

A mikroglia-neuron interakciók molekuláris anatómiája

Doktori tézisek

Máté-Schwarcz Dóra Anett

Semmelweis University Doctoral School
János Szentágothai Neurosciences Division



Témavezetők: Dr. Cserép Csaba, Ph.D
Dr. Dénes Ádám, D.Sc

Hivatalos bírálók:

Dr. Tóth Zsuzsanna, D.Sc
Dr. Tóth Kinga Ph.D

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, D.Sc
Tagok: Dr. Dobolyi Árpád, Ph.D
Dr. Hrabovszky Erik, Ph.D

Budapest
2025

1. Bevezetés

Az emberi agy, amely körülbelül 86 milliárd neuronból és hasonló számú nem-neuronális sejtéből épül fel, a természet egyik legösszetettebb rendszere. Bár a neurológia tudományterülete az elmúlt évtizedekben jelentős fejlődésen ment keresztül, a neurológiai betegségek továbbra is súlyos orvosi és társadalmi kihívást jelentenek. A legújabb kutatások arra engednek következtetni, hogy az agyműködés és patológiás folyamatainak megértéséhez nem elegendő kizárólag a neuronokra összpontosítani. A gliasejtek, különösen a mikroglia, alapvető szerepet játszanak az idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, így egyre inkább előtérbe kerülnek mint potenciális terápiás célpontok. A központi idegrendszer rezidens immunsejtjeként a mikroglia a fejlődéstől az öregedésig folyamatosan alakítja és szabályozza az idegsejtek, gliasejtek és az érrendszer fejlődését, biztosítja a központi idegrendszer homeosztázisát és kulcsszerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban, valamint az agyi integritás és a sejt egészséges működésének fenntartásában. Sokoldalú funkciójának köszönhetően a mikroglia központi szerepet tölt be a neurodegeneratív betegségek kialakulásában és lehetséges terápiás megközelítéseiben is.

A mikroglia sejtek rendkívül dinamikus nyúlványaikkal folyamatosan pásztázzák az agyi parenchimat, állandó kapcsolatot tartva a neuronokkal, asztrocitákkal, oligodendrocitákkal és a neurovaszkuláris egység minden elemével. Közvetlen membránkapcsolataikon keresztül célzottan és kompartment-specifikusan képesek szabályozni a sejtek működését: az oligodendrocitákkal együttműködve irányítják a mielinizációt, az asztrocitákkal közösen részt vesznek a sejttermékek eltávolításában és a szinaptikus kapcsolatok finomhangolásában, míg az érrendszeri elemekkel fenntartják a vér-agy gát integritását és szabályozzák az agyi véráramlást. Mindazonáltal ezeknek a kapcsolatoknak a szerkezeti és funkcionális sajátosságai még mindig hiányosan feltártak az irodalomban. Az öregedéssel azonban, akár csak a szervezet más sejtjei, a mikroglia is fokozatosan kimerül, és funkcionális hatékonysága csökken. Többek között gyengül a proliferációs, fagocitotikus képességük, morfológiai változásokon mennek keresztül, és nyúlványaik mozgékonyága mérséklődik. A környezetük folyamatos monitorozása lelassul, ami gyengébb válaszkészséget eredményez a károsodásokkal és gyulladásos folyamatokkal szemben.

Bár az idegsejtek és a mikroglia sejtek kapcsolatait illetően az eddigi kutatások főként a szinaptikus kapcsolatokra fókuszáltak, azonban nehezen elképzelhető, hogy a mikroglia az idegsejtek állapotát alapvetően befolyásoló szabályozási feladatait képes volna kizárólag a távoli szinapszisokon keresztül ellátni. A közelmúltban kutatócsoportunkkal azonosítottuk egy különösen specializált és gyakori kapcsolattípust a mikroglia nyúlványa és az idegsejtek irányító központja a sejttestje között a felnőtt egér és humán agyszövetben, amelyet szomatikus purinergikus kapcsolatnak nevezünk. Ezek

a kapcsolatok nagyon specifikus szerkezeti jellemzőkkel rendelkeznek többek között azonosítottuk, a sejtsor meghatározásában kritikus fontosságú neuronális mitokondriumok felhalmozódását, az ATP vezikulumokba szállításáért felelős vezikuláris nukleotid szállítások jelenlétét és az egzocitotikus felszín biztosításában szerepet játszó Kv2.1 fehérjék csoportosulását. Mikroglialis oldalról az ATP/ADP érzékelésében szerepet játszó purinerg mikroglia specifikus P2Y₁₂R felhalmozódását figyeltük meg. Továbbá az elektronmikroszkópos felvételeink igazolták e kapcsolat rendkívül összetett ultrastruktúráját, amelyet a különféle membránstruktúrák és vezikulumok gazdag jelenléte jellemez. A szomatikus kapcsolatok lehetővé teszik, hogy a mikroglia folyamatosan monitorozza a neuronok állapotát, szabályozza aktivitásukat és szükség esetén neuroprotektív hatás kifejtésére is képesek P2Y₁₂ receptor közvetítette útvonalon keresztül (Cserép és Pósfai et al., 2020).

A felnőtt agyszövetben azonosítottunk egy mikroglia–idegsejt kapcsolódási forráspontot, amely lehetőséget teremthet a mikroglia célzott szabályozási mechanizmusaira. Mivel a mikroglia az agyműködés kulcsszereplője a fejlődéstől az öregedésig, e szomatikus kapcsolatok jelentősége ezekben az állapotokban még ismeretlen. Részletesebb feltárásuk hozzájárulhat a neurodegeneratív betegségek molekuláris mechanizmusainak jobb megértéséhez.

