

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

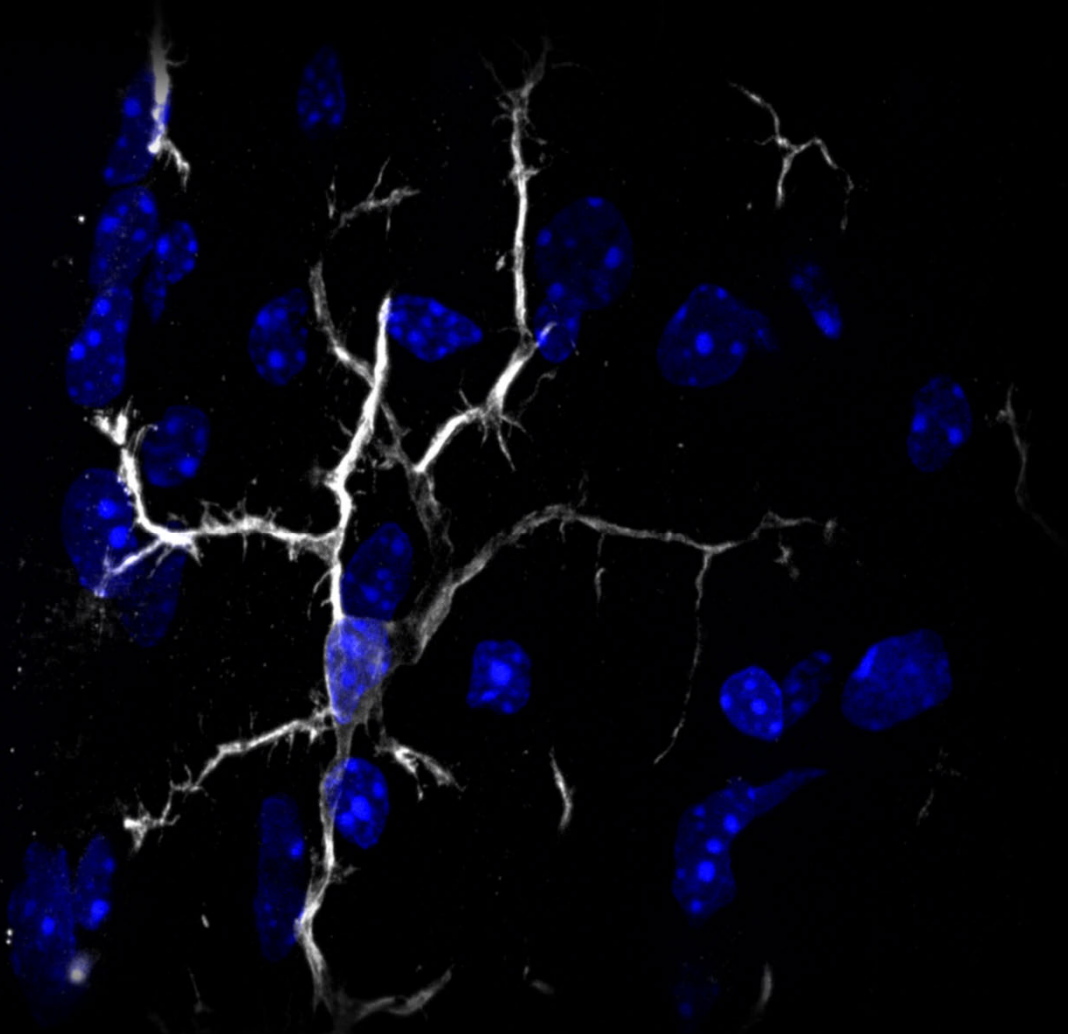
Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Neurozientziak Saila



**Achucarro**  
BASQUE CENTER FOR NEUROSCIENCE

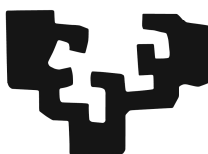
# P2X4 hartzaile purinergikoek neurohantura eta birsortzea modulatzeko dituzte esklerosi anizkoitz esperimentalean



DOKTOREGO TESIA  
Alazne Zabala Olaizola  
2019



eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Neurozientziak Saila



# P2X4 hartzaile purinergikoek neurohantura eta birsortzea modulatzeko dituzte esklerosi anizkoitz esperimentalean

Azaleko argazkia: saguaren bizkarrezur muineko mikroglia erlaxatu bat immunofluoreszentziaz ikusia.  
Zuria: mikroglia zelula. Urdina: zelulen nukleok.

**DOKTOREGO TESIA**

Alazne Zabala Olaizola

2019

Tesiaren zuzendaria:

María Domercq García



Doktorego tesi honetan aurkeztutako emaitzen zati bat honako argitalpenaren parte izan da:

**Zabala A**, Vazquez-Villoldo N, Rissiek B, Gejo J, Martin A, Palomino A, *et al.* (2018) P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis. *EMBO Mol Med* 10. pii: e8743.

Tesi hau honela finantziatua izan da:

- Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) - Ikertzaileak prestatzeko kontratazio deialdia 2014
- Merck Serono (a business of Merck KGaA, Germany) - Grant for Multiple Sclerosis Innovation
- Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2013-45084-R y SAF2016-75292-R)
- Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)
- Eusko Jaurlaritza (IT702-1)



*Attitta eta amamai*

*“Hor nonbait bada zerbait ikusgarria,  
guk noiz aurkituko zain.”*

*- Carl Sagan -*





<b>LABURDURAK.....</b>	<b>1</b>
<b>SARRERA .....</b>	<b>1</b>
1. ESKLEROSI ANIZKOITZA.....	3
1.1 Esklerosi anizkoitz motak.....	3
1.2 Esklerosi anizkoitzaren etiologia.....	5
1.3 Esklerosi anizkoitzaren patofisiologia.....	7
1.4 Esklerosi anizkoitza aztertzeko animalia ereduak .....	10
1.4.1 Entzefalomiелitis autoimmune esperimental (EAE).....	10
1.4.2 Birus-bidezko desmielinizazioa.....	11
1.4.3 Toxina bidezko desmielinizazioa .....	11
2. MIKROGLIA .....	12
2.1 Mikroglia funtzioak.....	13
2.1.1 Mikroglia garapenean.....	13
2.1.2 Mikroglia garun helduan .....	14
2.3 Mikroglia/makrofagoak EA-ean.....	18
2.3.1 Mikroglia bermielinizazioan .....	20
3. SEINALIZAZIO PURINERGIKOA .....	23
3.1 Hartzaile purinergikoak.....	24
3.2 ATP hartzaileak mikroglia .....	25
3.3 P2X4 hartzailea NSZ-ean.....	27
3.3.1 IRF5-P2X4R ardatza .....	29
<b>HIPOTESIA ETA HELBURUAK.....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIAL ETA METODOAK.....</b>	<b>35</b>
1. ANIMALIAK.....	37
2. <i>IN VITRO</i> EREDUAK .....	37
4.1 Mikroglia zelulen hazkuntza .....	37
4.2 Oligodendrozoitoen zelula aitzindarien hazkuntza .....	39
4.3 Oligodendrozoitoen hazkuntza.....	39
3. <i>IN VIVO</i> EREDUAK.....	39
3.1 Entzefalomiелitis autoimmune esperimental (EAE)-ren indukzioa.....	39
3.2 Lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazioa .....	40
4. TEKNIKAK.....	41

4.1 Mielinaren fagositosiaren zeharkako azterketa EAE-dun saguetan .....	41
4.2 Zelulen bideragarritasun entsegua .....	42
4.3 Western blota .....	42
4.4 Minaren entsegua .....	43
4.5 Immunokimia .....	43
4.6 Fluoreszentziaz aktibaturiko zelulen sailkatzailea ( <i>fluorescence-activated cell sorter</i> , FACS) .....	46
4.7 PCR kuantitatiboa (qPCR) eta Geneen adierazpen-profil entsegua .....	47
5. ANALISI ESTADISTIKOA .....	50
<b>EMAITZAK .....</b>	<b>51</b>
1. <i>P2x4r</i> -ren gainadierazpena ematen da EAE-an .....	53
2. P2X4R blokeatzeak EAE-a larriagotzen du .....	55
3. P2X4R-ren modulazioak ez du erantzun immunearen sorreran eraginik EAE-dun saguetan.....	57
4. P2X4R-en funtzioa mikroglia zelulen polarizazioan.....	59
5. P2X4R-ren eragina oligodendrozitoen diferentziazioan .....	65
6. P2X4R-ren indartzeak EAE-a hobetzen du .....	70
7. TNP-ATP-ak eta IVM-k ez dute aldaketarik eragiten alodinia mekanikoan EAE-dun saguetan.....	74
8. <i>Irf8</i> eta <i>Irf5</i> transkripzio faktoreak gainadierazita daude EAE-an.....	75
9. IRF5 transkripzio faktorearen funtzioa EAE-aren patogenesisian .....	77
10. IRF5 gabeziak ez du eraginik erantzun immunean .....	79
11. IRF5-aren gabeziak ehunen kaltetzea areagotzen du EAE-dun saguetan .....	80
12. Fagozitosi kaltetua IRF5 <sup>-/-</sup> saguetan EAE-a induzitu ondoren.....	82
13. IRF5 <sup>-/-</sup> saguek oligodendrozito zelula aintzindarien (OPC-en) errekrutatzean arazoak dituzte lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazioaren ondoren .....	83
14. Ez-ohiko hanturazko erantzuna IRF5 <sup>-/-</sup> saguetan LPC-bidezko desmielinizazioaren ondoren .....	85
<b>EZTABAIDA.....</b>	<b>87</b>
1. P2X4 hartzaileak mikroglia aktibazioa erregulatzen du eta bermielinizazioa bultzatu EAE-an.....	89
1.1 Mikroglia <i>P2x4r</i> gainadierazita dago EAE-dun saguetan.....	89
1.2 Tratamenduen espezifikotasuna .....	90
1.3 P2X4R-ren modulazioak, gehienbat mikroglia zeluletan du eragina.....	90

---

1.4 P2X4R-ren modulazioak ez du eraginik erantzun immunearen aktibazioan....	91
1.5 P2X4R-ren indartzeak mikroglia anti-hanturazko fenotiporantz aldarazten du eta EAE-aren sintomak hobetzen ditu sendatze fasean.....	91
1.6 P2X4R-ren indartzeak oligodendrozoitoen diferentziazioa bultzatzen du .....	93
1.7 IVM-bidezko P2X4R-ren indartzeak ez du alodinia areagotzen EAE-dun saguetan .....	93
2. IRF5 transkripzio faktorearen funtzio bikoitza EAE-an .....	94
2.1 Irf5 gainadierazita dago EAE-dun saguetan.....	94
2.2 IRF5-ren gabezia onuragarria da EAE-ko fase akutuan sintomen agertzea atzeratuz .....	95
2.3. Sendatzerik eza IRF5 <sup>-/-</sup> saguetan.....	95
3. IRF5 transkripzio faktorearen funtzioa LPC-bidezko desmielinizazio ereduan.....	96
<b>ONDORIOAK.....</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>103</b>



## LABURDURAK

Euskaraz definitzen duten hitzekin bat ez datozen laburdurak ingelesez definituak izango dira letra etzanez.

$\gamma\delta$ TCR	<i>Gamma-delta T-cell receptor</i>
5-BDBD	<i>5-(3-Bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro[3,2-e]-1,4-diazepin-2-one</i>
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
ANOVA	Bariantzaren analisia
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , zelula antígeno-aurrezlea
APC (CC1)	<i>Adenomatous polyposis coli clone CC1</i>
<i>Arg1</i>	Arginasaren genea
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATP $\gamma$ S	<i>Adenosine triphosphate-gammaS</i>
B220	<i>Cluster of differentiation 45 isoform B220</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , garunetik-eratorritako faktore neurotrofiko
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BzATP	<i>2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate tri (triethyl-ammonium) salt</i>
C3	<i>Complement protein 3</i>
Calcein-AM	<i>Calcein- acetoxymethyl</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
<i>Ccl2</i>	<i>C-C motif chemokine ligand 2 genea</i>
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i> , kalteari-loturiko patroio molekularra

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMT	<i>Disease modifying treatment</i>
EA	Esklerosi anizkoitza
EAE	Entzefalomieltis autoimmune esperimentalala
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERSI	<i>Experimental Research in Stroke and Inflammation</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fc	<i>Antibody receptor</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3 gen</i>
GABAergic	<i>Gamma-aminobutyric acid-ergic</i>
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HERV-W	<i>Human endogenous retrovirus type W</i>
IB4	<i>Isolectin B4</i>
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G, G immunoglobulina</i>
IL	Interleukina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dubelcco's Medium</i>
iNOS	<i>Inducible oxide nitrite synthase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor, faktore interferon erregulatzaile</i>
IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5, faktore interferon erregulatzaile 5</i>
IRF8	<i>Interferon regulatory factor 8, faktore interferon erregulatzaile 8</i>
IVM	<i>Ivermectin, Ibermektina</i>
LPC	<i>Lysolecithin; Lisolezitina</i>

LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> , lipopolisakaridoa
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>
MBM	Mikroglia baldintzatutako medioa
MBP	<i>Myelin basic protein</i> , mielinaren proteina basikoa
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> , oligodendrozito glikoproteina
<i>Mrc1</i>	Manosaren hartzailerako genea
MRC1	Manosaren hartzailerako genea
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i> , RNA mezularia
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NG2	<i>Neuron-glia antigen 2</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i> , nerbio hazkuntza faktorea
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
<i>Nos2</i>	<i>Inducible oxide nitrite synthase</i> genea
NP-1815-PX	(5-[3-(5-thioxo-4H-[1,2,4]oxadiazol-3-yl)phenyl]-1H-naphtho[1,2-b][1,4]diazepine-2,4(3H,5H)-dione)
NSZ	Nerbio sistema zentrala
NT3	<i>Neurotrophin-3</i>
Olig2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
OPC	<i>Oligodendrocyte progenitor cell</i> , oligodendrozitoen zelula aitzindaria
P2X4R	<i>Purinergic P2X4 receptor</i> , P2X4 hartzailerako purinergikoa
P2X7R	<i>Purinergic P2X7 receptor</i> , P2X7 hartzailerako purinergikoa
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PB	<i>Phosphate buffer</i>

PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDL	Poli-D-Lisina
PFA	Paraformaldehyde
PLP	Proteolipid protein
PNI	<i>Peripheral nerve injury</i>
PPMS	<i>Primary-progressive multiple sclerosis</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
pPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
Ror	Retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma genea
RRMS	<i>Relapsing-remitting multiple sclerosis</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMI-32	<i>Neurofilament H Non-Phosphorylated protein</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SPMS	<i>Secondary progressive multiple sclerosis</i>
T3	<i>Tri-iodothyronine</i>
T4	<i>L -Thyroxine</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-beta-activated kinase 1</i>
TBS-T	<i>Tris buffer saline tween-20</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-beta</i>
Th	T helper cell
TMEV	<i>Theiler's murine encephalomyelitis virus</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor-necrosis factor-alpha</i>
TNP-ATP	<i>2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)adenosine-5'-triphosphate tetra(triethyl-ammonium) salt</i>



Treg	T zelula erregulatzaileak
U	Unitate
UDP	<i>Uridine diphosphate</i>
UTP	<i>Uridine triphosphate</i>
WT	<i>Wild type, sagu basatia</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein, proteina fluoreszente horia</i>



SARRERA



## 1. ESKLEROSI ANIZKOITZA

Esklerosi anizkoitza (EA) nerbio-sistema zentraleko (NSZ) gaixotasun kroniko desmielinizatzailea da eta Jean-Martin Charcotek deskribatu zuen lehen aldiz 1868an. EA pertsona heldu gazteei eragiten dien gaixotasun desgaitzaile neurologikorik ohikoena da, eragin itzulezin fisiko eta psikikoak eragiten dituelarik (*Dendrou et al., 2015*). Gaixotasun hau munduan 2,3 milioi pertsonak pairatzen dutela kalkulatzen da (*Browne et al., 2014*) eta horietatik bi herenak emakumeak dira (*Giovannoni et al., 2016; Ontaneda et al., 2017*).

EA gaixotasun heterogeneoa da bai klinikoki eta baita patologikoki ere (*Ntranos eta Lublin, 2016*). Gaixotasunaren ezaugarri nagusia mielinaren osagaien aurkako hanturazko erreakzioa duten lesio fokalak dira, oligodendrozitoen heriotza, desmielinizazioa eta axoien endekapena eraginez (*Dendrou et al., 2015; Mahad et al., 2015*). Oraindik ez da ezagutzen gaixotasuna zerk sortzen duen, baina gaur egun onartutzat jotzen da faktore genetikoaren eta ingurugiro faktoreen bateratzeak eragiten duela gaixotasunaren agertzea (*Hafler et al., 2007; Huynh eta Casaccia, 2013*). EA-n ematen den desmielinizazioa hanturazko prozesu autoimmunek eragiten du eta, neurri ezberdinean, axoien endekapenak, NSZeko edozein gunetan eman daitekeelarik. Desmielinizazioak kondukzio abiadura moteltzea edo transmisioa guztiz etetea eragin dezake, neuronen kaltetzea eta sintoma neurologikoen agertzea eraginez. Sintoma hauek, lesioa gertatu den NSZ-eko gunearen arabera izango dira, ohikoena sustantzia zurian agertzea izanik, nahiz eta sustantzia grisean ere aurki daitezkeen. EA-ren sintoma ohikoenak honako hauek dira: zentzumen eta ikusmenean nahasmenak, espastizitatea, ahultasuna, espasmo mingarriak, maskuriko alterazioak, dardara, ataxia, neuritis optikoa, nekea eta disfagia (*Compston eta Coles, 2008*). Gaixo hauek izaten duten ezgaitasun progresiboa, sintomen berragertze bakoitzaren ondoren gelditzen diren defizit hondarren metatzearen edo gaixotasunaren progresio gerazinen ondorioa dira.

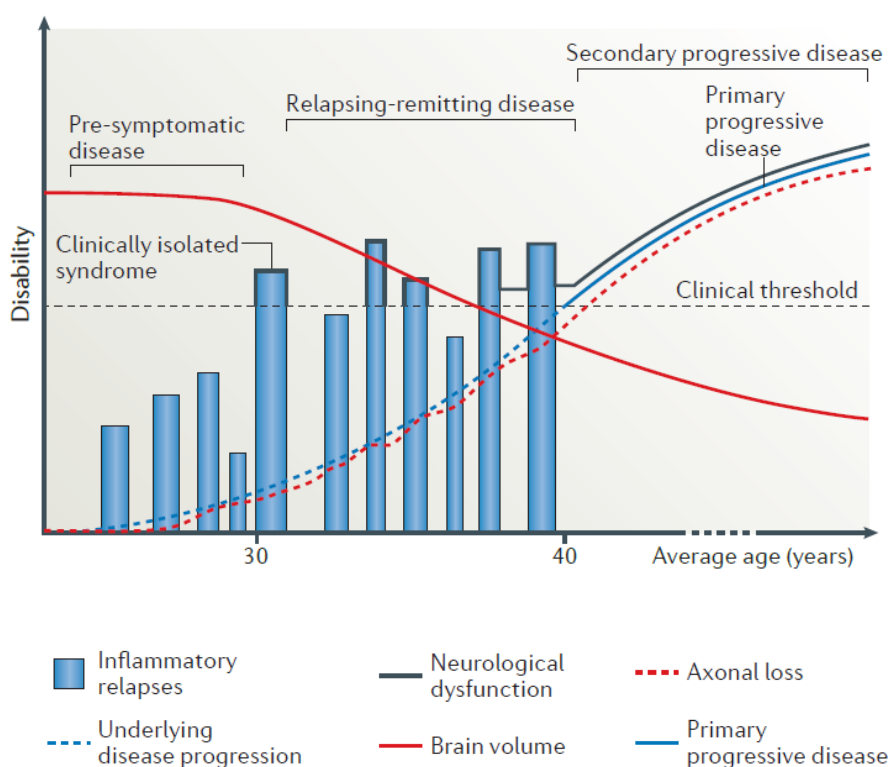
### 1.1 Esklerosi anizkoitz motak

1996an, Lublin eta Reingoldek EA 4 forma ezberdinetan bereizi zuten gaixotasunaren kurtso klinikoaren arabera (*Lublin eta Reingold, 1996*). Hala ere, patologiaren ulertzean eman diren aurkikuntza berrien aurrean, klasifikazioa berrikusi beharra egon da. Kriterio berriek, gaixotasunaren kurtso klinikoaz gain, erresonantzia magnetikoko irudietan lesioak duen aktibitatea eta ezgaitasunaren progresioa hartzen dituzte kontutan (*Lublin, 2014*).

Gaur egun ondorengo 4 motak bereizten dira:

- **Klinikoki isolatutako sindromea:** lehen aldiz agertzen den gertaera klinikoari dagokio. Hanturazko desmielinizazioaren ezaugarriak agertzen ditu, EA izan daitekeelarik, baina oraindik ez ditu denboran barreiatua izatearen kriterioak betetzen EA bezala definitu ahal izateko. Lehen gertaera klinikoa izatean erresonantzia magnetikoko irudietan lesioa aurkitzen bada, gaixoak %60-80ko probabilitatea izango du EA garatzeko. Aldiz, lehen gertaera klinikoan ez bada lesiorik aurkitzen erresonantzia magnetikoko irudietan, gaixoak %20ko aukera izango du EA garatzeko (*Miller et al., 2005*).
- **EA errepikari-atzerakaria:** EA-ren formarik ohikoena da, gaixoen %85-90ak izaten duelarik. Mota honen ezaugarri nagusia aurrekusi ezineko erasoak dira osatze garai batez jarraituak. Erasoak NSZ-eko hanturarekin eta desmielinizazioarekin batera ematen dira eta sustantzia zuriko lesio bezala identifikatzen dira erresonantzia magnetikoko irudietan (*Dendrou et al., 2015*). Osatze garai honetan NSZ-eko konpontze mekanismoak martxan jartzen dira kalteak konponduz eta konpentsatuz (*Rocca et al., 2003; Rocca eta Filippi, 2007*).
- **EA sekundarioki progresiboa:** EA mota hau dutenek aurretik EA errepikari-atzerakaria izan dute gerora etapa progresiboa garatzen dutelarik, itzulezinezko beherakada neurologikoarekin batera. EA errepikari-atzerakaria aurkezten duten gaixoen %80ak EA sekundarioki progresibo batean jarraituko du. Hanturazko lesioak ez dira forma honen ezaugarri eta itzulezinezko beherakada neurologikoa NSZ-aren atrofiaz eta axoien galtze handiagoaz lagundua joaten da.
- **EA primarioki progresiboa:** gaixoen %10-15ak ez du erasoen fase errepikari-atzerakaria izaten eta zuzenean gaixotasunaren garapen progresiboa pairatzen du.

Berriki, EA mota berri bat proposatu dute, EA mielokortikala izendatua. Forma honen ezaugarria bizkarrezur muinaren eta garuneko kortexaren desmielinizazio dira, baina ez garuneko sustantzia zuriarena, nahiz eta neurona kortikalen galera egon (*Trapp et al., 2018*). Ikerkuntza honetan lehen aldiz neurona kortikalen endekapena egon daitekeela deskribatu dute, garuneko sustantzia zuriaren desmielinizaziorik gertatu gabe.



**1. irudia.** Esklerosi anizkoitzaren 4 moten errepresentazioa, forma bakoitzaren ezaugarri diren arazo neurologiko, garunaren atrofia eta axoien galera irudikatuz (*Dendrou et al., 2015*).

## 1.2 Esklerosi anizkoitzaren etiologia

Gaixotasunaren arrisku faktore exogeno argien faltan, galdera irekia da oraindik EA-ren jatorria periferian (“kanpotik-barnera” teoria) edo NSZ-ean (“barnetik-kanpora” teoria) ote dagoen (**2. irudia**) (*Tsunoda eta Fujinami, 2002; Matute eta Pérez-Cerdá, 2005*).

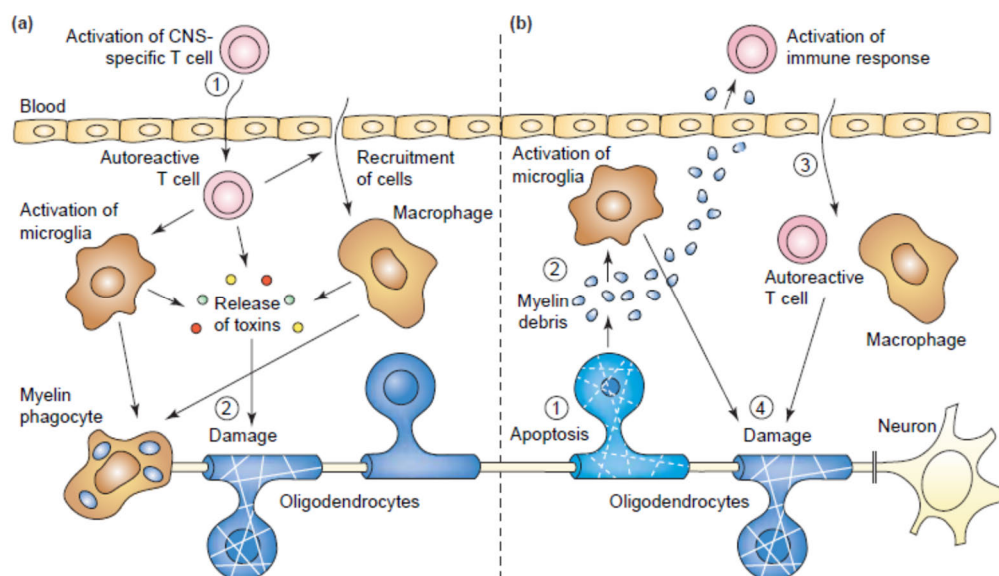
“**Kanpotik-barnera**” ereduak, T linfuzito autoerreaktiboak aktibatzen dira periferian, ziurrenik mimetismo molekularren bidez (*Geginat et al., 2017*), eta behin aktibatuta, barrera hematoentzefalikoaren zeharkatzeko gaitasuna dute B linfuzitoekin batera, baita sortzetiko sistema immuneko zelulekin batera ere (monozito, zelula dendritiko eta NK linfuzitoak). Zelula guzti hauek desmielinazioa eta axoien kaltetzaren erantzule izango dira (*Lopez-Diego eta Weiner, 2008*). “**Kanpotik-barnera**” ereduak EA ikertzeko entzefalomielite autoimmune esperimentalak (EAE) izeneko animalia ereduaren erabilera babestuko luke. Animalia eredu honetan, saguak mielinako antigenoekin immunizatzen dira, sistema immunearen erantzuna eraginez CD4<sup>+</sup> T 1

laguntzaileen (Th1) eta Th17en aktibazioaren bidez. Zelula guzti hauek barrera hematoentzefaliko edo barrera zefalorrakideoa zeharkatzeko gaitasuna dute (Ajami et al., 2011) eta mielina erasotzen dute beronen kaltetzea eta oligodendrozitoen heriotza eraginez. Honez gain, kaltetutako ehunen garbitzeaz ere arduratzen dira fagozitoen lanari esker (**2.a irudia**). Gaixotasunak aurrera egiten duen heinean, zelula immuneen infiltrazioak behera egiten du eta hantura kronikoa agertzen da mikrogliaren eta astrozitoen aktibazio kronikoaren eraginez batez ere.

Bestalde, “**barnetik-kanpora**” ereduaren arabera, lehen gertakizuna NSZ-ean emandako zitoendekapena da. Eredu hau babesten duen aurkikuntzarik garrantzitsuen gaixotasunaren etapa goiztiarrean eta zelula immuneen ausentzian aurkitutako oligodendrozitoen apoptosia da. Aurkikuntza histopatologiko hau Barnett eta Prineasek deskribatu zuten gaixotasunaren lehen agerraldi larri baten ondorioz hil ziren bi gaixoen ehunetan (Barnett eta Prineas, 2004). Birusen infekzioak, glutamatoa eta beste agente batzuek oligodendrozitoen apoptosia edo axoien endekapena eragin dezakete eta ondorioz mielina hondakinak eta molekula antigeniko indartsuak sor daitezke, linfuzito autoerreaktiboen infiltrazioa eraginez NSZ-ean bigarren mailako gertakari bezala (**2.b irudia**). Birusek eragindako infekzioak eta EA elkarrekin erlazionatzen dituztenak ebidentzia ugari aurkitu dira. Adibidez, karraskarien Theilerren entzefalomielitis birusak (TMEV) NSZ infekta dezake eta honek, axoien kaltetzea eragin dezakeela ikusi da saguetan (Tsunoda eta Fujinami, 2002). “**Barnetik-kanpora**” eredu babesten duen beste adibide bat giza erretrovirus endogenoa (HERV-W) da. Birus honek sinzitina izeneko proteina bat adierazten du, oligodendrozitoentzat zitotoxikoa den proteina eta adierazpen areagotua duena lesio desmielinizatzaile akutuetan EA duten gaixoetan (Antony et al., 2004). Glutamato extrazelularraren kopuru igoerak ere eragin dezake oligodendrozitoen apoptosia, estres oxidatzailea eta exzitotoxizitatea eraginez oligodendrozitoetan eta erantzun mota honek EAekin lotura duelarik (Matute et al., 2001; Werner et al., 2001; Groom et al., 2003).

Esklerosi anizkoitzaren bi ereduak ikerketa berrien beharra dute beraien babesa bermatu ahal izateko. Hala ere, bai “kanpotik-barnera” eta baita “barnetik-kanpora” ereduak batera aritu litezke, bata ez baita bestearekiko baztertzailea.





**2. irudia.** Esklerosi anizkoitzean agertzen diren lesioen mekanismo eragileen bi eredu. (a) “Kanpotik-barnera” eredu: T zelula aktibatuek NSZ-ra migratzen dute (1) eta hanturazko erantzunari hasiera ematen diote odoleko makrofagoak erakarriaz, mikroglia aktibatuz eta toxinak askatuz. Honek, mielinaren suntsitzea, oligodendrozitoen heriotza eta fagozito bidezko kaltetutako ehunen garbitzea eragiten ditu (2). (b) “Barnetik-kanpora” eredu: birus, glutamato eta beste agente batzuek oligodendrozitoen apoptosia eragin dezakete (1). Ondorioz, mielina hondakin kopuru handia sortzen da (2), zelula apoptotikoak kentzeko mekanismo fisiologikoak gaindituz, eta beraz, hanturazko erantzuna eraginez. Jarraian, T zelulek eta makrofagoek NSZ inbaditzen dute (3) eta mielinaren aurkako eraso autoimmunea hasten dute (4), lehenago deskribatu bezala (a). (*Matute eta Pérez-Cerdá, 2005*).

### 1.3 Esklerosi anizkoitzaren patofisiologia

EA-ren ezaugarri esanguratsuena mielina eta oligodendrozitoen galera duten hanturak eragindako desmielinizaziodun lesioen presentzia da, bai garunean eta baita bizkarrezur muinean ere (*Dendrou et al., 2015; Lassmann eta Bradl, 2017*).

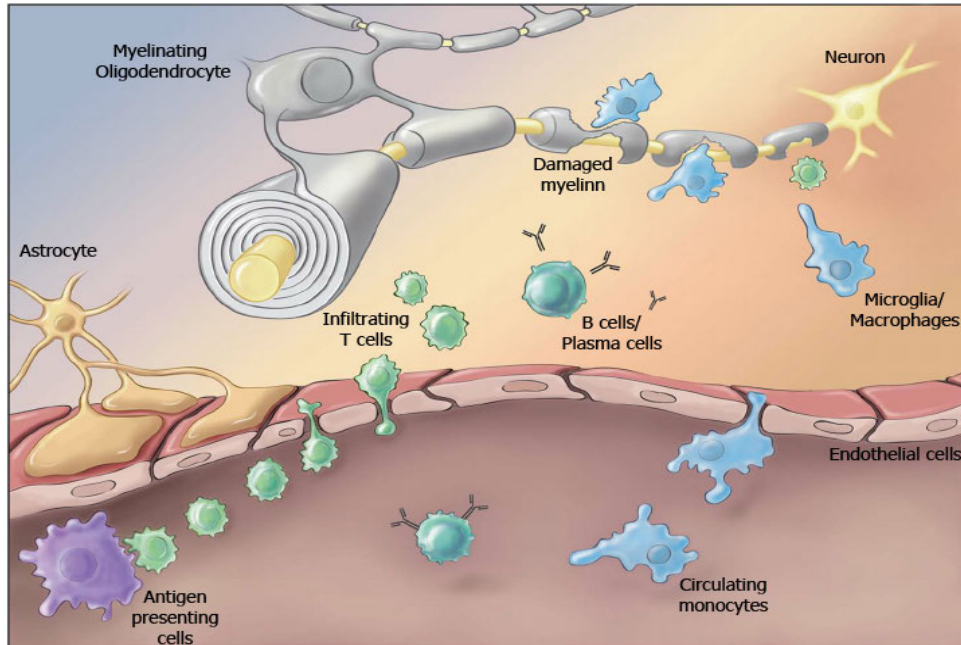
Naiz eta EA-ren hasierako etapetan axoi eta neuronen galerarik ia ez egon, gaixotasunak aurrera egin ahala, gaixoen ezgaitasun mailarekin eta garunaren atrofiarekin korrelazionatzen duen axoi eta neuronen kaltetze progresiboa ematen da (*Dendrou et al., 2015*). Hala ere, zelula immuneekin izandako interakzio zuzenen ondorio diren (*Zipp eta Aktas, 2006*), axoi galera goiztiarraren ebidentziak badira (*Trapp eta Nave, 2008*). Hantura, gaixotasunaren etapa guztietan aurki daiteke, baina batez ere etapa akutuan ematen da.

Gaixotasunaren hasierako etapetan, barrera hematoentzefalikoa hautsi egiten da eta lesio goiztiarretan zelula immuneak aurkitzen dira. Nagusiki, zelula infiltratzaileak makrofagoak izan ohi dira, kopuru txikiagoan zelula CD8<sup>+</sup>ak eta baita zelula CD4<sup>+</sup> ak, B zelulak eta plasma zelula gutxi batzuk ere (*Dendrou et al., 2015*).

Beraz, lesio guneetan nabarmenagoa den hanturazko erantzun barreiatua ematen da. Lesioak ez dira sustantzia zurian bakarrik aurkitzen, desmielinizazioa sustantzia grisean ere gerta daiteke. EA-ren etapa goiztiarretan kalte gutxi gertatzen da lesio guneetatik kanpo, itxura normaleko sustantzia zuria deitzen zaiolarik, baina hala ere, garunaren bolumena iada murriztua aurkitzen da. EAE-ren patogenesiaren hasieran, mikroglia eta makrofagoak aktibatua izaten dira, ziurrenik T linfuzitoen aktibazioaren eta infiltrazioaren aurretik (*Ajami et al., 2011; Goldmann et al., 2013; Yamasaki et al., 2014; Yoshida et al., 2014*). Bestalde, mikroglia/makrofagoen aktibazioak, prozesu patologikoak geldiarazi ditzakeela erakusten duten aurkikuntzak ere badira, faktore neurotrofiko eta immunomodulatzaileak askatuz eta honela, oligodendrozitoen heltzea eta ehunen berreskuratzea bultzatuz (*Kotter et al., 2006; Miron et al., 2014; Lampron et al., 2015*).

Gaur egun jakina da gune desmielinizatuak partzialki konponduak izan daitezkeela bermielinizazio deritzon prozesuaren bidez, baina gaixotasunaren etapa kronikoan birsortze mekanismo hauek ez dira hasierako etapetan bezain eraginkorrak izaten. Birsortze mekanismoen hutsegiteak eta erreserba neurologikoen ahitzeak gaixotasuna EA errepikarizatzerakaritik EA sekundarioki progresiora igarotzea eragingo duelarik (*Ransohoff, 2012; Dendrou et al., 2015*). Gaixotasunaren progresioarekin batera, T eta B zelulen infiltrazioa, mikroglia eta astrozitoen aktibazioa, mielinaren gutxitze lausoa eta axoien kaltetzea nabarmenak egiten dira. Mikroglia eta makrofagoek aktibatuta jarraitu ohi dute, ondorioz, gaixotasuna etapa kronikora bultzatuz. Gainera, lesioetako mikroglia eta makrofago kopuruak ehunen kaltearekin korrelazionatzen du, zelula hauen eragina adieraziz neuroendekapen prozesuan (*Bitsch et al., 2000, Rasmussen et al., 2007; Fischer et al., 2013; Vogel et al., 2013*).

Zelula populazio ezberdinek gaixotasunaren etapa ezberdinetan duten inplikazioa ulertzea, ez da argitzen erraza EAren patofisiologia multizelularra dela eta, eta baita NSZ-eko mikroglia zelulen hanturazko gaitasuna dela eta ere. Azken hamarkadetan, hainbat terapia immunomodulatzailek aurrera pausu handia eragin dute EA-ren tratamenduan. Tratamendu gaixotasun-eraldatzaileek T eta B zelulen aktibazioa eta zelula immuneen infiltrazioa dituzte itu.



**3. irudia.** Esklerosi anizkoitzaren patofisiologia. Organo linfoideetan T zelula autoerreaktiboak antígeno-aurkezle diren zelulekin eta B zelulekin kontaktuan jartzen dira eta behin aktibatuta barrera hematoentzefalikoa zeharkatzeko gaitasuna izaten dute. NSZean, T zelula autoerreaktiboen berraktibatzeak zitokina efektoreen produkzioa, makrofago eta mikrogliaeren erakartzea, plasma zelulen bidezko antigorputzen produkzioa eta T CD8<sup>+</sup> linfuzitoen eraso eragiten ditu. Mekanismo guzti hauek batera desmielinazioa eta axoien endekapena eragiten dute. Egokitua, *Bittner eta Meuth, 2013*.

Tratamendu hauek eraginkorrak dira gaixotasunaren eraso faseak eta larritasuna gutxiagotzen, baina ez dira gaixotasunaren progresioa gelditzeko gai eta kalte neuroaxonal jarriak metatzen jarraitzen du ekidin ezinako gaixotasunaren etapa kronikoan amaituz (*Haghikia et al., 2013; Feinstein et al., 2015*). Honek, gaixotasunaren eraso faseak eta etapa kronikoa mekanismo ezberdinek eragina izan daitekeela dioen ideia babestuko luke. Argi dago erantzun immunologikoak prozesu honetan eragina duela, baina kontutan hartu behar da NSZ-ean ere badagoela hanturazko osagarri gehigarri bat, hau da, mikroglia zelulen eragina ere kontutan hartu beharrekoa da. NSZ-eko zelula immune hauek gutxiago ezagutzen dira eta ez dira tratamendu gaixotasun-eraldatzaileen itu. Etorbizuneko tratamenduek zelula immune periferikoen modulazioa eta mikroglia zelulen modulazioa eragingo luketen produktuen konbinazioa izan beharko lukete, farmako neurobabesle edo neurobirsortzaileekin batera (*Dendrou et al., 2015*).

#### 1.4 Esklerosi anizkoitza aztertzekeo animalia ereduak

Animalia ereduak erabiltzea oso garrantzitsua da EA bezalako gaixotasun konplexuak aztertzerakoan. Konplexutasun hau animalia ereduetan ere islatzen da. Gaur egun animalia eredu bakar bat ere ez da gai gaixotasunaren ezaugarri guztiak erreproduzitzeko.

##### 1.4.1 EntzefalomiELITIS autoimmune experimentalA (EAE)

Animalia eredu erabiliena entzefalomiELITIS autoimmune experimentalA (EAE) deituriko ereduA da eta gaixotasunaren hanturazko ezaugarriak erreproduzitzen ditu. Emultsio antigeniko baten inokulazioak, adubantearen laguntzaz, erantzun immunea eragiten du. Immunizazioa dela eta, gehienbat T CD4<sup>+</sup> zelulek gidatutako erantzun immunea sortzen da NSZ-eko mielinaren aurka, aldiz, EA-ean T CD8<sup>+</sup> zelulak dira batez ere erantzun immunea gidatzen duten zelulak. Puntu hau kontutan hartzekoa da, animalia ereduA erabilia lortutako emaitzak gizakira pasatzerakoan. Eredu honen ezaugarri patologikoak EA-ren antzekoak dira, hanturazko guneak eta odol hodian eta bentrikuluen inguruko desmielinizazioa erakutsiz. Kontuan hartu beharreko beste ezaugarri bat lesioen kokapena da. EAE mota gehienek hantura guneak bizkarrezur muinean izaten dituzte, EA-aren kasuen gehienbat garunean ematen diren bitartean.

Kurtso klinikoA, erabilitako immunogenoaren eta sagu anduiaren araberakoA izango da. Proteina proteolipidikoaren (PLP) epitopoa erabiliz eginiko SJL/L saguen immunizazioak eraso eta errekuperazio faseak dituen kurtso klinikoA eragiten du (*Tuohy et al., 1989*). Aldiz, mielinaren oligodendrozitoetako glikoproteina (MBP) erabiliz C57BL6/J saguetan egindako immunizazioak kurtso kliniko kronikoA eragiten du (*Tompkins et al., 2002*). Azkenik, sagu diabetiko ez-obesoetan (NOD) eginiko immunizazioak, gaixotasunaren progresio kronikoA erreproduzitzen du. Beraz, immunogenoA eta sagu anduia galdera zientifikoaren konkordatzian aukeratu beharra dago.

Ingeneritza genetikoaren teknologia berriak eta sagu transgenikoak, irudien teknologian eman diren aurrerapenekin batera, EAE ereduaren erabilera potentziala zabaltzen ari dira. Guzti hau dela eta, EAE ereduaren erabilerak ezinbesteko izaten jarraituko du ikerkuntza preklinikoetarako eta baita mekanismoen ikerkuntzarako ere, *in vitro* egiten diren aurkikuntzak baieztatzea ahalbidetuz. Hala eta guztiz ere, EAE eredu sinplifikatzailea da, eta beraz, tentuz erabili eta interpretatu beharrekoA (*Dendrou et al., 2015*).

#### 1.4.2 Birus-bidezko desmielinizazioa

Gero eta ikerketa gehiago dira EA-aren patologiako lehen gertakaria NSZ-aren aurkako erantzun immunea sortzen duen birus baten infekzioa izan daitekeela esaten duen hipotesiaren aldekoak (*Tiwari et al., 2018*). Nahiz eta gaur egun ez dagoen EA-ren birus zehatz baten ebidentziarik, eredu hau erabilgarria izan daiteke mekanismo basikoak aztertzeko eta birusek giza EA-ean izan dezaketen ekarpena aztertzeko (*Lassmann eta Bradl, 2017*).

Desmielinizazioa eragin dezakeen birusik aztertuen karraskarien Theilerren entzefalomiyelitis birusa (TMEV) da. Sagu sentikorretan gaixotasun kroniko-progresiboa sortzen duten BeAn eta Danielen TMEV anduiak dira erabilienak. Etapa akutua gaixotasun desmielinizatzaile kronikoak jarraitzen du, batez ere bizkarrezur muina kaltetzen delarik. Eredu honetako lesioek, hantura kronikoa, desmielinizazio primariodun plaka konfluenteen sorrera, axoien kaltetzea eta bermielinizazio dituzte ezaugarri. Lesioetan T CD4<sup>+</sup> eta T CD8<sup>+</sup> linfozitoak, B linfozitoak eta plasma zelulak aurki daitezke (*Tsunoda et al., 2007; Pachner et al., 2011*). Beraz, eredu honetako lesioek funtsezko ezaugarriak partekatzen dituzte EA-eko lesioekin.

#### 1.4.3 Toxina bidezko desmielinizazioa

Desmielinizazio primarioa da EA-aren ezaugarri bereizgarriena, gainontzeko NSZ-eko hanturazko gaixotasunetatik bereizten duena. Desmielinizazioari eta bermielinizazioari zuzendutako estrategia terapeutiko berrien aurkikuntzak, prozesu hauetan parte hartzen duten mekanismoen ezagutza sakona eskatzen du (*Franklin eta Gallo, 2014*). Toxina bidezko desmielinizazio ereduetan informazio hau errazago lor daiteke, ez baitute hartutako immunitatearen hanturazko prozesuek NSZ-ean eragiten dituzten aldaketen zailtasun gehigarria. Agente desmielinizatzaile erabilienak lisolezitina eta kuprizona dira (*Lassmann eta Bradl, 2017*).

Kuprizona toxina bezala jokutzen duen kobre kelatzaile bat da, oligodendrozitoen heriotza eta honen ondorioz, desmielinizazioa eraginez astrozitoen eta mikrogliaaren aktibazioarekin batera (*Matsushima eta Morell, 2001*). Kuprizonaren itu zehatzak oligodendrozito helduak dira, hauengan apoptosia eragiten duelarik, ziurrenik eskari metaboliko handia dela eta. Beste zelula populazioei ez die eragiten (*Lucchinetti et al., 2000; Liu et al., 2010*), baina arrazoiak ezezagunak dira oraindik ere. Sagu heldu gazteei dietaren bitartez kuprizona ematen zaienean sustantzia zuriko hainbat estruktura desmielinizatuak izaten dira garunean. Dietatik kuprizona kentzen denean, oligodendrozito berriak sortzen dira oligodendrozitoen

zelula aitzindarien populaziotik eta mielinazko izara berriak sortzen dituzte sustantzia zuria partzialki edo guztiz bermielinizatuz (*Matsushima eta Morell, 2001*).

