

Paulina Kamińska

**Rola receptora sortującego SorLA w polaryzacji fenotypu
mikrogleju w glejaku**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Neurobiologii Molekularnej
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego, PAN
oraz Grupie Badawczej Neurobiologii Komórkowej
Uniwersytetu Warszawskiego

PROMOTOR:

dr hab. Anna Malik

Niniejsza praca nie powstałaby, gdyby nie zaangażowanie i pomoc wielu osób, którym chciałabym w tym miejscu podziękować.

*Szczególne podziękowania kieruję w stronę **dr hab. Anny Malik**, która zapewniła mi doskonałe warunki i przestrzeń do rozwoju naukowego. Dziękuję za powierzone mi zaufanie, wiele przeprowadzonych dyskusji na temat każdego naukowego pomysłu, wnikliwą ocenę każdej złożonej aplikacji czy wniosku oraz okazywane wsparcie i wiarę w moje możliwości.*

*Dziękuję **prof. dr hab. Bożenie Kamińskiej-Kaczmarek** za umożliwienie mi pracy w swoim laboratorium, naukowe dyskusje, a także za pomoc w tworzeniu niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję wszystkim **koleżankom i kolegom z Laboratorium Neurobiologii Molekularnej Instytutu Nenckiego oraz Grupy Badawczej Neurobiologii Komórkowej Uniwersytetu Warszawskiego**, za tworzenie środowiska pracy, do którego codziennie przychodziło się z przyjemnością. Ogromnie doceniam wszystkie Wasze rady i komentarze dotyczące prezentowanych przeze mnie wyników, dzięki którym ta praca mogła przybrać taką formę. W szczególności chciałabym podziękować:*

***Dr. Aleksandrze Ellert-Miklaszewskiej, dr. Katarzynie Poleszak** oraz **Paulinie Pilanc-Kudlek**, za nieocenioną pomoc w planowaniu doświadczeń, jak również za wiele ciekawych dyskusji (również tych nienaukowych). Dziękuję Wam także za okazane wsparcie w trakcie przeprowadzania doświadczeń cytometrycznych.*

***Monice Dźwigońskiej** za to, że zawsze mogłam na nią liczyć, oraz że była najlepszą kompanią w przeżywaniu doktoranckiej codzienności.*

***Dr. Kamilowi Wojnickiemu**, za jego zaraźliwy entuzjazm, pomocne rady w kwestii sposobu prezentowania wyników i stałe powtarzanie mi, że mogę wszystko (w tym zaplanować pracę tak, żeby zdążyć na BodyAttack).*

***Dr. Salwadorowi Cyranowskiemu**, którego zaangażowanie we wspólnie przeprowadzane eksperymenty cytometryczne było bezcenne. Dziękuję, że wprowadziłeś mnie w podstawy analizy danych i cierpliwie odpowiadałeś na każde pytanie.*

***Dr. Aleksandrze Tempes, dr. Ewelinie Ziemińskiej** oraz **Tomaszowi Obrębskiemu**, za niejednokrotną pomoc w realizacji doświadczeń i gwarancję dawki humoru i śmiechu.*

*Dziękuję także moim Przyjaciółom, którzy potrafili sprawić, że chwile zwątpienia szybko zniknęły. W szczególności dziękuję moim najwierniejszym kibicom: **Agnieszce, Weronice, Martynie, Ewelinie, Kali** oraz mojemu bratu, **Michałowi**.*

*Szczególnie dziękuję mojemu narzeczonemu **Mikołajowi**, który mimo zupełnie odmiennej specjalizacji zawsze z uwagą i zaangażowaniem słuchał o moich badaniach i cieszył się z najmniejszego sukcesu.*

***Pracę dedykuję moim Rodzicom, Ewie i Marcinowi**. Bez Waszego wsparcia i zapewnienia mi warunków do rozwoju i realizowania swoich naukowych zainteresowań od wczesnych etapów edukacji nie byłoby mnie w tym miejscu.*

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zrealizowane zostały dzięki następującym źródłom finansowania:

- Narodowe Centrum Nauki, OPUS 2020/37/B/NZ3/00761
(kierownik: dr hab. Anna Malik)
- Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, HOMING, POIR.04.04.00 00 5CEF/18 00
(kierownik: dr hab. Anna Malik)
- Narodowe Centrum Nauki, PRELUDIUM 2023/49/N/NZ4/01690
(kierownik: mgr Paulina Kamińska)
- Uniwersytet Warszawski, Działanie I.3.4. Programu Inicjatywa Doskonałości – Uniwersytet Badawczy (kierownik: dr hab. Anna Malik)
- Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, START 2025
(stypendium przyznane mgr Paulinie Kamińskiej)

Część wyników zaprezentowanych w poniższej rozprawie doktorskiej została opublikowana w pracy:

Kaminska P, Ovesen PL, Jakiel M, Obrebski T, Schmidt V, Draminski M, Bilska AG, Bieniek M, Anink J, Paterczyk B, Jensen AMG, Piątek S, Andersen OM, Aronica E, Willnow TE, Kaminska B, Dabrowski MJ, & Malik AR. (2024). SorLA restricts TNF α release from microglia to shape a glioma-supportive brain microenvironment. *EMBO Reports*, 25(5), 2278–2305

STRESZCZENIE

Glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma*, GBM) jest najczęstszym i najbardziej agresywnym nowotworem złośliwym mózgu występującym u osób dorosłych, a mediana czasu przeżycia pacjentów wynosi jedynie 14 miesięcy. Charakterystyczną cechą GBM jest jego złożone mikrośrodowisko, którego znaczną część stanowią mikroglej i makrofagi, komórki układu odpornościowego, które w teorii powinny walczyć z nowotworem. Jednakże czynniki wydzielane przez komórki glejaka promują polaryzację fenotypu mikrogleju i makrofagów, przez co zamiast hamować rozwój guza, wspierają one jego wzrost i ograniczają odpowiedź przeciwnowotworową, co czyni je głównymi mediatorami immunosupresyjnego charakteru mikrośrodowiska GBM. Tak przeprogramowane mikroglej i makrofagi są zbiorczo określane mianem mikrogleju i makrofagów związanych z glejakiem (ang. *glioma-associated microglia and macrophages*, GAMs) i mogą stanowić nawet do 30% masy guza. Odkrycie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za kształtowanie pronowotworowych właściwości GAMs jest więc kluczowe dla opracowania nowych strategii terapeutycznych GBM.

Białko SorLA (kodowane przez gen *SORL1*) jest wewnątrzkomórkowym receptorem sortującym, który transportuje białka między różnymi organellami komórkowymi, wpływając tym samym na ich ostateczną lokalizację. Początkowo uważano, że w mózgu SorLA występuje wyłącznie w neuronach, jednak później ekspresja receptora zidentyfikowana została również w komórkach glejowych, w tym w mikrogleju. Co ciekawe, na podstawie publicznie dostępnych danych pochodzących z analiz transkryptomu ludzkich próbek GBM, SorLA wydaje się odgrywać istotną rolę w kształtowaniu funkcjonalnych właściwości GAMs. Zgodnie z tą obserwacją, ogólnym celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu SorLA na właściwości GAMs, a w szczególności mikrogleju.

Przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej doświadczenia z wykorzystaniem mysiego pierwotnego mikrogleju wykazały, że poziom transkryptu *Sorl1* zależy od typu aktywacji komórek. Ponadto okazało się, iż brak SorLA wpływa na wzmożone wydzielanie przez mikroglej czynników prozapalnych w porównaniu do komórek typu dzikiego (ang. *wild type*, WT), w tym cytokiny TNF- α . Mikroglej pozbawiony SorLA (SorLA-KO) pod

wpływem współhodowli z komórkami mysiej linii glejaka charakteryzuje się również wyższym poziomem białek związanych z odpowiedzią interferonową i fagocytozą, co świadczy o ich prozapalnej aktywacji. Odkrycia te doprowadziły do postawienia hipotezy, że brak SorLA może odblokowywać prozapalny potencjał mikrogleju i tym samym wpływać na charakter mikrośrodowiska glejaka. Wykorzystując mysi model glejaka zaobserwowano, że myszy SorLA-KO rozwijają mniejsze guzy mózgu w porównaniu do zwierząt WT, czemu towarzyszą zmiany w morfologii mikrogleju sugerujące jego aktywację prozapalną. Jednocześnie GAMs z mikrośrodowiska SorLA-KO charakteryzują się podwyższoną ekspresją genów związanych z odpowiedzią interferonową, podczas gdy poziom transkryptów charakterystycznych dla funkcji wspierających nowotwór jest w tych komórkach obniżony. W mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO zaobserwowano także podwyższony poziom markerów związanych z nekroptozą, programowanym typem śmierci komórkowej, a także zmiany w profilu infiltrujących mikrośrodowisko nowotworu komórek układu odpornościowego.

Podsumowując, przedstawione badania wskazują, że SorLA odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu właściwości GAMs, a jej brak odblokowuje przeciwnowotworową odpowiedź tych komórek, co wpływa na ogólny potencjał mikrośrodowiska glejaka i w efekcie hamuje wzrost guza.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common and most aggressive brain malignancy in adults, with a median patients' survival of only 14 months. A hallmark feature of GBM is its complex microenvironment, largely composed of microglia and macrophages: immune cells which in theory should fight with the tumor. However, factors secreted by glioma cells drive the phenotypic polarization of microglia and macrophages, so instead of limiting tumor development, they support its growth and suppress anti-tumorigenic response. As a result, these cells constitute key mediators of the immunosuppressive nature of the GBM microenvironment. Such re-programmed microglia and macrophages are collectively called glioma-associated microglia and macrophages (GAMs) and may account for up to 30% of the tumor mass. Therefore, finding molecular mechanisms responsible for shaping tumor-supportive properties of GAMs is crucial for the development of new therapeutic strategies of GBM.

SorLA protein (encoded by *SORL1* gene) is an intracellular sorting receptor which transports its protein cargoes between different subcellular organelles and therefore defines their final localization. While the presence of SorLA was initially thought to be limited to neurons in the brain, it was later discovered to be expressed in glial cells as well, including microglia. Interestingly, according to publicly available data from analysis of human GBM samples transcriptomes, SorLA seems to be important in shaping functional properties of GAMs. In line with this notion, the overall aim of this study was to decipher the influence of SorLA on the properties of GAMs, in particular microglia.

Experiments performed in the frame of the PhD dissertation revealed that the level of *Sorl1* transcript in primary mouse microglia depends on the activation mode of the cells. Furthermore, it turned out that lack of SorLA unlocks the ability of microglia to release pro-inflammatory factors, including TNF- α , when compared to wild type cells (WT). Microglia depleted of SorLA (SorLA-KO) upon co-culture with mouse glioma cells are characterized by increased level of proteins linked to interferons-related response and phagocytosis, which indicates their pro-inflammatory activation. These findings raised the hypothesis that the lack of SorLA may unlock the pro-inflammatory potential of microglia and thereby could influence the properties of glioma microenvironment. Indeed, using

mouse model of glioma it was observed that SorLA-KO mice develop smaller brain tumors when compared to WT animals, which coincides with changes in microglia morphology suggesting their inflammatory activation. Simultaneously, GAMs from SorLA-KO microenvironment are characterized by increased expression of genes linked to interferons-related response, while the levels of transcripts linked to tumor-supportive functions of the cells are decreased. Finally, in glioma microenvironment of SorLA-KO mice, increased levels of markers related to necroptotic type of cell death are observed, as well as changes in the profile of infiltrating immune cells.

In summary, presented research indicates that SorLA is a key player in shaping the properties of GAMs and its depletion unlocks their anti-tumor response which influences the overall potential of glioma microenvironment and as a result, prevents tumor growth.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	15
I. WSTĘP	19
1.1. Epidemiologia nowotworów mózgu u osób dorosłych	19
1.2. Wybrane strategie terapeutyczne wykorzystywane w leczeniu glejaka wielopostaciowego.....	22
1.3. Mikroglej i makrofagi jako element mikrośrodowiska wspierający rozwój glejaka wielopostaciowego.....	24
1.4. Pęcherzykowy system transportowy komórek eukariotycznych.....	29
1.5. Receptory z domeną VPS10P.....	31
1.6. Neuronalne funkcje receptorów z domeną VPS10P	33
1.7. Rola receptorów VPS10P w komórkach nieneuronalnych	35
1.8. Potencjalna rola receptora SorLA w kształtowaniu właściwości GAMs.....	37
II. CEL PRACY	41
III. MATERIAŁY I METODY	43
3.1. Materiały używane w doświadczeniach	43
3.2. Roztwory używane w doświadczeniach.....	50
3.3. Pierwotne hodowle mysiego mikrogleju	51
3.3.1. Stymulacje mikrogleju	53
3.3.2. Barwienia immunofluorescencyjne mikrogleju	53
3.3.3. Przygotowanie pożywki hodowlanej do analiz biochemicznych.....	54
3.3.4. Test oceniający zdolności do fagocytozy	55
3.4. Hodowla ustalonych linii komórkowych	55
3.4.1. Transfekcja komórek linii HEK293 i koimmunoprecypitacja	57
3.4.2. Współhodowla pierwotnego mysiego mikrogleju z komórkami mysiego glejaka	58

3.4.3.	Przygotowywanie komórek linii GL261 do stereotaktycznych domózgowych implantacji <i>in vivo</i>	60
3.5.	Mysi model glejaka	60
3.5.1.	Stereotaktyczne domózgowe implantacje komórek glejaka	61
3.5.2.	Przyżyciowe monitorowanie wielkości mysich guzów mózgu.....	62
3.5.3.	Uśmiercanie zwierząt	62
3.5.4.	Przygotowanie homogenatów mysich półkul mózgów po implantacji komórek glejaka	63
3.5.5.	Izolacja rozpuszczalnej i błonowej frakcji białek z homogenatów mysich mózgów po implantacji komórek glejaka	64
3.5.6.	Barwienia immunofluorescencyjne skrawków mysich mózgów	64
3.5.7.	Dysocjacja mózgów przed analizą cytometryczną i sortowaniem komórek mieloidalnych	65
3.5.8.	Cytometria przepływowa	66
3.5.9.	Sortowanie komórek mieloidalnych CD11b ⁺	68
3.5.9.1.	Izolacja RNA oraz białek z wysortowanych komórek CD11b ⁺	70
3.6.	Testy ELISA.....	70
3.7.	Elektroforeza i Western blot	71
3.8.	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją	72
3.9.	Analiza zdjęć preparatów immunofluorescencyjnych wykonanych z użyciem mikroskopii.....	73
3.9.1.	Analiza morfologii mikrogleju w mysim mózgu	73
3.9.2.	Pomiar kolokalizacji TNF- α z markerami poszczególnych kompartmentów komórkowych w mikrogleju	74
3.9.3.	Określenie ilości aktywnie proliferującego mikrogleju <i>in vitro</i>	74
3.9.4.	Określenie ilości aktywnie proliferującego mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka <i>in vivo</i>	74
3.9.5.	Analiza infiltracji komórek układu odpornościowego do mikrośrodowiska glejaka	75
3.9.6.	Ocena zdolności mikrogleju WT i SorLA-KO do fagocytozy.....	75

3.10.	Analiza statystyczna	76
IV.	WYNIKI	77
4.1.	Określenie mechanizmów regulujących ekspresję <i>Sorl1</i> w pierwotnym mysim mikrogleju	77
4.1.1.	Ocena wpływu wybranych czynników na poziom ekspresji <i>Sorl1</i> w mysim mikrogleju	78
4.2.	Identyfikacja białek wydzielanych przez mikroglej w sposób zależny od SorLA	79
4.3.	TNF- α jako ligand wiązany przez SorLA	83
4.3.1.	Identyfikacja domeny SorLA odpowiedzialnej za interakcję z TNF- α	85
4.4.	Określenie wpływu receptora SorLA na komórkową dystrybucję TNF- α w mysim mikrogleju.....	88
4.5.	Porównanie proteomu mikrogleju WT i SorLA-KO hodowanego w obecności komórek mysiego glejaka.....	91
4.5.1.	Walidacja wyników dotyczących zdolności mikrogleju WT i SorLA-KO do proliferacji	94
4.5.2.	Ocena wpływu SorLA na zdolność mikrogleju do fagocytozy zależnej od receptorów Fc γ	94
4.6.	Określenie wpływu mikrogleju WT i SorLA-KO na komórki mysiego glejaka	95
4.7.	Zdefiniowanie wpływu SorLA na wielkość guzów w mysim modelu glejaka...	97
4.8.	Określenie wpływu receptora SorLA na właściwości mikrogleju w mysim mikrośrodowisku glejaka	98
4.8.1.	Ocena morfologii mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO.....	99
4.8.2.	Ustalenie ilości aktywnie proliferującego mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO.....	101
4.8.3.	Analiza poziomu markerów aktywacji GAMs w objętych glejakiem półkulach mózgów myszy WT i SorLA-KO	102
4.8.4.	Oznaczenie poziomu ekspresji genów związanych z polaryzacją fenotypu GAMs w komórkach pochodzących z mikrośrodowiska glejaka myszy WT i SorLA-KO	104

4.9.	Porównanie ilości CD14, SPP1 oraz TNF- α pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO.....	106
4.10.	Analiza poziomu markerów wybranych rodzajów programowanej śmierci komórkowej między mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO.....	107
4.11.	Porównanie mikrośrodowiskia glejaka myszy WT oraz SorLA-KO pod kątem obecności komórek układu odpornościowego	109
4.11.1.	Barwienia immunofluorescencyjne skrawków mózgów myszy WT i SorLA-KO po implantacji komórek glejaka	109
4.11.2.	Analiza cytometryczna komórek pochodzenia limfo- i mieloidalnego w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO.....	111
4.12.	Porównanie liczby komórek układu odpornościowego we krwi obwodowej myszy WT i SorLA-KO po implantacji komórek glejaka	114
V.	DYSKUSJA	117
5.1.	Wykorzystanie w doświadczeniach <i>in vivo</i> myszy pozbawionych SorLA we wszystkich komórkach organizmu	117
5.2.	Regulacja ekspresji genu <i>Sorl1</i> w mysim mikrogleju.....	119
5.3.	Wpływ SorLA na wydzielane przez mikroglej białka w kontekście glejaka....	121
5.4.	Rola SorLA w kształtowaniu właściwości mikrogleju pod wpływem komórek glejaka	124
5.5.	Ocena poziomu markerów śmierci komórkowej w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO	129
5.6.	Analiza populacji komórek układu odpornościowego infiltrujących mikrośrodowisko glejaka myszy WT i SorLA-KO.....	130
5.7.	Potencjalne konsekwencje wzmożonego stanu zapalnego w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO i perspektywy zablokowania funkcji receptora w mikrogleju	132
VI.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	135
VII.	WYKAZ PIŚMIENNICTWA	137
VIII.	PUBLIKACJE DOKTORANTKI.....	167

WYKAZ SKRÓTÓW

2-HG – 2-hydroksyglutaran

A β – amyloid β

AC-like (ang. *astrocyte-like*) – stan podobny do astrocytów

AD (ang. *Alzheimer's disease*) – choroba Alzheimera

APC (ang. *antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen

APP (ang. *amyloid precursor protein*) – białko prekursorowe amyloidu

ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) – Amerykańska Kolekcja Kultur Komórkowych

AU (ang. *arbitrary units*, AU) – jednostki arbitralne

BBB (ang. *blood-brain barrier*) – bariera krew-mózg

BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*) – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego

BSA (ang. *bovine serum albumin*) – albumina surowicy bydlęcej

CAR-T (ang. *chimeric antigen receptor T cell*) – limfocyty T z chimerowym receptorem antygenowym

CCR2 (ang. *C-C chemokine receptor type 2*) – receptor chemokiny C-C typu 2

CD (ang. *cluster of differentiation*) – białka CD

CD14 – białko CD14

CD44 – białko CD44

cDC (ang. *conventional dendritic cells*) – konwencjonalne komórki dendrytyczne

CDK4 (ang. *cyclin dependent kinase 4*) – kinaza 4 zależna od cykliny

cDNA (ang. *coding DNA*) – kodujące DNA

CR (ang. *complement-type repeats*) – powtórzenia typu dopełniacza

CR (ang. *complement receptor*) – receptor dopełniacza

CSF-1R (ang. *colony stimulating factor 1 receptor*) – receptor 1 czynnika stymulującego kolonie

CTL (ang. *cytotoxic T cells*) – limfocyty T cytotoksyczne

CX3CL1 (ang. *CX3C chemokine ligand 1*) – fraktalina

CX3CR1 – receptor fraktaliny

CXCL16 (ang. *CXC ligand chemoreceptor 16*) – białko CXCL16

DAMP (ang. *danger-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne związane z zagrożeniem

DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) – pożywka Eagle'a w modyfikacji Dulbecco

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

ECL (ang. *electrochemiluminescence*) – elektrochemiluminescencja

ECM (ang. *extracellular matrix*) – macierz zewnątrzkomórkowa

EGF (ang. *epidermal growth factor*) – czynnik wzrostu naskórka

EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) – receptor czynnika wzrostu naskórka

ER (ang. *endoplasmic reticulum*) – siateczka śródplazmatyczna

ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) – kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi

FACS (ang. *fluorescence activated cell sorting*) – sortowanie komórek aktywowane fluorescencją

FBS (ang. *fetal bovine serum*) – bydlęca surowica płodowa

FcγR (ang. *Fcγ receptors for immunoglobulins*) – receptory Fcγ dla immunoglobulin

FDA (ang. *Food and Drug Agency*) – Agencja Żywności i Leków

FDR (ang. *false discovery rate*) – współczynnik fałszywych odkryć

FMO (ang. *fluorescence minus one*) – kontrola pozbawiona jednego fluoroforu

FNIII (ang. *fibronectin III*) – fibronektyna III

G (ang. *grade*) – stopień klasyfikacji ludzkich glejaków

Gal-3 (ang. *galectin-3*) – galektyna-3

GAMs (ang. *glioma-associated microglia and macrophages*) – mikroglej i makrofagi związane z glejakiem

GAPDH (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

GBM (ang. *glioblastoma*) – glejak wielopostaciowy

GFP (ang. *green fluorescence protein*) – białko zielonej fluorescencji

GL261 (ang. *glioma 261*) – mysia linia glejaka 261

GM130 (ang. *Golgi matrix protein 130*) – białko macierzy Golgiego 130

GPX4 (ang. *glutathione peroxidase 4*) – peroksydaza glutationu 4

HBSS (ang. *Hanks' Balanced Salt Solution*) – zrównoważony roztwór soli fizjologicznej Hanka

HEK293 (ang. *human embryonic kidney 293 cells*) – ludzka embrionalna linia komórkowa nerki 293

HRP (ang. *horseradish peroxidase*) – peroksydaza chrzanowa

HS (ang. *horse serum*) – surowica końska

IBA1 (ang. *Ionized Calcium-Binding Adaptor Molecule 1*) – białko IBA1

IDH1/2 (ang. *isocitrate dehydrogenase 1/2*) – dehydrogenaza cytrynianowa 1/2

IFITs (ang. *interferon-induced proteins with tetrcopeptides*) – białka z grupy IFIT

IFN (ang. *interferons*) – interferony

IFN-γ – interferon-γ

IFNγR – receptor dla interferonu-γ

IL-10 (ang. *interleukin-10*) – interleukina-10

IL-6 (ang. *interleukin-6*) – interleukina-6

ISG (ang. *interferon-stimulated genes*) – geny stymulowane przez interferon

LAMP1 (ang. *Lysosome-associated membrane glycoprotein 1*) – białko LAMP1

LDLR (ang. *low-density lipoprotein receptors*) – receptory lipoprotein o niskiej gęstości

LKE – Lokalna Komisja Etyczna

LPS (ang. *lipopolysaccharide*) – lipopolisacharyd

M-CSF (ang. *macrophage colony-stimulating factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów

MGMT (ang. *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*) – metylotransferaza DNA O⁶-metyloguaniny

MLKL (ang. *mixed lineage kinase domain like pseudokinase*) – białko MLKL

MMP9 (ang. *metalloproteinase 9*) – metaloproteinaza 9

MPO (ang. *myeloperoxidase*) – mieloperoksydaza

mRNA (ang. *messenger ribonucleic acid*) – informacyjny kwas rybonukleinowy

MS (ang. *mass spectrometry*) – spektrometria mas

MVB (ang. *multivesicular body*) – ciało wielopęcherzykowe

NDS (ang. *normal donkey serum*) – normalna surowica ośła

NF1 (ang. *Neurofibromin-1*) – neurofibromina 1

NGF (ang. *nerve growth factor*) – czynnik wzrostu nerwów

NK (ang. *natural killer cells*) – komórki naturalni zabójcy

NPC-like (ang. *neural-progenitor like*) – stan podobny do progenitorów komórek neuronalnych

NRG1 - neuregulina-1

OPC-like (ang. *oligodendrocyte-progenitor like*) – stan podobny do progenitorów oligodendrocytów

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

P/S – penicylina/streptomycyna

p53 (ang. *tumor suppressor protein 53*) – białko supresorowe nowotworu 53

P75NTR (ang. *p75 neurotrophin receptor*) – receptor neurotrofinowy p75

PAMP (ang. *patohogen-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne związane z patogenami

PARP (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase-1*) – białko PARP

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) – buforowany roztwór soli fizjologicznej

PDGFRA (ang. *platelet-derived growth factor receptor A*) – receptor alfa dla płytkowego czynnika wzrostu

PFA (ang. *paraformaldehyde*) – paraformaldehyd

PLL (ang. *poly-L-lysine*) – poli-L-lizyna

PMA (ang. *phorbol myristate acetate*) – forbol 12-mirystynian 13-octan

qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

RIP1 (ang. *receptor-interacting protein kinase 1*) – białko RIP1

RIP3 (ang. *receptor-interacting protein kinase 3*) – białko RIP3

S.E.M. (ang. *standard error mean*) – błąd standardowy średniej

scRNA-seq (ang. *single-cell RNA sequencing*) – sekwencjonowanie RNA pojedynczej komórki

SDS-PAGE (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) – rozdział elektroforetyczny w żelu denaturującym

SNP (ang. *single nucleotide polymorphisms*) – polimorfizmy pojedynczego nukleotydu

SorLA-KO (ang. *SorLA-knockout*) – pozbawione SorLA

SPP1 (ang. *secreted phosphoprotein 1*) – osteopontyna

STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*) – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji

TBS (ang. *Tris-buffered saline*) – roztwór soli buforowanej Tris

tdT (ang. *tdTomato*) – białko fluorescencyjne tdTomato

TERT (ang. *telomerase reverse transcriptase*) – odwrotna transkryptaza telomerazy
TGN (ang. *trans Golgi network*) – sieć trans aparatu Golgiego
Th (ang. *T helper lymphocytes*) – limfocyty T pomocnicze
TLR4 (ang. *Toll-like receptor 4*) – receptor Toll-podobny 4
TMEM119 (ang. *transmembrane protein 119*) – białko TMEM119
TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów α
TREM2 (ang. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) – białko TREM2
TrfR (ang. *transferrin receptor*) – receptor transferyny
Trk (ang. *tropomyosin-related kinases*) – receptory z grupy kinaz tropomiozynowych
uPAR (ang. *urokinase-type plasminogen activator receptor*) – receptor uPAR
VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń
VPS10P (ang. *vacuolar protein sorting 10 protein*) – białko VPS10P
Vti1b (ang. *Vesicle Transport Through Interaction With T-SNAREs homolog 1B*) – białko Vti1b
WHO (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia
WT (ang. *wild type*) – typ dziki
 α -KG – alfa-ketoglutaran

I. WSTĘP

1.1. Epidemiologia nowotworów mózgu u osób dorosłych

Glejaki pierwotne to nowotwory mózgu powstające z macierzystych komórek nerwowych lub progenitorów komórek glejowych, które na skutek gromadzących się zmian genetycznych zaczynają ulegać niekontrolowanym podziałom. Spośród wszystkich glejaków pierwotnych 80% to nowotwory złośliwe. Na świecie rocznie diagnozuje się je u 7 na 100 000 osób, podczas gdy w Polsce, według Krajowego Rejestru Nowotworów, co roku diagnozowanych jest 2800 pacjentów. Ryzyko rozwoju glejaka wzrasta wraz z wiekiem, a nowotwór częściej rozwija się u mężczyzn (stosunek chorych mężczyzn do kobiet to 1,6:1) (Colopi i in., 2023). O chorobie pacjenci najczęściej dowiadują się po wystąpieniu fazy symptomatycznej, która w zależności od stopnia agresywności nowotworu obejmuje objawy takie jak napady padaczkowe, bóle głowy czy utrata zdolności poznawczych (Byun & Park, 2022).

Obecnie obowiązująca klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) nowotworów mózgu pochodząca z 2021 roku dzieli glejaki na te występujące u osób dorosłych oraz u dzieci. Do grupy glejaków pierwotnych zaliczono ponad 40 rodzajów guzów, których nazwy pochodzą od komórek ulegających transformacji nowotworowej. Kluczową podstawą klasyfikacji glejaków występujących u osób dorosłych jest status mutacji w genach kodujących dehydrogenazę cytrynianową 1/2 (ang. *isocitrate dehydrogenase*, IDH1/2). IDH to enzym biorący udział w cyklu Krebsa, który katalizuje proces oksydacyjnej dekarboksylacji izocytrynianu, na skutek czego powstaje α -ketoglutaran (α -KG). Najczęściej występujące mutacje związane z *IDH* obejmują substytucję aminokwasu argininy do histydyny w pozycji 132 w przypadku *IDH1* oraz w pozycjach 140 i 172 w przypadku *IDH2*. Mutacje te powodują, że białka IDH nabywają zdolności do metabolizowania α -KG do tzw. onkometabolitu, 2-hydroksyglutaranu (2-HG). Wzmożona produkcja 2-HG prowadzi do zmian metabolicznych w komórkach nowotworowych, obejmujących wzmożone procesy lipogenezy oraz zahamowanie glikolizy, co ma na celu rekompensację obniżonej zawartości α -KG. Co więcej, 2-HG hamuje enzymy z grupy demetylaz, co powoduje hipermetylację histonów oraz kwasu deokryrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic*

acid, DNA) i prowadzi do zmian w ekspresji wielu genów ważnych dla onkogenezy. Wszystkie te zjawiska wpływają na tempo rozwoju nowotworu i kształtowanie jego mikrośrodowiska, co ma znaczący wpływ na rokowania chorych – pacjenci z glejakami z mutacją *IDH1/2* wykazują dłuższą przeżywalność (Han i in., 2020; Klemm i in., 2020; Miller i in., 2023).

Według klasyfikacji WHO nowotwory mózgu grupowane są według stopnia złośliwości G (ang. *grade*), który określają cyfry od G1 do G4. Glejaki występujące u osób dorosłych pod kątem aktualnie obowiązującej klasyfikacji WHO charakteryzowane są według następujących kryteriów (Louis i in., 2021; Park i in., 2023):

- ich cech histologicznych (m.in. występowania licznych oznak mitozy, obecności nekrozy czy intensywności stopnia unaczynienia);
- występowania określonych mutacji w zmienionych nowotworowo komórkach, przede wszystkim mutacji w genach *IDH1/2* bądź m.in. mutacji w obrębie promotora genu odwrotnej transkryptazy telomerazy (ang. *telomerase reverse transcriptase*, TERT), mutacji w sekwencji genu białka supresorowego nowotworu 53 (ang. *tumor suppressor protein 53*, p53) lub amplifikacji genu receptora czynnika wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR);
- występowania współdelecji krótkiego ramienia chromosomu 1 (1p) oraz długiego ramienia chromosomu 19 (19q);
- występowania zmian w liczbie chromosomów: amplifikacje w chromosomie 7 i delecje w chromosomie 10.

Na podstawie powyższych kryteriów rozróżniane są m.in. najbardziej agresywne wśród nowotworów mózgu u dorosłych glejaki wielopostaciowe (ang. *glioblastoma*, GBM), posiadające niezmutowane wersje genów *IDH1/2*, których stopień złośliwości klasyfikowany jest jako G4. Do nowotworów mózgu charakteryzujących się mutacją *IDH1/2* zaliczane są m.in. gwiaździaki (ang. *astrocytoma*) (G2,G3,G4) czy skąpodrzewiaki (ang. *oligodendroglioma*) (G2,G3). Dla większości glejaków typowy jest tzw. wzrost rozlany (ang. *diffuse*), co oznacza, że guz rozprzestrzenia się w różnych częściach parenchymy mózgu (m.in. poprzez naczynia krwionośne, istotę białą bądź opony miękkie)

i nie ma jasno zaznaczonych granic, co uniemożliwia jego efektywne usunięcie na drodze operacji chirurgicznej. Z kolei do guzów o wzroście nierozlanym (ang. *non-diffuse*) zaliczane są m.in. gwiaździaki włosokomórkowate (ang. *pilocytic astrocytoma*) (G1) lub wyściółczaki (ang. *ependymoma*) (G2).

Najczęściej występującym u dorosłych glejakiem pierwotnym jest GBM (ok. 50% wszystkich przypadków nowotworów mózgu), charakteryzujący się wysoką agresywnością i szybkim stopniem postępowania choroby. Mediana przeżycia pacjentów od momentu diagnozy wynosi jedynie 14 miesięcy (Ostrom i in., 2021). Główną przyczyną wysokiej agresywności GBM jest heterogenność tworzących go komórek. Wyniki badań wykorzystujących transkryptomikę pojedynczych komórek wskazują, że GBM tworzą komórki o różnych stanach funkcjonalnych, charakteryzujących się występowaniem określonych mutacji genetycznych (Nefitel i in., 2019):

- stan podobny do progenitorów komórek neuronalnych (ang. *neural-progenitor like*, NPC-like) z mutacjami w genie kinazy 4 zależnej od cykliny (ang. *cyclin dependent kinase 4*, CDK4);
- stan podobny do astrocytów (ang. *astrocyte-like*, AC-like) z mutacjami w genie *EGFR*;
- stan podobny do progenitorów oligodendrocytów (ang. *oligodendrocyte-progenitor like*, OPC-like) z mutacjami w genie receptora alfa dla płytkowego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor receptor A*, PDGFRA);
- stan mezenchymalny (ang. *mesenchymal-like*, MES-like) z mutacjami w genie kodującym neurofibrominę 1 (ang. *neurofibromin-1*, NF1).

Mnogość mutacji w komórkach nowotworowych tworzących GBM znacząco utrudnia efektywne zastosowanie terapii nakierowanej na pojedynczy cel molekularny. Dodatkowo, heterogenność ta powoduje wysoki stopień zróżnicowania guzów między pacjentami, co utrudnia zastosowanie tego samego typu terapii u większej grupy chorych. Różnorodność komórek nowotworowych oraz zdolność ich migracji pomiędzy różnymi obszarami anatomicznymi mózgu nadaje GBM wysoce inwazyjny charakter (Holland, 2000; Noch i in., 2018).

1.2. Wybrane strategie terapeutyczne wykorzystywane w leczeniu glejaka wielopostaciowego

Najczęściej stosowanym standardem terapeutycznym GBM jest chirurgiczne usunięcie guza oraz radio- i chemioterapia przy użyciu temozolomidu, środka alkilującego DNA. Temozolomid oraz bewacyzumab, czyli przeciwciało monoklonalne hamujące powstawanie naczyń krwionośnych (tzw. angiogenezę), które używane jest najczęściej w przypadkach nawrotu choroby, to obecnie jedyne zatwierdzone przez Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Agency*, FDA) farmaceutyki stosowane w leczeniu GBM.

Mechanizm działania temozolomidu opiera się na tworzeniu pęknięć w strukturze podwójnej helisy DNA powstających na skutek alkilacji zasad azotowych, co doprowadza do uruchomienia mechanizmów programowanej śmierci komórkowej (Ortiz i in., 2021). Przed rozpoczęciem stosowania temozolomidu, celem oszacowania szans powodzenia terapii, u pacjentów sprawdzany jest status metylacji promotora genu metylotransferazy DNA O⁶-metyloguaniny (ang. *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase*, MGMT). Aktywny enzym MGMT zdolny jest do usuwania grup alkilowych z pozycji O⁶ guaniny DNA, co chroni komórki nowotworowe przed toksycznym działaniem leku. Metylacja promotora *MGMT* powoduje natomiast, że gen nie ulega transkrypcji, co zwiększa szanse na skuteczne zastosowanie chemioterapii. Leczenie temozolomidem wydłuża czas życia pacjentów nawet do 5 lat, jednak wraz z upływającym czasem stosowania, na lek ten wykształca się oporność (Chien i in., 2021).

Bewacyzumab wiążąc czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) hamuje angiogenezę, która jest kluczowa dla rozwoju guza. Mimo, że bewacyzumab nie wpływa istotnie na przeżywalność pacjentów, jego stosowanie znacząco poprawia komfort ich życia i niweluje skutki uboczne związane z radioterapią czy zażywaniem środków steroidowych (M. Fu i in., 2023).

Obecnie wiele zespołów na całym świecie prowadzi badania nad opracowaniem nowych terapii, które mogłyby znacząco wydłużyć długość i poprawić komfort życia pacjentów cierpiących na GBM, a wiele z nich znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych. Według danych ze strony internetowej rejestrującej wszystkie badania kliniczne (<http://clinicaltrials.gov>), w ramach terapii GBM prowadzonych jest obecnie

ponad 2000 badań, znajdujących się w różnych fazach (stan na dzień 12.06.2025 r. po wyszukaniu frazy „Glioblastoma multiforme”).

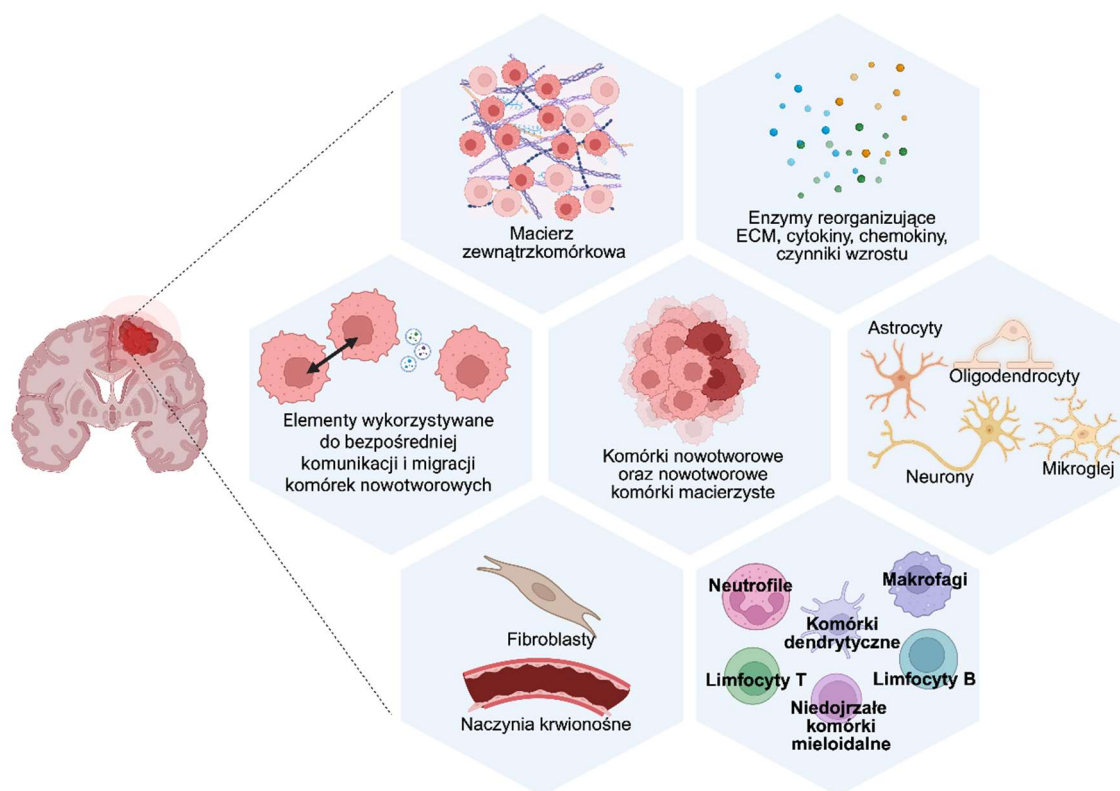
Do innowacyjnych strategii terapeutycznych GBM można zaliczyć m.in. zindywidualizowaną terapię CAR-T (ang. *chimeric antigen receptor T cell*), która polega na pobraniu z krwi pacjenta limfocytów T i poddania ich w warunkach laboratoryjnych odpowiednim modyfikacjom genetycznym. Ma to na celu przeprogramowanie komórek w taki sposób, aby wyrażały na swej powierzchni syntetyczne receptory CAR, dzięki którym po podaniu do organizmu pacjenta mogą one szybko i efektywnie rozpoznać i niszczyć komórki nowotworowe (Grewal i in., 2025). W leczeniu GBM dużą nadzieję pokłada się również w zastosowaniu inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (ang. *immune-checkpoints inhibitors*), które mają na celu uniemożliwić komórkom guza zahamowanie aktywności przeciwnowotworowych limfocytów T (Liu i in., 2024). Niestety, ze względu na niski stopień napływu limfocytów T do mikrośrodowiska guza oraz ich tzw. wyczerpanie (ang. *exhaustion*), terapie te nie przynoszą pożądanych efektów. Innym ciekawym podejściem terapeutycznym jest stosowanie wirusów onkolitycznych, które dzięki odpowiednim modyfikacjom genetycznym infekują komórki nowotworowe, a następnie doprowadzają do ich śmierci (Foreman i in., 2017).

Szczepionki przeciwnowotworowe stosowane w celu pobudzenia odpowiedzi układu odpornościowego również stanowią obiecującą perspektywę dla pacjentów cierpiących na GBM. Ich założeniem jest, iż podanie do organizmu pacjenta antygenów nowotworowych pobudzi aktywność komórek prezentujących antygen (ang. *antigen presenting cells*, APC), co wpłynie na pobudzenie aktywności przeciwnowotworowej limfocytów T oraz wykształcenie pamięci immunologicznej, znaczącej w przypadku nawrotu choroby. Szczepionki przeciwnowotworowe podawane są w formie peptydów bądź cząsteczek informacyjnego kwasu rybonukleinowego (ang. *messenger ribonucleic acid*, mRNA). Szczepionki mogą również składać się z konwencjonalnych komórek dendrytycznych (ang. *conventional dendritic cells*, cDC) hodowanych *ex vivo*, które po odpowiedniej procedurze różnicowania poddaje się kontaktowi z antygenem nowotworowym. Inną formą szczepionek są wektory wirusowe, zdolne do infekowania komórek nowotworowych i promowania przez nie ekspresji antygenów pobudzających odpowiedź przeciwnowotworową (Xiong i in., 2024).

Niestety, mimo intensywnych prac nad rozwojem nowatorskich terapii GBM, zróżnicowanie komórek nowotworowych oraz skomplikowane, silnie immunosupresyjne mikrośrodowisko (*sekcja 1.3.*) powoduje, że ich skuteczność wciąż jest bardzo niska. Obiecujące wydaje się natomiast stosowanie różnych rodzajów terapii jednocześnie (Schonfeld i in., 2024; Segura-Collar i in., 2023; P. Zhu i in., 2023).

