

VLOGA CISTATINA C PRI VNETNEM ODZIVU

Monika Biasizzo

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija

Mentorica: izr. prof. dr. Nataša Kopitar-Jerala, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana,
Slovenija

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. ddr. Boris Turk, predsednik, Inštitut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

prof. dr. Janko Kos, član Inštitut »Jožef Stefan« in Fakulteta za farmacijo, Univerza v
Ljubljani, Slovenija

dr. Iva Hafner Bratkovič, članica, Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija

MEDNARODNA PODIPLomsKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Monika Biasizzo

VLOGA CISTATINA C PRI VNETNEM ODZIVU

Doktorska disertacija

THE ROLE OF CYSTATIN C IN INFLAMMATORY
RESPONSE

Doctoral Dissertation

Mentorica: izr. prof. dr. Nataša Kopitar-Jerala

Ljubljana, Slovenija, april 2022

Zahvala

Najlepše se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Nataši Kopitar-Jerala za zaupanje, strokovno vodenje, dobro sodelovanje, nasvete in pomoč v času doktorskega študija in pri pisanju člankov.

Vodji Oddelka za biokemijo, strukturno in molekularno biologijo na Institutu "Jožef Stefan" prof. ddr. Borisu Turku se iskreno zahvaljujem, ker me je sprejel v svojo raziskovalno skupino in mi s konstruktivnimi predlogi pomagal pri poteku dela.

Najlepše hvala tudi vsem članom komisije, prof. ddr. Borisu Turku, prof. dr. Janku Kosu in dr. Ivi Hafner Bratkovič za skrben pregled doktorske disertacije in podano strokovno mnenje in predloge.

Najlepše se zahvaljujem vsem sodelavcem na Institutu "Jožef Stefan" za vse koristne nasvete, pomoč in dobro vzdušje v laboratorijih. Posebno se zahvaljujem Evi Vidak in Urbanu Javoršku za vse nasvete pri izvajanju poskusov in pomoč pri analizi rezultatov. Najlepša hvala Petri Matjan Štefin, dr. Janji Završnik in dr. Mihi Butinarju za pomoč pri izvajanju poskusov na živalih. Najlepša hvala dr. Janji Božič in dr. Nežki Kavčič za nasvete in učne urice na pretočnem citometru in uporabi programa FlowJo. Najlepša hvala tudi dr. Tini Zavašnik za učne urice na konfokalnem mikroskopu. Najlepša hvala Mojci Trstenjak-Prebanda in Ivici Štefe za odlično tehnično podporo, koristne nasvete in pomoč v laboratoriju. Najlepša hvala tudi Mariji Grozdanič, dr. Andreji Kozak, Mikiju Zariču, Tilnu Severju in Mateju Kolariču za podporo in medsebojne nasvete ter prijetno vzdušje v laboratoriju. Evi Vidak in Petri Matjan Štefin najlepša hvala za vso podporo, spodbudo, nasvete, skupno reševanje različnih zagat in neštete klepete, ki so naredili čas na Institutu še toliko bolj prijeten, zabaven in zanimiv.

Iz vsega srca hvala Katji Leben in Esteri Merljak za spodbudo in neštete pogovore ter izmenjave izkušenj z doktorskega študija. Hvala tudi ekipi in soplesalkam/soplesalcem na Šoli irskega plesa za neštete plesne trenutke in skupno sproščanje stresnih hormonov. Hvala tudi vsem ostalim, ki ste me v času doktorskega študija podpirali, spodbujali in verjeli vame.

Posebno zahvalo namenjam vsem mojim najbližjim, sestri Eli in staršema, Katarini in Antonu, ki sta me naučila vztrajnosti in me potrpežljivo spodbujala in podpirala na moji raziskovalni poti od začetka do konca.

Povzetek

Naravni imunski sistem je prva obrambna linija, ki ščiti organizem pred patogenimi organizmi. Regulacija imunskega in vnetnega odgovora je izredno pomembna, saj lahko prekomerni vnetni odziv vodi do poškodb tkiva in septičnega šoka. Makrofagi so imunske celice, ki prepoznajo patogene mikroorganizme z membranskimi in citosolnimi receptorji naravne imunosti. Aktivacija receptorjev vodi do prepisovanja, sinteze in aktivacije vnetnih mediatorjev, kar omogoči hitro odstranitev in uničenje patogenov. Pomembno vlogo pri vnetnem odzivu imajo multi-proteinski kompleksi inflammasomi, kjer poteče aktivacija vnetnih kaspaz -1 in -11, kar vodi do procesiranja in izločanja vnetnih citokinov IL-1 β in IL-18 ter vnetne oblike celične smrti – piroptoze. Cisteinski katepsini so peptidaze, ki sodelujejo pri razgradnji proteinov v lizosomu, a so vpleteni tudi v številne druge procese, kot so apoptoza, rak, vnetni odziv in predstavitev antigenov. Njihova aktivnost v citosolu in zunajceličnem prostoru je skrbno regulirana z endogenimi inhibitorji – cistatini. Poleg inhibitorne vloge imajo cistatini tudi druge, manj raziskane funkcije. Mehanizem delovanja cistatinov v imunskem sistemu in vnetnem odzivu še ni povsem pojasnjen.

Cistatin C se konstitutivno izraža in izloča iz vseh celic z jedrom in je prisoten v vseh telesnih tekočinah. Pokazali so, da ima cistatin C regulatorno vlogo pri izražanju in izločanju vnetnih mediatorjev, kot je dušikov oksid, ob stimulaciji imunskih celic z lipopolisaharidom (LPS) ali interferonom (IFN)- γ , zato je bil glavni namen naše raziskave preučiti vlogo cistatina C pri vnetnem odzivu. Preučili smo vpliv odsotnosti cistatina C na aktivacijo inflammasoma, sproščanje vnetnih in proti-vnetnih citokinov, signalne poti, povezane z vnetnim odzivom, sproščanje dušikovega oksida in indukcijo avtofagije. Pokazali smo, da so miši z izbitim genom za cistatin C bolj občutljive na visoke koncentracije LPS. V makrofagih z izbitim genom za cistatin C smo opazili povečano aktivnost obeh vnetnih kaspaz -1 in -11 ter povečano aktivacijo in izločanje vnetnih citokinov interleukinov (IL)-1 β in IL-18. Povečana aktivnost cisteinskih katepsinov v makrofagih z izbitim genom za cistatin C ni ključnega pomena za povečano aktivacijo inflammasoma. Prav tako odsotnost cistatina C ne vpliva na signalne poti NF- κ B in MAPK, na integriteto lizosomske membrane, nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti in poškodbe mitohondrijev. Pokazali smo, da imajo makrofagi z izbitim genom za cistatin C neučinkovito avtofagijo z zmanjšano količino avtofagosomov in zmanjšano indukcijo avtofagije. Avtofagija ima pomembno vlogo pri regulaciji imunskega in vnetnega odziva, zato predvidevamo, da je močnejši vnetni odziv ob odsotnosti cistatina C posledica zmanjšane avtofagije. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da miši z izbitim genom za cistatin C razvijejo prekomeren vnetni odziv na LPS, ki je slabše reguliran in vodi v življenjsko nevaren septični šok.

Abstract

Innate immune system acts as the first line of defence to protect the host against pathogens. The regulation of immune system and inflammatory response is crucial since dysregulated or sustained inflammation leads to pathological conditions, septic shock and tissue damage. Macrophages are innate immune cells that sense pathogens with pattern recognition receptors (PRR) on the cell membranes or in the cytosol. Recognition of pathogen- or danger-associated molecular patterns (PAMP or DAMP) triggers expression of inflammatory mediators and immune defence response genes to remove and destroy the pathogens. Inflammasomes are multi-molecular platforms that recruit and activate inflammatory caspases-1 and -11, leading to the maturation and secretion of pro-inflammatory cytokines interleukins (IL)-1 β and IL-18 and pyroptotic cell death, thus contributing to innate inflammatory responses. Cysteine cathepsins are proteases involved in the intracellular protein degradation in lysosomes; however, they also participate in other (patho)physiological processes, such as apoptosis, cancer progression and invasion, immune and inflammatory response, and antigen presentation. Potentially harmful and uncontrolled proteolytic activity of cysteine cathepsins is regulated by endogenous protein inhibitors, such as cystatins. Besides their inhibitory role, cystatins have other physiological roles. However, the role of cystatins in the immune response is still not well understood.

Cystatin C is constitutively expressed and secreted from all cells with nucleus and is present in all body fluids. Cystatin C was shown to have a regulatory role in the expression and secretion of inflammatory mediators, such as nitric oxide, from immune cells upon stimulation with lipopolysaccharide (LPS) or interferon (IFN)- γ . Therefore, the aim of our work was to elucidate the role of cystatin C in the inflammatory response. We examined the role of cystatin C in the inflammasome activation, release of inflammatory cytokines, innate immune signalling pathways, release of nitric oxide and autophagy induction. We demonstrated that cystatin C-deficient mice are more sensitive to LPS-induced sepsis. Further, cystatin C-deficient macrophages secrete higher amounts of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 due to the increased caspase-1 and -11 activation. The increase in the processing and secretion of IL-1 β in cystatin C-deficient macrophages was independent of the broad spectrum cathepsin inhibitor, indicating that increased cathepsin activity was not responsible for excessive inflammatory response in the absence of cystatin C. Cystatin C deficiency had no effect on NF- κ B and MAPK signalling pathways, lysosomal membrane integrity, reactive oxygen species production and mitochondrial damage. We have shown that cystatin C-deficient macrophages present dysfunctional autophagy with a reduced level of autophagosomes and decreased autophagy induction upon LPS stimulation. Autophagy has an important modulatory role in inflammation. Our data suggest that the decreased autophagy in the absence of cystatin C leads to excessive inflammatory response, resulting in the increased sensitivity of cystatin C-deficient mice to the LPS-induced sepsis.

Kazalo

Slike	xv
Tabele	xvii
Kratice	xix
1 Uvod	1
1.1 Naravni imunski sistem.....	1
1.1.1 Receptorji TLR	2
1.1.1.1 Receptor TLR4.....	3
1.1.2 Receptorji NLR	4
1.1.3 Inflamasom	5
1.1.3.1 Inflamasom NLRP3	6
1.1.3.1.1 Sprememba znotrajcelične koncentracije K ⁺ ionov	8
1.1.3.1.2 Ca ²⁺ signaliziranje	8
1.1.3.1.3 Sprememba znotrajcelične koncentracije Cl ⁻ ionov	8
1.1.3.1.4 Reaktivne kisikove zvrsti in poškodbe mitohondrijev..	9
1.1.3.1.5 Poškodbe lizosomov	9
1.1.3.2 Nekanonični inflamasom.....	10
1.1.4 Vnetne kaspaze.....	11
1.1.4.1 Kaspaza-1	12
1.1.4.2 Kaspaza-11	13
1.1.5 Piroptoza	14
1.1.6 Mediatorji vnetja.....	14
1.1.6.1 IL-1 β	14
1.1.6.2 IL-18.....	15
1.1.6.3 IL-10.....	15
1.1.6.4 NO.....	16
1.2 Avtofagija	16
1.2.1 Mitofagija	17
1.2.2 Avtofagija in vnetni odziv	17
1.3 Cisteinske peptidaze in cistatini v imunskem sistemu.....	19
1.3.1 Cisteinski katepsini.....	19
1.3.2 Legumain.....	20
1.3.3 Cistatini.....	20
1.3.3.1 Cistatin C.....	20
2 Namen dela	23
3 Materiali in metode	25
3.1 Materiali	25
3.1.1 Kemikalije in reagenti	25

3.1.1.1	Sprožilci vnetja in inhibitorji	25
3.1.1.2	Fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati.....	25
3.1.1.3	Ostale kemikalije.....	25
3.1.2	Kompleti reagentov.....	26
3.1.3	Pufri.....	26
3.1.4	Celične linije in celične kulture	28
3.1.5	Gojišča, dodatki za gojišča in delo s celicami.....	28
3.1.6	Protitelesa in rekombinantni proteini	29
3.1.6.1	Primarna protitelesa	29
3.1.6.2	Sekundarna protitelesa.....	29
3.1.7	Laboratorijska oprema	30
3.2	Metode	31
3.2.1	Miši.....	31
3.2.2	Delo s celicami	31
3.2.2.1	Priprava gojišč in gojenje celičnih linij.....	31
3.2.2.2	Priprava primarnih mišjih makrofagov iz kostnega mozga	31
3.2.2.3	Precepljanje celic.....	32
3.2.2.4	Odmrzovanje in zamrzovanje celic.....	32
3.2.2.5	Priprava filtriranega gojišča mišjih fibroblastov L929.....	32
3.2.3	Sprožitev vnetnega odziva <i>in vitro</i>	32
3.2.3.1	Tretiranje celic.....	32
3.2.3.2	Priprava celotnega celičnega lizata	33
3.2.3.3	Določanje celotne koncentracije proteinov v celičnem lizatu....	33
3.2.3.4	Precipitacija proteinov v celičnem gojišču	34
3.2.3.5	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS.....	34
3.2.3.6	Imunodetekcija proteinov s prenosom western.....	34
3.2.3.7	Merjenje citotoksičnosti na osnovi sproščanja encima laktat-dehidrogenaze	35
3.2.3.8	Merjenje koncentracije citokinov v celičnem gojišču z encimsko-immunskim testom ELISA	35
3.2.3.9	Posredno dokazovanje dušikovega oksida (NO) z merjenjem nitrita in nitrata v celičnem gojišču z reakcijo po Griessu	35
3.2.4	Merjenje aktivnosti cisteinskih peptidaz	36
3.2.4.1	Merjenje aktivnosti cisteinskih peptidaz v popolnih in citosolnih lizatih.....	36
3.2.4.2	Merjenje aktivnosti cisteinskih katepsinov v celičnem gojišču	36
3.2.5	Pretočna citometrija	37
3.2.5.1	Določitev integritete lizosomske membrane	37
3.2.5.2	Določitev membranskega potenciala mitohondrijev	37
3.2.5.3	Določitev mitohondrijskega superoksida	37
3.2.6	Sprožitev vnetnega odziva <i>in vivo</i>	38
3.2.6.1	Priprava mišjega seruma.....	38
3.2.6.2	Priprava tkivnih lizatov	38
3.2.6.3	Spremljanje viabilnosti miši	38
3.2.7	Statistična analiza.....	38
4	Rezultati	39
4.1	Imunski odgovor na bakterijski endotoksin <i>in vivo</i>	39
4.1.1	Vpliv cistatina C na septični šok, sprožen z endotoksinom.....	39
4.1.2	Vpliv cistatina C na sintezo vnetnih citokinov	39

4.2	Vloga cistatina C pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 v primarnih mišjih makrofagih	40
4.2.1	Izražanje in sproščanje cistatina C iz aktiviranih makrofagov.....	40
4.2.2	Aktivnost cisteinskih peptidaz v aktiviranih makrofagih	41
4.2.3	Aktivacija inflammasoma NLRP3 je neodvisna od aktivnosti cisteinskih katepsinov	44
4.2.3.1	Aktivacija inflammasoma NLRP3 z aktivatorjem ATP	44
4.2.3.2	Aktivacija inflammasoma NLRP3 s trdnimi delci	47
4.2.4	Vpliv cistatina C na integriteto mitohondrijev in oksidativni stres.....	49
4.3	Vloga cistatina C pri aktivaciji nekanoničnega inflammasoma v primarnih mišjih makrofagih	51
4.4	Vloga cistatina C pri regulaciji signalnih poti, povezanih z vnetnim odzivom....	53
4.4.1	Vpliv cistatina C na signalne poti transkripcijskega faktorja NF- κ B in MAP-kinaz	53
4.4.2	Vpliv cistatina C na nastanek dušikovega oksida.....	54
4.4.3	Vpliv cistatina C na sintezo IL-10.....	55
4.5	Vloga cistatina C pri regulaciji avtofagije, povezane z vnetnim odzivom	56
5	Razprava	59
6	Zaključki	65
	Literatura	67
	Bibliografija	85
	Biografija	87

Slike

Slika 1: Shematski prikaz signalnih poti po prepoznavi LPS z receptorji TLR4, ki vodijo do aktivacije transkripcijskih faktorjev in sinteze vnetnih mediatorjev.	3
Slika 2: Shematski prikaz strukture inflammasoma NLRP3.	6
Slika 3: Predlagani mehanizmi aktivacije Inflamasoma NLRP3.	7
Slika 4: Aktivacija nekanoničnega inflammasoma in sekundarna aktivacija kanoničnega inflammasoma NLRP3.	11
Slika 5: Struktura in aktivacija kaspaze-1.	12
Slika 6: Struktura in aktivacija kaspaze-11.	13
Slika 7: Shematski prikaz stopenj avtofagije.	16
Slika 8: Indukcija avtofagije.	17
Slika 9: Shematski prikaz mitofagije.	17
Slika 10: Shematski prikaz prepletanja avtofagije in aktivacije inflammasoma NLRP3.	18
Slika 11: Prikaz sekundarne strukture človeškega cistatina C.	21
Slika 12: Miši z izbitim genom za cistatin C so bolj občutljive na septični šok.	39
Slika 13: Prisotnost vnetnih citokinov <i>in vivo</i> po injiciranju LPS.	40
Slika 14: Povečano izločanje cistatina C v aktiviranih primarnih makrofagih.	41
Slika 15: Povečana aktivnost cisteinskih katepsinov v celotnih celičnih lizatih aktiviranih makrofagov z izbitim genom za cistatin C.	41
Slika 16: Povečana aktivnost cisteinskih katepsinov v celičnem gojišču aktiviranih makrofagov z izbitim genom za cistatin C.	42
Slika 17: Poškodbe lizosomov po aktivaciji inflammasoma v primarnih makrofagih.	42
Slika 18: Aktivnost katepsinov v citosolu po aktivaciji inflammasoma NLRP3 v primarnih makrofagih.	43
Slika 19: Zmanjšana aktivnost legumaina v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C.	43
Slika 20: Nivo legumaina in stefina B v primarnih makrofagih.	44
Slika 21: Aktivacija vnetnih kaspaz-1 in -11 v primarnih makrofagih pri stimulaciji LPS/ATP.	45
Slika 22: Povečano procesiranje in izločanje proinflammatoryh citokinov IL-1 β in IL-18 v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C.	46
Slika 23: Procesiranje GSDM D in celična smrt po aktivaciji inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP v primarnih makrofagih.	47
Slika 24: Aktivacija inflammasoma NLRP3 s kremenovimi kristali.	48
Slika 25: Viabilnost primarnih makrofagov ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 s kremenovimi kristali.	48
Slika 26: Oksidativen stres ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 v primarnih makrofagih.	49
Slika 27: Integriteta mitohondrijev ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 v primarnih makrofagih.	50
Slika 28: Mitohondrijske reaktivne kisikove zvrsti ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 v primarnih makrofagih.	51
Slika 29: Aktivacija kaspaze-11 s transfekcijo LPS v primarnih makrofagih.	52

Slika 30: Viabilnost primarnih makrofagov ob aktivaciji nekanoničnega inflammasoma s transfekcijo LPS.	53
Slika 31: Razgradnja NF- κ B inhibitorja α (I κ B- α) po stimulaciji primarnih makrofagov z LPS.	53
Slika 32: Fosforilacija MAP-kinaz po stimulaciji primarnih makrofagov z LPS.	54
Slika 33: Zmanjšano nastajanje in izločanje dušikovega oksida v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C.	55
Slika 34: Izločanje protivnetnega citokina IL-10 v primarnih makrofagih.	55
Slika 35: Povečana količina avtofagosomov po stimulaciji z LPS v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C.	56
Slika 36: Povečana fosforilacija kinaz v mTOR signalni poti po stimulaciji primarnih makrofagov z LPS.	57
Slika 37: Zmanjšana fosforilacija AMPK po stimulaciji LPS primarnih makrofagov z izbitim genom za cistatin C.	57
Slika 38: Vpliv odsotnosti cistatina C na vnetni odziv v primarnih makrofagih.	64

Tabele

Tabela 1: Lokalizacija najbolj raziskanih TLR receptorjev in njihovi ligandi.....	2
Tabela 2: NLR družine in njihova shematska struktura.....	5
Tabela 3: Primeri aktivatorjev inflammasoma NLRP3 glede na njihov izvor.....	7
Tabela 4: Sestava poliakrilamidnih gelov.	27
Tabela 5: Končne koncentracije inhibitorjev in sprožilcev vnetja v gojiščih in časi posameznih inkubacij. 33	
Tabela 6: Volumni BSA in vode, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje.	34

Kratice

Ab	...	protitelo; ang. antibody
AC	...	domena kisle transaktivacije; ang. acidic transactivation domain
ALR	...	AIM2 podobni receptor; ang. AIM2-like receptor
AMPK	...	AMP-aktivirana proteinska kinaza; ang. 5'-AMP-activated protein kinase
ang	...	angleško
AP-1	...	aktivatorski protein 1; ang. activator protein-1
APS	...	amonijev persulfat; ang. ammonium persulfate
ASC	...	protein, povezan z apoptozo, ki tvori pike in vsebuje CARD domeno; ang. apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain
ATG	...	geni, povezani z avtofagijo; ang. autophagy-related genes
ATP	...	adenozin trifosfat; ang. adenosine triphosphate
Baf	...	bafilomicin; ang. bafilomycin
BIR	...	domena s ponovitvami bakulovirusnega inhibitorja apoptoze; ang. baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain
BMDM	...	makrofagi, pridobljeni iz kostnega mozga; ang. bone marrow-derived macrophages
BSA	...	goveji serumski protein; ang. bovine serum albumin
CARD	...	domena, ki rekrutira kaspaze; ang. caspase activation and recruitment domain
CD14	...	diferenciacijski kluster, glikoprotein na površini imunskih celic; ang. cluster of differentiation 14
CDL	...	povezovalni peptid s CARD domeno; ang. CARD domain linker
CLR	...	tip C lektinski receptor; ang. C-type lectin receptor
CstC KO	...	z izbitim genom za cistatin C; ang. cystatin C knock-out
DAMP	...	stresne molekule; ang. danger-associated molecular pattern
DMEM	...	po Dulbeccu spremenjen medij Eagle; ang. Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	...	dimetilsulfoksid; ang. dimethyl sulfoxide
DTT	...	ditiotritol; ang. dithiothreitol
ECL	...	ojačana kemiluminiscenca; ang. enhanced chemiluminescence
ECM	...	zunajcelični matriks; ang. extracellular matrix
ELISA	...	encimska imunoabsorpcijska preiskava; ang. enzyme-linked immunosorbent assay
ER	...	endoplazemski retikulum; ang. endoplasmic reticulum
ERK	...	zunajcelična regulatorna kinaza; ang. extracellular signal-regulated kinase
FBS	...	fetusni serum goveda; ang. fetal bovine serum
GBP	...	protein, ki veže gvanilat; ang. guanylate-binding protein
GSDM	...	gasdermin; ang. gasdermin
GTP	...	gvanozin trifosfat; ang. guanosine triphosphate

HMGB1	...	protein B1 iz skupine proteinov z veliko mobilnostjo; ang. high mobility group protein B1
IDL	...	povezovalni peptid med domenami; ang. interdomain linker
IFN	...	interferon; ang. interferon
IKK	...	inhibitorna κ B kinaza; ang. inhibitor of nuclear factor κ B kinase
IL-10	...	interlevkin-10; ang. interleukin-10
IL-18	...	interlevkin-18; ang. interleukin-18
IL-1R1	...	receptor za IL-1; ang. interleukin-1 receptor
IL-1 β	...	interlevkin-1 β ; ang. interleukin-1 β
iNOS	...	inducirana sintaza dušikovega oksida; ang. inducible nitric oxide synthase
IRAK	...	kinaza, povezana z receptorjem IL-1; ang. interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	...	regulatorni faktor za interferone; ang. Interferon regulatory factor
ISRE	...	odzivni element, sprožen z IFN; ang. IFN-stimulated response elements
I κ B	...	inhibitor jedrnega faktorja κ B; ang. inhibitor of nuclear factor κ B
JNK	...	C-Jun N-terminalna kinaza; ang. c-Jun N-terminal kinase
LBS	...	LPS-vezavni protein; ang. LPS-binding protein
LC3	...	protein z lahko verigo 3, povezan z mikrotubuli; ang. microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LDH	...	laktat dehidrogenaza; ang. lactate dehydrogenase
LIR	...	regija, ki interagira z LC3; ang. LC3 interacting region
LPS	...	lipopolisaharid; ang. lipopolysaccharide
LRR	...	z levcini bogata domena; ang. leucine-rich repeat
LS	...	velika podenota; ang. large subunit
MAPK	...	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza; ang. mitogen-activated protein kinase
MAPKK	...	MAP-kinaza kinaza; ang. MAPK kinase
MAPKKK	...	MAP-kinaza kinaza kinaza; ang. MAPK kinase kinase
MAVS	...	mitohondrijski proti-virusni signalni protein; ang. mitochondrial antiviral-signaling protein
MD-2	...	mieloidni diferenciacijski faktor 2; ang. myeloid differentiation factor 2
MHC II	...	poglavitni histokompatibilnostni kompleks razreda II; ang. major histocompatibility complex class II
MSU	...	kristali sečne kisline; ang. monosodium urate
mTOR	...	sesalska tarča rapamicina; ang. mammalian target of rapamycin
MVB	...	multi-vezikularna telesa; ang. multi-vesicular bodies
MyD88	...	diferenciacijski faktor mieloidov 88; ang. myeloid differentiation primary response protein 88
NADPH	...	nikotinamidadenin dinukleotidfosfat; ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaDS	...	natrijev dodecilsulfat; ang. sodium dodecyl sulfate
NEK7	...	protein kinaza 7, povezana z NimA; ang. NimA-related protein kinase 7
NF- κ B	...	jedrni dejavnik κ B; ang. nuclear factor κ B
NLR	...	NOD-u podobni receptor; ang. NOD-like receptor
NLRP	...	protein NLR, ki vsebuje PYD domeno; ang. NACHT, LRR and PYD domains-containing protein
NO	...	dušikov oksid; ang. nitric oxide

NOD	...	nukleotidna oligomerizacijska domena; ang. nucleotide-binding and oligomerization domain
NTP	...	nukleotid trifosfat; ang. nucleoside triphosphate
OMV	...	vezikli iz zunanje membrane; ang. outer membrane vesicles
OPTN	...	optinevrin; ang. optineurin
P2X7	...	P2X purino-receptor 7; ang. P2X purinoceptor 7
p62	...	sekvestome 1; ang. sequestosome-1
p70 S6K	...	kinaza ribosomalnih proteinov S6; ang. ribosomal protein S6 kinase
PAGE	...	poliakrilamidna gelska elektroforeza; ang. polyacrylamide gel electrophoresis
PAMP	...	molekulski motivi patogenih organizmov; ang. pathogen-associated molecular pattern
Parkin	...	E3 ubikvitin ligaza parkin; ang. E3 ubiquitin-protein ligase parkin
PBS	...	fosfatni pufer z NaCl; ang. phosphate-buffered saline
pH	...	negativni desetiški logaritem aktivnosti H ⁺ ionov; ang.
PI-3K	...	fosfatidilinozitol-3-kinaza; ang. phosphoinositide 3-kinases
PINK1	...	protein kinaza 1, sprožena s PTEN; ang. PTEN-induced putative kinase protein 1
PRR	...	receptorji naravne imunosti; ang. pattern-recognition receptor
PYD	...	pirinska domena; ang. pyrin domain
RAGE	...	receptor za končne produkte glikacije; ang. receptor for advanced glycation endproducts
RIP	...	protein, ki reagira z receptorjem; ang. receptor-interacting protein
RLR	...	RIG-I podobni receptor; ang. RIG-I-like receptor
ROS	...	reaktivne kisikove zvrsti; ang. reactive oxygen species
shRNA	...	mala lasnična RNA; ang. short hairpin RNA
SiO ₂	...	silicijev dioksid (kristali); ang. silica, silicon dioxide
siRNA	...	mala interferenčna RNA; ang. small interfering RNA
SS	...	majhna podenota; ang. small subunit
STAT	...	prenašalec signala in aktivator transkripcije; ang. signal transducer and activator of transcription
TAB	...	protein, ki veže TAK1; ang. TAK1-binding protein
TAK1	...	s TGF- β aktivirana kinaza 1; ang. TGF- β -activated kinase 1
TBK	...	kinaza, ki veže TANK; ang. TANK-binding kinase
TBS	...	pufer s Trisom in NaCl; ang. Tris-buffered saline
TGF- β	...	tumorski rastni faktor β ; ang. transforming growth factor β
TIR	...	Toll/interlevkin-1 receptor; ang. Toll-Interleukin-1 receptor
TIRAP	...	adapterski protein s TIR domeno; ang. TIR domain-containing adapter protein
TLR	...	Toll-u podobni receptor; ang. Toll-like receptor
TNF	...	dejavnik tumorske nekroze; ang. tumor necrosis factor
TRAF	...	dejavnik, povezan z receptorjem TNF; ang. TNF-receptor-associated factor
TRIF	...	adapterska molekula s TIR domeno 1; ang. TIR domain-containing adapter molecule 1
ULK	...	UNC51 podobna kinaza; ang. Unc-51-like kinase 1
WT	...	divji tip; ang. wild type

Poglavje 1

Uvod

1.1 Naravni imunski sistem

Imunski sistem je kompleksen sistem, ki ščiti organizem pred patogenimi organizmi in maligno spremenjenimi lastnimi celicami. Imunski sistem sesalcev delimo na naravni (prirojeni) sistem in pridobljeni imunski sistem.

Naravni imunski sistem je prva faza obrambnega sistema in ima ključno vlogo pri hitri prepoznavi in odzivu organizma na okužbo ali poškodbo tkiva. Celični in biokemijski obrambni mehanizmi, ki so del naravnega imunskega sistema, so vzpostavljeni že pred okužbo ali poškodbo, kar doprinese k hitremu odzivu. Naravni imunski sistem sestavljajo: anatomska pregrada (epiteliji), imunske celice (fagocitne, dendritične celice) in proteini v krvni plazmi (npr. proteini sistema komplementa) [1], [2].

Pridobljeni imunski sistem se razvije kot specifični odgovor na okužbo ter prepozna veliko število različnih antigenov, ki jih razlikuje od lastnih. Pridobljeni imunski sistem ima sposobnost celičnega spomina, kar omogoča hitrejši in močnejši odziv na ponavljajoče okužbe. Za učinkovit obrambni odgovor je potrebno natančno regulirano delovanje in sodelovanje naravnega in pridobljenega imunskega sistema. Nepravilna regulacija obrambnih mehanizmov lahko privede do porušanja ravnotežja med gostiteljem in patogenom ali pretiranega odziva, kar lahko privede do bolezenskega stanja ali poškodbe tkiv gostitelja [1], [2].

Glavne funkcije naravnega imunskega sistema so preprečevanje, obvladovanje in odstranitev infekcije, odstranjevanje poškodovanih celic in obnova tkiv ter stimulacija in usmerjanje pridobljenega imunskega sistema. Glede na vrsto okužbe s patogenimi organizmi se naravni imunski sistem odzove z vnetnim ali protivirusnim odzivom. Pri vnetnem odzivu levkociti potujejo do mesta okužbe, kjer skupaj s plazemskimi proteini uničijo in odstranijo patogene. Vnetni odziv se pojavi tudi kot odgovor na poškodbo tkiva in akumulacijo nenormalnih snovi v celicah. Poleg efektorskih celic naravnega imunskega sistema, kot so makrofagi, dendritične celice in nevtrofilci, pri vnetju sodelujejo tudi celice tkiv na mestu okužbe in lokalni krvožilni sistem [1], [2].

Naravni imunski sistem deluje na principu prepoznavanja patogenih organizmov preko molekularnih motivov patogenih organizmov (PAMP) in stresnih molekul (DAMP) s pomočjo receptorjev na površini celic in v citoplazmi. Molekularni motivi patogenih organizmov so ohranjene molekularne strukture, značilne za različne skupine patogenih organizmov. Za PAMP je značilno, da so v patogenu stalno prisotni, se ne spreminjajo, so značilni le za patogene organizme in imajo pomembno vlogo pri mikrobnih fiziologiji, kar patogenom otežuje prilagajanje na imunski sistem gostitelja [3]. Bakterijski PAMP so pogosto gradniki celične stene, kot so lipopolisaharid (LPS), peptidoglikan, lipotehojska kislina in lipoproteini celične stene, in proteini, značilni za bakterije, kot sta pilin in flagelin.

Virusni PAMP so virusne nukleinske kisline, ki se zaradi kemičnih modifikacij in strukturnih značilnosti (npr. dvovijačna RNA – dsRNA, nemetilirani CpG motivi v DNA) bistveno razlikujejo od gostiteljske DNA [1], [2].

Receptorji naravne imunosti (PRR) ob prepoznavi PAMP in DAMP aktivirajo različne signalne poti, ki sprožijo imunski odziv preko izražanja provnetnih citokinov, interferonov (IFN) tipa I in drugih imunskih molekul in mediatorjev [4]. Poznamo več funkcijsko različnih razredov PRR, ki jih delimo glede na njihove strukturne značilnosti in homologijo. Med receptorje naravne imunosti spadajo Toll-u podobni receptorji (TLR), NOD-u podobni receptorji (NLR), RIG-I podobni receptorji (RLR) [5], lektinski receptorji tipa C (CLR) [6] in AIM2 podobni receptorji (ALR) [7]. PRR se lahko nahajajo na celični membrani, membranah organelov (npr. endolizosomi) ali v citosolu.

Ločevanje med lastnimi in tujimi molekulskimi motivi je izredno pomembno za prepoznavanje potencialnih nevarnosti za gostitelja ter za preprečevanje odziva na lastne celice. Nepravilna regulacija imunskega sistema ali nepravilno ločevanje med lastnimi in tujimi molekulskimi motivi lahko vodi do nastanka avtoimunskih bolezni [8].

Človeško telo naseljuje več trilijonov simbiotskih bakterij, ki naseljujejo večino epitelijskih površin, kot so koža, respiratorni in prebavni trakt in druge, ki imajo vlogo anatomske pregrade v imunskem sistemu. Med gostiteljem in simbiotskimi bakterijami se vzpostavi homeostaza, ki preprečuje vnetni in imunski odziv proti neškodljivim simbiotskih bakterijam in omogoča hiter odziv proti patogenim organizmom [9]. Porušitev stabilnega notranjega okolja lahko vodi v kronična vnetja, kot je Crohnova bolezen [10].

1.1.1 Receptorji TLR

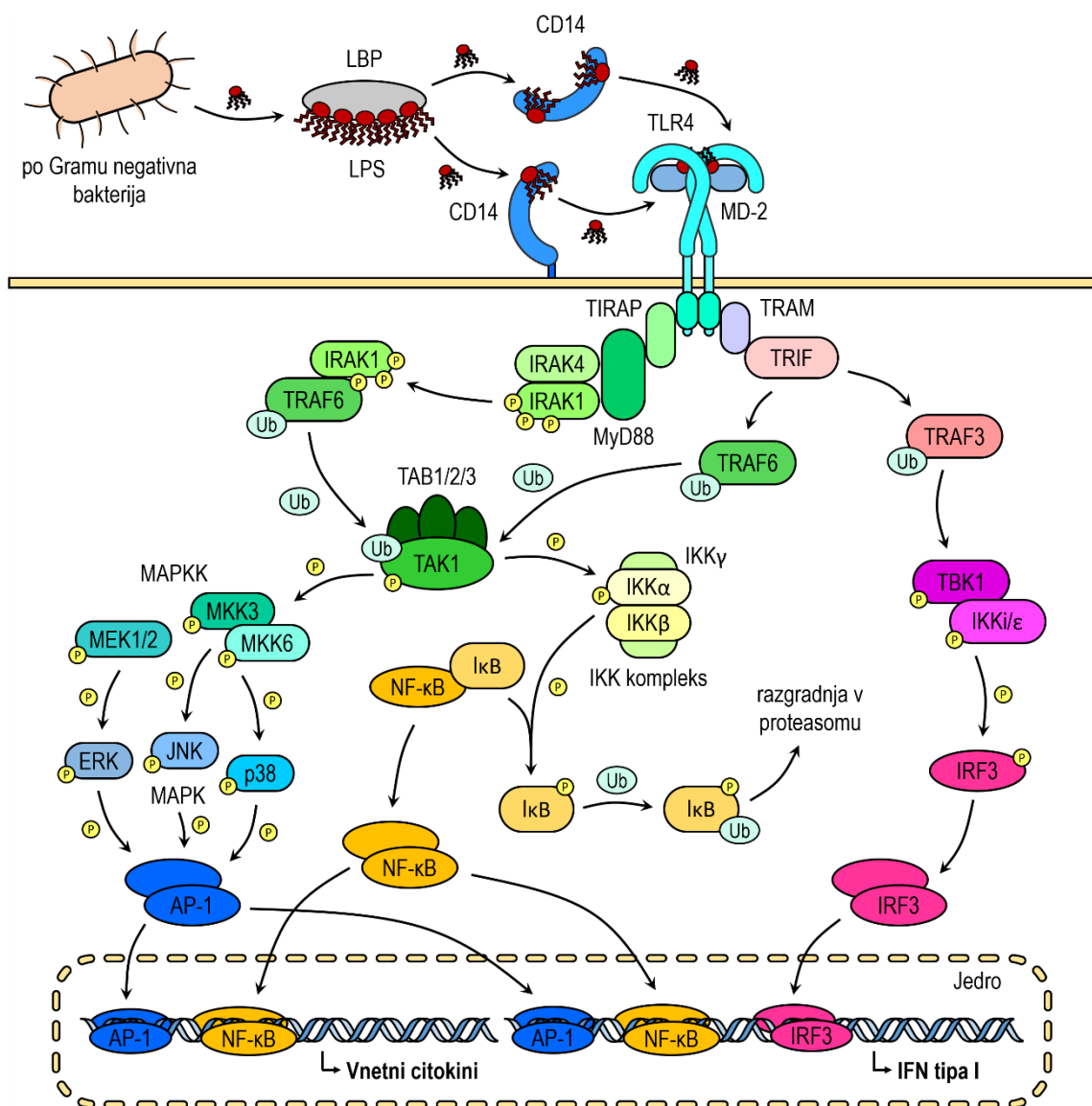
Receptorji razreda TLR so bili prvi odkriti receptorji naravne imunosti. TLR so transmembranski proteini, ki se nahajajo na celični membrani ali na membranah endosomalnih razdelkov [11]. Sestavljeni so iz z levcini bogate (LRR; ang. leucine-rich repeat) ektodomene, transmembranske domene in citoplazemske TIR (ang. Toll-Interleukin-1 receptor) domene. LRR ektodomena je odgovorna za prepoznavo in vezavo različnih PAMP, kot so lipidi, lipoproteini, proteini in nukleinske kisline. Ektodomena ima obliko podkve in ob vezavi liganda tvori homo- ali heterodimere v obliki “m” [12]. Ob dimerizaciji ektodomen se zblížata tudi transmembranski in citoplazemski TIR domeni, kar omogoči vezavo adapterskih proteinov in sproži signalne poti proti-mikrobnega odgovora [11], [12].

Tabela 1: Lokalizacija najbolj raziskanih TLR receptorjev in njihovi ligandi.

receptor	lokalizacija	ligandi (PAMP in DAMP)
TLR1	plazmalema	lipoproteini, peptidoglikani, lipotehojska kislina, zimosan
TLR2	plazmalema	lipoproteini, peptidoglikani, lipotehojska kislina, zimosan
TLR3	endosomi	virusna dsRNA, siRNA, lastna RNA iz poškodovanih celic
TLR4	plazmalema	LPS
TLR5	plazmalema	flagelin
TLR6	plazmalema	lipoproteini, peptidoglikani, lipotehojska kislina, zimosan
TLR7	endosomi	virusna ssRNA, RNA iz streptokokov skupine B
TLR8	endosomi	virusna in bakterijska RNA
TLR9	endosomi	nemetilirana CpG-DNA (virusna in bakterijska DNA)

1.1.1.1 Receptor TLR4

Lipopolisaharid (LPS) je glikolipid, ki se nahaja na zunanji strani zunanje membrane večine po Gramu negativnih bakterij. Sestava LPS je vrstno specifična in odzove različno močan imunski odgovor glede na vrsto izvora. LPS je sestavljen iz lipida A, oligosaharidne sredice in poli-saharidnega O-antigena. Molekule LPS se sproščajo v okolico v večji meri ob smrti bakterij, v manjši meri pa tudi ob njihovi delitvi. Serumski glikoprotein LBP (ang. LPS-binding protein) se veže na lipid A regijo LPS agregatov in prenese posamezne molekule LPS na membranski ali serumski glikoprotein CD14 [13]. LBP in CD14 preneseta posamezno molekulo LPS do proteina MD-2 (ang. myeloid differentiation factor 2), ki se nahaja v prosti obliki ali povezan v kompleks s TLR4. Za razliko od ostalih TLR, TLR4 potrebuje za vezavo liganda ko-receptor (MD-2) in ne veže liganda direktno [14]. Ob prepoznavi LPS kompleks TLR4/MD-2 dimerizira, kar zbliža TIR domeni TLR4 in pritegne adapterske proteine preko njihove TIR domene [12].