Lisolezitina, A2 fosfolipasaren aktibatzailea da eta bizkarrezur muinean injektatzea da ohikoena, desmielinizatutako plaka fokalak eraginez lokalizazio konkretu batean. Eredu honetan, desmielinizazioa lipidoz aberastutako mielina mintzetan xaboiak duen akzio toxikoaren eraginez ematen da (*Jeffery eta Blakemore, 1995*). Lisolezitinak sortutako desmielinizazioa erantzun immunearekiko independentea da eta beraz, sagu immunoeskasietan ere funtzionatzen du. Lisolezitina injektatu eta berehala T zelulak, B zelulak eta makrofagoak agertzen dira lesio gunean eta denbora-motzeko infiltrazio hau bermielinizazioa hasteko onuragarria dela pentsatzen da (*Bieber et al., 2003*). Lesio gunea arin berritzen da, nahiz eta bermielinizazioaren abiadura eta maila adinaren araberakoa izan, bermielinizazioa guztizkoa izan ohi da delarik 5-6 asteko sagu gazteetan (*Franklin et al., 2002; Crawford et al., 2013*).

## 2. MIKROGLIA

Ugaztunen NSZ neuronek eta glia zelulek osatzen dute eta mikroglia zelulak glia populazio guztiaren %5-12 dira garun heldu osasuntsuan (*Lawson et al., 1990; Perry et al., 1998; Aguzzi et al., 2013*). Mikroglia zelulak Pio del Río-Hortegak deskribatu zituen lehen aldiz zelula mota ezberdin bat bezala (*del Río-Hortega 1919a, b*) eta NSZ-eko fagozito egoiliarak dira. Zelula hauek bereziak dira beraien jatorriari eta baita funtzioari dagokionez ere.

Mikroglia jatorria eztabaidatua izan da urte askotan, baina duela gutxi segurtasunez baieztatu da mikroglia saku bitelinoko zelula aitzindari mieloideetatik datorrela, gainerako NSZ-eko zelulak neuroektodermotik eratorriak diren bitartean (*Ginhoux et al., 2010; Kierdorf et al., 2013*). Zelula aitzindari mieloideek NSZ-era bidaiatzen dute eta bertan ugaritzen dira enbriogenesi garaian barrera hematoentzefalikoa sortu aurretik (*Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010; Ginhoux et al., 2013; Prinz eta Priller, 2014*), zelula hauek izaki mikroglia aitzindari bakarrak. Garun heldu osasuntsuan, mikroglia zelulak ez dira odol aitzindariak ordezkatuak izaten, helduaro arte mantentzen dira iraupen luzeko NSZ-eko zelula immuneen populazio sendoa osatuz auto-berritze etengabea (*Lawson et al., 1992; Ajami et al., 2007; Kierdorf et al., 2013*).

## 2.1 Mikrogliaeren funtzioak

Mikroglia zelulak beharrezkoak dira NSZ-earen garapeneko etapa guztietan helduarora iritsi arte eta funtzio ezberdinak beteko dituzte garapen-etaparen arabera, eraldatzen eta heltzen ari den ingurunearen eraginez.

### 2.1.1 Mikroglia garapenean

Mikroglia hainbat funtzio bete ditzake NSZaren garapenean, bereziki “arkitekto” bezala, garatzen ari den NSZ-eko patroiak eta zirkuituak antolatu eta koordinatzen (*Prinz et al., 2017*). Garapenean zehar mikroglia betetzen dituen funtzioak jarraian deskribatzen dira (**4. irudia**).

- Neurona apoptotikoen fagozitosia. Fagozito profesional izanik, mikroglia zelulek funtzio garrantzitsua dute garapenean dagoen NSZ-eko neurona apoptotikoak kentzen. Garapenean zehar, gutxi gora behera neurona jaioberrien %50ak apoptosis jasaten du helduarora baino lehen (*Dekers et al., 2013; Schafer eta Stevens, 2015*) eta mikroglia da ehunaren homeostasia mantentzen duena iraungo ez duten zelula jaioberri hauek fagozitatuz (*Ferrer et al., 1990; Peri eta Nüsslein-Volhard, 2008; Sierra et al., 2010*).
- Garatzen ari diren neuronen populazioaren kontrola – Neurogenesis. Mikroglia zelulak beharrezkoak dira sare neuronalak egoki mihiztatuak izan daitezen (*Reemst et al., 2016*). Sarraskijale izateaz gain, mikrogliek neuronon irautea eta neurogenesis laguntzen eta bultzatzen dute garapenean dagoen NSZ-ean faktore neurotrofikoak askatuz, adibidez Intsulina-bezalako hazkuntza faktorea-1 (IGF-1) (*Ueno et al., 2013; Arno et al., 2014; Shigemoto-Mogami et al., 2014*). Gainera, funtzio aktiboa dute heriotza zelular neuronalaren eragiten garapenean dagoen garunean (*Frade eta Barde, 1998; Marín-Teva et al., 2004; Wakselman et al., 2008*). Beraz mikroglia zelulak beharrezkoak dira neurona kopuru egokia ezartzeko heriotza zelularra eta iraupena erregulatuz.
- Garatzen ari den baskularizazioaren gidatzea – Baskulogenesis. NSZ garapen prozesuan, neurona geruza gutxi batzuetatik zirkuitu ezberdinetan organizatutako bilioika neuronetara igarotzen da. Prozesu honekin batera oso ebentua garrantzitsua gertatzen da osagai eta oxigenoa zelula guztietara iritsi ahal izateko: NSZ-aren baskularizazioa. Mikroglia zelulak estrategikoki kokatuta egoten dira odol-hodi sistemaren kimuen garapena, migrazioa, anastomosis eta fintasuna erregulatuz (*Arnold et al., 2013*). Gida zelula bezala aritzen dira faktore gidari disolbagarriak askatuz (*Rymo et al., 2011*).

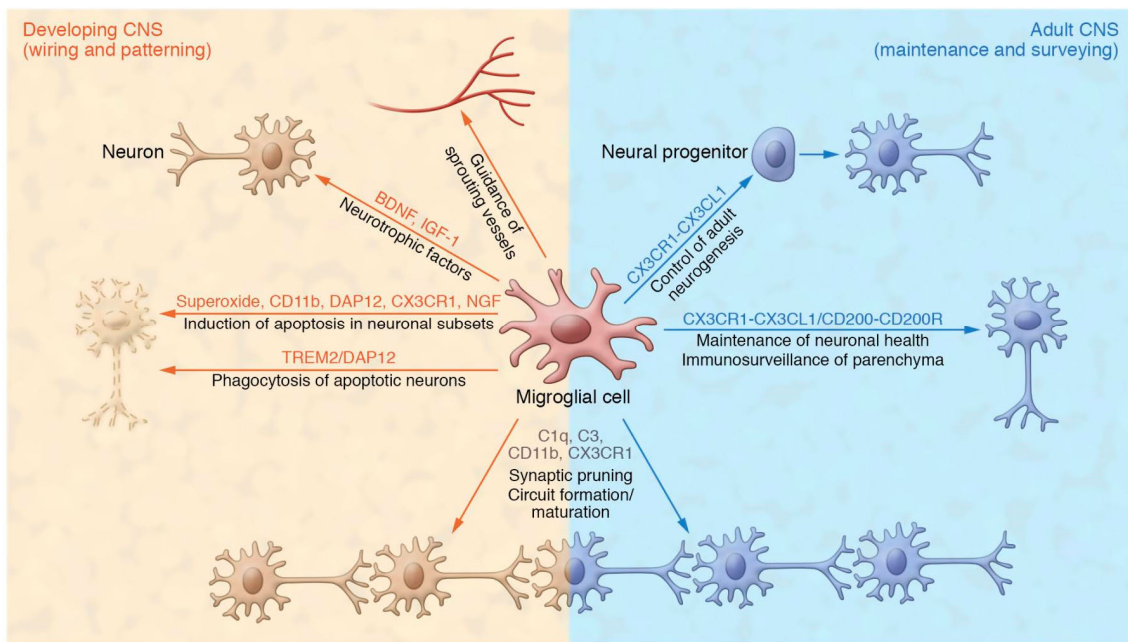
- Zirkuitu neuronalen heltzea eta fintzea – Inausketa sinaptikoa. Mikroglia zelulak ezinbestekoak dira heltze sinaptikorako. Mikrogliek funtzio dinamikoa dute erabiltzen ez diren dendritak kentzen jaio-osteko etapetan, "inausketa sinaptikoa" izeneko prozesu baten bidez. Inausketa sinaptikoa mikroglia kopuruaren eta dendriten aktibitate sinaptikoaren araberako izaten da (*Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012*). Horrez gain, prozesua konplementuak ere erregulatzen du, konplementuko C3 molekulaz etiketatuta dauden sinapsiak fagozituak izaten direlarik (*Stevens et al., 2007*). Funtzio honen gutxitzeak garuneko zirkuituak ez heltzea eragiten du eta gaixotasun neuropsikiatriko eta garatze neuronaleko gaixotasunekin lotzen da (*Paolicelli et al., 2011; Hoshiko et al., 2012; Schafer et al., 2012; Squarzoni et al., 2014; Zhan et al., 2014*).
- Mielinizazioa. Arratoietan mikroglia zelulek oligodendrogenesia bultzatu dezakete garapenean dagoen garunean hainbat zitokina askatuz bentrakulu azpiko eremuan (*Shigemoto-Mogami et al., 2014*). *In vitro* eginiko ikerkuntzek ere, mikrogliek oligodendrozitoen iraupena areagotu dezaketela erakutsi dute apoptosia eragotziz PDGF (*platelet-derived growth factor*) bezalako faktore disolbagarrien askatzeari esker eta oligodendrozitoetan NF-kB p65 faktorearen adierazpena bultzatuz (*Nicholas et al., 2001*). Ikerketa berri batean, Wlodarczyk eta kideek CD11c<sup>+</sup> den mikroglia mota deskribatu dute. Mikroglia honek NSZ-eko mielinogenesia erregulatzen du IGF-1 askatuaz, mielinizazioarako beharrezko den faktorea hain zuzen ere (*Wlodarczyk et al., 2017*).

### 2.1.2 Mikroglia garun helduan

NSZ heldu eta osasuntsuan "atseden-egoerako mikroglia" izenez ezagutzen den mikroglia adarkatua aurkitzen da, prozesu luze eta oso adarkatuekin eremu ez-gainjarriak mantenduz. "Atsedenean mikroglia" esaten zaion arren, bi fotoiko mikroskopia bidez *in vivo* eginiko entseguek erakutsi dutenez zelula hauek oso mugikorak dira garun osasuntsuan (*Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009; Nimmerjahn et al., 2012*). Atsedenean ordez, mikroglia zelulak etengabe eta aktiboki ari dira beren mikro-ingurugiroa aztertzen prozesu luze eta atzeratzeekin. Garbi geratzen ari da mikrogliek kontaktu azkarrak izaten dituztela NSZ-eko osagai guztiekin, bai inguruko neurona, sinapsi eta Ranvierren noduluekin eta baita beste glia zelulekin eta odol-hodiek ere. Jakina da ezinbesteko eragina dutela garunaren funtzionamendu egokian eta ehunaren osasun eta homeostasian (*Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009; Kettenmann 2011; Li et al., 2012; Zhang et al., 2018*).



- Plastizitate sinaptikoaren modulazioa. Jaio-osteko garapenean eta nerabezaroan elementu sinaptikoen fagozitosia prozesu garrantzitsua da, baina helduaroan eta zahartzaroan ere gertatzen da (*Tremblay et al., 2010; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Milior et al., 2016*). Honek mikroglia garrantzia azpimarratzen du plastizitate sinaptikoan eta ingurumenarekiko jokabide egokitzapenean baldintza fisiologikoetan (*Tremblay et al., 2010*). Hala ere, sinapsi gehiegi kentzeak, Alzheimerrean eta eskizofrenian bezalako gaixotasunak larriagotu ditzake (*Vilalta and Brown, 2017*). Kaltetutako neuronen sinapsiak fagozitateari “stripping sinaptikoa” esaten zaio (*Kettenmann et al., 2013*). Guzti honez gain, mikroglia osasuntsuak, seinale molekula ugari ekoizten ditu, horien artean zitokinak, neurotransmisoreak eta matrize extrazelularreko proteinak adibidez. Faktore guzti hauek aktibitate neuronalaren erregulatzeko gai dira eta baita aktibitate sinaptikoa eta plastizitatea ere (*Bessis et al., 2007; Bechade et al., 2013; Ji et al., 2013*). Behaketa hauek mikroglia garun heldu osasuntsuan egiturazko plastizitatearen eragile garrantzitsua dela iradokitzen dute, bai elementu sinaptikoen eraketan eta baita ezabatzean ere (*Tay et al., 2016*).
- Helduaroaren neurogenesiaren erregulazioa. Garun heldu osasuntsuan ere irauten du neurogenesiak bentrakulu azpiko eremuan eta baita hipokanpoko granulu azpiko eremuan ere (*Sierra et al., 2014; Ribeiro Xavier et al., 2015; Fourgeaud et al., 2016*). Mikroglia zelula aitzindari neuronalen dentsitatea erregulatzen du eremu neurogenikoetan zelula apoptotikoak fagozitatez (*Sierra et al., 2014; Fourgeaud et al., 2016*). Zahartzeak, mikroglia zelulengan eragin kaltegarria duela ematen duen arren neurogenesia gutxituz, ariketak eta ingurugiro aberastuak mikroglia zelulek neurogenesia bultzatzea eragiten dute (*Choi et al., 2008; Vučović et al., 2012; Gebara et al., 2013*). Helduaroan, hipokanpoko eremu neurogenikoaren mantenuan duten zeregina dela eta, mikroglia ezinbestekoa da ikaste prozesuetan eta oroimenen eraketan.
- Bermielinizazioa. EA bezalako gaixotasun desmielinizatzaileetan mikroglia zelulek funtzio garrantzitsua dute bermielinizazio prozesua erregulatzen. Mikroglia da fagozitosi bidez mielina hondakinak garbitzeaz arduratzen dena. Prozesu hau ezinbestekoa da bermielinizazioa has dadin, mielina hondakinek oligodendroitoen zelula aitzindariak (*oligodendrocyte progenitor cell, OPC*) lesio gunera etortzea eta heltzea oztokatzen baitute (*Lampron et al., 2015*). Bestalde, zelula hauek efektu kaltegarriak ere izan ditzakete bermielinizazio prozesuan faktore hantura-bultzatzaileak askatuz (*Domingues et al., 2016*).



**4. irudia.** Garun osasuntsuaren garapenean eta helduaroan mikroglia zelulek betetzen dituzten funtzio ezberdinen irudikapen eskematikoa. NSZ-eko zelula immuneak izateaz gain, mikrogliek hainbat funtzio dituzte ehunaren homeostasia mantentzeko. Mikrogliek zirkuitu eta patrioiak modulatzeko garapenean dagoen NSZ-ean neuronen dentsitatea erregulatuz, apoptosia eraginez, zelula apoptotikoak fagozitatuz, faktore neurotrofikoak askatuz eta odol-hodien garapena gidatuz. Garun heldu osasuntsuan ere funtzio garrantzitsuak dituzte zirkuitu neuronalen sorrera eta heldzea modulatzeko eta neurogenesia erregulatuz. (*Kierdorf eta Prinz, 2017*).

## 2.2 Mikroglia aktibazioa

Mikroglia aktibazioaren ezaugarriak esanguratsuenetakoa NSZ-aren homeostasiaren aurkako mehatxuen aurrean duen erreakzio bizkorra da. Agente infekziosoek, traumek edo kaltetutako zelulek askatutako neurotransmisoreek mikroglia aktibazioa bezala ezagutzen den zelulen eraldaketa morfologikoa, genetikoa eta funtzionala eragiten dute (*Sousa et al., 2017*). Mikroglia aktibatuan zelulen azaleko markatzaileen eta hanturazko geneen adierazpena aldatzen dira, prozesuak atzeratu eta morfologia amebiarra hartzen du, migrazioa eta proliferazioa ematen dira eta fagozitosi ahalmena areagotzen du (*Kettenmann et al., 2011*).

Ingurune mota guztiak hautemateko, eta horien aurrean behar bezala erreakzionatzeko, mikroglia aktibazioa hanturazko barietate handia adierazten du (Fc hanturazkoak, "Toll-like" hanturazkoak, hanturazko purinergikoak, etab.) (*Domercq et al., 2013; Kigerl et al., 2014*). Hanturazko hanturazko batzuk "hanturazko patrioi-egutzaile" gisa sailkatzen dira (PRR), infekzioak hauteman

ditzaketelarik “patogenoen proteina-espezifikoen” bidez (PAMP) eta zelula barneko arazoak “kalteari-loturiko patroi molekularren” bidez (DAMP) (Kigerl et al., 2014).

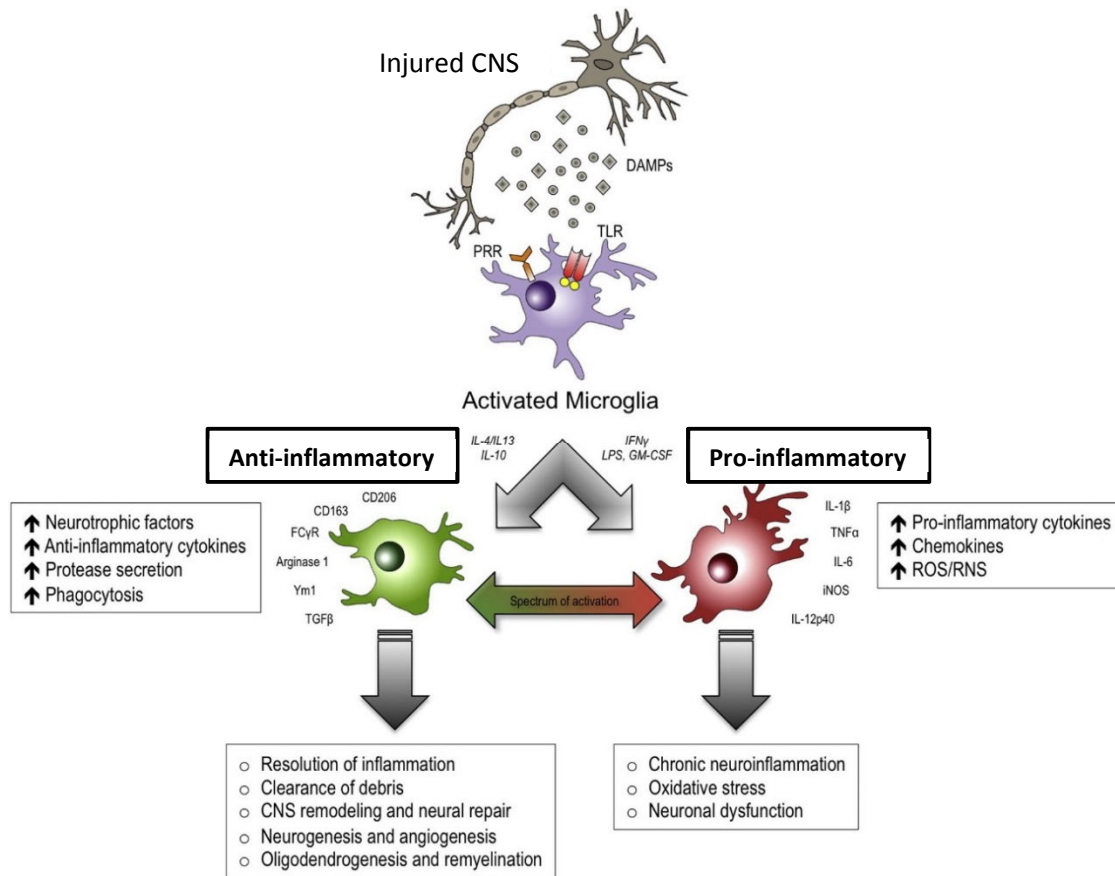
Mikrogliaaren aktibazioa NSZ-ren aurkako mehatxuen aurreko erantzun naturala da, zelulen hondakinak eta zelula apoptotikoak kentzeko eta ehunen konpontzea bultzatzeko. Mikroglia aktibazio fenotipo ezberdinak izan ditzake estimulu ezberdinen aurrean edo gaixotasunen progresio dinamiken fase ezberdinen aurrean. Mikroglia antigeno-aurkezle bezala ere jokatu du eta zitokinak aska ditzake garuneko erantzun immunea hedatu eta denboran luzatuz (Walter eta Neumann, 2009; Yenari et al., 2010). Mikroglia aktibazioa NSZ-eko baldintza patologiko gehienetan, agian guztietan, ematen da, baina funtzio onuragarria, kaltegarria edo, zurren biak, dituen oraindik eztabaida gai da.

Klasikoki-aktibatutako mikroglia (pro-hanturazko) eta alternatiboki-aktibatutako mikroglia (anti-hanturazko) terminologia oso erabilia izan da mikroglia aktibazioa deskribatzeko. Definizio hau immunologia eremutik dator, makrofagoen aktibazio ezberdinak deskribatzeko erabilia baita (Boche et al., 2013). Mikroglia zelula immunologiko oso heterogeneoa da, aktibazio espektro oso zabalarekin (Xue et al., 2014), beraz pro-hanturazko edo anti-hanturazko mikroglia espektro zabal honen bi ertzak izango liriteke (**5. irudia**) (Mosser eta Edwards, 2008; Murray et al., 2014; baina ikusi Ransohoff, 2016 ere). Nahiz eta sailkapen horrek mikrogliaaren plastizitatearen konplexutasuna gutxietsi, gaixotasunen patogenesisian sortzetiko immunitate sistemaren funtzio ezberdinen inguruko informazio erabilgarria ematen du.

Pro-hanturazko mikroglia LPS eta IFN- $\gamma$ -ren presentzian aktibatzen da eta metabolito oxidatzaileak, proteasak eta hantura bultzatzen duten zitokina ugari askatzen ditu. Fenotipo hau, patogenoen aurkako NSZ-aren defentsekin erlazionatzen da, baina neurona eta glia zelula osasuntsuak ere kaltetu ditzake hantura zitokinak, oxigeno espezie erreaktiboak, NO eta glutamatoa bezalako faktore neurotoxikoak askatuz. Ondorioz gaixotasun neuroendekatzailen patogenesisia konplexuago egin dezake (Walter eta Neumann, 2009; Yenari et al., 2010).

Bestalde, anti-hanturazko mikroglia IL-4 eta IL-13aren presentzian aktibatzen da eta IL-10 eta arginasa askatzen ditu beste hainbat faktoreren artean. Mikroglia neurobabesle edo birsortzaile bezala ere ezagutzen da hanturaren gutxitzean, ehunen konpontzean eta angiogenesisian duen eraginagatik (Czeh et al., 2011). Fenotipo honek hanturaren-aldeko erantzuna blokeatu du faktore neurotrofikoak ekoiztuz (nerbio hazkuntza faktorea, (NGF),

BDNF, GDNF, eta hanturaren aurkako zitokinak) eta gainera, fagozitosi ahalmen areagotua aurkezten du (Czeh *et al.*, 2011).



**5. irudia.** Mikroglia funtzio garrantzitsu eta ezberdinak ditu neurohanturan. Mikroglia neurobabeslea izan daiteke faktore neurotrofikoak eta hanturaren-aurkako zitokinak askatuz edo neurotoxikoa hanturaren-aldeko faktoreak eta sustantzia zitotoxikoak askatuz (Egokitua *Loane et al.*, 2016).

### 2.3 Mikroglia/makrofagoak EA-ean

EA immunitate-bidezko NSZ-eko gaixotasuna da, eta lesio guneetan aktibatutako mikroglia/makrofagoak aurkitzen dira axoien kaltetzearekin korrelazionatuz (*Lucchinetti et al.*, 2000; *Prineas et al.*, 2001). EAE-an, hezur muineko monozito aktibatuen kopuruak gora egiten du saguak immunizatu eta berehala, eta monozito hauek odolean pilatzen dira NSZ-era sartu aurretik (*King et al.*, 2009; *Mildner et al.*, 2009). Zelula immuneen infiltrazioa bizkarrezur muinean, lehen sintomen agertzearekin batera ematen da (*King et al.*, 2009; *Mishra et al.*, 2012). Behin barrera hematoentzefalikoa hautsi denean, monozitoak NSZ-era sartzen dira eta zaildu egiten da mikroglia aktibatua eta monozitoak bereiztea. Berriki, korrelazio handia ikusi da monozitoen infiltrazioaren eta gaixotasunaren etapa paralitikorako progresioaren artean EAE-

an. Horrez gain, mikroglia zelulak hiltzen joaten dira eta monozitoen infiltrazioarekin korrelazioa du gertaera honek ere (Ajami et al., 2011). Gainera, sintoma klinikoak eta desmielinizazioa agertu baino lehen, mikroglia zelulek multzoak sortzen dituztela ikusi da odol-hodien inguruan (Davalos et al., 2012). Azkenik, EAE-ren etapa kronikoan, lesioetako T zelulen dentsitateak iada behera egin duenean, aktibatutako mikroglia/makrofagoen metatzea oraindik mantendu egiten da (Rasmussen et al., 2007; Vogel 2013). Ikerketa ugari daude abian mikroglia/makrofagoek gaixotasunaren etapa ezberdinetan duten funtzioa argitu nahian.

Mikroglia/makrofagoen aktibazioa EAE-ren patogenesiko lehen gertakarietako bat izan liteke, T zelulen garapenaren aurretik, ziurrenik berau eraginez antigenoen erakustearekin (Heppner et al., 2005; Ajami et al., 2011; Goldmann et al., 2013; Yamasaki et al., 2014; Yoshida et al., 2014). Hala ere, beste ikerketa batzuen arabera mikroglia/makrofagoen aktibazioak, prozesu patologikoaren aurka egingo luke faktore neurotrofikoak eta immunoezabatzaileak eskainiz eta sendatzea bultzatuz (Kotter et al., 2006; Miron eta Franklin, 2014; Lampron et al., 2015). Erantzun kontrajarri hauek mikroglia/makrofagoen aktibazio fenotipoaren arabekoak direla proposatzen da. Izan ere, T zelulek eta mikroglia elkarri eragiten duten fenotipo aldaketa, NSZ-aren oreka konplexuan aldaketa eragilerik garrantzitsuenetakoa da.

Gaixotasunaren hanturazko fase aktibo goiztiarrean, pro-hanturazko mikroglia/makrofago dira nagusi eta axoien kaltetzearekin korrelazionatzen dute. Beste aldetik, anti-hanturazko fenotipoak igoera graduala izaten du hantura prozesuan zehar lesio aktibo kronikoetaraino, non bermielinizazio eraginkorra gertatzen den (Miron et al., 2013).

Ikerketa berri batek emaitza hauek berretsi ditu sagu transgeniko-bikoitzak erabiliaz. Sagu hauek proteina gorri fluoreszentea (tdTomato) adierazten dute iNOSen (pro-hanturazko markatzailea) promotorearen ondoren eta proteina hori fluoreszentea (YFP) Arginasaren (anti-hanturazko markatzailea) promotorearen ondoren (Locatelli et al., 2018). iNOS adierazten zuten mikroglia/makrofagoen pilaketa ikusi zen EAE-aren sintoma goiztiarrenetan. Zelula hauen proportzioa gutxituz joan zen progresiboki gaixotasunak aurrera egin ahala, aldi berean arginasa adierazten zuten zelulek gora egin zutelarik. Gainera, zelula positibo-bikoitzetan iNOS/Arginasa ratioa ere aldatu egiten da denboran zehar, mikroglia/makrofagoen populazioarekiko paralelo. Hori dela eta zelula positibo-bikoitz hauek erdibideko polarizazio fasean daudela esan liteke (Locatelli et al., 2018). Datu hauekin bat eginez, EA-eko lesio aktiboetan, nahiz eta zelulek adierazten dituzten markatzaile nagusiak pro-hanturazkoak izan, mikroglia/makrofago gehienek erdibideko polarizazio fenotipoa adierazten dute (Vogel et al., 2013).

Pro-hanturazko mikroglia/makrofagoek antígeno-aurkezle gaitasun handiagoarekin erlazionatzen dira eta baita hanturazko zitokina eta oxigenoaren espezie errektiboen askapen handiagoarekin ere, guzti honekin patologia bultzatuz (*Benarroch, 2013*). NSZ-ean hantura ematen denean mikroglia IL-1 $\beta$  eta TNF $\alpha$  bezalako zitokinak ekoizten ditu besteak beste. Bi zitokina hauek NSZ-eko hanturaren garatzearekin erlazionatu izan dira barrera hematoentzefalikoaren apurtzea eraginez, honek linfuzitoen NSZ-erako sarrera errazten duelarik (*Nishioku et al., 2010; Wang 2014*). Horrez gain, TNF $\alpha$  mikroglia bidezko neurotoxizitatearekin ere erlazionatu izan da (*Block et al., 2007*).

Anti-hanturazko mikroglia/makrofagoek, hainbat anti-hanturazko zitokina askatzen dituzte. IL-4, IL-10, IL-13, IL-33, eta TGF- $\beta$  dira zitokina horietako batzuek eta EAE-aren gelditzearekin (*Jiang et al., 2012*), hanturaren amaitzearekin eta ehunen konpontzearekin daude erlazionatuta (*Laria et al., 2016*). Aktibazio fenotipo honetan mikroglia/makrofagoek faktore neurotrofikoak eta hazkuntza faktoreak ere askatzen dituzte, OPC-ak lesio guneetara hurbilaraziz eta heldutasunera bultzatuz, eta honekin neuronak babestuz (*Butovsky et al., 2006; Mikita et al., 2011; Starossom et al., 2012; Miron et al., 2013; Yu et al., 2015*).

Guzti honez gain, anti-hanturazko mikroglia/makrofagoek Th2 linfuzito laguntzaileen eta linfuzito erregulatzaileen aktibazioa eragin dezakete. Linfuzito hauek funtzio garrantzitsua dute hantura erregulatzen eta gaixotasunaren progresioa kontrolatzen, baita Th1 linfuzito laguntzaileen aktibitatea gutxitzen eta pro-hanturazko zitokinen askatzea murrizten ere (*Mosser eta Edwards, 2008*). Fenotipo birsortzaile honek, pro-hanturazko fenotipoak baino fagozitosi gaitasun handiagoa du, eta jakina denez, mielina hondakinak fagozitatzea OPC-ak hurbilarazteko eta diferentziazioa emateko beharrezkoa da bermielinizazioa has dadin (*Kotter et al., 2006; Denney et al., 2012; Tierney et al., 2009*). Azkenik, pro-hanturazko fenotipetik anti-hanturazkorako aldaketa oztopatzeak bermielinizazioak huts egitea eragin dezakeela arrazoitu izan da EA-ren lesio inaktibo kronikoetan (*Miron et al., 2013; Sun et al., 2017*).

### 2.3.1 Mikroglia bermielinizazioan

Gaur egun oraindik, SNZ-ak birsortzeko gaitasun txikia duela pentsatzen du gehiengoak, baina honen aurkakoa da oligodendrozito edo mielinen lesioen ondoren ematen den erantzun birsortzaile indartsua, mielina izara berriak eratuz “bermielinizazioa” izeneko prozesuan (*Franklin, 2002; Franklin eta Ffrench-Constant, 2008*). Erantzun birsortzaile hau nabarmenagoa da EAE-dun animalia gazteetan eta gizakietan ere ematen da EA-k eragindako lesioen ondoren

(Prineas et al., 1993; Patrikios et al., 2006; Patani et al., 2007; Franklin eta Ffrench-Constant, 2017).

Naiz eta bermielinizazioa oso eraginkorra izan EA-aren etapa goiztiarretan, huts egiten du etapa kronikoagoetan. Normalean mielina izarek emandako sostengu metabolikoa galtzeak, axoien eta neuronen endekapena areagotzen du eta baita ezintasun progresiboa ere, EA-aren etapa berantiarraoan ezaugarri (Nave et al., 2010; Franklin et al., 2012).

Bermielinizazio prozesuaren etapa garrantzitsu guztiak ongi ezarrita daude gaur egun. Desmielinizazioari erantzunez, lesioaren inguruan dauden OPC-ak aktibatuta izaten dira eta ziklo zelularrean sartzen dira (Moyon et al., 2015). Behin aktibatuta, kaltetutako eremuan zehar sakabanatzen dira proliferazio eta migrazio bidez eta azkenik, heldutasuna lortzen dute prozesuaren amaieran mielinazko izara berriak eratuz axoien inguruan (Zawadzka et al., 2010; Tripathi et al., 2010). Mielinazko izara berri hauek garapenean zehar sortutakoak baino meheagoak izan ohi dira, ezaugarri oso erabilgarria bermielinizatutako eremuak eremu normaletatik bereiztu ahal izateko (Blakemore, 1974).

OPC-ak aktibatuzeko prozesuak hainbat dira eta ez daude guztiz deskribatuak. Zelula hauen aktibazioa kontrolatzen duen mekanismoetako bat ehunen kaltetzearen eraginez sortutako sortzetiko erantzun immunea da. Sortzetiko sistema immuneko zelulak, bai mikroglia eta baita makrofagoak ere, zelula aitzindarien aktibazioa, proliferazioa eta migrazioa bultzatzen duten faktoreen ekoizle nagusiak dira (Franklin eta Ffrench-Constant, 2017). Mikroglia/makrofagoek ekoiztutako hainbat molekulek OPC-engan eragin zuzena dute. Aspalditik jakina da IGF-1 eta TGF- $\beta$  faktoreak OPC-en heldutasuneranzko diferentziazioa bultzatzeko gai direla *in vitro* (McMorris eta Dubois-Dalq, 1988; McKinnon et al., 1993) eta A-aktibina ere OPC-ak heldutasunera iristeko ezinbesteko faktorea dela (Miron et al., 2013).

Anti-hanturazko mikroglia/makrofagoek OPC-en heldutasuna bultzatzen duten faktoreak ekoizten trebeagoak dira pro-hanturazkoak baino (Miron et al., 2013) eta denboran zeharreko pro-hanturazkotik anti-hanturazkorako aldaketa ezinbestekoa da bermielinizazioa azkar eta eraginkorra izan dadin.

Honez gain, beste ikerketa batzuk mikroglia/makrofagoen fagozitosi gaitasunaren efektu onuragarrietan sakondu izan dute, zehazki mielina hondakinak desagerrarazteko duten ahalmenean (Kotter et al., 2005; Döring et al., 2015; Lampron et al., 2015). Toxina-bidezko desmielinizazio ereduaren bidez ikusienez, mielina hondakinez betetako mikroglia/makrofago kopuruak eta bermielinizazio eraginkorra korrelazionatuta daude (Kotter et al., 2005; Lampron

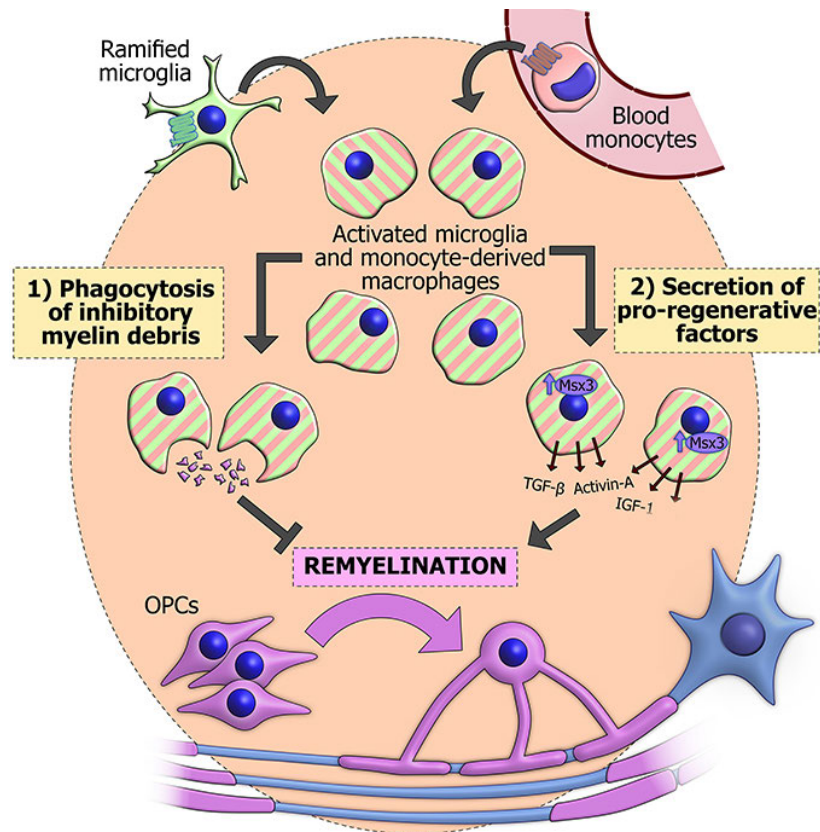
*et al., 2015*). Mielinak OPC-en heldutasunerako prozesua oztopatzen du, NSZ osasuntsuan axoirik ez dagoen lekuetan OPC-ak heldutasunera iristea oztopatuz. EA bezalako gaixotasun desmielinizatzaileetan, mielina hondakin ugari sortzen da OPC-en heldutasunerako prozesua oztopatuz eta beraz, garbitu beharra dago OPC-ak heldutasunera irits daitezzen eta bermielinizazioa eman dadin. Hau dela eta, mikroglia/makrofagoek mielina hondakinak fagozitzatzeko duten gaitasunak eragin zuzena izango du prozesu birsortzailean.

Ondorioz, bi mekanismo hauen konbinaketaz, mikroglia eta makrofagoek birsortzea errazteko ingurunea sortzeko ahalmena dute OPC-en eta bermielinizazioaren potentziala maximizatuz (**6. irudia**).

Prozesu birsortzaileak adinarekin gero eta murriztuagoak izatea prozesu birsortzaile guztien ezaugarria da (*Goodell et al., 2015*) eta bermielinizazioak ere geldotze progresiboa izaten du helduaroan aurrera egin ahala (*Shields et al., 2000; Hampton et al., 2012; Pfeifenbring et al., 2015*). Adinaren eragina ez da mikroglia/makrofagoen mobilizazioaren atzerapenean bakarrik nabaritzen, baita mielina hondakinak fagozitzatzeko gaitasunaren murriztean ere. Orain gutxi ikusi denez, adinarekin mikroglia/makrofagoek kolesterolean aberatsak diren mielina hondakin gehiegi metatzen dituzte eta honek kolesterol-kristalak sortzen ditu, ondorioz fagolisosomen mintza hautsiz. Arazo honek erantzun immune ez-kontrolatua eragin dezake eta ondorioz birsortzea oztopatu (*Cantuti-Castelvetri et al., 2018*). Gainera, badirudi mikroglia/makrofagoen populazioa pro-hanturazko fenotipotik anti-hanturazkora aldatzeko prozesua ere atzeratu egiten dela adinarekin (*Franklin eta Ffrench-Constant, 2017*).

Lehenago aipatu bezala, mikroglia zelulek izugarriko plastizitatea erakusten dute lesioen aurrean erantzuterako orduan eta plastizitate ahalmen horren barruan, hantura eteteko eta birsortzea bultzatzeko ere gai dira. Gaitasun hau dela eta, agertzen ari diren estrategia berriek, mikroglia efektu onuragarrietara eramatea dute helburu, honekin fenotipoaren aldaketa kontrolatzen duten mekanismoak ulertu nahirik. Mikroglia zelulak tratatzeko aukera ugari aurkeztu dira azken aldian agente farmakologiko, zitokina, mezulari lipidiko, mikroRNA edo terapia immunomodulatzaileen bidez (*Fumagalli 2018*). Mikroglia zelulak fenotipo onuragarriantz berprogramatu ahal izateak aukera terapeutiko berriak sortuko lituzke pro-hanturazko mikroglia-efektu kaltegarriak ekidinez eta gehiegizko hantura kontrolatuz garuneko gaixotasunetan.





**6. irudia.** Mikroglia/makrofagoen funtzioak bermielinizazio prozesuan. Mikroglia/makrofagoek mielina hondakinak fagozita ditzakete (1) eta faktore birsortzaileak askatu (2). Bi gaitasun hauen konbinaketak OPC-en heldutasuna lortzea eta ondorioz axoi biluzien inguruan mielinazko izara berriak sortzea eragingo du (Eraldatua McMurrin et al., 2016).

### 3. SEINALIZAZIO PURINERGIKOA

Sistema purinergikoaren ezaugarri ikusgarriena ATPak bete ditzakeen funtzio ezberdinak dira: energia iturri, neurotransmisore eta immunomodulatzaile. ATP molekula 1929an deskribatu zen lehen aldiz eta ondorenean, sistema biologikoen energia iturri unibertuala dela guztiz onartua izan zen. Geroago, purinak seinalizazio extrazelularreko molekula izan zitezkeela ikusi zen eta Burnstockek ATP-ak neurotransmisorea definitzen zuten kriterio guztiak betetzen zituela erakutsi zuen. Gaur egun onartua dago ATP extrazelularrek neurotransmisore gisa edo ko-transmisore gisa jokatzeko duela nerbio sistema periferikoko (NSP) eta NSZ-eko nerbio gehientsuenetan (Burnstock, 2006; Khakh eta North, 2012). Ehun

osasuntsuetan, espazio extrazelularrera askatzen den ATP estuki erregulatuta dago ektonukleotidasen lanaren bidez, ATP-aren seinalizazioa etenaz (*Cardoso et al., 2015*).

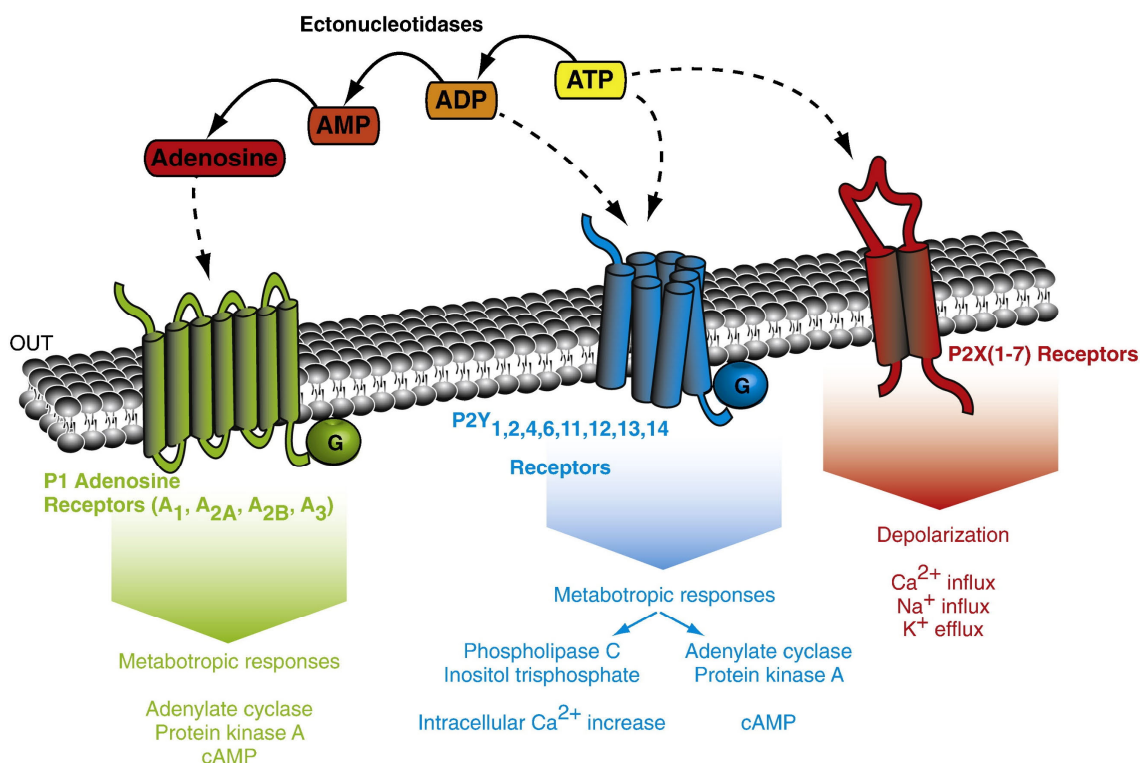
Seinalizazio purinergikoa adenosina eta ATP bidez ematen den seinalizazio extrazelularra da. Seinalizazio honek, hartzaille purinergikoen aktibazioa eragiten du eta honek aldi erean, zelulako hainbat funtzio erregulatzen ditu. Adenosina eta ATP bidezko seinalizazio purinergiko hau ezinbestekoa da zelulen seinalizaziorako eta zelulen arteko komunikaziorako NSZ-ean (*Burnstock, 2017*).