2. Célkitűzések

Fejlődésben

1. Rendelkeznek-e közvetlen mikroglialis szomatikus membrán kapcsolattal a fejlődő idegsejtek, mind a fejlődés, mind a felnőttkori neurogenesis során?
2. Az érett neuronok szomatikus kapcsolataiban korábban azonosított specifikus ultrastrukturális és celluláris komponensek megtalálhatók-e az éretlen neuronokban is?
3. Mi lehet a szomatikus kapcsolatok szerepe a fejlődés során fiziológias körülmények között?

Öregedés során:

4. Változik-e a sejtek eloszlása?
5. Milyen típusú és gyakoriságú kapcsolatok vannak a mikroglia és más agysejtek között a felnőtt agykéregben, és hogyan változnak meg az öregedés során?
6. Változnak-e a szomatikus kapcsolatok?
7. Van-e funkcionális változás a kétirányú mikroglia-neuron kommunikációban?

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 *Post mortem humán minták*

A humán agyszöveten végzett kísérleteinkhez a mintát középkorú (55-60 éves), illetve idős (79-86 éves), ismert neurológiai betegséggel nem rendelkező és agyi elváltozáshoz nem köthető okból elhunyt páciensből vételeztük, a HUN-REN KOKI Humán Agyszövet Laboratórium munkatársainak segítségével. A kutatáshoz szükséges etikai engedélyeket az ETT-TUKEB biztosította (62031/2015/EKU, 34/2016 és 31443/2011/EKU [518/PI/11]). A szövetminták kutatási célú felhasználása, valamint az orvosi adatokhoz való hozzáférés kizárólag tájékozott beleegyezés alapján történt, miközben a vizsgálat teljes időtartama alatt a betegek személyazonossága anonim maradt. A szövetminták kezelése, tárolása és felhasználása a Helsinki Nyilatkozat előírásainak megfelelően zajlott. Az elhunyt betegek agyát a halál beállta után 3–5 órával távolítottuk el. Ezt követően a vertebralis és a belső carotis artériák kanülálását végeztük el, majd az agyszöveteket heparint tartalmazó fiziológias sóoldattal perfundáltuk (kb. 1,5 liter oldat 30 perc alatt). A perfúziót ezt követően 4% paraformaldehidet, 0,05% glutaraldehidet és 0,2% pikrinsavat tartalmazó fixáló oldattal folytattuk (4–5 liter oldat 1,5–2 óra alatt). A perfúzió után a kérgi és hippokampusz régiókat tartalmazó szövetmetszeteket további egy napig glutaraldehidmentes fixáló oldatban tároltuk, majd vibratóm (VT1200S, Leica Biosystems) segítségével 50 μ m vastagságú metszeteket készítettünk.

3.3 *Állatok*

Minden kísérlet során hím C57Bl/6J egereket használtunk, az adott kísérlethez megfelelő életkori csoportból (RRID: IMSR_JAX:000664). A fejlődési vizsgálatokhoz az embriók 15. fejlődési napján (E15), valamint 1 (P1), 8 (P8) és 15 (P15) napos fiatal egereket, továbbá 90 napos (P90) felnőtt állatokat vizsgáltunk. Az öregedéssel kapcsolatos kísérletekhez 90 napos és 600 napos egereket alkalmaztunk. Kísérletet végeztünk P1 és P8 korú CX3CR1^{+/GFP} (IMSR_JAX:005582), P8 korú P2Y12^{-/-} (325) és CX3CR1^{GFP/GFP} hím egereken. Az in vivo vizsgálatok során hím CX3CR1^{+/tdTomato}//Thy1^{+/gcamp6^{+/GFP}} egereket tanulmányoztunk 50–60 napos kortól egészen 650–750 napos korig. Az in vivo mitokondriális mérésekhez CX3CR1^{+/GFP} egereket használtunk. Az állatok az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (IEM, Budapest, Magyarország) SPF

állatházában nevelkedtek. Az egerek szabadon hozzáférhettek táplálékhoz és vízhez, valamint fény-, páratartalom- és hőmérséklet-szabályozott környezetben voltak tartva.

3.4 *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 mólós 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.

3.5 *Immunfluoreszcens jelölés és konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM)*

Az immunfluoreszcens festést megelőzően az 50 μm vastagságú metszeteket foszfátpufferben (PB) és Tris-pufferes sóoldatban (TBS) mostuk. A Ctip2 és Satb2 festések esetében ezt követően citrát pufferes kezelést alkalmaztunk (10 mM nátrium-citrát, pH 6,0, 90 °C-on 45 percig). Az alapos mosást egy 1 órás blokkolás követte 1% humán szérumalbuminban (HSA; Sigma-Aldrich), amely 0,03–0,1% Triton X-100-at és 100 $\mu\text{g/mL}$ digitonint (D141-100MG, Sigma) tartalmazott, mindez TBS-ben oldva. A Ctip2 és Satb2 minták esetében Triton X-100 és digitonin nem került a blokkoló oldatba. A blokkolást követően a metszeteket elsődleges antitesteket tartalmazó keverékben inkubáltuk szobahőmérsékleten, egy éjszakán át. Az inkubáció után a metszeteket TBS-ben mostuk, majd másodlagos antitesteket tartalmazó oldatban további egy éjszakán át, 4 °C-on inkubáltuk. A TBS- és PB-mosásokat követően, ha a sejtmagok festésére is szükség volt, a mintákat DAPI-val (Sigma-Aldrich) kezeltük PB-ben oldva, majd PB-mosás után Aqua-Poly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) fedőoldattal fedtük le. Amennyiben elérhető volt, KO-validált antitesteket használtunk olyan antigének esetén, mint például P2Y12R, Kv2.1, CNP1 és IBA1. A sejthalált TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) eljárással detektáltuk az Apoptag Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Cat. nr. S7100) gyártói protokolljának megfelelően. A CLSM-képalkotást követően a metszetek elemzését a Fiji szoftver Analyze Particles bővítményével végeztük el.