Slika 1: Shematski prikaz signalnih poti po prepoznavi LPS z receptorji TLR4, ki vodijo do aktivacije transkripcijskih faktorjev in sinteze vnetnih mediatorjev. Povzeto po [11], [14], [15].

Signalne poti, ki jih sprožijo različni adapterski proteini po vezavi na TLR, ločimo na od MyD88 (ang. myeloid differentiation primary response protein 88) odvisno in od MyD88 neodvisno signalno pot. Prepoznavanje LPS z receptorjem TLR4 in obe signalni poti so prikazani na sliki 1.

Pri MyD88-odvisni signalni poti se MyD88 s svojo TIR domeno veže na TIR domeno receptorja TLR4 direktno ali preko adapterskega proteina TIRAP (ang. TIR domain-containing adapter protein) [16]. MyD88 preko domene smrti pritegne proteine IRAK (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase). Na MyD88 se veže IRAK4 in aktivira IRAK1, ki se avto-fosforilira na več mestih. Temu sledi disociacija IRAK1 od receptorja ter vezava in aktivacija TRAF6 (ang. TNF receptor-associated factor 6). TRAF6 v kompleksu z drugimi proteini deluje kot E3 ubikvitin ligaza, ki povzroči K63 poli-ubikvitinacijo TAK1 (ang. TGF- β -activated kinase 1). Preko interakcije z ubikvitinom TAK1 tvori kompleks s proteini, ki vežejo TAK1 (TAB1, TAB2, TAB3), kar vodi do aktivacije TAK1. TAK1 aktivira IKK (ang. inhibitor of nuclear factor κ B kinase) kompleks in MAP-kinaze (ang. mitogen-activated protein kinase), kar vodi do aktivacije transkripcijskih faktorjev NF- κ B (ang. nuclear factor κ B) AP-1 (ang. activator protein 1) [11], [15].

V neaktiviranih celicah se NF- κ B nahaja v citosolu, kjer je povezan z I κ B (ang. inhibitor of nuclear factor κ B), ki preprečujejo njegov prenos v jedro. IKK kompleks sestavljajo IKK α , IKK β in IKK γ /NEMO, ki fosforilirajo I κ B (ang. inhibitor of nuclear factor κ B), čemur sledi poli-ubikvitinacija in razgradnja I κ B v proteasomu [15]. Po razgradnji I κ B prost NF- κ B potuje v jedro, kjer se kot transkripcijski faktor veže na vezavna mesta κ B na DNA [17].

Signalne poti preko MAPK so evlucijsko v evkariontih dobro ohranjene in imajo pomembno vlogo pri regulaciji izražanja genov. Običajno so organizirane v treh nivojih kinaz: MAPK (MAP-kinaza), MAPK kinaza (MAP-kinaza kinaza, MEK, MKK) in MEK kinaza (MAP-kinaza kinaza kinaza, MAP3K). TAK1 spada v skupino MAP3K in fosforilira MKK3 in MKK6, ki posledično aktivirata JNK (ang. c-Jun N-terminal kinase) in p38 MAPK [15]. Preko aktivacije MEK1 in MEK2 se aktivira tudi ERK (ang. extracellular signal-regulated kinase). Glavne MAP-kinaze v imunskem sistemu p38, JNK (ang. c-Jun N-terminal kinase) in ERK (ang. extracellular signal-regulated kinase) nadalje fosforilirajo in aktivirajo transkripcijski faktor AP-1 [18].

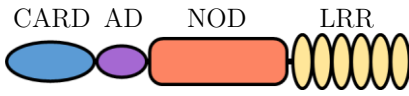
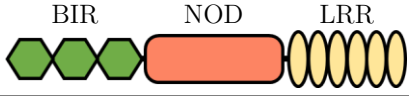
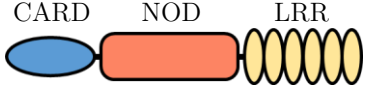
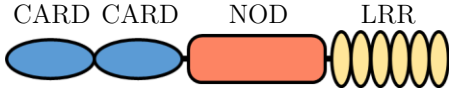
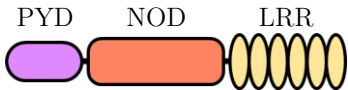


Od MyD88 neodvisna signalna pot se imenuje tudi od TRIF odvisna signalna pot, saj je odvisna od vezave proteina TRIF (ang. TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β) na TIR domeno receptorja TLR4 preko adapterskega proteina TRAM (ang. TRIF-related adapter molecule). TRIF pritegne proteina TRAF6 in TRAF3. TRAF6 nadalje pritegne kinazo RIP-1 (ang. receptor-interacting protein 1), kar omogoči aktivacijo TAK1 kompleksa in vodi v aktivacijo NK- κ B in MAPK signalnih poti, kot je opisano zgoraj [11], [15]. Ob vezavi TRAF3 na TRIF poteče njegova avto-ubikvitinacija, kar pritegne kinazi TBK1 (ang. TANK-binding kinase 1) in IKKi/IKK ϵ (ang. inducible inhibitor of NF- κ B kinase/I κ B kinase ϵ). Nastali kompleks povzroči fosforilacijo kinaz TBK1 ali IKKi/IKK ϵ , ki nadalje fosforilirajo IRF3 (ang. interferon regulatory factor 3). Fosforiliran IRF3 lahko tvori homo- ali heterodimere in potuje v jedro, kjer se veže na ohranjeno zaporedje ISRE (ang. IFN-stimulated response elements) in sproži izražanje IFN tipa I (npr. IFN- α , IFN- β) [11], [19].

1.1.2 Receptorji NLR

Receptorji NLR so evlucijsko ohranjeni citosolni sensorji s pomembno vlogo pri naravni imunosti. Sestavljeni so iz C-končne z levcini bogate (LRR) domene, centralne NOD-domene (ang. nucleotide-binding and oligomerization domain) in N-končne efektorske domene [20]. Centralna NOD-domena ima NTPazno aktivnost s preferenco za vezavo GTP

ali ATP in je odgovorna za oligomerizacijo receptorjev. C-končna LRR domena pri nekaterih NLR (NLRC4, NAIP receptorji) interagira z NOD-domeno in s tem inhibira oligomerizacijo receptorja v odsotnosti liganda [21]. Efektorske domene lahko interagirajo z adapterskimi proteini in sprožijo signalne poti, ki vodijo do imunskega odziva. Efektorske domene so lahko CARD domena (ang. caspase activation and recruitment domain), PYD domena (ang. pyrin domain), BIR domena (ang. baculoviral inhibitory repeat-like domain) in AD domena (ang. acidic transactivation domain) [22]. Glede na efektorske domene delimo receptorje NLR v različne družine, kot je prikazano v tabeli 2.

Tabela 2: NLR družine in njihova shematska struktura. Povzeto po [22], [23].

NLR družine	Efektorska domena	Struktura	Predstavniki
NLRA	AD		NLRA (CIITA)
NLRB	BIR		NAIP (NLRB)
NLRC	CARD		NOD1, NLRC4
			NOD2
NLRP	PYD		NLRP2-NLRP9, NLRP11-NLRP14
			NLRP1
nedefinirana domena			NLRC3, NLRC5, NLRX1

Receptorji NLR ob aktivaciji lahko delujejo kot trans-aktivatorji prepisovanja genov, aktivatorji NF- κ B in MAPK signalnih poti, sestavni del in aktivatorji kompleksov inflamasomov ter negativni regulatorji vnetnega odziva [20].

1.1.3 Inflamasom

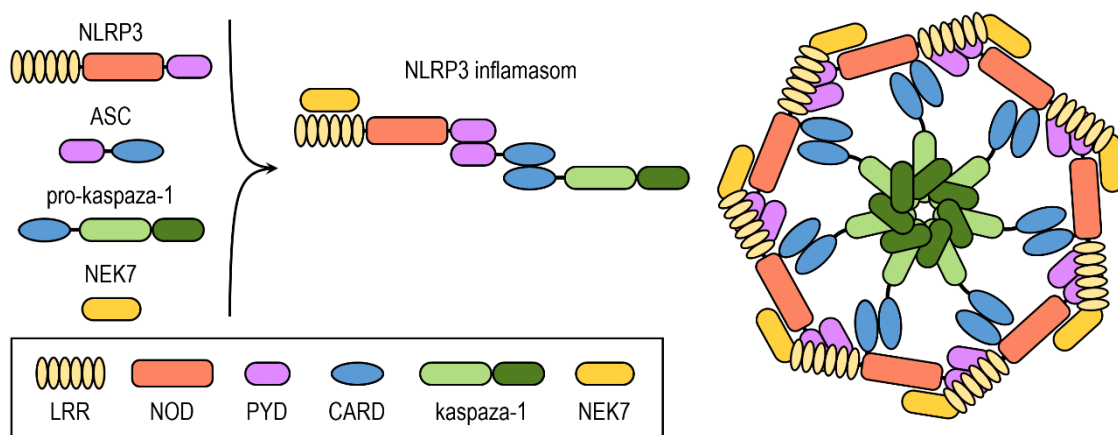
Inflasomi so proteinski kompleksi, ki nastanejo v citosolu ob prepoznavi PAMP in DAMP z določenimi receptorji. Pri sestavljanju in aktivaciji inflamasomov sodelujejo določeni receptorji naravne imunosti iz razredov NLR in ALR [24], [25]. Ob prepoznavi ligandov receptorji oligomerizirajo in pritegnejo adapterske proteine ter vnetne kaspaze v hierarhični ureditvi. Aktivacija in nastanek inflasoma vodi do aktivacije vnetnih kaspaz in posledično do celpitve in aktivacije provnetnih citokinov iz družine interleukinov (IL)-1 ter sprožitve vnetne oblike celične smrti, imenovane piroptoza [23].

Inflasomi imajo pomembno vlogo pri prepoznavanju patogenih organizmov in obrambnem odgovoru ob okužbi. Nepravilna regulacija aktivacije inflamasomov lahko vodi do razvoja avtoimunih (multipla skleroza), metabolnih (ateroskleroza, diabetes tipa 2 in debelost) in nevrodegenerativnih (Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen) motenj

[26]. Pri vnetnih boleznih je lahko nepravilno regulirana aktivacija inflammasomov vzrok ali doprinos k vnetnemu stanju. Pravilna in natančna regulacija inflammasomov je zato ključnega pomena za ohranjanje ravnovesja.

1.1.3.1 Inflamasom NLRP3

Inflamasom NLRP3 je eden izmed najbolj preučevanih inflammasomov, vendar natančen mehanizem njegove aktivacije še ni povsem pojasnjen. Inflamasoma NLRP3 je sestavljen iz receptorja NLRP3, ki preko svoje PYD domene pritegne adapterski protein ASC (ang. apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain), ki nadalje preko CARD domene pritegne pro-kaspazo-1 (Slika 2). V zadnjem času so pokazali, da je protein NEK7 (ang. NIMA-related kinase 7) pomemben pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 [27]. Ob aktivaciji inflammasoma NEK7 oligomerizira skupaj z NLRP3 v kompleks, ki pritegne ASC in pro-kaspazo-1 [28], [29].



Slika 2: Shematski prikaz strukture inflammasoma NLRP3. Ob aktivaciji receptorja NLRP3 le-ta skupaj z NEK7 oligomerizira v kompleks, ki pritegne ASC in pro-kaspazo-1. Povzeto po [23], [26], [30].

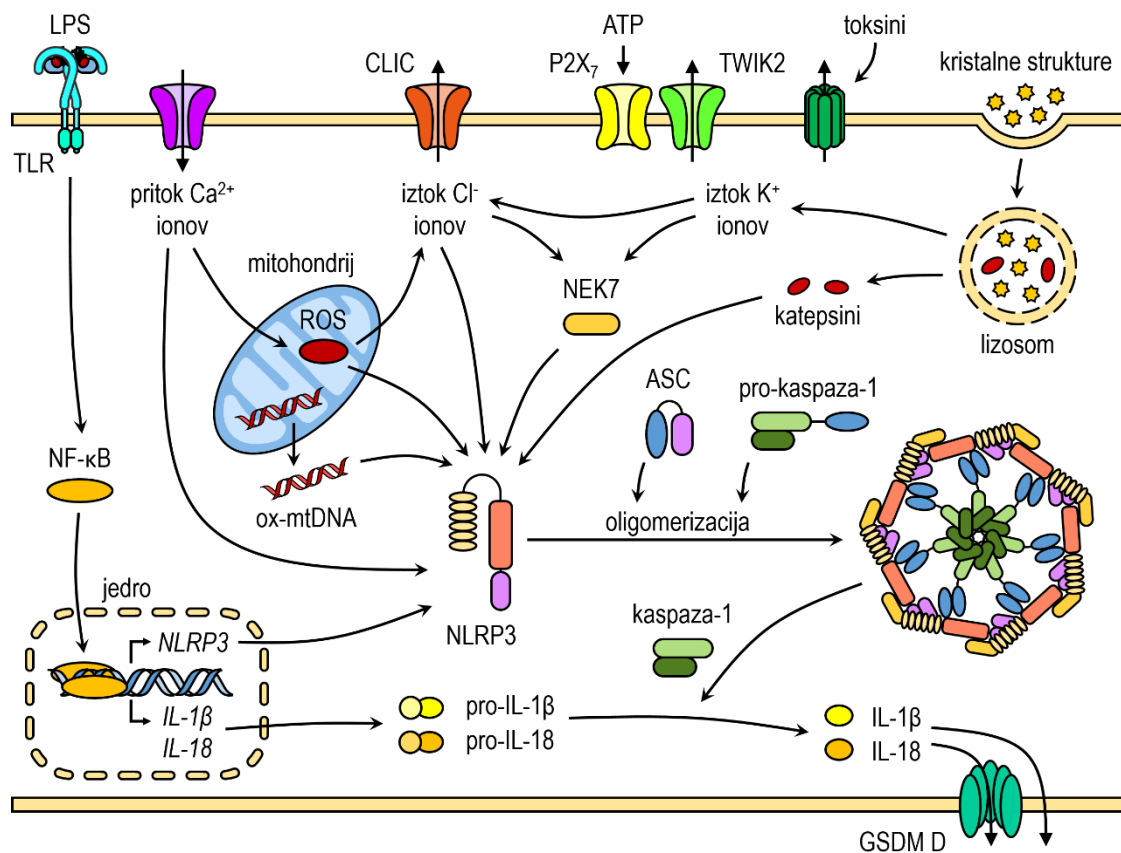
Za učinkovito aktivacijo inflammasoma NLRP3 in procesiranje provnetnih citokinov sta potrebni dve stopnji. V prvi stopnji se vnetni signal (PAMP) veže na receptorje, kot so TLR in NLR. S tem se aktivirajo signalne poti (npr. TLR4 signalna pot), ki vodijo do aktivacije transkripcijskih faktorjev (npr. NF- κ B, AP-1, IRF3) in sprožijo izražanje genov za provnetne citokine in NLRP3 [30]. V neaktiviranih celicah je nivo izražanja provnetnega citokina pro-IL-1 β nizek. Poleg regulacije izražanja genov prvi signal sproži de-ubikvitinacijo receptorja NLRP3 in ga s tem pripravi na aktivacijo [31], [32]. Prav tako je za aktivacijo inflammasoma NLRP3 potrebna predhodna K63-ubikvitinacija ASC [33], [34]. Drugi signal je potreben za sestavljanje in aktivacijo inflammasoma (aktivatorji inflammasoma NLRP3) [30], [35].

Receptor NLRP3 aktivirajo določeni PAMP (komponente celične stene mikroorganizmov, nukleinske kisline, toksini, ki tvorijo pore v membrani, ipd.), endogeni DAMP (zunajceličen ATP, hialuronska kislina, serumski amiloid A, kristali sečne kisline, kristali holesterola ipd.) in okolijski dejavniki (kristali azbesta, kristali aluminija, kristali silicija, UVB sevanje ipd.) [35]. Širok spekter aktivatorjev ne omogoča direktne vezave na receptor NLRP3, temveč najverjetneje aktivatorji sprožijo skupne celične procese, ki aktivirajo inflammasom NLRP3 [35].

Tabela 3: Primeri aktivatorjev inflammasoma NLRP3 glede na njihov izvor.

	izvor	aktivator
PAMP	celična stena	LPS, peptidoglikan, muramil dipeptid
	toksini	nigericin, gramicidin, α -hemolizin, β -hemolizin, M protein
	nukleinske kisline	bakterijska RNA, hibrid RNA-DNA
		virusna dsRNA, ssRNA
DAMP	stresne molekule	ATP, sečna kislina, hialuronan, ciklični GMP-AMP, NET, α -sinuclein, amiloid- β , serumski amiloid α , prioni, oksidirana mitohondrijska DNA
	kristali	holesterol, sečna kislina, kalcijev pirofosfat, kalcijev oksalat
okoljski dejavniki	kristali	aluminij, silicij, nano-delci, nano-cevke
	drugo	UVB sevanje

Celični procesi, ki so povezani z aktivacijo inflammasoma NLRP3, so spremembe znotrajcelične koncentracije K^+ ionov ali Cl^- ionov, Ca^{2+} signaliziranje, poškodbe in disfunkcija mitohondrijev in poškodbe lizosomov [35], [36]. Omenjeni procesi se med seboj ne izključujejo, temveč so pogosto povezani in se prepletajo (Slika 3). V zadnjem desetletju je veliko število različnih raziskav preučevalo celične procese, ki vplivajo na aktivacijo inflammasoma NLRP3, vendar zaradi prepletenosti omenjenih celičnih procesov natančen mehanizem in potek aktivacije še ni določen [35].



Slika 3: Predlagani mehanizmi aktivacije Inflamasoma NLRP3. Povzeto po [26], [35], [36].

1.1.3.1.1 Sprememba znotrajcelične koncentracije K^+ ionov Znižana znotrajcelična koncentracija K^+ ionov je skupni imenovallec pri večini aktivatorjev inflammasoma NLRP3 [37]. Zunanecelični ATP aktivira purinergični receptor $P2X_7$ (ang. $P2X$ purinoceptor 7), ki je ne-selektivni ionski kanalček, odvisen od vezave liganda (ATP) [38]. Ob aktivaciji prepušča Na^+ in Ca^{2+} ione in sodeluje s K^+ kanalčkom TWIK2 (ang. two-pore domain weak inwardly rectifying K^+ channel 2), kar vodi do zmanjšanja znotrajcelične koncentracije K^+ ionov [39]. Nigericin je bakterijski toksin, ki povzroči nastanek por v celični membrani in deluje kot K^+/H^+ ionofor, kar posledično vodi do zmanjšanja znotrajcelične koncentracije K^+ ionov [40]. Kristali aluminijevih soli ($Al(OH)_3$), silicija (SiO_2) in kalcijevega pirofosfata, prav tako povzročijo iztok K^+ ionov (ang. K^+ efflux) iz celic [41].

Nizka zunajcelična koncentracija in posledično zmanjšana znotrajcelična koncentracija ($< 70\%$ običajne) K^+ ionov zadostuje za spontano aktivacijo inflammasoma NLRP3 v mišjih makrofagih, izoliranih iz kostnega mozga [41]. Prav tako nizka koncentracija K^+ ionov povzroči nastanek kompleksa in aktivacijo inflammasoma NLRP3 v lizatih človeških makrofagov THP-1 [42]. Visoka zunajcelična koncentracija K^+ ionov prepreči zmanjšanje znotrajcelične koncentracije ob prisotnosti NLRP3 aktivatorjev in prepreči aktivacijo inflammasoma NLRP3 [40]–[42].

Nekatere raziskave so pokazale, da določene majhne molekule in mutacije na proteinu NLRP3 povzročijo aktivacijo inflammasoma NLRP3 neodvisno od K^+ ionov [41], [43]–[45]. To nakazuje na možnost, da zmanjšana koncentracija K^+ ionov omogoči konformacijsko spremembo v NLRP3, ki vodi do aktivacije inflammasoma, saj lahko majhne molekule in mutacije v proteinu NLRP3 povzročijo podobne konformacijske spremembe neodvisno od koncentracije K^+ ionov [36]. Natančen mehanizem aktivacije inflammasoma NLRP3 zaradi zmanjšane koncentracije K^+ ionov trenutno še ni povsem pojasnjen.

1.1.3.1.2 Ca^{2+} signaliziranje Ca^{2+} signaliziranje vpliva na veliko število različnih procesov v celici. Povišana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} ionov je bila povezana z aktivacijo inflammasoma NLRP3. Ca^{2+} kelator BAPTA-AM inhibira izločanje aktivnega IL- 1β pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 [46]–[48]. Nekateri NLRP3 aktivatorji, kot so ATP, nigericin in kristali, povzročijo spremembe v znotrajcelični koncentraciji Ca^{2+} ionov [49]. Ca^{2+} ioni lahko pripomorejo k interakcijam med NLRP3 in ASC ter s tem direktno vplivajo na aktivacijo inflammasoma NLRP3 [50]. Alternativno, povečana znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} ionov povzroči poškodbe in disfunkcijo mitohondrijev, kar vodi do posredne aktivacije inflammasoma NLRP3 [49].

V nasprotju z rezultati teh raziskav so pokazali, da je aktivacija inflammasoma NLRP3 z določenimi aktivatorji (ATP, nigericin in lizosomotropik Leu-Leu-OMe) neodvisna od Ca^{2+} signaliziranja [50]. Prav tako je inhibicija inflammasoma NLRP3 s kelatorjem BAPTA-AM neodvisna od njegove sposobnosti vezave Ca^{2+} ionov [50]. Mobilizacija Ca^{2+} ionov morda ni nujno potrebna za aktivacijo inflammasoma NLRP3, vendar ima lahko pri določenih pogojih regulatorno vlogo [36]. Vloga Ca^{2+} ionov signaliziranja pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 je zato kontroverzna in še ni povsem razjasnjena.

1.1.3.1.3 Sprememba znotrajcelične koncentracije Cl^- ionov Nizka znotrajcelična koncentracija Cl^- ionov sproži spontano aktivacijo inflammasoma NLRP3 in poveča izločanje IL- 1β ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 z različnimi aktivatorji NLRP3, kot so ATP, nigericin in kristali sečne kisline (MSU) [51]. Visoka zunajcelična koncentracija Cl^- ionov in inhibitorji Cl^- kanalčkov inhibirajo aktivacijo inflammasoma NLRP3 [51], [52]. Cl^- kanalčki CLIC (ang. chloride intracellular channel protein) so potrebni za aktivacijo inflammasoma NLRP3, saj njihova farmakološka inhibicija ali zmanjšanje izražanja (izbitje gena ali utišanje izražanja) vodi do zmanjšane aktivacije inflammasoma NLRP3 [51], [52].

Z uporabo različnih kombinacij inhibitorjev in različnih zunajceličnih koncentracij K^+ in Cl^- ionov so predlagali model aktivacije inflammasoma NLRP3 [51]. NLRP3 aktivatorji sprožijo iztok K^+ ionov, kar povzroči poškodbe mitohondrijev in nastanek mitohondrijskih reaktivnih kisikovih zvrsti, kar nadalje vodi do translokacije kanalčkov CLIC na celično membrano, iztoka Cl^- ionov in aktivacije inflammasoma NLRP3 [51]. Inhibicija kanalčkov CLIC je zmanjšala interakcije NEK7-NLRP3 in s tem negativno vplivala na nastanek in aktivacijo inflammasoma NLRP3 [51].

V nasprotju s temi rezultati je druga raziskovalna skupina pokazala, da iztok Cl^- ionov ne zadostuje za spontano aktivacijo inflammasoma NLRP3 in izločanje IL-1 β [53]. Pokazali so, da je iztok K^+ ionov pomemben za interakcije NEK7-NLRP3 in oligomerizacijo NLRP3, medtem ko iztok Cl^- ionov povzroči ASC oligomerizacijo. Nastanek ASC kompleksa (ang. ASC speck) v odsotnosti iztoka K^+ ionov ne pritegne in aktivira pro-kaspaze-1. Zmanjšanje znotrajcelične koncentracije (iztok) Cl^- ionov v tem modelu deluje kot pozitiven regulator, vendar ni nujno potreben za aktivacijo inflammasoma NLRP3 in izločanje IL-1 β [53].

1.1.3.1.4 Reaktivne kisikove zvrsti in poškodbe mitohondrijev Večina aktivatorjev NLRP3 povzroči nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki so bile predlagane kot skupni signal za aktivacijo NLRP3. Kot vir ROS je bila sprva predlagana NADPH oksidaza [54], [55], vendar so kasnejše študije pokazale, da farmakološka ali genetska inhibicija NADPH oksidaze ne vpliva na aktivacijo inflammasoma NLRP3 [56], [57].

Mitohondriji so drugi vir ROS v celicah in so povezani z aktivacijo inflammasoma NLRP3 preko nastanka mitohondrijskih ROS (mROS) in interakcij z določenimi komponentami v mitohondrijih, kot je mitohondrijska (oksidirana) DNA (ox-mtDNA) [58]–[61]. Nastanek mROS z inhibicijo dihalne verige vodi do aktivacije inflammasoma NLRP3 [62]. Nastanek mROS v poškodovanih mitohondrijih in sprostitvev mitohondrijske DNA je potrebna za aktivacijo inflammasoma NLRP3 z zunajceličnim ATP [59]. Mitohondrijska DNA direktno interagira z NLRP3 in njena oksidacija je pomembna za aktivacijo inflammasoma NLRP3 [60]. Druge študije so pokazale, da nastanek mROS in poškodbe mitohondrijev niso potrebne za aktivacijo inflammasoma NLRP3 [41], [63], [64].

Poleg mitohondrijske DNA tudi nekatere druge mitohondrijske molekule ko-lokalizirajo z inflammasomom NLRP3. MAVS direktno interagira z NLRP3 in je potreben za aktivacijo inflammasoma NLRP3 ob različnih aktivatorjih. Nekater študije so pokazale, da ima MAVS pomembno vlogo pri topnih aktivatorjih NLRP3, kot so ATP in nigericin, vendar ni potreben pri kristalnih aktivatorjih (kristali aluminijevih soli, MSU, kalcijevega pirofosfat) [65], [66]. Druge študije so pokazale vlogo MAVS pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 zgolj ob virusnih okužbah [67], [68]. Vloga ROS in poškodovanih mitohondrijev pri aktivaciji NLRP3 je še kontroverzna in potrebuje dodatne raziskave za boljše razumevanje.

1.1.3.1.5 Poškodbe lizosomov Kristali, npr. sečne kisline (MSU), aluminijevih soli, silicijevega oksida (SiO_2), holesterola, amiloid- β in drugi, po fagocitozi poškodujejo lizosome, kar povzroči sprostitvev vsebine lizosomov v citosol [69]–[74]. Lizosomotropik Leu-Leu-OMe povzroči poškodbe lizosoma in sproži aktivacijo inflammasoma NLRP3 [69], [71]. Iz poškodovanih lizosomov se v citosol sprostijo tudi cisteinske peptidaze katapsini [75]. Katapsin B interagira z NLRP3 in aktivira inflammasom NLRP3 [73]. Farmakološka inhibicija katapsina B s selektivnim inhibitorjem Ca-074me inhibira aktivacijo inflammasoma NLRP3 [69], [71], [72], [75]. V nasprotju s tem so druge študije pokazale, da genetska inhibicija katapsina B ne vpliva na aktivacijo inflammasoma [75], [76]. Pokazali so, da inhibitor Ca-074me ne inhibira zgolj katapsina B, temveč tudi druge cisteinske katapsine [75]. Cisteinski katapsini B, L, C, S in X imajo redundantno vlogo pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 in pripomorejo k aktivaciji inflammasoma ob genetski inhibiciji posameznih cisteinskih katapsinov [75].

Za aktivacijo inflammasoma NLRP3 s kristalnimi delci je potrebna fagocitoza [41], vendar je lahko v določenih primerih za aktivacijo inflammasoma NLRP3 dovolj stik kristalnih struktur s površino celic [77]. Kristalne strukture po fagocitozi povzročijo tudi iztok K^+ ionov, kar lahko vodi do aktivacije inflammasoma NLRP3 neodvisno od aktivnosti cisteinskih katepsinov. Bafilomicin A, inhibitor H^+ ATP črpalke v lizosomih, inhibira aktivacijo inflammasoma NLRP3 s kristalnimi strukturami, kar nakazuje na pomembno vlogo kislega okolja v lizosomih [69]. V skladu s tem so pokazali, da kislo okolje v lizosomih povzroči sprostitvev Na^+ ionov iz kristalov MSU, kar vodi do vdora vode v celico in posledično znižano znotrajcelično koncentracijo K^+ ionov [78]. Za ostale kristalne strukture povezava med poškodbami lizosomov in spremembami koncentracij ionov še ni pojasnjena.

1.1.3.2 Nekanonični inflamasom

Nekanonični inflamasom za razliko od kanoničnih inflamasomov (npr. NLRP3) ne vodi do aktivacije kaspaze-1, temveč aktivira kaspazi-4 in -5 pri ljudeh ter kaspazo-11 pri miših. Aktivacija nekanoničnega inflammasoma in kaspaze-11 ima ključno vlogo pri odzivu na LPS in posledičnem septičnem šoku pri miših. Za razliko od miši z izbitim genom za kaspazo-1 so miši z izbitim genom za kaspazo-11 odporne na septični šok, povzročen z LPS [79], [80].

Za razliko od kanoničnih inflamasomov pri nekanoničnem inflamasomu vnetne kaspaze ne potrebujejo receptorja za prepoznavo liganda in adapterskega proteina s CARD domeno, ki omogoči oligomerizacijo kaspaz [81]. Mišjo kaspazo-11 in človeški kaspazi-4 in -5 so identificirali kot direktne receptorje za znotrajcelični LPS [80]–[82]. Kaspaze-4, -5 in -11 preko svoje CARD domene prepoznajo znotrajcelični LPS in oligomerizirajo, kar vodi do njihove aktivacije [81].

Za aktivacijo nekanoničnega inflammasoma je potreben prenos LPS v notranjost gostiteljske celice. Nekatere bakterije vstopijo v gostiteljsko celico in ustvarijo vakuolo, kjer si ustvarijo ugodno okolje za preživetje in se skrijejo pred imunskih odzivom gostitelja [83]. Nekatere po Gramu negativne bakterije imajo lastne mehanizme, s katerimi iz vakuole preidejo v citosol, kjer jih lahko nekanonični inflamasom prepozna preko LPS na njihovi površini [83], [84]. Proteini GBP (ang. guanylate-binding protein) imajo pomembno vlogo pri obrambi organizma pred znotrajceličnimi bakterijami, saj lahko povzročijo lizo vakuol, ki vsebujejo znotrajcelične patogene in omogočijo sprostitvev bakterij v citosol [85]. Poleg tega se GBP lahko direktno vežejo na bakterije, pritegnejo IRGB10 (ang. immunity-related GTPase family member B10), ki poškoduje celično steno in membrano bakterij ter pripomore k sprostitvi LPS v citosol [86], [87].

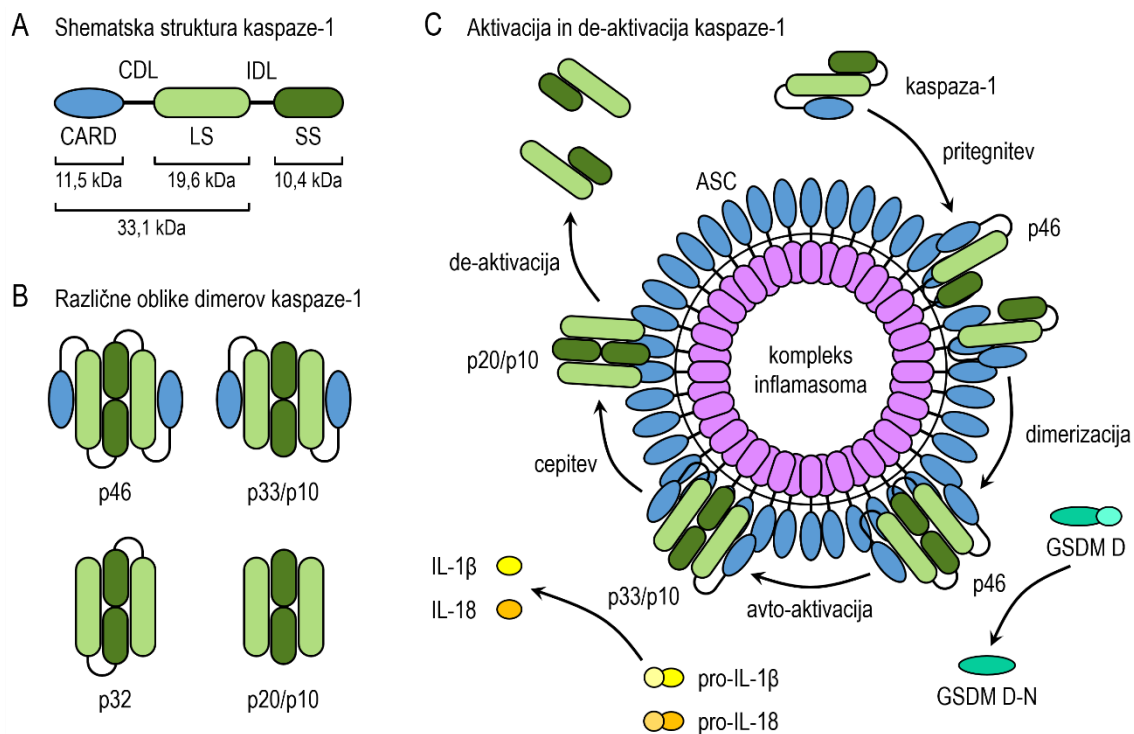
Vdor bakterij v gostiteljsko celico ni nujno potreben za aktivacijo nekanoničnega inflammasoma. Po Gramu negativne bakterije med svojo delitvijo in v stresnih pogojih sproščajo vezikle iz zunanje membrane (OMV, ang. outer membrane vesicle), ki vsebujejo veliko količino LPS [88], [89]. Vezikle OMV gostiteljska celica internalizira z endocitozo po klatrinski poti (ang. clathrin-mediated endocytosis) in s pomočjo GBP in IRGB10 se iz zgodnjih endosomov LPS sprosti v citosol [87], [90]–[92]. V zunajceličnem prostoru se lahko LPS veže na CD14 in se preko endocitoze prenese v notranjost celice in sprosti v citosol. Poleg tega se lahko LPS direktno veže na HMGB1 (ang. high-mobility group box 1) v zunajceličnem prostoru in sproži endocitozo preko receptorjev RAGE (ang. receptor for glycation end products) [93], [94].

Raziskave v zadnjem času so pokazale, da GBP1 lahko deluje kot citosolni LPS receptor in je ključen za aktivacijo nekanoničnega inflammasoma [95], [96]. Po vezavi na površino po Gramu negativnih bakterij ali OMV pritegne še ostale GBP (GBP2, -3 in -4), ki skupaj oligomerizirajo in tvorijo stabilen GBP kompleks [96], [97]. GBP kompleks pritegne kaspazo-4 na površino bakterij in izpostavi LPS na površini bakterij, kar omogoči aktivacijo nekanoničnega inflammasoma [95]–[97].

peptida med pro-domeno in katalitičnimi podenotami ter nastanek aktivnega dimera vnetnih kaspaz. [104], [106].

1.1.4.1 Kaspaza-1

Kaspaza-1 je ključna peptidaza za procesiranje vnetnih citokinov IL-1 β in IL-18 v njuno aktivno obliko. Kaspaza-1 ima pomembno vlogo tudi pri vnetni obliki celične smrti, saj lahko cepi GSDM D, ki po cepitvi tvori pore v celični membrani in povzroči celično smrt. Glavno mesto aktivacije kaspaze-1 so različni kanonični inflammasomi, ki pritegnejo kaspazo-1 in omogočijo njeno avto-aktivacijo. Kaspaza-1 je sestavljena iz N-končne pro-domene CARD, povezovalnega peptida CDL (ang. CARD domain linker), velike katalitične podenote (p20, LS), povezovalnega peptida IDL (ang. interdomain linker) in majhne katalitične podenote (p10, SS) (Slika 5). Za aktivno obliko kaspaze-1 velja tetramer p20/p10, saj je rekombinantni tetramer p20/p10 katalitično aktiven in po aktivaciji inflammasomov nastaneta fragmenta p20 in p10 [107]–[109].



Slika 5: Struktura in aktivacija kaspaze-1. A) Shematski prikaz strukture kaspaze-1. B) Shematski prikaz različnih možnih oblik kaspaze-1, ki nastanejo po dimerizaciji. C) Časovni potek aktivacije in deaktivacije kaspaze-1 na kompleksu inflammasoma. Povzeto po [109].

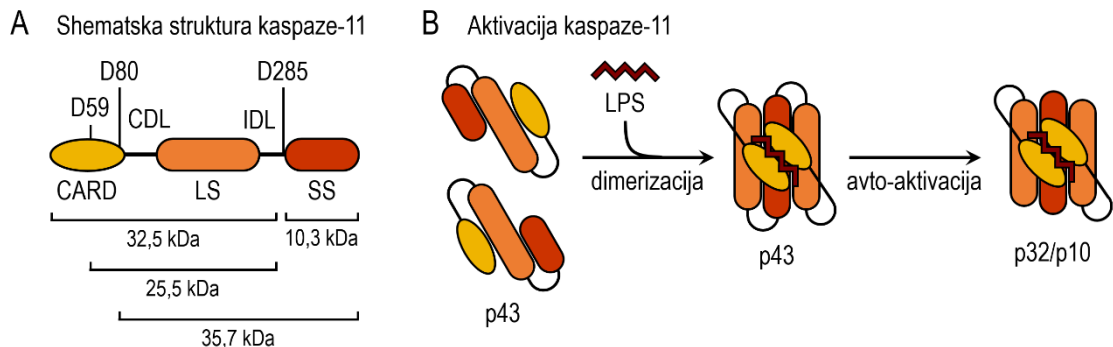
Z uporabo specifičnega inhibitorja (bFMK) in specifičnih protiteles, ki prepoznavajo zgolj veliko ali majhno podenoto, so določili katalitično aktivne oblike in časovni potek aktivacije kaspaze-1 [109]. Prav tako so predlagali mehanizem za negativno samoregulacijo aktivnosti kaspaze-1, ki omogoči zaključitev aktivnosti inflammasoma. Pritegnitev kaspaze-1 na kompleks inflammasoma omogoči dimerizacijo necepljene oblike p46, ki postane zaradi konformacijskih sprememb aktivna. Aktivna oblika p46 lahko cepi peptid IDL in ustvari prehodno katalitično aktivno obliko p33/p10. Oblika p33/p10 vsebuje domeno CARD, preko katere ostane aktivna oblika kaspaze-1 vezana na kompleks inflammasoma preko ASC. Aktivna oblika p33/p10 lahko nadalje cepi povezovalni peptid CDL, pri čemer nastane

oblike p20/p10, ki se odcepi od inflammasoma (Slika 5) [109]. Pri celičnih koncentracijah oblike p20/p10 postane tetramer nestabilen in razpade, kar vodi do izgube katalitične aktivnosti kaspaze-1 [109], [110].

Na časovni potek aktivacije in deaktivacije vpliva tudi velikost kompleksa inflammasoma, na katerega se veže kaspaza-1 [109]. Aktivna oblika p46 lahko cepi GSDM D, vendar ne more procesirati vnetnih citokinov [109], [111], [112]. Večji kompleksi z več vezavnimi mesti za kaspazo-1 omogočajo hitrejšo aktivacijo p46, nastanek oblike p33/p10 in hitrejšo deaktivacijo preko nastanka oblike p20/p10. Manjši kompleksi, kot je NLRC4 inflammasom, ali manjša količina proteina ASC omogočajo aktivacijo p46 in nastanek oblike p33/p10, vendar počasnejšo pretvorbo v obliko p20/p10, kar podaljša aktivnost kaspaze-1 [109]. Posledično lahko celice z manjšimi kompleksi sprožijo piroptozo brez procesiranja in izločanja vnetnih citokinov [109], [111], [112].