Honez gain, ATP sortzetiko immunitatearekin erlacionatutako “kalteari-loturiko patroik molekular” (DAMP) bezala klasifikatua izan da (*Junger, 2011*). Zelula immuneek, patogenorik ez dagoenean, lesioak antzematen dituzte zelulek mediora askatutako molekulen bidez, molekula hauek normalean zelula barruan aurkitzen direlarik. Molekula hauek DAMP edo arrisku-seinale endogeno bezala ezagutzen dira (*Di Virgilio, 2007*). Kaltetutako zelulek ATP askatzen dutenean hanturazko erantzuna hasten da eta P2 hartzaillearen aktibazioaren eraginez erantzun hau gehiago zabal eta mantentzen daiteke (*Domercq et al., 2013; Idzko et al., 2014*).

### 3.1 Hartzaille purinergikoak

Purinen efektu fisiologikoak hartzaille purinergikoen familien bidez ematen dira (**7. irudia**). Bi hartzaille familia bereizten dira (*Burnstock, 1978*):

- P1 hartzailleak: G-proteinei loturiko adenosinaren hartzaille metabotropikoen familia. Gaur egun 4 azpitalde bereizten dira (A1, A2A, A2B, A3).
- P2 hartzailleak, bi azpitaldetan bereiziak:
  - P2X hartzailleak: ATP bidez aktibaturiko katioien kanal ez-selektiboak, Ca<sup>2+</sup>-rekiko iragazkortasun handikoak. 7 gene ezberdin izan dira identifikatuak: P2X1R, P2X2R, P2X3R, P2X4R, P2X5R, P2X6R eta P2X7R.
  - P2Y hartzailleak: G-proteinei loturiko hartzaille metabotropikoak. Hartzaillearen arabera ATP, adenosina difosfato (ADP), uridina di- eta trifosfato (UDP eta UTP) edo UDP-glukosa bidez aktibatua. Behin aktibatuta, hartzaille hauek C fosfolipasa aktibatzen dute eta kaltzio intrazelularra askatzen dute edo adenilil ziklasari eragiten diote eta cAMP kantitateak aldatzen. 8 hartzaille mota bereizten dira: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14.



**7. irudia.** Hartzaille purinergikoen familia: P1, P2Y eta P2X. ATP extrazelularra P2X eta P2Y hartzailleek agonista da. Horrez gain, degradatua izaten denean adenosina sortzen da eta honek P1 hartzailleak aktibatzen ditu. Prozesuan ADP bezalako molekula bitartekariak sortzen dira, P2Y hartzailleek agonista (*Baroja-Mazo et al., 2013*).

### 3.2 ATP hartzailleak mikroglian

Hainbat gaixotasun neurologiko eta NSZ-eko lesio, hasierako mikrogliaren lesio generainoko migrazioa dute ezaugarri amankomun eta baita proliferazioaren eraginez, gerora ematen den zelula hauen metaketa ere. Migrazio eta metatze honen seinale eragilea, faktore azkarki barreiarria behar du izan, adibidez ATPa (*Domercq 2013*). Mikroglia zelulek hartzaille purinergiko ugari adierazten dituzte, zelulen hainbat funtzio kontrolatuz. Funtzio horien artean prozesuen luzatze eta laburtzea, migrazioa, proliferazioa, zitokinen ekoizpena eta fagozitosia daude (*Domercq et al., 2013*).

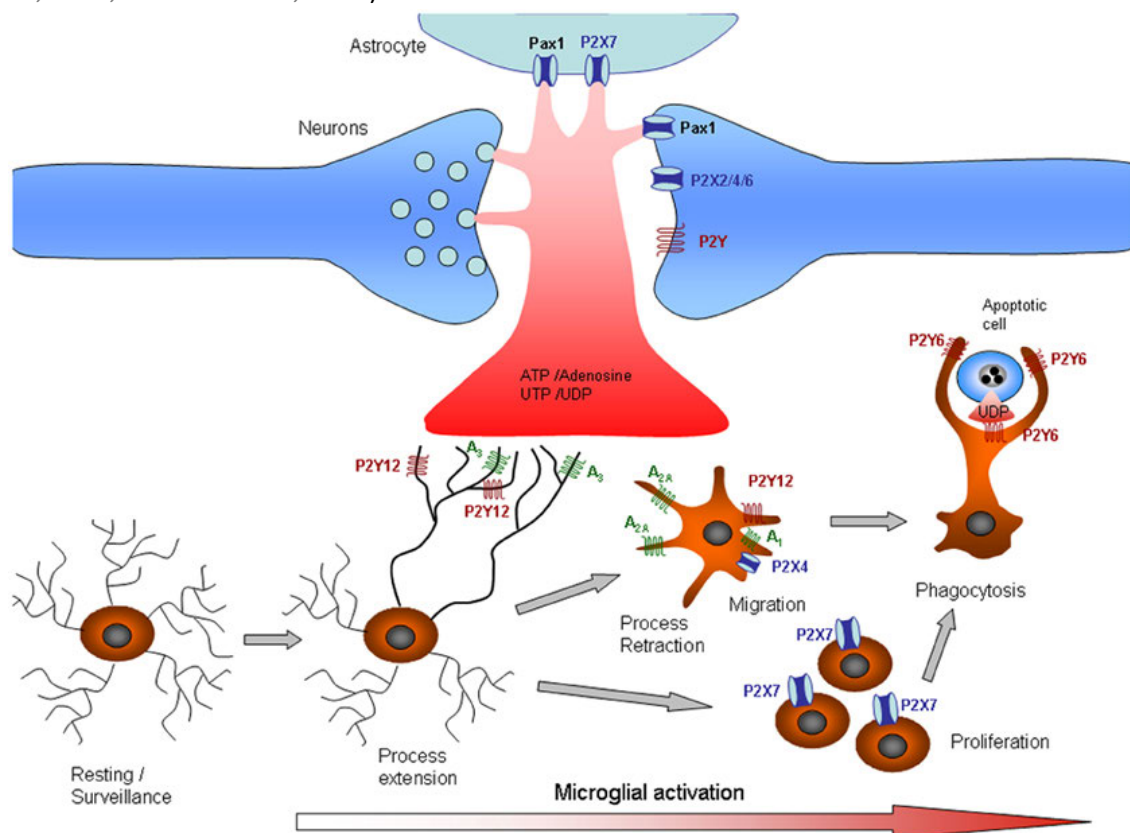
P2X eta P2Y hartzailleak bereziki garrantzitsuak dira mikroglia zeluletan, batez ere P2X4 eta P2X7 hartzaille ionotropikoak eta P2Y12 hartzaille metabotropikoa. Garun heldu osasuntsuan, mikrogliak P2X4R eta P2X7R kantitate txikian adierazten ditu (*Matute et al., 2007; Ulmann et al.,*

2008) eta P2Y12R kantitate handian (Haynes et al., 2006). Gaixotasun egoeran aldiz, hartzaille purinergikoen adierazpena aldatu egiten da. Hainbat gaixotasun neuroendekatzailleetan P2X7R gainadierazi egiten da hantura guneetan (Parvathenani 2003; McLarnon 2006; Arbeloa et al., 2012; Kimbler et al., 2012). P2X7R-ren antzera, hanturazko gaixotasunetan P2X4R ere gainadierazi egiten da mikroglia aktibatuan (berrikusia, Domercq et al., 2013). Bestalde, P2Y12 hartzaillearen adierazpena murriztu egiten da mikrogliaaren aktibazioarekiko paralelo (Haynes 2006; Beaino 2017). NSZ osasuntsuan mikrogliaaren prozesu finen mugimendua P2Y12 hartzaillearen bidez erregulatzen da. Gaixotasun egoeran, ATP askatzen da lesio gunean eta inguruko eremuetara iristen den ATP kontzentrazio txikiak, inguruko P2X4 eta P2Y12 hartzailleak aktibatzen ditu, mikrogliaaren kemotaxia kontrolatuz lesio gunerantz (Honda et al., 2001; Ohsawa et al., 2007). Mikroglia lesio gunera mugitzen denean P2Y12 hartzaillea galdu egiten du mikrogliaaren aldaketa morfologikoarekiko paralelo eta zelulak morfologia adarkatutik morfologia amebiarreara igarotzen dira. Mikroglia aktibatuan P2Y12 hartzaillearen galtzeak, hartzaille honek mikrogliaaren hasierako etapetan duela eragina adierazten digu. Bestalde, P2X4 hartzaillearen gainadierazpenak lesioen ondorengo kemotaxiaren erantzule izan daitekeela adierazten du (Ohsawa et al., 2007).

P2X7 hartzailleak ATParekiko afinitate txikia du eta egoera normaletan ATParen kantitate extrazelularra nanomolar neurrikoa izaten da ektonukleasen bidezko desaktibazio bizkorra dela eta (Abbracchio 2008). Arrazoi honengatik ez dago argi P2X7 hartzaillea egoera fisiologikoetan aktibatzen ote den edo ez. Lesio guneetan ATP kontzentrazio handiagoak aurki daitezke, eta honek, P2X7 hartzaille aktiba dezake (Di Virgilio 2016). P2X7 hartzailleak funtzio garrantzitsua du mikrogliaaren aktibazioan, proliferazioan, pro-hanturazko zitokinen askatzean eta heriotza zelularrean (Burnstock 2012). Zelula immuneetan, P2X7 hartzaillearen aktibazioak “inflamasonaren” eraketa, pro-hanturazko IL-1 $\beta$  eta IL-18 zitokinen askatzea eta azkenik, “piroptosi” izeneko pro-hanturazko programaturiko heriotza zelularra eragiten ditu. P2X7 hartzaillea ez da desensitizatzen eta aktibazio mantenduak mintza zeharkatzen duen poro handi baten eraketa eragiten du, pisu molekular handiko molekulak igaro daitezkeelarik bertatik, azkenik heriotza zelularra eraginez (Harada et al., 2011).

Fagozitosia gehienbat kaltetutako edo hildako zelulen azaleko “jan-nazazu” seinaleen bidez aktibatzen den arren, kaltetutako neuronek UDP ere aska dezakete eta P2Y6 hartzailleak aktibatu. Honen ondorioz, mikroglia zeluletan fagozitosia aktibatuko da (Koizumi et al., 2007). Fagozitosiaz gain UDPak kemokinen adierazpena ere bultzatzen du (Kim et al., 2011). Bestalde,

P2X7 eta P1 hartzailen aktibazioak mikroglia zelulen fagozitosi gaitasuna murrizten du (Fang et al., 2009; Bulavina et al., 2012).



**8. irudia. Seinalizazio purinerjikoak mikroglial.** Kaltetutako zeluletatik jarriotako nukleotido/nucleosidoek mikroglial eraldaketa fenotipikoak eragiten dituzte. Mikroglia aldaketa graduala jasaten du azaleko markatzaileak aldatuz, inflamazioari loturiko geneen adierazpena aldatuz, prozesuak laburtuz, eta beraz morfologia amebiarra hartuz, migratuz eta fagozitosi gaitasuna handituz. Aldaketa hauek hein batean hartzaile purinerjikoaren adierazpen aldaketak eraginak dira, honela ATP-arekiko erantzun ezberdinak sortuz. Prozesuen laburtzea P2Y12R-ren adierazpenaren murriztearen eraginez ematen da, migrazioa berriz P2X4 hartzailaren bitartez eta proliferazioa P2X7R-ren eraginez. Fagozitosia P2Y6 hartzailaren aktibazioaren eraginez areagotzen da (Domercq et al., 2013).

### 3.3 P2X4 hartzaila NSZ-ean

P2X4 hartzailak egitura homomerikoa edo heteromerikoa sor dezake P2X6R, P2X7R eta P2X1R-rekin batera. Bizkor aktibatzen da ATP-arekin eta P2X7R-ren antzera P2X4 hartzailak iragazkortasun handia du  $\text{Ca}^{2+}$ -arekiko, desensitizazio motela eta ATP-arekiko afinitate handiagoa.

Hartzaila hau ugari adierazten da NSZ-ean (Buell et al., 1996; Soto et al., 1996; Tsuda et al., 2003; Guo eta Schluesener, 2005; Amadio et al., 2007; Vazquez-Villoldo et al., 2014).

Neuronetako P2X4 hartzaila NSZeko funtzio fisiologikoetan aritzen da neurotransmisioa modulatu eta sinapsien sendotzean parte hartuz (*Rubio eta Soto, 2001; Sim et al., 2006; Baxter et al., 2011*). Glia zelulen kasuan, astrozito eta oligodendrozoitoetan ez da P2X4R aurkitzen. Esperimentu elektrofisiologikoek erakutsi dutenez astrozitoek eta oligodendrozoitoek ez dute P2X4R-bidezko korronterik sortzen (*Lalo et al., 2008; Laboratory data*). Bestalde, mikroglia zelulek P2X4R ugari adierazten dute garunean eta bizkarrezur muinean eta zelula hauetan hartzaila honek dituen funtzioek interes handia sortu dute azken hamarkadetan (*Tsuda et al., 2003; Ulmann et al., 2008*).

Lehen aipatu den bezala, P2X4R gainadierazi egiten da mikroglia zeluletan EAE-dun arratoietan eta baita EA duten gaixoen nerbio optikoetan ere (*Guo eta Schluesener, 2005; Vazquez-Villoldo et al., 2014*). Gainera, P2X4R-ren gainadierazpena duen mikroglia fenotipo konkretua deskribatu dute nerbio-lesio periferikoaren (*peripheral nerve injury, PNI*) ondoren (*Tsuda 2003; Beggs 2012*). Beste ikerketa batzuek P2X4R-ren gainadierazpena ikusi dute hipoxiaren eta iskemiaren ondoren (*Wixey et al., 2009; Li et al., 2011*), baita kainato-bidez eragindako epilepsia ereduaren ere (*Ulmann et al., 2013*).

P2X4R, minaren prozesamenduan lotu zen lehen aldiz prozesu patologikoekin. Tsuda eta kolaboratzaileek P2X4R-ren partehartze garrantzitsua deskribatu zuten min kronikoan eta alodinia mekanikoan (*Tsuda et al., 2003*). P2X4R-ren aktibazioak bizkarrezur muineko mikroglia BDNF-ren askatzea eragiten du eta honek mikroglia eta interneuronen arteko komunikazioa sortzen du minarekiko hipersentsibilitatea eraginez (*Tsuda et al., 2003; Coull et al., 2005; Ulmann et al., 2008; Trang et al., 2009*). PNIak eragindako alodinia, P2X4R-ren blokeatze farmakologikoarekin leheneratzen da bizkarrezur muinean (*Tsuda et al., 2003*) eta P2X4<sup>-/-</sup> saguek hanturazko erantzun eta min neuropatiko gutxiago aurkezten dute (*Ulmann et al., 2008*). Aurkikuntza hauek, P2X4R-ren garrantzia azpimarratzen dute mikroglia zeluletan min neuropatikoaren garapenean (berrikusia *Inoue eta Tsuda, 2012; Tsuda et al., 2013*).

Alzheimerra eta Parkinsona bezalako hainbat gaixotasun neuroendekatzaileetan neurohantura ematen da (*Ransohoff, 2016*) eta badirudi, mikroglia zelulek funtzio garrantzitsua dutela prozesu honetan (*Saijo eta Glass, 2011; Joers et al., 2016; Wes et al., 2016*). P2X4R mikroglia hainbat funtzioaren erregulazioan murgildua dago, beraz NSZ-eko hantura erregulatzen edo areagotzen ere izango du eraginik. Honekin lotuta, P2X4R-ren antagonistek (TNP-ATP eta 5-BDBD) mikroglia aktibazioa gutxitzen dutela *in vivo* eta mikroglia heriotza ekiditen dutela ikusi izan da bizkarrezur muinean LPS-bidezko neurohantura ereduaren (*Vazquez-Villoldo 2013*).

P2X4 hartzaileak badu beste berezitasun bat kokapenari dagokionez: hartzailea gehienbat zelularen barnean kokatzen da, bereziki lisosometan (Qureshi et al., 2007; Toyomitsu et al., 2012). Ezaugarri honek esanahi garrantzitsua izan lezake bere funtzioa aztertzerakoan. Azken urteetan ikusi denez, P2X4 hartzaileak ATP bidezko kanal bezala funtziona lezake lisosometan (Huang et al., 2014) eta endolisosomen mintzen fusioa kontrola lezake kalmodulinaren Ca<sup>2+</sup> bidezko aktibazioaren bidez (Cao et al., 2015).

### 3.3.1 IRF5-P2X4R ardatza

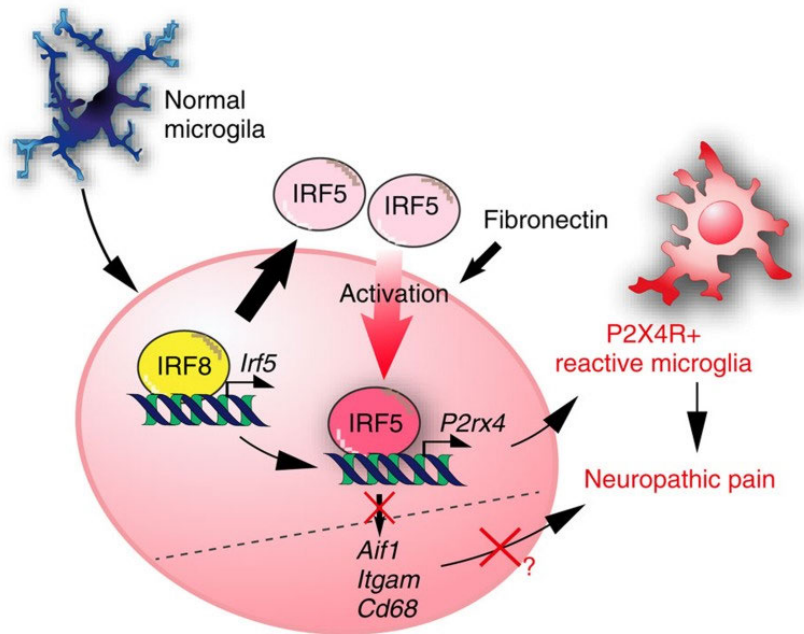
Faktore interferon erregulatzaile (*interferon regulatory factor*, IRF) transkripzio faktoreen familia apoptosia, ziklo zelularra, onkogenesia eta patogenoek eragindako seinaleei erantzuteko geneen erregulazioa bezalako funtziotan dago inplikatur. Ugaztunen IRF familiak 9 kide ditu (IRF1-9) (Zhao et al., 2014).

IRF familiako kideen artean IRF5ak paper garrantzitsua betetzen du hantura prozesuan. IRF5-ak hainbat pro-hanturazko zitokinen ekoizpena bultzatzen du: IL-6, IL-12, IL-23 eta TNF- $\alpha$  (Takaoka et al., 2005; Krausgruber et al., 2011). IRF5 ugari adierazten da monozito eta makrofagoetan eta faktore gakoa da makrofagoen hanturazko fenotipoa definitzeko orduan, baina B linfzitoek eta zelula dendritikoek ere adierazten dute. Makrofagoetan faktore honen adierazpena areagotu egiten da hanturazko ingurune baten aurrean eta bereziki GM-CSF eta IFN- $\gamma$  estimuluaren aurrean (Krausgruber et al., 2011; Weiss et al., 2013).

IRFen funtzioa NSZ-ean guztiz ezezaguna zen 2014an Masudak IRF8 gainadierazita zegoela ikusi zuen arte bizkarrezur muineko mikrogliak zeluletan PNIaren ondoren (Masuda et al., 2014). Interesgarriki, IRF5-aren adierazpenak mikrogliak aktibatuan, P2X4R-ren adierazpena bultzatzen du zuzenean *P2x4r* genearen promotoreari lotzen zaiolarik. Honekin bat eginez, IRF5<sup>-/-</sup> saguek ez dute P2X4R-ren gainadierazpena izaten bizkarrezur muinean PNIaren ondoren. Beraz, IRF8-IRF5 transkripzio ardatza, bizkarrezur muineko mikrogliak, P2X4R adierazten duen fenotipora igarotzerako prozesua bultzatzen duen ardatza da PNIaren ostean (Masuda et al., 2014).

Bestalde, *Irf5* genea arrisku faktore gisa identifikatua izan da hainbat gaixotasun autoimmuneetan. Lehen aldiz lupus eritematoso sistemikoarekin erlazionatu zen (Sigurdsson et al., 2005) eta gerora artritis erreumatoidearekin (Rueda et al., 2006), hesteetako hanturazko gaixotasunarekin (Dideberg et al., 2007) eta Sjögrenen sindromearekin ere erlazionatu izan da (Miceli-Richard et al., 2007; Shimane et al., 2009). Beraz, IRF5aren gehiegizko adierazpenak EA bezalako inflamazio bidezko gaixotasunen garatzea bultzatzen du. EA-an, *Irf5* genearen bi

polimorfismok (*single nucleotide polimorfism, SNP*) (rs4728142 eta rs3807306) asoziazio esanguratsua erakutsi dute hiru kohorte independeteetan eginiko ikerketan (*Kristjansdottir 2008*).



**9. irudia.** Ilustrazio eskematikoa mikrogliia P2X4R<sup>+</sup> fenotipoaren eredua eta min neuropatikoa erlazionatuz. (*Masuda et al., 2014*)



*HIPOTESIA ETA HELBURUAK*



Hartzaile purinergikoen adierazpena aldatuta aurkitzen da esklerosi anizkoitzean (EA) (Domercq et al., 2018). Bereziki, P2X4 hartzailearen adierazpena da hantura guneetan eta bizkarrezur muineko mikroglia zeluletan areagotzen den hartzailea EAE-dun arratoietan, eta baita EA-dun nerbio optikoen giza laginetan ere (Vazquez-Villoldo et al., 2014). Honekin bat etorritz, P2X4 hartzailearen adierazpena eta aktibitatea handitu egiten dira LPS-bidez aktibatutako mikroglia zeluletan (Vazquez-Villoldo et al., 2014). Datu interesgarriagoa da honakoa, P2X4 hartzailearen blokeatzeak LPS-bidez aktibatutako mikroglia biziaren biziraupena kontrolatzen du bai *in vivo* eta baita *in vitro* ere (Vazquez-Villoldo et al., 2014) eta EAE ereduaren sintomak larriagotzen ditu etapa kronikoan (Nuria Vazquez-Villoldoren datuak). Bestalde, P2X4 hartzailearen indartzeak EAE ereduaren sintomak hobetzen ditu. EA-n mielinaren berezko birsortzea ematen da, baina prozesua iragankorra da. Mikroglia eta makrofagoek osaturiko berriazko sistema immunearen erantzuna prozesu konpontzaile honen parte garrantzitsua da (Kotter et al., 2005; Li J et al., 2005; Miron et al., 2013). Mikroglia polarizazioa pro-hanturazko fenotipora edo anti-hanturazkora eramateko bideak, prozesu ezberdinek erregulatzen dituztela deskribatu izan da EAE gaixotasun ereduaren kurtsoan zehar eta anti-hanturazko fenotipora igarotzea ezinbestekoa da bermielinizazioa eman dadin. Datu guzti hauetan oinarrituz honako hipotesia proposatu genuen: P2X4 hartzailearen bidez mikroglia polarizazioa modulatu, mielinaren birsortzea bultzatu genezakeela.

Doktore tesi honen helburu orokorra P2X4 hartzailearen eginkizuna aztertzea izan da mikroglia zelulen aktibazioa modulatzeko eta esklerosi anizkoitzaren patofisiologian bai *in vitro* eta baita *in vivo* ereduetan.

Honetarako, hurrengo **helburu zehatzak** ezarri genituen:

**1. P2X4 hartzailearen funtzioa aztertzea EAE-aren patogenesisian**

**1.1 P2X4 hartzailearen blokeatzea:**

- P2X4 hartzailearen adierazpena aztertzea EAE ereduaren
- P2X4 hartzailearen blokeatzearen eragina ikertzea EAE-dun saguetan
- P2X4 hartzailearen blokeatzearen eragina aztertzea mikroglia polarizazioan *in vitro* eta oligodendroitoen diferentziazioan.

**1.2 P2X4 hartzailearen indartzea:**

- P2X4 hartzailearen indartzearen eragina aztertzea EAE eremuan
- P2X4 hartzailearen indartzearen eragina aztertzea mikrogliaaren polarizazioan *in vitro*.

**2.** IRF5aren funtzioa aztertzea:

2.1 IRF5-aren funtzioa aztertzea EAE eremuan

2.2 IRF5-aren funtzioa aztertzea lisolezitina-bidezko desmielinizazio eremuan

MATERIAL ETA METODOAK



## 1. ANIMALIAK

Esperimentu guztiak Sprague Dawley arratoiekin eta C57BL6 anduiko sagu basatiekin, P2X4<sup>-/-</sup>ekin eta IRF5<sup>-/-</sup>ekin burutu ziren. Prozedura guztiak helburu zientifikoekin erabilitako animaliak babesteko Europako Zuzentarauarekin bat gauzatu ziren (2010/63/UE), eta Euskal Herriko Unibertsitateko Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeak (AEEB) eta Gipuzkoako Aldundiak onetsi eta kontrolatu zituzten. Animaliak ohiko mantentze baldintzetan eduki ziren (22 ± 2°C, % 55 ± 10eko hezetasuna, argi/ilunpeko hamabi orduko zikloarekin eta ura eta janaria *ad libitum*) Euskal Herriko Unibertsitateko abeltegi zerbitzuan. Animalien oinazea eta erabili beharreko animalien zenbakia murrizteko ahalegin guztiak egin ziren.

## 2. IN VITRO EREDUAK

### 4.1 Mikrogliia zelulen hazkuntza

Glia zelulen hazkuntza mixto primarioa, arratoi eta sagu jaioberrien (P0-P2) garuneko kortexa erabiliz prestatu zen McCarthy eta De Vellis-ek deskribatutako protokoloa (*McCarthy eta De Vellis, 1980*) jarraituz. Garuneko kortextetik, digestio mekaniko eta entzimatiakoaren ondoren, suspentsio zelularra lortu zen eta aurretiaz poli-D-Lisinarekin (PDL) tratatutako 75 cm<sup>2</sup> -ko azalerako hazkuntza flaskoetan erein zen. Flaskoak Iscovek aldatutako Dulbecco-ren Medioan (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM*) mantendu ziren behi serum fetalarekin (% 10; *Fetal Bovine Serum, FBS*) nahastuta. Flaskoak 37°C-an, % 5 eko CO<sub>2</sub>-arekin eta atmosfera hezean kultibatu ziren.

Gutxi-gora-behera 15 egunen buruan, mikrogliia zelulak hazkuntza flaskoetatik isolatu ziren astintze mekaniko bidez. Mediora askatutako mikrogliia zelulak bildu eta plastikozko bakterien hazkuntzarako plaketan mantendu ziren 24-48 orduz gutxienez Dulbecco-k aldatutako Eagle-en Medioan (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM*) FBS-arekin (%10). Mikrogliia zelulak tripsinarekin inkubatu ondoren, plastikozko plaketatik askatu, jaso eta aurretiaz PDL-arekin tratatutako estalkidun 24 putzutzoko plaketan erein ziren (20.000 zelula/putzutzoko immunozitokimikarako; 100.000 zelula/putzutzoko Western bloterako; 200.000 zelula/putzutzoko medioak baldintzatzeko eta qPCRrako). Zelulak DMEM + % 10 FBS medioan mantendu ziren 37°C-an, % 5 eko CO<sub>2</sub> arekin eta atmosfera hezean eta 24 orduren ondoren erabiliak izan ziren.

Mikroglia zelulak Duraforten protokoloa jarraituz polarizatu ziren, aldaketa batzuekin (Durafort et al, 2012).

- Pro-hanturazko mikroglia: zelulak faktore granulozito makrofago kolonia estimulatzailearekin (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF, 5 ng/ml; Peprotech) tratatu ziren FBS-dun DMEM-ean 5 egunez eta ondoren 24 orduz lipopolisakaridoarekin (*lipopolysaccharide*, LPS, 10 ng/ml; Sigma) eta ganma-interferoiarekin (*Interferon- $\gamma$* , IFN $\gamma$ , 20 ng/ml; Peprotech).
- Anti-hanruazko mikroglia: zelulak faktore makrofago kolonia estimulatzailearekin (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF, 20 ng/ml; Peprotech) tratatu ziren FBS-dun DMEM-ean 5 egunez eta ondoren 24 orduz interleukina-4-arekin (*interleukin-4*, IL-4, 20 ng/ml; Peprotech) eta interleukina-13-arekin (*interleukin-13*, IL-13, 20 ng/ml; Peprotech).

Mikroglia oligodendrozitoen diferentziazioan zuen eragina aztertzeko, polarizatutako mikroglia medioa jaso eta OPC-ei gehitu zitzaion 3 egunez. Polarizazioko lehen 5 egunen ondoren, urrengo 24 orduetako faktoreak SATO medioan gehitu zitzaion mikroglia zelulei oligodendrozitoen proliferazioko eta diferentziazio faktorerik gabe (SATO-) (**1. taula**). Mikroglia polarizaziorako faktoreak, oligodendrozitoengan zuzenean probatuak izan ziren kontrol moduan.

**1. taula.** SATO- mediaren osagaiak.

Erreaktiboak	Kontzentrazioa	Konpainia
<b>DMEM</b>	Media Basea	Gibco
<i>BSA</i>	100 $\mu$ g/ml	Sigma
<i>N-Acetyl Cysteine</i>	6,3 ng/ml	Sigma
<i>Glutamine</i>	2 mM	Sigma
<i>Penicillin- Streptomycin</i>	100 U/ml	Invitrogen
<i>Insulin</i>	5 $\mu$ g/ml	Sigma
<i>Transferrin</i>	100 $\mu$ g/ml	Sigma
<i>Progesterone</i>	60 ng/ml	Sigma
<i>Sodium Selenite</i>	40 ng/ml	Sigma
<i>Putrescine</i>	16 $\mu$ g/ml	Sigma



#### 4.2 Oligodendrozoitoen zelula aitzindarien hazkuntza

Oligodendrozoitoen zelula aitzindariak (*oligodendrocyte progenitor cells*, OPCs) mikrogliaentzako eginiko zelula glialen hazkuntza mixto primario berdinetik lortu ziren. Flaskoetatik mikroglia isolatu ondoren, astrozitoen gainean aurkitzen ziren OPC-ak mediora askatu ziren flaskoak gau osoz astindu ondoren. OPC-dun flaskoko medioa jaso eta plastikozko bakterien hazkuntzarako plaketan isuri zen. Plakari itsatsi ez zitzaizkion zelulak (OPC-ak) berriz jaso eta aurretiaz PDL-arekin tratatutako estalkidun 24 putzutzoko plaketan erein ziren. 5.000 zelula/putzutzoko SATO medio osoan (SATO+) (**2. taula**) edo SATO- ean (**1. taula**).

**2. taula.** SATO- ari gehitu beharreko osagaiak SATO+ medioa prestatzeko

Erreaktiboak	Kontzentrazioa	Konpainia
<i>Tri-iodothyronine (T3)</i>	30 ng/ml	Sigma
<i>L -Thyroxine (T4)</i>	40 ng/ml	Sigma
<i>CNTF</i>	10 ng/ml	Peprotech
<i>NT-3</i>	1 ng/ml	Peprotech

#### 4.3 Oligodendrozoitoen hazkuntza

Oligodendrozoitoak Sprague-Dawley arratoien nerbio optikoetatik (P10-12) lortu ziren lehenago deskribatu zen bezala (*Domercq et al., 2010*). Nerbio optikoak mekanikoki eta entzimatikoki digeritu ziren eta aurretiaz PDL-arekin trataturiko plaketan erein ziren 10.000 zelula/putzutzoko dentsitatean SATO+ medioan. Zelulak 37°C-an, %5-eko CO<sub>2</sub>-arekin eta atmosfera hezean mantendu ziren eta 24 orduren ondoren erabiliak izan ziren.

### 3. IN VIVO EREDUAK

#### 3.1 Entzefalomielitis autoimmune esperimental (EAE)-ren indukzioa

EAE 8-10 asteko C57BL6 anduiko sagu emeetan induzitu zen, sagubasatietan, P2X4<sup>-/-</sup> saguetan eta IRF5<sup>-/-</sup> saguetan. Saguak subkutaneoki immunizatu ziren oligodendrozoito glikoproteina 35-55 (MOG(35-55); 200 µg; Sigma)-ren 300 µl-rekin Freunden adjubante osatugabearekin (Sigma) emultsionatuta eta 8 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra-rekin

suplementatuta. Pertusis toxina (500ng/0.1ml; Sigma) intraperitonealki injektatua izan zen immunizazio egunean eta berriz ere 2 egunetara, gaixotasunaren garapena errazteko.

Eredu honetan, saguak sintomak izaten hasten dira 10-12garren egunean immunizatu ostean. Arazo motoreak areagotuz joaten dira denborarekin puntu larrienera 20garren egun inguruan iristen direlarik, momentu honetatik aurrera sintomak mantendu edo poliki poliki hobetzen hasten dira. Sintoma motoreak egunero ebaluatu ziren Otik 8rako puntuazioa emanez jarraian azaltzen den bezala:

- 0, ez du sintomarik
- 1, ahultasuna buztanean
- 2, buztan paralizatua
- 3, buztan paralizatua eta ahultasuna atzeko hanketan
- 4, buztan paralizatua eta hemiparalisia atzeko hanketan
- 5, atzeko hankak guztiz paralizatuta
- 6, atzeko hankak guztiz paralizatuta eta arazoak aurreko hanketan
- 7, tetraplegia
- 8, hiltzorian

P2X4 hartzailearen funtzioa aztertzeke animaliak egunero tratatu ziren intraperitonealki TNP-ATP-arekin (10 mg/kg), ivermektin-arekin (*ivermectin*, IVM; 1 mg/kg) edo eramailearekin (serum fisiologikoa) sintomen hasieratik (10. eguna immunizazioaren ostean) esperimientua amaitu zen arte. Tratamenduak immunizazioak eragindako erantzun immunearen sorreran eraginik izan ez, sintomen agertzearen hasieran hasi ginen.

TNP-ATP eta IVM-ak erantzun immunearen garapenean izan zezaketen eragina aztertzeke eginiko esperimientuetan, tratamenduak immunizazio egunean bertan hasi ziren eta sintomen puntu maximoan amaitu, hau da, fase akutuan.

Gaixotasunaren etapa ezberdinak honela ezarri ziren: fase akutua, sintomak hasi eta 6-10 egunetara; sendatze fasea, sintomak estabilizatuak eta sintomak hasi eta 18-30 egunetara.

### **3.2 Lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazioa**

LPC-bidezko desmielinizazioa 14 asteko sagu arretan egin zen. Lesio desmielinizatzaileak LPC-aren injekzio estereotaxiko bidez burutu ziren (0.5µl, %1 LPC; Sigma). Ebakuntza baino lehen animaliak ketamina (100mg/kg)/ xilazina (10mg/kg) nahasketarekin anestesiatuak izan ziren injekzio intraperitoneal bidez. Bi ebaki longitudinal egin ziren *longissimus dorsian*

bizkarrezurraren bi aldeetan, eta bizkarrezurra ezaltzen duten giharrak kendu ziren. Animaliak aparatu estereotaxikoan jarri ziren, 13garren orno torazikoa saguen bizkarrezurra manipulatzeko bi barren artean tinkatu zelarik eta ornoarteko espazioa bistaratu zen ehun konektiboa kenduz. Meningeen *dura mater* 30G-ko horratza erabiliz zulatu zen eta mikromanipulatzailerik estereotaxikoa erabiliz, LPCa injektatu zen Hamilton xiringa bati loturiko beirazko mikropipeta bidez. Lesio gunea ikatzarekin markatu zen gerora lekua arazo gabe identifikatu ahal izateko.

LPC injekzioaren ondoren, ebakia josi eta animaliak suspertzen utzi ziren. Ebakuntza ondorenean burprenorfina (0.1mg/kg, injekzio subkutaneo) eman zitzaizkien animaliei analgesiko gisa. Saguak operazio osteko 14garren egunean sakrifikatu ziren oligodendrozoitoen diferentziazioa aztertzeko.

## 4. TEKNIKAK

### 4.1 Mielinaren fagositosiaren zeharkako azterketa EAE-dun saguetan

Mielinaren fagozitosisia MBP eta Iba1-ekin markatutako EAE-dun saguen bizkarrezur muineko laginetan aztertu zen. Argazkiak LEICA TCS STED SP8 mikroskopia konfokalean atera ziren 40x olio-zko-inmertsio objektiboarekin. Argazkiak *ImageJ* softwarea (Fiji; NIH) erabiliz prozesatu ziren. Mikroglia zelulen mielinaren fagozitosisia zeharka neurtu zen modu semi-automatizatuan Iba1-en markaketaren eta mielina hondakinen kolokalizazioan oinarrituta. *ImageJ*-ko "Threshold" tresna erabili zen automatikoki mielina hondakinak eta mikroglia/makrofagoak (Iba1 markaketa) identifikatu ahal izateko. Hainbat saiakeraren ostean aldagai bakoitzarentzako iragazki egokiena aukeratu zen: Yen iragazkia eta erradio = 1 "Gaussian blur" aplikatu ondoren mielina hondakinentzat eta Yen iragazkia mikroglia/makrofagoentzat. Gehieneko eta gutxieneko "Threshold-a" ezarri zen eskuz jatorrizko argazkia oinarri hartuta. Mielina hondakinen kasuan "Thresholdaren" gainera zeuden pixel guztiak maskara batean hautatuak izan ziren. Beso fagozitikoak hobeta hautatu ahal izateko maskara bat sortu zen "Analyze Particles" tresna erabiliaz "Include Holes" aukera klikaturik. Ondoren "Measurements" tresnarekin mikroglia/makrofago (Iba1 markaketa) eta mielina hondakinen (MBP markaketa) arteko kolokalizazioa neurtu zen.

#### 4.2 Zelulen bideragarritasun entsegua

Zelulen bideragarritasuna kaltzeina-AM (Invitrogen) proba erabiliz neurtu zen. Zelulak 0.5  $\mu$ M kaltzeina-AM-rekin inkubatu ziren 30 minutuz 37°C-tan. Garbiketak egin eta berehala zelula bideragarriak Synergy HT fluorimetro/espektrofotometro irakurgailua (Bio-tek Instruments Incl) erabiliz kuantifikatu ziren 485 nm-ko uhin luzeeran kitzikatuz eta 528 nm-tan igorriaz. Datuak Gen5 (Bio-tek, Beverly, MA, USA) softwarea erabiliaz aztertu ziren. Aktibitatea, heriotza zelular erlatiboaren ehuneko bezala adierazi zen, tratatu gabeko oligodendrozitoen balioak kontrol bezala erabiliaz (%100-eko bideragarritasuna). Emaitzak gutxienez hiru esperimentu independenteren batezbestekoa  $\pm$  batezbestekoaren errore estandarra ( $\pm$  *standard error of the mean*,  $\pm$  SEM) bezala adierazi dira.

#### 4.3 Western blota

Proteina totala lortzeko zelulak proteasa inhibitzaile (Roche) elektroforesi tanpoiarekin (62,5 mM Tris, pH 6,8, % 10 glizerol, % 2 SDS, 0,2 mg/mL bromofenol urdina eta %5,7  $\beta$ -merkptoethanol H<sub>2</sub>O-tan) lisatu eta bildu ziren. Laginak 5 minutuz 95°C-tan irakin eta %12ko SDS-poliakrilamidazko gel elektroforesiaren bitartez banatu ziren (Criterion TGX Precast Gels, Bio-Rad). Ondoren, laginak PVDF mintz batetara (Trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer Packs, Bio-Rad) transferitu ziren. Lotura ez-espezifikoak ekiditeko, mintzak %5 esne gaingabetua eta %5 NGS zuen TBS-T tanpoian (*Tris-Buffered Saline buffer with Tween*<sup>®</sup>20) blokeatuak izan ziren ordu betez giro tenperaturan. Proteinak detektatzeko mintzak 4°C-tan inkubatu ziren gau osoan zehar BDNF (1:200; Santa Cruz) eta  $\beta$ -aktinaren (1:1000; Sigma) aurkako antigorputz primarioak erabiliz %5 BSA zuen TBS-T tanpoian. Garbiketak burutu ostean, peroxidarekin konjokatutako ahuntza anti-untxia antigorputza (1:2000, Sigma) %5 esne gaingabetua eta %1 NGS zuen TBS-T tanpoian prestatu eta mintzekin inkubatu ziren ordu betez giro tenperaturan. Azkenik, errebelatua, kimioluminiszentzia erabiliz burutu zen fabrikatzailearen argibideei jarraituz (Super Signal, West Dura or Femto, Pierce) eta argazkiak ChemiDoc MP system (BioRad) aparatua erabiliaz lortu ziren. Seinaleak ImageLab (Bio-Rad) programarekin kuantifikatu eta  $\beta$ -aktinaren seinalearekiko normalizatu ziren. Lortutako balioak gutxienez hiru esperimentu independenteren batezbestekoa  $\pm$  SEM bezala adierazi dira.

#### 4.4 Minaren entsegua

Alodinia mekanikoa e-VF Electronic Von Frey aestesiometroa (Ugo Basile SRL) erabiliaz neurtu zen EAE-ko momentu ezberdinetan: immunizazioaren aurretik, sintomak agertu aurretik (5garren eguna immunizazio ondoren), sintomen hasieran (12garren eguna immunizazio ostean), fase akutuaren aurretik (16garren eguna immunizazio ondoren). Saguak alturan zegoen alanbrezko sare gainean jarri ziren kaxa batez (Perspex box) inguratuak eta metalezko filamentu baten bidez presio mekaniko konstantea aplikatu zitzaien atzeko hanketan. Hanka-kentze momentuan aplikaturiko presio mekanikoa automatikoki neurtu zen aparatuaren bidez. Neurriak 3 aldiz hartu ziren bai esker eta bai eskuin hankan gutxienez 10 minutuko tartearrekin hanka berdina neurtzerakoan. Batezbesteko neurriak kalkulatu ziren animalia bakoitzarentzat.

#### 4.5 Immunokimia

Immunozitokimiarako zelulak finkatuak eta aurretiaz azaldu bezala prozesatuak izan ziren (Domercq et al., 1999). Kasu guztietan zelulak %4 paraformaldehidoarekin (PFA) gatz fosfato tanpoian (*phosphate buffer saline*, PBS, 0,1 M, pH 7,4) 20 minutuz giro tenperaturan finkatu ziren eta PBS-arekin garbiketarako egin ondoren immunizitokimia burutu zen. B4 isolektinaren (IB4) markaketarako, zelula biziak 30 minutuz IB4 rekin (1:100, Vector) inkubatuak izan ziren zelulen hazkuntza medioan, PBSarekin garbituak, %4 paraformaldehidoarekin finkatuak 20 minutuz eta ondoren ohiko immunoizitokimia prozesua burutu zen.

Sagu kontrolak eta EAE-dunak sakon anestesiatuak izan ziren kloro-hidratoaren (500 mg/kg) injekzio intraperitonealaren bidez eta bihotzean zeharreko perfusioa burutu zitzaien lehenengo PBS-arekin (0,1 M, pH 7,4) eta jarraian %4 paraformaldehidorekin PBS tanpoian 15-20 minutuz. Esperimentu batzuen kasuan laginak hainbat tekniken bidez aztertuak izan ziren eta kasu horietan prozedura bestelakoa izan zen. Kasu horietan, saguak anestesiatu eta sakrifikatuak izan ziren. Jarraian garuna eta bizkarrezur muina isolatu ziren eta post-finkatu %4 paraformaldehidotan ondoratuz 4 orduz. Gero kriobabestu egin zire %20 sakarosadun soluzioan (0,1M fosfato tanpoian) 72 orduz 4°C-tan. Perfusioz finkatutako laginak Microm HM650V bibratomoa erabiliz moztu ziren (40 µm lodieran), eta aldiz, kriobabestutako laginak tissueteketan sartu ziren eta CM3050 S kriostatua (Leica) erabiliz moztu ziren (10 µm lodieran).

LPC-bidezko desmielinizazio esperimientuetako saguak anestesiatuak eta %2 paraformaldehidorekin perfundituak izan ziren 15-20 minutuz. Bizkarrezur muinak post-finkatuak izan ziren %2 paraformaldehidorekin 20 minutuz. Ehunak kriobabestuak izan ziren %15

sakarosatan 72 orduz eta ondoren %7 gelatina/%15 sakarosa soluzioan sartuak izan ziren kriostatuan moztu aurretik (12 µm lodieran).

Bai *in vivo* esperimentutako ehunak eta bai *in vitro* esperimentutako zelulak iragazkortuak eta lotura ez-espezifikokoak ekiditeko blokeatuak izan ziren antigorputz sekundarioa eginiko serumaren %4 rekin eta %0,1 Triton X-100-ekin inkubatuz (0,1 M PBS-tan prestatua) ordu betez giro tenperaturan. Ondoren, laginak antigorputz primarioekin inkubatu ziren gau osoan zehar 4°C-tan 1% serumarekin eta %0,1 Triton X-100-ekin (**3. taula**). PBS-arekin garbiketak egin ondoren, lagin bakoitzari zegokion fluorokromoari-loturiko antigorputz sekundarioa jarri zitzaion (**3. taula**) eta Hoechst 33258 (1,5 µg/ml; Sigma) nukleoak markatzeko ordu betez giro tenperaturan. Garbiketen ondoren, Glicergel muntaia medioa (Dako) erabiliz laginak muntatuak izan ziren. Bibratomo bidez lorturiko ehun zatien kasuan inkubazio eta garbiketa guztiak astintze arinean burutu ziren.

