https://doi.org/10.15388/vu.thesis.1022
https://orcid.org/0009-0003-3703-7173

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Kristina Mašalaitė

Makrofagų aktyvinimas rekombinantinių virusinių baltymų ir antikūnų imuniniais kompleksais

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2021–2025 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute, Imunologijos skyriuje.
Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (gauta stipendija už akademinius pasiekimus, paraiškos reg. Nr. P -DAP - 23 -110).

Mokslinė vadovė – prof. dr. Aurelija Žvirblienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:
Pirmininkė – dr. Veronika Viktorija Borutinskaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).
Nariai:
dr. Algirdas Grevys (*Thermo Fisher Scientific Norway*, gamtos mokslai, biochemija – N 004),
dr. Agata Mlynska (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),
doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),
dr. Egidijus Šimoliūnas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. gruodžio mėn. 10 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės Mokslų Centro R-401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, R-401 auditorija, Vilnius, Lietuva
Tel. +370 52234426; el. paštas: info@gmc.vu.lt

https://doi.org/10.15388/vu.thesis.1022
https://orcid.org/0009-0003-3703-7173

VILNIUS UNIVERSITY

Kristina Mašalaitė

Macrophage Activation by Immune Complexes Formed of Recombinant Viral Proteins and Specific Antibodies

DOCTORAL DISSERTATION

Nature Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2021 and 2025 at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biotechnology, Department of Immunology. The research was supported by Research council of Lithuania (was granted a scholarship for academic accomplishments, application no. P -DAP - 23 -110).

Academic Supervisor – Prof. Dr. Aurelija Žvirblienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Dr. Veronika Viktorija Borutinskaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).
Members:
Dr. Algirdas Grevys (*Thermo Fisher Scientific Norway*, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),
Dr. Agata Mlynska (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),
Assoc. Prof. Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),
Dr. Egidijus Šimoliūnas (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10:00 on 10 December 2026 in Room R-401 of the Life Sciences Center, Vilnius University.
Address: Saulėtekio al. 7, Room R-401, Vilnius, Lithuania
Tel. +370 52234426; e-mail: info@gmc.vu.lt

TURINYS

SANTRUMPOS 8
ĮVADAS 10
MOKSLINIS NAUJUMAS 13
GINAMIEJI TEIGINIAI 14
1. LITERATŪROS APŽVALGA 15
1.1. Pagrindiniai imuninės sistemos komponentai 15
1.1.1. Antikūnų struktūra ir funkcijos 15
1.1.2. Imuniniai kompleksai ir FcR 17
1.2. Makrofagų savybės 18
1.2.1. Makrofagų funkcijos 20
1.2.2. Mikroglijos savybės ir funkcijos 24
1.2.3. Makrofagai virusinės infekcijos metu 25
1.2.4. Makrofagų sekretuojami citokinai ir chemokinai 26
1.3. Inflamasoma 29
1.3.1. NLRP3 inflamasomos sandara 30
1.3.2. NLRP3 inflamasomos aktyvinimas 31
1.3.3. NLRP3 inflamasomos vaidmuo virusinių infekcijų metu 34
1.4. SYK kinazė 35
1.4.1. SYK kinazės struktūra 36
1.4.2. SYK kinazės aktyvinimas 37
1.4.3. SYK kinazė įgimtojo imuniteto ląstelėse 38
1.5. Lipidų plaustai 39
1.6. Žmogaus poliomos virusai 41
1.7. VPD modelis 44
2. MEDŽIAGOS IR METODAI 46
2.1. Medžiagos 46
2.1.1. Priemonės 46

2.1.2. Buferiniai tirpalai, terpės ir reagentai 46
2.1.3. Ląstelių kultūros 51
2.1.4. Eksperimentiniai gyvūnai 51
2.1.5. Programinė įranga duomenų analizei: 51
2.2. Metodai 52
2.2.1. Pirminės mikroglijos kultūros išskyrimas ir kultivavimas 52
2.2.2. L929 ląstelių kondicionuotos terpės ruošimas 52
2.2.3. Pirminės mikroglijos kultūros aktyvinimas 53
2.2.4. NLRP3 geno raiškos slopinimas siRNR 53
2.2.5. Ląstelių lizatų paruošimas 54
2.2.6. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis 55
2.2.7. Imunoblotas 55
2.2.8. Imunocitochemija 56
2.2.9. Tėkmės citometrija 57
2.2.10. Chemokinų sekrecijos profilio nustatymas 58
2.2.11. Antikūnų gryninimas 58
2.2.12. Antikūnų žymėjimas krienų peroksidaze 59
2.2.13. Baltymų žymėjimas *pHrodo* žyme 60
2.2.14. IK tyrimas imunoprecipitacijos metodu 60
2.2.15. Spektrinė elipsometrija 60
2.2.16. Imunofermentinė analizė (IFA) 61
2.2.17. Statistinė analizė 63
3. REZULTATAI 64
3.1. Mikroglijos ląstelių aktyvinimas VPD ir IK 64
3.1.1. IK formavimasis ir fagocitozė 64
3.1.2. MAk epitopų analizė 67
3.1.3. MAk ir IK apibūdinimas spektrinės elipsometrijos metodu 69
3.1.4. VPD ir IK sukeliamos uždegiminių molekulių sekrecijos analizė mikroglijos ląstelėse 71

3.1.5. NLRP3 inflamasomos aktyvinimo analizė mikroglijos ląstelėse 75
3.2. SYK kinazės vaidmuo, aktyvinant mikroglijos ląsteles VPD ir IK ... 78
3.2.1. SYK įtakos NLRP3 inflamasomos aktyvinimui VPD ir IK analizė... 78
3.2.2. SYK vaidmuo antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raiškos ir endocitozės procesuose VPD ir IK aktyvintose mikroglijos ląstelėse 82
3.2.3. Lipidinių struktūrų ląstelių paviršiuje susidarymas IK aktyvintose mikroglijos ląstelėse 84
4. REZULTATŲ APTARIMAS 88
IŠVADOS 95
LITERATŪROS SĄRAŠAS 96
SUMMARY 118
PADĖKA 138
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS 139
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS 140
Gyvenimo aprašymas 143
Užrašams 147

SANTRUMPOS

ASC – su apoptoze asocijuotas į tašką panašus baltymas, turintis CARD domeną (angl. *appoptosis associated speck-like protein containing CARD*);
b. t. – buferinis tirpalas;
BCA – bicinchoninė rūgštis;
BCR – B ląstelės receptorius;
BSA – jaučio serumo albuminas;
CARD – kaspazę-1 pritraukiantis domenas (angl. *caspase recruitment domain*);
CCL – C-C motyvo chemokino ligandas (angl. *C-C motif chemokine ligand*);
CH – sunkiosios grandinės pastovioji sritis;
CL – lengvosios grandinės pastovioji sritis;
CTB – choleros toksino subvienetas B;
CXCL – C-X-C motyvo chemokino ligandas (angl. *C-X-C motif chemokine ligand*);
DAMP – su ląstelių pažaidomis susijusios molekulinės struktūros (angl. *damage associated molecular pattern*);
DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle terpė (angl., *Dulbecco's Modified Eagle Medium*);
DMSO – dimetilsulfoksidas;
ECM – užląstelinis matriksas (angl. *extracellular matrix*);
FBS – fetalinis veršiuko serumas;
FcγR – Fc γ receptorius (angl. *fragment crystallizable γ receptor*);
GSDMD – Gasderminas D;
HBV – hepatito B virusas;
hMDM – žmogaus iš monocitų susidarę makrofagai (angl. *human monocyte-derived macrophages*);
HRP – krienų peroksidazė (angl., *horseradish peroxidase*);
HSV-1 – *Herpes simplex-1* virusas;
IFA – imunofermentinė analizė;
IFN – interferonas;
IgG – imunoglobulinų G klasės antikūnai;
IK – imuninis kompleksas;
IL – interleukinas;
ITAM – imuninių receptorių tirozo liekanų aktyvinimo motyvas (angl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*);
ITIM – imuninių receptorių tirozo liekanų slopinimo motyvas (angl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*);

K_d – tariamoji disociacijos konstanta;
KT – kambario temperatūra;
LPS – lipopolisacharidas;
MAk – monokloniniai antikūnai;
MAk-HRP – monokloniniai antikūnai žymėti krienų peroksidaze;
MHC – didysis audinių dermės kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*);
NK – natūralios žudikės ląstelės (angl. *natural killer cells*);
OT – optinis tankis;
PAk – poliklonіniai antikūnai;
PAMP – su patogenais susijusios molekulinės struktūros (angl. *pathogen associated molecular pattern*);
PBMC – periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (ang. *peripheral blood mononuclear cells*);
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas;
PBS-T – fosfatinis buferinis tirpalas su detergentu *Tween-20*;
PI4P – fosfatidilinozitolio 4-fosfatas;
PRR – molekulinius motyvus atpažįstantis receptorius (angl. *pattern recognition receptor*);
PYD – pirino domenas;
PyV – poliomos virusas;
ROS – reaktyvios deguonies formos;
SYK – blužnies tirozino kinazė (ang. *spleen tyrosine kinase*);
TBS – Tris buferinis tirpalas;
TBS-T – TBS su detergentu Tween-20;
TCR – T ląstelės receptorius;
TGF-β – transformuojantis augimo veiksnys beta (angl. *transforming growth factor beta*);
TLR – Toll tipo receptorius (angl. *Toll-like receptor*);
TMB – 3,3’,5,5’-tetrametilbenzidinas;
TNF-α – auglio nekrozės faktorius alfa (angl. *tumour necrosis factor*);
VH – sunkiosios grandinės variabilioji sritis;
VL – lengvosios grandinės variabilioji sritis;
VPD – į virusus panašios dalelės;
WUPyV – WU poliomos virusas;
ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas.

ĮVADAS

Makrofagai yra svarbios įgimtojo imuniteto ląstelės. Daugelyje organų išsidėstę makrofagai skirstomi į monocitų kilmės makrofagus ir audinių makrofagus. Vienas iš audinių makrofagų pavyzdžių yra smegenų makrofagai – mikroglijos ląstelės. Visi makrofagai yra atsakingi už imuninę patikrą, imuninio atsako iniciaciją, patogenų šalinimą, audinių regeneraciją ir homeostazės palaikymą. (1). Tokias įvairias funkcijas makrofagai gali atlikti, nes turi daug receptorių, kuriais jie atpažįsta mikroaplinkos molekulinius signalus. Makrofagai turi patogenines struktūras atpažįstančius receptorius (PRR), imuninių kompleksų (IK) Fc receptorius (FcR), pažeistų ląstelių struktūras identifikuojančius receptorius ir dar daugelį kitų receptorių. Makrofagų atsakas į šių receptorių aktyvinimą pasireiškia fagocitoze, antigenų pateikimu ir uždegiminių ar priešuždegiminių molekulių sekrecija (2). Vienas iš PRR grupės receptorių makrofaguose yra citoplazminis NLR šeimos pirino domeną turintis (NLRP3) receptorius. NLRP3 formuoja inflamasomą – multimerinį baltymų kompleksą, sukeliantį stiprų uždegiminį atsaką. NLRP3 inflamasomą sudaro trys pagrindiniai komponentai: NLRP3 receptorius, adaptorinis su apoptoze asocijuotas į tašką panašus baltymas, turintis CARD domeną – ASC ir autoproteolitiškai aktyvinama prokaspazė-1. NLRP3 receptorių gali aktyvinti aplinkos dirgikliai, metabolizmo produktai, su patogenais susijusios molekulinės struktūros (PAMP) ir su ląstelių pažeidimu susijusios molekulinės struktūros (DAMP). Šios molekulės aktyvina NLRP3 ne tiesiogiai, o per sukeliamus ląstelės homeostazės pokyčius (3). Kai kuriais atvejais inflamasomos susirinkimą palengvina tiesioginė NLRP3 ir ląstelės ar viruso baltymų sąveika (4). Inflamasomai susirinkus autoproteolitiškai aktyvinasi kaspazė-1, kurios aktyvumas lemia uždegiminių citokinų IL-1β ir IL-18 pirmtakų brendimą bei gasdermino D porų susidarymą plazminėje membranoje. Todėl NLRP3 inflamasomos aktyvinimas apibūdinamas IL-1β ir IL-18 sekreciją bei uždegimine ląstelių žūtimi, piroptoze (5). NLRP3 inflamasomos aktyvinimas yra vienas iš svarbiausių įgimtojo imuniteto mechanizmų apsaugai nuo bakterijų, grybų ir virusų, tačiau perteklinis inflamasomos aktyvinimas siejamas su Alzheimerio liga, podagra, ateroskleroze, autoimuniniais uždegiminiais sutrikimais ir sunkia virusinės infekcijos forma, pavyzdžiui, SARS-CoV-2 forma siejama su kvėpavimo nepakankamumu ir sepsiu (6). Žinoma, kad virusinės infekcijos sukelia lizosomų, mitochondrijų pažaidas, jonų koncentracijos pokyčius citozolyje, todėl gali būti aktyvinama NLRP3 inflamasoma (4,7,8). Be to, virusinių baltymų struktūra yra svarbus aspektas, lemiantis NLRP3

inflamasomos aktyvinimą (9). Virusinių infekcijų metu natūraliai susiformuojančių antikūnų specifinių virusiniams antigenams ir tų virusinių patogenų IK irgi siejami su inflamasomos aktyvinimu. SARS-CoV-2 infekcijos metu monocitų ir makrofagų aktyvinimas antikūnų opsonizuotais virusais siejamas su inflamasomos aktyvinimu ir sunkia ligos eiga (10). Kitame tyrime su adenovirusų IK parodyta, kad virusiniai IK skatina NLRP3 inflamasomos aktyvinimą makrofaguose (11). Tačiau nėra žinoma, kokios antikūnų su virusais sudaromų IK savybės nulemia inflamasomos aktyvinimą ir kokią IK savybės turi įtaką makrofagų atsakui.

Su NLRP3 aktyvinimu susijusių infekcinių ligų kontekste dažnai minima nereceptorinė blužnies tirozino kinazė (SYK). Bakterinių ir grybelinių infekcijų atvejais, ligandui prisijungus prie tam tikrų PRR aktyvinama SYK, kuri skatina NLRP3 inflamasomos susirinkimą. Aprašyta, kad SYK gali tiesiogiai fosforilinti inflamasomos adaptorinį baltymą ASC ir palengvinti inflamasomos susirinkimą (12). Taip pat grybelinių infekcijų metu nuo SYK priklausomas reaktyvių deguonies formų (ROS) susidarymas aktyvina NLRP3 (13). Tačiau SYK dažniausiai identifikuojama kaip imuninių ląstelių receptorių, pavyzdžiui, Fcγ receptorių (FcγR), signalo perdavimo molekulė. SYK aktyvinantys imuniniai receptoriai turi citoplazminius domenus susietus su tirozino liekanų aktyvinimo motyvais (ITAM). Ligandui prisijungus prie receptoriaus, prie fosforilintų ITAM prisijungia SYK ir aktyvina kinazę (14). Pelėse yra žinomos keturios skirtingos FcγR klasės – FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII ir FcγRIV, bei keturi imunoglobulinų G (IgG) poklasiai – IgG1, IgG2a, IgG2b ir IgG3. FcγR ir IgG jungiasi skirtingu afiniškumu ir specifiškumu. IgG opsonizuotų antigenų – IK paviršiuje esančių antikūnų Fc dalies susijungimas su FcγR lemia antigeno internalizavimą ir su antigeno pašalinimu susijusių signalinių kelių aktyvinimą (15). Ankstesni tyrimai rodo, kad IK prisijungus prie aktyvinančių FcγR – FcγRI, FcγRIII ir FcγRIV, aktyvinama SYK, kuri perduodama signalą antrinėms signalinėms molekulėms inicijuoja citoskeleto pokyčius, fagocitozę, citokinų ir chemokinų sekreciją (14). SARS-CoV-2 infekcijos metu viruso baltymų ir serumo IgG sudaromi IK aktyvina SYK ir lemia stiprų uždegiminį organizmo atsaką (16). Kitame tyrime atskleista, kad susidarę viruso IK gali prisidėti prie ūmaus plaučių pažeidimo, priklausomai nuo FcγR signalinių kelių aktyvinimo (17). Nors patogenų poveikis įgimtojo imuniteto komponentams plačiai tyrinėjamas daugelyje laboratorijų, nežinoma kaip konkrečios virusinių IK savybės siejasi su makrofagų uždegiminiu atsaku, NLRP3 aktyvinimu ir koks SYK vaidmuo šiuose procesuose.

Šiame darbe tirtas makrofagų aktyvinimas virusiniais baltymais ir jų IK. Skirtingų IK termodinaminių, kinetinių ir struktūrinių savybių įtaka makrofagų atsakui buvo analizuota vertinant NLRP3 inflamasomos aktyvinimą. Pirminė pelės mikroglijos kultūra pasirinkta kaip audinių makrofagų eksperimentinis modelis. Rekombinantinės į virusus panašios dalelės (VPD) pasirinktos kaip neinfekcinis virusinių antigenų modelis – tai gerai žinoma saugi alternatyva virusams, naudojama vakcinose (18). Taip pat buvo tiriamos mikroglijos ląstelių funkcinės savybės – endocitozė, antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raiška ir lipidinių struktūrų membranos paviršiuje formavimasis NLRP3 inflamasomos ir SYK kinazės aktyvinimo kontekste.

Darbo tikslas: ištirti pirminės mikroglijos ląstelių atsaką į imuninius kompleksus, sudarytus iš rekombinantinių virusinių baltymų, formuojančių į virusus panašias daleles, ir jiems specifiškų antikūnų.

Uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingų monokloninių antikūnų ir virusinių baltymų, formuojančių į virusus panašias daleles, gebėjimą sudaryti imuninius kompleksus ir jų sąveikos charakteristikas.

2. Įvertinti ir palyginti virusinių baltymų ir skirtingų imuninių kompleksų sukeliamą uždegiminį atsaką bei NLRP3 inflamasomos aktyvinimą pirminėse pelės mikroglijos ląstelėse.

3. Apibūdinti uždegiminių chemokinų sekreciją virusinių baltymų sukeliamo uždegiminio atsako metu mikroglijos ląstelėse ir įvertinti imuninių kompleksų formavimosi įtaką chemokinų sekrecijos profiliui.

4. Ištirti SYK kinazės vaidmenį virusinių baltymų ir imuninių kompleksų sukeliamo mikroglijos aktyvinimo procese ir įvertinti SYK kinazės aktyvinimo ir farmakologinio slopinimo poveikį NLRP3 inflamasomos aktyvinimui, endocitozei, antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raiškai ir lipidinių struktūrų formavimui.

MOKSLINIS NAUJUMAS

NLRP3 inflamasomos aktyvinimas siejamas su uždegiminiu atsaku virusinės infekcijos metu. Tačiau vis dar nedaug dėmesio skiriama virusinių IK sukeliamo NLRP3 aktyvinimo tyrimams. Disertacijos tyrimu atskleidžiamas nuo NLRP3 inflamasomos aktyvinimo priklausomas uždegiminis atsakas mikroglijos ląstelėse, kurį sukelia IK, sudaryti iš VPD ir specifiškų joms antikūnų. Taip pat pritaikant pažangiausius optinius ir akustinius spektroskopijos metodus kartu su imunologiniais metodais, praplėstos žinios apie antikūno savybių ir sąveikos su antigenu charakteristikos įtaką imuninių ląstelių aktyvinimui. Buvo parodyta, kad antikūnų ir IK savybės gali būti siejamos su IK gebėjimu aktyvinti inflamasomą ir keisti chemokinų sekrecijos profilį. Taip pat šiuo tyrimu atskleista, kad antikūno afiniškumas antigenui ir antikūno struktūrinės savybės nulemia imuninio atsako stiprumą. Be to, tyrimo objektu pasirinktos VPD yra plačiai taikomas antigenų modelis vakcinose, todėl disertacijos rezultatai yra itin aktualūs naujų vakcinų kūrimui bei nepageidaujamų vakcinacijos efektų tyrimams (18).

Žinoma, kad nuo SYK kinazės priklauso inflamasomos aktyvinimas bakterinių ir grybelinių infekcijų atvejais (12,13). Taip pat kitose laboratorijose atlikta tyrimų, siejančių SYK kinazę su stipriu uždegiminiu atsaku dėl IK aktyvinamų FcR (16,17). Šioje disertacijoje parodyta, kad IK sukeliamas NLRP3 susirinkimas, ASC dalelių susidarymas ir uždegiminių citokinų sekrecija priklauso nuo SYK aktyvinimo.

Formuojantis imuniniam atsakui, viena svarbiausių makrofagų funkcijų yra sąveikos su T limfocitais metu gebėjimas jiems pateikti antigenus. Antigeno pateikimo mechanizmai plačiai tyrinėjami, tačiau trūksta duomenų, kaip IK veikia makrofaguose esančių su antigeno pateikimu susijusių molekulių raišką. Šiuo tyrimu nustatyta, kad IK sudarančių antikūnų savybės, tokios kaip IgG poklasis, keičia mikroglijos ląstelių paviršiuje pateikiamų molekulių raišką. Be to, parodyta, kad SYK aktyvinimas yra svarbus antigeno pateikime dalyvaujančių ir kostimuliacinių molekulių raiškai mikroglijos ląstelių paviršiuje. Tai rodo, kad SYK ne tik svarbi inflamasomos aktyvinimui, bet veikia kaip įgimtojo ir įgytojo imuniteto tarpininkas.

Apibendrinant, disertacija atskleidžia NLRP3 inflamasomos aktyvinimo mechanizmus ir SYK svarbą mikroglijos ląstelėms atsakant į virusinius IK. Šiame tyrime taip pat gauti duomenys apie antikūnų ir jų sudaromų IK savybes, turinčias įtakos mikroglijos ląstelių atsako stiprumui.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Skirtingų poklasių ir skirtingo afiniškumo monokloniniai antikūnai (MAk) sąveikaudami su virusiniais baltymais – VPD, sudaro imuninius kompleksus, pasižyminčius skirtingomis sąveikos kinetinėmis ir struktūrinėmis charakteristikomis.

2. Imuninių kompleksų ir juos sudarančių MAk savybės – IgG poklasis ir sąveikos afiniškumas – yra susijusios su mikroglijos ląstelių atsako stiprumu ir NLRP3 inflamasomos aktyvinimu.

3. Mikroglijos ląstelėse VPD sukelia nuo NLRP3 inflamasomos aktyvinimo priklausomą chemokinų sekreciją, kuri kinta veikiant VPD formuojamais imuniniais kompleksais.

4. SYK kinazės slopinimas mažina imuninių kompleksų sukeltą NLRP3 inflamasomos aktyvinimą ir su antigeno pateikimu bei T limfocitų kostimuliacija susijusių MHC II ir CD86 molekulių raišką mikroglijos ląstelėse.

5. VPD ir MAk imuniniai kompleksai skatina mikroglijos ląstelėse lipidinių membranos sričių persitvarkymą, kuris nepriklauso nuo SYK aktyvinimo.

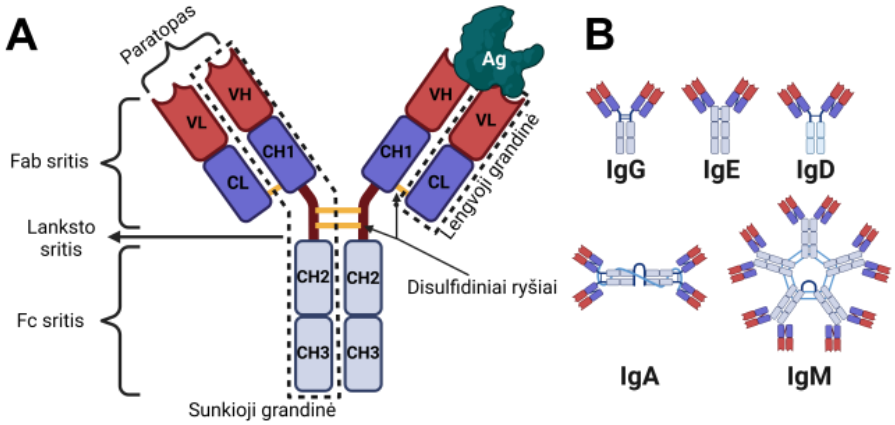
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pagrindiniai imuninės sistemos komponentai

1.1.1. Antikūnų struktūra ir funkcijos

Imuninė sistema – tai ląstelių, cheminių medžiagų ir procesų visuma, kurios funkcija yra apsaugoti organizmą nuo svetimų antigenų, pavyzdžiui, mikroorganizmų, virusų, vėžinių ląstelių ir toksinų. Šalia struktūrinių ir cheminių barjerų, saugančių nuo patogenų, imuninė sistema turi dvi pagrindines gynybos linijas: įgimtąjį imunitetą ir įgytąjį imunitetą (19). Pirmoji gynybos linija – įgimtojo imuniteto ląstelės ir molekuliniai komponentai pirmieji reaguoja į patogenus ar kitus pavojaus signalus bei yra atsakingi už audinių homeostazės palaikymą (20). Kita organizmo gynybos linija yra įgytasis imunitetas, kuris evoliucionavo taip, kad užtikrintų itin tikslią apsaugą nuo specifinių patogenų (19). Antikūnai sudaro vieną pagrindinių žmogaus įgytojo imuniteto komponentų, atsakingų už tikslų ir specifinį atsaką prieš patogenus.

Antikūnai (arba imunoglobulinai) yra B limfocitų gaminami glikoproteinai, kurių struktūrą sudaro keturios polipeptidinės grandinės – dvi sunkiosios ir dvi lengvosios grandinės, sujungtos disulfidiniais ryšiais (1.1 pav.). Kiekviena grandinė turi variabiliuosius domenus (VH ir VL) N-gale ir pastoviuosius domenus (CH ir CL) C-gale. Sunkiųjų ir lengvųjų grandinių variabilieji domenai sudaro paratopą – antigeno jungimosi vietą. Pagrindinis antikūno monomeras susideda iš dviejų Fab – antigeną surišančių fragmentų ir vienos Fc (angl. *fragment crystallizable*) dalies, atsakingos už efektorinę funkciją (21). Lengvąsias grandines sudaro κ arba λ grandinės ir turi vieną variabilųjį ir vieną pastovųjį domeną. Sunkiosios grandinės turi vieną variabilųjį ir tris (IgG, IgA ir IgD) arba keturis (IgM ir IgE) pastoviuosius domenus. Iš trijų pastoviųjų domenų sudarytos sunkiosios grandinės turi lanksto sritį tarp CH1 ir CH2 domenų. Sunkiųjų grandinių pastoviųjų domenų tipai μ, δ, γ, ε, ir α apibrėžia IgM, IgD, IgG, IgE ir IgA klases, kurių kiekviena pasižymi skirtingomis biologinėmis savybėmis (22). Žmogaus IgG ir IgA toliau skirstomi į poklasius, yra IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ir IgA2, o pelės organizme tik IgG skirstomi į IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 poklasius (21). Tipinių IgG sunkiųjų grandinių dydis yra maždaug 55 kDa, o lengvosios grandinės, κ arba λ, yra ~22–25 kDa dydžio ir yra bendros visoms antikūnų klasėms (23).



1.1 pav. Antikūno molekulės schematinis vaizdas. (A) IgG klasės antikūno struktūra. VL ir CL – lengvosios grandinės variabilusis ir pastovusis domenas, VH ir CH1–CH3 – sunkiosios grandinės variabilusis ir pastovieji domenai. Ag – antigenas. (B) Žmogaus Ig schematiniai vaizdai. Sukurta *Biorender.com* pagal (21).

Antikūnai dėl savo struktūros atlieka dvi pagrindines funkcijas: Fab sritimi suriša antigenus, suformuodami imuninius kompleksus (IK), ir Fc dalimi sąveikauja su imuninių ląstelių paviršiuje esančiais Fc receptoriais (FcR). IK ir FcR sąveika aktyvina efektorines funkcijas, tokias kaip fagocitozė, nuo antikūnų priklausomas ląstelių citotoksiškumas, taip pat citokinų bei kitų uždegiminių molekulių sekrecija (24).

Naudojant antikūnų kūrimo metodus – hibridomų technologiją, fagų raiškos technologiją, transgenines humanizuotas peles, yra kuriami monokloniniai antikūnai (MAk), kurie plačiai taikomi diagnostikai ir terapijai. Terapiniai antikūnai taikomi vėžinių, autoimuninių ir uždegiminių ligų gydymui (25). Antikūno terapinis mechanizmas priklauso nuo Fab ir Fc sričių struktūros. Fab sritis atsakinga už tirpaus antigeno neutralizavimą. Taip pat, jeigu antigenas yra membraninis, Ig prisijungimas gali sukelti ląstelės paviršiuje esančios molekulės aktyvinimą arba blokavimą. Klinikinėje praktikoje remiantis šiais mechanizmais taikoma keletas sukurtų antikūnų: *Bevacizumab* neutralizuojantis tirpų VEGF ir *Cetuximab* blokuojantis ligandų jungimąsi prie EGFR receptoriaus stabdo navikų angiogenezę ir augimą, o leukemijai gydyti skirtas *Rituximab* jungiasi prie B ląstelių ir inicijuoja apoptozę (26–28). Antikūno Fc srities efektorinės funkcijos priklauso nuo klasikinio komplemento kelio aktyvinimo arba sąveikos su imuninėmis ląstelėmis per FcR. Komplemento aktyvinimo metu kraujo plazmoje esantys

komplemento baltymai jungiasi ląstelės-taikinio membranoje ir sukelia jos lizę. Antikūnams jungiantis per FcR, sukeliamas nuo antikūnų priklausomas citotoksiškumas arba fagocitozė. Krūties vėžio gydymui taikomas *Trastuzumab* pasižymi abejomis Fc sąveikos sukeliamomis funkcijomis (29).

1.1.2. Imuniniai kompleksai ir FcR

Antikūnų formuojami IK yra vieni pagrindinių imuninės sistemos komponentų, siejančių įgimtojo imuniteto gynybinius mechanizmus ir įgytojo imuniteto specifiškumą. IK jungiasi su FcR ant įgimtojo imuniteto ląstelių – makrofagų, dendritinių ląstelių, granuliocitų, kuriose inicijuoja imuninį atsaką (30). Pagrindinė antikūnų klasė, dalyvaujanti cirkuliuojančių IK susidaryme yra IgG, nes tai gausiausi serume esantys antikūnai, kurie sudaro apie 80 % visų serumo imunoglobulinų (31). Todėl ir patologijos atveju dažniausiai pasitaikanti antikūnų klasė yra IgG. Ši tendencija stebima autoimuninių, infekcinių ir neuroužd egiminių ligų metu. Išsėtinės sklerozės atveju smegenų skystyje aptinkami IK yra sudaryti IgG klasės antikūnų (32). IgG kompleksai taip pat dominuoja autoimuninių ligų atveju. Pavyzdžiui, reumatoidinio artrito ir uždegiminių žarnyno ligų atveju kraujyje IgG klasės antikūnai sudaro didelės molekulinės masės agregatus (33). Virusinės infekcijos ar vakcinacijos metu kraujyje cirkuliuojantys IgG apgaubia antigeną, suformuoja oligomerinį kompleksą, kuriame Fc dalys yra nukreiptos tolyn nuo opsonizuoto baltymo paviršiaus ir lieka atviros daugiavalentei sąveikai su leukocitų FcγR receptoriais (34). Susiformavusiems IK sąveikaujant su FcR skatinamas patogenų pašalinimas, antigenų pateikimas ir uždegiminių signalų perdavimas. Tačiau taip pat ši sąveika gali sukelti imunopatologiją ir nuo antikūnų priklausomą infekcijos sustiprėjimą (35,36). SARS-CoV-2 infekcijos atveju tirpūs cirkuliuojantys IgG kompleksai aptinkami maždaug 80 % kritinės būklės pacientų (37).

IgG atpažįstantys FcR skirstomi į aktyvinančius – FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, FcγRIIIb žmoguje, FcγRI, FcγRIII ir FcγRIV pelėse – bei slopinančius – FcγRIIb tiek žmogaus, tiek pelės organizmuose (38). FcR taip pat charakterizuojami pagal afiniškumą. Mažo afiniškumo FcR jungiasi tik su multimeriniais, imuninį kompleksą sudarančiais ir ant opsonizuotų ląstelių esančiais Ig, o didelio afiniškumo FcR gali jungtis ir su monomeriniu Ig. Šis skirstymas būdingas IgG ir IgE receptoriams. Pavyzdžiui, pelių FcγRI pasižymi dideliu afiniškumu IgG2a antikūnams bei FcγRIV – IgG2a ir IgG2b antikūnams, o žmogaus FcγRI gali jungtis su monomeriniu IgG dideliu afiniškumu. Kiti FcγR pasižymi mažu afiniškumu IgG ir gali sąveikauti tik su

multimeriniu IgG IK arba opsonizuotomis ląstelėmis, susidariusiomis infekcijos metu (1.1 ir 1.2 lentelės) (15,39).

1.1 lentelė. Skirtingų klasių pelės IgG sąveika su pelės makrofagų FcγR. Parengta pagal (39).

IgG poklasis	FcγRI (didelio afiniškumo)	FcγRIIb (slopinantis)	FcγRIII	FcγRIV (didelio afiniškumo)
IgG1	–	+++	++	–
IgG2a	++++	++	++	+++
IgG2b	+	+++	++	++++

Sąveikos afiniškumas pateikiamas K_A (M^{-1}) +<10^5, ++<10^6, +++<10^7, ++++≥10^7, – nėra sąveikos.

1.2 lentelė. Skirtingų klasių žmogaus IgG sąveika su žmogaus makrofagų FcγR. Parengta pagal (39).

Ak	FcγRI (didelio afiniškumo)	FcγRIIa	FcγRIIb (slopinantis)	FcγRIIc	FcγRIIIa
IgG1	++++	+++	++	++	++
IgG2	–	++	+	+	+
IgG3	++++	++	++	++	++++
IgG4	++++	++	++	++	++

Sąveikos afiniškumas pateikiamas K_A (M^{-1}) +<10^5, ++<10^6, +++<10^7, ++++<10^8, – nėra sąveikos.

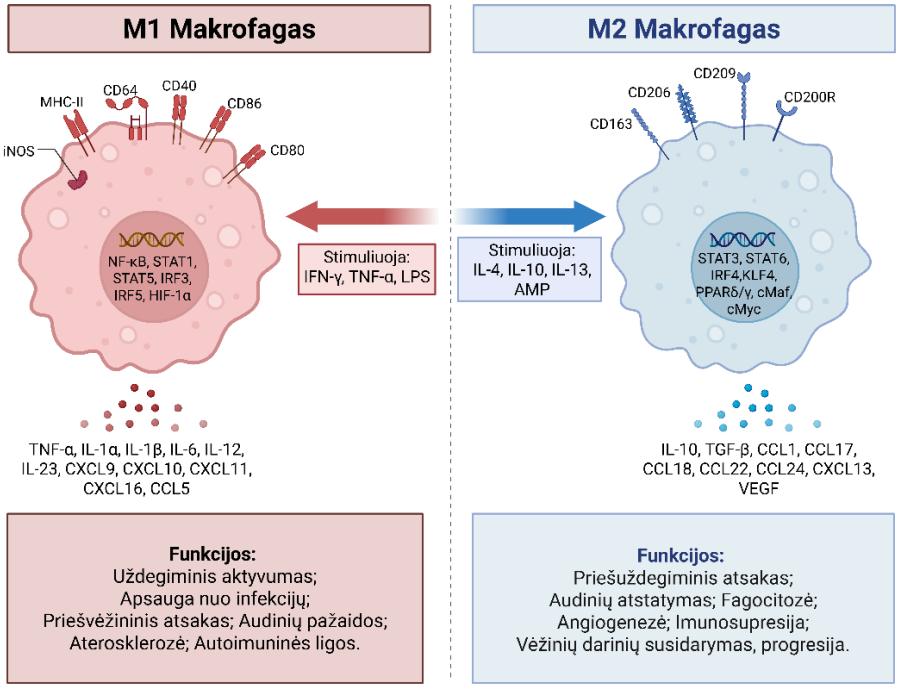
Ląstelių aktyvinimą sukelia FcγR kryžminė sąveika su daugiavalenčiais IK, o ne monomerinio IgG prisijungimas (40). Receptorių susitelkimas sukelia imuninių receptorių tirozino liekanų aktyvinimo motyvų (ITAM) fosforilinimą arba slopinimo motyvų (ITIM) fosforilinimą. ITIM atveju signalas neperduodamas toliau, o fosforilinti ITAM tirozinai pritraukia tolimesnes signalines molekules, blužnies tirozino kinazę (SYK), fosfolipazę Cγ1, fosfatidilinozitolio-3-kinazę ir mitogenų aktyvinamą baltymų kinazę (38). Aktyvinančių ir slopinančių FcγR santykinė pusiausvyra lemia, ar ląstelinis atsakas bus uždegiminis, ar imunomoduliacinis (41).

1.2. Makrofagų savybės

Itin svarbūs įgimtojo imuniteto veikėjai yra fagocituojančios ląstelės – makrofagai, atsakingi už ląstelių nuolaužų, patogenų ir kitų organizmui kenksmingų medžiagų šalinimą (42). Makrofagai yra tankiai išsidėstę visame

organizme ir aptinkami beveik visuose audiniuose, įskaitant centrinę nervų sistemą (CNS). Jie skirstomi į du pagrindinius tipus: audinių makrofagus ir monocitų kilmės makrofagus. Audinių makrofagai yra embrioninės kilmės, atsinaujinantys iš pirmtakų audiniuose, pasižymi aukštesniu aktyvinimo slenksčiu, yra ilgaamžiai ir reziduoja specifinėse nišose. Dėl nišos specifiškumo audinių makrofagai įgyja papildomas, specializuotas nišai funkcijas. Monocitų kilmės makrofagai esant poreikiui į audinius migruoja iš kraujo, pasižymi žemesniu aktyvinimo slenksčiu bei yra trumpaamžiai. Po infekcijos neatsikūrus audinių makrofagų populiacijai, monocitų kilmės makrofagai gali užpildyti audinių makrofagų nišas (1).

Makrofagai yra plastiškos ląstelės, kurių fenotipą ir funkcijas reguliuoja mikroaplinkos signalai, leidžiantys jiems specifiškai reaguoti į aplinkos dirgiklius. Makrofagai reaguodami į mikroaplinkos signalus įgauna skirtingas funkcines būsenas. Iki šiol taikomas klasikinis skirstymas į M1 ir M2 makrofagus. M1 – klasikinio aktyvinimo, uždegiminiai makrofagai ir M2 – alternatyvaus aktyvinimo, priešuždegiminiai makrofagai (1.2 pav.) (43). M1 ir M2 būsenos nėra fiksuotos, makrofagai išlaiko gebėjimą pakeisti tipą reaguodami į aplinkos pokyčius, M1 gali tapti M2 ir atvirkščiai (44). M1 makrofagų poliarizaciją skatina bakterinės kilmės produktai, pavyzdžiui, lipopolisacharidas (LPS) ir uždegiminiai citokinai. M1 makrofagai charakterizuojami pagal uždegiminių reakcijų skatinimą, apsaugą nuo infekcijų, priešvėžinį atsaką, paviršiaus žymenis CD64, CD80, CD86, CD40, MHC II ir uždegiminių citokinų TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23 bei chemokinų CXCL9, CXCL10 sekreciją (45). Sutrikus reguliacijai, ilgalaikė arba pernelyg intensyvi M1 tipo makrofagų veikla lemia audinių pažaidas ir yra siejama su autoimuninėmis ligomis (46). M2 makrofagai laikomi alternatyviai aktyvintais, jie poliarizuojami citokinų, tokių kaip IL-4 ir IL-13, IL-10, TGF-β. M2 tipo makrofagai atsakingi už priešuždegiminį atsaką, audinių remodeliavimą, atstatymą, angiogenezę, uždegimo slopinimą. M2 apibūdinami CD163, CD206, CD200R, CD209 molekulių raiška ir priešuždegiminių veiksnių, pavyzdžiui, IL-10, arginazės ir TGF-β, sekrecija (47). Vyraujant šiems makrofagams, slopinamas imuninis atsakas, skatinama fibrozė ir navikinių darinių vystymasis. Makrofagai gali būti toliau skirstomi į tarpinius potipius, pavyzdžiui M2a, M2b, M2c ir M2d, dalyvaujančius specializuotuose procesuose – žaizdų gijime, audinių atstatyme, angiogenezėje (48). Visgi pritaikant didelio našumo metodus, nustatoma daug didesnė makrofagų tipų įvairovė (49–52). Todėl makrofagų klasifikavimas į M1 ir M2 tipus neatspindi *in vivo* makrofagų, kurie pasižymi plačiu fenotipu ir persidengiančiomis savybėmis.



1.2 pav. Makrofagų tipai ir juos apibūdinančios savybės pagrįstos M1 ir M2 makrofagų klasifikacija. Parengta su *Biorender.com* pagal (47).

1.2.1. Makrofagų funkcijos

Makrofagai *in vivo* atlieka kelias pagrindines funkcijas: imuninę patikrą, pavojingų medžiagų šalinimą (endocitozė, eferocitozė), imuninę reguliaciją (antigeno pateikimą) bei audinių remodeliavimą (53). Savo funkcijoms atlikti makrofagai turi platų spektrą receptorių aplinkos fizikinių parametrų, metabolitų, pažeistų ląstelių ir patogenų atpažinimui (1.3 lentelė). Makrofagai atpažįsta fizikinius aplinkos parametrus tokius kaip pH, temperatūra, osmoliariškumas, hipoksija ir slėgis, metabolitus, įskaitant riebalų rūgštis, užląstelinio matrikso (ECM) komponentus, bei su patogenais susijusias molekulines struktūras (PAMP) ir su ląstelių pažaidomis susijusias molekulines struktūras (DAMP) (2). Šių molekulių atpažinimui pagrindinė grupė receptorių yra struktūras atpažįstantys receptoriai (PRR). Šiai grupei priskiriamos kelios šeimos receptorių, vienos geriausiai ištirtų yra *Toll* tipo receptoriai (TLR), C tipo lektinų receptoriai (CLR), NOD tipo receptoriai (NLR) ir AIM tipo receptoriai (ALR) (54). Taip pat makrofagai yra

profesionalūs fagocitai ir turi opsonizuotus patogenus atpažįstančius FcR ir dar daugelį kitų receptorių. Makrofagai integruoja visus šiuos aplinkos signalus, kad suteiktų specifinius efektorinius atsakus skirtingų audinių nišose homeostazės palaikymui (2).

1.3 lentelė. Pagrindinės makrofagų paviršiaus molekulės. Pagal (55)

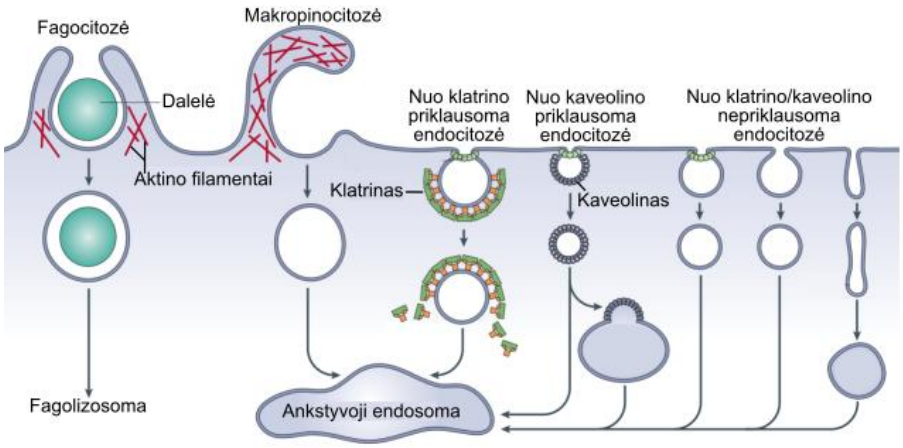
Receptorius / žymuo	Funkcija	Pavyzdžiai
PRR	Aptinka su patogenais ir ląstelių pažaidomis siejamas molekules PAMP ir DAMP, inicijuoja imuninį atsaką.	TLR: TLR1–TLR9 NLR: NLRP3, NLRC4. CLR:Mincle, MGL1, DC-SIGN.
FcR	Jungiasi prie antikūnų Fc dalies, atpažįsta antikūnais opsonizuotą antigeną, inicijuoja fagocitozę.	FcγR; FcαR; FcμR; FcεR.
Komplemento receptoriai	Atpažįsta komplemento baltymais apsuptas daleles, patogenus, inicijuoja fagocitozę.	CR1-CR4, CD59, MCP.
„Nuolaužų“ receptoriai	Atpažįsta bakterinius ir pakitusius savus antigenus.	SR-A1 - SR-A6, SR-B1 - SR-B3.
Citokinų / chemokinų receptoriai	Amplifikuoja makrofagų atsaką priklausomai nuo aplinkoje esančių ligandų.	TNFR, IL-1R, CCR2, CCR5, CX3CR.
MHC II	Antigenų pristatymas T ląstelėms.	HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR.
Kostimuliacinės molekulės	Suteikia kostimuliacijos signalą, reikalingą T ląstelių aktyvinimui.	CD80, CD86.
Adhezinės molekulės	Sąveika su kitomis imuninėmis ir endotelio ląstelėmis, ECM.	β1 integrinai, α1β1, L-selektinas.

1.2.1.1. Endocitozė ir fagocitozė

Užląstelinės aplinkos medžiagas makrofagai įsisavina endocitozės būdu. Endocitozės metu užląstelinėje aplinkoje esančios medžiagos apsupamos plazmine membrana, kuri vėliau ląstelės viduje suformuoja pūslelę.

Apibūdinami du pagrindiniai endocitozės mechanizmai – fagocitozė ir pinocitozė, kuriai priskiriama makropinocitozė (1.3 pav.). Pinocitozė būdinga daugumai eukariotinių ląstelių, jos metu susiformavus membranos įdubai, įsisavinamos iki 0,5 μm dydžio dalelės, maistinės medžiagos, makromolekulės (56). Išskiriama keletas šio proceso mechanizmų – nuo klatrino priklausoma endocitozė, nuo kaveolino priklausoma endocitozė ir nuo klatrino / kaveolino nepriklausoma endocitozė. Iš membranos įdubų susiformavusios pūslelės tampa pirminėmis endocitinėmis pūslelėmis. Makropinocitozės metu citoskeletas formuoja lamelipodijas, kurios apgaubia daug didesnį tūrį ir formuoja makropinosomas (57).

Makrofagai šalina patogenus, vėžines ląsteles ir kitus antigenus fagocitozės būdu. Fagocitozė yra esminis įgimtosios imuninės sistemos gynybos ir audinių regeneravimo mechanizmas (58). Makrofagai atpažįsta įvairius taikinius per opsoninius ir neopsoninius receptorius, ir pajutę dalelę – taikinį, inicijuoja signalinius kelius, kurie skatina fagocitozę. Neopsoniniai receptoriai, kuriems priskiriami PRR, tiesiogiai atpažįsta molekulines struktūras ant dalelės, kurią reikia fagocituoti (59). Opsoniniai receptoriai, tokie kaip FcR ir komplemento receptoriai, aptinka šeimininko kilmės baltymus – opsoninus, prisijungusius prie taikinių. Opsoninai – antikūnai, fibronektinas, komplementas ir manozę surišantis lektinas, žymi daleles kaip fagocitozės taikinius (59). Prisijungdami prie antigeno, fagocitiniai receptoriai inicijuoja signalinius kelius, lemiančius aktino citoskeleto remodeliavimąsi ląstelėje ir lipidų remodeliavimąsi membranoje, todėl membrana ištįsta, kad apgaubtų dalelę. Membranos pailgėjimo metu fagocitiniai receptoriai nuosekliai jungiasi prie taikinio ir padeda užbaigti fagosomos susidarymą. Membranos atšakoms apgaubus antigeną ir susijungus, sukuriama fagosoma su antigenu viduje. Toliau ankstyvoji fagosoma nuosekliai susilieja su endocitinėmis pūslelėmis, virsta vėlyvąja fagosoma, kuri susilieja su lizosomomis ir tampa fagolizosoma. Fagolizosoma pasižymi itin rūgščia aplinka, kurioje antigenai skaidomi veikiant fermentams – katepsinams, proteazėms, lipazėms, veikiami reaktyviomis deguonies formomis (ROS), Cl^- jonais ir kitomis mikrobicidinėmis medžiagomis (60). Sinergiškai su fagocitoze veikia eferocitozė – apoptotinių ląstelių fagocitinis šalinimas, kurį vykdo makrofagai. Apoptotinės ląstelės membranos išorėje pateikia fosfatidilseriną, kurį atpažįsta fagocitai ir inicijuoja eferocitozę. Apoptotinės ląstelės yra apgaubiamos ir susidariusiose fagosomose sunaikinamos (61). Tai svarbus procesas normaliai imuniteto funkcijai palaikyti. Sutrikus eferocitozei, kaupiasi apoptotinės dalelės, prasideda uždegimas ir sukeliamos palankios sąlygos ligų vystymuisi (62).



1. 3 pav. Endocitozės mechanizmų schematinis vaizdas. Pagal (63).