1.1.4.2 Kaspaza-11

Kaspaza-11 ima ključno vlogo pri odgovoru gostitelja na okužbo s po Gramu negativnimi bakterijami, ki vodi do piroptoze in septičnega šoka [79]. Kaspaza-11 je sestavljena iz N-končne pro-domene CARD, povezovalnega peptida CDL (ang. CARD domain linker), velike katalitične podenote (LS), povezovalnega peptida IDL (ang. interdomain linker) in majhne katalitične podenote (SS) (Slika 6). Kaspaza-11 je prisotna pri miših v dveh izooblikah p38 in p42. Izooblika p38 nastane pri uporabi alternativnega start kodona (M61) [113]. Kaspaza-11 je senzor citosolnega LPS in se s svojo domeno CARD direktno veže na LPS in lipid A [81]. Izooblika p38, ki ji manjka N-končna domena CARD, posledično ne prepozna in ne veže LPS [81].



Slika 6: Struktura in aktivacija kaspaze-11. A) Shematski prikaz strukture kaspaze-11. B) Shematski prikaz in časovni potek aktivacije kaspaze-11. Povzeto po [114].

Ob vezavi na LPS kaspaza-11 dimerizira ali oligomerizira in tvori nekanonični inflammasom [81], [114], [115]. Dimerizacija kaspaze-11 delno aktivira kaspazo-11, vendar ne zadostuje za cepitev substrata GSDM D, sprožitev piroptoze in aktivacijo inflammasoma NLRP3 [114], [115]. Delno aktiven dimer kaspaze-11 cepi za D285 znotraj peptida IDL in povzroči nastanek aktivne oblike, ki lahko cepi GSDM D in vodi v piroptozo in aktivacijo inflammasoma NLRP3 [114], [116]. Pri cepitvi p43 znotraj peptida IDL nastane aktivna oblika p32/p10 [114], [115]. Aktivna oblika p32/p10 v dimerni obliki prepozna in se veže na GSDM D, kar omogoči njegovo cepitev [115]. Krajša oblika p26/p10 je bila prav tako predlagana kot aktivna oblika kaspaze-11 in lahko nastane z dodatnim procesiranjem znotraj domene CARD ali iz izooblike p38 po cepitvi znotraj peptida IDL [116]. Predlagani cepitveni mesti (D59 ali D80) za nastanek p26/p10 se nahajata v α -vijačnici domene CARD, ki je težko dostopna [114]. Nastanek aktivne oblike iz izooblike p38 ima vprašljivo

biološko vlogo, saj izoblika ne prepozna citosolnega LPS [114]. Nastanek oblike p26/p10 in njegova vloga zato še nista povsem pojasnjena.

1.1.5 Piroptoza

Piroptoza je vnetna in nekrotična oblika programirane celične smrti, ki je odvisna od vnetnih kaspaz in ni odvisna od apoptotičnih kaspaz. Za piroptozo so značilni permeabilizacija in nastanek por v membrani, vdor vode zaradi porušenega ionskega gradienta, nabrekanje celice, ozmotska liza, kondenzacija kromatina, izguba mitohondrijskega medmembranskega potenciala in sprostitvev celične vsebine v okolico. Sprostitvev vsebine celice sprosti v okolico tudi vnetne citokine IL-1 β in IL-18 ter druge stresne molekule, ki dodatno sprožijo vnetni odgovor [117].

Aktivne vnetne kaspaze cepijo GSDM D, ki je ključni efektor v piroptozni. GSDM D je sestavljen iz N-končne domene (31 kDa), vmesnega linkerja in C-končne domene (22 kDa) [118], [119]. V citosolu je C-končna domena preko intramolekularnih interakcij vezana na N-končno domeno (p31 GSDM D) in deluje kot njen represor [118], [120]. Cepitev vmesnega linkerja z vnetnimi kaspazami omogoči vezavo N-končne domene GSDM D na fosfolipide v celični membrani, kar povzroči prekinitev interakcij s C-končno domeno. Sproščena N-končna domena ob vezavi na celično membrano oligomerizira in tvori membranske pore v velikosti 10 – 20 nm [120]–[123]. Nastale pore v membrani so ključne za sprostitvev vnetnih citokinov IL-1 β in IL-18 ter drugih znotrajceličnih molekul iz piroptotičnih celic [118], [119].

N-končna domena GSDM D se veže predvsem na kisle fosfolipide, kot so fosforilirani fosfatidilinozitol (mono-, bis- in tris-fosforilirani), ki se nahaja zgolj na notranjemu sloju celične membrane, in kardiolipin, ki se nahaja na mitohondrijski membrani [120], [122]. N-končna domena GSDM D se zato veže zgolj na notranji strani celične membrane in ne sproži piroptoze, če je prisoten v zunajceličnem prostoru [122]. Za vezavo na fosfolipide so odgovorni ohranjeni bazični aminokislinski ostanki v amfipatskih α -vijačnicah [122]. Ob vezavi na membrano p31 GSDM D oligomerizira in tvori 33-mer [123]. Za oligomerizacijo sta pomembna dva cisteinska aminokislinska ostanka [122], pri sidranju GSDM D v lipidni dvosloj pa sta pomembna dva hidrofobna aminokislinska ostanka [123].

Ob okužbi z bakterijami N-končna domena GSDM D vpliva na vitalnost bakterij (po Gramu negativne in pozitivne), saj se lahko veže na njihovo membrano, ki vsebuje kardiolipin [122]. Prav tako N-končna domena GSDM D sodeluje pri uničevanju znotrajceličnih bakterij [122].

1.1.6 Mediatorji vnetja

1.1.6.1 IL-1 β

Družina IL-1 vsebuje 11 topnih molekul (citokinov) in 10 receptorjev [124], [125]. IL-1 α in IL-1 β imata podobne biološke vloge in aktivirata iste membranske receptorje na tarčnih celicah, vendar se razlikujeta v tkivno-specifičnem izražanju in procesiranju [126]. IL-1 β je ena izmed najpomembnejših signalnih molekul ob infekcijah, vnetju in pri poškodbah tkiva. IL-1 β vpliva na centralno-živčni sistem, kjer sproži povišano telesno temperaturo in vročino (pirogen) in aktivira os hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza (HPA os, ang. hypothalamic–pituitary–adrenal axis). Povišana temperatura pospeši migracijo levkocitov in skupaj z indukcijo adhezijskih molekul v endotelijskih celicah vodi do pospešene pritegnitve imunskih celic na mesto okužbe ali poškodbe. Posledice aktivacije HPA osi vodijo v sintezo proteinov akutne faze, ki ojačajo prirojeni imunski odgovor in regulirajo poškodbo tkiv [127].

IL-1 β se izraža večinoma v mieloidnih celicah, v največji meri v monocitih in makrofagih [127]. Izražanje in sinteza IL-1 β poteče šele ob aktivaciji makrofagov, kot je vezava ligandov na TLR receptorje in aktivacija signalnih poti. Sintetizira se v obliki neaktivnega prekursorja pro-IL-1 β (31 kDa), ki se nahaja v citoplazmi. Aktivna kaspaza-1 po aktivaciji inflamatornega procesira pro-obliko v krajšo aktivno obliko IL-1 β (17 kDa). Pro-obliko IL-1 β lahko procesirajo tudi druge serinske peptidaze (npr. elastaza, kimaza in grancim A) v nevtrofilcih [126]. IL-1 β se sintetizira brez signalnega peptida in se izloči po nestandardni sekretijski poti [128]. Za mehanizem sekrecije IL-1 β je predlaganih več modelov. Najbolje opisana je sekrecija IL-1 β ob nastanku GSDM D por v membrani, ki so dovolj velike, da prepuščajo tudi IL-1 β [120]–[122]. Drugi modeli vključujejo avtofagijo IL-1 β , ki ji sledi sekrecija IL-1 β iz avtofagosomov [129], [130] in nastanek eksoveziklov, ki se sprostijo iz celic [131], [132].

Sproščeni citokin IL-1 β lahko deluje avtokrino kot tudi para- in endokrino. Zunajcelični IL-1 β se veže na receptor IL-1R1 (ang. interleukin-1 receptor type 1), ki tvori heterodimer z receptorjem IL-1R3 in aktivira NF- κ B in MAPK signalne poti [126]. IL-1 β se veže tudi na receptor IL-1R2, ki deluje kot receptor vaba (ang. decoy receptor) in ne sproži signalnih poti, ker ne vsebuje TIR domene. IL-1R2 deluje antagonistično in preprečuje delovanje IL-1 β in IL-1 α [126].

1.1.6.2 IL-18

IL-18 spada v družino IL-1 in se za razliko od IL-1 β izraža konstitutivno v monocitih, makrofagih, dendritičnih celicah ter tudi v endotelijskih celicah, keratinocitih in epitelijskih celicah prebavnega trakta [133]. IL-18 se sintetizira kot prekursor pro-IL-18 (24 kDa) brez signalnega peptida. Podobno kot pri IL-1 β aktivna oblika IL-18 (17 kDa) nastane po cepitvi s kaspazo-1. Alternativno lahko IL-18 cepijo tudi nekatere serinske peptidaze, kot so grancim B, kimaza in proteinaza 3 [133].

IL-18 se veže na receptor IL-18R α (ang. interleukin-18 receptor α) z nizko afiniteto, ki se ob prisotnosti ko-receptorja IL-18R β močno poveča. Ob vezavi IL-18 na receptorja nastane heterodimer, ki sproži signalne poti in aktivacijo NF- κ B [126].

IL-18 ima provnetne lastnosti, saj poveča izražanje adhezivnih molekul, nastanek dušikovega oksida (NO) in izražanje ostalih citokinov. Pomemben je za aktivacijo in diferenciacijo različnih populacij limfocitov T ter regulira citotoksičnost limfocitov T in celic NK, ki je posredovana z ligandom Fas [124], [133]. Skupaj z IL-12 je pomemben za induciranje sinteze IFN- γ v naravnih celicah ubijalkah in imfocitih T [124], [133].

1.1.6.3 IL-10

Interleukin-10 (IL-10) je ključni proti-vnetni citokin, ki preprečuje prekomerni vnetni odziv in avtoimunske bolezni [134]. IL-10 sintetizirajo in izločajo različne celice imunskega sistema, kot so makrofagi, monociti, dendritične celice, nevtrofilci, celice NK ter limfociti T in B [135]. Izražanje IL-10 je skrbno nadzorovano preko različnih signalnih poti, transkripcijskih faktorjev in epigenetskih sprememb. Med najbolj pomembne signalne poti za uravnavanje izražanja IL-10 v makrofagih spadata ERK in MAPK p38 signalni poti ter aktivacija NF- κ B transkripcijskega faktorja po aktivaciji receptorjev naravne imunosti [136], [137]. Na izražanje IL-10 vpliva tudi avtofagija, ki lahko pozitivno ali negativno vpliva na nastanek IL-10 [138].

IL-10 se veže na receptorja IL-10R α in IL-10R β , ki ob vezavi tvorita heterodimer in sprožita signalno pot, ki vodi do fosforilacije in aktivacije transkripcijskega faktorja STAT3 [136]. STAT3 regulira izražanje genov, ki imajo protivnetni učinek in zavirajo imunski odziv. STAT3 posredno povzroči negativno regulacijo p38 MAPK in NF- κ B signalnih poti [139], [140]. Poleg tega STAT3 regulira tudi izražanje IL-10 [141]. Makrofagi na svoji

površini izražajo večjo količino IL-10R in so posledično ena izmed glavnih tarč protivnetnih učinkov IL-10. IL-10 povzroči inhibicijo izražanja vnetnih citokinov, kemokinov in adhezijskih molekul. Preko inhibicije izražanja MHC II (ang. major histocompatibility complex class II) zavre predstavitev antigenov ter učinkovit odgovor T limfocitov. Poleg tega IL-10 zavira bakteriocidne mehanizme, kot sta nastanek NO in ROS [134].

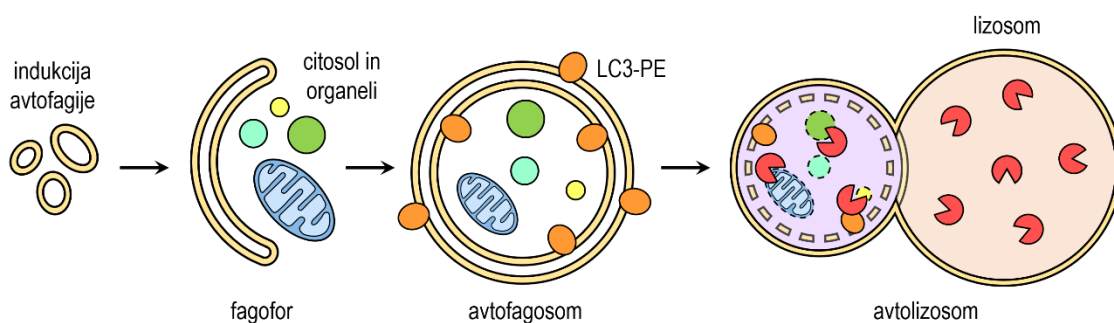
1.1.6.4 NO

Dušikov oksid (NO) deluje kot signalna molekula in ima pomembno vlogo pri neurotransmisiji, homeostazi žilnega sistema, obrambi pred patogenimi organizmi in regulaciji imunskega odgovora [142]. Sintaza dušikovega oksida (NOS, ang. NO synthase) katalizira nastanek NO iz L-arginina [142]. Inducibilna NOS (iNOS) je prisotna zgolj v imunskih celicah, kot so makrofagi, dendritične celice in T limfociti. Aktivacija receptorjev naravne imunosti (npr. TLR) in vnetni citokini (npr. IFN- γ) v makrofagih sprožijo izražanje iNOS in nastanek NO [143]. NO s prostimi kisikovimi radikali tvori reaktivne dušikove zvrsti, ki imajo citotoksičen učinek na patogene mikroorganizme [142]. NO ima tudi protivnetne učinke, saj zavira nastanek citokina IL-12 in s tem vpliva na diferenciacijo in aktivacijo T limfocitov [143]. Poleg tega NO negativno regulira izražanje protivnetnih citokinov v aktiviranih makrofagih [144]. Regulacija NO med okužbo mora biti skrbno nadzorovana, saj lahko prekomeren nastanek NO povzroči poškodbe tkiva [143].

1.2 Avtofagija

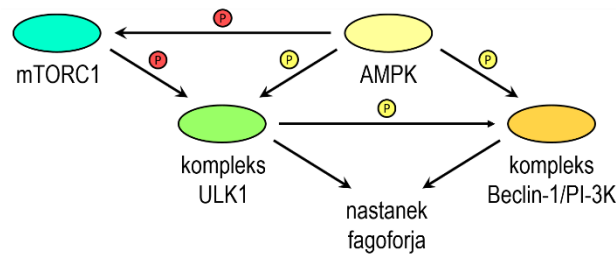
Avtofagija je znotrajceličen proces, pomemben za celično homeostazo, ki je odgovoren za dostavo delov citosola in organelov do lizosomov, kjer poteče njihova razgradnja. Avtofagija omogoča razgradnjo in recikliranje komponent citosola, kot je razgradnja proteinov do aminokislin med stradanjem. Poleg tega ima pomembno vlogo pri odstranjevanju poškodovanih organelov, kot so mitohondriji [145].

Avtofagijo nadzorujejo in usmerjajo proteini, ki so produkti genov *atg* (ang. autophagy-related genes) [146]. Nastanek avtofagosomov poteče v več stopnjah (Slika 7). Ob indukciji avtofagije nastane fagofor (ang. phagophore). Za nastanek fagoforja je ključna aktivacija kompleksa ULK (ang. UNC51-like kinase) in posledično aktivacija kompleksa Beclin-1/PI-3K razreda III (ang. class III phosphoinositide 3-kinase). V naslednjih stopnjah se membrana fagofora podaljšuje in obda del citosola ali organela. Za podaljševanje membrane je ključna lipidacija proteina LC3 (ang. microtubule-associated protein 1 light chain 3) s fosfatidiletanolaminom (PE). Iz citosolne oblike LC3-I nastane lipidirana oblika LC3-II (LC3-PE), ki je prisotna na membrani avtofagosoma. Po fuziji membran nastane zaprt razdelek, obdan z dvojno membrano, imenovan avtofagosom [145]. Avtofagosom se zlije z lizosomom (avtolizosom), kjer poteče razgradnja vsebine avtofagosoma [147].



Slika 7: Shematski prikaz stopenj avtofagije. Povzeto po [145].

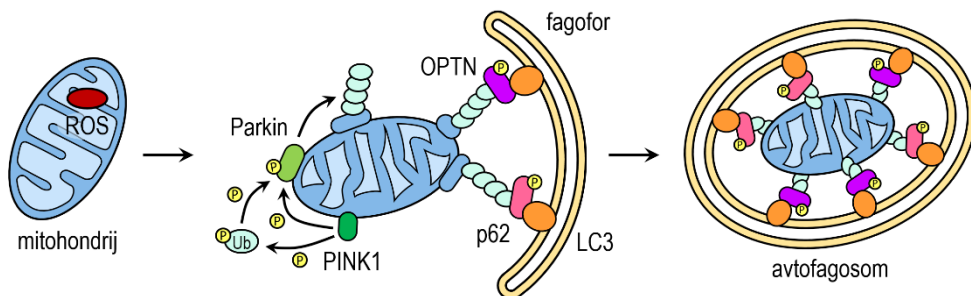
Indukcija avtofagije je regulirana preko različnih signalnih poti, ki zaznavajo dostopnost hranil v celici [145]. Kinaza mTOR (ang. mammalian target of rapamycin) tvori kompleks mTORC1, ki posredno zaznava rastne faktorje in dostopnost aminokislin v celici. Ob prisotnosti rastnih faktorjev in hranil se kompleks mTORC1 aktivira in preko fosforilacije proteina ULK1 ter drugih proteinov v kompleksih ULK in PI-3K razreda III inhibira indukcijo in napredovanje avtofagije [148]–[150]. AMPK (ang. 5-AMP activated protein kinase) zaznava energijsko stanje celice in se aktivira ob izčrpanju ATP ali glukoze. Aktiven AMPK direktno fosforilira in inhibira delovanje mTORC1 ter s tem omogoči iniciacijo avtofagije. Poleg tega AMPK direktno fosforilira in aktivira kompleksa ULK1 in Beclin-1/PI-3K razreda III ter sproži avtofagijo (Slika 8) [149]–[151].



Slika 8: Indukcija avtofagije. Povzeto po [148], [150].

1.2.1 Mitofagija

Mitofagija je specifična pot avtofagije, odgovorna za odstranjevanje mitohondrijev ob prilagajanju celičnega metabolizma na anaerobne pogoje, pri dozorevanju eritrocitov in odstranjevanju poškodovanih mitohondrijev [152]. Poškodovani mitohondriji imajo zmanjšan mitohondrijski medmembranski potencial, kar vodi v aktivacijo kinaze PINK1 (ang. PTEN-induced kinase 1), ki fosforilira ubikvitin (Ub) in E3 ubikvitin ligazo Parkin [152], [153]. Aktivacija proteina Parkin povzroči ubikvitinacijo različnih proteinov na površini poškodovanih mitohondrijev. Na ubikvitinirane proteine se vežejo različni adapterji avtofagije, kot so p62/SQSTM1, OPTN, NBR1 in drugi, ki vsebujejo ubikvitin-vezavno domeno in domeno LIR (ang. LC3-interacting region), ki omogoča interakcije s proteinom LC3. Adapterji avtofagije k poškodovanim mitohondrijem pritegnejo nastajajočo membrano fagoforja, ki ima na površini LC3, in usmerjajo podaljševanje membrane okoli poškodovanega mitohondrija (Slika 9). Nastali avtofagosom se zlije z lizosomom, kjer se poškodovani mitohondrij uniči in reciklira [152], [153].



Slika 9: Shematski prikaz mitofagije. Povzeto po [152].

1.2.2 Avtofagija in vnetni odziv

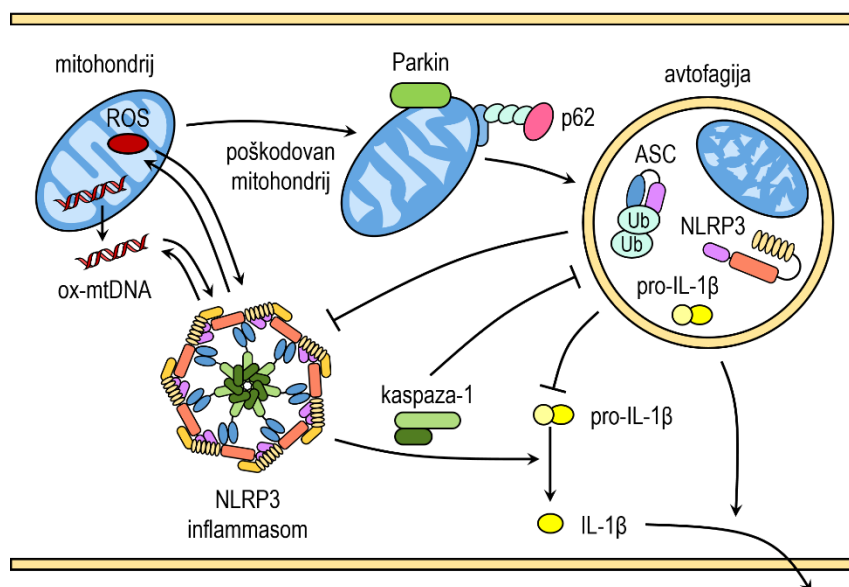
Avtofagija je pomembna obrambna linija pri okužbi z znotrajceličnimi patogeni. Med okužbo se sproži avtofagija preko receptorjev TLR [154], [155]. Avtofagosomi zajamejo

patogene in jih usmerijo v lizosome v razgradnjo, kar uniči patogene in omogoči predstavitev antigenov na površini celic [156]. Avtofagija in imunski odziv sta medsebojno povezana tudi preko regulacije izločanja citokinov in regulacije avtofagije s citokini [157], [158].

Avtofagija ima pomembno vlogo tudi pri regulaciji aktivnosti inflammasomov. Avtofagija lahko odstrani poškodovane mitohondrije (mitofagija) in s tem zmanjša sproščanje mitohondrijskih DAMP in zavira aktivacijo inflammasoma NLRP3 (Slika 10) [58]. Farmakološka ali genetska inhibicija avtofagije povzroči kopičenje poškodovanih mitohondrijev, kjer nastajajo ROS in posledično povečano aktivacijo inflammasoma NLRP3 z NLRP3 aktivatorji [58], [59], [159]. Inhibicija mitofagije poveča aktivacijo inflammasoma NLRP3, medtem ko indukcija mitofagije zmanjša aktivacijo inflammasoma NLRP3 [160]–[162]. Pri mitofagiji ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 ima ključno vlogo adapter p62, saj so ob njegovi odsotnosti v makrofagih zaznali povečano izločanje IL-1 β in občutljivost miši na septični šok, sprožen z LPS [163]. Kljub temu zmanjšana količina avtofagije ne zadostuje za aktivacijo inflammasoma NLRP3 ob odsotnosti NLRP3 aktivatorjev [58], [59].

Poleg mitofagije in odstranjevanja mitohondrijskih PAMP ima avtofagija pomembno vlogo tudi pri odstranjevanju komponent kompleksa inflammasoma (Slika 10) [164]–[168]. Post-translacijski modifikaciji komponent inflammasoma NLRP3, kot sta ubikvitinacija ASC in fosforilacija NLRP3, omogočata prepoznavo in vezavo p62, kar vodi do zajetja komponent inflammasoma v avtofagosome in njihovo razgradnjo [164], [165]. Poleg komponent kompleksa avtofagija odstranjuje tudi pro-IL-1 β in s tem zmanjša izločanje aktivne oblike IL-1 β ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 [169].

Po drugi strani pa avtofagija predstavlja enega izmed predlaganih mehanizmov za izločanje IL-1 β ob aktivaciji inflammasoma. Indukcija avtofagije je povečala izločanje, medtem ko je inhibicija avtofagije izločanje IL-1 β zavrnila [129], [130], [170]. Aktivna oblika IL-1 β se lahko ujame v prostor med membranama avtofagosoma in se izloči iz celice ob direktnem zlitju avtofagosoma s celično membrano ali preko multi-vezikularnih teles (MVB, ang. multi-vesicular bodies) [171]. Vpliv avtofagije na IL-1 β se med posameznimi raziskavami razlikuje, zato vloga avtofagije v izločanju IL-1 β še ni povsem razjasnjena.



Slika 10: Shematski prikaz prepletanja avtofagije in aktivacije inflammasoma NLRP3. Povzeto po [172].

1.3 Cisteinske peptidaze in cistatini v imunskem sistemu

Peptidaze ali proteinaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v proteinskih in peptidnih substratih. Peptidaze imajo poleg razgradnje proteinov v organizmu tudi veliko drugih vlog, ki so povezane s specifičnimi cepitvami in nastankom novih proteinskih in peptidnih produktov. Peptidaze regulirajo lokalizacijo, aktivacijo in usodo številnih proteinov in interakcije med njimi. Poleg tega sodelujejo v različnih signalnih poteh in so vpletene pri različnih procesih, kot so proliferacija, diferenciacija, angiogeneza, strjevanje krvi, vnetni in imunski odziv, avtofagija, nekroza, apoptoza in druge. Aktivnost peptidaz regulirajo njihovi inhibitorji. Usklajeno delovanje peptidaz in njihovih inhibitorjev je ključno za pravilen potek procesov in vzdrževanje homeostaze v organizmu.

1.3.1 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini so endolizosomske cisteinske peptidaze, ki spadajo v družino papainu podobnih cisteinskih peptidaz. V svojem aktivnem mestu vsebujejo katalitski par Cys-His, ki neposredno sodeluje pri hidrolizi peptidne vezi. Poznamo 11 predstavnikov pri ljudeh (katepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W). Večina cisteinskih katepsinov deluje kot endopeptidaze (katepsini B, F, H, K, L, S in V), nekateri delujejo kot eksopeptidaze (katepsin B, H, C in X). Cisteinski katepsini imajo široko specifičnost in preferenčno cepijo substrate za bazičnimi ali hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki [173].

Večina cisteinskih katepsinov se izraža v vseh tkivih, vendar so katepsini K, S in W tkivno specifični. Cisteinski katepsini se v največji meri nahajajo v lizosomih, vendar so lahko prisotni tudi v citosolu, jedru, na celični membrani in v zunajceličnem prostoru. Cisteinski katepsini imajo optimalno aktivnost v rahlo kislem (pH 4,5–6,5) in reducirajočem okolju, ki je prisotno v endosomih in lizosomih. V nevtralnem pH okolju je večina katepsinov nestabilnih [173].

Katepsini se sintetizirajo kot ne-aktivni pre-pro-encimi (cimogeni). N-končni signalni peptid se odstrani ob prehodu v endoplazemski retikulum, kjer poteče N-glikozilacija, ki se konča v Golgijevem aparatu. N-končni pro-peptid sodeluje pri pravilnem zvijanju in usmeri protein v endosome ali lizosome preko receptorjev za manozo-6-fosfat [174]. Pro-peptid sterično ovira dostop substrata do aktivnega mesta in s tem inhibira delovanje pro-encima [173]. V kislem okolju poteče avto-aktivacija cisteinskih katepsinov. Pro-peptid v kislem okolju disociira od aktivnega mesta, kar omogoči procesiranje in aktivacije druge molekule cisteinskega katepsina v pro-obliki [175]. Nastali aktiven cisteinski katepsin v verižni reakciji procesira in aktivira preostale molekule cisteinskih katepsinov [175], [176]. Avto-aktivacija po tem mehanizmu lahko poteče samo pri endopeptidazah, medtem ko eksopeptidaze potrebujejo za cepitev pro-peptida in njihovo aktivacijo druge endopeptidaze [177].

Cisteinski katepsini v endo/lizosomih sodelujejo pri znotrajcelični razgradnji proteinov, avtofagiji, metabolizmu lipidov, predstavitvi antigenov in celični smrti. Poleg tega določeni cisteinski katepsini sodelujejo pri različnih fizioloških procesih, kot so remodeliranje kosti, diferenciacija keratinocitov, aktivacija pro-hormonov in angiogeneza [173], [178]. Povišano izražanje in aktivnost cisteinskih katepsinov sta povezana z različnimi patofiziološkimi stanji, kot so nevrološke motnje, kardiovaskularne bolezni, debelost, rakava obolenja in z vnetjem povezane bolezni, kot je revmatoidni artritis [173], [178], [179]. Med vnetnim odzivom se cisteinski katepsini pogosto izločajo iz celic na njihovo membrano ali v zunajcelični prostor, kjer spreminjajo lokalno mikrookolje z razgradnjo zunajceličnega matriksa (ECM, ang. extracellular matrix) in regulirajo signalne poti s selektivnim procesiranjem zunajceličnih receptorjev, kemokinov in drugih peptidaz [178], [179].

1.3.2 Legumain

Legumain je cisteinska endopeptidaza, ki specifično cepi substratno peptidno vez za asparaginom ali aspartatom na položaju P1 [180]. Legumain se izraža v številnih tkivih in imunskih celicah [181]. Legumain se izraža v neaktivni obliki pre-pro-encima, ki se znotraj ER in Golgijevega aparata N-glikozilira. Legumain se večinoma nahaja v endolizosomskem sistemu. Kislo okolje omogoči avto-aktivacijo pro-legumaina (56 kDa) s procesiranjem na N- in C-koncu, kar vodi do nastanka vmesnih oblik (46 in 47 kDa). Procesiranje na C-koncu (46 kDa) je ključno za aktivacijo in peptidazno aktivnost. Na C-koncu lahko poteče dodatno procesiranje s pomočjo drugih cisteinskih peptidaz, kar vodi do nastanka oblike s 36 kDa, ki ima podobno aktivnost kot oblika s 46 kDa [181].

Znotraj celice se legumain nahaja večinoma v endolizosomskem sistemu, kjer je v kislem okolju stabilen v aktivni obliki. Pri nevtralnem pH aktivna oblika hitro izgubi svojo konformacijo in se ireverzibilno inaktivira [181], [182]. Kljub temu je aktivna oblika legumaina lahko prisotna izven endolizosomskega sistema v patofizioloških pogojih ali če je njena oblika stabilizirana z vezavo na druge proteine, kot so integrini in cistatini [181], [182]. Pri patofizioloških pogojih, kot so Alzheimerjeva bolezen in rakava obolenja, je okolje peptidaz (citosol ali ECM) pogosto nakisano, kar omogoči stabilizacijo aktivne oblike legumaina [181].

Legumain ima vlogo v imunskem sistemu, kjer omogoča procesiranje lastnih in tujih proteinov do nastanka primernih epitopov za predstavitev na kompleksu MHC II [181], [183]. Poleg tega legumain sproži razgradnjo invariantne verige in omogoči aktivacijo MHC II. Legumain ima tudi pomembno vlogo pri aktivaciji drugih cisteinskih peptidaz v endolizosomskem sistemu [184]. Legumain je vpleten tudi v signalne poti v imunskem sistemu, kjer pripomore k proteolitični aktivaciji receptorjev TLR [181], [184], [185].

1.3.3 Cistatini

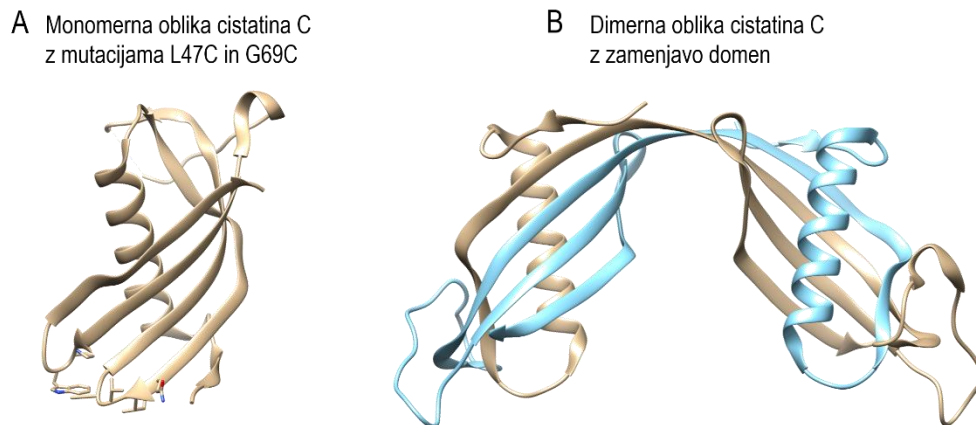
Cistatini so endogeni inhibitorji papainu podobnih cisteinskih peptidaz, kot so cisteinski katepsini. Cistatini so reverzibilni inhibitorji s tesno vezavo. Cistatini tipa I se imenujejo stefini (stefin A in B) in so znotrajcelični proteini, ki ne vsebujejo disulfidnih mostičkov in niso glikozilirani. Cistatini tipa 2 (cistatini C, D, E/M, F, S, SN in SA) vsebujejo 2 ohranjena disulfidna mostička in signalni peptid, ki jih usmerja v zunajcelični prostor. Cistatini tipa 3 so kininogeni, ki so veliki multifunkcionalni proteini v plazmi in vsebujejo 3 domene, podobne cistatinom tipa 2. Cistatini imajo vlogo v različnih bioloških procesih, kot so razgradnja proteinov, regulacija procesiranja hormonov, predstavitev antigenov, resorbcija kosti, vnetni odziv in odpornost na različne okužbe.

1.3.3.1 Cistatin C

Cistatin C (CstC) spada v skupino cistatinov tipa 2. Cistatin C se konstitutivno izraža in izloča iz vseh celic z jedrom, največ iz imunskih celic, ki izvirajo iz kostnega mozga [186], [187]. Cistatin C dobro inhibira večino lizosomskih cisteinskih peptidaz, kot so cisteinski katepsini (B, L, S in H) in legumain ($K_i < 1$ nM) [188], [189]. Prisoten je v večini telesnih tekočin, kot so krvna plazma, urin, cerebrospinalna tekočina in slina [186]. Zaradi nizke molekulske mase (13 kDa) in pozitivnega naboja pri fiziološkem pH-ju se izloči iz krvnega obtoka v ledvicah s prosto glomerulno filtracijo [190]. Proksimalne tubularne celice po filtraciji prevzamejo cistatin C in ga razgradijo, kar prepreči njegovo reabsorpcijo v krvni obtok [191]. Zaradi konstantne stopnje izražanja je količina cistatina C v serumu odvisna pretežno od glomerulne filtracije in se uporablja kot označevalec glomerulne filtracije (GFR, ang. glomerular filtration rate) [186].

Cistatin C ima podobno strukturo kot ostali cistatini. Sestavljen je iz antiparalelne β -ploskve, ki je ovita okoli α -vijačnice, ki je pravokotno orientirana na β -ploskev. β -ploskev je sestavljena iz 5 β -trakov, ki jih povezuje zanki L1 (med β 2 in β 3) in L2 (med β 4 in β 5). Na zanki L1 se nahaja ohranjen motiv QxVxG (QIVAG pri človeškem in QLVAG pri mišjem CstC) in na zanki L2 ohranjen motiv PW, ki imata pomembno vlogo pri inhibiciji cisteinskih peptidaz (Slika 11) [192]. N-končni del ter zanki L1 in L2 tvorijo vezavno in inhibitorno mesto v obliki klina. N-končni del vpliva na afiniteto vezave in specifičnost inhibicije [193]. Pri inhibiciji legumaina ne sodeluje inhibitorno mesto za inhibicijo papainu podobnih cisteinskih peptidaz, temveč drugo mesto [189].

Signalni peptid usmeri nastajajoč protein cistatina C v ER. V ER velik delež cistatina C dimerizira, kar preprečuje interakcije s cisteinskimi peptidazami, ki so prisotne v sekrecijski poti [187], [194]. Dimer cistatina C nastane z zamenjavo domen in nima inhibitorne aktivnosti (Slika 11) [195]. Dimeri cistatina C se razgradijo ali disociirajo, saj se iz celic izloča zgolj aktivna monomerna oblika [187], [194]. V zunajceličnem prostoru se cistatin C veže na tarčne peptidaze in nastali kompleksi ali posamezen cistatin C so privzeti v celice z endocitozo [75], [196]–[198]. Po endocitozi lahko cistatin C v kislih celičnih razdelkih ponovno tvori dimere in se razgradi. Na dimerizacijo cistatina C pozitivno vpliva tudi povišana količina znotrajceličnih ROS. Preko dimerizacije cistatina C se nadzoruje izločanje aktivne oblike inhibitorja [187].



Slika 11: Prikaz sekundarne strukture človeškega cistatina C. A) Monomerna oblika človeškega cistatina C z mutacijama L47C in G69C (PBD: 3GAW). Aminokislinski ostanki v zankah L1 (QIVAG) in L2 (PW), ki sodelujejo pri inhibiciji, so prikazani palično. B) Dimerna oblika človeškega cistatina C, ki nastane ob zamenjavi domen (PDB: 1R4C). Vsaka veriga je prikazana s svojo barvo.

Cistatin C je vpleten v različne procese v imunskem sistemu, kot so obramba pred invazijo patogenov, predstavitev antigenov, regulacija vnetnih mediatorjev in citokinov [199]. Cistatin C se vmeša v procese podvojevanja virusov in zmanjša virusno obremenitev preko inhibicije cisteinskih peptidaz [200], [201]. Cistatin C preko inhibicije katepsina S regulira predstavitev antigenov, vendar njegova vloga ni ključna za nastanek kompleksa antigen/MHC II [202], [203]. Cistatin C regulira delovanje fagocitnih celic, kot so monociti in makrofagi. Cistatin C zavira fagocitozo in oksidativni izbruh (ang. oxidative burst) v polimorfonuklearnih levkocitih (nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci) [204].

Cistatin C je vpleten v regulacijo vnetnih mediatorjev in citokinov. Stimulacija mišjih peritonealnih makrofagov z LPS ali IFN- γ je zmanjšala izločanje cistatina C [205], [206]. Mišji peritonealni makrofagi z izbitim genom za cistatin C imajo zmanjšano aktivacijo NF- κ B in povečano sintezo IL-10 ob stimulaciji z IFN- γ [206]. Dodatek eksogenega

cistatina C mišjim peritonealnim makrofagom poveča aktivacijo NF- κ B, sintezo TNF- α , izražanje iNOS in nastanek NO ter zmanjšano sintezo IL-10 ob stimulaciji z IFN- γ [206]. Podoben učinek na mišje peritonealne makrofage ob stimulaciji z IFN- γ ima tudi dodajanje kokošnjega cistatina, ki je homolog cistatinu C [207]. Kokošji cistatin C ob stimulaciji z IFN- γ povzroči povečano fosforilacijo MAP kinaz ERK1/2 in JNK, posledično povečano aktivacijo transkripcijskih faktorjev NF- κ B, STAT1 in IRF1, kar vodi do povečanega izražanja TNF- α in iNOS ter nastanka NO [207]. Po drugi strani je utišanje izražanja gena za cistatin C v mišjih peritonealnih makrofagih povzročilo povečano izražanje gena za IL-1 β ob LPS stimulaciji in izločanje IL-1 β ob aktivaciji inflamasma NLRP3 [75]. V skladu s tem je dodatek eksogenega človeškega cistatina C povzročil zmanjšano fosforilacijo ERK1/2, zmanjšano izražanje genov in izločanje vnetnih citokinov IL-1 β in TNF- α [197].

V zadnjem času so pokazali, da ima cistatin C regulatorno vlogo pri indukciji avtofagije [208]–[212]. Dodatek eksogenega cistatina C mišjim nevroblastom in primarnim nevronom med stradanjem poveča pretvorbo citosolne oblike LC3-I v lipidirano obliko LC3-II in poveča število nastalih avtofagosomov in avtofagolizosomov [208], [209]. Povečano število avtofagosomov ni posledica blokade zlitja avtofagosomov z lizosomi, temveč sovpada s povečano proteolizo in povečanim tokom avtofagije (ang. autophagic flux) [208]. Cistatin C sproži avtofagijo preko inhibicije mTOR signalne poti, saj dodatek cistatina C zmanjša fosforilacijo p70 S6 kinaze, ki je direktni substrat kinaze mTOR [208], [209]. Dodatek cistatina C poveča aktivnost AMPK, ki inhibira mTOR in hkrati direktno inducira avtofagijo [209], [212]. Odsotnost cistatina C v mišjem modelu za aterosklerozo (apoE^{-/-} miši) vodi do zmanjšane količine LC3-II in povečano količino p62 v lezijah in peritonealnih makrofagih [210]. Vpliv cistatina C na avtofagijo so pokazali tudi na mišjem modelu za Parkinsonovo bolezen, kjer je dodatek eksogenega cistatina C v možganih povzročil povečano količino LC3-II in zmanjšanje p62 [211]. V skladu z zgornjimi raziskavami prekomerno izražanje oziroma utišanje gena za cistatin C v podganjih nevronih vodi do povečane oziroma zmanjšane indukcije avtofagije [211].