Esperimentu berdineko argazki guztiak doitasun berdinarekin atera ziren. Argazkiak ateratzeko Axiovision mikroskopia (Zeiss) (Neurozientziak Saila), Zeiss Axio Observer mikroskopia Apotomearekin (UPV/EHUko Mikroskopia Analitikoa eta Bereizmen Handikoa Biomedikuntzan zerbitzua) eta LeicaTCS STED SP8 mikroskopia konfokala erabili ziren.

Gorputz kailukarako eta bizkarrezur muineko Olig2<sup>+</sup> zelulak eta bizkarrezur muineko Iba1<sup>+</sup> zelulak zenbartzeko argazkiak Axiovision mikroskopiaarekin hartu ziren 40X objektiboarekin. Mikroglia zelulen azalera neurtzeko, zelulak Iba1 markaketaren arabera delineatu ziren eta “intereseke eremu” bezala definitu (*region of interest*, ROI) ziren ondoren azalera neurtzeko *ImageJ* softwarea erabiliz. Animaliaiko gutxienez 3 ehun xaflako eta hauetako 4 eremu ezberdin zenbatu ziren.

Mikroglia zelulen polarizazioa aztertzeko oxido nitrito sintasa induzituaren (*inducible oxide nitrite synthase*, iNOS), manosaren hartzailearen (*mannose receptor*, MRC1) eta arginasaren immunoerreaktibitatea neurtu ziren *ImageJ* softwarea (NIH) erabiliaz eta zelulen kopuruarekiko normalizatu ziren (8 eremu estalki bakoitzeko, gutxienez 4 esperimentu ezberdinetatik modu hirukoitean burutuak). Emaitzak fluoreszentiaren intentsitatean emandako aldaketa bezala adierazi dira kontrolekin edo tratamendurik gabekoekin alderatuz.

Mikroglia (IB4<sup>+</sup>) eta oligodendroitoetako (Olig2<sup>+</sup>) P2X4R eta P2X7Rren adierazpen maila aztertzeko ROI-ak delineatu ziren zelulen inguruan eta immunoerreaktibitatea neurtu zen *Image J* softwarea erabiliaz (12-15 eremu estalkiko, 3 esperimentu ezberdinetatik) Leica TCS STED SP8 mikroskopia konfokalean 40x objektiboarekin ateratako argazkietan.

**Table 3.** Immunokimiarako erabilitako antigorputzak.

Antigorputza	Espeziea	Kontzentrazioa	Konpainia
APC (CC1)	Sagua	1:200	Calbiochem
Arginase	Ahuntza	1:100	Santa Cruz
B220	Arratoia	1:200	BD Pharmingen
CD3	Arratoia	1:50	Serotek
Iba1	Untxia	1:1000	Wako
iNOS	Sagua	1:500	BD Bioscience
IRF5	Untxia	1:500	Abcam
Laminin	Untxia	1:200	Sigma
MBP	Sagua	1:500	Covance
MBP	Untxia	1:200	Millipore
MBP	Oilaskoa	1:100	Millipore
MRC1	Untxia	1:1000	Abcam
NG2	Untxia	1:500	Abcam
Olig2	Sagua	1:1000	Invitrogen
P2X4R	Untxia	1:400	Alomone
P2X7R	Untxia	1:100	Alomone
SMI-32	Sagua	1:1000	Covance
IgG Rabbit-Alexa 488	Ahuntza	1:400	Invitrogen
IgG Rabbit-Alexa 594	Ahuntza	1:400	Invitrogen
IgG Rabbit-Alexa 633	Ahuntza	1:400	Invitrogen
IgG Mouse-Alexa 488	Ahuntza	1:400	Invitrogen
IgG Mouse-Alexa 546	Ahuntza	1:400	Invitrogen
IgG Mouse-Alexa 594	Ahuntza	1:400	Invitrogen

Oligodendrozoen azalera aztertzeko, argazkiak Axiovision mikroskopiarekin atera ziren 40x objetiboarekin eta oligodendrozoak MBPren markaketan oinarrituz delineatu ziren eta ROI-ak eratu ziren *ImageJ* softwarea (NIH) erabiliaz.

Oligodendrozoen diferentziazioa aztertzeko, argazkiak Axiovision mikroskopian atera ziren 40x objetiboarekin. Argazkietan MBP<sup>+</sup> zelulak zenbatu ziren eta emaitzak zelula kopuruarekiko ehunekotan adierazi ziren (15 eremu estalkiko, 3 esperimentu ezberdinetatik modu hirukoitzean burutuak).

EAE-dun saguen bizkarrezur muineko zelula CD3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup> eta Iba1<sup>+</sup> dentsitatea neurtzeko argazkiak Leica TCS STED SP8 mikroskopia konfokala erabili zen 40x objetiboarekin. Sustantzia zuriaren eta lesion gunearen eremua ROI-ak markatuz definite ziren MBP-aren markaketan oinarrituta *ImageJ* softwarearekin (NIH). Gutxienez 4 eremu ezberdin zenbatu ziren sekzioko eta gutxienez 3 sekzio saguko. 6 sagu zenbatu ziren talde esperimental bakoitzeko.

Axoiaren kaltetzea aztertzeko argazkiak Leica TCS STED SP8 mikroskopia konfokalarekin atera ziren eta SMI-32-ren immunoerreaktibitatea neurtu zen eta ROI bidez definitu zen sustantzia zuriarekiko normalizatu zen. Gutxienez 4 eremu ezberdin zenbatu ziren sekzioko eta gutxienez 3 sekzio saguko. 6 sagu zenbatu ziren talde esperimental bakoitzeko.

LPC-a injektatutako saguen bizkarrezur muineko lesioen azalera, zelula Olig2<sup>+</sup>, CC1<sup>+</sup> eta CD3<sup>+</sup> dentsitatea neurtzeko argazkiak Zeiss Axio Observer mikroskopia Apotomearekin atera ziren 20x objetiboa erabiliz. Zelulen dentsitatea lesioen azalerarekiko kalkulatu zen eta lesioak ROI bezala definituak izan ziren MBP-ren markaketan oinarrituta *Image J* softwarea (NIH) erabiliz. Gutxienez lesiodun 3 sekzio ezberdin aztertu ziren animalia eta gutxienez 5 animalia talde bakoitzeko.

#### 4.6 Fluoreszentziaz aktibaturiko zelulen sailkatzailea (*fluorescence-activated cell sorter, FACS*)

Saguak isofluoranoa erabiliz anestesiatu ziren eta sakrifikatuak izan ziren dekapitazioz. Garunak eta bizkarrezur muinak isolatu, homogeneousatu eta mekanikoki eta entzimatikoki digeritu ziren. Suspentsioa %60-ko perkolezko gradiente batean zentrifugatu izan zen mielina kendu ahal izateko. Lotura ez-espezifikoa ekiditeko, antigorputzen hartzaileak (Fc hartzaileak) blokeatuak izan ziren TruStain FcX antigorputzarekin (BioLegend) inkubatuz 10 minutuz 4°C-tan FACS tanpoian (%0,1 BSA eta 1 mM EDTA PBS-tan). Zelulak markatzeko fluorokromoari-loturiko antigorputzak erabili ziren (**4. taula**) denak batera inkubatuz 30 minutuz 4°C-tan. Zelulak FACS tanpoiarekin garbituak eta zentrifugatu ondoren 300 µl FACS tanpoian altsatuak izan ziren fluxu zitometroan aztertuak izateko edo sailkatu eta isolatuak.

Mikroglia zelulak isolatzeko, CD11b, CD45, Ly6G eta CCR2 (**4. taula**) antigorputzak erabili ziren mikroglia (CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>/Ly6G<sup>-</sup>/CCR2<sup>-</sup>) eta makrofago inbaditzaileak (CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup>) (*Szulzewsky et al., 2015*) bereiztu ahal izateko FACS Aria IIIu (BD Bioscience) erabiliz.

Zelula immuneen analisisa egiteko, zelulak BD LSR Fortessa erabiliz aztertu ziren eta ondoren, datuak FlowJo softwarea (Tree Star) erabiliz landu ziren.



Esperimentu hauek Hamburgo-Ependorf-eko Ospitale Unibertsitarioko Neurologia saileko Isuri eta Inflamazioan ikerkuntza esperimentalak (*Experimental Research in Stroke and Inflammation*, ERSI) laborategiaren kolaborazioarekin burutu ziren.

**Table 4.** Mikroglia isolatzeko eta FACS analisiarako erabilitako antigorputzak

<b>Mikroglia isolatzeko antigorputzak</b>	<b>Fluorokromoa</b>	<b>Klona</b>	<b>Konpainia</b>	<b>Kat#</b>
CD11b	FITC	M 1/70	Biologend	101205
CD45	Bv421	30-F11	Biologend	103134
Ly6G	AF700	1A8	Biologend	127622
CCR2	PE	475301	R&D Systems	FAB5538P
<b>FACSerako antigorputzak</b>	<b>Fluorokromoa</b>	<b>Klona</b>	<b>Konpainia</b>	<b>Kat#</b>
CD4	Bv605	RM4-5	Biologend	100547
CD8a	perCP	53.6-7	Biologend	100732
$\gamma\delta$ TCR	Bv650	GL-3	Biologend	118129
CD3e	Bv421	17A2	Biologend	100228
CD45	APC-eFluor780	30-F11	eBioscience	47-0451-82
CD11b	FITC	M 1/70	Biologend	101205

#### 4.7 PCR kuantitatiboa (qPCR) eta Geneen adierazpen-profil entsegua

Kultiboko mikroglia zelulen eta saguen laginen (bizkarrezur muina, gongoil linfatikoak eta barea) RNA, Trizola (Invitrogen) erabiliz isolatu zen fabrikatzailearen argibideei jarraituz. Ondoren,  $\mu\text{g}$  1 RNA erabilita cDNA sintetizatu zen SuperScript III erretrotranskriptasa (200 U/ $\mu\text{l}$ ; Invitrogen) eta ausazko hasle hexamerikoak (*random hexamers primers*; Promega) erabilita. Isolatutako mikroglia zeluletako RNA lortzeko RNeasy Plus Micro Kita (Quiagen) erabili zen eta cDNAren sintesirako AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kita (Agilent Technologies) eta ausazko hasle hexamerikoak (*random hexamers primers*; Promega).

qPCR-aren erreakzioak SYBR-Greenarekin egin ziren eta BioRad CFX96 Denbora-Errealeko PCR Detekzio Sistema erabili zen lehenago deskribatu bezala (*Domercq et al., 2016*). Hasle zehatzak (*Primers*) (**5. taula**) Primer Express softwarea (Applied Biosystems) erabiliaz diseinatu ziren exoien lotuneetan, honela DNA genomikoaren amplifikazioa ekidinez. Kondizio

esperimental guztietatik harturiko lagintxoekin kurba estandarra sortu zen eta hortik cDNA kantitatea kalkulatu ahal izan zen. Faktore normalizatzailea GeNorm v3.5 free softwarearen (Vandesompele et al., 2002) bidez kalkulatu zen 3 erreferentzia generen (*Housekeeping genes*) adierazpen mailaren arabera.

EAE esperimentuetako ehun osoko RNA eta isolatutako mikrogliia zelulen RNA Fluidigm qPCR bidez analizatu ziren eta GenEx softwarearen bidez landu. Emaitzak gene adierazpen erlatibo bezala aurkeztu ziren  $\Delta\Delta C_q$  metodoa ( $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ) aplikatuz eta eskala logaritmikoan (2 oinarrian).

**Table 5.** qPCRrako erabilitako hasleak

**Arratoien hasleen sekuentziak**

<b>Genea</b>	<b>Hasle zuzena (5'-&gt;3')</b>	<b>Atzeranzko haslea (5'-&gt;3')</b>
<i>Arg1</i>	GTGAAGAACCCACGGTCTGTG	GAGATGCTTCCAATTGCCATACTG
<i>Ccl2</i>	GTGCTGTCTCAGCCAGATGCA	GCTGCTGGTGATTCTCTTGTAGTT
<i>Mrc1</i>	AAGTTTAAGCACTGGCTGGCA	CAGGTTCTGATGATGGACTTCTG
<i>Nos2</i>	GAGATTTTTACGACACCCTTAC	CATGCATAATTTGGACTTGCAAG
<b>Erreferentzia genea</b>	<b>Hasle zuzena (5'-&gt;3')</b>	<b>Atzeranzko haslea (5'-&gt;3')</b>
<i>Cyclophilin A</i>	CAAAGTTCCAAAGACAGCAGAAAA	CCACCCTGGCACATGAATC
<i>Gapdh</i>	GAAGGTCGGTGTCAACGGATTT	CAATGTCCACTTTGTCACAAGAGA
<i>Hprt</i>	ATGGACTGATTATGGACAGGACTGA	ACACAGAGGGCCACAATGTG

**Saguen hasleen sekuentziak**

<b>Genea</b>	<b>Hasle zuzena (5'-&gt;3')</b>	<b>Atzeranzko haslea (5'-&gt;3')</b>
<i>Arg1</i>	GGATTGGCAAGGTGATGGAA	CGACATCAAAGCTCAGGTGAA
<i>Bdnf</i>	TCCAAAGGCCAACTGAAGCA	CTGCAGCCTTCCTTGGTGTA
<i>Ccl2</i>	AGCAGCAGGTGTCCAAA	TTCTTGGGGTCAGCACAGAC
<i>Ccr7</i>	GTGGTGGCTCTCCTTGTC	GGTATTCTCGCCGATGTAGTCA
<i>Chi3l3</i>	GCCCACCAGGAAAGTACACA	CCTCAGTGGCTCCTTCATTCA
<i>Clec7a</i>	ACCACAAGCCACAGAATCA	AGGAAGGCAAGGCTGAGAAA
<i>Foxp3</i>	ACCACACTTCATGCATCAGCTC	GGCTGGGTTGTCCAGTGGAC
<i>Ifny</i>	TAACTATTTTAACTCAAGTGGCATAGAT GTG	GCCAGTTCCTCCAGATATCCAAG

<i>Il10</i>	AAAGGACCAGCTGGACAACA	TAAGGCTTGGCAACCCAAGTA
<i>Il12a</i>	AAACCAGCACATTGAAGACC	GGAAGAAGTCTCTCTAGTAGCC
<i>Il1b</i>	TGGCAACTGTTCTGAACTCA	GGGTCCGTCAACTTCAAAGAAC
<i>Il4</i>	ACGGAGATGGATGTGCCAAA	GAAGCACCTTGAAGCCCTA
<i>Il6</i>	CGATGATGCACTTGACAGAAA	ACTCCAGAAGACCAGAGGAA
<i>Irf5</i>	TGATGTCAAACCCCGAGAGAA	GAACATCTCCAGCAGCAACC
<i>Irf8</i>	GATATGCCGCCTATGACACA	CCCGTAGTAGAAGCTGATGAC
<i>Jak3</i>	CATAGAGGACGTGGACACTCAA	TGACATGTCTCCAGCCAAA
<i>Marco</i>	TTCTGTGCATGCTCGGTTA	TTGTCCAGCCAGATGTTCCC
<i>Mbp</i>	CCCTCACAGCGATCCAAGTA	CTCTGTGCCTTGGGAGGAA
<i>Mr1</i>	GCTCGCTGTATTCTTGGTGAA	ACCAGGATCGGAAACAGCTA
<i>Mrc1</i>	CACAAAGCCATGCTGTAGTACC	GTAAAACCCATGCCGTTTCCA
<i>Msx3</i>	CTCCAGTCGCGCACTCTT	CCGTGGTTTGCGATTGGTTT
<i>Nos2</i>	GAGGAGCAGGTGGAAGACTA	GGAAAAGACTGCACCGAAGATA
<i>P2rx4</i>	TTTGCATTGAGACGCCAAC	ATGGAACACACCTTCCAGTCC
<i>Ptgs2</i>	CTTCTCCCTGAAGCCGTACA	TGTCACTGTAGAGGGCTTTCAA
<i>Retnla</i>	ATCCCTCCACTGTAACGAAGAC	ACAAGCACACCCAGTAGCA
<i>Ror</i>	ACTGAAAGCAGGAGCAATGGAAG	TTCAAAAAGACTGTGTGGTTG TTG
<i>Stat1</i>	GCAGGTGTTGTCAGATCGAAC	ATGCACGGCTGTCGTTCTA
<i>Stat3</i>	TGGGCATCAATCCTGTGGTA	CCAATTGGCGGCTTAGTGAA
<i>Stat6</i>	TGACTTCCACAACGCCTAC	CATCTGAACCGACCAGGAAC
<i>Tgfb1</i>	GCTGCGCTTGACAGAGATTAA	GTAACGCCAGGAATTGTTGCTA
<i>Tnf</i>	GGGTGATCGGTCCCAAAA	TGAGGGTCTGGGCCATAGAA
<b>Erreferentzia genea</b>	<b>Hasle zuzena (5'→3')</b>	<b>Atzeranzko haslea (5'→3')</b>
<i>B2m</i>	ACTGACCGGCCTGTATGCTA	ATGTTGGCTTCCCATTCTCC
<i>Gapdh</i>	AGACGGCCGCATCTTCTT	TTCACACCGACCTTACCAT
<i>Hprt</i>	CAGTACAGCCCCAAAATGGTTA	AGTCTGGCCTGTATCCAACA
<i>Ppia</i>	AGGGTTCCTCTTTCACAGAA	TGCCGCCAGTGCCATTA

## 5. ANALISI ESTADISTIKOA

Datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira, laginen tamaina eta errepikapenak irudien legendan daude zehaztuta. *In vitro* esperimentuetatik ateratako datuen kasuan, bi taldeen arteko konparaketak parekaturiko Studenten bi-buztaneko t-testa erabilia aztertu ziren, eta aldiz, *in vivo* esperimentuetatik ateratako datuen kasuan, parekatu gabeko Studenten bi-buztaneko t-testa erabili zen, EAE esperimentuetako datuetan izan ezik, azken kasu honetan puntuazio neurologikoen estatistika Mann-Whitneyren *U* testa erabilia kalkulatu zen. Hainbat talderen arteko konparaketak bide-bateko ANOVA bidez aztertu ziren eta ondoren Bonferroniren konparaketa multiplearen testa aplikatu zen. Esangura-maila  $P < 0.05$ -ean doitu zen.

EMAITZAK



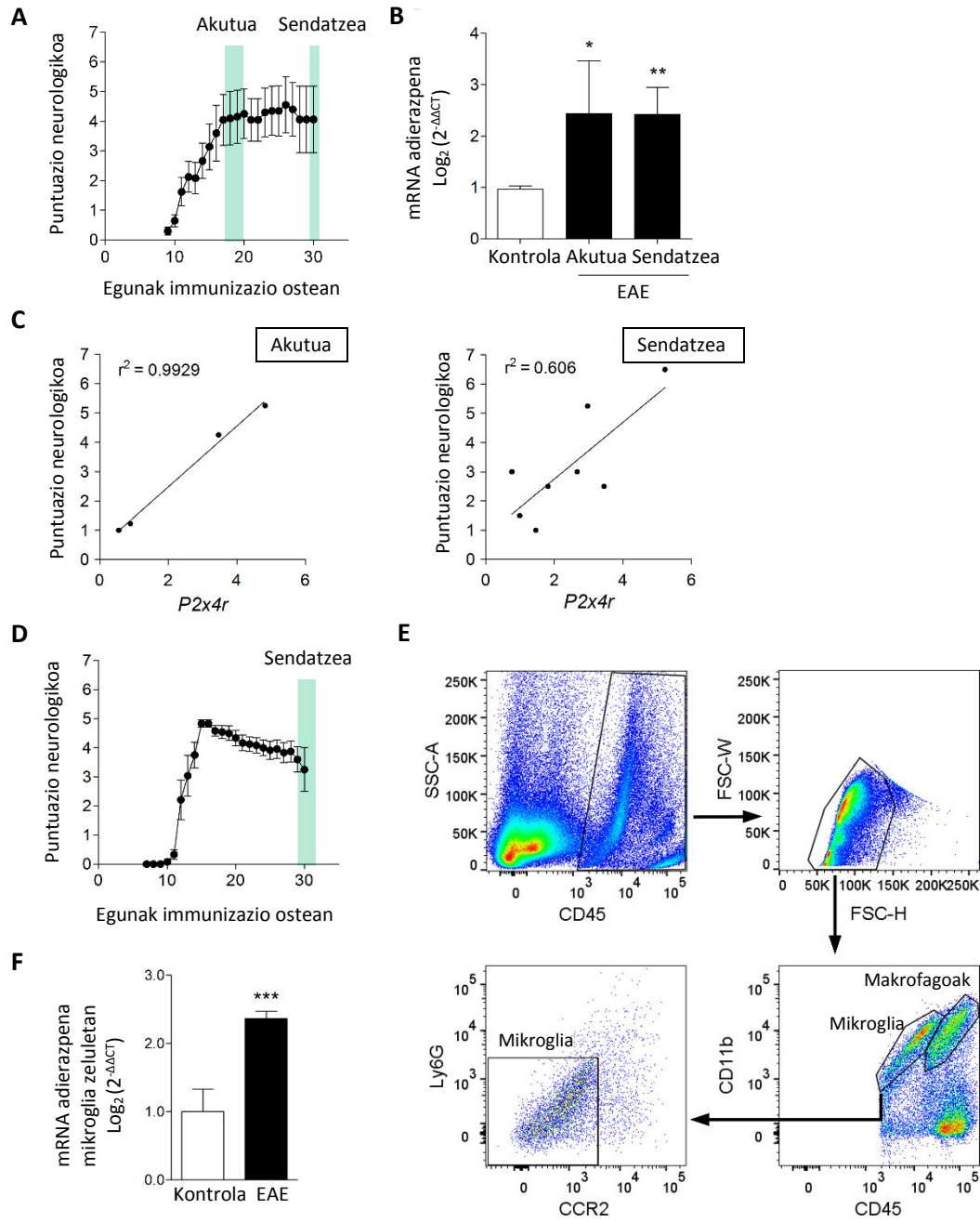
## 1. *P2x4r*-ren gainadierazpena ematen da EAE-an

Jakina da nerbio-lesio periferikoaren ondoren, bizkarrezur muineko aurreko adarrean mikroglia zelulek fenotipo erreaktiboa hartzen dutela eta hainbat gene gainadierazten dituztela, horien artean *P2x4r* genea (Tsuda et al., 2003; Beggs et al., 2012). Honekin bat etorri, gure laborategian aurretiaz *P2x4r*-ren mRNA gainadierazita zegoela deskribatu zen hantura guneetan eta aktibatutako mikroglia zeluletan EAE akutudun arratoien bizkarrezur muinean, eta baita EAE-dun gaixoen nerbio optikoko laginetan ere (Vazquez-Villoldo et al., 2014).

Guk *P2x4r*-ren adierazpena eta denboran zeharreko eraginaren analisisian gehiago sakondu dugu, horretarako EAE kronikoaren sagu eredua erabiliz. EAE kronikoaren ereduak EAE-ren hanturazko etapa eta etapa neuroendekatzaila erreproduzitzen ditu. Saguak mielina oligodendrozito glikoproteinarekin (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG) immunizatu ziren lehenago deskribatua izan den bezala (Matute et al., 2007). Animalia bakoitzaren gabezia motoreak egunero ebaluatu ziren puntuazio neurologiko bat ezarriz bakoitzari. Animaliak gaixotasunaren fase akutuan, hau da, puntuazio neurologikoa altuena den unean (sintomak hasi eta 6-10 egunera) eta sendatze fasean (immunizatu osteko 30garren egunean) sakrifikatu ziren (**10.A irudia**).

EAE-dun saguen bizkarrezur muineko mRNA guztia isolatu zen eta Fluidigm qPCR bidez aztertua izan zen. *P2x4r*-ren adierazpen maila sagu kontrolatan (osasuntsuetan) baino altuagoa zela ikusi zen gaixotasunaren fase akutuan eta baita sendatze fasean ere (**10.B irudia**). Datu interesgarria izan zen *P2x4r*-ren adierazpen mailaren eta animalien puntuazio neurologikoaren artean korrelazio handia zegoela ikustea, bai gaixotasunaren fase akutuan eta baita sendatze fasean ere (**10.C irudia**,  $r^2 = 0.99$  eta  $0.61$  hurrenez urren).

Jarraian, *P2x4r*-ren adierazpen maila aztertu genuen mikroglia zeluletan. Honetarako beste EAE esperimendu bat burutu zen eta animaliak sendatze fasean sakrifikatu ziren (**10.D irudia**). Mikroglia zelulak bizkarrezur muineko homogeneousatuetatik isolatu ziren FACS bidez CD11b, CD45, Ly6G eta CCR2 antigorputzak erabiliaz ( $\text{Cd11b}^+\text{CD45}^{\text{baxua}}\text{Ly6G}^-\text{CCR2}^-$ ; ikusi estrategia **10.E irudian**). FACS bidez bereizitutako mikroglia zelulen mRNA isolatu zen eta qPCR bidez aztertua izan zen. EAE-dun saguen bizkarrezur muineko mikroglia zeluletan ere *P2x4r*-ren gainadierazpena antzeman genuen gaixotasunaren sendatze fasean (**10.F irudia**).



**10. irudia. *P2x4r* gainadiazita dago EAE-dun saguetan fase akutuan eta sendatze fasean.**

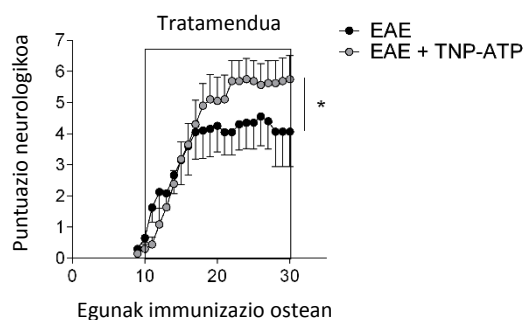
- A- EAE-dun saguen puntuazio neurologikoa (n = 12).
- B- *P2x4r*-ren adierazpena sagu kontrolen (n = 7) eta fase akutuko (n = 4) eta sendatze faseko (n = 8) EAE-dun saguen bizkarrezur muinetan qPCR bidez aztertua.
- C- *P2x4r*-ren adierazpenaren eta puntuazio neurologikoaren arteko korrelazioa fase akutuan eta sendatze fasean.
- D- Mikrogliak isolatzeko erabilitako EAE-dun saguen puntuazio neurologikoa (n = 6).
- E- FACS bidez mikrogliak (Cd11b<sup>+</sup>CD45<sup>baxua</sup>Ly6G<sup>-</sup>CCR2<sup>-</sup>) makrofagoetatik (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>altua</sup>) bereizteko erabilitako estrategia saguen bizkarrezur muinean.
- F- *P2x4r*-ren adierazpena mikrogliak sagu kontroletan (n = 4) eta sendatze faseko EAE-dunetan (n = 6).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  batezbestekoaren errore estandarra (s.e.m.) bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA (B) eta Studenten t-testa erabiltuta egin zen (F). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.



## 2. P2X4R blokeatzeak EAE-a larriagotzen du

Ondoren P2X4R-ren eginkizuna aztertu genuen EAE-aren patogenesisian P2X4R-ren TNP-ATP antagonistarekin (10 mg/kg) egunero trataturiko saguetan. Tratamendua sintomen agertzean hasi (10garren eguna immunizazio ostean) eta esperimendua bukatu arte luzatu zen. Tratamenduaren denbora leiho hau mikroglia-aren aktibazio fasearekin bat dator aurretiaz deskribatu denaren arabera (Ajami *et al.*, 2011) eta gainera, ez luke erantzun immuneraren sorrerarengan eraginik izan beharko. Lehenagoko ikerketek adierazi dutenez, mikroglia hil egiten da EAE-aren fase goiztiarrean eta populazio hau infiltraturiko monozitoek ordezkatzen dutela, gaixotasunaren paralisiranzko progresioa bultzatuz (Ajami *et al.*, 2011). P2X4R blokeatzeak LPS-bidezko mikroglia zelulen heriotza ekiditen duela ikusi da (Vazquez-Villoldo *et al.*, 2014) eta hau kontuan hartuta, TNP-ATP bidez mikroglia-aren heriotza ekiditeak, EAE-an monozitoek mikroglia populazioa ez ordezkatzea, eta beraz, sintomak hobetzea espero genuen. Esperotakoaren aurka, TNP-ATP bidezko P2X4R-ren blokeatzeak sintomen larriagotzea eragin zuen EAE-dun saguetan (**11. irudia**).



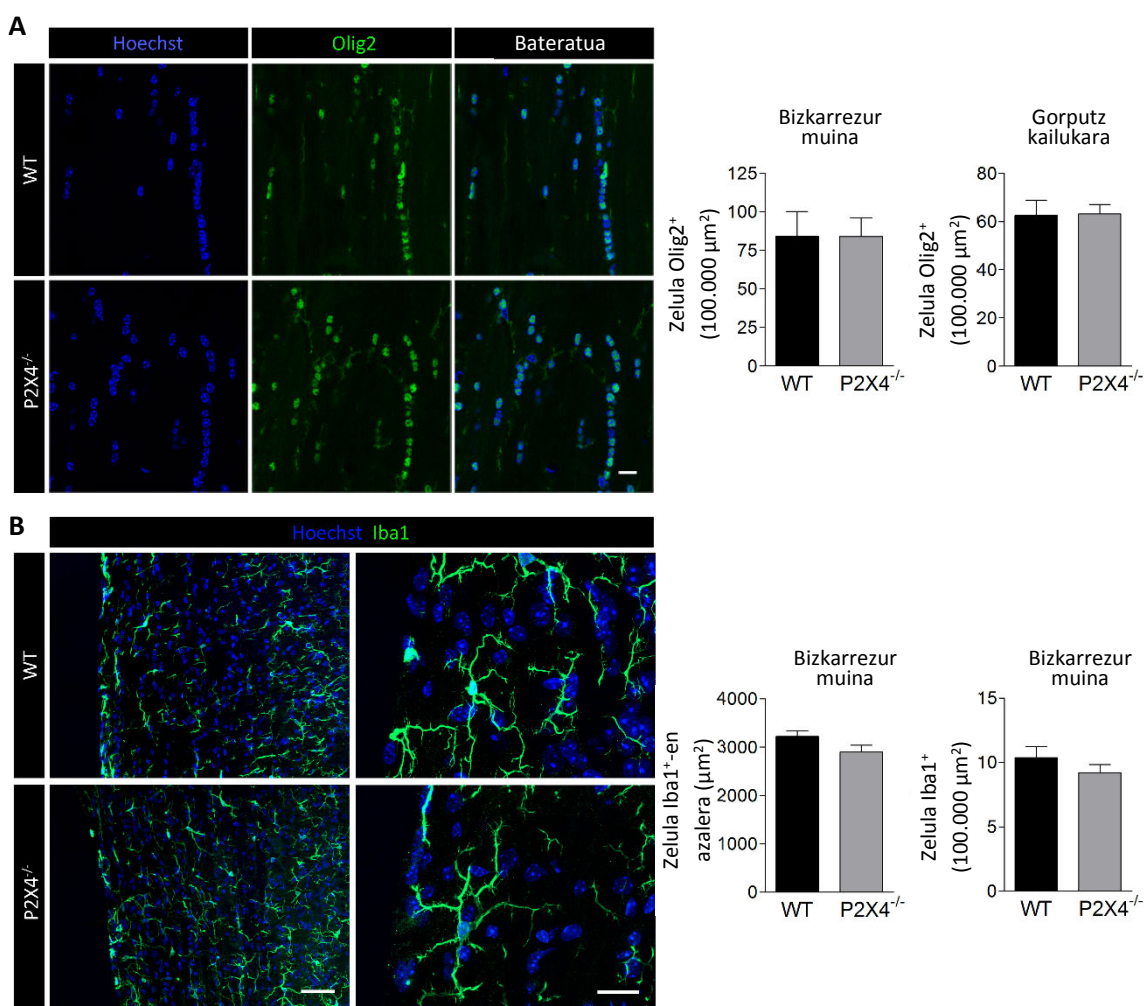
### 11. irudia. P2X4R-ren blokeatzeak EAE-a larriagotzen du.

Eramaila eta TNP-ATP (10 mg/kg)-arekin tratatutako saguen puntuazio neurologikoa EAE-a induzitu ondoren (n = 10 sagu/taldeko). Saguk egunero tratatu ziren immunizazio osteko 10garren egunetik esperimendua amaitu arte.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Mann-Whitney-ren U-testa erabilita egin zen. \*P < 0.05.

Jarraian, EAE-aren patogenesisian P2X4R-k zuen eragina berretsi genuen P2X4<sup>-/-</sup> saguk erabilita. Horretarako, lehendabizi baldintza normaletan P2X4R-ren gabeziak sagu hauen mikroglia eta oligodendrozitoengan izan zezakeen eragina aztertu genuen. Ez genuen inolako aldaketarik antzeman ez zelulen kopuruan ezta morfologian ere bizkarrezur muineko Iba1<sup>+</sup> mikroglia zeluletan eta ezta Olig2<sup>+</sup> oligodendrozitoen kopuruan ere gorputz-kailukaran eta bizkarrezur muinean 2 hilabeteko saguetan (**12.A, B irudia**). Behin P2X4<sup>-/-</sup> saguek baldintza normaletan mikroglia eta oligodendrozitoetan alterazio nabarmenik ez zutela ikusita, puntuazio

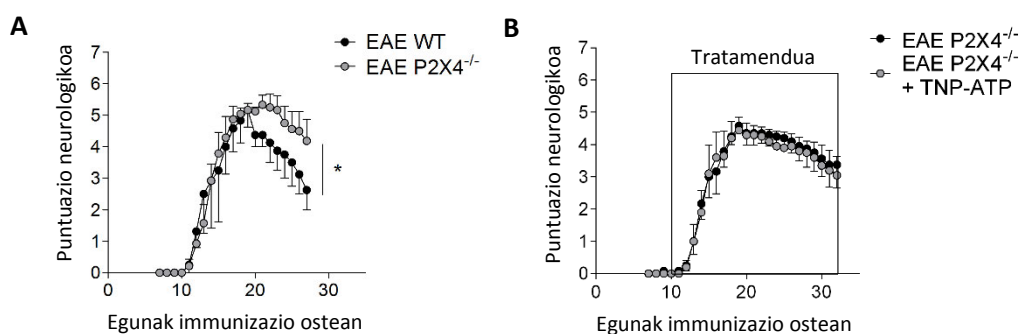
neurologikoak alderatu genituen sagu basatien (*wild type*, WT) eta P2X4<sup>-/-</sup> saguen artean EAE-a induzitu ondoren. TNP-ATP-arekin lortutako emaitzekin bat etorriaz, P2X4<sup>-/-</sup> saguek ere EAE larriagoa izan zuten (**13.A irudia**). TNP-ATP-ak EAE-an eragindako efektua P2X4R-ren menpekoa zela ziurtatzeko, beste EAE bat burutu genuen eta P2X4<sup>-/-</sup> saguak TNP-ATP-arekin tratatu genituen (10 mg/kg) sintomen agertzetik esperimntua amaitu arte. P2X4<sup>-/-</sup> saguetan TNP-ATP-ak ez zuen gaixotasunaren eboluzioa aldatu eta honela, EAE-an TNP-ATP-ak eragindako efektua P2X4R-ren partehartzeari esker izan zela baieztatu genuen (**13.B irudia**). Emaitza guzti hauek P2X4R-ren eragina berresten dute EAE-aren patogenesisian.



**12. irudia. P2X4R-ren gabeziak ez du oligodendrozitoen eta mikrogliaeren garapen normalean eraginik.**

- A- Olig2-aren (oligodendrozitoen markatzailea) analisi immunohistokimikoa gorputz kailukaran eta bizkarrezur muinean sagu basati (WT) (n = 3) eta P2X4<sup>-/-</sup> saguetan (n = 3). Argazkiek gorputz kailukarako eremu adierazgarriak erakusten dituzte. Histogramek zelulen dentsitatea adierazten dute azalerarekiko normalizatuak. Zelulak Hoechst -bidezko nukleoaren markaketari esker identifikatu ziren. Eskala = 20 μm.
- B- Iba1-en (mikrogliaeren markatzailea) analisi immunohistokimikoa bizkarrezur muinean sagu basati (WT) (n = 3) eta P2X4<sup>-/-</sup> saguetan (n = 3). Argazkiek eremu adierazgarriak erakusten dituzte. Histogramek zelulen dentsitatea azalerarekiko normalizatua eta zelulen azalera adierazten dituzte. Zelulak Hoechst -bidezko nukleoaren markaketari esker identifikatu ziren. Eskalak = 50 μm (*ezker*) eta 20 μm (*eskuin*).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira.



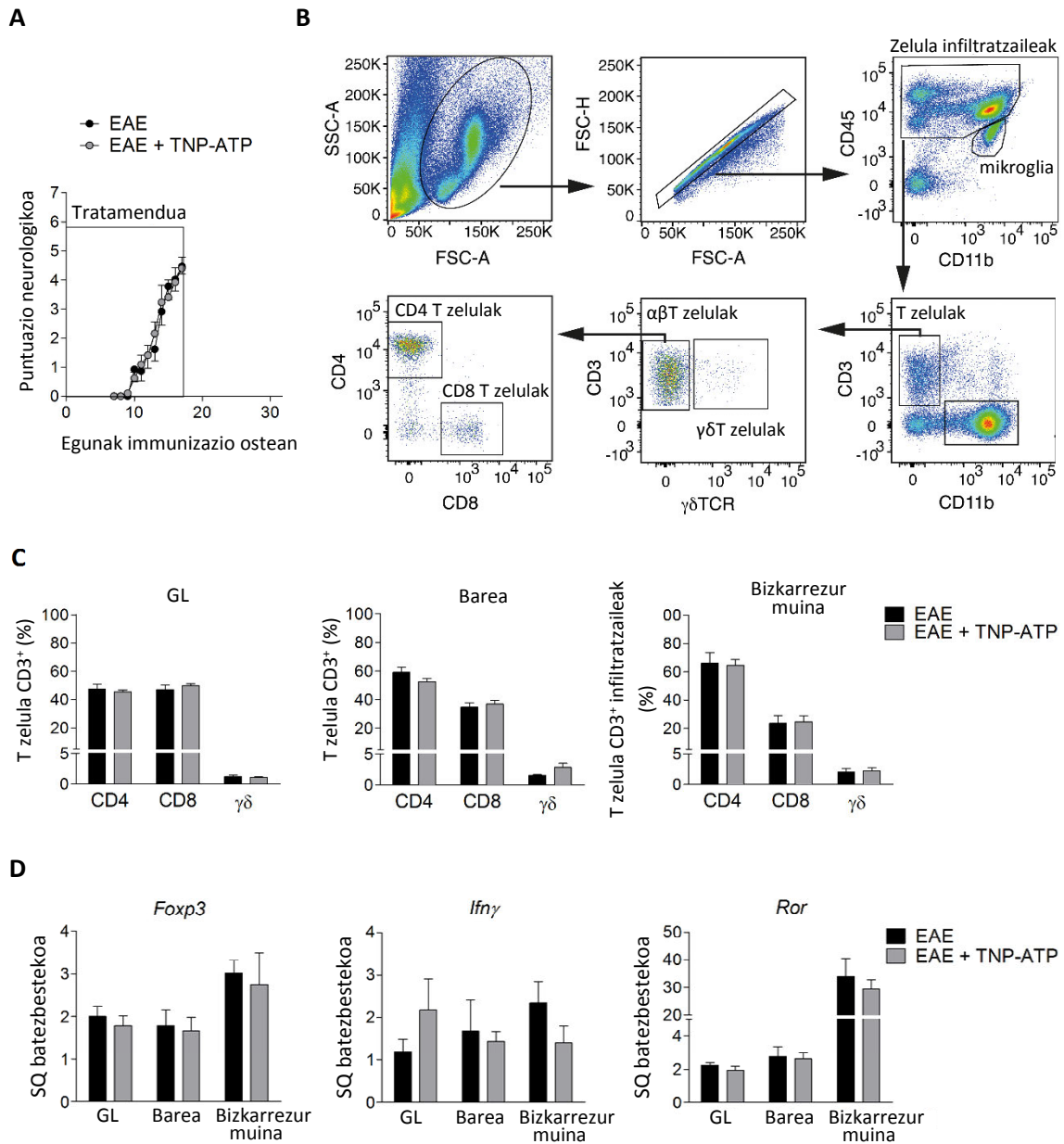
### 13. irudia. P2X4R-ren gabeziak EAE-a larrigotzen du.

- A- Puntuazio neurologikoa sagu basati (WT) eta P2X4<sup>-/-</sup> saguetan EAE-a induzitu ondoren (n = 10 sagu/taldeko).
- B- Puntuazio neurologikoa EAE-a induzitu ondoren eramailearekin (n = 4) eta TNP-ATP-arekin (10 mg/kg) (n =5) trataturiko P2X4<sup>-/-</sup> saguetan. Saguak egunero tratatu ziren immunizatu ondorengo 10garren egunetik aurrera esperimentu amaitu arte.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Mann–Whitney-ren U-testa erabiltzen zen. \*P < 0.05.

## 3. P2X4R-ren modulazioak ez du erantzun immunearen sorreran eraginik EAE-dun saguetan

EAE-an, sintomen agertzearen aurretik T zelulak aktibatua izaten dira saguen sistema immune periferikoan (*Stromnes eta Goverman, 2006*), eta beraz, TNP-ATP-aren tratamendua sintomak agertu ondoren hastek, ez luke eraginik izan beharko T zelulen aktibazioan. Hala ere, hartutako sistema immunean P2X4R-ren edozein funtzio baztertzeko asmoz, beste EAE bat burutu genuen, eta oraingoan tratamendua T zelulen aktibazio fasean eman zen (immunizazio egunetik 17garren egunera). TNP-ATP-aren tratamenduak fase honetan ez zuen gaixotasunaren eboluzioan aldaketarik eragin (**14.A irudia**). Gaixotasunaren fase akutuan, erantzun immunea neurtu genuen periferian (barean eta gongoil linfatikoetan) fluxu zitometria bidez (ikusi estrategia **14.B irudian**). TNP-ATP-aren tratamenduak ez zuen T CD4<sup>+</sup> zelulen, T CD8<sup>+</sup> zelulen eta T  $\gamma\delta$  zelulen kopurua aldatu ez barean, ez gongoil linfatikoetan eta ezta bizkarrezur muinean ere (**14.C irudia**). T CD4<sup>+</sup> zelulen erantzuna sakonago aztertzeko *Foxp3* eta *Ror* transkripzio faktoreen mRNA neurtu genuen (T zelula erregulatzaileen markatzailea eta T-laguntzaile 17 (Th17) zelulen markatzailea hurrenez hurren) eta baita *Ifny* ere (Th1 zelulen markatzailea). Ez genuen mRNA-n inolako eraginik antzeman TNP-ATP-aren tratamenduaren ondoren (**14.D irudia**). Emaitza hauek adierazten dutenez, T zelulen aktibazio fasean emandako TNP-ATP-aren tratamenduak ez du eraginik T zelulen erantzun eta infiltrazioan EAE-a induzitu ondoren.



**14. irudia. P2X4R-k ez du eraginik T zelulen aktibazio fasean.**

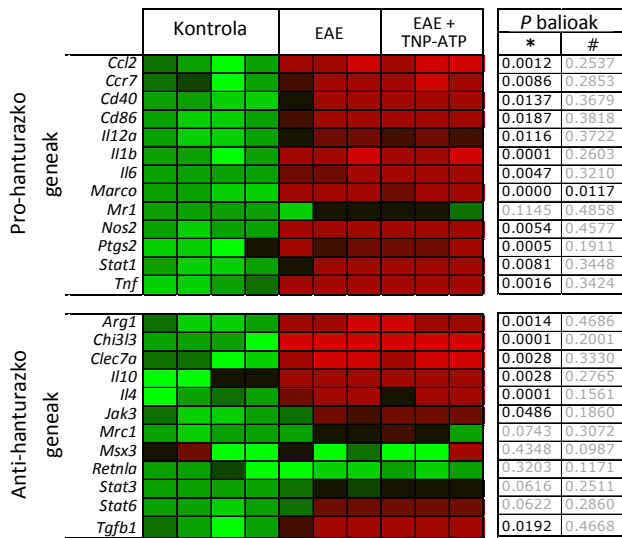
- A- Eramaillearekin (n = 13; 2 esperimentu independentetakoak) eta TNP-ATP-arekin (n = 12; 2 esperimentu independentetakoak) trataturiko saguen puntuazio neurologikoa EAE-a induzitu ondoren. Saguak egunero tratatu ziren immunizazio egunetik gaixotasunaren fase akutura iritsi arte.
- B- EAE-aren fase akutuan bizkarrezur muineko infiltratuak aztertzeko fluxu zitometriarako erabilitako estrategia.
- C- T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> eta  $\gamma\delta$  zelulen analisia fluxu zitometria bidez gongoil linfatikoetan (GL), barean eta bizkarrezur muinean EAE-aren fase akuturarte eramailearekin (n = 7) eta TNP-ATP-arekin (n = 5) tratatutako saguetan.
- D- *Foxp3* (Terregulatzaileak), *Ifn $\gamma$*  (Th17) and *Ror* (Th1)-en mRNA adierazpena gongoil linfatikoetan (GL), barean eta bizkarrezur muinean EAE-aren fase akuturarte eramailearekin (n = 6) eta TNP-ATP-arekin (n = 7) tratatutako saguetan.