1.2.1.2. Antigeno pateikimas ir kitos makrofagų funkcijos

Po fagocitozės makrofagai apdoroja antigenus, suskaldo juos iki peptidų ir pateikia juos CD4+ T limfocitams. Antigenus pateikiančiųjų ląstelių, tokių kaip makrofagai, fagocituotos egzogeninės medžiagos yra pateikiamos didžiojo audinių dermės komplekso II klasės (MHC II) molekulėse (64). Kartu su MHC II molekule, kurioje pateikiamas antigeno peptidas, makrofagai ląstelės paviršiuje pateikia ir kostimuliacijos signalus, pavyzdžiui, CD86 ar CD80. Kostimuliacinės molekulės jungiasi su T limfocitų receptoriumi CD28 ir sukuria signalą būtiną T ląstelių išlikimui, aktyvinimui ir efektorinių funkcijų vykdymui (65). Aktyvinti CD4+ T limfocitai proliferuoja ir diferencijuojasi į efektorines T ląsteles, kurios išskiria citokinus įgytojo imuniteto ląstelių aktyvinimui (58). Tai glaudžios sąveikos tarp įgimtojo ir įgytojo imuniteto rezultatas, kurį moduliuoja makrofagai. Jie taip pat prisideda prie imuninės reguliacijos, išskirdami citokinus. Citokinų sekrecija veikia kaip pagrindinis komunikacijos mechanizmas tarp įgimtojo ir įgytojo imuniteto (58). Priklausomai nuo makrofago būsenos, sekretuojamos skirtingos molekulės – uždegiminės ar priešuždegiminės. Uždegiminiai citokinai – TNF-α, IL-1β, IL-6 ir IL-12, išskiriami M1 tipo makrofagų inicijuoja imuninį atsaką prieš patogenus, pritraukia kitas imunines ląsteles į infekcijos vietą (66). Išskiriamos priešuždegiminės molekulės – IL-10 ir TGF-β, slopina uždegimą ir atkuria homeostazę (66).

Be tiesiogiai su imuniniu atsaku susijusių funkcijų, makrofagai taip pat koordinuoja pagrindinius fiziologinius procesus, įskaitant kraujagyslių

formavimąsi, adipogenezę, medžiagų apykaitą ir neuronų funkcionavimą (67). Makrofagai sintetina daugybę proteazių, augimo faktorių ir ligandų, kurie skatina audinių organizavimą, ECM skaidymą ir ląstelių sudėtį. Angiogenezės, limfinių kraujagyslių augimo palaikymui gamina angiogeninius augimo veiksnius, tokius kaip VEGF-A ir VEGF-C. Makrofagai taip pat išskiria tirpius mediatorius, kurie skatina vietinių stromos ir pirmtakių ląstelių, dalyvaujančių atstatymo procese, dauginimąsi (2). Šias funkcijas prisitaikę atlikti audinių makrofagai, palaiko homeostazės sąlygas specifinėse nišose, reguliuodami kaimyninių ląstelių medžiagų apykaitą, neuronų funkciją, kraujagyslių vientisumą ir kamieninių ląstelių palaikymą (67).

1.2.2. Mikroglijos savybės ir funkcijos

Audinių makrofagams priskiriami CNS reziduojantys makrofagai – mikroglija. Mikroglijos kilmė skiriasi nuo kitų makrofagų, ji yra kilusi iš trynio maišelio makrofagų pirmtakų, kurie patenka į besivystančio embriono CNS dar nesusiformavus kraujo-smegenų barjerui (68). Mikroglijos populiacijos palaikymas nepriklauso nuo cirkuliuojančių monocitų – dėl nuolatinės proliferacijos ir apoptozės mikroglija geba atsinaujinti (69). Tyrimai rodo, kad sveikų suaugusių pelių smegenyse apie 0,69 % mikroglijos ląstelių bet kuriuo metu yra S fazėje, o populiacija atsinaujina kas ~95 dienas; žmogaus smegenyse šis atsinaujinimas vyksta dar sparčiau, todėl gyvenimo eigoje mikroglijos populiacija gali atsinaujinti daugybę kartų (70). Nepaisant ontogeninių skirtumų mikroglija, kaip ir kiti makrofagai, atlieka audinio imuninę patikrą, yra profesionalūs fagocitai – šalina mikroorganizmus, apoptotines ląsteles, baltymų sankaupas, antigenus, opsonizuotus antikūnais. Ji taip pat sekretuoja uždegimines ir priešuždegimines signalines molekules bei atlieka antigeno pateikimo funkciją (71). Vis dėlto mikroglija atlieka unikalių funkcijų CNS nišoje – palaiko CNS homeostazę, dalyvauja neurogenezėje, sinapsių genėjime. Plačiai pasklidusios visame smegenų audinyje mikroglijos ląstelės aktyviai sąveikauja su neuronais, astrocitais, oligodendrocitais ir endotelinėmis ląstelėmis, palaikydamos smegenų funkcionalumą. Mikroglija yra būtina mielino sluoksnio palaikymui ir atkūrimui kartu su oligodendrocitais (69). Neurogenezės metu mikroglija prisideda prie neuronų tinklo formavimo, kaip pirmosios CNS glijos ląstelės, koordinuoja neuronų migraciją neuronų tinklų formavimosi metu (72). Organizmo vystymosi metu mikroglija šalina nereikalingus neuronus, nesudarančius veiksnių grandinių, ir atlieka sinapsių genėjimą. Šalinamos

sinapsės, nesudarančios aktyvių kontaktų, prisideda prie neuroninio tinklo optimizavimo. Be to, mikroglija reguliuoja ir sinapsių stiprumą ir plastiškumą. Prieš sinapsės pašalinimą mikroglija išskiria uždegiminius citokinus, ROS, azoto oksidą (NO) ir kitus veiksnius, sukeliančius receptorių endocitozę ir sumažinančius sinapsės efektyvumą (73). Šios funkcijos rodo mikroglijos prisitaikymą prie specifinės nišos, tuo pačiu atliekant kitiems audinių makrofagams ir monocitų kilmės makrofagams būdingas funkcijas.

Į CNS patekus įvairiems patogenams, pavyzdžiui, virusams, mikroglija yra pagrindinės imuninį atsaką formuojančios ląstelės (55). Mikroglija, taip pat kaip makrofagai, tam tikromis sąlygomis gali įgyti M1 ir M2 tipą. Reaktyvų, M1 tipo fenotipą mikroglija įgyja neuroužd egiminių sutrikimų – encefalito, Parkinsono ligos, išsėtinės sklerozės, smegenų traumos ir kitais atvejais (74,75). Neuroužd egimas yra fiziologinis atsakas į pavojingas medžiagas ir pagrindinė CNS sutrikimų priežastis. Su neuroužd egimu siejamos Alzhaimerio ligos atveju amiloidas β aktyvina mikrogliją ir skatina NLRP3 susirinkimą (76). Taip pat Parkinsono ligos metu α-sinukleino monomerai ir oligomerai aktyvina mikroglijos NLRP3 inflamasomą (77). Mikroglijos NLRP3 inflamasomos aktyvinimas yra pagrindinis neuroužd egimo patogenezės mechanizmas, dėl kurio vyksta neuronų pažaidos, prarandamos smegenų funkcijos. Tuo pačiu inflamasomos aktyvinimas yra svarbus patogenų ir pažeistų ląstelių šalinimo būdas, kurį mikroglija taiko audinio atstatymui ir neuroprotekcijai (78). Taigi, mikroglijos ląstelės yra tinkamas uždegiminių ligų ir sutrikimų modelis.

Vienas plačiausiai taikomų neuroužd egimo ir imuninio atsako modelių yra pirminė pelės mikroglijos kultūra. Pirminės mikroglijos ląstelės pasižymi visomis audinių makrofagams būdingomis savybėmis, fagocitoze, PRR ir FcγR ir mieloidiniais žymenimis. Taip pat pirminės mikroglijos ląstelių atsakas į patogenus – citokinų ir chemokinų sekrecija, ROS/NO produkcija, aukštas aktyvinimo slenkstis atitinka audinių makrofagų formuojamą atsaką (79). Tačiau šis modelis taip pat pasižymi ontogeniniais skirtumais nuo audinių makrofagų ir tik mikroglijai būdingomis specifinėmis funkcijomis, svarbiomis neuroužd egimo tyrimams (80).

1.2.3. Makrofagai virusinės infekcijos metu

Makrofagai yra vienos iš pirmųjų ląstelių, kurios aptinka virusinę infekciją, fagocituoja patogenus, pateikia antigenus, pritraukia kitas imunines ląsteles ir lemia perėjimą nuo uždegimo prie gijimo (81). Makrofagų atsakas į infekciją vyksta etapais – pirmiausia atpažįstami patogenai PRR ar Fc

receptoriais. Tuomet inicijuojami signaliniai keliai, lemiantys makrofagų aktyvinimą ir efektorines funkcijas. Po atpažinimo patogenas endocitozės būdu patenka į ląstelės endosomas, kuriose degraduojamas makrofagų išskiriamais fermentais, ROS ir NO, o patogeno antigenai pateikiami ląstelės paviršiuje kitų ląstelių – T limfocitų aktyvinimui. Tuo pačiu metu makrofagai aktyvina aplinkines ląsteles ir pritraukia kitas imunines ląsteles į infekcijos židinį, sekretuodami citokinus. Tačiau atsaką lemianti makrofagų poliarizacija link M1 ar M2 tipo gali priklausyti nuo viruso tipo. M1 tipo makrofagai paprastai išskiria priešvirusinius citokinus ir riboja replikaciją infekcijos pradžioje, o M2 tipo makrofagai paprastai slopina uždegimą, skatina audinių atsinaujinimą ir padeda sustabdyti pažeidimus (46). Kai kurie virusai keičia makrofagų poliarizaciją ir blokuoja antivirusinių fenotipų įgijimą (82). Hepatito C virusas skatina IL-10 sekreciją makrofaguose, o *Herpesviridae* šeimos virusai genome koduoja IL-10 ortologą, kuris skatina makrofagų poliarizaciją M2 kryptimi (83,84). Monocitai ir makrofagai taip pat gali veikti kaip infekcijos platintojai ir rezervuarai. Audinių makrofagai ir monocitai yra aprašyti kaip žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) rezervuarai (85).

Virusinės infekcijos metu susidarantys virusiniai IK taip pat daro įtaką makrofagų atsakui. Antikūnais padengti virusiniai antigenai pagerina virusų endocitozę bei keičia makrofagų poliarizaciją ir skatina uždegiminį atsaką per FcγR (11). Pavyzdžiui, IgG antikūnai ir virusiniai IK yra siejami su sunkia SARS-CoV-2 infekcijos forma dėl makrofagų sukeliamo uždegimo (16). Šis aktyvinimas gali būti siejamas su kitame tyrime aprašytu NF-κB ir NLRP3 inflamasomos aktyvinimu, po kurio išsiskiria uždegiminiai mediatoriai IL-1β, TNF-α (10). Be SARS-CoV-2, virusinių IK sukeliamas makrofagų aktyvinimas stebimas dengės karštligės, SARS-CoV, adenoviruso infekcijų atvejais. SARS-CoV infekcijos metu susidarę IgG prieš viruso baltymus sukelia stiprias plaučių pažaidas (17). Pelėse adenovirusų IK siejami su NLRP3 inflamasomos ir I tipo interferono aktyvinimo keliais (86). Pakartotinė dengės karštligės infekcija dėl susidariusių IK sąveikos su įgimtojo imuniteto ląstelėmis siejama su sunkesnės ligos rizika (87). Šie tyrimai atskleidžia FcγR ir IK sąveikos svarbą makrofagų atsakui virusinės infekcijos metu.

1.2.4. Makrofagų sekretuojami citokinai ir chemokinai

Makrofagai yra vienas iš pagrindinių citokinų ir chemokinų sekrecijos šaltinių (58). Citokinai ir chemokinai yra mažos molekulinės 6–70 kDa dydžio baltymai, kurie koordinuoja įvairius procesus (88). Citokinai yra būtini

makrofagų funkcijoms atlikti, imuninio atsako formavimui, tarpininkavimui tarp įgytojo ir įgimtojo imuniteto komponentų ir mikroaplinkos formavimui. Chemokinai sukelia chemotaksį, t. y. kryptingą ląstelių migracija į uždegimo vietą (58).

Citokinai pagal atliekamas funkcijas yra skirstomi į uždegiminius ir priešuždegiminius. Kiekvienas iš jų jungiasi prie konkretaus ląstelių paviršiaus receptoriaus ir sukelia ląstelės signalinių kelių kaskadą, nulemiančią ląstelės atsaką (58). Dauguma citokinų turi trumpą gyvavimo pusperiodį ir veikia lokaliai autokrininiu ir parakrininiu būdu (artimoje aplinkoje esančias arba juos sekretuojančias ląsteles) (89). Imuninio atsako metu, kuomet reikia pašalinti patogenus, makrofagai išskiria uždegiminius citokinus TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 ir IL-23 (1.4 lentelė). Vienas pirmųjų citokinų išskiriamų formuojantis atsakui prieš patogenus yra TNF-α. Tai stiprų poveikį turintis pirogeninis citokinas, pritraukiantis limfocitus, neutrofilus, monocitus į uždegimo vietą bei skatinantis kitų citokinų ir chemokinų sekreciją. Taip pat TNF-α skatina ūmios fazės baltymų, pavyzdžiui C reaktyvaus baltymo, sintezę kepenyse ir yra vienas iš pagrindinių citokinų, lemiančių septinį šoką (58). Kitas ankstyvoje infekcijos stadijoje sekretuojamas pirogeninis citokinas yra IL-1β. Šis citokinas dažniausiai sekretuojamas po inflamasomos aktyvinimo makrofaguose, pritraukia granuliocitus į uždegimo vietą ir skatina CD4+ T limfocitų aktyvinimą bei didina už jo gamybą atsakingų genų raišką (90). Kuomet reikia slopinti uždegimines reakcijas, regeneruoti audinius, makrofagai išskiria priešuždegiminius citokinus, tokius kaip IL-10, TGF-β (1.4 lentelė) (58).

Chemokinai – tai signalinių baltymų šeima, kuri yra būtina koordinuojant imuninių ląstelių migraciją, aktyvinimą ir tarpląstelinę komunikaciją (91). Chemokinai skatina chemotaksį pagal chemokino koncentracijos gradientą ir tokiu būdu užtikrina imuninių ląstelių nukreipimą į infekcijos, audinių pažeidimo ar uždegimo vietas. Be chemotaksio, chemokinai dalyvauja angiogenezėje, audinių regeneracijoje bei imuninės sistemos reguliacijoje, priklausomai nuo konkretaus baltymo funkcijos (1.4 lentelė) (92).

1.4 lentelė. Pagrindiniai makrofagų sekretuojami citokinai ir chemokinai. Pagal (93,94).

Citokinas / chemokinas	Funkcija
Uždegiminiai	
TNF-α	Endotelio ląstelių ir leukocitų aktyvinimas, skatina uždegiminių citokinų sekreciją, ūmios fazės baltymų sintezę.
IL-1β	Endotelio ląstelių ir leukocitų aktyvinimas, skatina uždegiminių citokinų sekreciją, ūmios fazės baltymų sintezę, granuliocitų pritraukimas į uždegimo vietą.
IL-6	Skatina B ląstelių proliferaciją, CD8+ T limfocitų aktyvinimą ir antikūnų bei ūmios fazės baltymų sintezę.
IL-8	Neutrofilų pritraukimas, angiogenezės skatinimas.
IL-12	Ląstelinio imuniteto aktyvinimas – CD8+ T ląstelių, NK ląstelių ir Th1 aktyvinimas.
IL-23	Aktyvina T limfocitus (Th17), NK ląsteles ir makrofagus su dendritinėmis ląstelėmis, skatina IL-17 sekreciją.
CXCL1	Neutrofilų ir makrofagų pritraukimas į infekcijos vietą, skatina IL-1β sekreciją.
CXCL2	Neutrofilų pritraukimas į infekcijos vietą, skatina IL-1β sekreciją.
CXCL9	T limfocitų ir NK ląstelių pritraukimas.
CXCL10	T limfocitų, NK ir dendritinių ląstelių pritraukimas.
CXCL16	NK ląstelių pritraukimas į infekcijos vietą.
CCL8	Pritraukia T limfocitus ir makrofagus.
Priešuždegiminiai	
IL-10	Slopina uždegiminių citokinų sekreciją, MHC II ir kostimuliacinių molekulių raišką.
TGF-β	Slopina aktyvintus T limfocitus, jų diferenciaciją.

Chemokinai struktūriškai klasifikuojami pagal konservatyvių cisteino liekanų išsidėstymą į keturias šeimas: CX_3C (tarp pirmų dviejų cisteinų įsiterpusios trys aminorūgštys), XC (neturintys pirmojo ir trečiojo cisteinų), CC (gretimos cisteino liekanos) ir CXC (tarp pirmųjų dviejų cisteinų įsiterpusi viena aminorūgštis). Didžioji dalis chemokinų priklauso CC ir CXC šeimoms (95). CXCL1, CXCL2 ir CXCL9 yra vieni reikšmingiausių CXC šeimos chemokinų. Makrofagai juos sintetina reaguodami į uždegiminius dirgiklius,

tokius kaip TNF-α, IL-1β ar bakteriniai produktai, pavyzdžiui, LPS (96). Šie chemokinai dalyvauja imuninio atsako procesuose, pritraukia neutrofilus bei kitus granulocitus į pažeidimo ar infekcijos vietą (97). Be to, CXCL1 ir CXCL2 yra glaudžiai susiję su NLRP3 inflamasomos aktyvinimu (98). Tuo tarpu CXCL9 pritraukia aktyvintas T ląsteles ir skatina jų kaupimąsi uždegimo vietose (99). Vienas iš makrofagų sekretuojamų CC šeimos chemokinų yra CCL8, atsakingas už monocitų ir limfocitų pritraukimą į uždegimo ar infekcijos vietas (95). Visi šie chemokinai yra svarbūs imuninių ląstelių migracijos reguliatoriai, prisidedantys prie organizmo apsaugos nuo patogenų bei audinių homeostazės palaikymo.

Citokinai ir chemokinai yra esminiai ląstelinio atsako tyrimuose, nes jie koordinuoja imuninių ląstelių telkimą, aktyvinimą ir reguliavimą įvairiomis fiziologinėmis bei patologinėmis sąlygomis. Žinios apie jų vaidmenis ir sąveikas leidžia atskleisti mechanizmus, kuriais grindžiamas imuninis atsakas ir uždegimas.

1.3. Inflamasoma

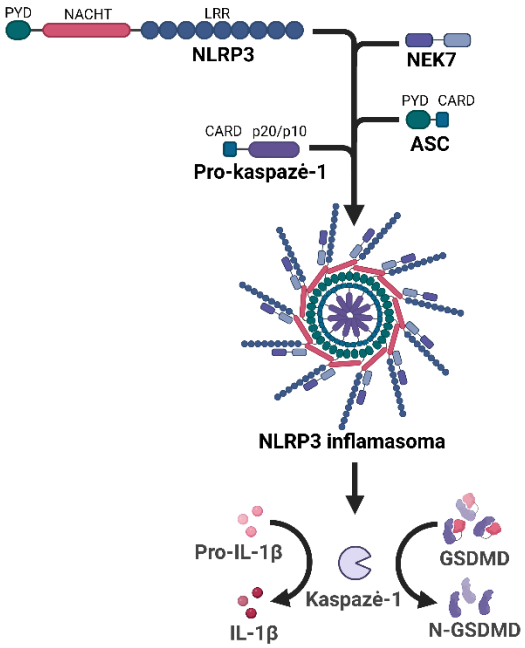
Itin svarbi mikroglijos ir viso įgimtojo imuniteto gynybos sudėtinė dalis yra inflamasoma – daugiabaltyminis citozolinis kompleksas, atsakingas už uždegiminį atsaką į „pavojaus“ signalą, pavyzdžiui, patogenus ar ląstelės stresą (100). Yra identifikuota keletas inflamasomų tipų, pavadintų pagal jas sudarančius receptorius. Didžioji dalis inflamasomų formuojasi PRR priklausančių NLR ir AIM receptorių pagrindu, pavyzdžiui, NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2. Priklausomai nuo receptoriaus tipo, kiekvienos inflamasomos susirinkimą skatina skirtingi ligandai. Bakteriniai toksinai ir peptidai aktyvina NLRP1, gramneigiamų bakterijų sekrecijos sistemos aktyvina NLRC4, dvigrandė DNR aktyvina AIM2, PAMP, DAMP ar ląstelės homeostazės trikdžiai aktyvina NLRP3 (3). Viena geriausiai ištirtų yra NLRP3 inflamasoma. NLRP3 inflamasoma išsiskiria itin plačiu spektru aktyviklių, nes inflamasomos susirinkimą aktyvina ne tik įvairūs PAMP ir DAMP kaip įprastus PRR, bet ir aplinkos pokyčiai, metaboliniai produktai (101). NLRP3 inflamasomos baltymai yra sintetinami monocituose, neutrofiluose, makrofaguose ir epitelinėse ląstelėse, tačiau makrofagai yra pagrindinės ląstelės, kuriose vyksta NLRP3 inflamasomos aktyvinimas įvairių infekcijų ir patologijų atvejais (102).

1.3.1. NLRP3 inflamasomos sandara

NLRP3 inflamasomą sudaro trys pagrindinės dalys: NLRP3 receptorius, adaptorinis baltymas ASC (angl. *appoptosis associated speck-like protein containing CARD*) ir efektorius – kaspazė-1. NLRP3 receptorius yra 118 kDa molekulinės masės citozolinis baltymas, kuris sintetinamas daugelyje imuninės sistemos ląstelių – neutrofiluose, makrofaguose, mikroglijoje, limfocituose, osteoblastuose, dendritinėse ir epitelinėse ląstelėse (6). NLRP3 sudaro keli domenai: N-gale pirino domenas (PYD), centrinis NACHT domenas bei C-gale LRR domenas. NACHT domenas turi ATP prisijungimo sritis, kurios svarbios NLRP3 oligomerizacijai ir funkcijai, o LRR domenas atlieka autoinhibicijos funkciją – per homodimerines jungtis palaiko neaktyvią baltymo formą. Neaktyvios stadijos NLRP3 sudaro dekamerinę (žmogaus) arba dodekamerinę (pelės) žiedinę narvo pavidalo struktūrą. Aktyvinimo metu prie LRR domenų jungiasi ir neaktyvaus NLRP3 narvo struktūrą suardo NEK7 kinazė (103). Kita svarbi inflamasomos sudedamoji dalis – adaptorinis baltymas ASC sudarytas iš dviejų domenų: N-gale PYD ir C-gale CARD, kurie sąveikauja su atitinkamais NLRP3 ir kaspazės-1 domenais. Efektorinė inflamasomos dalis – kaspazė-1 taip pat turi CARD domeną N-gale jungtuku atskirtą nuo katalitinio domeno, sudaryto iš didžiojo (p20) ir tarpdomeniniu jungtuku atskirto mažojo (p10) subvieneto C-gale (5).

Visų trijų inflamasomos dalių susirinkimas vyksta, kai aktyvintas NLRP3 oligomerizuojasi, elektrostatiniais ryšiais prisijungia NEK7 kinazė, vyksta NACHT domenų nuo ATP priklausoma savaiminė oligomerizacija ir pradeda sąveikauti PYD domenai pritraukiantys ASC (1.4 pav.). Susiformavęs NLRP3 oligomeras jungiasi su ASC, per homotipinę PYD domenų sąveiką. Jungdamiesi ASC baltymai formuoja filamentus ir sutelkia ASC C-galinius CARD domenus, kurie veikia kaip platforma prokaspazės-1 prisijungimui. Tokiu būdu ASC suformuoja filamentines, makromolekulines iki 1 μM dydžio struktūras, vadinamas ASC dalelėmis (angl. *ASC speck*) (5). Prie ASC filamentinės platformos prisijungusios prokaspazės-1 molekulės dimerizuojasi, vyksta autoproteolitinis skilimas ir susidaro aktyvi kaspazės-1 fermento forma. Šio proceso metu yra suskaidomas tarpdomeninis jungtukas tarp p20 ir p10 subvienetų, todėl susidaro p10 subvienetas bei iš CARD ir p20 sudaryta p33 molekulė. Kompleksą sudarantys p10 ir p33 fragmentai susijungę su ASC, pasižymi proteolitiniu aktyvumu (104). Aktyvi kaspazė-1 proteolitiškai skelia uždegiminių citokinų pirmtakus pro-IL-1β ir pro-IL-18, paversdama juos aktyviomis uždegiminėmis citokinų formomis ir aktyvina gasderminą D (GSDMD), atskeliant C-galinį fragmentą. Susidaręs N-galo

GSDMD yra pagrindinis uždegiminės ląstelių žūties – piroptozės iniciatorius (5).



1.4 pav. NLRP3 inflamasomos sandara. Sukurta su *Biorender.com* pagal (5).

1.3.2. NLRP3 inflamasomos aktyvinimas

NLRP3 inflamasomos susirinkimas yra svarbus imuninis procesas, kurio metu dėl aktyvios kaspazės-1 subręsta uždegiminiai citokinai IL-1β ir IL-18 (1.5 pav.). Be to, inicijuojama piroptozė, kuomet kaspazės-1 atskeltas GSDMD N-galo domenas sąveikauja su vidinėje plazminės membranos pusėje esančiais fosfolipidais, oligomerizuojasi ir suformuoja poras membranoje. Pro šias poras į ląstelės vidų patenka užląstelinės medžiagos, ląstelė išbrinksta ir galiausiai pratrūksta. Pro GSDMD poras membranoje ir trūkus ląstelei į tarpląstelinę erdvę išsiskiria IL-1β, IL-18, DAMP ir PAMP molekulės, kurios aktyvina gretimas ląsteles (5).

Kadangi inflamasomos aktyvinimas inicijuoja stiprią uždegiminę reakciją, ląstelėse palaikoma tiksli proceso reguliacija ir aukštas aktyvinimo slenkstis. Išskiriami du NLRP3 inflamasomos aktyvinimo tipai – kanoninis ir nekanoninis. Nekanoninis aktyvinimas vyksta be iniciacijos etapo, kuomet viduląstelinis gramneigiamų bakterijų LPS aktyvina kaspazę-4 / kaspazę-5

(žmoguje) arba kaspazę-11 (pelėje). Aktyvintos kaspazės oligomerizuojasi, pasižymi katalitiniu aktyvumu, atskelia poras formuojantį GSDMD N-galo domeną ir nulemia tiesioginį NLRP3 inflamasomos susirinkimą (105).

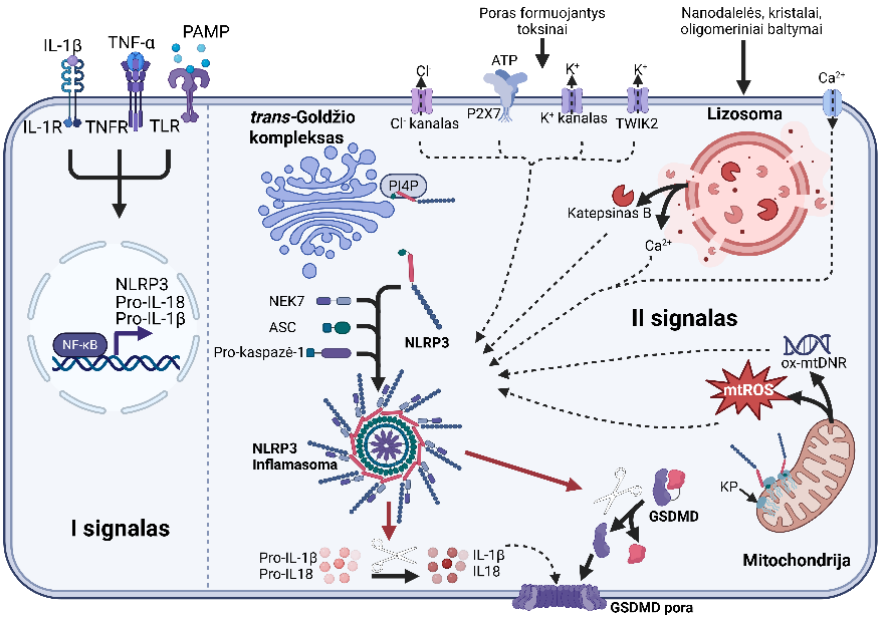
Kanoninis NLRP3 inflamasomos aktyvinimas yra dviejų etapų procesas. Pirmasis etapas – pirminis iniciacijos signalas, antrasis – aktyvinantis signalas (1.5 pav.). Pirminį signalą sukelia PRR receptorių, pavyzdžiui, TLR, aktyvinimas. Iniciacijos etapo esmė yra transkripcijos veiksnio NF-κB aktyvinimas, kuris lemia inflamasomos susirinkimui reikalingų baltymų, pavyzdžiui, NLRP3 ir citokinų pirmtakų, pavyzdžiui, pro-IL-1β, genų raiškos padidėjimą. Kadangi ramybės sąlygomis šių genų raiška maža, pirminis signalas yra būtinas, kad inflamasoma galėtų susiformuoti ir susidarytų kaspazės-1 substratai (106). PRR aktyvinimas taip pat lemia TNF-α koncentracijos padidėjimą, kas palaiko NF-κB aktyvinimą ir skatina tikslinių genų transkripciją (107). Po iniciacijos signalo ląstelėje susintetinti NLRP3 baltymai sudaro neaktyvią žiedinę narvo struktūrą, kuri lokalizuojama ant įvairių membraninių organelių (103).

Pirminis signalas paruošia NLRP3 receptorių tolimesniam aktyvinimui, kurį gali sukelti įvairūs endogeninės ar egzogeninės kilmės veiksniai. Šių dirgiklių sukeltas antrinis stimulas inicijuoja inflamasomos komponentų sąveiką ir komplekso susidarymą (108). Antrąjį aktyvinimo signalą gali sukelti įvairūs struktūriškai skirtingi veiksniai, todėl manytina, kad šis etapas nesusijęs su tiesiogine NLRP3 sąveika su ligandais. Teigiama, kad inflamasomos susirinkimą inicijuoja ląstelės homeostazės pokyčiai, nulemti aktyviklių. Tarp bendrų aktyvinimo mechanizmų nurodomas jonų koncentracijos pokyčiai, mitochondrijų pažaidos, lizosomų pažeidimai bei trans-Goldžio fragmentacija (1.5 pav.) (109–111).

Vienas universaliausių mechanizmų yra viduląstelinės K^+ koncentracijos sumažėjimas, kuris vyksta veikiant įvairiais NLRP3 aktyvikliais, pavyzdžiui, bakteriniu jonoforu nigericinu (6). Kitas klasikinis NLRP3 aktyviklis – mononatrio urato kristalai, patekę į lizosomas sukelia Na^+ kiekio padidėjimą, tuomet ląstelės išbrinkimą dėl vandens įtekėjimo ir K^+ koncentracijos sumažėjimą, kuris aktyvina NLRP3 (112). Plačiai aprašytas aktyviklis – ATP – per P2X7 kanalą sukelia Ca^{2+} ir Na^+ jonų įtekėjimą į ląstelę. Šis katijonų srautas pakeičia membranos potencialą taip, kad jis tampa palankus K^+ jonų ištekėjimui per TWIK2 kanalą (113). Su NLRP3 aktyvinimu siejami Na^+ ir Cl^- jonų koncentracijų pokyčiai. Na^+ kiekio padidėjimas lemia K^+ sumažėjimą, o Cl^- ištekėjimas skatina NLRP3-NEK7 sąveiką. Taip pat K^+ koncentracijos įtaka grindžiama sukeliamais NLRP3 konformacijos pokyčiais. Bendrai jonų koncentracijos pokyčiai, dėl jonų atpalaidavimo iš endoplazminio tinklo ar

lizosomų, skatina NLRP3 konformacinius pokyčius ir skatina mitochondrijų pažaidas (112).

Mitochondrijų pažeidimo metu į citozolį patenka mitochondrinė DNR (mtDNR) bei ROS. Abu šie junginiai apibūdinami kaip svarbūs veikėjai NLRP3 aktyvinime (6). Nuo ROS priklausomas NLRP3 aktyvinimas aiškinamas NEK7 gebėjimu reaguoti į padidėjusią ROS koncentraciją (114), o dėl mitochondrijų pažaidų citozolyje esanti oksiduota mtDNR sąveikauja su NLRP3 ir skatina aktyvinimą (109). Be to, pažeistų mitochondrijų baltymai ir lipidai (mitofuzinas 2, mitochondrinis antivirusinis signalinis baltymas (MAVS) bei kardiolipinas) tiesiogiai dalyvauja inflamasomos susirinkime. Virusinių infekcijų metu MAVS sąveikauja su NLRP3 ir ASC, palengvina ASC oligomerizaciją ir inflamasomos aktyvinimą (108). Mitofuzinas 2 ir kardiolipinas taip pat tiesiogiai sąveikauja su NLRP3 (112,115). Analogišką funkciją gali atlikti ir fragmentuotas trans-Goldžio kompleksas: jo paviršiuje esantis fosfatidilinozitolio-4-fosfatas jungiasi su NLRP3 molekulėmis ir sudaro platformą inflamasomos susirinkimui (110).



1.5 pav. Inflamasomos aktyvinimo schema. PI4P – fosfatidilinozitolio-4-fosfatas, KP – kardiolipinas, ox-mtDNR – oksiduota mitochondrijų DNR. Sukurta *Biorender.com*

Įvairios dalelės – mononatrio uratas, amiloidas β, aliuminio druskos, asbestas, oligomeriniai baltymai sukelia lizosomų pažaidas (112). Lizosomų

pažaidos yra vienas esminių NLRP3 aktyvinimo būdų. Pažeidus lizosomas citozolyje padidėja Na^+ ir Ca^{2+} koncentracija, kinta pH, o tai lemia NLRP3 susirinkimą (111). Be to, lizosomoms pratrūkus, į citozolį patenka lizosomų proteazės, katepsinai. Katepsinas B ir kiti katepsinų šeimos baltymai aktyvina NLRP3 inflamasomą. Šis mechanizmas būdingas virusinių baltymų, cholesterolio kristalų sukeliamam uždegiminiam atsakui (116,117). Taip pat adenoviruso, gripo A viruso infekcijų atvejais stebimas nuo katepsino B priklausomas inflamasomos aktyvinimas (118,119).

Apibendrinant, vieningo mechanistinio modelio, kuris iki galo paaiškintų NLRP3 inflamasomos aktyvinimo principus, šiuo metu nėra. Eksperimentiškai nė vienas modelis išsamiai nepaaiškina NLRP3 aktyvinimo mechanizmo, nes šiuos procesus sukelia įvairūs dirgikliai, inicijuojantys persidengiančius signalų perdavimo kelius.

1.3.3. NLRP3 inflamasomos vaidmuo virusinių infekcijų metu

Priešvirusinio organizmo atsako metu PRR, tokie kaip TLR, pirmieji sąveikauja su virusais, jų komponentais arba signalinėmis molekulėmis pranešančiomis apie infekciją. Prie PRR prisijungus ligandui, sukuriamas pirminis aktyvinimo signalas, dažniausiai per NF-κB signalinius kelius, aktyvinama NLRP3 inflamasomos komponentų raiška bei padidėja uždegiminių citokinų, tokių kaip TNF-α ir IL-6, gamybą (120). SARS-CoV-2 spyglio baltymas aktyvina NF-κB ir inicijuoja signalinius kelius nulemiančius NLRP3 aktyvinimą ir uždegiminių citokinų sekreciją (7). Enterovirusas 71 aktyvina NLRP3 inflamasomą per vimentino aktyvinamą ERK kinazę, kuri inicijuoja NF-κB signalinio kelio aktyvinimą (8). Antrinis inflamasomos aktyvinimo signalas priklauso nuo viruso tipo. Pastaruųjų metų tyrimai atskleidė, kad virusiniai baltymai gali tiesiogiai sąveikauti su NLRP3. SARS-CoV-2 N baltymas tiesiogiai jungiasi su NLRP3, skatina jo sąveiką su ASC ir palengvina inflamasomos komplekso susirinkimą (4). Virusai taip pat gali ne tiesiogiai aktyvinti NLRP3, o per sukeltą ląstelės homeostazės disbalansą. Pavyzdžiui, adenovirusai ir gripo A virusas skatina ROS susidarymą bei sukelia lizosomų pažeidimus, kurių metu išlaisvinamas katepsinas B – NLRP3 aktyviklis (118,119). Gripo A virusas, SARS-CoV virusas ir kiti išskiria viroporinus, kurie jungiasi prie ląstelės membranos ir sukelia jonų disbalansą (121). Hepatito C virusas sukelia kalio jonų koncentracijos sumažėjimą, o žmogaus rinoviruso 2B baltymas sutrikdo kalcio jonų homeostazę, sukeldamas jonų ištekėjimą iš Goldžio komplekso ir endoplazminio tinklo į citozolį (122). Dideliu guanino ir uracilo kiekiu

pasižyminčios viengrandės SARS-CoV-2, SARS-CoV ir ŽIV RNR sukelia nuo kaspazės-1, kaspazės-8 ir NLRP3 priklausomą IL-1β sekreciją (123). Be to, *Herpes simplex* (HSV-1) virusas gali aktyvinti NLRP3 ir sukelti IL-1β sekreciją makrofaguose nekanoniniu būdu (124). Visgi inflamasomos aktyvinimas nėra palankus procesas virusams, todėl kai kurie virusai išvystė strategijas NLRP3 slopinimui. Pavyzdžiui, tymų viruso V baltymas slopina NLRP3 oligomerizaciją (125), o *Epstein–Barr* virusas sintetina miR-BART15, kuri slopina *NLRP3* raišką (126). Hepatito B virusas (HBV) sintetina antigeną e (HBeAg), kuris slopina NF-κB fosforilinimą ir inflamasomos aktyvinimą sukeliančią ROS gamybą (127).

NLRP3 sukeliama stipri uždegiminė reakcija virusinės infekcijos metu siejama su ligos patologija. Gripo A virusu infekuotoms pelėms ilgalaikis IFN-I koncentracijos padidėjimas ir NLRP3 inflamasomos aktyvinimas lemia sunkias plaučių pažaidas (128), o ŽIV infekcijos metu mikroglijoje stebimas nuo NLRP3 inflamasomos priklausomas neurouždegimas (129). Taip pat stiprus uždegiminis atsakas, apibūdinamas NLRP3 aktyvinimu ir uždegiminių citokinų, tokių kaip IL-1β ir TNF-α, raiška skatina sunkaus plaučių pažeidimo ir ūminio respiracinio sindromo vystymąsi sunkios SARS-CoV-2 infekcijos atvejais (130). Žinoma, kad virusinių infekcijų metu susidarantys IK gali prisidėti ar sustiprinti organizmo uždegiminį atsaką. Keletas tyrimų pateikia aiškias sąsajas tarp IK susidarymo ir NLRP3 inflamasomos aktyvinimo (10,11). Be to, tai galėtų paaiškinti dengės karštligės, SARS-CoV, ŽIV infekcijų atvejais IK sukeliamą stiprų uždegimą ir citokinų audrą (16,17,87). Siekiant sumažinti audinių žalos riziką, kuri kyla dėl stipraus virusinio uždegimo, naudojami NLRP3 slopikliai. Visų pirma plačiausiai tiriamas slopiklis MCC950 – specifinis NLRP3 inhibitorius, efektyvus *in vitro* bei gyvūnų modeliuose, tačiau klinikinėje praktikoje pastebėtas toksiškumas kepenims (131). Vieninteliu klinikinėje praktikoje naudojamu slopikliu alergijų gydymui nurodomas *Tranilast*. Jis veikia NLRP3 per NACHT domeną, užkertant kelią jo oligomerizacijai ir inflamasomos surinkimui (132).

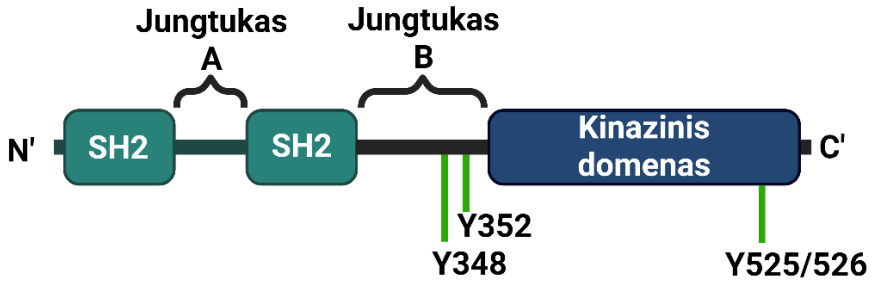
1.4. SYK kinazė

Prie imuninių receptorių prisijungus ligandams, pavyzdžiui prie FcγR prisijungus IK, aktyvinami signalinių kelių komponentai, tarp jų – tirozino kinazės. Viena svarbiausių ir NLRP3 inflamasomos aktyvinimo kontekste minima yra SYK kinazė. Tai 72 kDa dydžio nereceptorinė tirozino kinazė, priklausanti SYK kinazių šeimai, kuriai taip pat priklauso žinduoliams

būdinga baltymų kinazė ZAP-70 (133). SYK šeimos kinazės paprastai yra citozoliniai baltymai, kurių raiška pasižymi hematopoetinės kilmės ląstelės bei aptinkama endotelio ląstelėse, neuronuose, fibroblastuose. ZAP-70 raiška vykdoma T limfocituose ir NK ląstelėse (14).

1.4.1. SYK kinazės struktūra

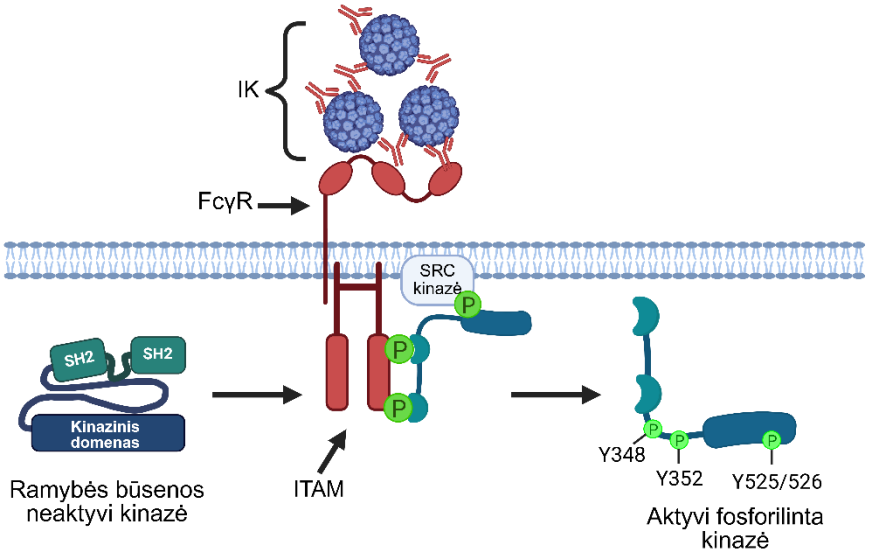
SYK yra labai konservatyvus baltymas. Homologiški tokios pat ar panašios struktūros baltymai aptinkami daugelyje rūšių – žmonių, pelių, kiaulių ir net vaisinių muselių ląstelėse (14). Pelės SYK yra šešiomis aminorūgštimis trumpesnė, bet turi tokią pat domeninę sandarą kaip žmogaus SYK, o bendra sekų homologija siekia apie 92 % (134). SYK yra sudaryta iš dviejų SH2 (angl. *SRC homology 2*) domenų N-gale ir katalitinio kinazės domeno C-gale sujungtų jungtukais A ir B (1.6 pav.). Neaktyvios / autoinhibicinės stadijos SYK įgauna kompaktišką „sumuštinio“ formą, kuomet jungtukas B priartėja prie jungtuko A ir katalitinio domeno. Neaktyvios SYK konformacijos palaikymą lemia vidumolekuliniai vandeniliniai ryšiai tarp jungtukų A, B ir katalitinio domeno, kurie fiksuoja baltymą uždaroje būsenoje (135). Tokios formos nefosforilinta SYK nepasižymi kinaziniu aktyvumu. Kinazė aktyvinimui turi fosforilinimo sritis, kurių daugiausiai susikaupę jungtuko B dalyje, pagrindiniai fosforilinami tirozinai padėtyse Y348 ir Y352, o katalitinį aktyvinimą užtikrina katalitiniame domene esančios fosforilinimo sritys – aktyvinimo kilpa su Y525/526 tirozino liekanomis (136).



1.6 pav. SYK kinazės struktūros schematinis vaizdas. Sukurta *Biorender.com* remiantis (136).

1.4.2. SYK kinazės aktyvinimas

Svarbus SYK aktyvinimo etapas yra kinazės prisijungimas prie fosforilintų imuninių receptorių tirozininių aktyvinimo motyvų (ITAM). Šie motyvai randami su klasikiniais imuninių ląstelių receptoriais – FcR, B ląstelių receptoriais (BCR), T ląstelių receptoriais (TCR) asocijuotų membraninių baltymų sudėtyje. Taip pat kai kurie receptoriai, pavyzdžiui, FcγRIIA, savo struktūros viduląstelinėje dalyje turi ITAM, o CLR receptoriai gali turėti vieno tirozino, vadinamus pusiniu, ITAM (14). ITAM yra konservatyvus domenas, dažniausiai sudarytas iš dviejų tiksliai išdėstytų tirozino liekanų, supančių specifinę SYK SH2 domenų jungimosi vietą (133). Ligandui prisijungus prie receptoriaus, ITAM tirozinus fosforilina SRC šeimos tirozino kinazės. FcR ir BCR dvi fosforilintos ITAM motyvo tirozinų liekanos jungiasi su SYK kinazės SH2 domenais (1.7 pav.) (14). Tai lemia konformacinį SYK pokytį – SYK įgyja atvirą konformaciją, atsilaisvina katalizinis domenas, jungtuko srityje esanti Y352 liekana tampa prieinama SRC kinazių fosforilinimui. Tuomet vyksta aktyvinimo kilpoje esančių Y525/526 fosforilinimas lemiantis pilną SYK aktyvinimą (136).



1.7 pav. SYK aktyvinimo schema. Sukurta *Biorender.com* pagal (136).

Priklausomai nuo fosforilintų tirozinų padėties aktyvinta SYK kinazė sąveikauja su skirtingais baltymais. CLR receptorių aktyvinta SYK fosforilina baltymų kinazę Cδ, kurios tolimesni signalo perdavimo keliai lemia NF-κB

aktyvinimą ir imuninio atsako prieš grybelinę infekciją susiformavimą (137). Kitos SYK fosforilinamos molekulės – Vav šeimos baltymai, fosfolipazė Cγ, dalyvauja FcγR inicijuojamoje fagocitozėje, reguliuoja kalcio jonų pasiskirstymą ir aktino citoskeletą (14). BCR aktyvinimo metu SYK fosforilinama fosfatidilinozitol-3 kinazė inicijuoja signalinius kelius lemiančius B limfocitų proliferaciją ir išgyvenimą (138).

Apibendrinant, nuo SYK inicijuojamų signalinių kelių priklauso įgimtojo ir įgytojo imuniteto receptorių signaliniai keliai, ląstelių adhezija, kraujagyslių vystymasis, osteoklastų brendimas ir trombocitų aktyvinimas (14).