1.3. Mikroglej i makrofagi jako element mikrośrodowiska wspierający rozwój glejaka wielopostaciowego

Wraz z rozwojem glejaków pierwotnych kształtuje się ich mikrośrodowisko, na które składają się zarówno elementy niekomórkowe, jak i komórkowe. Do pierwszej kategorii zaliczyć można szeroko pojętą macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM), enzymy wpływające na jej reorganizację, wydzielane cząsteczki sygnałowe takie jak cytokiny, chemokiny czy czynniki wzrostu, jak również elementy wykorzystywane przez komórki nowotworowe do migracji i bezpośredniej komunikacji między sobą, m.in. mikrotubule nowotworowe bądź pęcherzyki wydzielnicze (Indira Chandran i in., 2024; Osswald i in., 2015). Do elementów komórkowych mikrośrodowiska guza (pomijając komórki nowotworowe) zaliczyć można astrocyty, oligodendrocyty, neurony i mikroglej, jak również fibroblasty oraz komórki endotelialne tworzące naczynia krwionośne (Faisal i in., 2022; P. Sharma i in., 2023). Ważnym elementem mikrośrodowiska glejaków są również komórki układu odpornościowego, które napływają do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) z krwi obwodowej przez barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB), której przepuszczalność zmienia się pod wpływem rozwoju guza. W przeważającej ilości są to monocyty, powstające z monocytów makrofagi, jak również neutrofile, komórki dendrytyczne, limfocyty T, limfocyty B czy niedojrzałe komórki mieloidalne. Proporcje, w jakich określone komórki układu odpornościowego występują w mikrośrodowisku glejaka zależą od stopnia jego złośliwości (Klemm i in., 2020). Schematyczne przedstawienie mikrośrodowiska glejaka z uwzględnieniem występujących w nim elementów komórkowych i niekomórkowych przedstawiono na **Rycinie 1**.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie wybranych elementów mikrośrodowiska glejaka z uwzględnieniem elementów niekomórkowych i komórkowych [na podstawie P. Sharma i in., 2023]. Rycina została przygotowana z wykorzystaniem programu BioRender.

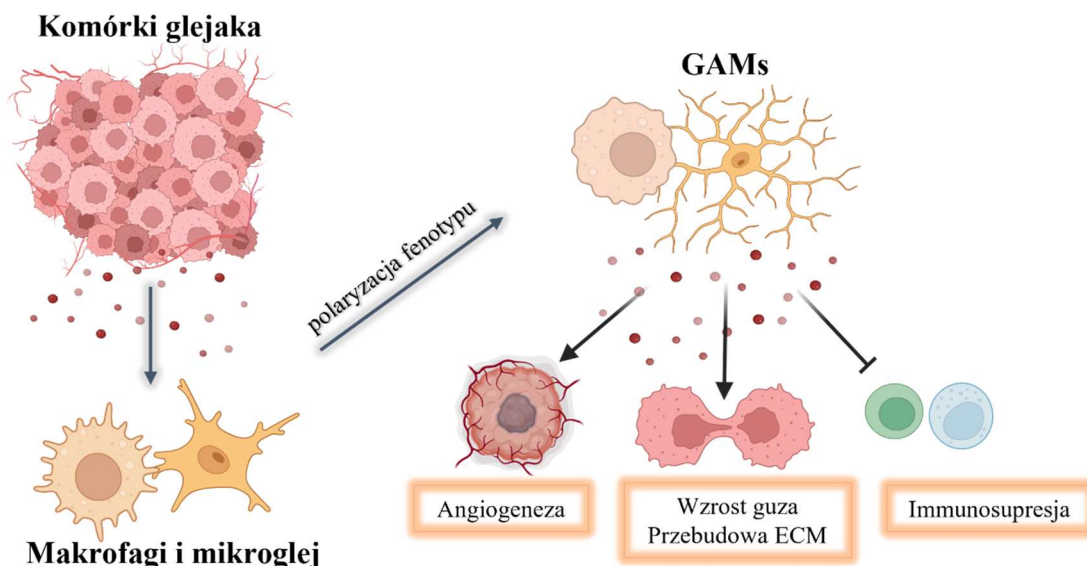
Mikroglej oraz makrofagi to komórki linii mieloidalnej, najliczniej obecne w mikrośrodowisku GBM, mogące stanowić nawet 30% masy guza (Charles i in., 2012; Xuan i in., 2021). Jako populacja komórek układu odpornościowego mózgu, mikroglej pełni w OUN kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy: rozpoznaje m.in. patogeny i białka o nieprawidłowej strukturze, a także wpływa na przeżywalność komórek nerwowych. Mikroglej reguluje również ilość połączeń neuronalnych podczas rozwoju osobniczego oraz uczestniczy w procesach związanych z plastycznością synaptyczną. Mikroglej wywodzi się z komórek progenitorowych powstających w pęcherzyku żółtkowym w trakcie rozwoju embrionalnego i stanowi długo utrzymującą się populację (Q. Li & Barres, 2018; Prinz i in., 2019; Prinz & Priller, 2014). Makrofagi powstają natomiast z monocytów produkowanych w szpiku kostnym, które po przedostaniu się z krwioobiegu do środowiska guza ulegają różnicowaniu do stadium makrofagów, stanowiących krótko żyjącą populację. Makrofagi mogą zostać łatwo zastąpione przez nowo produkowane w szpiku kostnym monocyty (Mass i in., 2023). Zarówno mikroglej jak i makrofagi to

komórki zdolne do fagocytozy, które charakteryzuje wysoka plastyczność, co oznacza, że pod wpływem określonych bodźców mogą przybierać różne właściwości, m.in. prozapalne, proregeneracyjne czy pronowotworowe, co określane jest mianem polaryzacji fenotypu. Podczas rozwoju GBM, komórki nowotworowe wydzielają szereg czynników, takich jak interleukina-10 (ang. *interleukin-10*, IL-10), czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (ang. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) fraktalina (ang. *CX3C chemokine ligand 1*, CX3CL1) czy osteopontyna (ang. *secreted phosphoprotein 1*, SPP1), które promują polaryzację fenotypu mikrogleju i makrofagów w kierunku wspierającym nowotwór (Ellert-Miklaszewska i in., 2018). Mimo faktu, że mikroglej i makrofagi stanowią różne populacje komórek, w przebiegu glejaka ze względu na ich pronowotworowe właściwości i ekspresję wielu tych samych genów zaliczane są one do jednej grupy, którą określa się mianem mikrogleju i makrofagów związanych z glejakiem (ang. *glioma-associated microglia and macrophages*, GAMs).

Pomimo licznych podobieństw, mikroglej i makrofagi różnią się między sobą m.in. pod kątem lokalizacji w mikrośrodowisku glejaka: mikroglej gromadzi się w przeważającym stopniu na obrzeżach guza, podczas gdy makrofagi zajmują przestrzeń pomiędzy komórkami nowotworowymi, zasiedlając w szczególności okolice naczyń krwionośnych. Dodatkowo, mikroglej w przeciwieństwie do makrofagów posiada większą liczbę wypustek, a stopień ich rozgałęzienia związany jest z rodzajem aktywacji komórek: wysoki stopień rozgałęzienia występuje, gdy komórki pełnią homeostatyczne bądź proregeneracyjne funkcje, podczas gdy aktywacja w kierunku prozapalnym promuje przyjmowanie przez mikroglej kształtu ameboidalnego, o niskim stopniu rozgałęzienia (Z. Chen i in., 2019).

GAMs, wydzielając czynniki takie jak enzymy reorganizujące ECM, interleukiny, chemokiny bądź czynniki wzrostu, wspierają angiogenezę, promują wzrost i inwazyjność guza, a także hamują przeciwnowotworową odpowiedź wywoływaną przez limfocyty T, doprowadzając je do stanu wyczerpania. Równocześnie GAMs przyciągają i pobudzają limfocyty T regulatorowe, które hamują rozwój odpowiedzi odpornościowej przeciwko nowotworowi (Buonfiglioli & Hambardzumyan, 2021; Mantovani i in., 2021). Mikrośrodowisko GBM, które ogranicza napływ komórek układu odpornościowego nakierowanych na walkę z guzem i uniemożliwia rozwój efektywnej odpowiedzi

przeciwnowotworowej określa się mianem „mikrośrodowiska immunologicznie zimnego”. Schemat polaryzacji fenotypu mikrogleju i makrofagów w kierunku GAMs przedstawiono na **Rycinie 2**.



Rycina 2. Schemat polaryzacji fenotypu mikrogleju i makrofagów w kierunku wspierających nowotwór GAMs. Rycina została przygotowana z wykorzystaniem programu BioRender.

Właściwości GAMs w mikrośrodowisku nowotworu mózgu przez długi czas określane były w sposób zero-jedynkowy, tzn. przypisywano im funkcje prozapalne (M1) bądź pronowotworowe (M2). Od czasu rozwoju zaawansowanych technik biologii molekularnej takich jak sekwencjonowanie RNA pojedynczej komórki (ang. *single-cell RNA sequencing*, scRNA-seq) okazało się, iż klasyfikacja ta nie jest do końca prawidłowa, gdyż profile transkryptomiczne komórek często sugerują pełnienie przez nie przeciwstawnych funkcji jednocześnie. Prawdopodobnie wynika to z faktu, iż GAMs to silnie plastyczne komórki, w związku z czym polaryzacja ich fenotypu może być procesem ciągłym. Na podstawie różnych, niezależnych danych pochodzących z scRNA-seq obecnie wiadomo, że GAMs w mikrośrodowisku GBM wykazują spektrum właściwości, od pronowotworowych do prozapalnych. Należy jednak zaznaczyć, iż ekspresja niektórych genów silnie wskazuje, które właściwości GAMs przeważają na poziomie funkcjonalnym. Przykładowo, ekspresja genów takich jak *ARG1*, *CD206*, *CD163*, *TREM2*, *SPP1* wskazuje na właściwości pronowotworowe GAMs, podczas gdy wysoki poziom ekspresji genów takich jak *iNOS*, *NLRP1*, *COX2*, *CD68*, *IRF7* świadczy o ich funkcjach prozapalnych

(Abdelfattah i in., 2022; Ellert-Miklaszewska i in., 2013; Gabrusiewicz i in., 2016; Guimarães i in., 2024; Liu i in., 2021).

Biorąc pod uwagę wysoki odsetek GAMs w mikrośrodku nowotworu, zablokowanie molekularnych mechanizmów uczestniczących w polaryzacji ich fenotypu w kierunku pronowotworowym stanowi obiecującą strategię mającą na celu zmniejszenie immunosupresyjnych właściwości mikrośrodowiska GBM. Powstający stan zapalny pobudzałby wówczas odpowiedź układu odpornościowego w kierunku walki z guzem, co mogłoby również zwiększyć efektywność zastosowanych immunoterapii. Dodatkowo, wydzielane przez GAMs czynniki prozapalne wpływałyby na aktywację ścieżek związanych z programowaną śmiercią komórkową, likwidując tym samym komórki tworzące nowotwór, prowadząc do jego regresji.

Do tej pory podejmowano różne próby modyfikacji właściwości GAMs w przebiegu GBM. Jedną z nich jest użycie inhibitorów receptora 1 czynnika stymulującego kolonie (ang. *colony stimulating factor 1 receptor*, CSF-1R), który jest znaczący dla przeżycia zarówno mikrogleju jak i makrofagów. W zależności od użytej cząsteczki, blokada CSF-1R w terapii GBM może spowodować obniżenie liczby GAMs (Ries i in., 2014) lub ograniczać ich pronowotworowe funkcje (Pyonteck i in., 2013). Innymi przykładami prób przeprogramowania GAMs są terapie celujące w interleukinę-6 (IL-6) i białko powierzchniowe CD40 (F. Yang i in., 2021), polipeptyd SLIT2 (Geraldo i in., 2021) bądź cząsteczkę adhezyjną P-selektynę (Yeini i in., 2021). W terapiach skoncentrowanych na GAMs podejmuje się również próby zahamowania ich napływu do mikrośrodowiska poprzez celowanie w m.in. SPP1 (Wei i in., 2019) czy receptor chemokiny C-C typu 2 (ang. *C-C chemokine receptor type 2*, CCR2) (Flores-Toro i in., 2020).

Ciekawą strategią modyfikacji właściwości GAMs wydaje się również wpływ na wydzielanie przez nie biologicznie aktywnych białek. Należy bowiem zaznaczyć, iż główną funkcjonalną konsekwencją polaryzacji fenotypu jest uwalnianie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej czynników, które w przypadku GAMs promują rozwój procesów proregeneracyjnych/pronowotworowych, podczas gdy wydzielanie czynników prozapalnych jest ograniczone. Mechanizmów regulujących uwalnianie przez komórki biologicznie aktywnych białek jest kilka. Podstawowy z nich obejmuje pęcherzykowy

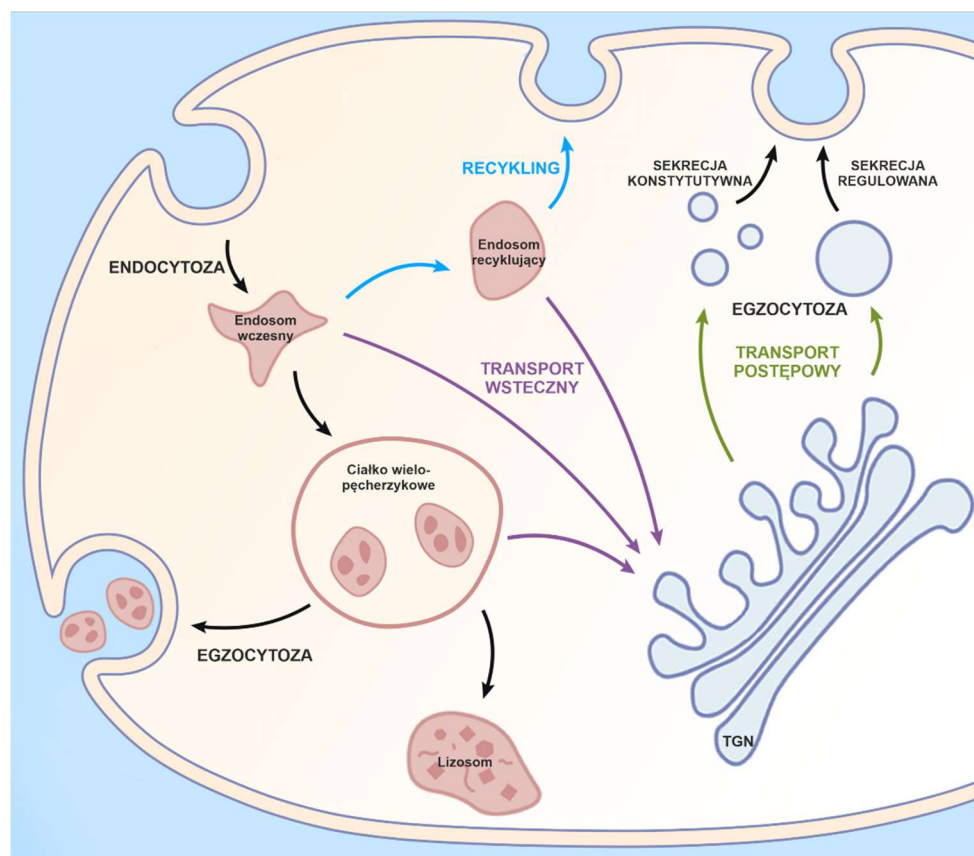
system transportowy (sekcja 1.4.). Wydzielanie różnorodnych czynników przez mikroglej i makrofagi może opierać się również na reorganizacji ich cytoszkieletu, bądź wydzielaniu nieklasycznym (procesy te zostały opisane w pracy przeglądowej Kaminska i in., 2024). Mimo, że próby wywarcia wpływu na wydzielanie czynników przez GAMs nie są tak powszechne jak inne metody stosowane w podejściach mających na celu zmianę kierunku polaryzacji ich fenotypu, strategia ta wydaje się stanowić interesujący kierunek badań nad nowatorskimi terapiami GBM.

1.4. Pęcherzykowy system transportowy komórek eukariotycznych

Podstawą prawidłowego funkcjonowania każdej komórki eukariotycznej jest czasowe i przestrzenne rozdzielenie zachodzących w niej procesów. Maszyną napędzającą owe procesy są różnorodne białka, które - aby pełnić swoje funkcje - muszą zostać dostarczone do konkretnej organelli komórkowej, zostać wydzielone poza wnętrze komórki lub ulec zakotwiczeniu w jej błonie komórkowej. Kluczowa jest również regulacja ilości owych białek, stąd procesy związane z ich degradacją stanowią ważny element utrzymania homeostazy. Czasową i przestrzenną regulację rozmieszczenia białek komórkowych, a przez to procesów, w których uczestniczą, zapewnia komórkom eukariotycznym system błon wewnętrznych. Jest to ogólna nazwa dla otoczonych błoną struktur komórkowych, takich jak siateczka śródplazmatyczna (ang. *endoplasmic reticulum*, ER), aparat Golgiego, lizosomy bądź pęcherzyki egzo- i endosomalne (Witkos & Lowe, 2017). Ze względu na angielską nazwę systemu – *endomembrane system* i powszechność stosowania tego sformułowania w literaturze, w dalszej części tekstu system ten określany będzie nazwą spolszczoną, tj. systemem endomembranowym.

Białka po syntezie zachodzącej w szorstkim ER, poprzez pęcherzyki transportowe stanowiące uwypuklenie błony organelli, trafiają do aparatu Golgiego, gdzie podlegają różnorodnym modyfikacjom potranslacyjnym. Następnie, z najbardziej zewnętrznej części aparatu Golgiego, tzw. sieci trans (ang. *trans Golgi network*, TGN) mogą zostać dostarczone w obręb błony komórkowej lub wydzielone poza komórkę na drodze egzocytozy, co określa się mianem transportu postępowego. W zależności od tego, czy białko ulega egzocytozie bezpośrednio po procesie syntezy, bądź dopiero pod wpływem określonego bodźca, wydzielanie określa się mianem sekrecji konstytutywnej bądź regulowanej (Burgoyne & Morgan, 2003). Jeżeli natomiast przeznaczeniem białka jest

dostanie się do wnętrza komórki z przestrzeni zewnątrzkomórkowej bądź z błony komórkowej, ulega ono procesowi endocytozy. Białko zamykane jest wówczas w świetle pęcherzyka stanowiącego wpuklenie błony komórkowej. Następnie pęcherzyk dojrzewa do stopnia endosomu wczesnego i przekształcając się w endosom recyklujący może transportować białko ponownie w obręb błony komórkowej lub do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Endosom wczesny może również ulec transformacji do endosomu późnego, określanego alternatywnie mianem ciała wielopęcherzykowego (ang. *multivesicular body*, MVB). Ze światła MVB białko może ponownie zostać skierowane na drogę egzocytozy, bądź w przypadku kiedy MVB dojrzewa do stopnia lizosomu, podlegać degradacji. Kolejnym przeznaczeniem białka, które uległo endocytozie, może być również transport wsteczny: wówczas transportowane jest ono do światła TGN (Huotari & Helenius, 2011; Scott i in., 2014). Główne szlaki egzo- i endocytozy, wraz z głównymi elementami systemu endomembranowego biorącymi udział w owych procesach zostały przedstawione na **Rycinie 3**.



Rycina 3. Schemat transportu białek poprzez elementy systemu endomembranowego [na podstawie Kaminska i in., 2024].

1.5. Receptory z domeną VPS10P

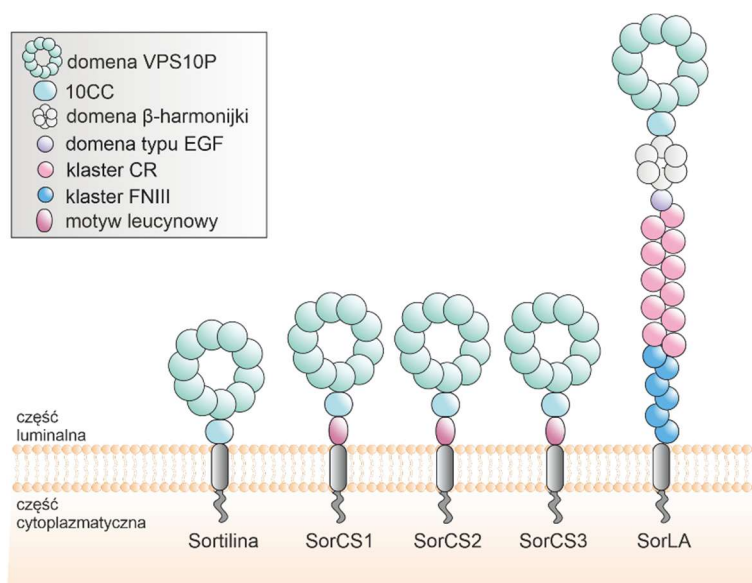
Transport białek w obrębie systemu endomembranowego jest kluczowy, aby białko trafiło do miejsca swojego przeznaczenia. Jednym z elementów regulujących to zjawisko jest obecność w komórce receptorów z domeną VPS10P (ang. *vacuolar protein sorting 10 protein*), które sortują białka pomiędzy poszczególnymi elementami systemu endomembranowego, wpływając tym samym na ich dystrybucję w komórce, ich wydzielanie poza nią lub dostarczanie w obręb błony komórkowej. Rodzina receptorów z domeną VPS10P w komórkach ssaczych liczy 5 członków: sortilinę, SorCS1, SorCS2, SorCS3 oraz SorLA, a ich funkcje do tej pory najlepiej opisano w komórkach nerwowych (Malik & Willnow, 2020). Nazwa rodziny pochodzi od strukturalnego podobieństwa domeny VPS10P do białka Vps10p zidentyfikowanego u drożdży z gatunku *Saccharomyces Cerevisiae*, które odpowiada za kierowanie wewnątrzkomórkowym transportem karboksypeptydazy Y (Marcusson i in., 1994).

Receptory z domeną VPS10P to białka przezbłonowe, które syntetyzowane są w formie białek prekursorowych. Odcięcie kilkudziesięcioaminokwasowej sekwencji na N-końcu w TGN umożliwia receptorom pełnienie ich funkcji, czyli wiązanie ich białkowych ligandów i transportowanie ich w miejsce przeznaczenia (Munck Petersen i in., 1999; Westergaard i in., 2004). Każdy z receptorów z domeną VPS10P składa się z części luminalnej, przezbłonowej oraz wewnętrznej, określanej też mianem cytoplazmatycznej.

Do składu części luminalnej każdego z pięciu receptorów zaliczyć można domenę VPS10P przyjmującą kształt lejka złożonego z 10-segmentowej β -harmonijki, która odpowiedzialna jest za wiązanie białkowych ligandów. Domena VPS10P połączona jest z krótkim motywem aminokwasowym bogatym w cysteiny, 10CC. Te dwie domeny stanowią całość luminalnej części sortiliny. W przypadku SorCS1, SorCS2 i SorCS3 w części luminalnej można wyróżnić dodatkowo motyw aminokwasowy bogaty w leucynę (Hermey, 2009; Quistgaard i in., 2009). SorLA charakteryzuje się najbardziej złożoną budową części luminalnej, gdyż poza domeną VPS10P i motywem 10CC posiada również domenę β -harmonijki (ang. *β -propeller*), domenę typu czynnika wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor*, EGF), klaster powtórzeń typu dopełniacza (ang. *complement-type repeats*, CR) składający się z powtarzalnych sekwencji aminokwasowych bogatych w cysteinę oraz klaster FNIII, składający się z 90-aminokwasowych powtórzeń, pierwotnie

opisanych w strukturze białka fibronektyny III (ang. *fibronectin III*). Domeny te odpowiadają za interakcje z białkowymi ligandami bądź zmiany konformacyjne receptora. Ze względu na fakt, iż domeny β -harmonijki oraz typu EGF są charakterystyczne również dla receptorów lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low-density lipoprotein receptors*, LDLR), SorLA zaliczana jest również do tej grupy białek (Herz, 2001; Schmidt, Subkhangulova, i in., 2016).

Część cytoplazmatyczna receptorów z domeną VPS10P stanowi krótki fragment peptydowy (liczący od 10 do 78 aminokwasów), który odpowiada za ich oddziaływanie z białkami adaptorowymi, charakterystycznymi dla poszczególnych przedziałów systemu endomembranowego. Interakcje pomiędzy białkami adaptorowymi a receptorami z domeną VPS10P są podstawą, aby te mogły transportować swoje białkowe ligandy do konkretnych kompartmentów komórkowych. To właśnie różnice pod kątem wiązania poszczególnych białek adaptorowych sprawiają, iż każdy z receptorów z domeną VPS10P w różnym stopniu uczestniczy w poszczególnych szlakach transportu wewnątrzkomórkowego. Przykładowo, SorCS1 odgrywa znaczącą rolę w kierowaniu białek na drogę lizosomalnej degradacji (Nielsen i in., 2008), podczas gdy SorLA wydaje się być znacząca dla transportu wstecznego swoich białkowych ligandów do światła TGN (Fjorback i in., 2012). Schemat budowy receptorów VPS10P wraz z zaznaczaniem poszczególnych domen przedstawiony jest na **Rycinie 4**.



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie receptorów z domeną VPS10P z zaznaczeniem poszczególnych domen funkcjonalnych [na podstawie Kamińska i in., 2023].

Ekspresja poszczególnych receptorów z domeną VPS10P w OUN w warunkach homeostazy obserwowana jest w konkretnych typach komórek neuronalnych obecnych w danych strukturach mózgu. Przykładowo, SorCS1, SorCS2, SorCS3 obecne są w neuronach m.in. mózdzku, kory mózgowej czy hipokampu, w której ich ilość różni się w zależności od danej podstruktury: SorCS1 i SorCS3 ulegają ekspresji w regionie CA1, podczas gdy SorCS2 obecny jest przede wszystkim w regionie CA2 i zakręcie zębatym. Sortilina jest również obecna w komórkach nerwowych siatkówki oka, a SorLA w neuronach kory czołowej, mózdzku czy jąder podstawnych (Hermey i in., 2004; Offe i in., 2006; Sarret i in., 2003).

Charakterystycznym zjawiskiem dla sortiliny oraz SorLA jest ich cięcie proteolityczne przez metaloproteinazę ADAM17, na skutek czego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej uwalniana jest ich część luminalna (ektodomena). Funkcje uwalnianych ektodomen receptorów z domeną VPS10P nie są w pełni poznane. Dowiedziono, że część luminalna sortiliny uwalniana jest na skutek depolaryzacji komórek nerwowych (Hermey i in., 2006), a ektodomena SorLA poprzez wiązanie EGFR na powierzchni komórek nerwowych promuje rozwój neurytów (Stupack i in., 2020). Ektodomeny receptorów z domeną VPS10P mogą stanowić cenne narzędzie w diagnostyce klinicznej: podwyższony poziom ektodomeny SorLA w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdza się u pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease*, AD), a w przypadku osób chorujących na otyłość – we krwi (Q.-L. Ma i in., 2009; Whittle i in., 2015).

1.6. Neuronalne funkcje receptorów z domeną VPS10P

Najlepiej opisaną neuronalną funkcją receptorów z domeną VPS10P jest ich rola w transporcie białek biorących udział w sygnalizacji neurotroficznej. Neurotrofiny oddziałując z receptorami z grupy kinaz tropomiozynowych (ang. *tropomyosin-related kinases*, Trk) promują procesy związane z przeżywalnością neuronów, plastycznością synaptyczną czy reorganizacją aksonów i dendrytów. Pro-neurotrofiny, czyli formy prekursorowe neurotrofin, które nie podległy cięciu proteolitycznemu, również pełnią aktywną rolę w komórkach nerwowych. Oddziałując z receptorem neurotrofinowym p75 (ang. *p75 neurotrophin receptor*, p75NTR) promują przede wszystkim procesy

przeciwstawne do ich dojrzałych odpowiedników, czyli apoptotyczne (Bekinschtein & von Bohlen Und Halbach, 2020).

Receptory z domeną VPS10P pełnią znaczącą rolę w sygnalizacji neurotroficznej, gdyż regulują transport m.in. czynnika wzrostu nerwów (ang. *nerve growth factor*, NGF), neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF), ich form prekursorowych, jak również receptorów Trk. Przykładami zaangażowania receptorów z domeną VPS10P w sygnalizację neurotroficzną jest m.in. udział sortiliny w regulacji wydzielania BDNF przez neurony hipokampalne (Z.-Y. Chen i in., 2005) i w transporcie receptorów Trk do zakończeń aksonów (Vaegter i in., 2011). SorCS2 także uczestniczy w kierowaniu komórkową dystrybucją receptorów Trk, jak również p75NTR, wpływając tym samym na rozwój aksonów, przez co pełni znaczącą rolę w rozwoju umiejętności uczenia i pamięci przestrzennej (Glerup i in., 2016).

Kolejnym dobrze poznanym przykładem neuronalnych funkcji receptorów z domeną VPS10P jest udział SorLA w zapobieganiu tworzenia toksycznego amyloidu β ($a\beta$), stanowiącego jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za rozwój AD. Źródłem $a\beta$ jest białko prekursorowe amyloidu (ang. *amyloid precursor protein*, APP), które lokalizuje się w błonie komórki nerwowej, gdzie może ulegać cięciu przez dwa enzymy proteolityczne. W przypadku cięcia przez α -sekretazę, APP kierowane jest na tzw. ścieżkę nie-amyloidogenną, w wyniku której produktem końcowym jest m.in. rozpuszczalny sAPP α , promujący procesy korzystne dla neuronów. Jeżeli jednak APP ulega cięciu przez β -sekretazę na drodze ścieżki amyloidogennej, dochodzi do produkcji toksycznego $a\beta$, który wydzielany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej tworzy złoże uszkadzające komórki nerwowe (Hefter i in., 2020). Protekcyjna rola SorLA w AD polega przede wszystkim na regulacji transportu APP – receptor kontroluje jego lokalizowanie w obrębie błony komórkowej oraz promuje transport wsteczny APP do światła TGN, co zapobiega jego cięciu przez β -sekretazę, które odbywa się przede wszystkim w świetle endosomów wczesnych. Dodatkowo, SorLA zaangażowana jest w kierowanie już powstałego $a\beta$ na drogę lizosomalnej degradacji (Andersen i in., 2005; Caglayan i in., 2014). Mutacje oraz polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNP) w sekwencji genu kodującego SorLA (*SORL1*) prowadzące do

zmian w poziomie ekspresji receptora, powstawania jego nieprawidłowej formy bądź nieprawidłowym lokalizowaniu w komórce stanowią tym samym czynnik ryzyka rozwoju AD (Rogaeva i in., 2007; Rovelet-Lecrux i in., 2021).

1.7. Rola receptorów VPS10P w komórkach nieneuronalnych

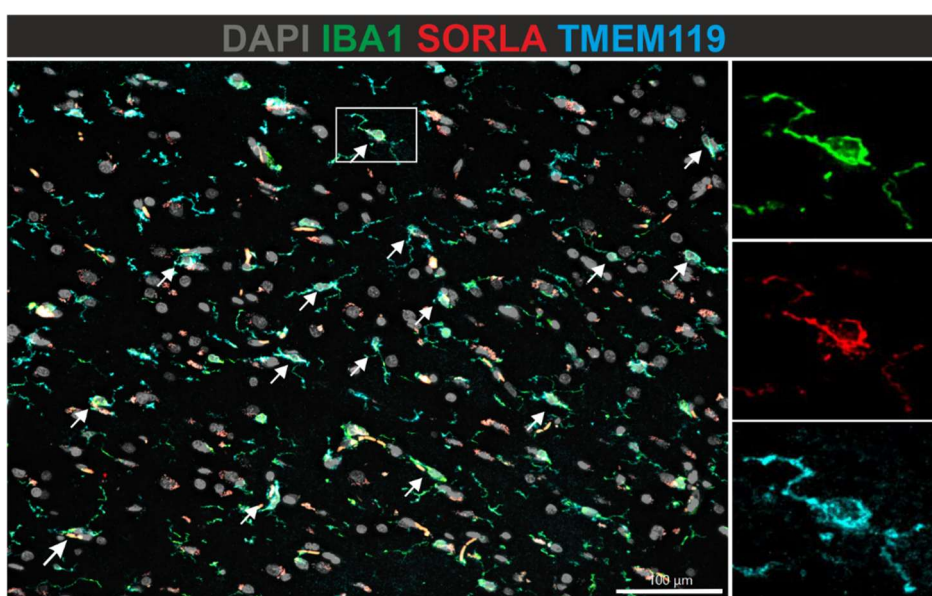
Receptory z domeną VPS10P znane są nie tylko ze swoich neuronalnych funkcji, gdyż pełnią również ważną rolę w regulacji metabolizmu węglowodanów oraz tłuszczów w tkankach obwodowych. Mogą również kształtować funkcje komórek układu odpornościowego. Najlepiej poznanymi pod tym kątem receptorami są SorLA oraz sortilina.

Badania nad zaangażowaniem SorLA w procesy metaboliczne wykazały, iż receptor stanowi ważny element w rozwoju otyłości i chorób sercowo-naczyniowych. Jednym z przykładów jest bezpośrednia interakcja receptora z lipazą lipoproteinową – enzymem, który odpowiada za rozkład triglicerydów stanowiących budulec blaszek miażdżycowych. SorLA, kierując lipazę lipoproteinową na drogę lizosomalnej degradacji, obniża poziom enzymu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co powoduje zwiększenie ilości cząsteczek tłuszczowych w krwioobiegu i odkładanie ich w ścianach naczyń krwionośnych w postaci złogów miażdżycowych (Klinger i in., 2011). Dodatkowo, SorLA regulując transport receptora dla insuliny w adipocytach pośrednio wpływa na zależne od niego ścieżki metaboliczne, co w efekcie prowadzi do wzmożonego gromadzenia cząsteczek tłuszczu w komórkach i rozwoju nadwagi (Schmidt, Schulz, i in., 2016). SorLA promuje również lokalizowanie receptora uPAR (ang. *urokinase-type plasminogen activator receptor*) w błonie komórkowej mięśni gładkich, co aktywuje ich podziały, a w konsekwencji prowadzi do pogrubienia ścian naczyń krwionośnych, zjawiska typowego dla chorób sercowo-naczyniowych (Y. Zhu i in., 2004).

W przypadku sortiliny, rola receptora w regulacji metabolizmu tłuszczów opiera się przede wszystkim na jego oddziaływaniach z lipoproteinami, co stanowi mechanizm wpływający na ilość cząsteczek tłuszczowych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (Conlon i in., 2022). Dowiedziono również znaczenia sortiliny dla wchłaniania cholesterolu oraz jego biosyntezy (Hagita i in., 2018; J. Li i in., 2017).

Sortilina oraz SorLA pełnią także udział w regulowaniu funkcji komórek układu odpornościowego (Kaminska i in., 2024). Sortilina promuje produkcję interferonu- γ (IFN- γ) przez limfocyty T cytotoksyczne (ang. *cytotoxic T cells*, CTL), co potęguje ich prozapalne właściwości (Herda i in., 2012). Receptor ten wpływa także na wydzielanie IL-6 przez limfocyty T pomocnicze (ang. *T helper lymphocytes*, Th) (Mortensen i in., 2014). SorLA reguluje z kolei endocytozę kompleksu IL-6 i jej receptora z powierzchni błony komórkowej, wpływając tym samym na aktywację zależnych od IL-6 ścieżek sygnałowych (Larsen & Petersen, 2017).

Przez długi czas uważano, że w OUN rola receptorów z domeną VPS10P jest ograniczona jedynie do komórek neuronalnych. Obecnie odchodzi się jednak od tego podejścia, ze względu na rosnącą ilość doniesień potwierdzających ekspresję receptorów również w komórkach glejowych. Przykładowo, dane scRNA-seq ludzkiego zdrowego mikrogleju wykazały w nim ekspresję genów *SORT1* (sortilina) i *SORL1* (SorLA) (Sankowski i in., 2024). Dodatkowo, nasze nieopublikowane dane wskazują, że SorLA obecna jest również na poziomie białka w mikrogleju, którego białkowymi markerami są IBA1 (ang. *Ionized Calcium-Binding Adaptor Molecule 1*) oraz TMEM119 (ang. *transmembrane protein 119*) (Rycina 5).



Rycina 5. SorLA jest obecna w mikrogleju w zdrowym ludzkim mózgu. Reprezentatywne zdjęcie fragmentu ludzkiego mózgu, barwionego immunofluorescencyjnie przy użyciu DAPI znakującego jądra komórkowe oraz przeciwciał anti-IBA1 (marker mikrogleju i makrofagów), anti-SorLA oraz anti-TMEM119 (marker mikrogleju). Strzałki wskazują komórki mikrogleju

(IBA1⁺, TMEM119⁺), w których obecne jest białko SorLA. Powiększony obraz komórki zaznaczonej białym prostokątem znajduje się po prawej stronie. Skala: 100 μ m. Barwienie i obrazowanie wykonane zostało przez Paulinę Kamińską podczas stażu w laboratorium prof. Marco Prinza na Uniwersytecie we Freiburgu w Niemczech.

Ciekawym aspektem badań nad receptorami z domeną VPS10P i ich rolą w komórkach mózgu innych niż neurony jest fakt, że ich ekspresja może być regulowana pod wpływem czynników patologicznych. Po raz pierwszy zjawisko to zostało udokumentowane dla receptora SorCS2, którego ekspresja w mysich astrocytach w warunkach homeostatycznych utrzymuje się na bardzo niskim poziomie. Jednakże pod wpływem udaru niedokrwienego ekspresja SorCS2 w astrocytach znacząco wzrasta, co wiąże się ze wzmożonym wydzielaniem przez komórki endostatyny, kluczowej dla regulacji angiogenezy poudarowej (Malik i in., 2020). Badania te sugerują, iż poziom ekspresji receptorów z domeną VPS10P w komórkach glejowych może ulegać zmianie w odpowiedzi na czynniki patologiczne, wpływając tym samym na kształtowanie typu ich właściwości.

1.8. Potencjalna rola receptora SorLA w kształtowaniu właściwości GAMs

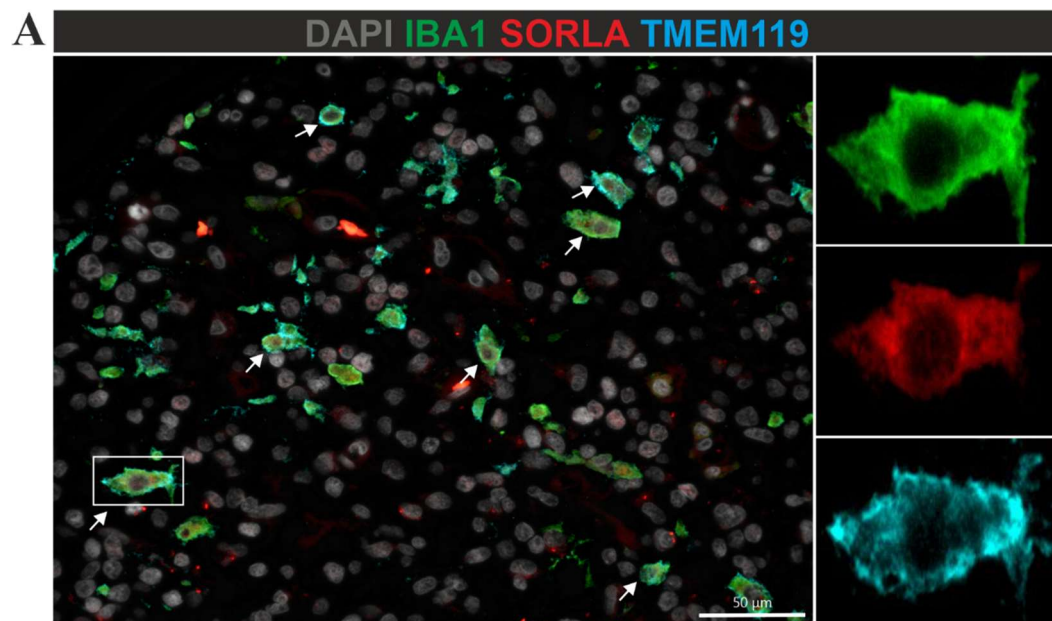
Mając na uwadze możliwe zmiany w poziomie ekspresji receptorów z domeną VPS10P w komórkach glejowych pod wpływem stanów patologicznych, ich rolę w kierowaniu komórkową dystrybucją białek, a także wysoką zdolność GAMs do wydzielania czynników pronowotworowych postanowiono sprawdzić, czy receptory te mogą uczestniczyć w procesie polaryzacji fenotypu GAMs. Publicznie dostępne dane pochodzące z sekwencjonowania RNA przeprowadzonego z wykorzystaniem mysiego modelu glejaka wskazują, że w komórkach mieloidalnych (CD11b⁺, obejmujących mikroglej i makrofagi) pochodzących z mózgow objętych guzem, poziom transkryptu *Sorl1* rośnie, a poziom transkryptu *SorCS2* maleje (Szulzewsky i in., 2015) w porównaniu do komórek kontrolnych (**Tabela 1**).

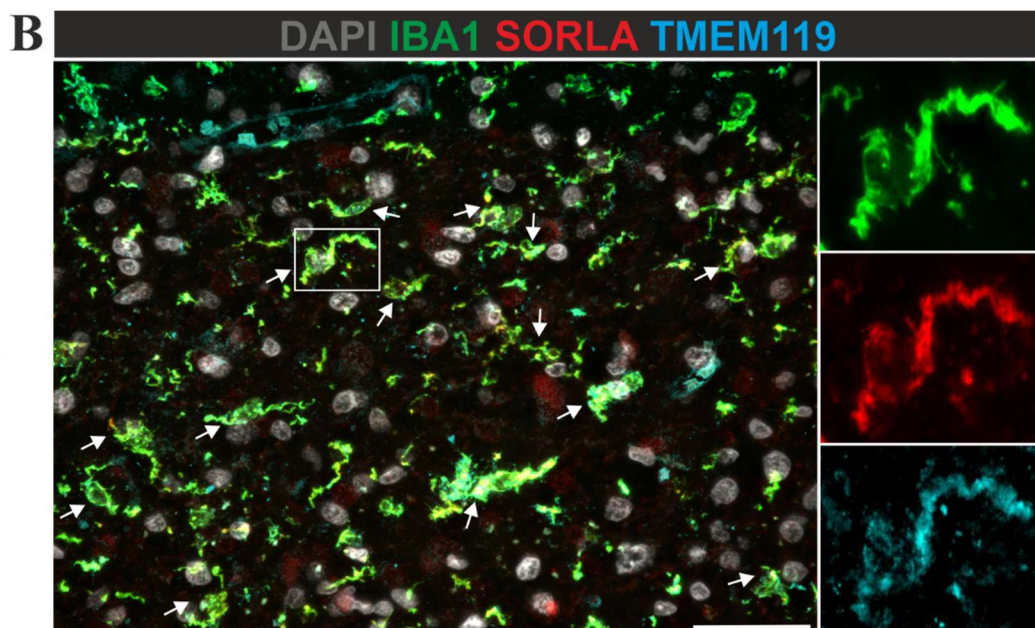
Tabela 1. Dane transkryptomiczne pochodzące z publikacji Szulzewsky i in., 2015.

Komórki CD11b⁺ izolowane z mysich mózgów z glejakiem vs komórki kontrolne

<i>transkrypt</i>	<i>krotność zmiany</i>	<i>wartość p</i>
<i>SorCS2</i>	0.49525767	2.13E-07
<i>Sorl1</i>	3.19175141	0.007874669

Nasze nieopublikowane dane wykazały także obecność SorLA na poziomie białka w mikrogleju obecnym w mikrośrodkowisku ludzkich nowotworów mózgu: GBM (**Rycina 6A**) oraz gwiazdki typu 2, charakteryzującego się zmutowaną wersją genu *IDH1* (**Rycina 6B**).