3.6 *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-tDTomato vektorból kb. 1 μl -nyit (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -es oldatból) endotoxin-mentes vízben feloldottunk, és Fast Green festékanyagot (1:10000) adtunk hozzá. Az így kapott

oldatot üvegkapilláris segítségével az embrionális oldalkamrákba juttattuk. A sebet az izomfalak és a bőr öltésével zártuk, majd az embriók természetes úton jöttek világra.

3.7 Kraniális ablak műtét

Az egereket ehhez a beavatkozáshoz fentanyllal (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 koponyaacsont egy részének eltávolítása után köralakú, üveg fedőlemezt helyeztünk a dura mater felszínére, majd Vetbond (3M) szövetragasztóval rögzítettük. Ezután egy egyedi, fémből készült befogót (Femtonics Ltd.) erősítettünk az üveglemez köré.

3.8 Slide scanner mikroszkópos vizsgálat

A sejtszámláláshoz Panoramic MIDI II/2 tárgylemez-szkennert (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) használtunk, amely Zeiss Plan-Apochromat 20 $\times$ objektívvel (NA: 0.8), Lumencor SPECTRA X fényforrással (LED megvilágítás) és PCO.edge 4.2 back-illuminated sCMOS kamerával volt felszerelve. A következő szűrőket alkalmaztuk: DAPI-1160B, TRITC-Q, FITC-2024B, LF635-C, Cy3.5. A letapogatás z-stack módban történt, 2 μ m-es lépésközzel, a pixelméret 6,5 μ m $\times$ 6,5 μ m volt. Az így kapott képeket a SlideViewer szoftver 2.5-ös verziójával elemeztük.

3.9 A sejtszámeloszlás kvantitatív elemzése

A sejtszámláláshoz tárgylemez-szkennelő mikroszkópos felvételeket készítettünk teljes metszetekről, amelyeken C57Bl/6J P90 és P600 napos egerek, valamint humán minták szerepeltek. Az agykéreg teljes vastagságában egységes méretű ROI-kat (125 $\times$ 125 μ m) osztottunk el egyenletesen a kérgi területeken. A ROI-on belül található összes sejttestet megszámoltuk a sztereológiai mérések optikai diszektor módszerének megfelelően.

3.10 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) imaging

Mintáink konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos vizsgálatát egy Nikon Eclipse Ti-E fordított mikroszkóp (Nikon Instruments Europe B.V.) segítségével vizsgáltuk, melyhez AIR 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.

3.11 A mikroglia markerok kolokalizációs mérése

A mikroglia markerek kolokalizációs mérésehez hármass immunfluoreszcens jelölést végeztünk (IBA1-Gp, IBA1-Gt és P2Y12R). A CLSM felvételeket az E15 egerek VZ/SVZ régiójából, a P1–P15 egerek neokortexéből, valamint a P90 egerek gyrus dentatusából készítettük. Az elemzés során véletlenszerűen választottunk ki sejteket, amelyek DAPI-val jelölt sejtmagot tartalmaztak az IBA1-Gp csatornában. Ezt követően

az egyes életkori csoportokban mértük a kolokalizációt a másik két mikroglia markerrel (IBA1-Gt, P2Y12R).

3.12 TOM20 fluoreszcenciaintenzitás mérése

A TOM20 fluoreszcenciaintenzitás-profilt félig automatizált módszerrel elemeztük. Ehhez hármas immunfluoreszcens jelöléssel készült konfokális képeket használtunk, amelyek a mikroglia, DCX és TOM20 fehérjéket jelölték. Az elemzés során a neuron legnagyobb keresztmetszetét tartalmazó metszetet választottuk ki, ahol a sejtmembránt a DCX-jelölés alapján követtük nyomon. Ezután a meghatározott kontúrt 0,5 μm -rel kifelé és befelé kiterjesztettük, így hoztunk létre egy extracelluláris és egy intracelluláris vonalat. A fluoreszcens jelölések intenzitását ezek mentén elemeztük. A normalizálás és skálázás után mikroglia-kontaktnak azokat a területeket azonosítottuk, ahol a mikroglia fluoreszcenciaintenzitása meghaladta a teljes intenzitás 20%-át legalább 500 nm-es szakaszon. Ezt követően a kontaktzónát 500-500 nm-rel kiterjesztettük mindkét irányban, és a TOM20 fluoreszcenciaintenzitását ezen a területen mértük, amelyet „kontakt” értéként definiáltunk.