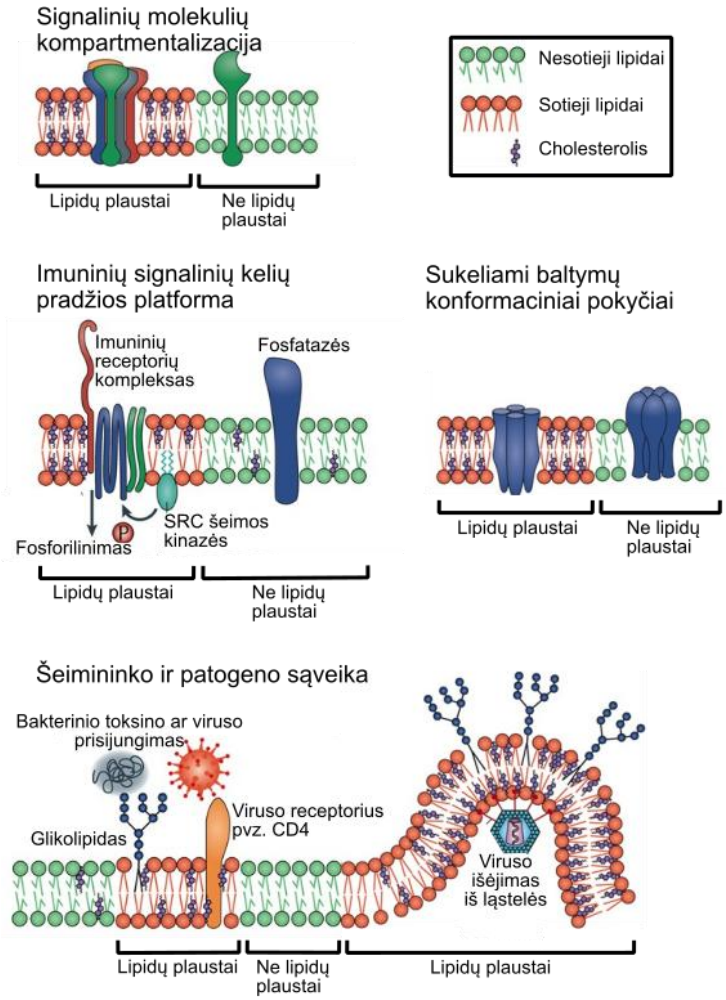
1.4.3. SYK kinazė įgimtojo imuniteto ląstelėse

Įgimtojo imuniteto ląstelėse SYK kinazė atlieka pagrindinį vaidmenį perduodant signalus nuo aktyvintų receptorių antrinėms signalinėms molekulėms. Patogenų, pavyzdžiui, parazitų ar grybų, sukeliamo uždegimo metu SYK perduodama signalą, reguliuoja uždegiminių citokinų sekreciją, ląstelių migraciją ir patogenų pašalinimą (139). SYK taip pat prisideda prie NLRP3 inflamasomos susirinkimo – kinazė fosforilina ASC baltymo tirozinus ir palengvina adaptorinio baltymo oligomerizaciją (12). Taip pat žinoma, kad aktyvinus PRR šeimos receptorius, inicijuojami nuo kinazės priklausomi signaliniai keliai aktyvinantys transkripcijos veiksnį NF-κB, kurie lemia tolimesnį uždegiminį atsaką, citokinų sekreciją. *Candida albicans* sukeltos infekcijos metu nuo SYK priklausomo CARD9–Bcl10–MALT1 signalinio kelio aktyvinimo rezultatas yra NF-κB aktyvinimas ir IL-1β bei IL-23 citokinų sintezė (140). *Mycobacterium tuberculosis* aktyvina SYK ir inicijuoja taip pat nuo CARD9 priklausomą signalinį kelią CARD9–Bcl10–MALT1 ir aktyvina NF-κB (141,142). Grybų ar pirmuonių sukeliamų infekcijų metu SYK aktyvinimas per CLR receptorius lemia NLRP3 inflamasomos aktyvinimą. *Toxoplasma gondii* infekcijos metu, signalinio kelio PKCδ–CARD9/MAVS–NF-κB, kurį inicijuoja SYK, rezultatas yra aktyvinta NLRP3 inflamasoma (143). HSV-1 infekcijos metu, aktyvinta SYK būtina priešvirusiniam atsakui, nes SYK fosforilina STING, kuris atsakingas už signalinius kelius lemiančius interferonų genų raišką ir viruso replikacijos stabdymą (144).

Nors šiuo metu žinoma daug apie SYK signalinius kelius infekcijų atveju, vis dar trūksta duomenų apie SYK vaidmenį NLRP3 inflamasomos aktyvinime, kurį sukelia FcγR sąveika su virusiniais IK.

1.5. Lipidų plaustai

Lipidų plaustai – tai nedideli (10-200 nm) heterogeniški, labai dinamiški plazminės membranos mikrodomenai, kuriuose gausu cholesterolio, sfingolipidų ir baltymų. Taip pat lipidų plaustuose aptinkami gangliozidai – sialo rūgštį sudėtyje turintys sfingolipidai, pavyzdžiui GM1 (145) . Lipidų plaustų struktūros gali formuoti didesnius mikroskopinius domenus (>300nm) dėl baltymo-baltymo ir baltymo-lipido ryšių inicijuoto jungimosi į sankaupas. Plaustai yra asimetrinės ląstelės membranos vidiniame ir išoriniame sluoksniuose sujungti ir sudaro funkcines platformas ląstelinių procesų reguliavimui. Jie yra ypač svarbūs imuninių ląstelių funkcionavimui, nes dalyvauja endocitozėje, imuniniuose signaliniuose keliuose, reguliacinių elementų kompartmentalizacijoje ir šeimininko su patogenu sąveikoje (1.8 pav.) (146). Lipidų plaustai užtikrina receptorių, kurie sudaro kompleksus iš kelių sąveikaujančių subvienetų, koncentraciją ir receptoriaus inicijuojamo signalinio kelio komponentų artumą, susidaro katalitinės platformos. Pavyzdžiui, B ir T ląstelių receptoriai prisijungus ligandui asocijuojasi su lipidų plaustais, nuo kurių vyksta signalo perdavimas limfocitų aktyvinimui (147). Be to, sąsaja su plaustus linkusiais formuoti lipidais ir jų sukuriama išskirtine fizikine ir chemine aplinka, gali pakeisti plauste esančio baltymo konformaciją bei jo aktyvumą. Tuo pačiu lipidų plaustuose vyksta kompartmentalizacija, sutelkiami teigiami reguliavimo komponentai (kinazės) ir atskiriami neigiami reguliavimo elementai (fosfatazės). SRC šeimos kinazės dėl savo palmitoilinimo lokalizuojasi lipidų plaustuose, o transmembraninės fosfatazės į juos paprastai nepatenka. Šis atskyrimas yra svarbus imuninės sistemos signaliniams keliams (146). Lipidų plaustai taip pat dalyvauja endocitinių, egzocitinių, sinaptinių ir užląstelinių pūslelių formavime ir transporte. Endocitozės mechanizme dalyvaujantys baltymai kaveolinas, flotilinas ir kiti formuojantys ir stabilizuojantys endocitines pūsleles aptinkami lipidų plaustuose, pavyzdžiui, kaveolinui būdinga sąveika su GM1 gangliozidu plaustuose (145) . Be to, cholesterolis lipidų plaustuose sumažina paviršiaus įtampą membranos linkimui ir trūkiams, dėl ko lipidų plaustai tampa svarbūs endocitozei (148).



1.8 pav. Lipidų plaustų funkcijos. Modifikuota pagal (146).

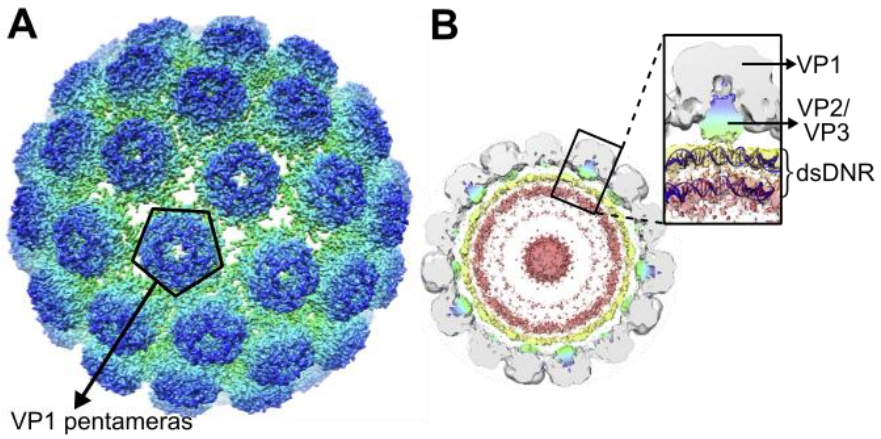
Daugelis patologinių procesų taip pat priklauso nuo lipidų plaustų. Virusai ir bakterijų produktai, pavyzdžiui, toksinai, skverbdamiesi į ląstelę, selektyviai jungiasi prie lipidų plaustų, naudoja kaip „sąlyčio tašką“. Dėl sukoncentruotų molekulių gausos lipidų plaustai tinka patogenų prisitvirtinimui. Virusai ir bakterijos sąveikauja su įvairiomis ląstelės paviršiaus molekulėmis, sutelktose plaustuose. Tokių receptorių pavyzdžiai yra CD4 receptorius ŽIV arba ACE2 receptorius SARS-CoV ir SARS-CoV-2 virusams, bakterijų *Shigela flexneri* ir *Salmonella enterica* receptoriai CD44 ir CD55 (149–152). Be to, viruso apvalkalo glikoproteinai gali jungtis su baltymais ar lipidais plaustuose. Pavyzdžiui, sfingolipidai, ceramido dariniai sąveikauja su ŽIV viruso glikoproteinais, lemia membranų susiliejimą ir

viruso patekimą. O susiliejimas su lipidų plaustais ir endocitozės mechanizmo panaudojimas yra esminis kai kurių virusų patekimo mechanizmas (153). Iš kitos pusės, lipidų plaustuose inicijuojamas prieš patogenus nukreiptas atsakas. Plaustuose sugrupuoti patogenus aptinkantys receptoriai ir inicijuojami signaliniai keliai, nulemiantys programuotą ląstelių žūtį ir citokinų sekreciją, kurie skirti patogenams pašalinti (152). Pagrindinis ROS šaltinis – nikotinamido adenino dinukleotido fosfato oksidazė (NOX) yra multimerinis baltymas lokalizuotas plaustuose. Infekcijos atveju dėl fermento NOX susiformavę dideli ROS kiekiai padeda pašalinti patogenus, inicijuojant apoptozę ir nekroptozę (152). Taigi lipidų plaustai veikia kaip įvairiapusiai membranų organizavimo veiksniai, kurie koordinuoja signalų perdavimą, sąveiką su patogenais ir ląstelių likimą.

1.6. Žmogaus poliomos virusai

Žmogaus poliomos virusai (PyV) yra maži DNR virusai be išorinio apvalkalo, priklausantys *Polyomaviridae* šeimai. Iki šiol yra atrasta 16 žmogaus PyV, pasižyminčių panašia viriono struktūra ir genomo sandara. Šių virusų genetinę medžiagą sudaro žiedinė dvigrandė DNR, o visas genomas yra maždaug 5 kb ilgio DNR molekulė, supakuota į ikosaedro formos 45-55 nm skersmens kapsidę (154). *Polyomaviridae* šeimos PyV virusai pasižymi dideliu struktūros, genomo sudėties ir organizavimo panašumu. PyV kapsidė sudaryta iš trijų struktūrinių baltymų: didžiojo VP1 ir mažųjų VP2 ir VP3. Viriono apvalkalas sudarytas iš 72 pentamerų, kuriuos formuoja VP1, o mažieji VP2 ir VP3 baltymai lokalizuoti kapsidės vidinėje pusėje (1.9 pav.). Kapsomeros tarpusavyje susijungusios VP1 baltymo C-galais, o N-galu VP1 jungiasi prie VP2 ar VP3, papildomai kapsidę stabilizuoja Ca^{2+} jonai bei disulfidiniai ryšiai tarp VP1 (155). VP1 yra pagrindinis baltymas sąveikaujantis su ląstelių receptoriais, todėl šio baltymo sąvybės lemia specifiškumą receptoriams, audinių tropizmą ir viruso patogeniškumą (156). Viriono kapsidėje esantį genomą sudaro 5-6 baltymus koduojantys genai. Genome yra du transkripciniai regionai (ankstyvasis ir vėlyvasis) atskirti nekoduojančia kontroline sritimi. Ankstyvosios srities regionas koduoja nestruktūrinius, reguliacinius viruso replikacijos ir transkripcijos baltymus. Vėlyvosios srities regione koduojami struktūriniai viruso baltymai VP1, VP2 ir VP3. Nekoduojančioje kontrolinėje srityje yra išsidėstę promotoriai, replikacijos pradžios taškas ir kiti transkripcijos reguliaciniai elementai (156).

Nors žmogaus PyV pasižymi skirtingu audinių tropizmu, visų jų infekcijos ciklas yra panašus. PyV jungiasi prie šeimininko ląstelės paviršiaus receptorių, turinčių sialo rūgštį. Sialo rūgšties motyvus turintys glikoproteinai ir gangliozidai yra dažnai virusų (gripo, tymų, koronavirusų) pasitelkiami receptoriai patekimui į ląstelę (158). Iš tiesų, nemažai PyV prisijungia prie sialo rūgšties receptoriaus, ant gangliozido lipidų plaustuose ir pasitelkiant kaveolinus ar kitus su endocitoze susijusius baltymus patenka į ląstelę. Nepaisant patekimo būdo, į ląstelę, patekę PyV transportuojami endoplazminio tinklo link. Endoplazminiame tinkle esančių šaperonų, disulfidinių izomerazių, reduktazių bei kitų fermentų viruso kapsidė dalinai suardoma ir virionas perkeliamas į branduolį. Tuomet vyksta PyV genomo transkripcija, replikacija, citozolyje surenkami virionai ir PyV išsiskiria iš ląstelių įvykus ląstelės lizei arba egzocitozės būdu (156).



1.9 pav. PyV viriono struktūra. (A) PyV struktūra užfiksuota kriogeninės elektroninės mikroskopijos metodu; (B) PyV viriono skersinis pjūvis. Modifikuota pagal (157).

Didžioji dalis žmogaus PyV sukelia besimptomes arba lengvas infekcijas, bet išlieka ilgą laiką organizme latentinėje būsenoje. Tačiau silpną imunitetą ar imunologinių sutrikimų turintiems asmenims PyV gali sukelti rimtesnių sutrikimų. BKPyV yra siejamas su inkstų transplantato recipientų nefropatija ar kaulų čiulpų recipientų cistitu (159). JCPyV gali sukelti progresyvią leukoencefalopatiją ŽIV užsikrėtusiems ar imunosupresantus vartojantiems žmonėms. Dėl nusilpusio imuniteto, UV poveikio ar senatvės MCPyV gali sukelti Merkelio ląstelių karcinomą. Leukemija sergantiems ar

po organo transplantacijos su nusilpusiu imunitetu pacientams pastebėta TSPyV sukeliama trichodisplazinė spinuliozė (155).

1.6.1. WU PyV ypatybės

Pirmieji žmogaus PyV atrasti 1971 m. buvo BK PyV ir JC PyV. Pritaikius naujas technologijas 2007 m. atrasti nauji virusai. Švedijoje buvo izoliuotas Karolinska Instituto (KI) PyV, o ketvirtasis žmogaus PyV buvo Vašingtono universiteto (*Washington University*) – WU PyV, išskirtas iš nežinomos kilmės kvėpavimo takų liga sergančių vaikų nosiaryklės (154).

WUPyV VP1 baltymas pasižymi didele sekos homologija su KIPyV VP1 seka ir žymiai mažesne su kitų žmogaus PyV VP1 sekomis. Tai rodo WUPyV ir KIPyV evoliucinį nutolimą nuo kitų žmogaus PyV. KIPyV ir WUPyV aminorūgščių sekos, apibūdinančios jungimąsi prie sialo rūgšties liekanų ląstelių paviršiuje, nėra konservatyvios ir skiriasi VP1 struktūra nuo poliomos virusams būdingų (160). Be to, PyV sukeliama hemagliutinacija siejama su VP1 baltymo jungimusi prie sialo rūgšties liekanų. Tyrimai su WUPyV į virusus panašiomis dalelėmis (VPD), atskleidė, kad WUPyV VP1 formuojamos VPD nesukelia hemagliutinacijos (161). Kadangi nėra atlikta tyrimų, nustatančių WUPyV jungimosi prie ląstelių tipą bei dėl ankstesnių tyrimų su WUPyV VPD, manoma, kad WUPyV prie sialo rūgšties jungiasi kitaip, nei jau ištirti PyV arba jungiasi prie kitų molekulių.

Po atradimo WUPyV buvo rastas klinikiniuose mėginiuose visame pasaulyje. Serologinių tyrimų duomenimis, šiuo virusu užsikrečiama vaikystėje ir infekcija pasireiškia lengvu kvėpavimo takų sutrikimu arba nesukelia jokių simptomų, o virusas išlieka organizme nuolatos. Serologiniais tyrimais nustatyta, kad WUPyV yra paplitęs visose amžiaus grupėse: 1-5 metų amžiaus vaikų grupėje paplitimas nuo 44,6 %, 50 metų ir vyresnių asmenų siekia 70,9 % (162). Pagal seroepidemiologinių tyrimų rezultatus, iki 80 % populiacijos per gyvenimą susiduria su WU PyV. Dar didesnis viruso paplitimas stebimas tarp asmenų su nusilpusiu imunitetu, pavyzdžiui, sergančių ŽIV (156).Nepaisant to, WUPyV patogeniškumas nėra ištirtas. Tai galima sieti su tuo, kad WUPyV dažnai aptinkamas kaip gretutinė infekcija. Tyrimu, kuriuo siekta nustatyti KIPyV ir WUPyV paplitimą tarp SARS-CoV-2 sergančiųjų, nustatyta, kad 4,5% (5 iš 127) buvo užsikrėtę WUPyV gretutine infekcija, o 2,7 % (3 iš 127) buvo užsikrėtę KIPyV ir WUPyV (163). Ūmios kvėpavimo takų infekcijos atveju WUPyV koinfekcija nustatyta 4 % (10 iš 251) tiriamųjų. WUPyV aptiktas pacientuose turėjusiuose rinoviruso,

sincitinio viruso, adenoviruso ar koronaviruso infekcijas, bei gretutinių ligų atvejais (164). ŽIV sirgusių asmenų smegenų autopsijos mėginiuose taip pat buvo aptiktas WUPyV (165). Be to, nors WUPyV yra laikomas kvėpavimo takų virusu, jis aptinkamas įvairiuose audiniuose – kraujyje, limfoje, blužnyje, šlapime, išmatose ir smegenų skystyje (166). WUPyV aptikimas įvairiuose audiniuose, rodo viruso gebėjimą plisti po visą organizmą.

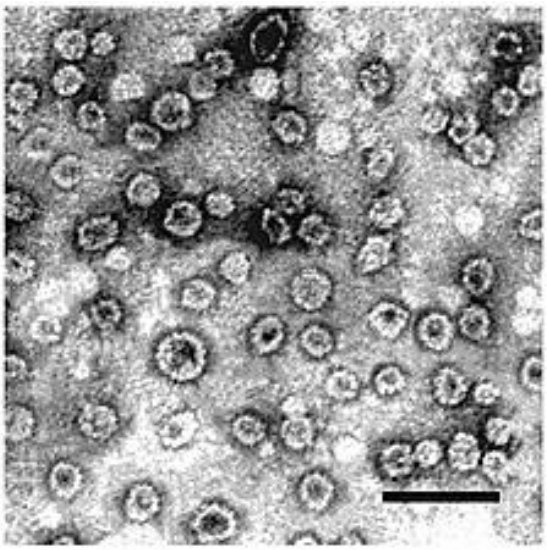
1.7. VPD modelis

VPD – tai iš viruso baltymų sudarytos keliasdešimties nanometrų dydžio struktūros, kuriose nėra viruso genomo. Šios dalelės atkartoja viruso antigenines savybes, bet neturi viruso genetinės medžiagos ir negali replikuotis. VPD susidaro savaime susirenkant virusų struktūriniams baltymams ir įgyja viruso ikosaedrinę arba lazdelės formos struktūrą (167). VPD pirmą kartą identifikuotos 1968 m. pacientų sergančių Dauno sindromu, leukemija ir hepatitu serumuose. Vėliau atskleista, kad viruso kapsidė, apvalkalas ir viruso šerdies baltymai gali formuoti VPD struktūras, kurios pasitelkiant rekombinantinius viruso struktūrinius baltymus taip pat gali būti eksperimentiškai gaunamos laboratorijoje (168). Kadangi VPD atitinka natyvią viruso struktūrą, o replikacija nevyksta, VPD tampa patraukliu modeliu virusinės infekcijos tyrimuose. Tai ypač aktualu virusų, kurių infekcija ląstelių kultūrose būna nesėkminga, tyrimams.

Žmogaus PyV VPD sudaromos iš pagrindinio kapsidę formuojančio baltymo VP1. Kiti struktūriniai PyV baltymai VP2 ir VP3 neformuoja kapsidės. WUPyV VPD ypač vertingos šio viruso tyrimams, nes WUPyV sunkiai kultivuojamas dėl riboto šeimininkų spektro – iki šiol aprašytas tik vienas sėkmingas WUPyV kultivavimo tyrimas (161,169). WUPyV VPD dažniausiai gaunamos pasitelkiant *Saccharomyces cerevisiae* mieles ir naudojant pFX7 raiškos vektorių. Šiuo būdu gautos WUPyV VPD yra 40 kDa dydžio ir 25-35 nm skersmens (1.10 pav) (161).

Taip pat VPD pripažintos kaip saugi alternatyva natyviems virusams ir naudojamos kuriant vakcinas. Praktikoje taikomos HBV, hepatito E ir žmogaus papilomos virusų profilaktinės vakcinos, kurių pagrindą sudaro VPD (170). Taip pat yra sukurtos žmogaus PyV VPD pagrįstos vakcinos, kurios šiuo metu yra išbandomos ikiklinikiniuose tyrimuose (171). Tačiau organizme egzistuojantys antikūnai prieš vakcinos komponentus gali turėti įtakos vakcinos saugumui ir veiksmingumui. Tyrimai rodo, kad antikūnai dažnai sukelia vietinę uždegiminę reakciją dėl IK susidarymo ir sąveikos su FcR

(172). Todėl svarbu suprasti, kaip VPD ir jų IK aktyvina ląsteles ir koks jų formuojamo imuninio atsako ląstelėse mechanizmus.



1.10 pav. WUPyV VPD elektroninės mikroskopijos nuotrauka. Mastelis 100 nM (161).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Priemonės

Ląstelių auginimo indai 75cm^2 *Cellstar* (#658175, *Greiner Bio-One)*; ląstelių auginimo indai 25 m^2 ir 75 cm^2 *Cell Culture Treated EasYFlasks* (#156367, #156499, *Nunc*); nesterilios 96 šulinėlių plokštelės *MaxiSorp* (#442404, *Nunc*); 3cm^2 lėkštelė, 6, 12, 24, 48 ir 96 šulinėlių ląstelių kultūrų plokštelės (#93040, #92006, #92012, #92024, #92048, #92096, *TPP Techno Plastic Products AG)*; 8 šulinėlių *IbiTreat µ-slides* ir 96 šulinėlių *IbiTreat µ-plates* plokštelės (#80826, #89626, *Ibidi)*; 100 µm ir 40 µm dydžio porų ląstelių filtrai (#22363549, #22363547, *fisherbrand);* 0,1 µm porų dydžio PES švirkšto filtrai (#16553, *Sartorius)*; 0,22µm porų dydžio PVDF švirkšto filtrai (#P666.1, *Roth*); Tween-20 (#9127.1, *Roth*); 2-merkaptoetanolis (#4227.1, *Roth*); proteomo profilio pelės chemokinų nustatymo rinkinys (#ARY020, *R&D systems)*; 12–14 kDa dydžio dializės mėgintuvėliai *"D-Tube Dialyzer Mini"* (#71505, *SigmaAldrich by Merck)*; serologinės 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml tūrio pipetės (#170366N, #170356N, #170357N, #170358N, *Nunc*); sterilūs automatinių mikropipečių antgaliai su filtru (1–10 µl), (2–200 µl), (100–1000 µl) (#16490865, #16440875, #16400875, *fisherbrand*); 96 šulinėlių V formos plokštelės (#249570, *Nunc*); 0,5 ml, 1,5 ml, 2ml, 15 ml ir 50 ml tūrio mėgintuvėliai (#10318661, #10398031, #10073321, #17650006, #17660006, *Eppendorf*); 20ml švirkštai (#4606205V, *Braun*); 1 ml švirkštai (#303172, *BDPlastiPak*).

2.1.2. Buferiniai tirpalai, terpės ir reagentai

<u>Darbui su ląstelėmis naudoti reagentai ir tirpalai:</u>

Mitybinė terpė *"Dulbecco's modified Eagle's medium"* (DMEM) (#31966047), fetalinis veršiuko serumas (FBS angl. *fetal bovine serum*) (#10500-064), 10 mg/ml Penicilino ir streptomicino mišinys (P/S) (#15140122), *Dulbecco's* fosfatinis buferinis tirpalas (b. t.) (DPBS) (#14190250), *Hank's Balanced* buferinis druskų tirpalas (HBSS angl. *Hank's Balanced Salt Solution*) (#14025092), ląstelių vaizdinimui skirta terpė "*FluoroBrite DMEM*" (#A1896701), ląstelių disociacijos reagentas "*TrypLE"* (#12604021), 0,25 % tripsino EDTA b. t. (#25-200-056) iš *Gibco*; mitybinė terpė su sumažintu serumo kiekiu *Opti-MEM* (#31985070), lipofektaminas

RNAiMAX (#13778030), 40 nmol *Silencer Select* neigiamos kontrolės trumposios interferuojančios RNR (siRNR, ang. *small interfering RNA*) (#4390844, Lot ASO2KDRZ), 40 nmol *Silencer Select* NLRP3 siRNR, ID s103710 (#4390816, Lot. ASO2KT00) iš *Thermo Fisher Scientific*; baltymų žymės jautrios pH pokyčiams *pHrodo™ Dyes for Amine Labeling* (#P36011; #P36013) iš *Invitrogen*; citotoksiškumo nustatymo rinkinys (#11644793001), deoksiribonukleazė (DNazė) I (#04536282001) iš *Roche Diagnostics;* 50 mg/ml gentamicino tirpalas (#G1522-10ML), poli-L lizinas (#P4832) iš *SigmaAldrich;* dimetilsulfoksidas (DMSO) (#A3672) iš *PanReac AppliChem; E. coli* lipopolisacharidas (LPS) (#tlrl-eblps); nigericinas (#tlrnig); NLRP3 slopiklis MCC950 (#inh-mcc), SYK kinazės slopilis R406 (#inh-r406) iš *InvivoGen*.

Hibridomų auginimo terpė: DMEM, 300 μg/ml gentamicino ir 10 % (v/v) FBS.

Ląstelių auginimo terpė: DMEM, 100 μg/ml P/S ir 10 % FBS.

Beseruminė terpė: DMEM ir 100 μg/ml P/S.

Gaivinimo po siRNR transfekcijos terpė: DMEM ir 5 % FBS.

Imunocitochemijai naudoti reagentai ir tirpalai:

Branduolių dažas *Hoechst33342* (#639), propidžio jodidas (PI) (#638) iš *ImmunoChemistry Technologies*; ląstelių membranos dažas "*CellMask Deep Red*" 5 mg/ml (#C10046); choleros toksino subvienetas B (CTxB) konjuguotas su *Alexa Fluor™ 594 (*#C34777); asilo poliklonіniai antikūnai (PAk) specifiški pelės IgG konjuguoti su *Alexa Fluor 594* (#A21203); ožkos PAk specifiški pelės IgG konjuguoti su *Alexa Fluor 488* (#A11029) iš *Invitrogen;* paraformaldehidas (PFA) (#0335.1) iš *Roth*; tritonas X-100 (#9036-19-5) iš *SigmaAldrich*; jaučio serumo albuminas (BSA angl. *bovine serum albumin*) (#P06-1391000) iš *PAN-Biotech.*

Fiksavimo tirpalas: 4 % (w/v) PFA paruoštas DPBS;

Permeabilizavimo tirpalas: 0,1 % (v/v) Tritono X-100 dejonizuotame vandenyje;

Blokavimo b. t.: 2 % (w/v) BSA dejonizuotame vandenyje.

Ląstelių lizatų ruošimui naudoti reagentai ir tirpalai:

Halt proteazių ir fosfatazių inhibitorių 100 kartų koncentruotas mišinys (#78400), *Pierce* bicinchoninės rūgšties (BCA) baltymų koncentracijos matavimo rinkinys (#23225), baltymų redukavimo 5 kartus koncentruotas b. t. (#39000) iš *Thermo Fisher Scientific*; ląstelių lizės 10 kartų koncentruotas tirpalas (#9803) iš *Cell Signaling Technology*.

Ląstelių lizės tirpalas: dejonizuotame vandenyje skiedžiamas ląstelių lizės koncentruotas tirpalas papildytas „*Halt“* proteazių ir fosfatazių inhibitorių mišiniu.

Baltymų elektroforezei denatūruojančiomis sąlygomis ir imunoblotui naudoti reagentai ir tirpalai:

Baltymų molekulinės masės žymuo (#26616), chemiliuminescencinis substratas „*SuperSignal West Pico PLUS“* (#34577) iš *Thermo Fisher Scientific*; natrio azidas (NaN3) (#71289-250G), N,N-metilenbisakrilamidas (#7256) iš *SigmaAldrich*; akrilamidas (#7871.1), natrio dodecilsulfatas (SDS, angl. *sodium dodecyl sulphate*) (#2326.2) iš *Roth*; 0,45 μm skersmens porų nitroceliuliozinė membrana ir filtrinis popierius (#LC2001), Tris b. t. (TBS) (#28379), *NuPAGE™ MOPS 20X* elektroferezės b. t. (#NP0001), baltymų pernašos *Bolt™ Transfer buffer* (*Novex*) 20X (#BT00061), gelio dažas *Page Blue Protein Staining Solution* (#24620), *SureCast* gelių ruošimo rinkinys (#HC1000SR) iš *Invitrogen, Thermo Fischer Scientific*.

Pirminiai antikūnai:

Triušio MAk specifiški fosforilintai SYK (pSYK) (Tyr525/526) (#2710), triušio MAk specifiški pelės NLRP3 (D4D8T) (#15101) iš *Cell Signaling Techology*; pelės MAk specifiški β-Aktinui (BA3R) (#MA5-15739) iš *Invitrogen, Thermo Fischer Scientific*.

Antriniai antikūnai:

Ožkos PAk specifiški triušio IgG konjuguoti su krienų peroksidaze (HRP) (#1706515), ožkos PAk specifiški pelės IgG konjuguoti su HRP (#1721011) iš *Bio-Rad*.

10 % (w/v) APS tirpinamas šviežiai vandenyje;

10 % (w/v) SDS tirpinamas vandenyje;

12 % skiriamasis gelis: 12 % (v/v) akrilamido-bisakrilamido, 0,4 M TrisHCl (pH 8,8), 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED.

4 % koncentruojamasis gelis: 4 % (v/v) akrilamido-bisakrilamido, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,01 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED.

TBS-T: TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20;

Blokavimo b. t.: 5 % (w/v) BSA paruoštas TBS;

10 % (w/v) NaN_3 b. t. paruoštas dejonizuotame vandenyje;

Membranos atstatymo b. t.: 0,5 M Tris HCl, 10 % (w/v) SDS, 0,8 % (v/v) 2-merkaptoetanolis, paruoštas vandenyje;

Pirminių antikūnų b. t: antikūnai santykiu 1:1000 TBS-T su 1% (w/v) BSA ir 0,05 % (w/v) NaN_3;

Antrinių antikūnų b. t.: antikūnai skiesti santykiu 1:3000 TBS-T su 1 % (w/v) BSA.

MOPS b. t., 20 kartų skiedžiamas vandenyje;

Bolt baltymų pernašos b. t. 20 kartų skiedžiamas vandenyje pridedant 10 % metanolio;

Imunofermentinei analizei (IFA) naudoti reagentai ir tirpalai:

"*NeA-Blue*" 3,3′,5,5′-Tetrametilbenzidinas (TMB) (#01016-1-1000) iš *Clinical Science Products*; BSA (#P06-1391000) iš *PAN-Biotech*; sieros rūgštis (#X873.1), $NaHCO_3$, NaCl, KCl, KH_2PO_4, Na_2HPO_4 iš *CarlRoth*.

Pelės citokinų nustatymo rinkiniai: "*Mouse IL-1 beta Uncoated ELISA Kit"* (#88-7013A-77), *"TNF alpha Uncoated ELISA Kit"* (#88-7324-76) iš *Invitrogen, Thermo Fischer Scientific*.

Pelės chemokinų nustatymo rinkiniai: "*Mouse CXCL2/MIP-2 DuoSet ELISA*" (#DY452-05), "*Mouse CXCL1/KC DuoSet ELISA*" (#DY453-05), "*Mouse CXCL9/MIG DuoSet ELISA*" (#DY492-05), "*Mouse CXCL16 DuoSet ELISA"* (#DY503) ir "*Mouse CCL8/MCP-2 DuoSet ELISA"* (#DY790) iš *R&D systems.*

Imobilizacijos b. t.: 50 mM $NaHCO_3$, pH 9.5;

Fosfatinis b. t. (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 nmM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4;

PBS su detergentu (PBS-T): PBS su 0,1 % (v/v) *Tween-20*;

Plovimo b. t.: PBS su 0,05 % (v/v) *Tween-20*;

Blokavimo b. t.: 2 % (w/v) BSA ištirptas PBS;

Reakcijos stabdymo tirpalas: 1 M H_2SO_4 atskiesta vandenyje.

Tėkmės citometrijai naudotos priemonės:

7-AAD gyvybingumo dažas (#00-6993-50) iš *Thermo Fischer Scientific*; PBS/EDTA tirpalas iš *Roth*; Fc receptorius blokuojantis antikūnų tirpalas *TruStain FcX™ Anti-CD16/32 (*#101320) iš *BioLegend.*

Antikūnai:

Žiurkės MAk specifiški pelės CD11b žymėti Brilliant Violet 786, klonas M1/70, (#417-0112-82) iš *Thermo Fischer Scientific;* žiurkės MAk specifiški pelės CD86 konjuguoti su PE, klonas GL1 (#A16385) iš *Life Technologies;* žiurkės MAk specifiški pelės MHC II konjuguoti su *redFluor 710*, klonas M5/114.15.2 (#29097S) iš *Cell Signaling.*

Izotipinės kontrolės:

Žiurkės MAk konjuguoti su *redFluor 710* klonas LTF-2 (#90283S) iš *Cell Signaling*; žiurkės MAk konjuguoti su *Brilliant Violet 786*, klonas eB149/10H5 (#417-4031-81) iš *eBioscience*.

Citometrijos b. t.: 2 % (w/v) BSA, paruošta PBS.

Blokavimo b. t.: 2 % (w/v) BSA, 2 % (v/v) *TruStain FcX™ Anti-CD16/32*.

Antikūnų tirpalas: antikūnai skiedžiami santykiu 1:100 arba 1:50 citometrijos b. t.

Antikūnų gryninimui naudoti reagentai ir tirpalai:

Distiliuotas vanduo, sterilus (#10977035) iš *Invitrogen, Thermo Fisher Scientific;* baltymu A padengta sefarozė *rProtein A SepharoseTM Fast Flow* (#17127903) iš *Cytiva; Amicon* 100 kDa baltymų filtravimo rinkinys, (#UFC5100BK) iš *Sigma-Aldrich by Merck*; glicinas, Tris-HCl iš *CarlRoth*.

Eliucijos b. t.: 100 mM glicino ištirpinto distiliuotame steriliame vandenyje, pH 3.0;

IgG1 antikūnų užnešimo/plovimo b. t.: 1.5 M glicino ir 3 M NaCl distiliuotame steriliame vandenyje, pH 8.9;

IgG2a/2b antikūnų užnešimo/plovimo b.t.: 100 mM Tris-HCl distiliuotame steriliame vandenyje, pH 8.0.

Koncentruotas 1M Tris-HCl tirpalas paruoštas distiliuotame steriliame vandenyje, pH 8.

Antikūnų žymėjimui krienų peroksidaze naudoti reagentai ir tirpalai:

Krienų peroksidazė (HRP angl. *horseradish peroxidase*) (#P8375) iš *SigmaAldrich by Merck*; $NaIO_4$, $NaBH_4$, $NaHCO_3$, Na_2CO_3, Na_2CH_3COO iš *Roth.*

Natrio periodato tirpalas: 200 mM $NaIO_4$*;*

Natrio boro hidrido tirpalas: 0,2–0,4 mg/ml $NaBH_4$

Natrio acetato b. t.: 1 mM Na_2CH_3COO, pH 4,5;

Natrio karbonatinis b. t.: 200 mM $NaHCO_3$, 200 mM Na_2CO_3, pH 9,5;

Imunoprecipitacijoje naudoti reagentai ir tirpalai:

Magnetinių rutuliukų padengtų *S. aureus* rekombinantiniu baltymu G rinkinys *Dynabeads™ Protein G and Magnet Starter Pack* (#10017D) iš *Thermo Fisher Scientific;*

Eliucijos b. t.: 100 mM Gly, baltymų redukavimo 5 kartus koncentruotas tirpalas, skiedžiama PBS, pH 3,0.

IK formavimui naudotos medžiagos:

VPD – žmogaus WUPyV į virusus panašios dalelės, gautos iš VU GMC BTI Eukariotų genų inžinerijos skyriaus darbuotojos dr. Mildos Norkienės. Rekombinantinės VPD sudarytos iš 360 WUPyV rekombinantinio kapsidės baltymo VP1 monomerų. VPD susintetintos *S. cerevisiae* mielių raiškos sistemoje ir išgrynintos CsCl gradientinio centrifugavimo būdu pagal anksčiau aprašytą metodiką (161).

Antikūnai specifiški WUPyV VPD (toliau VPD): IgG1 poklasio MAk klonas 11D2, IgG2a poklasio MAk klonai 12F8, 12F1, 4E12, IgG2b poklasio MAk klonas 5H10 išgryninti iš pelių hibridomų terpės. Pelių hibridomos sukurtos po BALB/c pelių imunizacijos išgrynintomis rekombinantinėmis VPD (116).

2.1.3. Ląstelių kultūros

Pelės fibroblastų L929 ląstelių linija; pelės pirminė mikroglijos kultūra, gauta iš C57BL/6 naujagimių peliukų.

VU GMC BTI Imunologijos skyriuje sukurtos hibridinių ląstelių linijos sekretuojančios 11D2, 12F8, 4E12,12F1, 5H10 MAk.

2.1.4. Eksperimentiniai gyvūnai

Pirminės mikroglijos kultūrai išskirti naudoti C57BL/6 linijos pelių naujagimiai. C57BL/6 buvo auginamos ir veisiamos VU GMC vivariume. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos išduotas leidimas Nr. LT 61-13-004. Peliukai naudoti tik pirminės kultūros ruošimui, kuriam nereikalaujami papildomi leidimai. Procedūros su C57BL/6 pelėmis atliktos Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre (Vilnius, Lietuva) pagal Lietuvos ir Europos teisės aktus. Procedūras atliko K. Mašalaitė, turinti išduotą pažymėjimą, suteikiantį teisę dirbti su laboratoriniais gyvūnais Lietuvos Respublikoje.

2.1.5. Programinė įranga duomenų analizei:

Programa ImageJ 1.54p (*W. Rasband, USA National Institute of Health*) (173) , naudota nuotraukų apdorojimui bei imunobloto rezultatų analizei. GraphPad Prism 10.1.0 (*GraphPad Software Inc*.) naudota statistinei analizei.

PyCharm Community Edition 2024.2.2 naudota duomenų analizei ir vaizdinimui. Tėkmės citometrijos duomenys analizuoti *FlowJoTM* v10.10 programine įranga.

2.2. Metodai

2.2.1. Pirminės mikroglijos kultūros išskyrimas ir kultivavimas

Pirminė mikroglijos kultūra skiriama iš 1–3 parų C57BL/6 pelių naujagimių, pagal anksčiau aprašytą protokolą (174). Pasitelkiant stereoskopinį mikroskopą nuo peliukų smegenų pašalinami smegenų dangalai. Surinktas smegenų audinys tris kartus plaunamas HBSS, inkubuojamas 0,25 % tripsino tirpale 37 °C temperatūroje 10 min. Po inkubacijos tripsinas neutralizuojamas DMEM su serumu ir pridedama DNazės I, audinys suardomas mechaniniu būdu pipeptuojant iki homogeninės masės ir centrifuguojamas 300 × g 10 min. Dviejų smegenų audiniui naudojama 1 ml 0,25 % tripsino, 4 ml auginimo terpės ir 100 µl DNazės I. Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas, ląstelių nuosėdos resuspenduojamos šiltoje auginimo terpėje ir pasėjamos į poli-L-lizinu padengtus 75 cm^2 flakonus. Viename 75 cm^2 flakone sėjamas 2 smegenų audinys su 15 ml terpės. Po paros neprisitvirtinusios ląstelės pašalinamos – flakono paviršius 3 kartus skalaujamas DPBS. Terpė pakeičiama šviežia auginimo terpe papildyta 10 % L929 kondicionuotos terpės, kurioje yra L929 fibroblastų išskirtų mikroglijos augimą skatinančių veiksnių.

Mikroglijos ląstelėms pasiekus reikiamą tankį (po 8–10 d.), ląstelės nupurtomos nuo susidariusio astroglijos sluoksnio. Mikroglijos ląstelių suspensija surenkama, centrifuguojama 250 × g 5 min ir ląstelių nuosėdos filtruojamos per 40 µm filtrą. Ląstelių gyvybingumas įvertinamas *Trypan Blue* dažu ir kiekis skaičiuojamas hemocitometru. Ląstelės sėjamos į sterilias auginimo plokšteles su terpe, kurios 50 % sudaro sena terpė (pirminės kultūros supernatantas) ir 50 % šviežia auginimo terpė. Į flakonus, nuo kurių atpurtytos mikroglijos ląstelės, taip pat įpilama terpės: 40 % senos terpės, 50 % šviežios terpės; 10 % L929 kondicionuotos terpės. Mikroglijos ląstelių surinkimas vykdomas 4 kartus kas 2–3 dienas. Šiuo metodu surinktos mikroglijos kultūros grynumas yra $\geq$ 95 % (2.1 pav.).

2.2.2. L929 ląstelių kondicionuotos terpės ruošimas

Pelių fibroblastų linija L929 kultivuojama ląstelių auginimo terpėje. Kondicionuotos terpės ruošimui 1/8 pilno padengimo iš 75 cm^2 flakono

ląstelių pasėjama į atskirą 75 cm^2 flakoną ir inkubuojama 14 dienų. Po to surinkta terpė nuo ląstelių centrifuguojama 300 × g 10 min ir filtruojama per 0,2 µm porų dydžio filtrą. Paruošta kondicionuota terpė laikoma –20 °C temperatūroje ir vėliau naudojama kaip augimo veiksnių priedas pirminei mikroglijos kultūrai.

2.2.3. Pirminės mikroglijos kultūros aktyvinimas

Praėjus parai po sėjimo mikroglijos ląstelės nuplaunamos beserumine terpe ir veikiamos virusiniais baltymais bei IK, paruoštais beseruminėje terpėje. Ląstelės veikiamos 20 µg/ml (500 nM) VPD ir penkiais skirtingais IK. Kompleksų sudarymui parinktos koncentracijos, kurioms esant susiformuoja imunoprecipitacijos metodu aptinkami multivalentiniai IK, kuriuose antigeną sudarančių baltymo monomerų ir antikūnų santykis yra 1:10. Kiekvieną IK sudarė 20 µg/ml (500 nM, pagal VP1 molekulinę masę) VPD ir 7,5 µg/ml (50 nM) vieno iš IgG klasės MAk klonų: IgG1 poklasio 11D2; IgG2a poklasio 12F8, 4E12 ir 12F1; IgG2b poklasio 5H10 MAk. IK susidarymui MAk ir VPD tirpalas inkubuojamas 30 min 37 °C temperatūroje. Vėliau VPD ir IK suspensijos užpilamos ant ląstelių ir inkubuojama 24 h. Kiekvienam eksperimentui naudota beseruminės terpės ir antikūnų kontrolė – 7,5 µg/ml (50 nM) kiekvieno klono antikūnų tirpalas. Aktyvinimo mechanizmų tyrimams naudoti SYK fosforilinimo slopiklis R406 (1 µM) ir NLRP3 slopiklis MCC950 (1 µM) buvo pridėti atitinkamai 1 h ir 30 min prieš poveikį VPD ar IK. Po inkubacijos surenkami ląstelių supernatantai ir paruošiami ląstelių lizatai ir laikomi – 20 °C tolimesnei citokinų sekrecijos bei SYK ir NLRP3 baltymų raiškos analizei.

2.2.4. NLRP3 geno raiškos slopinimas siRNR

Siekiant patvirtinti NLRP3 inflamasomos aktyvinimą, NLRP3 genas buvo slopintas taikant RNR interferencijos metodą. Į NLRP3 koduojančią mRNR nukreipta siRNR vadinama NLRP3 siRNR, o kontrolinė, pelės transkriptams nespecifinė siRNR – neigiama siRNR. Prieš transfekciją paruošiamos 100 µM koncentracijos siRNR tirpalo porcijos, jos išpilstomos ir laikomos –70 °C temperatūroje, vengiant pasikartojančių šildymo ir šaldymo ciklų. Ląstelės transfekuojamos NLRP3 siRNR pagal gamintojo rekomendacijas. Transfekcijos metu ląstelės auginamos terpėje be antibiotikų. Dieną prieš transfekciją ląstelės pasėjamos į 6 šulinėlių plokšteles 1 × 10^6 ląstelių/šul. tankiu kaip nurodyta 2.2.1 skyriuje. Likus 6 h iki transfekcijos,

terpė pakeičiama ir į šulinėlius pilama po 2 ml terpės be antibiotikų su 5 % FBS. Pasiruošiami siRNR–*Lipofectamine* kompleksai. *Lipofectamine* skiedžiamas 25 kartus, o 100 µM siRNR tirpalas – 250 kartus atskiruose mėgintuvėliuose su Opti-MEM ir inkubuojama 5 min. Po to siRNR tirpalas švelniai sumaišomas su *Lipofectamine* reagentu santykiu 1:1 ir inkubuojama 20 min kambario temperatūroje (KT). Neigiamos siRNR kontroliniai kompleksai ruošiami analogiškai. Galiausiai į kiekvieną šulinėlį ant ląstelių užlašinama po 500 µl paruošto siRNR–*Lipofectamine* komplekso. Pasiekiamas galutinis tūris šulinėliuose 2,5 ml, o siRNR koncentracija – 40 nM. Ląstelės inkubuojamos 24 h. Tuomet terpė keičiama DMEM su 5 % FBS be antibiotikų, ir ląstelės inkubuojamos dar 24 h.

Po transfekcijos ląstelės vieną kartą plaunamos ir veikiamos VPD arba IK beseruminėje terpėje be antibiotikų pagal 2.2.3 skyriaus metodiką. NLRP3 raiškos slopinimas vertinamas imunobloto metodu.

2.2.5. Ląstelių lizatų paruošimas

Po ląstelių aktyvinimo ruošiami jų lizatai tolimesnei baltymų analizei. Pirminės mikroglijos ląstelės vieną kartą plaunamos DPBS ir 5 min inkubuojamos su ląstelių lizės tirpalu ant ledo. Po inkubacijos ląstelės atkeliamos ląstelių gremžtuku, surenkamos į mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 14000 × g 10 min. Po centrifugavimo surenkami supernatantai, kuriuose baltymų koncentracija nustatoma 96 šulinėlių plokštelėje naudojant „*Pierce“* BCA baltymų koncentracijos nustatymo rinkinį. Nustatymas vykdomas pagal gamintojo protokolą. Trumpai, dalis lizato skiedžiama santykiu 1:3 DPBS ir įnešama po 25 µL/šul. į plokštelę. Taip pat paruošiami ir į plokštelę pilami BSA standartai, standartinės kreivės sudarymui. Ant mėginių į šulinėlius įpilama po 200 µl BCA tirpalo, sudaryto iš BCA ir $CuSO_4$ tirpalų sumaišytų santykiu 50:1. Plokštelė su mėginiais 30 min inkubuojama 37 °C temperatūroje. Tuomet plokštelė atvėsinama ir matuojama sugertis plokštelių skaitytuvu *Multiscan Go* ties 562 nm bangos ilgiu. Pagal standartų optinį tankį (OT) braižoma kalibracinė kreivė, lizatuose esančių baltymų koncentracijos nustatymui. Lizatų baltymų koncentracijos vienodinamos skiedžiant DPBS. Tuomet lizatai redukuojami su redukuojančiu b.t. santykiu 1:5, inkubuojami 20 min KT ir 20 min 70 °C temperatūroje. Atvėsinti lizatai laikomi –20 °C temperatūroje.

2.2.6. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

Pirminės mikroglijos lizatai ir išgryninti antikūnai frakcionuojami baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis metodu. Elektroforezė vykdoma naudojant *Mini Gel Tank* sistemą ir iš anksto paruoštus 4–12 % Bis-Tris poliakrilamidinius gelius. Surinkta *Mini Gel Tank* sistema užpildoma MOPS b. t., ištraukiamos gelio šukutės ir į gelio šulinėlius įpilami mėginiai – į pirmąjį šulinėlį baltymų molekulinės masės standarto, o į likusius 1 µg išgrynintų antikūnų ar 30–60 µg lizato baltymų. Elektroforezė pradedama esant 70 V įtampai, vėliau numigravus baltymams į 12 % gelio dalį tęsiama su 150 V įtampa. Po elektroforezės baltymų vizualizavimui išgrynintų MAk atveju, gelis 1 h dažytas *Page Blue* dažu, plaunamas distiliuotu vandeniu ir skenuojamas, o tolimesnei tikslinių baltymų analizei skirti lizatų geliai naudojami imunoblotui.

2.2.7. Imunoblotas

Baltymai išfrakcionuoti elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis iš poliakrilamidinio gelio pernešami šlapios pernašos būdu ant nitroceliuliozinės membranos. Prieš pernaša 0,45 µm porų dydžio nitroceliuliozinė membrana, gelis, filtrinis popierius ir kempinės merkiami į *Bolt* baltymų pernašos b. t. Tuomet iš eilės ant modulio katodo dedami šlapia kempinė, filtrinis popierius, gelis, membrana, filtrinis popierius, antra kempinė ir užspaudžiama modulio anodo dalimi. Modulis patalpinamas į *Mini Gel Tank* aparatą ir pripildomas *Bolt* baltymų pernašos b. t. Pernešimas vykdytas 1 h palaikant 15 V įtampą. Po pernešimo membrana plaunama TBS ir blokuojama blokavimo b. t. per naktį 4 °C temperatūroje. Po blokavimo membrana inkubuojama su pirminiais antikūnais, specifiškais tiriamajam baltymui (pSYK arba NLRP3) per naktį 4 °C temperatūroje. Kitą dieną membrana 3 kartus po 5 min plaunama TBS-T ir inkubuojama su antriniais antikūnais žymėtais HRP 1 h KT. Galiausiai membrana dar 5 kartus po 5 min plaunama TBS-T ir ryškinama su chemiliuminescenciniu substratu. Signalas fiksuojamas *Azure 280* vaizdinimo sistema.

