

Antalet fall av TBE har ökat under de senaste 20 åren, trots att vi har tillgång till effektiva vacciner. Det tidiga immunförsvaret styr vilka områden i hjärnan men även specifikt vilka celltyper som infekteras av TBE-virus. Detta visar ny forskning från Umeå universitet, som beskrivs i denna artikel av **Emma Nilsson** och **Anna Överby Wernstedt**.

# TBE

**drabbar olika  
delar av hjärnan –  
och olika celltyper**

**Fästingburen encefalit** eller TBE (tick-borne encephalitis) orsakas av TBE-virus från familjen flavivirus. Denna virusfamilj har ett flertal välkända medlemmar som orsakar miljontals infektioner världen över, såsom denguevirus, gula febernvirus, zikavirus och West Nile-virus. Det som alla dessa virus har gemensamt är att de är vektorburna, vilket betyder att de sprids via bitt från infekterade myggor eller fästingar. TBE-virus är den medlem i flavivirusfamiljen som förekommer i Sverige. Antalet fall av TBE i Sverige har under de senaste 20 åren ökat kraftigt från cirka 50–100 fall före år 2000 till över 600 fall 2023.<sup>1</sup> Detta trots att det finns bra vacciner att tillgå med nästintill 100 procents skydd vid fullföljt vaccinationsprogram. I många fall orsakar virusinfektionen endast lindriga symtom, såsom feber, men i en del fall tar sig viruset till hjärnan där det orsakar hjärninflammation (encefalit) med svår huvudvärk, förvirring samt förlamningar. I så mycket som en tredjedel av fallen av svår TBE lider patienterna av bestående besvär, såsom trötthet och minnesstörningar.<sup>2</sup> För att kunna upptäcka, förhindra och behandla TBE på bästa sätt behöver vi mer kunskap om hur viruset fungerar samt hur kroppens egna försvar jobbar för att bekämpa infektionen. Som ett steg på vägen behöver nya me-

toder utvecklas och användas vilket är något som vi har ägnat de senaste åren åt.

#### DET MEDFÖDDA IMMUNFÖRSVARET

En av kroppens första försvarslinjer vid virusinfektion utgörs av produktion av typ I interferon (IFN). När ett virus infekterar en cell resulterar det i en produktion av virala signaturmolekyler, såsom dubbelsträngat RNA, detta känns igen som något främmande av cellens specifika receptorer. En signalkaskad startas vilket leder till en produktion av interferon som utsöndras från cellen som en larmsignal för att varna intilliggande icke-infekterade celler så att de i sin tur kan skydda sig mot infektion. IFN binder till interferonreceptorer på intilliggande celler med effekten att denna cell börjar producera hundratals proteiner (interferon-stimulated genes) med uppdraget att känna igen eller bekämpa virusinfektionen. Vissa av dessa proteiner har en direkt antiviral verkan. Vi har under åren försökt att i detalj kartlägga hur interferonsystemet och hur det interferonstimulerade antivirala proteinet viperin specifikt försöker hindra TBE-virus.<sup>3,4</sup>

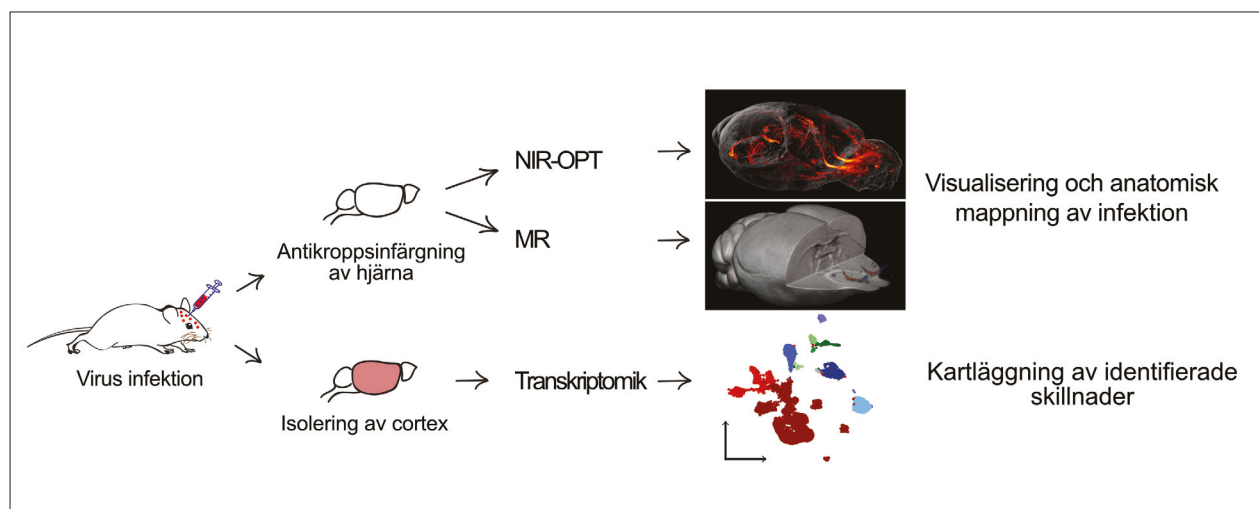
#### NYA AVBILDNINGSTEKNIKER GER BÄTTRE INSYN