Poglavje 2

Namen dela

Številne raziskave so že poročale o vlogi cistatinov pri imunskem odzivu, vendar vloga cistatina C pri vnetnem odzivu in aktivaciji inflamasma NLRP3 še ni dobro raziskana. Namen doktorskega dela je bil opredeliti vlogo cistatina C pri regulaciji vnetnega odziva in v nadaljevanju preučiti mehanizme, ki so vpleteni v regulacijo vnetnega odziva:

1. Preučiti vpliv cistatina C na vnetni odziv na primarni ravni kot direktnega inhibitorja cisteinskih katepsinov.
2. Preučiti vpliv cistatina C na vnetni odziv preko alternativnih mehanizmov delovanja, kot so signalne poti, poškodbe mitohondrijev ter avtofagija.
3. Preučiti vpliv cistatina C na potek seapse, sprožene z lipopolisaharidom pri miših.

Delovne hipoteze so bile:

1. Primarni mišji makrofagi, izolirani iz miši z izbitim genom za cistatin C, bodo imeli močnejši vnetni odziv in večjo količino (sproščenih) vnetnih faktorjev v primerjavi s primarnimi mišjimi makrofagi, izoliranimi iz miši divjega tipa.
2. Pomanjkanje cistatina C v primarnih mišjih makrofagih bo vodilo v povečano zunajcelično in celokupno celično aktivnost katepsinov, vendar ne v povečano citosolno aktivnost katepsinov ob vnetnem odzivu.
3. Cistatin C bo zaščitil mitohondrije in zmanjšal nastanek (mitohondrijskih) reaktivnih kisikovih zvrsti ob vnetnem odzivu v primarnih mišjih makrofagih.
4. Cistatin C bo sprožil avtofagijo ob vnetnem odzivu v primarnih mišjih makrofagih.

Poglavje 3

Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije in reagenti

3.1.1.1 Sprožilci vnetja in inhibitorji

- LPS (lipopolisaharid iz bakterije *Escherichia coli* 055:B5; L6529; Sigma-Aldrich)
- ATP (adenozin trifosfat; A6419; Sigma-Aldrich)
- SiO₂ (silicijev dioksid) kristali (tlrl-sio-2; Invivogen)
- MSU (mononatrijev urat) kristali (tlrl-msu-25; Invivogen)
- rekombinantni mišji interferon (IFN)- γ (14-8311-63; eBioscience Technologys)
- Pam3CSK4 (Pam3CysSerLys4; Invivogen)
- Bafilomycin A1 (11038; Cayman Chemical)
- E-64d (L-trans-epoksisukcinil-leucilamido-3-metil-butan etil ester; 4321-v; Peptide Institute)
- Ca-074me (L-3-trans-propilkarbonil-oksiran-2-karbonil)-L-izoleucil-L-prolin metil ester; HY-100350; MedChemExpress)
- E-64 (trans-epoksisukcinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butan; 4096; Peptide Institute)

3.1.1.2 Fluorescenčna barvila in fluorogeni substrati

- z-Phe-Arg-AMC (I-1160; Bachem)
- z-Arg-Arg-AMC (I-1135; Bachem)
- z-Ala-Ala-Asn-AMC (MCA-3209-v; PeptaNova)
- MitoSOXTM (M36008; Invitrogen)
- MitoTrackerTM Green FM (M7514; Invitrogen)
- MitoTrackerTM Red CMXRos (M7512; Invitrogen)
- LysoTrackerTM Green DND-26 (L7526; Invitrogen)

3.1.1.3 Ostale kemikalije

- akrilamid (N, N-metilenbisakrilamid; Serva)
- APS (amonijev persulfat; Serva)
- bromfenol modro (Serva)
- digitonin (Sigma-Aldrich)
- DMSO (dimetilsulfoksid; Sigma-Aldrich)
- DOTAP (Roche Applied Science)

- DTT (ditiotreitol; Sigma-Aldrich)
- EDTA (etilendiamintetraocetna kislina; Serva)
- glicerol (Serva)
- glicin (Sigma-Aldrich)
- goveji serumski albumin, BSA (Sigma-Aldrich)
- H_3PO_4
- mešanica inhibitorjev fosfataz (G-Biosciences)
- mešanica inhibitorjev peptidaz (Sigma-Aldrich)
- metanol (Merck)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat; Merck)
- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (trinatrijev citrat; Serva)
- Na_3VO_4 (natrijev ortovanedat; Sigma-Aldrich)
- NaCl (natrijev klorid; AppliChem)
- NaDS (natrijev dodecilsulfat; Thermo Scientific)
- NaF (natrijev fluorid; Sigma-Aldrich)
- NaH_2PO_4 (natrijev dihidrogenfosfat; Merck)
- NaHCO_3 (natrijev hidrogenkarbonat; Sigma-Aldrich)
- NaNO_2 (natrijev nitrit; Riedel-de Haën)
- NED (N-1-naftiletildiamin dihidroklorid)
- NH_4Cl (amonijev klorid; Acros)
- NP-40 (Nonident P40 oz. oktilfenoksipolietoksiletanol; Roche Diagnostics)
- označevalec velikosti proteinov PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)
- posneto mleko v prahu (Pomurka)
- raztopina razvijalca Mediphot E90 in fiksirja Mediphot F90 (Colenta Labortechnik)
- reagent Bradford (Bio-Rad)
- reagent ECL za kemiluminiscenco (GE Healthcare Amersham)
- sulfanilamid
- TCA (triklorocetna kislina; Sigma-Aldrich)
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamin; Merck)
- tripan modro (Sigma-Aldrich)
- Tris (tris(hidroksimetil)aminometan; Serva)
- TritonX-100 (oktilfenoletoksilat; Serva)
- Tween-20 (polisorbat 20; Serva)
- β -glicerofosfat (Sigma-Aldrich)

3.1.2 Kompleti reagentov

- Komplet reagentov za test ELISA "mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!" (88-7013-22; eBioscience Technology)
- Komplet reagentov za test ELISA "mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go!" (88-7105-22; Invitrogen)
- Komplet reagentov za določanje LDH v gojišču "Cytotoxicity Detection KitPlus" (4744934001; Roche Applied Science)

3.1.3 Pufri

Pufer za liziranje rdečih krvničk:

15,5 mM NH_4Cl

14,2 mM NaHCO_3

0,1 mM EDTA

pH = 7,3; sterilno filtriran (0,45 μm)

Lizirni pufer za analizo fosforiliranih proteinov:

20 mM Tris-HCl
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 % (v/v) NP-40
 10 % (v/v) glicerol
 1 mM natrijev ortovanedat
 10 mM NaF
 10 mM β -glicerofosfat
 mešanica peptidaznih in fosfataznih inhibitorjev v razmerju 1:100
 pH 7,4

Nanašalni pufer za NaDS PAGE (6x):

300 mM Tris
 30 mM EDTA
 60 % (v/v) glicerol
 3 % (w/v) NaDS
 0,3 % (w/v) barvilo bromfenol modro
 1,2 M DTT
 pH 6,8

Pufra za pripravo poliakrilamidnih gelov in sestava poliakrilamidnih gelov:

Koncentracijski pufer (4x):

0,5 M Tris
 pH 6,8 (umerimo s HCl)

Ločevalni pufer (8x):

3 M Tris
 pH 8,8 (umerimo s HCl)

Tabela 4: Sestava poliakrilamidnih gelov.

sestavina	12,5 % ločevalni gel	koncentracijski gel
dH ₂ O	5,52 ml	3,075 ml
40 % akrilamid	3,13 ml	625 μ l
ločevalni pufer (8x), pH = 8,8	1,25 ml	/
koncentracijski pufer (4x), pH = 6,8	/	1,25 ml
10 % NaDS	100 μ l	50 μ l
10 % APS	40 μ l	20 μ l
TEMED	20 μ l	10 μ l

Elektroforezni pufer za NaDS PAGE:

25 mM Tris
 192 mM glicin
 0,1 % (w/v) NaDS

Prenašalni pufer za prenos western:

25 mM Tris
 192 mM glicin
 20 % (v/v) metanol

Pufer TBS:

20 mM Tris
500 mM NaCl
pH 7,5 (umerimo s HCl)

Pufer TBS-Tween (TBS-T):

pufer TBS z dodanim detergentom Tween 20 v končnem deležu 0,05 % (w/v)

Blokirna raztopina posnetega mleka v prahu:

5 % (w/v) mleko v prahu
pufer TBS-T

Blokirna raztopina BSA za analizo fosforiliranih proteinov:

3 % (w/v) BSA
pufer TBS-T

Fosfatni pufer za merjenje aktivnosti katepsina L:

5,15 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
94,85 mM NaH₂PO₄
1 mM EDTA
pH 5,6 (preverimo)

Fosfatni pufer za merjenje aktivnosti katepsina B:

12,00 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
88,00 mM NaH₂PO₄
1 mM EDTA
pH 6,0 (preverimo)

Citratni pufer za merjenje aktivnosti legumaina:

50 mM citrat
150 mM NaCl
1 mM EDTA
25 μM E-64
pH 6,0 (umerimo z NaOH)

Griessov reagent:

1 % (w/v) sulfanilamid
0,1 % (w/v) NED (N-1-naftiletildiamin dihidroklorid)
5 % H₃PO₄

3.1.4 Celične linije in celične kulture

- L929 – trajna celična linija mišjih fibroblastov (ECACC)
- primarni mišji makrofagi, izolirani iz kostnega mozga miši (BMDM), z izbitim genom za cistatin C in miši divjega tipa

3.1.5 Gojišča, dodatki za gojišča in delo s celicami

- Dulbeccov pufer PBS (dPBS; angl. Dulbecco's PBS with Ca²⁺ and Mg²⁺; BioWest)
- Dulbeccov pufer PBS brez Ca²⁺ in Mg²⁺ (dPBS brez Ca²⁺ in Mg²⁺; angl. Dulbecco's PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺; Corning)

- fetusni serum goveda – toplotno obdelan (angl. fetal bovine serum – heat inactivated; Sigma-Aldrich)
- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom (Sigma-Aldrich)
- mešanica ne-esencialnih aminokislin MEM (angl. MEM Non-Essential Amino Acids Solution; Gibco)
- mešanica penicilina in streptamicina (Sigma-Aldrich)
- OptiMEM (Invitrogen)
- stabilni L-glutamin (Sigma-Aldrich)
- TrypLE Select / tripsin (Gibco)
- β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

3.1.6 Protitelesa in rekombinantni proteini

3.1.6.1 Primarna protitelesa

- mišja monoklonska proti kaspazi-1 (NB100-56565; Novus Biologicals)
- podganja monoklonska proti kaspazi-11 (ab10454; Abcam)
- mišja monoklonska proti IL-1 β (3ZD; National Cancer Institute, USA)
- kunčja poliklonska proti IL-18 (ab71495; Abcam)
- mišja monoklonska proti NLRP3 (AG-20B-0014; AdipoGen Life Sciences)
- kunčja monoklonska proti GSDM D (ab209845; Abcam)
- kunčja poliklonska proti stefinu B (ab53725; Abcam)
- kunčja monoklonska proti cistatinu C (ab109508; Abcam)
- kunčja poliklonska proti I κ B- α (9242; Cell Signalling Technology)
- kunčja poliklonska proti fosforilirani obliki p38 MAPK T180/Y182 (9211; Cell Signalling Technology)
- kunčja poliklonska proti p38 MAPK (Cat # 9212; Cell Signalling Technology)
- mišja monoklonska proti fosforilirani obliki ERK1/2 (M8159; Sigma-Aldrich)
- kunčja poliklonska proti ERK1/2 (ab17942; Abcam)
- kunčja poliklonska proti iNOS (ab3523; Abcam)
- kunčja poliklonska proti fosforilirani obliki mTOR S2448 (441125G; Invitrogen)
- kunčja poliklonska proti mTOR (2972; Cell Signalling Technology)
- kunčja monoklonska proti fosforilirani obliki kinaze p70 S6 T389 (108D2; Cell Signalling Technology)
- kunčja monoklonska proti kinazi p70 S6 (2708; Cell Signalling Technology)
- kunčja monoklonska proti fosforilirani obliki AMPK α Thr172 (2535; Cell Signalling Technology)
- mišja monoklonska proti AMPK α 1/2 (sc-74461; Santa Cruz Biotechnology)
- kunčja poliklonska proti LC3B (ab51520; Abcam)
- mišja monoklonska proti p62 (sc-48402; Santa Cruz Biotechnology)
- mišja monoklonska proti β -actinu (A1978; Sigma-Aldrich)
- kunčja monoklonska proti GAPDH (2118; Cell Signalling Technology)
- kunčja monoklonska proti legumainu (ab183028; Abcam)

3.1.6.2 Sekundarna protitelesa

- kozja antikunčja IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (111-035-045; Jackson ImmunoResearch)
- kozja antimišja IgG, IgM, konjugirana s hrenovo peroksidazo (115-035-068; Jackson ImmunoResearch)

- kozja antipodganja IgG, IgM, konjugirana s hrenovo peroksidazo (112-035-068; Jackson ImmunoResearch)

3.1.7 Laboratorijska oprema

- 1,5 ml in 2 ml mikrocentrifugirke (Sarstedt)
- 10 cm in 15 cm petrijevke (Greiner)
- 10 cm neobdelane petrijevke (VWR)
- 15 ml in 50 ml centrifugirke (Greiner)
- avtomatske pipete z volumni 0,1–2,5 μ l, 0,5–10 μ l, 2–20 μ l, 20–200 μ l in 100–1000 μ l (Eppendorf)
- bralnik mikrotitrskih plošč TECAN Infinite M1000 (Tecan)
- centrifugi 5415R in 5810R (Eppendorf)
- črne mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami (Greiner)
- digestorij (Wesemann)
- epruvete za pretočni citometer (Falcon)
- fazno kontrastni svetlobni mikroskop CX 40-RPLS (Olympus)
- filmi Biomax Light Film (Kodak)
- hladilniki in zamrzovalniki
- homogenizator Ultraturrax (IKA)
- inkubator s kontrolirano atmosfero – 37 °C in 5 % CO₂ (Binder)
- kadička za NaDS PAGE Mini PROTEAN Tetra Cell 52BR (BioRad)
- kadička za prenos western TE22 (Hofer)
- kasetna za razvijanje filmov X-omatic regular screens (Kodak)
- laminar M18 (Iskra PIO)
- ledomat AF200 (Scotsman)
- magnetno mešalo D-6011 (NeoLAB)
- naprava za NaDS PAGE in prenos western EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)
- naprava za razvijanje filmov SRX-101A (Konica Minolta)
- naprava za slikanje gelov in membran G:Box (Syngene)
- Neubauerjeva števna komora (Improved Neubauer, Blaubrand)
- nitrocelulozna membrana NC45 (Serva)
- pH meter MP220 (Mettler Toledo)
- pipetor (Brand/Eppendorf)
- posode za tekoči dušik Arpege 40/70 (Air Liquide)
- posoda T-75 za gojenje celic (TPP)
- pretočni citometer FACSCalibur (BD)
- prozorne mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami (Costar)
- prozorne mikrotitrne plošče za celične kulture s 96 vdolbinicami (TPP)
- skrinja s temperaturo -80 °C (Sanyo)
- steklovina (čaše (Simax), erlenmajerice (Schott), merilni valji, pipete, Pasteurjeve pipete ...)
- stresalnik Vibromix 314 EVT (Tehtnica)
- tehtnici PB5001-S in AB104-S (Mettler Toledo)
- termomešalnik Thermomixer compact (Eppendorf)
- ultrazvočni razbijalec W-405D (Branson)
- vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica)
- vir napetosti western Lightning Volt™ Power Supply (Thermo Scientific)

3.2 Metode

3.2.1 Miši

Miši z izbitim genom za cistatin C smo dobili od dr. Andersa Grubba z Univerze Lund, Švedska. S križanjem (več kot 10 generacij) smo ustvarili lastno kolonijo z genotipskim ozadjem FVB/N. V vseh poskusih smo uporabili 8–16 tednov stare miši divjega tipa (WT, CstC+/+) in miši z izbitim genom za cistatin C (CstC KO, CstC-/-). Vse in vivo poskuse smo izvajali le ustrezno usposobljeni raziskovalci v skladu z dovoljenji Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in zdravje rastlin (številka dovoljenja za izvajanje poskusov na živalih: U34401-49/2014/7 in U34401-8/2019/5) ter Etične komisije za poskuse na živalih. Ravnanje in izvajanje poskusov na živalih je bilo v skladu s Pravilnikom o pogojih za izvajanje postopkov na živalih, sprejetim leta 2013 in 2021.

3.2.2 Delo s celicami

3.2.2.1 Priprava gojišč in gojenje celičnih linij

Kompletno gojišče za diferenciacijo primarnih makrofagov vsebuje:

- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom
- 20 % (v/v) filtrirano gojišče mišjih fibroblastov L929
- 10 % (v/v) FBS HI
- 100 U/ml penicilina; 0,1 mg/ml streptomicina
- 2 mM stabilni L-glutamin
- 1 % (v/v) mešanica ne-esencialnih aminokislin MEM
- 50 μ M β -merkaptotanol

Kompletno gojišče za celično linijo L929 in diferencirane primarne makrofage vsebuje:

- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom
- 10 % (v/v) FBS HI
- 100 U/ml penicilina; 0,1 mg/ml streptomicina
- 2 mM stabilni L-glutamin

Gojišče za zamrzovanje celic L929 vsebuje:

- gojišče DMEM z visoko vsebnostjo glukoze in L-glutaminom
- 40 % (v/v) FBS HI
- 10 % (v/v) DMSO

Celice smo gojili v inkubatorju v nadzorovani atmosferi, nasičeni z vodno paro, pri 37 °C in 5 % CO₂. Primarne celice smo uporabljali zgolj do 2. pasaže, celično linijo pa smo gojili največ do 15. pasaže. Pri delu smo se držali postopkov dobre laboratorijske prakse in uporabljali sterilni material (centrifugirke, petrijevke, pipete, skalpele, brizge, igle, pufre in gojišča).

3.2.2.2 Priprava primarnih mišjih makrofagov iz kostnega mozga

Predhodno žrtvovani miši smo sterilno odvzeli stegenici, golenici in nadlahti ter jih sprali s 100 % EtOH in PBS. Odstranili smo mišično in vezivno tkivo ter sterilno odrezali sklep. Kostni mozeg smo spirali iz kosti z iglo in brizgo, napolnjeno z ogretim gojiščem, v 50-mililitrsko centrifugirko skozi mrežico s porami 40 μ m. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 1000 rpmi pri 4 °C. Po centrifugiranju smo odstranili gojišče, resuspendirali celice v 1 ml pufra za liziranje rdečih krvničk in inkubirali na ledu 4 min.

Dodali smo 20 ml pufra PBS in ponovno centrifugirali 5 min pri 1000 rpm pri 4 °C. Po centrifugiranju smo odstranili pufer, resuspendirali celice v kompletnem gojišču za diferenciacijo primarnih makrofagov in jih nasadili na neobdelane 10 cm petrijevke (VWR). Primarnim makrofagom smo dodali ali zamenjali polovico gojišča na 2., 4. in 6. dan po pripravi. Po sedmih dneh je potekla popolna diferenciacija.

3.2.2.3 Precepljanje celic

Primarne makrofage smo precepili po končani diferenciaciji. Celično linijo L929 smo precepili, ko so celice dosegle 80–90 % preraščenost. Najprej smo odstranili izrabljeno gojišče in celice dvakrat sprali z ogretim pufrom dPBS brez Ca^{2+} in Mg^{2+} za primarne makrofage ter z ogretim pufrom dPBS za celice L929. Dodali smo raztopino TrypLE Select in tripsinizirali celice v CO_2 inkubatorju pri 37 °C približno 10 min. Delovanje raztopine TrypLE Select smo ustavili z dodatkom gojišča, prenesli celice v centrifugirko in jih centrifugirali. Celice smo nato razdelili in nacepili na različne plošče v odvisnosti od potreb za poskus.

3.2.2.4 Odmrzovanje in zamrzovanje celic

Viale z zamrznjenimi celicami smo vzeli iz tekočega dušika oziroma zamrzovalnika s temperaturo -80 °C in jih odtalili v vodni kopeli, predhodno ogreti na 37 °C. Odtaljene celice smo prenesli v 10 ml ogretega kompletnega gojišča in jih centrifugirali 5 min pri 400 x g. Gojišče smo odsesali z vakuumsko črpalko, celice resuspendirali v 10 ml svežega kompletnega gojišča in jih prenesli na 10 cm petrijevko.

Za zamrzovanje celic smo vzeli v celoti preraščeno petrijevko/ploščo in celice najprej tripsinizirali. Celice smo prenesli v centrifugirko in jih centrifugirali 5 min pri 400 x g. Gojišče smo odsesali z vakuumsko črpalko, celice resuspendirali v gojišču za zamrzovanje celic do končne gostote 2–4 x 10^6 celic/ml in jih prenesli v kriogeno vialo (1 ml/vialo). Viale smo prenesli v zamrzovalnik s temperaturo -80 °C v posodi z izopropanolom, ki omogoča počasno ohlajanje s hitrostjo 1 °C/ minuto. Zamrznjene celice smo za krajše obdobje shranili v zamrzovalniku s temperaturo -80 °C, za daljše obdobje pa v tekočem dušiku.

3.2.2.5 Priprava filtriranega gojišča mišjih fibroblastov L929

Za pridobitev gojišča, bogatega z M-CSF, ki smo ga uporabili za diferenciacijo primarnih makrofagov, smo nasadili 5 x 10^5 celic L929 v 50 ml kompletnega gojišča v posodo T-75 (75 cm²) za gojenje celic. Celice smo pustili rasti v inkubatorju 7 dni brez menjave gojišča. Sedmi dan smo gojišče odvezli, ga centrifugirali (5 min pri 400 x g), filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm in shranili pri -80 °C do uporabe.

3.2.3 Sprožitev vnetnega odziva *in vitro*

3.2.3.1 Tretiranje celic

Primarne makrofage smo nacepili na različne plošče v odvisnosti od potreb poskusa in jih gojili preko noči. Naslednji dan smo pripravili ustrezne redčitve inhibitorjev in sprožilcev vnetja in jih dodali celicam. Celice smo najprej inkubirali z inhibitorji, kot je opisano v tabeli 5. Po končani inkubaciji celic z inhibitorji smo celicam zamenjali gojišče in dodali različne sprožilce vnetja, enega za drugim ali istočasno (v tabeli 5 označeno z *), kot je opisano v tabeli 5. V netretiranih vzorcih (kontrola) smo zamenjali staro gojišče z novim. Po končanih inkubacijah s sprožilci vnetja smo celice pripravili za želeno analizo. Zaradi prisotnosti govejega cistatina C v FBS HI smo celice tretirali v gojišču OptiMEM.

Za aktivacijo nekanoničnega inflammasoma in sprožitve piroptoze smo celice nacepili na ploščo s 96 vdolbinicami ($7,5 \times 10^4$ celic/vdolbinico) in jih gojili preko noči. Naslednji dan smo celicam dodali Pam3CSK4 za 4 h in med inkubacijo pripravili mešanico za LPS transfekcijo s transfekcijskim reagentom DOTAP za 3 vdolbinice. LPS smo raztopili v DMEM do končne koncentracije $2,5 \mu\text{g/ml}$ v $8,75 \mu\text{l}$. V enakem volumnu smo zmešali DOTAP in OptiMEM v razmerju 1:1. Po 5-minutni inkubaciji smo raztopini LPS in DOTAP združili in inkubirali 30 min. Transfekcijsko mešanico DOTAP/LPS smo dopolnili do $175 \mu\text{l}$ z OptiMEM. Celicam smo po končani inkubaciji s Pam3CSK4 odsesali gojišče z vakuumsko črpalko in dodali $50 \mu\text{l}$ OptiMEM in $50 \mu\text{l}$ mešanice DOTAP/LPS ter inkubirali 6 h. Po končani inkubaciji smo prenesli celično gojišče v novo mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami za nadaljno analizo.

Tabela 5: Končne koncentracije inhibitorjev in sprožilcev vnetja v gojiščih in časi posameznih inkubacij.

aktiviran biološki proces	sprožilci vnetja	reagent	končna koncentracija	čas inkubacije
inflammasom NLRP3	LPS + ATP	E-64d	$20 \mu\text{M}$	2 h
		LPS	100 ng/ml	4 h
		ATP	5 mM	20 min
	LPS + SiO ₂	Ca-074me	$20 \mu\text{M}$	2 h
		LPS	100 ng/ml	4 h
nekanoničen inflammasom	Pam3CSK4 + LPS	SiO ₂	$150 \mu\text{g/ml}$	6 h
		Pam3CSK4	$1 \mu\text{g/ml}$	4 h
		LPS	125 ng/ml	6 h*
		DOTAP	$12,5 \mu\text{l/ml}$	
dušikov oksid	IFN- γ + LPS	IFN- γ	100 U/ml	12 – 24 h*
		LPS	100 ng/ml	0 – 8 h
signalne poti	LPS	LPS	100 ng/ml	0 – 120 min
avtofagija	LPS	Baf	80 nM	1 h
		LPS	100 ng/ml	0 – 24 h

3.2.3.2 Priprava celotnega celičnega lizata

Celice smo nacepili na ploščo s 6 vdolbinicami (2×10^6 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot opisano v poglavju 3.2.3.1. Po končani inkubaciji smo prenesli gojišče v označene mikrocentrifugirke in jih shranili v zamrzovalniku s temperaturo $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ za nadaljnjo analizo. Celice smo sprali s hladnim pufrom dPBS in dodali $100 \mu\text{l}$ /vdolbinico hladnega lizirnega pufra. S celičnim strgalom smo mehansko ločili celice od površine plošče in vzorce zbrali v ustreznih mikrocentrifugirkah. Vzorce smo izpostavili ultrazvoku ($2 \times 10 \text{ s}$, 20 kHz) in jih centrifugirali 15 min na $16.000 \times g$ pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatante – celične lizate – smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in vzorce uporabili za analizo ali jih shranili v zamrzovalniku s temperaturo $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3.3 Določanje celotne koncentracije proteinov v celičnem lizatu

Koncentracijo proteinov v celičnem lizatu smo določali z metodo po Bradfordu. Pripravili smo umeritveno krivuljo z različnimi koncentracijami BSA (od 0 do $24 \mu\text{g/ml}$). Začetna koncentracija BSA je bila 10 mg/ml , vmesna koncentracija pa $100 \mu\text{g/ml}$. Ustrezne redčitve BSA (prikazane v tabeli 6) smo dodali k $40 \mu\text{l}$ reagenta Bradford v mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami in izmerili absorbanci pri valovni dolžini 595 nm . Celične lizate smo redčili z

dH₂O v razmerju 1:200–1:1000 in 160 μ L redčenega vzorca dodali k 40 μ L reagenta Bradford ter izmerili absorbanco. Celokupno koncentracijo proteinov v vzorcu smo nato izračunali iz umeritvene krivulje.

Tabela 6: Volumni BSA in vode, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje.

končna koncentracija BSA (μ g/ml)	volumen BSA s koncentracijo 100 μ g/ml (μ L)	volumen dH ₂ O (μ L)	volumen reagenta Bradford (μ L)
0	0	160	40
2	4	156	40
4	8	152	40
6	12	148	40
8	16	144	40
10	20	140	40
12	24	136	40
14	28	132	40
16	32	128	40
20	40	120	40
24	48	112	40

3.2.3.4 Precipitacija proteinov v celičnem gojišču

Vzorci celičnega gojišča smo odmrznili na ledu, dodali TCA do končne koncentracije 10 % (v/v) ter inkubirali čez noč pri 4 °C. Vzorce smo centrifugirali 10 min pri 18.000 x g pri 4 °C in previdno odstranili supernatante. Oborino smo sprali s 300 μ L mešanice etanol:eter (v razmerju 1:1) in dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Postopek centrifugiranja in spiranja smo ponovili še dvakrat – vzorce smo skupaj trikrat sprali. Po zadnjem spiranju smo ponovno centrifugirali 10 min pri 18.000 x g pri 4 °C in previdno odstranili ves supernatant. Vzorce smo nato pri sobni temperaturi posušili, da smo odstranili preostalo mešanico etanol:eter. Vzorcem smo dodali 1x nanašalni pufer za NaDS PAGE in vzorce segrevali 5 min pri 95 °C.

3.2.3.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS pod redukcijskimi pogoji (z dodanim DTT v vzorcih) smo uporabili za ločevanje proteinov iz pripravljenih lizatov glede na njihovo velikost. Uporabili smo 12,5 % ločevalni gel in 4 % koncentracijski gel (sestava navedena v tabeli 4). Vzorcem celičnega lizata (20–50 μ g proteinov) smo dodali 6-kratni nanašalni pufer za NaDS PAGE, jih segrevali 5 min pri 95 °C in nanesli na gel. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru pri konstantnem električnem toku 30 mA/gel. Za določanje velikosti proteinov v vzorcih smo nanesli proteinske standarde PAGE Ruler.

3.2.3.6 Imunodetekcija proteinov s prenosom western

Po končani elektroforezi smo proteine prenesli na nitrocelulozno membrano z metodo prenosa western. Prenos je potekal 3 h pri konstantnem električnem toku 250 mA v prenašalnem pufru z metanolom. Po končanem prenosu smo membrano sprali s pufrom TBS-T, nato smo prosta vezavna mesta na membrani blokirali s 60-minutno inkubacijo v blokirni raztopini (5 % posneto mleko v prahu v pufru TBS-T oziroma 3 % BSA v pufru

TBS-T za analizo fosforiliranih proteinov) pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem. Membrano smo ponovno sprali s pufrom TBS-T in jo nato inkubirali s primarnimi protitelesi preko noči pri 4 °C z rahlim mešanjem. Membrano smo nato spirali 4-krat po 15 min v svežem pufru TBS-T pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem. Nato smo membrano inkubirali 1 h s sekundarnimi protitelesi, ki so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo, pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem. Ponovno smo nevezana protitelesa sprali 4-krat po 15 min s pufrom TBS-T. Za detekcijo proteinov smo uporabili detekcijo na podlagi kemiluminiscence s sistemom ECL v skladu z navodili proizvajalca. Iskane proteine smo določili na fotografskem filmu ali z napravo za slikanje gelov in membrane G:Box. Nivo β -aktina ali GAPDH je služil za kontrolo enakega nanosa vzorcev. Rastopine primarnih in sekundarnih protiteles so bile pripravljene v 3 % BSA v pufru TBS-T oziroma po navodilih proizvajalcev.

3.2.3.7 Merjenje citotoksičnosti na osnovi sproščanja encima laktat-dehidrogenaze

Encim laktat-dehidrogenaza (LDH) katalizira pretvorbo piruvata v laktat in je prisoten v celičnem citosolu. V primeru poškodb celic oziroma poškodbe plazmaleme se LDH sprosti v gojišče in tako predstavlja biomarker za spremljanje citolize oziroma celične smrti in citotoksičnosti določenih snovi. Sproščanje citosolnega encima LDH smo določali s pomočjo kompleta reagentov po navodilih proizvajalca. Za določanje celične smrti oziroma citotoksičnosti smo nacepili celice na ploščo s 96 vdolbinicami (1×10^5 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Po končanih inkubacijah smo prenesli gojišče v novo mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami in dodali mešanico reagentov, inkubirali pri sobni temperaturi in zaščiteno pred svetlobo 15–30 min ter pomerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm, z referenčno valovno dolžino 600 nm.

3.2.3.8 Merjenje koncentracije citokinov v celičnem gojišču z encimsko-immunskim testom ELISA

Za merjenje koncentracije citokinov v celičnem gojišču smo nacepili celice na plošče s 96 vdolbinicami (1×10^5 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Po končanih inkubacijah smo gojišče prenesli v novo mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. Za merjenje citokinov IL-1 β in IL-10 v gojišču in mišjem serumu smo uporabili komplete reagentov za test ELISA ter jih izvedli po navodilih proizvajalcev. Na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo preko noči pri 4 °C vezali prva protitelesa in prosta vezavna mesta blokirali. Nato smo na ploščo nanесли ustrezno redčene vzorce in pripravljeno umeritveno krivuljo ter inkubirali preko noči pri 4 °C. Nevezane vzorce smo sprali s pufrom iz kompleta in dodali druga protitelesa, ki so bila biotinizirana. Nevezana protitelesa smo sprali in dodali hrenovo peroksidazo, konjugirano s streptavidinom, ki se veže na biotinizirana protitelesa. Nevezan encim smo ponovno sprali in dodali kromogen substrat, iz katerega je ob prisotnosti hrenove peroksidaze nastal obarvan produkt. Izmerili smo absorbanco na spektrofotometru pri valovni dolžini 450 nm. Koncentracijo IL-1 β in IL-10 v vzorcih smo določili iz umeritvenih krivulj.

3.2.3.9 Posredno dokazovanje dušikovega oksida (NO) z merjenjem nitrita in nitrata v celičnem gojišču z reakcijo po Griessu

Nastajanje NO v celičnem gojišču lahko posredno dokažemo z merjenjem količine nitrita in nitrata z reakcijo po Griessu. Nitrit in nitrat v kisli raztopini reagirata s sulfanilno kislino ali sulfanilamidom, nastali vmesni produkt nadalje reagira z alfa-naftilaminom in nastane obarvan produkt. Za določanje koncentracije NO oziroma nitrita in nitrata smo nacepili celice na ploščo s 96 vdolbinicami (1×10^5 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano

v poglavju 3.2.3.1. Po končanih inkubacijah smo gojišče prenesli v novo mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. Pripravili smo svež Griessov reagent in umeritveno krivuljo iz NaNO_2 (0–500 μM). V novo mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo prenesli 50 μl celičnega gojišča in dodali 50 μl Griessovega reagenta ter inkubirali 15 min pri sobni temperaturi. Absorbanco smo izmerili na spektrofotometru pri valovni dolžini 545 nm. Koncentracije NO v vzorcih smo določili iz umeritvene krivulje.

3.2.4 Merjenje aktivnosti cisteinskih peptidaz

Aktivnost cisteinskih katepsinov in legumaina smo določali z uporabo sintetičnih fluorogenih substratov Z-Phe-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-AMC in Z-Ala-Ala-Asn-AMC. Vzbujevalna valovna dolžina svetlobe za substrat je 370 nm, emisijska valovna dolžina svetlobe pa 460 nm. Sprememba fluorescence v časovni enoti (naklon) je sorazmerna encimski aktivnosti.

3.2.4.1 Merjenje aktivnosti cisteinskih peptidaz v popolnih in citosolnih lizatih

Za določanje aktivnosti katepsinov v celotnih in citosolnih celičnih lizatih smo celice nacepili na plošče s 24 vdolbinicami (2×10^5 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Po končanih inkubacijah smo odsesali gojišče z vakuumsko črpalko in celice sprali s pufrom dPBS. Nato smo dodali 200 μl /vdolbinico fosfatnega pufra (za cisteinske katepsine) oziroma citratnega pufra (za legumain) za merjenje aktivnosti z dodatnim detergentom digitonin ter inkubirali na ledu 15 min. Za pripravo celotnih lizatov smo uporabili visoko koncentracijo digitonina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ki poškoduje vse celične membrane; za pripravo citosolnih lizatov pa nizko koncentracijo digitonina (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ki poškoduje le plazmalemo. Po končani inkubaciji na ledu smo prenesli 180 μl /vdolbinico v mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. V črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo dodali 60 μl ustreznega pufra za merjenje aktivnosti z dodanim DTT v končni koncentraciji 2,5 mM (za cisteinske katepsine) oziroma 1 mM (za legumain) in dodali 30 μl pripravljenega celičnega lizata. Vzorce s pufrom smo inkubirali 10 min pri 37 °C. Zatem smo dodali 10 μl izbranega substrata, tako da je bila končna koncentracija substrata 50 μM (za cisteinske katepsine) oziroma 30 μM (za legumain), in takoj pričeli z merjenjem fluorescence s fluorimetrom za mikrotitrsko ploščo. Vzbujevalna valovna dolžina svetlobe za substrat je 370 nm, emisijska valovna dolžina svetlobe pa 460 nm. Sprememba fluorescence v časovni enoti (naklon) je sorazmerna encimski aktivnosti. Iz pripravljenih celičnih lizatov smo izmerili koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu in dobljeno encimsko aktivnost normalizirali na koncentracijo proteinov v celičnem lizatu.

3.2.4.2 Merjenje aktivnosti cisteinskih katepsinov v celičnem gojišču

Za določanje aktivnosti katepsinov v celotnih in citosolnih celičnih lizatih smo celice nacepili na plošče z 12 vdolbinicami (2×10^6 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Po končanih inkubacijah smo prenesli gojišče v mikrocentrifugirke na ledu. V črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo dodali 40 μl fosfatnega pufra za merjenje aktivnosti katepsinov z dodanim DTT v končni koncentraciji 2,5 mM in dodali 50 μl vzorca gojišča. Vzorce s pufrom smo inkubirali 10 min pri 37 °C. Zatem smo dodali 10 μl izbranega substrata, tako da je bila končna koncentracija substrata 50 μM , in takoj pričeli z merjenjem fluorescence s čitalcem mikrotitrskih plošč.

3.2.5 Pretočna citometrija

3.2.5.1 Določitev integritete lizosomske membrane

Integriteto lizosomske membrane smo spremljali z uporabo probe LysoTracker Green DND-26, ki se selektivno kopiči v celičnih organelih z nizkim pH. Probe LysoTracker so fluorescentne probe za označevanje in spremljanje kislih organelov v živih celicah. Celice smo nacepili na plošče z 12 vdolbinicami (4×10^5 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Po koncu inkubacij smo celice sprali s pufrom dPBS in jim dodali sveže ogreto gojišče DMEM probe LysoTracker Green 50 s končno koncentracijo nM. Celice smo inkubirali 15 min v CO₂ inkubatorju pri 37 °C. Po inkubaciji smo celice sprali, tripsinizirali, centrifugirali 5 min pri 1000 rpmi in nato celični pelet resuspendirali v 300 µl pufra dPBS. Na pretočnem citometru smo pomerili emisijsko fluorescenco pri valovni dolžini 511 nm.

3.2.5.2 Določitev membranskega potenciala mitohondrijev

Za označitev mitohondrijev in določitev membranskega potenciala mitohondrijev smo uporabili probi MitoTracker Green in MitoTracker Red CMX-ROS, ki pasivno difundirata preko plazemske membrane v mitohondrije. Proba MitoTracker Red CMX-ROS se kopiči v metabolno aktivnih mitohondrijih v odvisnosti od membranskega potenciala mitohondrijev, medtem ko proba MitoTracker Green ni odvisna od membranskega potenciala mitohondrijev. Z označevanjem mitohondrijev z obema probama lahko ločimo celice s poškodovanimi in nedelujočimi mitohondriji od normalnih, saj imajo le-te nižji membranski potencial glede na količino mitohondrijev v celicah.

Celice smo nacepili na plošče z 12 vdolbinicami (4×10^5 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Po koncu inkubacij smo celice sprali s pufrom dPBS in jim dodali sveže ogreto gojišče DMEM s probama MitoTracker v končni koncentraciji 50 nM za vsako posamezno probo. Celice smo inkubirali 30 min v CO₂ inkubatorju pri 37 °C. Po inkubaciji smo celice sprali, tripsinizirali, centrifugirali 5 min pri 1000 rpmi in nato celični pelet resuspendirali v 300 µl pufra dPBS. Na pretočnem citometru smo pomerili emisijsko fluorescenco pri valovni dolžini 516 nm in 599 nm.

3.2.5.3 Določitev mitohondrijskega superoksida

Mitohondrijski superoksid nastaja kot stranski produkt oksidativne fosforilacije in predstavlja poglavitni del reaktivnih kisikovih zvrsti v mitohondrijih. Nastanek superoksidnih anionov v mitohondrijih smo merili z indikatorjem MitoSOX Red, ki selektivno prehaja v mitohondrije živih celic. Superoksidni anioni oksidirajo probo MitoSOX Red v mitohondrijih, nastali produkt se veže na nukleinske kisline in oddaja močno fluorescenco. Z označevanjem mitohondrijev s probama MitoTracker Green in MitoSOX Red lahko ločimo celice z mitohondriji, kjer nastaja veliko superoksidnih anionov v mitohondrijih, od tistih z manj superoksidnih anionov.

Celice smo nacepili na plošče z 12 vdolbinicami (4×10^5 celic/vdolbinico) in jih tretirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Po koncu inkubacij smo celice sprali s pufrom dPBS in jim dodali sveže ogreto gojišče DMEM s probama MitoSOX Red v končni koncentraciji 5 µM in MitoTracker Green v končni koncentraciji 50 nM. Celice smo inkubirali 30 min v CO₂ inkubatorju pri 37 °C. Po inkubaciji smo celice sprali, tripsinizirali, centrifugirali 5 min pri 1000 rpmi in nato celični pelet resuspendirali v 300 µl pufra dPBS. Na pretočnem citometru smo pomerili emisijsko fluorescenco pri valovni dolžini 516 nm in 590 nm.