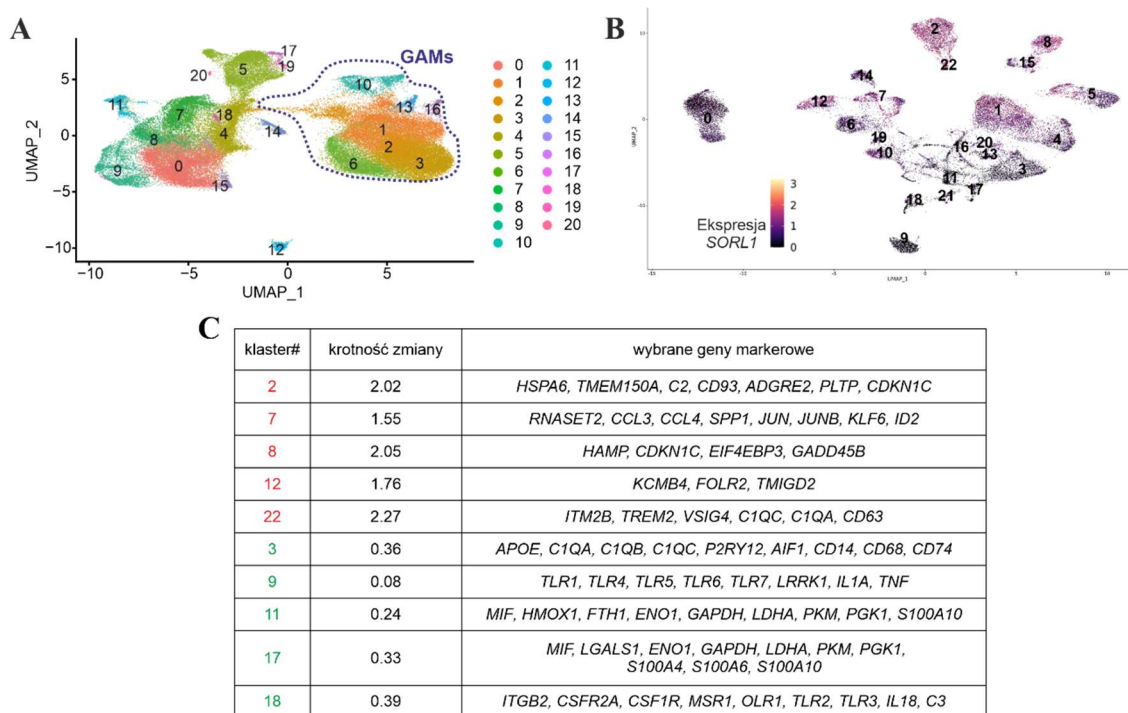




Rycina 6. SorLA jest obecna w mikrogleju w mikrośrodku GBM oraz gwiazdki typu 2. Reprezentatywne zdjęcia fragmentów mózgu pacjentów cierpiących na (A) GBM oraz (B) gwiazdki typu 2, barwionych immunofluorescencyjnie przy użyciu DAPI znakującego jądra komórkowe oraz przeciwciał anti-IBA1 (marker mikrogleju i makrofagów), anti-SorLA oraz anti-TMEM119 (marker mikrogleju). Strzałki wskazują komórki mikrogleju (IBA1⁺, TMEM119⁺), w których obecne jest białko SorLA. Powiększony obraz komórek zaznaczonych białym prostokątem znajduje się po prawej stronie każdego zdjęcia. Skala: 50 μ m. Barwienie i obrazowanie wykonane przez Paulinę Kamińską podczas stażu w laboratorium prof. Marco Prinza na Uniwersytecie we Freiburgu w Niemczech.

Biorąc pod uwagę zwiększoną ekspresję *Sorl1* w mysich GAMs oraz obecność SorLA w komórkach mikrogleju w mikrośrodku ludzkich nowotworów mózgu, postanowiono sprawdzić, czy SorLA może potencjalnie wpływać na właściwości GAMs. W tym celu zespół bioinformatyków pod kierownictwem dr. Michała J. Dąbrowskiego przeprowadził analizę publicznie dostępnych danych pochodzących z scRNA-seq próbek nowo zdiagnozowanych pacjentów cierpiących na GBM (Abdelfattah i in., 2022). Na podstawie ekspresji genów markerowych dla makrofagów i mikrogleju (*AIF1*, *CD68*, *ITGAM*, *P2RY12*, *TMEM119*, *CXCR1*) wytypowano spośród wszystkich komórek klastry odpowiadające GAMs (**Rycina 7A**). Następnie GAMs zostały scharakteryzowane pod kątem poziomu ekspresji *SORL1* (**Rycina 7B**). Spośród 23 klastrów wybrano 5 o najwyższej i 5 o najniższej ekspresji *SORL1*. Celem poznania ich potencjalnych właściwości, przeanalizowano ich profile transkryptomyczne (**Rycina 7C**). Analiza ta wykazała, iż komórki należące do klastrów charakteryzujących się wysokim poziomem ekspresji *SORL1* wyrażały geny takie jak *SPPI*, *TREM2* oraz *CD63*, a więc typowe dla

pronowotworowych funkcji GAMs. Z kolei komórki z klastrów o najniższym poziomie *SORL1* charakteryzowały się ekspresją genów związanymi z funkcjami prozapalnymi: *CD68*, *TNF*, *MIF*. Dodatkowo, ich profil transkryptomyczny wskazywał na aktywację procesów związanych z glikolizą (*HMOX1*, *GAPDH*, *LDHA*), o której wiadomo, iż wiąże się z prozapalną odpowiedzią mikrogleju i makrofagów (Dionísio i in., 2023; Lauro & Limatola, 2020). Wyniki te doprowadziły do postawienia hipotezy, iż ekspresja *SORL1* w GAMs jest zróżnicowana i powiązana z ich funkcjonalnymi właściwościami.



Rycina 7. Poziom ekspresji *SORL1* w ludzkich GAMs związany jest z ich potencjalnymi właściwościami. (A) Graficzne przedstawienie grupowania komórek od pacjentów chorych na GBM, na podstawie poziomu ekspresji genów (scRNA-seq), przy użyciu UMAP. Każdy punkt odpowiada pojedynczej komórce, a kolorystyka wskazuje na przynależność do konkretnego klastra. Klastry zaznaczone fioletową przerywaną linią odpowiadają komórkom zidentyfikowanym jako GAMs. (B) Grupowanie komórek, na 23 klastry, oznaczonych jako GAMs w (A), na podstawie poziomu ekspresji genu *SORL1*, przy użyciu UMAP. Zróżnicowany poziom ekspresji *SORL1* odzwierciedla skala kolorów. Każdy punkt odpowiada pojedynczej komórce. (C) Przykłady genów charakterystycznych dla klastrów wybranych w (B), charakteryzujących się najwyższym (kolor czerwony) i najniższym (kolor zielony) poziomem ekspresji *SORL1*. W tabeli zaznaczono krotność zmiany ekspresji *SORL1* oraz wybrane geny markerowe dla każdego klastra (Kaminska i in., 2024).

II. CEL PRACY

Glejaki złośliwe charakteryzuje obecność złożonego, silnie immunosupresyjnego mikrośrodowiska, utrudniającego rozwój efektywnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Mikroglej oraz makrofagi związane z glejakiem (GAMs) są najliczniejszą grupą komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka, które pod wpływem wydzielanych przez nowotwór czynników ulegają przeprogramowaniu w kierunku wspierającym rozwój guza. Określenie, a następnie zablokowanie mechanizmów odpowiedzialnych za polaryzację ich fenotypu w kierunku pronowotworowym na rzecz pobudzenia w nich funkcji prozapalnych stanowi więc kluczowy element rozwoju nowych terapii glejaków.

Analizy bioinformatyczne wykazały, iż poziom ekspresji genu kodującego SorLA w GAMs różni się w zależności od ich potencjalnych właściwości prozapalnych i pronowotworowych. Wobec tego sformułowano hipotezę, iż wysoki poziom SorLA w GAMs związany jest z ich pronowotworowymi właściwościami, co może wiązać się z bezpośrednią rolą receptora w kształtowaniu ich funkcji. Dlatego też głównym celem przedstawionych w rozprawie badań było opisanie roli SorLA w kształtowaniu właściwości GAMs (w szczególności mikrogleju), jak również scharakteryzowanie wpływu braku SorLA na rozwój guza i mikrośrodowisko mysiego glejaka.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

- Określenie czynników wpływających na ekspresję *Sorll* w mikrogleju;
- Zidentyfikowanie białek wydzielanych przez mikroglej w sposób zależny od SorLA;
- Określenie domeny SorLA odpowiedzialnej za interakcję z cytokiną TNF- α ;
- Ocenę wpływu SorLA na kształtowanie właściwości mikrogleju w odpowiedzi na współhodowlę z komórkami mysiej linii glejaka;
- Określenie, jak brak SorLA wpływa na wielkość mysiego nowotworu mózgu;
- Scharakteryzowanie właściwości mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka myszy pozbawionych SorLA;
- Określenie profilu komórek układu odpornościowego infiltrujących mikrośrodowisko glejaka myszy pozbawionych SorLA.

III. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały używane w doświadczeniach

Tabela 2. Lista materiałów wykorzystanych w doświadczeniach z zaznaczeniem ich specyfikacji.

	<u>Źródło</u>	<u>Numer katalogowy</u>
Zwierzęta		
Myszy pozbawione SorLA (SorLA ^{-/-} ; (SorLA-knockout (KO)/SLKO) C57BL/6J	Andersen i in., 2005	-
Myszy typu dzikiego (ang. <i>wild type</i> , WT) C57BL/6J	IBD im. Nenckiego w Warszawie/Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego	-
Linie komórkowe		
HEK-293	ATCC (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)	CRL-1573
GL261-luc ⁺ -tdT ⁺	Ochocka i in., 2021	-
GL261-WT	Ochocka i in., 2021	-
GL261-GFP	Markovic i in., 2005	-
Plazmidy		
pEGFPC2-BIO („plazmid GFP”)	Swiech i in., 2011	-
GFP-TNF- α	Manderson i in., 2007	Addgene #28089
SorLA- Δ VPS10P	Kaminska i in., 2024	-
SorLA- Δ EGF/ β -propeller	Kaminska i in., 2024	-
SorLA- Δ FN3	Kaminska i in., 2024	-
SorLA- Δ CR	Mehmedbasic i in., 2015	-
SorLA-WT	Kaminska i in., 2024	-
SorLA mini-VPS10P	Kaminska i in., 2024	-
SorLA mini-EGF/ β -propeller (EGF/ β p)	Kaminska i in., 2024	-
SorLA mini-FN3	Kaminska i in., 2024	-
SorLA mini-CR	Kaminska i in., 2024	-
Przeciwciała używane do barwień immunofluorescencyjnych (IF) oraz analiz Western blot (WB) (z zaznaczeniem zastosowanych rozcieńczeń)		
anty-CD8-alfa (1:500, IF)	Abcam	ab217344
anty-Galektyna-3 (1:500, IF)	Biolegend	M3/38

anty-GAPDH (1:25000, WB)	Millipore	MAB374
anty-GFP (1:250, WB)	Santa Cruz Biotechnology	SC8334
anty-GM130 (1:1000, IF)	BD Biosciences	BD610823
anty-GPX4 (1:1000, WB)	Abcam	ab125066
anty-Iba1 (1:200, IF)	WAKO	019-19741
Anty-IFN γ R (1:1000, WB)	ThermoFisher Scientific	MA5-35147
anty-Ki67 (1:200, IF)	Abcam	ab15580
anty-Lamp1 (1:500, IF)	Sigma-Aldrich	MABC39
anty-MPO (1:40, IF)	R&D Systems	AF3667
anty-myc-tag (1:1000, WB)	Cell Signaling	2278S
anty-PARP (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS9542
anty-Rab7 (1:100, IF)	Cell Signaling	CS95746
anty-p-RIP1 (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS83613
anty-RIP1 (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS3493
Anty-p-RIP3 (1:1000, WB)	Abcam	ab222320
anty-RIP3 (1:1000, WB)	Abcam	ab62344
anty-p-STAT3 (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS9145
anty-STAT3 (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS4909
anty-p-STAT1 (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS9171
anty-STAT1 (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS9172
anty-Rab11 (1:200, IF)	BD Biosciences	BD610657
anty-SorLA C-koniec (1:1000)	Schmidt i in., 2007	-
anty-SorLA (1:1000, WB)	BD Biosciences	611861
anty-SorLA (1:1000, WB)	EMD Millipore	MABN1793
anty-Tmem119 (1:500, IF)	Synaptic Systems	400002
anty-TNF- α (1:1000, WB)	Cell Signaling	CS11948S
anty-TRFR (1:1000, WB)	Abcam	ab269513
anty-Vti1b (1:1000, IF)	BD Biosciences	BD611404

Odczynniki używane do doświadczeń *in vitro*

Bydlęca surowica płodowa (ang. <i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Gibco	#10500064
FBS dla hodowli mikrogleju	Pan Biotech	#P30-3302
Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco	#31885
DMEM z dodatkiem Glutamaxu (pożywka o zwiększonej zawartości glukozy i L-glutaminy)	Gibco	#10569-010

0.25% Trypsyna z 0.02% EDTA	Sigma-Aldrich	T8003
Roztwór penicyliny/streptomycyny (P/S)	Sigma-Aldrich	#P4333
Poli-L-lizyna (ang. <i>poly-L-lysine</i> , PLL)	Sigma	#P1274
Hank's Buffered Saline Solution (HBSS) bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}	Gibco	14175-095
Buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	Gibco	18912-014
Trypsyna	Sigma-Aldrich	T8003
DNaza	Sigma-Aldrich	DN25
G418	Invitrogen	#ant-gn-5
Lipofektamina 2000™	ThermoFisher Scientific	11668019
OptiMEM™	Gibco	31985070
GFP-Trap Magnetic Particles®	Chromotek	#gtd
Inserty do hodowli komórkowej z porami o średnicy 0.4 µm	Falcon	#353090
Lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i> , LPS)	Sigma	#L7770
Phorbol myristate acetate (PMA)	Sigma	#P8139
NRG-1	Biotechnie	9875-NR-050
IL-10	Immunotools	12340108
M-CSF	ThermoFisher Scientific	#315-02-10UG
BDNF	Sigma	B3795
CX3CL1	ThermoFisher Scientific	300-31-20UG
Leupeptyna	Sigma-Aldrich	108975
Aprotynina	Sigma-Aldrich	A1153
Hydrochlorek benzamidyny	Sigma-Aldrich	434760
Pefablok	Sigma-Aldrich	76307
Uwodniona sól β-glicerofosforanu disodowego	Sigma-Aldrich	G9422
Ortowanadan sodu (Na_3VO)	Sigma-Aldrich	S6508
Sodium pyrophosphate tetrabasic (NaPP)	Sigma-Aldrich	P8010
Fluorek sodu (NaF)	Sigma-Aldrich	201154

Odczynniki i materiały używane do doświadczeń *in vivo*

Izofluran	Polypharm	5468
D-Lucyferyna	Synchem	103404-75-7

Metacam [®] (melkoksykam)	Boehringer Ingelheim	-
Bupredine multidose [®] (buprenorfina)	Dechra	-
Butomidor [®] (butorphanol)	Polypharm	-
Żel Vidisic [®]	Bausch&Lomb	-
Marcaine [®] (bupiwakaina)	Aspen	-
Tramvetol [®] (tramadol)	Stada	-
Środek odkażający na bazie propanolu, Cutasept G [®]	Paul Hartmann AG	-
Probówki z EDTA	Profilab	#320
Zestaw do obrazowania luminescencji Xtreme	Bruker	-
Strzykawka 1 µl	Hamilton	B-2821
Wosk kostny	SMI	Z046
Lignokaina	Jelfa	-
VetaKetam [®] (ketamina)	Vetargo	-
Sedazin [®] (ksylazyna)	Biowet	-

Odczynniki używane do barwień fluorescencyjnych

Surowica ośła (ang. <i>normal donkey serum</i> , NDS)	Sigma Aldrich	D9663
Albumina surowicy bydlęcej (ang. <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	ITW Reagents	A1391
Końska surowica (ang. <i>horse serum</i> , HS)	Vector	S-2000
Odczynnik do zatapiania preparatów fluorescencyjnych	Agilent	S3023
DAPI	Sigma	#D9542

Przeciwciała drugorzędowe używane do barwień immunofluorescencyjnych (z zaznaczeniem zastosowanych rozcieńczeń)

anty-koza sprzężone z Alexa Fluor 488 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-11055
anty-mysz sprzężone z Alexa Fluor 488 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-11011
anty-królik sprzężone z Alexa Fluor 488 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-11034
anty-królik sprzężone z Alexa Fluor 555 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-31572
anty-koza sprzężone z Alexa Fluor 555 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-21432

anty-mysz sprzężone z Alexa Fluor 555 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-31570
anty-mysz sprzężone z Alexa Fluor 647 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-31571
anty-królik sprzężone z Alexa Fluor 647 (1:250)	ThermoFisher Scientific	A-31573

Odczynniki i sprzęty używane do dysocjacji mysich mózgów przed cytometrią przepływową i sortowaniem komórek mieloidalnych

10x HBSS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}	Gibco	14185045
10x HBSS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+}	Gibco	14065-049
FACSówki polipropylenowe	Falcon	352063
C-tuby	Miltenyi Biotec	130-093-237
DNaza	Sigma-Aldrich	DN25
Kolagenaza IV	Sigma-Aldrich	C4-BIOC
Bufor FACS	BD Biosciences	554656
DPBS	Gibco	14190-136
Perkol	GE Healthcare	17-0891-01
Filtry 70 μm	ThermoFisher	352350
Filtry 40 μm	ThermoFisher	10737821
GentleMACS™ Octo Dissociator	Miltenyi Biotec	130-095-937
Licznik komórek	NanoEnTek Inc.	EVE-MC

Odczynniki i przeciwciała użyte do analizy cytometrycznej i sortowania komórek mieloidalnych (z zaznaczeniem zastosowanych rozcieńczeń)

anti-mouse CD16/CD32, FcBlock (1:250)	BD Biosciences	BD553142
Fixable Viability Dye eFluor™ 455UV (1:1000)	ThermoFisher Scientific	65-0868-14
LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (1:1000)	Invitrogen	L34964
Bufor Brilliant stain	ThermoFisher Scientific	00-4409-42
Zestaw buforów do permeabilizacji i utrwalenia komórek	eBioscience	00-5523-00
Anty-CD45 Pe-Cy7 (1:800)	BD Biosciences	561868
Anty-CD11b FITC (1:100)	BD Biosciences	553310
Anty-CD11b PE (1:800)	BD Biosciences	553311
Anty-CD11b AF700 (1:800)	BD Biosciences	557960
Anty-CD3e PerCP-eF710	eBioscience	46-0033-82

Anty-CD8a PE-eF610	eBioscience	61-0081-82
Anty-CD4 BUV496	BD Biosciences	741051
Anty-CD19 SB600	ThermoFisher Scientific	63-0193-82
Anty-NK.1.1. BV510	BD Biosciences	563096
Anty-Ly6C APC	BD Biosciences	560595
Anty-Ly6G PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	560602
Anty-F4/80 PE-eF610	eBioscience	61-4801-82
Anty-CD11c APC-eF780	BD Biosciences	553801
Anty-Foxp3 eF450 (1:200)	eBioscience	48-5773-82

Gotowe zestawy dostępne komercyjnie

Test ELISA SPP1	Bio-Techne	MOST00
Test ELISA CD14	Bio-Techne	MC140
Zestaw Luminex	Luminex	LXSAMSM-07
Murine U-Plex Biomarker Group 1 assay	Meso Scale Diagnostics	#K15083K
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific	4352042
Zestaw do mierzenia stężenia białka Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific	23225
Zestaw do izolacji RNA RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
Zestaw do izolacji RNA Universal RNA Purification Kit	EURx	E3598
Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC)	Cayman Chemicals	NC0646109

Western blot – odczynniki i sprzęty

Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad	1704150
Zestaw do turbotransferu (bibuły+membrany)	BioRad	1704159
Akrylamid/bisakrylamid	Sigma-Aldrich	A3699
Marker wielkości mas białkowych	BioRad	1610374
Przeciwciało IgG anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (ang. <i>horsradish peroxidase</i> , HRP)	Vector laboratories	PI-1000-1
Przeciwciało IgG anty-mysie-HRP	Vector laboratories	PI-2000-1

Zestaw do wywoływania sygnału elektrochemiluminescencji (ang. <i>electrochemiluminescence</i> , ECL)	BioRad	1705062
ChemiDoc	BioRad	12003153
Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją – odczynniki i sprzęty		
Zestaw do odwrotnej transkrypcji	ThermoFisher Scientific	4387406
Bufor do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> , qPCR)	ThermoFisher Scientific	4352042
SYBR Green Master Mix	ThermoFisher Scientific	4385612
Woda ultraczysta	Invitrogen	10-977-015
Sonda Taqman Sorl1	ThermoFisher Scientific	Mm01169526_m1
Sonda Taqman Hprt1	ThermoFisher Scientific	Mm00446968_m1
Sonda TaqMan β 2M	ThermoFisher Scientific	Mm00437762_m1
Sonda Taqman CD163	ThermoFisher Scientific	Mm00474091_m1
Sonda Taqman CD206	ThermoFisher Scientific	Mm01329359_m1
<i>W przypadku poniżej wymienionych starterów, zamiast numeru katalogowego podano ich sekwencje nukleotydowe (dostarczone przez dr hab. Pawła Sikorskiego z Uniwersytetu Warszawskiego).</i>		
Starter forward IFIT1	NEXBIO	ACATTGAAGAAAG CCCTCAGCA
Starter reverse IFIT1	NEXBIO	TCTACGCGATGTTT CCTACGG
Starter forward IFIT2	NEXBIO	ACAGCAGACAGTT ACACAGCA
Starter reverse IFIT2	NEXBIO	TAGCTGTCGCAGA TTGCTCTC
Starter forward IFIT3	NEXBIO	GCTCAGGCTTACG TTGACAAGG
Starter reverse IFIT3	NEXBIO	CTTTAGGCGTGTC CATCCTTCC
Pozostałe sprzęty i materiały		
Rotor do ultrawirówki Sorvall™ MTX	ThermoFisher Scientific	45583
Probówki do ultrawirówki	ThermoFisher Scientific	45237
Probówki typu FACS	Corning	352063

Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 3kDa MWCO	Merck	UFC900308
Sonikator	Diagenode	B01080010
Kriostat	Microm International GmbH	HM 505N

3.2. Roztwory używane w doświadczeniach

Tabela 3. Wykaz stosowanych roztworów oraz ich skład.

<u>Roztwór</u>	<u>Składniki</u>
<i>Bufor do lizy komórek linii HEK293</i>	10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂ ; 0,5% IGEPAL
<i>Bufor do lizy komórek linii GL261</i>	20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100; 0,5% IGEPAL; 2 mM MgCl ₂ ; 10% glicerol
<i>Mieszanina inhibitorów proteaz i fosfataz (stężenia końcowe)</i>	5 µg/mL leupeptyny; 5 µg/mL aprotoniny; 2 mM hydrochlorku benzamidyny; 0,25 mM pefabloku; 25 mM uwodnionej soli β-glicerofosforanu disodowego; 2 mM Na ₃ VO ₃ ; 2 mM NaPPi; 20 mM NaF
<i>4x stężony bufor Laemmiego</i>	8% 2-merkaptoetanol; 250 mM Tris-HCl; 8% SDS; 0,02% błękit bromofenolowy; 40% glicerol, pH 6,5 - 7,5
<i>Bufor do homogenizacji mysich mózgów po implantacji komórek glejaka</i>	20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 2 mM MgCl ₂ ; 10% glicerol
<i>Bufor do homogenizacji mysich mózgów po implantacji komórek glejaka przed frakcjonowaniem</i>	20 mM Tris-HCl pH 7.5; 2 mM MgCl ₂ ; 0.25 M sacharoza

<i>Bufor do zawieszenia białek frakcji błonowej</i>	1% IGEPAL; 1% Triton-X-100; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 5 mM EDTA
<i>Bufor zapobiegający zamrażaniu skrawków mózgow</i>	300 mL glicerol; 300 mL glikol etylenowy; 400 mL PBS
<i>Bufor stosowany do wytworzenia gradientu gęstości przed analizą cytometryczną i sortowaniem komórek mieloidalnych</i>	5.65 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 20 mM Na ₂ HPO ₄ x 2(H ₂ O); 135 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM glukoza; pH 7,4
<i>10x stężony bufor do elektroforezy</i>	25 mM Tris; 192 mM glicyna; 1% SDS; pH 8,3
<i>10x stężony bufor do transferu</i>	25 mM Tris; 192 mM glicyna; pH 8,3
<i>Bufor do transferu gotowy do użycia</i>	1x stężony bufor do transferu; 20% czystego metanolu
<i>10x stężony TBS (ang. Tris-buffered saline)</i>	20 mM Tris; 500 mM NaCl; pH 7,6
<i>TBS-T</i>	1x TBS z dodatkiem 0,1% Triton-X-100
<i>Bufor do solubilizacji białek</i>	150 mM Tris pH 6,8; 4% SDS

3.3. Pierwotne hodowle mysiego mikrogleju

Wykorzystywane w badaniach komórki mysiego mikrogleju pozyskiwane były z mieszanych hodowli glejowych pochodzących z mózgow mysich osesków C57BL/6J typu dzikiego (ang. *wild type*, WT) lub C57BL/6J pozbawionych SorLA (SorLA-KO), nie starszych niż jednodniowe (P0-P1), na podstawie opisanego wcześniej protokołu (Walentyńowicz i in., 2018). Na jedno powtórzenie biologiczne przypadają komórki pochodzące z dwóch mysich mózgow hodowane wspólnie na jednej butelce. Przed rozpoczęciem procedury, butelki hodowlane o powierzchni 75cm² pokrywano 0,1 mg/ml

roztworem PLL i inkubowano w 37°C przez ok. 2 godziny w celu przygotowania powierzchni optymalnej do hodowli komórek glejowych.

Mysie oseski uśmiercane były poprzez dekapitację. Z wyizolowanych mózgów usuwano opony mózgowe z wykorzystaniem binokularu. Następnie mózgi trzykrotnie płukano z użyciem HBSS bez dodatku jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . W celu dysocjacji, mózgi traktowane były mieszaniną 1% trypsyny i 0,05% DNazy (proporcje na dwa mózgi), których działanie hamowane było dodaniem pożywki hodowlanej DMEM z dodatkiem Glutamax, wzbogaconej 10% FBS i 1% P/S. Następnie z nad mózgów odciągano ok. 2/3 pożywki hodowlanej i dodawano 5% roztwór DNazy (proporcje na dwa mózgi). Wówczas mózgi mechanicznie dysocjowano przy użyciu pipety serologicznej, dodawano świeżej pożywki hodowlanej i wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 min ($130 \times g$). W międzyczasie odciągano PLL z butelek hodowlanych i trzykrotnie przepłukiwano je PBS. Po wirowaniu mózgi zawieszano w świeżej pożywce hodowlanej, przenoszono do wcześniej przygotowanych butelek i hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, o stałej wilgotności powietrza (95%) i 5% stężeniu CO_2 .

Po 48 godzinach z butelek hodowlanych odciągano pożywkę i trzykrotnie, energicznie przepłukiwano ogrzanym do 37°C PBS. Po dodaniu świeżej porcji pożywki hodowlanej, komórki hodowano przez kolejne 8 dni, w warunkach opisanych powyżej. Po upływie tego czasu komórki poddawano wytrząsaniu w 37°C przez godzinę przy prędkości 100 rpm w celu oddzielenia mikrogleju od innych komórek glejowych obecnych w hodowli (głównie astrocytów). Następnie z naczynia hodowlanego pobierano pożywkę hodowlaną i wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 min ($130 \times g$). Otrzymany w ten sposób osad komórkowy (mikroglej) zawieszano w świeżej porcji pożywki hodowlanej, a komórki liczono z wykorzystaniem komory Bürkera. W zależności od celu doświadczenia, mikroglej wysiewano na szkiełka hodowlane umieszczonych w szalkach 6- lub 24-dółkowych, odpowiednio w ilościach $6,5 \times 10^5$ lub 1×10^5 . W czasie prowadzenia hodowli regularnie wykonywano testy w celu wykrycia ewentualnego zakażenia komórek mykoplazmą.

3.3.1. Stymulacje mikrogleju

Po dwóch dniach od wysiania mikrogleju na szalki 6-dołkowe, komórkom zmieniano pożywkę hodowlaną na pożywkę DMEM z dodatkiem Glutamax, który wzbogacony był o czynnik wykorzystywany do trwającej 24 godziny stymulacji:

- LPS (100 ng/ml)
- M-CSF (50 ng/ml)
- IL-10 (100 ng/ml)
- Neuregulina 1 (NRG-1) (100 ng/ml)
- BDNF (100 ng/ml)
- CX3CL1 (100 ng/ml)

Jako kontrolę traktowano mikroglej, któremu w tym samym momencie wymieniano pożywkę hodowlaną na pożywkę DMEM z dodatkiem Glutamax, niewzbogaconą żadnym dodatkowym czynnikiem. Po upływie 24 godzin mikroglej dwukrotnie płukano zimnym PBS i dodawano bufor do lizy stanowiący składnik zestawu do izolacji RNA firmy Qiagen lub EURx. Tak przygotowaną szalkę hodowlaną przechowywano w temperaturze -80°C do momentu dalszych etapów izolacji RNA.

3.3.2. Barwienia immunofluorescencyjne mikrogleju

Mikroglej wykorzystywany w celu przeprowadzenia barwień immunofluorescencyjnych hodowano na szalkach 24-dołkowych. W zależności od schematu doświadczenia, dwa dni po wysianiu komórkom zmieniano pożywkę hodowlaną na pożywkę DMEM z dodatkiem Glutamax wzbogaconą PMA (100 nM) lub poddawano współhodowli z komórkami mysiego glejaka (*sekcja 3.4.2.*). W obu wariantach doświadczenie trwało 24 godziny. Następnie mikroglej utrwalano przez 15 minut przy użyciu 4% roztworu paraformaldehydu (ang. *paraformaldehyde*, PFA) w PBS, a następnie trzykrotnie płukano PBS. W kolejnym etapie szkiełka z utrwalonymi komórkami były poddawane trwającej godzinę inkubacji w roztworze PBS z dodatkiem 5% NDS i 0,3% Triton-X-100, co miało na celu uniemożliwienie niespecyficznego związania przeciwciał i permeabilizację. Tak przygotowane szkiełka z komórkami inkubowano przez noc w 4°C

z przeciwciałami pierwszorzędowymi zawieszonymi w roztworze PBS z dodatkiem 1% BSA i 0,3% Triton-X-100. Następnie szkiełka trzykrotnie płukano PBS i inkubowano przez godzinę w ciemności, w temperaturze pokojowej, z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z odpowiednimi fluoroforami, zawieszonymi w tym samym buforze, co przeciwciała pierwszorzędowe. Po zakończonej inkubacji szkiełka trzykrotnie płukano PBS, a ostatnie płukanie wzbogacono o dodatek DAPI (ostateczne stężenie 1 µg/ml), w celu wyznakowania jąder komórkowych. Przygotowane preparaty zatapiano na szkiełkach podstawowych, suszono w temperaturze pokojowej, a następnie obrazowano wykorzystując mikroskop konfokalny Zeiss LSM 780 oraz Nikon A1R MP.

3.3.3. Przygotowanie pożywki hodowlanej do analiz biochemicznych

W celu zidentyfikowania białek wydzielanych przez mikroglej w sposób zależny od SorLA wykorzystywano pożywki hodowlane pozyskane z mikrogleju WT i SorLA-KO hodowanych na szalkach 6-dołkowych. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometrii mas (ang. *mass spectrometry*, MS), testów immunoenzymatycznych ELISA oraz zestawów Luminex i Murine U-Plex Biomarker Group 1 assay.

W przypadku przygotowania próbek do analiz MS, mikroglej dwa dni po wysianiu trzykrotnie przepłukiwano ciepłym PBS w celu pozbycia się FBS obecnego w pożywce hodowlanej, a następnie komórki hodowano przez 24 godziny w pożywce DMEM z dodatkiem Glutamax wzbogaconej PMA (100 nM). Na jedno powtórzenie biologiczne dla każdego genotypu składała się pożywka pobrana z wszystkich dołków szalki 6-dołkowej. Po upływie czasu inkubacji pobierano pożywkę hodowlaną znad komórek i wirowano w 4°C przez 15 minut (3220 x g). Po wirowaniu otrzymany supernatant umieszczano na kolumnach Amicon® Ultra Centrifugal Filter 3kDa MWCO i wirowano w 4°C przez 45 minut (3220 x g). Następnie kolumnę płukano 10 ml PBS i ponownie wirowano w 4°C przez 30 minut (3220 x g). Proces powtórzono łącznie trzy razy, przy czym każde kolejne wirowanie wydłużano o 15 minut. Po ostatnim wirowaniu zawartość kolumny pobierano do nowej probówki i mierzono stężenie białka przy użyciu zestawu BCA Pierce™ BCA Protein Assay. Tak przygotowane próbki były następnie analizowane przy użyciu MS przez pracowników Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

W przypadku użycia pożywki hodowlanej do przeprowadzenia analiz z wykorzystaniem testów ELISA oraz zestawów Luminex i Murine U-Plex Biomarker Group 1 assay, mikroglej przez 24 godziny hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem Gutamax wzbogaconej PMA (100 nM) lub w przypadku warunków kontrolnych, przez 24 godziny w pożywce DMEM z dodatkiem Glutamax. Następnie pożywkę hodowlaną zbierano do probówek i wirowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut ($1000 \times g$), a otrzymany supernatant poddawano odpowiednim testom. Otrzymane wartości normalizowane były do wcześniej określonego z wykorzystaniem zestawu BCA Pierce™ BCA Protein Assay stężenia białka w lizacie komórkowym, uzyskanym z hodowli komórek, z których pochodziła badana pożywka hodowlana.

3.3.4. Test oceniający zdolności do fagocytozy

W celu porównania zdolności mikrogleju WT i SorLA-KO do fagocytozy wykorzystywano komercyjnie dostępny zestaw Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC). 24 godziny po wysianiu mikrogleju na szalkę 24-dołkową, komórkom wymieniano pożywkę na pożywkę kondycjonowaną pochodzącą z komórek mysiej linii glejaka 261 (ang. *glioma 261*, GL261) z metką białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*, GFP) (GL261-GFP) (*sekcja 3.4.*). Po upływie kolejnych 24 godzin do pożywki dodawano kulki opłaszczane przeciwciałami IgG sprzężonymi z fluoroforem FITC w rozcieńczeniu 1:250. Po 4 godzinach komórki przez 2 minuty traktowano odczynnikiem Trypan Blue, który stanowił element używanego zestawu, przepłukiwano według zaleceń producenta i utrwalano przez 15 minut przy użyciu 4% roztworu PFA w PBS, po czym trzykrotnie płukano PBS. Następnie komórki inkubowano przez 5 minut w PBS z dodatkiem DAPI (ostateczne stężenie 1 $\mu\text{g/ml}$) w celu wyznakowania jąder komórkowych. Tak przygotowane preparaty zatapiano na podstawowych szkiełkach mikroskopowych, suszono w temperaturze pokojowej, a następnie obrazowano wykorzystując mikroskop fluorescencyjny Zeiss Axio Observer.Z1.

3.4. Hodowla ustalonych linii komórkowych

W doświadczeniach *in vitro* przedstawionych w niniejszej pracy używano następujących ustalonych linii komórkowych:

- Ludzka embrionalna linia komórkowa nerki 293 (ang. *human embryonic kidney 293 cells*, HEK293);
- Komórki mysiej linii glejaka GL261: komórek tych używano zarówno w formie niemodyfikowanej genetycznie (GL261-WT), jak również w wersji z wprowadzonymi sekwencjami lucyferazy i białka fluorescencyjnego tdTomato (GL261-luc⁺-tdT⁺) bądź białka GFP (GL261-GFP);

Wszystkie linie komórkowe hodowane były w 37°C przy stałej wilgotności powietrza (95%) i 5% stężeniu CO₂. W czasie prowadzenia hodowli regularnie wykonywano testy w celu wykrycia ewentualnego zakażenia komórek mykoplazmą. W poniższej tabeli przedstawiono skład pożywek hodowlanych dla każdej z używanych linii komórkowych.

<u>Linia komórkowa</u>	<u>Skład pożywki</u>
HEK293	DMEM + 10% FBS + 1% P/S
GL261	DMEM + 10% FBS + 1% P/S (w przypadku linii GL261-luc ⁺ -tdT ⁺ do trzeciego pasażu zamiast P/S używano antybiotyku selekcyjnego G418 (ostateczne stężenie 100 µg/ml)

Każdą linię komórkową do momentu rozpoczęcia doświadczenia pasażowano co 2-4 dni, w zależności od ich aktywności proliferacyjnej. Do pasażu komórek stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA, a proces odklejania komórek z powierzchni naczynia hodowlanego hamowano przy wykorzystaniu odpowiedniej dla danej linii pożywki hodowlanej.

W przypadku pozyskiwania pożywki kondycjonowanej z komórek GL261-GFP, po 2-3 dniach od ostatniego pasażu, kiedy komórki uzyskiwały konfluencje ok. 70%, pobierano z nich pożywkę hodowlaną. Pożywkę wirowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut (200 x g), a otrzymany supernatant wykorzystywano do hodowli mikroggleju.

3.4.1. Transfekcja komórek linii HEK293 i koimmunoprecypitacja

Celem przeprowadzenia koimmunoprecypitacji mającej na celu weryfikację oddziaływań białkowych, komórki linii HEK293 hodowano na szalkach Petriego o średnicy 10 cm, do momentu osiągnięcia konfluencji 70%. Komórki poddawano wówczas transfekcji dwoma plazmidami: jeden z nich zawierał sekwencję kodującą czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α) z dołączoną sekwencją białka GFP (TNF- α -GFP), natomiast drugi plazmid zawierał sekwencję kodującą SorLA, która w zależności od celu doświadczenia:

- a) nie była w żaden sposób zmieniona (SorLA-WT);
- b) pozbawiona była jednej z funkcjonalnych domen luminalnych receptora (mutanty delecyjne);
- c) posiadała wyłącznie jedną funkcjonalną domenę luminalną receptora (mini-receptory).

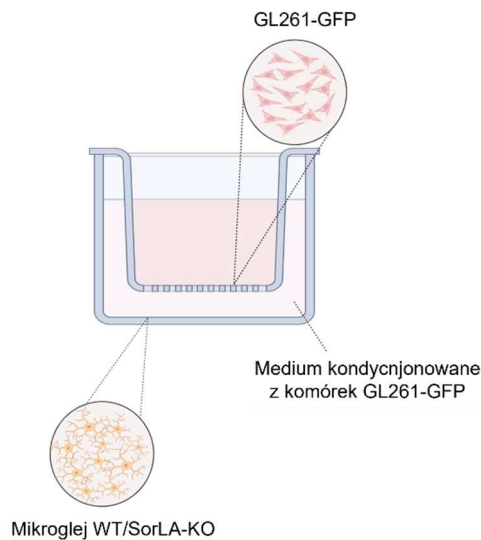
Przed rozpoczęciem transfekcji komórki płukano PBS ogrzanym do 37°C, a pożywkę hodowlaną wymieniano na pożywkę zwiększającą wydajność transfekcji, OptiMEM™. Mieszanina do transfekcji składała się z 1,2 ml pożywki OptiMEM™ z dodatkiem 3 μ g plazmidu kodującego jeden z wariantów białka SorLA, 3 μ g plazmidu kodującego TNF α -GFP oraz 12 μ l odczynnika Lipofectamine2000™. Jako kontrolę negatywną w doświadczeniach wykorzystywano transfekcję komórek plazmidem pEGFPC2-BIO (kodującym białko GFP) oraz plazmidem kodującym SorLA-WT lub SorLA mini-EGF/ β -propeller (w przypadku doświadczenia z użyciem mini-receptorów). Mieszaniny transfekcyjne po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej równomiernie dodawano do szalek hodowlanych z komórkami HEK293 a następnie inkubowano przez 4 godziny w 37°C przy stałej wilgotności powietrza (95%) i 5% stężeniu CO₂. Po upływie tego czasu komórkom wymieniano pożywkę hodowlaną na świeżą, pozbawioną dodatku antybiotyków.

Po upływie 24 godzin od rozpoczęcia transfekcji komórki dwukrotnie płukano zimnym PBS i zdrapywano z powierzchni szalki przy użyciu drapak w buforze do lizy z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz. Otrzymane w ten sposób lizaty komórkowe przenoszono do probówek i inkubowano na lodzie przez 30 minut, po czym wirowano

w 4°C przez 15 minut ($16\ 000 \times g$). Do otrzymanego supernatantu dodawano bufor do lizy bez dodatku IGEPAL w celu zmniejszenia stężenia detergentu do 0,2%. Po pomiarze stężenia białka przy użyciu zestawu Pierce™ BCA Assay Kit, 40 µg białka z każdej próbki zachowywano jako frakcję całościową (*input*) do dalszych analiz i przygotowywano je do analizy Western blot poprzez wyrównanie stężeń wszystkich próbek, dodanie 4x buforu Laemmliego i pięciominutową inkubację w 95°C. Pozostałe 500-600 µg białka inkubowano natomiast ze złożem GFP Trap Particles® przez 30 minut w 4°C z rotacją. Następnie złoże trzykrotnie płukano buforem do lizy o zawartości detergentu zmniejszonej do 0,2%, po czym przy użyciu 2x buforu Laemmliego i 10 minutowej inkubacji w 95°C uwalniano związane ze złożem białka. Próbkę analizowano następnie wykorzystując technikę Western blot.

3.4.2. Współhodowla pierwotnego mysiego mikrogleju z komórkami mysiego glejaka

W dniu pozyskiwania mikrogleju z mieszanej hodowli glejowej (*sekcja 3.1.*), na inserty o średnicy porów 0,4 µm wysiewano komórki linii GL261-GFP. W zależności od typu wykorzystywanych szalek hodowlanych, komórki te wysiewano odpowiednio w ilości $2,5 \times 10^5$ /insert (szalki 6-dołkowe) lub $1,8 \times 10^4$ /insert (szalki 24-dołkowe). Po 24 godzinach komórkom GL261-GFP oraz mikroglejowi zmieniano pożywkę hodowlaną na świeżą, składającą się z DMEM z dodatkiem Glutamax, wzbogaconą 10% FBS (PanBiotech) oraz 1% P/S. Po upływie kolejnej doby delikatnie odciągano pożywkę znad mikrogleju i dodawano pożywkę kondycjonowaną pozyskaną spod insertu z komórkami GL261-GFP. Następnie, w szalce na której hodowano mikroglej umieszczano insert z komórkami glejaka (schemat doświadczenia przedstawiono na **Rycinie 8**). Jako kontrolę traktowano mikroglej, któremu 24 godziny od momentu wysiania zmieniano pożywkę hodowlaną na świeżą i nie poddawano dalej żadnym manipulacjom.



Rycina 8. Schemat współhodowli mikrogleju z mysią linią glejaka. Rycina została przygotowana z wykorzystaniem programu BioRender.

Po 24 godzinach od rozpoczęcia współhodowli, mikroglej w zależności od celu doświadczenia:

- a) Zdrapywano z powierzchni szalki przy użyciu drapak w 150 μ l roztworu Tris z dodatkiem 1% SDS (pH 8) i sonifikowano w 4°C (12 cykli 30s ON 30s OFF). Następnie otrzymany lizat komórkowy poddawano działaniu temperatury 95°C przez 10 min. Tak przygotowane próbki następnie analizowane były przy użyciu MS przez pracowników Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.
- b) Utrwalano przy wykorzystaniu 4% PFA w PBS i poddawano procedurze barwienia immunofluorescencyjnego.

Komórki mysiej linii glejaka znajdujące się na insertach trypsynizowano, a po ok. 5 minutach działanie enzymu hamowano przez dodanie pożywki hodowlanej. Zawiesinę komórek przenoszono do probówek i wirowano w 4°C przez 5 minut (200 $\times$ g). Otrzymany osad komórkowy płukano zimnym PBS i wirowano w warunkach jak powyżej. Następnie osad zawieszano w buforze do lizy z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz i inkubowano na lodzie przez 30 min. Komórki wówczas wirowano w 4°C przez 15 minut (16 000 $\times$ g), a na uzyskanym supernatancie przeprowadzano pomiar stężenia białka przy użyciu zestawu Pierce™ BCA Assay Kit. Następnie próbki przygotowywano do analizy Western blot,

poprzez wyrównanie stężeń wszystkich próbek, dodanie 4x buforu Laemmliego i pięciominutową inkubację w 95°C.