Under dessa grundläggande studier har vi kunnat visa att den lokala interferonresponsen i hjärnan hos infekterade möss till viss del kan begränsa infektionen.<sup>5,6</sup> De tekniker som har använts i

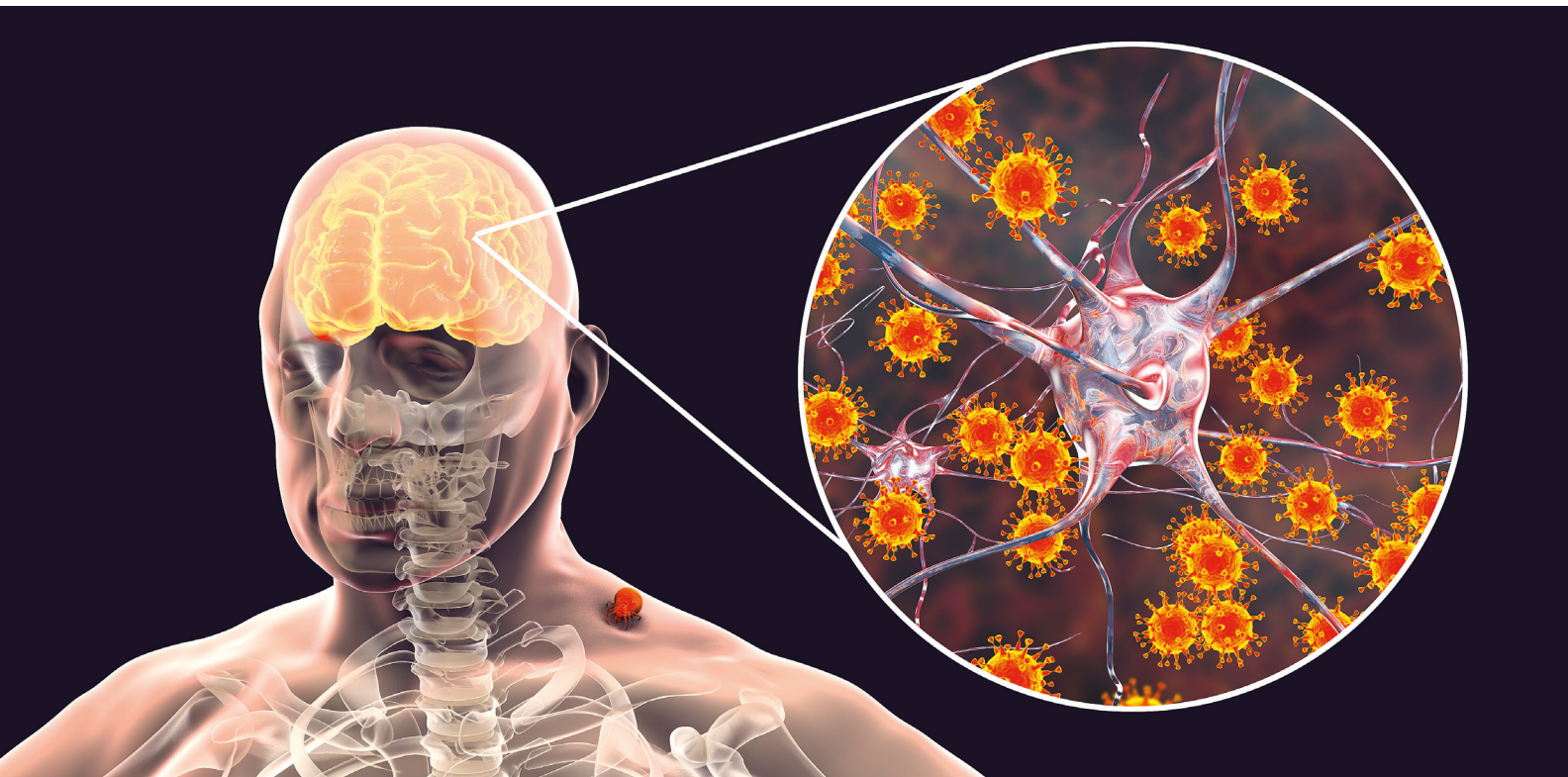
dessa studier är dock ej tillräckligt känsliga för att kunna tillhandahålla en övergripande bild av hur viruset sprider sig i hjärnan och hur interferonsystemet påverkar detta. Med hjälp av olika samarbetspartners har vi nu utvecklat nya verktyg samt nya kombinationer av verktyg för att på bästa sätt kunna ta vår forskning till nästa nivå. Det första steget var att utveckla helhjärneavbildning av virusinfektion, i mushjärna, genom användning av NIR-OPT (near infrared optical projection tomography). Detta resulterade i att vi nu kan visualisera infektionen i 3D.<sup>7</sup> Även om OPT ger oss möjlighet att synliggöra infektionen så har den sina begränsningar när det kommer till den anatomiska information som kan erhållas. För att lösa detta har vi även utvecklat en MR-mall (magnetrontgen-mall) som kan kombineras med den information som vi får ut från OPT. Detta gör det möjligt för oss att både synliggöra virusinfektionen och ge en exakt anatomisk karta över de infekterade områdena [Figur 1].<sup>8</sup>