Siekiant toje pačioje membranoje nustatyti leidimo kontrolės baltymų, pavyzdžiui, β-aktino lygį, po tiriamojo baltymo ryškinimo membrana regeneruojama su membranos atstatymo b. t. 1 h 70°C temperatūroje. Po regeneravimo membrana plaunama 3 kartus po 10 min TBS-T. Tuomet membrana blokuojama, plaunama, inkubuojama su pirminiais ir antriniais antikūnais bei ryškinama pagal anksčiau aprašytas sąlygas. Imunobloto

duomenų analizė atliekama *ImageJ Fiji* programa. Tiriamųjų baltymų signalai normalizuojami pagal atitinkamus leidimo kontrolės baltymų signalus.

2.2.8. Imunocitochemija

Siekiant įvertinti IK fagocitozę, ASC dalelių susidarymą, SYK aktyvinimą ar GM1 lipidų sankaupų susidarymą buvo pasitelktas imunocitochemijos metodas. Šiam metodui mikroglijos ląstelės auginamos *IbidiTreat* 8 arba 96 šulinėlių plokštelėse, pritaikytose mikroskopijai ir veikiamos pagal 2.2.3. skyriaus metodiką. Po poveikio pašalinama terpė ir ląstelės fiksuojamos fiksavimo tirpalu 15 min KT. Viduląstelinių procesų ir baltymų stebėjimui po fiksavimo ląstelės inkubuojamos su permeabilizavimo tirpalu 10 min KT. Fiksuotos ir permeabilizuotos ląstelės tris kartus plaunamos DPBS ir blokuojamos blokavimo b. t. 30 min 4 °C temperatūroje. Po blokavimo ląstelės inkubuojamos su pirminiais antikūnais specifiškais tiriamajam baltymui per naktį 4 °C temperatūroje. Kitą dieną, nuplovus DPBS, ląstelės 1 h inkubuojamos su antriniais fluorescencine žyme žymėtais antikūnais 4 °C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelių branduoliai dažomi 1 µg/ml *Hoechst* 33342, 20 min 4 °C temperatūroje. Nudažytos ląstelės tris kartus plaunamos DPBS, užpilama *FluoroBrite DMEM* terpe vaizdinimui ir analizuojama mikroskopu.

Siekiant nustatyti IK pasisavinimą, taikyta kitokia žymėjimo antikūnais strategija. Fiksuotos, permeabilizuotos ir blokuotos ląstelės pirmiausia veikiamos antriniais *AlexaFluor 488* fluoroforu žymėtais ožkos antikūnais specifiškais pelės IgG, kurie jungiasi prie antikūnų sudarančių IK. Inkubuojama 1 h 4 °C temperatūroje. Po inkubacijos, ląstelės plaunamos DPBS ir užpilama pirminių pelės antikūnų, specifiškų VPD, inkubuojama per naktį 4 °C temperatūroje. Tuomet nuplautos ląstelės inkubuojamos *AlexaFluor 594* fluoroforu žymėtais antriniais asilo antikūnais specifiškais pelės IgG 1 h 4 °C temperatūroje. Po plovimo branduoliai dažomi *Hoechst* 33342, o plazminė membrana – *Deep Red Cell Membrane* dažu skiestu DPBS santykiu 1:1000. Inkubuojama 30 min 4 °C temperatūroje. Po to ląstelės tris kartus plaunamos DPBS, užpilama terpė vaizdinimui ir analizuojama mikroskopu.

Lipidinių struktūrų membranos paviršiuje nustatymui, ląstelės 10 min laikomos ant ledo prieš dažymą ir fiksavimą. Pašalinus terpę ląstelės 30 min 4 °C temperatūroje veikiamos CTxB skiestu DPBS santykiu 1:500. Tuomet analogiškai plaunamos, fiksuojamos ir dažomos *Hoechst 33342*.

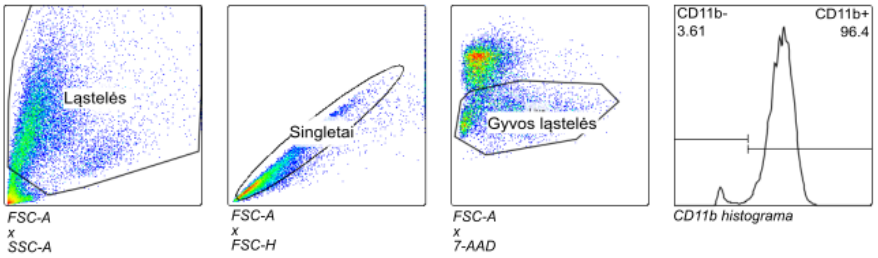
ASC dalelės analizuojamos fluorescenciniu mikroskopu *EVOS FL Auto* naudojant 20× objektyvą. ASC dalelės fiksuojamos GFP kanalu, o branduoliai DAPI kanalu. IK ląstelėse, pSYK ir GM1 lipidų sankaupos fiksuojami (184,52 × 184,52 µm) fluorescenciniu mikroskopu *Leica SP8,* naudojant 63×/1.40 OIL HC PL APO CS2 objektyvą ir *TCS SP8* programinę įrangą (*Leica Microsystems,* Vokietija). GM1 lipidinės struktūros ir ASC dalelės taip pat fiksuojami plataus lauko fluorescenciniu *Nikon Eclipse Ti-2E* mikroskopu naudojant 40× objektyvą. Nuotraukų analizė atliekama su *ImageJ Fiji* programa.

2.2.9. Tėkmės citometrija

Imuninių ląstelių paviršiaus žymenų raiškos, viduląstelinių baltymų ir fagocitozės analizei buvo pasitelkta tėkmės citometrija. Ląstelės aktyvinamos pagal 2.2.3 skyriuje aprašytą metodiką, tik fagocitozės analizei naudojamos pH pokyčiams jautria pHrodo žyme žymėtos VPD. Praėjus 24 h po poveikio VPD ir IK arba praėjus 3h po poveikio pHrodo žymėtomis VPD ir IK, nusiurbiamas supernatantas, ląstelės plaunamos DPBS ir į kiekvieną šulinėlį įnešama 150 µl *TrypLe* tirpalo. Inkubuojama 10 min. 37 °C temperatūroje. Po to pridedama po 50 µl PBS/EDTA b. t., prisitvirtinusios ląstelės atkeliamos ląstelių gremžtuku, perkeliamos į 96 šulinėlių V formos plokštelę ir centrifuguojamos 300 × g 10 min. Po centrifugavimo pašalinamas supernatantas, ląstelės plaunamos DPBS ir centrifuguojamos 300 × g 5 min. Tuomet ląstelių nuosėdos resuspenduojamos 40 µL/šul. blokavimo b. t. ir inkubuojamos 15 min 4 °C temperatūroje. Po to įnešama po 10 µL/šul. pirminių antikūnų tirpalo, bei antikūnų izotipinės kontrolės. Ląstelės su antikūnais inkubuojamos 30 min. 4 °C temperatūroje, vėliau plaunamos DPBS (100 µL/šulinėlį) ir centrifuguojamos 300 × g 5 min. Pašalinus supernatantą, nuosėdos resuspenduojamos 100 µl DPBS ir perkeliamos į mėgintuvėlius citometrijai. 5 min prieš matavimą citometru, į kiekvieną mėginį pridedama 3 µl/ 100 µl gyvybingumo dažo 7-AAD. Ląstelių matavimai atliekami tėkmės citometru *FACSSymphony A1* (*BD Biosciences*), surenkant bent po 10 000 įvykių kiekvienam mėginiui.

Analizuojant tėkmės citometrijos duomenis taikoma nuosekli populiacijų atranka. Pirmiausia pagal FSC-A ir SSC-A parametrus pašalinamos šiukšlės ir ląstelių nuolaužos. Tuomet pagal FSC-A ir FSC-H parametrus atskiriamos pavienės ląstelės nuo dublikatų. Po to gyvos ląstelės identifikuojamos pagal 7-AAD dažo signalą, kuris žymi tik negyvas ląsteles ir, galiausiai, mikroglijos populiacija patvirtinama pagal CD11b žymenį (2.1 pav.). Atrinkus gyvas

mikroglijos ląsteles, vertinamas jų pasiskirstymas pagal tiriamuosius žymenis. Duomenų analizė atlikta *FlowJoTM* v10.10 programine įranga.



2.1 pav. Populiacijos atrankos schema

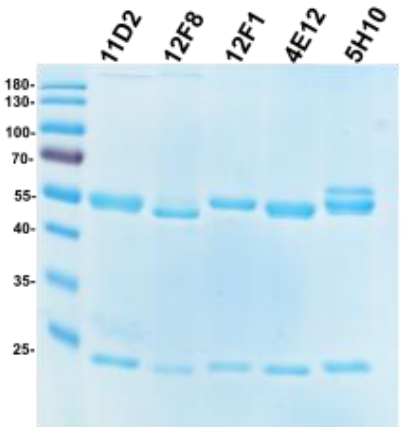
2.2.10. Chemokinų sekrecijos profilio nustatymas

Uždegiminių chemokinų sekrecijos profiliui įvertinti buvo naudotas *Proteome Profiler Mouse Chemokine Array Kit* rinkinys, pagal kurio gamintojo instrukcijas atliekamas šis metodas. Membranos, padengtos chemokinus sugaunančiais antikūnais, blokuojamos *Array Buffer 6* 1 h KT. Tuo metu mėginiai (1 ml) sumaišomi su *Array Buffer 4* (0,5 ml) ir *Detection Antibody Cocktail* (15 µl) bei inkubuojami 1 h KT. Po inkubacijos mėginiai užpilami ant membranų ir inkubuojami per naktį 2–8 °C temperatūroje. Kitą dieną membranos plaunamos plovimo b. t. ir inkubuojamos su streptavidino–HRP b. t. 30 min KT. Po inkubacijos membranos nuplaunamos ir padengiamos *Chemi Reagent Mix*. Chemiliuminescencinis signalas fiksuojamas vaizdinimo sistema *ChemiDoc Imaging System*. Rezultatų analizė atliekama su vaizdinės medžiagos apdorojimo programa *Image J Fiji* pasitelkiant *Protein Array* įskiepį.

2.2.11. Antikūnų gryninimas

Ląstelių aktyvinimo tyrimui ir imunocitochemijai buvo naudojami Imunologijos skyriuje sukurti pelės MAk, specifiški VPD baltymams. Antikūnų šaltinis buvo Imunologijos skyriuje hibridomų technologijos būdu sukurtos pelių hibridinių ląstelių linijos sekretuojančios MAk. Hibridomos kultivuojamos hibridomų auginimo terpėje. Ląstelėms pasiekus pilną konfluenciją, terpė surenkama, centrifuguojama 1000 × g 10 min. MAk gryninami iš surinktos hibridomų ląstelių kultūros terpės afininės chromatografijos metodu. Gryninimas atliekamas kolonėlėje užpildytoje 200 µl sefarozės rutuliukų, padengtų *S. aureus* rekombinantiniu baltymu A

Kolonėlė kalibruojama 2 ml užnešimo b. t. ir tuomet užnešama per 0,2 µm filtrą filtruota hibridomų terpė, sumaišyta su užnešimo b. t. santykiu 1:2 IgG1 poklasio antikūnų atveju arba su 1 M Tris-HCl (pH 8) tirpalu santykiu 9:1, IgG2a ir IgG2b antikūnų atveju. Po užnešimo kolonėlė plaunama 2 ml užnešimo b. t. Toliau vykdoma eliucija su 1 ml eliucijos b. t., renkamos 100 µl MAk frakcijos, kurių koncentracijos matuojamos *Nanodrop* spektrofotometru 280 nm ilgio bangomis. Po eliucijos kolonėlė regeneruojama 2 ml eliucijos b. t. ir gryninimas kartojamas. Po gryninimo atliekamas frakcijų su antikūnais koncentravimas ir dializė prieš DPBS naudojant 100 kDa porų dydžio *Amicon* filtrus. Galiausiai išgryninti antikūnai filtruojami per 0,2 µm filtrą ir saugomi 4°C. Galutinė koncentracija nustatoma *Nanodrop* spektrofotometru matuojant sugertį ties 280 nm bangos ilgiu ir taikant IgG ekstinkcijos koeficientą $\varepsilon = 1{,}37$. MAk grynumas įvertinamas denatūruojančiomis sąlygomis baltymų elektroforeze poliakrilamido gelyje (2.2 pav.), o specifiškumas – netiesioginės IFA metodu.



2.2 pav. Išgryninti antikūnai vertinami baltymų elektroforeze poliakrilamido gelyje. M – baltymų molekulinės masės žymuo. 11D2, 12F8, 12F1, 4E12, 5H10 – MAk klonai.

2.2.12. Antikūnų žymėjimas krienų peroksidaze

Siekiant apibūdinti MAk, antikūnai buvo konjuguoti su krienų peroksidaze (HRP). Paruošiamas 1 ml 5 mg/ml HRP tirpalas distiliuotame vandenyje, į kurį įmaišoma 250 µl šviežiai paruošto 0,2 M natrio perjodato tirpalo ir inkubuojama 20 min maišant KT tamsoje. Po inkubacijos HRP tirpalas dializuojamas prieš 1 mM natrio acetato b. t. (pH 4,5) naudojant 30 kDa porų dydžio *Amicon* filtrus. Tuo pačiu metu išgryninti MAk

dializuojami prieš natrio karbonatinį b. t. (pH 9,5). Po dializės MAk sumaišomi su HRP tirpalu santykiu 1:1 (w/w). Mišinys inkubuojamas 2 h KT tamsoje, periodiškai purtant, galiausiai pakoreguojamas pH iki ~9,5. Mėginio stabilumui palaikyti į mišinį įpilama šviežiai paruošto natrio boro hidrido tirpalo (galutinė koncentracija 0,2–0,4 mg/ml) ir inkubuojama 2 h 4 °C temperatūroje.

Gauti MAk–HRP konjugatai dializuojami prieš PBS naudojant *D-Tube Dialyser* mėgintuvėlius per naktį. Po dializės MAk–HRP konjugatai stabilizuojami pridedant 2 % BSA (w/v) ir 50 % glicerolio (v/v) bei saugomi –20 °C temperatūroje.

2.2.13. Baltymų žymėjimas *pHrodo* žyme

Siekiant tirti baltymų ir IK fagocitozę, VPD ir MAk buvo pažymėti pH jautria pHrodo žyme *pHrodo™ iFL*. Žymėjimas atliekamas pagal gamintojo instrukciją. Trumpai, *pHrodo* dažas sumaišomas su baltymu santykiu 5:1 pagal molekulinę masę. Valandą inkubuojama tamsoje ir susidaręs konjugatas dializuojamas prieš DPBS per naktį. Dializei naudojamas 600 kartų didenis DPBS tūris nei konjugato. Po dializės konjugatas skiedžiamas su gliceroliu santykiu 1:1 ir laikomas –20 °C.

2.2.14. IK tyrimas imunoprecipitacijos metodu

IK susidarymui tarp VPD ir MAk patvirtinti atlikta imunoprecipitacija, naudojant *Dynabeads* magnetinius rutuliukus, padengtus *S. aureus* baltymu G. Visi žingsniai buvo vykdomi pagal gamintojo protokolą. Rutuliukai inkubuojami su antikūnais: 25 µl rutuliukų su 2,25 µg antikūnų 10 min KT. Gautas antikūnų-rutuliukų kompleksas plaunamas PBS-T. Po to pridedama 6 µg VPD ir mėginiai inkubuojami 37 °C temperatūroje, kad susidarytų IK ant rutuliukų. Susidaręs rutuliukų-antikūnų-VPD kompleksas tris kartus plaunamas PBS-T. Galiausiai siekiant atskirti susidariusius kompleksus nuo rutuliukų, užpilamas eliucijos b. t., inkubuojama 10 min KT ir 10 min 70 °C temperatūroje. Surinktuose supernatantuose IK susidarymas tikrinamas baltymų elektroforezės metodu.

2.2.15. Spektrinė elipsometrija

MAk afiniškumas ir IK termodinaminės savybės tirti spektrinės elipsometrijos metodu pagal anksčiau aprašytą protokolą (175). Suformuojamas 11-merkaptoundekano rūgšties ir 6-merkapto-1-heksanolio

sluoksnis ant paviršiaus plazmonų rezonanso jutiklio disko. Į matavimo kamerą su disku suleidžiama 500 nM VPD paruoštų DPBS ir inkubuojama 60 min. Po to kamera 10 min plaunama DPBS. Tuomet į matavimo kamerą įnešama 100 nM MAk (11D2, 12F8, 4E12 arba 5H10), paruoštų DPBS. VPD ir kiekvieno MAk IK formuojami 60 min. ir realiuoju laiku matuojamas IK susidarymas tarp imobilizuotų VPD ir MAk. Spektrinės elipsometrijos matavimai suteikia informacijos apie paviršiaus prisotinimą baltymais, matuojant suformuotų baltymų sluoksnių lūžio rodiklį (n) realiuoju laiku. Tai naudojama termodinaminėms parametrų reikšmėms apskaičiuoti.

VPD ir antikūnų sąveikos tyrimus šiuo metodu atliko prof. dr. Ievos Plikusienės grupė (Vilniaus universitetas, Chemijos ir geomokslų fakultetas, Chemijos institutas).

2.2.16. Imunofermentinė analizė (IFA)

2.2.16.1. Tiesioginė imunofermentinė analizė

Tiesioginės IFA metodu vertintas HRP žymėtų MAk aktyvumas. 96 šulinėlių plokštelėje imobilizuojamas antigenas, įpilant po 50 µl/šul. imobilizacijos b. t. paruošto 5 µg/ml antigeno ir inkubuojama 4 °C temperatūroje per naktį. Kitą dieną plokštelių paviršius blokuojamas įnešant 250 µl/šul. blokavimo b. t. ir inkubuojama 1 h KT ant purtyklės. Po inkubacijos šulinėliai 2 kartus plaunami plovimo b. t. ir į šulinėlius įpilama 50 µl/šul. MAk žymėtų HRP atskiestų su PBS-T santykiu 1:100. Atliekami serijiniai konjugatų skiedimai ir plokštelė su išpilstytais mėginiais inkubuojama 1 h KT purtant. Po inkubacijos plokštelės 6 kartus plaunamos plovimo b. t. ir 2 kartus su vandeniu. Į šulinėlius įpilama po 50 µl HRP substrato TMB ir ryškinama 15 min. Fermentinė reakcija stabdoma reakcijos stabdymo tirpalu įpilant 25 µl/šul. OT matuojamas naudojant plokštelių skaitytuvą *Multiskan GO* ties 450 nm bangos ilgiu atimant vertes nustatytas ties 620 nm bangos ilgiu. Pagal gautus rezultatus parenkama HRP žymėtų MAk darbinė koncentracija konkurencinei IFA.

2.2.16.2. Netiesioginė imunofermentinė analizė

Netiesioginės IFA metodu tikrinti surinktų hibridomos ląstelių supernatantai ir išgryninti MAk. Plokštelėse imobilizuojamas antigenas, blokuojama ir plaunama pagal 2.2.16.1 skyriuje aprašytą metodiką. Po plovimo pilama su PBS-T 50 kartų praskiesta hibridomų augimo terpė arba 5 µg/ml koncentracijos išgrynintų MAk po 50 µl/šul., atliekami serijiniai

skiedimai ir plokštelės inkubuojamos 1 h KT purtant. Po inkubacijos plokštelės praplaunamos, įpilama su PBS-T 5000 kartų skiesto HRP konjuguotų antrinių ožkos antikūnų specifiškų pelės IgG po 50 µl/šul ir inkubuojama 1 h KT purtant. Tuomet plokštelė plaunama ir ryškinama pagal 2.2.16.1 skyriuje nurodytą metodiką. Pagal gautus rezultatus brėžiama titravimo kreivė pagal OT priklausomybę nuo antikūnų koncentracijos, nustatomos tariamosios disociacijos konstantos – K_d atitinkančios antikūnų koncentraciją, kuriai esant MAk prisijungia prie pusės tirpale esančio antigeno.

2.2.16.3. Konkurencinė imunofermentinė analizė

MAk epitopų pasiskirstymui nustatyti buvo atlikta konkurencinė IFA. Plokštelėse imobilizuojamas antigenas, blokuojama ir plaunama pagal 2.2.16.1 skyriuje aprašytą metodiką. Po blokavimo į šulinėlius įpilama po 50 µl nežymėtų MAk skiestų PBS-T iki 5 µg/ml. Inkubuojama 1 h KT ant purtyklės. Po inkubacijos įpilama dar po 50 µl žymėtų MAk–HRP, kurie atskiesti PBS-T pagal tiesioginės IFA rezultatus, inkubuojama 1 h KT purtant. Po inkubacijos plokštelė plaunama, ryškinama pagal 2.2.16.1 skyriuje nurodytą metodiką. Konkurencija tarp MAk vertinama pagal optinio tankio sumažėjimą lyginant su MAk–HRP kontrole (kontrolėje nededama nežymėtų MAk). Kontrolės OT laikomas maksimaliu (100 %), o konkurencijos efektas išreiškiamas procentais: 100 % – konkurencijos nėra, 50 % – vidutinė konkurencija, 0 % – visiška konkurencija.

2.2.16.4. Citokinų ir chemokinų nustatymas dviepitopės imunofermentinės analizės metodu

Pelės citokinų ir chemokinų (CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL16, CCL8, IL-10, IL-1β ir TNF-α) koncentracijos ląstelių kultūrų supernatantuose buvo nustatytos naudojant komercinius dviepitopės IFA rinkinius. Analizė atliekama pagal gamintojų nurodymus. Pirmiausiai, 96 šulinėlių plokštelės padengiamos citokinus/chemokinus sugaunančiais antikūnais 100 µl/šul. ir inkubuojamos per naktį 4 °C temperatūroje. Kitą dieną su plovimo b. t. plokštelė plaunama, blokuojama su rinkinio blokavimo b. t. 250 µl/šul. ir inkubuojama 1 h KT ant purtyklės. Tuo metu paruošiamas standartas ir atskiedžiami supernatantai (skiedžiama santykiu nuo 1:1 iki 1:200, priklausomai nuo citokino/chemokino sekrecijos lygio ląstelėse), įpilama po 100 µl/šul., atliekami standarto serijiniai skiedimai ir inkubuojama 4 °C temperatūroje per naktį. Po inkubacijos plokštelės plaunamos ir įnešama

100 µl/šul. detekcijos antikūnų, su kuriais plokštelės inkubuojamos 1 h KT purtant. Vėliau vykdomas plovimas, pilama po 100 µl/šul. streptavidino-HRP konjugato ir inkubuojama 30 min KT. Prieš ryškinimą plokštelės plaunamos. Tuomet į šulinėlius įpilama 100 µl/šul. substrato, reakcijos vystymasis stebimas 15–20 min ir reakcija stabdoma pridedant 50 µl/šul. H_2SO_4 tirpalo. Sugertis matuojama ties 450 nm bangos ilgiu, atimant vertes nustatytas 570 nm bangos ilgiu. Pagal standarto skirtingų serijinių skiedimų sugertį sudaroma kalibracinė kreivė, kuri pritaikoma citokinų koncentracijos nustatymui.

2.2.17. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta naudojant *GraphPad Prism 10.1.0* programinę įrangą (*GraphPad Software, Inc., La Jolla,* JAV). Duomenys pateikti stačiakampėmis diagramomis, parodančiomis minimalią vertę, pirmąją kvartilę, medianą, trečiąją kvartilę ir maksimalią vertę, arba stulpelinėmis diagramomis (vidurkis ± SD). Diagramose pateikiami taškai, nurodantys atskirus pakartojimus (N). N atitinka skirtingus mikroglijos surinkimus atliekamus iš nepriklausomai paruoštų pirminių kultūrų. Kiekvienas nepriklausomas eksperimentas atspindi atskirą mikroglijos ląstelių surinkimą. *Shapiro-Wilk* normalumo testu buvo vertinta, ar duomenys pasiskirstę pagal Gauso skirstinį. Poveikių skirtumai buvo lyginami taikant vieno faktoriaus dispersinę analizę (ANOVA) su *Tukey* daugkartinių palyginimų testu arba priklausomų imčių *Studento t* testu. Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$: *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; ****$p < 0,0001$.

3. REZULTATAI

Šiuo darbu siekta ištirti virusinių antigenų ir jiems specifiškų antikūnų formuojamų IK sukeliamo atsako pobūdį ir mechanizmus mikroglijos ląstelėse. Tyrimo metu pirminė pelės mikroglijos kultūra buvo veikiama IK, sudarytais iš virusinių antigenų – VPD ir specifiškų šioms VPD pelės MAk. Buvo naudojami skirtingų poklasių pelės MAk, gauti hibridomų technologijos būdu (116). Tyrimo modelis ir objektas pagrįstas anksčiau atliktais tyrimais, kuriais įrodyta, kad rekombinantinės VPD sukelia uždegiminį atsaką žmogaus ir pelių monocitų kilmės makrofaguose, o MAk ir VPD sudaryti IK sukelia panašią reakciją – uždegiminių citokinų sekreciją, kaip VPD (9,176). Be to, buvo žinoma, kad pelių pirminės mikroglijos kultūroje oligomeriniai baltymai aktyvina inflamasomą (177). Todėl remiantis šiais duomenimis, pirminė pelės mikroglija pasirinkta kaip audinių makrofagų modelis, su kuriuo atlikti VPD ir IK sukeliamo uždegiminio atsako tyrimai.

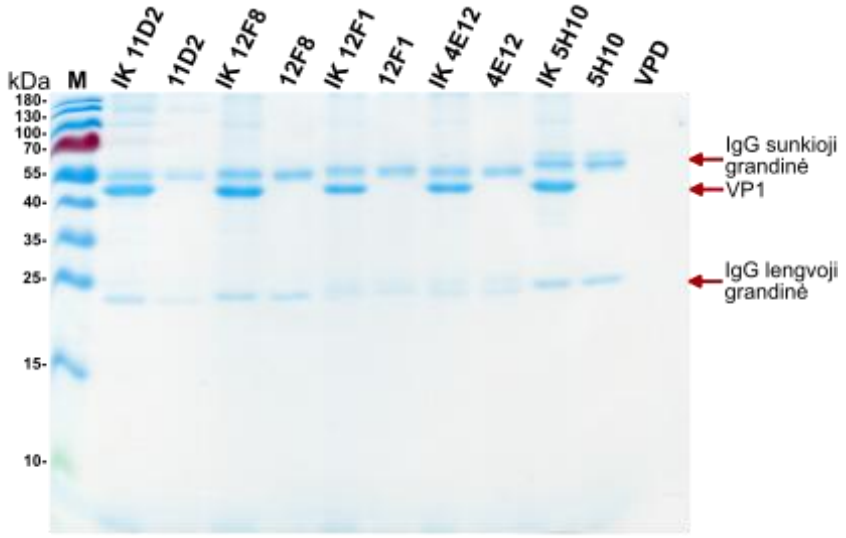
3.1. Mikroglijos ląstelių aktyvinimas VPD ir IK

Pirmojoje tyrimo dalyje, siekiant nustatyti IK savybes, darančias įtaką mikroglijos ląstelių uždegiminio atsako fenotipui, buvo pasitelkti antikūnų ir IK apibūdinimo metodai – imunoprecipitacija, konkurencinė IFA, spektrinė elipsometrija. Šiais metodais patvirtintas IK formavimasis, apibūdintos IK sudarančių antikūnų kinetinės ir funkcinės savybės, tarp jų – afiniškumas, konkurencija dėl epitopų padengimo ir kitos savybės. Pirmieji rezultatai atskleidė kiekvieno virusinio IK charakteristikas, kurios toliau buvo lyginamos su jų sukeliamu imuniniu atsaku mikroglijos ląstelėse. Imuninis atsakas vertintas pagal chemokinų ir citokinų sekreciją IFA metodu bei analizuojant NLRP3 inflamasomos aktyvinimą. Inflamasomos aktyvinimas patvirtintas siRNR nukreiptos į NLRP3 koduojančią mRNR interferencijos metodu. Remiantis gautais rezultatais, nustatytos IK savybės, lemiančios mikroglijos ląstelių atsako stiprumą ir pobūdį.

3.1.1. IK formavimasis ir fagocitozė

IK formavimui buvo pasitelkti virusiniai baltymai – VPD ir joms specifiški trijų skirtingų IgG poklasių MAk. Prieš analizuojant sąveiką su mikroglijos ląstelėmis, tirtas IK susidarymas imunoprecipitacijos metodu. Po IK susiformavimo ant magnetinių rutuliukų, eliucijos tirpalu kompleksai denatūruoti ir pašalinus magnetinius rutuliukus atlikta galutinio

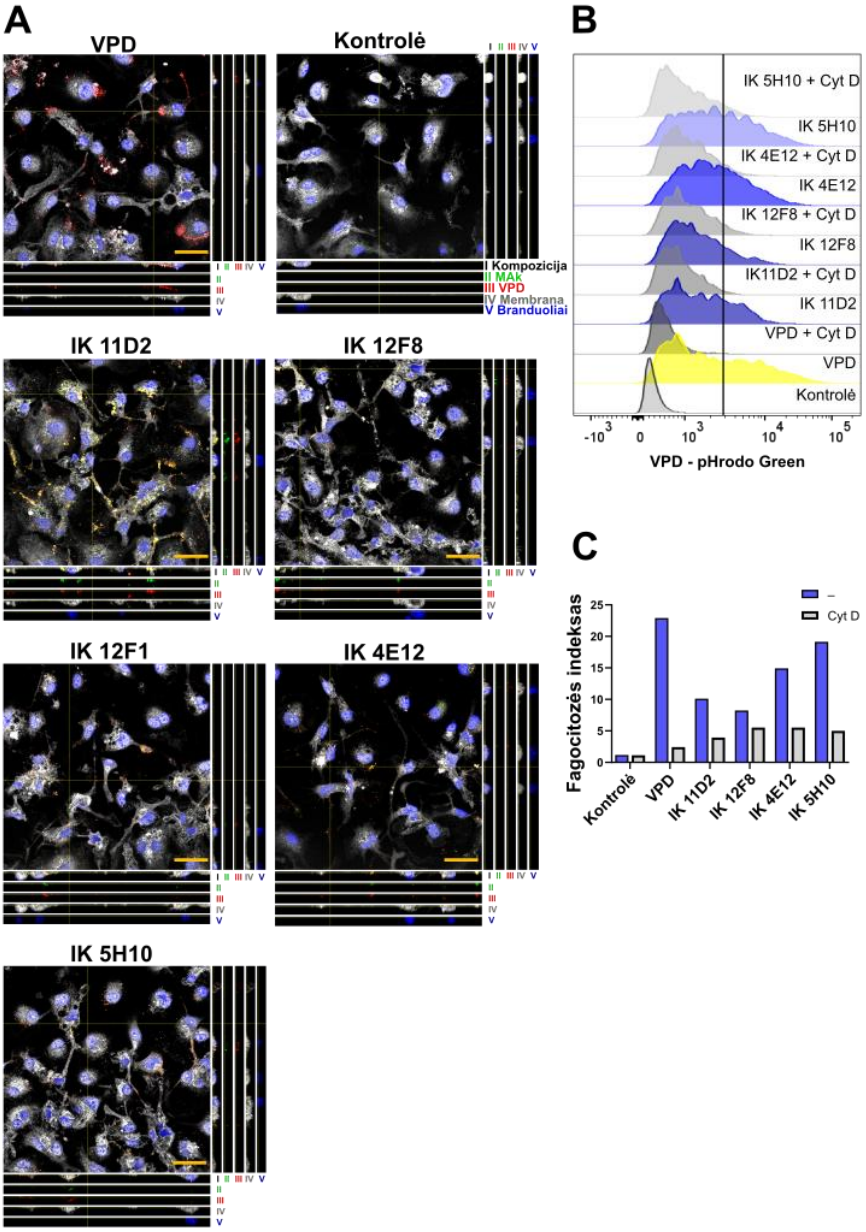
imunoprecipitacijos tirpalo elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis. Gelyje buvo matomos VPD sudarančio ~40 kDa dydžio baltymo VP1 ir MAk ~55 ir ~25 kDa dydžio IgG sunkiųjų ir lengvųjų grandinių atitinkamos juostos. Tai patvirtino, kad visi naudoti MAk formuoja IK su VPD (3.1 pav.). Kontroliniuose mėginiuose, kai į tirpalą su magnetiniais rutuliukais buvo dedami tik MAk arba tik VPD, neaptikta pašalinių baltymų juostelių.



3.1 pav. IK vertinimas imunoprecipitacijos metodu. Imunoprecipitacijos mėginiai frakcionuoti baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis poliakrilamido gelyje metodu. M – baltymų molekulinės masės standartas. 11D2, 12F8, 12F1, 4E12, 5H10 – MAk klonai.

Toliau siekiant išsiaiškinti, ar susiformavę IK patenka į ląsteles, pirminės mikroglijos ląstelės buvo veikiamos IK, kurių patekimas tirtas imunocitochemijos metodu. Po poveikio IK, mikroglijos ląstelės fiksuotos, permeabilizuotos, o kompleksus sudarantys VPD ir MAk atskirai išryškinti jiems specifiškais antikūnais. Analizuojant ląstelių nuotraukas, gautas fluorescenciniu mikroskopu, buvo užfiksuota VPD ir MAk signalų kolokalizacija ląstelėse (3.2 A pav.). Tai parodė, kad susiformavę IK patenka į mikroglijos ląsteles. Galutiniam IK endocitozės patvirtinimui buvo panaudota pH pokyčiams jautri baltymų žymė – pHrodo ir nuo aktino priklausomos endocitozės slopiklis Citochalazinas D (Cyt D). Mikroglijos ląstelės buvo veikiamos Cyt D ir vėliau IK, kuriuos sudarė pHrodo žyme pažymėtos VPD. Tėkmės citometrijos metodu patvirtinta, kad VPD ir IK veiksmingai fagocituojami mikroglijos ląstelių – stebėtas pHrodo

fluorescencinis signalas, atsirandantis po baltymų patekimo į endosomas, o Cyt D slopino pHrodo signalą mikroglijos ląstelėse (3.2 B, C pav.). Šie rezultatai patvirtino IK susidarymą ir fagocitozę, todėl kitame etape buvo apibūdinti MAk ir jų sudaromi IK.

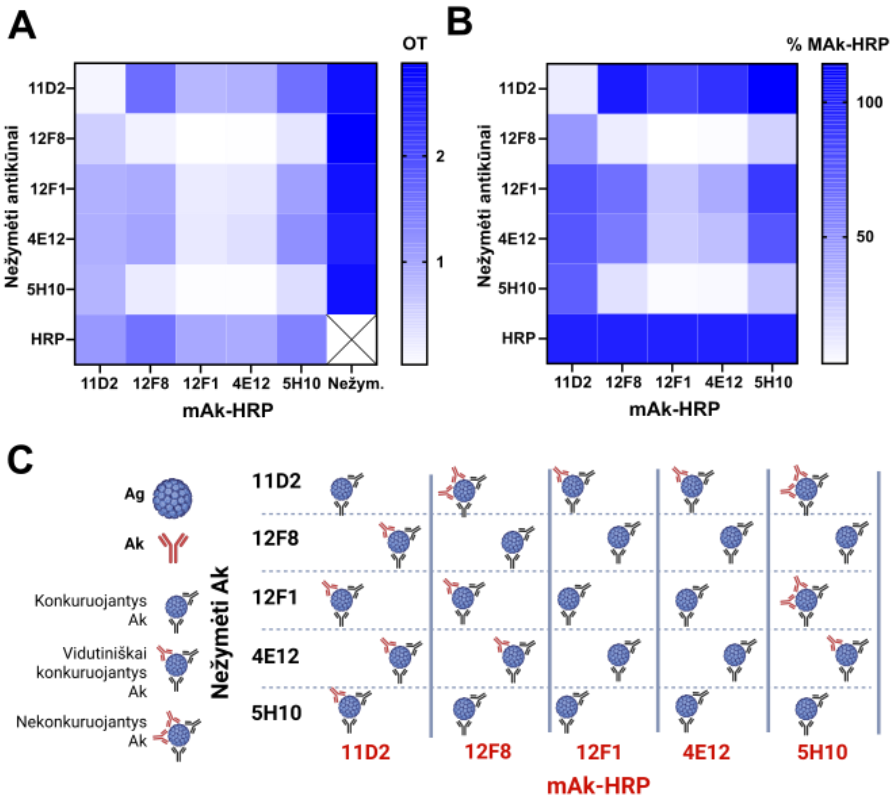


3.2 pav. VPD ir IK endocitozė mikroglijos ląstelėse. (A) Ląstelės buvo veiktos VPD (20 µg/ml) ir MAK (7,5 µg/ml) 24 h ir dažytos antikūnais specifiškais

pelės MAk (žalia), VPD (raudona), ląstelės membranos dažu *DeepRed Membrane Stain* (pilka) ir branduolio dažu *Hoechst33342* (mėlyna). Eksperimentas kartotas 3 kartus, paveiksle yra vieno eksperimento reprezentatyvūs vaizdai. Pateikiami 4 kadrų (z = 4) iš 28 kompoziciniai vaizdai ir ortogonalios projekcijos. 3D 184,52 × 184,52 µm dydžio ir 8,06 µm storio vaizdai buvo padaryti *Leica TCS SP8* konfokaliniu mikroskopu, naudojant 63 × aliejaus imersijos objektyvą. Mastelis 30 µm. 11D2, 12F8, 12F1, 4E12, 5H10 – MAk klonai. (B–C) Ląstelės buvo veiktos pHrodo žyme dažytomis VPD (10 µg/ml) ir MAk (7,5 µg/ml) 3 h, o endocitozės inhibitorius Cyt D buvo pridėtas 30 min prieš poveikį. (B) Pateikiamos vieno eksperimento reprezentatyvios histogramos. (C) pHrodo dalelių fagocitozės indeksas: duomenys pateikiami kaip vidutinis fluorescencinis intensyvumas padaugintas iš pHrodo fagocitavusių ląstelių procento.

3.1.2. MAk epitopų analizė

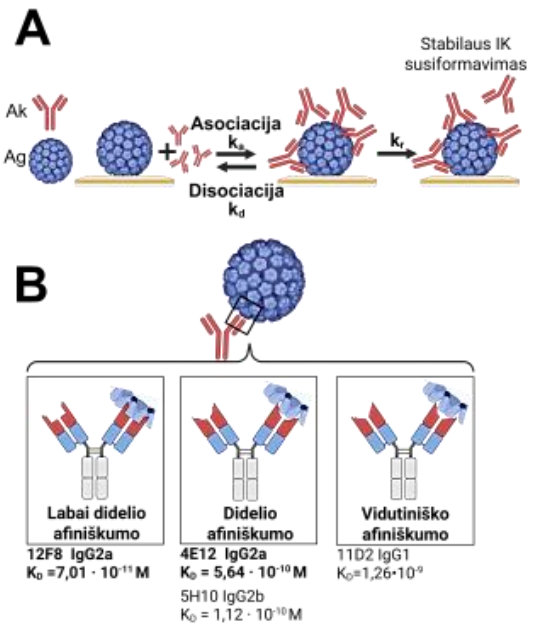
IK charakterizavimas pradėtas nuo juos sudarančių skirtingų antikūnų epitopų analizės konkurencinės IFA metodu. Iš anksčiau buvo žinoma, kad visi tyrime naudoti MAk atpažįsta ketvirtinę VPD sudarančio baltymo – VP1 struktūrą ir visi MAk išskyrus 11D2 kloną, jungiasi prie pirminės (denatūruoto) VP1 baltymo struktūros (116). 11D2 MAk jungiasi tik prie ketvirtinės struktūros ir atpažįsta skirtingą konformacinį epitopą, tai patvirtino ir konkurencinės IFA rezultatai (3.3 Pav.). 11D2 MAk prisijungus prie VPD, kiti antikūnai taip pat jungėsi prie savo epitopų. Be to, kai kiti MAk prisijungia prie VPD, mažesnis 11D2 MAk kiekis jungiasi su VPD (3.3 pav.). Tarp 12F8 ir 5H10 MAk nustatyta konkurencija dėl jungimosi su VPD įrodo, kad šie MAk atpažįsta panašius epitopus (3.3 pav.). Kiti MAk, išskyrus 11D2, negali jungtis prie VPD po 12F8 ar 5H10 MAk prisijungimo, nors tiek 12F8 MAk, tiek 5H10 MAk gali jungtis prie VPD, po 4E12 ir 12F1 MAk (3.3 pav.). Tai rodo, kad 12F8 ir 5H10 MAk atpažįsta kitokius epitopus, nei 4E12 ir 12F1 MAk. Tikėtina, kad 12F8 ir 5H10 MAk sukelia konformacinius VPD pokyčius arba padengia daugelį VPD epitopų ir neleidžia prisijungti 12F1 ir 4E12 MAk. Be to, 12F1 ir 4E12 MAk užima panašius epitopus, nes tarpusavyje stipriai konkuruoja dėl prisijungimo prie VPD (3.3 pav.). Dėl šių to paties poklasio antikūnų panašumo tolimesniuose IK apibūdinimo tyrimuose naudoti tik 4E12 MAk. Apibendrinant konkurencinės IFA rezultatus, 4E12 ir 12F1 MAk atpažįsta tuos pačius persidengiančius epitopus, 12F8 ir 5H10 MAk – labai panašius epitopus, 11D2 MAk – visiškai skirtingą epitopą, o 4E12, 12F1, 12F8 ir 5H10 MAk artimus epitopus.



3.3 pav. Antikūnų apibūdinimas pagal konkurenciją dėl epitopų. Konkurencija tarp kiekvieno MAk jungiantis prie epitopų vertinta konkurencinės IFA metodu. Pirmiausia, nežymėti MAk buvo inkubuojami su VPD ir vėliau įdėti MAk-HRP. (A) OT vertės rodančios MAk-HRP gebėjimą jungtis prie VPD jau prisijungus nežymėtiems MAk. Konkurencingumo įvertinimui kiekvieno MAk-HRP kontrolinė OT vertė laikoma maksimalia (100%). (B) MAk-HRP jungimosi procentinė išraiška. 100 % rodo konkurencijos nebuvimą, 50% – vidutinę konkurenciją, o 0% – stiprią konkurenciją. (C) Reprezentatyvi MAk-HRP (raudoni) jungimosi prie VPD schema po nežymėtų MAk (juodi) prisijungimo. MAk-HRP nebuvimas ant VPD reiškia, pilnai okupuotą epitopą kitais MAk, vienas MAk-HRP ant antigeno žymi jungimąsi prie artimo epitopo nežymėtam antikūnui, o du MAk-HRP ant antigeno žymi, kad MAk-HRP jungiasi prie skirtingų epitopų nei nežymėti MAk. 11D2, 12F8, 12F1, 4E12, 5H10 – MAk klonai. C schema sukurta *BioRender.com*.

3.1.3. MAk ir IK apibūdinimas spektrinės elipsometrijos metodu

Bendradarbiaujant su prof. dr. I Plikusienės grupe iš VU Chemijos ir Geomokslų fakulteto, apibūdintas MAk afiniškumas ir jų termodinaminės savybės. Buvo pritaikytas didelio jautrumo fizikinis metodas – spektrinė elipsometrija (SE). SE metodu matuojamas poliarizuotos šviesos būsenos pokytis, kai ji atspindima nuo mėginio. Tai leidžia stebėti baltymų monosluoksnio lūžio rodiklio ir storio pokyčius ant jutiklio paviršiaus jų susidarymo metu. Kinetinės VPD ir MAk sąveikos konstantos – afiniškumo konstantos (K_D) ir asociacijos greičio konstantos (k_a) (3.4 A pav.) buvo apskaičiuotos eksperimentiškai išmatavus SE metodu ir pritaikius atitinkamą matematinį modelį (3.1 lentelė). Pagal nustatytą afiniškumą (K_D vertę) MAk buvo suskirstyti į tris grupes: vidutinio, didelio ir labai didelio (3.4 B pav.) afiniškumo. 12F8 apibūdintas kaip labai didelio afiniškumo su verte 0,07 nM, 4E12 ir 5H10 – didelio afiniškumo, kurių vertės siekia 0,564 nM ir 0,112 nM, o 11D2 – vidutinio afiniškumo, vertė 1,26 nM. Atliktas MAk afiniškumo charakterizavimas parodė jų skirtumus ir papildė konkurencinės IFA rezultatus. 12F8 ir 5H10 MAk afiniškumo skirtumas patvirtina šių antikūnų skirtingumą, nors pagal konkurencinės IFA duomenis jie jungiasi prie arti viena kitos esančių VP1 vietų.



3.4 pav. IK afiniškumo nustatymas SE metodu. (A) IK formavimosi žingsnių schema, VPD minimas kaip antigenas. (B) VPD jungimosi su įvairaus

afiniškumo MAk schema. Afiniškumas pateikiamas K_D vertėmis, kurios pažymėtos prie kiekvieno antikūno, IgG2a poklasio antikūnų K_D vertės paryškintos. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAk klonai. A ir B schemos sukurtos *BioRender.com*

Asociacijos greičio konstantos (k_a) duomenys parodė, kad 12F8 išsiskiria tuo, kad per sekundę prie VPD prisijungia mažiausias MAk kiekis, lyginant su kitais MAk (3.1 lentelė). Kitų MAk k_a vertės buvo panašios, nors 4E12 MAk prie VPD prisijungė greičiau, nei kiti. Disociacijos greičio konstanta (k_d) parodė, kad 12F8 disocijuoja lėčiau nei kiti MAk (3.1 lentelė). Taip pat apskaičiavus stabilaus IK susidarymo greičio konstantą (k_r), kuri atitinka laiką, reikalingą tvirtam IK susidaryti, paaiškėjo, kad stabiliam 12F8 IK susidaryti reikėjo daugiausiai laiko (3.1 lentelė). Šie duomenys rodo, kad labai didelio afiniškumo MAk ypač greitai jungiasi prie antigeno, tačiau stabilaus IK susidarymas yra ilgiau trunkantis procesas.

3.1 lentelė. SE metodu nustatytos IK formavimosi kinetinės konstantos.

Γ^{SE}, ng/cm^2	k_a, M^{-1} s^{-1}	k_d, s^{-1}	k_r, s^{-1}	K_A, M^{-1}	K_D, M
VPD					
392	–	–	–	–	–
IgG1 MAk 11D2					
51,3	$1{,}76\cdot10^{4}$	$2{,}21\cdot10^{-4}$	$1{,}97\cdot10^{-5}$	$7{,}96\cdot10^{8}$	$1{,}26\cdot10^{-9}$
IgG2a MAk 12F8					
44,9	$8{,}80\cdot10^{3}$	$6{,}18\cdot10^{-7}$	$1{,}78\cdot10^{-7}$	$1{,}43\cdot10^{10}$	$7{,}01\cdot10^{-11}$
IgG2a MAk 4E12					
28,4	$2{,}48\cdot10^{4}$	$1{,}40\cdot10^{-5}$	$6{,}40\cdot10^{-6}$	$1{,}77\cdot10^{9}$	$5{,}64\cdot10^{-10}$
IgG2b MAk 5H10					
60,9	$1{,}27\cdot10^{4}$	$1{,}42\cdot10^{-6}$	$1{,}56\cdot10^{-6}$	$8{,}93\cdot10^{9}$	$1{,}12\cdot10^{-10}$

Γ^{SE} – sausų baltymų paviršiaus masės tankis, k_a – asociacijos greičio konstanta, k_d – disociacijos greičio konstanta, k_r – stabilaus IK susiformavimo greičio konstanta, K_A – asociacijos konstanta, K_D – disociacijos konstanta.

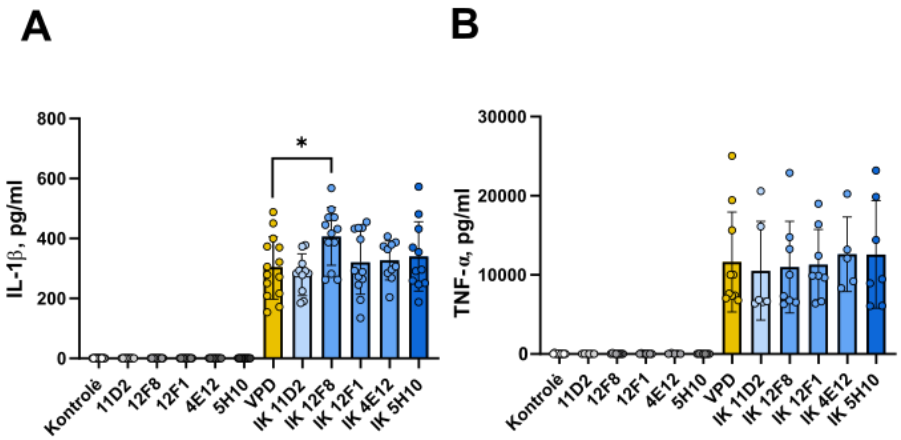
Sausų baltymų paviršiaus masės tankis (Γ^{SE}) rodo prie konkretaus antigeno prisijungusių MAk kiekį ir buvo apskaičiuotas remiantis SE matavimais pastoviosios būsenos sąlygomis (3.1 lentelė). Mažiausia Γ^{SE} vertė – 28,4 ng/cm² – buvo apskaičiuota po 4E12 IK susidarymo. 11D2 ir 5H10

MAk suformuoti IK išsiskyrė didžiausia paviršiaus masės tankio verte tarp visų tiriamųjų (11D2 Γ^{SE} = 51,3 ng/cm² ir 5H10 Γ^{SE} = 60,9 ng/cm²). Didžiausio afiniškumo 12F8 MAk neišsiskyrė pagal MAk masę ant VPD sluoksnio, gauta vidutinė vertė (Γ^{SE} = 44,9 ng/cm²).