3.4.3. Przygotowywanie komórek linii GL261 do stereotaktycznych domózgowych implantacji *in vivo*

Komórki linii GL261-WT oraz GL261-luc⁺-tdT⁺ w dniu implantacji stereotaktycznych osiągały konfluencję ok. 70%. Komórki płukano ogrzanym do 37°C PBS i trypsynizowano w celu odklejenia z powierzchni butelki hodowlanej. Po zahamowaniu reakcji z użyciem pożywki hodowlanej komórki liczone z wykorzystaniem komory Bürkera. Następnie pobierano 1×10^6 komórek, które wirowano w 4°C przez 5 minut ($150 \times g$). Osad komórkowy płukano przy użyciu zimnego DMEM i ponownie wirowano w warunkach opisanych powyżej. Po dokładnym odciągnięciu pożywki, osad komórkowy zawieszano w 12,5 μ l zimnego DMEM, dzięki czemu w 1 μ l mieszaniny znajdowało się 8×10^4 komórek.

3.5. Mysi model glejaka

W doświadczeniach *in vivo* zdecydowano się wykorzystać myszy model glejaka GL261 ze względu na powszechność jego stosowania w badaniach przedklinicznych glejaków oraz podobieństwa pomiędzy guzami powstającymi na skutek podziałów komórek GL261 a ludzkimi GBM, obejmujące m.in. stopień unaczynienia i zmian nekrotycznych, inwazyjność oraz immunosupresyjność mikrośrodowiska nowotworu (Abdelwahab i in., 2011). Do doświadczeń wykorzystywano myszy C57BL/6J WT oraz C57BL/6J SorLA-KO w wieku od 8-12 tygodni, ważące 25-35 g. Zwierzęta przebywały w klatkach hodowlanych o stałym dostępie do wody i pożywienia. Myszy utrzymywane były w cyklu dobowym 12/12 (światło od 7:00 do 19:00), temperatura pomieszczenia wynosiła 20-24°C, a wilgotność: 55-65%. Roztwory leków używanych podczas i po operacji przygotowywano w 0,9% roztworze soli fizjologicznej. Doświadczenia zostały przeprowadzone według zgód otrzymanych od I Lokalnej Komisji Etycznej (LKE) działającej przy Uniwersytecie Warszawskim (zgody nr. 1102/2020, 1274/2021 oraz 1468/2023). Bupredine multidose[®] używano na podstawie zgód wydanych przez Wojewódzki Inspektorat Farmaceutyczny (zgody nr. WIF.WA.I.857.3.3.2024.AK oraz WIF.WA.I.857.3.11.2023.AK).

3.5.1. Stereotaktyczne domózgowe implantacje komórek glejaka

Domózgowe implantacje komórek linii GL261-WT bądź GL261-luc⁺-tdT⁺ zostały przeprowadzone według wcześniej opublikowanego protokołu (Kaminska i in., 2024). W przypadku doświadczeń przeprowadzanych wg zgody 1468/2023, myszy 20 minut przed rozpoczęciem implantacji zamiast Butomidol[®] podskórnie otrzymywały Bupredine multidose[®] w dawce 0,06 mg/kg masy ciała. Celem przeprowadzenia zabiegu, myszy usypiane były w komorze wypełnionej mieszaniną 4% izofluranu i tlenu, po czym umieszczano je w aparacie stereotaktycznym. Stan anestezji utrzymywano dzięki masce wziewnej, która doprowadzała do dróg oddechowych zwierząt mieszaninę 1,5% izofluranu i tlenu. Zwierzęta podczas zabiegu przez cały czas umieszczone były na macie grzewczej, zapewniającej utrzymanie temperatury ciała na poziomie 37°C. Bezpośrednio przed rozpoczęciem zabiegu, w zależności od otrzymanej zgody LKE, myszom podskórnie aplikowano:

- Metcam[®] w dawce 2 mg/kg masy ciała oraz Butomidol[®] w dawce 2 mg/kg masy ciała (m.c.) – zgody LKE 1102/2020 oraz 1274/2021
- Metcam[®] w dawce 2 mg/kg m.c. – zgoda LKE 1468/2023

Zwierzęta otrzymywały również znieczulenie miejscowe w postaci 5% Marcaine[®] podanego podskórnie w miejscu cięcia, a ich oczy były zabezpieczone przed światłem lampy operacyjnej i wysychaniem przy użyciu żelu Vidisic[®] oraz sterylnych gazików. Po potwierdzeniu głębokości znieczulenia (brak odruchów po uciśnięciu opuszki palcowej i braku odruchu rogówkowego), głowę zwierząt odkażano przy użyciu Cutasept G[®], golono sierść na głowie i wykonywano 0,5 cm rozcięcie skóry celem uwidocznienia szwów czaszkowych. Następnie, odnosząc się do bregmy, 1 mm w kierunku przednim oraz 2 mm w prawo przy użyciu wiertła wywiercano w czaszce otwór o średnicy ok 1 mm. Przy użyciu strzykawki Hamilton i automatycznej pompy myszom wstrzykiwano 8 x 10⁴ komórek GL261 w objętości 1 µl na głębokość 3 mm, z prędkością 0,25 µl/min. 2 minuty po zakończeniu wstrzykiwania igłę wyciągano z prędkością 1 mm/min, a wywiercony w czaszce otwór zabezpieczano woskiem kostnym. Rozcięcie skóry głowy zamykano wykorzystując nici chirurgiczne, a ranę pokrywano miejscowo znieczulającą lignokainą. Myszy do momentu wybudzenia z narkozy przebywała pod stałą obserwacją.

Przez pierwsze trzy dni od momentu operacji zwierzęta podskórnie otrzymywały leki przeciwbólowe – Metcam[®] w dawce 2 mg/kg m.c. (zgody LKE 1102/2020 i 1274/2021) oraz Metcam[®] i Tramvetol[®] odpowiednio w dawce 2 mg/kg m.c. i 25 mg/kg m.c. (zgoda LKE 1468/2023). Przez cały okres trwania eksperymentu co 2-3 dni kontrolowano stan zdrowia zwierząt oraz ich masę ciała, w celu wykrycia wszelkich oznak dystresu lub cierpienia.

3.5.2. Przyżyciowe monitorowanie wielkości mysich guzów mózgu

Do doświadczenia mającego na celu obrazowanie wielkości guzów mózgu, myszy WT i SorLA-KO poddawane były implantacji komórkami GL261-luc⁺-tdT⁺. 7, 14 oraz 21 dni od momentu operacji myszom podawano dootrzewnowo D-lucyferynę w dawce 150 mg/kg m.c. w PBS. Po upływie 8 minut zwierzęta usypiano przy użyciu mieszaniny 2% izofluranu z tlenem, po czym umieszczano je w aparacie Xtreme, gdzie poprzez maskę wziewną utrzymywano stan anestezji. Oczy zwierząt zabezpieczano przed wysychaniem wykorzystując żel Vidisic[®]. 10 minut od podania D-lucyferyny rozpoczynano dwuminutowe obrazowanie emisji bioluminescencji (pochodzące z rozkładu owego związku przez lucyferazę, którą produkowały komórki nowotworowe). Po zarejestrowaniu sygnału bioluminescencji wykonywano również zdjęcie rentgenowskie zwierząt. Objętość guzów szacowano z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania Bruker Molecular Imaging, który przy użyciu opcji „Auto Rois” automatycznie wyznaczał intensywność sygnału bioluminescencji.

3.5.3. Uśmiercanie zwierząt

21 dni od momentu implantacji komórek glejaka myszy uśmiercane były poprzez dyslokację kręgów szyjnych (analizy biochemiczne) lub poprzez perfuzję transkardialną (barwienia immunofluorescencyjne, analiza krwi obwodowej, cytometria przepływowa i sortowanie komórek mieloidalnych). W przypadku analizy krwi obwodowej myszy niepoddanych implantacjom komórek glejaka, zwierzęta zostały uśmiercone przez perfuzję transkardialną w 12 tygodniu życia.

W przypadku dyslokacji kręgów szyjnych, zwierzęta umieszczane były w komorze wypełnionej mieszaniną 4% izofluranu i tlenu. Po utracie przytomności dokonywano

dyslokacji kręgów szyjnych i dekapitacji w celu izolacji półkul mózgow objętych glejakiem.

Perfuzje transkardialne również poprzedzone były uśpieniem zwierząt przeprowadzonym w komorze wypełnionej mieszaniną 4% izofluranu i tlenu. Następnie narkozę pogłębiano poprzez dootrzewnowe podanie myszom mieszaniny VetaKetam[®] i Sedazin[®] (odpowiednio 160 mg/kg m.c. i 40 mg/kg m.c.). Po potwierdzeniu zaniku głębokiego czucia (brak odruchów po uciśnięciu opuszki palcowej) i braku odruchu rogówkowego, skórę brzucha zwierząt dezynfekowano przy użyciu Cutasept G[®] i otwierano klatkę piersiową w celu uwidocznienia serca. Po usunięciu worka osierdziowego nacinano prawy przedsionek serca i pobierano krew obwodową do probówek wysyconych EDTA w celu poddania dalszym analizom. Następnie do aorty wstępującej przez lewą komorę serca wprowadzano igłę, przez którą przy użyciu pompy perystaltycznej pompowano zimny PBS, a w przypadku przeznaczenia mózgow do barwień immunofluorescencyjnych dodatkowo 4% PFA w PBS. Po zakończeniu perfuzji dokonywano dekapitacji i izolowano mózgi do dalszych analiz. Analizy krwi obwodowej zwierząt przeprowadzone zostały przez firmę Vetlab sp.z.o.o.

3.5.4. Przygotowanie homogenatów mysich półkul mózgow po implantacji komórek glejaka

Wyizolowane mysie półkule mózgow po implantacji komórek GL261-WT traktowano buforem do lizy (z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz) w ilości 0,1 ml/ 0,1 g tkanki. Następnie, przy użyciu mechanicznego homogenizatora z metalowym ostrzem mózgi rozdrabniano przez ok. 30 sekund, inkubowano na lodzie przez 20 minut i wirowano w 4°C przez 10 minut (*1000 x g*). Otrzymany supernatant przenoszono do probówek i dodawano detergenty, Triton-X-100 oraz IGEPAL, do końcowego stężenia 0,5%. Tak przygotowane próbki inkubowano przez godzinę w 4°C z rotacją. Następnie próbki ponownie wirowano w 4°C przez 5 min (*16 000 x g*), mierzono stężenie białka w supernatancie z wykorzystaniem Pierce[™] BCA Assay Kit i przygotowywano do analizy Western blot poprzez wyrównanie stężeń wszystkich próbek, dodanie 4x stężonego buforu Laemmliego i pięciominutową inkubację w 95°C.

3.5.5. Izolacja rozpuszczalnej i błonowej frakcji białek z homogenatów mysich mózgów po implantacji komórek glejaka

W celu rozdzielenia białek frakcji rozpuszczalnej i błonowej stosowano metodę bazującą na ultrawierowaniu homogenatów mysich półkul mózgów objętych guzem, po implantacji komórek GL261-WT. Początkowo do mózgów dodawano bufor do homogenizacji mysich mózgów po implantacji komórek glejaka przed frakcjonowaniem (z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz) w ilości 0,1 ml/0,1 g tkanki. Następnie, przy użyciu mechanicznego homogenizatora z metalowym ostrzem mózgi rozdrabniano przez ok. 30 sekund, inkubowano na lodzie przez 20 minut i wirowano w 4°C przez 10 minut ($1000 \times g$). Część otrzymanego supernatantu pozostawiano do dalszych analiz jako frakcję białek niepoddanych frakcjonowaniu (*input*). Pozostałą część supernatantu umieszczano w probówkach przeznaczonych do ultrawierowania i wirowano w 4°C przez godzinę ($100000 \times g$). Uzyskany supernatant, który zawierał białka frakcji rozpuszczalnej, pobierano do probówek, a osad, który stanowił frakcję białek błonowych, zawieszano przy użyciu strzykawki-insulinówki w buforze do zawieszenia białek frakcji błonowej. Następnie stężenie białka we wszystkich próbkach (*input*, białkach frakcji rozpuszczalnej oraz błonowej) mierzono z wykorzystaniem Pierce™ BCA Assay Kit. Próbkę przygotowywano do analizy Western blot poprzez wyrównanie ich stężenia, dodanie 4x stężonego buforu Laemmliego i pięciominutową inkubację w 95°C. Próbkę przeznaczoną do testów ELISA po pomiarze stężenia białka przechowywano w -80°C do momentu przeprowadzenia analizy.

3.5.6. Barwienia immunofluorescencyjne skrawków mysich mózgów

Po perfuzji przy użyciu PBS oraz 4% PFA w PBS, mysie mózgi poddane implantacjom komórek GL261-luc⁺-tdT⁺ na 24 godziny umieszczane były w 4% roztworze PFA w 4°C. W celu krioprotekcji mózgi następnie inkubowano w 4°C w 30% roztworze sacharozy, który wymieniało łącznie dwa razy, kiedy zaobserwowano, że mózgi znajdują się na dnie probówki. Następnie mózgi krojono na skrawki o grubości 40 μm w -20°C przy użyciu kriostatu. Skrawki umieszczane były w buforze zapobiegającym zamrażaniu i przechowywane w -20°C do momentu dalszych analiz.

W momencie rozpoczęcia barwienia skrawki płukane były w PBS i inkubowane przez godzinę w roztworze PBS z dodatkiem 5% HS, celem uniemożliwienia niespecyficznego związania przeciwciał. Następnie skrawki inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi zawieszonymi w roztworze PBS z dodatkiem 1% BSA, 1% NDS i 0,3% Triton-X-100. Następnie skrawki trzykrotnie płukano PBS i inkubowano przez godzinę w ciemności, w temperaturze pokojowej, z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z odpowiednimi fluoroforami, zawieszonymi w tym samym buforze, co przeciwciała pierwszorzędowe. Po zakończonej inkubacji skrawki trzykrotnie płukano PBS, a ostatnie płukanie wzbogacono o dodatek DAPI (ostateczne stężenie 1 µg/ml) w celu wyznakowania jąder komórkowych. Następnie skrawki przenoszono na szkiełka mikroskopowe, osuszano i zamykano przy użyciu zatapiacza i szkiełka nakrywkowego. Tak przygotowane preparaty po całkowitym wysuszeniu były obrazowane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DM400B lub mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 700.

3.5.7. Dysocjacja mózgów przed analizą cytometryczną i sortowaniem komórek mieloidalnych

Po perfuzji PBS, mysie mózgi 21 dni po implantacji komórek GL261-WT umieszczano w HBSS bez dodatku jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} i rozdzielano na dwie półkule. Półkulę objętą guzem dysocjowano mechanicznie skalpelem, a następnie przenoszono do C-tuby, do której dodawano mieszaninę enzymów DNazy (0,5 mg/ml) i Kolagenazy IV (2,5 mg/ml) zawieszonych w DMEM z dodatkiem 10% FBS. C-tuby umieszczano w urządzeniu GentleMACS™ Octo Dissociator i dysocjowano według ustawień programu 37C_NTDK_1. Po zakończeniu dysocjacji działanie enzymów hamowano poprzez dodanie HBSS z dodatkiem jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . Mieszaninę następnie filtrowano wykorzystując filtry nylonowe o średnicy porów 70 µm oraz 40 µm i wirowano w 4°C przez 10 minut (300 x g). Celem pozbycia się mieliny, otrzymany po wirowaniu osad zawieszono w schłodzonym buforze do wytworzenia gradientu gęstości z dodatkiem Perkolu i 1,5M NaCl, a następnie bardzo powoli, przy użyciu pipety serologicznej dodawano DPBS tak, aby utworzył on osobną warstwę pokrywającą bufor do wytworzenia gradientu gęstości. Tak przygotowana zawiesina wirowana była w 4°C przez 20 minut (900 x g) bez przyspieszeń ani hamowań. Proces ten miał na celu wyodrębnienie z mieszaniny mieliny,

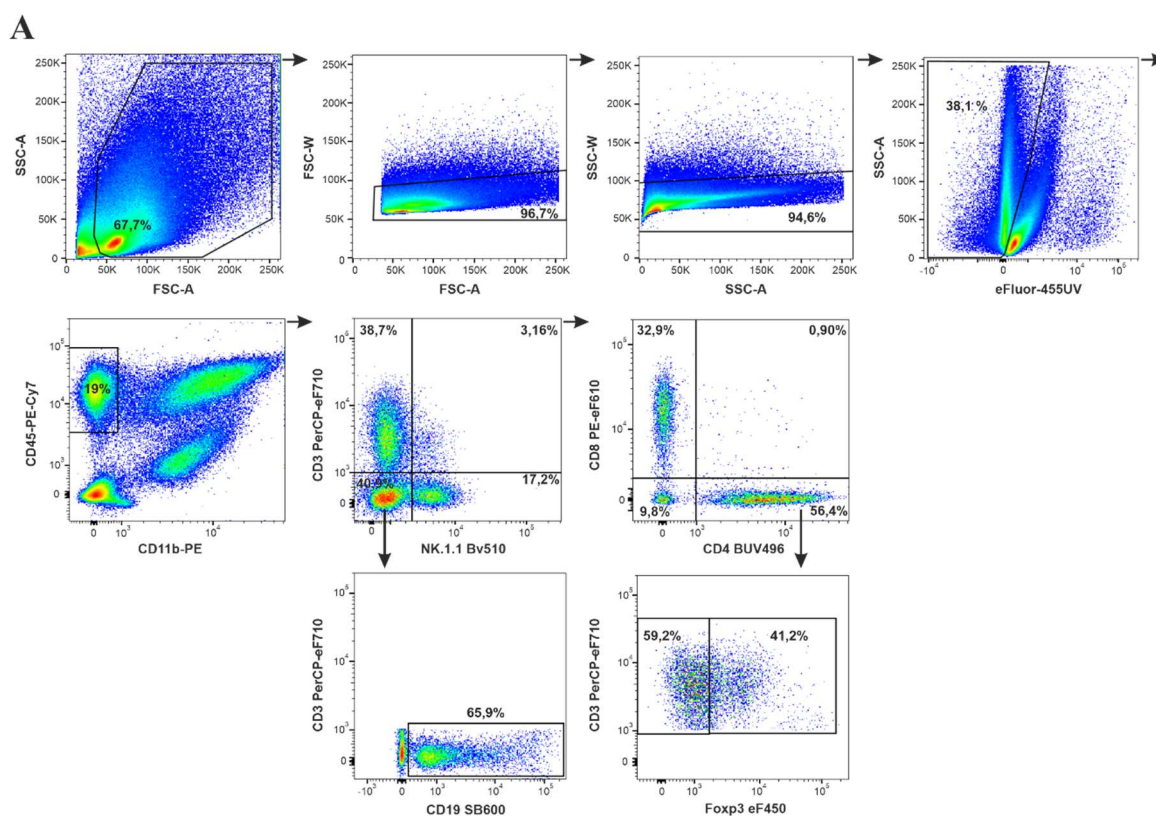
która po wirowaniu znajdowała się na granicy DPBS oraz buforu do wytworzenia gradientu gęstości, co umożliwiało jej dokładne usunięcie. Pozostały osad komórkowy zawieszono w PBS i liczono przy użyciu automatycznego licznika komórek. W przypadku analizy cytometrycznej, z każdej próbki pobrano 5×10^5 komórek do analizy profilu komórek linii mieloidalnej bądź limfoidalnej. Na potrzeby kontroli pobierano $2,5 \times 10^5$ komórek. Pozostałą część materiału wykorzystywano do sortowania komórek CD11b⁺ metodą FACS (ang. *fluorescence activated cell sorting*).

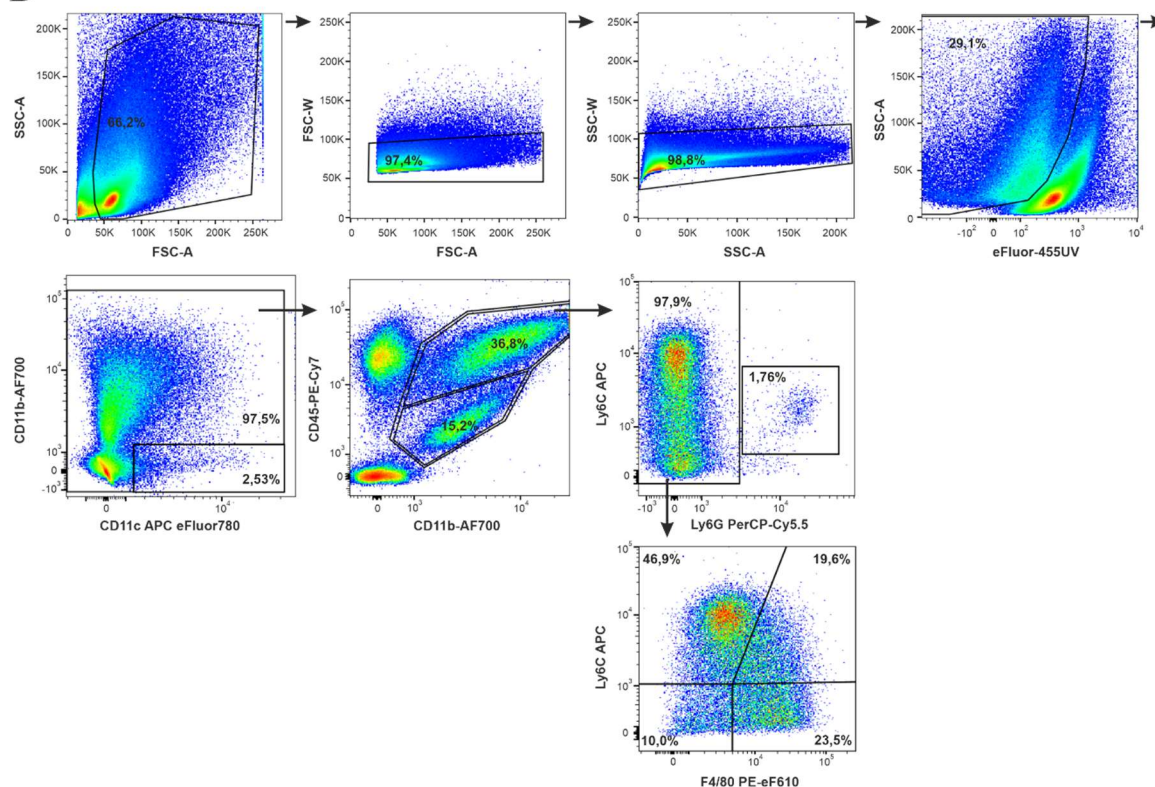
3.5.8. Cytometria przepływowa

Po liczeniu komórki przenoszono na 96-dołkową płytkę typu „V-bottom” i wirowano w 4°C przez 5 minut ($300 \times g$). Warunki dla każdego następnego wirowania opisanego w tej podsekcji pozostawały takie same. Komórki używane jako kontrola niebarwiona, kontrola pozytywna znakowania nieżywych komórek bądź kontrole pozbawione jednego fluoroforu (ang. *fluorescence minus one*, FMO) stanowiły mieszaninę materiału pochodzących z mózgów myszy WT oraz SorLA-KO w proporcjach 1:1.

Celem wyznakowania nieżywych komórek i wykluczenia ich z dalszych analiz, osad na 10 minut zawieszano w 100 µl PBS z dodatkiem Fixable Viability Dye eFluor™ 455UV. Wyjątek stanowiła kontrola niebarwiona, która została zawieszona w samym PBS. Jako kontrolę pozytywną znakowania nieżywych komórek wykorzystano komórki, z których połowa została uśmiercona przez 5 minutową inkubację w temperaturze 55°C. Następnie do wszystkich komórek dodawano 100 µl buforu FACS i wirowano. Osad następnie zawieszano na 10 minut w 200 µl buforu FACS z dodatkiem odczynnika FcBlock celem uniemożliwienia niespecyficznego wiązania przeciwciał. Po kolejnym wirowaniu komórki zawieszono w 100 µl buforu Brilliant stain z dodatkiem przeciwciał wchodzących w skład panelu limfo- lub mieloidalnego (*Sekcja 3.1. „Odczynniki i przeciwciała użyte do analizy cytometrycznej i sortowania komórek mieloidalnych”*) wiążących białka powierzchniowe. Inkubacja ta trwała 45 minut i przeprowadzono ją w ciemności. W tym samym czasie komórki stanowiące kontrolę niebarwioną oraz kontrolę pozytywną znakowania nieżywych komórek zawieszano w 100 µl buforu FACS, natomiast komórki stanowiące kontrole FMO zostały zawieszone w 100 µl mieszaniny przeciwciał bez dodatku tego, dla którego stanowiły kontrolę. Po upływie czasu inkubacji komórki wirowano. W przypadku komórek służących do analizy panelu limfoidalnego, na tym

etapie poddano je dodatkowo 30 minutowej inkubacji w buforze do permeabilizacji/utrwalania, po czym wirowano je, a następnie przez 45 minut inkubowano w ciemności z przeciwciałem anti-Foxp3 zawieszonym w buforze do permeabilizacji. Po wirowaniu komórki te, analogicznie do komórek wykorzystanych do analizy panelu mieloidalnego zawieszono w 200 µl buforu FACS i filtrowano do probówek. Obsługa cytometru BD LSR Fortessa i analiza uzyskanych danych z wykorzystaniem oprogramowania FlowJo® (v. 10.5.3, FlowJo LLC, BD) przeprowadzona została przez pracowników Laboratorium Cytometrii Instytutu Nenckiego PAN w Warszawie. Na **Rycinie 9** przedstawiono strategię bramkowania komórek dla panelu limfoidalnego (**Rycina 9A**) i mieloidalnego (**Rycina 9B**). Bramki ustawiono na podstawie kontroli FMO oraz kontroli pozytywnej znakowania nieżywych komórek.



B

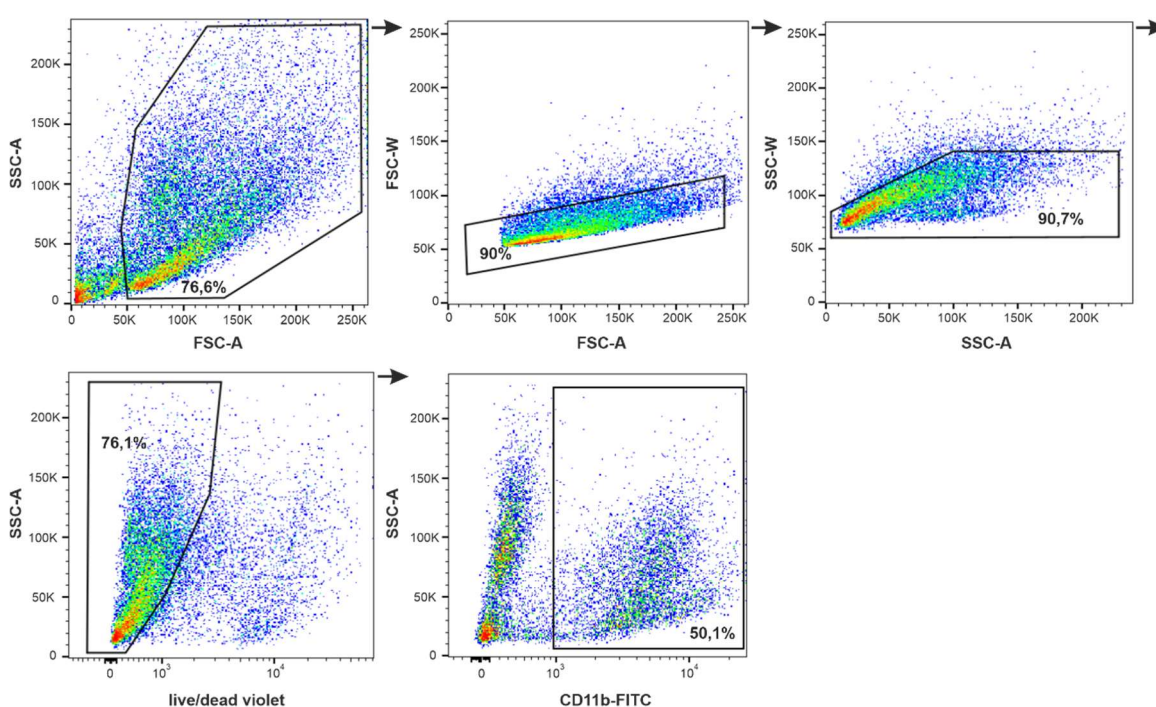
Rycina 9. Strategia bramkowania komórek dla panelu limfo- i mieloidalnego. (A) Strategia bramkowania komórek panelu limfoidalnego, **(B)** strategia bramkowania komórek panelu mieloidalnego.

3.5.9. Sortowanie komórek mieloidalnych CD11b+

Po pobraniu komórek do analizy cytometrycznej, pozostałe komórki przeznaczano na sortowanie celem pozyskania z mikrośrodowiska glejaka myszy WT i SorLA-KO komórek mieloidalnych CD11b⁺. Komórki używane jako kontrola niebarwiona bądź kontrola pozytywna znakowania nieżywych komórek stanowiły mieszaninę materiału pochodzącego z mózgów myszy WT oraz SorLA-KO w proporcjach 1:1. Opisane poniżej wirowania przeprowadzano w 4°C przez 5 minut (300 x g).

Po liczeniu komórki wirowano i przenoszono do probówek typu FACS. Celem wyznakowania nieżywych komórek i wykluczenia możliwości ich sortowania, komórki zawieszano w PBS z dodatkiem barwnika LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit w ilości 1 x 10⁶ komórek/100 µl, z wyjątkiem kontroli niebarwionej. Kontrolę pozytywną znakowania nieżywych komórek stanowiła mieszanina komórek, wśród

których połowa została uśmiercona przez 5 minutową inkubację w temperaturze 55°C. Po trwającej 10 minutowej inkubacji na lodzie, do komórek dodano bufor FACS i wirowano. Uzyskany osad komórkowy zawieszano w buforze FACS z dodatkiem FcBlock w ilości 1×10^6 komórek/100 μ l celem zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał. Następnie bezpośrednio do zawiesiny dodawano przeciwciało CD11b-FITC. Komórki inkubowano w ten sposób 45 minut na lodzie, w ciemności. Po zakończonej inkubacji do komórek dodano bufor FACS i wirowano. Otrzymane osady komórkowe zawieszano w buforze FACS w objętości 500-1000 μ l (w zależności od początkowej liczby komórek), filtrowano, i w tej formie poddawano sortowaniu w Laboratorium Cytometrii Instytutu Nenckiego PAN w Warszawie z wykorzystaniem sortera BD FACS Aria II. Wszystkie komórki sortowano do 20% roztworu BSA w PBS. Po zakończonym sortowaniu komórki wirowano, płukano zimnym PBS, po czym ponownie wirowano. Z otrzymanych osadów komórkowych izolowano następnie RNA oraz białka. Na **Rycinie 10** przedstawiono strategię bramkowania komórek CD11b⁺.



Rycina 10. Strategia bramkowania komórek CD11b⁺ przeznaczonych do sortowania.

3.5.10. Izolacja RNA oraz białek z wysortowanych komórek CD11b⁺

W celu jednoczesnego pozyskania z wysortowanych komórek CD11b⁺ materiału w postaci RNA oraz białek, zastosowano metodę opartą na wykorzystaniu TRIzol i chloroformu. Osady komórkowe lizowano poprzez 5 minutową inkubację w TRIzolu, po której do próbek dodawano chloroform w tej samej objętości, co miało na celu oddzielenie kwasów nukleinowych od białek. Próbkę wirowano w 4°C przez 5 minut (5000 x g). Otrzymaną po wirowaniu fazę górną (wodną) zawierającą RNA pobierano i dodawano jedną objętość 70% etanolu, po czym przeprowadzano izolację kwasu nukleinowego przy wykorzystaniu zestawu komercyjnego firmy EURx. Do fazy dolnej, w której znajdowały się białka, dodawano 4 objętości metanolu, 3 objętości wody i 1 objętość chloroformu. Po dokładnym wymieszaniu, próbkę wirowano w 4°C przez 15 minut (5000 x g) po czym odcinano ciecz nad interfazą, którą stanowiły wyizolowane białka. W celu ich wytrącenia do próbek dodawano 6 objętości metanolu, mieszano i wirowano w 4°C przez 5 minut (5000 x g). Po odrzuceniu supernatantu wytrącone białka suszono w 37°C przez 5 minut i zawieszano w buforze do solubilizacji białek. Pomiar stężenia białka przeprowadzano z wykorzystaniem Pierce™ BCA Assay Kit, po czym próbki przygotowywano do analizy Western blot poprzez wyrównanie ich stężenia, dodanie 4x stężonego buforu Laemmli i pięciominutową denaturację w 95°C.

3.6. Testy ELISA

Testy immunoenzymatyczne ELISA przeprowadzone były według zaleceń producenta. Zarówno pożywki hodowlane mikrogleju WT oraz SorLA-KO, jak również białka frakcji rozpuszczalnej pozyskane z homogenatów mysich półkul mózgow objętych glejakiem, przed przeprowadzeniem testu zostały odpowiednio rozcieńczone. Wartości absorbancji uzyskane przy pomiarze długości fali 470 nm z korekcją przy długości fali 570 nm były normalizowane były do wcześniej określonego z wykorzystaniem zestawu BCA Pierce™ BCA Protein Assay stężenia białka w lizacie komórkowym, uzyskanym z hodowli komórek, z których pochodziła badana pożywka hodowlana lub stężenia białek frakcji rozpuszczalnej pozyskanych z homogenatów mysich półkul mózgow.

3.7. Elektroforeza i Western blot

Zdenaturowane działaniem buforu Laemmliego i temperatury 95°C białka poddawane były rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu denaturującym (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). W zależności od masy analizowanego białka wykorzystywano żele o 12% (białka poniżej 40 kDa), 10% (białka o masie 40 – 140 kDa) lub 8% (białka o masie 140-250 kDa) stężeniu poliakrylamidu. Przygotowane próbki nakładano do studzienek w żelu w identycznych ilościach, a w zależności od eksperymentu ilość białka w próbce wynosiła od 5 do 30 µg (z wyjątkiem próbek po koimmunoprecypitacji, gdzie po uwolnieniu białek ze złoża niemożliwy był pomiar stężenia). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 1x stężonym buforze do elektroforezy, przy początkowym napięciu prądu wynoszącym 90V, a następnie 120V. Każdy rozdział elektroforetyczny prowadzony był w obecności markera wielkości mas cząsteczkowych białek.

Po zakończeniu rozdzielu elektroforetycznego żel poliakrylamidowy płukano w 1x stężonym buforze do transferu, a następnie przeprowadzano transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową przy użyciu aparatu Trans-Blot Turbo Transfer System i komercyjnie przygotowanych zestawów. W zależności od analizowanych białek wybierano program dedykowany białkom o niskiej, średniej lub dużej masie cząsteczkowej. Po przeprowadzonym transferze membrany płukano w wodzie destylowanej i barwiono odczynnikiem Ponceau S celem uwidocznienia efektywności transferu. Membrany przez godzinę inkubowano w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w TBS-T, co miało na celu uniemożliwienie niespecyficznego wiązania przeciwciał. Następnie membrany inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi zawieszonymi w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w TBS-T. Po zakończonej inkubacji membrany trzykrotnie płukano TBS-T i przez godzinę inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi IgG-HRP zawieszonymi w tym samym buforze, co przeciwciała pierwszorzędowe. Następnie, po ponownym trzykrotnym przepłukaniu membran w TBS-T, sygnał chemiluminescencji rejestrowano w urządzeniu ChemiDoc dzięki użyciu komercyjnie dostępnych odczynników ECL. Analizy intensywności sygnału przeprowadzano w programie Image Lab 6.1. (BioRad). Sygnał pochodzący od badanego białka normalizowano do sygnału pochodzącego od dehydrogenazy aldehydu

3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH), β -aktyny lub PonceauS, a w przypadku określania poziomu białek fosforylowanych, do ich form niefosforylowanych.

3.8. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

Celem określenia poziomu ekspresji genów stosowano metodę qPCR. W tym celu z hodowli pierwotnych mikrogleju WT oraz wysortowanych komórek CD11b⁺ z objętych nowotworem półkul mózgow myszy WT i SorLA-KO izolowano RNA z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów firm Qiagen lub EURx. Uzyskane RNA poddawano następnie reakcji odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania kodującego DNA (ang. *coding DNA*, cDNA) przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnego zestawu firmy Applied Biosystems. W zależności od stopnia efektywności izolacji, używano w tym celu RNA w ilości od 100 do 500 ng, Reakcję przeprowadzano w termocyklerze w następujących warunkach:

- Temperatura 37°C, 1 godzina
- Temperatura 95°C, 5 minut
- Temperatura 4°C, ∞ .

Otrzymane cDNA w zależności od wyjściowej ilości RNA rozcieńczano do finalnego stężenia wynoszącego ok. 5 ng na reakcję. Reakcję qPCR przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia QuantStudio 12K Flex.

- W przypadku użycia sond Taqman, do próbek dodawano mieszaninę buforu Fast Universal PCR Master Mix oraz odpowiednich sond TaqMan, które rozcieńczono do końcowego stężenia 1x z wykorzystaniem ultraczystej wody. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 μ l. Reakcję przeprowadzono wedle następujących etapów:

- | | | |
|--------------------------------|---|----------|
| 1) Temperatura 95°C, 20 sekund | } | 40 cykli |
| 2) Temperatura 95°C, 1 sekunda | | |
| 3) Temperatura 60°C, 20 sekund | | |

- W przypadku użycia starterów, do próbek dodawano mieszaninę buforu SYBR™ Green oraz mieszaninę odpowiednich starterów. Przy użyciu ultraczystej wody mieszaninę rozcieńczano do końcowego stężenia buforu 1x oraz 10 μM każdego ze starterów. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 μl. Reakcję przeprowadzono według następujących etapów:

- 1) Temperatura 50°C, 2 minuty
 - 2) Temperatura 95°C, 10 minut
 - 3) Temperatura 95°C, 15 sekund
 - 4) Temperatura 60°C, 1 minuta
- } 40 cykli

Każda próbka analizowana była przy użyciu reakcji qPCR w dwóch powtórzeniach technicznych. Poziom ekspresji badanego genu normalizowany był do poziomu ekspresji genów referencyjnych, których poziom nie zmienia się pod wpływem badanych warunków (tzw. *housekeeping genes*), tj. *Hprt1* lub *β2M*. W tym celu wyznaczano wartość ΔC_T , która wyraża różnicę wartości cyklu progowego (ang. *threshold cycle*) zarejestrowaną dla genów *Hprt1* lub *β2M* i genu badanego. Od wartości ΔC_T każdej z próbek odejmowano następnie uśrednioną wartość ΔC_T wszystkich próbek kontrolnych (w przypadku wysortowanych komórek CD11b⁺ jako kontrolę uznawano materiał pochodzący ze zwierząt WT). Uzyskaną wartość $\Delta\Delta C_T$ przeliczano na krotność zmiany w poziomie ekspresji genów stosując wzór $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

3.9. Analiza zdjęć preparatów immunofluorescencyjnych wykonanych z użyciem mikroskopii

3.9.1. Analiza morfologii mikrogleju w mysim mózgu

Analizę morfologii mikrogleju w mikrośrodku glejaka oraz półkulach mysich mózgów nieobjętych guzem przeprowadzono na zdjęciach skrawków mózgów myszy WT i SorLA-KO pozyskanych 21 dni po implantacji komórek GL261-luc⁺-tdT⁺. Zdjęcia zebrano w postaci Z-stacków, tzn. wielu zdjęć wykonanych w różnych odległościach ogniskowych, a następnie nałożonych na siebie. Przy wykorzystaniu oprogramowania ImageJ ze zdjęć wybierano pojedyncze komórki, a obejmujące je Z-stacki duplikowano

i zapisywano w formie nowych plików. Następnie przy użyciu programu Imaris 9.1.2., wykorzystując opcję Imaris Filament Tracer zaznaczano punkty początkowe i końcowe każdej komórki. Otrzymywany tym sposobem zrekonstruowany szkielet komórki w projekcji 3D poddawano analizie Sholla.

3.9.2. Pomiar kolokalizacji TNF- α z markerami poszczególnych kompartmentów komórkowych w mikrogleju

Celem określenia kolokalizacji TNF- α z białkowymi markerami poszczególnych kompartmentów komórkowych w mikrogleju WT i SorLA-KO stosowano oprogramowanie ImageJ, w którym po zaznaczeniu pojedynczej komórki obliczano współczynnik korelacji Mandersa 1 sygnału pochodzącego z barwienia TNF- α oraz określonego markera przy wykorzystaniu wtyczki „colocalization plugin”.

3.9.3. Określenie ilości aktywnie proliferującego mikrogleju *in vitro*

W celu określenia ilości aktywnie proliferującego mikrogleju poddanego współhodowli z komórkami mysiego glejaka, wykorzystując zdjęcia preparatów immunofluorescencyjnych obliczano liczbę jąder komórkowych Ki67⁺ oraz liczbę jąder DAPI⁺, a następnie wyznaczano stosunek obu wartości. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Zdjęcia każdego kanału poddawano modyfikacjom przy użyciu funkcji „Threshold” w celu wyraźnego zaznaczenia wybarwionych komórek. Następnie jądra komórkowe Ki67⁺ oraz DAPI⁺ liczono z wykorzystaniem funkcji „Analyze particles”.

3.9.4. Określenie ilości aktywnie proliferującego mikrogleju w mikrośrodoisku glejaka *in vivo*

Analiza ilości aktywnie proliferującego mikrogleju w mikrośrodoisku glejaka myszy WT oraz SorLA-KO została przeprowadzona z wykorzystaniem zdjęć skrawków mysich mózgów pozyskanych 21 dni po implantacji komórek GL261-luc⁺-tdT⁺. Skrawki barwiono immunofluorescencyjnie przeciwciałami anti-Iba1 oraz anti-Ki67. Liczba komórek Iba1⁺Ki67⁺ obliczana była manualnie z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ oraz wtyczki CellCounter. Liczba komórek z danego pola widzenia była następnie dzielona

przez wymiary całego zdjęcia w celu uzyskania informacji dotyczącej ilości komórek na powierzchnię 1 mm².

3.9.5. Analiza infiltracji komórek układu odpornościowego do mikrośrodowiska glejaka

Intensywność sygnału pochodzącą z barwień immunofluorescencyjnych skrawków mózgowi myszy WT i SorLA-KO pozyskanych 21 dni po implantacji komórek GL261-luc⁺-tdT⁺ z użyciem przeciwciał znakujących poszczególne populacje komórek układu odpornościowego obliczano z wykorzystaniem funkcji „Measure” w programie ImageJ.

3.9.6. Ocena zdolności mikrogleju WT i SorLA-KO do fagocytozy

Intensywność sygnału fluorescencji pochodzącą ze sfagocytowanych przez mikroglej kulek IgG-FITC mierzono z wykorzystaniem oprogramowania QuPath-0.5.1. Przy pomocy funkcji „Cell detection” program zaznaczał pojedynczą komórkę na podstawie zadanych parametrów:

- Nucleus parameters:
 - Background radius: 10 μm
 - Median filter radius: 1 μm
 - Sigma: 1,5
 - Minimum area: 30 μm^2
 - Maximum area: 400 μm^2
- Intensity parameters:
 - Threshold: 200
 - ✓ Split by shape
- Cell parameters
 - Cell expansion: 20 μm
- General parameters:
 - ✓ Smooth boundaries

- ✓ Make measurements

Następnie, w celu określenia powierzchni cytoplazmy odejmowano od powierzchni całej komórki powierzchnię jądra, a otrzymaną wartość mnożono przez średnią intensywność sygnału FITC w celu uzyskania wartości odpowiadającej całkowitej intensywności sygnału w komórce.