3.13 A DCX-pozitív sejtek denzitásának mérése

A DCX-pozitív sejtestek denzitását a fejlődő kéregben különböző genotípusok esetén P8 korban mértük. A kérgi rétegek pontos meghatározásához Ctip2 és Satb2 immunfluoreszcens festést alkalmaztunk, majd a DCX+ fejlődő neuronok sűrűségét a 6., 4/5. és 2/3. rétegekben elemeztük. A DCX+ sejtek számlálását az optikai diszektor sztereológiai módszerrel végeztük, amely torzításmentes megközelítést biztosít a teljes sejtszám meghatározására. A vizsgálat során 50 μm vastagságú kérgi metszetről CLSM (konfokális lézer pásztázó mikroszkópos) képalkotást alkalmaztunk, amely háromdimenziós z-stack optikai felvételt eredményezett. A sztereológiai elveknek megfelelően a sejtszámlálást 50 $\times$ 50 μm -es érdeklődési régiókban (ROI) végeztük, amelyeket NIS-Elements szoftverrel helyeztünk el szisztematikusan a mintán belül. A sejtek számlálását 3D-ben végeztük, biztosítva az objektív és pontos elemzést.

3.14 A Kv2.1-pozitív sejtek denzitásának mérése

A Kv2.1-pozitív neuronális sejtestek denzitásának méréséhez különböző genotípusú felnőtt egerek kérgi régióiban Kv2.1 immunfluoreszcens festés alkalmaztunk, DAPI jelöléssel kombinálva a kérgi rétegek pontos meghatározására (a 327. hivatkozás szerint). A neuronok denzitását az 1., 2/3., 4., 5. és 6. rétegekben vizsgáltuk. A neuronális sejtestek számlálását az optikai diszektor módszerrel végeztük 50 μm vastagságú CLSM z-stack felvételekben. A sejtszámolást NIS-Elements szoftverrel, valamint 50 $\times$ 50 μm -es számlálási keretekkel hajtottuk végre a pontos és objektív kvantifikáció érdekében.

3.15 Annexin-V- és Ki67-pozitív sejtek mérése

A P1 kérgi DCX-pozitív sejtek eloszlásának, a Ki67-pozitív sejtek denzitásának, a Ki67/DCX kolokalizációjának, valamint a mikroglia nyúlványai és Ki67-pozitív sejtek közötti kontaktok denzitásának mérésére 20 μm vastagságú kriostát-metszeteket készítettünk WT és P2Y12R $-/-$ egerek agyából. Hasonló módon elemeztük az Annexin-V-pozitív sejtek denzitását, az Annexin-V/DCX kolokalizációt, valamint a mikroglia nyúlványai és Annexin-V-pozitív sejtek közötti kontaktok sűrűségét. A kérgi szélességet 10 egyenlő részre osztottuk a kvantifikációhoz. A sejtek számlálását optikai diszektor módszerrel végeztük. Minden kísérlet során biztosítottuk, hogy a méréseket azonos rostro-kaudális pozícióban lévő metszeteken végezzük.

3.16 A szomatikus kapcsolatok előfordulásának mérése

A szomatikus kapcsolatok előfordulásának elemzéséhez kettős immunfluoreszcens jelöléssel (Kv2.1 és IBA1) készült konfokális képkötegeket készítettünk a P90 és P600 egerek neokortexéből, valamint emberi betegek Br17 kérgi területéről. Minden jelölt és azonosított sejtet megszámláltunk, amennyiben a teljes sejttest a Z-stack felvételen belül helyezkedett el. Minden egyes állat vagy beteg esetében a kérgi területekről készült képekből szisztematikusan és véletlenszerűen választottunk ki neuronokat, kizárólag a neuronális jel alapján. A kiválasztott sejttesteket mikroglia által érintettek tekintettük, ha egy mikroglia nyúlvány egyértelműen érintkezett a sejttesttel (azaz nem volt tér a neuronális szoma és a mikroglia nyúlványa között), legalább 0,5 μm hosszúságú szakaszon.

3.17 A mikroglia kapcsolódásának mérése

Két különböző immunfluoreszcens jelöléssel (mikroglia-neuron-asztroglia-sejtmag és mikroglia-oligodendroglia-sejtmag) készült konfokális Z-stack felvételeket készítettünk. A képeken véletlenszerűen kiválasztottuk azokat a mikroglia sejteket, amelyek teljes egészében a Z-stack tartományon belül helyezkedtek el. A mikroglia sejtek nyúlványait manuálisan követtük, és megjelöltük azokat a kontaktusokat, ahol a nyúlványok és sejttestek neuronokkal, asztrocitákkal, oligodendrocitákkal és vérerekkel érintkeztek. A kontaktusokat az alábbi kategóriákba soroltuk: nyúlvány-nyúlvány; nyúlvány-sejttest; sejttest-sejttest (satellite) kapcsolatok. Ezen kívül a mikroglia sejttestéhez kapcsolódó érintkezéseket is megszámláltuk.