3.2.6 Sprožitev vnetnega odziva *in vivo*

Miši divjega tipa (WT) in z izbitim genom za cistatin C (CstC KO), stare od 8 do 12 tednov, smo intraperitonealno nacepili z LPS v koncentraciji 30 mg/kg telesne mase miši za spremljanje viabilnosti. Za določanje vnetnih citokinov smo miši intraperitonealno nacepili z LPS v koncentraciji 5 mg/kg telesne mase miši za 4 h in 24 h. Za negativno kontrolo smo miši intraperitonealno nacepili z dPBS v koncentraciji 5 ml/kg telesne mase miši za 24 h. Po končani inkubaciji smo miši žrtvovali, retroorbitalno odvzeli kri, odvzeli smo notranje organe (vranico, jetra, ledvico, pljuča in možgane) ter jih zamrznili v tekočem dušiku in shranili v zamrzovalniku s temperaturo -80 °C.

3.2.6.1 Priprava mišjega seruma

Vzorci krvi smo takoj po odvzetju centrifugirali 10 minut pri 2000 rpm v ohlajeni centrifugi in nato previdno prenesli supernatant (serum) v novo epico in ga shranili v zamrzovalniku s temperaturo -80 °C.

3.2.6.2 Priprava tkivnih lizatov

Zamrznjene organe (vranice) smo odmrznili na ledu in dodali 300 µl lizirnega pufra za analizo fosforiliranih proteinov. Tkivne lizate smo pripravili s homogeniziranjem (10 s) in jih dodatno izpostavili ultrazvoku (2x 10 s, 20 kHz) ter jih centrifugirali 15 min na 16.000 x g pri 4 °C. Tkivnim lizatim smo izmerili koncentracijo proteinov z metodo Bradford in jih analizirali z imunodetekcijo s prenosom western po NaDS PAGE.

3.2.6.3 Spremljanje viabilnosti miši

Miši smo injicirali z visoko koncentracijo LPS (30 mg/kg) in spremljali stanje miši šestkrat na dan v obdobju štirih dni.

3.2.7 Statistična analiza

Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost treh neodvisnih poskusov \pm SD. Statistično značilnost smo določili z uporabo Studentovega t-testa z dvodelno porazdelitvijo z uporabo programa GraphPad Prism. Rezultati imunodetekcije po prenosu western so reprezentativni od vsaj treh neodvisnih poskusov. Rezultati pretočne citometrije so bili analizirani s programom FlowJo. Krivulje preživetja smo določili z metodo po Kaplan-Meier in s testom log-rank določili statistično značilne razlike. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

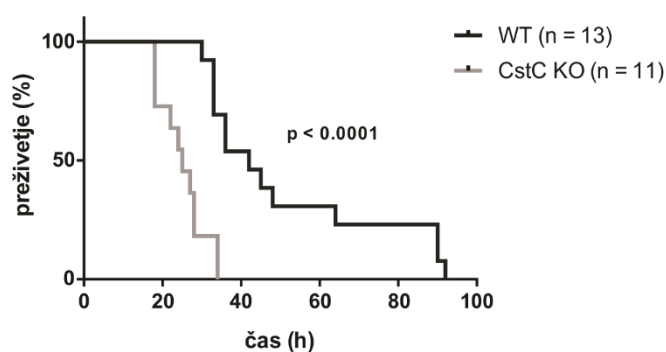
Poglavje 4

Rezultati

4.1 Imunski odgovor na bakterijski endotoksin *in vivo*

4.1.1 Vpliv cistatina C na septični šok, sprožen z endotoksinom

Prisotnost endotoksina oziroma lipopolisaharida (LPS) v gostitelju nakazuje na okužbo s po Gramu negativnimi bakterijami in posledično sproži vnetni odziv, ki lahko vodi v septični šok in je gostitelju škodljiv [213]. Vnos LPS v poskusno žival je uporaben model za študij vnetnega odziva in septičnega šoka. Miši z izbitim genom za cistatin C in miši divjega tipa smo intraperitonealno injicirali z visoko koncentracijo LPS (30 mg/kg) in vsake štiri ure v času 96 ur spremljali stanje miši (Slika 12). Vse miši z izbitim genom za cistatin C so poginile v času 34 h po injiciranju z LPS, medtem ko je v tem času poginilo 30,7 % miši divjega tipa, med katerimi so nekatere preživele tudi do 92 h po injiciranju z LPS (Slika 12).

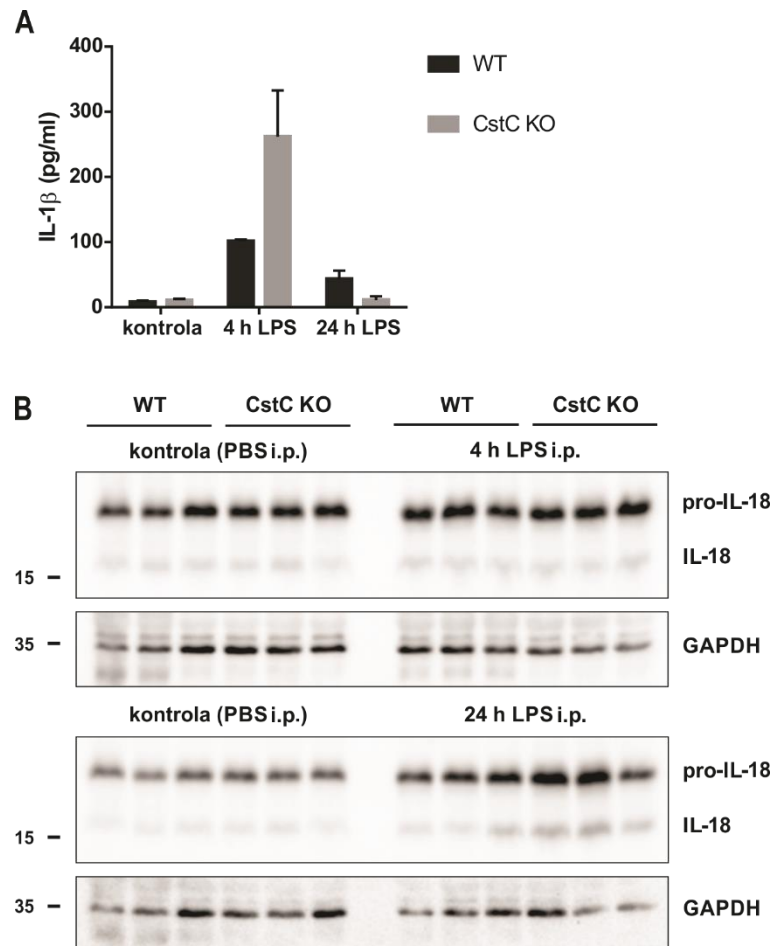


Slika 12: Miši z izbitim genom za cistatin C so bolj občutljivi na septični šok. Miši divjega tipa in miši z izbitim genom za cistatin C smo intraperitonealno injicirali z visoko koncentracijo LPS in spremljali preživetje. Graf Kaplan-Meier prikazuje odstotek preživetja miši v odvisnosti od časa po injiciranju LPS.

4.1.2 Vpliv cistatina C na sintezo vnetnih citokinov

Miši z izbitim genom za cistatin C in miši divjega tipa smo intraperitonealno injicirali z nizko koncentracijo LPS (5 mg/kg). Po 4 h in 24 h smo živali žrtvovali, vzeli vranice in vzorec krvi, iz katerega smo pripravili serum. V serumih miši z izbitim genom za cistatin C smo 4 h po injiciranju LPS zaznali višjo koncentracijo vnetnega citokina IL-1 β (Slika 13). V lizatih vranic miši z izbitim genom za cistatin C smo 24 h po injiciranju LPS zaznali večjo količino procesiranega vnetnega citokina IL-18 (Slika 13). Oba citokina, IL-1 β in

IL-18, cepi na inflammasomu aktivirana kaspaza-1. V nadaljevanju smo na primarnih mišjih makrofagih, izoliranih iz kostnega mozga, preučevali različne mehanizme, ki regulirajo aktivacijo inflammasoma in vnetni odziv, da bi odkrili mehanizme, pri katerih je vpleten cistatin C.

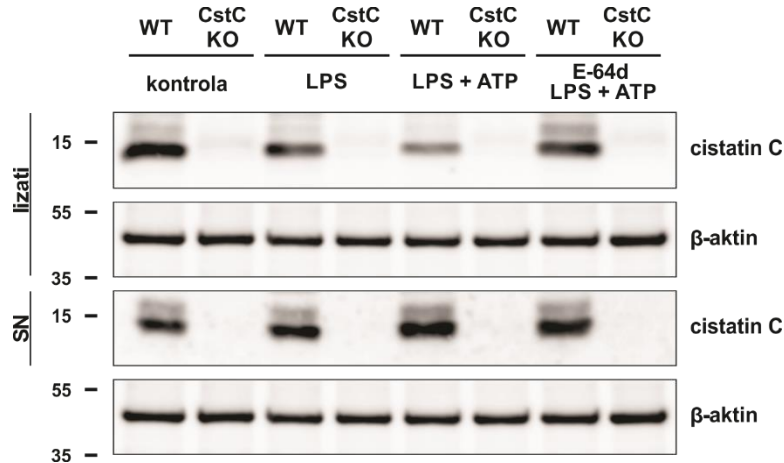


Slika 13: Prisotnost vnetnih citokinov *in vivo* po injiciranju LPS. A) Koncentracija vnetnega citokina IL-1 β v serumu miši 4 h in 24 h po injiciranju LPS, določena s testom ELISA. B) Količina vnetnega citokina IL-18 v lizatu vranic miši 4 h in 24 h po injiciranju LPS, določena z imunodetekcijo.

4.2 Vloga cistatina C pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 v primarnih mišjih makrofagih

4.2.1 Izražanje in sproščanje cistatina C iz aktiviranih makrofagov

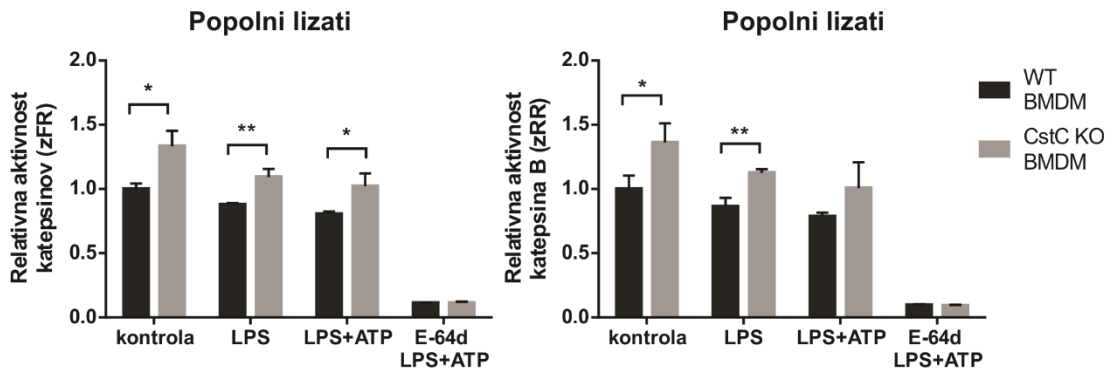
Cistatin C je pretežno zunajcelični protein, ki ga celice konstitutivno izločajo [205], vendar ga lahko tudi privzamejo [196], [198]. Primarne mišje makrofage smo stimulirali z LPS in ATP ter preverili prisotnost cistatina C v celičnih lizatih in celičnem gojišču. Opazili smo povečano izločanje cistatina C ob stimulaciji z LPS in LPS/ATP v celično gojišče.



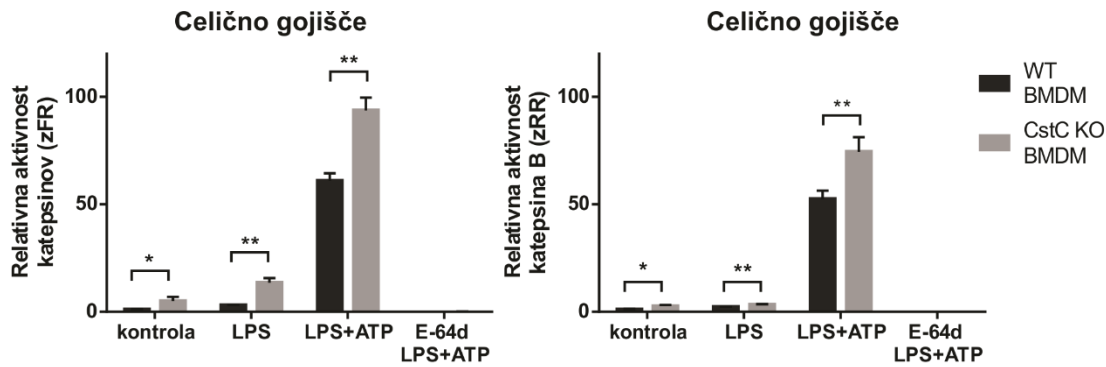
Slika 14: Povečano izločanje cistatina C v aktiviranih primarnih makrofagih. Primarne miške makrofage smo stimulirali 4 h z LPS in 20 min z ATP. Po koncu inkubacij smo oborili proteine v celičnem gojišču in pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

4.2.2 Aktivnost cisteinskih peptidaz v aktiviranih makrofagih

Zanimalo nas je, ali odsotnost cistatina C vpliva na aktivnost cisteinskih peptidaz ob aktivaciji primarnih makrofagov. V skladu s hipotezo in zunajcelično lokalizacijo cistatina C (Slika 14) smo opazili povešano aktivnost cisteinskih katepsinov v celotnih celičnih lizatih (Slika 15) in celičnem gojišču primarnih makrofagov z izbitim genom za cistatin C (Slika 16).

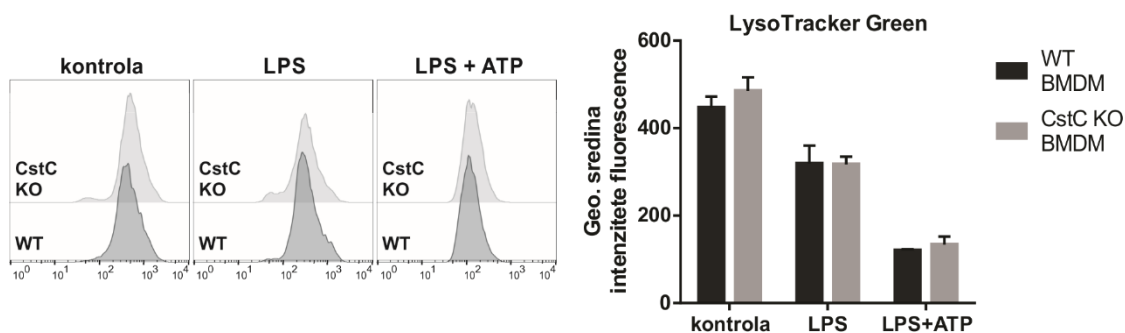


Slika 15: Povečana aktivnost cisteinskih katepsinov v celotnih celičnih lizatih aktiviranih makrofagov z izbitim genom za cistatin C. Primarne celične lizate smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celične lizate in določili aktivnost katepsinov z uporabo fluorogenih substratov.



Slika 16: Povečana aktivnost cisteinskih katepsinov v celičnem gojišču aktiviranih makrofagov z izbitim genom za cistatin C. Primarne celične lizate smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo prenesli celično gojišče in določili aktivnost katepsinov z uporabo fluorogenih substratov.

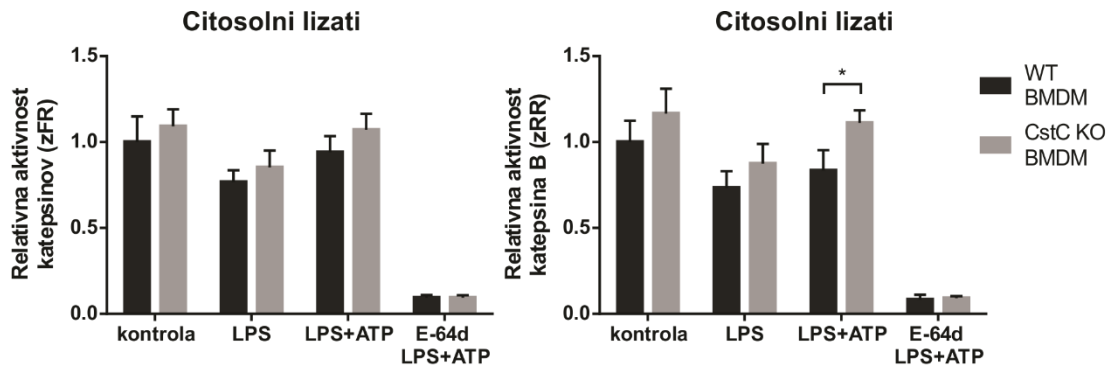
Številne raziskave so poročale, da fagocitoza bakterij in drugih tujih snovi (kremenovi kristali, kristali sečne kisline, kristali holesterola, β -amiloidi ...) vodi do poškodb lizosomov in sprostitev lizosomskih katepsinov, kar sproži aktivacijo inflammasoma NLRP3 [56], [72], [73]. Dodatno so pokazali, da poškodbe lizosomov, povzročene s hipertoničnim okoljem ali Leu-Leu-OMe, zadostujejo za aktivacijo inflammasoma NLRP3 brez dodatnih znanih aktivatorjev inflammasoma [56], [214]. Vlogo katepsina B pri aktivaciji inflammasoma so različne raziskave pokazale z uporabo inhibitorjev (Ca-074me) ali genetsko manipulacijo (siRNA, shRNA in izbijanje genov) [215]. Zanimalo nas je, ali aktivacija inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP v primarnih makrofagih povzroči poškodbe lizosomov ter če odsotnost cistatina C vpliva na obseg teh poškodb. Ob aktivaciji inflammasoma z LPS/ATP smo pri obeh genotipih opazili poškodbe lizosomov, vendar prisotnost cistatina C ne vpliva na delež celic s poškodovanimi lizosomi, saj med genotipoma ni statistično značilnih razlik (Slika 17).



Slika 17: Poškodbe lizosomov po aktivaciji inflammasoma v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo po koncu stimulacije barvali s fluorescentnim barvilom LysoTracker Green in analizirali celice s pretočno citometrijo. Rezultati so predstavljeni kot značilni histogrami treh neodvisnih poskusov in kot povprečna geometrična sredina intenzitete fluorescence treh neodvisnih poskusov \pm SD.

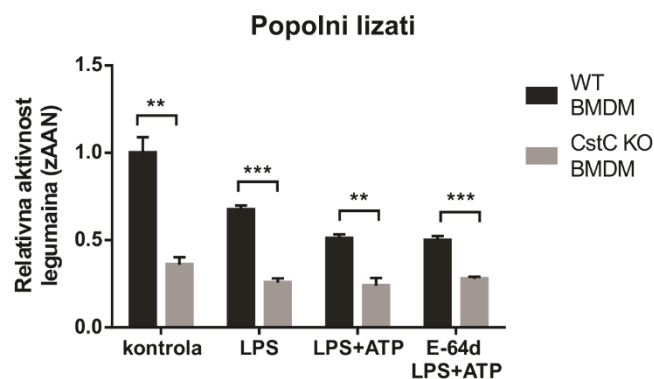
Da bi določili količino lizosomskih katepsinov, ki so se zaradi poškodb lizosomov sprostili v citosol, smo izmerili aktivnost katepsinov v citosolu po aktivaciji inflammasoma. V nasprotju s poškodbami lizosomov nismo opazili povišane aktivnosti katepsinov v citosolu po aktivaciji inflammasoma (Slika 18). V skladu s hipotezo med genotipoma nismo

opazili statistično značilnih razlik, razen pri aktivnosti katepsina B po stimulaciji LPS/ATP, kjer je bila razlika majhna, vendar statistično značilna.



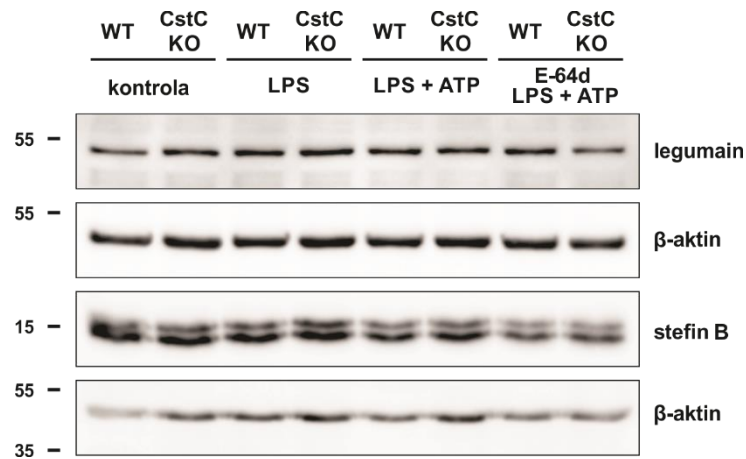
Slika 18: Aktivnost katepsinov v citosolu po aktivaciji inflamasma NLRP3 v primarnih makrofagih. Primarne celične lizate smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili citosolne lizate z nizko koncentracijo digitonina in določili aktivnost katepsinov z uporabo fluorogenih substratov.

Poleg cisteinskih katepsinov imajo vlogo pri imunskem sistemu tudi druge cisteinske peptidaze (npr. kaspaze). Legumain je cisteinska endopeptidaza, ki se nahaja pretežno v endo-lizosomskem sistemu v sesalskih celicah [181]. Legumain ima pomembno vlogo v imunskem sistemu in je vpleten v proteolitično aktivacijo TLR receptorjev in drugih cisteinskih peptidaz, s čimer modulira signalne poti pri imunskem odgovoru [184], [185]. Cistatin C se veže v aktivno mesto legumaina in s tem inhibira njegovo aktivnost. Kompleks legumain-cistatin C nastane pri rahlo kislem pH (5,5–6,5) in pri kislem pH (4,0) razpade. Cistatin C v poznih endosomih in zunajceličnem prostoru pripomore k stabilizaciji legumaina pri nevtralnem in rahlo kislem pH in ob internalizaciji kompleksa sprosti aktivno obliko legumaina v endo-lizosomskem sistemu z nižjim pH [181]. Zanimalo nas je, ali aktivacija inflamasma NLRP3 vpliva na aktivnost legumaina ob odsotnosti cistatina C. V nasprotju s pričakovanim je bila aktivnost legumaina v celotnih lizatih v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C statistično značilno nižja (Slika 19). E-64d ne inhibira aktivnosti legumaina, zato je le-ta primerljiva z ostalimi stimulacijami.



Slika 19: Zmanjšana aktivnost legumaina v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C. Primarne celične lizate smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne lizate in določili aktivnost legumaina z uporabo fluorogenega substrata.

Višja aktivnost legumaina v prisotnosti inhibitorja cistatina C je lahko posledica večje količine encima, zato smo preverili količino legumaina v celotnih lizatih ob aktivaciji inflammasoma. Prav tako smo preverili količino inhibitorja stefina B, ki inhibira druge katepsine znotraj celice. Nivo legumaina in stefina B je bil primerljiv med obema genotipoma (Slika 20).



Slika 20: Nivo legumaina in stefina B v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

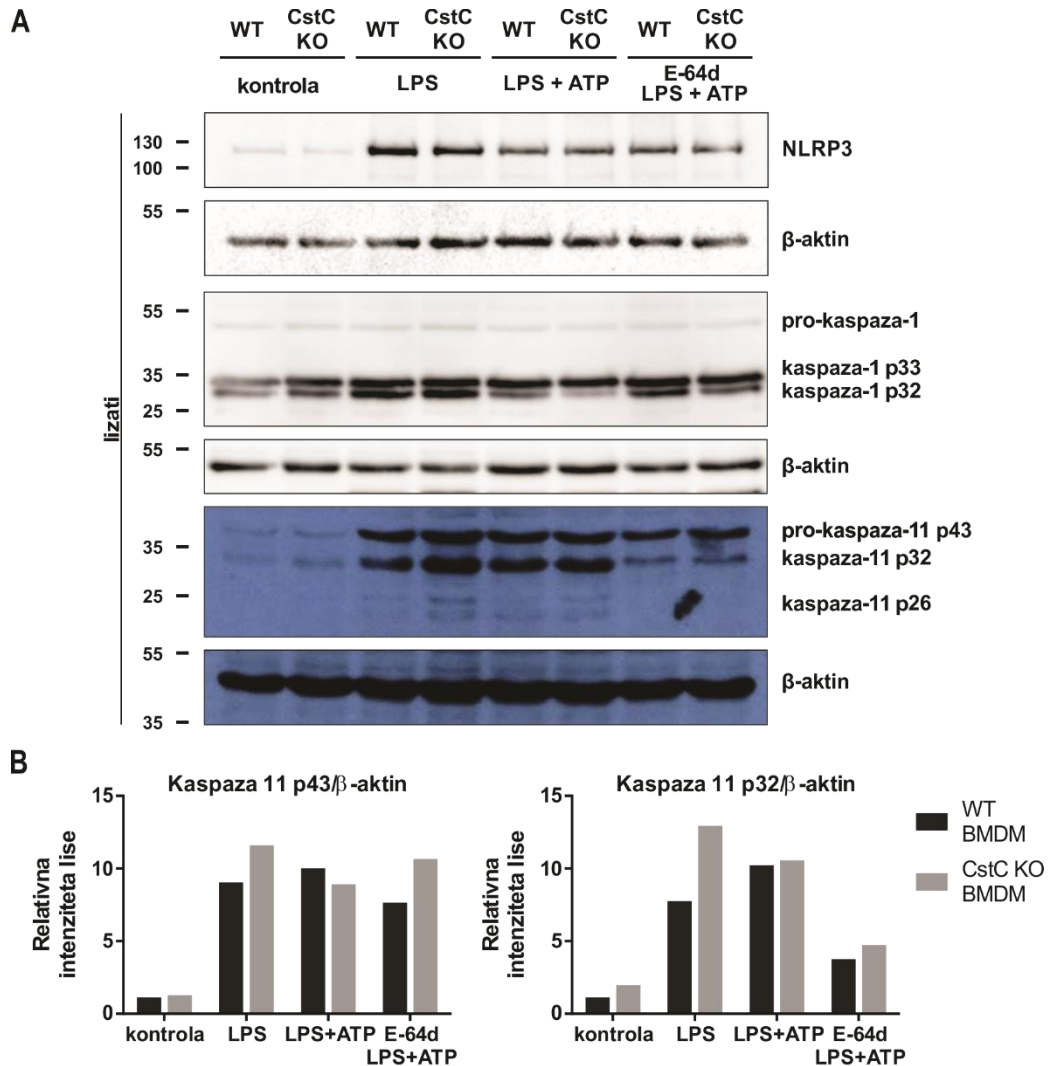
4.2.3 Aktivacija inflammasoma NLRP3 je neodvisna od aktivnosti cisteinskih katepsinov

Primarni makrofagi z izbitim genom za cistatin C imajo povišano aktivnost cisteinskih katepsinov v celotnih celičnih lizatih in celičnem gojišču. Predpostavili smo, da povišana aktivnost katepsinov vodi do večje aktivacije NLRP3 inflammasoma. Da bi ovrgli ali potrdili hipotezo, smo primarne makrofage pred aktivacijo inflammasoma NLRP3 inkubirali z inhibitorjem katepsinov E-64d ali inhibitorjem katepsina B Ca-074me.

4.2.3.1 Aktivacija inflammasoma NLRP3 z aktivatorjem ATP

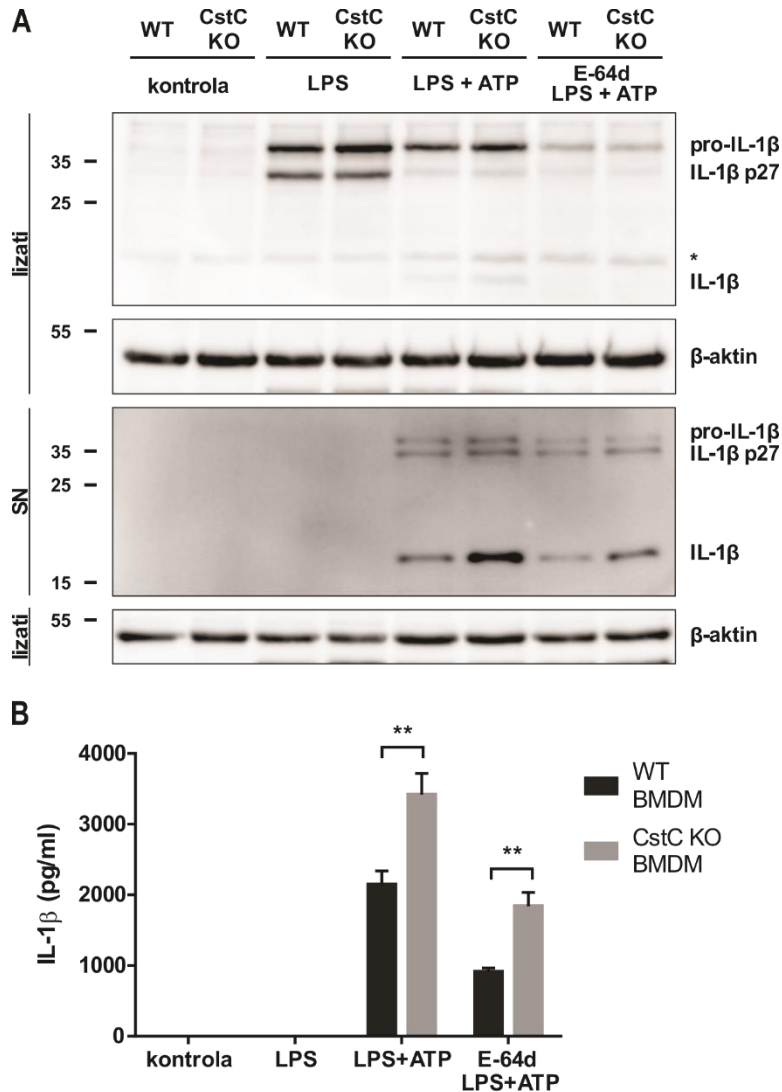
Prvo stopnjo aktivacije inflammasoma NLRP3 predstavlja stimulacija primarnih makrofagov z LPS, ki povzroči izražanje genov za NLRP3, pro-kaspaze-11 in citokina IL-1 β , medtem ko se pro-kaspaza-1 in IL-18 izražata konstitutivno (Slika 21 in Slika 22). Ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP na nastalem kompleksu inflammasoma se avto-aktivira kaspaza-1. Pro-kaspaza-1 (p46) se avto-procesira do vmesnih produktov p33/p10 ali p32 [109]. Nadaljnje procesiranje vmesnih produktov vodi do nastanka fragmenta p10, ki je aktivna oblika kaspaze-1. Fragmenta p10 z imunodetekcijo po prenosu western nismo zaznali, vendar smo zaznali zmanjšano količino fragmenta p32 po stimulaciji LPS/ATP, ki se je lahko procesiral v fragment p10 (Slika 21). Fragment p32 se je v večji meri procesiral pri stimulaciji LPS/ATP v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C, kar nakazuje na povečano aktivacijo inflammasoma NLRP3. V nasprotju z našo hipotezo inhibicija cisteinskih katepsinov ni vplivala na avto-aktivacijo kaspaze-1.

Kaspaza-11 se avto-aktivira ob vezavi citosolnega LPS, pri čemer nastane aktivna oblika p32/p10 oziroma oblika p26/p10. Opazili smo povečano aktivacijo kaspaze-11 (p32 in p26) pri stimulaciji LPS v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C. Ob inhibiciji cisteinskih katepsinov smo zaznali zmanjšano količino kaspaze-11 (Slika 21), vendar kaspaza-11 ne sodeluje pri klasični aktivaciji inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP.



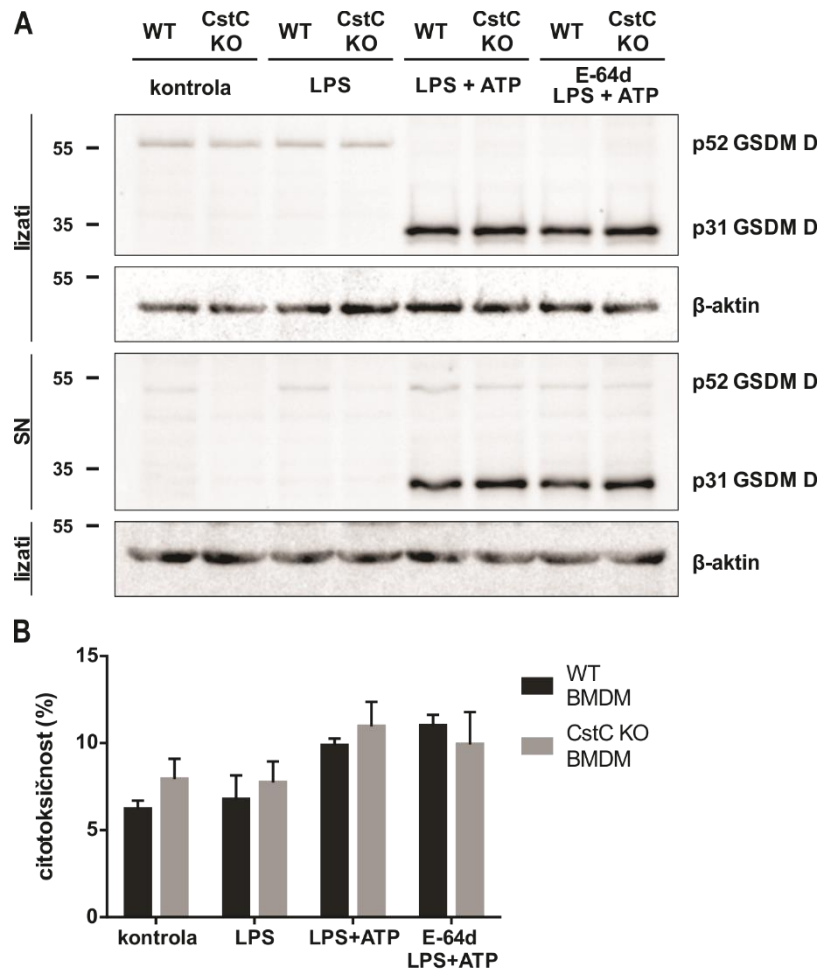
Slika 21: Aktivacija vnetnih kaspaz-1 in -11 v primarnih makrofagih pri stimulaciji LPS/ATP. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. A) Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western. B) Intenziteto lis smo kvantificirali s programom ImageJ in normalizirali glede na intenziteto lis β -aktina.

Aktivirana kaspaza-1 procesira in aktivira provnetna citokina IL-1 β in IL-18, zato smo preverili procesiranje in sproščanje teh citokinov. V celičnem gojišču primarnih makrofagov z izbitim genom za cistatin C smo opazili povečano količino sproščenega IL-1 β po aktivaciji inflamiasoma NLRP3 neodvisno od aktivnosti cisteinskih katapsinov (Slika 22). Inhibicija cisteinskih katapsinov je zmanjšala količino sproščenega IL-1 β pri obeh genotipih. Encimski test ELISA lahko zazna pro- in aktivno obliko IL-1 β , zato smo z imunodetekcijo po prenosu western preverili, da v celičnem gojišču po aktivaciji inflamiasoma NLRP3 prevladuje aktivna oblika IL-1 β (Slika 22). Opazili smo tudi povečano izražanje pro-oblike IL-18 po stimulaciji LPS v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C.



Slika 22: Povečano procesiranje in izločanje prvotnih citokinov IL-1 β in IL-18 v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. A) Po končanih stimulacijah smo izmerili koncentracijo IL-1 β v celičnem gojišču s testom ELISA. B) Po končanih stimulacijah smo oborili proteine v celičnem gojišču (SN), pripravili celotne celične lizate (lizati) ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

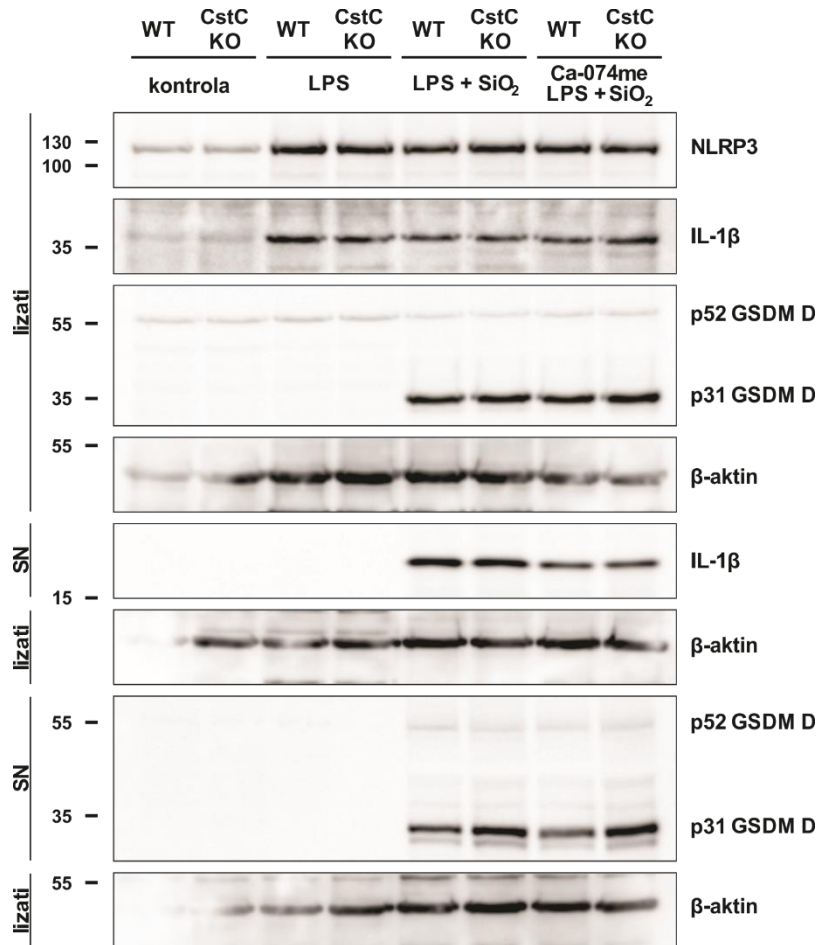
Aktivirani kaspazi-1 in -11 cepita tudi GSDM D, ki je ključen protein v piroptozni, vnetni obliki celične smrti. Z imunodetekcijo po prenosu western smo določili procesiranje GSDM D po aktivaciji inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP (Slika 23). Cepljeno obliko GSDM D smo dokazali v celičnih lizatih kot tudi v celičnem gojišču, kamor se le-ta sprosti ob piroptozni. Procesiranje GSDM D je bilo neodvisno od aktivnosti cisteinskih katepsinov, saj njihova inhibicija z E-64d ni imela vpliva na količino procesirane oblike GSDM D. Določili smo tudi celično smrt ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP z merjenjem encima laktat dehidrogenaze (LDH) v gojišču. Encim LDH se sprosti iz celic v gojišče ob poškodbi celic ali njihovi smrti in je dober pokazatelj viabilnosti celic. Opazili smo rahlo povečano celično smrt po aktivaciji inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP, ki je bila neodvisna od aktivnosti cisteinskih katepsinov in pri obeh genotipih primerljiva (Slika 23).



Slika 23: Procesiranje GSDM D in celična smrt po aktivaciji inflammasoma NLRP3 z LPS/ATP v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. A) Po končanih stimulacijah smo oborili proteine v celičnem gojišču (SN), pripravili celotne celične lizate (lizati) ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western. B) Po končanih stimulacijah smo določili sproščanje encima LDH v gojišče. Citotoksičnost smo predstavili kot odstotek celotnega sproščenega LDH v gojišču.

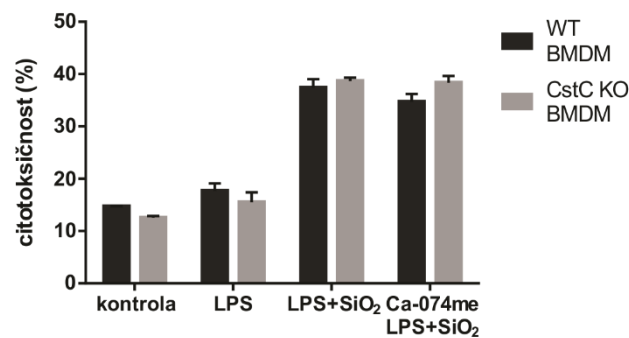
4.2.3.2 Aktivacija inflammasoma NLRP3 s trdnimi delci

Fagocitoza trdnih delcev, kot so kremenovi kristali (SiO_2), lahko vodi v aktivacijo inflammasoma NLRP3 preko poškodbe lizosomov in sprostitve lizosomskih katepsinov. Zanimalo nas je, ali odsotnost cistatina C, pomembnega inhibitorja cisteinskih katepsinov, vpliva na aktivacijo inflammasoma NLRP3, ki jo sprožijo trdni delci. Poleg tega smo preverili vlogo katepsina B pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 s kremenovimi kristali z uporabo inhibitorja Ca-074me, ki je delno selektiven za katepsin B. Stimulacija primarnih makrofagov s kremenovimi kristali po predhodni stimulaciji z LPS je vodila do aktivacije kaspaze-1 in procesiranja vnetnega citokina IL-1 β ter GSDM D (Slika 24). Procesiranje IL-1 β in GSDM D je bilo med obema genotipoma primerljivo, nekoliko večjo količino procesiranega GSDM D smo zaznali v gojišču primarnih makrofagov z izbitim genom za cistatin C.