3.10. Analiza statystyczna

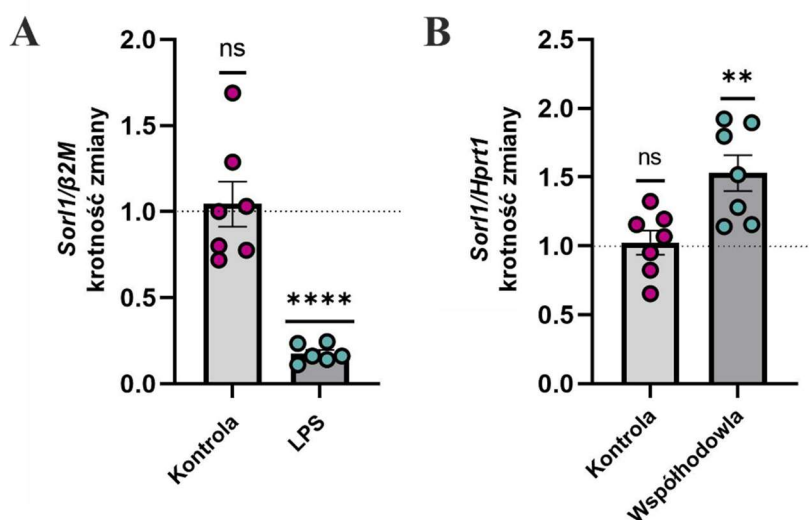
Do przeprowadzenia analiz statystycznych oraz graficznej prezentacji wyników liczbowych wykorzystywano program GraphPad Prism 9. Testy przeprowadzane w ramach porównania dwóch grup badanych obejmowały test t-studenta dla jednej próby (odnosząc się do hipotetycznej wartości 1), dwustronny test t-studenta oraz test U Manna-Whitneya. Dla porównań wielokrotnych stosowano analizę wariancji ANOVA, jedno- lub dwuczynnikową, dla których w zależności od analizy stosowano dodatkowo test post-hoc Tuckey'a lub test Sidak'a. Słupki błędów na wykresach liczbowych przedstawiają błąd standardowy średniej (ang. *standard error mean*, S.E.M).

Jeżeli analiza nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami, wynik opisywano jako „ns” (nieistotny statystycznie) lub liczbowo wskazywano wartość p. Jeżeli różnica wykazywała istotność statystyczną oznaczano ją symbolem „*”, a liczba symboli odnosiła się do wartości p: „*” $p < 0,05$; „**” $p < 0,01$; „***” $p < 0,001$; „****” $p < 0,0001$. Literą n opisywano liczbę wykorzystanych w doświadczeniach powtórzeń biologicznych. Informacje na temat poszczególnych analiz zawarte są w opisach rycin.

IV. WYNIKI

4.1. Określenie mechanizmów regulujących ekspresję *Sorl1* w pierwotnym mysim mikrogleju

Analizy bioinformatyczne danych scRNA-seq pochodzących z próbek pacjentów chorujących na GBM wykazały, że poziom ekspresji *SORL1* w ludzkich GAMs może być związany z ich potencjalnymi właściwościami pronowotworowymi (wysoki poziom *SORL1*) lub prozapalnymi (niski poziom *SORL1*) (sekcja 1.8.). W związku z tym postanowiono sprawdzić, czy poziom ekspresji *Sorl1* w mikrogleju może ulegać zmianom w zależności od kierunku aktywacji komórek. W tym celu pierwotny mysy mikroglej WT traktowano LPS lub współhodowano z komórkami mysiej linii glejaka GL261-GFP. Miało to na celu odwzorowanie polaryzacji fenotypu mikrogleju zachodzącej odpowiednio pod wpływem stanu zapalnego bądź czynników wydzielanych przez komórki glejaka. Analiza poziomu ekspresji genu *Sorl1* wykazała, że traktowanie komórek z wykorzystaniem LPS powoduje spadek poziomu ekspresji *Sorl1* (**Rycina 11A**), podczas gdy pod wpływem współhodowli z komórkami GL261 poziom jego transkryptu w mikrogleju wzrasta (**Rycina 11B**), co wskazuje, iż w zależności od kierunku aktywacji mikrogleju, poziom ekspresji genu kodującego SorLA ulega zmianom.



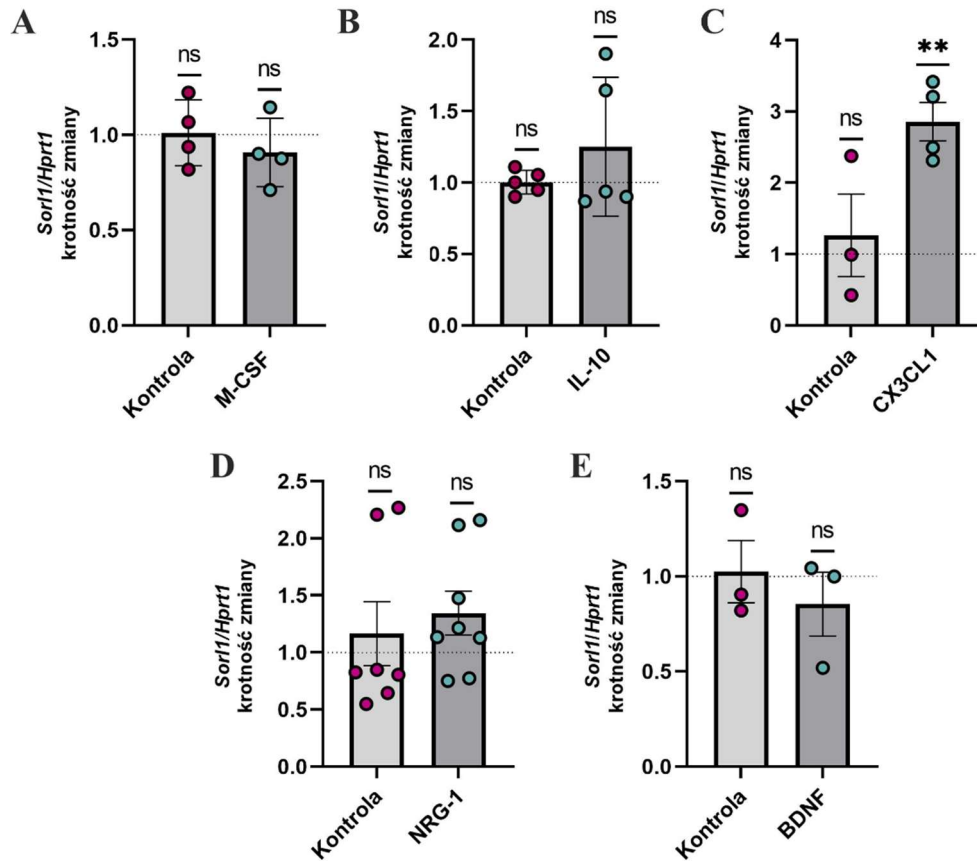
Rycina 11. Porównanie ekspresji genu *Sorl1* w pierwotnym mysim mikrogleju WT zależy od kierunku jego aktywacji. Wykresy przedstawiające poziom ekspresji *Sorl1* w mikrogleju (A) po 24-godzinnej traktowaniu LPS oraz (B) po 24-godzinnej współhodowli z komórkami mysiej linii glejaka GL261-GFP. Poziom ekspresji *Sorl1* normalizowano do poziomu ekspresji genów

referencyjnych (A) *Hprt1* oraz (B) $\beta 2M$. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta dla jednej próby. Liczba powtórzeń biologicznych n=6-7.

4.1.1. Ocena wpływu wybranych czynników na poziom ekspresji *Sor11* w mysim mikrogleju

Mając na uwadze fakt, iż poziom ekspresji genu kodującego SorLA zależy od polaryzacji fenotypu mikrogleju, w celu określenia mechanizmu regulującego to zjawisko postanowiono zidentyfikować wpływ wybranych czynników na poziom transkryptu *Sor11*. W pierwszej kolejności skupiono się na czynnikach, o których wiadomo, że wydzielane są przez komórki glejaka i mogą wpływać na rozwój wspierających nowotwór właściwości GAMs: M-CSF, IL-10 oraz CX3CL1. W przypadku traktowania komórek M-CSF lub IL-10 nie zaobserwowano zmian w poziomie ekspresji *Sor11* pomiędzy mikroglejem hodowanym w warunkach kontrolnych, a stymulowanym (**Rycina 12A-B**), podczas gdy stymulacja komórek z wykorzystaniem CX3CL1 spowodowała wzrost ekspresji genu kodującego receptor SorLA (**Rycina 12C**).

Jako kolejne czynniki mogące potencjalnie wpływać na poziom ekspresji *Sor11* w mikrogleju wybrano NRG-1 oraz BDNF, o których wiadomo, iż mogą uczestniczyć w polaryzacji fenotypu mikrogleju (Charlton i in., 2023; Y. Ma i in., 2022; X. Zhang i in., 2014) i promują ekspresję *SORL1* w komórkach linii ludzkiego nowotworu piersi (NRG-1) (Al-Akhrass i in., 2021) lub neuronach (BDNF) (Young i in., 2015). Stymulacja mikrogleju tymi czynnikami nie spowodowała jednak zmian w poziomie ekspresji *Sor11* w mysim mikrogleju (**Rycina 12D-E**).



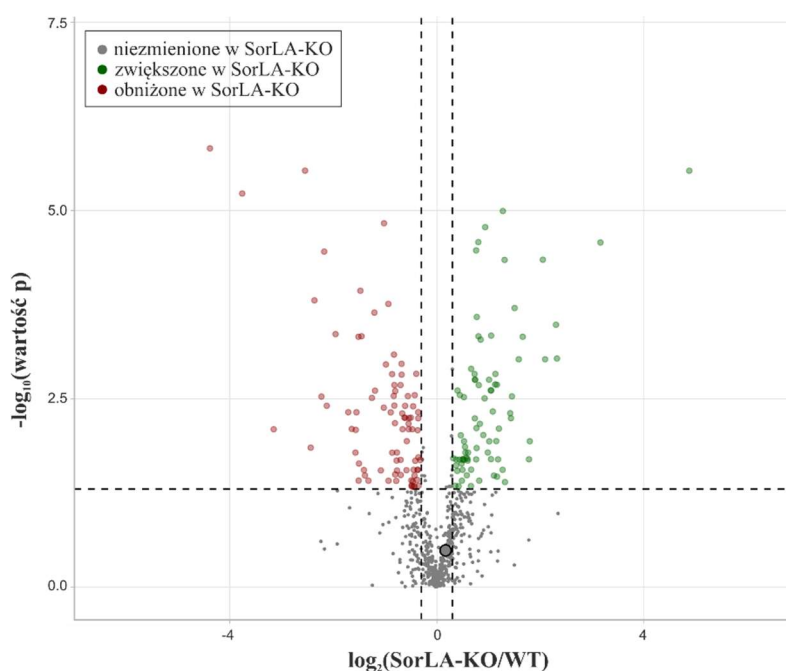
Rycina 12. Poziom ekspresji genu *Sorl1* w mysim mikrogleju wzrasta pod wpływem stymulacji CX3CL1. Wykresy przedstawiające poziom ekspresji *Sorl1* w mikrogleju po 24-godzinnej stymulacji (A) M-CSF, (B) IL-10, (C) CX3CL1, (D) NRG-1 oraz (E) BDNF. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta dla jednej próby. Liczba powtórzeń biologicznych n=3-8.

4.2. Identyfikacja białek wydzielanych przez mikroglej w sposób zależny od SorLA

Jedną z głównych konsekwencji polaryzacji fenotypu mikrogleju zachodzącej pod wpływem określonych warunków jest wydzielanie biologicznie aktywnych białek, które mają na celu promowanie procesów prozapalnych bądź proregeneracyjnych. SorLA jako receptor sortujący, odgrywa kluczową rolę w regulacji uwalniania białek poza komórkę, jednakże nie zostało wcześniej zweryfikowane, czy obecność receptora warunkuje ten proces również w mikrogleju. Mając na uwadze fakt, iż poziom ekspresji *Sorl1* w komórkach mikrogleju różni się w zależności od typu jego aktywacji (sekcja 4.1.) postanowiono sprawdzić, czy SorLA może bezpośrednio kształtować odpowiedź mikrogleju poprzez regulację wydzielanych przez niego białek. W tym celu mikroglej WT

i SorLA-KO przez 24 godziny hodowano w pożywce DMEM z dodatkiem Glutamax wzbogaconej PMA, którą następnie analizowano przy użyciu MS. Użycie w doświadczeniu PMA podyktowane było faktem, iż w warunkach *in vitro* aktywuje ono białkową kinazę C, co w efekcie pobudza komórki do produkcji i wydzielania różnego rodzaju białek (Cao i in., 2020).

Analiza MS wykazała, iż skład pożywki hodowlanej pochodzącej z hodowli mikrogleju pozbawionego SorLA w porównaniu do pożywki pozyskanej z hodowli mikrogleju WT różnił się pod kątem obecności określonych białek (**Rycina 13, Tabela 4**). Jako białka wydzielane różnicowo przez mikroglej SorLA-KO wybrano te, które spełniały następujące kryteria: (1) zlogarytmowana wartość krotności zmiany ($\log_2 \text{SorLA-KO/WT}$) wynosiła $0,3 \leq$ bądź $\geq -0,3$; (2) różnica między genotypami była istotna statystycznie ($-\log_{10}(\text{wartość } p) > 1,3$).



Rycina 13. Brak SorLA wpływa na wydzielanie białek przez mikroglej. Wykres typu Volcano Plot przedstawiający relatywne ilości białek wydzielanych przez mikroglej SorLA-KO w porównaniu do mikrogleju WT. Wartości na osi X wyrażają zlogarytmowane wartości krotności zmian w ilości białek wydzielanych przez mikroglej SorLA-KO. Wartości zlogarytmowanej krotności zmian białek wydzielanych w sposób różnicowy zostały wyznaczone jako $0,3 \leq$ bądź $\geq -0,3$ (linie pionowe). Wartości na osi Y przedstawiają $-\log_{10}(\text{wartość } p)$. Zlogarytmowane wartości krotności zmian, dla których $-\log_{10}$ z wartości p wynosił $> 1,3$ uznane zostały za istotne statystycznie (linia pozioma). Białka uznane za wydzielane w mniejszych ilościach przez mikroglej SorLA-KO w porównaniu do mikrogleju WT zaznaczono na wykresie kolorem czerwonym, z kolei w większych – kolorem zielonym. Białka, dla których wartości

zlogarytmowanej krotności zmian mieściły się w przedziale -0,3 - 0,3 lub zaobserwowana różnica nie wykazywała istotności statystycznej ($-\log_{10}$ wartość $p \leq 1,3$) zaznaczono kolorem szarym. Liczba powtórzeń biologicznych $n=6$.

Tabela 4. Wybrane białka różnicowo wydzielane przez mikroglej SorLA-KO.

<u>Białko[*]</u>	<u>Wartość p</u>	<u>FDR^{**}</u>	<u>Krotność zmiany</u>
CD14	0,0024	0,0310	1,32
CD44	0,0009	0,0198	4,99
CXCL16	0,0017	0,0271	1,66
SPP1	0,0164	0,0976	0,586
MMP9	0,0080	0,0587	0,686

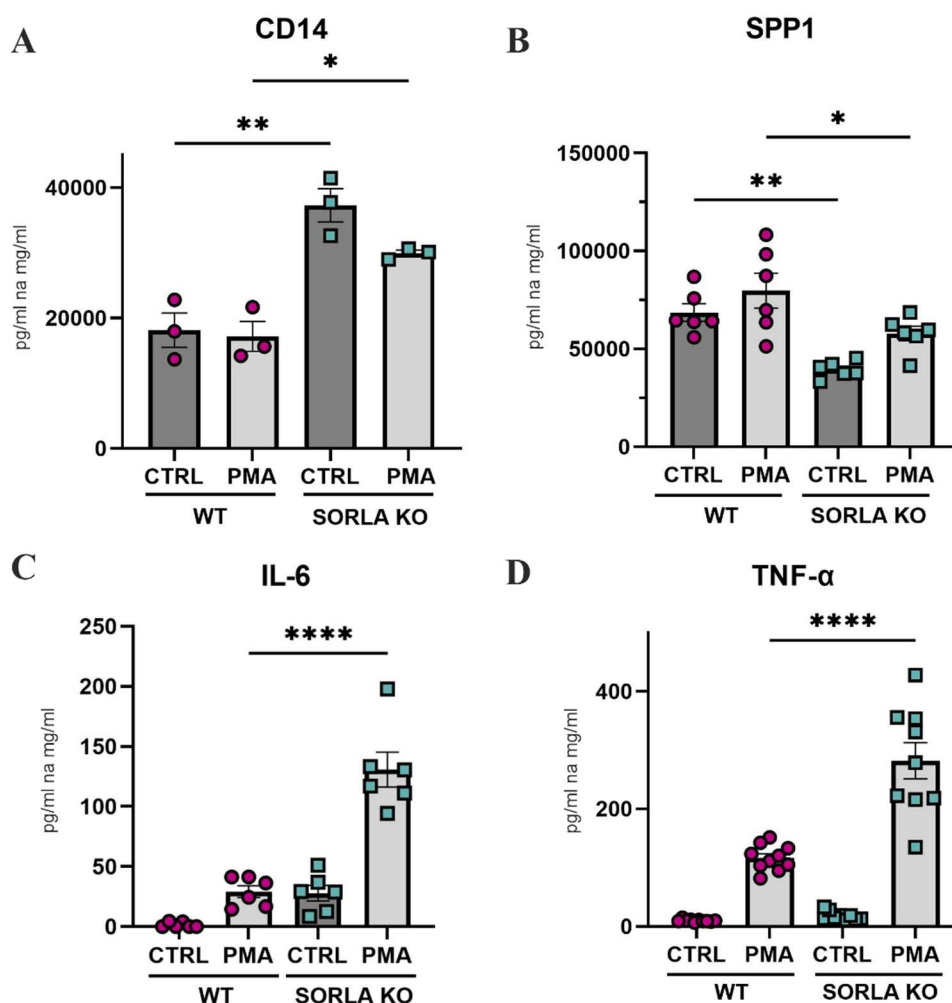
*Skróty objaśnione w dalszej części tekstu.

**Współczynnik fałszywych odkryć (ang. *false discovery rate*, FDR)

Do grupy białek, których wydzielanie przez mikroglej SorLA-KO było zwiększone w porównaniu do mikrogleju WT zaliczyć można m.in. CD14 (ang. *cluster of differentiation 14*), CD44 (ang. *cluster of differentiation 44*), czy CXCL16 (ang. *CXC ligand chemoreceptor 16*). Każde z nich zlokalizowane jest w obrębie błony komórkowej, gdzie pełni określone funkcje. Jednakże na skutek określonych bodźców takich jak wzmożony stan zapalny w żywym organizmie czy stymulacja PMA w warunkach *in vitro*, ulegają one cięciu przez enzymy proteolityczne. Na skutek tego procesu uwalniana jest ich tzw. część rozpuszczalna (ang. *soluble*), pełniąca określone funkcje, oraz stanowiąca biomarker stanu zapalnego (Lehrke i in., 2007; Tabung i in., 2017; Wong i in., 2024). W przypadku CD14, ważnego elementu inicjującego odpowiedź komórek na LPS, jego cięcie stanowi ważny mechanizm regulujący ilość receptora na powierzchni komórki (Rokita & Menzel, 1997). CD44 to z kolei cząsteczka adhezyjna, która odgrywa znaczącą rolę w przebudowie ECM. Spekuluje się, iż cięcie CD44 na skutek którego powstaje sCD44 stanowi ważny element rozwoju odpowiedzi prozapalnej (Puré & Cuff, 2001). Forma rozpuszczana CXCL16 aktywuje z kolei receptor CXCR6, prowadząc do zapoczątkowania kaskady reakcji promujących odpowiedź zapalną i chemoatrakcję komórek układu odpornościowego (Abel i in., 2004; Garcia i in., 2007).

Wśród grupy białek, które przez mikroglej SorLA-KO były wydzielane w mniejszym stopniu niż przez mikroglej WT zidentyfikowano m.in. SPP1 oraz metaloproteinazę 9 (ang. *metalloproteinase 9*, MMP9), a więc białka, których właściwości można najogólniej określić jako proregeneracyjne. Jak zostało wspomniane w *sekcji 1.3*, wydzielana przez komórki glejaka SPP1 wpływa na polaryzację fenotypu GAMs w kierunku wspierającym nowotwór. Jednakże GAMs również wydzielają SPP1, która odpowiada m.in. za reorganizację ECM, promując tym samym wzrost guza (C. He i in., 2021). Podobna sytuacja dotyczy MMP9, enzymu proteolitycznego, który zaangażowany jest w przebudowę ECM, co przyczynia się do tworzenia bardziej sprzyjającego środowiska dla wzrostu nowotworu (F. Hu i in., 2014).

Z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych ELISA postanowiono potwierdzić wyselekcjonowane wyniki pochodzące z analizy MS, wykorzystując ten sam schemat doświadczalny, tzn. badając pożywkę hodowlaną mikrogleju po 24-godzinnej stymulacji PMA jak również taką, która pochodziła z mikrogleju niepoddanego stymulacji. Tym samym potwierdzono, iż w porównaniu do mikrogleju WT, komórki pozbawione SorLA wydzielają zwiększone ilości CD14 (**Rycina 14A**), a zmniejszone ilości SPP1 (**Rycina 14B**). Dodatkowo postanowiono sprawdzić, czy SorLA może wpływać na wydzielanie przez mikroglej cytokin znanych ze swoich prozapalnych właściwości, które nie zostały zidentyfikowane w ramach analizy MS – IL-6 oraz TNF- α . Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem zestawu Luminex (IL-6) oraz Murine U-Plex Biomarker Group 1 assay (TNF- α) wykazały, iż mikroglej pozbawiony SorLA wydzielą znacznie większe ilości obu rodzajów cytokin w porównaniu do mikrogleju WT (**Rycina 14C-D**).



Rycina 14. Brak SorLA w mikrogleju wpływa na zwiększone wydzielanie białek o właściwościach prozapalnych. Wykresy przedstawiające wyniki testów porównujących ilości (A) CD14, (B) SPP1, (C) IL-6 oraz (D) TNF- α w pożywkach hodowlanych mikrogleju WT i SorLA-KO hodowanych w warunkach kontrolnych (CTRL) lub po 24-godzinnej stymulacji PMA. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a. Liczba powtórzeń biologicznych n=3-10. Testy porównujące ilości SPP1 oraz IL-6 zostały wykonane przez dr hab. Annę Malik. W przypadku TNF- α , pomiar został przeprowadzony w laboratorium Thomasa Willnowa w MDC w Berlinie.

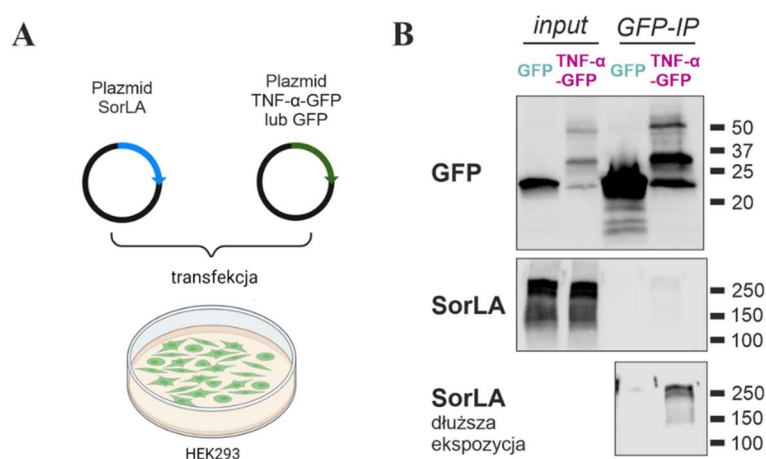
Podsumowując, uzyskane wyniki stały się podstawą do postawienia hipotezy, iż brak SorLA może zwiększać prozapalny potencjał mikrogleju poprzez promowanie wydzielania przez niego czynników biorących udział w tym rodzaju odpowiedzi.

4.3. TNF- α jako ligand wiązany przez SorLA

SorLA, podobnie jak inne receptory z domeną VPS10P, reguluje komórkową dystrybucję swoich białkowych ligandów poprzez bezpośrednie interakcje z nimi. Mając

na uwadze zaobserwowaną różnicę w poziomie wydzielanego TNF- α pomiędzy mikroglejem WT a SorLA-KO postanowiono zweryfikować, czy SorLA może wiązać tę cytokinę, regulując tym samym na jej transport. W tym celu wykorzystując linię komórkową HEK293 przeprowadzono doświadczenie bazujące na koimmunoprecypitacji, umożliwiającą weryfikację oddziaływań białkowych. W celu wywołania nadekspresji, komórki transfekowano dwoma plazmidami, z których jeden kodował białko SorLA, a drugi TNF- α -GFP. Jako kontrolę negatywną wykorzystano wariant, w którym zamiast plazmidu TNF- α -GFP do transfekcji użyto plazmidu kodującego wyłącznie białko GFP (**Rycina 15A**). Po 24 godzinach od transfekcji, na otrzymanych lizatach komórkowych przeprowadzano koimmunoprecypitację z użyciem złoża sprzężonego z przeciwciałami rozpoznającymi białko GFP. Uzyskane kompleksy białko-przeciwciało (*GFP-IP*), jak również frakcję białek niepoddanych koimmunoprecypitacji (*input*) analizowano następnie z wykorzystaniem techniki Western blot.

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia zaobserwowano, iż SorLA obecna jest w koimmunoprecypitacie pochodzącym z komórek poddanych transfekcji plazmidem TNF- α -GFP, podczas gdy obecności receptora nie wykryto w koimmunoprecypitacie pochodzącym z komórek transfekowanych plazmidem kodującym jedynie GFP, co dowodzi zachodzenia interakcji pomiędzy receptorem SorLA a TNF- α . Równocześnie, SorLA oraz białko GFP obecne były w próbkach niepoddanych koimmunoprecypitacji, co potwierdziło efektywny przebieg procesu transfekcji (**Rycina 15B**).

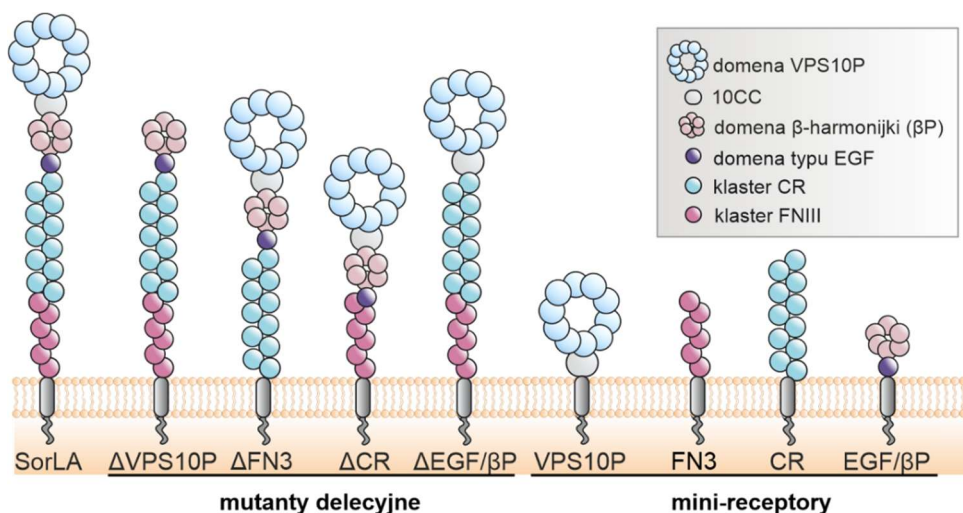


Rycina 15. SorLA oddziałuje z cytokiną TNF- α . (A) Schematyczne przedstawienie doświadczenia wykonane z wykorzystaniem programu BioRender. (B) Wynik analizy Western blot przedstawiający obecność białka SorLA oraz białka GFP po transfekcji komórek HEK293

plazmidami kodującymi SorLA oraz TNF- α -GFP, w próbkach niepoddanych koimmunoprecypitacji (*input*) oraz w próbkach po procedurze koimmunoprecypitacji (*GFP-IP*). Transfekcja plazmidem GFP służyła jako kontrola negatywna. Doświadczenie zostało przeprowadzone przez dr hab. Annę Malik.

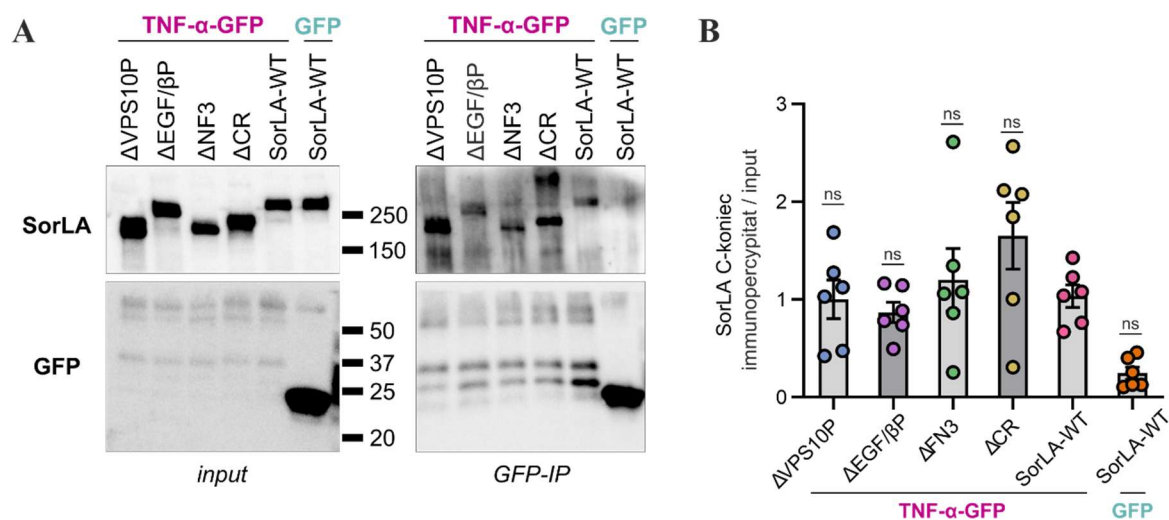
4.3.1. Identyfikacja domeny SorLA odpowiedzialnej za interakcję z TNF- α

Spośród wszystkich receptorów z domeną VPS10P, struktura SorLA jest najbardziej złożona – oprócz charakterystycznej domeny VPS10P posiada również inne funkcjonalne fragmenty, mogące wiązać białkowe ligandy (Jacobsen i in., 2001; Mehmedbasic i in., 2015). W związku z tym postanowiono określić, który z nich odpowiada za interakcję receptora SorLA z TNF- α . W tym celu przeprowadzono dwa doświadczenia, oba bazujące na transfekcji komórek linii HEK293 i koimmunoprecypitacji. W pierwszym podejściu do transfekcji komórek oprócz plazmidu TNF- α -GFP stosowano jeden z plazmidów z grupy tzw. mutantów delecyjnych SorLA, które pozbawione były jednej określonej domeny w części luminalnej receptora. W drugim podejściu, do transfekcji z plazmidem TNF- α -GFP używano natomiast plazmidów z grupy tzw. mini-receptorów, które kodowały wyłącznie jedną domenę luminalną SorLA, połączonych dodatkowo z metką „myc”. Schematyczne przedstawienie struktury receptora SorLA oraz zastosowanych w doświadczeniu mutantów delecyjnych i mini-receptorów przedstawiono na **Rycinie 16**.



Rycina 16. Schematyczne przedstawienie struktury SorLA oraz użytych w doświadczeniu wersji receptora pozbawionych jednej z domen funkcjonalnych (mutanty delecyjne) oraz składających się z jednej funkcjonalnej domeny (mini-receptory). W polu po prawej stronie opisano nazewnictwo poszczególnych domen funkcjonalnych SorLA [na podstawie Kaminska i in., 2024].

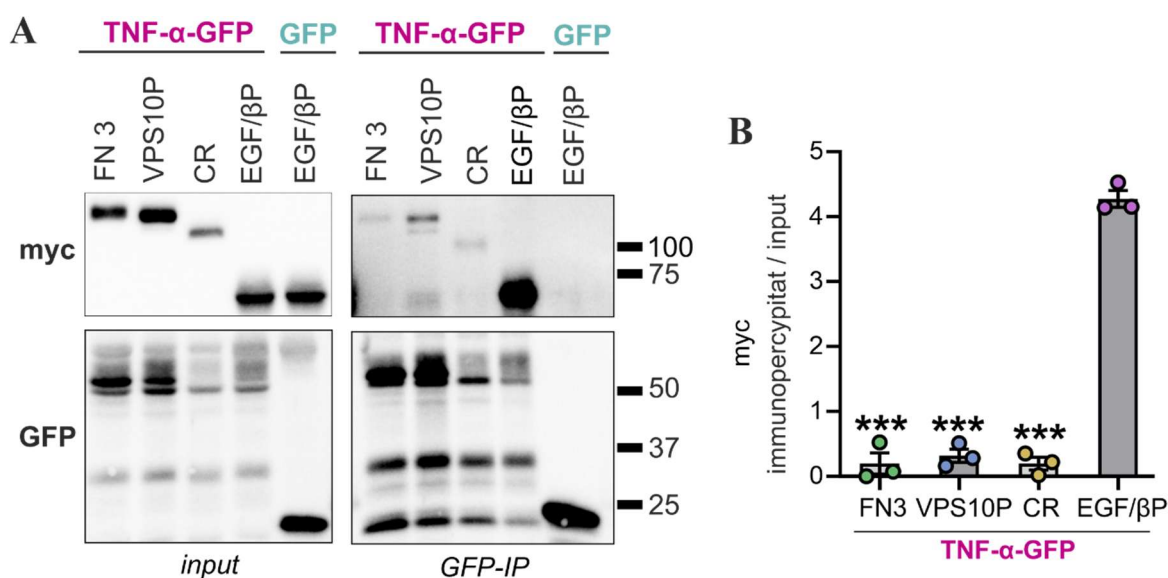
W podejściu doświadczalnym, w którym zastosowano mutanty delecyjne SorLA, jako kontrolę wykorzystano wariant, gdzie komórki transfekowano plazmidem kodującym SorLA-WT i TNF- α -GFP. Kontrolę negatywną stanowił natomiast wariant, w którym komórki transfekowane były plazmidami kodującymi SorLA-WT oraz GFP. Po przeprowadzeniu koimmunoprecypitacji próbki analizowano wykorzystując technikę Western blot. Należy zaznaczyć, iż komercyjnie dostępne przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające SorLA wiążą fragmenty części luminalnej receptora, co mogłoby uniemożliwić detekcję mutantów delecyjnych. W związku z tym w tym doświadczeniu użyto przeciwciała skierowanego na część cytoplazmatyczną SorLA (C-koniec). Celem stwierdzenia czy brak określonej domeny SorLA wpływa na osłabienie wiązania TNF- α -GFP, obliczano stosunek intensywności sygnału SorLA pochodzącego z próbek po koimmunoprecypitacji względem odpowiadającym im intensywnościom sygnału SorLA pochodzącego z próbek *input*. Wyniki doświadczenia nie wykazały, aby usunięcie którejkolwiek z domen SorLA istotnie wpływało na osłabienie interakcji pomiędzy receptorem a TNF- α -GFP w porównaniu do SorLA-WT (**Rycina 17A**). Zaobserwowano natomiast, iż SorLA pozbawiona domeny EGF/ β P wykazywała tendencję do najslabszego wiązania cytokiny, podczas gdy SorLA bez domeny CR oddziaływała z nią najsilniej.



Rycina 17. Pozbawienie SorLA jednej z funkcjonalnych domen zewnętrznych nie wpływa istotnie na osłabienie interakcji z TNF- α . (A) Wynik analizy Western blot przedstawiający obecność mutantów delecyjnych SorLA i SorLA-WT oraz białek TNF- α -GFP lub GFP w próbkach pochodzących z transfekcji komórek linii HEK293 niepoddanych koimmunoprecypitacji (*input*) oraz w próbkach po procedurze koimmunoprecypitacji (*GFP-IP*). Transfekcja komórek z wykorzystaniem plazmidów kodujących SorLA-WT oraz GFP służyła jako kontrola negatywna. (B) Wykres przedstawiający obliczony dla każdego wariantu transfekcji stosunek intensywności

sygnału pochodzącego od białka SorLA zarejestrowanego w próbkach *GFP-IP* do sygnału zarejestrowanego w próbkach *input*. Stosunek ten wyliczono dla każdego z 6 powtórzeń biologicznych. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a, odnosząc się do wartości liczbowych otrzymanych dla wariantu transfekcji SorLA-WT:TNF- α -GFP.

Alternatywne podejście, w którym do transfekcji komórek linii HEK293 zastosowano mini-receptory SorLA z dołączonym peptydem „myc” umożliwiło wysnucie pewniejszych wniosków co do określenia domeny receptora odpowiedzialnej za interakcję z TNF- α -GFP. Analiza Western blot wykazała bowiem, że wiązanie TNF- α -GFP było najsilniejsze w przypadku mini-receptora składającego się jedynie z domeny EGF/ β P (**Rycina 18A**). Obserwacje to zostały potwierdzone przez dane liczbowe, odzwierciedlające stosunek intensywności sygnału „myc” pochodzącego z próbek *GFP-IP* względem intensywności sygnału „myc” pochodzącego z próbek *input* (**Rycina 18B**).

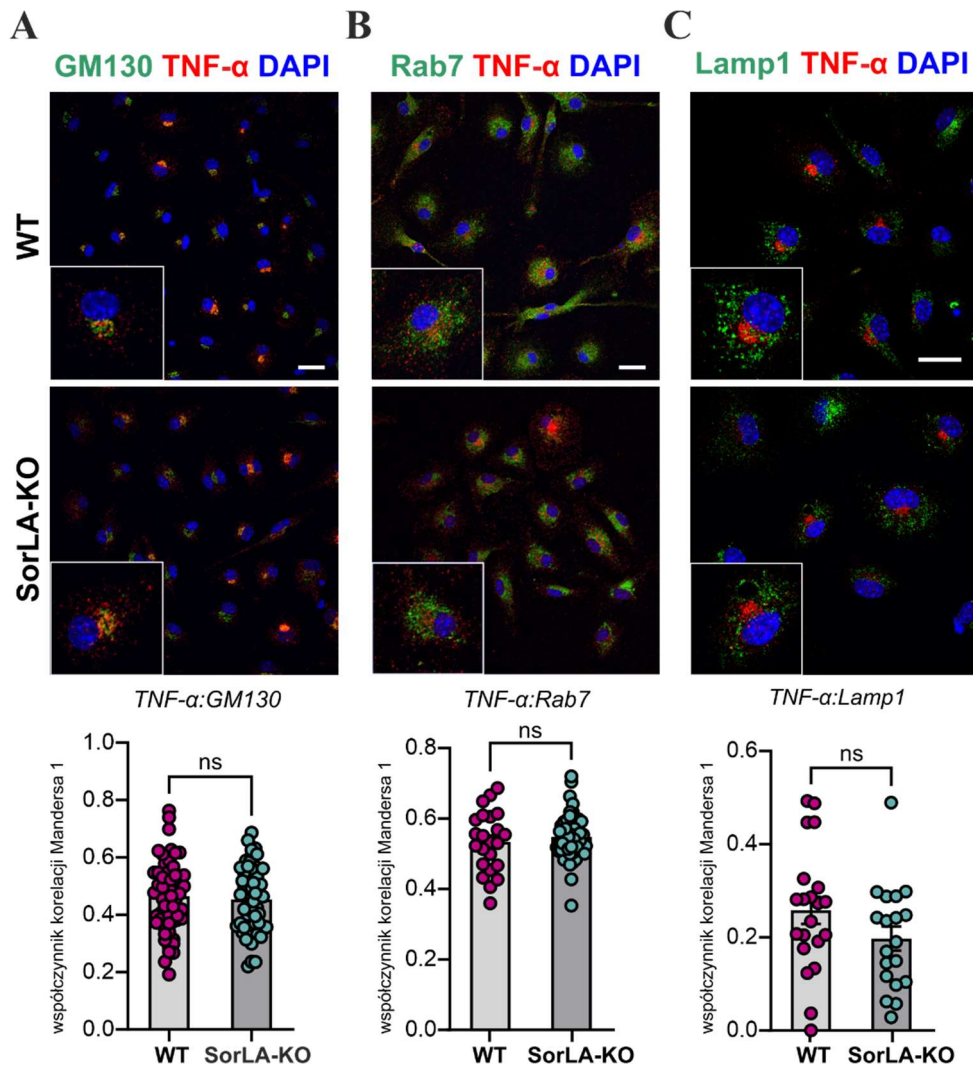


Rycina 18. Domena EGF/ β P receptora SorLA wykazuje największą zdolność do oddziaływania z TNF- α . (A) Wynik analizy Western blot przedstawiający obecność mutantów receptora SorLA zawierających metkę myc oraz białek TNF- α -GFP lub GFP w próbkach pochodzących z transfekcji komórek HEK293 z wykorzystaniem mini-receptorów SorLA we frakcji *input* oraz frakcji *GFP-IP*. Transfekcja komórek z wykorzystaniem plazmidów kodujących mini-receptor EGF/ β P oraz GFP służyła jako kontrola negatywna. (B) Wykres przedstawiający obliczony dla każdego wariantu transfekcji stosunek intensywności sygnału pochodzącego od peptydu myc zarejestrowanego w próbkach *GFP-IP* do sygnału zarejestrowanego w próbkach *input*. Stosunek ten wyliczono dla każdego z 3 powtórzeń biologicznych. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując analizę jednoczynnikowej wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey'a, odnosząc się do wartości liczbowych otrzymanych dla wariantu transfekcji EGF/ β P:TNF- α -GFP.

4.4. Określenie wpływu receptora SorLA na komórkową dystrybucję TNF- α w mysim mikrogleju

Receptory z domeną VPS10P wpływają na komórkową dystrybucję swoich białkowych ligandów, transportując je pomiędzy poszczególnymi elementami systemu endomembranowego, co stanowi istotny element regulujący procesy związane z egzo- i endocytozą, jak również lizosomalną degradacją. Niejednokrotnie wykorzystując eksperymenty *in vitro* udowodniono, że brak receptorów z domeną VPS10P, bądź mutacje wpływające na ich oddziaływania z białkami adaptorowymi zakłócają komórkowe rozmieszczenie ich białkowych ligandów (Dumanis i in., 2015; Herskowitz i in., 2012; Mehmedbasic i in., 2015; Schmidt i in., 2007). W przypadku SorLA, wpływ receptora został dokładnie udokumentowany w przypadku regulowania komórkowej dystrybucji APP – SorLA kierując APP na drogę transportu wstecznego z powierzchni błony komórkowej do światła TGN zatrzymuje go w świetle organelli, co zapobiega jego proteolitycznemu cięciu i powstawaniu toksycznego a β (Dumanis i in., 2015). Mając na uwadze fakt, iż SorLA oddziałuje z TNF- α , postanowiono sprawdzić, czy różnice w ilości wydzielanej cytokiny pomiędzy mikroglejem WT i SorLA-KO (sekcja 4.2.) są powiązane ze zmianami w jej komórkowej dystrybucji. W tym celu pomiędzy mikroglejem WT i SorLA-KO, poddanemu 24-godzinnej stymulacji PMA porównano kolokalizację TNF- α z wybranymi białkami występującymi w poszczególnych elementach systemu endomembranowego.