#### TYP I INTERFERONER STYR VILKA OMRÅDEN I HJÄRNAN SOM INFEKTERAS

Med hjälp av denna nya kombination av visualiseringstekniker samt våra olika musmodeller har vi kunnat kartlägga hur interferonresponsen begränsar infektionen i vissa delar av hjärnan. I vildtypsmöss ser vi framför allt infektion i cerebrale cortex samt till viss del i olfaktoriet, medan mönstret ser helt annorlunda ut i möss som saknar interferon-



**Figur 1.** Illustration av metoden för helhjärneavbildning i 3D av virusinfektion i mushjärna (övre panelen) samt efterföljande transkriptomik (nedre panelen) för kartläggning och validering av uppmärksammade skillnader.



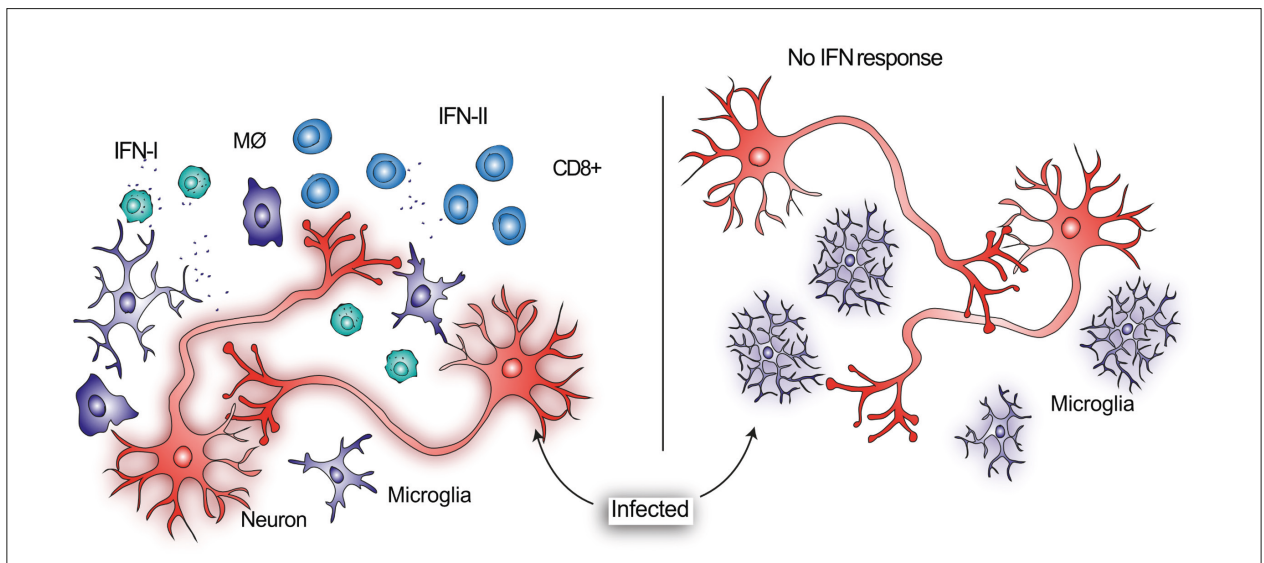
” *Detta visar hur otroligt viktigt det är att tänka igenom sitt val av modellsystem så att systemet i så stor utsträckning som möjligt efterliknar situationen in vivo.*