Datuen informazioa: datueak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira

#### 4. P2X4R-en funtzioa mikroglia zelulen polarizazioan

Mielinaren eliminazioa beharrezkoa da sendatzea eman dadin (*Li et al., 2005; Kotter et al., 2006; Neuman et al., 2009*) eta fagozitosia eta bermielinizazioa mikroglia/makrofagoen polarizazioak modulatu dauden bi prozesu dira (*Miron et al., 2013*). Hori dela eta, P2X4R-k prozesu honetan parte har dezakeela pentsatu genuen. Hipotesi hau frogatzeko, mikroglia/makrofagoen aktibazio maila aztertu genuen TNP-ATP-arekin tratatutako EAE-dun saguetan. Geneen adierazpen-profila egin genuen bizkarrezur muineko laginetan eramailearekin eta TNP-ATP-arekin tratatutako saguetan EAE-aren fase akutuan eta sendatze fasean (**15.A, B irudia**). Mikroglia/makrofagoen aktibazioan eragina duten pro-hanturazko eta anti-hanturazko geneen adierazpena aztertu genuen Fluidigm qPCR bidez. EA-an mikroglia/makrofagoek erdi-bideko aktibazio maila erakusten dute (*Vogel et al., 2013*) eta honekin bat etorrita, EAE-aren fase akutuan (**15.A irudia**) eta sendatze fasean (**15.B irudia**) pro-hanturazko eta anti-hanturazko gene gehienak gainadierazita zeudela ikusi genuen. P2X4R-ren blokeatzeak ez zuen anti-hanturazko geneen adierazpenean eraginik izan, baina pro-hanturazko geneak gainadierazi zituen sendatze fasean (**15.B irudia**), baina ez EAE-aren fase akutuan (**15.A irudia**). Pro-hanturazko geneen gainadierazpena FACS bidez isolatutako mikroglia zeluletan ere antzeman genuen (ikus estrategia **10.E irudian**) P2X4<sup>-/-</sup> saguak eta sagu basatiak alderatzean sendatze fasean (**15.C irudia**). Ondoren, immunohistokimia bidez iNOS-en (pro-hanturazko markatzailea) adierazpena aztertu genuen TNP-ATP-arekin tratatutako saguen eta P2X4<sup>-/-</sup> saguen bizkarrezur muinetan EAE-a indutitu ondoren. Espero bezala, mikroglia/makrofagoetan iNOS-en adierazpen handiagoa aurkitu genuen TNP-ATP-arekin tratatutako saguetan eta baita P2X4<sup>-/-</sup> saguetan ere (**16.A, B irudia**). Datu hauek P2X4R-k mikroglia/makrofagoen aktibazioan eragiten duela adierazten dute.

**A Fase akutua**



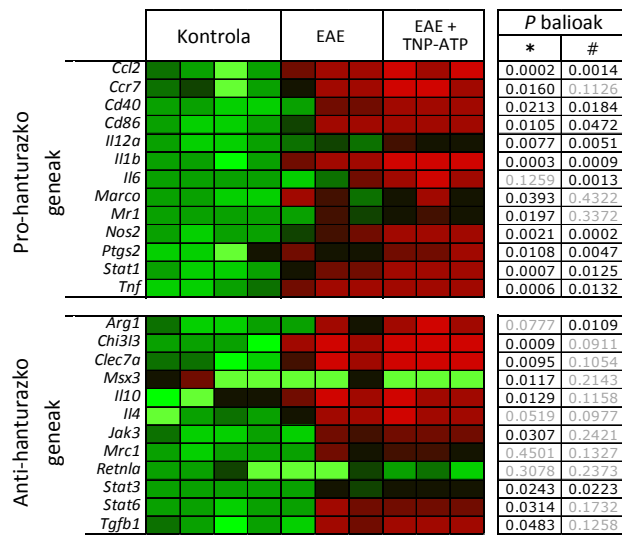
15. irudia. P2X4R blokeatzeak pro-hanturazko geneen gainadierazpena eragiten du EAE-a induzitu ondoren.

A-B- Heatmap-ak pro-hanturazko eta anti-hanturazko geneen adierazpen aldaketak adierazten ditu bizkarrezur muineko laginetan EAE-aren fase akutuan (A) eta sendatze fasean (B) TNP-ATP-aren presentzian edo ausentzian (n = 3).

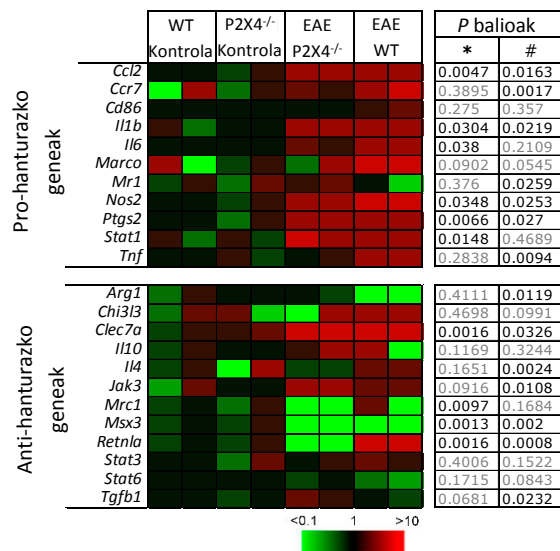
C- Heatmap-ak pro-hanturazko eta anti-hanturazko geneen adierazpen aldaketak adierazten ditu bizkarrezur muinetik FACS bidez isolatutako mikroglia zeluletan, sagu basatien eta P2X4<sup>-/-</sup> saguen kasuan EAE-aren sendatze fasean (n = 2, duplikak).

Datuen informazioa: taulek esangura estatistikoa adierazten dute kontrolen eta EAE-dun saguen artean (\*) eta EAE-dun saguen eta TNP-ATP-arekin tratatutako EAE-dun saguen artean (A, B) edo EAE-dun sagu basatien eta EAE-dun P2X4<sup>-/-</sup> saguen artean (#) (C). Datuak Studenten t-testa erabilia aztertu ziren.

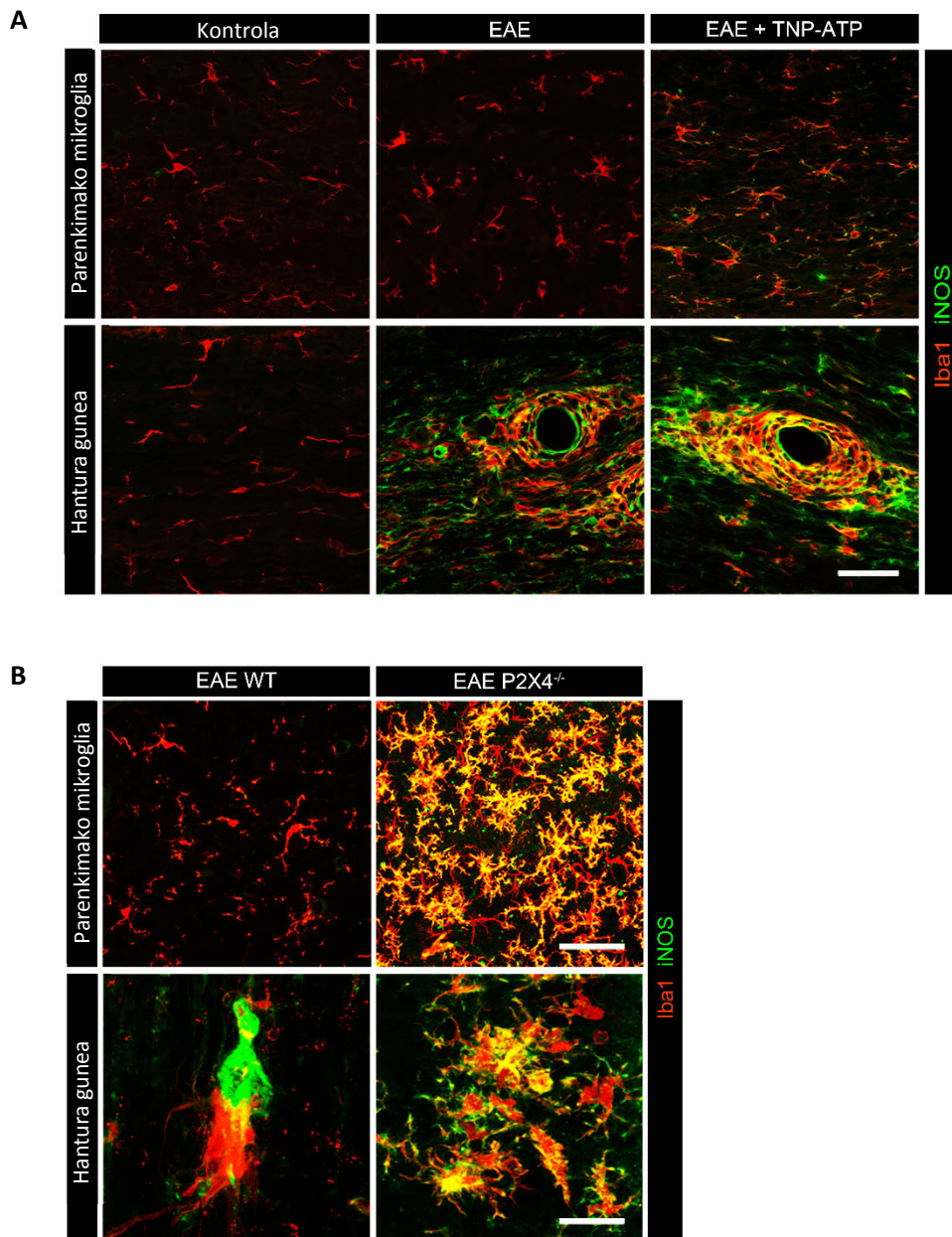
**B Sendatze fasea**



**C FACS bidez isolatutako mikroglia**



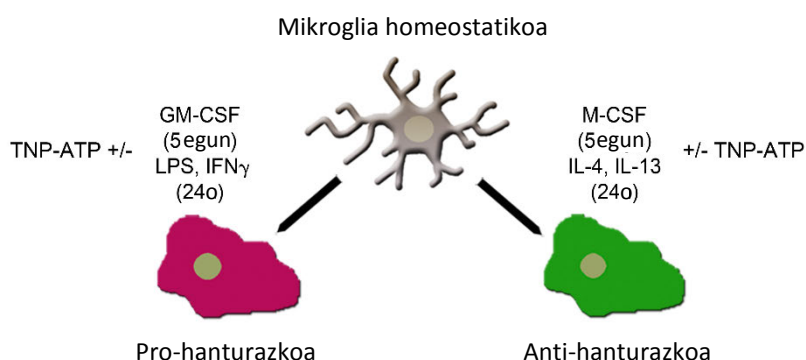




**16. irudia. P2X4R blokeatzeak iNOS-en adierazpenaren igoera eragiten du EAE-a induzitu ondoren.**

iNOS-en (pro-hanturazko markatzailea; berdea) adierazpen igoera Iba1<sup>+</sup> zeluletan (gorria) TNP-ATP-arekin tratatutako EAE-dun saguen bizkarrezur muinean eramailearekin tratatutakoekin alderatuz (A) eta P2X4<sup>-/-</sup> saguetan sagu basatiekin (WT) alderatuz (B) (n = 3). Analisia sendatze fasean burutu zen. Eskalak = 50 (A, B *goian*) eta 25 (B *behean*) µm.

Mikrogliaaren aktibazioan P2X4R-k duen eragina sakonago aztertzeko, *in vitro* eginiko esperimentuetan, mikroglia zelulak aurretiazko protokolo bat jarraituz, faktore kolonia estimulatzaileekin aktibatu ziren eta ondoren zitokinekin edo LPS-arekin pro-hanturazko edo anti-hanturazko mikroglia lortzeko (Durafort *et al.*, 2012; **17. irudia**). Polarizazioa immunozitokimia bidez aztertu zen pro-hanturazko (iNOS) eta anti-hanturazko (manosaren hartzailea (MRC1) eta arginase) markatzaileak erabilita. P2X4R-ren TNP-ATP bidezko blokeatzeak igoera esanguratsua eragin zuen iNOS-en adierazpenean pro-hanturazko mikroglia zeluletan eta beherakada MRC1 eta arginasaren kasuan anti-hanturazko mikroglia zeluletan (**18.A, B irudia**). Honekin bat etorritik, qPCR bidez ere pro-hanturazko geneen igoera eta anti-hanturazkoen beherakada ikusi zen TNP-ATP-aren eraginez (**19. irudia**). Ondoren, P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia zelulen aktibazioa aztertu genuen eta espero bezala, pro-hanturazko P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia zelulek igoera esanguratsua izan zuten iNOS-en adierazpenean. Anti-hanturazko P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia zelulek aldiz, beherakada izan zuten MRC1-en adierazpenean (**20. irudia**). Datu guzti hauek P2X4R-k mikrogliaaren polarizazioa modulatzeko duela adierazten dute.

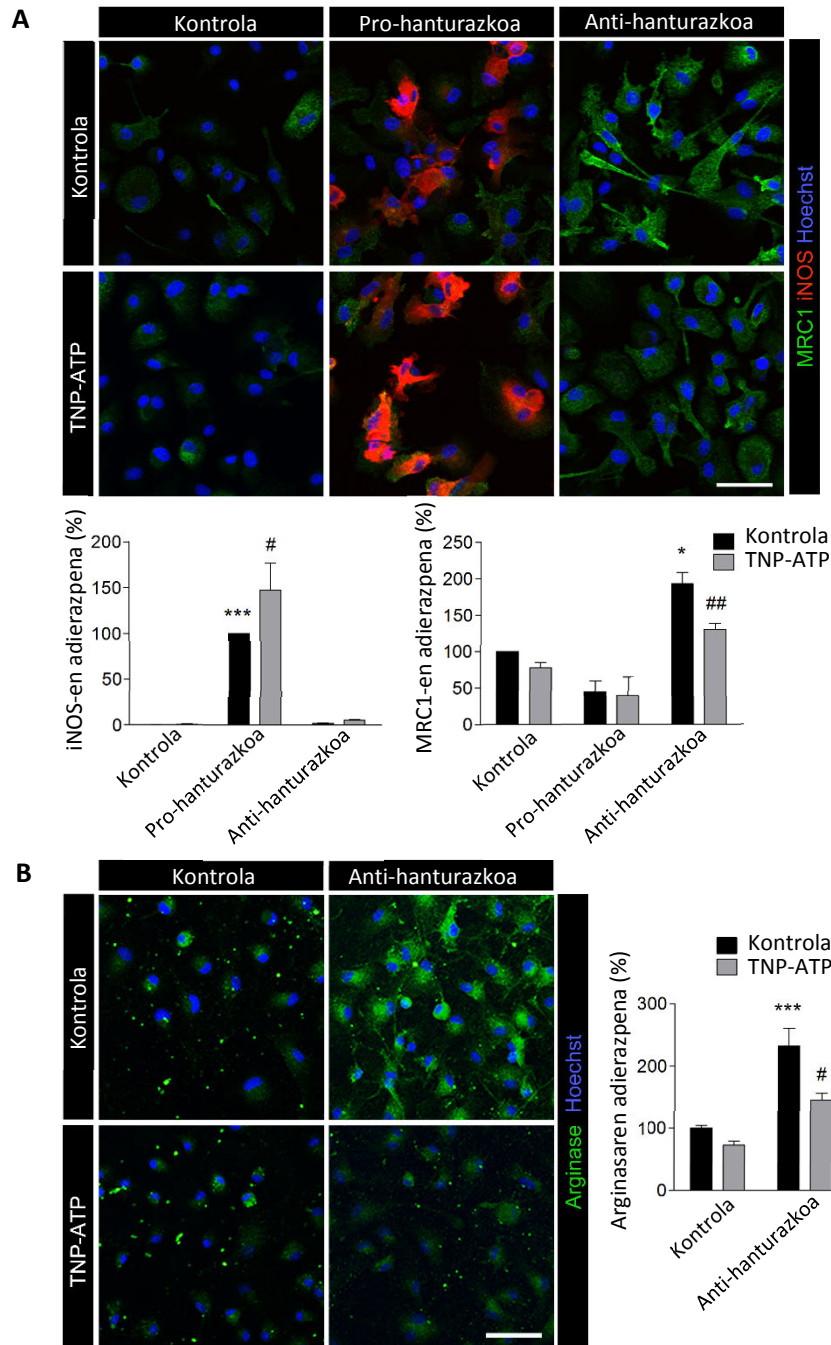


**17. irudia. Mikroglia zelulen polarizazio protokoloaren ilustrazio eskematikoa.**

- Pro-hanturazko mikroglia: zelulak GM-CSF-rekin (5 ng/ml) tratatu ziren 5 egunez eta ondoren 24 ordu (o) LPS (10 ng/ml) eta IFN<sub>γ</sub>-rekin (20 ng/ml).
- Anti-hanturazko mikroglia: zelulak M-CSF-rekin (20 ng/ml) tratatu ziren 5 egunez eta ondoren 24 ordu (o) IL-4 (20 ng/ml) eta IL-13-rekin (50 ng/ml).

Polarizazio protokoloa TNP-ATP-aren (10 μM) presentzian edo gabezian burutu zen denbora guztian.



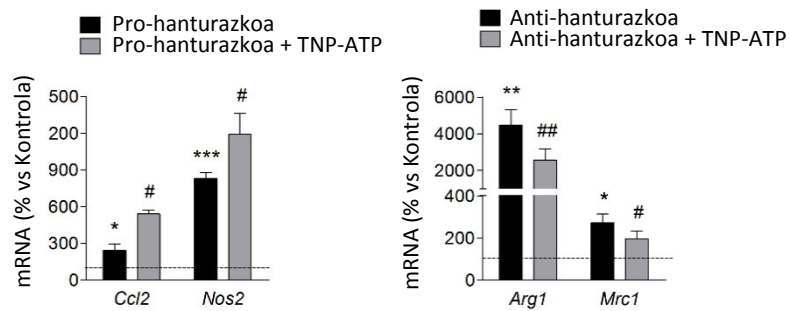


### 18. irudia. P2X4R-k mikrogliaen polarizazioa modulatzeko du.

A- iNOS (gorria) (n = 7) eta manosaren hartzaila (MRC1, berdea) (n = 4) mikroglia polarizatuan TNP-ATP-aren (10  $\mu$ M) presentzian edo gabezian. Histogramek zelulako immunoerreaktibitatea adierazten dute. Zelulak Hoechst -bidezko nukleoaren markaketari esker identifikatu ziren. Eskala = 50  $\mu$ m.

B- Arginasa (berdea) (n = 3) anti-hanturazko mikroglia zeluletan TNP-ATP-aren (10  $\mu$ M) presentzian edo gabezian. Histogramek zelulako immunoerreaktibitatea adierazten dute. Zelulak Hoechst -bidezko nukleoaren markaketari esker identifikatu ziren. Eskala = 50  $\mu$ m.

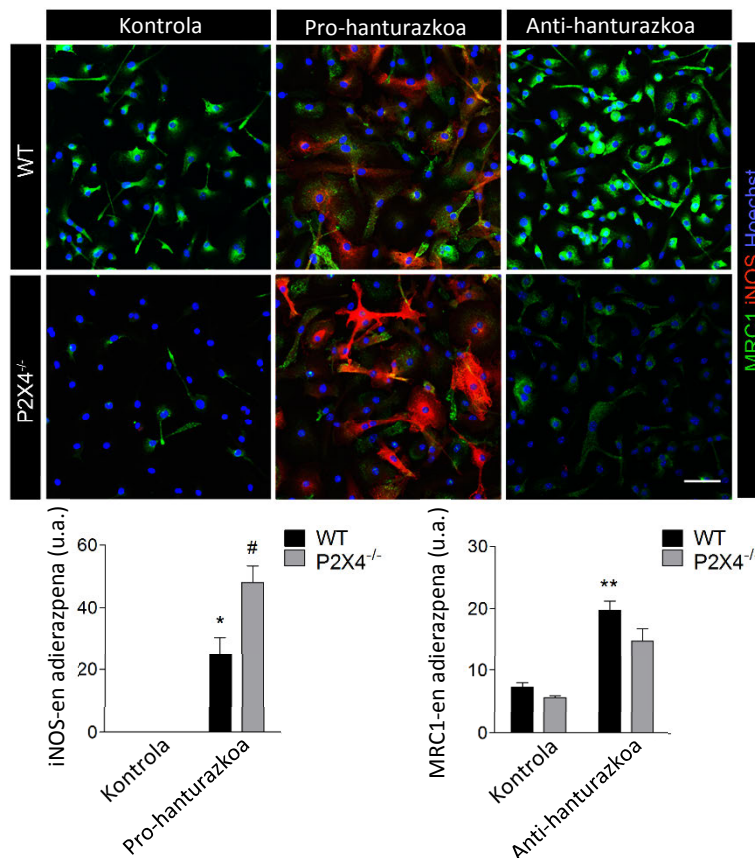
Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA erabilita egin zen. \*/#P < 0.05, ##P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 kontrolerikiko (\*) edo pro-/anti-hanturazko mikrogliaerikiko (#).



**19. irudia. P2X4R-k mikroglia polarizazio markatzaileen mRNA kantitatea modulatu du.**

qPCR bidezko pro-hanturazko geneen (*Ccl2* eta *Nos2*) eta anti-hanturazko geneen (*Arg1* eta *Mrc1*) adierazpena mikroglia polarizatuan TNP-ATP-aren (10 μM) presentzian edo gabezian (n = 3).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA erabilita egin zen. \*/#P < 0.05, \*\*/##P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 kontrolekiko (\*) edo pro-/anti-hanturazko mikrogliaerikiko (#).



**20. irudia. Pro-hanturazko eta anti-hanturazko polarizazioa mikroglia basatian (WT) eta P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia.**

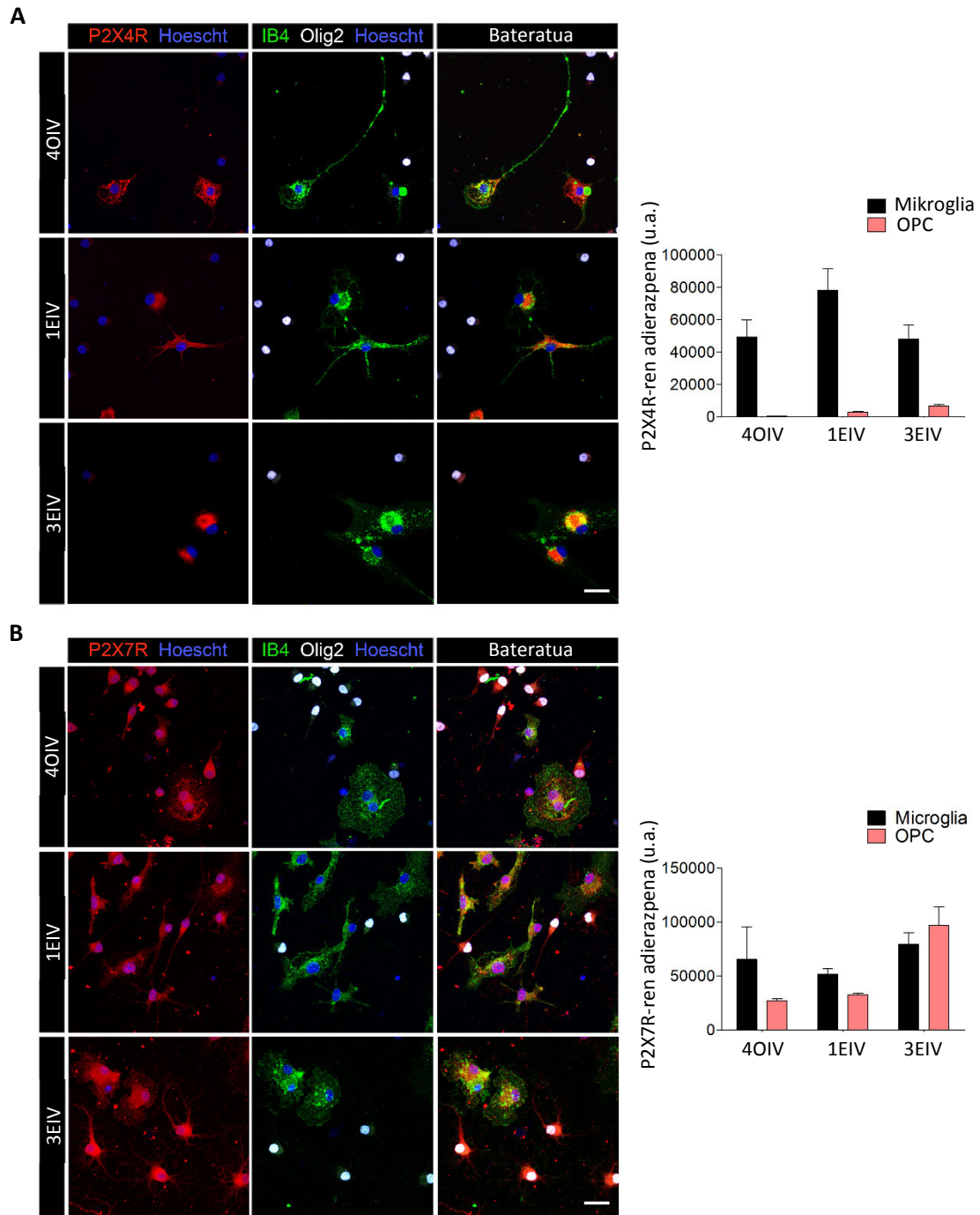
iNOS (gorria) eta manosaren hartzailea (MRC1, berdea) mikroglia polarizatu basatian eta P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia polarizatuan. Histogramek zelulako immunoerreaktibilitatea adierazten dute (n = 4). Zelulak Hoechst -bidezko nukleoaren markatari esker identifikatu ziren Eskala = 50 μm.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA erabilita egin zen. \*/#P < 0.05, \*\*P < 0.01 kontrolekiko (\*) edo pro-/anti-hanturazko mikrogliaerikiko (#).

## 5. P2X4R-ren eragina oligodendrozoen diferentziazioan

EA-n ematen den bermielinizazioan zehar pro-hanturazko fenotipotik anti-hanturazko fenotiporanzko eraldaketa ematen da mikroglia zeluletan eta makrofagoetan, eta aldaketa hau ezinbestekoa da bermielinizazioa eraginkorra izan dadin (*Miron et al., 2013*). Datu hauek jakinda, P2X4R-ren blokeatzeak oligodendrozoen diferentziazioan zeharkako eragina izan zezakeela pentsatu genuen. Hipotesi hau frogatzeko, lehendabizi P2X4R-ren adierazpena eta funtzioa aztertu genituen oligodendrozo eta mikroglia zeluletan *in vitro*. Immunozitokimia hirukoitz bidez P2X4R ez zela Olig2<sup>+</sup> zeluletan aurkitzen ikusi genuen, hau da, oligodendrozoen zelula aitzindariak (OPC) eta oligodendrozo helduek ez zuten P2X4R adierazten, aldiz B4<sup>+</sup> zelulek (mikroglia markatzailea) adierazpen handia aurkezten zuten (**21.A irudia**). Bestalde, P2X7R bi populazio zelularretan aurkitzen zen (**21.B irudia**).

Oligodendrozoen diferentziazioan P2X4R-ren zuzeneko edozein efektu baztertzeko, oligodendrozoak agente farmakologikoekin estimulatu genituen. Oligodendrozoak ATP $\gamma$ S-ren (10  $\mu$ M) presentzian jarri ziren 3 egunez. Kontzentrazio baxua erabili zen P2X7R-ren aktibazioa ekiditeko asmoz. Oligodendrozoen diferentziazioa zelulen azalera neurtuz eta MBP<sup>+</sup> zelulen kopurua zenbatuz aztertu zen. ATP $\gamma$ S-ek ez zuen inongo aldaketarik eragin bi parametroetan (**22.A irudia**). Laborategian lehenago lortutako datuek adierazten dute oligodendrozoek P2X7R funtzionala adierazten dutela eta beraren gainaktibazioak oligodendrozoen heriotza eragiten duela (*Matute et al., 2007*). Ondoren, P2X4R-k oligodendrozoen biziraupenean eraginik izan zezakeen aztertu genuen, zeluletan hartzaile hau adieraziko balitz. BzATP-arekin (hartzaile purinergikoen espektru zabaleko agonista) denbora luzez mantentzeak (3 egun) oligodendrozoen heriotza eragin zuen, baina TNP-ATP-a (10  $\mu$ M) ez zen zelulen heriotza ekiditeko gai izan (**22.B irudia**). Gainera, oligodendrozoak ATP $\gamma$ S-rekin denbora luzez mantentzeak (3 egun) P2X4R-ren modulatzailer positiboa den ibermektinaren (IVM, 3  $\mu$ M) presentzian ez zuen oligodendrozoen heriotza eragin (**22.B irudia**). Datu guzti hauek kontuan hartuta, oligodendrozoek ez dutela P2X4R-rik adierazten ondoriozta genezake.



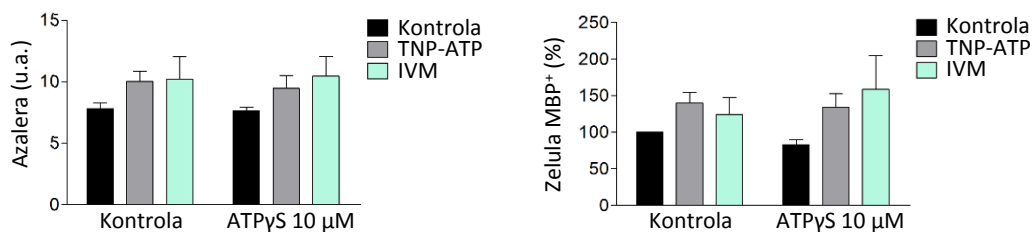
**21. irudia. Oligodendrozoitek ez dute P2X4R.**

Mikroglia-OPC-en adibide argazkiak non P2X4R (A; gorria) edo P2X7R (B; gorria), Olig2 (oligodendrozoeten leinuaren markatzailea; zuria), isolectin B4 (mikroglia markatzailea, IB4; berdea) eta Hoechst-arekin (nukleo markatzailea; urdina) markatu diren oligodendrozoeten garapen momentu ezberdinetan: 4 ordu *in vitro* (4OIV), egun 1 *in vitro* (1EIV) eta 3 egun *in vitro* (3EIV). Eskala = 20 µm.

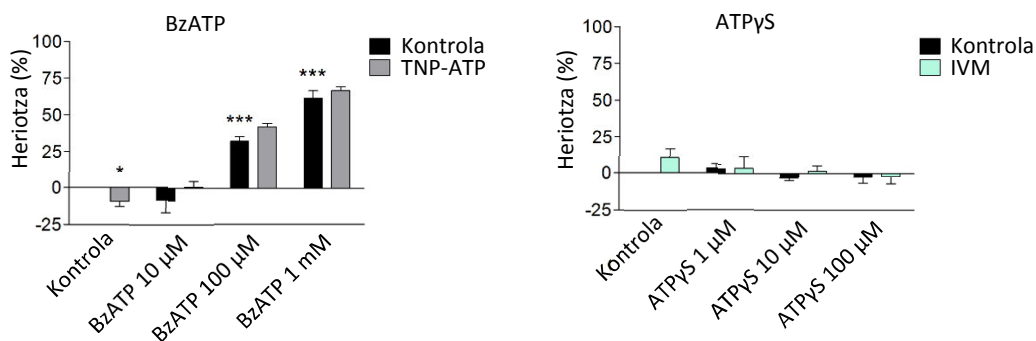
Ikusi P2X4R-ren presentzia isolectin IB4<sup>+</sup>- mikroglia zeluletan eta gabezia Olig2<sup>+</sup> zeluletan. Histogramek P2X4R (A) eta P2X7R (B) -ren kuantifikazioa adierazten dute oligodendrozoeten garapeneko momentu ezberdinetan ko-kultiboan (n = 3).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira

A



B

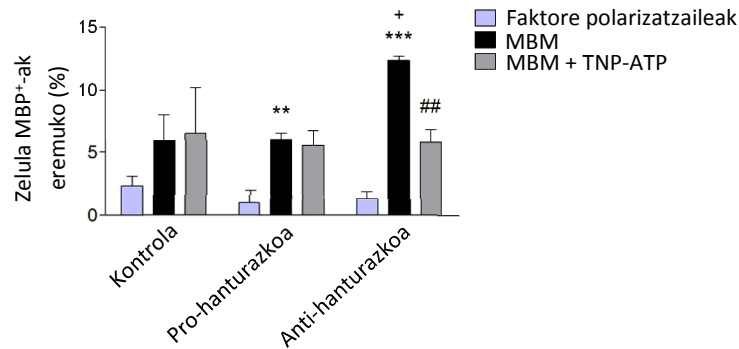
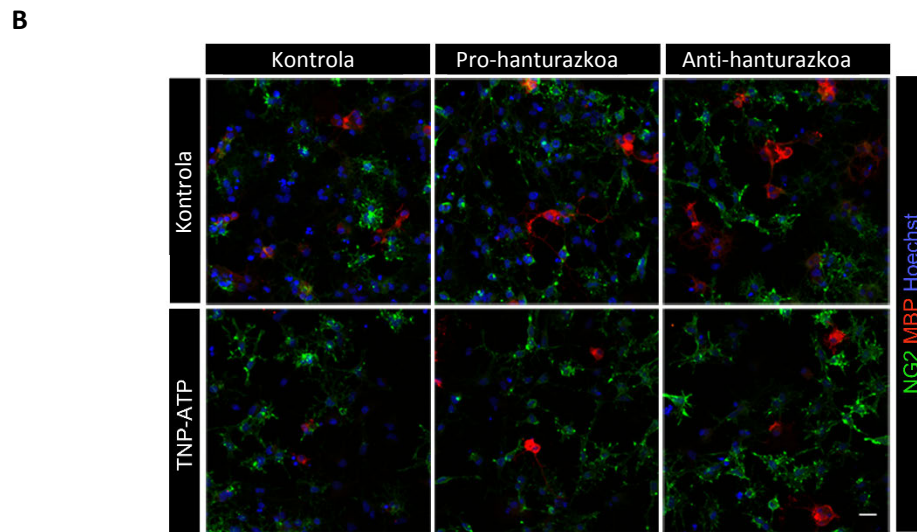
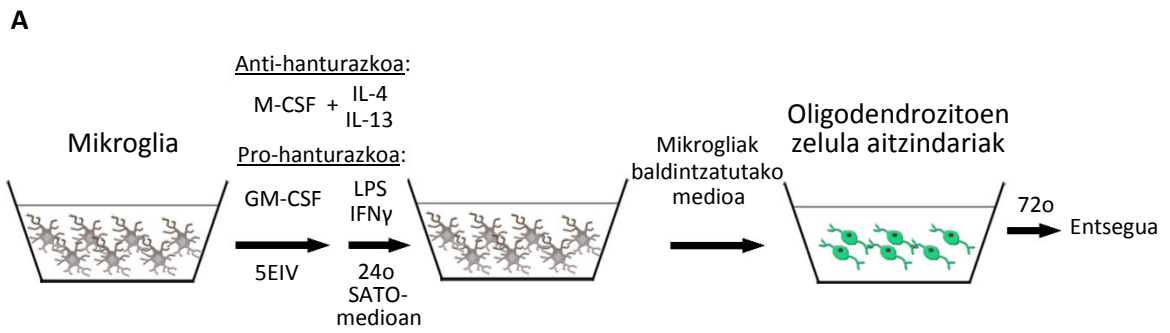


## 22. irudia. Ez dago P2X4R funtzionalik oligodendroitoetan *in vitro*.

- A- ATPγS-ren (10 μM) efektua ± IVM edo TNP-ATP (10 μM) oligodendroitoen diferentziazioan, zelulen azaleraren (*ezker*) eta zelula guztiekiko MBP<sup>+</sup> zelulen kopuruaren (*eskuin*) arabera aztertua (n = 3).
- B- Oligodendroitoen biziraupena BzATP-rekin (hartzaile purinergikoen espektru zabaleko agonista) mantendu ondoren 24 orduz, TNP-ATP-aren (10 μM) presentzian edo gabezian (*ezker*) edo ATPγS-rekin IVM-ren (3 μM) presentzian edo gabezian (*eskuin*) (n = 3).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilita egin zen. \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001.

Behin oligodendroitoek P2X4R-rik ez zutela ikusita, mikroglia zelulen P2X4R-k oligodendroitoen diferentziazioan eraginik izan zezakeen azertu genuen. Horretarako, mikroglia zelulak polarizatu genituen fenotipo kontrol, pro-hanturazko eta anti-hanturazkora TNP-ATP-aren (10 μM) presentzian edo gabezian. Polarizazio protokoloko azken 24 orduak SATO- medioan burutu ziren gero medio hau OPC-ei gehitu ahal izateko (ikusi Material eta Metodoak atala). Mikroglia zelulek baldintzatutako medioa (MBM) jaso, OPC-ei jarri eta 3 egunez mantendu ziren (ikusi marrazkia **23.A irudian**). Mikroglia baldintzatutako medio (MBM) guztiek MBP<sup>+</sup> oligodendroito helduen kopurua igo zuten, faktore polarizatzaileek heurrek bakarrik izaniko eraginarekin alderatuz (**23.B irudia**). Hala ere, anti-hanturazko mikroglia baldintzatutako medioa izan zen oligodendroitoen diferentziazio handiena eragin zuen medioa eta TNP-ATP-a eragin hau ekiditeko gai izan zen (**23.B irudia**).



**23. irudia. Mikroglia zelulen P2X4R oligodendroitoen diferentziazioa modulatzeko gai da.**

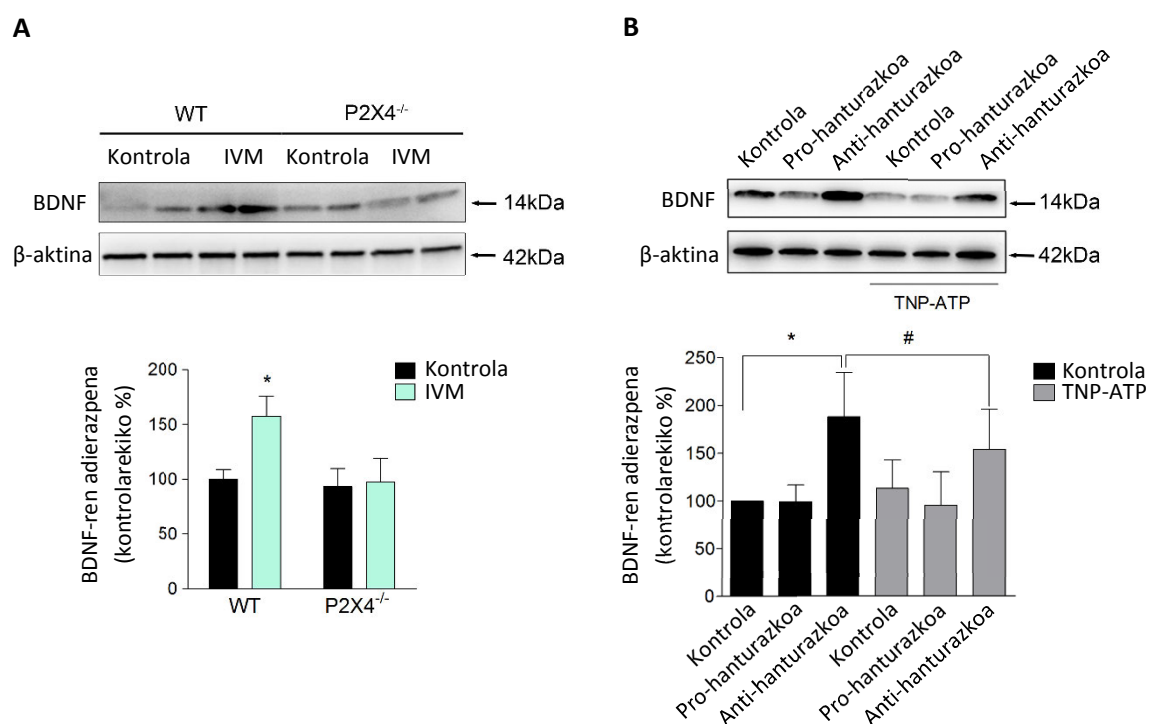
A- OPC-ak mikroglia kontrolak, anti-hanturazkoek eta pro-hanturazkoek baldintzatutako medioekin (MBM) mantendu ziren 3 egunez. o = ordu.

B- NG2 (berdea) eta MBP-ren (gorria) adierazpena MBM-ekin trataturiko OPC-etan. Histogramak MBP<sup>+</sup> zelulen zenbaketa adierazten du eremuko (n = 3). Zelulak Hoechst -bidezko nukleoek markatutako esker identifikatu ziren. Eskala = 20 μm.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA erabilia egin zen. +P < 0.05, \*\*/###P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 polarizazio faktoreekiko (\*), MCM-rekiko (#) edo MBM kontrolarekiko (+).



Garunetik-eratorritako faktore neurotrofikoak (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) oligodendrozoen diferentziazioa eta bermielinizazioa bultzatzen ditu (Wong et al., 2013) eta mikroglia zelulen P2X4R-ren estimulatzea BDNF-aren askatzearekin lotu izan da (Tsuda et al., 2003; Coull et al., 2005). Hau kontuan izanda, anti-hanturazko mikroglia eragina BDNF-aren parte hartzeari ote zegokion aztertu genuen. Lehendabizi P2X4R-ren eta BDNF-aren arteko lotura ziurtatu genuen eta horretarako, mikroglia zelulen P2X4R IVM-a (3  $\mu$ M) bidez aktibatu genuen. Western blot analisiak IVM-ak BDNF-aren askatzea areagotzen zuela erakutsi zuen sagu basatietatik lortutako mikroglia zeluletan, P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia zeluletan aldiz, IVM-ak ez zuen eraginik izan, honela, P2X4R-k BDNF-aren askatzean duen funtzioa berretsiz (**24.A irudia**). Ondoren, BDNF-aren ekoizpena aztertu genuen mikroglia polarizatu ezberdinetan. Western blot analisiak erakutsi zuenez anti-hanturazko mikroglia BDNF ekoizpen handiagoa zuen eta efektu hau blokeatu egiten zen TNP-ATP-aren presentzian (**24.B irudia**).



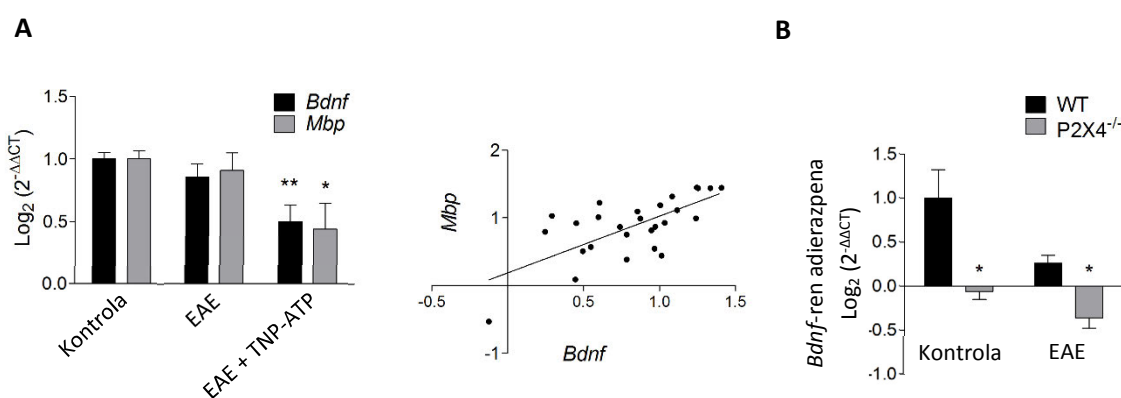
#### 24. irudia. BDNF ekoizpen handiagoa du anti-hanturazko mikroglia.

A- BDNF-aren ekoizpena Western blot bidez aztertua mikroglia basatian (WT) eta P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia baldintza kontrolatan eta IVM-rekin tratatuta. Histogramak BDNF-aren adierazpena erakusten du  $\beta$ -aktinaren normalizatuta (n = 3).