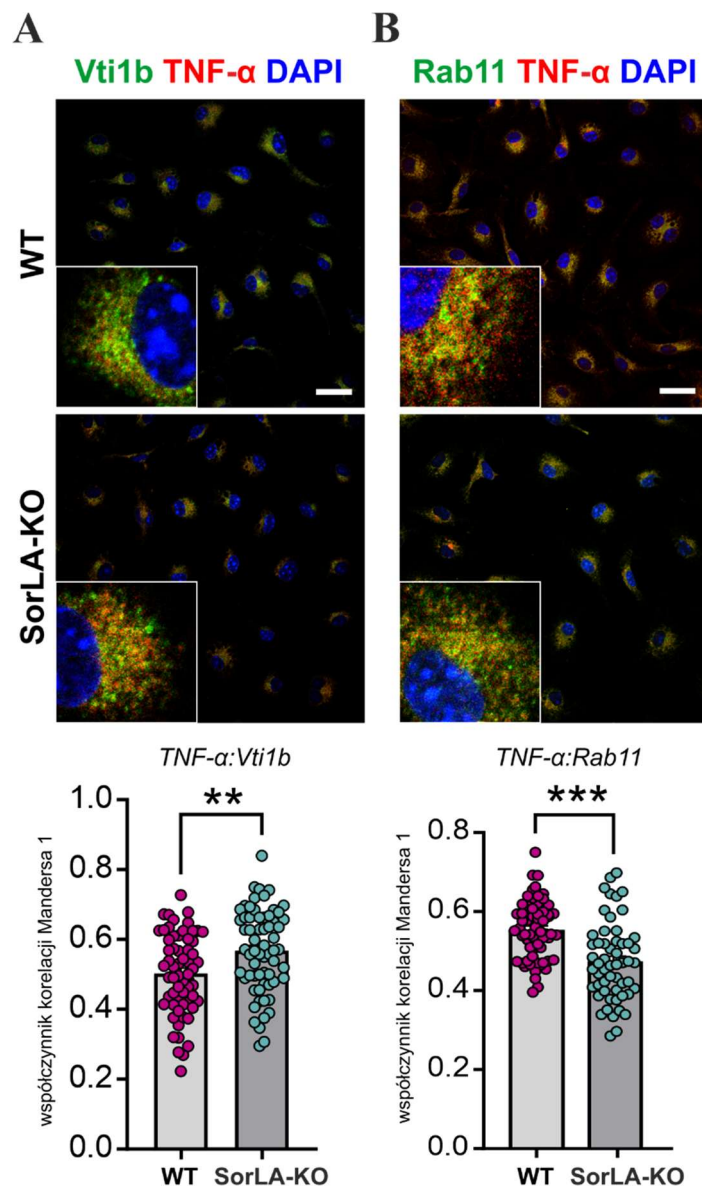
Kierując się dobrze scharakteryzowaną rolą SorLA w regulacji transportu wstecznego, w pierwszej kolejności postanowiono sprawdzić, czy brak SorLA w mikrogleju może wpływać na lokalizowanie TNF- α w obrębie aparatu Golgiego. Nie zaobserwowano jednak różnic pomiędzy komórkami o dwóch genotypach w poziomie kolokalizacji cytokiny z markerem organelli, białkiem macierzy Golgiego 130 (ang. *Golgi matrix protein 130*, GM130) (**Rycina 19A**). Podobny wynik otrzymano w przypadku porównywania kolokalizacji TNF- α z markerem endosomów późnych, białkiem Rab7 oraz markerem pęcherzyków lizosomalnych, białkiem Lamp1 (ang. *lysosome-associated membrane glycoprotein 1*) (**Rycina 19B-C**).



Rycina 19. Brak SorLA w mikrogleju nie wpływa na stopień lokalizowania TNF- α w aparacie Golgiego, endosomach późnych i lizosomach. Reprezentatywne zdjęcia mikrogleju WT oraz SorLA-KO, barwionego immunofluorescencyjnie przy użyciu DAPI znakującego jądra komórkowe, przeciwciała anti-TNF- α oraz przeciwciał skierowanych na markery kompartmentów komórkowych: (A) GM130, (B) Rab7 oraz (C) Lamp1. Powiększony obraz wybranych komórek znajduje się w polu po lewej stronie zdjęcia. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba przeanalizowanych komórek: 40-35. Skala: 50 μ m (A), 20 μ m (B-C).

Istotne różnice w dystrybucji TNF- α pomiędzy mikroglejem WT a SorLA-KO stwierdzono natomiast w przypadku pęcherzyków wydzielniczych: kolokalizacja cytokiny z ich białkowym markerem, Vti1b (ang. *Vesicle Transport Through Interaction With T-SNAREs homolog 1B*) była zwiększona w przypadku mikrogleju pozbawionego SorLA (Rycina 20A). Z kolei w mikrogleju WT, TNF- α silniej kolokalizował z markerem endosomów recyklujących, białkiem Rab11 (Rycina 20B). Wyniki te sugerują, że brak

SorLA promuje kierowanie TNF- α na drogę egzocytozy, co może stanowić wytłumaczenie wzmożonego wydzielania cytokiny przez mikroglej SorLA-KO.



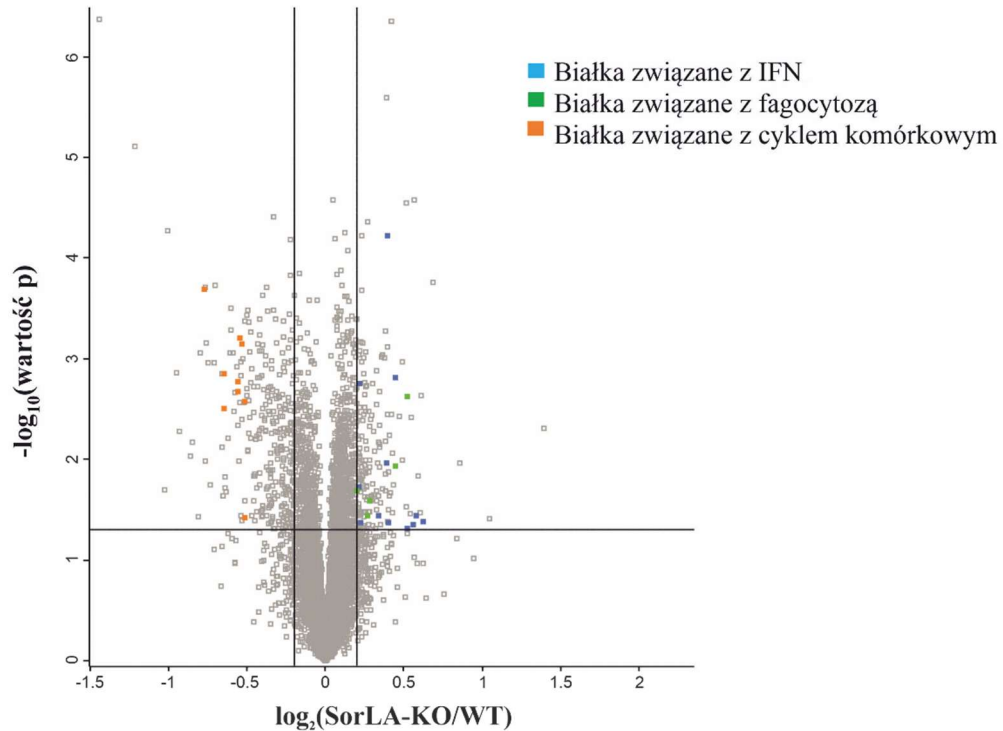
Rycina 20. Brak SorLA w mikrogleju promuje wzmożone lokalizowanie TNF- α w obrębie pęcherzyków wydzielniczych. Reprezentatywne zdjęcia mikrogleju WT oraz SorLA-KO, barwionego immunofluorescencyjnie przy użyciu DAPI znakującego jądra komórkowe, przeciwciała anti-TNF- α oraz przeciwciał skierowanych na markery kompartmentów komórkowych (A) Vti1b oraz (B) Rab11. Powiększony obraz wybranych komórek znajduje się w polu po lewej stronie zdjęcia. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba przeanalizowanych komórek: 55-64. Skala: 25 μ m.

4.5. Porównanie proteomu mikrogleju WT i SorLA-KO hodowanego w obecności komórek mysiego glejaka

Jak wykazały wcześniejsze doświadczenia, pod wpływem współhodowli z komórkami glejaka poziom transkryptu *Sor11* w mikrogleju wzrasta (sekcja 4.1.). Równocześnie, brak SorLA w komórkach mikrogleju promuje wydzielanie przez komórki czynników o charakterze prozapalnym (sekcja 4.2.). Bazując na tych obserwacjach postanowiono sprawdzić, czy brak SorLA może wpływać na właściwości mikrogleju w obecności komórek glejaka. W tym celu przeprowadzono współhodowlę mikrogleju WT i SorLA-KO z komórkami GL261-GFP, a następnie z wykorzystaniem analizy MS porównano ilościowo skład proteomu (białek obecnych w komórkach) mikrogleju o obu genotypach.

Analiza MS wykazała, że brak SorLA wpływa na skład proteomu mikrogleju w obecności komórek mysiego glejaka. Jako białka obecne różnicowo w mikrogleju SorLA-KO wybrano te, które spełniały następujące kryteria: (1) zlogarytmowana wartość krotności zmiany ($\log_2 \text{SorLA-KO/WT}$) wynosiła $-0,2 \leq$ bądź $\geq 0,2$; (2) różnica między genotypami była istotna statystycznie ($-\log_{10}(\text{wartość } p) > 1,3$).

Na podstawie otrzymanych wyników wyselekcjonowano trzy grupy białek, których ilość znacząco różniła się między genotypami. Tym samym stwierdzono, iż mikroglej SorLA-KO pod wpływem współhodowli z komórkami glejaka charakteryzuje się zwiększoną ilością białek związanych z odpowiedzią zależną od interferonów (ang. *interferons*, IFN) oraz białek związanych z receptorami Fcγ dla immunoglobulin (ang. *Fcγ receptors for immunoglobulins*, FcγR), które odpowiadają za fagocytozę cząsteczek opsonizowanych przez przeciwciała IgG (Bournazos i in., 2020; Fitzer-Attas i in., 2000). Jednocześnie, brak SorLA wiązał się z niższym poziomem białek związanych z cyklem komórkowym (**Rycina 21, Tabela 5**). Ze względu na złożoność nazewnictwa, nazwy białek przedstawionych w Tabeli 5 nie zostały przetłumaczone na język polski.



Rycina 21. Brak SorLA wpływa na proteom mikrogleju hodowanego w obecności komórek mysiej linii glejaka. Wykres typu Volcano Plot przedstawiający relatywne ilości białek w próbkach pozyskanych z mikrogleju SorLA-KO w porównaniu do mikrogleju WT. Komórki mikrogleju hodowano w obecności mysiej linii glejaka GL261-GFP. Wartości na osi X wyrażają zlogarytmowane wartości krotności zmian w ilości białek obecnych w mikrogleju SorLA-KO. Wartości zlogarytmowanej krotności zmian białek obecnych różnicowo w mikrogleju SorLA-KO zostały wyznaczone jako $-0,2 \leq$ bądź $\geq 0,2$ (linie pionowe). Wartości na osi Y przedstawiają $-\log_{10}(\text{wartość } p)$. Zlogarytmowane wartości krotności zmian, dla których $-\log_{10}$ z wartości p wynosił $> 1,3$ uznane zostały za istotne statystycznie (linia pozioma). Białka o zmienionym poziomie w mikrogleju SorLA-KO związane z odpowiedzią interferonową zaznaczono kolorem niebieskim, białka związane z fagocytozą kolorem zielonym, a białka związane z cyklem komórkowym kolorem pomarańczowym. Białka, dla których wartości zlogarytmowanej krotności zmian mieściły się w przedziale $-0,2 - 0,2$, bądź zaobserwowana różnica nie wykazywała istotności statystycznej ($-\log_{10}\text{wartość } p \leq 1,3$) uznano za niezmienione między genotypami. Liczba powtórzeń biologicznych $n=4$.

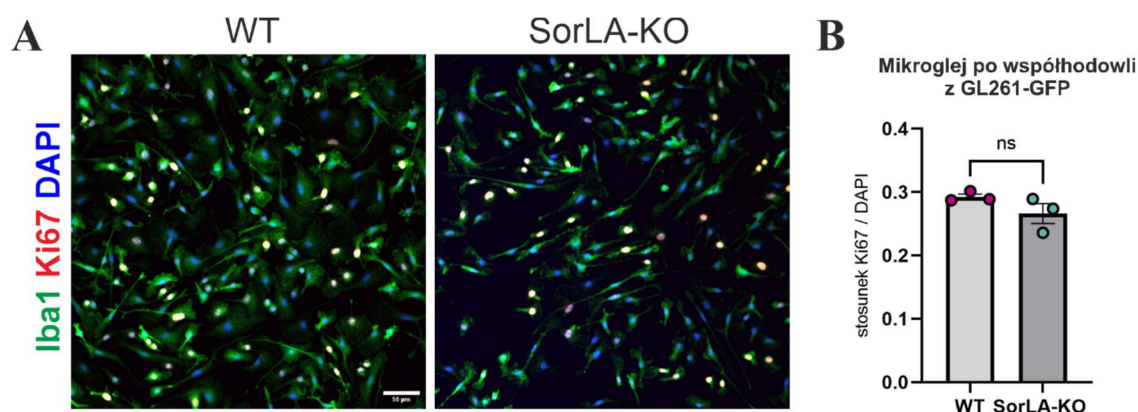
Tabela 5. Wybrane białka różnicowo obecne w mikrogleju SorLA-KO poddanemu współhodowli z komórkami GL261-GFP.

<u>Białko</u>	<u>Wartość p</u>	<u>FDR</u>	<u>Krotność zmiany</u>
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2)	0,042	0,176	1,539
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3)	0,036	0,164	1,495
Z-DNA—binding protein 1	0,045	0,179	1,475
Interferon-inducible GTPase 1	0,002	0,075	1,362
Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	0,012	0,119	1,362
High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I	0,034	0,161	1,344
Cyclin-A2	0,0002	0,084	0,586
G2/mitotic-specific cyclin-B2	0,001	0,071	0,692
Proliferation marker protein Ki-67	0,003	0,084	0,701

Mając na uwadze dobrze określoną rolę IFN w kształtowaniu odpowiedzi prozapalnej komórek, w tym mikrogleju (Aw i in., 2020; Negishi i in., 2018; Roy i in., 2020), jak również wpływ fagocytozy na promowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej (Richard, 2022) i wydzielanie czynników prozapalnych (Fitzer-Attas i in., 2000), podwyższony poziom białek związanych z tymi procesami w mikrogleju SorLA-KO pod wpływem współhodowli z komórkami glejaka może świadczyć o aktywacji ich prozapalnych właściwości. Zaobserwowane różnice w poziomie białek powiązanych z cyklem komórkowym w komórkach pozbawionych SorLA, ze względu na często sprzeczne doniesienia dotyczące powiązania zdolności proliferacyjnych z typem aktywacji mikrogleju (Gieryng i in., 2017; S. Wang i in., 2020; Zusso i in., 2012), nie mogą zostać jednoznacznie powiązane z określonym kierunkiem polaryzacji fenotypu mikrogleju SorLA-KO poddanego współhodowli z komórkami mysiej linii glejaka.

4.5.1. Walidacja wyników dotyczących zdolności mikrogleju WT i SorLA-KO do proliferacji

Celem określenia, czy pod wpływem współhodowli z komórkami glejaka brak SorLA wpływa na zmniejszenie zdolności mikrogleju do podziałów, wykonane zostały barwienia immunofluorescencyjne mikrogleju WT i SorLA-KO znakujące białko jądrowe Ki67 (marker komórek proliferujących) (X. Sun & Kaufman, 2018), którego poziom w mikrogleju SorLA-KO w obecności komórek GL261-GFP był obniżony (Tabela 5). Otrzymane wyniki nie wykazały jednak zmian w liczbie komórek Ki67⁺ pomiędzy genotypami (Rycina 22). W odniesieniu do wyników analizy MS nie stwierdzono zatem, aby współhodowla z mysią linią glejaka wpływała na zmienione zdolności do podziałów mikrogleju SorLA-KO w porównaniu do mikrogleju WT.

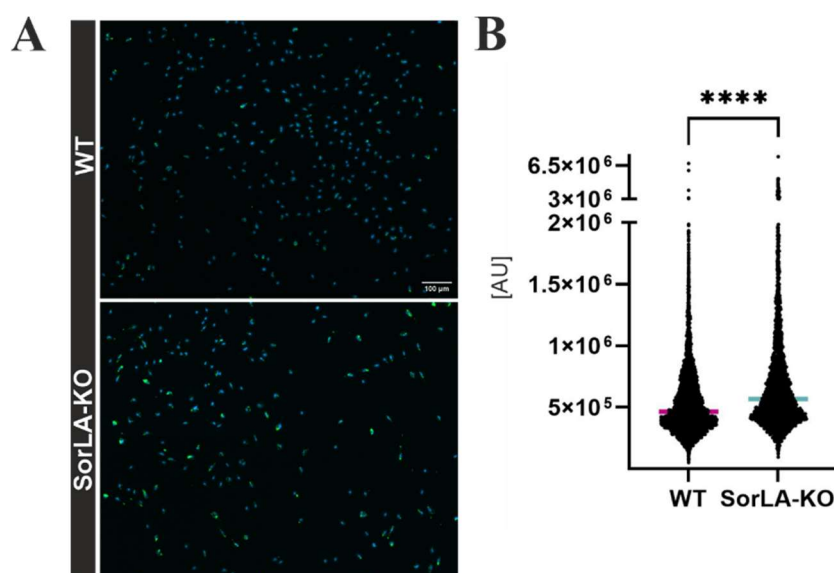


Rycina 22. Brak SorLA nie wpływa na zdolności mikrogleju do proliferacji w obecności komórek glejaka. (A) Reprezentatywne zdjęcia poddanego współhodowli z mysią linią glejaka mikrogleju WT oraz SorLA-KO, barwionego immunofluorescencyjnie przy użyciu DAPI znakującego jądra komórkowe, przeciwciała anti-Ki67 oraz przeciwciała anti-Iba1. Skala: 50 μm (B) Wykres przedstawiający stosunek liczby jąder Ki67⁺ do liczby jąder DAPI⁺. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=3.

4.5.2. Ocena wpływu SorLA na zdolność mikrogleju do fagocytozy zależnej od receptorów Fcγ

Wyniki analizy MS wykazały, że w obecności komórek linii GL261-GFP proteom mikrogleju SorLA-KO charakteryzuje zwiększona ilość białek związanych z FcγR, które rozpoznają antygeny opsonizowane przez przeciwciała IgG i umożliwiają ich fagocytozę (Fitzer-Attas i in., 2000). W celu określenia roli SorLA w kształtowaniu zdolności

mikrogleju do przeprowadzania tego typu fagocytozy zastosowano komercyjnie dostępny zestaw, umożliwiający ocenę pochłaniania przez komórki lateksowych kulek opłaszczonych przeciwciałami IgG sprzężonych z fluoroforem FITC. W celu aktywacji mikrogleju WT i SorLA-KO, przez 24 godziny komórki hodowano w pożywce kondycjonowanej pochodzącej z komórek GL261-GFP, a następnie inkubowano je przez 4 godziny z kulkami opłaszczonymi IgG, po czym przeprowadzano pomiar sygnału fluorescencji FITC w obrębie cytoplazmy poszczególnych komórek. Analiza zdjęć mikroskopowych wykazała, że mikroglej SorLA-KO charakteryzuje się zwiększoną intensywnością sygnału pochodzącą od sfagocytowanych cząsteczek (**Rycina 23**), co świadczy o zwiększeniu fagocytarnych właściwości mikrogleju pod wpływem braku SorLA.

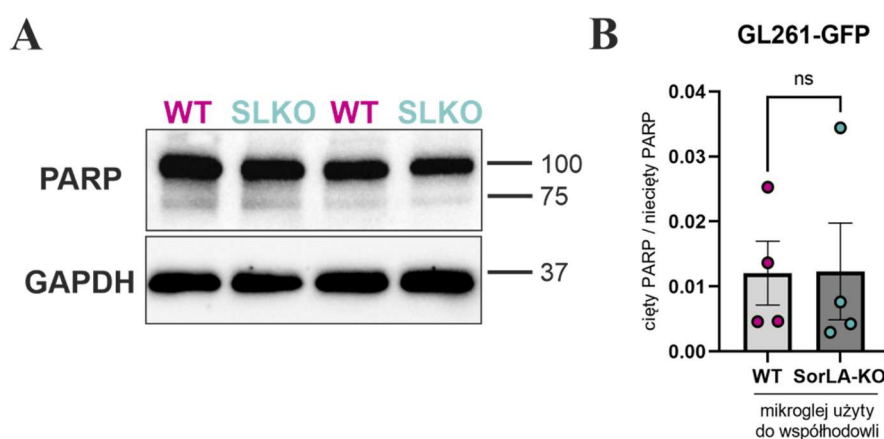


Rycina 23. Zdolności mikrogleju do fagocytozy zależnej od receptorów Fcγ zależą od receptora SorLA. (A) Reprezentatywne zdjęcia mikrogleju WT i SorLA-KO po przeprowadzonym teście oceniającym fagocytarne zdolności komórek. Zielony sygnał pochodzi od sfagocytowanych kulek IgG-FITC, jądra komórkowe zostały wybarwione z wykorzystaniem DAPI. Skala: 100 μm (B) Wykres przedstawiający obliczoną dla mikrogleju WT i SorLA-KO intensywność sygnału pochodzącego od fluoroforu FITC w obrębie cytoplazmy. Jeden punkt na wykresie odpowiada pojedynczej komórce. Oś Y wyraża jednostki arbitralne (ang. *arbitrary units*, AU). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu U Manna-Whitneya. Poziomymi liniami zaznaczono medianę wartości. Liczba analizowanych komórek: 4059-7082.

4.6. Określenie wpływu mikrogleju WT i SorLA-KO na komórki mysiego glejaka

Mając na uwadze zwiększoną zdolność mikrogleju SorLA-KO do wydzielania czynników prozapalnych, jak również zaobserwowane zmiany w jego proteomie po

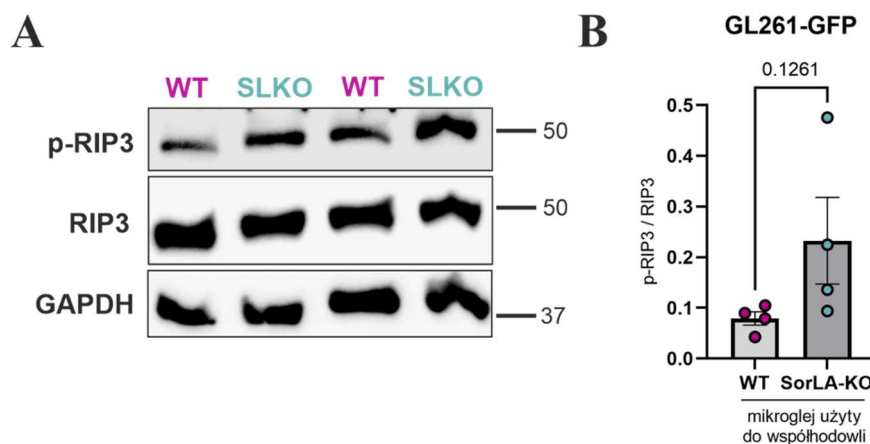
poddaniu współhodowli z komórkami GL261-GFP, postanowiono następnie zweryfikować, czy komórki glejaka mogą różnicowo reagować na obecność mikrogleju WT i SorLA-KO w kontekście aktywacji mechanizmów związanych ze śmiercią komórkową. W tym celu, wykorzystując lizaty białkowe komórek GL261-GFP poddanych współhodowli z mikroglejem WT lub pozbawionym SorLA, porównano poziom markerów wybranych rodzajów programowanej śmierci komórkowej. Nie stwierdzono, aby ilość ciętego białka PARP (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase-1*), które uczestniczy m.in. w procesach naprawy DNA i którego ilość zwiększa się na skutek aktywacji apoptozy (Chaitanya i in., 2010) różniła się w komórkach GL261-GFP w zależności, czy poddawano je współhodowli z mikroglejem WT bądź SorLA-KO (**Rycina 24**).



Rycina 24. Obecność mikrogleju WT i SorLA-KO nie aktywuje procesów związanych z apoptozą w komórkach mysiego glejaka. (A) Wynik analizy Western blot przedstawiający brak różnic w poziomie cięcia białka PARP w komórkach linii GL261-GFP współhodowanych z mikroglejem WT i SorLA-KO (SLKO). Cięta forma białka PARP charakteryzuje się masą cząsteczkową na poziomie ok. 89 kDa, podczas gdy jego niecięta forma – ok. 116 kDa. Jako kontrolę ładowania białka na żel wykorzystano rejestrację sygnału pochodzącego od białka GAPDH. (B) Wykres przedstawiający stosunek sygnału pochodzącego od ciętej i nieciętej formy PARP. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=4.

Następnie postanowiono określić, czy współhodowla z mikroglejem WT bądź SorLA-KO wpływa w komórkach GL261-GFP na aktywację nekroptozy, rodzaju śmierci komórkowej zwanej inaczej programowaną nekrozą, indukowanej na skutek rozwiniętego stanu zapalnego. Nekroptoza, podobnie jak nekroza, cechuje się postępującym pęcznieniem komórek i utratą integralności błony komórkowej (Dhuriya & Sharma, 2018). Jednakże w przeciwieństwie do nekrozy, nekroptoza wymaga aktywacji określonych ścieżek

sygnałowych zależnych w głównej mierze od kinaz białkowych, wśród których kluczowa jest m.in. kinaza RIP3 (ang. *receptor-interacting protein kinase 3*). Fosforylacja RIP3 (p-RIP3) jest kluczowa dla aktywacji białka MLKL (ang. *mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), promującego powstawanie porów w błonie komórkowej (Dhuriya & Sharma, 2018). Zaobserwowano, że w komórkach GL261-GFP pod wpływem współhodowli z mikroglejem SorLA-KO ilość p-RIP3 wykazuje tendencję do podwyższonego poziomu w porównaniu do komórek glejaka hodowanego z mikroglejem WT (**Rycina 25**). Sugeruje to, iż czynniki wydzielane przez mikroglej SorLA-KO mogą aktywować w komórkach GL261-GFP procesy związane ze śmiercią komórkową na drodze nekroptozy.

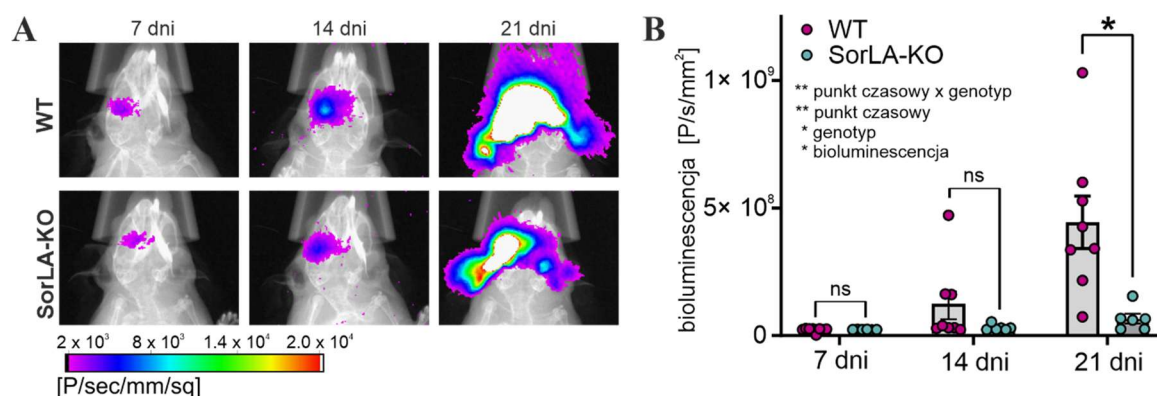


Rycina 25. Mikroglej SorLA-KO może aktywować procesy związane z nekroptozą w komórkach mysiej linii glejaka. (A) Wynik analizy Western blot przedstawiający tendencję do zwiększonej ilości białka p-RIP3 w komórkach linii GL261-GFP, współhodowanych z mikroglejem SorLA-KO (SLKO) w porównaniu do współhodowli z mikroglejem WT. Jako kontrolę ładowania białka na żel wykorzystano rejestrację sygnału pochodzącego od białka GAPDH. **(B)** Wykres przedstawiający stosunek sygnału pochodzącego od białka p-RIP3 do sygnału pochodzącego od białka RIP3. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=4.

4.7. Zdefiniowanie wpływu SorLA na wielkość guzów w mysim modelu glejaka

Podczas rozwoju GBM jako jedną z głównych przyczyn trudności w jego leczeniu uznaje się wspierające guz mikrośrodowisko, które w głównej mierze tworzą przeprogramowane w kierunku pronowotworowym GAMs. Odwrócenie polaryzacji fenotypu GAMs w kierunku prozapalnym mogłoby zmienić charakter mikrośrodowiska GBM, tworząc je bardziej podatnym na odpowiedź przeciwnowotworową. Bazując na

przedstawionych wcześniej doświadczeniach *in vitro* potwierdzających, iż SorLA kształtuje właściwości mikrogleju postanowiono sprawdzić, czy brak receptora może wpływać na rozwój mysiego glejaka *in vivo*. W tym celu myszy WT i SorLA-KO (pozbawione ekspresji *Sor11* we wszystkich komórkach organizmu) poddano domózgowej implantacji komórkami linii GL261-tdT⁺-luc⁺. Co 7 dni od momentu operacji monitorowano wielkość guza na podstawie oceny bioluminescencji pochodzącej z rozkładu podanej zwierzętom D-lucyferyny przez obecny w komórkach GL261 enzym lucyferazy. W przypadku 7-u i 14-u dni po implantacji komórek nowotworowych nie stwierdzono istotnych różnic w wielkości guza pomiędzy myszami WT a SorLA-KO. Jednakże 21 dni po implantacji komórek glejaka, a więc punkcie czasowym, który charakteryzuje się zaawansowanym stopniem rozwoju guza i jego w pełni wykształconym mikrośrodowiskiem, u myszy SorLA-KO zaobserwowano, że nowotwory w porównaniu z myszami WT są mniejsze (Rycina 26).



Rycina 26. Brak SorLA zapobiega rozwojowi guza w mysim modelu glejaka. (A) Reprezentatywne zdjęcia zarejestrowanego w mózgach myszy WT i SorLA-KO sygnału bioluminescencji [P/s/mm²] emitowanego przez komórki glejaka linii GL261-tdT⁺-luc⁺ 7, 14 i 21 dni po implantacji komórek glejaka. Zarejestrowane intensywności sygnału przedstawione za pomocą skali kolorystycznej zestawiono z wykonanymi równolegle zdjęciami rentgenowskimi zwierząt. (B) Odpowiadające (A) dane liczbowe przedstawiające intensywność sygnału bioluminescencji. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Sidak’a. Liczba powtórzeń biologicznych n=6-8. Implantacje komórek glejaka oraz obrazowanie wielkości guzów zostały przeprowadzone przez dr hab. Annę Malik.

4.8. Określenie wpływu receptora SorLA na właściwości mikrogleju w mysim mikrośrodowisku glejaka

Należy zaznaczyć, iż myszy SorLA-KO użyte w opisanym powyżej doświadczeniu pozbawione są genu *Sor11* we wszystkich komórkach organizmu. Celem weryfikacji, czy

zaobserwowana zmniejszona wielkość guzów u myszy SorLA-KO może być spowodowana utratą SorLA przez GAMs sprawdzono, czy receptor ten obecny jest w tych komórkach na poziomie białka. W tym celu wykorzystano wysortowane komórki CD11b⁺ pozyskane z objętych nowotworem półkul mózgów myszy WT i SorLA-KO. Wyniki analizy Western blot wykazały obecność SorLA w GAMs pochodzących z myszy niezmodyfikowanych genetycznie (**Rycina 27**). Biorąc pod uwagę te obserwacje oraz wcześniej przedstawione wyniki badań *in vitro* stwierdzono zatem, że brak SorLA może odgrywać rolę w kształtowaniu właściwości mikrogleju w mysim modelu glejaka.

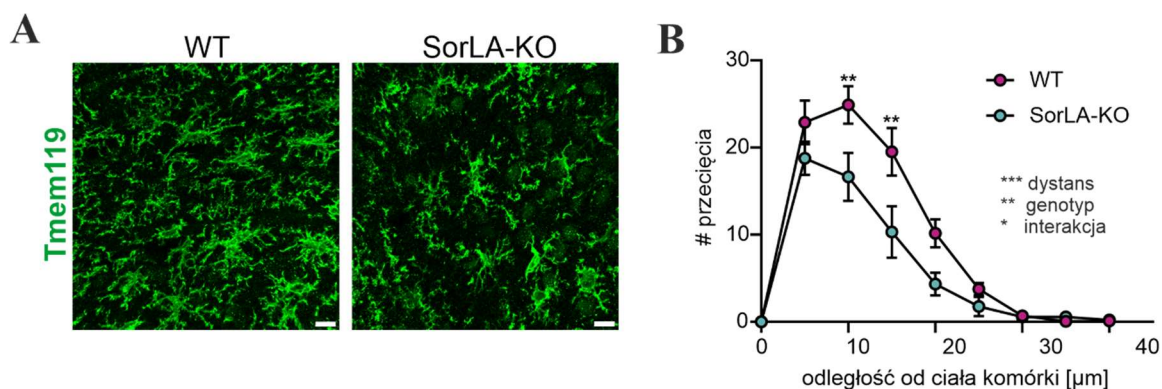


Rycina 27. SorLA obecna jest w populacji GAMs na poziomie białka. Wynik analizy Western blot potwierdzający obecność białka SorLA w GAMs pochodzących z mikrośrodowiska myszy WT i jego brak w GAMs pochodzących z mikrośrodowiska myszy SorLA-KO (SLKO), 21 dni po implantacji komórek glejaka. Jako kontrolę ładowania białka na żel wykorzystano rejestrację sygnału pochodzącego od białka β-aktyny. Liczba powtórzeń biologicznych n=3.

4.8.1. Ocena morfologii mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO

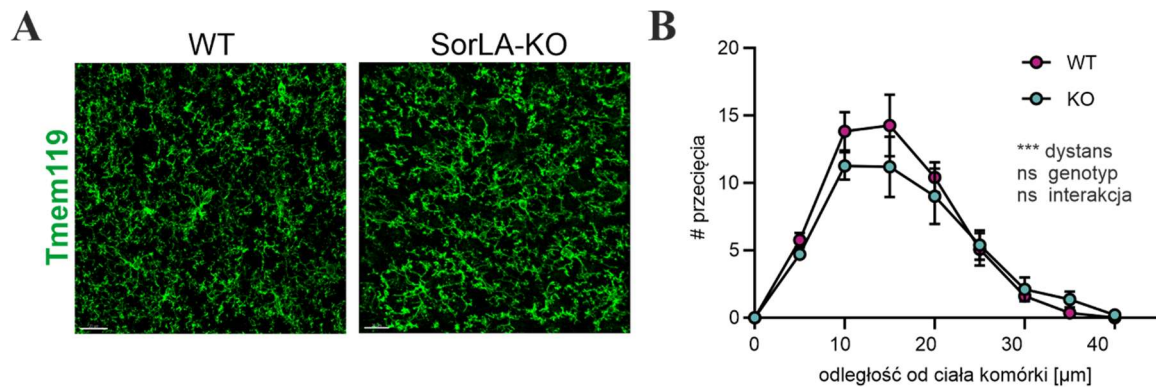
Celem określenia, czy w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO mikroglej wykazuje inne właściwości niż mikroglej obecny z mikrośrodowisku guza myszy WT, w pierwszej kolejności postanowiono przeprowadzić analizę morfologii komórek, która stanowi ważny parametr świadczący o typie ich aktywacji. Wiadomo, że wysoki stopień rozgałęzienia mikrogleju świadczy o stanie homeostatycznym bądź proregeneracyjnym. Z kolei aktywacja w kierunku prozapalnym powoduje przybieranie przez mikroglej kształtu ameboidalnego, o zmniejszonej liczbie wypustek (Franco-Bocanegra i in., 2021; Morrison i in., 2017; Vidal-Itriago i in., 2022). Celem wizualizacji komórek mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO, skrawki mózgów zostały wyznakowane fluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała anty-Tmem119 (**Rycina 28A**). Następnie pojedyncze komórki zlokalizowane przy granicy nowotworu analizowane były z wykorzystaniem analizy Sholla, która pozwala określić liczbę wypustek przecinających okręgi znajdujące się w określonej, rosnącej odległości od ciała komórki. Wyniki analizy

wykazały, iż mikroglej w mikrośrodkowisku glejaka myszy WT charakteryzuje zwiększona liczba wypustek w porównaniu do mikrogleju otaczającego glejaka u myszy SorLA-KO (**Rycina 28B**). Sugeruje to, iż komórki pozbawione SorLA najprawdopodobniej cechuje wzmożona aktywność prozapalna.



Rycina 28. Mikroglej w mikrośrodkowisku glejaka myszy SorLA-KO charakteryzuje się inną morfologią niż mikroglej w mikrośrodkowisku glejaka myszy WT. (A) Reprezentatywne zdjęcia fragmentów półkul mysich mózgów objętych nowotworem, 21 dni po implantacji komórek glejaka, barwionych immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała anti-Tmem119 (marker mikrogleju). Skala: 15 μm. **(B)** Wykres przedstawiający wyniki analizy Sholla porównującej stopień rozgałęzienia mikrogleju jak w (A). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Sidak'a. Dla każdego z genotypów przeanalizowano po 5 komórek pochodzących od 4 zwierząt, a następnie wartość dla każdego z nich uśredniono.

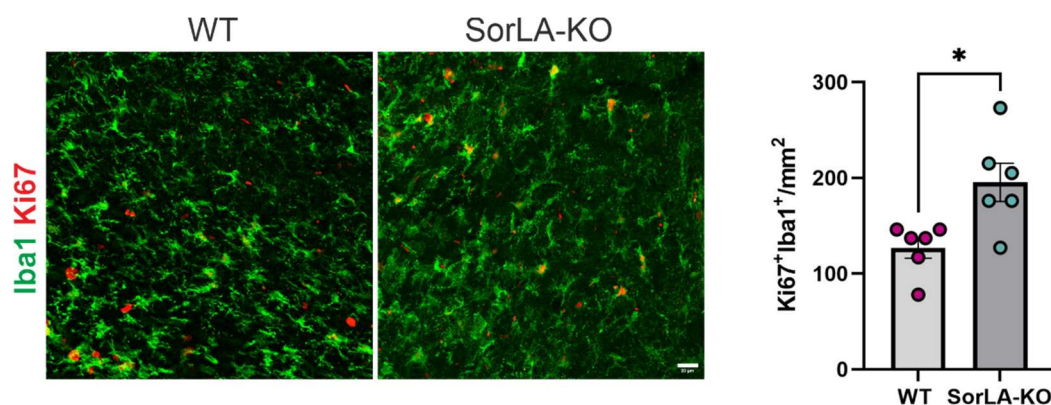
W analogiczny sposób przeprowadzono analizę morfologii mikrogleju w nieobjętych guzem półkulach mózgów myszy WT i SorLA-KO. Miało to na celu weryfikację, czy zaobserwowane wcześniej zmiany w morfologii mikrogleju spowodowane są obecnością nowotworu, a nie jedynie brakiem SorLA. W tym wypadku nie zaobserwowano jednak różnic w poziomie rozgałęzienia mikrogleju pomiędzy genotypami (**Rycina 29**), co świadczy o tym, iż SorLA odgrywa znaczącą rolę w kształtowaniu właściwości mikrogleju pod wpływem obecności komórek glejaka.



Rycina 29. Brak SorLA nie wpływa na morfologię mikrogleju w półkuli mysiego mózgu nieobjętej nowotworem. (A) Reprezentatywne zdjęcia fragmentów półkul mysich mózgów nieobjętych nowotworem, 21 dni po implantacji komórek glejaka, barwionych immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała anti-Tmem119 (marker mikrogleju). Skala: 15 μm . (B) Wykres przedstawiający wyniki analizy Sholla porównującej stopień rozgałęzienia mikrogleju jak w (A). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Sidak’a. Dla każdego z genotypów przeanalizowano po 5 komórek pochodzących od 4 zwierząt, a następnie wartość dla każdego z nich uśredniono. Analiza została wykonana we współpracy z mgr Sylwią Piątek.

4.8.2. Ustalenie ilości aktywnie prolierującego mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO

Mikroglej stanowi populację komórek, która w OUN w warunkach homeostazy ulega rzadkim podziałom komórkowym. Jednakże, pod wpływem stanu patologicznego, komórki te mogą aktywować procesy związane z proliferacją (Gao i in., 2023). Bazując na wynikach analizy MS wykazujących różnice w poziomie białek związanych z regulacją cyklu komórkowego w mikrogleju SorLA-KO hodowanym w obecności mysiej linii glejaka (sekcja 4.5.) postanowiono sprawdzić, czy w mikrośrodowisku guza mózgu brak SorLA może wpływać na zdolności tych komórek do podziałów. Analiza zdjęć mikroskopowych mikrogleju zlokalizowanego na granicy guza wykazała, iż w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO występuje więcej mikrogleju (Iba1⁺) wyrażającego Ki67⁺ niż w mikrośrodowisku guza myszy WT (**Rycina 30**).

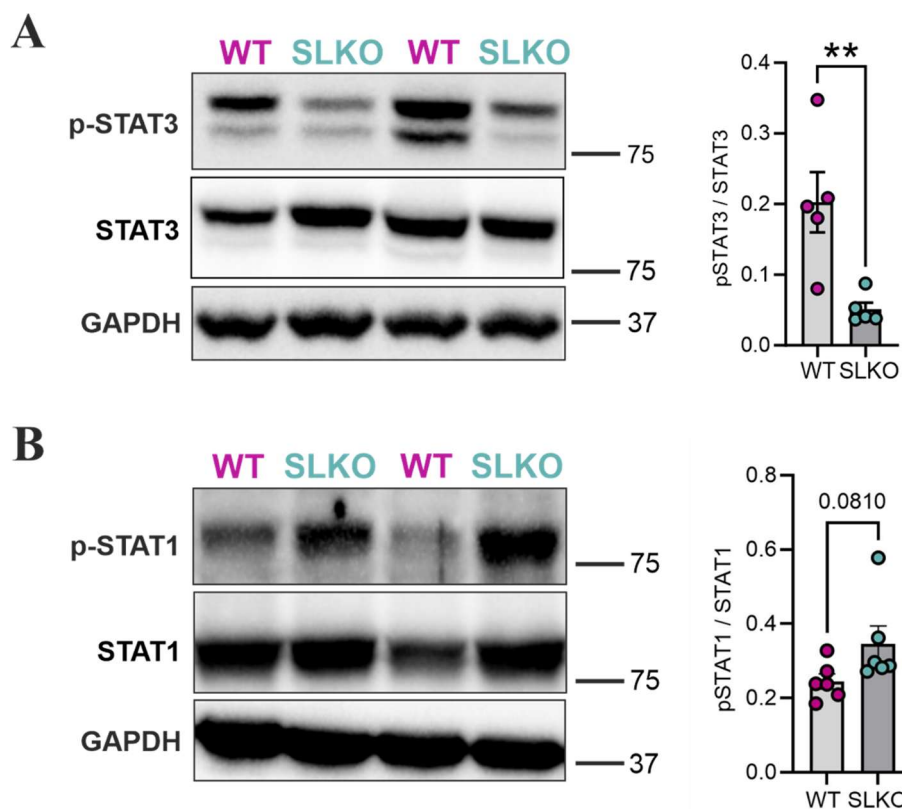


Rycina 30. Mikroglej w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO wykazuje zwiększony potencjał do proliferacji. (A) Reprezentatywne zdjęcia fragmentów półkul mysich mózgów objętych nowotworem, 21 dni po implantacji komórek glejaka, barwionych immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciała anti-Iba1 (marker mikrogleju i makrofagów) oraz anti-Ki67 (marker komórek proliferujących) Skala: 20 μ m. (B) Wykres przedstawiający liczbę komórek Iba1⁺Ki67⁺ na mm². Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=6.