Kinetinius matavimus ir skaičiavimus atliko prof. dr. Ieva Plikusienė ir dokt. Silvija Juciutė (VU Chemijos ir Geomokslų fakultetas, Chemijos institutas).

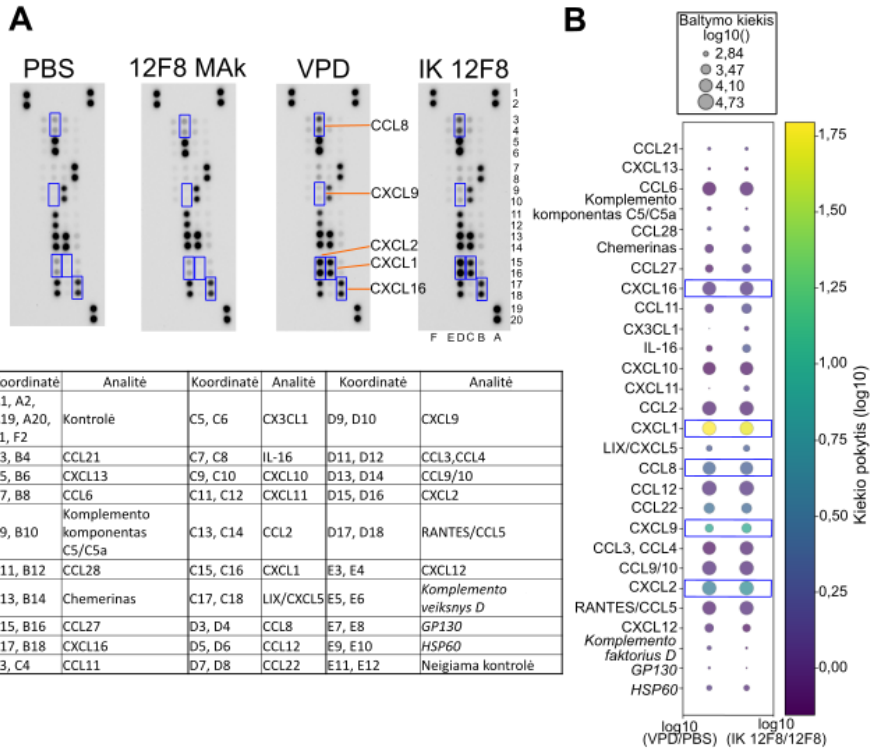
3.1.4. VPD ir IK sukeliamos uždegiminių molekulių sekrecijos analizė mikroglijos ląstelėse

Pirmiausia, prieš tiriant detaliau ląstelinį atsaką į VPD ir IK, mikroglijos ląstelių atsakas buvo sugretintas su anksčiau publikuotais monocitų kilmės makrofagų duomenimis (9,176). Nustatyta, kad VPD sukėlė TNF-α (3.5 B pav.) ir IL-1β sekreciją (3.5 A pav.) mikroglijos ląstelėse. Šių citokinų sekrecija taip pat vyksta monocitų kilmės makrofaguose, aktyvintuose virusiniais baltymais. Taigi, pelių mikroglijos kultūra buvo pasirinkta kaip tinkamas modelis makrofagų aktyvinimo, kurį sukelia iš MAk ir VPD sudaryti IK, tyrimams.



3.5 pav. VPD ir IK indukuota citokinų sekrecija mikroglijos ląstelėse. Ląstelės buvo veiktos VPD (20 µg/ml) ir MAk (7,5 µg/ml) 24 h. (A) IL-1β, N = 10–14, (B) TNF-α, N = 5–10, sekrecija nustatyta IFA metodu. Duomenys pateikiami stulpelinėmis diagramomis su taškais, rodančiais nepriklausomų eksperimentų skaičių (N), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, pritaikyta vienkryptė ANOVA, po kurios atliktas *Tukey* daugkartinis palyginimo testas. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAk klonai.

Taip pat šie citokinai svarbūs VPD ir IK sukelto uždegiminio atsako vertinimui, nes TNF-α siejamas su NF-κB kelio aktyvinimu, o IL-1β yra vienas iš pagrindinių inflamasomos aktyvinimo rodiklių. TNF-α buvo išskiriamas mikroglijos ląsteles paveikus tiek VPD, tiek IK ir nebuvo pastebėta jokių skirtumų tarp tik VPD arba IK sukeltos sekrecijos (3.5 B pav.). Tačiau IL-1β atveju nustatyta, kad IK skatino didesnį citokino išsiskyrimą mikroglijos ląstelėse nei tik VPD. IK, sudaryti iš didžiausiu afiniškumu pasižymėjusių IgG2a poklasio 12F8 MAk, sukėlė reikšmingai didesnę IL-1β sekreciją (3.5 A pav.). Be to, tarp kitų dviejų IgG2a poklasio MAk 12F1 ir 4E12 formuojamų IK poveikio ląstelėms nebuvo aptikta skirtumų, todėl visuose tolimesniuose eksperimentuose naudoti tik 4E12 MAk IK.



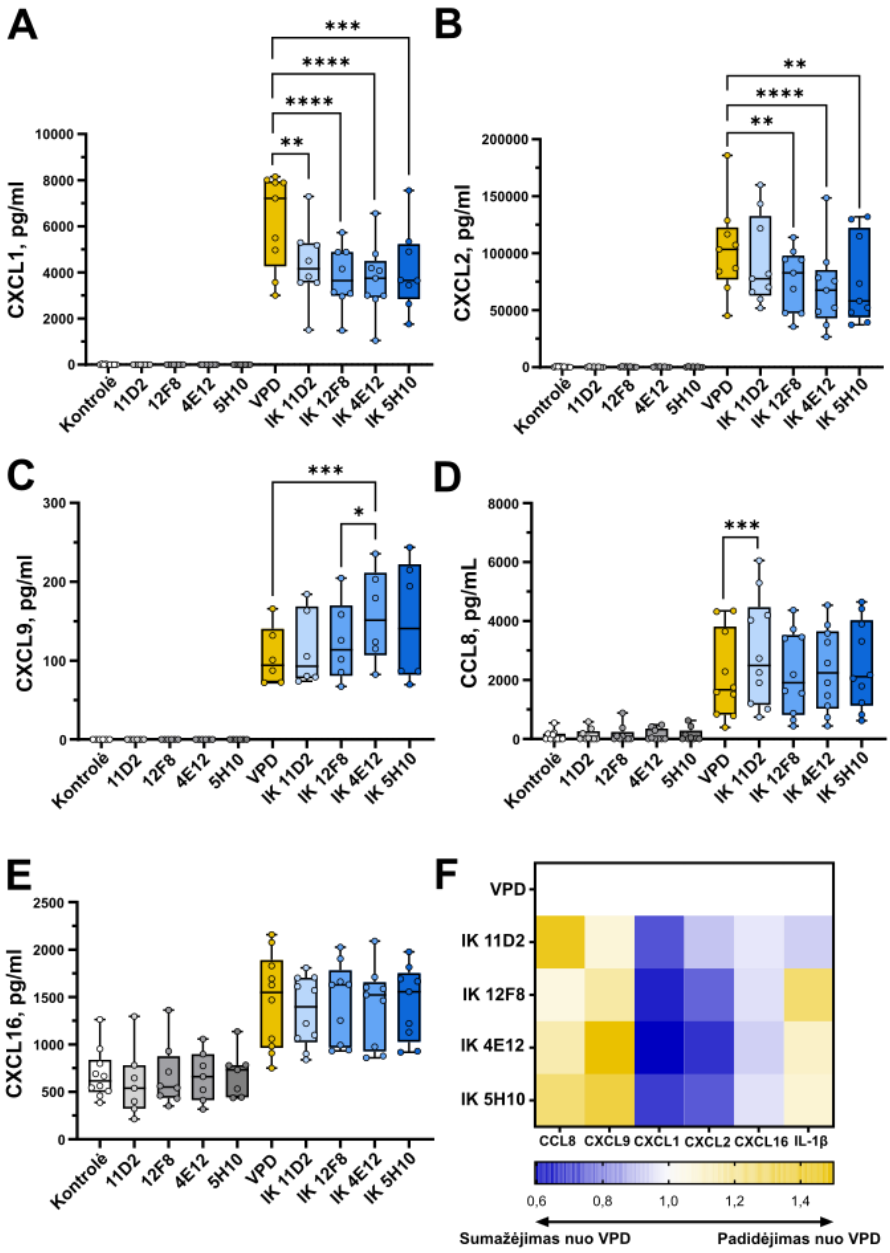
Koordinatė	Analitė	Koordinatė	Analitė	Koordinatė	Analitė
A1, A2, A19, A20, F1, F2	Kontrolė	C5, C6	CX3CL1	D9, D10	CXCL9
B3, B4	CCL21	C7, C8	IL-16	D11, D12	CCL3,CCL4
B5, B6	CXCL13	C9, C10	CXCL10	D13, D14	CCL9/10
B7, B8	CCL6	C11, C12	CXCL11	D15, D16	CXCL2
B9, B10	Komplemento komponentas C5/C5a	C13, C14	CCL2	D17, D18	RANTES/CCL5
B11, B12	CCL28	C15, C16	CXCL1	E3, E4	CXCL12
B13, B14	Chemerinas	C17, C18	LIX/CXCL5	E5, E6	*Komplemento veiksnys D*
B15, B16	CCL27	D3, D4	CCL8	E7, E8	*GP130*
B17, B18	CXCL16	D5, D6	CCL12	E9, E10	*HSP60*
C3, C4	CCL11	D7, D8	CCL22	E11, E12	Neigiama kontrolė

3.6 pav. VPD ir IK sukeltos mikroglijos ląstelių chemokinų sekrecijos analizė. Ląstelės buvo veiktos VPD (20 µg/ml) ir MAk (7,5 µg/ml) 24 h, N = 1. (A) Chemokinų sekrecija įvertinta naudojant „*Proteomic Chemokine Profile Array*“ rinkinį. Pateikiamas keturių išryškintų membranų sujungtas vaizdas. Kiekviena membrana atitinkamai atspindi kontrolę (PBS), antikūnų kontrolę (tik 12F8 MAk), VPD ir IK 12F8. Chemokinų koordinatės pateiktos lentelėje

po membranomis, kursyvu pažymėti kontroliniai mėginiai – baltymai, paprastai esantys ląstelių kultūrų supernatantuose ir naudojami kaip teigiama kontrolė. (B) Burbuline diagrama pateikti chemokinų kiekio pokyčiai, pirmame stulpelyje tarp VPD ir PBS kontrolės, antrame stulpelyje tarp IK 12F8 ir MAk 12F8 kontrolės. Burbuliuko dydis atspindi santykinį baltymo kiekį VPD ir IK 12F8 poveikio metu, o spalva kiekio pokytį nuo PBS ir 12F8 kontrolių. Mėlyni stačiakampiai žymi atrinktus chemokinus, kuriuos buvo numatyta tirti IFA metodu.

Toliau siekiant ištirti, ar IK sukėlė kitus uždegiminius procesus, buvo vertinta uždegiminių chemokinų sekrecija. Pirmiausia preliminariam chemokinų sekrecijos nustatymui buvo pasitelktas „*Proteome Profiler Mouse Chemokine Array Kit“* rinkinys. Šiuo rinkiniu buvo ištirtas mikroglijos ląstelių supernatantas po poveikio VPD ir IK 12F8 (3.6 pav.). Pastebėta, kad keletas chemokinų sekretuojami baziniu lygiu paveikus tik PBS ar MAk kontrole, o po poveikio VPD ir IK sekrecija padidėja (3.6 A pav.). Remiantis šiais rezultatais, atrinkta keletas chemokinų – CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL16, CCL8 – tolesniam vertinimui IFA metodu. Pasirinkimas taip pat buvo pagrįstas ankstesniais duomenimis apie pelės makrofagų / mikroglijos ląstelių sekretuojamus chemokinus virusinės infekcijos metu ir jų klasifikacija į uždegiminius chemokinus pelėje ir žmoguje (178,179).

IFA metodu ištyrus mikroglijos kultūros supernatantus buvo nustatyta, kad VPD ir IK skatina pasirinktų chemokinų sekreciją (3.7 A–E pav.). Lyginant su virusiniais baltymais, skirtingų MAk suformuoti IK arba sumažino, arba padidino chemokinų sekreciją. Visi IK sumažino CXCL1 ir CXCL2 chemokinų, reguliuojančių inflamasomos aktyvinimą, išsiskyrimą lyginant su VPD (3.7 A, B, F pav.). Tačiau CXCL2 sekrecijos sumažėjimas po poveikio IgG1 poklasio MAk formuojamais IK buvo nežymus (3.7 B, F pav.). CXCL9 chemokino, susijusio su stipriu antivirusiniu atsaku, sekrecija buvo padidėjusi veikiant IK – šis rezultatas skyrėsi nuo tik VPD sukelto poveikio. Tačiau didžiausias ir reikšmingas CXCL9 išsiskyrimo padidėjimas buvo nustatytas ląsteles paveikus IgG2a poklasio 4E12 MAk formuojamais IK (3.7 C, F pav.). Kito uždegiminio chemokino – CCL8 – sekrecija žymiai padidėjo tik IK 11D2 poveikio atveju (3.7 D, F pav.). VPD taip pat skatino limfocitus pritraukiančio chemokino CXCL16 sekreciją, tačiau jokių skirtumų tarp IK ir VPD poveikio nebuvo (3.7 E, F pav.). Šis chemokinas, kuris turėtų būti išskiriamas uždegiminėmis sąlygomis, taip pat buvo sekretuojamas baziniu lygiu ląstelių kultūroje.



3.7 pav. VPD ir IK sukelta uždegiminių chemokinų sekrecija mikroglijos ląstelėse. Ląstelės buvo veiktos VPD (20 µg/ml) ir MAk (7,5 µg/ml) 24 h. (A) CXCL1, N = 8–9, (B) CXCL2, N = 9, (C) CXCL9, N = 6, (D) CCL8, N = 10, (E), CXCL16, N = 9 sekrecija nustatyta IFA metodu. (F) IK sukeltos chemokinų sekrecijos palyginimas su VPD. Siekiant įvertinti pokyčius nuo VPD poveikio, vidutinės chemokinų koncentracijos buvo normalizuotos pagal

VPD vertes, kurios laikomos 1,0. Abipusė rodyklė rodo didesnę (geltona) arba mažesnę (mėlyna) chemokinų sekreciją, palyginus su VPD. Duomenys pateikiami stačiakampėmis diagramomis su taškais, rodančiais nepriklausomų eksperimentų skaičių (N), pritaikyta vienkryptė ANOVA, po kurios atliktas *Tukey* daugkartinis palyginimo testas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAk klonai.

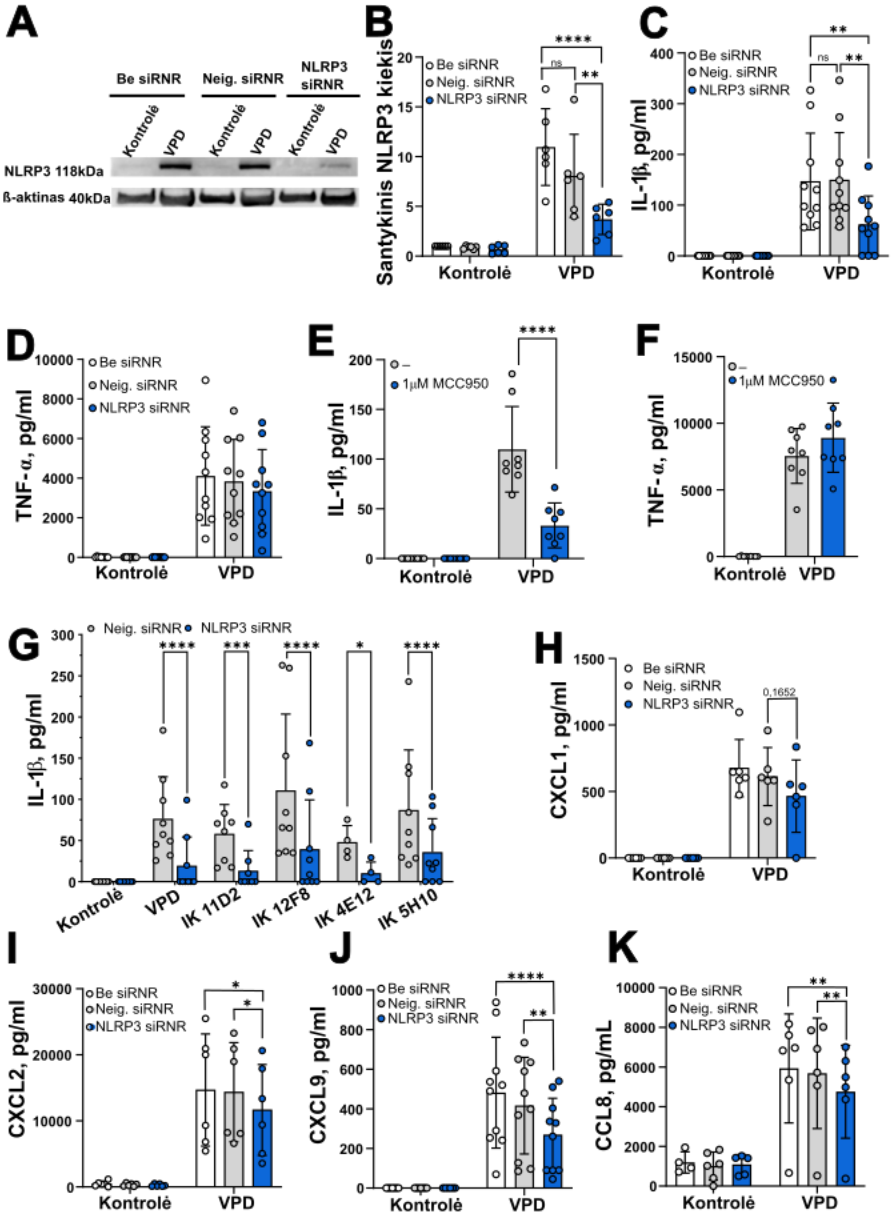
Be to, palyginus MAk afiniškumą ir IK sukeltą uždegiminių molekulių sekreciją mikroglijos ląstelėse, matoma, kad tik IK, sudaromi didžiausio afiniškumo 12F8 MAk, sukelia reikšmingai didesnę IL-1β sekreciją (3.5 A pav.). Taip pat tirti IK sukėlė jiems būdingą uždegiminių chemokinų sekreciją. Nepaisant skirtingo MAk afiniškumo, visi IK slopino CXCL1 ir CXCL2 sekreciją, išskyrus IK 11D2, kuris nesukėlė reikšmingo CXCL2 sekrecijos pokyčio (3.7 F pav.). Taip pat šio komplekso unikalumą patvirtino reikšmingai didesnė CCL8 sekrecija po poveikio IK 11D2 (3.7 D pav.). CXCL9 išsiskyrimas reikšmingai padidėjo, veikiant IK 4E12 ir žymiai skyrėsi nuo IK 12F8, formuojamų to paties IgG2a poklasio MAk (3.7 C pav.). Lyginant IK formuojamus IgG2a/b MAk, pastebėta tendencija, kad kuo mažesnio afiniškumo MAk, tuo didesnė CXCL9 sekrecija, lyginant su tik VPD (3.4 B, 3.7 F pav.). Šie rezultatai parodė, kad IK sudarančių MAk poklasis ir, ypač afiniškumas daro didelę įtaką IK sukeliamo uždegiminio atsako stiprumui.

3.1.5. NLRP3 inflamasomos aktyvinimo analizė mikroglijos ląstelėse

Toliau tirta, ar IK ir jų savybės yra susijusios su inflamasomos aktyvinimu mikroglijos ląstelėse. Tam buvo pasitelktas specifinis inflamasomos slopiklis MCC950 ir siRNR interferencijos metodas, kuomet siRNR nukreipta į NLRP3 koduojančią mRNR, blokuoja NLRP3 inflamasomos aktyvinimui reikalingo receptoriaus sintezę. Tyrimo, kuriame pritaikytas siRNR interferencijos metodas, neigiama kontrole buvo siRNR, nenukreipta į jokį taikinį. Po sintezės NLRP3 užblokavimo ir aktyvinimo VPD ar IK buvo surenkami mikroglijos kultūros supernatantai citokinų sekrecijos tyrimams ir ląstelių lizatai NLRP3 kiekio nustatymui. Inflamasomos aktyvinimo analizė pradėta nuo VPD poveikio mikroglijos ląstelėms. Gauti rezultatai patvirtino sėkmingą inflamasomos slopinimą – siRNR nukreipta į NLRP3 mRNR reikšmingai sumažino IL-1β išsiskyrimą VPD veiktose mikroglijos ląstelėse, o neigiama siRNR neturėjo jokios įtakos sekrecijai (3.8 C pav.). Kaip ir tikėtasi, TNF-α sekrecija nepakito (3.8 D pav.), nes TNF-α

išsiskyrimas priklauso nuo NF-κB aktyvinimo, o ne nuo NLRP3 aktyvinimo. Analizuojant NLRP3 baltymo kiekį mikroglijos lizatuose, pastebėta, kad siRNR, nukreipta į NLRP3 mRNR, nuslopino apie 50 % NLRP3 baltymo sintezės (3.8 A, B pav.) ir tuo pačiu sumažino IL-1β išsiskyrimą apie 50 % (3.8 C pav.). Taip pat panaudotas selektyvus NLRP3 inflamasomos slopiklis MCC950, kuris sąveikauja su NLRP3 baltymo NACHT domenu stabdydamas baltymo konformacinius pokyčius (180) . Kaip ir siRNR, nukreipta į NLRP3 mRNR, MCC950 ne visiškai slopino VPD sukeltą IL-1β išsiskyrimą (3.8 E pav.) ir neturėjo įtakos TNF-α sekrecijai (3.8 F pav.). Tai rodo, kad VPD, be NLRP3 inflamasomos aktyvinimo, inicijuoja alternatyvius uždegiminius mechanizmus arba nepilną slopiklio farmakologinį efektą. Analizuojant IK įtaką inflamasomos aktyvinimui nustatyta, kad siRNR, nukreipta į NLRP3, visų IK atvejais reikšmingai sumažino IL-1β sekreciją (3.8 G pav.). Šie rezultatai taip pat patvirtino, kad IK, sudaryti iš MAk 12F8, geba sustiprinti NLRP3 inflamasomos aktyvinimą (3.8 G pav.). Remiantis šiais rezultatais, galima teigti, kad VPD ir IK sukelia nuo NLRP3 inflamasomos priklausomą mikroglijos ląstelių atsaką.

Toliau analizuota, ar VPD sukeltas chemokinų išsiskyrimas priklauso nuo inflamasomos aktyvinimo. Slopinant NLRP3 sintezę reikšmingai sumažėjo CXCL2, CXCL9, CCL8 sekrecija (3.8 I–K pav.), bet ne CXCL1 (3.8 H pav.). Sumažėjimas buvo dalinis, o tai rodo, kad VPD sukeltas uždegiminių chemokinų išsiskyrimas priklauso nuo NLRP3 inflamasomos aktyvinimo, bet tuo pačiu gali būti susijęs ir su kitais makrofagų signaliniais keliais.



3.8 pav. NLRP3 inflamasomos įtaka VPD ir IK sukeltai uždegiminių molekulių sekrecijai mikroglijos ląstelėse**.** Mikroglijos ląstelės praėjus 48 h po transfekcijos siRNR, buvo veiktos VPD (20 µg/ml) ir MAk (7,5 µg/ml) 24 h. siRNR buvo naudojama NLRP3 geno raiškos slopinimui, neigiama (neig.) siRNR buvo naudojama kaip kontrolė. NLRP3 slopiklis MCC950 (1 µM) pridėtas 30 min. prieš poveikį. NLRP3 baltymo sintezės įvertinimas: (A) imunobloto rezultatas, (B) kiekybinis įvertinimas, N = 5, siekiant apskaičiuoti

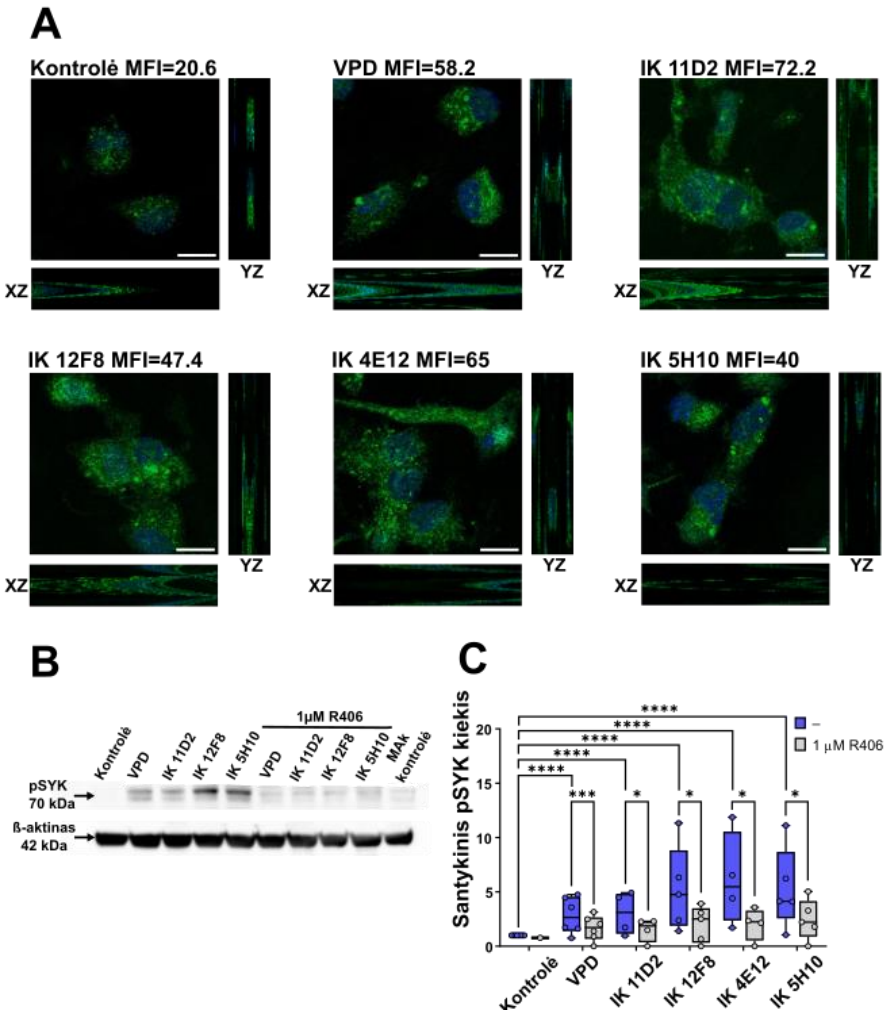
santykinį NLRP3 kiekį, NLRP3 baltymo signalas buvo normalizuotas pagal β-aktino signalą, o apskaičiuota vertė padalinta iš kontrolinės vertės nesant siRNR (Be siRNR sąlygomis NLRP3 santykinio kiekio vertė lygi 1,0 kiekviename nepriklausomame eksperimente). (C) IL-1β, N = 10, (E) IL-1β, N = 8, (D) TNF-α, N = 9, (F) TNF-α, N = 8, (H) CXCL1, N = 5, (I) CXCL2, N = 6, (J) CCL8, N = 5, (K) CXCL9, N = 10, sekrecija nustatyta IFA metodu. (G) Skirtingų IK sukelta IL-1β sekrecija, N = 4–9. Duomenys pateikiami stulpelinėmis diagramomis su taškais, rodančiais nepriklausomų eksperimentų skaičių (N). Taikyta vienkryptė ANOVA, po kurios atliktas *Tukey* daugkartinis palyginimo testas, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

3.2. SYK kinazės vaidmuo, aktyvinant mikroglijos ląsteles VPD ir IK

Antrojoje tyrimo dalyje siekta įsigilinti į IK veikimo mechanizmą bei imuninių receptorių signaliniuose keliuose dalyvaujančios SYK kinazės vaidmenį. Tėkmės citometrijos metodu detaliau analizuotos mikroglijos ląstelių funkcinės savybės, tokios kaip endocitozė ir antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raiška. Taip pat fluorescenciniu mikroskopu stebėtas lipidinių sankaupų susidarymas po poveikio IK. Specifiškas SYK kinazei slopiklis – R406 buvo pasitelktas, siekiant atskleisti SYK įtaką tiriamiems mikroglijos ląstelių procesams.

3.2.1. SYK įtakos NLRP3 inflamasomos aktyvinimui VPD ir IK analizė

Kadangi NLRP3 inflamasomos aktyvinimo kontekste minima SYK kinazė, buvo nuspręsta išsiaiškinti SYK vaidmenį mikroglijos ląstelių aktyvinimo VPD ir IK procesuose. Pirmiausia tirtas SYK aktyvinimas po poveikio VPD ir IK. SYK aktyvinimui nustatyti buvo taikytas fosforilintos SYK kinazės (pSYK) imunocitocheminis dažymas ir fluorescencinė mikroskopija. Atlikus mikroskopijos duomenų analizę paaiškėjo, kad VPD ir IK inicijuoja SYK fosforilinimą (3.9 A pav.). Fosforilintos SYK imunobloto analizė parodė panašius rezultatus (3.9 B pav.). Kiekybinė imunobloto duomenų analizė (3.9 C pav.) patvirtino, kad tiek VPD, tiek IK sukelia reikšmingą fosforilintos SYK kiekio padidėjimą. Tačiau nė vienas iš IK nesukėlė aukštesnio SYK fosforilinimo lygio, lyginant su vien VPD sukeltu SYK aktyvinimu (3.9 C pav.).

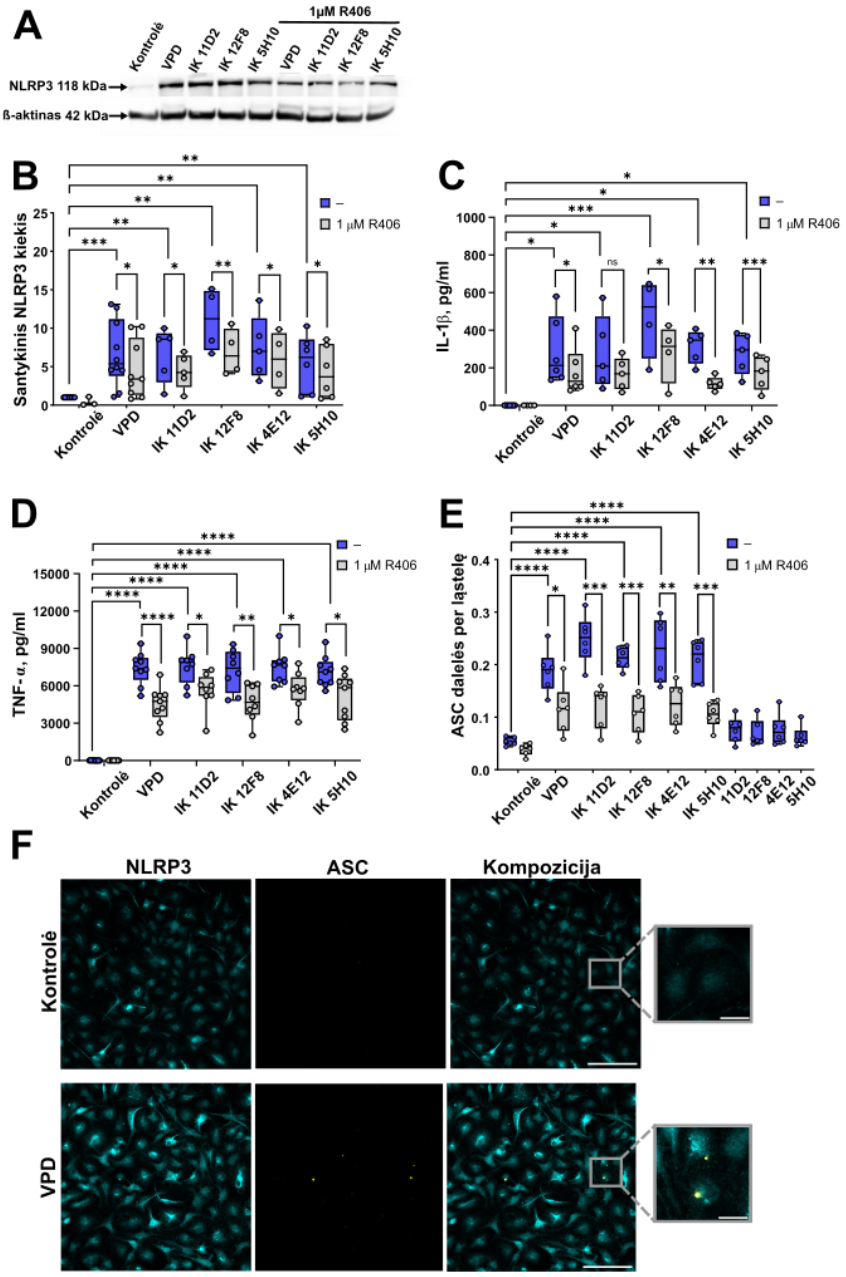


3.9 pav. SYK aktyvinimas VPD ir IK mikroglijos ląstelėse. Ląstelės buvo veiktos VPD (20 μg/ml) ir MAk (7,5 μg/ml) 24 h, o 1 μM SYK inhibitorius R406 buvo pridėtas 1 h prieš poveikį. Ląstelės dažytos ir imunobloto metu pSYK nustatytas specifiškais pelės pSYK (Y525/526) antikūnais. (A) Fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos, kuriose matoma pSYK (žalia) ir branduoliai nudažyti *Hoechst33342* branduolių dažu (mėlyna). Eksperimentas buvo pakartotas keturis kartus, pateikiami 30 kadrų kompoziciniai vaizdai ir ortogonalios projekcijos. 3D 48,7 × 46,9 μm dydžio ir 8,66 μm storio vaizdai buvo padaryti *Leica TCS SP8* konfokaliniu mikroskopu, naudojant 63 × aliejaus imersijos objektyvą. Apskaičiuotas vidutinis fluorescencijos intensyvumas (MFI) vienai ląstelei. Mastelis 10 μm. SYK aktyvinimo įvertinimas: (B) imunobloto rezultatas, (C) kiekybinis įvertinimas, N = 4–6, siekiant apskaičiuoti santykinį pSYK kiekį, pSYK signalas buvo

normalizuotas pagal β-aktino signalą, o apskaičiuota vertė padalinta iš kontrolinės vertės (lygi 1,0 kiekviename nepriklausomame eksperimente). Duomenys pateikiami stačiakampe diagrama su taškais, rodančiais atskirų eksperimentų skaičių. Pritaikyta vienkryptė ANOVA, po kurios atliktas *Tukey* testas *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Toliau tirta SYK aktyvinimo reikšmė IK sukeliamam NLRP3 inflamasomos aktyvinimui. Pradėta nuo NLRP3 receptoriaus kiekio analizės imunobloto metodu (3.10 A pav.). Pastebėta, kad nuslopintas SYK fosforilinimas lemia sumažėjusią NLRP3 sintezę. Kiekybinė NLRP3 imunobloto analizė parodė, kad SYK slopinimas sukelia reikšmingą NLRP3 lygio sumažėjimą visuose mikroglijos lizatuose, veiktuose VPD arba IK (3.10 B pav.). Kitas svarbus baltymas NLRP3 inflamasomos susirinkimui yra adaptorinis baltymas ASC, kuris sudaro lengvai matomas 1 μM dydžio taško formos struktūras (5). Imunocitochemijos metodu nudažytos ląstelės, stebėtos fluorescenciniu mikroskopu. Rezultatai parodė, kad tiek VPD, tiek jų IK reikšmingai padidina ASC dalelių skaičių, tenkantį vienai ląstelei (3.10 E, F pav.). Be to, SYK slopinimas sustabdė ASC dalelių susidarymą – slopiklis sumažino ASC dalelių skaičių beveik iki kontrolinio lygio (3.10 E pav.).

Siekiant patvirtinti SYK dalyvavimą NLRP3 inflamasomos aktyvinime, taip pat buvo analizuoti uždegiminių citokinų sekrecijos pokyčiai po SYK slopinimo. SYK slopiklis reikšmingai sumažino IL-1β koncentraciją ląstelių augimo terpėje (3.10 C pav.). IL-1β sekrecija sumažėjo visuose mikroglijos ląstelių supernatantuose, kuriuose ląstelės buvo veiktos VPD arba IK, išskyrus IK, sudarytą iš 11D2 MAk (3.10 C pav.). Be to, SYK slopinimas reikšmingai sumažino tiek VPD, tiek IK veiktose ląstelių kultūrose TNF-α sekreciją (3.10 D pav.). Apibendrinant, šie rezultatai rodo, kad VPD ir IK sukelia NLRP3 inflamasomos aktyvinimą, priklausantį nuo SYK aktyvinamų signalinių kelių.



3.10 pav. SYK įtaka NLRP3 aktyvinimui VPD ir IK mikroglijos ląstelėse. Ląstelės buvo veiktos VPD (20 µg/ml) ir MAk (7,5 µg/ml) 24 h, o 1 µM SYK slopiklis R406 buvo pridėtas 1 h prieš poveikį. NLRP3 baltymo sintezės įvertinimas: (A) imunobloto rezultatas, (B) kiekybinis įvertinimas, N = 5–6, siekiant apskaičiuoti santykinį NLRP3 kiekį, NLRP3 baltymo signalas buvo normalizuotas pagal β-aktino signalą, o apskaičiuota vertė buvo padalinta iš

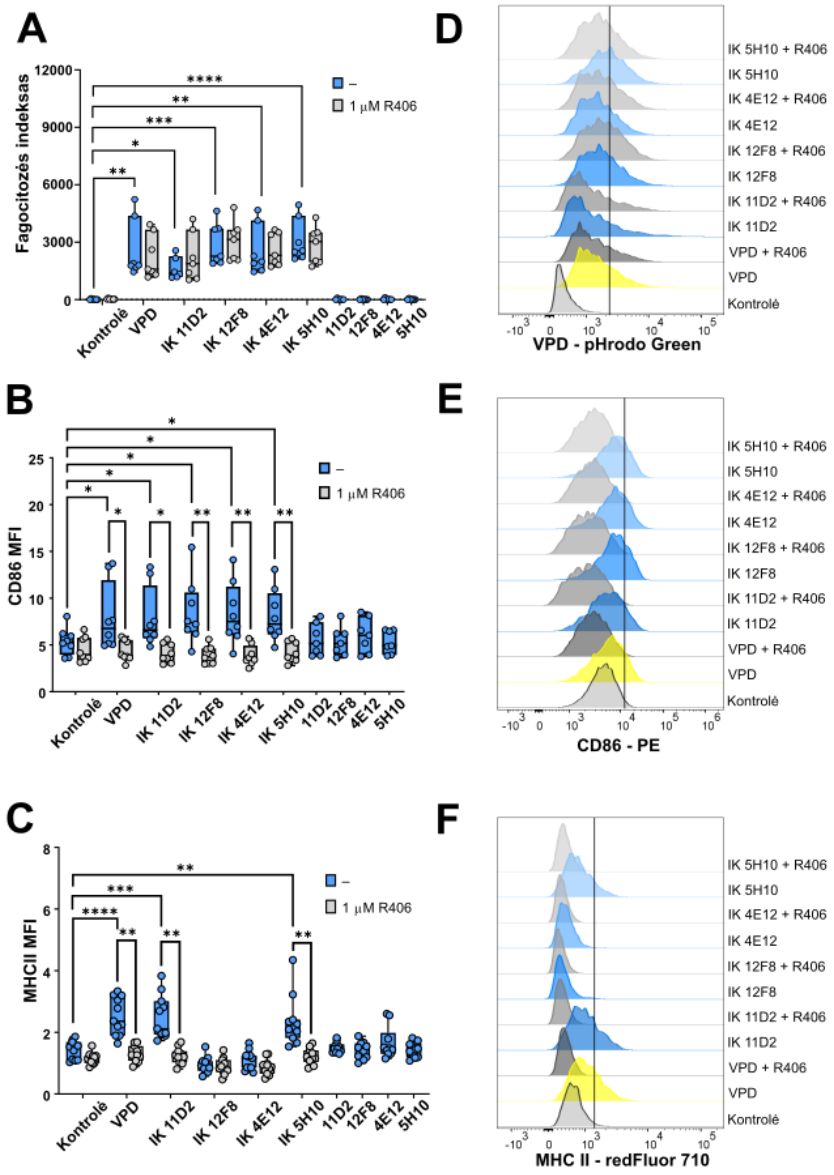
kontrolinės vertės. (C) IL-1β sekrecija, N = 4–6, ir (D) TNF-α sekrecija, N = 8–9, ištirta IFA metodu. (E) ASC dalelių susidarymo kiekybinis įvertinimas, N = 6. Duomenys pateikiami stačiakampe diagrama su taškais, rodančiais atskirų eksperimentų skaičių. Reikšmingumas buvo nustatytas taikant vienkryptę ANOVA, po kurios buvo atliktas *Tukey* testas *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAk klonai. (F) NLRP3 (melsva) ir ASC dalelių (geltona), dažytų antikūnais žymėtais *AlexaFluor 488* ir *PE* fluoroforais atitinkamai, fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos. Pateikiami 384,94 × 384,94 μm dydžio bendri ir 64,32 × 64,32 μm dydžio išdidinti vaizdai buvo padaryti *Nikon Eclipse Ti-2E* plataus lauko mikroskopu, naudojant 40 × objektyvą. Mastelis 50 μm ir 20 μm išdidintuose vaizduose.

3.2.2. SYK vaidmuo antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raiškos ir endocitozės procesuose VPD ir IK aktyvintose mikroglijos ląstelėse

Patvirtinus SYK svarbą IK sukeltam NLRP3 aktyvinimui mikroglijos ląstelėse, toliau buvo tirta šios kinazės įtaka mikroglijos ląstelių funkcinėms savybėms, endocitozei ir antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raiškai. Pirmiausia tėkmės citometrijos metodu buvo analizuota pHrodo žyme pažymėtų VPD ir IK fagocitozė mikroglijos ląstelėse paveiktuose SYK kinazės specifiniu slopikliu R406. Analogiškai anksčiau atliktiems tyrimams (3.2 B pav.), mikroglijos ląstelės efektyviai fagocitavo VPD ir visus IK – ląstelėse buvo pastebimas fluorescencinis signalas (3.11 A, D pav.). Tačiau ląsteles paveikus R406, fagocitozės intensyvumas nesumažėjo. Tai parodė, kad SYK neturi įtakos VPD ar IK fagocitozei (3.11 A, D pav.).

Vėliau tuo pačiu principu analizuota antigeno pateikime dalyvaujančių MHC II ir CD86 molekulių raiška ląstelių paviršiuje. MHC II pateikia CD4+ T ląstelėms peptidų fragmentus, gautus iš apdorotų antigenų, o CD86 yra kostimuliacinė molekulė, kuri sąveikauja su CD28 molekule ant CD4+ T ląstelių. Šių žymenų ir T ląstelių receptorių sąveika yra būtina veiksmingam CD4+ T ląstelių atsakui (65,181). Tėkmės citometrijos metodu buvo nustatyta, kad VPD ir visi IK sukelia reikšmingą CD86 raiškos padidėjimą, lyginant su kontrolinėmis grupėmis (3.11 B, E pav.). MHC II raiškos lygis skyrėsi priklausomai nuo IK, reikšmingai didesnė molekulės raiška aptikta po poveikio IK sudarytais su 11D2 (IgG1) ir 5H10 (IgG2b) MAk. Įdomu tai, kad po poveikio IK, sudarytais iš VPD ir IgG2a poklasio MAk (klonai 12F8 ir 4E12), MHC II raiškos lygis nepakito, buvo lygus kontrolei (3.11 C, F pav.). Be to, su R406 nuslopinus SYK, reikšmingai sumažėjo IK sukelta abiejų

molekulių – CD86 ir MHC II – raiška ląstelių paviršiuje (3.11 B, C pav.). Taigi, šie rezultatai atskleidė, kad antigeno pateikimui svarbių molekulių raiška priklauso nuo SYK aktyvinamų signalinių kelių, nors SYK neturi įtakos VPD ar IK endocitozei mikroglijos ląstelėse.



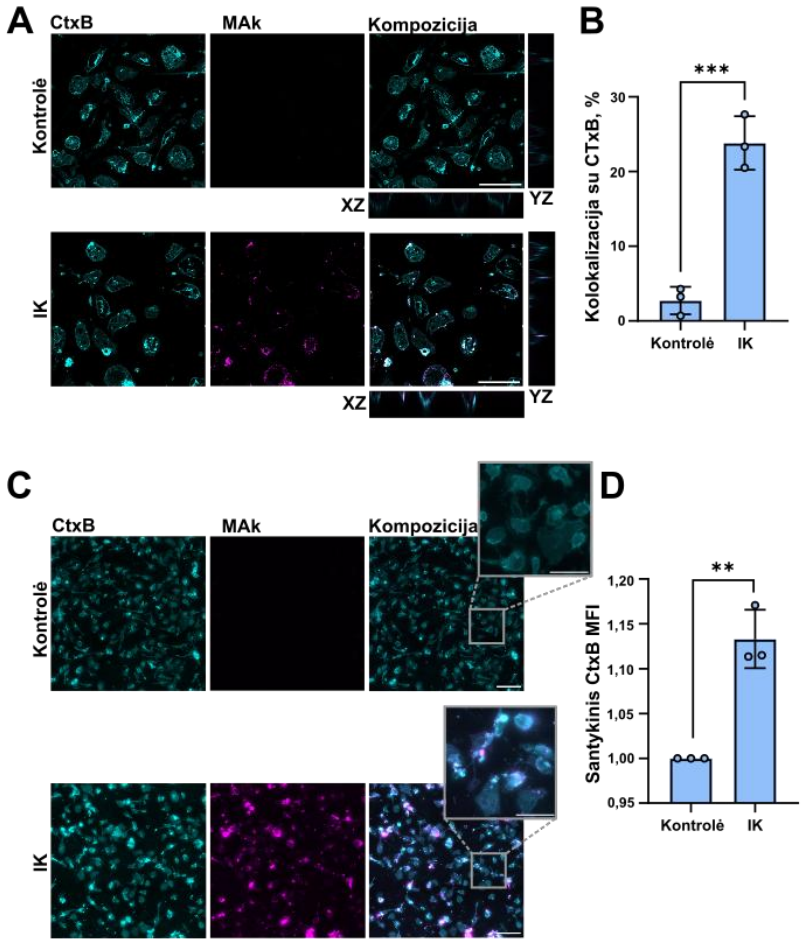
3.11 pav. SYK įtakos VPD ir IK endocitozei bei antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raiškai mikroglijos ląstelėse analizė. Ląstelės 3h buvo veiktos pHrodo žymėtomis VPD (10 µg/ml) ir MAk (7,5 µg/ml), 1h

prieš poveikį pridėta 1 µM R406. Ląstelės dažytos antikūnais specifiškais pelės CD86 ir MHC II, žymėtais PE ir *redFluor710* fluoroforais. Fagocitozė, CD86 ir MHC II raiška buvo matuojamos tėkmės citometrijos metodu. (A) pHrodo dalelių fagocitozės indeksas: duomenys pateikiami kaip vidutinis fluorescencinis intensyvumas padaugintas iš pHrodo fagocitavusių ląstelių procento, N = 7. (B, C) CD86 ir MHC II vidutinio fluorescencijos intensyvumo (MFI) vertės, normalizuotos pagal kiekvieno eksperimento izotipinę kontrolę, (B) N = 8, (C) N = 11. Duomenys pateikiami stačiakampėmis diagramomis su taškais, rodančiais atskirų eksperimentų skaičių (N). Taikyta vienkryptė ANOVA, po kurios atliktas *Tukey* testas *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAk klonai. (D–F) Pateikiamos eksperimento reprezentatyvios histogramos (D) – fagocitozės ir (E) – CD86, (F) – MHC II molekulių raiškos.