receptorn och inte kan svara på interferoner (IFNAR<sup>-/-</sup> möss). Där ser vi istället infektion i hjärnhinnorna, ventriklarna, främre delen av cerebrum samt olfaktoriet. Genom att kombinera OPT och MR kan vi nu visualisera och kartlägga virusinfektion i helhjärneformat samtidigt som vi har möjlighet att specifikt mäta och jämföra infektionsnivåerna i 336 olika anatomiska regioner. Jämförelsen av virussignalen i dessa anatomiska regioner mellan vildtypsmöss och IFNAR<sup>-/-</sup> möss verifierade ytterligare de distinkta skillnaderna i infektion som vi visuellt uppmärksammat med hjälp av OPT. Som ett komplement till dessa metoder använder vi även avbildningstekniker, såsom konfokal mikroskopi, LSM (light sheet fluorescent microscopy) samt elektronmikroskopi. Dessa gör det möjligt för oss att gå från cm-skala hela vägen ner till nm-upplösning. Med hjälp av denna kombination av ny

och befintlig teknik ser vi att interferonresponsen inte bara påverkar vilka regioner i hjärnan som infekteras utan även vilken specifik celltyp. I vildtypsmöss är det framför allt nervceller som infekteras, medan i möss som saknar interferonreceptorn så är majoriteten av de infekterade cellerna mikroglia. Dessa lite oväntade resultat visar även att det som ses i cellkultur (*in vitro*) inte nödvändigtvis stämmer överens med vad som händer i djurmodellen (*in vivo*). *In vitro* ser vi hög infektion av astrocyter från IFNAR<sup>-/-</sup> möss, vilket inte ses *in vivo*. Vi kan inte heller överföra det tropismskifte som vi ser i mikroglia i IFNAR<sup>-/-</sup> möss *in vivo* till *in vitro*-situationen där vi har väldigt låg infektion av mikroglia. Detta visar hur otroligt viktigt det är att tänka igenom sitt val av modellsystem så att systemet i så stor utsträckning som möjligt efterliknar situationen *in vivo*.

#### INFLAMMATION OCH REKRYTERING AV IMMUNCELLER STYRS AV INTERFERONSVARET

Den observerade skillnaden mellan infektion av mikroglia *in vivo* kontra *in vitro* kan antingen bero på den specifika miljön i hjärnan eller så har vi en infiltration av mikroglia/makrofager från periferin in till hjärnan. För att kunna besvara denna frågeställning tog vi hjälp av transkriptomik på singelcell-nivå (singel nuclei RNA-sekvensering). Till skillnad från våra tidigare transkriptomik-analyser av astrocyter *in vitro*, där vi såg ganska stora skillnader i grunduttrycket mellan celler från vildtyps- och IFNAR<sup>-/-</sup> möss, ser vi att de individuella cellerna hos de olika djurmodellerna är mycket lika.<sup>9</sup> Å andra sidan ser vi stora skillnader i hur specifika celltyper i hjärnan från vildtyps- och IFNAR<sup>-/-</sup> möss reagerar på infektionen. Överlag ser vi att responsen i vildtypsmöss är mycket starkare än i



**Figur 2.** Virusinfekterade vildtypsmöss uppvisar ett kraftigt inflammatoriskt svar med infiltration av makrofager samt CD8+ NK-celler vilket i sin tur bidrar till aktivering av mikroglia (vänster panel). Total avsaknad av infiltration av celler och aktivering av mikroglia observeras i möss som saknar IFN-svar (höger panel) vilket har till följd att mikroglia infekteras.