3.18 Idegsejtek mikroglialis borítottságának mérése

A mikroglialis borítottság méréséhez olyan konfokális képsorozatokat 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 kerületét minden képsíkon

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

3.19 TOM20, VNUT és Kv2.1 marker lokalizációjának mérése

A TOM20 és VNUT marker lokalizációját konfokális Z-stack felvételek segítségével elemeztük, hármass immunfluoreszcens jelölést alkalmazva (mikroglia, neuron (Kv2.1) és TOM20 vagy VNUT). A kérgi területekről készült képekből szisztematikusan és véletlenszerűen választottuk ki a szomatikus kapcsolódásokat, kizárólag a neuronális és mikroglia jelek alapján. A kiválasztott kapcsolódásokat mikroglia által érintettnek tekintettük, ha egy mikroglia nyúlvány egyértelműen érintkezett velük (azaz nem volt tér a neuronális sejtest és a mikroglia nyúlvány között) legalább 0,5 μm hosszúságú szakaszon. A TOM20 és VNUT jelek lokalizációját a neuronális sejtest citoplazmájában, a szomatikus kapcsolódás helyétől számított 2 μm mélységben határoztuk meg. A VNUT jelölés mellett a Kv2.1 fehérjék klasztereződését is azonosítottuk a szomatikus kapcsolódás mentén.

3.19.1 Korrelált CLSM és immun-elektronmikroszkópia

Az immunhisztokémiai eljárás során a fluoreszcensen jelölt antitestek mellett biotinilált másodlagos antitestekkel is kezeltük a mintákat. A metszeteket pufferben vizsgáltuk CLSM mikroszkóppal. A vizsgálat során $20\times$ és $60\times$ nagyítású képekből térképeket készítettünk, hogy ugyanazokat a jeleneteket beazonosíthassuk az elektronmikroszkópos felvételeken. A mintákat ezt követően kisebbre trimmeltük, a könnyebb azonosítás érdekében. A szöveteket avidin–biotinilált torna peroxidáz komplexszel (Elite ABC; 1:300; Vector Laboratories) inkubáltuk 3 órán keresztül szobahőmérsékleten, vagy egy éjszakán át 4°C -on. Az IBA1-Rb vagy P2Y12R elleni immunperoxidáz reakciót 3,3-diaminobenzidinnel (DAB; Sigma-Aldrich) kromogénnel fejlesztettük ki. A metszeteket ezt követően 1% OsO_4 oldattal (0,1 M PB-ben) kezeltük szobahőmérsékleten, majd fokozatos alkoholsorozattal és acetonitrillel dehidratáltuk, végül Durcupan (ACM; Fluka) műgyantába ágyaztuk. A dehidratálás során 1% uranil-acetát oldattal (70%-os etanolban) kezeltük őket 20 percig. Az E15 VZ és P90 gyrus dentatus szövetrégiókból származó mintákat Durcupan blokkokra ragasztottuk, majd 70 nm vastag metszeteket vágunk ultramicrotóm segítségével (Leica EM UC7), és Formvar-bevonatú egyhelyes rácsoakra helyeztük. Az ultravékony metszeteket Hitachi 7100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, amely Veleta CCD kamerával (Olympus Soft Imaging Solutions, Németország) volt felszerelve. A konfokális képeken véletlenszerűen kiválasztott szomatikus kapcsolódásokat elektronmikroszkópos képeken azonosítottuk, hogy ellenőrizzük a közvetlen membrán-membrán érintkezések gyakoriságát. Az elemzésekhez Adobe Photoshop CS6 és Fiji szoftvereket használtunk. Összesen 10 szomatikus kapcsolatot azonosítottunk egy felnőtt állatban, valamint 7 szomatikus kapcsolatot egy E15 fejlődési stádiumú állatban.

3.19.2 *Ex vivo kétfoton képalkotás akut agyszeleteken*

Akut agyszeleteket készítettünk P1 és P8 CX3CR1+/GFP egerekből. Az állatokat jégre helyeztük (5–6 perc), eltávolítottuk a feji régiót, majd agyukat gyorsan jéghideg, karbogénnel (95% O₂–5% CO₂) telített mesterséges agy-gerincvelői folyadékba (ACSF) helyeztük. A 300 µm vastag koronális metszeteket Leica VT1200S vibratóm segítségével vágtuk. A szeleteket 40 mM Cal-590-AM festékkel (ACSF-ben oldva) töltöttük meg 60–90 percen át, szobahőmérsékleten, miközben a festékkoldatot folyamatosan oxigenizáltuk. A Calbryte 590-AM fluoreszcens kalciumindikátort választottuk a magas fényessége, jó jel-zaj aránya és citoplazmatikus eloszlása miatt. A többfotonos képalkotást Nikon Eclipse FN1 mikroszkópon végeztük Chameleon Vision II Ti:Sapphire lézerrel (680–1080 nm) és 25X vízbe meríthető objektívvel (NA: 1.1, WD = 2 mm). Az ingerlési hullámhossz 980 nm volt a GFP (920 nm) és Calbryte-590 (1050 nm) egyidejű detektálására. Az emissziós fényt 593 nm-nél szétválasztottuk, majd két detektorral rögzítettük (GFP: 550/88 nm; Cal-590 AM: 641/75 nm). A Z-stack képeket (2 µm lépésközzel, 10 µm tartományban) 0,25 képkocka/mp sebességgel rögzítettük 15 percen át. Ezután 3 mL/perc áramlási sebességgel kontroll oldatot vagy 4 mM PSB-0739-et (szelektív P2Y12R-antagonista) perfundáltunk 15 percig. A kalciumjel-adatok elemzését Fiji szoftverrel végeztük a Cal-590-AM-mel festett sejtek határain belül. A mikroglia nyúlványok által lefedett területet egy 1,2 µm széles peremzónában határoztuk meg. Az egyes neuronok esetében az időbeli változásokat a kontrollhoz viszonyítva ábrázoltuk.