Slika 24: Aktivacija inflamasoma NLRP3 s kremenovimi kristali. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo oborili proteine v celičnem gojišču (SN), pripravili celotne celične lizate (lizati) ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

Določili smo tudi celično smrt primarnih makrofagov po aktivaciji inflamasoma NLRP3 s kremenovimi kristali (Slika 25). Po stimulaciji primarnih makrofagov s kremenovimi kristali smo zaznali občutno povečanje celične smrti. Viabilnost celic in celična smrt je bila primerljiva med obema genotipoma in neodvisna od aktivnosti katepsina B.

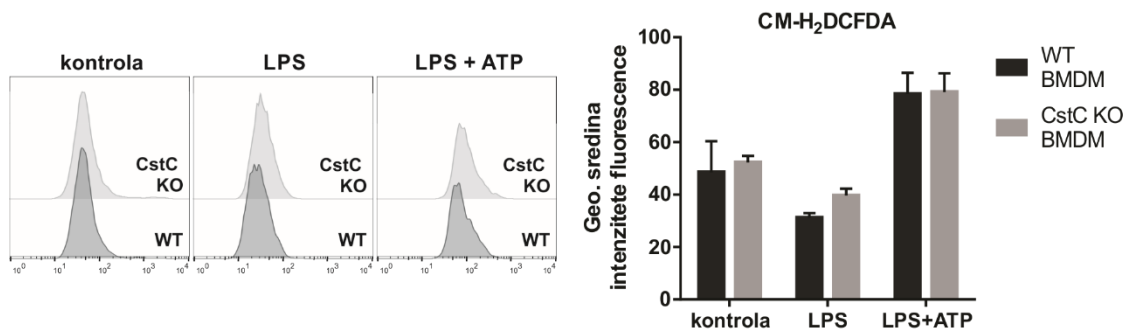


Slika 25: Viabilnost primarnih makrofagov ob aktivaciji inflamasoma NLRP3 s kremenovimi kristali. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih

stimulacijah smo določili sproščanje encima LDH v gojišče. Citotoksičnost smo predstavili kot odstotek celotnega sproščenega LDH v gojišču.

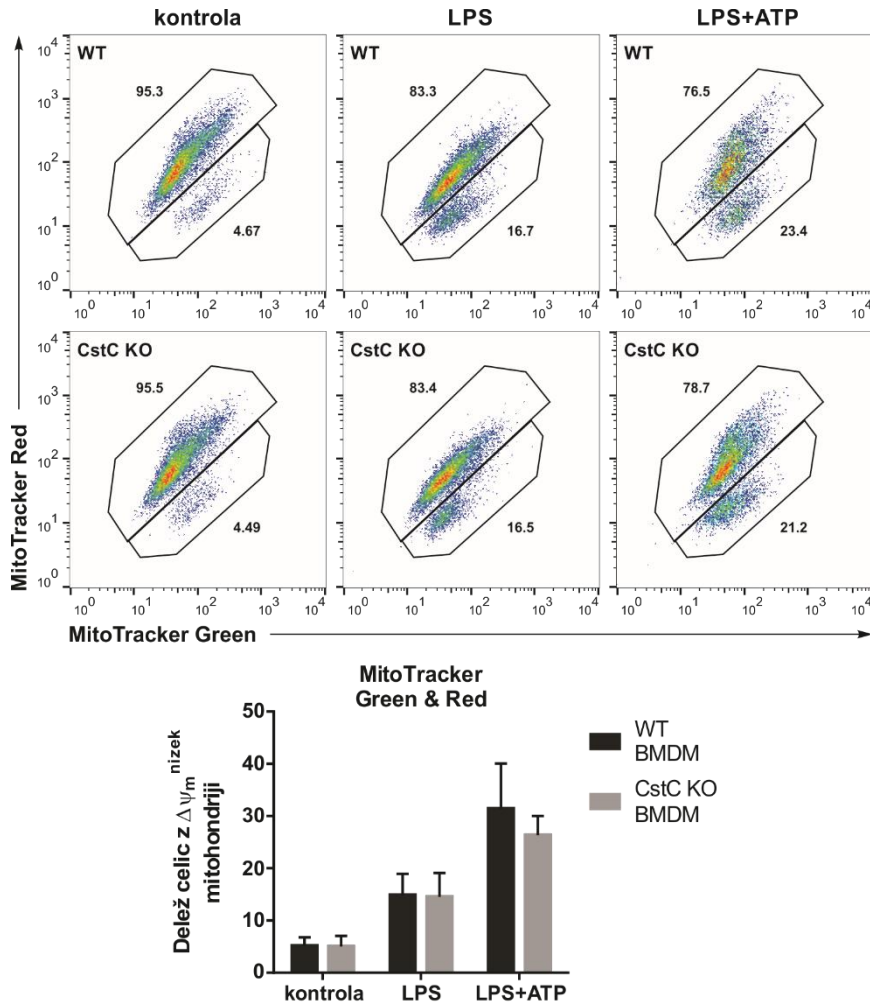
4.2.4 Vpliv cistatina C na integriteto mitohondrijev in oksidativni stres

Številne raziskave so pokazale pomen mitohondrijskih reaktivnih kisikovih zvrsti, mitohondrijske DNA in oksidativnega stresa pri aktivaciji inflammasoma NLRP3. Za stefin B, znotrajcelični inhibitor cisteinskih katepsinov, je bilo pokazano, da zaščiti integriteto mitohondrijev [216]. Odsotnost stefina B je vodila do povečanega nastanka mitohondrijskih reaktivnih kisikovih zvrsti in povečane aktivacije inflammasoma NLRP3 [216]. Zanimalo nas je, ali ima cistatin C podobno zaščitno vlogo pri integriteti mitohondrijev ali pri oksidativnem stresu in s tem preprečuje pretirano aktivacijo inflammasoma NLRP3. Za določitev oksidativnega stresa smo primarne makrofage barvali z barvilom CM-H₂DCFDA, ki v prisotnosti reaktivnih kisikovih zvrsti v celici oksidira in postane fluorescenčno. Opazili smo povečan oksidativni stres ob stimulaciji LPS/ATP primarnih makrofagov obeh genotipov (Slika 26). V nasprotju s pričakovanji je stimulacija primarnih makrofagov samo z LPS vodila v zmanjšano količino reaktivnih kisikovih zvrsti pri obeh genotipih.



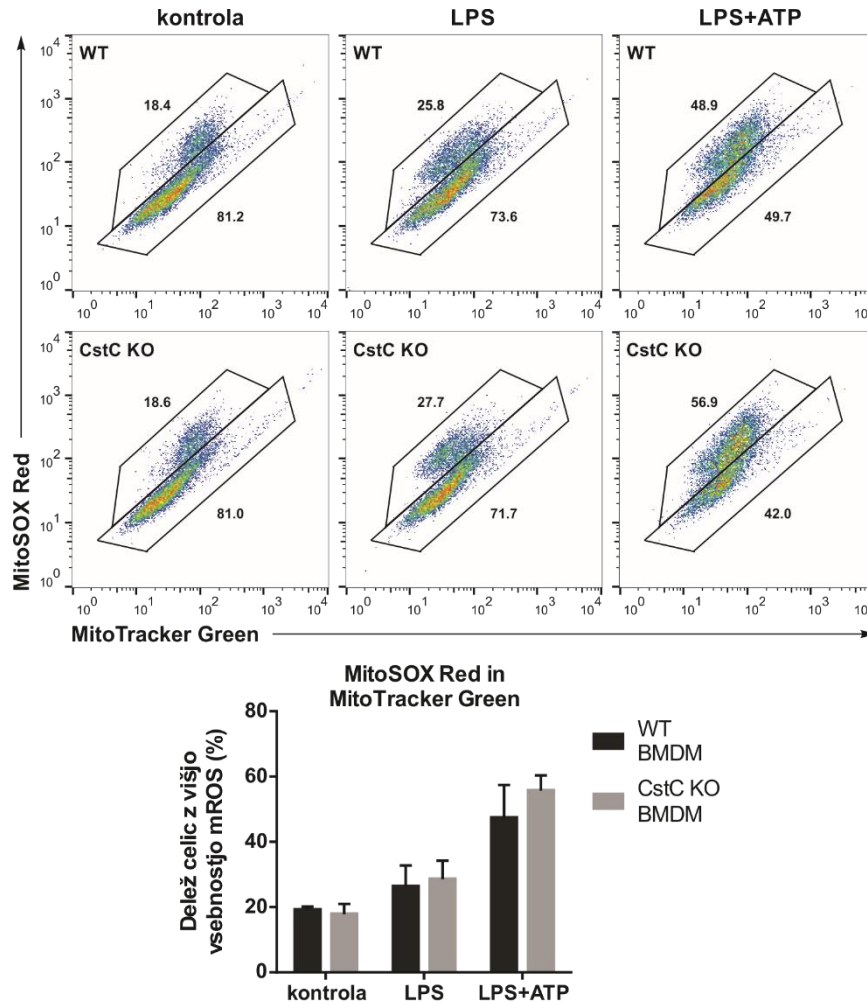
Slika 26: Oksidativni stres ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo celice pobarvali z barvilom CM-H₂DCFDA in izmerili intenziteto fluorescence s pretočnim citometrom.

Integriteto mitohondrijev smo določili z uporabo barvil MitoTracker™. Barvila MitoTracker™ lahko prosto prehajajo celično membrano in se akumulirajo v mitohondrijih. MitoTracker™ Green obarva mitohondrije neodvisno od njihove metabolne aktivnosti in medmembranskega potenciala. Barvilo MitoTracker™ Red CMXRos se veže in akumulira zgolj v metabolno aktivnih mitohondrijih in njegova fluorescenca je odvisna od mitohondrijskega medmembranskega potenciala. Z uporabo obeh barvil istočasno lahko določimo populacijo celic, ki vsebujejo zdrave in metabolne aktivne mitohondrije ter populacijo celic s poškodovanimi mitohondriji, ki niso več metabolno aktivni. Ob aktivaciji inflammasoma NLRP3 smo opazili večji delež primarnih makrofagov s poškodovanimi mitohondriji pri obeh genotipih (Slika 27).



Slika 27: Integriteta mitohondrijev ob aktivaciji inflamasona NLRP3 v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo celice pobarvali z barviloma MitoTracker™ Green in MitoTracker™ Red CMXRos ter izmerili intenziteto fluorescence s pretočnim citometrom.

Nadalje nas je zanimalo, ali ob aktivaciji inflamasona NLRP3 v primarnih makrofagih nastajajo mitohondrijske reaktivne kisikove zvrsti in ali ima prisotnost cistatina C vpliv na njihov nastanek. Mitohondrijske reaktivne kisikove zvrsti smo določali z barvilom MitoSOX™ Red. Superoksidni ioni v mitohondrijih oksidirajo barvilo MitoSOX™ Red, ki postane fluorescenčno. Kot pričakovano, mitohondrijske reaktivne kisikove zvrsti nastajajo ob aktivaciji inflamasona NLRP3, vendar v nasprotju z našo hipotezo pri obeh genotipih primerljivo, brez statistično značilnih razlik (Slika 28).



Slika 28: Mitohondrijske reaktivne kisikove zvrsti ob aktivaciji inflamasma NLRP3 v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo celice pobarvali z barviloma MitoTracker™ Green in MitoSOX™ Red ter izmerili intenziteto fluorescence s pretočnim citometrom.

4.3 Vloga cistatina C pri aktivaciji nekanoničnega inflamasma v primarnih mišjih makrofagih

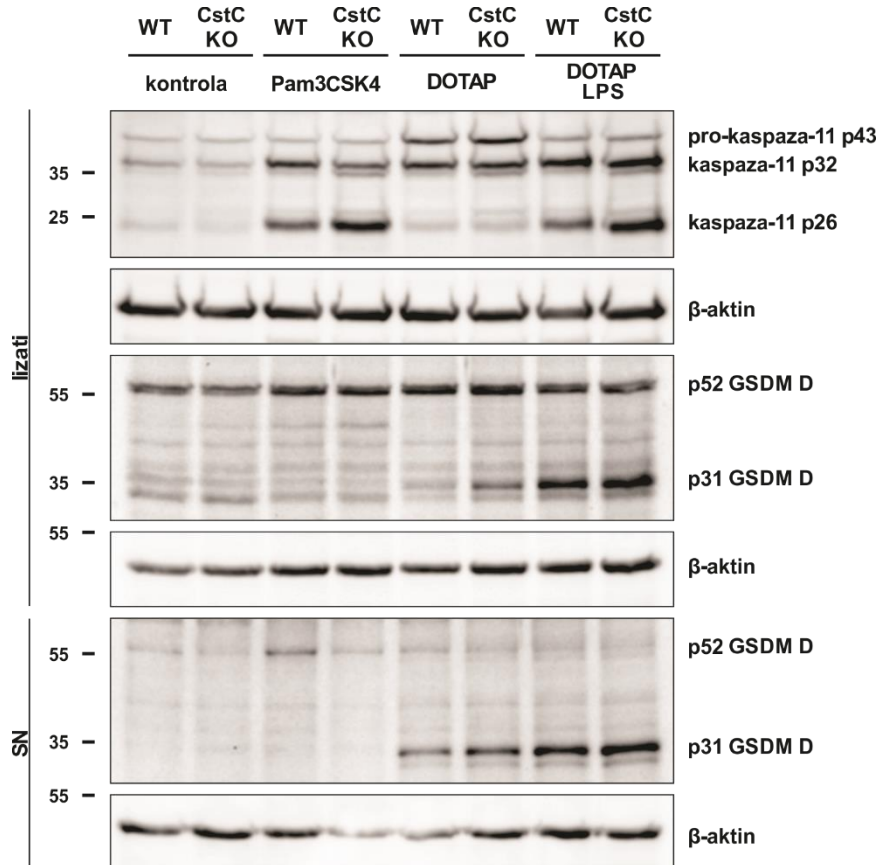
Nekanonični inflamasm prepozna in se aktivira ob vezavi LPS v citosolu. Po prehodu LPS v citosol le-tega prepozna kaspaza-11, ki ob vezavi LPS oligomerizira in se aktivira. Aktivna kaspaza-11 lahko cepi GSDM D in s tem povzroči piroptozo. Ob piroptozo se sprostijo DAMPi, kot je ATP, ki lahko sprožijo sekundarno aktivacijo inflamasma NLRP3 in nadaljnjo sproščanje vnetnih citokinov.

Za aktivacijo nekanoničnega inflamasma in kaspaze-11 smo primarne makrofage stimulirali s Pam3CSK4 (TLR2/TLR1 agonistom) in transfecirali z mešanico transfekcijskega reagenta DOTAP in LPS. Transfekcijski reagent DOTAP omogoči prenos LPS v citosol celic, kjer lahko direktno aktivira kaspazo-11. Pro-kaspaza-11 (p43) se avto-procesira do aktivne oblike p32/p10 [114].

Stimulacija s Pam3CSK4 je povzročila izražanje pro-kaspaze-11 (p43 in p36). Aktivacija kaspaze-11 ob transfekciji z LPS je bila povečana v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 29). Transfekcijski reagent DOTAP ni povzročil aktivacije kaspaze-11.

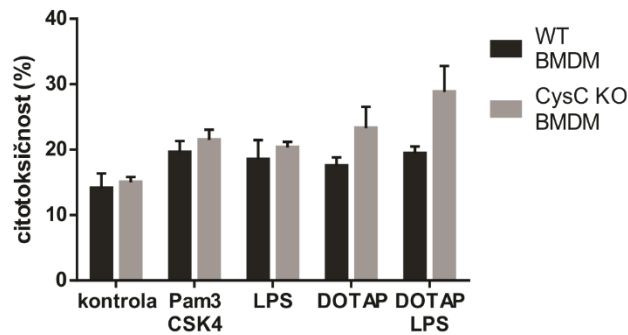
Stimulacija makrofagov z LPS brez transfekcijskega reagenta po začetni stimulaciji z Pam3CSK4 (vzorci Pam3CSK4, Slika 29) je prav tako vodila do aktivacije kaspaze-11, kar nakazuje, da se vsaj del LPS iz celičnega gojišča prenese v citosol, kjer povzroči aktivacijo kaspaze-11.

Transfekcija makrofagov z LPS je povzročila povečano cepitev GSDM D, substrata kaspaze-11, v makrofagih z izbitim genom za cistatin C. Transfekcijski reagent DOTAP je prav tako povzročil cepitev GSDM D, vendar v zelo majhni količini. Stimulacija makrofagov z LPS brez transfekcijskega reagenta ni povzročila cepitve GSDM D za razliko od aktivacije kaspaze-11. Iz tega lahko razberemo, da pride do pravilne aktivacije kaspaze-11 in posledične cepitve GSDM D zgolj pri transfekciji z LPS.



Slika 29: Aktivacija kaspaze-11 s transfekcijo LPS v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo oborili proteine v celičnem gojišču (SN), pripravili celotne celične lizate (lizati) ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

V nadaljevanju smo določili celično smrt oziroma piroptozo ob transfekciji makrofagov z LPS in aktivaciji nekanoničnega inflamiasoma (Slika 30). Celična smrt pri makrofagih, stimuliranih samo z Pam3CSK4 ali LPS v celičnem mediju, je bila rahlo povečana v primerjavi s kontrolno, vendar primerljiva med genotipoma. Transfekcijski reagent DOTAP je rahlo povečal celično smrt pri makrofagih z izbitim genom za cistatin C, vendar razlika ni bila statistično značilna. Transfekcija makrofagov z LPS je povečala celično smrt pri makrofagih z izbitim genom za cistatin C, kar je primerljivo z rezultati imunodetekcije GSDM D po prenosu western v celičnih lizatih.



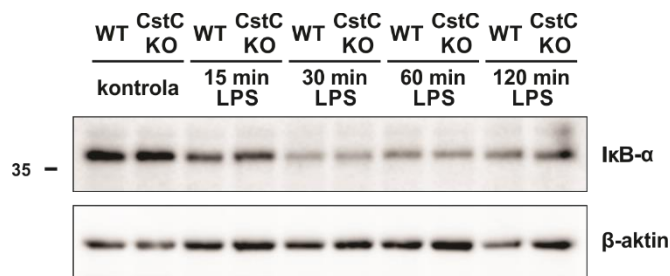
Slika 30: Viabilnost primarnih makrofagov ob aktivaciji nekanoničnega inflammasoma s transfekcijo LPS. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo določili sproščanje encima LDH v gojišče. Citotoksičnost smo predstavili kot odstotek celotnega sproščenega LDH v gojišču.

4.4 Vloga cistatina C pri regulaciji signalnih poti, povezanih z vnetnim odzivom

Poleg aktivacije NLRP3 in nekanoničnega inflammasoma nas je zanimal vpliv cistatina C tudi na nekatere druge signalne poti, povezane z vnetnim odzivom.

4.4.1 Vpliv cistatina C na signalne poti transkripcijskega faktorja NF- κ B in MAP-kinaz

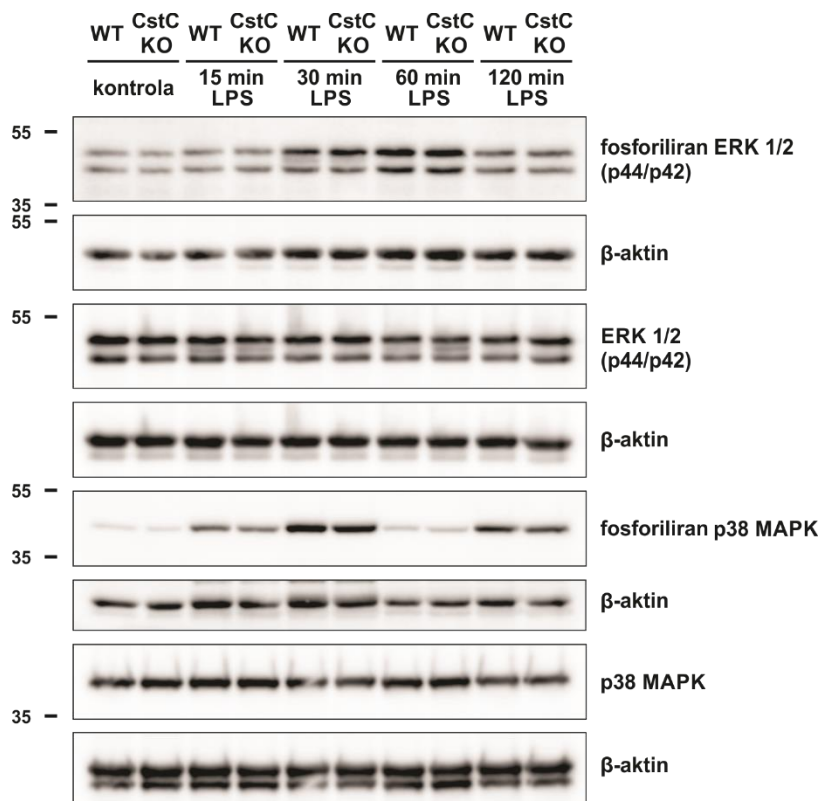
Transkripcijski faktor NF- κ B (jedrni faktor κ B) je ključni regulator vnetnega odziva. Inhibitorji transkripcijskih faktorjev NF- κ B (I κ B) preprečujejo prehod NF- κ B v jedro in njihovo aktivacijo. Aktivacija NF- κ B signalnih poti vodi do razgradnje I κ B v proteasomu in posledično sprostitvev ter aktivacijo NF- κ B in reguliranje izražanja določenih genov (Slika 1) [217]. Zanimalo nas je, ali odsotnost cistatina C vpliva na aktivacijo NF- κ B ob stimulaciji makrofagov z LPS. Aktivacijo NF- κ B smo določili z imunodetekcijo NF- κ B inhibitorja α (I κ B- α). Stimulacija makrofagov z LPS je povzročila razgradnjo I κ B- α in aktivacijo NF- κ B, vendar med genotipoma nismo zaznali razlik (Slika 31).



Slika 31: Razgradnja NF- κ B inhibitorja α (I κ B- α) po stimulaciji primarnih makrofagov z LPS. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

Vezava LPS in aktivacija TLR4 receptorja vodi tudi do aktivacije MAPK signalnih poti (Slika 1). Poročali so, da ima cistatin C vlogo tudi pri regulaciji MAPK signalnih poti, zato nas je zanimalo, ali odsotnost cistatina C vpliva na MAPK signalne poti ob stimulaciji makrofagov z LPS [207]. Aktivacijo MAP-kinaz ERK1/2 in p38 smo določili z

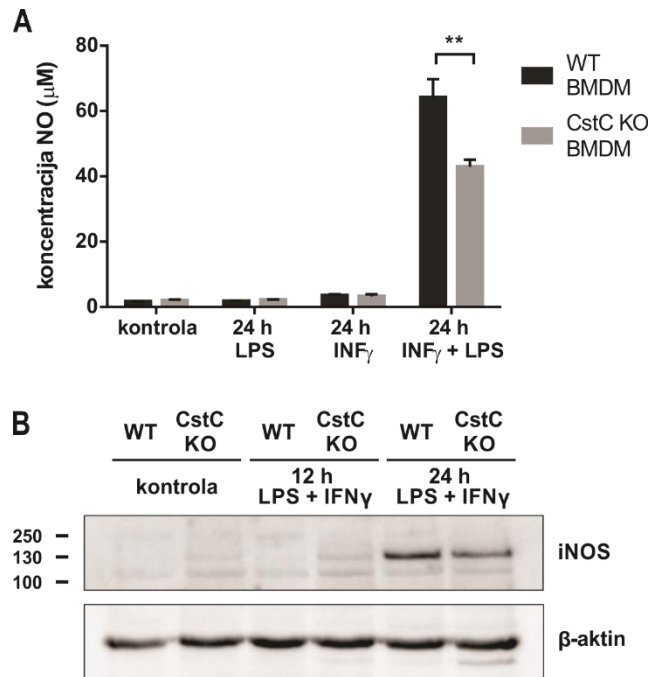
imunodetekcijo fosforiliranih in celotnih oblik kinaz. Fosforilirane oblike MAP-kinaz so aktivne oblike, ki nakazujejo sproženo signalno pot. Stimulacija makrofagov z LPS je povzročila aktivacijo tako ERK1/2 kot tudi p38, vendar nismo zaznali razlik med genotipoma (Slika 32).



Slika 32: Fosforilacija MAP-kinaz po stimulaciji primarnih makrofagov z LPS. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

4.4.2 Vpliv cistatina C na nastanek dušikovega oksida

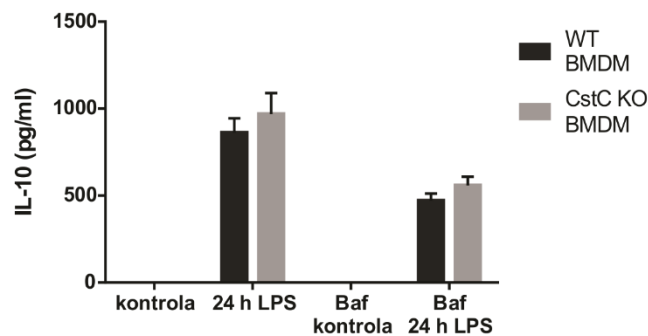
Dušikov oksid (NO) je signalna molekula, ki ima pomembno vlogo pri obrambi pred patogenimi organizmi in regulaciji imunskega odgovora. V imunskih celicah se po aktivaciji receptorjev naravne imunosti (npr. TLR) in/ali z vnetnimi citokini (npr. IFN- γ) sproži izražanje iNOS in nastanek NO [143]. Poročali so, da je cistatin C vpleten v regulacijo izražanja iNOS in nastanka NO (ref.). Zanimalo nas je, ali odsotnost cistatina C vpliva na nastali NO in izražanje iNOS v makrofagih po stimulaciji z LPS in IFN- γ . Stimulacija makrofagov z LPS ali IFN- γ za 24 h ur ne povzroči nastanka NO, medtem ko stimulacija makrofagov z LPS/IFN- γ hkrati za 24 h vodi do nastanka NO, ki ga lahko zaznamo v celičnem gojišču z reakcijo po Griessu (Slika 33A). Odsotnost cistatina C zmanjša količino nastalega NO. V skladu s tem stimulacija makrofagov z LPS/IFN- γ povzroči izražanje iNOS, ki je zmanjšano ob odsotnosti cistatina C. Izražanja iNOS po stimulaciji makrofagov z LPS/IFN- γ za 12 h z imunodetekcijo po prenosu western še nismo zaznali (Slika 33B).



Slika 33: Zmanjšano nastajanje in izločanje dušikovega oksida v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C. Primarne makrofage smo stimulirali kot je označeno. A) Po končanih stimulacijah smo posredno določili koncentracijo dušikovega oksida (NO) v celičnem gojišču z merjenjem nitrita in nitrata z reakcijo po Griessu. B) Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate (lizati) ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

4.4.3 Vpliv cistatina C na sintezo IL-10

Interleukin-10 (IL-10) je pomemben proti-vnetni citokin, ki regulira prekomerni vnetni odziv. Izražanje in sintezo IL-10 uravnava različne signalne poti, kot so MAP-kinaze in NF- κ B signalne poti, ter avtofagija. Izločanje IL-10 smo določili v celičnem gojišču makrofagov po stimulaciji z encimsko imunskim testom ELISA. Pred stimulacijo z LPS smo makrofage inkubirali z inhibitorjem avtofagije bafilomicinom A1, ki inhibira V-ATPazo in s tem prepreči nakisanje lizosomov in zlitje lizosomov z avtofagosomi. Posledično bafilomicin A1 preprečuje zadnji korak pri avtofagiji, ki je razgradnja in recikliranje vsebine avtofagosomov.



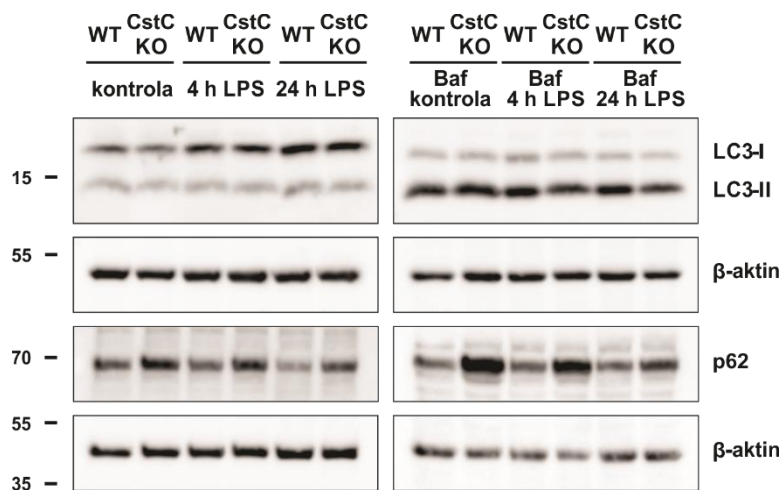
Slika 34: Izločanje protivnetnega citokina IL-10 v primarnih makrofagih. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo izmerili koncentracijo IL-10 v celičnem gojišču s testom ELISA.

Makrofagi so izločali IL-10 šele po stimulaciji z LPS. Inkubacija z bafilomicinom A1 je zmanjšala količino izločenega IL-10, vendar nismo zaznali statistično značilnih razlik med genotipoma (Slika 34).

4.5 Vloga cistatina C pri regulaciji avtofagije, povezane z vnetnim odzivom

Avtofagija ima pomembno vlogo pri regulaciji vnetnega odziva in lahko prepreči prekomeren vnetni odziv. Aktivacija receptorjev TLR vodi do indukcije avtofagije. Pri regulaciji avtofagije ima pomembno vlogo tudi cistatin C, ki lahko povzroči indukcijo avtofagije. Zanimalo nas je, ali ima odsotnost cistatina C v makrofagih ob stimulaciji z LPS vpliv na avtofagijo. Pred stimulacijo z LPS smo makrofage inkubirali z inhibitorjem avtofagije bafilomicinom A1. Inhibicija razgradnje vsebine avtofagosomov prepreči tudi razgradnjo proteinov, ki so udeleženi v procesu avtofagije, kot sta lipidirana oblika LC3-II in adapter p62.

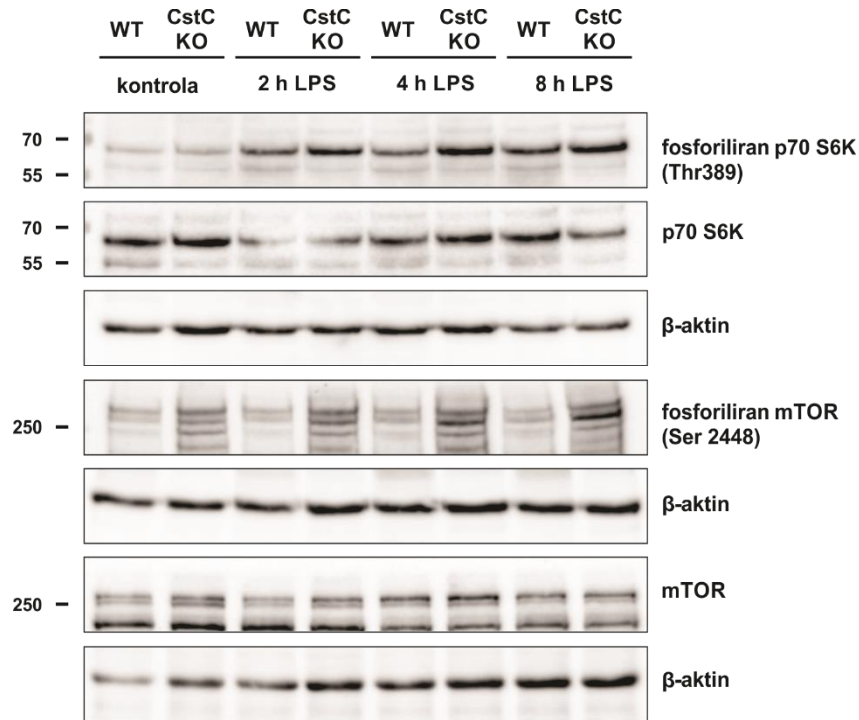
Stimulacija makrofagov z LPS sproži avtofagijo, saj je v celičnih lizatih makrofagov, stimuliranih z LPS za 24 h, prisotna manjša količina adapterja p62 v primerjavi s kontrolo (Slika 35). Majhna količina oblike LC3-II v primerjavi z obliko LC3-I nakazuje na učinkovit tok avtofagije. Odsotnost cistatina C povzroči zmanjšan tok avtofagije v makrofagih, saj vsebujejo večjo količino adapterja p62. Ob inhibiciji zadnje stopnje avtofagije se tok avtofagije ustavi in oblika LC3-II ter adapter p62 se kopičita v celicah. V makrofagih z izbitim genom za cistatin C je prisotno manj oblike LC3-II v primerjavi z divjim tipom, kar nakazuje na manjše število avtofagosomov v makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 35). Omenjeni rezultati nakazujejo na motnje avtofagije v makrofagih z izbitim genom za cistatin C.



Slika 35: Povečana količina avtofagosomov po stimulaciji z LPS v primarnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

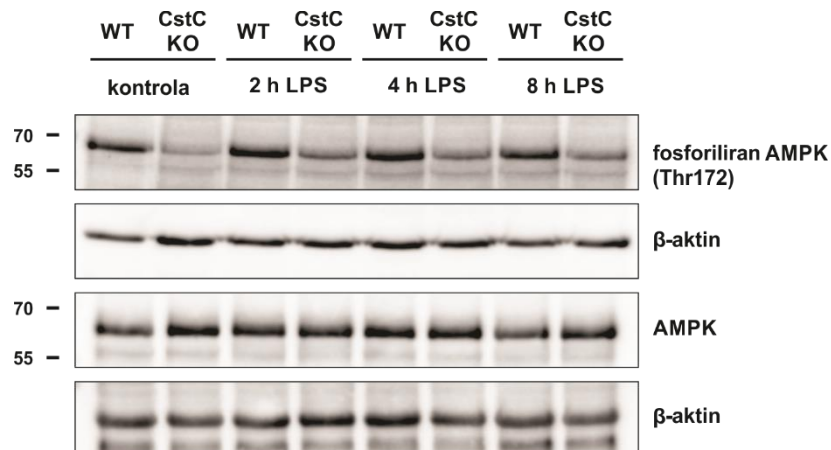
Cistatin C lahko regulira avtofagijo preko mTOR signalne poti, zato nas je zanimalo, ali odsotnost cistatina C vpliva na indukcijo avtofagije v makrofagih ob stimulaciji z LPS. Aktivacijo mTOR signalne poti smo določili z imunodetekcijo fosforilirane oblike mTOR (Ser 2448) in njegovega substrata p70 S6K (Thr389) v celičnih lizatih po prenosu western. V makrofagih z izbitim genom za cistatin C je stimulacija z LPS povzročila aktivacijo

mTOR signalne poti, saj smo zaznali povečano količino fosforiliranega mTOR in p70 S6K (Slika 36). Aktivacija mTOR signalne poti vodi v inhibicijo indukcije avtofagije.



Slika 36: Povečana fosforilacija kinaz v mTOR signalni poti po stimulaciji primarnih makrofagov z LPS. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

Na indukcijo avtofagije pomembno vpliva tudi AMPK signalna pot. Aktiven in fosforiliran AMPK (Thr172) inhibira mTOR in direktno sproži indukcijo avtofagije. V makrofagih z izbitim genom za cistatin C smo zaznali zmanjšano količino fosforilirane oblike AMPK, kar vodi do zmanjšane indukcije avtofagije (Slika 37).



Slika 37: Zmanjšana fosforilacija AMPK po stimulaciji LPS primarnih makrofagov z izbitim genom za cistatin C. Primarne makrofage smo stimulirali, kot je označeno. Po končanih stimulacijah smo pripravili celotne celične lizate ter jih analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

Poglavje 5

Razprava

Imunski sistem je obrambni mehanizem, ki specifično prepozna in uniči tuje patogene mikroorganizme. Ob delovanju imunskega sistema se sproži vnetni odziv, ki lahko ob nepravilni regulaciji povzroči poškodbo tkiv in poruši homeostazo. Pri prepoznavanju in uničevanju patogenih mikroorganizmov sodelujejo endolizosomske peptidaze, med katerimi so najštevilčnejši cisteinski katepsini. Endolizosomske peptidaze so vpletene v vnetni odziv tudi preko regulacije signalnih poti, procesiranja in predstavitve antigenov, aktivacije hormonov in remodeliranja zunajceličnega matriksa [173], [178]. Aktivnost endolizosomskih peptidaz je regulirana na nivoju prepisovanja, procesiranja in inhibicije z endogenimi inhibitorji, kot so cistatini. Ravnovesje med aktivnostjo peptidaz in njihovimi inhibitorji je ključno za uravnavanje imunskega odgovora in porušenje ravnovesja lahko privede do poškodb tkiva ali bolezenskih stanj [173], [178].

Številne raziskave so že preučevale vlogo cistatinov pri imunskem sistemu, vendar mehanizem delovanja nekaterih cistatinov še ni podrobneje razjasnjen [218]–[220]. Vedno več raziskav potrjuje, da imajo cistatini tudi druge funkcije, ki ne vključujejo inhibicije peptidaz [199], [218], [220]. Prejšnje raziskave so predlagale regulatorno vlogo cistatina C pri imunskem in vnetnem odzivu pri nekaterih z vnetjem povezanih boleznih, kot so revmatoidni artritis in ateroskleroza [221]–[224]. Vloga cistatina C in molekularnih mehanizmov pri imunskem in vnetnem odzivu še ni podrobneje razjasnjena. V naši raziskavi smo preučevali vlogo cistatina C pri vnetnem odzivu, ki ga sproži LPS. Raziskali smo, kako odsotnost cistatina C vpliva na pojav sepse, preživetje miši, jakost imunskega odziva in sintezo vnetnih mediatorjev. Raziskali smo tudi vpliv cistatina C na signalne poti, ki so vpletene v regulacijo vnetnega odziva.

Nizka koncentracija LPS lahko sproži hudo vnetno reakcijo in septični šok. Aktivirani makrofagi pričnejo izločati velike količine provnetnih citokinov, peptidaze, reaktivne kisikove in dušikove zvrsti. Sprožitev vnetnega odziva pri miših z intraperitonealnim injiciranjem LPS je model septičnega šoka pri miših [225]. V naši raziskavi smo pokazali, da so miši z izbitim genom za cistatin C bolj občutljive na visoko koncentracijo LPS, saj je bila stopnja umrljivosti statistično značilno višja kot pri miših divjega tipa (Slika 12). Poleg tega smo v vranici miši z izbitim genom za cistatin C po injiciranju z nizko koncentracijo LPS zaznali večje količine procesirane oblike IL-18 kot pri miših divjega tipa (Slika 13). To nakazuje na prekomerni vnetni odziv na LPS pri miših z izbitim genom za cistatin C.

Poročali so, da se izražanje cistatinov spremeni ob stimulaciji z različnimi PAMPi in vnetnimi mediatorji. Ob stimulaciji z LPS se poveča izražanje stefina B v makrofagih in monocitih [216], [226]. Prejšnje raziskave so poročale, da se izražanje oziroma izločanje cistatina C v celično gojišče ob stimulaciji mišjih peritonealnih makrofagov z LPS ali IFN- γ (24 h) zmanjša [205], [226]. V nasprotju s temi raziskavami smo pokazali povečano izločanje

cistatina C po stimulaciji makrofagov z LPS in LPS/ATP (Slika 14). Razlike v dobljenih rezultatih so lahko posledica različne internalizacije (endocitoze) cistatina C zaradi različnih časovnih točk (stimulacija z LPS za 4 h ali 24 h) in celičnih tipov (makrofagi, pridobljeni iz kostnega mozga, ali peritonealni makrofagi) [227].

