jelenléte feltétlenül szükséges a sikeres fagocitózis végrehajtásához.

Kutatásom egyik új felfedezéseként azonosítottam a mikroglia, mint a monocita toborzás fő szabályozóját vírusfertőzött agyban. Ezt igazoltam vírusfertőzött, mikroglia depletált állatokban, ahol megfigyeltem, hogy mikroglia hiányában nem történik meg a monociták infiltrációja az agyi parenchímába vírusfertőzés hatására. Az általunk alkalmazott mikroglia depléciós modellről bebizonyítottuk, hogy a depléció nincs érdemi hatással a perifériás immunsejt populációkra. Ezekből az eredményeimből kiindulva leukocita infiltrációt megvizsgáltam P2Y12 receptor knock out, vírusfertőzött állatokban is, de ott a kontroll csoporttal azonos mértékű monocita toborzódást figyeltem meg. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy más mikroglialis kemotaktikus faktorok, mint az MCP-1 vagy RANTES szabályozhatják a leukocita toborzódást az agyba, függetlenül a mikroglialis P2Y12 receptortól.

Mivel eredményeim arra utalnak, hogy a mikroglia aktív résztvevője a monocita toborzódásnak neurotróp vírusfertőzés modellünkben, megvizsgáltam, hogy a mikroglia befolyásolhatja-e a vér-agy gát integritását. A mikroglia depletált és kontroll vírusfertőzött csoportokból mért citokin méréseim számos anti- és pro-inflammatórikus citokin szintjének szignifikáns csökkenését mutatta ki, ami a vér-

agy gát sérülésére enged következtetni. Vizsgálataimat megerősítettem, IgG fehérje immunhisztokémiával, és az intracellular adhesion molecule1 (ICAM) immunfluoreszcens jelölésével is. Eredményeim megmutatták, hogy a mikroglia hiánya nem befolyásolja a vér-agy gát sérülésének mértékét a kontroll, fertőzött csoporthoz képest. Habár ebben a modellben a mikroglia hiánya nem befolyásolja a vér-agy gát sérülést, a leukocita infiltrációt szabályozhatja olyan faktorokon keresztül, amelyek megváltoztathatják az endotéliális barrier integritását.

Kutatásom részeként, a mikroglia viselkedését humán HSV-1 fertőzött post mortem agyban is megvizsgáltam, ahol hasonlóan az egérben tapasztaltakhoz, megfigyeltem a P2Y12 pozitív mikroglia toborzódását és barrier képzését a HSV-1 pozitív neuronok körül. A leukociták infiltrációja a humán agyszövetben is megfigyelhető, valamint a toborzódott immunsejtek száma jól korrelálható a fertőzés súlyosságával. Eddigi eredményeim alapján kijelenthető, hogy a mikroglia P2Y12 receptorán keresztül képes a neurotróp vírusfertőzést szabályozni, mind egér, mind pedig humán agyban. Ebből arra következtettünk, hogy a mikroglialis P2Y12 receptor az antivirális immunitás egy esszenciális faktora a központi idegrendszerben.

Több, új kutatás is egyre meggyőzőbb bizonyítékkal támasztja alá, hogy a neurotróp vírusok, mint a HSV-1 gyakori, krónikus neurodegenerációs betegségek kialakulásához is hozzájárulnak, mint az Alzheimer kór. Kutatási eredményeim ezért fontosak lehetnek mikroglialis viselkedés jobb megértéséhez, és hozzájárulhatnak új terápiás eljárások kifejlesztéséhez is a különböző neurodegeneratív megbetegedések gyógyítására.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezéshez felhasznált publikációk

1. **Fekete R**, Cserép C, Lénárt N, Tóth K, Orsolits B, Martinecz B, Méhes E, Szabó B, Németh V, Gönci B, Sperlág B, Boldogkői Z, Kittel Á, Baranyi M, Ferenczi S, Kovács K, Szalay G, Rózsa B, Webb C, Kovacs GG, Hortobágyi T, West BL, Környei Z, Dénes Á (2018) *Microglia control the spread of neurotropic virus infection via P2Y12 signalling and recruit monocytes through P2Y12-independent mechanisms*. **Acta Neuropathologica** 136(3):461-482. doi: 10.1007/s00401-018-1885-0.
2. Szalay G, Martinecz B, Lénárt N, Környei Z, Orsolits B, Judák L, Császár E, **Fekete R**, West BL, Katona G, Rózsa B, Dénes Á (2016) *Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke*. **Nature Communications** 7:11499. doi: 10.1038/ncomms11499.

6.2. Egyéb publikációk

1. Singel KL, Grzankowski KS, Khan ANMNH, Grimm MJ, D'Auria AC, Morrell K, Eng KH, Hylander B, Mayor PC, Emmons TR, Lénárt N, **Fekete R**, Környei Z, Muthukrishnan U, Gilthorpe JD, Urban CF, Itagaki K, Hauser CJ, Leifer C, Moysich KB, Odunsi K, Dénes Á, Segal BH (2019) *Mitochondrial DNA in the tumour microenvironment activates neutrophils and is associated with worse outcomes in patients with advanced epithelial ovarian cancer*. **Br J Cancer** 120(2):207-217. doi: 10.1038/s41416-018-0339-8
2. Nagy AM, **Fekete R**, Horvath G, Koncsos G, Kriston C, Sebestyén A, Giricz Z, Környei Z, Madarász E, Tretter L (2018) *Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions*. **Biochim Biophys Acta Bioenerg.** 1859(3):201-214. doi:10.1016/j.bbabi.2017.12.002.
3. Hegyi B, Környei Z, Ferenczi S, **Fekete R**, Kudlik G, Kovács KJ, Madarász E, Uher F (2014) *Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. **Stem Cells Dev.** 23(21):2600-12. doi: 10.1089/scd.2014.0088.