3.19.3 *In vivo 2-photon imaging in live animals*

Kísérleteinkhez Femto2D-Dual Scanhead mikroszkópot (Femtonics Ltd.) és Chameleon Discovery hangolható lézerrendszert (Coherent, USA) használtunk. A 920 nm-re hangolt lézerrel egyidejűleg gerjesztettük a fluoreszcens fehérjéket (GFP, GCaMP6f, tdTomato). A képalkotást rezonáns és galvo pásztázási módokban végeztük, Nikon 18× vízbe meríthető objektívvel. Az adatrögzítést és exportálást MES és MESc szoftverekkel (Femtonics Ltd.) végeztük. Az állatokon fentanyl anesztéziát alkalmaztunk. A galvo Z-stack felvételeket (7 kép, 820×820 px, 5 µm lépésköz) 200–225 µm mélységig készítettük a pialis felszíntől, 2–2,5 percenként. A kétfotonos képanyagokat MES szoftverből exportáltuk és FIJI-ben elemeztük. A mikroglia nyúlványok és neuronális mitokondriumok egyidejű megjelenítéséhez Mito-R-Geco1-elektroporált CX3CR1+/GFP egereket használtunk. A fluoreszcens jeleket Nikon 18× víz immerziós objektívvel rögzítettük, az adatrögzítést pedig MES szoftverrel (Femtonics Ltd.) végeztük.

3.20 *Longitudinális képalkotás és kvantifikáció*

A méréseket CX3CR1+/tdTomato//Thy1/gcamp6⁺/GFP egerekben kezdtük 50–60 napos korban, 1–2 héttel a kraniotómia után. A képalkotási területet azonosítottuk, és részletes térképet készítettünk az érhálózat és neuronok elhelyezkedése alapján, hogy a sejtek

hosszú távon újra beazonosíthatók legyenek. A felvételek során 6×3 perces rezonáns pásztázásokat rögzítettünk egy síkban. Ezt követően galvo Z-stacket készítettünk 50 µm-rel feljebb és lejjebb, 3 µm lépésközzel. A mérések anesztéziában zajlottak, és két havonta ismételtük őket egészen 650–750 napos korig. A kvantifikációt a MESc programmal végeztük. Azokat a sejteket választottuk ki, amelyeknek szomatikus kapcsolata volt és kalciumaktivitást mutattak. Az idegsejteket és a legnagyobb szomatikus kontaktokat megjelöltük, és az adott ROI-n belül a fluoreszcencia intenzitását vizsgáltuk, normalizálva a háttérértékekhez. A mikroglia- és neuronális kalciumfluoreszcencia-görbéket elemeztük, és a kalciumaktivitási eseményeket megszámoztuk, valamint a hozzájuk társuló mikroglia-változásokat elemeztük. Azokat a kalciumeseményeket vizsgáltuk, ahol a fluoreszcenciaintenzitás legalább 20%-kal nőtt. A mikroglia-változásokat az 1,5 perces időintervallumban határoztuk meg, a kalciumcsúcs előtt és után. Az elemzés során a két fluoreszcens jel egyidejű változásának százalékos arányát határoztuk meg.

3.21 Statisztika

Az adatok összehasonlításához a következő statisztikai tesztek alkalmaztak: Wilcoxon-féle előjeles rangpróba két összefüggő adathalmaz esetén, Mann-Whitney U-teszt két független csoport összehasonlítására, Kruskal-Wallis teszt több független csoport elemzésére. A statisztikai elemzést a Statistica 13.4.0.14 (TIBCO) szoftverrel végeztük, és $p < 0,05$ értéket tekintettünk szignifikánsnak. Az ábrákon a szignifikanciajelölések a következők voltak: nem szignifikáns: n.s., * $p < 0,05$: **, * $p < 0,01$: ****, * $p < 0,001$: ***, * $p < 0,0001$: *****.

4 Eredmények

4.1 *A mikroglia-neuron szomatikus csomópontok jelentősége a fejlődésben*

- Kutatásunk során az embrionális (E15 – VZ/SVZ), posztnatális (P1, P8, P15 – neokortex) és felnőtt (P90 – gyrus dentatus) egerek agyszöveget vizsgáltuk a neurogenesis szempontjából legjelentősebb területeken.
- A mikroglia sejtek IBA1 és P2Y12R elleni többszörös immunhisztokémiai jelölésével és konfokális lézer pásztázó mikroszkópos (CLSM) vizsgálatával igazoltuk a sejtek jelenlétét a vizsgált területeken és a markerek megbízható expresszióját a fejlődés során.
- CLSM felvételeinken az éretlen idegsejtek sejtestjén és proximális szegmensén megfigyeltük a mikroglia nyúlványainak szomatikus kontaktjait.