B- Immunoblotak BDNF-aren adierazpen maila adieraziz mikroglia polarizatu ezberdinetan TNP-ATP-aren (10  $\mu$ M) presentzian edo gabezian. Histogramak BDNF-aren adierazpena erakusten du  $\beta$ -aktinaren normalizatuta (n = 10).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilita egin zen. \*/#P < 0.05.

*In vitro* lorturiko emaitza hauen ostean, *Bdnf*-ren mRNA adierazpen maila aztertu genuen EAE esperimentuko laginetan sendatze fasean. Datuekin bat etorriz, *Bdnf*-ren adierazpen maila txikiagoa zen TNP-ATP-arekin tratatutako saguetan, eta gainera *Mbp*-ren adierazpen baxuagoarekin korrelazionatzen zuen (**25.A irudia**). *Bdnf*-ren mRNA kantitatea txikiagoa zen FACS bidez isolatutako P2X4<sup>-/-</sup> mikroglia zeluletan ere, bai kontroletan eta baita EAE-dun saguetan ere (**25.B irudia**). Datu hauek iradokitzen dutenez, mikroglia P2X4R blokeatzeak oligodendroitoen diferentziazioa oztopatzen du mikroglia zelulak pro-hanturazko fenotipo batera eramanez, eta honek bermielinizazioa oztopa lezake *in vivo*.



**25. irudia. P2X4R-ren gabeziak *Bdnf* mailaren murrizketa eragiten du EAE-a induzitu ondoren.**

- A- *Bdnf* eta *Mbp*-ren mRNA maila (ezker) eta euren arteko korrelazioa (eskuin) animalia osasuntsuetan (Kontrola), EAE-dun saguetan eta TNP-ATP-arekin tratatutako EAE-dun saguetan, sendatze fasean (n = 10 sagu/taldeko).
- B- *Bdnf* mRNA maila sagu basatien (WT) eta P2X4<sup>-/-</sup> saguen bizkarrezur muin laginetan baldintza osasuntsuetan eta EAE-a induzitu ondoren (n = 4 sagu/taldeko).

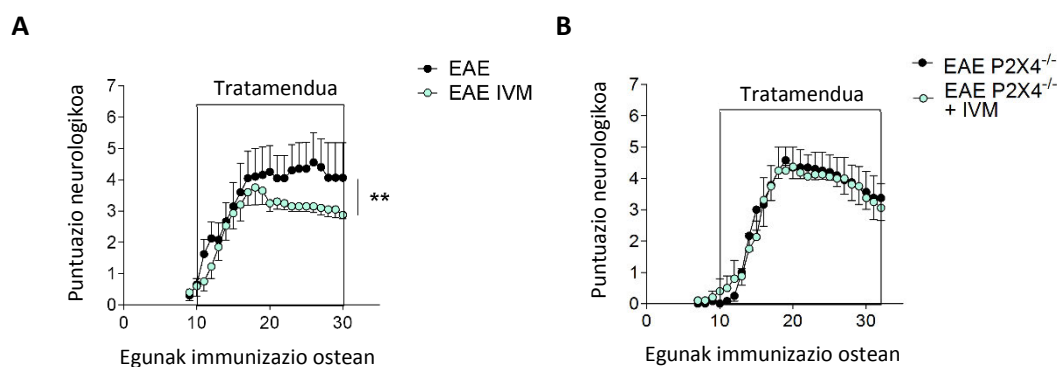
Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA erabilita egin zen. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

**6. P2X4R-ren indartzeak EAE-a hobetzen du**

Ondoren P2X4R-ren indartzearen erabilgarritasun terapeutikoa aztertu genuen. Helburu honetarako, ivermektina (*ivermectin*, IVM) erabili genuen, Medikamentu eta Elikagaien Administrazioak (*Food and Drug Administration*, FDA) onartuta duen agente anti-parasitikoa. IVM-ak alosterikoki modulatu ditu bai P2X4R-ren ioien kondukzioa eta baita kanalaren irekitzea ere (*Priel eta Silberberg, 2004*). Lehendabizi P2X4R-ren indartzea aztertu genuen EAE-aren patogenesisian eta horretarako saguak egunero IVM-rekin (1 mg/kg) tratatu genituen



sintomen agertzetik (10garren eguna immunizazio ostean) esperimentera amaitu arte. IVM-ak arazo motoreen hobetze esanguratsua eragin zuen (**26.A irudia**). IVM-ak EAE-an eragindako efektua P2X4R-ren menpekoa zela ziurtatzeko, P2X4<sup>-/-</sup> saguak IVM-arekin (1 mg/kg) tratatu genituen sintomen agertzetik esperimentera amaitu arte. P2X4<sup>-/-</sup> saguetan IVM-ak ez zuen gaixotasunaren eboluzioa aldatu eta honela, EAE-an IVM-ak eragindako efektua P2X4R-ren partehartzeari esker izan zela baieztatu genuen (**26.B irudia**). Datu hauek IVM-ak modu eraginkorren sendatzea bultzatzen duela erakusten dute.



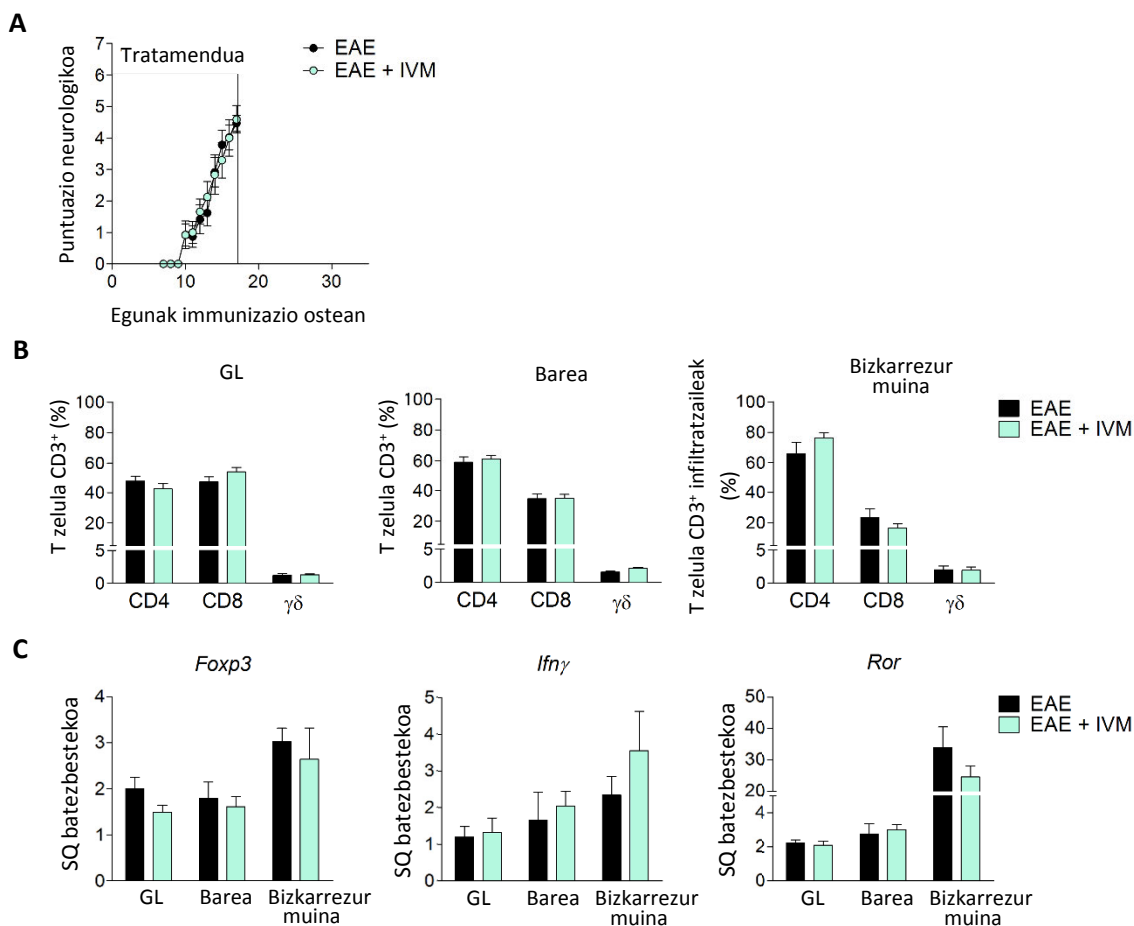
#### 26. irudia. P2X4R-ren indartzeak EAE-aren sintomak hobetzen ditu.

C- Eramaille eta IVM (1 mg/kg)-rekin tratatutako saguen puntuazio neurologikoa EAE-a induzitu ondoren (n = 5 sagu/taldeko). Saguak egunero tratatu ziren immunizazio osteko 10garren egunetik esperimentera amaitu arte.

D- Puntuazio neurologikoa EAE-a induzitu ondoren eramailearekin (n = 4) eta IVM (1 mg/kg)-rekin (n = 5) trataturiko P2X4<sup>-/-</sup> saguetan. Saguak egunero tratatu ziren immunizazio osteko 10garren egunetik esperimentera amaitu arte.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Mann-Whitney-ren U-testa erabilia egin zen. \*\*P < 0.01.

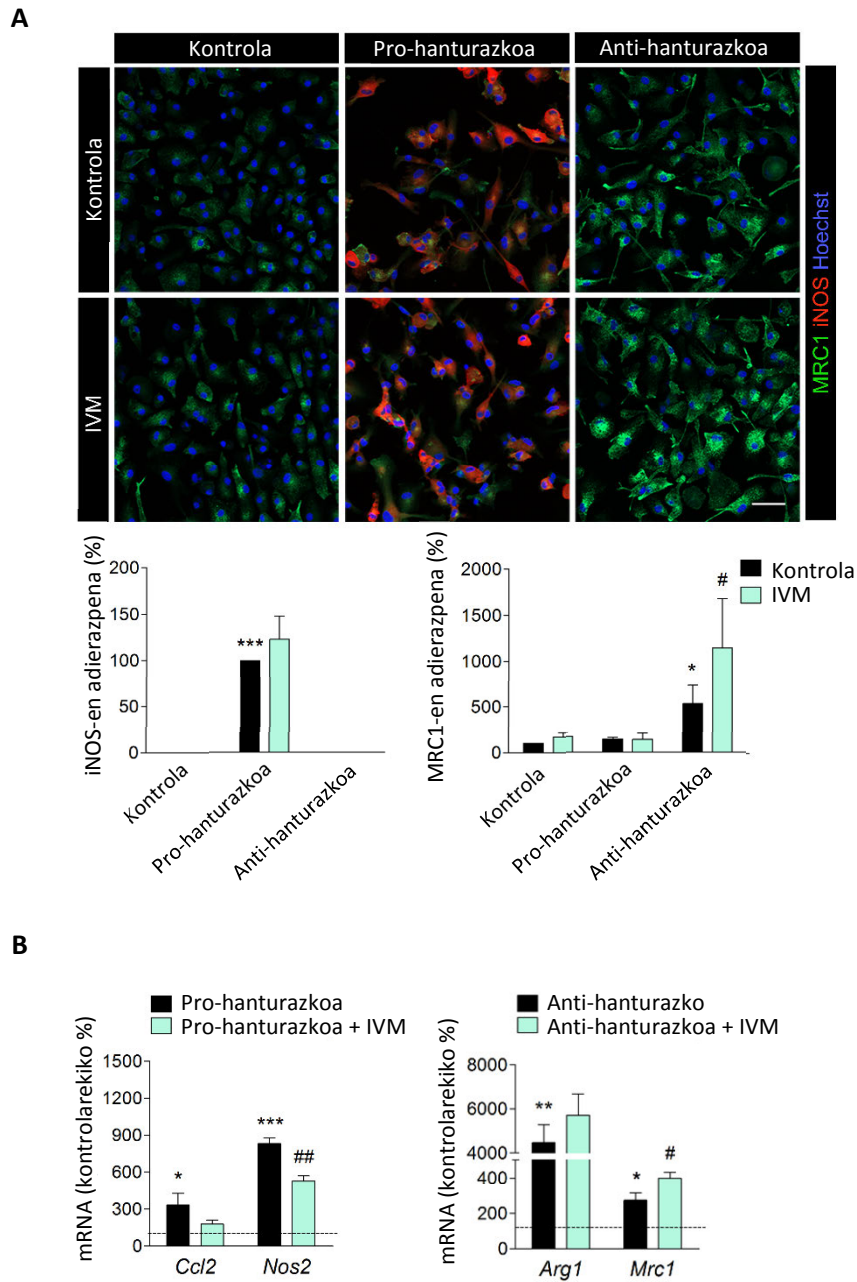
TNP-ATP-aren kasuan egin genuen bezala, hartutako sistema immunean P2X4R-ren edozein funtzio baztertzeko beste EAE esperimentera bat burutu genuen, eta oraingo honetan tratamendua T zelulen aktibazio fasean egin genuen (immunizazio egunetik 17garren egunera). IVM-ren tratamenduak ez zuen gaixotasunaren eboluzioan aldaketarik eragin (**27.A irudia**). Gainera, gaixotasunaren fase akutuan, erantzun immunea neurtu genuen periferian (barean eta gongoil linfatikoetan) fluxu zitometria bidez (ikusitako estrategia **14.B irudian**). IVM-ren tratamenduak ez zuen T CD4<sup>+</sup> zelulen, T CD8<sup>+</sup> zelulen eta T γδ zelulen kopuruan eraginik izan (**27.B irudia**). Horrez gain, T CD4<sup>+</sup> zelulen erantzuna sakonago aztertu genuen qPCR bidez eta ez genuen inolako eraginik antzeman *Foxp3* (T erregulatzaileak), *Ror* (Th17) eta *Ifnγ* (Th1)-ren mRNA mailan IVM-ren tratamenduaren ondoren (**27.C irudia**).



#### 14. irudia. P2X4R-k ez du eraginik T zelulen aktibazio fasean.

- A- Eramailearekin eta IVM-rekin (1 mg/kg) trataturiko saguen puntuazio neurologikoa EAE-a induzitu ondoren. (n = 13; 2 esperimentu independentetakoak). Saguak egunero tratatu ziren immunizazio egunetik gaixotasunaren fase akutura iritsi arte.
- B- T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> eta γδ zelulen analisia fluxu zitometria bidez gongoil linfatikoetan (GL), barean eta bizkarrezur muinean, EAE-aren fase akuturarte eramailearekin eta IVM-rekin tratatutako saguetan (n = 7). (Ikusi fluxu zitometriarako erabilitako estrategia **5.B irudian**).
- C- *Foxp3* (T erregulatzaileak), *Ifnγ* (Th17) and *Ror* (Th1)-en mRNA adierazpena gongoil linfatikoetan (GL), barean eta bizkarrezur muinean EAE-aren fase akuturarte eramailearekin (n = 6) eta IVM-rekin (n = 7) tratatutako saguetan.
- Datuen informazioa: datueak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira.

Ondoren, IVM-ren eragina aztertu genuen mikroglia polarizazioan *in vitro*. Mikroglia zelulak IVM-ren (3 μM) presentzian edo gabezian polarizatuak izan ziren eta tratamenduak igoera esanguratsua eragin zuen anti-hanturazko mikroglia polarizazioan (**28.A irudia**). Honekin bat etorriz, qPCR bidez ere pro-hanturazko geneen jeitsiera eta anti-hanturazkoen igoera ikusi zen IVM-ren eraginez (**28.B irudia**). Datu hauek, P2X4R-ren indartzeak mikroglia anti-hanturazko fenotipora bideratu eta ondorioz bermielinizazio eraginkorra bultzatu dezakeela iradokitzen dute.



## 28. irudia. P2X4R-k mikrogliaen polarizazioa modulatzeko du.

A- iNOS (gorria) eta manosaren ahrtzailea (MRC1, berdea) mikroglia polarizatuan IVM-ren (3  $\mu$ M) presentzian edo gabezian. Histogramek zelulako immunoerreaktibitatea adierazten dute (n = 3). Zelulak Hoechst-bidezko nukleoaren markaketari esker identifikatu ziren. Eskala = 50  $\mu$ m.

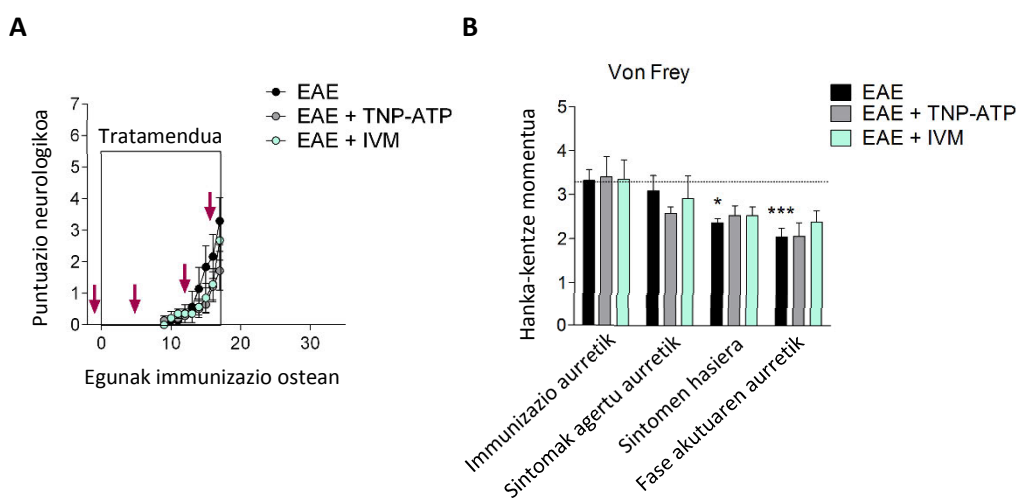
B- Denbora-erreakzio PCR bidezko pro-hanturazko geneen (Ccl2 eta Nos2) eta anti-hanturazko geneen (Arg1 eta Mrc1) adierazpena mikroglia polarizatuan IVM-ren (3  $\mu$ M) presentzian edo gabezian (n = 3).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA erabili egin zen. \*/#P < 0.05, \*\*/#P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 kontrolarekiko (\*) edo pro-/anti-hanturazko mikrogliarekiko (#).

## 7. TNP-ATP-ak eta IVM-k ez dute aldaketarik eragiten alodinia mekanikoan EAE-dun saguetan

IVM-ren erabilgarritasun terapeutikoa zalantzan egon liteke P2X4R-k min neuropatikoarekin duen lotura dela eta. P2X4R-ren antagonista berri batek eragin anti-alodiniakoak erakutsi ditu nerbio kaltetze traumatikoaren ondoren, nahiz eta antagonistak ez duen min akutu nozizeptiboan eta funtzio motorean eraginik izan (*Matsumura et al., 2016*). Honez gain, EA-a duten gaixoetan oso sintoma ohikoa da mina (*O'Connor et al., 2008*).

Sentzu honetan P2X4R-ren parte hartzea aztertzeko, beste EAE esperimentu bat burutu genuen, eta oraingo honetan saguak egunero tratatu ziren eramailearekin, TNP-ATP-arekin (10 mg/kg) edo IVM-rekin (1 mg/kg) immunizazio egunetik (0garren eguna) esperimentua amaitu arte. Alodinia mekanikoa neurtu zen immunizazio aurretik, sintomak agertu aurretik (5garren eguna immunizazio ondoren), sintomen hasieran (12garren eguna immunizazio ondoren) eta fase akutura iritsi aurretik (16garren eguna immunizazio ondoren). Hanka-kentze momentuan aplikaturiko presio mekanikoa automatikoki neurtu zen e-VF Electronic Von Frey aestesimetroaren bidez EAE-ko momentu ezberdinetan, sintoma motoreak larriegiak izan aurretik. Hanka-kentzea eragiteko beharrezko presioa esanguratsuki murriztu zen eramailearekin tratatutako EAE-dun saguetan sintomen hasieran eta fase akutua baino lehen, minarekiko sentsibilitate handiagoa erakutsiz EAE-an zehar. Hala ere, tratamenduek ez zuten aldaketarik eragin minaren pertzepzioan (**29. irudia**).



**29. irudia. P2X4R-ren indartzeak ez du alodinia areagotzen EAE-an.**

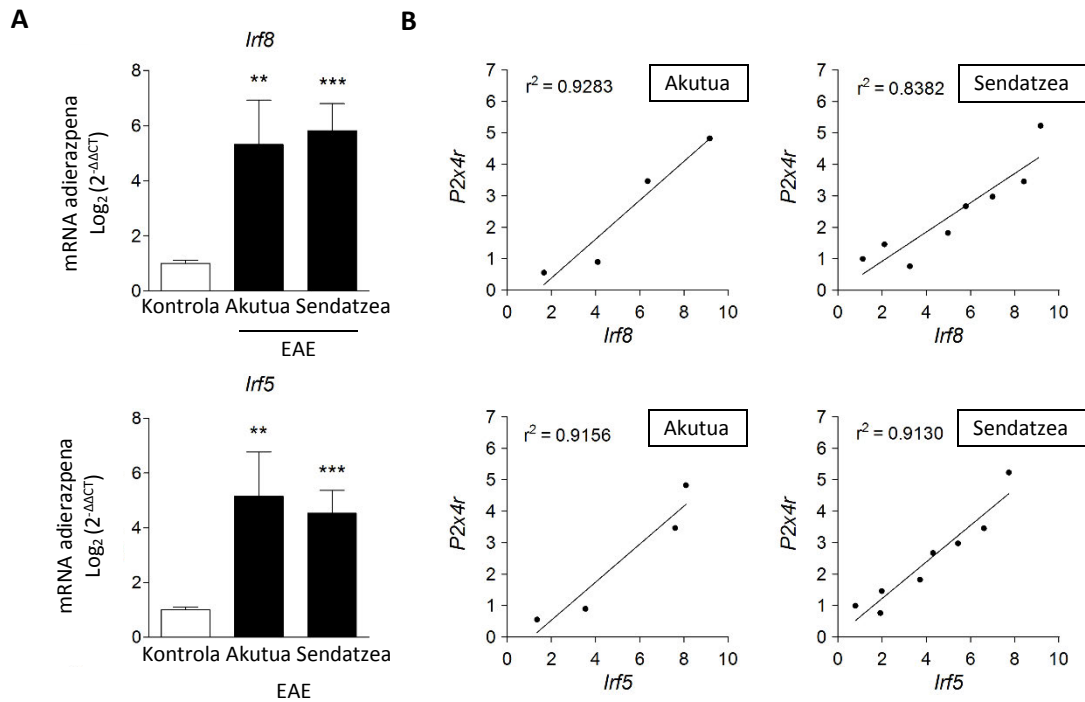
- A- Puntuazio neurologikoa eramailearekin (n = 6), TNP-ATP-arekin (n = 7) eta IVM-rekin (n = 7) trataturiko saguetan EAE-a induzitu ondoren. Saguak egunero tratatu ziren immunizazio egunetik (0garren eguna) esperimientua amaitu arte. Geziek alodinia mekanikoaren neurtua egunak adierazten dituzte.
- B- Hanka-kentze momentua (gramotan) Von Frey bidez neurtua eramailearekin (n = 6), TNP-ATP-arekin (n = 7) eta IVM-rekin (n = 7) tratatutako saguetan EAE-ko momentu ezberdinetan.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilia egin zen. \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001 immunizatu aurreko EAE-saguekiko.

**8. *Irf8* eta *Irf5* transkripzio faktoreak gainadierazita daude EAE-an**

Faktore interferon erregulatzaile 5-ak (*interferon regulatory factor 5*, IRF5) sortzetiko sistema immuneko hainbat erantzunetan hartzen du parte eta aurreko ikerketek frogatu dutenez IRF8-IRF5 transkripzio ardatza erabakiagarria da mikroglia P2X4R<sup>+</sup> fenotipo erreaktibora pasa dadin (Masuda et al., 2014). IRF5-a gainadierazi egiten da GM-CSF-ren presentzian egon ondoren (Krausgruber et al., 2011) eta hau ezinbestekoa da pro-hanturazko geneen adierazpena gerta dadin (Takaoka et al., 2005; Krausgruber et al., 2011). Gainera, gizakietan IRF5-aren polimorfismo genetikoek IRF5-aren isoforma bereziak edo IRF5-aren gainadierazpena eragiten dituzte eta ikusi denez, honek EA bezalako gaixotasun immuneekin du lotura (Kristjansdottir et al., 2008; Tang et al., 2014).

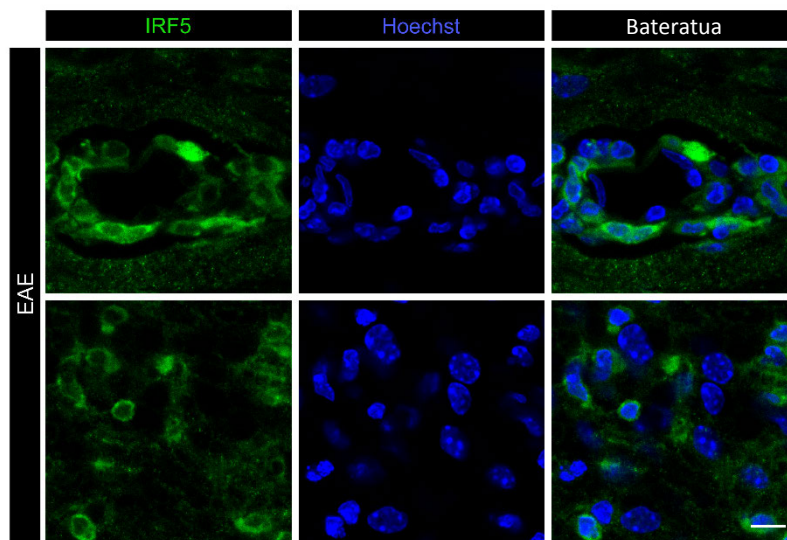
Hasteko, *Irf8* eta *Irf5* transkripzio faktoreen adierazpena eta denboran zeharreko eraginaren analisia egin genuen *P2x4r*-ren adierazpena aztertzeko erabili genituen EAE lagin berdinetan (10.A irudia). Espero bezala, *Irf8* eta *Irf5* transkripzio faktoreen gainadierazpena antzeman genuen gaixotasunaren fase akutuan eta baita sendatze fasean ere (30.A irudia) eta gainera, euren adierazpenak *P2x4r*-ren adierazpenarekin korrelatzen zuela ikusi genuen (30.B irudia). Immunohistokimia bidez ere IRF5 transkripzio faktorearen gainadierzpena ikusi genuen EAE-ko lesio kronikoetan (31. irudia).



**30. irudia. *Irf8* eta *Irf5*-a gainadierazita daude EAE-aren fase akutuan eta sendatze fasean.**

- A- *Irf8* (goian) eta *Irf5*-ren (behean) adierazpena bizkarrezur muinean sagu kontrolatan (n = 7) eta EAE-dun saguetan, fase akutuan (n = 4) eta sendatze fasean (n = 8) qPCR bidez neurtuta.
- B- *P2x4r*-ren adierazpenaren eta *Irf8* (goian) eta *Irf5* (behean) transkripzio faktoreen adierazpenen arteko korrelazioa EAE-ko fase akutuan eta sendatze fasean.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa bide-bateko ANOVA erabilita egin zen. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

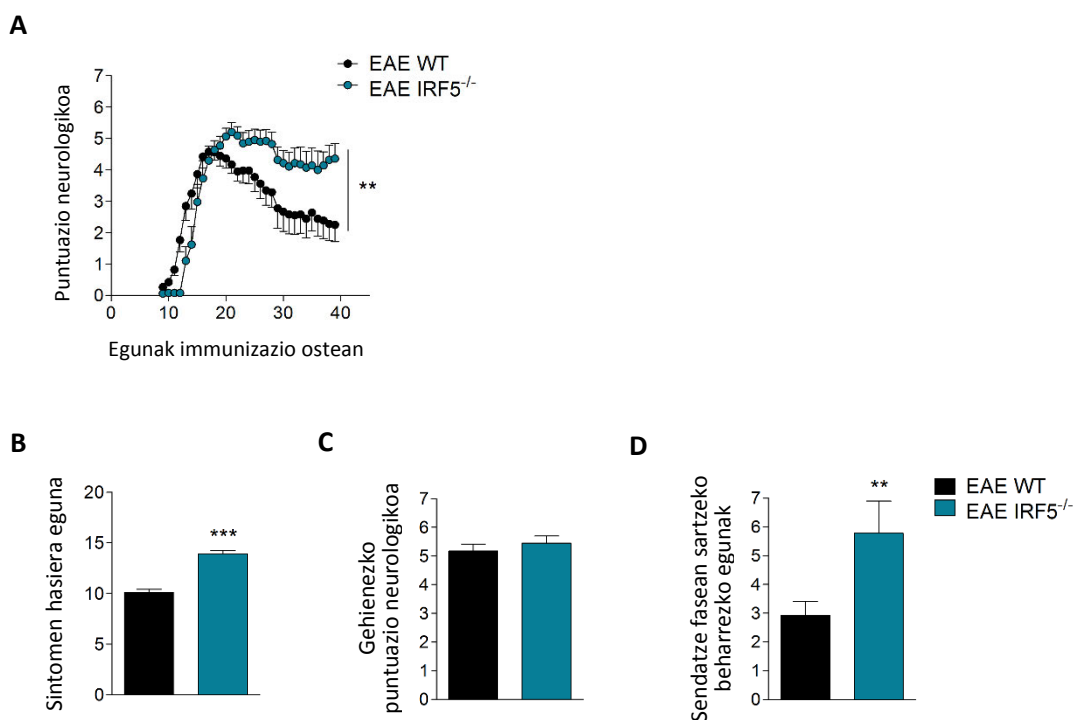


**31. irudia. IRF5-a EAE-ko lesioetan adierazten da.**

Argazki esanguratsuak IRF5-en (berdea) eta nukleoena (Hoechst) markaketa adieraziz EAE-dun saguen bizkarrezur muinean sendatze fasean. Ikusi IRF5<sup>+</sup> zelulen pilaketa lesio gunean. Eskala = 50  $\mu\text{m}$ .

## 9. IRF5 transkripzio faktorearen funtzioa EAE-aren patogenesisian

IRF5 transkripzio faktoreak EAE-aren patogenesisian duen funtzioa aztertzeko EAE esperimentu bat egin genuen IRF5<sup>-/-</sup> saguak erabilia. IRF5<sup>-/-</sup> saguek sintomen agertzean atzerapen nabarmena izan zuten, sagu hauetan sistema immunearen aktibazioa atzeratuta egon zitekeela adieraziz (**32.A, B irudia**). Hala ere, P2X4R blokeatzean gertatu zenaren antzera, IRF5<sup>-/-</sup> saguek sagu basatiek baino sintoma larriagoak izan zituzten sendatze fasean (**32.A irudia**), naiz eta gehieneko puntuazio neurologikoa antzekoa izan bi fenotipoetan (**32.A, C irudia**). Banaka aztertzerakoan ikusi genuenez, IRF5<sup>-/-</sup> saguek sagu basatiek baino denbora gehiago igarotzen zuten gehieneko puntuazioan sendatzea hasi baino lehen (**32.D irudia**) eta gainera, sendatze hau txikiagoa zenan (**32.A irudia**). Emtiza hauek IRF5 transkripzio faktoreak EAE-aren patogenesisian funtzio bikoitza izan dezakeela iradokitzen dute eta, P2X4R-ren gabeziaren antzera, IRF5-aren gabeziak ere bermielinizazioa oztopa lezakeela sendatze fasean.



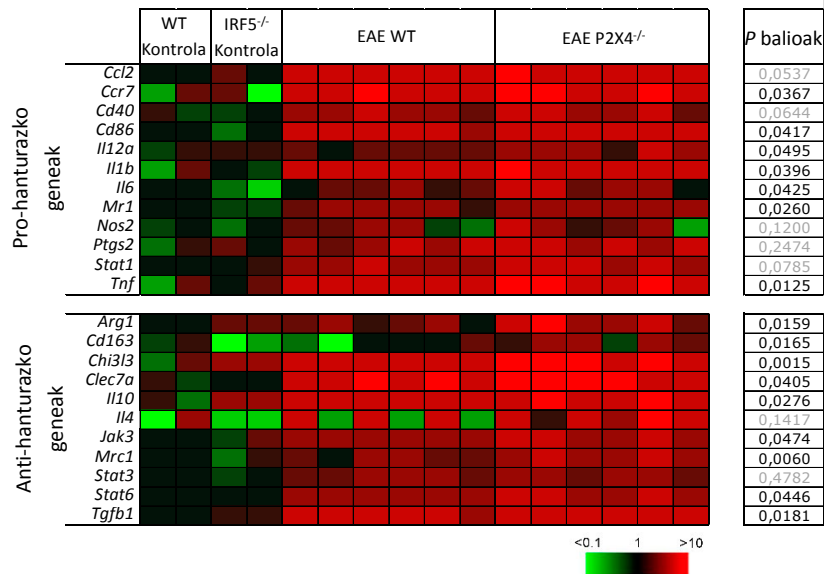
### 32. irudia. IRF5<sup>-/-</sup> saguek atzerapena dute sintomen agertzean, baina arazoak sendatze fasean.

A- Sagu basatien (WT) (n = 14) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen (n = 12) puntuazio neurologikoa EAE-a induzitu ondoren.

B, C, D- Sintomen agertze eguna (B), gehieneko puntuazio neurologikoa fase akutuan (C) eta sendatze fasean sartzeko beharrezko egun kopurua (D) sagu basatietan (WT) (n = 14) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguetan (n = 12) EAE-a induzitu ondoren.

Datuen informazioa: datuak bi esperimentutatik lortutako datuen batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Mann-Whitney-ren U-testa (A) eta Studenten t-testa (B, D) erabilia egin zen. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

Ondoren, TNP-ATP-arekin tratatutako EAE-dun saguetan egin genuen bezala, mikroglia/makrofagoen aktibazio maila aztertu genuen IRF5<sup>-/-</sup> saguetan EAE-a induzitu ondoren. Geneen adierazpen-profila egin genuen bizkarrezur muineko laginetan sagu basatietan eta IRF5<sup>-/-</sup> saguetan EAE-aren sendatze fasean (puntuazio neurologikoa **32.A irudian; 33. irudia**). Pro-hanturazko eta anti-hanturazko geneen adierazpena aztertu genuen Fluidigm qPCR bidez. Esperimentu honetan ere EAE-dun sagu basatietan bi fenotipoetako (pro-hanturazko eta anti-hanturazko) geneen gainadierazpena berretsi genuen. IRF5<sup>-/-</sup> saguek gainadierazpen apala, baina esanguratsua, izan zuten pro-hanturazko eta anti-hanturazko geneetan sagu basatiekin alderatuz (**33. irudia**). Datu hauek arrigarriak dira IRF5 transkripzio faktoreak mikroglia zelulen aktibazioan parte hartzen baitu eta gainera pro-hanturazko geneak erregulatzen bait ditu.



**33. irudia. IRF5 gabeziak mikroglia zelulen aktibazio markatzaileen adierazpena areagotzen du EAE-a induzitu ondoren.**

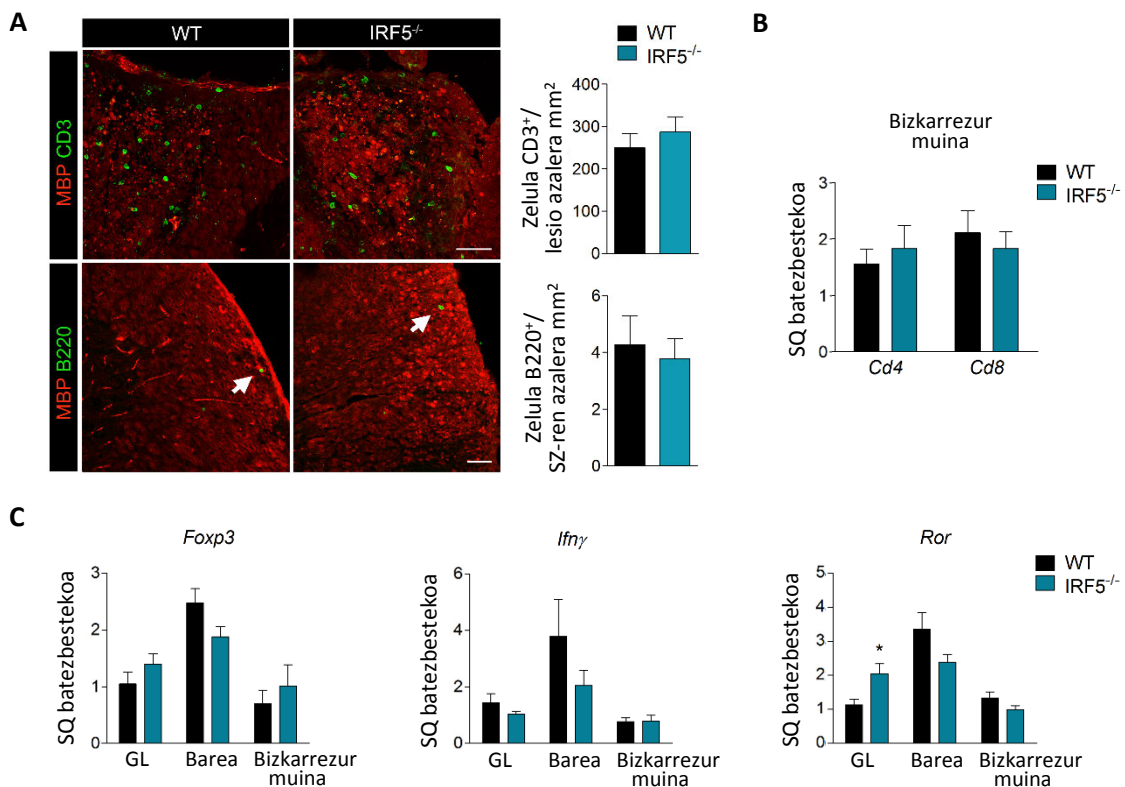
Heatmap-ak pro-hanturazko eta anti-hanturazko geneen adierazpen aldaketak adierazten ditu bizkarrezur muineko laginetan EAE-aren sendatze fasean sagu basatietan (WT) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguetan (n = 6).

Datuen informazioa: taulek esangura estatistikoa adierazten dute EAE-dun sagu basatien (WT) eta EAE-dun IRF5<sup>-/-</sup> saguen artean. Datuak Studenten t-testa erabilia aztertu ziren.



## 10. IRF5 gabeziak ez du eraginik erantzun immunean

IRF5 transkripzio faktoreak funtzio garrantzitsua betetzen du inflamazioan, eta mikroglia zeluletan adierazteaz gain, zelula immune periferikoetan ere adierazten da. Hasteko, zelula immuneen infiltrazioa aztertu genuen immunohistokimia bidez EAE-dun saguetan bizkarrezur muineko laginetan eta ez genuen inolako aldaketarik antzeman T zelulen ( $CD3^+$  zelulak) eta B zelulen ( $B220^+$  zelulen) infiltrazioan  $IRF5^{-/-}$  saguetan sagu basatiekin alderatuz (**34.A irudia**). Hartutako sistema immunean IRF5 transkripzio faktoreak izan dezakeen funtzioa aztertzeko, *Cd4* eta *Cd8*-ren mRNA kantitatea neurtu genuen EAE-dun saguen bizkarrezur muineko laginetan qPCR bidez. IRF5 -aren gabeziak ez zuen aldaketarik eragin *Cd4* eta *Cd8*-ren adierazpen mailan (**34.B irudia**). Azkenik, *Foxp3*, *Ror* eta *Ifn $\gamma$* -ren adierazpen maila neurtu genuen T  $CD4^+$  zelulen erantzuna sakonago aztertzeko asmoz.  $IRF5^{-/-}$  saguetan antzemandako aldaketa esanguratsu bakarra *Ror*-ren (Th17 erantzuna) gainadierazpena izan zen gongoil linfatikoetakoetan EAE-ko sendatze fasean (**34.C irudia**).



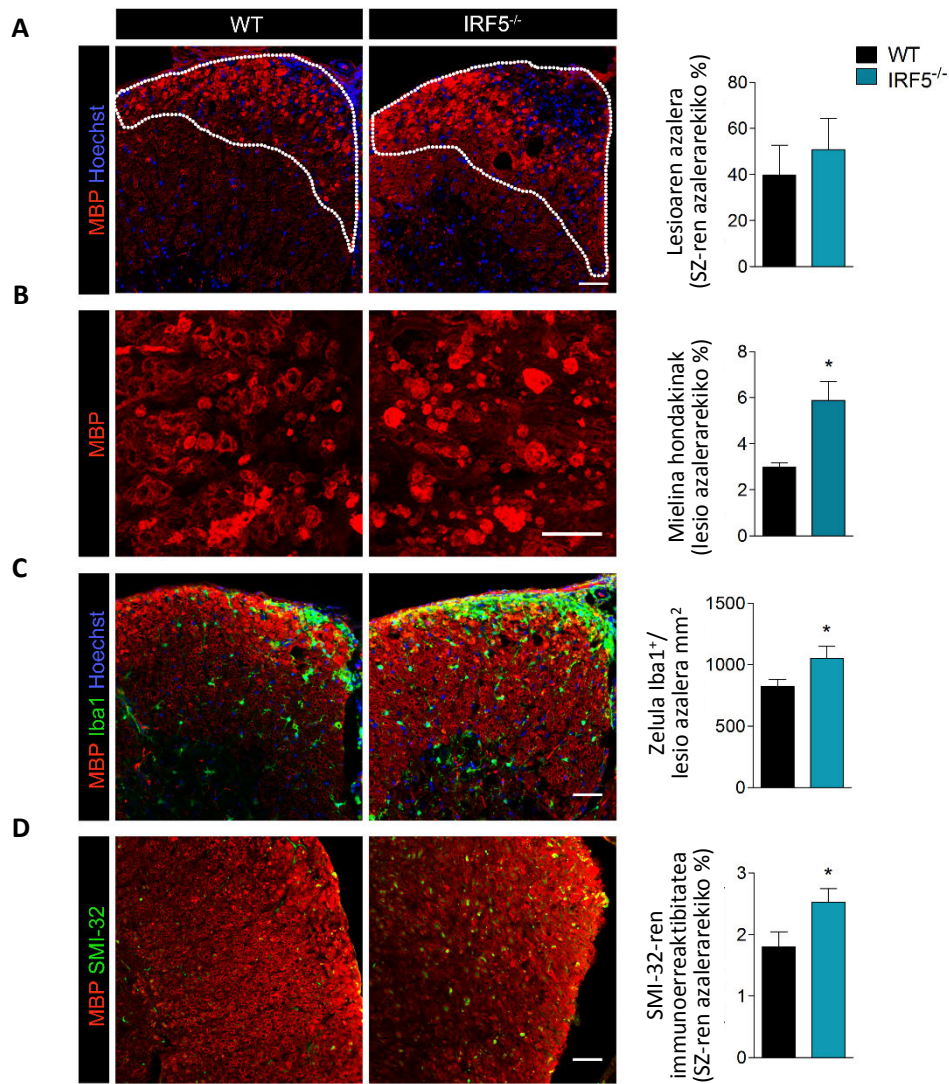
### 34. irudia. IRF5 transkripzio faktorearen gabeziak ez du eraginik erantzun immunean.

- A- MBP (gorria), CD3 (T zelulen markatzailea; berdea; *goian*) eta B220-ren (B zelulen markatzailea; berdea, *behean*) markaketa sagu basatietan (WT; n = 7) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguetan (n = 6) EAE-ko sendatze fasean. Histogramek zelula CD3<sup>+</sup>-en dentsitatea lesio arearekiko normalizatua (*goian*) eta zelula B220<sup>+</sup>-en dentsitatea sustantzia zuriarekiko (SZ) normalizatua (*behean*) adierazten dute. Geziek zelula B220<sup>+</sup> seinalatzen dituzte. Eskala = 50 µm.
- B- *Cd4* eta *Cd8*-ren mRNA adierazpena sagu basatien (WT; n=14) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen (n=12) bizkarrezur muinean EAE-ko sendatze fasean.
- C- *Foxp3* (T erregulatzaileak), *Ifny* (Th17) and *Ror* (Th1)-en mRNA adierazpena gongoil linfaticoetan (GL), barean eta bizkarrezur muinean sagu basatietan (WT; n = 14) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguetan (n = 12) EAE-ko sendatze fasean.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira (bi esperimentutatik lortutako datuekin B eta C kasuetan) eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilia egin zen. \*P < 0.05.