IFNAR<sup>-/-</sup> möss, samt att den mest uppreglerade signaleringsvägen inte helt oväntat är IFN-signaleringsvägen.

Genom att komplettera resultaten från RNA-sekvenseringen med tekniker såsom flödescytometri och histologi har vi byggt en modell baserat på våra resultat [Figur 2]. Det vi ser i vildtypsmöss är ett starkt svar på infektionen med en kraftig infiltration av makrofager (MØ) samt andra CD8+ NK-celler som i sin tur uttrycker typ II IFN som bidrar till en kraftig inflammatorisk miljö i hjärnan. IFNAR<sup>-/-</sup> mössen saknar helt denna inflammatoriska miljö och infiltrering av andra immunceller. Vi ser även en tydlig skillnad vad gäller aktiveringen av mikroglia och mängden cell-cell-kommunikation är kraftigt reducerad vid avsaknad av IFN-svar (IFNAR<sup>-/-</sup> möss). Detta visar på vikten av en fungerande lokal inflammatorisk miljö i hjärnan samt de specifika signalerna från andra celler som stimulerar aktiveringen av mikroglia. Båda dessa viktiga nyckelpunkter saknas i IFNAR<sup>-/-</sup> möss vilket i slutändan gör att mikroglia cellerna i dessa möss blir mottagliga för infektion.

#### SLUTSATSER OCH FRAMTIDA FORSKNING

Vi har nu utvecklat ett unikt tillvägagångssätt där vi kan avbilda hela mus-hjärnan och visualisera virusdistribu-

tionen, denna information kombinerar vi med den framtagna MR-kartan vilket ger oss en möjlighet att på ett anatomiskt korrekt sätt kartlägga infektionen samt den efterföljande inflammatoriska processen. Vi kombinerar sedan denna information med olika omics-metoder för att på så sätt öka förståelsen för de sjukliga effekterna och det inflammatoriska svaret som viruset framkallar i enskilda celler. Med hjälp av denna unika kombination av tekniker hoppas vi i framtiden kunna svara på frågor såsom hur viruset tar sig in i hjärnan. Och kan vi i så fall stoppa det? Vårt långsiktiga mål är att tillhandahålla värdefull information som kan ligga till grund för utveckling av framtida läkemedel och vaccin mot flavivirusinfektioner.



**EMMA NILSSON**  
Förste forskningsingenjör,  
Institutionen för klinisk  
mikrobiologi, Umeå  
universitet  
emma.nilsson@umu.se



**ANNA ÖVERBY  
WERNSTEDT**  
Professor, Institutionen  
för klinisk mikrobiologi,  
Umeå universitet; Biträ-  
dande föreståndare vid  
Laboratoriet för Mole-  
kylär infektionsmedicin  
(MIMS), Umeå universitet  
anna.overby@umu.se

#### Referenser

1. Folkhälsomyndigheten, Tick Borne Encephalitis (TBE) – Sjukdomsstatistik. 2022, Folkhälsomyndigheten.
2. Lindquist L et Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet* 2008; 371(9627):1861-1871.
3. Lindqvist R et Overby AK. The Role of Viperin in Antiflavivirus Responses. *DNA Cell Biol* 2018; 37(9): 725-730.
4. Lindqvist R, Upadhyay A et Overby AK. Tick-Borne Flaviviruses and the Type I Interferon Response. *Viruses* 2018; 10(7).
5. Weber E, et al. Type I interferon protects mice from fatal neurotropic infection with Langat virus by systemic and local antiviral responses. *J Virol.* 2014; 88(21):12202-12212.
6. Kurhade C, et al. Type I Interferon response in olfactory bulb, the site of tick-borne flavivirus accumulation, is primarily regulated by IPS-1. *J Neuroinflammation* 2016; 13:22.
7. Sharpe J, et al. Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science* 2002; 296(5567):541-545.
8. Chotiwan N, et al. Type I interferon shapes brain distribution and tropism of tick-borne flavivirus. *Nat Commun* 2023; 14(1):2007.
9. Lindqvist R, et al. Fast type I interferon response protects astrocytes from flavivirus infection and virus-induced cytopathic effects. *J Neuroinflammation* 2016; 13(1):277.