4.8.3. Analiza poziomu markerów aktywacji GAMs w objętych glejakiem półkulach mózgów myszy WT i SorLA-KO

Porównanie właściwości mikrogleju w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO przeprowadzono także przy użyciu homogenatów pochodzących z półkul mysich mózgów objętych nowotworem. Wykorzystując analizę Western blot postanowiono porównać między myszami o obu genotypach poziom aktywacji czynników transkrypcyjnych z grupy STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*), wyrażony przez ich fosforylację. Fosforylowany STAT3 (p-STAT3) indukuje bowiem ekspresję genów związanych z aktywacją komórek w kierunku pronowotworowym i immunosupresyjnym (Dumas i in., 2020), a jego wyciszenie powoduje przeprogramowanie GAMs w kierunku prozapalnym, co hamuje rozwój guza w mysim modelu glejaka (L. Zhang i in., 2009). Równocześnie, biorąc pod uwagę wyniki analizy MS proteomu mikrogleju SorLA-KO po współhodowli z komórkami GL261-GFP (sekcja 4.5.) postanowiono porównać również poziom fosforylowanego czynnika transkrypcyjnego STAT1 (p-STAT1), którego ilość wzrasta pod wpływem odpowiedzi prozapalnej zależnej od IFN (Sadzak i in., 2008). W przypadku p-STAT3 zaobserwowano istotne zmniejszenie ilości białka w objętych glejakiem półkulach mózgów myszy SorLA-KO w porównaniu do analogicznego materiału pozyskanego z myszy WT (**Rycina 31A**).

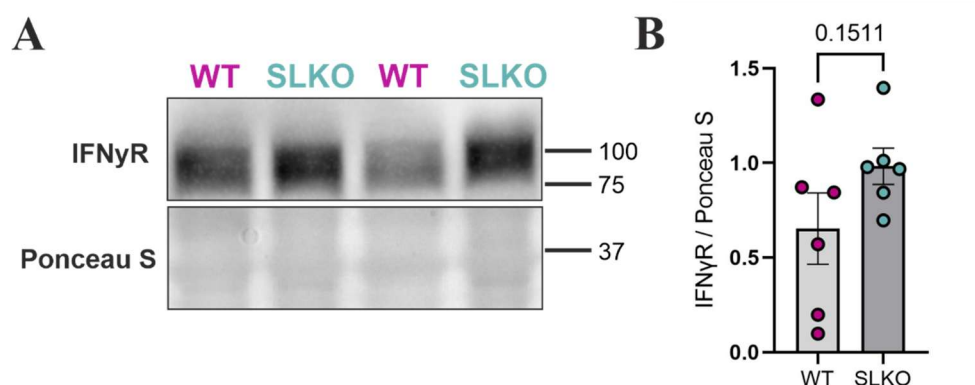
Jednocześnie, p-STAT1 okazał się wykazywać tendencję do zwiększonej ilości w próbkach pozyskanych od zwierząt pozbawionych SorLA (**Rycina 31B**). Wyniki te wskazują, iż mikrośrodowisko glejaka myszy SorLA-KO charakteryzuje się zwiększonym potencjałem prozapalnym na rzecz zmniejszonego charakteru pronowotworowego.



Rycina 31. Mikrośrodowisko glejaka myszy SorLA-KO charakteryzuje się zmniejszoną ilością białka p-STAT3 oraz tendencją do zwiększonej ilości białka p-STAT1. Wyniki analizy Western blot porównujące ilości (**A**) białka p-STAT3 oraz (**B**) białka p-STAT1 w objętych nowotworem półkulach mózgowi myszy WT i SorLA-KO (SLKO), 21 dni po implantacji komórek glejaka. Sygnały pochodzące od białek p-STAT3 i p-STAT1 normalizowano do sygnału pochodzącego od ich form niefosforylowanych (wykresy po prawej stronie Ryciny). Jako kontrolę ładowania białka na żel wykorzystano rejestrację sygnału pochodzącego od białka GAPDH. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=5-6.

Mając na uwadze zaobserwowaną tendencję do wyższego poziomu p-STAT1 w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO, która sugeruje wzmożoną aktywację odpowiedzi zależnej od IFN, postanowiono porównać między mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i pozbawionych SorLA poziom receptora dla interferonu- γ (IFN γ R). W tym celu wykorzystano frakcję błonową białek pozyskaną z objętych nowotworem półkul mózgowi myszy WT i SorLA-KO. Analiza Western blot wykazała tendencję do

zwiększonej ilości receptora w próbkach pochodzących od myszy pozbawionych SorLA (**Rycina 32**). Wynik ten może wskazywać więc na zwiększoną podatność komórek obecnych w mikrośrodkowisku glejaka myszy SorLA-KO na aktywację odpowiedzi zależnej od IFN- γ .



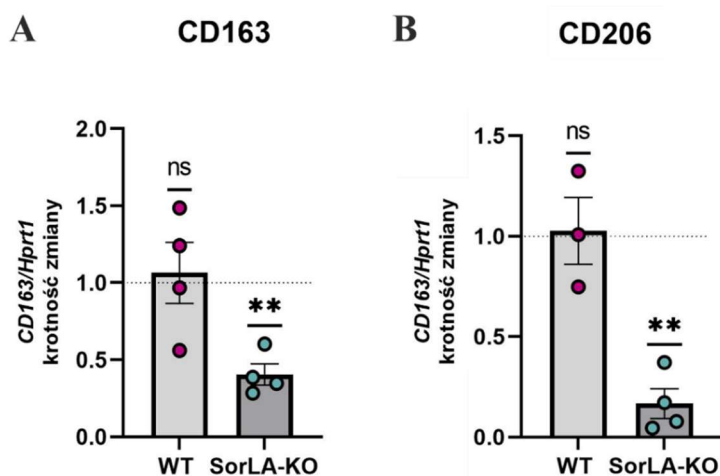
Rycina 32. W mikrośrodkowisku glejaka myszy SorLA-KO IFN γ R wykazuje tendencję do zwiększonej ilości w porównaniu do mikrośrodkowiska glejaka myszy WT. (A) Wynik analizy Western blot porównujący ilości IFN γ R w objętych nowotworem półkulach mózgowi myszy WT i SorLA-KO (SLKO), 21 dni po implantacji komórek glejaka. **(B)** Wykres przedstawiający stosunek sygnału pochodzącego od białka IFN γ R, do intensywności sygnału pochodzącego ze znakowania białek przy wykorzystaniu barwnika PonceauS. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=6

4.8.4. Oznaczenie poziomu ekspresji genów związanych z polaryzacją fenotypu

GAMs w komórkach pochodzących z mikrośrodkowiska glejaka myszy WT i SorLA-KO

Mimo, iż powyżej przedstawione wyniki wskazują na zależne od SorLA zmiany w charakterze mikrośrodkowiska mysiego glejaka należy zaznaczyć, iż bazują one na wykorzystaniu całościowych homogenatów mysich półkul mózgowi objętych glejakiem, a więc materiale pochodzącym ze wszystkich komórek obecnych w mikrośrodkowisku guza. W związku z tym nie można na ich podstawie wnioskować na temat bezpośredniej roli SorLA w kształtowaniu właściwości GAMs. W kolejnych doświadczeniach, celem możliwości pewniejszego określenia roli SorLA w kształtowaniu kierunku polaryzacji fenotypu GAMs, analizy przeprowadzono z wykorzystaniem komórek CD11b⁺ wysortowanych z objętych nowotworem półkul mózgowi myszy WT i SorLA-KO. Przy wykorzystaniu RNA pochodzącego z uzyskanych w ten sposób GAMs sprawdzono poziom ekspresji genów charakterystycznych dla ich pronowotworowych właściwości. Analizy te

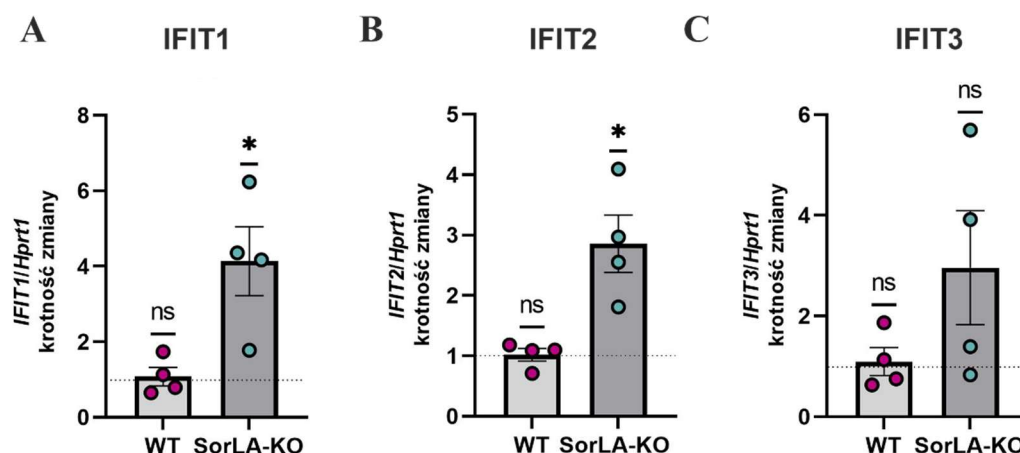
wykazały, iż GAMs pochodzące z mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO charakteryzuje obniżona ekspresja genów związanych z funkcjami wspierającymi rozwój guza, tj. *CD163* oraz *CD206* (**Rycina 33**) (Bertani i in., 2017; Lisi i in., 2017).



Rycina 33. GAMs pochodzące z mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO wykazują obniżoną ekspresję genów związanych z właściwościami wspierającymi nowotwór. Porównanie poziomu ekspresji genów (A) *CD163* oraz (B) *CD206* w komórkach CD11b⁺ wysortowanych z objętych nowotworem półkul mózgow myszy WT i SorLA-KO, 21 dni po implantacji komórek glejaka. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta dla jednej próby. Liczba powtórzeń biologicznych n=3-4.

Wcześniejsze doświadczenia *in vitro* wykazały, iż mikroglej pozbawiony SorLA hodowany w obecności komórki glejaka wykazuje wyższy poziom białek związanych z odpowiedzią zależną od IFN niż mikroglej WT (*sekcja 4.5.*). Co więcej, poziom p-STAT1 oraz IFN γ R również wykazywał tendencje do zwiększonej ilości w mikrośrodowisku glejaka myszy pozbawionych SorLA (*sekcja 4.8.3.*). W związku z tym postanowiono sprawdzić, czy GAMs pochodzące z objętych nowotworem półkul mózgow myszy WT i SorLA-KO wykazują różnice w poziomie transkrypcji genów aktywowanych pod wpływem odpowiedzi zależnej od IFN. W tym celu skupiono się na genach z grupy IFIT (ang. *interferon-induced proteins with tetracoptides*), ze względu na fakt, iż analiza MS proteomu mikrogleju WT i SorLA-KO poddanych współhodowli z komórkami GL261-GFP wykazała, iż białka IFIT2 oraz IFIT3 występowały w większych ilościach w mikrogleju pozbawionym SorLA (*sekcja 4.5.*). Główną funkcją białek IFIT jest blokowanie translacji wirusowego RNA, jednak wiadomym jest, iż poziom ich ekspresji drastycznie wzrasta po ogólnej aktywacji odpowiedzi komórkowej zależnej od IFN (głównie IFN z grupy I) (Vladimer i in., 2014). W GAMs pochodzących z mikrośrodowiska

glejaka myszy SorLA-KO zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genów *IFIT1* oraz *IFIT2* w porównaniu do GAMs pozyskanych z myszy WT (**Rycina 34A-B**). Różnica w poziomie ekspresji genu *IFIT3* nie była natomiast istotna statystycznie (**Rycina 34C**). Wyniki te wskazują, iż GAMs pozbawione SorLA są bardziej podatne na aktywację odpowiedzi zależnej od IFN, co może wzmacniać ich prozapalne właściwości.

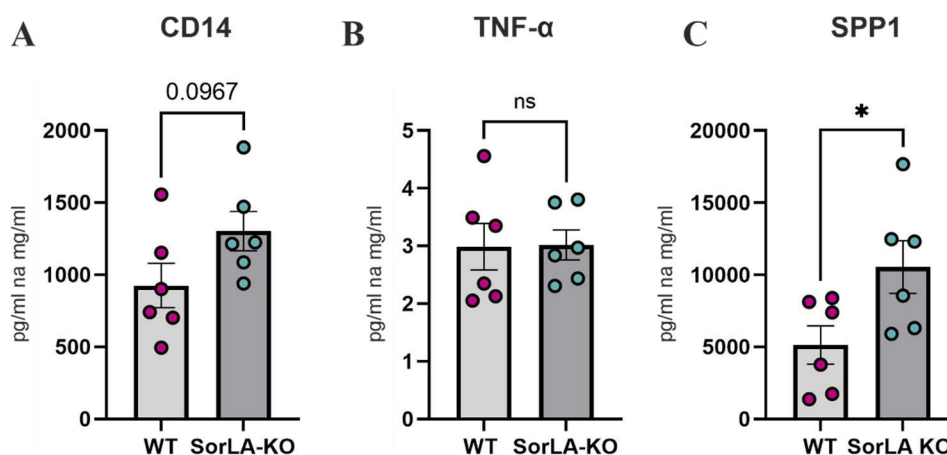


Rycina 34. GAMs z mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO wykazują podwyższoną ekspresję genów aktywowanych pod wpływem odpowiedzi zależnej od interferonów. Porównanie poziomu ekspresji genów (A) *IFIT1* (B) *IFIT2* oraz (C) *IFIT3* w komórkach CD11b⁺ wysortowanych z objętych nowotworem półkul mózgow myszy WT i SorLA-KO, 21 dni po implantacji komórek glejaka. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta dla jednej próby. Liczba powtórzeń biologicznych n=4.

4.9. Porównanie ilości CD14, SPP1 oraz TNF- α pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO

Wcześniejsze doświadczenia *in vitro* wykazały, że mikroglej SorLA-KO w porównaniu do mikrogleju WT wydziela większe ilości CD14 oraz TNF- α , a więc białek związanych ze stanem zapalnym. W przypadku SPP1, w kontekście glejaka znanej przede wszystkim ze swoich pronowotworowych funkcji, brak SorLA hamował natomiast jej wydzielanie przez mikroglej (sekcja 4.2). Mając na uwadze fakt, że zmiany w poziomie wydzielania wszystkich wyżej wymienionych białek przez mikroglej mogą znacząco wpływać na całokształt mikrośrodowiska glejaka, postanowiono porównać ich ilości pomiędzy frakcjami białek rozpuszczalnych pozyskanych z objętych nowotworem półkul mózgow myszy WT i SorLA-KO. W przypadku białka CD14 zaobserwowano tendencję do jego zwiększonej ilości w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO, podczas gdy ilość cytokiny TNF- α nie różniła się pomiędzy genotypami (**Rycina 35A-B**).

Co ciekawe, poziom SPP1 był wyższy w próbkach pochodzących od myszy SorLA-KO, co stanowi zmianę przeciwną do tej zaobserwowanej w warunkach *in vitro* (**Rycina 35C**).



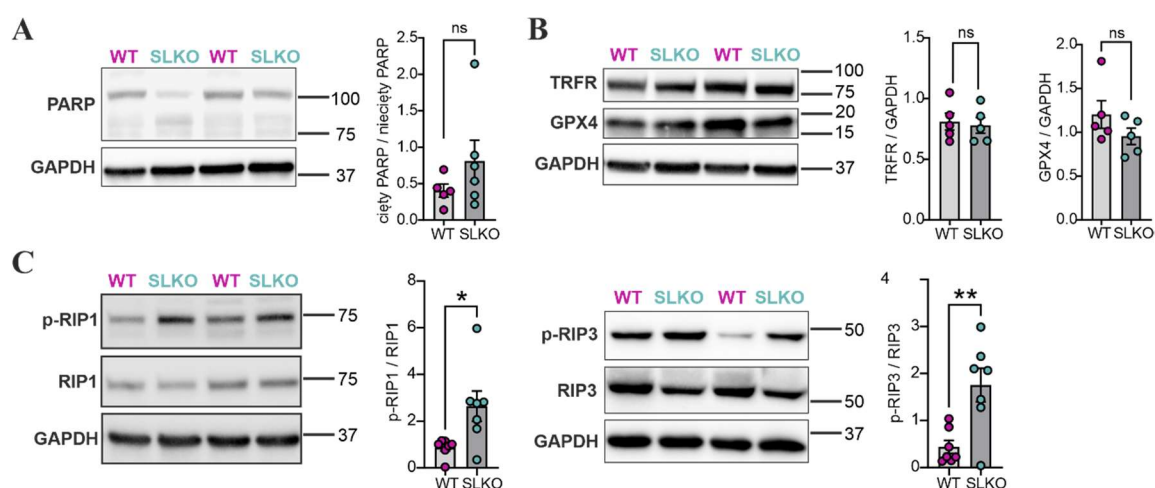
Rycina 35. Porównanie ilości białek CD14, TNF- α i SPP1 w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO. Wykresy przedstawiające wyniki testów porównujących ilości (A) CD14 (B) TNF- α oraz (C) SPP1 we frakcji białek rozpuszczalnych pochodzących z objętych nowotworem półkul mózgow myszy WT i SorLA-KO, 21 dni po implantacji komórek glejaka. Test (A) oraz (C) przeprowadzono przy wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów ELISA, test (B) przeprowadzono z wykorzystaniem Murine U-Plex Biomarker Group 1 assay w laboratorium prof. Thomasa Willnowa w MDC w Berlinie. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=6.

4.10. Analiza poziomu markerów wybranych rodzajów programowanej śmierci komórkowej między mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO

Na podstawie wyników wskazujących na zwiększony potencjał prozapalny GAMs w mikrośrodowisku nowotworu mózgu myszy SorLA-KO stwierdzono, że to właśnie wzmożona odpowiedź prozapalna najprawdopodobniej stanowi przyczynę ograniczenia wzrostu glejaka u tej grupy zwierząt. Celem określenia mechanizmu tego zjawiska postanowiono porównać poziom markerów różnych rodzajów programowanej śmierci komórkowej pomiędzy homogenatami uzyskanymi z objętych nowotworem półkul mózgow myszy WT i SorLA-KO. W szczególności postanowiono skupić się na tych procesach, które mogą być aktywowane przez wzmożony stan zapalny, czyli apoptozie, ferroptozie i nekroptozie.

W przypadku porównywania poziomu markerów apoptozy pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO, analiza Western blot nie wykazała różnic w poziomie ciętego PARP między genotypami (**Rycina 36A**). Następnie porównano

poziom markerów charakterystycznych dla ferroptozy, czyli śmierci komórkowej zależnej od jonów żelaza, zachodzącej na skutek utlenienia tłuszczów tworzących błonę komórkową. Aktywacja ferroptozy wiąże się ze wzrostem ilości receptora transferyny (ang. *transferrin receptor*, TrfR) oraz spadkiem ilości peroksydazy glutationu 4 (ang. *glutathione peroxidase 4*, GPX4) (Y. Chen i in., 2023). Jednakże również w ilości tych białek nie zaobserwowano różnic pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO (**Rycina 36B**). W przypadku markerów charakterystycznych dla procesu nekroptozy, a więc białek p-RIP3 oraz p-RIP1 (tworzącego kompleks białkowy z p-RIP3), zaobserwowano natomiast ich zwiększoną ilość w próbkach pochodzących od zwierząt SorLA-KO (**Rycina 36C**). Wynik ten może sugerować, iż zwiększony potencjał prozapalny mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO spowodowany zmienioną aktywnością GAMs promuje aktywację procesu nekroptozy, która potencjalnie może odpowiadać za śmierć komórek nowotworowych i ograniczenie rozwoju guza.



Rycina 36. Mikrośrodowisko mysiego glejaka pozbawione SorLA charakteryzuje się zwiększoną ilością markerów świadczących o aktywacji procesu nekroptozy. Wyniki analiz Western blot porównujących w objętych nowotworem półkulach mózgów myszy WT i SorLA-KO (SLKO), 21 dni po implantacji komórek glejaka ilości (**A**) ciętego białka PARP (**B**) białek TRFR i GPX4 oraz (**C**) białek p-RIP1 oraz p-RIP3. Sygnał pochodzący od ciętej formy białka PARP normalizowano do jego nieciętej formy (A), sygnały pochodzące od białek TRFR i GPX4 normalizowano do intensywności sygnału GAPDH (B), a sygnały pochodzące od białek p-RIP1 oraz p-RIP3 normalizowano do ich form niefosforylowanych (C). W przypadku (A) i (C) rejestracja sygnału pochodzącego od białka GAPDH służyła jako kontrola ładowania białka na żel. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=6.

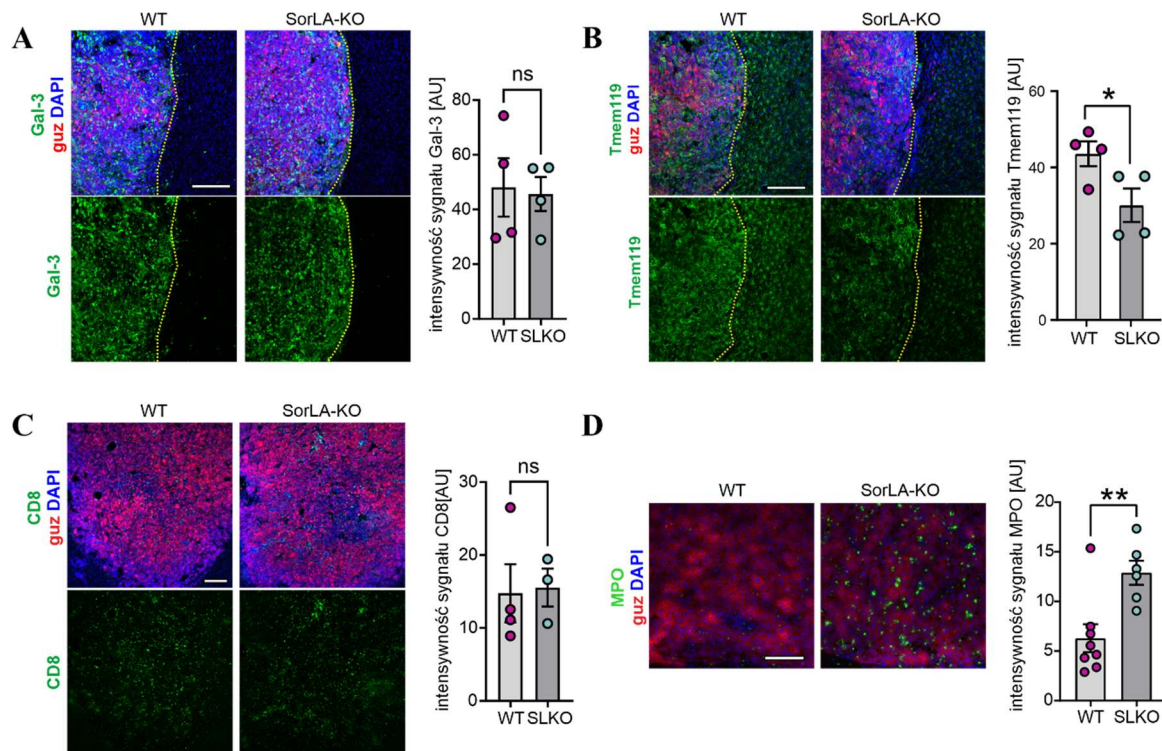
4.11. Porównanie mikrośrodowiska glejaka myszy WT oraz SorLA-KO pod kątem obecności komórek układu odpornościowego

Jedną z konsekwencji silnie immunosupresyjnego charakteru mikrośrodowiska glejaka jest ograniczenie napływu komórek układu odpornościowego do objętego nowotworem mózgu oraz uniemożliwienie im rozwinięcia odpowiedzi przeciwnowotworowej. Mając na uwadze fakt, iż u myszy SorLA-KO GAMs wykazują zwiększony potencjał prozapalny, na skutek którego potencjalnie mogą wydzielać czynniki wpływające na infiltrację komórek układu odpornościowego w okolice guza, postanowiono porównać profil określonych populacji komórek odpornościowych pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka zwierząt WT i pozbawionych SorLA.

4.11.1. Barwienia immunofluorescencyjne skrawków mózgów myszy WT i SorLA-KO po implantacji komórek glejaka

Wykorzystując skrawki mózgów myszy WT i SorLA-KO, przy użyciu barwień immunofluorescencyjnych postawiono porównać występowanie wybranych populacji komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka myszy o obu genotypach. W pierwszej kolejności skupiono się na komórkach wchodzących w skład populacji GAMs: makrofagach oraz mikrogleju. Użycie przeciwciała znakującego napływające z obwodu makrofagi (anty-Galektyna-3, Gal-3) nie wykazało różnic w intensywności sygnału pochodzącego z barwienia pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO (**Rycina 37A**). Jednocześnie barwienie z użyciem przeciwciała anty-Tmem119 znakującego mikroglej wykazało obniżoną intensywność sygnału w mikrośrodowisku guza myszy pozbawionych SorLA (**Rycina 37B**). Kolejne analizy nie wykazały różnic pomiędzy genotypami w ilości infiltrujących limfocytów T cytotoksycznych (CTL) ($CD8^+$) (**Rycina 37C**), jednakże w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO zaobserwowana została zwiększona intensywność sygnału pochodzącego z barwienia mieloperoksydazy (ang. *myeloperoxidase*, MPO) (**Rycina 37D**). MPO to białkowy marker charakterystyczny dla populacji neutrofilii aktywnie wytwarzających reaktywne formy tlenu (Lin i in., 2024). Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że również monocyty i makrofagi mogą syntetyzować MPO, co wiąże się ich z właściwościami przeciwnowotworowymi (Karimi i in., 2023). Na podstawie wykonanych barwień immunofluorescencyjnych nie można zatem wnioskować, która

z tych populacji komórek intensywniej napływa do mikrośrodowiska nowotworu myszy pozbawionych SorLA.

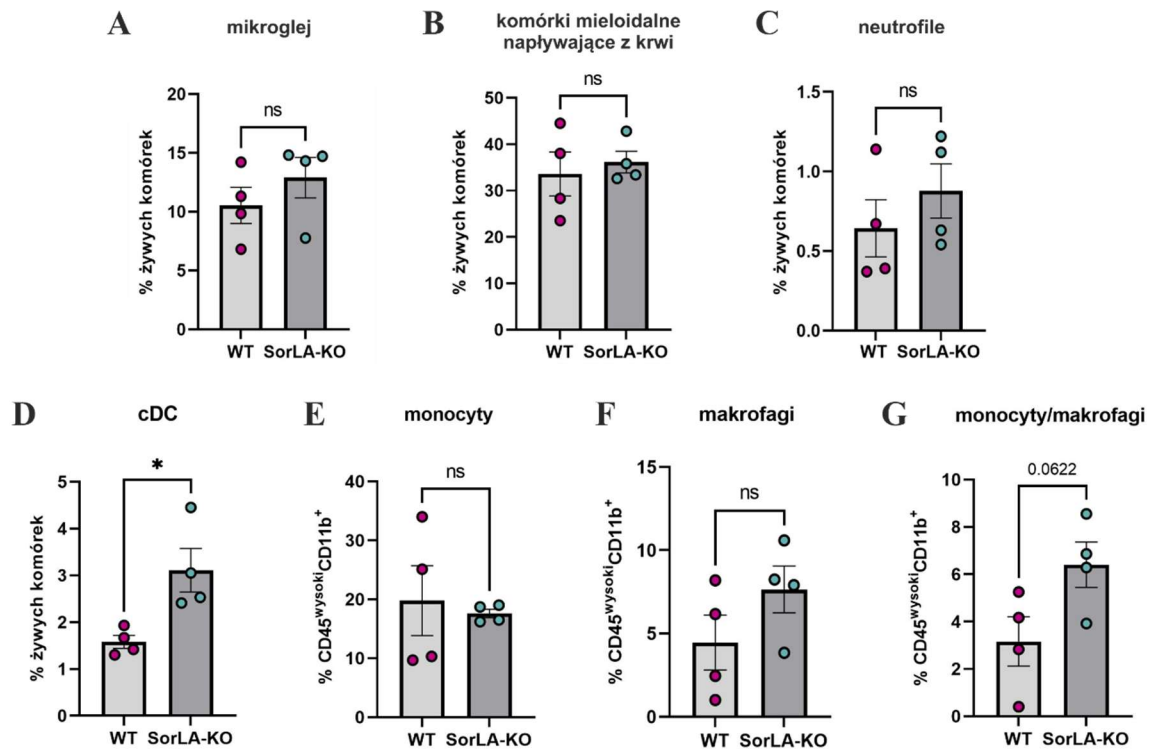


Rycina 37. Komórki MPO⁺ silnie infiltrują mikrośrodowisko glejaka myszy SorLA-KO. Reprezentatywne zdjęcia objętych nowotworem półkul mózgów myszy WT i SorLA-KO, 21 dni po implantacji komórek glejaka, barwionych immunofluorescencyjnie z wykorzystaniem przeciwciał znakujących (A) Gal-3 (B) Tmem119 (C) CD8 oraz (D) MPO. Jądra komórkowe wyznakowano za pomocą DAPI, z kolei komórki nowotworowe GL261-tdT⁺-luc⁺ zaznaczone są kolorem czerwonym. Żółta przerywana linia widoczna w (A) i (B) wskazuje granicę guza. Po prawej stronie każdego przedstawionego zdjęcia znajduje się wykres przedstawiający intensywność sygnału pochodzącą ze znakowania białka stanowiącego marker danej populacji komórek. Skala: 200 μ m. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=4-8. Barwienia i analizy zostały przeprowadzone przez dr hab. Annę Malik.

4.11.2. Analiza cytometryczna komórek pochodzenia limfo- i mieloidalnego w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO

Mikrośrodowisko glejaka charakteryzuje się wysokim stopniem złożoności, a obecność różnych populacji komórek układu odpornościowego napływających z obwodu może zależeć od wielu czynników, w tym od określonego rejonu guza (Moffet i in., 2023). Mając ten fakt na uwadze, postanowiono porównać mikrośrodowisko myszy WT i SorLA-KO pod kątem obecności komórek układu odpornościowego, wykorzystując w tym celu cytometrię przepływową. Technika ta w przeciwieństwie do barwień immunofluorescencyjnych umożliwia uzyskanie ilościowych informacji pochodzących z całej półkuli mózgu objętej guzem, a nie jej fragmentu.

Analiza populacji komórek linii mieloidalnej nie wykazała różnic w odsetku komórek mikrogleju ($CD11b^+CD45^{\text{niski}}$), napływających z krwi komórek mieloidalnych ($CD11b^+CD45^{\text{wysoki}}$) czy neutrofilii ($Ly6C^{\text{średni}}Ly6G^{\text{wysoki}}$) pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO (**Rycina 38A-C**). W mikrośrodowisku myszy SorLA-KO zaobserwowano natomiast zwiększony odsetek populacji konwencjonalnych komórek dendrytycznych (cDC) ($CD11b^-CD11c^+$) (**Rycina 38D**), które należą do grupy komórek prezentujących antygen (APC) i stanowią kluczowy element w rozwoju nabytej odpowiedzi układu odpornościowego, będącej podstawą odpowiedzi przeciwnowotworowej (Böttcher & Reis e Sousa, 2018). Zastosowanie markerów mających na celu rozróżnienie populacji monocytów ($Ly6C^{\text{wysoki}}F4/80^{\text{wysoki}}$) od makrofagów ($Ly6C^{\text{niski}}F4/80^{\text{niski}}$) nie wykazało różnic w odsetkach tych populacji pomiędzy genotypami (**Rycina 38E-F**). Co ciekawe w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO zaobserwowano natomiast tendencję do zwiększonego odsetka komórek będących w stanie pośrednim między monocytami a makrofagami (monocyty/makrofagi) ($Ly6C^{\text{średni}}F4/80^{\text{średni}}$) (**Rycina 38G**).

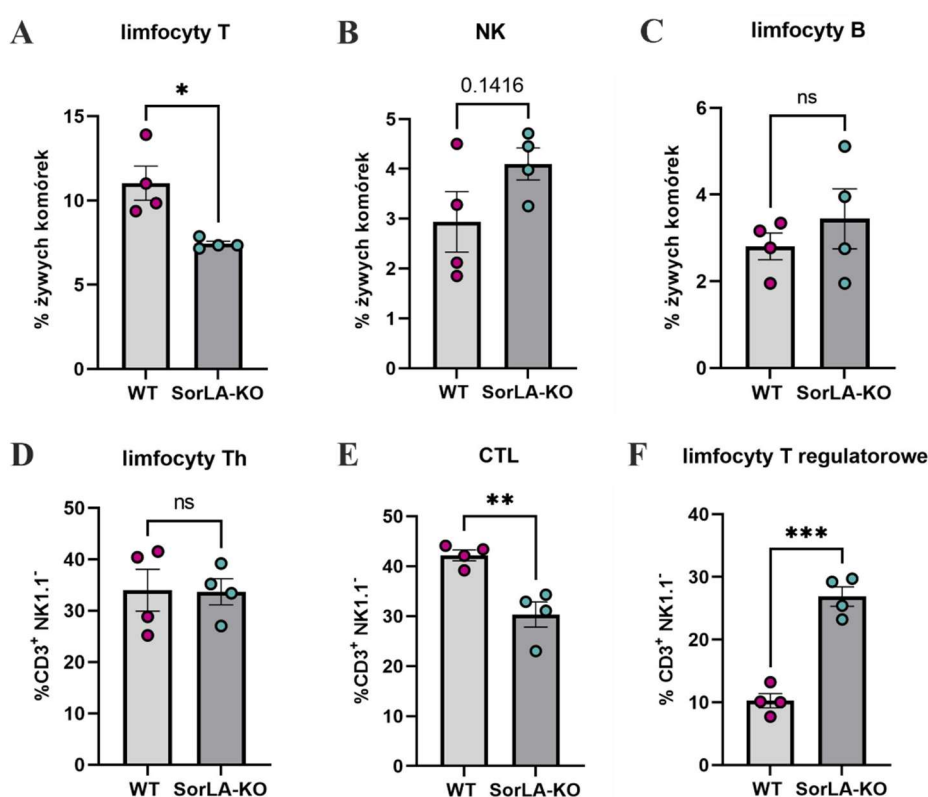


Rycina 38. Mikrośrodowisko glejaka myszy SorLA-KO charakteryzuje się zwiększonym odsetkiem komórek dendrytycznych i komórek stanowiących stadium pośrednie między monocytyami a makrofagami. Wykresy przedstawiające procentowe ilości (A) mikrogleju (B) napływających z krwi komórek mieloidalnych (C) neutrofilii (D) konwencjonalnych komórek dendrytycznych (E) monocytów (F) makrofagów oraz (G) komórek w stadium pośrednim między monocytyami a makrofagami, w mikrośrodowisku nowotworu myszy WT i SorLA-KO, 21 dni implantacji komórek glejaka. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=4. Panele A-D przedstawiają odsetek, jaki dana populacja stanowi w obrębie wszystkich żywych komórek. Panele E-G przedstawiają odsetek, jaki dana populacja stanowi w obrębie komórek CD45^{wysoki}CD11b⁺, a więc napływających z obwodu komórek mieloidalnych.

W przypadku analizy populacji komórek linii limfoidalnej w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO odnotowano obniżony odsetek populacji limfocytów T (CD3⁺) oraz tendencję do zwiększonego odsetka komórek naturalnych zabójców (ang. *natural killer cells*, NK)(CD3⁺NK1.1⁺), aktywnie uczestniczących w eliminacji zagrożenia w organizmie, w tym komórek zmienionych nowotworowo (Coënon i in., 2024) (**Rycina 39A-B**). Nie zaobserwowano natomiast różnic między genotypami w odsetku limfocytów T pomocniczych (Th) (CD4⁺) oraz limfocytów B (CD19⁺) (**Rycina 39C-D**).

Zaskakująca okazała się za to zaobserwowana różnica w odsetku ilości CTL (CD8⁺) oraz limfocytów T regulatorowych (CD4⁺Foxp3⁺) pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO (**Rycina 39E-F**). Limfocyty T cytotoksyczne znane są bowiem ze

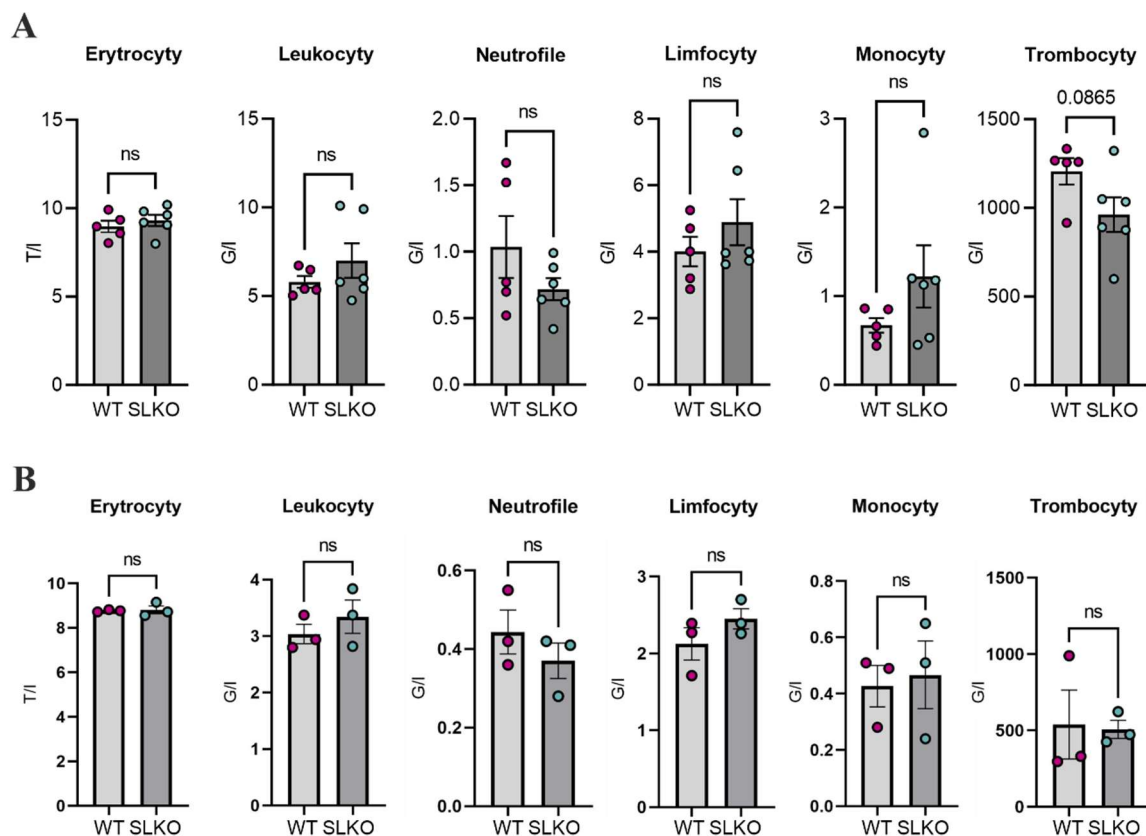
swoich przeciwnowotworowych właściwości (Lee-Chang, 2022), a wyniki analizy cytometrycznej wykazały ich obniżony odsetek w próbkach pochodzących od myszy SorLA-KO, których mikrośrodowisko glejaka na podstawie wcześniej przedstawionych wyników charakteryzuje się osłabionym potencjałem pronowotworowym niż mikrośrodowisko nowotworu myszy WT. Co ciekawe, odsetek limfocytów T regulatorowych, cechujących się zdolnością do wyciszania odpowiedzi wywołanej przez pozostałe komórki układu odpornościowego, charakterystycznych dla immunosupresyjnego mikrośrodowiska nowotworu (Ooi i in., 2014) okazał się zwiększony w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO (**Rycina 39F**).



Rycina 39. Mikrośrodowisko glejaka myszy SorLA-KO charakteryzuje się zwiększonym napływem komórek NK i limfocytów T regulatorowych, a zmniejszonym napływem limfocytów T cytotoksycznych. Wykresy przedstawiające odsetek (A) limfocytów T (B) komórek NK (C) limfocytów B (D) limfocytów Th (E) limfocytów T cytotoksycznych oraz (F) limfocytów T regulatorowych, w mikrośrodowisku nowotworu myszy WT i SorLA-KO, 21 dni po implantacji komórek glejaka. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Ilość powtórzeń biologicznych n=4. Panele A-C przedstawiają odsetek danych populacji w obrębie wszystkich żywych komórek. Panele D-F przedstawiają odsetek, jaki dana populacja stanowi w obrębie limfocytów T CD3⁺.

4.12. Porównanie liczby komórek układu odpornościowego we krwi obwodowej myszy WT i SorLA-KO po implantacji komórek glejaka

W celu zweryfikowania, czy zaobserwowane różnice w napływie komórek układu odpornościowego do mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO nie wynikają z braku SorLA we wszystkich komórkach organizmu i towarzyszących temu zmian np. w procesie hematopoezy, postanowiono określić profil poszczególnych populacji komórek układu odpornościowego we krwi obwodowej myszy WT i SorLA-KO, poddanych implantacji komórek glejaka. Analiza nie wykazała, aby profil wybranych populacji komórek układu odpornościowego różnił się między myszami WT a SorLA-KO (**Rycina 40A**). Co więcej, analogiczna analiza krwi obwodowej myszy WT i SorLA-KO niepoddanych implantacjom komórek glejaka (myszy zdrowych) także nie wykazała różnic w profilu komórek układu odpornościowego (**Rycina 40B**). W związku z tym można wnioskować, iż opisane wcześniej różnice w odsetkach danych populacji komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO mogą wynikać ze zmienionych pod wpływem braku SorLA właściwości GAMs, wpływających na całościowy charakter mikrośrodowiska glejaka.



Rycina 40. Brak SorLA nie wpływa na profil komórek układu odpornościowego we krwi obwodowej zwierząt poddanych implantacjom komórek glejaka oraz zwierząt zdrowych. Wykresy przedstawiające profile wybranych populacji komórek układu odpornościowego we krwi obwodowej myszy WT i SorLA-KO (**A**) 21 dni po implantacji komórek glejaka oraz (**B**) u myszy zdrowych. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu t-studenta. Liczba powtórzeń biologicznych n=3-6.

V. DYSKUSJA

5.1. Wykorzystanie w doświadczeniach *in vivo* myszy pozbawionych SorLA we wszystkich komórkach organizmu

Przez długi czas uważano, że w OUN receptory z domeną VPS10P pełnią swoje funkcje jedynie w komórkach nerwowych. Receptor SorLA został najlepiej poznany w kontekście swoich protekcyjnych funkcji w przebiegu rozwoju AD, a badania mające na celu dokładne scharakteryzowanie tych właściwości rozpoczęły się na początku lat dwutysięcznych. Wykorzystywane w tym celu modele zwierzęce bazowały jednak na użyciu myszy pozbawionych genu kodującego *Sorl1* we wszystkich komórkach organizmu (Andersen i in., 2005; Dodson i in., 2008). Obecnie, dzięki zaawansowanym metodom biologii molekularnej takim jak scRNA-seq wiadomym jest, iż SorLA w OUN ulega transkrypcji również w mikrogleju, zarówno w zdrowym (Sankowski i in., 2024) jak i objętym AD (Gosselin i in., 2017) ludzkim mózgu, a także mózgu mysim (Van Hove i in., 2019). Co ciekawe, mutacje genu *SORL1*, którym w przebiegu AD przypisywano powstawanie nieprawidłowości w funkcjonowaniu receptora w komórkach nerwowych, mogą wpływać również na mikroglej (Nott i in., 2019), który w patogenezie tej choroby odgrywa znaczącą rolę (Leng & Edison, 2021). W związku z tym dopiero od niedawna uwaga badaczy skupia się na określeniu roli SorLA w kształtowaniu funkcji mikrogleju w kontekście AD, jednak badania te bazują na wykorzystaniu modeli *in vitro* (Mishra i in., 2025; Ovesen i in., 2025). Można zatem stwierdzić, iż próby zdefiniowania roli receptora SorLA w mikrogleju stanowią nowy kierunek badań w tematyce receptorów z domeną VPS10P. Mając na uwadze nieopisany wcześniej w żaden sposób wpływ SorLA na właściwości mikrogleju w kontekście nowotworów mózgu, w niniejszej pracy postanowiono wykorzystać więc dostępne zwierzęta SorLA-KO pozbawione ekspresji *Sorl1* we wszystkich komórkach organizmu.