Višji nivo procesirane oblike vnetnih citokinov družine IL-1 pri *in vitro* in *in vivo* poskusih nakazuje (Slika 13 in Slika 22), da cistatin C vpliva na molekularne mehanizme, ki vodijo v sintezo in/ali aktivacijo teh citokinov. Za procesiranje in nastanek zrele oblike vnetnih citokinov družine IL-1 je ključna aktivirana kaspaza-1. Kaspaza-1 se aktivira na multiproteinskih kompleksih – inflamasomih. Zato smo podrobneje preučili aktivaciji vnetnih kaspaz-1 in -11 ter sproščanje vnetnih citokinov pri makrofagih z izbitim genom za cistatin C v primerjavi z makrofagi divjega tipa. Stimulacija makrofagov z LPS/ATP povzroči aktivacijo inflamasoma NLRP3, ki aktivira kaspazo-1. Pokazali so, da se pro-kaspaza-1 avto-procesira do vmesnih produktov p33/p10 ali p32, ki se lahko nadalje procesira do aktivnega fragmenta p10 [109]. Fragmenta p10 z imunodetekcijo po prenosu western nismo zaznali pri nobenih pogojih, tako v celičnih lizatih kot v gojišču. Pri aktivaciji inflamasoma NLRP3 (stimulacija LPS/ATP) smo zaznali zmanjšano količino fragmenta p32, ki se lahko procesira v fragment p10. Zmanjšanje količine fragmenta p32 je bilo bolj izrazito v makrofagih z izbitim genom za cistatin C, kar nakazuje na povečano aktivacijo inflamasoma NLRP3 (Slika 21). Prav tako smo opazili povečano aktivacijo kaspaze-11 in nastanek aktivne oblike p32 in p26 v makrofagih z izbitim genom za cistatin C po stimulaciji z LPS (Slika 21).

V skladu s povečano aktivnostjo vnetnih kaspaz smo po aktivaciji inflamasoma NLRP3 v makrofagih z izbitim genom za cistatin C zaznali povečano količino procesirane oblike IL-1 β v celičnih lizatih in gojišču ter procesirane oblike IL-18 v celičnih lizatih (Slika 22). Izražanje citokina IL-1 β je inducibilno, medtem ko je izražanje citokina IL-18 konstitutivno. Prejšnja raziskava je pokazala, da utišanje izražanja genov (siRNA) za stefin B in cistatin C vodi do povečanega izražanja pro-oblike IL-1 β po stimulaciji mišjih peritonealnih makrofagov z LPS [75]. V nasprotju s temi rezultati nismo pokazali povečanega izražanja (na nivoju mRNA in proteinov) pro-oblike IL-1 β v makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 22) [228] in prav tako niso tega potrdili v makrofagih z izbitim genom za stefin B [216]. Kljub konstitutivnemu izražanju IL-18 smo pokazali povečano količino pro-oblike IL-18 v makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 22).

Glavna in primarna vloga cistatina C je inhibicija cisteinskih katepsinov in regulacija njihove aktivnosti. Preverili smo, kako odsotnost cistatina C vpliva na aktivnost cisteinskih katepsinov v celičnih lizatih in gojišču ob aktivaciji inflamasoma NLRP3. Določili smo aktivnost katepsinov, ki so podobni katepsinu L s substratom z-Phe-Arg-AMC, in katepsina B s substratom z-Arg-Arg-AMC. Zaradi zunajcelične lokalizacije cistatina C smo, v skladu z našimi pričakovanji, največjo razliko med makrofagi z izbitim genom za cistatin C in divjega tipa dobili pri aktivnosti cisteinskih katepsinov v celičnem gojišču (Slika 16). Statistično značilno povečana aktivnost cisteinskih katepsinov je prisotna tudi v popolnih celičnih lizatih v makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 15), kar je najverjetneje posledica privzetja in internalizacije cistatina C iz gojišča v endolizosomski sistem v makrofagih divjega tipa. Aktivnost cisteinskih katepsinov v celičnem gojišču močno naraste ob aktivaciji inflamasoma NLRP3, kar je v skladu s prejšnjimi raziskavami [229].

Poleg aktivnosti cisteinskih katepsinov, smo preverili tudi aktivnost cisteinske peptidaze legumain, ki je prav tako tarča cistatina C. Aktivnost legumaina se ob aktivaciji inflamasoma NLRP3 zmanjša (Slika 19), kar je najverjetneje posledica destabilizacije lizosomske membrane, saj legumain pri nevtralnem pH hitro izgubi konformacijo in se ireverzibilno inaktivira [182]. V nasprotju z našimi pričakovanji smo opazili statistično značilno zmanjšano aktivnost v popolnih celičnih lizatih makrofagov z izbitim genom za cistatin C (Slika 19). Aktivna oblika legumaina je lahko prisotna izven endo-lizosomskega

sistema, če je stabilizirana z vezavo na druge proteine, kot je cistatin C [182]. Zato predvidevamo, da je večja aktivnost legumaina v makrofagih divjega tipa posledica vezave legumaina na cistatin C, ki stabilizira aktivno konformacijo pri nevtralnem pH in omogoči aktivnost legumaina v pufru za merjenje aktivnosti legumaina, ki ima kisel pH. Podoben vpliv cistatina C na aktivnost legumaina po izpostavitvi nevtralnemu pH so pokazali v prejšnji študiji [182].

Eden izmed predlaganih mehanizmov aktivacije inflammasoma NLRP3 predpostavi poškodbe lizosomov, ki vodijo do sprostitve cisteinskih katepsinov [69], [71]–[73], [75]. Katepsin B je bil predlagan kot interakcijski partner NLRP3, ki povzroči njegovo aktivacijo. Kot inhibitor cisteinskih katepsinov cistatin C regulira njihovo aktivnost in lahko preko svoje inhibitorne vloge vpliva na aktivacijo inflammasoma NLRP3. Preverili smo, ali cistatin C vpliva na destabilizacijo lizosomske membrane ob aktivaciji inflammasoma NLRP3. V skladu s prejšnjimi raziskavami smo pokazali [216], [229], da aktivacija inflammasoma NLRP3 povzroči destabilizacijo lizosomske membrane, vendar ni odvisna od cistatina C (Slika 17). Prav tako je aktivnost cisteinskih katepsinov, sproščenih v citosol, primerljiva med makrofagi z izbitim genom za cistatin C in divjega tipa (Slika 18).

Za določitev vloge cisteinskih katepsinov pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 v našem modelu smo makrofage pred stimulacijo z LPS in NLRP3 aktivatorji (ATP in SiO_2) inkubirali z inhibitorjema cisteinskih katepsinov E-64d in Ca-074me. E-64d je ireverzibilni inhibitor cisteinskih katepsinov (F, K, B, H in L), ki prosto prehaja celično membrano. Ca-074me je selektiven ireverzibilni inhibitor katepsina B, ki prosto prehaja celično membrano, vendar je njegova selektivnost za katepsin B vprašljiva, saj so raziskave poročale, da inhibira tudi katepsin L [75], [230]. Inkubacija makrofagov z inhibitorjem E-64d je popolnoma inhibirala aktivnost cisteinskih katepsinov v celičnih lizatih in gojišču (Slika 15 in Slika 16). Inhibicija cisteinskih katepsinov ni imela vpliva na procesiranje in aktivacijo kaspaze-1, medtem ko je zmanjšala aktivacijo kaspaze-11 (Slika 21). Inhibicija cisteinskih katepsinov je nekoliko zmanjšala izločanje IL-1 β , vendar ni zmanjšala razlike med genotipoma (Slika 22). Nekatere prejšnje raziskave so prav tako pokazale, da cisteinski katepsini nimajo vloge pri aktivaciji inflammasoma NLRP3 in kaspaze-1 [73], [216], [229]. V nasprotju z našo hipotezo razlike v vnetnem odzivu med makrofagi z izbitim genom za cistatin C in divjega tipa ne moremo pripisati njegovi inhibitorni vlogi in povečani aktivnosti cisteinskih katepsinov.

Povečano izločanje citokina IL-1 β je lahko posledica povečane celične smrti v obliki piroptoze. Zato smo preverili viabilnost celic in količino cepljene oblike GSDM D, ki povzroči nastanek por v celični membrani med piroptozo. Opazili smo nekoliko povečano celično smrt ob aktivaciji inflammasoma NLRP3, ki je bila neodvisna od genotipa in aktivnosti cisteinskih katepsinov (Slika 23 in Slika 25). Poročali so, da stimulacija makrofagov s kristali, kot so kremenovi kristali in kristali sečne kisline, povzroči celično smrt, ki je neodvisna od aktivacije inflammasoma NLRP3 (pri stimulaciji s kremenovimi kristali) oziroma kaspaze-1 in GSDM D (pri stimulaciji s kristali sečne kisline) [231], [232]. Primerljivo stopnjo celične smrti med genotipoma pri stimulaciji makrofagov s kremenovimi kristali lahko tako pojasnimo s celično smrtjo, ki ni povezana z aktivacijo inflammasoma NLRP3. Cepitev GSDM D prav tako ni bila odvisna od aktivnosti cisteinskih katepsinov, vendar je bila količina p31 GSDM D rahlo povečana pri makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 23 in Slika 24).

Iz naših rezultatov smo ugotovili, da inhibitorna vloga cistatina C nima ključne vloge pri vnetnem odzivu na LPS. Za stefin B so pokazali, da ima pomembno zaščitno vlogo pri nastanku oksidativnega stresa in mitohondrijskih ROS [216]. Zanimalo nas je, ali ima cistatin C podobno vlogo pri oksidativnem stresu in poškodbah mitohondrijev. Stimulacija makrofagov z LPS/ATP vodi do povečanega oksidativnega stresa, poškodovanih

mitohondrijev in nastanka mitohondrijskih ROS, kot je opisano že v literaturi, vendar neodvisno od cistatina C (Slika 26, Slika 27 in Slika 28).

Odsotnost stefina B preko povečanega oksidativnega stresa vodi v povečano izražanje in aktivacijo kaspaze-11 [216]. Odsotnost cistatina C prav tako povzroči povečano izražanje in aktivacijo kaspaze-11 (Slika 21) ob stimulaciji makrofagov z LPS [228]. Da bi dodatno preverili vlogo kaspaze-11 v našem modelu, smo makrofage stimulirali s Pam3CSK4, ki aktivira receptorje TLR1/TLR2 in sproži izražanje pro-kaspaze-11. Aktivacijo kaspaze-11 in nekanoničnega inflammasoma smo sprožili s transfekcijo (DOTAP) makrofagov z LPS, pri čemer prenesemo LPS v citosol. Pri makrofagih z izbitim genom za cistatin C smo zaznali povečano količino aktivne oblike p32 ter povečano količino cepljene oblike GSDM D, ki je direkten substrat kaspaze-11 in povzroči piroptozo (Slika 29). V skladu s tem smo zaznali tudi rahlo povečano celično smrt ob odsotnosti cistatina C (Slika 30). Poleg aktivne oblike kaspaze p32 smo ob odsotnosti cistatina C zaznali tudi povečano obliko p26 (Slika 29), ki je prav tako posledica avto-aktivacije kaspaze-11, vendar najverjetneje ni aktivna [114]. Kljub povečani količini oblike p26 po stimulaciji makrofagov s Pam3CSK4, brez citosolnega LPS nismo zaznali cepljene oblike GSDM D, ki nakazuje aktivno obliko kaspaze-11 (Slika 29). S tem smo potrdili, da oblika p26 nima katalitične aktivnosti in ne cepi GSDM D.

Pri septičnem šoku ob okužbi z endotoksinom oziroma LPS imata ključno vlogo kaspaza-11 (nekanonični inflammasom) in GSDM D (piroptozo), medtem ko kaspaza-1 in vnetna citokina iz družine IL-1 nimajo ključne vloge [79], [82], [116], [119]. Povečano izražanje kaspaze-11, njena aktivacija in cepitev GSDM D ob odsotnosti cistatina C imajo lahko pomembno vlogo pri povečani občutljivosti miši z izbitim genom za cistatin C na septični šok, sprožen z LPS.

Prejšnje raziskave so pokazale, da dodajanje kokošjega cistatina in cistatina C poveča izločanje dušikovega oksida (NO) v mišjih peritonealnih makrofagih po stimulaciji z IFN- γ [206], [233], [234]. Za razliko od cistatinov tipa II stefin B negativno vpliva na izločanje NO, saj mišji makrofagi z izbitim genom za stefin B izločajo večjo količino NO po stimulaciji z LPS in/ali IFN- γ [235]. V skladu s prejšnjimi raziskavami smo pokazali, da imajo makrofagi z izbitim genom za cistatin C zmanjšano izražanje iNOS in posledično izločajo manj NO ob stimulaciji z LPS in/ali IFN- γ (Slika 33) [206].

Zanimal nas je tudi vpliv cistatina C na signalne poti, vpletene v vnetni odziv. Poročali so, da odsotnost cistatina C v mišjih peritonealnih makrofagih ob stimulaciji z IFN- γ povzroči zmanjšano aktivnost transkripcijskega faktorja NF- κ B [206]. Stimulacija makrofagov z LPS je povzročila aktivacijo NF- κ B, saj se je količina inhibitorja I κ B- α zmanjšala, vendar zmanjšanje ni bilo odvisno od cistatina C (Slika 31). Za človeški cistatin C so poročali, da ob dodajanju v celično gojišče k monocitom ob stimulaciji z LPS zmanjša aktivnost MAPK signalne poti preko zmanjšane fosforilacije ERK1/2 kinaze [197]. Pokazali smo aktivacijo MAPK signalnih poti ob stimulaciji mišjih makrofagov, pridobljenih iz kostnega mozga z LPS preko fosforilacije ERK1/2 in p38 kinaze. Za razliko od omenjene raziskave [197] je bila fosforilacija neodvisna od prisotnosti cistatina C (Slika 32). Frenđeus in sod. so poročali tudi o povečani količini izločenega protivnetnega citokina IL-10 pri mišjih peritonealnih makrofagih z izbitim genom za cistatin C ob stimulaciji z IFN- γ . Ob stimulaciji makrofagov iz kostnega mozga z LPS teh razlik nismo zaznali (Slika 34).

Frenđeus in sod. so poročali, da odsotnost cistatina C v mišjih peritonealnih makrofagih ob stimulaciji z IFN- γ povzroči zmanjšano aktivnost transkripcijskega faktorja NF- κ B, zmanjšano izražanje iNOS in izločanje NO ter povečano izločanje protivnetnega citokina IL-10 [206]. Ob stimulaciji makrofagov iz kostnega mozga z izbitim genom za cistatin C nismo zaznali zmanjšane aktivnosti NF- κ B in povečanega izločanja IL-10. Po drugi strani so naši rezultati za izražanje iNOS in izločanje NO primerljivi, saj so bili makrofagi stimulirani z LPS in IFN- γ . Zato lahko razliko med rezultati pripišemo različnim stimulacijam makrofagov kot tudi različnim tipom makrofagov [227].

Prejšnje raziskave so pokazale, da nastanek NO ob stimulaciji mišjih makrofagov z LPS in IFN- γ zmanjša aktivnost inflammasoma NLRP3, aktivnost kaspaze-1 in procesiranje ter izločanje IL-1 β [236], [237]. Vpliv NO na aktivnost inflammasoma NLRP3 so dodatno potrdili s stimulacijo mišjih makrofagov z eksogenimi donorji NO, ki so prav tako inhibirale aktivnost inflammasoma NLRP3 [236]–[239]. Mišji makrofagi z izbitim genom za iNOS imajo od zaradi zmanjšane količine NO posledično povečano procesiranje in izločanje IL-1 β ob stimulaciji z aktivatorji NLRP3 (npr. ATP in nigericin) [236]–[239]. Nekatere raziskave so pokazale, da NO direktno S-nitrozilira protein NLRP3 in s tem prepreči njegovo aktivnost oziroma nastanek kompleksa, v katerem je prisoten tudi ASC [237]–[239]. Poleg tega lahko NO direktno S-nitrozilira tudi kaspazo-1 in s tem inhibira njeno aktivnost ter s tem zmanjša procesiranje in izločanje IL-1 β [236], [239]. Zmanjšano izražanje iNOS in zmanjšan nastanek NO v makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 33) lahko vodi v zmanjšano inhibicijo inflammasoma NLRP3 ter posledično v povečano procesiranje in izločanje IL-1 β .

Prejšnje raziskave so poročale o regulatorni vlogi cistatina C pri indukciji avtofagije preko mTOR ali AMPK signalnih poti [208]–[212]. Zanimalo nas je, ali ima cistatin vpliv na avtofagijo, ki se sproži ob vnetnih signalih, kot je stimulacija makrofagov z LPS. Makrofagi z izbitim genom za cistatin C vsebujejo večjo količino adapterja p62, ki se v celicah razgradi med procesom avtofagije, kar nakazuje na zmanjšano avtofagijo ob odsotnosti cistatina C. Z inkubacijo makrofagov z bafilomicinom A1 smo preprečili fuzijo avtofagosomov z lizosomi in nakisanje nastalih avtofagolizosomov, kar prepreči razgradnjo vsebine avtofagosomov, vključno z lipidirano obliko LC3-II (Slika 35). Makrofagi z izbitim genom za cistatin C imajo v primerjavi z divjim tipom zmanjšano količino lipidirane oblike LC3-II ob stimulaciji z LPS, kar nakazuje za zmanjšano število avtofagosomov oziroma zmanjšano avtofagijo (Slika 35).

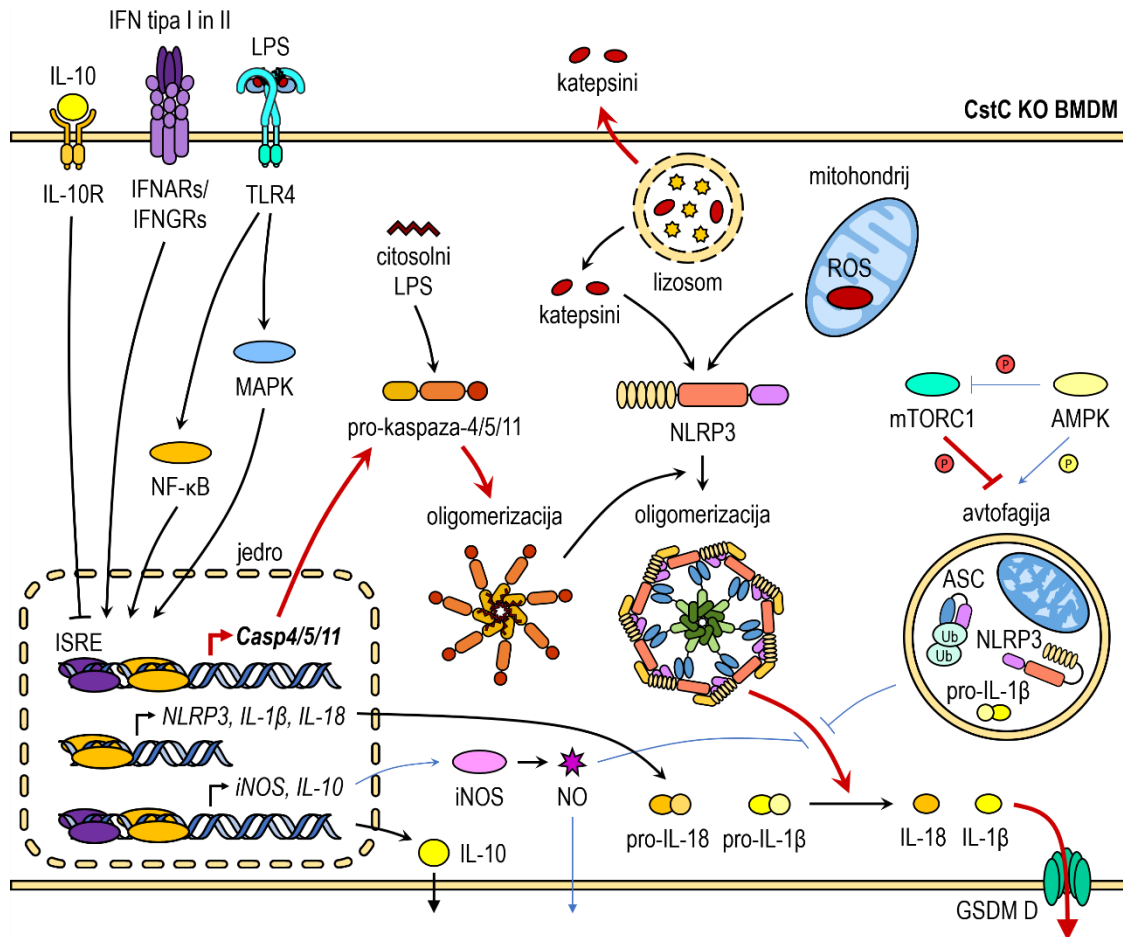
Na indukcijo avtofagije in nastanek avtofagosomov vplivajo različne signalne poti, kot sta mTOR in AMPK signalni poti, ki se med sabo tudi prekrivata. Zanimalo nas je, ali cistatin C vpliva na indukcijo avtofagije in na ta način tudi na avtofagijo. V makrofagih z izbitim genom za cistatin C smo ob stimulaciji z LPS zaznali povečano fosforilacijo mTOR (Ser2448) in posledično povečano fosforilacijo p70 S6K, ki je substrat mTOR kinaze (Slika 36). Dodatno smo opazili zmanjšano fosforilacijo AMPK v makrofagih z izbitim genom za cistatin C (Slika 37). Zmanjšana aktivnost AMPK vpliva direktno na zmanjšano indukcijo avtofagije ter ne inhibira delovanja mTOR, ki zato v aktivni obliki inhibira indukcijo avtofagije. Odsotnost cistatina C tako zaradi aktivnega mTOR in zmanjšane aktivnosti AMPK vodi v zmanjšano indukcijo avtofagije oziroma neučinkovito avtofagijo.

Avfogija ima pomembno vlogo pri odstranjevanju poškodovanih organelov, kot so mitohondriji, in na ta način zmanjša količino stresnih molekul, ki so posledica poškodb mitohondrijev (npr. mitohondrijski ROS, mitohondrijska DNA). Mitofagija ima pomembno vlogo pri aktivaciji inflammasoma NLRP3, saj disfunkcionalna mitofagija vodi do podaljšanega in prekomernega vnetnega odziva [160], [161]. Pokazali so, da ima pri indukciji mitofagije, ki prepreči prekomerni vnetni odziv, ključno vlogo mTOR signaliziranje [161].

Poleg tega so pokazali, da avtofagija zavira delovanje inflammasoma NLRP3 preko odstranjevanja komponent inflammasoma in pro-IL-1 β [164]–[169]. Odsotnost cistatina C preko zmanjšane avtofagije lahko vodi do povečanega in prekomernega vnetnega odziva, ki smo ga zaznali *in vitro* v makrofagih in *in vivo* v miših.

Pri vnetnem odzivu ima cistatin C več različnih vlog, med katerimi nekatere niso neposredno povezane z njegovo inhibitorno vlogo pri cisteinskih peptidazah (Slika 38). Opisanih je bilo več različnih vlog cistatina C, ki bi lahko vplivale na vnetni odziv, kot so inhibicija katepsina B, regulacija signalnih poti, regulacija nastanka NO in izločanja IL-10 ter regulacija avtofagije. V naši raziskavi smo potrdili imuno-modulatorno vlogo cistatina C in dodatno raziskali različne molekularne mehanizme, preko katerih cistatin C vpliva na imunski odziv. Naši rezultati so izključili vpliv odsotnosti cistatina C na NF- κ B in MAPK

signalne poti ter izločanje IL-10 v našem modelu mišjih makrofagov, pridobljenih iz kostnega mozga, stimuliranih z LPS. Iz naših rezultatov lahko zaključimo, da je prekomerni vnetni odziv pri miših in makrofagih z izbitim genom za cistatin C posledica zmanjšane nastanka NO, povečane aktivacije kaspaze-11 in posledične piroptoze ter zmanjšane avtofagije, ki blaži in umirja vnetni odziv. Cistatin C ima tako pomembno vlogo pri uravnavanju imunskega odziva in ščiti organizem pred prekomernim vnetnim odzivom in sepsom.



Slika 38: Vpliv odsotnosti cistatina C na vnetni odziv v primarnih makrofagih. Odsotnost cistatina C poveča izražanje in aktivacijo kaspaze-11 in zmanjša izločanja NO. Poleg tega preko povečane fosforilacije mTOR in zmanjšane fosforilacije AMPK zavre avtofagijo, kar povzroči prekomerni vnetni odziv.

Poglavje 6

Zaključki

Doktorska disertacija prinaša nova spoznanja o imuno-modulatorni vlogi cistatina C pri vnetnem odzivu in aktivaciji inflammasoma. Raziskali smo vpliv cistatina C na različne molekularne mehanizme, ki so vpleteni v regulacijo vnetnega odziva. Pokazali smo, da odsotnost cistatina C v makrofagih:

- poveča smrtnost miši, ki jo sproži močan imunski odgovor na endotoksin (LPS), oziroma poveča občutljivost na septični šok pri miših,
- vodi do povečanega izražanja in aktivacije kaspaze-11,
- povzroči statistično značilno povečano procesiranje in izločanje aktivnih vnetnih citokinov IL-1 β in IL-18 zaradi boljše aktivacije vnetnih kaspaz-1 in -11,
- poveča celokupno in zunajcelično aktivnost, vendar ne citosolne aktivnosti cisteinskih katepsinov, ki pa niso vpleteni v aktivacijo inflammasoma NLRP3,
- zmanjša izražanje iNOS in tvorbo dušikovih reaktivnih zvrsti (NO) ob stimulaciji z IFN- γ in LPS,
- vodi do povečane aktivnosti kinaze mTOR in zmanjšane aktivnosti kinaze AMPK, kar vodi do zmanjšane indukcije avtofagije,
- vodi do zmanjšane toka avtofagije in avtofagosomov,
- ne vpliva na nastanek (mitohondrijskih) reaktivnih kisikovih spojin in poškodb mitohondrijev,
- ne vpliva na NF- κ B in MAPK signalne poti ter izločanje protivnetnega citokina IL-10.

Cistatinu C smo poleg inhibitorne vloge določili pomembno imuno-modulatorno vlogo pri preprečevanju prekomernega vnetnega odziva in raziskali molekularne mehanizme, na katere vpliva.

Literatura

- [1] A. K. Abbas, A. H. H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Health Sciences, 2014.
- [2] K. M. Murphy, *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group, 2011.
- [3] T. H. Mogensen, "Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 240–273, Apr. 2009, doi: 10.1128/cmr.00046-08.
- [4] D. Li and M. Wu, "Pattern recognition receptors in health and diseases," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, p. 291, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00687-0.
- [5] J. Rehwinkel and M. U. Gack, "RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 9, pp. 537–551, Sep. 2020, doi: 10.1038/s41577-020-0288-3.
- [6] M. Drouin, J. Saenz, and E. Chiffoleau, "C-Type Lectin-Like Receptors: Head or Tail in Cell Death Immunity," *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 251, Feb. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00251.
- [7] Y. Nakaya, J. Lilue, S. Stavrou, E. A. Moran, and S. R. Ross, "AIM2-Like Receptors Positively and Negatively Regulate the Interferon Response Induced by Cytosolic DNA," *MBio*, vol. 8, no. 4, Sep. 2017, doi: 10.1128/mBio.00944-17.
- [8] I. R. Rifkin, E. A. Leadbetter, L. Busconi, G. Viglianti, and A. Marshak-Rothstein, "Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease," *Immunol. Rev.*, vol. 204, no. 1, pp. 27–42, Apr. 2005, doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00239.x.
- [9] I. Jarchum and E. G. Pamer, "Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 23, no. 3, pp. 353–360, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.coi.2011.03.001.
- [10] N. W. Palm, M. R. de Zoete, and R. A. Flavell, "Immune–microbiota interactions in health and disease," *Clin. Immunol.*, vol. 159, no. 2, pp. 122–127, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.clim.2015.05.014.
- [11] T. Kawasaki and T. Kawai, "Toll-Like Receptor Signaling Pathways," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. SEP, p. 461, Sep. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- [12] I. Botos, D. M. Segal, and D. R. Davies, "The Structural Biology of Toll-like Receptors," *Structure*, vol. 19, no. 4, pp. 447–459, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.str.2011.02.004.
- [13] R. Jerala, "Structural biology of the LPS recognition," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 297, no. 5, pp. 353–363, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.ijmm.2007.04.001.

- [14] Y.-C. Lu, W.-C. Yeh, and P. S. Ohashi, "LPS/TLR4 signal transduction pathway," *Cytokine*, vol. 42, no. 2, pp. 145–151, May 2008, doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- [15] T. Kawai and S. Akira, "TLR signaling," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 5, pp. 816–825, May 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401850.
- [16] X. Li *et al.*, "Data-Driven Modeling Identifies TIRAP-Independent MyD88 Activation Complex and Myddosome Assembly Strategy in LPS/TLR4 Signaling," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 9, May 2020, doi: 10.3390/IJMS21093061.
- [17] F. Wan and M. J. Lenardo, "Specification of DNA Binding Activity of NF- B Proteins," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 4, Oct. 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a000067.
- [18] H. J. Schaeffer and M. J. Weber, "Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 19, no. 4, pp. 2435–2444, Apr. 1999, doi: 10.1128/MCB.19.4.2435.
- [19] M. O. Ullah, M. J. Sweet, A. Mansell, S. Kellie, and B. Kobe, "TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 100, no. 1, pp. 27–45, Jul. 2016, doi: 10.1189/jlb.2RI1115-531R.
- [20] A. O. Babamale and S.-T. Chen, "Nod-like Receptors: Critical Intracellular Sensors for Host Protection and Cell Death in Microbial and Parasitic Infections," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 21, p. 11398, Oct. 2021, doi: 10.3390/ijms222111398.
- [21] Z. Hu *et al.*, "Crystal Structure of NLRC4 Reveals Its Autoinhibition Mechanism," *Science (80-.)*, vol. 341, no. 6142, pp. 172–175, Jul. 2013, doi: 10.1126/science.1236381.
- [22] F. J. Velloso, M. Trombetta-Lima, V. Anschau, M. C. Sogayar, and R. G. Correa, "NOD-like receptors: major players (and targets) in the interface between innate immunity and cancer," *Biosci. Rep.*, vol. 39, no. 4, pp. 1–21, Apr. 2019, doi: 10.1042/BSR20181709.
- [23] D. Sharma and T.-D. Kanneganti, "The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation," *J. Cell Biol.*, vol. 213, no. 6, pp. 617–629, Jun. 2016, doi: 10.1083/jcb.201602089.
- [24] F. Martinon, K. Burns, and J. Tschopp, "The Inflammasome," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 2, pp. 417–426, Aug. 2002, doi: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3.
- [25] P. Broz and V. M. Dixit, "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 7, pp. 407–420, Jul. 2016, doi: 10.1038/nri.2016.58.
- [26] H. Guo, J. B. Callaway, and J. P. Y. Ting, "Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 7, pp. 677–687, Jul. 2015, doi: 10.1038/nm.3893.
- [27] J. L. Schmid-Burgk *et al.*, "A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 1, pp. 103–109, Jan. 2016, doi: 10.1074/JBC.C115.700492.
- [28] Y. He, M. Y. Zeng, D. Yang, B. Motro, and G. Núñez, "NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux," *Nature*, vol. 530,

- no. 7590, pp. 354–357, Feb. 2016, doi: 10.1038/nature16959.
- [29] H. Shi *et al.*, “NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component,” *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 3, pp. 250–258, Mar. 2016, doi: 10.1038/ni.3333.
- [30] M. Lamkanfi and V. M. Dixit, “Mechanisms and Functions of Inflammasomes,” *Cell*, vol. 157, no. 5, pp. 1013–1022, May 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007.
- [31] C. Juliana, T. Fernandes-Alnemri, S. Kang, A. Farias, F. Qin, and E. S. Alnemri, “Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 43, pp. 36617–36622, Oct. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.407130.
- [32] B. F. Py, M.-S. Kim, H. Vakifahmetoglu-Norberg, and J. Yuan, “Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity,” *Mol. Cell*, vol. 49, no. 2, pp. 331–338, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.009.
- [33] M. A. Rodgers *et al.*, “The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation,” *J. Exp. Med.*, vol. 211, no. 7, pp. 1333–1347, Jun. 2014, doi: 10.1084/jem.20132486.
- [34] K. Guan *et al.*, “MAVS Promotes Inflammasome Activation by Targeting ASC for K63-Linked Ubiquitination via the E3 Ligase TRAF3,” *J. Immunol.*, vol. 194, no. 10, pp. 4880–4890, May 2015, doi: 10.4049/jimmunol.1402851.
- [35] K. V. Swanson, M. Deng, and J. P. Y. Ting, “The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 19, no. 8, pp. 477–489, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.
- [36] N. Kelley, D. Jeltema, Y. Duan, and Y. He, “The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 13, p. 3328, Jul. 2019, doi: 10.3390/ijms20133328.
- [37] I. Hafner-Bratkovič and P. Pelegrín, “Ion homeostasis and ion channels in NLRP3 inflammasome activation and regulation,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 52, pp. 8–17, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.coi.2018.03.010.
- [38] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, and G. Buell, “The Cytolytic P₂Z Receptor for Extracellular ATP Identified as a P₂X Receptor (P₂X₇),” *Science (80-.)*, vol. 272, no. 5262, pp. 735–738, May 1996, doi: 10.1126/science.272.5262.735.
- [39] A. Di *et al.*, “The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation,” *Immunity*, vol. 49, no. 1, pp. 56–65.e4, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.032.
- [40] D. Perregaux and C. A. Gabel, “Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 21, pp. 15195–15203, May 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)36591-2.
- [41] R. Muñoz-Planillo, P. Kuffa, G. Martínez-Colón, B. L. Smith, T. M. Rajendiran, and G. Núñez, “K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter,” *Immunity*, vol. 38, no. 6, pp. 1142–1153, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016.
- [42] V. Pétrilli, S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, and J. Tschopp,

- “Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration,” *Cell Death Differ.*, vol. 14, no. 9, pp. 1583–1589, Sep. 2007, doi: 10.1038/sj.cdd.4402195.
- [43] G. Meng, F. Zhang, I. Fuss, A. Kitani, and W. Strober, “A Mutation in the Nlrp3 Gene Causing Inflammasome Hyperactivation Potentiates Th17 Cell-Dominant Immune Responses,” *Immunity*, vol. 30, no. 6, pp. 860–874, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.012.
- [44] L. E. Sanman *et al.*, “Disruption of glycolytic flux is a signal for inflammasome signaling and pyroptotic cell death,” *Elife*, vol. 5, no. MARCH2016, Mar. 2016, doi: 10.7554/eLife.13663.
- [45] C. J. Groß *et al.*, “K⁺ + Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria,” *Immunity*, vol. 45, no. 4, pp. 761–773, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.010.
- [46] D. Brough *et al.*, “Ca²⁺ Stores and Ca²⁺ Entry Differentially Contribute to the Release of IL-1 β and IL-1 α from Murine Macrophages,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 6, pp. 3029–3036, Mar. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3029.
- [47] L. Feldmeyer, M. Keller, G. Niklaus, D. Hohl, S. Werner, and H.-D. Beer, “The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 β by Keratinocytes,” *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 13, pp. 1140–1145, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.cub.2007.05.074.
- [48] J. Chu, L. M. Thomas, S. C. Watkins, L. Franchi, G. Núñez, and R. D. Salter, “Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 β from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 86, no. 5, pp. 1227–1238, Nov. 2009, doi: 10.1189/jlb.0309164.
- [49] T. Murakami *et al.*, “Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 28, pp. 11282–11287, Jul. 2012, doi: 10.1073/pnas.1117765109.
- [50] G.-S. Lee *et al.*, “The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP,” *Nature*, vol. 492, no. 7427, pp. 123–127, Dec. 2012, doi: 10.1038/nature11588.
- [51] T. Tang *et al.*, “CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 202, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00227-x.
- [52] R. Domingo-Fernández, R. C. Coll, J. Kearney, S. Breit, and L. A. J. O’Neill, “The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 β transcription and activate the NLRP3 inflammasome,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 29, pp. 12077–12087, Jul. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.797126.
- [53] J. P. Green *et al.*, “Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 40, pp. E9371–E9380, Oct. 2018, doi: 10.1073/pnas.1812744115.
- [54] C. Dostert, V. Pétrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, and J. Tschopp, “Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica,” *Science (80-.)*, vol. 320, no. 5876, pp. 674–677, May 2008, doi: 10.1126/science.1156995.

- [55] C. M. Cruz, A. Rinna, H. J. Forman, A. L. M. Ventura, P. M. Persechini, and D. M. Ojcius, "ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 5, pp. 2871–2879, Feb. 2007, doi: 10.1074/jbc.M608083200.
- [56] A *et al.*, "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 8, pp. 847–856, Aug. 2008, doi: 10.1038/ni.1631.
- [57] R. van Bruggen *et al.*, "Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent," *Blood*, vol. 115, no. 26, pp. 5398–5400, Jul. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-10-250803.
- [58] R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, and J. Tschopp, "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation," *Nature*, vol. 469, no. 7329, pp. 221–225, Jan. 2011, doi: 10.1038/nature09663.
- [59] K. Nakahira *et al.*, "Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 3, pp. 222–230, Mar. 2011, doi: 10.1038/ni.1980.
- [60] K. Shimada *et al.*, "Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis," *Immunity*, vol. 36, no. 3, pp. 401–414, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.009.
- [61] T. Zhang *et al.*, "A novel mechanism for NLRP3 inflammasome activation," *Metab. Open*, vol. 13, p. 100166, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.metop.2022.100166.
- [62] R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, and J. Tschopp, "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation," *Nat. 2010 4697329*, vol. 469, no. 7329, pp. 221–225, Dec. 2010, doi: 10.1038/nature09663.
- [63] R. Allam *et al.*, "Mitochondrial apoptosis is dispensable for <sc>NLRP</sc> 3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming," *EMBO Rep.*, vol. 15, no. 9, pp. 982–990, Sep. 2014, doi: 10.15252/embr.201438463.
- [64] F. Bauernfeind, E. Bartok, A. Rieger, L. Franchi, G. Núñez, and V. Hornung, "Cutting Edge: Reactive Oxygen Species Inhibitors Block Priming, but Not Activation, of the NLRP3 Inflammasome," *J. Immunol.*, vol. 187, no. 2, pp. 613–617, Jul. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1100613.
- [65] S. Park *et al.*, "The Mitochondrial Antiviral Protein MAVS Associates with NLRP3 and Regulates Its Inflammasome Activity," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 8, pp. 4358–4366, Oct. 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1301170.
- [66] N. Subramanian, K. Natarajan, M. R. Clatworthy, Z. Wang, and R. N. Germain, "The Adaptor MAVS Promotes NLRP3 Mitochondrial Localization and Inflammasome Activation," *Cell*, vol. 153, no. 2, pp. 348–361, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.054.
- [67] M. E. Ermler *et al.*, "Rift Valley fever virus infection induces activation of the NLRP3 inflammasome," *Virology*, vol. 449, pp. 174–180, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.virol.2013.11.015.
- [68] L. Franchi *et al.*, "Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3

- Inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K⁺ Efflux,” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 8, pp. 4214–4222, Oct. 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1400582.
- [69] V. Hornung *et al.*, “Silica crystals and aluminum salts mediate NALP-3 inflammasome activation via phagosomal destabilization,” *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 8, p. 847, Aug. 2008, doi: 10.1038/NI.1631.
- [70] B. Parajuli, Y. Sonobe, H. Horiuchi, H. Takeuchi, T. Mizuno, and A. Suzumura, “Oligomeric amyloid β induces IL-1 β processing via production of ROS: implication in Alzheimer’s disease,” *Cell Death Dis.*, vol. 4, no. 12, pp. e975–e975, Dec. 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.503.
- [71] H. Lima Jr. *et al.*, “Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death,” *Cell Cycle*, vol. 12, no. 12, pp. 1868–1878, Jun. 2013, doi: 10.4161/cc.24903.
- [72] P. Duewell *et al.*, “NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals,” *Nature*, vol. 464, no. 7293, pp. 1357–1361, Apr. 2010, doi: 10.1038/nature08938.
- [73] A. Halle *et al.*, “The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β ,” *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 8, pp. 857–865, Aug. 2008, doi: 10.1038/ni.1636.
- [74] F. Martinon, V. Pétrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp, “Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome,” *Nature*, vol. 440, no. 7081, pp. 237–241, Mar. 2006, doi: 10.1038/nature04516.
- [75] G. M. Orlowski, J. D. Colbert, S. Sharma, M. Bogyo, S. A. Robertson, and K. L. Rock, “Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1 β Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1 β Activation,” *J. Immunol.*, vol. 195, no. 4, p. 1685, Aug. 2015, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1500509.
- [76] C. Dostert *et al.*, “Malarial Hemozoin Is a Nalp3 Inflammasome Activating Danger Signal,” *PLoS One*, vol. 4, no. 8, p. e6510, Aug. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006510.
- [77] A. Hari *et al.*, “Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, p. 7281, May 2015, doi: 10.1038/srep07281.
- [78] C. Schorn *et al.*, “Sodium Overload and Water Influx Activate the NALP3 Inflammasome,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 1, pp. 35–41, Jan. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.139048.
- [79] N. Kayagaki *et al.*, “Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11,” *Nature*, vol. 479, no. 7371, pp. 117–121, Nov. 2011, doi: 10.1038/nature10558.
- [80] J. A. Hagar, D. A. Powell, Y. Aachoui, R. K. Ernst, and E. A. Miao, “Cytoplasmic LPS Activates Caspase-11: Implications in TLR4-Independent Endotoxic Shock,” *Science (80-.)*, vol. 341, no. 6151, pp. 1250–1253, Sep. 2013, doi: 10.1126/science.1240988.
- [81] J. Shi *et al.*, “Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS,” *Nature*, vol. 514, no. 7521, pp. 187–192, Oct. 2014, doi: 10.1038/nature13683.
- [82] N. Kayagaki *et al.*, “Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4,” *Science (80-.)*, vol. 341, no. 6151, pp. 1246–1249, Sep.