3.2.3. Lipidinių struktūrų ląstelių paviršiuje susidarymas IK aktyvintose mikroglijos ląstelėse

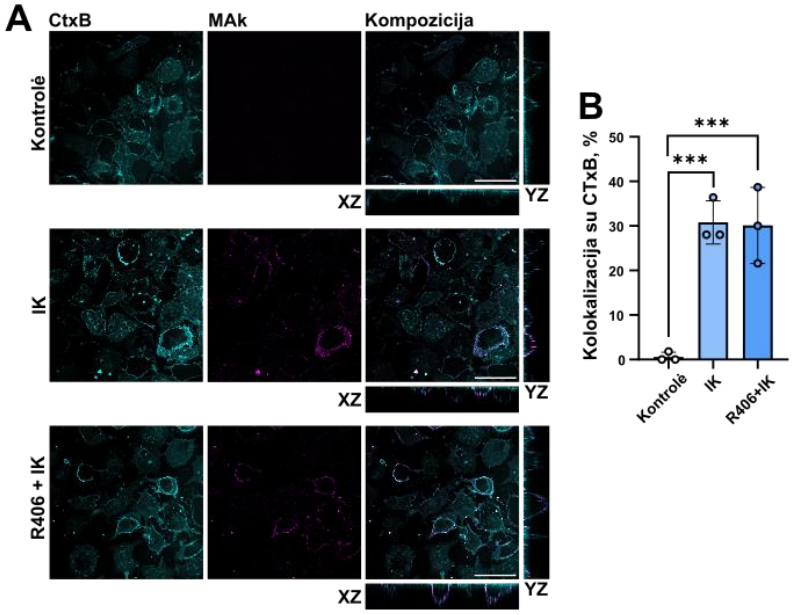
Siekiant plačiau išanalizuoti IK aktyvintos mikroglijos procesus, buvo analizuojamas lipidų plaustų formavimasis. Lipidų plaustai – tai organizuotos membranos sritys, kuriose gausu cholesterolio ir sfingolipidų. Plaustai atlieka esmines funkcijas imuninėse ląstelėse – formuoja signalinių kelių platformas ir dalyvauja pradiniuose įvairių tipų endocitozės etapuose. Būtent iš lipidų plaustų susidariusios platformos sutelkia imuninius receptorius ir tampa signalinių kelių iniciacijos tašku (146). Todėl siekta sužinoti, ar lipidų plaustai taip pat dalyvauja IK endocitozėje. Choleros toksino subvienetas B (CTxB), pasižymintis dideliu afiniškumu lipidų plaustuose aptinkamam GM1 gangliozidui, buvo naudojamas kaip dažas lipidinėms struktūroms ir plazminei membranai, o IK formuojantys MAk buvo dažomi su *AlexaFluor488* konjuguotais antikūnais prieš pelės IgG. Mikroglijos ląstelės buvo tiriamos konfokaliniu mikroskopu po imunocitocheminio dažymo. Kontrolinėse ląstelėse, veiktose tik MAk, antikūnų signalo nebuvo, o CTxB dažymas ant membranos buvo homogeniškas. Priešingai nei kontroliniame eksperimente, IK paveiktose ląstelėse matėsi aiškios CTxB ir MAk sankaupos (3.12 A pav.). IK ir lipidinių sankaupų signalų kolokalizacijos analizė parodė, kad mikroglijos ląstelės, aktyvintos IK, suformuoja lipidų plaustų tipo struktūras (3.12 B pav.). Siekiant vizualizuoti bendrą lipidinių struktūrų pasiskirstymą mikroglijos ląstelėse, IK paveiktos ląstelės analizuotas plataus lauko mikroskopu. Šiuo mikroskopu gauti rezultatai parodė, kad po poveikio IK mikroglijos ląstelių paviršiuje susidaro sankaupos, pasižyminčios ryškiu

CTxB signalu, kuris persidengia su MAk signalu ir lemia žymiai padidėjusį fluorescencijos intensyvumą (3.12 C, D pav.). Šie rezultatai rodo, kad lipidinės struktūros susiformuoja virusiniais IK aktyvintose mikroglijos ląstelėse ir galimai dalyvauja imuniniuose signaliniuose keliuose. Galiausiai, siekiant patikrinti ar SYK taip pat svarbi lipidinių struktūrų susidarymui, konfokaliniu mikroskopu analizuotas GM1 sankaupų susidarymas po poveikio SYK slopikliu. Rezultatai parodė, kad lipidinių struktūrų susidarymas nepriklauso nuo SYK aktyvumo – slopiklis neturėjo įtakos po IK aktyvinimo vykstančiam lipidinių struktūrų membranoje formavimuisi (3.13 pav.). Todėl galima teigti, kad lipidinių struktūrų susidarymas vyksta anksčiau, nei aktyvinama SYK.



3.12 pav. Lipidinių struktūrų ir IK sąveikos vizualizacija mikroglijos ląstelių paviršiuje. Ląstelės 3 val. buvo veikiamos VPD (20 µg/ml) ir MAk (7,5

µg/ml), kontrolės atveju ląstelės veiktos tik MAk. 30 min. prieš ląstelių fiksavimą, GM1 lipidai dažyti CTxB-AF594 (melsva). IK ant fiksuotų ląstelių dažyti antriniais antikūnais su *AlexaFluor 488* žyme (rausva). (A) Lipidinių GM1 struktūrų susidarymas po poveikio IK. Pateikiami 32 kadrų kiekvieno kanalo kompoziciniai vaizdai ir ortogonalios projekcijos. 3D 184,26 × 184,26 µm dydžio ir 9,25 µm storio vaizdai buvo padaryti *Leica TCS SP8* konfokaliniu mikroskopu, naudojant 63 × aliejaus imersijos objektyvą. Mastelis 50 µm. (B) Kiekybiškai įvertinta kolokalizacija rodo CTxB signalo dalį, kuri sutampa su IK signalu. *Mander* sutapimo koeficientas buvo apskaičiuotas naudojant *ImageJ Fiji BIOP JACoP* papildinį, N = 3. (C) Reprezentaciniai GM1 sankaupų ir IK fluorescencinės mikroskopijos vaizdai, gauti naudojant *Nikon Eclipse Ti-2E* plataus lauko mikroskopą su 40 × objektyvu. Pateikiami kiekvieno kanalo ir kompoziciniai 644,47 × 644,47 µm dydžio ir mažesni 144,72 × 144,72 µm dydžio vaizdai. Mastelis didesnėse nuotraukose yra 100 µm, o išdidintuose fragmentuose 50 µm. (D) Santykinis CTxB signalo MFI kiekvienai nuotraukai buvo apskaičiuotas naudojant *NIS-elements* programą ir normalizuotas pagal kontrolines grupes, N = 3. (B, D) duomenys pateikiami stulpeline diagrama kaip vidurkis ± SD, o taškai rodo atskirų eksperimentų skaičių (N). Pritaikytas *Student* t testas, **p < 0,01, ***p < 0,001



3.13 pav. SYK įtakos lipidinių struktūrų ir IK sąveikai nustatymas mikroglijos ląstelių paviršiuje. Ląstelės 3 val. buvo veikiamos VPD (20 µg/ml) ir MAk

(7,5 µg/ml), kontrolės atveju ląstelės veiktos tik MAk, 1h prieš poveikį pridėta 1 µM R406. 30 min. prieš ląstelių fiksavimą, GM1 lipidai dažyti CTxB-AF594 (melsva). IK ant fiksuotų ląstelių dažyti antriniais antikūnais su *AlexaFluor 488* žyme (rausva). (A) Reprezentacinės lipidinių struktūrų ir IK fluorescencinės mikroskopijos nuotraukos. Pateikiami 33 kadrų kompoziciniai vaizdai ir ortogonalios projekcijos. 3D 184,26 × 184,26 µm dydžio ir 9,85 µm storio vaizdai buvo padaryti naudojant *Leica TCS SP8* konfokalinį mikroskopą su 63 × aliejaus imersijos objektyvu. Mastelis 50 µm. (B) Kiekybiškai įvertinta IK signalo kolokalizacija su CTxB. *Mander* sutapimo koeficientas apskaičiuotas naudojant *ImageJ Fiji BIOP JACoP* papildinį. Taikyta vienkryptė ANOVA, ***$p<0,001$. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAk klonai.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Makrofagų sąveika su IK yra svarbus priešvirusinio atsako etapas: opsonizuoti antigenai sąveikauja su FcR, taip nulemiant ir keičiant antigenų pasisavinimą, signalinius kelius ir galiausiai infekcijos slopinimą arba sustiprinimą (11,36,182). Tai svarbu daugelio infekcijų atvejais, nes makrofagų atsakas gali nulemti viruso kontrolę, citokinų sekreciją, audinių pažeidimą ir netgi viruso išlikimą ar gebėjimą išvengti imuninės sistemos. Tačiau naujausi tyrimai rodo, kad IK poveikis imuninei sistemai ne visada priklauso tik nuo viruso (35,183). Todėl disertacijos pagrindiniu tiriamuoju objektu pasirinkti virusinių antigenų ir antikūnų formuojami IK. Naudotas IK modelis, imituojantis natūraliai susidarančius IK, sudarytus iš virusinių baltymų ir jiems specifiškų skirtingo IgG poklasio MAk. Antigenu pasirinktos WUPyV VPD savo forma ir struktūra atitinka natūralius virusus. Nustatyta, kad WUPyV aptinkamas pacientų, sergančių kvėpavimo takų infekcijomis, įvairiose kvėpavimo takų vietose, kas leidžia manyti, kad šis virusas yra kvėpavimo takų ligų priežastis (184). Tačiau dėl WUPyV patogeniškumo vis dar diskutuojama, ypač dėl šio viruso sąsajos su sunkiomis kvėpavimo takų infekcijomis (164). Epidemiologiniai tyrimai parodė, kad WUPyV pasitaiko kaip gretutinės infekcijos sukėlėjas kartu su kitais kvėpavimo takų virusais, tačiau dėl nedidelio pacientų skaičiaus jo sąsajos su pagrindinės infekcijos sunkumu neištirtas (185). Kadangi žmogaus PyV yra labai paplitę (186), ilgai išlieka organizme ir aptinkami įvairiuose užsikrėtusių žmonių audiniuose (kvėpavimo takuose, kraujyje, išmatose ir smegenų skystyje) (166), jie yra įdomūs gretutinių infekcijų ir viruso sąveikos su imuninėms ląstelėms tyrimo objektai.

IK sudarymui su VPD buvo atrinkti skirtingų poklasių MAk, siekiant atskleisti, ar IK savybės gali turėti įtakos imuniniam atsakui. MAk yra svarbūs terapiniai įrankiai virusinėms infekcijoms ir kitoms ligoms gydyti, nes jais galima moduliuoti imuninį atsaką ir neutralizuoti virusus (187). Terapijai naudojamų MAk savybės nulemia funkcijas, pavyzdžiui, MAk poklasis apsprendžia antikūno jungimąsi su FcR imuninių ląstelių paviršiuje ir tolesnį ląstelės aktyvinimą. Su humanizuotų pelių modeliu buvo parodyta, kad virusą atpažįstantis IgG, kuris stipriai jungiasi prie aktyvinančių FcγR, yra veiksmingas gydant SARS-CoV-2 infekciją (188). Virusinių infekcijų metu svarbų vaidmenį atlieka antikūnų nulemtos imuninių ląstelių funkcijos – nuo antikūnų priklausomas ląstelių citotoksiškumas ar opsonizuotų antigenų fagocitozė (189). Be to, antikūnų gebėjimas jungtis prie FcR moduliuoja humoralinį ir ląstelinį imuninį atsaką (190). Vis dėlto nuo antikūnų

priklausomas imuninio atsako sustiprinimas gali atsirasti dėl IK sukeltos stiprios uždegiminės reakcijos imuninėse ląstelėse (191–193). Kadangi vis dar trūksta duomenų apie MAk savybes ir susidariusių IK įtaką imuniniam atsakui, virusinių antigenų ir skirtingų IgG poklasių MAk sudaryti IK yra tinkamas modelis imuninio atsako makrofaguose tyrimams.

IK sukeliamo imuninio atsako tyrimo modeline sistema buvo pasirinkta pirminė pelės mikroglijos kultūra. Pagrindinis mikroglijos kultūros privalumas tai, kad šios ląstelės yra specializuoti smegenų audinio makrofagai pasižymintys bendromis makrofagų funkcijomis ir išlaikantys audiniui būdingas savybes (69,71). Tai leidžia daryti prielaidą, kad pirminių mikroglijos ląstelių atsakas atspindi natūraliai organizme vykstančius procesus. Be to, mikroglijos ląstelių išskyrimui buvo naudotas plačiai taikomas ir pripažintas metodas, kuriuo pasiekiamas daugiau nei 95 % kultūros grynumas. Tačiau, mikroglijos ląstelės kaip ir kitų audinių makrofagai pasižymi aukštu aktyvinimo slenksčiu (1). Todėl kitų audinių makrofagai gali pasižymėti panašiu atsaku, o monocitų kilmės makrofagams būdingas intensyvesnis atsakas dėl žemesnio aktyvinimo slenksčio.

Pirmiausia šio darbo metu, derinant pažangias ir itin jautrias metodikas bei imunologinius tyrimus, buvo nustatyta, kad MAk afiniškumas koreliuoja su įgimtojo imuniteto ląstelių atsaku. Tiksliai nustatyti termodinaminiai parametrai leidžia padaryti išvadą, kad MAk, formuojančio IK, afiniškumas turi įtakos NLRP3 inflamasomos aktyvinimui, nes didžiausio afiniškumo MAk (12F8) formuojami IK sustiprino NLRP3 inflamasomos aktyvinimą. Be to, šis MAk priklauso IgG2a poklasiui, kuris, kaip manoma, pasižymi labai dideliu afiniškumu aktyvinančiam FcγR (39). Kadangi buvo ištirta keletas pelės IgG2a poklasio MAk, pasižyminčių skirtingu afiniškumu, galima teigti, kad IK sukeltas ląstelių aktyvinimas priklauso nuo antikūno afiniškumo ir IK struktūros, nes 12F8 MAk formavo IK, kuriuose daugiau MAk dengia VPD paviršių nei kituose IK. Anksčiau paskelbtas SARS-CoV-2 RBD specifiškų MAk *in silico* tyrimas parodė, kad MAk afiniškumas ir gebėjimas prisijungti prie specifinių sričių daro įtaką jų funkcinėms savybėms, nes epitopų dydis ir struktūra lemia IK stabilumą bei prisijungimą prie FcR (194). Šiame disertaciniame darbe taip pat nustatyta, kad IK paveiktų ląstelių uždegiminių chemokinų sekrecijos lygį lemia MAk afiniškumas. Lyginant tarpusavyje IgG2a poklasio MAk, nustatyta, kad IK, sudaryti iš mažiausio afiniškumo IgG2a MAk (4E12), skatina su virusine infekcija susijusio chemokino CXCL9 sekreciją. Visi MAk, išskyrus IgG1 poklasio, slopino su inflamasomos aktyvinimu susijusio chemokino CXCL2 sekreciją. Įdomu tai, kad CCL8, svarbaus daugelio infekcijų veiksnio, skatinančio leukocitų migraciją (95),

sekrecija padidėjo tik po poveikio IK, sudarytais su IgG1 poklasio MAk. MAk 11D2 taip pat pasižymėjo mažiausia įtaka kitų uždegiminių molekulių sekrecijai. Išskirtinė šio MAk savybė yra VPD konformacinio epitopo atpažinimas. Disertacijos rezultatai pagrindžia ankstesnius pastebėjimus, kad IK sukeltas ląstelių aktyvinimas skiriasi priklausomai nuo IK formuojančių MAk savybių. Be to, šio tyrimo privalumas yra tas, kad buvo naudojami MAk, gauti taikant hibridomų technologiją po pelių imunizacijos VPD. Pakartotinės imunizacijos procedūros lėmė, kad iš gemalinių centrų kilusios B ląstelės ėmė gaminti itin specifiškus antigenui ir aukšto afiniškumo antikūnus. Todėl gautos hibridomų ląstelės sekretuoja VPD specifiškus MAk, kurie praėjo afiniškumo brendimo ir Fc modifikacijų etapus *in vivo* bei išlaikė humoralinio imuninio atsako pobūdį (195,196). Taigi, gautieji rezultatai, apibūdinantys IK sukeltą mikroglijos ląstelių atsaką, bent iš dalies atspindi *in vivo* vykstantį priešvirusinį atsaką.

IK modelių svarba virusinių infekcijų sukelto uždegiminio atsako tyrimams atsispindi ir kituose moksliniuose darbuose. Pavyzdžiui, manoma, kad HBV viruso kapsidės IK ir specifiški antikūnai susidaro infekcijos metu, o jų sukeltas uždegiminis atsakas gali prisidėti prie ligos progresavimo, tačiau IK vaidmuo šiame ilgalaikiame procese nėra visiškai aiškus (197). Be to, kepenų uždegimas koreliuoja su IK koncentracija kraujo serume, o tai rodo IK įtaką patologijai. Kitas įdomus faktas – SARS-CoV-2 užsikrėtę vaikai, kurių kraujo serume yra didelė cirkuliuojančio S baltymo ir uždegiminių molekulių koncentracija, serga daugiasisteminiu uždegiminiu sindromu (198). S baltymas gali formuoti IK ir sustiprinti uždegimą. Be to, sunkiais SARS-CoV-2 infekcijos atvejais buvo nustatytas aukštas virusui specifiško IgG lygis, o pacientų kraujyje buvo rasta cirkuliuojančių IK kartu su pernelyg aktyviomis FcγR ekspresuojančiomis ląstelėmis, kas rodo, kad IK prisideda prie ligos patogenezės (37). Tai galėtų paaiškinti SARS-CoV-2 infekciją lydinčios citokinų audros mechanizmus (199). Šioje disertacijoje parodyta, kad IK gali sustiprinti VPD sukeltą uždegiminį atsaką mikroglijos ląstelėse. Priešingai šio darbo rezultatams, kiti tyrimai rodo, kad klasikiniai IK iš eritrocitų ir ovalbumino antigenų makrofaguose slopina uždegiminį atsaką (200). Autoriai aktyvino makrofagus klasikiniais inflamasomos aktyvikliais – silikatu bei ATP ir dar naudojo patogeną *C. albicans*, kuris aktyvina NLRP3 inflamasomą, tačiau jų naudoti klasikiniai IK sumažino inflamasomos aktyvinimą. Inflamasomos aktyvikliai, kurių kilmė skiriasi nuo virusinių antigenų ir virusinių IK, gali turėti kitokį poveikį. Ankstesnių *in vitro* ir *in vivo* virusinių infekcijų tyrimų duomenys patvirtina disertacijos duomenis apie nuo antikūnų priklausomą uždegiminio atsako, susijusio su inflamasomos

aktyvinimu, sustiprinimą. Be to, IK poveikis buvo įrodytas su kitais NLRP3 inflamasomos aktyvikliais – α-sinukleino agregatais, kurie yra svarbūs neuroužd egimo veiksniai Parkinsono ligos patogenezėje (77). IK, susidarę iš α-sinukleino ir antikūnų, sustiprino inflamasomos aktyvinimą žmogaus mikroglijos ląstelėse (201). Tai patvirtina, kad IK gali reguliuoti antigenų sukeltą inflamasomos aktyvinimą. Be to, α-sinukleino agregatai stimuliuoja panašius uždegiminius citokinus (IL-1β, TNF-α, CXCL1) (202), kaip ir VPD šiame tyrime. Taigi, IK nulemtas antigeno sukeltų signalų sustiprinimas makrofaguose gali būti provokuojamas įvairių antigenų formuojamais IK.

Didelis uždegiminių molekulių, priklausančių nuo IFN ir TNF signalinių kelių, raiškos lygis nustatomas virusinių infekcijų, pavyzdžiui, SARS-CoV-2, HBV, ŽIV ir HSV-1, metu (203–205). Disertaciniame darbe taip pat buvo atlikta išsami VPD ir IK indukuojamos chemokinų sekrecijos analizė. Buvo nustatyta, kad paveikus VPD, mikroglijos ląstelėse reikšmingai padidėja šių molekulių lygis (TNF-α, IL-1β, CCL8, CXCL9, CXCL16, CXCL1 ir CXCL2), kuris siejamas su kituose tyrimuose aprašyta sunkia SARS-CoV-2 infekcijos forma (206–208). Virusiniai antigenai stimuliuoja įgimtojo imuniteto ląsteles sekretuoti uždegimines molekules, kad į infekcijos vietą būtų pritrauktos imuninės ląstelės. Virusinių infekcijų atveju CXCL9 kartu su CXCL10 atlieka pagrindinį vaidmenį, pritraukiant aktyvintas T ląsteles per CXCR3 (209). Makrofagų išskiriami CXCL9 ir CXCL10 yra svarbūs chemokinai, stimuliuojantys įgytąjį imunitetą (210). Padidėjusi pastarųjų chemokinų raiška taip pat stebima PyV infekcijos atveju (211). Žinoma, kad kiti CXC chemokinai, tarp jų CXCL1, CXCL9 ir CXCL16, dalyvauja PyV infekcijų patogenezėje (212). Disertacijoje atskleista, kad PyV kilmės VPD, imituojančios virusus, tiesiogiai stimuliuoja šių chemokinų išsiskyrimą mikroglijos ląstelėse, o VPD specifiniai MAk moduliuoja jų sekreciją. Šiame darbe nustatyta, kad VPD skatina mikroglijos ląsteles išskirti CXCL1 ir CXCL2, kurie gali sukelti inflamasomos aktyvinimą, sąveikaujant su CXCR2 receptoriumi (98). Suintensyvėjusi CXCL1 ir CXCR2 kartu su NLRP3 baltymų sintezė ir genų raiška pastebimos mikroglijoje vykstant smegenų uždegiminiams procesams, todėl manoma, kad jie dalyvauja NLRP3 inflamasomos aktyvinime (213). Pagal gautus rezultatus VPD sukelta CXCL1 ir CXCL2 sekrecija gali sumažėti dėl poveikio IK, suformuotais su specifiniais MAk, o tai rodo galimą būdą sumažinti uždegimą. CXCL1 ir CXCL2 sekreciją gali sukelti patogenai ar citokinai, tokie kaip IL-1β (214). Įdomu tai, kad lyginant ląsteles, paveiktas skirtingais IK, kurie skatino intensyvesnį arba ne tokį intensyvų IL-1β išsiskyrimą, nebuvo rasta jokių skirtumų CXCL1 ir CXCL2 sekrecijos lygio. Tai rodo, kad VPD sukelta

CXCL1 ir CXCL2 sekrecija nekoreliuoja su IL-1β sekrecija. Nepaisant to, aptikta keletas skirtumų tarp IK sukeltos CXCL1 ir CXCL2 sekrecijos. Tik IK, sudaryti iš IgG1 poklasio MAk, kurie turėjo mažiausią poveikį IL-1β sekrecijai, sumažino vieno chemokino (CXCL1) kiekį, o kiti IK sumažino abiejų chemokinų kiekį. Šie chemokinai yra svarbūs neutrofilų pritraukimui bakterinės infekcijos metu ir gali atlikti kitokį vaidmenį virusinės infekcijos atveju. Kituose tyrimuose IL-1β receptoriaus IL-1R1 blokavimas žmogaus epitelio ląstelėse, užkrėstose rinovirusais, užkirto kelią uždegiminių molekulių, taip pat ir CXCL2, sekrecijai, o tai parodo, kad IL-1β gali būti tiesioginis CXCL2 induktorius (215). Tačiau analizuojant šio darbo rezultatus nepastebėta CXCL2 sekrecijos pokyčių, susijusių su IK sukeltu IL-1β išsiskyrimu.

Opsonizuotų virusinių IK buvimas sukelia FcγR kryžminę sąveiką ir tolimesnių imuninių signalinių kelių aktyvinimą. Ligando prisijungimas prie receptoriaus sukelia SRC šeimos kinazių aktyvinimą ir ITAM domenų fosforilinimą, tuomet aktyvinama SYK, sukelianti savo substratų, tokių kaip fosfoinozitido 3-kinazės, ERC kinazės, proteinkinazės Cδ arba fosfolipazės Cγ, fosforilinimą (137,139). Vienas iš galutinių SYK signalinio kelio procesų yra NF-κB veiksnio aktyvinimas. SYK fosforilinti substratai, tokie kaip fosfolipazė Cγ arba proteinkinazė C-δ, perduoda signalą toliau CARD9, kuris indukuoja NF-κB aktyvinimą (137,143). Šis mechanizmas paprastai yra susijęs su patogenų sukeltu uždegiminiu atsaku ir paaiškina SYK vaidmenį NLRP3 aktyvinime. Tačiau nebuvo aišku, ar šis mechanizmas taikytinas IK sukeltam uždegimui mieloidinėse ląstelėse. Šiuo darbu buvo įrodyta SYK fosforilinimo reikšmė IK sukeltame NLRP3 inflamasomos aktyvinimo procese. Buvo pastebėta, kad SYK slopinimas sumažina NLRP3 sintezę, ASC dalelių formavimąsi ir IL-1β sekreciją, kurie yra pagrindiniai inflamasomos aktyvinimo žymenys. Todėl sumažėję šių žymenų rodikliai po SYK slopinimo rodo, kad SYK atlieka svarbų vaidmenį virusinių IK sukeltame NLRP3 aktyvinime. Tai siejasi su kitų tyrėjų atliktais tyrimais, kuriuose teigiama, kad SARS-CoV-2 S baltymo ir specifinių antikūnų suformuoti IK skatina uždegiminių citokinų ir chemokinų sekreciją per SYK signalinius kelius makrofaguose (16). Be to, disertacijoje buvo įrodyta, kad SYK slopinimas reikšmingai veikia TNF-α sekreciją. NLRP3 inflamasomos aktyvinimas paprastai apibūdinamas kaip dviejų etapų procesas, apimantis iniciaciją ir aktyvinimą. Iniciacija paprastai prasideda nuo TLR aktyvinimo ir signalinių kelių vedančių link NF-κB, kuris lemia padidėjusią NLRP3 ir pro-IL-1β baltymų sintezę. Tik tuomet NLRP3 inflamasoma gali būti aktyvinta įvairiais veiksniais, pavyzdžiui, PAMP ir DAMP (216,217). NF-κB yra pagrindinis

transkripcijos veiksnys genams, reguliuojantiems TNF-α citokino sekreciją, kuris savo ruožtu gali aktyvinti NF-κB (218). Todėl tikėtinas mechanizmas mikroglijos ląstelėse gali būti susijęs su SYK–NF-κB–NLRP3 signaline kaskada. Kuomet po aktyvinimo IK, SYK aktyvina NF-κB, kuris inicijuoja NLRP3 raišką, vedančią prie NLRP3 inflamasomos aktyvinimo ir IL-1β sekrecijos. Tačiau SYK slopinimas ne visiškai blokuoja NLRP3 aktyvinimą. Tai reiškia, kad yra ir kitų signalinių kelių, aktyvinančių NF-κB ir NLRP3 inflamasomą. Pavyzdžiui, anksčiau buvo įrodyta, kad VPD aktyvina NLRP3 inflamasomą dėl vykstančių lizosomų pažaidų ir katepsinų išsiliejimo (9).

Makrofagai prisideda prie imuninio atsako per NLRP3 inflamasomos aktyvinimą ir veikia kaip antigeną pateikiančios ląstelės CD4+ T ląstelėms (219). Fagolizosomose suskaidytus antigenus MHC II molekulė pateikia CD4+ T ląstelėms. Tačiau veiksmingam T ląstelių aktyvinimui reikalingas ne tik tiesioginis kontaktas su antigeno peptidu MHC II komplekse, bet ir CD28 dalyvavimas (220). Šio kostimuliacijos signalo nebuvimas sukelia T ląstelių anerginę reakciją (221). CD86 yra viena iš kostimuliacinių molekulių, kurią nuolat pateikia antigeną pateikiančios ląstelės (APC), todėl CD86 yra svarbi ankstyvosiose T ląstelių ir APC sąveikose (65). FcγR yra pagrindiniai antigeno pateikimo reguliatoriai, o SYK atlieka esminį vaidmenį FcγR inicijuotoje signalinių kelių kaskadoje (222). Tačiau nėra pakankamai duomenų apie skirtingų IK poveikį antigenų pateikimui makrofaguose ir SYK dalyvavimą šiame procese. Todėl buvo tirtas SYK vaidmuo su antigeno pateikimu susijusių molekulių raiškai mikroglijos ląstelėse, aktyvintose skirtingais IK. Įrodyta, kad tiek VPD, tiek jų IK indukuoja antigeno pateikime dalyvaujančių molekulių raišką mikroglijos ląstelėse, nes CD86 ir MHC II molekulių raiška žymiai padidėja po poveikio VPD ir IK, kuriuos sudarė IgG1 ir IgG2b poklasių MAk. Nors IgG2a yra labiausiai siejamas su uždegiminiu atsaku ir IgG2a MAk (klonai 12F8 ir 4E12) suformuoti IK sukėlė didesnę CD86 raišką mikroglijos ląstelių paviršiuje, šie IK neturėjo jokio poveikio MHC II raiškai. Taigi, IK savybės gali turėti įtakos antigeno pateikimo APC procesui. Be to, buvo įrodyta, kad SYK taip pat svarbi su antigeno pateikimu susijusių molekulių raiškai, nes SYK slopinimas visiškai sumažino MHC II ir CD86 raišką iki kontrolinio lygio. Žinoma, kad kostimuliacinių molekulių raiška yra skatinama per PRR signalinius kelius, o MHC II raiška yra susijusi su NF-κB aktyvinimu (223,224). Todėl galima teigti, kad SYK blokavimas trukdo signalų perdavimui NF-κB ir slopina MHC II ir CD86 raišką.

Galiausiai šioje disertacijoje analizuotas lipidų plaustų tipo struktūrų susidarymas IK aktyvintose mikroglijos ląstelėse ir SYK dalyvavimas šiame procese. Daugumos imuninių ląstelių receptoriai yra lokalizuoti lipidų

plaustuose, nes juose gali susikaupti signalinės molekulės ir susidaryti signalinių kelių pradžios platformos (152,225). Lipidų plaustų signalinės platformos taip pat yra praturtintos SRC kinazėmis, kurios yra pirminės signalų perdavimo molekulės SYK signaliniuose keliuose (134,146). Be to, antigenų surinkimas ir endocitozė dažnai vyksta lipidų plaustų srityse, nes plaustuose yra daug patogenų receptorių ir pūsleles formuojančių baltymų (146,148). Analizuojant mikroglijos ląstelių aktyvinimą, kurį sukelia iš VPD ir MAk susidarantys IK, pastebėta lipidinių sankaupų kolokalizaciją su IK. Todėl galima daryt prielaidą, kad IK aktyvina mikroglijos ląsteles per lipidines struktūras ląstelės paviršiuje. Šios struktūros gali atitikti ankščiau aprašytus lipidų plaustus – signalines platformas, kuriose lokalizuotos SYK ir kitos signalų perdavimo molekulės. Tačiau šios prielaidos patvirtinimui reikalingi detalesni lipidų plaustus apibūdinantys tyrimai.

Apibendrinant, šioje disertacijoje atskleista, kad fagocituoti IK aktyvina mikroglijos ląsteles ir sukelia NLRP3 inflamasomos aktyvinimą, kuri apima NLRP3 raišką, ASC dalelių susidarymą ir citokinų sekreciją, priklausančią nuo SYK signalinių kelių. SYK taip pat dalyvauja mikroglijos gebėjime pateikti antigenus per MHC II ir CD86 molekulių raiškos reguliavimą. Įdomu tai, kad IgG2a poklasio antikūnais suformuoti IK neturėjo jokio poveikio MHC II pateikimui ląstelių paviršiuje, priešingai nei IgG1 ir IgG2b antikūnų suformuoti IK, kurie žymiai padidino MHC II raišką. Šiuo tyrimu atskleista, kad IK formuojančių antikūnų savybės yra svarbus veiksnys, nulemiantis imuninių ląstelių atsaką. Šie rezultatai taip pat suteikia naujų duomenų apie IK vaidmenį uždegiminėse reakcijose, kurias sukelia virusiniai antigenai ir jiems specifiniai antikūnai, susidarę po virusinių infekcijų bei vakcinacijos arba naudojami terapijai.

IŠVADOS

1. Ištyrus į virusus panašių dalelių (VPD) ir jiems specifiškų monokloninių antikūnų (MAk) sąveikos ypatybes, nustatyta, kad imuninius kompleksus formuojantys skirtingų poklasių MAk yra vidutinio, didelio ir labai didelio afiniškumo – jų K_D yra nuo 1,26 nM iki 0,07nM.
2. Ištyrus skirtingų poklasių ir skirtingo afiniškumo MAk sudarytų imuninių kompleksų poveikį pelės mikroglijos ląstelėms, nustatytos sąsajos tarp MAk savybių ir poveikio ląstelėms. Imuniniai kompleksai, sudaryti iš labai didelio afiniškumo MAk 12F8, sustiprino nuo NLRP3 aktyvinimo priklausomą uždegiminį atsaką, lyginant su VPD.
3. VPD sukelia nuo NLRP3 inflamasomos priklausomą CXCL2, CXCL9 ir CCL8 bei nuo inflamasomos nepriklausomą CXCL1 chemokinų sekreciją mikroglijos kultūroje, o imuninių kompleksų formavimas ją slopina arba stiprina. Visi MAk, išskyrus 11D2, slopina VPD sukeltą CXCL1 ir CXCL2 sekreciją, CXCL9 sekrecija atvirkščiai proporcinga IgG2a/ IgG2b poklasių MAk afiniškumui, o konformacinius VPD epitopus atpažįstantis MAk 11D2 didina CCL8 sekreciją, lyginant su VPD.
4. VPD ir imuninių kompleksų sukeliamas mikroglijos ląstelių atsakas – NLRP3 inflamasomos aktyvinimas, citokinų sekrecija, su antigeno pateikimu susijusių molekulių raiška – priklauso nuo SYK kinazės aktyvinamų signalinių kelių.
5. Mikroglijos ląstelių aktyvinimas imuniniais kompleksais sukelia lipidinių struktūrų formavimąsi nepriklausomai nuo SYK aktyvinimo.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Sreejit G, Fleetwood AJ, Murphy AJ, Nagareddy PR. Origins and diversity of macrophages in health and disease. Clin Transl Immunology. 2020;9(12). doi:10.1002/cti2.1222
2. Lazarov T, Juarez-Carreño S, Cox N, Geissmann F. Physiology and diseases of tissue-resident macrophages. Nature. 2023 Jun 22;618(7966):698–707. doi:10.1038/s41586-023-06002-x
3. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Cell. 2010;140(6):821–32. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
4. Pan P, Shen M, Yu Z, Ge W, Chen K, Tian M, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. Nat Commun. 2021 Dec 1;12(1). doi:10.1038/s41467-021-25015-6
5. Fu J, Wu H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. Annu Rev Immunol. 2023 Apr 26;41:301–16. doi:10.1146/annurev-immunol-081022-021207
6. Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. Front Aging Neurosci. 2022 Jun 10;14. doi:10.3389/fnagi.2022.879021
7. Olajide OA, Iwuanyanwu VU, Lepiarz-Raba I, Al-Hindawi AA. Induction of Exaggerated Cytokine Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by a Recombinant SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 and Its Inhibition by Dexamethasone. Inflammation. 2021 Oct 1;44(5):1865–77. doi:10.1007/s10753-021-01464-5
8. Gong Z, Gao X, Yang Q, Lun J, Xiao H, Zhong J, et al. Phosphorylation of ERK-Dependent NF-κB Triggers NLRP3 Inflammasome Mediated by Vimentin in EV71-Infected Glioblastoma Cells. Molecules. 2022 Jul 1;27(13). doi:10.3390/molecules27134190
9. Lučiūnaitė A, Dalgėdienė I, Žilionis R, Mašalaitė K, Norkienė M, Šinkūnas A, et al. Activation of NLRP3 Inflammasome by Virus-Like Particles of Human Polyomaviruses in Macrophages. Front Immunol. 2022 Mar 9;13. doi:10.3389/fimmu.2022.831815
10. Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S, de Lacerda LB, Lewandrowski M, Ingber J, et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. Nature. 2022 Jun 16;606(7914):576–84. doi:10.1038/s41586-022-04702-4

11. Labzin LI, Bottermann M, Rodriguez-Silvestre P, Foss S, Andersen JT, Vaysburd M, et al. Antibody and DNA sensing pathways converge to activate the inflammasome during primary human macrophage infection. EMBO J. 2019 Nov 4;38(21). doi:10.15252/embj.2018101365
12. Lin YC, Huang DY, Wang JS, Lin YL, Hsieh SL, Huang KC, et al. Syk is involved in NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation through adaptor ASC phosphorylation and enhanced oligomerization. J Leukoc Biol. 2015 May 1;97(5):825–35. doi:10.1189/jlb.3hi0814-371rr
13. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hannesschläger N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. Nature. 2009 May 21;459(7245):433–6. doi:10.1038/nature07965
14. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: A crucial player in diverse biological functions. Nature Reviews Immunology. 2010. p. 387–402. doi:10.1038/nri2765
15. Bournazos S, Gupta A, Ravetch J V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. Nat Rev Immunol. 2020 Oct 1;20(10):633–43. doi:10.1038/s41577-020-00410-0
16. Hoepel W, Chen HJ, Geyer CE, Allahverdiyeva S, Manz XD, de Taeye SW, et al. High titers and low fucosylation of early human anti-SARS-CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages. Sci Transl Med. 2021 Jun 2;13(596). doi:10.1126/scitranslmed.abf8654
17. Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H, et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. JCI Insight. 2019 Feb 21;4(4). doi:10.1172/jci.insight.123158
18. Nooraei S, Bahrulolum H, Hoseini ZS, Katalani C, Hajizade A, Easton AJ, et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. J Nanobiotechnology. 2021 Dec 1;19(1). doi:10.1186/s12951-021-00806-7
19. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma and Clinical Immunology. 2018 Sep 12;14. doi:10.1186/s13223-018-0278-1
20. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010 Feb;125(2). doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016

21. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010 Feb;125(2). doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046
22. Chailyan A, Marcatili P, Tramontano A. The association of heavy and light chain variable domains in antibodies: Implications for antigen specificity. FEBS Journal. 2011 Aug;278(16):2858–66. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08207.x
23. Gong S, Gautam S, Coneglio JD, Scinto HB, Ruprecht RM. Antibody Light Chains: Key to Increased Monoclonal Antibody Yields in Expi293 Cells? Antibodies. 2022 Jun 1;11(2). doi:10.3390/antib11020037
24. Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. Front Immunol. 2013;4(OCT). doi:10.3389/fimmu.2013.00302
25. Lu RM, Chiang HL, Yuan JP, Wang HH, Chen CY, Panda SS, et al. Technological advancements in antibody-based therapeutics for treatment of diseases. J Biomed Sci. 2025 Dec 1;32(1). doi:10.1186/s12929-025-01190-2
26. Masuda C, Sugimoto M, Wakita D, Monnai M, Ishimaru C, Nakamura R, et al. Bevacizumab suppresses the growth of established non-small-cell lung cancer brain metastases in a hematogenous brain metastasis model. Clin Exp Metastasis. 2020 Feb 1;37(1):199–207. doi:10.1007/s10585-019-10008-z
27. Graham J, Muhsin M, Kirkpatrick P. Cetuximab. Nat Rev Drug Discov. 2004;3(7):549–50. doi:10.1038/nrd1445
28. Freeman CL, Sehn LH. A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. British Journal of Haematology. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 29–45. doi:10.1111/bjh.15232
29. Nair RR. Introduction to Therapeutic Antibodies. Journal of Tumor Medicine & Prevention. 2018 Sep 24;3(3). doi:10.19080/jtmp.2018.03.555613
30. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol. 2008 Jan;8(1):34–47. doi:10.1038/nri2206
31. Megha KB, Mohanan P V. Role of immunoglobulin and antibodies in disease management. Int J Biol Macromol. 2021 Feb 1;169:28–38. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.073

32. Kennedy PGE, George W, Yu X. The elusive nature of the oligoclonal bands in multiple sclerosis. J Neurol. 2024 Jan 1;271(1):116–24. doi:10.1007/s00415-023-12081-7
33. Djukić T, Drvenica I, Kovačić M, Milanović S, Majerič D, Šefik-Bukilica M, et al. Exploring the Link between Hydrodynamic Size and Immunoglobulins of Circulating Immune Complexes in Rheumatoid Arthritis Patients. Int J Mol Sci. 2024 Mar 1;25(6). doi:10.3390/ijms25063138
34. Tay MZ, Wiehe K, Pollara J. Antibody dependent cellular phagocytosis in antiviral immune responses. Front Immunol. 2019;10(FEB). doi:10.3389/fimmu.2019.00332
35. Edgar JE, Bournazos S. Fc-FcγR interactions during infections: From neutralizing antibodies to antibody-dependent enhancement. Immunol Rev. 2024 Nov 1;328(1):221–42. doi:10.1111/imr.13393
36. Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: Disease regulation by immune complexes. Lancet Infect Dis. 2010;10(10):712–22. doi:10.1016/S1473-3099(10)70166-3
37. Ankerhold J, Giese S, Kolb P, Maul-Pavicic A, Voll RE, Göppert N, et al. Circulating multimeric immune complexes contribute to immunopathology in COVID-19. Nat Commun. 2022 Dec 1;13(1). doi:10.1038/s41467-022-32867-z
38. Nimmerjahn F, Gordan S, Lux A. FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. Trends Immunol. 2015 Jun 1;36(6):325–36. doi:10.1016/j.it.2015.04.005
39. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. Immunol Rev. 2015 Nov 1;268(1):25–51. doi:10.1111/imr.12350
40. Beneduce C, Nguyen S, Washburn N, Schaeck J, Meccariello R, Holte K, et al. Inhibitory Fc-Gamma IIb Receptor Signaling Induced by Multivalent IgG-Fc Is Dependent on Sialylation. Cells. 2023 Sep 1;12(17). doi:10.3390/cells12172130
41. Vorsatz C, Friedrich N, Nimmerjahn F, Biburger M. There is strength in numbers: Quantitation of Fc gamma receptors on murine tissue-resident macrophages. Int J Mol Sci. 2021 Nov 1;22(22). doi:10.3390/ijms222212172
42. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. Nat Rev Immunol. 2015 Dec 1;15(12):731–44. doi:10.1038/nri3920

43. Kerneur C, Cano CE, Olive D. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer. Front Immunol. 2022 Oct 17;13. doi:10.3389/fimmu.2022.1026954
44. Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, Kalergis AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. Immunology. 2018 Jun 1;154(2):186–95. doi:10.1111/imm.12910
45. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. Cell Immunol. 2013;281(1):51–61. doi:https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010
46. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. Int J Mol Sci. 2018 Jun 19;19(6). doi:10.3390/ijms19061801
47. Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Macrophage Polarity and Disease Control. Int J Mol Sci. 2022 Jan 1;23(1). doi:10.3390/ijms23010144
48. Sezginer O, Unver N. Dissection of pro-tumoral macrophage subtypes and immunosuppressive cells participating in M2 polarization. Inflammation Research. 2024 Sep 1;73(9):1411–23. doi:10.1007/s00011-024-01907-3
49. Xue J, Schmidt S V., Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. Immunity. 2014 Feb 20;40(2):274–88. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006
50. Lin J Da, Nishi H, Poles J, Niu X, Mccauley C, Rahman K, et al. Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like properties, during atherosclerosis progression and regression. JCI Insight. 2019 Feb 21;4(4). doi:10.1172/jci.insight.124574
51. Mould KJ, Jackson ND, Henson PM, Seibold M, Janssen WJ. Single cell RNA sequencing identifies unique inflammatory airspace macrophage subsets. JCI Insight. 2019 Mar 7;4(5). doi:10.1172/jci.insight.126556
52. Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2018 Jan 1;18(1):35–45. doi:10.1038/nri.2017.76
53. Luo M, Zhao F, Cheng H, Su M, Wang Y. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. Front Immunol. 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1352946

54. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. Signal Transduct Target Ther. 2021 Dec 1;6(1). doi:10.1038/s41392-021-00687-0
55. Ley K, Pramod AB, Croft M, Ravichandran KS, Ting JP. How mouse macrophages sense what is going on. Front Immunol. 2016 Jun 2;7(JUN). doi:10.3389/fimmu.2016.00204
56. Hartenstein V, Martinez P. Phagocytosis in cellular defense and nutrition: a food-centered approach to the evolution of macrophages. Cell Tissue Res. 2019 Sep 1;377(3):527–47. doi:10.1007/s00441-019-03096-6
57. Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: Multiple ways to enter the cell. Cell Res. 2010 Mar;20(3):256–75. doi:10.1038/cr.2010.19
58. Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. Front Immunol. 2014;5(OCT). doi:10.3389/fimmu.2014.00491
59. Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. Front Immunol. 2020 Jun 2;11. doi:10.3389/fimmu.2020.01066
60. Depierre M, Pompili C, Niedergang F. Phagocytosis at a glance. J Cell Sci. 2025 Jun 1;138(12). doi:10.1242/jcs.263833
61. Sheng Y, Hu W, Chen S, Zhu X. Efferocytosis by macrophages in physiological and pathological conditions: regulatory pathways and molecular mechanisms. Front Immunol. 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1275203
62. Razi S, Yaghmoorian Khojini J, Kargarijam F, Panahi S, Tahershamsi Z, Tajbakhsh A, et al. Macrophage efferocytosis in health and disease. Cell Biochem Funct. 2023 Mar 1;41(2):152–65. doi:https://doi.org/10.1002/cbf.3780
63. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Aug;8(8):603–12. doi:10.1038/nrm2216
64. Bandola-Simon J, Roche PA. Regulation of MHC class II and CD86 expression by March-I in immunity and disease. Curr Opin Immunol. 2023 Jun 1;82. doi:10.1016/j.coi.2023.102325
65. Halliday N, Williams C, Kennedy A, Waters E, Pesenacker AM, Soskic B, et al. CD86 Is a Selective CD28 Ligand Supporting FoxP3+ Regulatory T Cell Homeostasis in the Presence of High Levels of CTLA-4. Front Immunol. 2020 Dec 8;11. doi:10.3389/fimmu.2020.600000

66. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. Front Immunol. 2019;10(JULY). doi:10.3389/fimmu.2019.01462
67. Mass E, Nimmerjahn F, Kierdorf K, Schlitzer A. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. Nat Rev Immunol. 2023 Sep 1;23(9):563–79. doi:10.1038/s41577-023-00848-y
68. Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. Nat Immunol. 2016 Jun 21;17(7):797–805. doi:10.1038/ni.3423
69. Pallarés-Moratalla C, Bergers G. The ins and outs of microglial cells in brain health and disease. Front Immunol. 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1305087
70. Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, et al. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. Cell Rep. 2017 Jan 10;18(2):391–405. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.041.
71. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. Front Cell Neurosci. 2020 Aug 6;14. doi:10.3389/fncel.2020.00198
72. Squarzoni P, Thion MS, Garel S. Neuronal and microglial regulators of cortical wiring: Usual and novel guideposts. Front Neurosci. 2015;9(JUN). doi:10.3389/fnins.2015.00248
73. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017;33(35):27. doi:10.1146/annurev-immunol
74. Moehle MS, West AB. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? Neuroscience. 2015;302:59–73. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.018
75. Kumar A, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma. 2016 Oct 1;33(19):1732–50. doi:10.1089/neu.2015.4268
76. Jung ES, Suh K, Han J, Kim H, Kang HS, Choi WS, et al. Amyloid-β activates NLRP3 inflammasomes by affecting microglial immunometabolism through the Syk-AMPK pathway. Aging Cell. 2022 May 1;21(5). doi:10.1111/acel.13623

77. Scheiblich H, Bousset L, Schwartz S, Griep A, Latz E, Melki R, et al. Microglial NLRP3 Inflammasome Activation upon TLR2 and TLR5 Ligation by Distinct α-Synuclein Assemblies. The Journal of Immunology. 2021 Oct 15;207(8):2143–54. doi:10.4049/jimmunol.2100035
78. Xu W, Huang Y, Zhou R. NLRP3 inflammasome in neuroinflammation and central nervous system diseases. Cell Mol Immunol. 2025 Apr 1. doi:10.1038/s41423-025-01275-w
79. Knoll R, Schultze JL, Schulte-Schrepping J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. Front Immunol. 2021 Jul 21;12. doi:10.3389/fimmu.2021.720109
80. Yu S, Ge H, Li S, Qiu HJ. Modulation of Macrophage Polarization by Viruses: Turning Off/On Host Antiviral Responses. Front Microbiol. 2022 Feb 11;13. doi:10.3389/fmicb.2022.839585
81. Kwon YC, Meyer K, Peng G, Chatterjee S, Hoft DF, Ray R. Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Induces an Immunoregulatory Phenotype in Macrophages. Hepatology. 2019 May 1;69(5):1873–84. doi:10.1002/hep.29843
82. Ouyang P, Rakus K, van Beurden SJ, Westphal AH, Davison AJ, Gatherer D, et al. IL-10 encoded by viruses: a remarkable example of independent acquisition of a cellular gene by viruses and its subsequent evolution in the viral genome. Journal of General Virology. 2014;95(2):245–62. doi:https://doi.org/10.1099/vir.0.058966-0
83. Veenhuis RT, Abreu CM, Costa PAG, Ferreira EA, Ratliff J, Pohlenz L, et al. Monocyte-derived macrophages contain persistent latent HIV reservoirs. Nat Microbiol. 2023 May 1;8(5):833–44. doi:10.1038/s41564-023-01349-3
84. Zaiss AK, Vilaysane A, Cotter MJ, Clark SA, Meijndert HC, Colarusso P, et al. Antiviral Antibodies Target Adenovirus to Phagolysosomes and Amplify the Innate Immune Response. The Journal of Immunology. 2009 Jun 1;182(11):7058–68. doi:10.4049/jimmunol.0804269
85. Narayan R, Tripathi S. Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Oct 2;10. doi:10.3389/fcimb.2020.580096
86. Lacy P. Editorial: Secretion of cytokines and chemokines by innate immune cells. Frontiers in Immunology. Frontiers Research Foundation; 2015. doi:10.3389/fimmu.2015.00190

87. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. BASIC IMMUNOLOGY: FUNCTIONS AND DISORDERS OF THE IMMUNE SYSTEM, SIXTH EDITION. Elsevier; 2020.
88. Zhou C, Gao Y, Ding P, Wu T, Ji G. The role of CXCL family members in different diseases. Cell Death Discovery. Springer Nature; 2023. doi:10.1038/s41420-023-01524-9
89. Huynh KK, Kay JG, Stow JL, Grinstein S. Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. Physiology. 2007 Dec;22(6):366–72. doi:10.1152/physiol.00028.2007
90. Garlanda C, Di Ceglie I, Jaillon S. IL-1 family cytokines in inflammation and immunity. Cell Mol Immunol. 2025 Nov 1;22(11):1345–62. doi:10.1038/s41423-025-01358-8
91. Zhang K, Liu J, Liu Q, Zhu N, Ye B. Macrophage-derived chemokines in T cell regulation: implications for cancer immunotherapy. Front Immunol. 2026;16. doi:10.3389/fimmu.2025.1739154
92. Gencer S, Evans BR, Van Der Vorst EPC, Döring Y, Weber C. Inflammatory chemokines in atherosclerosis. Cells. 2021 Feb 1;10(2):1–26. doi:10.3390/cells10020226
93. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. FEBS Journal. 2018 Aug 1;285(16):2944–71. doi:10.1111/febs.14466
94. Skelly DT, Hennessy E, Dansereau MA, Cunningham C. A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1B, TNF-α and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. PLoS One. 2013 Jul 1;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0069123
95. Shi H, Han X, Sun Y, Shang C, Wei M, Ba X, et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 and CXCL2 produced by tumor promote the generation of monocytic myeloid-derived suppressor cells. Cancer Sci. 2018 Dec 1;109(12):3826–39. doi:10.1111/cas.13809
96. Boro M, Balaji KN. CXCL1 and CXCL2 Regulate NLRP3 Inflammasome Activation via G-Protein–Coupled Receptor CXCR2. The Journal of Immunology. 2017 Sep 1;199(5):1660–71. doi:10.4049/jimmunol.1700129
97. Ding Q, Lu P, Xia Y, Ding S, Fan Y, Li X, et al. CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. Cancer Med. 2016 Nov 1;5(11):3246–59. doi:10.1002/cam4.934
98. Swanson K V., Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol. 2019 Aug 1;19(8):477–89. doi:10.1038/s41577-019-0165-0

99. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol. 2020 Feb 1;20(2):95–112. doi:10.1038/s41577-019-0215-7
100. Yao J, Sterling K, Wang Z, Zhang Y, Song W. The role of inflammasomes in human diseases and their potential as therapeutic targets. Signal Transduct Target Ther. 2024 Dec 1;9(1). doi:10.1038/s41392-023-01687-y
101. Andreeva L, David L, Rawson S, Shen C, Pasricha T, Pelegrin P, et al. NLRP3 cages revealed by full-length mouse NLRP3 structure control pathway activation. Cell. 2021 Dec 22;184(26):6299-6312.e22. doi:10.1016/j.cell.2021.11.011
102. Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. Journal of Experimental Medicine. 2018 Mar 1;215(3):827–40. doi:10.1084/jem.20172222
103. Downs KP, Nguyen H, Dorfleutner A, Stehlik C. An overview of the non-canonical inflammasome. Mol Aspects Med. 2020 Dec 1;76. doi:10.1016/j.mam.2020.100924
104. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. Cell Death Dis. 2019 Feb 1;10(2). doi:10.1038/s41419-019-1413-8
105. Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F, Diaz-del-Olmo I, Nichols EM, Davis DM, et al. Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. Front Immunol. 2020 Sep 30;11. doi:10.3389/fimmu.2020.565924
106. Groslambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. J Inflamm Res. 2018;11:359–74. doi:10.2147/JIR.S141220
107. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. Immunity. 2012 Mar 23;36(3):401–14. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.009
108. Chen J, Chen ZJ. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. Nature. 2018 Dec 6;564(7734):71–6. doi:10.1038/s41586-018-0761-3
109. Hornung V, Latz E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. Eur J Immunol. 2010 Mar;40(3):620–3. doi:10.1002/eji.200940185

110. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. Int J Mol Sci. 2019 Jul 1;20(13). doi:10.3390/ijms20133328
111. Di A, Xiong S, Ye Z, Malireddi RKS, Kometani S, Zhong M, et al. The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. Immunity. 2018 Jul 17;49(1):56-65.e4. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.032
112. Groß CJ, Mishra R, Schneider KS, Médard G, Wettmarshausen J, Dittlein DC, et al. K+ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. Immunity. 2016 Oct 18;45(4):761–73. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.010
113. Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. Immunity. 2013 Aug 22;39(2):311–23. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.001
114. Lučiūnaitė A, Dalgėdienė I, Vasiliūnaitė E, Norkienė M, Kučinskaitė-Kodzė I, Žvirblienė A, et al. Immunogenic Properties and Antigenic Similarity of Virus-like Particles Derived from Human Polyomaviruses. Int J Mol Sci. 2023 Mar 1;24(5). doi:10.3390/ijms24054907
115. Yalcinkaya M, Tall AR. Cholesterol Crystals as Triggers of NLRP3 Inflammasome Activation in Atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2025 Dec 1;27(1). doi:10.1007/s11883-025-01323-w
116. Barlan AU, Danthi P, Wiethoff CM. Lysosomal localization and mechanism of membrane penetration influence nonenveloped virus activation of the NLRP3 inflammasome. Virology. 2011 Apr 10;412(2):306–14. doi:10.1016/j.virol.2011.01.019
117. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. Immunity. 2009 Apr 17;30(4):556–65. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.005
118. Shin HJ, Kim IS, Kim JK, Jo EK. Molecular mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. Exp Mol Med. 2026 Mar 1;58(3):650–63. doi:10.1038/s12276-026-01656-9
119. Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome—A Key Player in Antiviral Responses. Front Immunol. 2020 Feb 18;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00211

120. Triantafilou K, Kar S, Van Kuppeveld FJM, Triantafilou M. Rhinovirus-induced calcium flux triggers NLRP3 and NLRC5 activation in bronchial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013 Dec;49(6):923–34. doi:10.1165/rcmb.2013-0032OC
121. Campbell GR, To RK, Hanna J, Spector SA. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway. iScience. 2021 Apr 23;24(4). doi:10.1016/j.isci.2021.102295
122. Karaba AH, Figueroa A, Massaccesi G, Botto S, DeFilippis VR, Cox AL. Herpes simplex virus type 1 inflammasome activation in proinflammatory human macrophages is dependent on NLRP3, ASC, and caspase-1. PLoS One. 2020;15(2). doi:10.1371/journal.pone.0229570
123. Komune N, Ichinohe T, Ito M, Yanagi Y. Measles Virus V Protein Inhibits NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1β Secretion. J Virol. 2011 Dec 15;85(24):13019–26. doi:10.1128/jvi.05942-11
124. Haneklaus M, Gerlic M, Kurowska-Stolarska M, Rainey AA, Pich D, McInnes IB, et al. Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1β Production. The Journal of Immunology. 2012 Oct 15;189(8):3795–9. doi:10.4049/jimmunol.1200312
125. Yu X, Lan P, Hou X, Han Q, Lu N, Li T, et al. HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1ß; production via suppressing the NF-&kB pathway and ROS production. J Hepatol. 2017 Apr 1;66(4):693–702. doi:10.1016/j.jhep.2016.12.018
126. Coates BM, Staricha KL, Koch CM, Cheng Y, Shumaker DK, Budinger GRS, et al. Inflammatory Monocytes Drive Influenza A Virus–Mediated Lung Injury in Juvenile Mice. The Journal of Immunology. 2018 Apr 1;200(7):2391–404. doi:10.4049/jimmunol.1701543
127. Saylor D, Dickens AM, Sacktor N, Haughey N, Slusher B, Pletnikov M, et al. HIV-associated neurocognitive disorder - Pathogenesis and prospects for treatment. Nat Rev Neurol. 2016 Apr 1;12(4):234–48. doi:10.1038/nrneurol.2016.27
128. Harris J, Borg NA. The multifaceted roles of NLRP3-modulating proteins in virus infection. Front Immunol. 2022 Aug 30;13. doi:10.3389/fimmu.2022.987453
129. Vong CT, Tseng HHL, Yao P, Yu H, Wang S, Zhong Z, et al. Specific NLRP3 inflammasome inhibitors: promising therapeutic agents for

inflammatory diseases. Drug Discov Today. 2021 Jun 1;26(6):1394–408. doi:10.1016/j.drudis.2021.02.018
130. Huang Y, Jiang H, Chen Y, Wang X, Yang Y, Tao J, et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases. EMBO Mol Med. 2018 Apr 1;10(4). doi:10.15252/emmm.201708689
131. Riccaboni M, Bianchi I, Petrillo P. Spleen tyrosine kinases: Biology, therapeutic targets and drugs. Drug Discov Today. 2010 Jul;15(13–14):517–30. doi:10.1016/j.drudis.2010.05.001
132. Tohyama Y, Yamamura H. Protein tyrosine kinase, Syk: A key player in phagocytic cells. J Biochem. 2009 Mar;145(3):267–73. doi:10.1093/jb/mvp001
133. Grädler U, Schwarz D, Dresing V, Musil D, Bomke J, Frech M, et al. Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. J Mol Biol. 2013 Jan 23;425(2):309–33. doi:10.1016/j.jmb.2012.11.007
134. Mansueto MS, Reens A, Rakhilina L, Chi A, Pan BS, Miller JR. A reevaluation of the spleen tyrosine kinase (SYK) activation mechanism. Journal of Biological Chemistry. 2019 May 10;294(19):7658–68. doi:10.1074/jbc.RA119.008045
135. Strasser D, Neumann K, Bergmann H, Marakalala MJ, Guler R, Rojowska A, et al. Syk Kinase-Coupled C-type Lectin Receptors Engage Protein Kinase C-δ to Elicit Card9 Adaptor-Mediated Innate Immunity. Immunity. 2012 Jan 27;36(1):32–42. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.015
136. Hatton O, Phillips LK, Vaysberg M, Hurwich J, Krams SM, Martinez OM. Syk activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt prevents HtrA2-dependent loss of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) to promote survival of Epstein-Barr Virus+(EBV+) B cell lymphomas. Journal of Biological Chemistry. 2011 Oct 28;286(43):37368–78. doi:10.1074/jbc.M111.255125
137. Lowell CA. Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: Signaling cross talk. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Mar;3(3):1–16. doi:10.1101/cshperspect.a002352
138. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, Brown GD. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. Eur J Immunol. 2011 Feb;41(2):276–81. doi:10.1002/eji.201041252

139. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses. Nat Rev Immunol. 2009 Jul;9(7):465–79. doi:10.1038/nri2569
140. Wong KW, Jacobs WR. Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by Mycobacterium tuberculosis. Cell Microbiol. 2011 Sep;13(9):1371–84. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01625.x
141. Pandori WJ, Lima TS, Mallya S, Kao TH, Gov L, Lodoen MB. Toxoplasma gondii activates a Syk-CARD9-NF-κB signaling axis and gasdermin Dindependent release of IL-1β during infection of primary human monocytes. PLoS Pathog. 2019;15(8). doi:10.1371/journal.ppat.1007923
142. Wang C, Sharma N, Veleeparambil M, Kessler PM, Willard B, Sen GC. STING-Mediated Interferon Induction by Herpes Simplex Virus 1 Requires the Protein Tyrosine Kinase Syk. American Society for Microbiology. 2021;12(6). doi:10.1128/mbio.03228-21.
143. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Jun 1;18(6):361–74. doi:10.1038/nrm.2017.16
144. Varshney P, Yadav V, Saini N. Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. Immunology. 2016 Sep 1;149(1):13–24. doi:10.1111/imm.12617
145. Sapon K, Manka R, Janas T, Janas T. The role of lipid rafts in vesicle formation. J Cell Sci. 2023 May 1;136(9). doi:10.1242/jcs.260887
146. Van Wilgenburg B, Moore MD, James WS, Cowley SA. The productive entry pathway of HIV-1 in macrophages is dependent on endocytosis through lipid rafts containing CD4. PLoS One. 2014 Jan 22;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0086071
147. Glende J, Schwegmann-Wessels C, Al-Falah M, Pfefferle S, Qu X, Deng H, et al. Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. Virology. 2008 Nov 25;381(2):215–21. doi:10.1016/j.virol.2008.08.026
148. Baglivo M, Baronio M, Natalini G, Beccari T, Chiurazzi P, Fulcheri E, et al. Natural small molecules as inhibitors of coronavirus lipid-dependent attachment to host cells: A possible strategy for reducing SARS-COV-2 infectivity? Acta Biomedica. 2020;91(1):161–4. doi:10.23750/abm.v91i1.9402

149. Kulkarni R, Wiemer EAC, Chang W. Role of Lipid Rafts in Pathogen-Host Interaction. Front Immunol. 2022 Jan 20;12. doi:10.3389/fimmu.2021.815020
150. Ripa I, Andreu S, López-Guerrero JA, Bello-Morales R. Membrane Rafts: Portals for Viral Entry. Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2021. doi:10.3389/fmicb.2021.631274
151. Fazeli MM, Heydari Sirat S, Shatizadeh Malekshahi S. Novel Human Polyomaviruses Discovered From 2007 to the Present: An Update of Current Knowledge. Rev Med Virol. 2025 Mar 1;35(2). doi:10.1002/rmv.70017
152. Moens U, Krumbholz A, Ehlers B, Zell R, Johne R, Calvignac-Spencer S, et al. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. Infection, Genetics and Evolution. 2017 Oct 1;54:18–38. doi:10.1016/j.meegid.2017.06.011
153. Maginnis MS. Encyclopedia of Virology Human Polyomaviruses (Papillomaviridae). 4th ed. Vol. 2. Elsevier; 2021. 518–527 p. doi:doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.21316-2
154. Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, Prescott EL, Panou MM, Macdonald A, et al. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. Structure. 2016 Apr 5;24(4):528–36. doi:10.1016/j.str.2016.02.008
155. Matrosovich M, Herrler G, Klenk HD. Sialic acid receptors of viruses. Top Curr Chem. 2015 Jul 31;367:1–28. doi:10.1007/128_2013_466
156. Helanterä I, Hirsch HH, Wernli M, Ortiz F, Lempinen M, Räisänen-Sokolowski A, et al. Simultaneous BK Polyomavirus (BKPyV)-associated nephropathy and hemorrhagic cystitis after living donor kidney transplantation. Journal of Clinical Virology. 2016 Mar 1;76:4–7. doi:10.1016/j.jcv.2015.12.008
157. Neu U, Wang J, Macejak D, Garcea RL, Stehle T. Structures of the Major Capsid Proteins of the Human Karolinska Institutet and Washington University Polyomaviruses. J Virol. 2011 Jul 15;85(14):7384–92. doi:10.1128/jvi.00382-11
158. Norkiene M, Stonyte J, Ziogiene D, Mazeike E, Sasnauskas K, Gedvilaite A. Production of recombinant VP1-derived virus-like particles from novel human polyomaviruses in yeast. BMC Biotechnol. 2015 Aug 4;15(1). doi:10.1186/s12896-015-0187-z

159. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. PLoS Pathog. 2009 Mar;5(3). doi:10.1371/journal.ppat.1000363
160. Prezioso C, Moens U, Oliveto G, Brazzini G, Piacentini F, Frasca F, et al. Ki and wu polyomavirus in respiratory samples of sars-cov-2 infected patients. Microorganisms. 2021 Jun 1;9(6). doi:10.3390/microorganisms9061259
161. Caldeira DB, de Souza Luna LK, Watanabe A, Perosa AH, Granato C, Bellei N. The occurrence of polyomaviruses WUPyV and KIPyV among patients with severe respiratory infections. Brazilian Journal of Microbiology. 2019 Jan 23;50(1):133–7. doi:10.1007/s42770-018-0038-x
162. Barzon L, Squarzon L, Militello V, Trevisan M, Porzionato A, Macchi V, et al. WU and KI polyomaviruses in the brains of hiv-positive patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. Journal of Infectious Diseases. 2009 Nov;200(11):1755–8. doi:10.1086/648095
163. Imperiale MJ, Jiang M. Polyomavirus Persistence. Annu Rev Virol. 2016 Sep 29;3:517–32. doi:10.1146/annurev-virology-110615-042226
164. Chung YH, Cai H, Steinmetz NF. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. Adv Drug Deliv Rev. 2020 Jan 1;156:214–35. doi:10.1016/j.addr.2020.06.024
165. Nooraei S, Bahrulolum H, Hoseini ZS, Katalani C, Hajizade A, Easton AJ, et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. Journal of Nanobiotechnology. BioMed Central Ltd; 2021. doi:10.1186/s12951-021-00806-7.
166. Wang C, Wei T, Huang Y, Guo Q, Xie Z, Song J, et al. Isolation and characterization of WUPyV in polarized human airway epithelial cells. BMC Infect Dis. 2020 Jul 9;20(1). doi:10.1186/s12879-020-05224-y.
167. Mohsen MO, Bachmann MF. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. Cell Mol Immunol. 2022 Sep 1;19(9):993–1011. doi:10.1038/s41423-022-00897-8
168. Peretti A, Scorpio DG, Kong WP, Pang YYS, McCarthy MP, Ren K, et al. A multivalent polyomavirus vaccine elicits durable neutralizing antibody responses in macaques. Vaccine. 2023 Mar 3;41(10):1735–42. doi:10.1016/j.vaccine.2023.02.002

169. Hirsiger JR, Scarascia S, Recher M, Bantug G, Berger CT. Preexisting IgG forms immune complexes and links local thermal reactogenicity with immunogenicity in influenza vaccination. NPJ Vaccines. 2026 May 2;11(1):137. doi:10.1038/s41541-026-01477-x
170. Giulian D, Baker TJ. Characterization of Ameboid Microglia Isolated from Developing Mammalian Brain. Vol. 6. 1986.
171. Plikusiene I, Balevicius Z, Ramanaviciene A, Talbot J, Mickiene G, Balevicius S, et al. Evaluation of affinity sensor response kinetics towards dimeric ligands linked with spacers of different rigidity: Immobilized recombinant granulocyte colony-stimulating factor based synthetic receptor binding with genetically engineered dimeric analyte derivatives. Biosens Bioelectron. 2020 May 15;156:112112. doi:10.1016/J.BIOS.2020.112112
172. Dalgėdienė I, Lučiūnaitė A, Žvirblienė A. Activation of macrophages by oligomeric proteins of different size and origin. Mediators Inflamm. 2018;2018. doi:10.1155/2018/7501985
173. Lučiūnaitė A, McManus RM, Jankunec M, Rácz I, Dansokho C, Dalgėdienė I, et al. Soluble Aβ oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. J Neurochem. 2020 Dec 1;155(6):650–61. doi:10.1111/jnc.14945
174. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. Genome Biol. 2006 Dec 29;7(12). doi:10.1186/gb-2006-7-12-243
175. DePaula-Silva AB, Gorbea C, Doty DJ, Libbey JE, Sanchez JMS, Hanak TJ, et al. Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation. J Neuroinflammation. 2019 Jul 20;16(1). doi:10.1186/s12974-019-1545-x
176. Mangalam A, Rodriguez M, David C. Role of MHC class II expressing CD4+ T cells in proteolipid protein91-110-induced EAE in HLA-DR3 transgenic mice. Eur J Immunol. 2006 Dec;36(12):3356–70. doi:10.1002/eji.200636217
177. Lučiūnaitė A, Mašalaitė K, Plikusiene I, Maciulis V, Juciute S, Norkienė M, et al. Structural properties of immune complexes formed by viral antigens and specific antibodies shape the inflammatory response of macrophages. Cell Biosci. 2024 Dec 1;14(1). doi:10.1186/s13578-024-01237-1
178. Park YJ, Acosta D, Rubel Hoq M, Khurana S, Golding H, Zaitseva M. Pyrogenic and inflammatory mediators are produced by polarized M1

and M2 macrophages activated with D-dimer and SARS-CoV-2 spike immune complexes. Cytokine. 2024 Jan 1;173. doi:10.1016/j.cyto.2023.156447

179. Csoma E, Lengyel G, Bányai K, Takács P, Ánosi N, Marton S, et al. Study of Karolinska Institutet and Washington University polyomaviruses in Tonsil, Adenoid, Throat Swab and Middle Ear Fluid Samples. Future Microbiol. 2018 Dec 1;13(16):1719–30. doi:10.2217/fmb-2018-0280
180. Hansen-Estruch C, Coleman KK, Thoon KC, Low JG, Anderson BD, Gray GC. Prevalence of respiratory polyomaviruses among pediatric patients with respiratory symptoms in Singapore. Front Pediatr. 2018 Aug 17;6. doi:10.3389/fped.2018.00228
181. De Gascun CF, Carr MJ. Human polyomavirus reactivation: Disease pathogenesis and treatment approaches. Clin Dev Immunol. 2013;2013. doi:10.1155/2013/373579
182. Crowe JE. Human Antibodies for Viral Infections. Annual Review of Immunology Downloaded from www.annualreviews.org Guest. 2025;15:32. doi:10.1146/annurev-immunol-042718
183. Yamin R, Jones AT, Hoffmann HH, Schäfer A, Kao KS, Francis RL, et al. Fc-engineered antibody therapeutics with improved anti-SARS-CoV-2 efficacy. Nature. 2021 Nov 18;599(7885):465–70. doi:10.1038/s41586-021-04017-w
184. Pantaleo G, Correia B, Fenwick C, Joo VS, Perez L. Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress. Nat Rev Drug Discov. 2022 Sep 1;21(9):676–96. doi:10.1038/s41573-022-00495-3
185. Kang TH, Jung ST. Boosting therapeutic potency of antibodies by taming Fc domain functions. Exp Mol Med. 2019 Nov 1;51(11). doi:10.1038/s12276-019-0345-9
186. Graham BS. Vaccines against respiratory syncytial virus: The time has finally come. Vaccine. 2016 Jun 24;34(30):3535–41. doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.083
187. Polack FP. Atypical Measles and Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease (ERD) Made Simple. Pediatr Res. 2007. doi:10.1203/PDR.0b013e3180686ce0.
188. Kolb P, Giese S, Voll RE, Hengel H, Falcone V. Immune complexes as culprits of immunopathology in severe COVID-19. Med Microbiol Immunol. 2023 Apr 1;212(2):185–91. doi:10.1007/s00430-022-00743-8

189. Abduljaleel Z, Shahzad N, Aziz SA, Malik SM. Monoclonal antibody designed for SARS-nCoV-2 spike protein of receptor binding domain on antigenic targeted epitopes for inhibition to prevent viral entry. Mol Divers. 2023 Apr 1;27(2):695–708. doi:10.1007/s11030-022-10449-x
190. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. doi:10.1186/s43141-021-00264-6
191. Laustsen AH, Greiff V, Karatt-Vellatt A, Muyldermans S, Jenkins TP. Animal Immunization, in Vitro Display Technologies, and Machine Learning for Antibody Discovery. Trends Biotechnol. 2021 Dec 1;39(12):1263–73. doi:10.1016/j.tibtech.2021.03.003
192. Zhang X, Tang Y, Wu M, Wang C, Hu L, Zhang Z. The Origin of Capsid-Derived Immune Complexes and Their Impact on HBV-Induced Liver Diseases. Viruses. 2022 Dec 1;14(12). doi:10.3390/v14122766
193. Sacco K, Castagnoli R, Vakkilainen S, Liu C, Delmonte OM, Oguz C, et al. Immunopathological signatures in multisystem inflammatory syndrome in children and pediatric COVID-19. Nat Med. 2022 May 1;28(5):1050–62. doi:10.1038/s41591-022-01724-3
194. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. Front Immunol. 2020 Jun 16;11. doi:10.3389/fimmu.2020.01446
195. Janczy JR, Ciraci C, Haasken S, Iwakura Y, Olivier AK, Cassel SL, et al. Immune Complexes Inhibit IL-1 Secretion and Inflammasome Activation. The Journal of Immunology. 2014 Nov 15;193(10):5190–8. doi:10.4049/jimmunol.1400628
196. Trudler D, Nazor KL, Eisele YS, Grabauskas T, Dolatabadi N, Parker J, et al. Soluble α-synuclein-antibody complexes activate the NLRP3 inflammasome in hiPSC-derived microglia. PNAS. 2021;118(15). doi:10.1073/pnas.2025847118/-/DCSupplemental
197. Choi I, Heaton GR, Lee YK, Yue Z. Regulation of α-synuclein homeostasis and inflammasome activation by microglial autophagy. Sci Adv. 2022;8:1298. doi:10.1126/sciadv.abn1298.Epub2022Oct26
198. Callahan V, Hawks S, Crawford MA, Lehman CW, Morrison HA, Ivester HM, et al. The pro-inflammatory chemokines cxcl9, cxcl10 and cxcl11 are upregulated following sars-cov-2 infection in an akt-dependent manner. Viruses. 2021 Jun 1;13(6). doi:10.3390/v13061062

199. Yu X, Chen Y, Cui L, Yang K, Wang X, Lei L, et al. CXCL8, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 as biomarkers of liver injury caused by chronic hepatitis B. Front Microbiol. 2022 Nov 24;13. doi:10.3389/fmicb.2022.1052917
200. Yin X, Wang Z, Wu T, Ma M, Zhang Z, Chu Z, et al. The combination of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 levels during primary HIV infection predicts HIV disease progression. J Transl Med. 2019 Dec 13;17(1). doi:10.1186/s12967-019-02172-3
201. Lowery SA, Sariol A, Perlman S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. Cell Host Microbe. 2021 Jul 14;29(7):1052–62. doi:10.1016/j.chom.2021.05.004
202. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. Cell. 2020 May 28;181(5):1036-1045.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.04.026
203. Arunachalam PS, Wimmers F, Ka Pun Mok C, P M Perera RA, Scott M, Hagan T, et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. Science (1979). 2020;369. doi:10.1126/science.abc6261
204. Dalit L, Alvarado C, Küijper L, Kueh AJ, Weir A, D'Amico A, et al. CXCL11 expressing C57BL/6 mice have intact adaptive immune responses to viral infection. Immunol Cell Biol. 2022 May 1;100(5):312–22. doi:10.1111/imcb.12541
205. House IG, Savas P, Lai J, Chen AXY, Oliver AJ, Teo ZL, et al. Macrophage-derived CXCL9 and CXCL10 are required for antitumor immune responses following immune checkpoint blockade. Clinical Cancer Research. 2020 Jan 15;26(2):487–504. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1868
206. Jackson JA, Kim EJ, Begley B, Cheeseman J, Harden T, Perez SD, et al. Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. American Journal of Transplantation. 2011 Oct;11(10):2228–34. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03680.x
207. Mohammadi MH, Kariminik A. CC and CXC chemokines play key roles in the development of polyomaviruses related pathological conditions. Virol J. 2021 Dec 1;18(1). doi:10.1186/s12985-021-01582-4

208. Serdar M, Kempe K, Herrmann R, Picard D, Remke M, Herz J, et al. Involvement of CXCL1/CXCR2 During Microglia Activation Following Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. Front Neurol. 2020 Oct 6;11. doi:10.3389/fneur.2020.540878
209. Biondo C, Mancuso G, Midiri A, Signorino G, Domina M, Lanza Cariccio V, et al. The interleukin-1β/CXCL1/2/neutrophil axis mediates host protection against group B streptococcal infection. Infect Immun. 2014;82(11):4508–17. doi:10.1128/IAI.02104-14
210. Piper SC, Ferguson J, Kay L, Parker LC, Sabroe I, Sleeman MA, et al. The Role of Interleukin-1 and Interleukin-18 in Pro-Inflammatory and Anti-Viral Responses to Rhinovirus in Primary Bronchial Epithelial Cells. PLoS One. 2013 May 28;8(5). doi:10.1371/journal.pone.0063365
211. Feng S, Wierzbowski MC, Hrovat-Schaale K, Dumortier A, Zhang Y, Zyulina M, et al. Mechanisms of NLRP3 activation and inhibition elucidated by functional analysis of disease-associated variants. Nat Immunol. 2025 Mar 1;26(3):511–23. doi:10.1038/s41590-025-02088-9
212. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Van De Leur E, Lehnen E, Liedtke C, Weiskirchen R. NLRP3 inflammasome expression is driven by NF-κB in cultured hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Mar 13;458(3):700–6. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.029
213. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017;2. doi:10.1038/sigtrans.2017.23
214. Arnold CE, Gordon P, Barker RN, Wilson HM. The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. Immunobiology. 2015 Jan 1;220(1):10–9. doi:10.1016/j.imbio.2014.09.022
215. Tung CC, Rathore APS, St. John AL. Conventional and non-conventional antigen presentation by mast cells. Discovery Immunology. 2023;2(1). doi:10.1093/discim/kyad016
216. Agadjanyan MG, Kim JJ, Trivedi N, Wilson DM, Monzavi-Karbassi B, Morrison LD, et al. CD86 (B7-2) Can Function to Drive MHC-Restricted Antigen-Specific CTL Responses In Vivo. The Journal of Immunology. 1999;162(6).
217. Junker F, Gordon J, Qureshi O. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. Front Immunol. 2020 Jul 3;11. doi:10.3389/fimmu.2020.01393

218. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses. Nat Rev Immunol. 2012 Feb;12(2):136–48. doi:10.1038/nri3152
219. Hang DTT, Song JY, Kim MY, Park JW, Shin YK. Involvement of NF-κB in changes of IFN-γ-induced CIITA/MHC-II and iNOS expression by influenza virus in macrophages. Mol Immunol. 2011 May;48(9–10):1253–62. doi:10.1016/j.molimm.2011.03.010
220. Ruysschaert JM, Lonez C. Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2015 Jul 11;1848(9):1860–7. doi:10.1016/j.bbamem.2015.03.014
221. Plikusiene I, Maciulis V, Ramanaviciene A, Balevicius Z, Buzavaite-Verteliene E, Ciplys E, et al. Evaluation of kinetics and thermodynamics of interaction between immobilized SARS-CoV-2 nucleoprotein and specific antibodies by total internal reflection ellipsometry. J Colloid Interface Sci. 2021 Jul 15;594:195–203. doi:10.1016/j.jcis.2021.02.100

SUMMARY

Abbreviations

CTxB – Cholera toxin subunit B;
DAMP – damage-associated molecular patterns;
FcR – Fc receptors;
IC – immune complexes;
IgG – immunoglobulin G;
MAb – monoclonal antibodies;
PAMP – pathogen-associated molecular patterns;
PRR – pattern recognition receptors;
ROS – reactive oxygen species;
SE – spectroscopic ellipsometry;
VLP – virus-like particles.

Introduction

Macrophages are the sentinels of innate immunity responsible for immune surveillance, initiation of immune responses, elimination of pathogens, tissue regeneration and maintenance of homeostasis (1). Macrophages can perform those functions because they have a wide range of receptors, including pathogen recognition receptors (PRRs), immune complex (IC) Fc receptors (FcRs), and others that provide information about the microenvironment. Macrophages respond to receptor activation by phagocytosis, antigen presentation and secretion of pro-inflammatory or anti-inflammatory molecules (2). The cytoplasmic PRR family NOD-like receptor NLRP3 forms an inflammasome, a multimeric protein complex consisting of three main components: the NLRP3 receptor, the adaptor protein ASC and autoproteolytically activated procaspase-1. Activation of the inflammasome results in the secretion of inflammatory cytokines, such as IL-1β, and cell death - pyroptosis. NLRP3 has numerous activators, including metabolic products, pathogen-associated molecular patterns (PAMP), and damage-associated molecular patterns (DAMP). These molecules do not activate NLRP3 directly but rather through induced changes in cellular homeostasis (3). Activation of the NLRP3 inflammasome is one of the main mechanisms of the innate immunity for protection against bacteria, fungi and viruses. However, excessive activation of the inflammasome is associated with

inflammatory disorders, Alzheimer's disease, gout, atherosclerosis, autoimmune inflammatory diseases and severe viral infections (6). Viral infections disrupt cellular homeostasis by damaging lysosomes and mitochondria and altering cytosolic ion concentrations, thereby activating the NLRP3 inflammasome (4,7,8). In addition, the structure of viral proteins is an important aspect determining activation (9). During viral infections, naturally formed antibodies and IC of viral pathogens have also been associated with inflammasome activation (10,11). However, it is not known which IC properties determine inflammasome activation and what impact they have on macrophage responses.

Spleen tyrosine kinase (SYK), a non-receptor kinase involved in immunoreceptor signalling, has been implicated in regulating NLRP3 inflammasome activation. In bacterial and fungal infections, ligand binding to specific PRRs activates SYK, promoting the assembly of the NLRP3 inflammasome. SYK has been described to directly phosphorylate the inflammasome adaptor protein ASC and facilitate inflammasome assembly (12). Also, during fungal infections, SYK-dependent generation of reactive oxygen species (ROS) activates NLRP3 (13). However, SYK is most commonly identified as a signalling molecule for immune cell receptors, such as Fcγ receptors (FcγRs). Four different classes of FcγRs are known in mice – FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII and FcγRIV, and four subclasses of immunoglobulin G (IgG) – IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3. The binding of the Fc portion of IgG-opsonised antigens to FcγRs leads to antigen internalisation and activation of signalling pathways involved in antigen clearance (15). Previous studies have shown that IC binding to FcγRs activates SYK, which transmits signals to downstream signalling molecules and initiates processes, including cytoskeletal changes, phagocytosis, cytokine and chemokine secretion, which might lead to a strong inflammatory response (14,16,17). Despite extensive research on the effects of pathogens on components of innate immunity, there is a lack of comprehensive structural and mechanistic studies of viral ICs, their interactions with macrophages, NLRP3 activation, and SYK's role in these processes.

In this work, the activation of macrophages by viral proteins and their IC was investigated. The influence of different IC thermodynamic, kinetic and structural properties on the macrophage response was analysed through the prism of NLRP3 inflammasome activation. Recombinant virus-like particles (VLPs) were chosen as an antigen model, which is a recognised safe alternative to native viruses used in vaccines (18). The functional properties of macrophages, such as endocytosis, antigen presentation molecule

expression, and lipid structure formation at the membrane surface, were also analysed in the context of NLRP3 inflammasome and SYK kinase activation.

The aim of the work: to study the response of primary mouse microglia to immune complexes composed of recombinant viral antigens that form virus-like particles and specific antibodies.

Objectives:

1. To determine the ability of viral proteins, which form virus-like particles, and different monoclonal antibodies to form immune complexes and properties of their interaction.
2. To evaluate and compare the inflammatory response and NLRP3 inflammasome activation induced by viral proteins and different immune complexes in primary mouse microglia.
3. To assess the secretion of inflammatory chemokines in microglia cells activated by viral proteins and to describe the influence of immune complexes on the chemokine secretion profile.
4. To investigate the role of SYK kinase in the activation of microglia cells induced by viral proteins and immune complexes and to evaluate SYK's activation and pharmacological inhibition influence on NLRP3 inflammasome activation, endocytosis, antigen presentation molecule expression and lipid structure formation at the membrane surface.

Scientific novelty

Activation of the NLRP3 inflammasome is associated with a strong inflammatory response during viral infection. However, little attention has still been paid to studies of NLRP3 activation induced by viral ICs. This study reveals NLRP3 inflammasome-dependent inflammatory response in macrophages (microglia) induced by IC composed of viral proteins and their antibodies. Also, this work expanded our understanding of how antibody properties and antigen interaction characteristics influence immune cell activation by combining advanced optical and acoustic spectroscopy methods with immunological methods. This study linked the properties of antibodies and IC with the ability to activate the inflammasome and change the chemokine secretion profile. Besides, this dissertation revealed that the antibody's affinity and structural properties correlate with the strength of the immune response. In addition, the results of the dissertation are relevant to the

development of new vaccines and to studies of adverse vaccination effects, as this study employs recombinant VLPs, a widely used vaccine model (18).

It is known that the SYK kinase is involved in inflammasome activation during bacterial and fungal infections (12,13). Studies have also linked SYK kinase to a strong inflammatory response induced by IC-activated FcRs (16,17). The dissertation study showed that IC induce NLRP3 assembly, ASC particle formation and inflammatory cytokine secretion via SYK-dependent pathways.

One of the most important functions of macrophages in the immune response is their ability to present antigens to T lymphocytes. The mechanisms of antigen presentation are widely studied, but there is a lack of data on IC-mediated antigen presentation in macrophages. This study highlighted that antibody properties, such as IgG subclass, determine the macrophages' ability to present antigens. In addition, it was demonstrated that SYK activation is important for the expression of antigen-presenting and costimulatory molecules on the surface of microglia. This revealed that SYK is not only important for inflammasome activation, but also links the innate and adaptive immunity through antigen presentation. In summary, the dissertation reveals new mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and the importance of SYK in macrophages' immune response to viral ICs. This study also provided new data on antibody properties and the IC they form, which affect the strength of the macrophage response.

Statements to be defended

1. Monoclonal antibodies (MAb) of different subclasses and affinities together with viral proteins (VLPs) form immune complexes that exhibit specific kinetic and structural properties.
2. The properties of immune complexes and the MAbs forming them – IgG subclass and interaction affinity are related to the strength of the microglia response and the activation of the NLRP3 inflammasome.
3. VLPs induce NLRP3 inflammasome activation-dependent chemokine secretion in microglia and the formation of immune complexes by VLPs has an impact on the chemokine secretion profile.
4. Inhibition of SYK kinase reduces immune complex-induced activation of the NLRP3 inflammasome, as well as the expression of antigen-presenting and costimulatory molecules in microglial cells.

5. Immune complexes formed by VLPs and MAbs promote the formation of lipid structures at membrane surface of microglia, an effect independent of SYK activation.

Methods

Primary mouse microglia culture was prepared from newborn C57BL/6 mouse pups according to the protocol described earlier (174). Microglia were treated with VLPs 20μg/ml and immune complexes composed of VLPs 20 μg/ml and 7.5 μg/ml murine MAbs of different subclasses: IgG1 MAb 11D2, IgG2a subclass MAbs 12F8, 12F1 and 4E12, and IgG2b subclass MAb 5H10. The properties of MAbs and their IC – MAb affinity to antigen, formation of ICs, competition for epitope coverage and others - were analysed using spectral ellipsometry, immunoprecipitation and competitive ELISA. A pH-sensitive probe, pHrodo, was used to stain VLPs and MAbs and detect phagocytosis. Uptake of VLPs and IC was confirmed with immunocytochemistry, fluorescent microscopy and flow cytometry. The immune response was assessed by measuring the chemokine and cytokine secretion by ELISA and by analysing NLRP3 inflammasome activation. Inflammasome activation and its effects were examined using the siRNA interference method and the specific inhibitor MCC950.

Additionally, the SYK kinase inhibitor R406 was used to assess SYK's influence on the immune response to VLPs and ICs. Expression of NLRP3 and phosphorylated SYK (pSYK) was analysed with Western blot and fluorescence microscopy. Immunocytochemistry was also used to analyse ASC speck formation upon NLRP3 activation and SYK inhibition. The functional properties of microglia, such as phagocytosis and the expression of molecules involved in antigen presentation, were analysed using flow cytometry. The formation of lipid raft-like structures after exposure to IC was also observed using fluorescence microscopy. *GraphPad Prism 10.1.0* was used for statistical analysis and data representation, and *ImageJ* 1.54p was used for microscopy data representation and analysis. The *FlowJoTM* v10.10 program package was used for flow cytometry data representation and analysis.

Results

This study aimed to investigate the nature and mechanisms of the response induced by viral immune complexes (IC) in macrophages. Primary mouse microglia cells were used as macrophage model. During the study, primary mouse microglia were treated with IC composed of viral antigens (VLPs) and murine monoclonal antibodies (MAbs) specific to these VLPs.

Characterization of immune complexes

First, IC uptake by microglia cells was characterised. The VLPs and MAbs were fluorescently stained separately in the cells and their signals were detected using a confocal microscope. Co-localisation of VLP and MAb signals showed that the formed IC were taken up by macrophages (Fig. 1A). To confirm endocytosis of IC, a pH-sensitive protein probe (pHrodo) and the actin-dependent endocytosis inhibitor cytochalasin D (Cyt D) were used. Microglia were treated with Cyt D and subsequently with IC formed from pHrodo-labelled VLPs and MAbs. Flow cytometry confirmed that VLP and IC are effectively phagocytosed by microglial cells – a pHrodo fluorescent signal was observed following the entry of the proteins into endosomes, whilst Cyt D inhibited the pHrodo signal in macrophages (Fig. 1 B). These results confirmed the formation of IC and phagocytosis.

Next, to determine MAb affinity and thermodynamic parameters, a high-sensitivity biosensing technique – spectroscopic ellipsometry (SE) – was applied in collaboration with prof. dr. I. Plikusienė's group from the Faculty of Chemistry and Geosciences at Vilnius University. Kinetic interaction constants, the equilibrium dissociation affinity constants (K_D), and binding rate constants (k_a) were obtained from the measurements of interaction kinetics using SE and by fitting the normalised n evolution over time to a binding mathematical model based on encounter theory (Table 1) (226). MAbs were divided into three groups according to their affinity (K_D value): medium, high and very high. 12F8 was distinguished with very high affinity, with a value of 0.07 nM; 4E12 and 5H10 were distinguished with high affinity, with values of 0.564 nM and 0.112 nM respectively; and 11D2 was distinguished with medium affinity, with a value of 1.26 nM.

The association rate constant (k_a) data indicated that 12F8 had the lowest binding rate to VLPs per second among the MAbs (Table 1). The k_a values of the other MAbs were of the same grade, although MAb 4E12 associated with VLPs faster than the others. The dissociation rate constant (k_d) also showed

that 12F8 dissociates slower than the other MAbs (Table 1). Furthermore, after calculating the stable IC formation rate constant (k_r), which corresponds to the time needed to form a tightly bound IC, it became apparent that 12F8 needed the longest time to form a stable IC (Table 1). These data show that very high-affinity MAbs bind antigens particularly fast; however, forming a stable IC is a time-consuming process.

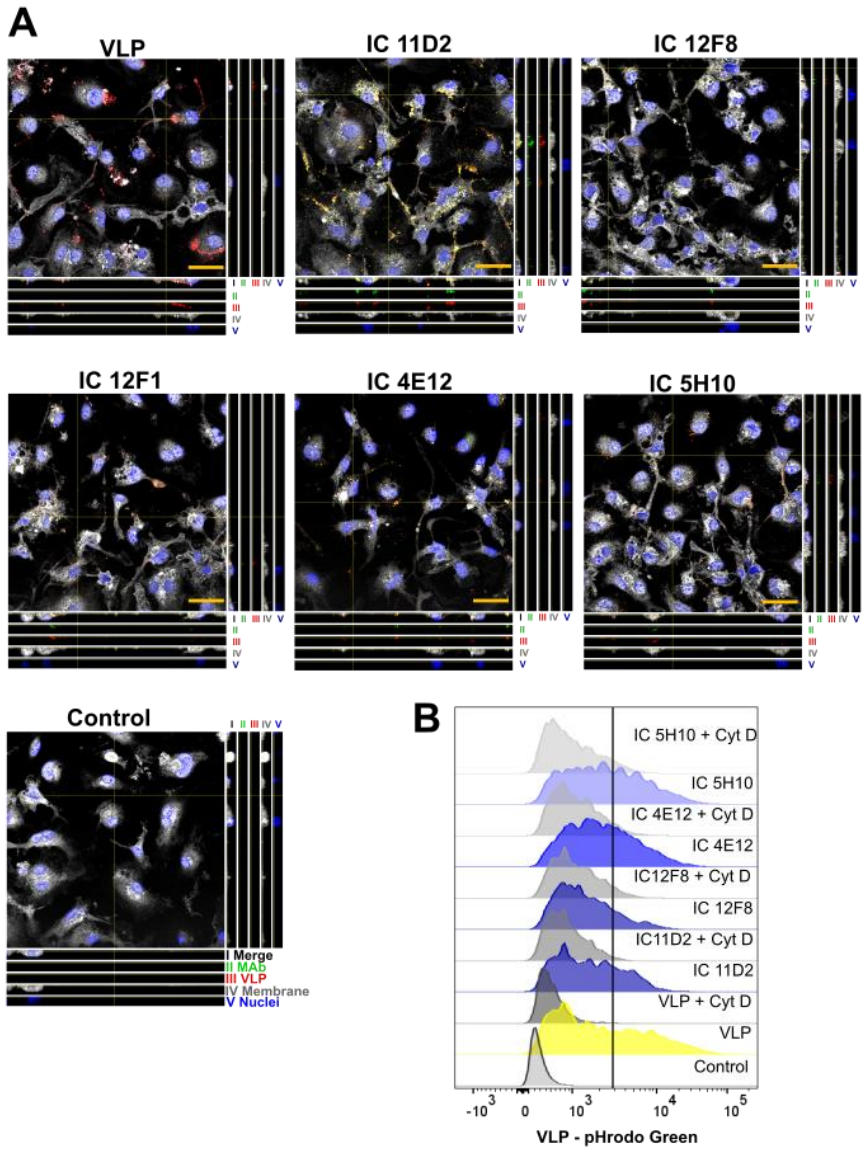


Fig. 1. Uptake of VLPs and IC by microglial cells. (A) Fluorescence microscopy images of cells treated with VLPs (20 µg/ml) and MAb (7.5 µg/ml) for 24 hours and

stained with antibodies against mouse MAb (green) and VLPs (red). Cell membrane was stained with Deep Red Membrane Stain (grey) and the nuclei with Hoechst 33342 (blue). Scale bar – 10 μm. 11D2, 12F8, 12F1, 4E12, 5H10 – MAb clones. (B) Cells were treated with pHrodo-labelled VLPs (10 μg/ml) and MAb (7.5 μg/ml) for 3 h. Cyt D was added 30 min prior to treatment. Representative histograms are shown.

Table 1. Kinetic constants for IK formation determined using the spectral ellipsometry method.

Γ^{SE}, ng/cm^2	k_a, M^{-1} s^{-1}	k_d, s^{-1}	k_r, s^{-1}	K_A, M^{-1}	K_D, M
VLP					
392	–	–	–	–	–
IgG1 MAb 11D2					
51.3	$1.76 \cdot 10^4$	$2.21 \cdot 10^{-4}$	$1.97 \cdot 10^{-5}$	$7.96 \cdot 10^8$	$1.26 \cdot 10^{-9}$
IgG2a MAb 12F8					
44.9	$8.80 \cdot 10^3$	$6.18 \cdot 10^{-7}$	$1.78 \cdot 10^{-7}$	$1.43 \cdot 10^{10}$	$7.01 \cdot 10^{-11}$
IgG2a MAb 4E12					
28.4	$2.48 \cdot 10^4$	$1.40 \cdot 10^{-5}$	$6.40 \cdot 10^{-6}$	$1.77 \cdot 10^9$	$5.64 \cdot 10^{-10}$
IgG2b MAb 5H10					
60.9	$1.27 \cdot 10^4$	$1.42 \cdot 10^{-6}$	$1.56 \cdot 10^{-6}$	$8.93 \cdot 10^9$	$1.12 \cdot 10^{-10}$

Γ^{SE} – dry protein surface mass density, k_a – association rate constant, k_d – dissociation rate constant, k_r – the stable immune complex formation rate constant, K_A – equilibrium association constant, K_D – dissociation constant.

The dry protein surface mass density (Γ^{SE}) represents the quantity of MAbs bound to the specific antigen and was calculated from SE measurements under steady-state conditions (Table 1). The lowest Γ^{SE} = 28.4 ng/cm^2 was calculated after IC formation by MAb 4E12. The IC formed by MAbs 11D2 and 5H10 distinguished themselves with the highest surface mass density value among all investigated MAbs (Γ^{SE} = 51.3 ng/cm^2 for 11D2 and Γ^{SE} = 60.9 ng/cm^2 for 5H10). The highest affinity MAb, 12F8, was in the middle according to MAb mass on the VLP layer (Γ^{SE} = 44.9 ng/cm^2).

The kinetic measurements and calculations were carried out by prof. dr. Ieva Plikusienė and Silvija Juciutė (Faculty of Chemistry and Geosciences, Institute of Chemistry, Vilnius University).

Analysis of the secretion of inflammatory molecules induced by VLPs and IC in microglial cells

To prove the relevance of the selected cell model, the secretion of inflammatory cytokines by VLP-treated microglia was compared to previously determined cytokine secretion profiles in monocyte-derived macrophages (9,176). It was found that VLPs induced the secretion of TNF-α (Fig. 2B) and IL-1β (Fig. 2A) in microglial cells. Thus, mouse microglial culture represents a suitable model for investigating microglia activation by IC formed by MAb and VLPs.