- A mikroglia nyúlványok és az éretlen idegsejtek sejttestje közötti közvetlen membránkapcsolat meglétét korrelált-CLSM és elektronmikroszkópiás vizsgálatokkal is igazoltuk.
- CLSM és elektronmikroszkópos elemzések során minden korcsoportban kimutattuk a mitokondriumok felhalmozódását az éretlen idegsejtek szomatikus kapcsolataiban, félautomatikus fluoreszcens analízissel.
- Az excitotikus aktivitást segítő Kv2.1 fehérjeklaszterek az érett idegsejtekkel ellentétben az éretlen neuronoknál nem voltak kimutathatók, ami arra utal, hogy ebben az életszakaszban más fehérjék láthatják el ezt a funkciót.
- A mitokondriumokból felszabaduló vezikulumok endolizoszómális integrációját vizsgálva CLSM-mel kimutattuk a LAMP1 pozitív vezikulumok jelenlétét, amelyek az éretlen idegsejtek szomatikus kapcsolatai több mint kétharmadában előfordultak.
- In vitro akut agyszeleteken végzett 2-foton mikroszkópos méréseink igazolták, hogy a mikroglia P2Y₁₂R-függő módon képes növelni a szomatikus kapcsolatok méretét az éretlen idegsejteken, kiemelve a P2Y₁₂R szerepét a sejtek közötti kommunikációban.
- A kortikális citoarchitektúra CLSM alapú vizsgálata során P2Y₁₂R hiányában P8 és P90-es korcsoportokban szabálytalan kéregfejlődést tapasztaltunk.
- A neokortexben a proliferatív aktivitás vizsgálata során P2Y₁₂R-hiányos egerekben csökkent osztódó sejtsűrűséget azonosítottunk, ami arra utal, hogy a mikroglia P2Y₁₂R-függő módon szabályozza a neuronális proliferációt.
- A P2Y₁₂ receptor közvetlen szerepét a mikroglia által közvetített neuronális apoptózis szabályozásában nem tudtuk igazolni.

4.2 *Megváltozott mikroglialis közvetlen kölcsönhatások az öregedés során*

- Kutatásunkhoz 90 napos és 600 nap fölötti idős egér és 65 év körüli és 85 év körüli idős páciensekből származó mintákat vizsgáltunk.
- Slide scanner mikroszkóppal a szterológiai optical dissector szabályok alkalmazásával megfigyeltük az idegsejtek és a mikroglia sejtek csökkenő sejttségét, az oligodendrocita sejtek emelkedett sejttségét az idősebb korosztályban.
- CLSM 3D képsorozat felvételeinken manuálisan végig követtük a mikroglia sejtek nyúlványait és megvizsgáltuk, milyen kapcsolatokat

létesítenek az asztrocita-, oligodendrocita- idegsejtekkel és az erekkel. Elkülönítettünk nyúlvány-nyúlvány, sejttest-nyúlvány és sejttest- sejttest (szatellita) kapcsolatokat. Vizsgálatunk eredményeként a mikroglia sejtek nagyon ritka esetekben létesítettek szatellita kapcsolatot az említett sejtípusokkal. Ezzel szemben a núólvány kapcsolatok száma sokkal gyakoribbnak bizonyult, minden sejtípus esetén. Az idegsejtek szomatikus kapcsolatainak számában (felnőtt esetben átlagosan 8 idegsejttel létesített szomatikus kapcsolatok számában) szignifikáns csökkenést tapasztaltunk az idősebb korosztályban. Ellenben az oligodendrocita sejtek sejttestjét érintő mikroglia nyúlvány kapcsolatban azonban emelkedést figyeltünk meg az idősebb koresoportban. Ezeket a jelenségeket a humán szövetminták esetén is igazoltuk.

- A szomatikus kapcsolatokban korábban azonosított molekuláris elemek (Kv2.1 klaszterek, mitokondriumok, vezikuláris nukleotid transzporterek) expressziója nem mutatott eltérést idősebb korban a CLSM vizsgálatok során.
- Korábbi kutatásaink során kimutattuk, hogy a mikroglia nyúlványborítottsága fokozódik az idegsejtek sejttestjén fiziológias és patológiás állapotokban is. CLSM vizsgálataink megerősítették, hogy ez a jelenség az idős korosztályban is jelen van, az emelkedett mikroglialis borítottság formájában.
- A szomatikus kapcsolatok dinamikájának vizsgálatához 2-foton mikroszkópiát alkalmaztunk, és egy longitudinális protokollt dolgoztunk ki, amely lehetővé tette ugyanazon sejtek élettartamon át történő megfigyelését. Eredményeink szerint az idegsejtek kalciumaktivitására adott szomatikus kapcsolati válaszok száma idősebb korban 25%-kal csökkent.

5 Következtetések

A mikroglia dinamikus és alkalmazkodó immunsejtek, amelyek nélkülözhetetlenek olyan fiziológiai folyamatokban, mint a neuronális fejlődés és neurogenesis, ugyanakkor fontos szerepet játszanak a neurodegeneratív betegségek és az öregedés kóros válaszaiban is. Eredményeink rávilágítanak a mikroglia szomatikus junctionjainak kulcsszerepére, melyek lehetővé teszik a közvetlen és speciális kommunikációt a neuronokkal, befolyásolva azok sorsát, anyagcsere szabályozását és túlélését. A fejlődés során a mikroglia-neuron interakciók nem csupán a szinaptikus kapcsolatokra terjednek ki, hanem közvetlen kapcsolatba lépnek a neuronális szomákkal, hogy szabályozzák azok proliferációját, migrációját és a kortikális struktúra kialakulását, különösen purinerg jelátviteli útvonalakon, különböző mechanizmusok által, mint például a P2Y₁₂R. A szomatikus junctionok funkcionális jelentőségének megértése még korai fázisban van, és ezen rejtett szerepek felfedezése izgalmas lehetőségeket kínál a