## 11. IRF5-aren gabeziak ehunen kaltetzea areagotzen du EAE-dun saguetan

IRF5 transkripzio faktoreak EAE-aren patogenesia izan dezakeen funtzioa sakonago aztertzeko, sagu basatien eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen karakterizazio histologikoa egin genuen EAE-ko sendatze fasean. Bizkarrezur muineko sekzioak MBP-rekin markatu ziren eta ondoren sustantzia zuriko lesioen eremua zehaztu genuen MBP-ren gabezia, mielina hondakinen presentzia eta nukleoaren pilaketa kontutan hartuta. Lesio eremua zertxobait handiagoa izan zen IRF5<sup>-/-</sup> saguetan, baina ezberdintasuna ez zen esanguratsua izan (**35.A irudia**). Mielina hondakinek immunoerreaktibilitate handiagoa dute MBP-rekiko, mielina osasuntsuak baino, ziurrenik epitopo proteikoak azaleratzen direlako. Ezaugarri honetaz baliatuz, mielina hondakin kantitatea neurtu genuen eta IRF5<sup>-/-</sup> saguek igoera esanguratsua adierazi zuten lesio eremuko mielina hondakin kantitatean sagu basatiekin alderatuz (**35.B irudia**). Mikroglia/makrofagoen kopurua ere zenbatu genuen Iba1 markatzailea erabiliz eta IRF5<sup>-/-</sup> saguek igoera esanguratsua izan zuten lesio eremuko zelula Iba1<sup>+</sup>-en kopuruan (**35.C irudia**). Azkenik, axoien kaltetze maila neurtu genuen SMI-32 markatzailea erabilia eta immunoerreaktibilitate handiagoa antzeman genuen EAE-dun IRF5<sup>-/-</sup> saguetan sagu basatietan baino (**35.D irudia**). Emaizta hauen arabera, IRF5-aren gabezia kaltegarria da EAE-ko sendatze faserako.



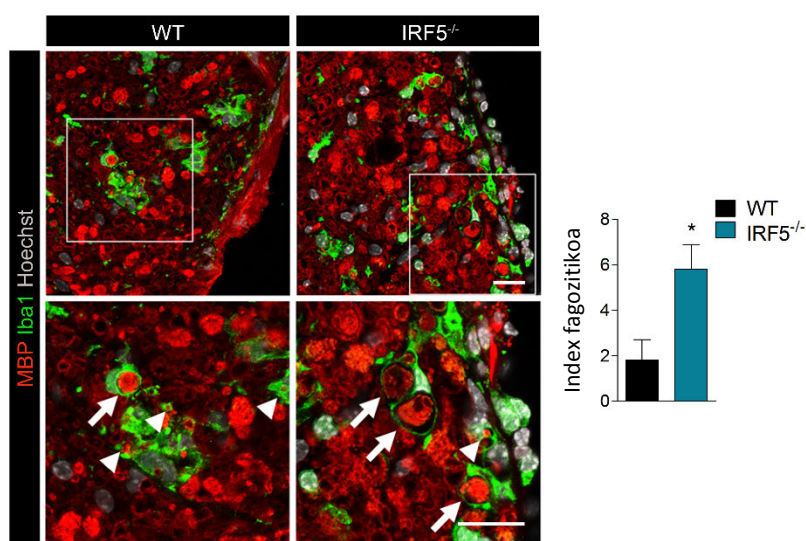
### 35. irudia. IRF5-aren gabeziak mielinaren eta axoien kaltetzea areagotzen du

Sagu basatien (WT; n = 7) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen (n = n=6 (A, C, D); n=3 (B)) bizkarrezur muineko laginen analisi histologikoa EAE-ko sendatze fasean. MBP eta Hoechst-aren markaketa lesio eremua zehazteko (A), mielina hondakin pilaketa MBP-ren markaketarekin ikusia (B), Iba1-en markaketa mikroglia/makrofagoak zenbatzeko (C) eta SMI-32-ren markaketa axoien kaltetzea ikusteko (D). Eskala = 50 µm.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilia egin zen. \*P < 0.05.

## 12. Fagozitosi kaltetua IRF5<sup>-/-</sup> saguetan EAE-a induzitu ondoren

Mikroglia zelulek mielina hondakinen fagozitosia burutzea ezinbestekoa da erantzun birsortzaile eraginkorra eman dadin (Kotter et al., 2006; Ruckh et al., 2012). EAE-dun IRF5<sup>-/-</sup> saguen kasuan, mielina hondakinen metaketa handiagoa antzeman genuen lesio eremuetan (**35. irudia**). Hau dela eta, mikroglia/makrofagoek fagozitosi prozesuan arazoak izan zitzaizketela arrazoitu genuen. Hipotesi hau frogatzeko fagozitosiaren zeharkako neurketa egin genuen EAE-ko sendatze fasean immunohistokimia bidezko Iba1 eta MBP-ren kolokalizazioa aztertuz lesio guneetan (ikusi Materialak eta Metodoak atala). IRF5<sup>-/-</sup> mikroglia/makrofagoek mielina hondakin pilakea handiagoa erakusten zuten zitoplasman eta prozesu fagozitikoetan mikroglia/makrofago basatiek baino (**36. irudia**). Gainera, IRF5<sup>-/-</sup> saguen kasuan, hondakinek neurri handiagoa zuten eta batez ere prozesu fagozitikoetan aurkitzen ziren. Aldiz, sagu basatietan hondakinek neurri txikiagoa zuten, degradazio maila handiagoa adieraziz, eta gainera gehienbat zelulen zitoplasman kokatzen ziren (**36. irudia**). Emaizta hauek, IRF5-aren gabeziak fagozitosi prozesuan arazoak sortzen dituela iradokitzen dute.



### 36. irudia. IRF5-aren gabeziak mielina hondakinen fagozitosia kaltetzen du EAE-a induzitu ostean

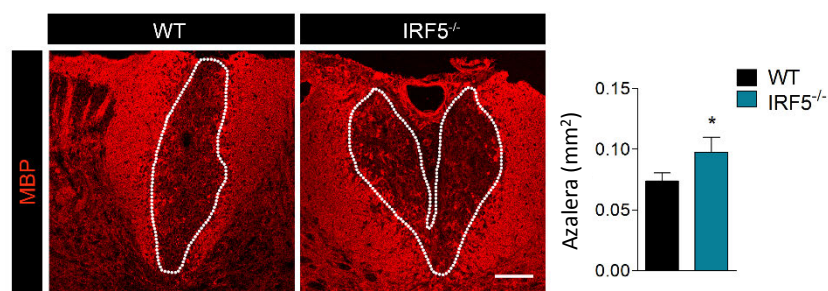
Sagu basatien (WT; n = 3) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen (n = 3) bizkarrezur muineko laginak EAE-ko sendatze fasean MBP (gorria) eta Iba1-ekin (berdea) markatuta. Ikusi mielina degradatutakoaren presentzia sagu basatien (WT) zitoplasman (geziak) eta mielina hondakin handiagoak IRF5<sup>-/-</sup> saguen prozesu fagozitikoetan (geziak). Nukleoak Hoechst-arekin markatu ziren (grisa). Histogramak sagu basatien (WT) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen index fagozitikoa adierazten du MBP-ren eta Iba1-en kolokalizazioaren arabera *ImageJ* softwarea erabiliz kalkulatu. Eskala = 20 µm.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilita egin zen. \*P < 0.05.

### 13. IRF5<sup>-/-</sup> saguek oligodendroziro zelula aintzindarien (OPC-en) errekrutatzean arazoak dituzte lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazioaren ondoren

IRF5 transkripzio faktoreak bermielinizazioan izan dezakeen funtzioa aztertzeko, EA-aren beste animalia eredu bat erabili genuen: Lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazio eredu. Eredu honetan, desmielinizazioa LPC-ak mielina izaretan duen eragin toxikoaren ondorioz gertatzen da (*Jeffery eta Blakemore, 1995*) eta prozesu hau erantzun immunearekiko independentea da, azken ezaugarri honek bermielinizazioa aztertzeko eredu egoki bihurtzen duelarik.

LPC-a sagu basatien eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen bizkarrezur muinetan injektatu zen eta lortutako laginetan, bermielinizazioa aztertu genuen immunohistokimia bidez, injekzioa sartu eta 14 egunetara. Baldintza normaletan, 14garren egunerako OPC-ak lesio gunera migratzen dute eta oligodendroziro heldu mielinizatzaileetan diferentziatuak egoten dira iada. Lesio eremua MBP-ren immunoerreaktibitate faltaren arabera zehaztu genuen eta LPC-ak IRF5<sup>-/-</sup> saguetan sagu basatietan baino lesio eremu handiagoak eragin zituela ikusi genuen (**37. irudia**). Ondoren, lesio guneko oligodendroziroen leinuko zelulen kopurua (Olig2<sup>+</sup> zelulak) eta oligodendroziro helduen kopurua (CC1<sup>+</sup> zelulak) zenbatu genituen. IRF5<sup>-/-</sup> saguek Olig2<sup>+</sup> zelulen kopuruan murrizketa erakutsi zuten lesio eremuan (**38.A irudia**). Hala eta guzti ere, CC1<sup>+</sup> oligodendroziroen ehunekoan ez genuen ezberdintasunik antzeman (**38.B irudia**). Beraz, emaitza hauek, bermielinizazioan duten arazoa, errekrutamentuko arazo bat dela iradokitzen dute eta ez diferentziazio prozesuaren arazoa.

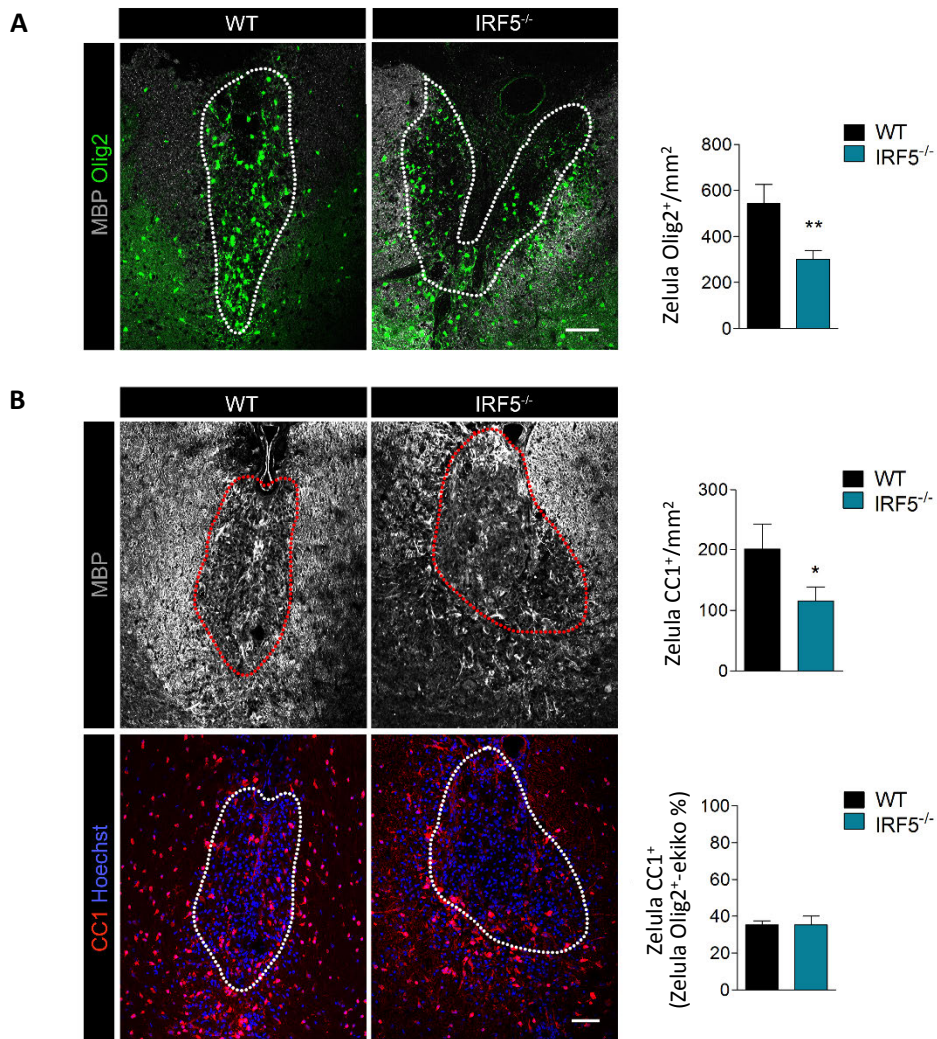


#### 37. irudia. IRF5-aren gabeziak lesio handiagoak eragiten ditu lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazioaren ostean

Sagu basatien (WT) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen bizkarrezur muineko sekzioak MBP-arekin (lesio eremua zehazteko; gorria) markatua LPC-a injektatu eta 14 egunera. Histogramak lesio eremuaren kuantifikazioa adierazten du sagu basatien (n = 5) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen bizkarrezur muineko sekzioetan. Lerro zuriak lesioaren ertza adierazten du. Eskala = 100 µm.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilita egin zen. \*P < 0.05.





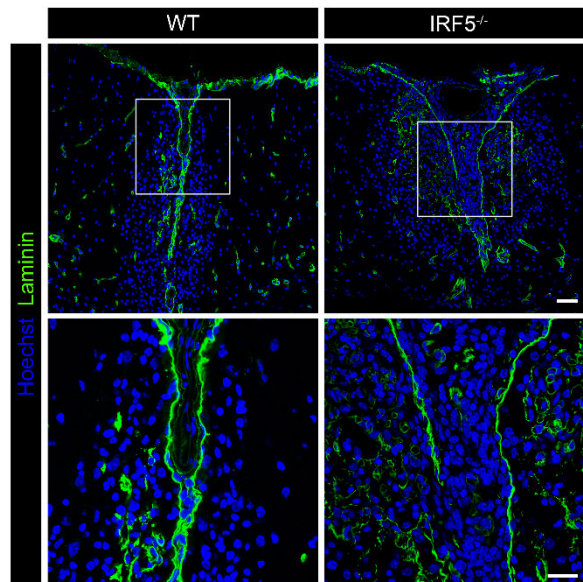
**38. irudia. IRF5-aren gabeziak OPC-en errekrutatzea murrizten du lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazioaren ostean**

- A- Sagu basatien (WT; n = 5) eta IRF5<sup>-/-</sup> (n = 6) saguen bizkarrezur muineko sekzioak Olig2-arekin (oligodendrozioten leinuaren markatzailea; berdea) eta MBP-rekin (lesio eremua zehazteko; grisa) markatua LPC-a injektatu eta 14 egunera. Histogramak zelula Olig2<sup>+</sup>-en dentsitatea adierazten du lesio eremuarekiko. Lerro zuriak lesioaren ertza adierazten du. Eskala = 50 µm.
- B- Sagu basatien (WT; n = 5) eta IRF5<sup>-/-</sup> (n = 6) saguen bizkarrezur muineko sekzioak MBP-rekin (lesio eremua zehazteko; grisa; *goian*) eta CC1-en (oligodendrozioto helduen markatzailea; gorria; *behean*) markatua LPC-a injektatu eta 14 egunera. Zelulak Hoechst-bidezko nukleoaren markaketari esker identifikatu ziren. Histogramek zelula CC1<sup>+</sup>-en dentsitatea lesio eremuarekiko (*goian*) eta zelula CC1<sup>+</sup>-en ehunekoa zelula Olig2<sup>+</sup>-ekiko (*behean*) adierazten dute. Lerro gorriak (*goian*) eta zuriak (*behean*) lesioaren ertza adierazten dute. Eskala = 50 µm.

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa ± s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabilia egin zen. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

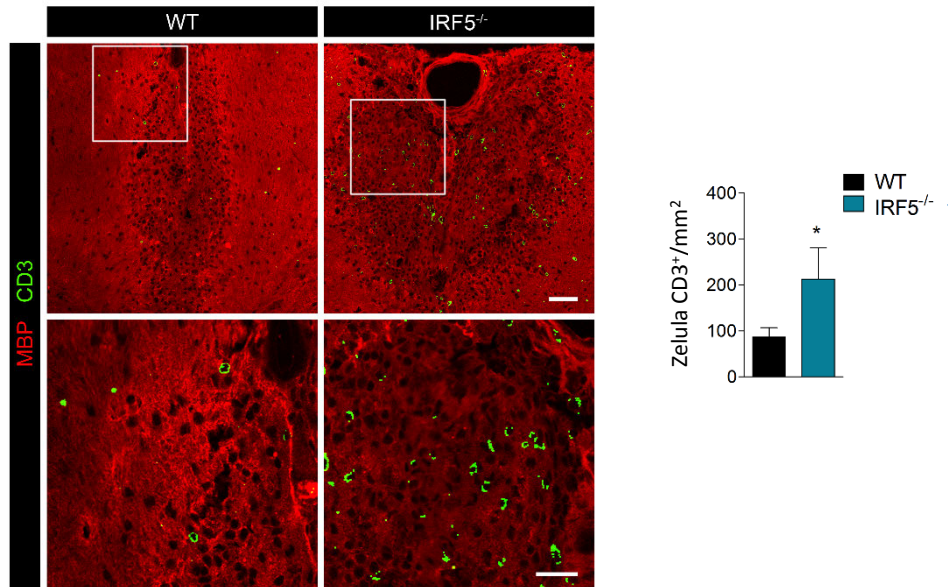
## 14. Ez-ohiko hanturazko erantzuna IRF5<sup>-/-</sup> saguetan LPC-bidezko desmielinizazioaren ondoren

Naiz eta animalia eredu hau erantzun immunearekiko independentea izan, LPC-ren injekzioaren jarraian T zelulen, B zelulen eta makrofagoen infiltrazioa ematen da lesio guneetan eta epe motzeko infiltrazio honek bermielinizazioan eragin onuragarria duela esaten da (*Bieber et al., 2003*). Lehenago azaldu bezala, IRF5<sup>-/-</sup> saguen lesioek sagu basatienek baino neurri handiago zuten 14garren egunean (**37. irudia**). Gainera, IRF5<sup>-/-</sup> saguek hantura nabarmena zuten meningeetan (**39. irudia**), lamininaren markaketak erakutsi zigunez. Animalia eredu honetan ez da hanturazko erantzunik deskribatu bibliografian, izan ere, sagu basatietan ez genuen horrelako erantzunik ikusi. IRF5 transkripzio faktoreak LPC-aren osteko erantzun immunean izan zezakeen funtzioa sakonago aztertzeko T zelulak zenbatu genituen (zelula CD3<sup>+</sup>-ak). Sagu basatietan oso zelula CD3<sup>+</sup> gutxi aurkitu genituen lesio gunean (**40. irudia**). IRF5<sup>-/-</sup> saguetan aldiz T zelulen infiltrazio handiagoa antzeman genuen lesio eremuan (**40. irudia**). Datu guzti hauek kontuan hartuta, IRF5<sup>-/-</sup> saguek erantzun immune areagotua dutela ondoriozta dezakegu. Erantzun immune areagotu hau ote den EAE-dun saguek sendatze fasean dituzten arazoan erantzule edo ez oraindik argitu gabe dago.



### 39. irudia. IRF5-aren gabeziak erantzun immunean eragiten du lisolizitina (LPC)-bidezko desmielinizazioaren ostean

*Goian*, sagu basatien (WT; n = 5) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen (n = 6) bizkarrezur muineko sekzioak lamininarekin (meningeak ikustarazteko; berdea) markatuak LPC injekzio ondorengo 14garren egunean. Nukleoak Hoechst-arekin markatu ziren. *Behean*, karratutxo zuriko eremuak (A) handipen gehiagorekin. Eskalak = 50 µm (*goian*) eta 25 µm (*behean*).



#### 40. irudia. IRF5-aren gabeziak T zelulen erantzunean eragiten du lisolezitina (LPC)-bidezko desmielinizazioaren ostean

*Goian*, sagu basatien (WT; n = 5) eta IRF5<sup>-/-</sup> saguen (n = 6) bizkarrezur muineko sekzioak CD3-rekin (T zelulen markatzailea; berdea) eta MBP-rekin markatuak LPC injekzio ondorengo 14garren egunean. Nukleoak Hoechst-arekin markatu ziren. *Behean*, karratutxo zuriko eremuak (A) handipen gehiagorekin. Eskalak = 50  $\mu$ m (*goian*) eta 25  $\mu$ m (*behean*).

Datuen informazioa: datuak batezbestekoa  $\pm$  s.e.m. bezala adierazi dira eta analisi estatistikoa Studenten t-testa erabiltuta egin zen. \*P < 0.05.



EZTABAIDA



P2X4 hartzaile purinergikoaren gainadierazpena gaixotasun ugari dute amankomunean (*Tsuda et al., 2003; Wixey et al., 2009; Li et al., 2011; Beggs et al., 2012; Ulmann et al., 2013; Vazquez-Villoldo et al., 2014*). Garuneko lesio traumatikoetan P2X4R-ren gainadierazpena ematen da eta mikroglia zelulak P2X4R<sup>+</sup> fenotipoa izatera pasatzen dira IRF8-IRF5 transkripzio ardatzaren bitartez (*Beggs et al., 2012*). Ikerketa lan honetan IRF8-IRF5-P2X4R ardatza gainadierazita dagoela deskribatu dugu EAE-ko fase akutuan eta sendatze fasean. Gainera, P2X4R-ren blokeatzeak EAE-a larriagotzen duela erakutsi dugu eta, aldiz, IVM-bidezko P2X4R-ren indartzeak, sintomak arintzen dituela. Mekanismoari dagokionez, P2X4R-ren seinalizazioa indartzeak mikroglia/makrofagoak anti-hanturazko fenotipo batera eraldatzen ditu eta honek bermielinizazioa bultzatzen du BDNF-a bezalako faktoreen askapenari esker. Aldi berean, IRF5-aren gabeziak EAE-aren sintomen agertzean atzerapena eragiten du, baina bestalde, bermielinizazioa oztokatzen du, P2X4R-ren gabeziak eragiten duen antzera.

## **1. P2X4 hartzaileak mikroglia-aren aktibazioa erregulatzen du eta bermielinizazioa bultzatu EAE-an**

### **1.1 Mikroglia-aren P2x4r gainadierazita dago EAE-dun saguetan**

ATP-a hainbat funtzio ezberdin betetzen dituen eta zelulen aktibazioaren, estresaren edo kaltetzearen ondorioz, espazio extrazelularrera askatzen den seinalizazio molekula da. Jakina da nerbio sistema zentraleko (NSZ-eko) seinalizazio purinergikoak esklerosi anizkoitza (EA) bezalako gaixotasun neuroendekatzaila eta neurohanturazkoetan hartzen duela parte (*Amadio et al., 2011*). Hartzaile purinergikoak kantitate ugarian adierazten dira NSZ-ean (*Tsuda et al., 2003; Ulmann et al., 2008*) eta mikroglia zeluletan hainbat funtzio erregulatzen dituzte, mugikortasuna, zitokinen askatzea eta fagozitosia besteak beste (*Domercq et al., 2013*). Mikroglia zeluletan ematen den P2X4R-ren gainadierazpena, hanturarekin erlazionaturiko gaixotasun neuroendekatzaila akutuen eta kronikoen arteko ezaugarri amankomuna dela dirudi (*Domercq et al., 2013*-ek berrikusia). Mikroglia zeluletako P2X4R-ren gainadierazpena, EAE-dun arratoietan eta EA-dun giza nerbio optikoko laginetan deskribatuta dago (*Vazquez-Villoldo et al., 2014*). Honela, datu hauek gure EAE esperimentuetan ikusi dugun P2x4r-ren gainadierazpenarekin bat datoz.

## 1.2 Tratamenduen espezifikotasuna

Ikerketa lan honetan TNP-ATP-bidezko tratamenduak EAE-aren sintomak larriagotzen dituela ikusi dugu eta IVM-bidezko tratamenduak aldiz, gaixotasuna hobetzeko gaitasuna duela sendatze fasean. TNP-ATP-a P2X hartzaillearen antagonista ez-selektiboa da, baina gaur egun ez dago uretan disolba daitekeen P2X4R-ren antagonista selektiborik eskuragarri. 5-BDBD-ak P2X4 hartzaillearen antagonista selektibo bezala jarduten du, baina oso disolbagarritasun txikia du uretan, eta ezaugarri honek bere erabilera baldintzatzen du injekzio sistemikoetan. P2X4R-ren antagonista indartsu eta selektibo berri bat aurkitu da, NP-1815-PX izenekoa (*Matsumura et al., 2016*), baina orindik ez dago merkatuan. TNP-ATP eta IVM-ren espezifikotasuna aztertzeko, tratamenduak EAE-dun P2X4<sup>-/-</sup> saguetan probatu genituen eta bietako inor ez zen EAE-dun P2X4<sup>-/-</sup> saguen puntuazio neurologikoan aldaketak eragiteko gai izan. Honela, gure esperimentuetan ikusitako eraginak P2X4R hartzaillearen parte hartzearen ondorio direla eta beraz, tratamenduen espezifikotasuna frogatu ahal izan dugu.

## 1.3 P2X4R-ren modulazioak, gehienbat mikroglia zeluletan du eragina

Garunean, P2X4R kantitate handiagoan adierazten da mikroglia zeluletan oligodendroitoetan eta NSZ-eko beste zeluletan baino (*Zhang et al., 2014*). Hala ere, P2X4R neuronetan ere adierazten da eta baldintza osasuntsuetan, beronen aktibazioak sinapsien indartzean laguntzen du hipokanpoko CA1 eremuan (*Sim et al., 2006*). Hanturazko mina gertatzen denean, neurona sentsoreek adierazten duten P2X4R, neuronen BDNF askapenarekin lotzen da eta hiper-kitzikakortasuna bultzatzen du hanturazko min kronikoaren kasuan (*Lalisse et al., 2018*). Lan honetan ezin dugu neuronen P2X4R-rengan izandako eraginik baztertu, baina *in vitro* eginiko esperimentuek mikroglia zeluletako P2X4R-ren funtzioa babesten dute gure eredu esperimentalean. Gainera, karakterizazio immunozitokimikoak eta farmakologikoak P2X4R-ren adierazpen selektiboa erakusten dute mikroglia zeluletan oligodendroitoekin alderatuta. Honekin bat etorri, elektrofisiologiako esperimentuetan astrozito eta oligodendroitoetan ikusi den P2X4R-bidezko korronteen faltak, NSZ-eko zelulen artean P2X4R adierazle garrantzitsuenak mikroglia zelulak direla baieztatzen du (*Lalo et al., 2008; Zabala et al., 2018*).

Ikerketa berri batek aurkikuntza interesgarria egin du, naiz eta oligodendroitoek P2X4R-rik ez izan schwan zelulek hartzaillearen gainadierazpena izaten dutela ikusi dute nerbio zapalkuntzaren ondoriozko lesioetan. Are gehiago, tresna genetiko bidezko hartzaillearen gainadierazpenak, bermielinizazioa eta sendatzea bultzatzen ditu BDNF bidez nerbio lesio baten

ondoren (Su et al., 2018). Emaizta hauek bat datoz gure lanean deskribatu dugun P2X4 hartzailearen funtzio onuragarriarekin.

#### 1.4 P2X4R-ren modulazioak ez du eraginik erantzun immunearen aktibazioan

P2X4R T zeluletan ere adieraz daiteke eta beraz, erantzun immunea modula dezake. Izan ere, hainbat ikerketek erakutsi dutenez P2X4R-k T zelulen aktibazioan parte hartzen du. Pannexin-1 hemikanalak, P2X1R-ak eta P2X4R-k ATP-aren askatzea baimentzen dute eta eragin autokrinoz, T zelulen aktibazioa erregulatzen du, T zelulen eta zelula antigen-aurkezleen (*antigen-presenting cells*, APC) artean ematen den sinapsi immunean (Woehrle et al., 2010; Manohar et al., 2012). Honez gain, T zelulek ATP-aren askatzea eta P2X4R-ren seinalizazioa behar dituzte APC-ak dauden tokira migrate ahal izateko (Ledderose et al., 2018). Bestalde, APC-ek, mikroglia eta makrofagoak barne, funtzio garrantzitsua dute Th17 erantzunaren sorreran eta barrera hematoentzefalikoaren zeharkatzean, EAE-a garatzea erraztuz (Bartholomäus et al., 2009; Goldman et al., 2013; Xiao et al., 2013; Yoshida et al., 2014). Hala ere, gure emaitzek ez dute P2X4R-ren funtzio zuzen (T zelula-bidezkoa) ez zeharkakorik (APC-bidezkoa) erakusten T zelulen erantzunaren sorreran eta ezta NSZerako infiltrazioan ere (Zabala et al., 2018). Datu guzti hauek kontuan izanda, P2X4R-ren blokeatzeak edo indartzeak immunizazioaren eraginkortasunean eta erantzun immunean eraginik ez duela ondoriozta dezakegu.

#### 1.5 P2X4R-ren indartzeak mikroglia anti-hanturazko fenotiporantz aldarazten du eta EAE-aren sintomak hobetzen ditu sendatze fasean

Hainbat ikerketek adierazten dutenez, hanturazko prozesua beharrezkoa da ondoren sendatze prozesu eraginkor bat eman dadin. Jakina da mikroglia eta makrofagoek ekoiztutako hainbat produktuk axoien konpontzea (David et al., 1990; Yin et al., 2006) eta bermielinizazioa bultzatzen dutela desmielinizazioa aztertzeke erabiltzen diren animalia ereduetan, eta zelula hauen eraginkortasun faltak bermielinizazio prozesua moteltzen duela (Kotter et al., 2005; Kondo et al., 2011; Miron et al., 2013; Sun et al., 2017; Cantuti-Castelvetri et al., 2018). Hala ere, sortzetiko sistema immuneak EA-n bermielinizazioa bultzatzeko duen gaitasuna, mikroglia eta makrofagoen polarizazio fenotipoaren araberkoa da. Pro-hanturazko mikroglia/makrofagoak desaktibatzeak EAE-aren fase akutua ezabatzen du (Starossom et al., 2012), aldiz, anti-hanturazko fenotipoa dutenean bermielinizazio eraginkorra bultzatzeko gai dira sendatze fasean (Butovsky et al., 2006; Miron et al., 2013; Sun et al., 2017). Hau kontuan izanda, pro-hanturazko fenotipotik anti-hanturazkorantz pasatzea, beharrezko aldaketa da sendatze prozesua gerta

dadin eta beraz, mikroglia/makrofagoen polarizazioaren modulazioa estrategia terapeutiko interesgarria litzateke EA-ren tratamendurako. Ikerketa lan honetan, P2X4R-ren blokeatzeak edo bere gabeziak pro-hanturazko fenotiporantz bultzatzen du mikroglia, endekapen neurologikoa bultzatuz sendatze fasean. Aldiz, IVM-bidezko hartzailearen indartzeak anti-hanturazko fenotipoa bultzatzen du eta sintomak hobetzen ditu. Sekzio organotipikoak erabiliz eginiko ikerketetan, LPC-bidezko desmielinizazioaren ondoren P2X4R-ren manipulaziotik lortutako emaitza kaltegarri/onuragarriek, P2X4R-k EAE-aren sendatze fasean duen funtzioa babesten dute. LPC-bidezko eredu honetan ez dago sistema immunearen parte hartzerik, eta beraz mikroglia zelulen funtzioa berretsiko luke. Gaur egun EA tratatzeko eskuragarri dauden tratamenduek hartutako sistema immunea dute jomuga eta eraginkorrek dira eraso faseak gutxitzen, baina ez dira gaixotasunaren progresioa gelditzeko gai (*Haghikia et al., 2013; Feinstein et al., 2015*). Sentzu honetan, P2X4R-ren indartzeak fase kronikoan erakutsi duen eragin onuragarria puntu garrantzitsua litzateke EA-ren etapa kronikoak tratatu ahal izateko.

Azkenaldian aurkeztu diren ikerketen arabera, mikroglia/makrofagoen aktibazio fenotipoa espektro jarrai bat litzateke, anti-hanturazko eta pro-hanturazko fenotipoak espektro honen bi ertzak izanik. Idea hau bat dator mikroglia eta makrofagoek EA-n erakusten duten erdi-mailako aktibazioarekin (*Ponomarev et al., 2007; Vogel et al., 2013*) eta baita EAE-ko etapa ezberdinetan aurkitzen diren fenotipo ezberdinekin ere (*Ajami et al., 2018; Locatelli et al., 2018*). Gainera, mikroglia/makrofagoen mugimendua norabide bakarrekoa dela esan dezakegu, hau da, fase goiztiarretan pro-hanturazko fenotipo da gehien aurkitzen dena, baina denbora pasa ahala anti-hanturazko fenotipodun zelulek ordezkatuak izaten dira (*Locatelli et al., 2018*). Gure ikerketan bai pro-hanturazko eta baita anti-hanturazko geneen gainadierazpena antzeman genuen EAE-aren fase akutuan eta baita sendatze fasean ere. Datu hauek bat datoz esprektruaren ideiarekin eta beraz, mikroglia/ makrofagoek fenotipo ezberdina izango dute lesio barneko edo inguruko seinaleen arabera.

Mikroglia eta makrofagoek eragin ezberdina dute EAE-aren garapenean (*Ajami et al., 2011; Yamasaki et al., 2014*), baina ez daude bermielinizazioan izan ditzaketen funtzio ezberdinetan sakondu duten ikerketa lan asko (*Lampron et al., 2015*). Guk erabili ditugun tresnekin ezin daitezke mikroglia zelulak eta makrofagoetatik bereizi EAE-an. Nahiz eta bi zelula motek propietate ezberdinak izan (*Ajami et al., 2011; Yamasaki et al., 2014*), biek antzeko polarizazioa izaten dute eta biek hartzen dute parte bermielinizazio prozesuan (*Miron et al., 2013*). Guzti hau dela eta esperimentu gehiago beharrezkoak dira P2X4R-ren funtzioa aztertzeko bi zelula mota hauetan.

## 1.6 P2X4R-ren indartzeak oligodendrozitoen diferentziazioa bultzatzen du

Aurreko ikerketek erakutsi dutenez OPC-en diferentziazioa eta mielinizazioa estuki erregulaturiko prozesuak dira, bertan parte hartuz axoiek askaturiko neurotransmisoreek, hazkuntza faktoreek, neuregulinek, integrinek eta atxikidura molekulek besteak beste. Guzti hauen artean jakina da BDNF-ak oligodendrozitoen diferentziazioa eta mielinizazioa bultzatzen dituela (*Wong et al., 2013*). Iskemiaren ostean adibidez, BDNF iturri nagusia astrozitoak dira, honela oligodendrozitoen diferentziazioa bultzatuz (*Miyamoto et al., 2015*). Hala ere, mikroglia zelulek ere funtzio garrantzitsua betetzen dute BDNF-aren ekoizpenean lesioen ondoren (*Dougherty et al., 2000; Parkhurst et al., 2013*). Mikroglia zelulen P2X4R-ren aktibazioa BDNF-aren ekoizpen eta askatzearekin lotu izan da eta honek alodinia eragiten duela ikusi izan da (*Ferrini et al., 2013*). Datu hauekin bat etorritik, ikerketa lan honetan BDNF-ren ekoizpen handiagoa ikusi dugu IVM-rekin tratatutako mikroglia zeluletan, honela aurreko ikerketek deskribaturiko efektua berretsiz. Ikusi dugunez mikroglia zelulek baldintzatutako medioek oligodendrozitoen diferentziazioa bultzatzen dute eta gainera, diferentziazio hau handiagoa da anti-hanturazko mikroglia baldintzatutako medioaren kasuan. BDNF-ren ekoizpen handiagoa antzeman genuen anti-hanturazko mikroglia zeluletan eta eragina murriztu egiten zen TNP-ATP-aren presentzian. Horrez gain, EAE-ko fase akutuan eta sendatze fasean *Mbp*-ren adierazpen mailak korrelazio handia azaldu zuen *Bdnf*-ren adierazpen mailarekin eta esanguratsuki murrizten zen euren adierazpena TNP-ATP-arekin tratatutako saguen kasuan. Datu hauek korrelazioak baino ez direnez, ez dugu mikroglia aska dezakeen beste faktoreren baten eragina baztertzen oligodendrozitoen diferentziazioan.

## 1.7 IVM-bidezko P2X4R-ren indartzeak ez du alodinia areagotzen EAE-dun saguetan

Ongi deskribatua dago P2X4R min neuropatikoarekin lotuta dagoela nerbio periferikoko lesioetan eta hartzailearen blokeatzaileak proposatu izan dira estrategia terapeutiko bezala min neuropatikoa tratatzeko (*Tsuda et al., 2003; Trang et al., 2009; Beggs et al., 2012; Matsumura et al., 2016*). Min neuropatikoa, gaixotasun autoimmune desmielinizatzaile askoren sintoma amankomuna da. EA-ren kasuan, min neuropatikoa oso sintoma ohikoa da eta gaixoen bizi kalitatean eragin handia izaten du (*Osterberg et al., 2005; Ferraro et al., 2018*), baina mekanismo patologikoei buruzko oso informazio gutxi dago oraindik. P2X4R-k min neuropatikoan duen parte hartzea puntu garrantzitsua da, EA tratatzeko asmoz, IVM-rekin inongo ikerketarik edo inbertsiorik burutzea erabaki aurretik. EAE eredian ere deskribatua dago saguek jarrera sentikorragoa dutela minarekiko atzeko hanketan eta buztanean, ongi erreproduzitzen EA-dun

gaixok batez ere beheko gorputz-adarretan izaten duten mina (Svendsen et al. 2005b; Olechowski et al., 2013; Serizawa et al., 2018). EAE ereduaren ezaugarri honek, eredu egokia bihurtzen du EA-aren min neuropatikoaren patofisiologia aztertzeko. Gure emaitzek ere EAE-dun saguetan sentzibilitate mekaniko handiagoa dagoela berretsi zuten, baina P2X4R-ren blokeatze edo indartzeak ez zuen sentzibilitate honetan eraginik izan. Horrela, EA-rekin loturiko min mekanismoetan eraginik ez genuela eragin adieraziz eta IVM-ren erabilera terapeutiko posiblea ez baztertuz.

## 2. IRF5 transkripzio faktorearen funtzio bikoitza EAE-an

### 2.1 Irf5 gainadierazita dago EAE-dun saguetan

IRF5-ak P2X4R-ren adierazpena bultzatzen du zuzenean bere promotorean kokatuz (Masuda et al., 2014). SNP-en analisiak IRF8 transkripzio faktorea arrisku faktore bezala identifikatu dute esklerosi anizkoitzean (De Jager et al., 2009). Gainera, giza IRF5 genean emandako polimorfismoek isoforma berezien sorrera edo gainadierazpena eragiten dute eta berauek, EA-bezalako gaixotasun autoimmuneekin erlazionatu izan dira (Kristjansdottir et al., 2008). IRF5 eta IRF8-ak funtzio garrantzitsua dute pro-hanturazko zitokinen indukzioan, makrofagoen pro-hanturazko fenotipoaren aktibazioan eta Th1-Th17 erantzun immunearen sorreran, guzti honekin EAE-aren progresioa bultzatuz (Krausgruber et al., 2011; Yoshida et al., 2014). Ikerketa lan honetan, *Irf5*, *Irf8* eta *P2x4r*-en mRNA-ren gainadierazpena antzeman dugu eta elkarren artean korrelazioa dagoela ikusi dugu bai fase akutuan eta baita sendatze fasean ere. Gainera, *in vitro* polarizatutako mikroglia zeluletan P2X4R-ren gainadierazpena aurkitu da pro-hanturazko mikroglia zeluletan, baina ez anti-hanturazkoetan (Zabala et al., 2018). Hala ere, IRF5 eta IRF8 EA-rako arrisku faktore izatea, ez dator bat lan honetan P2X4R-rentzako deskribatu dugun funtzio onuragarriarekin. Beraz, nahiz eta hartzailea pro-hanturazko mikroglia zeluletan gainadierazten den, baliteke gainadierazpen hau erantzun immunea orekatzeko edo kontrolatzeko izatea eta jarraian, anti-hanturazko erantzuna aktibatzea. Izan ere, adibidez *Listeria monocytogenes* bakterioaren infekzioan, pro-hanturazko makrofagoen presentzia beharrezkoa da ondoren anti-hanturazkoak agertzeko (Chazaud, 2014; Bleriot et al., 2015).



## 2.2 IRF5-ren gabezia onuragarria da EAE-ko fase akutuan sintomen agertzea atzeratuz

IRF8-IRF5 transkripzio ardatza erabakiagarria da mikroglia P2X4R<sup>+</sup> fenotipo erreaktibora pasa dadin (Masuda et al., 2014). Bestalde, IRF8<sup>-/-</sup> saguek ez dute EAE-a garatzen, ez baita T zelulen erantzunik aktibatzen sagu hauek MOG-rekin immunizatu ondoren. Datu hau, IRF8-a arrisku faktore bezala identifikatzen duten ikerketekin bat dator (De Jager et al., 2009; Disanto et al., 2012). Bi transkripzio faktoreak ardatz berdinean inplikaturik daudenez, lan honetan IRF5-aren funtzioa aztertu genuen EAE ereduaren. Hasteko, sintomen agertzean atzerapen nabarmena antzeman dugu EAE induzitutako IRF5<sup>-/-</sup> saguetan. Emaiza honekin bat dator IRF5-aren gabezia esklerosi sistemikoa (Saigusa et al., 2015) eta lupus eritematoso sistemikoa (Ban et al., 2016) bezalako gaixotasun autoimmuneetan onuragarria dela adierazten duten hainbat ikerketa. IRF5 transkripzio faktorea sortzetiko erantzun immunearekin dago nagusiki erlazionatuta, baina B zelulen erantzunean ere badu eragina (Ban et al., 2018). Gaixotasun autoimmuneetan duen eragin onuragarria, sortzetiko sistema immunearen erantzunaren modulazioaren eraginez ematen da. Aldiz, gure ikerketa lanean, IRF5<sup>-/-</sup> saguetan ikusi dugun sintomen atzerapenak, erantzun immunearen sorreran eta T zelulen infiltrazioan, hau da, hartutako sistema immunearen sorreran, atzerapena dagoela adierazten digu. Hala ere, ezin da baztertu mikroglia/makrofagoetan IRF5-aren gabezia izatea T zelulen erantzuna atzeratzen duena. Ideia honekin lotuta, deskribatua dago mikroglia zeluletan TAK1 kinasaren delezioak EAE-a ez garatzea eragiten duela (Goldmann et al., 2013). Lan horrek erakutsi duenez, mikroglia zelulek EAE-aren fase goiztiarrean, erantzun immunea bultzatzen lezakeen zitokinen mikroingurumena sortuko lukete. Beraz, IRF5 gabeko mikroglia zelulak izan litezke sintomen agertzearen atzerapenaren erantzule. Hala ere esperimentu gehiagoren beharra dago hipotesi hau ziurtatu ahal izateko.

## 2.3. Sendatzerik eza IRF5<sup>-/-</sup> saguetan

IRF5<sup>-/-</sup> saguek ez zituzten sagu basatiek baino sintoma larriagoak izan EAE-ko fase akutuan, baina denbora gehiago behar izan zuten sendatze fasean sartzeko eta gainera, sendatze hori txikiagoa izan zen sagu hauetan. IRF5 faktorea zelula immuneetan bakarrik aurkitzen da eta ez oligodendroitoetan, hori dela eta, sendatze faseko arazoak mikroglia/makrofagoen funtzioen eraginkortasun ezak eraginak direla ondorioztatu dugu. Izan ere, ez dugu T zelulen erantzunean aldaketarik aurkitu sendatze fasean. Mikroglia/makrofagoek gaixotasun desmielinizatzaileetan aurkeztu dituzten eragin onuragarriak mielina hondakinak garbitzeko duten ahalmenaren ondorio dira ehin batean (Kotter et al., 2006; Neuman et al.,

2009; Lampron et al., 2015; Cantuti-Castelvetri et al., 2018). Gainera, P2X4R-ren blokeatzeak mielinaren endozitosisia eta degradazioa oztopatzen dituela ikusi da eta gainera, P2X4<sup>-/-</sup> saguek mielina hondakinen metaketa handiagoa aurkezten dute EAE-aren ondoren sagu basatiek baino (Zabala et al., 2018). Honekin bat etorritik, IRF5<sup>-/-</sup> saguetan ere mielina hondakinen metatze handiago ikusi dugu EAE-ko sendatze fasean. *In vitro* eginiko esperimenduetan ikusten ari garenez IRF5<sup>-/-</sup> mikroglia arazoak ditu mielina degradatzerakoan, baina ez endozitatzerakoan (erakutsi gabeko datuak). Esperimendu gehiagoren beharra dago puntu hau argitzeko eta mekanismoa deskribatzeko. Datu guztiak kontuan hartuta, IRF5 transkripzio faktorea EAE-an mielina hondakinak garbitzeko beharrezkoa dela ondoriozta dezakegu.