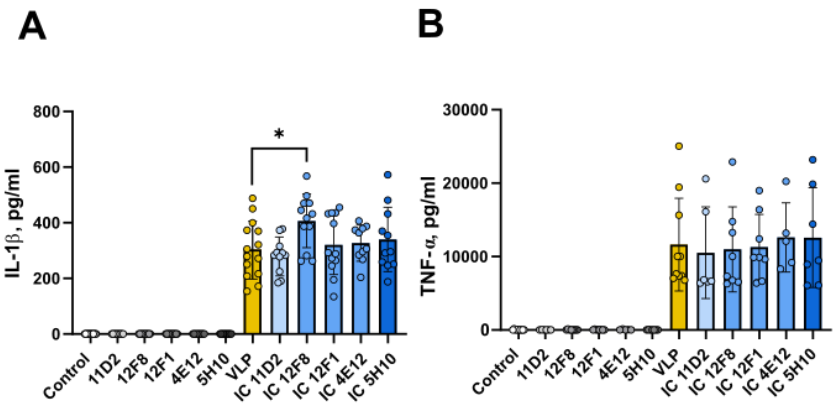


Fig. 2. VLP- and IC-induced cytokine secretion in microglial cells. Microglia were treated with VLPs (20 μg/ml) and the respective MAbs (7.5 μg/ml) for 24 hours. (A) IL-1β, N = 10–14, (B) TNF-α, N = 5–10, secretion was determined by ELISA. *p<0.05; one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAb clones.

These cytokines are also important for assessing the inflammatory response triggered by VLPs and ICs, as TNF-α is associated with activation of the NF-κB pathway, whilst IL-1β is a key marker of inflammasome activation. It was demonstrated that VLPs induce the release of investigated cytokines. No differences were observed in TNF-α secretion levels compared to macrophages treated either with VLPs alone or IC (Fig. 2B). In contrast, it was found that IC promoted a higher release of IL-1β than VLPs alone. However, only IC formed by 12F8 (IgG2a subclass) induced a significantly higher level of IL-1β (Fig. 2A).

To investigate whether IC induced other inflammatory processes, the secretion of inflammatory chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL9, CXCL16 and CCL8 was evaluated. Results showed a significant induction of selected

chemokines by VLPs (Fig. 3A–E). IC formed by different MAbs either downregulated or upregulated the secretion of selected inflammatory chemokines. All ICs, except IC 11D2, downregulated the release of chemokines CXCL1 and CXCL2, which regulate inflammasome activation (Fig. 3A, B, F). Secretion of CXCL9, implicated in a strong antiviral response, was upregulated by IC treatment compared to VLPs alone. However, a significant increase in CXCL9 release was observed only in cells treated with the IC of IgG2a MAb 4E12 (Fig. 3C, F). The secretion of another inflammatory chemokine, CCL8, was significantly upregulated only by IC 11D2 (Fig. 3D, F). VLPs also promoted the secretion of the lymphocyte-attracting chemokine CXCL16; however, there were no differences in CXCL16 levels between IC- and VLP-induced conditions (Fig. 3E, F). This chemokine, thought to be secreted during inflammatory conditions, was also released at basal levels in cell culture (Fig. 3E).

After comparing MAb affinity and the IC-induced secretion of inflammatory molecules in microglial cells, it was found that only IC formed by the highest affinity MAb (12F8) significantly enhanced IL-1β release (Fig. 2A). The investigated IC also mediated the release of inflammatory chemokines depending on their features. Despite the different affinities of MAbs, all IC downregulated the release of CXCL1 and CXCL2, except the IC formed by IgG1 MAb (11D2), which did not change CXCL2 secretion (Fig. 3F). Furthermore, only IC 11D2 significantly upregulated CCL8 release (Fig. 3D), evincing this IC's uniqueness. IC 4E12 significantly upregulated CXCL9 release and it was significantly different compared to IC of higher affinity MAb 12F8 of the same subclass IgG2a (Fig. 3C). Comparing IC formed by IgG2a/b MAbs, a tendency was observed that the lower affinity of MAb, the higher CXCL9 release was induced compared to VLP-mediated effect (Fig. 3F). Our results show that the subclass and especially the affinity of MAbs have a significant impact on the IC-induced inflammatory response.

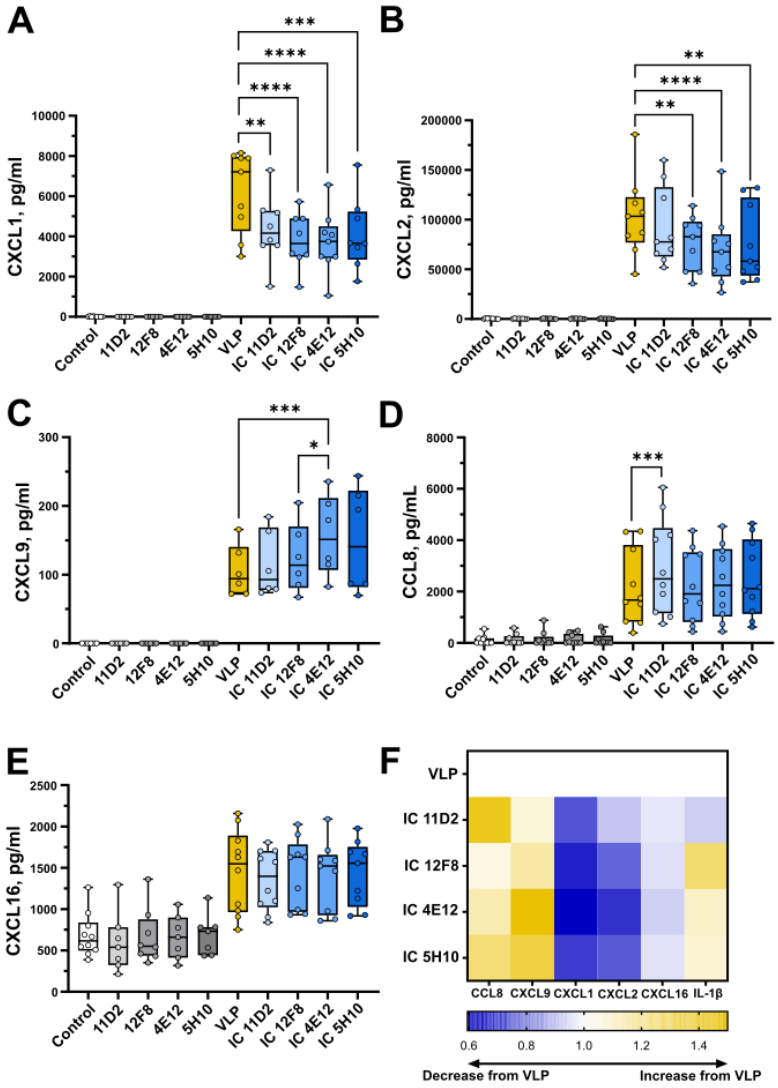


Fig. 3. Inflammatory chemokine secretion in microglial cells activated by VLPs and ICs. The cells were treated with VLPs (20 μg/ml) and MAbs (7.5 μg/ml) for 24 hours. (A) CXCL1, N = 8–9, (B) CXCL2, N = 9, (C) CXCL9, N = 6, (D) CCL8, N = 10, (E) CXCL16, N = 9, secretion was determined by ELISA. (F) Comparison of IC-induced chemokine secretion with VLP. A double-headed arrow indicates higher (yellow) or lower (blue) chemokine secretion compared with VLP. A one-way ANOVA was performed, followed by Tukey's multiple comparison test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAb clones.

NLRP3 inflammasome in microglial cells activated by VLPs and their ICs

Further, it was investigated whether IC properties are related to inflammasome activation. For this, siRNA targeting NLRP3 mRNA was used to downregulate NLRP3 inflammasome activation. First, the effect of VLPs alone on inflammasome activation was investigated. It was found that targeting siRNA significantly decreased IL-1β release in VLP-treated microglial cells compared to negative siRNA treatment (Fig. 4C). As expected, there were no changes in TNF-α secretion (Fig. 4D). siRNA targeting NLRP3 downregulate NLRP3 protein expression by approximately 50% (Fig. 4A, B). IL-1β release also decreased by approximately 50% (Fig. 4C). In addition, NLRP3 inflammasome activation inhibitor MCC950 also incompletely inhibited IL-1β release (Fig. 4E) and did not affect TNF-α secretion (Fig. 4F). This suggests that VLPs mediate alternative inflammatory mechanisms in addition to NLRP3 inflammasome activation or the partial pharmacological effect of MCC950. Analysing IL-1β release after IC treatment, it was found that NLRP3-targeting siRNA significantly reduced IL-1β secretion across all cases (Fig. 4G). These results also confirmed that IC formed by the highest affinity MAb 12F8 enhanced NLRP3 inflammasome activation.

Further, it was analysed whether VLP-induced chemokine release depends on inflammasome activation. After downregulation of NLRP3 expression, secretion of CXCL2, CXCL9, CCL8 cytokines significantly reduced (Fig. 4I–K) except for CXCL1 (Fig. 4H). The decrease was partial, suggesting that VLP-induced secretion of inflammatory chemokines depends on NLRP3 inflammasome activation, while other macrophage signalling pathways might be involved.

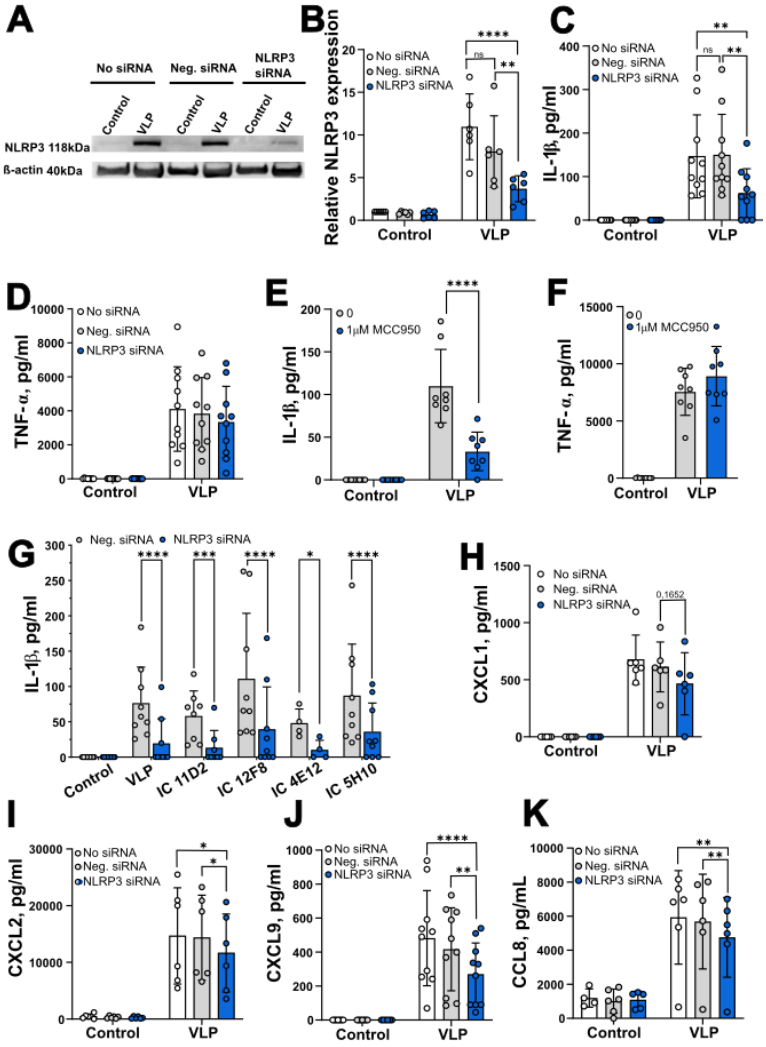


Fig. 4. The effect of the NLRP3 inflammasome on the secretion of inflammatory molecules in microglial cells activated by VLPs and IC. Microglia were treated with VLPs (20 μg/ml) and MAbs (7.5 μg/ml) for 24 h. siRNA was used to inhibit NLRP3 expression; negative (neg.) siRNA was used as a control. 1 μM MCC950 was added 30 minutes prior to treatment. Assessment of NLRP3 protein synthesis: (A) Western blot data show the expression of the indicated protein, (B) quantification of NLRP3 expression from Western blot data normalised to a loading control, N = 5. (C), (E) IL-1β, N = 10 and 8, and (D), (F) TNF-α, N = 9 and 8, (H) CXCL1, N = 5, (I) CXCL2, N = 6, (J) CCL8, N = 5, (K) CXCL9, N = 10, secretion was determined by ELISA. (G) IL-1β secretion, N = 4–9, induced by different ICs. A one-way ANOVA was performed, followed by Tukey's multiple comparison test; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Role of SYK in NLRP3 inflammasome activation by VLPs and their IC in microglial cells

To unravel the SYK's role in microglia activation, SYK activation by IC was analysed. Immunocytochemical staining for pSYK and fluorescence microscopy were used to assess SYK activation. From microscopy data, it was evident that VLPs and their IC initiate SYK phosphorylation (Fig. 5A). Western blot of the phosphorylated SYK showed similar results (Fig. 5B). Quantitative analysis of Western blot data (Fig. 5C) showed that both VLPs and IC cause a significant increase in SYK activation. However, none of the IC induced higher SYK phosphorylation levels than VLPs alone (Fig. 5C).

The role of SYK activation in IC-induced NLRP3 inflammasome activation was then investigated. The study began with an analysis of NLRP3 receptor expression by Western blot (Fig. 6A). Quantitative Western blot analysis of NLRP3 revealed that SYK inhibition causes a significant reduction of NLRP3 level in all microglia lysates treated with VLPs or any of the IC (Fig. 6B). Another essential protein for the NLRP3 inflammasome assembly is adaptor protein ASC. The cells were immunocytochemically stained and observed under a fluorescence microscope to detect ASC specks. The results showed that both VLPs and their IC significantly increased ASC speck count per cell (Fig. 6E, F). Additionally, SYK inhibition stopped ASC speck formation, the inhibitor reduced ASC speck count nearly to control levels (Fig. 6E).

To confirm SYK involvement in NLRP3 inflammasome activation, changes in inflammatory cytokine secretion after SYK inhibition were analysed. The level of IL-1β secreted in cell growth medium was significantly reduced by the SYK inhibitor (Fig. 6C). R406 reduced IL-1β concentration in all supernatants of microglia treated with either VLPs or their IC, except for IC 11D2 (Fig. 6C). Moreover, SYK inhibition caused a significant decrease in TNF-α secretion in both VLP- and IC-treated cells (Fig. 6D). Together, these results demonstrate that both VLPs and their IC activate the NLRP3 inflammasome in a SYK-dependent manner.

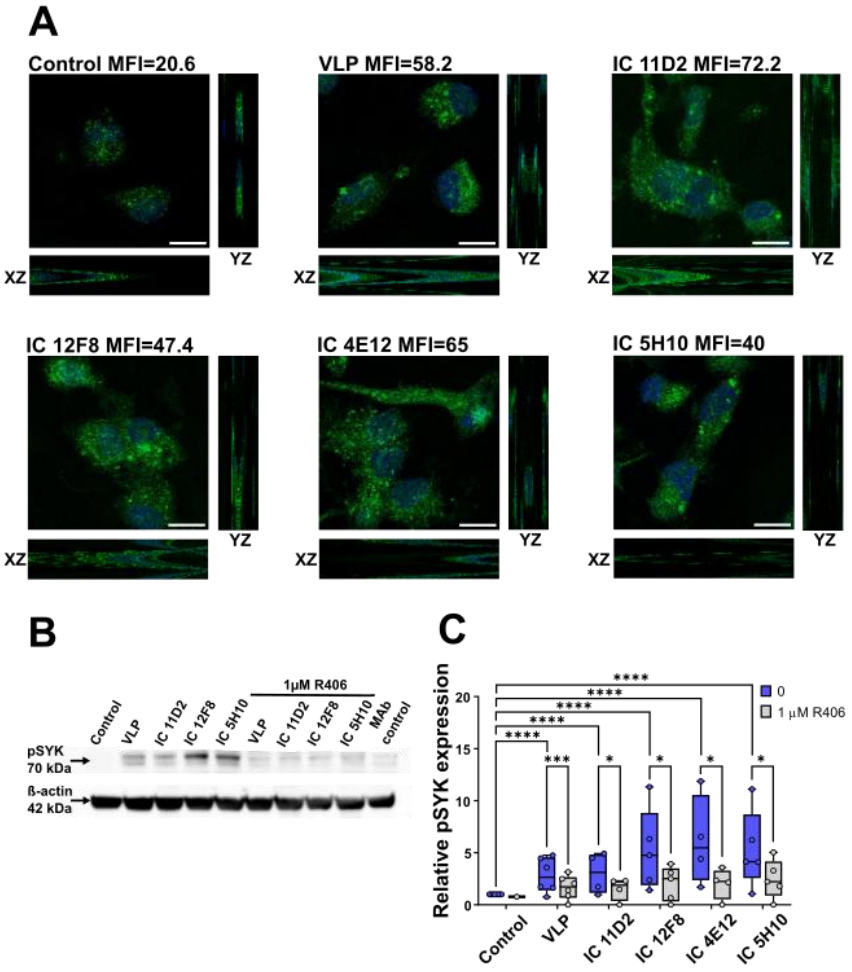


Fig. 5. SYK activation in microglial cells induced by VLPs and IC. The cells were treated with VLPs (20 µg/ml) and MAbs (7.5 µg/ml) for 24 hours. 1 µM R406 was added 1 hour prior to treatment. pSYK was detected using specific antibodies against pSYK (Y525/526). (A) Fluorescence microscopy images of pSYK (green) and nuclei (blue). The mean fluorescence intensity (MFI) per cell was calculated. Scale bar 10 µm. (B) Western blot data show the expression of the indicated protein in primary microglia lysates. (C) Quantification of pSYK expression from Western blot data normalised to a loading control, N = 4–6. A one-way ANOVA was performed, followed by a Tukey test: *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001.

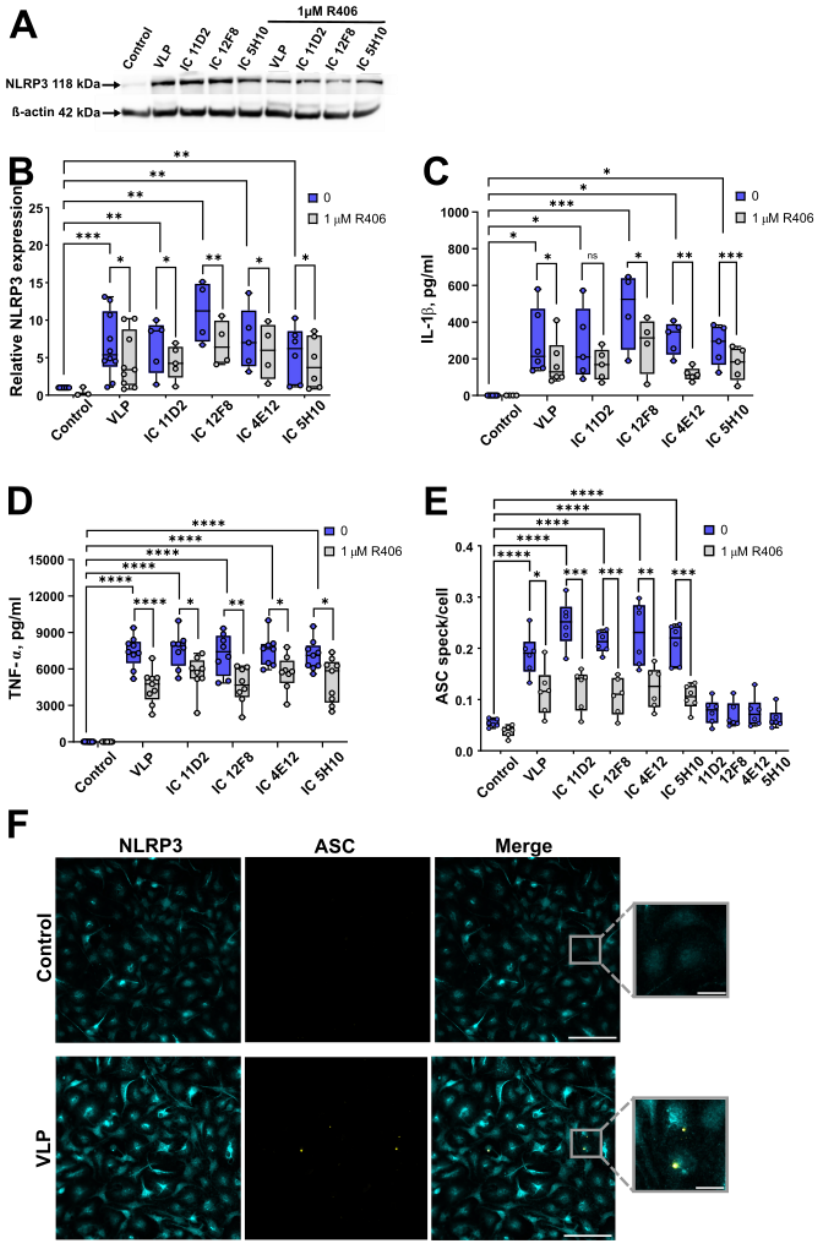


Fig. 6. The impact of SYK inhibition on NLRP3 activation. The cells were treated with VLPs (20 μg/ml) and MAbs (7.5 μg/ml) for 24 hours. 1 μM R406 was added 1 hour prior to treatment. (A) Western blot data show the expression of the indicated protein in microglia lysates, (B) Quantification of pSYK expression from Western blot data normalised to a loading control, N = 5–6. (C) IL-1β secretion, N = 4–6, and (D) TNF-α secretion, N = 8–9, were analysed using ELISA. (E) Quantification of ASC specks per cell, N = 6. Significance was determined using one-way ANOVA,

followed by Tukey's test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAb clones. (F) Fluorescence microscopy images of NLRP3 (cyan) and ASC specks (yellow). The scale bar is 50 μm and 20 μm in the magnified images.

Role of SYK in functional properties of microglial cells activated by VLPs and their IC

Further, it was investigated whether SYK is involved in any functional properties of microglia, such as endocytosis, expression of antigen-presenting and costimulatory molecules or lipid structure formation in the plasma membrane. The endocytosis of pHrodo-stained VLPs and IC was assessed by flow cytometry. The results showed that SYK inhibition with R406 does not affect endocytosis (Fig. 7A, D). Subsequently, expression of molecules participating in antigen presentation was analysed by measuring the expression of the major histocompatibility complex class II (MHC II) and CD86 molecules on the cell surface. It was found that VLPs and all IC cause a significant increase in CD86 expression compared with the controls (Fig. 7B, E), while MHC II expression levels varied. A significant increase was observed after treatment with IC 11D2 and IC 5H10. Interestingly, both IC formed by IgG2a subclass MAbs (IC 12F8 and IC 4E12) did not affect MHC II expression (Fig. 7C, F). Besides, SYK inhibition significantly reduced CD86 and MHC II levels on the cell surface (Fig. 7B, C). Consequently, these results indicate that expression of antigen-presenting and costimulatory molecules depends on SYK signalling pathways, although SYK does not impact the endocytosis of VLPs or their IC in microglia.

To further analyse the processes involving IC-activated microglia, lipid structure formation in plasma membrane was examined. Cholera toxin subunit B (CTxB) was used as a stain for lipid structures and plasma membrane, while IC-forming MAbs were also stained with antibodies against mouse IgG. Microglia were analysed under the confocal microscope after immunocytochemical staining of lipid structures and MAbs. In control wells, where cells were treated only with medium, there was little to no antibody signal, and more homogenous membrane staining with CTxB was observed, contrary to IC-activated cells, which displayed distinct clusters stained with CTxB and MAbs (Fig. 8A). The colocalization analysis of IC and CTxB lipid structure staining suggests that microglia form lipid raft-like structures upon activation by IC (Fig. 8B). These results suggest that lipid structures are involved in immune signalling induced by viral IC. Finally, to clarify the relationship between SYK and lipid structure formation, R406 was applied.

The results showed that lipid clustering is independent of SYK activity, as lipid structure formation did not change in the presence of the inhibitor (Fig. 8). Therefore, lipid structure clustering occurs upstream of SYK activation.

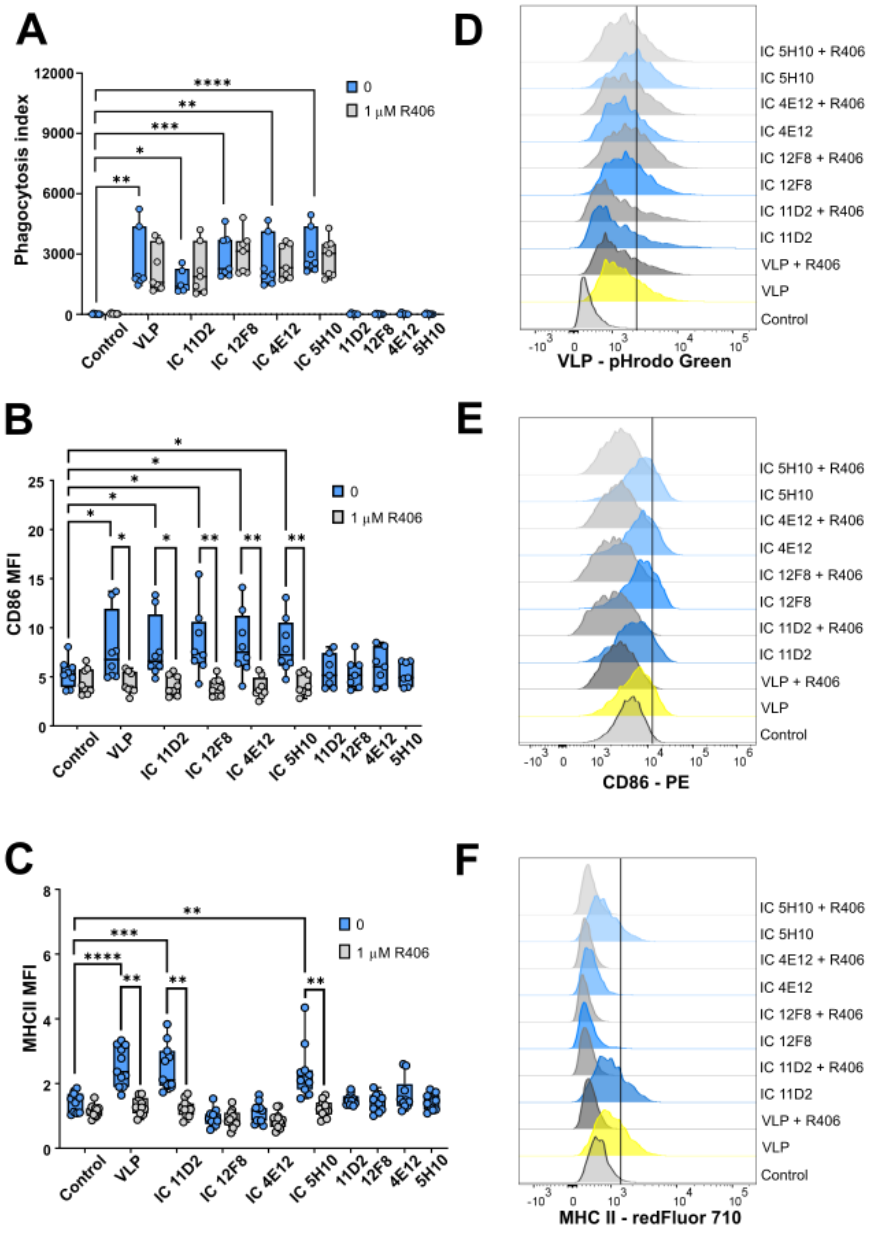


Fig. 7. The effect of SYK inhibition on endocytosis and expression of antigen-presenting and costimulatory molecules in microglial cells. Cells were treated for 3 hours with pHrodo-labelled VLPs (10 μg/ml) and MAbs (7.5 μg/ml). 1 μM R406 was

added 1 hour prior to treatment. The cells were stained with antibodies against mouse CD86 and MHC II, labelled with PE and redFluor710 fluorophores. Endocytosis, CD86 and MHC II expression were measured by flow cytometry. (A) phagocytosis index of pHrodo particles: data are presented as mean fluorescence intensity multiplied by % of cells with phagocytosed pHrodo particles, N = 7. (B, C) CD86 and MHC II MFI values normalised to isotype control of each experiment, (B) N = 8, (C) N = 11. One-way ANOVA was performed, followed by Tukey's test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. 11D2, 12F8, 4E12, 5H10 – MAb clones. (D–F) Representative histograms of endocytosis (D), CD86 (E) and MHC II (F) expression.

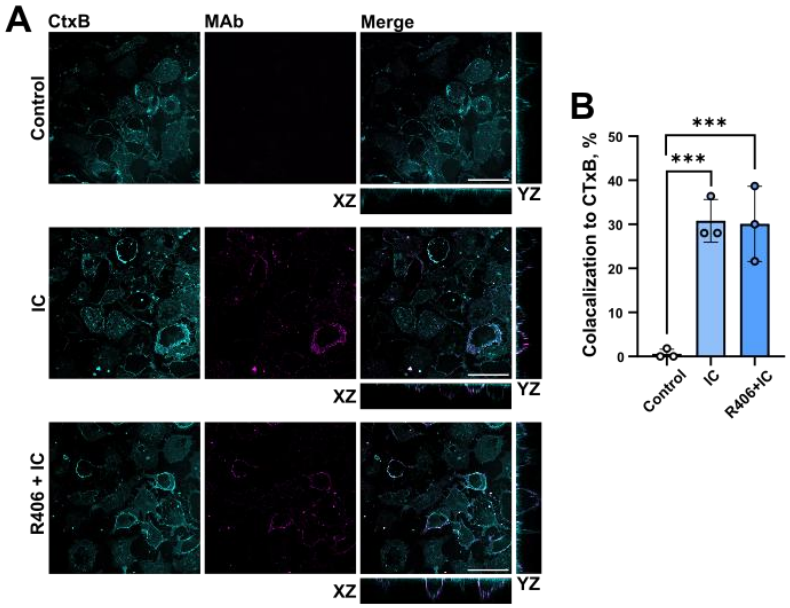


Fig. 8. Visualisation of lipid structure and IC interaction on the surface of microglial cells. Cells were treated with VLPs (20 µg/ml) and MAbs (7.5 µg/ml) for 3 hours. In the control group, cells were treated only with MAbs. 1 µM R406 was added 1 hour prior to treatment. 30 minutes prior to cell fixation, lipid structures were stained with CTxB-AF594 (cyan). IC on the fixed cells were stained with secondary antibodies labelled with AlexaFluor 488 (magenta). (A) Representative fluorescence microscopy images of lipid structures and ICs. Composite images comprising 33 frames and orthogonal projections are shown. Scale bar 50 µm. (B) Quantified colocalization with CTxB indicates the fraction of CTxB signal that overlaps with IC signal. Mander's overlap coefficient was calculated with the ImageJ Fiji BIOP JACoP plugin, N = 3. Statistical significance was established using one-way ANOVA, followed by Tukey's test, ***p < 0.001.

In summary, this study reveals that endocytosis of IC activates microglial cells and triggers NLRP3 inflammasome, which involves NLRP3 expression, ASC formation, and cytokine secretion dependent on SYK signalling pathways. SYK is also involved in expression of antigen-presenting and costimulatory molecules MHC II and CD86. This study revealed that the properties of the antibody forming the IC are an important factor determining the immune cell response. These results also provide new insights into the role of IC in inflammatory reactions triggered by viral antigens and their specific antibodies, which are produced following viral infections and vaccination or are used for therapeutic purposes.

Conclusions

1. After investigating the interaction properties of virus-like particles (VLPs) and virus-specific monoclonal antibodies (MAbs), it was found that MAbs of different subclasses that form immune complexes exhibit moderate, high, and very high affinity – their K_D range from 1.26 nM to 0.07 nM.
2. Analysis of the effects of immune complexes formed by MAbs of different subclasses and affinities on mouse microglial cells revealed relations between MAb affinity and their effects on the cells. Immune complexes formed by very high-affinity MAb 12F8 enhanced the NLRP3-activated inflammatory response compared to VLPs alone.
3. VLPs induce NLRP3 inflammasome-dependent secretion of the chemokines CXCL2, CXCL9, and CCL8 and inflammasome-independent secretion of CXCL1 in microglia, while the formation of immune complexes either inhibits or enhances this secretion. All MAbs, except 11D2, inhibit VLP-induced CXCL1 and CXCL2 secretion; CXCL9 secretion is inversely proportional to the affinity of MAb belonging to the IgG2a/IgG2b subclasses; while the MAb 11D2, which recognizes conformational VLP epitopes, increases CCL8 secretion compared to VLPs alone.
4. VLPs and their immune complexes induce microglia response – activation of the NLRP3 inflammasome, cytokine secretion, and expression of molecules participating in antigen presentation – in a SYK-dependent manner.
5. Microglia activation by immune complexes leads to the formation of lipid raft-like structures independently of SYK activation.

PADĖKA

Noriu padėkoti savo darbo vadovei prof. dr. Aurelijai Žvirblienei už pasitikėjimą, kantrybę, pagalbą rašant ir vertingus patarimus. Esu dėkinga už suteiktą galimybę augti kaip tyrėjai ir rengti disertaciją Imunologijos skyriuje. Taip pat ypatingą padėką skiriu dr. Astai Lučiūnaitei už pasiryžimą dalytis savo žiniomis ir patirtimi, kantrybę bei profesionalias įžvalgas.

Nuoširdžiai dėkoju VU GMC BTI Imunologijos skyriaus kolegoms už draugišką atmosferą, pagalbą ir pasidalytą patirtį. Taip pat skiriu padėką buvusioms savo studentėms Linai Ramanauskaitei, Kotrynai Vilkaitei, Elingai Ubartei ir Agnei Palčikevičiutei už pagalbą tyrimuose.

Dėkoju VU GMC BTI Eukariotų genų inžinerijos skyriaus dr. Mildai Norkienei už suteiktas žmogaus WUPyV VPD.

Skiriu padėką Ritai Lasickienei už hibridomų sukūrimą.

Dėkoju už bendradarbiavimą prof. dr. Ievai Plikusienei ir jos grupei iš VU Chemijos ir geomokslų fakulteto, Chemijos instituto.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Kristina Mašalaitė**, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė, Asta Lučiūnaitė. SYK Signalling in NLRP3 Inflammasome-Mediated Response of Murine Microglia Activated by Immune Complexes Formed of Viral Proteins and Specific IgG // European journal of immunology. Weinheim : Wiley-VCH GmbH. ISSN 0014-2980. eISSN 1521-4141. 2026, vol. 56, iss. 5, art. no. e70199, p. [1-12]. DOI: 10.1002/eji.70199 (Atlikau eksperimentinę dalį, rezultatų analizę ir parengiau rankraštį).
2. Asta Lučiūnaitė*, **Kristina Mašalaitė***, Ieva Plikusiene, Vincentas Maciulis, Silvija Juciute, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė. Structural properties of immune complexes formed by viral antigens and specific antibodies shape the inflammatory response of macrophages // Cell and bioscience. London : BioMed Central Ltd. eISSN 2045-3701. 2024, vol. 14, iss. 1, art. no. 53, p. [1-21]. DOI: 10.1186/s13578-024-01237-1. (Atlikau su ląstelėmis susijusią eksperimentinę dalį ir reikšmingai prisidėjau prie rankraščio parengimo).

* – Pagrindiniai autoriai

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

Žodiniai pranešimai:

1. **Kristina Mašalaitė**, Milda Norkienė, Asta Lučiūnaitė, Aurelija Žvirblienė. *SYK Signaling Links Viral Immune Complexes to NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. EFIS-EJI North Eastern European Immunology School*, NEEIS 2026, Jurmala, Latvija, 2026 m. gegužės 29–30 d. (gautas apdovanojimas už geriausią trumpą pranešimą)
2. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė. *SYK-mediated NLRP3 Inflammasome Activation Induced by Immune Complexes of Virus-like Particles in Macrophages. The 3rd forum on innate immunity in Sterile Inflammation, Autoimmunitu and their Resolution* (iiSIAR), Vilnius, Lietuva, 2026 m. gegužės 11–13 d. (gautas apdovanojimas už išskirtinį indėlį į mokslinius tyrimus, susijusius su SLB misija)
3. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Ieva Plikusienė, Aurelija Žvirblienė. *Microglial NLRP3 Inflammasome Activation By Immune Complexes Composed Of Virus-like Particles And Their Specific Antibodies, 12th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SSEEIS 2023),* Trogiras, Kroatija; 2023 m. spalio 20–23 d.
4. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Indrė Dalgėdienė, Indrė Kučinskaitė-Kodzė, Aurelija Žvirblienė. *NLRP3 Inflammasome Activation by Immune Complexes of Virus-like Particles in Microglia*, Estijos, Latvijos ir Lietuvos biochemikų draugijų konferencija *FEBS 3+*; 2022 m. birželio 15–17 d.
5. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Indrė Kučinskaitė-Kodzė, Aurelija Žvirblienė. *NLRP3 Inflamasomos Aktyvinimas Virusiniais Oligomeriniais Baltymais Mikroglijoje*, Lietuvos mokslų akademijos organizuojama 14-oji konferencija: „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos", Kaunas, Lietuva, 2021 m. lapkričio 25 d.

Stendiniai pranešimai:

1. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė. *SYK Signaling in NLRP3 Inflammasome Activation by Immune Complexes of Virus-like Particles in Murine Microglia. EMBO Young Scientists' Forum 2025*, Vilnius, Lietuva, 2025 m. rugsėjo 24–26 d.
2. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė. *SYK Signaling in Antigen Presentation and NLRP3*

Inflammasome Activation in Macrophages Stimulated by Virus-like Particles and their Immune Complexes; Imunologijos mokykla *Baltic-Polish School of Immunology BPSI 2025*, Vilnius, Lietuva, 2025 m. gegužės 12–13 d.

3. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė. *Role of SYK in NLRP3 Inflammasome Activation by Immune Complexes in Murine Microglia, The 37th Annual Meeting of the European Macrophage and Dendritic Cell Society 2024 EMDS 2024*, Viena, Austrija, 2024 m. lapkričio 27–29 d.
4. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė. *Role of SYK in Activation of Microglial NLRP3 Inflammasome by Immune Complexes*, EMBO Dirbtuvės *The Inflammasomes*, Miunchenas, Vokietija, 2024 m. rugsėjo 24–27 d. (LMT suteikta parama akademinėms išvykoms)
5. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Milda Norkienė, Aurelija Žvirblienė. *Role of SYK in Microglial NLRP3 Inflammasome Activation by Immune Complexes composed of Virus-like Particles and Their Specific Antibodies*, Imunologijos mokykla *50 shades of Immunology*. Balstogė, Lenkija, 2024 m. gegužės 18–21 d. (gautas apdovanojimas už geriausią pranešimą)
6. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Ieva Plikusienė, Aurelija Žvirblienė. *NLRP3 Inflammasome Activation by Immune Complexes Formed by Virus-like Particles and Their Specific Antibodies in Microglia*, EMBO Dirbtuvės *Pathogen immunity and signaling*, Venecija, Italija, 2024 m. balandžio 8–12 d. (gauta EMBO parama kelionei)
7. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Aurelija Žvirblienė. *Microglial NLRP3 Inflammasome Activation by Immune Complexes of Virus-like Particles*, Memorialinė J. Sniadeckio konferencija *"Frontiers in Molecular Life Sciences" (JSMC-2023)*, Vilnius, Lietuva, 2023 m. gegužės 23–25 d.
8. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Aurelija Žvirblienė. *Activation of NLRP3 Inflammasome by Immune Complexes of Virus-like Particles in Primary Mouse Microglia*, Tarptautinė gyvybės mokslų konferencija *The COINS 2023*, Vilnius, Lietuva, 2023 m. balandžio 24–26 d.
9. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Indrė Dalgėdienė, Aurelija Žvirblienė. *Activation of Microglial NLRP3 Inflammasome by Immune Complexes of Virus-like Particles*, Lietuvos biochemikų draugijos 2022

mini-konferencija *Biochemistry in the Big Data Age*, Vilnius, Lietuva, 2022 m. rugsėjo 30 d.

10. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Indrė Dalgėdienė, Indrė Kučinskaitė-Kodzė, Aurelija Žvirblienė. *Activation of Microglial NLRP3 Inflammasome by Immune Complexes of Virus-like Particles*, EMBO|EMBL Simpoziumas *Innate immunity in host-pathogen interactions*, Heidelbergas, Vokietija; 2022 m. liepos 17–20 d. (LMT suteikta parama akademinėms išvykoms)
11. **Kristina Mašalaitė**, Asta Lučiūnaitė, Indrė Dalgėdienė, Indrė Kučinskaitė-Kodzė, Aurelija Žvirblienė. *NLRP3 Inflammasome Activation by Virus-like Particles in Mouse Microglia*, EMBO Dirbtuvės *Pathogen immunity and signaling*, Sen Malo, Prancūzija; 2022 m. balandžio 4–8 d. (gauta EMBO parama kelionei)

GYVENIMO APRAŠYMAS

	Kristina Mašalaitė
Darbo adresas	Imunologijos skyrius (IS), Biotechnologijos institutas (BTI), Gyvybės mokslų centras (GMC), Vilniaus universitetas (VU) Saulėtekio al. 7, Vilnius
El. paštas	kristina.masalaite@gmc.vu.lt
Išsilavinimas	
2021–2025	Biochemijos doktorantūros studijos VU
2019–2021	Molekulinės biologijos magistrantūros studijos VU
2015–2019	Medicininės ir veterinarinės biochemijos bakalauro studijos Lietuvos sveikatos mokslų universitete (LSMU)
Darbo patirtis	
Nuo 2026.10.01	VU GMC BTI Biologė tyrėja
2022–2026	VU GMC BTI Jaunesnioji mokslo darbuotoja
2021–2022	VU GMC BTI Biologė tyrėja
2020–2021	VU GMC BTI laborantė
2018–2019	LSMU Neuromokslų instituto laborantė
Vadovavimas studentams	Elingos Končiūtės (genetika, bakalauras) baigiamasis darbas tema: *NLRP3 inflamasomos aktyvinimo virusiniais baltymais ir jų imuniniais kompleksais tyrimas pelės pirminėje mikroglijoje*, darbo įvertinimas 10 balų, 2024 m. Kotrynos Vilkaitės (biochemija, bakalauras) baigiamasis darbas tema: *Virusinių baltymų ir jų imuninių kompleksų sukeliamo ląstelinio atsako pelės pirminės mikroglijos ląstelėse tyrimas*, darbo įvertinimas 10 balų, 2024 m. Agnės Palčikevičiūtės (biochemija, bakalauras) baigiamasis darbas tema: *SYK kinazės įtakos pelės pirminės mikroglijos atsakui į virusinių antigenų imuninius kompleksus tyrimas*, darbo įvertinimas 10 balų, 2025 m.
Studentų konsultavimas	Linos Ramanauskaitės (biochemija, bakalauras) baigiamojo darbo tema: *Syk kinazės vaidmens mikroglijos aktyvinime virusiniais baltymais ir jų imuniniais kompleksais tyrimas*, darbas įvertintas 10 balų 2022m.

Dalyvavimas projektuose	
2026–2027	Projekto vadovė VU Mokslo skatinimo fondo projekte Nr. MSF-JM-14/2026 „Imuninių ląstelių Fcγ receptorių sąveikos su skirtingais imuniniais kompleksais tyrimai“
2026–2028	Pagrindinė projekto vykdytoja projekte Nr. S-MIP-25-102 "Aukšto laipsnio gimdos kaklelio neoplazijos rizikos modeliavimas remiantis mikrobiotos ir neutrofilų žymenimis"
2023 m.	Projekto ekspertė projekte Nr. 09.3.1-ESFA-V-738-03-0001 “Aukštųjų mokyklų tinklo organizavimas ir studijų kokybės gerinimas Šiaulių universitetą prijungiant prie Vilniaus universiteto”
2021–2023	Specialistė projekte Nr. 01.2.2-LMT-K-718-05-0012 “Diagnostinių antikūnų prieš SARS-CoV-2 kūrimas”
2020–2021	Laborantė projekte Nr. P-SEN-20-1 „Virusinių antigenų poveikis imuninėms ląstelėms su senėjimu susijusio uždegimo kontekste“
Apdovanojimai	• Latvijos imunologų draugijos apdovanojimas už geriausią trumpą pranešimą *EFIS-EJI North Eastern European Immunology School*, NEEIS 2026, Jurmala, Latvija, 2026 m. gegužės 29–30 d. • Leukocitų biologijos draugijos (SLB) jaunojo mokslininko apdovanojimas už išskirtinį indėlį į mokslinius tyrimus, susijusius su SLB misija 2026 m. • GMC vardinė stipendija rudens semestrui suteikta už puikius mokslinius rezultatus, aktyvią mokslinę, mokslo populiarinimo ir organizacinę veiklą 2024 m. • Lietuvos mokslo tarybos suteikta parama akademinėms išvykoms dalyvavimui konferencijoje *EMBO The Inflammasomes*, Miunchenas, Vokietija, 2024 m. rugsėjo 24–27 d. • Lenkijos imunologų draugijos apdovanojimas už geriausią stendinį pranešimą Imunologijos mokykloje *50 shades of Immunology*, Balstogė, Lenkija, 2024 m. gegužės 18–21 d. • EMBO suteikta kelionės stipendija dalyvauti konferencijoje EMBO *Pathogen immunity and signaling,* Venecija, Italija, 2024 m. balandžio 8–12 d. • Lietuvos mokslo tarybos suteikta parama doktorantams už studijų rezultatus 2023 m.

	• GMC vardinė stipendija rudens semestrui suteikta už puikius mokslinius rezultatus, aktyvią mokslinę, mokslo populiarinimo ir organizacinę veiklą. 2022 m. • Lietuvos mokslo tarybos suteikta parama akademinėms išvykoms dalyvavimui konferencijoje EMBO|EMBL *Innate immunity in host-pathogen interactions*, Heidelbergas, Vokietija, 2022 m. liepos 17–20 d. • EMBO suteikta kelionės stipendija dalyvauti konferencijoje EMBO *Pathogen immunity and signaling*, Sen Malo, Prancūzija, 2022 m. balandžio 4–8 d.
Kita veikla	Savanoriavimas knferencijoje *8th Antibody Validation Workshop 14th EuroMabNet Meeting*, Vilnius, Lietuva, 2026 m. rugsėjo 9-11 d. Savanoriavimas konferencijoje *The 3rd forum on innate immunity in Sterile Inflammation, Autoimmunitu and their Resolution* (iiSIAR), Vilnius, Lietuva, 2026 m. gegužės 11–13 d. Savanoriavimas Imunologijos mokykloje *Baltic-Polish School of Immunology BPSI 2025*, Vilnius, Lietuva, 2025 m. gegužės 12–13 d. Pravestas imunologijos laboratorinis darbas „Imunofermentinė analizė: antikūnų titro nustatymas“ moksleivių seminarui, VU GMC 2024 m. spalio 2 d. ir 2025 m. spalio 2 d. Komisijos narė Vilniaus Gabijos progimnazijoje rengtoje respublikinėje integruotoje gamtos mokslų ir anglų kalbos konferencijoje Akademinė popietė 2024, 2024 m. gegužės 16 d. Savanoriavimas memorialinėje J. Sniadeckio konferencijoje *Frontiers in Molecular Life Sciences (JSMC 2023)*, Vilnius, Lietuva, 2023 m. gegužės 23–25 d. Vesta pamoka 9 klasės moksleiviams Vilniaus Simono Daukanto gimnazijoje, pranešimas: „Imunologija ir studijos Vilniaus universitete“ 2022 m. gegužės 8 d.
Kitos publikacijos	1. Stanciauskaite M., Usvaltas M., **Masalaitė K**., Luciunaite A., Plikusiene I. *Towards Therapeutic Applications of Nanobody-Fc Constructs: Comparative Analysis of Fc Receptor Binding and Immune Modulation*. Biomater. Sci. 2026; DOI: 10.1039/d6bm00509h 2. Valiulytė-Simaitė I, Šlekienė L, Balnytė I, Daukšaitė V, Tacionis S, Paškevičiūtė G, **Mašalaitė K**, Kazlauskas A.

Substitution of the SEMA3A basic domain with the VEGF165 heparin-binding domain enhances anti-angiogenic potency in ovo. Biol Res. 2026 Mar 16; 59(1):25. DOI: 10.1186/s40659-026-00684-z.

3. Lučiūnaitė A, Dalgėdienė I, Žilionis R, **Mašalaitė K**, Norkienė M, Šinkūnas A, Gedvilaitė A, Kučinskaitė-Kodzė I, Žvirblienė A. *Activation of NLRP3 Inflammasome by Virus-Like Particles of Human Polyomaviruses in Macrophages*. Front Immunol. 2022 Mar 9; 13:831815. DOI: 10.3389/fimmu.2022.831815.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.