- 2013, doi: 10.1126/science.1240248.
- [83] P. Liehl, V. Zuzarte-Luis, and M. M. Mota, “Unveiling the pathogen behind the vacuole,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 9, pp. 589–598, Sep. 2015, doi: 10.1038/nrmicro3504.
- [84] K. P. Downs, H. Nguyen, A. Dorfleutner, and C. Stehlik, “An overview of the non-canonical inflammasome,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 76, p. 100924, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.mam.2020.100924.
- [85] E. Meunier *et al.*, “Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases,” *Nature*, vol. 509, no. 7500, pp. 366–370, May 2014, doi: 10.1038/nature13157.
- [86] S. M. Man *et al.*, “IRGB10 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes,” *Cell*, vol. 167, no. 2, pp. 382–396.e17, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.09.012.
- [87] A. Balakrishnan, R. Karki, B. Berwin, M. Yamamoto, and T.-D. Kanneganti, “Guanylate binding proteins facilitate caspase-11-dependent pyroptosis in response to type 3 secretion system-negative *Pseudomonas aeruginosa*,” *Cell Death Discov.*, vol. 4, no. 1, p. 66, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41420-018-0068-z.
- [88] A. L. Horstman and M. J. Kuehn, “Enterotoxigenic *Escherichia coli* Secretes Active Heat-labile Enterotoxin via Outer Membrane Vesicles,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 17, pp. 12489–12496, Apr. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.17.12489.
- [89] T. N. Ellis and M. J. Kuehn, “Virulence and Immunomodulatory Roles of Bacterial Outer Membrane Vesicles,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 74, no. 1, pp. 81–94, Mar. 2010, doi: 10.1128/MMBR.00031-09.
- [90] S. K. Vanaja *et al.*, “Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation,” *Cell*, vol. 165, no. 5, pp. 1106–1119, May 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.015.
- [91] S. Chen *et al.*, “Dysregulated hemolysin liberates bacterial outer membrane vesicles for cytosolic lipopolysaccharide sensing,” *PLOS Pathog.*, vol. 14, no. 8, p. e1007240, Aug. 2018, doi: 10.1371/journal.ppat.1007240.
- [92] R. Finethy *et al.*, “Inflammasome Activation by Bacterial Outer Membrane Vesicles Requires Guanylate Binding Proteins,” *MBio*, vol. 8, no. 5, Nov. 2017, doi: 10.1128/mBio.01188-17.
- [93] J. H. Youn, Y. J. Oh, E. S. Kim, J. E. Choi, and J.-S. Shin, “High Mobility Group Box 1 Protein Binding to Lipopolysaccharide Facilitates Transfer of Lipopolysaccharide to CD14 and Enhances Lipopolysaccharide-Mediated TNF- α Production in Human Monocytes,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 7, pp. 5067–5074, Apr. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.7.5067.
- [94] J. Xu *et al.*, “Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis,” *Cell Death Differ.*, vol. 21, no. 8, pp. 1229–1239, Aug. 2014, doi: 10.1038/cdd.2014.40.
- [95] M. Kutsch, L. Sistemich, C. F. Lesser, M. B. Goldberg, C. Herrmann, and J. Coers, “Direct binding of polymeric GBP1 to LPS disrupts bacterial cell envelope functions,” *EMBO J.*, vol. 39, no. 13, Jul. 2020, doi: 10.15252/embj.2020104926.
- [96] J. C. Santos *et al.*, “Human GBP1 binds LPS to initiate assembly of a caspase-4

- activating platform on cytosolic bacteria,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 3276, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16889-z.
- [97] M. P. Wandel *et al.*, “Guanylate-binding proteins convert cytosolic bacteria into caspase-4 signaling platforms,” *Nat. Immunol.*, vol. 21, no. 8, pp. 880–891, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41590-020-0697-2.
- [98] M. L. G. Ramirez, M. Poreba, S. J. Snipas, K. Groborz, M. Drag, and G. S. Salvesen, “Extensive peptide and natural protein substrate screens reveal that mouse caspase-11 has much narrower substrate specificity than caspase-1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 18, pp. 7058–7067, May 2018, doi: 10.1074/jbc.RA117.001329.
- [99] B. Bibo-Verdugo, S. J. Snipas, S. Kolt, M. Poreba, and G. S. Salvesen, “Extended subsite profiling of the pyroptosis effector protein gasdermin D reveals a region recognized by inflammatory caspase-11,” *J. Biol. Chem.*, vol. 295, no. 32, pp. 11292–11302, Aug. 2020, doi: 10.1074/jbc.RA120.014259.
- [100] S. Rühl and P. Broz, “Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K⁺ efflux,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, no. 10, pp. 2927–2936, Oct. 2015, doi: 10.1002/eji.201545772.
- [101] J. L. Schmid-Burgk, M. M. Gaidt, T. Schmidt, T. S. Ebert, E. Bartok, and V. Hornung, “Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, no. 10, pp. 2911–2917, Oct. 2015, doi: 10.1002/eji.201545523.
- [102] D. Yang, Y. He, R. Muñoz-Planillo, Q. Liu, and G. Núñez, “Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock,” *Immunity*, vol. 43, no. 5, pp. 923–932, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.009.
- [103] K. W. Chen, B. Demarco, and P. Broz, “Pannexin-1 promotes NLRP3 activation during apoptosis but is dispensable for canonical or noncanonical inflammasome activation,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 50, no. 2, pp. 170–177, Feb. 2020, doi: 10.1002/eji.201948254.
- [104] F. Martinon and J. Tschopp, “Inflammatory Caspases,” *Cell*, vol. 117, no. 5, pp. 561–574, May 2004, doi: 10.1016/j.cell.2004.05.004.
- [105] O. Julien and J. A. Wells, “Caspases and their substrates,” *Cell Death Differ.*, vol. 24, no. 8, pp. 1380–1389, Aug. 2017, doi: 10.1038/cdd.2017.44.
- [106] D. J. Fernández and M. Lamkanfi, “Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death,” *Biol. Chem.*, vol. 396, no. 3, pp. 193–203, Mar. 2015, doi: 10.1515/hsz-2014-0253.
- [107] D. Datta, C. L. McClendon, M. P. Jacobson, and J. A. Wells, “Substrate and Inhibitor-induced Dimerization and Cooperativity in Caspase-1 but Not Caspase-3,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 14, pp. 9971–9981, Apr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.426460.
- [108] P. Ramage *et al.*, “Expression, Refolding, and Autocatalytic Proteolytic Processing of the Interleukin-1 β -converting Enzyme Precursor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 16, pp. 9378–9383, Apr. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.16.9378.
- [109] D. Boucher *et al.*, “Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity,” *J. Exp. Med.*, vol. 215, no. 3, p. 827, Mar. 2018, doi:

- 10.1084/JEM.20172222.
- [110] J. G. Walsh, S. E. Logue, A. U. Lüthi, and S. J. Martin, “Caspase-1 Promiscuity Is Counterbalanced by Rapid Inactivation of Processed Enzyme,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 37, pp. 32513–32524, Sep. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.225862.
- [111] P. Broz, J. Von Moltke, J. W. Jones, R. E. Vance, and D. M. Monack, “Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing,” *Cell Host Microbe*, vol. 8, no. 6, pp. 471–483, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.CHOM.2010.11.007.
- [112] M. S. Dick, L. Sborgi, S. Rühl, S. Hiller, and P. Broz, “ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, p. 11929, Sep. 2016, doi: 10.1038/ncomms11929.
- [113] A. Agnew, C. Nulty, and E. M. Creagh, “Regulation, Activation and Function of Caspase-11 during Health and Disease,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 4, p. 1506, Feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22041506.
- [114] C. Ross, A. H. Chan, J. Von Pein, D. Boucher, and K. Schroder, “Dimerization and auto-processing induce caspase-11 protease activation within the non-canonical inflammasome,” *Life Sci. Alliance*, vol. 1, no. 6, p. e201800237, Dec. 2018, doi: 10.26508/lsa.201800237.
- [115] K. Wang *et al.*, “Structural Mechanism for GSDMD Targeting by Autoprocessed Caspases in Pyroptosis,” *Cell*, vol. 180, no. 5, pp. 941–955.e20, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.CELL.2020.02.002.
- [116] B. L. Lee *et al.*, “Caspase-11 auto-proteolysis is crucial for noncanonical inflammasome activation,” *J. Exp. Med.*, vol. 215, no. 9, pp. 2279–2288, Sep. 2018, doi: 10.1084/jem.20180589.
- [117] T. Bergsbaken, S. L. Fink, and B. T. Cookson, “Pyroptosis: host cell death and inflammation,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 2, pp. 99–109, Feb. 2009, doi: 10.1038/nrmicro2070.
- [118] J. Shi *et al.*, “Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death,” *Nat. 2015 5267575*, vol. 526, no. 7575, pp. 660–665, Sep. 2015, doi: 10.1038/nature15514.
- [119] N. Kayagaki *et al.*, “Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling,” *Nature*, vol. 526, no. 7575, pp. 666–671, Oct. 2015, doi: 10.1038/nature15541.
- [120] J. Ding *et al.*, “Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family,” *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 111–116, Jul. 2016, doi: 10.1038/nature18590.
- [121] L. Sborgi *et al.*, “<sc>GSDMD</sc> membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death,” *EMBO J.*, vol. 35, no. 16, pp. 1766–1778, Aug. 2016, doi: 10.15252/embj.201694696.
- [122] X. Liu *et al.*, “Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores,” *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 153–158, Jul. 2016, doi: 10.1038/nature18629.
- [123] S. Xia *et al.*, “Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1,” *Nature*, vol. 593, no. 7860, pp. 607–611, May 2021, doi:

- 10.1038/S41586-021-03478-3.
- [124] A. Mantovani, C. A. Dinarello, M. Molgora, and C. Garlanda, “Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity,” *Immunity*, vol. 50, no. 4, pp. 778–795, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.012.
- [125] A. H. Chan and K. Schroder, “Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines,” *J. Exp. Med.*, vol. 217, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1084/jem.20190314.
- [126] N. Kaneko, M. Kurata, T. Yamamoto, S. Morikawa, and J. Masumoto, “The role of interleukin-1 in general pathology,” *Inflamm. Regen.*, vol. 39, no. 1, p. 12, Dec. 2019, doi: 10.1186/s41232-019-0101-5.
- [127] C. Garlanda, C. A. Dinarello, and A. Mantovani, “The Interleukin-1 Family: Back to the Future,” *Immunity*, vol. 39, no. 6, pp. 1003–1018, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.
- [128] M. Daniels and D. Brough, “Unconventional Pathways of Secretion Contribute to Inflammation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 1, p. 102, Jan. 2017, doi: 10.3390/ijms18010102.
- [129] N. Dupont, S. Jiang, M. Pilli, W. Ornatowski, D. Bhattacharya, and V. Deretic, “Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β ,” *EMBO J.*, vol. 30, no. 23, pp. 4701–4711, Nov. 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.398.
- [130] M. Zhang, S. J. Kenny, L. Ge, K. Xu, and R. Schekman, “Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion,” *Elife*, vol. 4, Nov. 2015, doi: 10.7554/eLife.11205.
- [131] Y. Qu, L. Franchi, G. Nunez, and G. R. Dubyak, “Nonclassical IL-1 β Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages,” *J. Immunol.*, vol. 179, no. 3, pp. 1913–1925, Aug. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1913.
- [132] Y. Qu *et al.*, “P2X7 Receptor-Stimulated Secretion of MHC Class II-Containing Exosomes Requires the ASC/NLRP3 Inflammasome but Is Independent of Caspase-1,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 8, pp. 5052–5062, Apr. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0802968.
- [133] G. Kaplanski, “Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis,” *Immunol. Rev.*, vol. 281, no. 1, pp. 138–153, Jan. 2018, doi: 10.1111/imr.12616.
- [134] M. Saraiva, P. Vieira, and A. O’Garra, “Biology and therapeutic potential of interleukin-10,” *J. Exp. Med.*, vol. 217, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1084/JEM.20190418/132577.
- [135] K. W. Moore, R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O’Garra, “Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 19, no. 1, pp. 683–765, Apr. 2001, doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- [136] W. Ouyang and A. O’Garra, “IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation,” *Immunity*, vol. 50, no. 4, pp. 871–891, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.020.
- [137] M. Saraiva *et al.*, “Identification of a Macrophage-Specific Chromatin Signature in

- the IL-10 Locus,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 2, pp. 1041–1046, Jul. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.175.2.1041.
- [138] T. Wu, W.-M. Li, and Y.-M. Yao, “Interactions between Autophagy and Inhibitory Cytokines,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 12, no. 7, pp. 884–897, Jun. 2016, doi: 10.7150/ijbs.15194.
- [139] E. J. Hillmer, H. Zhang, H. S. Li, and S. S. Watowich, “STAT3 signaling in immunity,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 31, pp. 1–15, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.001.
- [140] P. J. Murray, “STAT3-mediated anti-inflammatory signalling,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 34, no. 6, pp. 1028–1031, Dec. 2006, doi: 10.1042/BST0341028.
- [141] E. M. Benkhart, M. Siedlar, A. Wedel, T. Werner, and H. W. L. Ziegler-Heitbrock, “Role of Stat3 in Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Gene Expression,” *J. Immunol.*, vol. 165, no. 3, pp. 1612–1617, Aug. 2000, doi: 10.4049/jimmunol.165.3.1612.
- [142] N. Tuteja, M. Chandra, R. Tuteja, and M. K. Misra, “Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2004, no. 4, pp. 227–237, Sep. 2004, doi: 10.1155/S1110724304402034.
- [143] Q. Xue, Y. Yan, R. Zhang, and H. Xiong, “Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 12, p. 3805, Nov. 2018, doi: 10.3390/ijms19123805.
- [144] G. Lu *et al.*, “Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 6676, May 2015, doi: 10.1038/ncomms7676.
- [145] J. Kaur and J. Debnath, “Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 8, pp. 461–472, Aug. 2015, doi: 10.1038/nrm4024.
- [146] N. Mizushima, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, “The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 107–132, Nov. 2011, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- [147] P. Lőrincz and G. Juhász, “Autophagosome-Lysosome Fusion,” *J. Mol. Biol.*, vol. 432, no. 8, pp. 2462–2482, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.jmb.2019.10.028.
- [148] A. S. Dossou and A. Basu, “The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 10, p. 1422, Sep. 2019, doi: 10.3390/cancers11101422.
- [149] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, and K.-L. Guan, “AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 132–141, Feb. 2011, doi: 10.1038/ncb2152.
- [150] M. Holczer, B. Hajdú, T. Lőrincz, A. Szarka, G. Bánhegyi, and O. Kapuy, “Fine-tuning of AMPK–ULK1–mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 17803, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-75030-8.
- [151] P. J. Roach, “AMPK → ULK1 → Autophagy,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 15, pp. 3082–3084, Aug. 2011, doi: 10.1128/MCB.05565-11.
- [152] M. Onishi, K. Yamano, M. Sato, N. Matsuda, and K. Okamoto, “Molecular

- mechanisms and physiological functions of mitophagy,” *EMBO J.*, vol. 40, no. 3, p. e104705, Feb. 2021, doi: 10.15252/embj.2020104705.
- [153] G. Chen, G. Kroemer, and O. Kepp, “Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 200, Mar. 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00200.
- [154] Y. Xu, C. Jagannath, X.-D. Liu, A. Sharafkhaneh, K. E. Kolodziejska, and N. T. Eissa, “Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity,” *Immunity*, vol. 27, no. 1, pp. 135–144, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.immuni.2007.05.022.
- [155] K. Cadwell, “Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 11, pp. 661–675, Nov. 2016, doi: 10.1038/nri.2016.100.
- [156] J. Huang and J. H. Brummell, “Bacteria–autophagy interplay: a battle for survival,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 2, pp. 101–114, Feb. 2014, doi: 10.1038/nrmicro3160.
- [157] J. Harris, “Autophagy and cytokines,” *Cytokine*, vol. 56, no. 2, pp. 140–144, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.022.
- [158] Y. Ge, M. Huang, and Y. Yao, “Autophagy and proinflammatory cytokines: Interactions and clinical implications,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 43, pp. 38–46, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.07.001.
- [159] Z. Ding *et al.*, “LOX-1, mtDNA damage, and NLRP3 inflammasome activation in macrophages: implications in atherogenesis,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 103, no. 4, pp. 619–628, Sep. 2014, doi: 10.1093/cvr/cvu114.
- [160] M.-J. Kim *et al.*, “SESN2/sestrin2 suppresses sepsis by inducing mitophagy and inhibiting NLRP3 activation in macrophages,” *Autophagy*, vol. 12, no. 8, pp. 1272–1291, Aug. 2016, doi: 10.1080/15548627.2016.1183081.
- [161] W. K. E. Ip, N. Hoshi, D. S. Shouval, S. Snapper, and R. Medzhitov, “Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages,” *Science (80-.)*, vol. 356, no. 6337, pp. 513–519, May 2017, doi: 10.1126/science.aal3535.
- [162] J. Wu, X. Li, G. Zhu, Y. Zhang, M. He, and J. Zhang, “The role of Resveratrol-induced mitophagy/autophagy in peritoneal mesothelial cells inflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation triggered by mitochondrial ROS,” *Exp. Cell Res.*, vol. 341, no. 1, pp. 42–53, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.01.014.
- [163] Z. Zhong *et al.*, “NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria,” *Cell*, vol. 164, no. 5, pp. 896–910, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2015.12.057.
- [164] C.-S. Shi *et al.*, “Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction,” *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 3, pp. 255–263, Mar. 2012, doi: 10.1038/ni.2215.
- [165] M. R. Spalinger *et al.*, “PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner,” *Autophagy*, vol. 13, no. 9, pp. 1590–1601, Sep. 2017, doi: 10.1080/15548627.2017.1341453.
- [166] T. Kimura *et al.*, “TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic

- regulators of innate immunity,” *J. Cell Biol.*, vol. 210, no. 6, pp. 973–989, Sep. 2015, doi: 10.1083/jcb.201503023.
- [167] S.-H. Su, Y.-F. Wu, Q. Lin, D.-P. Wang, and J. Hai, “URB597 protects against NLRP3 inflammasome activation by inhibiting autophagy dysfunction in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion,” *J. Neuroinflammation*, vol. 16, no. 1, p. 260, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12974-019-1668-0.
- [168] S. Mehto *et al.*, “The Crohn’s Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy,” *Mol. Cell*, vol. 73, no. 3, pp. 429–445.e7, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2018.11.018.
- [169] J. Harris *et al.*, “Autophagy Controls IL-1 β Secretion by Targeting Pro-IL-1 β for Degradation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 11, pp. 9587–9597, Mar. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.202911.
- [170] L. Iula *et al.*, “Autophagy Mediates Interleukin-1 β Secretion in Human Neutrophils,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. FEB, Feb. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00269.
- [171] J. Ding *et al.*, “Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family,” *Nature*, vol. 535, no. 7610, pp. 111–116, Jul. 2016, doi: 10.1038/nature18590.
- [172] M. Biasizzo and N. Kopitar-Jerala, “Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy,” *Front. Immunol.*, vol. 11, Oct. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.591803.
- [173] V. Turk *et al.*, “Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1824, no. 1, pp. 68–88, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002.
- [174] P. Saftig and J. Klumperman, “Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 9, pp. 623–635, Sep. 2009, doi: 10.1038/nrm2745.
- [175] J. R. Pungerčar *et al.*, “Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity,” *FEBS J.*, vol. 276, no. 3, pp. 660–668, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06815.x.
- [176] J. Rozman, J. Stojan, R. Kuhelj, V. Turk, and B. Turk, “Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process,” *FEBS Lett.*, vol. 459, no. 3, pp. 358–362, Oct. 1999, doi: 10.1016/S0014-5793(99)01302-2.
- [177] S. W. Dahl *et al.*, “Human Recombinant Pro-dipeptidyl Peptidase I (Cathepsin C) Can Be Activated by Cathepsins L and S but Not by Autocatalytic Processing,” *Biochemistry*, vol. 40, no. 6, pp. 1671–1678, Feb. 2001, doi: 10.1021/bi001693z.
- [178] L. Kramer, D. Turk, and B. Turk, “The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 38, no. 10, pp. 873–898, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.tips.2017.06.003.
- [179] E. Vidak, U. Javoršek, M. Vizovišek, and B. Turk, “Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment,” *Cells*, vol. 8, no. 3, p. 264, Mar. 2019, doi: 10.3390/cells8030264.
- [180] R. Vidmar, M. Vizovišek, D. Turk, B. Turk, and M. Fonović, “Protease cleavage site fingerprinting by label-free in-gel degradomics reveals pH-dependent specificity

- switch of legumain,” *EMBO J.*, vol. 36, no. 16, pp. 2455–2465, Aug. 2017, doi: 10.15252/embj.201796750.
- [181] E. Dall and H. Brandstetter, “Structure and function of legumain in health and disease,” *Biochimie*, vol. 122, pp. 126–150, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2015.09.022.
- [182] E. Dall, J. C. Fegg, P. Briza, and H. Brandstetter, “Structure and Mechanism of an Aspartimide-Dependent Peptide Ligase in Human Legumain,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 54, no. 10, pp. 2917–2921, Mar. 2015, doi: 10.1002/anie.201409135.
- [183] S. P. Matthews, I. Werber, J. Deussing, C. Peters, T. Reinheckel, and C. Watts, “Distinct Protease Requirements for Antigen Presentation In Vitro and In Vivo,” *J. Immunol.*, vol. 184, no. 5, pp. 2423–2431, Mar. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0901486.
- [184] R. Maehr *et al.*, “Asparagine Endopeptidase Is Not Essential for Class II MHC Antigen Presentation but Is Required for Processing of Cathepsin L in Mice,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 11, pp. 7066–7074, Jun. 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.11.7066.
- [185] S. Maschalidi *et al.*, “Asparagine Endopeptidase Controls Anti-Influenza Virus Immune Responses through TLR7 Activation,” *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 8, p. e1002841, Aug. 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002841.
- [186] H. A. Lee and Y. S. Seo, “Current knowledge about biomarkers of acute kidney injury in liver cirrhosis,” *Clin. Mol. Hepatol.*, vol. 28, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2022, doi: 10.3350/cmh.2021.0148.
- [187] Y. Xu, P. Lindemann, J. Vega-Ramos, J.-G. Zhang, and J. A. Villadangos, “Developmental Regulation of Synthesis and Dimerization of the Amyloidogenic Protease Inhibitor Cystatin C in the Hematopoietic System,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 14, pp. 9730–9740, Apr. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.538041.
- [188] A. O. Grubb, “Cystatin C-Properties and use as diagnostic marker,” in *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 35, Elsevier, 2001, pp. 63–99.
- [189] M. Alvarez-Fernandez, A. J. Barrett, B. Gerhartz, P. M. Dando, J. Ni, and M. Abrahamson, “Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins Is Due to a Novel Second Reactive Site,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 27, pp. 19195–19203, Jul. 1999, doi: 10.1074/JBC.274.27.19195.
- [190] P. Villa, M. Jiménez, M. C. Soriano, J. Manzanares, and P. Casasnovas, “Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients,” *Crit. Care*, vol. 9, no. 2, pp. 1–5, Feb. 2005, doi: 10.1186/cc3044.
- [191] O. Tenstad, A. B. Roald, A. Grubb, and K. Aukland, “Renal handling of radiolabelled human cystatin C in the rat,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 56, no. 5, pp. 409–414, Jan. 1996, doi: 10.3109/00365519609088795.
- [192] R. Kolodziejczyk, K. Michalska, A. Hernandez-Santoyo, M. Wahlbom, A. Grubb, and M. Jaskolski, “Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 7, pp. 1726–1737, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07596.x.
- [193] A. Hall, K. Håkansson, R. W. Mason, A. Grubb, and M. Abrahamson, “Structural Basis for the Biological Specificity of Cystatin C,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 10,

- pp. 5115–5121, Mar. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.10.5115.
- [194] G. S. Merz *et al.*, “Human cystatin C forms an inactive dimer during intracellular trafficking in transfected CHO cells,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 173, no. 3, pp. 423–432, Dec. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199712)173:3<423::AID-JCP15>3.0.CO;2-C.
- [195] R. Janowski *et al.*, “Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping,” *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 316–20, Apr. 2001, doi: 10.1038/86188.
- [196] U. Ekström, H. Wallin, J. Lorenzo, B. Holmqvist, M. Abrahamson, and F. X. Avilés, “Internalization of cystatin C in human cell lines,” *FEBS J.*, vol. 275, no. 18, pp. 4571–4582, Sep. 2008, doi: 10.1111/J.1742-4658.2008.06600.X.
- [197] S. T. Gren *et al.*, “The protease inhibitor cystatin C down-regulates the release of IL- β and TNF- α in lipopolysaccharide activated monocytes,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 100, no. 4, pp. 811–822, Oct. 2016, doi: 10.1189/jlb.5A0415-174R.
- [198] H. Wallin, M. Abrahamson, and U. Ekström, “Cystatin C Properties Crucial for Uptake and Inhibition of Intracellular Target Enzymes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 23, pp. 17019–17029, Jun. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.453449.
- [199] M. Zi and Y. Xu, “Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis,” *Immunol. Lett.*, vol. 196, pp. 80–90, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.imlet.2018.01.006.
- [200] L. Björck, A. Grubb, and L. Kjellén, “Cystatin C, a human proteinase inhibitor, blocks replication of herpes simplex virus,” *J. Virol.*, vol. 64, no. 2, pp. 941–943, Feb. 1990, doi: 10.1128/jvi.64.2.941-943.1990.
- [201] A. Bandivdekar, V. Vernekar, and S. Velhal, “Evaluation of cystatin C activities against HIV,” *Indian J. Med. Res.*, vol. 141, no. 4, p. 423, 2015, doi: 10.4103/0971-5916.159282.
- [202] P. Pierre and I. Mellman, “Developmental Regulation of Invariant Chain Proteolysis Controls MHC Class II Trafficking in Mouse Dendritic Cells,” *Cell*, vol. 93, no. 7, pp. 1135–1145, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81458-0.
- [203] D. El-Sukkari *et al.*, “The Protease Inhibitor Cystatin C Is Differentially Expressed among Dendritic Cell Populations, but Does Not Control Antigen Presentation,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 10, pp. 5003–5011, Nov. 2003, doi: 10.4049/jimmunol.171.10.5003.
- [204] J. Leung-Tack, C. Tavera, M. C. Gensac, J. Martinez, and A. Colle, “Modulation of phagocytosis-associated respiratory burst by human cystatin C: Role of the N-terminal tetrapeptide Lys Pro Pro Arg,” *Exp. Cell Res.*, vol. 188, no. 1, pp. 16–22, May 1990, doi: 10.1016/0014-4827(90)90272-C.
- [205] A. H. Warfel, D. Zucker-Franklin, B. Frangione, and J. Ghiso, “Constitutive secretion of cystatin C (gamma-trace) by monocytes and macrophages and its downregulation after stimulation,” *J. Exp. Med.*, vol. 166, no. 6, pp. 1912–1917, Dec. 1987, doi: 10.1084/jem.166.6.1912.
- [206] K. H. Freundus, H. Wallin, S. Janciauskiene, and M. Abrahamson, “Macrophage responses to interferon- γ are dependent on cystatin C levels,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 11, pp. 2262–2269, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.biocel.2009.05.005.
- [207] S. Kar, A. Ukil, and P. K. Das, “Signaling events leading to the curative effect of

- cystatin on experimental visceral leishmaniasis: Involvement of ERK1/2, NF- κ B and JAK/STAT pathways,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 3, pp. 741–751, Mar. 2009, doi: 10.1002/eji.200838465.
- [208] B. Tizon *et al.*, “Induction of Autophagy by Cystatin C: A Mechanism That Protects Murine Primary Cortical Neurons and Neuronal Cell Lines,” *PLoS One*, vol. 5, no. 3, p. e9819, Mar. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0009819.
- [209] S. Watanabe, T. Hayakawa, K. Wakasugi, and K. Yamanaka, “Cystatin C protects neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity,” *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 10, pp. e1497–e1497, Oct. 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.459.
- [210] W. Li *et al.*, “Autophagy dysfunction and regulatory cystatin C in macrophage death of atherosclerosis,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 20, no. 9, pp. 1664–1672, Sep. 2016, doi: 10.1111/jcmm.12859.
- [211] J. Zou *et al.*, “Cystatin C as a potential therapeutic mediator against Parkinson’s disease via VEGF-induced angiogenesis and enhanced neuronal autophagy in neurovascular units,” *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 6, pp. e2854–e2854, Jun. 2017, doi: 10.1038/cddis.2017.240.
- [212] S. Watanabe, O. Komine, F. Endo, K. Wakasugi, and K. Yamanaka, “Intracerebroventricular administration of Cystatin C ameliorates disease in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice,” *J. Neurochem.*, vol. 145, no. 1, pp. 80–89, Apr. 2018, doi: 10.1111/jnc.14285.
- [213] S. M. Opal, “The host response to endotoxin, antilipoplysaccharide strategies, and the management of severe sepsis,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 297, no. 5, pp. 365–377, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.ijmm.2007.03.006.
- [214] K. Kinnunen, N. Piippo, S. Loukovaara, M. Hytti, K. Kaarniranta, and A. Kauppinen, “Lysosomal destabilization activates the NLRP3 inflammasome in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs),” *J. Cell Commun. Signal.*, vol. 11, no. 3, pp. 275–279, Sep. 2017, doi: 10.1007/s12079-017-0396-4.
- [215] M. Abrahamson, M. Alvarez-Fernandez, and C.-M. Nathanson, “Cystatins,” *Biochem. Soc. Symp.*, vol. 70, no. 70, pp. 179–199, Sep. 2003, doi: 10.1042/bss0700179.
- [216] K. Maher *et al.*, “A Role for Stefin B (Cystatin B) in Inflammation and Endotoxemia,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 46, pp. 31736–31750, Nov. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.609396.
- [217] M. Mussbacher *et al.*, “Cell type specific roles of nf-kb linking inflammation and thrombosis,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. FEB, p. 85, 2019, doi: 10.3389/FIMMU.2019.00085/BIBTEX.
- [218] N. Kopitar-Jerala, “The role of cystatins in cells of the immune system,” *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 27, pp. 6295–6301, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.055.
- [219] V. Turk, “Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance,” *Front. Biosci.*, vol. Volume, no. 13, p. 5406, May 2008, doi: 10.2741/3089.
- [220] Š. Magister and J. Kos, “Cystatins in Immune System,” *J. Cancer*, vol. 4, no. 1, pp. 45–56, 2013, doi: 10.7150/jca.5044.
- [221] M. Bokarewa *et al.*, “Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its

- cytokine-generating properties.” *J. Rheumatol.*, vol. 34, no. 6, pp. 1293–1301, 2007.
- [222] A. Bäcklund *et al.*, “Cystatin C influences the autoimmune but not inflammatory response to cartilage type II collagen leading to chronic arthritis development,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 13, no. 2, pp. 1–14, Mar. 2011, doi: 10.1186/AR3298/FIGURES/6.
- [223] E. Bengtsson *et al.*, “Lack of the Cysteine Protease Inhibitor Cystatin C Promotes Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 10, pp. 2151–2156, Oct. 2005, doi: 10.1161/01.ATV.0000179600.34086.7d.
- [224] G.-P. Shi *et al.*, “Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms,” *J. Clin. Invest.*, vol. 104, no. 9, pp. 1191–1197, Nov. 1999, doi: 10.1172/JCI7709.
- [225] J. A. Nemzek, K. M. S. Hugunin, and M. R. Opp, “Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being,” *Comparative Medicine*, vol. 58, no. 2. American Association for Laboratory Animal Science, pp. 120–128, Apr. 2008, Accessed: Mar. 31, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC2703167/.
- [226] T. Suzuki *et al.*, “Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE,” *Blood*, vol. 96, no. 7, pp. 2584–2591, Oct. 2000, doi: 10.1182/blood.V96.7.2584.
- [227] C. M. Zajd *et al.*, “Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: The Questions Asked Dictate the Cell Type Used,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 269, Feb. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00269.
- [228] M. Biasizzo *et al.*, “Cystatin C Deficiency Increases LPS-Induced Sepsis and NLRP3 Inflammasome Activation in Mice,” *Cells*, vol. 10, no. 8, p. 2071, Aug. 2021, doi: 10.3390/cells10082071.
- [229] G. Lopez-Castejon, J. Theaker, P. Pelegrin, A. D. Clifton, M. Braddock, and A. Surprenant, “P2X 7 Receptor-Mediated Release of Cathepsins from Macrophages Is a Cytokine-Independent Mechanism Potentially Involved in Joint Diseases,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 4, pp. 2611–2619, Aug. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.1000436.
- [230] M. Montaser, G. Lalmanach, and L. Mach, “CA-074, But Not Its Methyl Ester CA-074Me, Is a Selective Inhibitor of Cathepsin B within Living Cells,” *Biol. Chem.*, vol. 383, no. 7–8, pp. 1305–1308, Jan. 2002, doi: 10.1515/BC.2002.147.
- [231] S. L. Cassel *et al.*, “The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 26, pp. 9035–9040, Jul. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0803933105/ASSET/51E411DD-847F-4578-B8C0-5ED5D0394147/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ9990837210004.JPEG.
- [232] M. Rashidi *et al.*, “The Pyroptotic Cell Death Effector Gasdermin D Is Activated by Gout-Associated Uric Acid Crystals but Is Dispensable for Cell Death and IL-1 β Release,” *J. Immunol.*, vol. 203, no. 3, pp. 736–748, Aug. 2019, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1900228.
- [233] L. Verdot *et al.*, “Cystatins Up-regulate Nitric Oxide Release from Interferon- γ -activated Mouse Peritoneal Macrophages,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 45, pp. 28077–28081, Nov. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.45.28077.

- [234] L. Verdot, G. Lalmanach, V. Vercruyssen, J. Hoebeke, F. Gauthier, and B. Vray, "Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon- γ -activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis," *Eur. J. Biochem.*, vol. 266, no. 3, pp. 1111–1117, Dec. 1999, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00964.x.
- [235] K. Maher, J. Završnik, B. Jerič-Kokelj, O. Vasiljeva, B. Turk, and N. Kopitar-Jerala, "Decreased IL-10 expression in stefin B-deficient macrophages is regulated by the MAP kinase and STAT-3 signaling pathways," *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 5, pp. 720–726, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.015.
- [236] Y. M. Kim, R. V. Talanian, J. Li, and T. R. Billiar, "Nitric oxide prevents IL-1 β and IFN- γ -inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1 β -converting enzyme)," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 8, pp. 4122–8, Oct. 1998, Accessed: May 03, 2022. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9780184/>.
- [237] B. B. Mishra *et al.*, "Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β ," *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 1, pp. 52–60, Jan. 2013, doi: 10.1038/NI.2474.
- [238] K. Mao *et al.*, "Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock," *Cell Res.*, vol. 23, no. 2, pp. 201–212, Feb. 2013, doi: 10.1038/CR.2013.6.
- [239] E. Hernandez-Cuellar *et al.*, "Cutting Edge: Nitric Oxide Inhibits the NLRP3 Inflammasome," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 11, pp. 5113–5117, Dec. 2012, doi: 10.4049/JIMMUNOL.1202479.

Bibliografija

Objave v povezavi z delom

M. Biasizzo *et al.*, "Cystatin C Deficiency Increases LPS-Induced Sepsis and NLRP3 Inflammasome Activation in Mice," *Cells*, vol. 10, no. 8, p. 2071, Aug. 2021, doi: 10.3390/cells10082071.

Članki v revijah

M. Biasizzo and N. Kopitar-Jerala, "Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy," *Front. Immunol.*, vol. 11, Oct. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.591803.

Prispevki na konferenci

M. Biasizzo, M. Trstenjak-Prebanda, J. Završnik, A. Grubb, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "Cystatin C deficiency is associated with increased NLRP3 inflammasome activation and LPS-induced sepsis", *The 45th FEBS Congres, Molecules of Life: Towards New Horizons*, online, 3. – 8. julij 2021

E. Vidak, M. Vizovišek, R. Vidmar, N. Kavčič, M. Biasizzo, M. Fonović, B. Turk, "Extracellular substrates of apoptotic and inflammatory caspases in cancer", *The 45th FEBS Congres, Molecules of Life: Towards New Horizons*, online, 3. – 8. julij 2021

M. Biasizzo, M. Trstenjak –Prebanda, J. Završnik, A. Grubb, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "Impaired autophagy and increased susceptibility to LPS induced sepsis in cystatin C-deficient mice", *38th Winter School on Proteinases and Inhibitors 2021*, online, 24. – 26. februar 2021

M. Trstenjak-Prebanda, M. Biasizzo, J. Završnik, V. Brault, Y. Hearult, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "The role of cystatins in inflammasome activation and sepsis", *7th Slovenian Pneumology, Allergology and Immunology Congress*, online, 10. – 12. december 2020

E. Vidak, M. Vizovišek, R. Vidmar, N. Kavčič, M. Biasizzo, M. Fonović, B. Turk, "Extracellular substrates of apoptotic caspases in cancer", *6th Conference on Mitochondria, Apoptosis and Cancer (MAC'19)*, Praga, Češka, 17. – 20. september 2019

M. Trstenjak-Prebanda, M. Biasizzo, J. Završnik, V. Brault, Y. Héroult, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "Anti inflammatory role of cystatins and mitochondrial function", *14th Conference on Mitochondrial Physiology, Mitochondrial function: changes during life cycle and in noncommunicable diseases*, Beograd, Srbija, 13. – 16. oktober 2019

M. Biasizzo, M. Trstenjak-Prebanda, J. Završnik, A. Grubb, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "The role of cystatin C in inflammatory response and endotoxemia", *FEBS Workshop: 16. International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control*, Portorož, Slovenija, 8. – 12. september 2018

- M. Trstenjak-Prebanda, M. Biasizzo, J. Završnik, V. Brault, Y. Hérault, B. Turk, Nataša Kopitar-Jerala, "Anti-inflammatory effect of cysteine cathepsin inhibitor stefin B is mediated by autophagy", *FEBS Workshop: 16. International Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control*, Portorož, Slovenija, 8. – 12. september 2018
- M. Biasizzo, M. Trstenjak –Prebanda, J. Završnik, A. Grubb, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "The role of cystatin C in inflammatory response and endotoxemia", *35th Winter School on Proteinases and Inhibitors 2018*, Tiers, Italija, 28. februar – 4. marec 2018
- M. Trstenjak-Prebanda, M. Biasizzo, K. Maher, J. Završnik, V. Brault, Y. Hérault, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "The role of cystatins in non-canonical NLRP3 inflammasome activation", *12th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation*, Bled, Slovenija 20. – 23. september 2017
- M. Biasizzo, M. Trstenjak-Prebanda, J. Završnik, A. Grubb, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "The role of cystein C in inflammasome activation and endotoxemia", *12th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation*, Bled, Slovenija 20. – 23. september 2017
- M. Biasizzo, M. Trstenjak-Prebanda, J. Završnik, A. Grubb, B. Turk, N. Kopitar-Jerala, "The role of cystatin C in inflammation and endotoxemia", *XVth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control*, Portorož, Slovenija, 17. – 21. September 2016

Biografija

Monika Biasizzo je magistrski študij zaključila na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo septembra 2016 in s tem pridobila naziv magistrica biokemije. Oktobra 2016 se je vpisala na podiplomski študij Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana, smer Nanoznanosti in nanotehnologije (NANO3) pri mentorici doc. dr. Nataši Kopitar-Jerala. Istočasno se je zaposlila Institutu »Jožef Stefan«, na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, kot mlada raziskovalka. Avtorica je opravila tečaj za usposabljanje za delo z živalmi v raziskovalne in izobraževalne namene (izvajalec in vodja postopkov) in se udeležila številnih konferenc ter delavnic v Sloveniji in tujini.