P2X4R blokeatzeak edo indartzeak, zelulen polarizazioak fagozitosian duen eragina modulatu du (Zabala et al., 2018), nahiz eta kontrako interpretazioa ere posible den. Beraz, mielinaren fagozitosiak mikroglia/makrofagoen hanturazko erantzuna erregula lezake (Kroner et al., 2014). Mielinaren fagozitosiak *in vitro*, anti-hanturazko mikroglia aktibazioa bultzatzen du (Boven et al., 2006; Liu et al., 2006). Hala ere, baldintza patologikoetan joera hau alda daiteke. Bizkarrezur muineko lesioaren ondoren adibidez, mikroglia zelulak batez ere pro-hanturazko fenotipoa mantentzen dute, sendatzea oztopatuz (Kroner et al., 2014). Mikroglia/makrofagoen pro-hanturazko fenotipotik anti-hanturazkora pasatzea oztopatzen duten eta fagozitosiarekin erlazionatuta dauden bi faktore TNF alpha eta mikroglia/makrofagoetan burdinaren metatzea dira. Beste faktore garrantzitsu bat zelulen adina izan liteke. Berriki ikusi denez, mikroglia/makrofago zaharretan kolesterol metaketa gertatzen da mielinaren fagozitosiaren ondoren eta honek zelula hauetan hanturazko erantzun okerra eragiten du, inflamasiaren aktibazioa eraginez eta bermielinizazioa oztopatuz (Cantuti-Castelvetri et al., 2018). Ideia honekin lotuta, IRF5<sup>-/-</sup> saguek pro-hanturazko geneen gainadierazpen txikia baina esanguratsua izan dute gure esperimenduetan EAE-ko sendatze fasean. Datu hauek harrigarriak dira, IRF5 faktoreak pro-hanturazko geneak erregulatzen dituela kontutan hartzen badugu. (Krausgruber et al., 2011). Gainadierazpen hau fagozitosi prozesuko arazoaren ondorioa den edo transkripzio faktorearen eragin zuzenaren ondorioa den oraindik ez dago argi.

### **3. IRF5 transkripzio faktorearen funtzioa LPC-bidezko desmielinizazio eremuan**

Toxina-bidezko desmielinizazio ereduak, mielina hondakinak eta berauek dituzten OPC-en diferentziazio inhibitzaileak kentzea beharrezkoa dela erakutsi dute bermielinizazio eraginkor

bat eman dadin. Mikroglia eta makrofagoak dira mielina hori fagozitatearen erantzuleak. Baina, beraien fagozitosi ahalmenaz gain, hainbat faktore ekoizten dituzte oligodendroitoen errekrutatzean eta diferentziazioan eraginez (Kotter et al., 2005; Döring et al., 2015; Lampron et al., 2015). LPC-bidezko desmielinazio ereduaren lortutako gure emaitzek IRF5-aren gabeziak OPC-en errekrutatzea atzeratzen edo oztopatzen duela ikusi dugu, ondorioz bermielinizazioa atzeratuz. Ideia honek, IRF5<sup>-/-</sup> saguek lesio handiagoak izatea azalduko luke. Ikerketarekin jarraitu beharko da errekrutatzerakoan dagoen arazoa mielinen fagozitosian dagoen arazoaren ondorio den edo ez azaltzeko. Ideia hau EAE-an lorturiko emaitzekin bat etor liteke.

LPC-bidezko desmielinazioa erantzun immunearekiko independentea da, izan ere immunoeskasidun saguetan ere ematen baita (Bieber et al., 2003). Hala ere, LPC-a injektatu eta berehala T zelulak, B zelulak eta makrofagoak agertzen dira lesio gunean. Zelulen infiltrazio hau onuragarritzat jotzen da gero bermielinizazioa gerta dadin (Bieber et al., 2003; Nielsen et al., 2011; Dombrowski et al., 2017). Gure emaitzek adierazten dutenez, IRF5<sup>-/-</sup> saguetan erantzun immunea larriagotuta dago LPC-bidezko desmielinazioaren ostean, T zelula CD3<sup>+</sup> gehiago dituztelarik lesio gunean eta hanturazko erantzun nabarmena meningeetan. Erantzun immune areagotu honek ziurrenik eragin kaltegarriak izango ditu, IRF5<sup>-/-</sup> saguek lesio eremu handiagoak erakusten baitituzte. Naiz eta toxina-bidezko desmielinazio ereduak nagusiki erantzun immunearekiko independenteak izan, gure aurkikuntzak, baldintza patologikoetan erantzun immune sekundario bat ager daitekeela iradokitzen du. Adibidez, mielinopatia txikiak hanturazko erantzun desmielinizatzailea sor dezaketela deskribatu izan da, EA-ko lesioen antzerakoak (Caprarielo et al., 2018). Ikerketa lan horretan kuprizona-bidezko desmielinazio eredu motza erabili zuten eta ondoren sistema immunearen erantzuna bultzatu (Caprarielo et al., 2018). Kuprizonaren tratamenduaren ondoren aldaketak antzeman zituzten mielinan. Beraz, mielinako aldaketa eta lesioek erantzun immunea aktibatu dezakete. Mielinen aldaketa biokimikoek, zehazki MBP-aren deiminazioak (mielinen konpaktazioa eragiten duen element nagusia), epitope immunogenikoa azaleratzen du (Musse et al., 2006). Gainera, biokimikoki eraldatutako mielina kantitateak EA-ko lesioen larritasunarekin korrelazionatzen duela ikusi izan da (Wood et al., 1996; Moscarello et al., 1996; Bradford et al., 2014). Beraz, LPC-ak mielinari eragindako kalteak, fagozitosian dauden arazoekin batera mielinen epitope antigenikoak denbora luzeagoz utziko lituzke azaleratuta, ondorioz erantzun immune sekundario bat sortuz IRF5<sup>-/-</sup> saguetan. Hartutako immunitateko zelulek lesioen tamainan edo OPC-en errekrutamentuan izan dezaketen eragina aztertzeko esperimentu gehiago burutu behar dira.

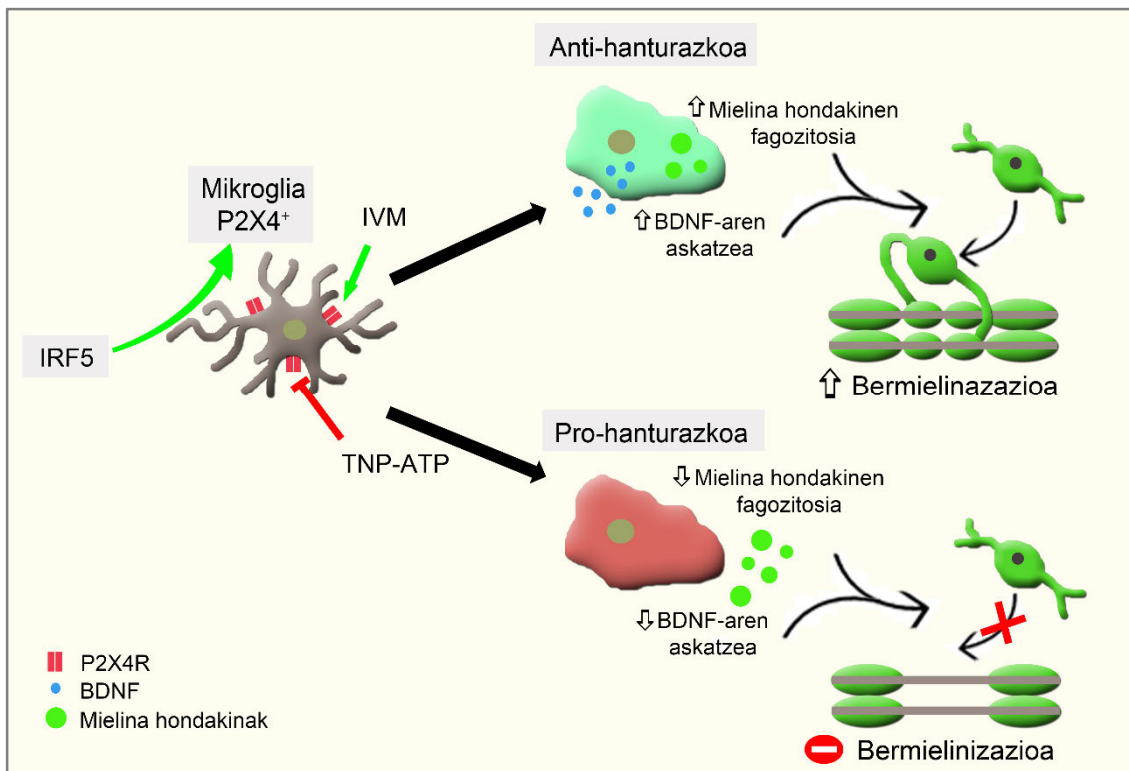


ONDORIOAK



Lan honetatik lortutako ondorioak honakoak dira (ikusi **41. irudia** ere):

1. *P2x4r*-ren eta bere transkripzioa erregulatzen duten *Irf8* eta *Irf5* transkripzio faktoreen adierazpena handituta dago EAE-an.
2. P2X4R-ren blokeatzeak EAE-ko sintomak larriagotzen ditu eta ibermektina-bidezko indartzeak aldiz, sintomen hobetzea eragiten du.
3. P2X4R-ren blokeatzeak edo indartzeak ez du erantzun immunearen sorreran eraginik EAE-aren immunizazio ostean.
4. P2X4R-ren indartzeak mikroglia/makrofagoak anti-hanturazko fenotiporantz bultzatzen ditu eta BDNF-ren askatzea areagotu, honela, oligodendroitoen diferentziazioa bultzatuz.
5. IRF5-aren gabeziak EAE-ko sintomen agertzea atzeratzen du, baina sendatze faseko sintomak larriagotzen ditu.
6. IRF5<sup>-/-</sup> saguek mielina hondakinen metatzea erakusten dute EAE-an eta arazoak dituzte fagozitosi prozesuan.
7. IRF5<sup>-/-</sup> saguek arazoak dituzte oligodendroito aitzindarien errekrutatzean eta erantzun immune areagotua agertzen dute toxina-bidezko desmielinizazioaren ostean.



**41. irudia.** IRF5-aren adierazpenak eta mikroglia/makrofagoen P2X4R-ren aktibazioak entzefalomielite autoimmunean (esklerosi anizkoitzaren animalia eredu) duen eragina azaltzen duen irudikapen eskematikoa. (Eraldatua, *Zabala et al., 2018*).

Birsortzea bultzatzeko sortzetiko sistema immunearen modulazioa esklerosi anizkoitzaren tratamendurako etorkizun handiko estrategia terapeutikoa litzateke. Lan honetako datuek IRF5-P2X4R ardatzaren gainadierazpena esklerosi anizkoitzeko erantzun immunearen markatzailea izan daitekelako adierazten dute eta P2X4R mikroglia/makrofagoen aktibazioaren modulatzaile gako delako. Lortu ditugun emaitzek ibermektinaren erabilera babesten dute mikroglia/makrofagoen anti-hanturazko fenotipo birsortzailea indartzeko, honela bermielinizazioa bultzatuz esklerosi anizkoitzean. Gainera, gorputzaren helmintoen aurkako erantzuna makrofagoen anti-hanturazko fenotipoan oinarritzen da (*Sato et al., 2010*) eta beraz, baliteke hemen ibermektinarentzat deskribatu dugun mekanismoa helmintoen aurka duen efektuarekin bateratu ahal izatea. Ibermektina gaur egun parasitoen aurkako tratamenduetan erabiltzeak, sendagai honen entsegu klinikoak erraztuko ditu esklerosi anizkoitzaren tratamendurako.

IRF5 transkripzio faktorea hainbat gaixotasun autoimmunerekin dago erlazionatuta eta horien artean esklerosi anizkoitza aurkitzen da. Ikerketa lan honetan lortutako emaitzek IRF5 transkripzio faktorearen funtzioa konplexua dela adierazten dute, EAE-an funtzio kaltegarri batetik onuragarri batera igaroz. IRF5-aren konplexutasuna mikroglia berak patologian erakusten duen konplexutasunarekin eta eragin bikoitzarekin (onuragarria/kaltegarria) ere bat dator. Mekanismo eta zelula mota ezberdinak egon daitezke efektu bikoitz honen atzean. Hori dela eta, puntu hauek argitzeko esperimentu berriak ditugu antolatuta: 1) IRF5-aren funtzioa aztertzea erantzun immunearen sorreran eta 2) bere aktibitatea indartzearen aukera bermielinizazioa bultzatzeko.

Guztia kontuan izanda, doktore tesi honetan lortu diren emaitzak aurrerapausu nabarmena dira P2X4 hartzailak eta IRF5 transkripzio faktoreak esklerosi anizkoitzaren patofisiologian betetzen dituzten funtzioen ulertzean. Horrez gain, P2X4 hartzailak eta IRF5 transkripzio faktoreak mikroglia/makrofagoen erantzuna modulatzeko dutenez, mikroglia/makrofagoek EAE-ko sendatze fasean duten eraginaren ulertzean ere aurrerakada garrantzitsua eman dugu. Esklerosi anizkoitzaren etapa kronikoranzko progresioa ulertzea, (erantzun autoimmunezko eraso faseak baino) eta animalia ereduetan sendatzea bultzatzen duten mekanismoak ulertzea benetan garrantzitsua da ordezkotzat estrategia terapeutikoak diseinatu ahal izateko eta honela esklerosi anizkoitz primarioa alde batetik eta sekundarioa bestetik tratatu ahal izateko.



## *BIBLIOGRAFIA*



- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19-29.
- Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML (2013) Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339:156-161.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14:1142-1149.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538-1543.
- Ajami B, Samusik N, Wieghofer P, Ho PP, Crotti A, Bjornson Z, et al. (2018) Single-cell mass cytometry reveals distinct populations of brain myeloid cells in mouse neuroinflammation and neurodegeneration models. *Nat Neurosci* 21:541-551.
- Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117:145-152.
- Alonso A, Hernán MA (2008) Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 71:129-135.
- Amadio S, Apolloni S, D'Ambrosi N, Volonté C (2011) Purinergic signalling at the plasma membrane: a multipurpose and multidirectional mode to deal with amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. *J Neurochem* 116:796-805.
- Amadio S, Montilli C, Picconi B, Calabresi P, Volonté C (2007) Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study. *Purinergic Signal* 3:389-398.
- Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, et al. (2004) Human endogenous retrovirus glycoprotein mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7:1088-1095.
- Arbeloa J, Pérez-Samartín A, Gottlieb M, Matute C (2012) P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiol Dis* 45:954-961.
- Arno B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, et al. (2014) Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nat Commun* 5:5611.
- Arnold T, Betsholtz C (2013) The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell* 5:4.

- Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, *et al.* (2016) Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity* 45:319-332.
- Ban T, Sato GR, Tamura T (2018) Regulation and role of the transcription factor IRF5 in innate immune responses and systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 30:529-536.
- Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurology* 55:458-468.
- Baroja-Mazo A, Barberà-Cremades M, Pelegrín P (2013) The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *BBA-Biomembranes* 1828:79-93.
- Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, *et al.* (2009) Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 462:94-98.
- Baxter AW, Choi SJ, Sim JA, North RA (2011) Role of P2X4 receptors in synaptic strengthening in mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 34:213-220.
- Beaino W, Janssen B, Kooij G, van der Pol SMA, van Het Hof B, van Horssen J, *et al.* (2017) Purinergic receptors P2Y12R and P2X7R: potential targets for PET imaging of microglia phenotypes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 14:259.
- Béchéde C, Cantaut-Belarif Y, Bessis A (2013) Microglial control of neuronal activity. *Front Cell Neurosci* 7:32.
- Beggs S, Trang T, Salter MW (2012) P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci* 15:1068-1073.
- Bernarroch EE (2013) Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* 81:1079-1088.
- Bessis A, Béchéde C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-238.
- Bieber AJ, Kerr S, Rodriguez M (2003) Efficient central nervous system remyelination requires T cells. *Ann Neurol* 53:680-684.
- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123:1174-1183.
- Bittner S, Meuth SG (2013) Targeting ion channels for the treatment of autoimmune neuroinflammation. *Ther Adv Neurol Disord* 6:322-336.
- Blakemore WF (1974) Pattern of remyelination in the CNS. *Nature* 249:577-578.

- Bleriot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M (2015) Liver-resident macrophage necrosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2 mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* 42:145-158.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Boche D, Perry VH, Nicoll JAR (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:3-18.
- Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M, Wierenga-Wolf A, Hintzen RQ, Boot RG, et al. (2006) Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain* 129:517-526.
- Bradford CM, Ramos I, Cross AK, Haddock G, McQuaid S, Nicholas AP, et al. (2014) Localisation of citrullinated proteins in normal appearing white matter and lesions in the central nervous system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 273:85-95.
- Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. (2014) Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83:1022-1024.
- Buell G, Lewis C, Collo G, North RA, Surprenant A (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J* 15:55-62.
- Bulavina L, Szulzewsky F, Rocha A, Krabbe G, Robson SC, Matyash V, et al. (2012) NTPDase1 activity attenuates microglial phagocytosis. *Purinergic Signal* 9:199-205.
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509-581.
- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub, R.W., Bolis, L. (Eds.), *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Raven Press, New York, pp. 107-118.
- Burnstock G (2006) Purinergic signaling. *Br J Pharmacol* 147Suppl 1:S172-181.
- Burnstock G (2012) Purinergic signaling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* 34:218-225.
- Burnstock G (2017) Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* 8:661.
- Butovsky O, Landa G, Kunis G, Ziv Y, Avidan H, Greenberg N, et al. (2006) Induction and blockade of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:905-915.
- Cantuti-Castelvetri L, Fitzner D, Bosch-Queralt M, Weil MT, Su M, Sen P, et al. (2018) Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system. *Science* 359:684-688.

- Cao Q, Zhong XZ, Zou Y, Murrell-Lagnado R, Zhu MX, Dong XP (2015) Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J Cell Biol* 209:879-894.
- Caprariello AV, Rogers JA, Morgan ML, Hoghooghi V, Plemel JR, Koebel A, *et al.* (2018) Biochemically altered myelin triggers autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:5528-5533.
- Cardoso AM, Schetinger MR, Correia-de-Sá P, Sévigny J (2015) Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. *Auton Neurosci* 191:25-38.
- Chazaud B (2014) Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 219:172-178.
- Choi SH, Veeraraghavalu K, Lazarov O, Marler S, Ransohoff RM, Ramirez JM, *et al.* (2008) Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron* 59:568-580.
- Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502-1517.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, *et al.* (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017-1021.
- Crawford AH, Chambers C, Franklin RJ (2013) Remyelination: the true regeneration of the central nervous system. *J Comp Pathol* 149:242-254.
- Czeh M, Gressens P, Kaindl AM (2011) The yin and yang of microglia. *Dev Neurosci* 33:199-209.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V, Zuo Y, Jung S, *et al.* (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neuroscience* 8:752-758.
- Davalos D, Ryu JK, Merlini M, Baeten KM, Le Moan N, Petersen MA *et al.* (2012) Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun* 3:1227.
- David S, Bouchard C, Tsatas O, Giftochristos N (1990) Macrophages can modify the nonpermissive nature of the adult mammalian central nervous system. *Neuron* 5:463-469.
- De Jager PL, Chibnik LB, Cui J, Reischl J, Lehr S, Simon KC, *et al.* (2009) Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. *Lancet Neurol* 8:1111-1119.
- Dekkers MP, Barde YA (2013) Developmental biology. Programmed cell death in neuronal development. *Science* 340:39-41.

- Del Río-Hortega P (1919a) El “tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal. II. Intervencion de la microglia en los procesos patologicos (Celulas en bastoncito y cuerpos granuloadiposos). *Boletín de la Sociedad Española de Biología* VIII:69-109.
- Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15:545-558.
- Di Virgilio F (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28:465-472.
- Di Virgilio F, Pinton P, Falzoni S (2016) Assessing extracellular ATP as danger signal in vivo: the pmeLuc system. *Nlr Proteins: Methods and Protocols* 1417:115-129.
- Dideberg V, Kristjansdottir G, Milani L, Libioule C, Sigurdsson S, Louis E, *et al.* (2007) An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet* 16:3008-3016.
- Disanto G, Sandve GK, Berlanga-Taylor AJ, Morahan JM, Dobson R, Giovannoni G (2012) Genomic regions associated with multiple sclerosis are active in B cells. *PLoS One*. 7:e32281.
- Dombrowski Y, O'Hagan T, Dittmer M, Penalva R, Mayoral SR, Bankhead P, *et al.* (2017) Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat Neurosci* 20:674-680.
- Domercq M, Pérez-Samartín A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C (2010) P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia* 58:730-740.
- Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Areso P, Matute C (1999) Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *Eur J Neurosci* 11:2226-36.
- Domercq M, Szczupak B, Gejo J, Gómez-Vallejo V, Padro D, Gona KB, *et al.* (2016) PET Imaging with [(18)F]FSPG Evidences the Role of System xc(-) on Brain Inflammation Following Cerebral Ischemia in Rats. *Theranostics* 6:1753-1767.
- Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C (2013) Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci* 7:49.
- Domercq M, Zabala A, Matute C (2018) Purinergic receptors in multiple sclerosis pathogenesis. *Brain Res Bull* pii: S0361-9230(18)30611-7.
- Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB (2016) Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol* 4:71.
- Döring A, Sloka S, Lau L, Mishra M, van Minnen J, Zhang X, *et al.* (2015) Stimulation of monocytes, macrophages, and microglia by amphotericin B and macrophage colony-stimulating factor promotes remyelination. *J Neurosci* 35:1136-1148.

- Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB (2000) Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 7:574-585.
- Durafourth BA, Moore CS, Zammit DA, Johnson TA, Zaguia F, Guiot MC, *et al.* (2012) Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* 60:717-727.
- Fang KM, Yang CS, Sun SH, Tzeng SF (2009) Microglial phagocytosis attenuated by short-term exposure to exogenous ATP through P2X receptor action. *J Neurochem* 111:1225-1237.
- Feinstein A, Freeman J, Lo AC (2015) Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed. *Lancet Neurol* 14:194-207.
- Ferraro D, Plantone D, Morselli F, Dallari G, Simone AM, Vitetta F, *et al.* (2018) Systematic assessment and characterization of chronic pain in multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 39:445-453.
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, del Rio T, Fonseca M (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39:451-458.
- Ferrini F, Trang T, Mattioli TA, Laffray S, Del'Guidice T, Lorenzo LE, *et al.* (2013). Morphine hyperalgesia gated through microglia mediated disruption of neuronal Cl<sup>-</sup> homeostasis. *Nat Neurosci* 16:183-192.
- Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, *et al.* (2013) Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain* 136:1799-1815.
- Fourgeaud L, Través PG, Tufail Y, Leal-Bailey H, Lew ED, Burrola PG, *et al.* (2016) TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature* 532:240-244.
- Frade JM, Barde YA (1998) Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20:35-41.
- Franklin RJ, Ffrench-Constant C (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 9:839-855.
- Franklin RJM, Ffrench-Constant C (2017) Regenerating CNS myelin – from mechanisms to experimental medicines. *Nat Rev Neurosci* 18:753-769.
- Franklin RJM, Ffrench-Constant C, Edgar J, Smith JM (2012) Neuroprotection and repair in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 8:624-634.
- Franklin RJM, Gallo V (2014) The translational biology of remyelination: past, present and future. *Glia* 62:1905-1915.



- Fumagalli M, Lombardi M, Gressens P, Verderio C (2018) How to reprogram microglia toward beneficial functions. *Glia* 66:2531-2549.
- Gebara E, Sultan S, Kocher-Braissant J, Toni N (2013) Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Front Neurosci* 7:145.
- Geginat J, Paroni M, Pagani M, Galimberti D, De Francesco R, Scarpini E, *et al.* (2017) The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends Immunol* 38:498-512.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, *et al.* (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7:45.
- Giovannoni G, Butzkueven H, Dhib-Jalbut S, Hobart J, Kobelt G, Pepper G, *et al.* (2016) Brain health: time matters in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 9 Suppl 1:S5-S48.
- Goldmann T, Wieghofer P, Müller PF, Wolf Y, Varol D, Yona S, *et al.* (2013) A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci* 16:1618-1626.
- Goodell MA, Rando TA (2015) Stem cells and healthy aging. *Science* 350:1199-1204.
- Groom AJ, Smith T, Turski L (2003) Multiple sclerosis and glutamate. *Ann N Y Acad Sci* 993:229-275.
- Guo LH, Schluesener HJ (2005) Lesional accumulation of P2X(4) receptor(+) macrophages in rat CNS during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 134:199-205.
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL *et al.* (2007) Risk alleles for MS identified by a genomewide study. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. *N Engl J Med* 357:851-862.
- Haghikia A, Hohlfeld R, Gold R, Fugger L (2013) Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol Med* 19:309-319.
- Hampton DW, Innes N, Merkler D, Zhao C, Franklin RJ, Chandran S (2012) Focal immune-mediated white matter demyelination reveals an age-associated increase in axonal vulnerability and decreased remyelination efficiency. *Am J Pathol* 180:1897-1905.
- Harada K, Hide I, Seki T, Tanaka S, Nakata Y, Sakai N (2011). Extracellular ATP differentially modulates Toll-like receptor 4-mediated cell survival and death of microglia. *J Neurochem* 116:1138-1147.

- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey M E, Gan W B, *et al.* (2006) The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neuroscience* 9:1512-1519.
- Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, *et al.* (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 11:146-152.
- Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 45:494-504.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, *et al.* (2001) Extracellular ATP or ADP Induce Chemotaxis of Cultured Microglia through Gi/o-Coupled P<sub>2</sub>Y Receptors. *J Neuroscience* 21:1975-1982.
- Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012) Deficiency of the microglial receptor CX<sub>3</sub>CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci* 32:15106-15111.
- Huang P, Zou Y, Zhong XZ, Cao Q, Zhao K, Zhu MX, *et al.* (2014) P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *J Biol Chem* 289:17658-17667.
- Huynh JL, Casaccia P (2013) Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment. *Lancet Neurol* 12:195-206.
- Hvilsted Nielsen H, Toft-Hansen H, Lambertsen K L., Owens T, Finsen B (2011) Stimulation of adult oligodendrogenesis by myelin-specific T cells. *Am J Pathol* 179:2028-2041.
- Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:310-317.
- Inoue K, Tsuda M (2012) P<sub>2</sub>X<sub>4</sub> receptors of microglia in neuropathic pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11:699-704.
- Jeffery ND, Blakemore WF (1995) Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol* 24:775-781.
- Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, Tsirka SE (2013) Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One* 8:e56293.
- Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, *et al.* (2012) IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- $\gamma$  production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 42:1804-1814.
- Junger WG (2011) Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11:201-212.

- Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of Microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77:10-18.
- Khakh BS, North RA (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76:51-69.
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, *et al.* (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16:273-280.
- Kierdorf K, Prinz M (2017) Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127:3201-3209.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol* 258:5-16.
- Kim B, Jeong HK, Kim JH, Lee SY, Jou I, Joe EH (2011) Uridine 5'-diphosphate induces chemokine expression in microglia and astrocytes through activation of the P2Y6 receptor. *J Immunol* 186:3701-3709.
- Kimbler DE, Shields J, Yanasak N, Vender JR, Dhandapani KM (2012) Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice. *PLoS One* 7:e41229.
- King IL, Dickendesher TL, Segal BM (2009) Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113:3190-3197.
- Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, *et al.* (2007) UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446:1091-1095.
- Kondo Y, Adams JM, Vanier MT, Duncan ID (2011) Macrophages counteract demyelination in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. *J Neurosci* 31:3610-3624.
- Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ (2006) Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 26:328-332.
- Kotter MR, Zhao C, van Rooijen N, Franklin RJ (2005) Macrophage-depletion induced impairment of experimental CNS remyelination is associated with a reduced oligodendrocyte progenitor cell response and altered growth factor expression. *Neurobiol Dis* 18:166-175.
- Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, *et al.* (2011) IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12:231-238.

- Kristjansdottir G, Sandling JK, Bonetti A, Roos IM, Milani L, Wang C, *et al.* (2008) Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations. *J Med Genet* 45:362-369.
- Kroner A, Greenhalgh AD, Zarruk JG, Passos Dos Santos R, Gaestel M, David S (2014) TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron* 83:1098-1116.
- Lalisse S, Hua J, Lenoir M, Linck N, Rassendren F, Ulmann L (2018) Sensory neuronal P2RX4 receptors controls BDNF signaling in inflammatory pain. *Sci Rep* 8:964.
- Lalo U, Pankratov Y, Wichert SP, Rossner MJ, North RA, Kirchhoff F *et al.* (2008) P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 28:5473-5480.
- Lampron A, Larochelle A, Laflamme N, Préfontaine P, Plante MM, Sánchez MG, *et al.* (2015) Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J Exp Med* 212:481-495.
- Laria A, Lurati A, Marrazza M, Mazzocchi D, Re KA, Scarpellini M (2016) The macrophages in rheumatic diseases. *J Inflamm Res* 9:1-11.
- Lassmann H, Bradl M (2017) Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133:223-244.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-415.
- Ledderose C, Liu K, Kondo Y, Slubowski CJ, Dertnig T, Denicoló S, *et al.* (2018) Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. *J Clin Invest* 128:3583-3594.
- Li F, Wang L, Li JW, Gong M, He L, Feng R, *et al.* (2011) Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* 12:111.
- Li WW, Setzu A, Zhao C, Franklin RJ (2005) Minocycline-mediated inhibition of microglia activation impairs oligodendrocyte progenitor cell responses and remyelination in a non-immune model of demyelination. *J Neuroimmunol* 158:58-66.
- Li Y, Du XF, Liu CS, Wen ZL, Du JL (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* 23:1189-1202.

- Liu L, Belkadi A, Darnall L, Hu T, Drescher C, Coteleur AC, *et al.* (2010) CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis. *Nat Neurosci* 13:319-326.
- Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, *et al.* (2006) Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci* 26:12904-12913.
- Locatelli G, Theodorou D, Kendirli A, Jordão MJC, Staszewski O, Phulphagar K, *et al.* (2018) Mononuclear phagocytes locally specify and adapt their phenotype in a multiple sclerosis model. *Nat Neurosci* 21:1196-1208.
- López-Diego RS, Weiner HL (2008) Novel therapeutic strategies for multiple sclerosis - a multifaceted adversary. *Nat Rev Drug Discov* 7:909-925.
- Lublin FD (2014) New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* 72Suppl 1:1-5.
- Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907-911.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurology* 47:707-717.
- Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H (2015) Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 14:183-193.
- Manohar M, Hirsh MI, Chen Y, Woehrle T, Karande AA, Junger WG (2012) ATP release and autocrine signaling through P2X4 receptors regulate  $\gamma\delta$  T cell activation. *J Leukoc Biol* 92:787-794.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- Masuda T, Iwamoto S, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Nishiyama A, Mak TW, *et al.* (2014) Transcription factor IRF5 drives P2X4R+-reactive microglia gating neuropathic pain. *Nat Commun* 5:3771.
- Matsumura Y, Yamashita T, Sasaki A, Nakata E, Kohno K, Masuda T, *et al.* (2016) A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain. *Sci Rep* 6:32461.
- Matsushima GK, Morell P (2001) The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* 11:107-116.

- Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Sánchez-Gómez MV (2001) The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci* 24:224-230.
- Matute C, Pérez-Cerdá F (2005) Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming lesions. *Trends Neurosci* 28:173-175.
- Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Alberdi E, Etxebarria E, *et al.* (2007) P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 27:9525-9533.
- McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.
- McKinnon RD, Piras G, Ida JA Jr, Dubois-Dalcq M (1993) A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol* 121:1397-1407.
- McLarnon JG, Ryu JK, Walker DG, Choi HB (2006) Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:1090-1097.
- McMorris FA, Dubois-Dalcq M (1988) Insulin-like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment in rat glial progenitor cells developing in vitro. *J Neurosci Res* 21:199-209.
- McMurrin CE, Jones CA, Fitzgerald DC, Franklin RJ (2016) CNS Remyelination and the Innate Immune System. *Front Cell Dev Biol* 4:38.
- Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X (2007) Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 56:3989-3994.
- Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, *et al.* (2011) Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler* 17:2-15.
- Mildner A, Mack M, Schmidt H, Brück W, Djukic M, Zabel MD, *et al.* (2009) CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* 32:2487-2500.
- Milior G, Lecours C, Samson L, Bisht K, Poggini S, Pagani F, *et al.* (2016) Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain Behav Immun* 55:114-125.

- Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M (2005) Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol* 4:281-288.
- Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, *et al.* (2013) M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16:1211-1218.
- Miron VE, Franklin RJ (2014) Macrophages and CNS remyelination. *J Neurochem* 130:165-171.
- Mishra MK, Wang J, Silva C, Mack M, Yong VW (2012) Kinetics of proinflammatory monocytes in a model of multiple sclerosis and its perturbation by laquinimod. *Am J Pathol* 181:642-651.
- Miyamoto N, Maki T, Shindo A, Liang AC, Maeda M, Egawa N, *et al.* (2015) Astrocytes promote oligodendrogenesis after white matter damage via brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 35:14002-14008.
- Moscarello MA, Wood DD, Ackerley C, Boulias C (1994) Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J Clin Invest* 94:146-154.
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- Moyon S, Dubessy AL, Aigrot MS, Trotter M, Huang JK, Dauphinot L, *et al.* (2015) Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration. *J Neurosci* 35:4-20.
- Murphy N, Cowley TR, Richardson JC, Virley D, Upton N, Walter D, *et al.* (2011) The Neuroprotective Effect of a Specific P2X(7) Receptor Antagonist Derives from its Ability to Inhibit Assembly of the NLRP3 Inflammasome in Glial Cells. *Brain Pathol* 22:295-306.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, *et al.* (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41:14-20.
- Musse AA, Boggs JM, Harauz G (2006) Deimination of membrane-bound myelin basic protein in multiple sclerosis exposes an immunodominant epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4422-4427.
- Nave KA (2010) Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11:275-283.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288-295.
- Nicholas RS, Wing MG, Compston A (2001) Nonactivated microglia promote oligodendrocyte precursor survival and maturation through the transcription factor NF-kappa B. *Eur J Neurosci* 13:959-967.

- Nimmerjahn A (2012) Two-photon imaging of microglia in the mouse cortex in vivo. *Cold Spring Harb Protoc* 2012(5). pii: pdb.prot069294.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, Sumi N, Miyao K, Takata F, *et al.* (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci* 112:251-254.
- Ntranos A, Lublin F (2016) Diagnostic criteria, classification and treatment goals in multiple sclerosis: The chronicles of time and space. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16:90.
- O'Connor AB, Schwid SR, Herrmann DN, Markman JD, Dworkin RH (2008) Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed classification. *Pain* 137:96-111.
- Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K (2007) Involvement of P2X 4 and P2Y 12 Receptors in ATP-Induced Microglial Chemotaxis. *Glia* 61:604-616.
- Olechowski CJ, Tenorio G, Sauve Y, Kerr BJ (2013) Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol* 241:113-121.
- Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA (2005) Central pain in multiple sclerosis--prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain* 9:531-542.
- Pachner AR (2011) Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 24:291-299.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, *et al.* (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates 3<sup>rd</sup> JR, Lafaille JJ, *et al.* (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155:1596-1609.
- Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278:13309-13317.
- Patani R, Balaratnam M, Vora A, Reynolds R (2007) Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:277-287.
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, *et al.* (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129:3165-3172.
- Peri F, Nüsslein-Volhard C (2008) Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. *Cell* 133:916-927.
- Perry V H (1998) A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Neuroimmunol* 90: 113-121.



- Pfeifenbring S, Nessler S, Wegner C, Stadelmann C, Brück W (2015) Remyelination After Cuprizone-Induced Demyelination Is Accelerated in Juvenile Mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:756-766.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN (2005) Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res.* 81:374-389.
- Priel A, Silberberg SD (2004) Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol* 123:281-293.
- Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES (1993) Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33:137-151.
- Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, *et al.* (2001) Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:646-657.
- Prinz M, Priller J (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 15:300-312.
- Qureshi OS, Paramasivam A, Yu JC, Murrell-Lagnado RD (2007) Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *J Cell Sci* 120:3838-3849.
- Ransohoff RM (2012) Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci* 15:1074-1077.
- Ransohoff RM (2016) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 19:987-991.
- Rasmussen S, Wang Y, Kivisäkk P, Bronson RT, Meyer M, Imitola J, *et al.* (2007) Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 130:2816-2829.
- Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM (2016) The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front Hum Neurosci* 10:566.
- Ribeiro Xavier AL, Kress BT, Goldman SA, Lacerda de Menezes JR, Nedergaard M (2015) A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. *J Neurosci* 35:11848-11861.
- Rocca MA, Filippi M (2007) Functional MRI in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 17Suppl 1:36S-41S.
- Rocca MA, Mezapesa DM, Falini A, Ghezzi A, Martinelli V, Scotti G, *et al.* (2003) Evidence for axonal pathology and adaptive cortical reorganization in patients at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Neuroimage* 18:847-855.

- Royle SJ, Qureshi OS, Bobanović LK, Evans PR, Owen DJ, Murrell-Lagnado RD (2005) Non-canonical YXXGPhi endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J Cell Sci* 118:3073-3080.
- Rubio ME, Soto F (2001) Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21:641-653.
- Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, van Wijngaarden P, Rao TN, Wagers AJ, et al. (2012) Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell Stem Cell* 10:96-103.
- Rueda B, Reddy MV, González-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Petersson IF, et al. (2006) Analysis of IRF5 gene functional polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54:3815-3819.
- Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, Lang R, Uv A, Betsholtz C (2011) A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One* 6:e15846.
- Saigusa R, Asano Y, Taniguchi T, Yamashita T, Ichimura Y, Takahashi T, et al. (2015) Multifaceted contribution of the TLR4-activated IRF5 transcription factor in systemic sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:15136-15141.
- Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, et al. (2010) The *Jmjd3-Irf4* axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 11:936-944.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74:691-705.
- Schafer DP, Stevens B (2015) Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020545.
- Schwab JM, Guo L, Schluesener HJ (2005) Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *J Neuroimmunol* 163:185-189.
- Serizawa K, Tomizawa-Shinohara H, Magi M, Yogo K, Matsumoto Y (2018) Anti-IL-6 receptor antibody improves pain symptoms in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 319:71-79.
- Shields S, Gilson J, Blakemore W, Franklin R (2000) Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following flitoxin-induced CNS demyelination. *Glia* 29:102.

- Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34:2231-2243.
- Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A, *et al.* (2009) A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis* 68:377-383.
- Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay MÈ (2014) Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast* 2014:610343.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet- Wadiche LS, *et al.* (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483-495.
- Sigurdsson S, Nordmark G, Göring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, *et al.* (2005) Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 76:528-537.
- Sim JA, Chaumont S, Jo J, Ulmann L, Young MT, Cho K, *et al.* (2006) Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *J Neurosci* 26:9006-9009.
- Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez JM, Hollmann M, Karschin C, Stühmer W (1996) P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3684-3688.
- Sousa C, Biber K, Michelucci A (2017) Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Front Immunol* 8:198.
- Squarzone P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, *et al.* (2014) Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep* 8:1271-1279.
- Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, *et al.* (2012) Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity* 37:249-263.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, *et al.* (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- Stromnes IM, Goverman JM (2006) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1:1810-1819.
- Su WF, Wu F, Jin ZH, Gu Y, Chen YT, Fei Y, *et al.* (2018) Overexpression of P2X4 receptor in Schwann cells promotes motor and sensory functional recovery and remyelination via BDNF secretion after nerve injury. *Glia* 67:78-90.

- Sun D, Yu Z, Fang X, Liu M, Pu Y, Shao Q, *et al.* (2017) LncRNA GAS5 inhibits microglial M2 polarization and exacerbates demyelination. *EMBO Rep* 18:1801-1816.
- Svendsen KB, Jensen TS, Hansen HJ, Bach FW (2005) Sensory function and quality of life in patients with multiple sclerosis and pain. *Pain* 114:473-481.
- Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, Synowitz M, Markovic D, Langmann T, *et al.* (2015) Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. *PLoS One* 10:e0116644.
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, *et al.* (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
- Tang L, Chen B, Ma B, Nie S (2014) Association between IRF5 polymorphisms and autoimmune diseases: a meta-analysis. *Genet Mol Res* 13:4473-4485.
- Tierney JB, Kharkrang M, La Flamme AC (2009) Type II-activated macrophages suppress the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol* 87:235-240.
- Tiwari S, Lapierre J, Ojha CR, Martins K, Parira T, Dutta RK, *et al.* (2018) Signaling pathways and therapeutic perspectives related to environmental factors associated with multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 96:1831-1846.
- Tompkins SM, Padilla J, Dal Canto MC, Ting JP, Van Kaer L, Miller SD (2002) De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168:4173-4183.
- Toyomitsu E, Tsuda M, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tanaka Y, Inoue K (2012) CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. *Purinergic Signal* 8:301-310.
- Trang T, Beggs S, Wan X, Salter MW (2009) P2X4-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci* 29:3518-3528.
- Trapp BD, Nave K-A (2008) Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? *Annual Rev Neurosci* 31:247-269.
- Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, *et al.* (2018) Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 17:870-884.
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8:e1000527.

- Tripathi RB, Rivers LE, Young KM, Jamen F, Richardson WD (2010) NG2 glia generate new oligodendrocytes but few astrocytes in a murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of demyelinating disease. *J Neurosci* 30:16383-16390.
- Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2013) P2X4 receptors and neuropathic pain. *Front Cell Neurosci* 7:191.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, *et al.* (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778-783.
- Tsunoda I, Fujinami RS (2002) Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer Semin Immunopathol* 24:105-125.
- Tsunoda I, Libbey JE, Fujinami RS (2007) TGF-beta1 suppresses T cell infiltration and VP2 puff B mutation enhances apoptosis in acute polioencephalitis induced by Theiler's virus. *J Neuroimmunol* 190:80-89.
- Tuohy VK, Lu Z, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB (1989) Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol* 142:1523-1527.
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, *et al.* (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16:543-551.
- Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, *et al.* (2008) Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J Neurosci* 28:11263-11268.
- Ulmann L, Levavasseur F, Avignone E, Peyrourou R, Hirbec H, Audinat E, *et al.* (2013) Involvement of P2X4 receptors in hippocampal microglial activation after status epilepticus. *Glia* 61:1306-1319.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.
- Vazquez-Villoldo N, Domercq M, Martín A, Llop J, Gómez-Vallejo V, Matute C (2014) P2X4 receptors control the fate and survival of activated microglia. *Glia* 62:171-184.
- Vilalta A, Brown GC (2017) Neurophagy, the phagocytosis of live neurons and synapses by glia, contributes to brain development and disease. *FEBS J* 285:3566-3575.

- Vogel DY, Vereyken EJ, Glim JE, Heijnen PD, Moeton M, van der Valk P, *et al.* (2013) Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation* 10:35.
- Vukovic J, Colditz MJ, Blackmore DG, Ruitenbergh MJ, Bartlett PF (2012) Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J Neurosci* 32:6435-6443.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974-3980.
- Wakselman S, Béchade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (2008) Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 28:8138-8143.
- Walter L, Neumann H (2009) Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. *Semin Immunopath* 31:513-525.
- Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, *et al.* (2014) Interleukin-1 $\beta$  induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One* 9:e110024.
- Weiss M, Blazek K, Byrne AJ, Perocheau DP, Udalova IA (2013) IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo. *Mediators Inflamm* 2013:245804.
- Werner P, Pitt D, Raine CS (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50:169-180.
- Wixey JA, Reinebrant HE, Carty ML, Buller KM (2009) Delayed P2X4R expression after hypoxia-ischemia is associated with microglia in the immature rat brain. *J Neuroimmunol* 212:35-43.
- Włodarczyk A, Holtman IR, Krueger M, Yogev N, Bruttger J, Khorooshi R, *et al.* (2017) A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *EMBO J* 36:3292-3308.
- Woehrle T, Yip L, Elkhali A, Sumi Y, Chen Y, Yao Y, *et al.* (2010) Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* 116:3475-3484.
- Wong AW, Xiao J, Kemper D, Kilpatrick TJ, Murray SS (2013) Oligodendroglial expression of TrkB independently regulates myelination and progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 33:4947-4957.

- Wood DD, Bilbao JM, O'Connors P, Moscarello MA (1996) Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* 40:18-24.
- Xiao Y, Jin J, Chang M, Chang JH, Hu H, Zhou X, *et al.* (2013) Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation. *Nat Med* 19:595-602.
- Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, *et al.* (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40:274-288.
- Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, *et al.* (2014) Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 211:1533-1549.
- Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA (2010) Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7:378-391.
- Yin Y, Henzl MT, Lorber B, Nakazawa T, Thomas TT, Jiang F, *et al.* (2006) Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat Neurosci* 9:843-852.
- Yoshida Y, Yoshimi R, Yoshii H, Kim D, Dey A, Xiong H, *et al.* (2014) The transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF- $\beta$  signaling and promotes neuroinflammation. *Immunity* 40:187-198.
- Yu Z, Sun D, Feng J, Tan W, Fang X, Zhao M, *et al.* (2015) MSX3 switches microglia polarization and protects from inflammation-induced demyelination. *J Neurosci* 35:6350-6365.
- Zabala A, Vazquez-Villoldo N, Rissiek B, Gejo J, Martin A, Palomino A, *et al.* (2018) P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis. *EMBO Mol Med* 10. pii: e8743.
- Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, *et al.* (2010) CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 6:578-590.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, *et al.* (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 17:400-406.
- Zhang JD, Yang XL, Zhou Y, Fox H, Xiong H (2018) Direct contacts of microglia on myelin sheath and Ranvier's node in the corpus callosum in rats. *J Biomed Res.* doi: 10.7555/JBR.32.20180019.

Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, *et al.* (2014) An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci* 34:11929-11947.

Zhao GN, Jiang DS, Li H (2014) Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease. *Biochim Biophys Acta* 1852:365-378.

Zipp F, Aktas O (2006) The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 29:518-527.