jövőbeli kutatások számára. A CNS öregedésével a mikroglia működése alapvető változásokon megy keresztül, melyeket csökkent mozgékonyság, alacsonyabb fagocitáló kapacitás és egy gyulladásoz állapot (úgynevezett „inflammaging”) irányába történő eltolódás jellemez. Ezek a változások csökkentik a mikroglia hatékonyságát a neuronális homeosztázis fenntartásában, hozzájárulva ezzel a kognitív hanyatláshoz és a neurodegeneratív betegségek előrehaladásához. Az öregedés során különösen a szomatikus junctionok csökkenése figyelhető meg, ami gyengíti a mikroglia figyelő funkcióját a neuronális szomákkal szemben, és zavarja a két sejtípus közötti kommunikációt. Ennek következményeként a neuronok fokozottan sérülékenyebbé válnak a káros hatásokkal szemben, így szükségessé válik a célzott beavatkozások alkalmazása a mikroglia egészségének támogatására az öregedő populációkban. Eredményeink arra is rávilágítanak, hogy az öregedés során a mikroglia, az oligodendrociták és az asztrociták közötti interakciók változása tovább befolyásolja a CNS homeosztázisát. Az idősebb egyedeknél tapasztalt oligodendrocita interakciók növekedése akár kompenzációs mechanizmusokat is jelezhet, amelyek a mielin lebomlását próbálják ellensúlyozni, ugyanakkor arra is utalhatnak, hogy a glia sejtek közötti kommunikáció dinamikájában fontos változások zajlanak, amelyek további kutatásokat igényelnek. Klinikai szempontból e felfedezések új paradigmát sugallnak a neurodegeneratív betegségek kezelésében, amely túlmutat a neuronok központi megközelítéseken, és figyelembe veszi a CNS-en belüli szélesebb körű sejtinterakciókat. A mikroglia ígéretes terápiás célpontként emelkedik ki, mivel fagocitáló képessége, anyagcsere-rugalmassága és dinamikus kommunikációja új lehetőségeket kínál a beavatkozásra. A mikroglia működésének módosítására irányuló stratégiák — mint a fagocitáló kapacitás növelése, proteosztázis helyreállítása vagy a gyulladásoz válaszok szabályozása — képesek enyhíteni az életkorral összefüggő neurodegeneratív állapotokat és javítani a CNS ellenálló képességét. Összességében, a mikroglia központi szerepe mind a fejlődési, mind az öregedési folyamatokban hangsúlyozza fontosságukat, mint a CNS „őrei”. A mikroglia interakciók és szabályozó mechanizmusok jobb megértése elősegíti olyan innovatív terápiás stratégiák kidolgozását, amelyek erősítik a neuroprotektációt, megőrzik a CNS integritását, és válaszokat adnak a neurodegeneratív betegségek egyre növekvő kihívásaira.

6 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Cserép Csaba*, **Schwarcz Anett D***, Pósfa Balázs, László Zsófia I, Kellermayer Anna, Környei Zsuzsanna, Kisfali Máté, Nyerges Miklós, Lele Zsolt, Katona István, Dénes Ádám Microglial control of neuronal development via somatic purinergic junctions **CELL REPORTS** 40: 12 Paper: 111369, 22 p. (2022) Közlemény: 33111942 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos Scopus - Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous) SJR indikátor: D1 1 Megosztott első szerzők **IF: 8,8**

*Megosztott első szerzők

Cserép C, Pósfa B, Lénárt N, Fekete R, László ZI, Lele Z, Orsolits B, Molnár G, Heindl S, **Schwarcz AD**, Ujvári K, Környei Zs, Tóth K, Szabadits E, Sperlágh B, Baranyi M, Csiba L, Hortobágyi T, Maglóczky Zs, Martinecz B, Szabó G, Erdélyi F, Szipőcs R, Tamkun MM, Gesierich B, Duering M, Katona I, Liesz A, Tamás G, Dénes Á Microglia monitor and protect neuronal function through specialized somatic purinergic junctions **SCIENCE** 367: 6477 pp. 528-537. (2020) Közlemény: 31294298 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos Scopus - History and Philosophy of Science SJR indikátor: D1 Scopus - Multidisciplinary SJR indikátor: D1 **IF: 47,728**

További publikációk:

Császár Eszter, Lénárt Nikolett, Cserép Csaba, Környei Zsuzsanna, Fekete Rebeka, Pósfa Balázs, Balázsfi Diána, Hangya Balázs, **Schwarcz Anett**, Szabadits Eszter, Szöllősi Dávid, Szigeti Krisztián, Máthé Domokos, Brian L West, Sviatkó Katalin, Brás Ana Rita, JeanCharles Mariani, Kliewer Andrea, Lenkei Zsolt, Hricisák László, Benyó Zoltán, Baranyi Mária, Sperlágh Beáta, Menyhárt Ákos, Farkas Eszter, Dénes Ádám Microglia modulate blood flow, neurovascular coupling, and hypoperfusion via purinergic actions **JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE** 219: 3 Paper: e20211071, 33 p. (2022) Közlemény: 32710992 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos Scopus - Immunology SJR indikátor: D1 Scopus - Immunology and Allergy SJR indikátor: D1 Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: D1 **IF: 15,3**

Cserép C, Pósfa B, **Schwarcz AD**, Dénes A Mitochondrial Ultrastructure Is Coupled to Synaptic Performance at Axonal Release Sites **ENEURO** 5: 1 Paper: e0390-17.2018, 15 p. (2018) Közlemény: 3332460 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: D1 Scopus - Neuroscience (miscellaneous) SJR indikátor: Q1