Przeprowadzony przez nas przegląd ogólnodostępnych danych pochodzących z scRNA-seq mikrośrodowiska GBM wykazał, że GAMs charakteryzują się wysokim poziomem ekspresji genu kodującego receptor SorLA, podczas gdy w innych typach komórek nie zaobserwowano znaczącej ilości jego transkryptu. Co więcej stwierdzono, iż poziom ekspresji genu *SORL1* wydaje się zależeć od kierunku polaryzacji fenotypu GAMs

(Kaminska i in., 2024), (sekcja 1.8.). W związku z tym wysnuta została hipoteza, iż to właśnie w tej populacji komórek obecnych w mikrośrodku glejaka SorLA może odgrywać znaczącą funkcję. Na tej podstawie zapoczątkowane zostały przedstawione w niniejszej pracy badania nad rolą receptora SorLA w kształtowaniu funkcjonalnych właściwości GAMs.

W GAMs pochodzących z mikrośrodku nowotworu mózgu myszy WT stwierdzono obecność SorLA na poziomie białka (sekcja 4.8.), co daje podstawę do wnioskowania, iż to właśnie utrata receptora w tej populacji komórek u myszy SorLA-KO po implantacji komórek glejaka powoduje polaryzację ich fenotypu w kierunku prozapalnym, co ogranicza wzrostu guza (sekcja 4.7.). Należy jednak zaznaczyć, że GAMs to heterogenna grupa komórek, które mimo podobieństw, stanowią odrębne populacje mikrogleju oraz makrofagów. Biorąc jednak pod uwagę wcześniej udokumentowaną ekspresję genu kodującego SorLA w mikrogleju (Sankowski i in., 2024; Van Hove i in., 2019), w niniejszej pracy, zarówno w doświadczeniach *in vitro* oraz *in vivo*, postanowiono skupić się przede wszystkim na tej populacji komórek. Niewykluczone natomiast, iż SorLA wpływa także bezpośrednio na właściwości makrofagów. W związku z tym, w celu dopełnienia wiedzy dotyczącej roli SorLA w kształtowaniu fenotypu GAMs jako całej grupy, analogiczne doświadczenia powinny zostać w przyszłości przeprowadzone również z uwzględnieniem makrofagów.

Należy zaznaczyć, że nowotwór bez względu na lokalizację, silnie oddziałuje na cały organizm. Nie można zatem wykluczyć, iż procesy zależne od SorLA mające miejsce poza OUN mogą w pewien sposób wpływać na ograniczenie wzrostu guzów mózgu u myszy SorLA-KO. Rola SorLA niejednokrotnie została potwierdzona bowiem m.in. w kontekście regulacji metabolizmu tłuszczów (Schmidt, Schulz, i in., 2016; Y. Zhu i in., 2004). Kwestią nierozstrzygniętą pozostaje więc, czy zmiany w metabolizmie tych cząsteczek spowodowane brakiem SorLA we wszystkich komórkach organizmu mogłyby wpływać na rozwój mysiego glejaka w OUN. W celu jednoznacznego określenia wpływu braku SorLA na kształtowanie prozapalnych funkcji mikrogleju należy przeprowadzić zatem doświadczenia z wykorzystaniem myszy genetycznie modyfikowanych tak, aby gen *Sorl1* nie ulegał ekspresji wyłącznie w tej populacji komórek.

5.2. Regulacja ekspresji genu *Sorl1* w mysim mikrogleju

Wydzielane przez komórki glejaka czynniki powodują polaryzację fenotypu GAMs w kierunku wspierającym nowotwór, przez co komórki te uwalniają szereg biologicznie aktywnych białek promujących procesy angiogenezy, przebudowy ECM czy podziałów macierzystych komórek nowotworowych. GAMs wpływają także na napływ i funkcje innych komórek układu odpornościowego, przez co tłumiona jest odpowiedź przeciwnowotworowa (Buonfiglioli & Hambardzumyan, 2021; F. Khan i in., 2023). W związku z tym określenie oraz zablokowanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój pronowotworowych właściwości GAMs stanowi kluczowy element w rozwoju nowych terapii glejaków.

SorLA jako receptor sortujący odgrywa ważną rolę w regulacji wydzielania białek, przez co może wpływać na funkcjonalne właściwości komórek. Biorąc więc pod uwagę znaczącą ekspresję genu *SORL1* w GAMs (sekcja 1.8.) oraz fakt, iż w zależności od typu aktywacji komórki te wydzielają czynniki proregeneracyjne lub prozapalne (X. Hu i in., 2015), w niniejszej pracy postanowiono określić mechanizmy regulujące poziom ekspresji genu kodującego SorLA w mysim mikrogleju. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że w mikrogleju pod wpływem współhodowli z komórkami mysiej linii glejaka GL261 poziom ekspresji genu *Sorl1* wzrasta, podczas gdy pod wpływem stymulacji LPS maleje (sekcja 4.1.). Doświadczenia te dowodzą, iż poziom SorLA w mikrogleju zależy od kierunku aktywacji komórek, co wskazuje na zaangażowanie receptora w kształtowanie ich funkcjonalnych właściwości.

Mając na uwadze mnogość czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe, w celu określenia mechanizmu wzmagającego transkrypcję genu *Sorl1* w mikrogleju pod wpływem obecności komórek glejaka postanowiono skupić się na wybranych biologicznie aktywnych białkach wpływających na polaryzację fenotypu GAMs: M-CSF, IL-10 oraz CX3CL1 (fraktalina) (sekcja 4.1.1.). Wykazano, iż traktowanie mikrogleju przy wykorzystaniu CX3CL1 powoduje wzrost poziomu transkryptu *Sorl1*. CX3CL1 aktywuje na powierzchni komórek mikrogleju swoisty receptor CX3CR1, a interakcja ta w warunkach homeostazy odpowiada za komunikację komórek nerwowych i mikrogleju, kluczową dla fagocytozy połączeń synaptycznych mających ulec degradacji (Cornell i in., 2021). W warunkach patologicznych, aktywacja CX3CR1 przez fraktalinę może wzmacniać

natomiast aktywację mikrogleju i wydzielanie cytokin prozapalnych (Mattison i in., 2013; Zujovic i in., 2000) bądź też promować efekty przeciwnie, związane z zapobieganiem nadmiernej aktywacji komórek (Cardona i in., 2006; J. Wang i in., 2021). W związku z tym kierunek polaryzacji fenotypu mikrogleju zależnej od aktywacji CX3CR1 wydaje się być zależny od kontekstu (Lauro i in., 2015). W kontekście glejaka, GAMs charakteryzują się podwyższoną ekspresją genu *CX3CR1* (Hattermann i in., 2014), a aktywacja receptora, głównie za sprawą wydzielanej przez komórki nowotworowe fraktaliny, promuje nabywanie przez nie funkcji wspierających nowotwór (Held-Feindt i in., 2010; Pong i in., 2013). Obserwując wzrost ekspresji *Sor11* w mikrogleju pod wpływem traktowania CX3CL1 można spekulować, iż to właśnie ta chemokina może być odpowiedzialna za zwiększenie ilości transkryptu SorLA w GAMs.

W kontekście prób zdefiniowania mechanizmów zaangażowanych w regulację poziomu ekspresji genu *Sor11* w mikrogleju postanowiono skupić się również na czynnikach o których wiadomo, iż wpływają na wzrost transkrypcji tego genu w komórkach innych niż mikroglej: BDNF oraz NRG-1 (*sekcja 4.1.1.*). Traktowanie neuronów BDNF wpływa bowiem na wzrost ekspresji genu kodującego SorLA, co może być związane z protekcyjną funkcją receptora w kontekście rozwoju AD (Rohe i in., 2009; Young i in., 2015). Wykorzystanie BDNF do stymulacji mikrogleju nie wpłynęło jednak na poziom ekspresji genu *Sor11*. Kwestią nierozstrzygniętą pozostaje, czy mikroglej wyraża na swej powierzchni wystarczającą ilość receptorów Trk odbierających sygnały od tej neurotrofiny (Prowse & Hayley, 2021). Istnieją doniesienia wskazujące na rolę BDNF w kształtowaniu polaryzacji fenotypu mikrogleju *in vitro*, bazują one jednak na schematach doświadczalnych, w których badano wpływ neurotrofiny na kierunek aktywacji komórek pod wpływem działania LPS (Charlton i in., 2023) bądź ATP (X. Zhang i in., 2014).

Mając na uwadze udokumentowany wpływ NRG-1 na wzrost ekspresji genu *SORL1* w komórkach ludzkiej linii nowotworu piersi w ramach aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ang. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK) (Al-Akhrass i in., 2021) postanowiono zweryfikować, czy czynnik ten może regulować transkrypcję genu również w mysim mikrogleju. Co ważne, NRG-1, aktywując receptory powierzchniowe o aktywności kinaz tyrozynowych z grupy EGFR, może kształtować kierunek aktywacji mikrogleju zarówno

w kierunku prozapalnym jak i proregeneracyjnym (Y. Ma i in., 2022; L. J. Simmons i in., 2016; Xiang i in., 2015). W przypadku genu *Sorl1*, NRG-1 okazała się nie wpływać jednak na poziom jego transkrypcji w mikrogleju.

Ciekawym aspektem dalszych badań związanych z regulacją ekspresji *Sorl1* w mikrogleju będzie zdefiniowanie określonej ścieżki sygnałowej aktywującej transkrypcję tego genu. Interesującym wydaje się fakt, iż aktywacja CX3CR1 może wpływać na kaskady sygnałowe zależne od kinaz ERK (Rivas-Fuentes i in., 2021), których aktywacja, jak wspomniano wcześniej, wpływa na indukcję ekspresji genu *SORL1* w ludzkiej linii nowotworu piersi (Al-Akhrass i in., 2021). Możliwe jest zatem, że również za pośrednictwem ścieżki sygnałowej związanej z kinazami ERK, aktywowanej za pośrednictwem CX3CR1, może dochodzić do wzmożonej ekspresji genu *Sorl1* w mikrogleju.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały również, że pod wpływem aktywacji prozapalnej indukowanej LPS poziom transkryptu genu *Sorl1* w mikrogleju spada. Można spekulować, iż obniżenie poziomu SorLA stanowi efekt funkcjonalny w kontekście wzmożonej zdolności komórek do wydzielania czynników prozapalnych (*sekcja 4.2.*). Ciekawą perspektywę dalszych badań nad tym zagadnieniem stanowi fakt, iż LPS aktywuje ścieżkę sygnałową zależną od receptora Toll-podobnego 4 (ang. *Toll-like receptor 4*, TLR4) i CD14 (Ciesielska i in., 2021), który przez mikroglej SorLA-KO *in vitro* wydzielany jest intensywniej w porównaniu do mikrogleju WT (*sekcja 4.2.*) oraz który wykazuje tendencję do zwiększonej ilości w mikrośrodku glejaka myszy pozbawionych SorLA (*sekcja 4.9.*). Możliwe jest zatem, iż regulacja ekspresji *Sorl1* może zależeć od tej ścieżki sygnałowej, której aktywacja może prowadzić do zahamowania ekspresji genu bądź degradacji powstającego transkryptu. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak przeprowadzenia dodatkowych badań.

5.3. Wpływ SorLA na wydzielane przez mikroglej białka w kontekście glejaka

SorLA wiążąc bezpośrednio swoje białkowe ligandy reguluje ich transport w obrębie systemu endomembranowego, definiując tym samym ich ostateczną lokalizację. Jak dotąd, najlepiej poznanymi białkami, których transport w obrębie komórek nerwowych regulowany jest w sposób zależny od SorLA są BDNF, receptory Trk oraz APP i αβ

(Schmidt, Subkhangulova, i in., 2016). W przypadku białek związanych z odpowiedzią układu odpornościowego, rola SorLA została również potwierdzona w kontekście transportu IL-6 oraz jej receptora (Larsen & Petersen, 2017). Wyniki przedstawione w niniejszej pracy przedstawiają istotny wpływ receptora SorLA na wydzielanie białek przez mikroglej, komórki odpornościowe OUN (*sekcja 4.2.*). W celu określenia, które białka wydzielane są przez te komórki w sposób zależny od SorLA, postanowiono porównać skład pożywki hodowlanej mikrogleju WT i SorLA-KO pod wpływem stymulacji PMA. PMA to aktywator białkowej kinazy C, w związku z czym jego użycie nie ogranicza zdolności komórek do wydzielania białek w sposób zależny od określonej ścieżki sygnałowej a co więcej, pobudza proces egzocytozy (Ai i in., 2013; Xue i in., 2009). Wybór takiego schematu doświadczalnego miał więc na celu scharakteryzowanie jak najszerszego spektrum wydzielanych białek.

Analiza z wykorzystaniem MS wykazała, że skład pożywki hodowlanej mikrogleju SorLA-KO znacząco różnił się od pożywki mikrogleju WT pod kątem ilości określonych białek. Wśród nich zidentyfikowano takie, które mogą znacząco wpływać na polaryzację odpowiedzi odpornościowej w kierunku prozapalnym, a jednym z nich jest białko CD14. Co ciekawe, w próbkach pozyskanych z objętych glejakiem półkul mózgów myszy SorLA-KO, które rozwijają mniejsze guzy w porównaniu do myszy WT, również zaobserwowano tendencję do zwiększonej ilości CD14 (*sekcja 4.9.*). Białko CD14 znane jest ze swojej lokalizacji w obrębie błony komórkowej, gdzie uczestniczy w przewodnictwie sygnałów pochodzących od tzw. wzorców molekularnych związanych z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) lub wzorców molekularnych związanych z zagrożeniem (ang. *danger-associated molecular patterns*, DAMP), które aktywują odpowiedź prozapalną (Ciesielska i in., 2021). Jednakże w obrębie błony komórkowej CD14 może ulegać cięciu proteolitycznemu, co jest oznaką wzmożonego stanu zapalnego i może stanowić mechanizm regulujący ilość białka CD14 (Bazil & Strominger, 1991), bądź wtórnie wpływać na produkcję cytokin prozapalnych (Lévêque i in., 2017). Tym samym można wnioskować, iż zwiększona ilość CD14 w mikrośrodku glejaka myszy SorLA-KO związana jest ze zwiększonym stanem zapalnym. Mimo, iż w opisanym doświadczeniu użyto homogenatów całych półkul mysich mózgów należy zaznaczyć, iż to właśnie mikroglej oraz makrofagi są komórkami, które w głównej mierze produkują białko CD14 (Beschoner i in., 2002; Janova i in., 2016; Silvin i in., 2023). W związku z tym

prawdopodobnym jest, iż to właśnie brak SorLA w GAMs odpowiada za zwiększone wydzielanie CD14 w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO i tym samym, uczestniczy w rozwoju stanu zapalnego ograniczającego wzrost guza.

Wśród białek wydzielanych w mniejszej ilości przez mikroglej SorLA-KO w porównaniu do mikrogleju WT *in vitro* zidentyfikowano m.in. SPP1 (sekcja 4.2.). Glikoproteina ta pełni szereg funkcji związanych m.in. z regulacją odpowiedzi odpornościowej, która w zależności od kontekstu może przybierać charakter prozapalny bądź proregeneracyjny (Atai i in., 2011; Hur i in., 2007; Rollo i in., 1996; Yim i in., 2022). W kontekście glejaka, odpowiednie modyfikacje produkowanej przez komórki nowotworowe SPP1 powodują uwolnienie jej biologicznie aktywnego fragmentu, który wpływa na polaryzację fenotypu GAMs w kierunku pronowotworowym, a także wspiera procesy związane z migracją i inwazyjnością (Ellert-Miklaszewska i in., 2016). Również w samych GAMs, zwiększona produkcja SPP1 związana jest z ich właściwościami wspierającymi nowotwór (Szulzewsky i in., 2015, 2018). Zablockowanie SPP1 przy użyciu syntetycznego peptydu w mysim modelu glejaka GL261 pozytywnie wpływa na skuteczność terapii wykorzystującej inhibitor immunologicznego punktu kontrolnego, co wpływa na profil transkryptomyczny GAMs, sugerujący ich przeciwnowotworowe właściwości (Ellert-Miklaszewska i in., 2025). W przeciwieństwie do przedstawionych w niniejszej pracy wyników *in vitro*, w próbkach pochodzących z objętych nowotworem półkul mózgów myszy SorLA-KO zaobserwowano zwiększoną ilość SPP1 w porównaniu do próbek pozyskanych od myszy WT (sekcja 4.9.), które charakteryzują się większym rozmiarem guzów i bardziej pronowotworowym mikrośrodowiskiem. Należy jednak zaznaczyć, iż SPP1 produkowana jest także przez inne komórki obecne w mikrośrodowisku glejaka, w tym w znaczących ilościach przez astrocyty, co ma miejsce również pod wpływem ich prozapalnej aktywacji (Choi i in., 2007; Ikeshima-Kataoka i in., 2018; Jin i in., 2006). Niewykluczone zatem, iż mimo potencjalnej obniżonej zdolności GAMs do wydzielania SPP1, w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO aktywowane astrocyty są przeważającym źródłem produkcji tego białka.

Analiza MS wydzielanych przez mikroglej WT i SorLA-KO białek nie wykazała różnic między genotypami w ilości produkowanych cytokin, kluczowych dla rozwoju odpowiedzi odpornościowej. Co więcej, żadna z cytokin nie została zidentyfikowana wśród

wszystkich białek obecnych w badanych pożywkach hodowlanych (*dane nie zostały przedstawione*). Mając jednak na uwadze istotność cytokin w kształtowaniu charakteru odpowiedzi odpornościowej, jako element uzupełniający wyniki analizy MS, postanowiono porównać ilości cytokin prozapalnych IL-6 oraz TNF- α w pożywkach hodowlanych mikrogleju WT i SorLA-KO, hodowanych zarówno w warunkach kontrolnych jak i po 24-godzinnej stymulacji PMA. Analiza ta wykazała znacząco zwiększoną ilość obu białek w materiale pochodzącym z mikrogleju SorLA-KO poddanego stymulacji (*sekcja 4.2*), co dodatkowo potwierdziło wniosek, iż brak SorLA wzmacnia zdolność mikrogleju do wydzielania czynników prozapalnych. Mając na uwadze fakt, iż SorLA, aby regulować transport swoich białkowych ligandów musi z nimi oddziaływać, postanowiono skupić się na jej roli w kierowaniu komórkową dystrybucją TNF- α , którego powiązanie z SorLA nie zostało wcześniej udokumentowane. Z wykorzystaniem doświadczeń bazujących na koimmunoprecypitacji wykazano, iż SorLA wiąże TNF- α za pośrednictwem domeny EGF/ β p (*sekcja 4.3.*, *sekcja 4.3.1.*), co najprawdopodobniej ogranicza wydzielanie cytokiny przez mikroglej (*sekcja 4.2.*, *sekcja 4.5.*). Należy jednak zaznaczyć, że doświadczenia przedstawione w niniejszej pracy nie wykazały, aby poziom TNF- α w próbkach pochodzących z objętych nowotworem półkul mózgow myszy SorLA-KO był wyższy w porównaniu do próbek pozyskanych od myszy WT (*sekcja 4.9*). Przyczyną tego zjawiska może być fakt, iż ze względu na zmniejszony rozmiar guzów u myszy SorLA-KO, obecność większego fragmentu mózgu nieobjętego nowotworem w pewien sposób może maskować ten efekt, nie uwydatniając tym samym potencjalnych różnic w ilości cytokiny między genotypami.

5.4. Rola SorLA w kształtowaniu właściwości mikrogleju pod wpływem komórek glejaka

Analiza morfologii mikrogleju, stanowiącej ważny wyznacznik świadczący o typie aktywacji komórek wykazała, iż w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO mikroglej przyjmuje bardziej ameboidalny, kompaktowy kształt, charakteryzujący się mniejszą ilością wypustek w porównaniu do mikrogleju obecnego w mikrośrodowisku glejaka myszy WT, co wskazuje na jego odmienne właściwości (*sekcja 4.8.1.*). Jednocześnie, w półkulach mysich mózgów nieobjętych nowotworem nie zaobserwowano różnic w stopniu rozgałęzienia mikrogleju (*sekcja 4.8.1.*), co świadczy o tym, że to właśnie

obecność komórek nowotworowych wpływa na zależne od SorLA funkcje mikrogleju. Bezpośredni wpływ SorLA na kształtowanie odpowiedzi mikrogleju pod wpływem obecności komórek glejaka został również wykazany przy użyciu doświadczeń *in vitro* bazujących na współhodowli mikrogleju WT i SorLA-KO z komórkami mysiej linii glejaka (sekcja 4.5.). Okazało się bowiem, iż komórki pozbawione SorLA charakteryzują się wyższym poziomem białek związanych z odpowiedzią zależną od IFN oraz FcγR, podczas gdy poziom białek związanych z regulacją cyklu komórkowego przez mikroglej SorLA-KO jest obniżony.

IFN to grupa cytokin produkowanych przede wszystkim przez limfocyty T. Ich główną rolą jest kształtowanie prozapalnej odpowiedzi komórek w odpowiedzi na zagrożenie, najczęściej w postaci infekcji wirusowej (Negishi i in., 2018). IFN można podzielić na kilka grup, mogących aktywować różne ścieżki sygnałowe: IFN grupy I (IFN- α oraz IFN- β), IFN grupy II (IFN- γ) oraz IFN grupy III określane jako IFNs- λ (Negishi i in., 2018). Oprócz bardzo dobrze poznanej funkcji IFN w aktywacji odpowiedzi przeciwwirusowej, rola cytokin z tej grupy niejednokrotnie została opisana również w kontekście promowania odpowiedzi przeciwnowotworowej. IFN wpływają na aktywację procesów związanych ze śmiercią komórek nowotworowych, polaryzację fenotypu GAMs w kierunku prozapalnym, a także promują rozwój wrodzonej odpowiedzi odpornościowej m.in. poprzez aktywację zdolności cDC do prezentowania antygenu (Z. Du i in., 2017; Jorgovanovic i in., 2020; D. P. Simmons i in., 2012). W kontekście GBM okazuje się, iż ekspresja genów związanych z odpowiedzią zależną od IFN z grupy I koreluje ze zwiększoną przeżywalnością pacjentów (Lim i in., 2024). Co więcej, z wykorzystaniem mysiego modelu glejaka GL261 zostało udowodnione, iż brak receptora dla IFN- α w komórkach organizmu myszy powoduje zmiany w profilu transkryptomycznym komórek mieloidalnych, które sugerują wzmocnienie ich pronowotworowych właściwości (Blomberg i in., 2023). Z kolei domózgowe podanie czynnika regulatorowego interferonu 8 do mikrośrodowiska mysiego glejaka z użyciem wektora wirusowego ograniczało wzrost nowotworu i wpływało na polaryzację fenotypu komórek mieloidalnych w kierunku przeciwnowotworowym (Montoya i in., 2024). W szczurzym modelu glejaka stwierdzono natomiast, że połączenie terapii temozolomidem z IFN- γ ogranicza wzrost guza oraz poprawia zdolności kognitywne i motoryczne gryzoni (Moslemizadeh i in., 2022).

Mimo, iż IFN to grupa do której zaliczane są różne cytokiny, ściśle łączącym je elementem jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 wyrażona poprzez jego fosforylację (Sadzak i in., 2008; Zhou i in., 2007), na skutek której dochodzi do ekspresji tzw. genów stymulowanych przez interferon (ang. *interferon-stimulated genes*, ISG). Zaobserwowana tendencja do wyższego poziomu p-STAT1 w objętych glejakiem półkulach mózgów myszy SorLA-KO (sekcja 4.8.3.) może wskazywać więc na wzmożoną odpowiedź prozapalną zależną od IFN, która mogłaby przyczyniać się do ograniczonego wzrostu nowotworu i wzmocnienia prozapalnego charakteru mikrośrodowiska guza.

Bazując na doświadczeniach *in vitro*, które wykazały, iż mikroglej pozbawiony SorLA cechuje się wyższym niż komórki WT poziomem białek związanych z odpowiedzią zależną od IFN w warunkach współhodowli z komórkami mysiego glejaka (sekcja 4.5.) postanowiono zweryfikować, czy GAMs pochodzące z mikrośrodowiska SorLA-KO mogą być bardziej podatne na aktywację tego typu odpowiedzi. Okazało się, iż GAMs wyizolowane z mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji ISG z grupy IFIT w porównaniu do GAMs pochodzących z mózgów myszy WT (sekcja 4.8.4.). Aktywacja IFIT związana jest przede wszystkim z odpowiedzią zależną od IFN z grupy I oraz III (Fensterl & Sen, 2015). Jednakże należy zaznaczyć, iż w próbkach pochodzących z objętych glejakiem półkul mózgów myszy SorLA-KO stwierdzono tendencję do wyższego poziomu IFN γ R (sekcja 4.8.3.), a zarówno mikroglej jak i makrofagi zdolne są do wyrażania na swej powierzchni tego receptora, a tym samym, aktywacji odpowiedzi zależnej od IFN- γ (Dhananjayan i in., 2017; Kann i in., 2022). Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie jest więc możliwe jednoznaczne rozstrzygnięcie, która grupa IFN wpływa na aktywację GAMs w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO.

Mikroglej to komórki zdolne do fagocytozy, w ramach której pochłaniają m.in. resztki mieliny, komórki apoptotyczne, fragmenty synaps czy toksyczny A β (Sierra i in., 2013). Na powierzchni mikrogleju można wyróżnić kilka typów receptorów zaangażowanych w proces fagocytozy, takich jak TREM2 (ang. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), Fc γ R, receptor dopełniacza (ang. *complement receptor*, CR) 1 i 3 czy receptor mannozowy (R. Fu i in., 2014). Aktywacja każdego z tych receptorów powoduje zmiany w strukturze cytoszkieletu prowadzące do wytworzenia pęcherzyka

fagocytarnego (ang. *phagocytic cup*) i pochłonięcie określonej cząsteczki, a następnie jej degradację w strukturach określonych mianem fagolizosomów (Frautschy, 2021; Podleśny-Drabiniok i in., 2020). Jako funkcjonalne następstwa zależnej od mikrogleju fagocytozy, które są związane z odpowiedzią odpornościową można wymienić prezentację antygenów limfocytom T oraz regulację rozwoju stanu zapalnego (Sierra i in., 2013). W kontekście nowotworów mózgu kwestią sporną jest natomiast, czy fagocytoza zależna od mikrogleju wiąże się z efektami przeciw- czy pronowotworowymi. Okazuje się bowiem, że mikroglej zlokalizowany w strefach nekrotycznych (martwiczych) charakteryzuje się wysokimi zdolnościami do fagocytozy, mającej na celu najprawdopodobniej „oczyszczenie” środowiska, co sprzyja migracji i inwazji komórek nowotworowych (Saavedra-López i in., 2020). Z drugiej strony, zdolności mikrogleju do fagocytozy komórek nowotworowych stanowią istotny mechanizm ograniczający rozwój guza, a zastosowanie terapii mającej na celu uniemożliwienie komórkom nowotworowym ochrony przed fagocytozą powoduje ograniczenie wzrostu guza i dłuższą przeżywalność myszy po implantacji komórek linii GL261 (von Roemeling i in., 2020).

Interesującym wydaje się fakt, iż mikroglej SorLA-KO pod wpływem współhodowli z komórkami linii GL261 charakteryzuje się wyższym poziomem białek związanych zarówno z IFN jak i fagocytozą: okazuje się bowiem, iż IFN mogą wpływać na aktywację procesów fagocytarnych. Przykładowo, IFN z grupy I zwiększają zdolności mikrogleju do fagocytozy synaps w rozwoju osobniczym (Escoubas i in., 2024), a IFN- γ wzmacnia zdolności tych komórek do prezentacji antygenów i fagocytozy komórek apoptotycznych *in vitro* (Chan i in., 2001; Gottfried-Blackmore i in., 2009). Aktywacja mikrogleju przez IFN- γ w mysim modelu glejaka okazuje się natomiast zwiększać ich zdolności do fagocytozy komórek nowotworowych w kontekście terapii z zastosowaniem inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (D. Chen i in., 2023). Co więcej, IFN mogą aktywować fagocytozę zależną od Fc γ R (Schiff i in., 1997; Sivo i in., 1993). Możliwym jest zatem, iż zwiększone zdolności mikrogleju SorLA-KO do fagocytozy cząsteczek opsonizowanych przez przeciwciała IgG (*sekcja 4.5.2.*) są następstwem odpowiedzi zależnej od IFN, na skutek której dochodzi do wzmożonego lokalizowania Fc γ R w obrębie błony komórkowej i uwrażliwienia komórek na te sygnały. Weryfikacja tej hipotezy wymaga jednak przeprowadzenia dalszych doświadczeń.

W warunkach homeostatycznych w OUN mikroglej proliferuje na bardzo niskim poziomie (Füger i in., 2017). Jednakże pod wpływem stanów chorobowych, takich jak AD (Füger i in., 2017; Olmos-Alonso i in., 2016), udar niedokrwienny (T. Li i in., 2013) czy uszkodzenie rdzenia kręgowego (Bellver-Landete i in., 2019) może dochodzić do zwiększenia zdolności mikrogleju do podziałów, co ma miejsce głównie w obszarach objętych zmianami patologicznymi. Niejednokrotnie udowodniono, iż w mikrośrodkowisku glejaka mikroglej również wykazuje zdolności do wzmożonych podziałów komórkowych, jednak fakt, czy związane jest to z ich właściwościami prozapalnymi bądź pronowotworowymi nie może zostać jednoznacznie określone. Przykładowo, analiza scRNA-seq próbek ludzkich glejaków wykazała, że mikroglej, którego profil transkryptomiczny wskazuje na aktywację prozapalną, cechuje się również ekspresją genów związanych z proliferacją. Autorzy pracy zaznaczyli jednakże, że komórki te promują wzrost guza (Liu i in., 2021). W próbkach pochodzących od pacjentów cierpiących na GBM oraz glejaka ze zmutowaną wersją genu *IDH1* także stwierdzono obecność aktywnie dzielącego się mikrogleju Ki67⁺ (Klemm i in., 2020). Dane scRNA-seq uzyskane z wykorzystaniem mysich modeli glejaka również wykazują obecność populacji proliferującego mikrogleju w mikrośrodkowisku nowotworu (Ochocka i in., 2021; Pombo Antunes i in., 2021). Badania *in vitro* potwierdziły z kolei, że traktowanie mikrogleju pożywką hodowlaną pochodzącą z komórek szczurzej linii glejaka wpływa na wzrost aktywności proliferacyjnej mikrogleju (Ellert-Miklaszewska i in., 2013). W przypadku mikrogleju SorLA-KO, przedstawione w niniejszej pracy wyniki analizy MS wykazały, że pod wpływem współhodowli z komórkami GL261 charakteryzuje się on niższym poziomem białek związanych z cyklem komórkowym (w tym Ki67) w porównaniu do mikrogleju WT. Znakowanie Ki67 w komórkach o obu genotypach nie wykazało jednak, aby mikroglej pozbawiony SorLA charakteryzował się zmienioną zdolnością do proliferacji w obecności komórek nowotworowych (*sekcja 4.5.1.*). W celu dokładniejszego określenia wpływu SorLA na zdolności mikrogleju do proliferacji pod wpływem współhodowli z komórkami glejaka należałoby zatem przeprowadzić inne doświadczenia, np. bazujące na wbudowywaniu do struktury DNA dzielących się komórek analogu tymidyny (bromodeoksyurydyny). Co ciekawe, w mikrośrodkowisku glejaka myszy SorLA-KO stwierdzono natomiast zwiększoną ilość mikrogleju wyrażającego Ki67 (*sekcja 4.8.2.*), co stanowi wynik przeciwny do danych pochodzących z analizy MS *in vitro*. Na

podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem innych mysich modeli chorób można wnioskować, iż zwiększone zdolności do podziałów mogą być związane z aktywacją prozapalną mikrogleju (McGuinness i in., 2016; Tan i in., 2022), a co więcej, proliferacja może być bezpośrednio związana z fagocytarną aktywnością tych komórek (Daria i in., 2017; Giulian & Ingeman, 1988).

5.5. Ocena poziomu markerów śmierci komórkowej w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO

Jednym z kierunków eksperymentalnych strategii terapeutycznych glejaków jest próba aktywacji procesów programowanej śmierci komórkowej w komórkach nowotworowych m.in. na drodze apoptozy (Opel i in., 2008; Unterkircher i in., 2011), nekroptozy (Huang i in., 2013; Pagano i in., 2022) czy ferroptozy (S. Sun i in., 2023; Z. Wang i in., 2018). Wszystkie z tych procesów mogą być indukowane na skutek wzmożonego stanu zapalnego (Y. Chen i in., 2023; Y. Yang i in., 2015). Mając na uwadze zwiększony potencjał prozapalny mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO postanowiono sprawdzić więc, czy któryś z wymienionych rodzajów programowanej śmierci komórkowej może być aktywowany pod wpływem braku SorLA i potencjalnie wpływać na ograniczenie wzrostu guza (*sekcja 4.10.*). Okazało się, iż w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO poziom markerów związanych z procesem nekroptozy, p-RIP1 oraz pRIP-3 jest wyższy w porównaniu do mikrośrodowiska nowotworu myszy WT. Dodatkowo, komórki linii GL261 pod wpływem współhodowli z mikroglejem SorLA-KO również wykazały tendencję do wyższego poziomu białka p-RIP3 (*sekcja 4.6.*). Należy zaznaczyć, iż dobrze scharakteryzowanym aktywatorem śmierci komórkowej na drodze nekroptozy jest cytokina prozapalna TNF- α (Cho i in., 2009; S. He i in., 2009). Choć przeprowadzone eksperymenty nie wykazały różnic w ilości cytokiny między próbkami pochodzącymi od myszy WT i SorLA-KO poddanych implantacji komórek glejaka (*sekcja 4.9*), znaczna różnica w ilości wydzielanego TNF- α między mikroglejem WT i SorLA-KO *in vitro* (*sekcja 4.2*) może wskazywać, iż to właśnie wzmożone wydzielanie tej prozapalnej cytokiny przez mikroglej pozbawiony SorLA może aktywować nekroptozę komórek glejaka.

Aktywacja nekroptozy w kontekście nowotworów nie zawsze związana jest jednak z efektami pozytywnymi. Okazuje się bowiem, iż związany z nekroptożą stan zapalny

może promować podziały macierzystych komórek nowotworowych, angiogenezę czy metastazę (Gong i in., 2019). W kontekście GBM ekspresja genów związanych z nekroptozą wiąże się z gorszymi rokowaniami pacjentów (Dong i in., 2019; M. Khan i in., 2024), a badania *in vitro* wykazały, że makrofagi charakteryzujące się aktywacją prozapalną mogą być bardziej podatne na śmierć na drodze nekroptozy (Hao i in., 2021). Z drugiej strony natomiast, aktywacja nekroptozy może wpływać na zmniejszenie potencjału pronowotworowego mikrośrodowiska guza na rzecz aktywacji odpowiedzi skierowanej przeciwko niemu (Snyder i in., 2019; Yatim i in., 2015). W związku z dualistyczną rolą nekroptozy w nowotworach nie można zatem jednoznacznie określić, czy jej nasilenie w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO ostatecznie wiąże się z efektami korzystnymi. Mając jednak na uwadze zmniejszone rozmiary guzów u myszy pozbawionych SorLA można przypuszczać, że w tym przypadku nekroptoza to zjawisko pożądane.

5.6. Analiza populacji komórek układu odpornościowego infiltrujących mikrośrodowisko glejaka myszy WT i SorLA-KO

Polaryzacja GAMs w kierunku wspierającym rozwój glejaka nie wpływa wyłącznie na procesy związane z rozwojem nowotworu, ale również wywiera efekt na inne komórki układu odpornościowego, ograniczając ich napływ do mikrośrodowiska nowotworu i hamując ich odpowiedź skierowaną przeciwko guzowi (P. Sharma i in., 2023). Mając na uwadze zmniejszoną wielkość glejaków u myszy SorLA-KO (*sekcja 4.7.*) postanowiono więc porównać profile komórek układu odpornościowego obecnych w mikrośrodowisku glejaka myszy WT i SorLA-KO. Barwienia immunofluorescencyjne skrawków mysich mózgów po implantacji komórek glejaka wykazały, iż w mikrośrodowisku guza myszy SorLA-KO najprawdopodobniej występuje mniej mikrogleju, podczas gdy napływ komórek MPO⁺ jest zwiększony (*sekcja 4.11.1.*). W przypadku mikrogleju analiza cytometryczna nie wykazała jednak, aby pomiędzy mikrośrodowiskiem glejaka myszy WT i SorLA-KO występowały różnice w odsetku tej populacji komórek (*sekcja 4.11.2.*). Należy zaznaczyć jednak, że pod wpływem aktywacji mikroglej może obniżać ekspresję genów takich jak *Tmem119* (W. Ma i in., 2024; Mercurio i in., 2022), co mogło wpłynąć na zaobserwowaną tendencję do zmniejszonej intensywności sygnału pochodzącego z barwienia *Tmem119* w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO.

MPO to dobrze scharakteryzowany marker populacji neutrofilii, kluczowy dla produkcji reaktywnych form tlenu oraz tzw. zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (Björnsdóttir i in., 2015). Ostatnie doniesienia wskazują jednak, iż m.in. w mikrośrodku glejaka do syntezy MPO zdolne są również monocyty oraz makrofagi, charakteryzujące się właściwościami przeciwnowotworowymi (Karimi i in., 2023). Analiza cytometryczna wykazała, iż mikrośrodku glejaka myszy SorLA-KO nie odznacza się zwiększonym odsetkiem neutrofilii w porównaniu do myszy WT, jednakże zaobserwowano tendencję do zwiększonego odsetka komórek stanowiących stadium pośrednie między monocytami a makrofagami (*sekcja 4.11.2.*), które potencjalnie mogą być źródłem zaobserwowanej zwiększonej liczby komórek MPO⁺. Należy zaznaczyć, że rola MPO w kontekście nowotworów może być związana zarówno z odpowiedzią próbą przeciwnowotworową (Valadez-Cosmes i in., 2022). Z jednej strony aktywność MPO może nadmiernie indukować stan zapalny i wpływać na ekspresję genów zaangażowanych w przebudowę ECM co sprzyja tworzeniu przerzutów w przypadku nowotworów piersi (Panagopoulos i in., 2017). Zwiększony poziom reaktywnych form tlenu produkowanych na skutek aktywności MPO w neutrofilach może także wpływać na powstawanie mutacji w strukturze DNA promując proces nowotworzenia (Güngör i in., 2010). Jednakże aktywność MPO może przyczyniać się także do wzmocnienia odpowiedzi układu odpornościowego poprzez wzmacnianie procesów związanych z prezentacją antygenów przez APC takie jak cDC czy makrofagi (Biedroń i in., 2015; Prokopowicz i in., 2010). W tym kontekście interesujące jest, iż w mikrośrodku glejaka myszy SorLA-KO zaobserwowano wyższy odsetek cDS, co może świadczyć o wpływie MPO na ich zdolności do prezentacji antygenów i rozwój odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Mysi model glejaka GL261, w przeciwieństwie do ludzkich GBM, charakteryzuje się zwiększonym napływem limfocytów T do mikrośrodku nowotworu (Yabo i in., 2024). Mimo to, wykorzystanie tego modelu umożliwia uzyskanie cennych informacji mogących wskazywać kierunki badań mających na celu zwiększenie stopnia infiltracji limfocytów T do mikrośrodku ludzkich glejaków. W mikrośrodku glejaka myszy SorLA-KO zaobserwowano zmniejszony odsetek limfocytów T w porównaniu do mikrośrodku glejaka myszy WT, podczas gdy odsetek komórek NK był wyższy w przypadku zwierząt pozbawionych SorLA. Komórki NK charakteryzują się silnymi właściwościami przeciwnowotworowymi, uczestnicząc w eliminacji komórek

nowotworowych (Coënon i in., 2024). Co ważne, komórki NK stanowią jedno z głównych źródeł produkcji IFN- γ (Bach i in., 1997), w związku z czym potencjalnie mogą one uczestniczyć w aktywacji odpowiedzi zależnej od IFN w GAMs pochodzących z mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO. Zaskakujący okazał się natomiast zaobserwowany zmniejszony odsetek CTL w mikrośrodowisku nowotworu myszy SorLA-KO, gdyż CTL znane są bowiem z wywoływania efektów przeciwnowotworowych (Lee-Chang, 2022). W związku z tym w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO, charakteryzującego się wyższym potencjałem prozapalnym i zmniejszoną wielkością guza można by spodziewać się, iż napływ CTL będzie większy w porównaniu do myszy WT. Możliwe jest jednak iż mimo, że do mikrośrodowiska glejaka myszy WT CTL napływają w większym stopniu, mogą one nie wykazywać funkcjonalnych właściwości. Weryfikacja tej hipotezy wymaga przeprowadzenia dalszych doświadczeń, skupiających się na analizie ilości CTL wyrażających markery aktywacji limfocytów, takich jak CD44 bądź CD62L (Nakajima i in., 2021). W mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO zaobserwowano również zwiększony odsetek populacji limfocytów T regulatorowych, charakterystycznych dla mikrośrodowiska wspierającego rozwój nowotworu (El Andaloussi & Lesniak, 2006; Ooi i in., 2014). Jednakże, mając na uwadze fakt, iż mikrośrodowisko glejaka myszy SorLA-KO charakteryzuje się wzmożonym charakterem prozapalnym, zwiększony napływ limfocytów T regulatorowych może stanowić swego rodzaju mechanizm mający na celu jego wyciszenie (Arvey i in., 2014; Burzyn i in., 2013).

5.7. Potencjalne konsekwencje wzmożonego stanu zapalnego w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO i perspektywy zablokowania funkcji receptora w mikrogleju

Jak zostało wspomniane wcześniej, dużą uwagę w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych nowotworów mózgu przypisuje się właściwościom GAMs, gdyż przeprogramowanie ich fenotypu w kierunku prozapalnym może mieć istotny wpływ na obniżenie pronowotworowego charakteru mikrośrodowiska guza (Kricha i in., 2024). W mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO, które rozwijają mniejsze guzy w porównaniu z myszami WT, stwierdzono zmniejszoną ilość p-STAT3 oraz tendencję do zwiększonej ilości białka p-STAT1, co świadczy o obniżeniu pronowotworowego charakteru mikrośrodowiska guza na rzecz rozwoju stanu zapalnego (*sekcja 4.8.3.*).

Kwestią dyskusyjną pozostaje jednak, czy wzmożony stan zapalny w mikrośrodkowisku glejaka myszy SorLA-KO, mimo zmniejszonych rozmiarów guza, nie mógłby ostatecznie doprowadzać do negatywnych konsekwencji, takich jak skrócona przeżywalność czy szybsze wystąpienie zaburzeń neurologicznych. Należy mieć bowiem na uwadze, iż wzmożony stan zapalny to jedna z cech charakterystycznych nowotworów związana z ich agresywnością (Hanahan, 2022). W przypadku GBM niejednokrotnie udowodniono, że stan zapalny sprzyja podziałom macierzystych komórek nowotworowych, promuje zmiany epigenetyczne DNA, wzmacnia angiogenezę oraz uniemożliwia efektywne działanie zastosowanych terapii (Bazan i in., 2021; N. Chen i in., 2022; V. Sharma i in., 2011; Vyas i in., 2014). Z drugiej strony wiele razy wykazano, iż aktywacja prozapalnych właściwości GAMs związana jest z efektami przeciwnowotworowymi (Fermi i in., 2023; Hajji i in., 2022; Pilanc i in., 2021; L. Zhang i in., 2009). Na podstawie tych przeciwstawnych wniosków można zatem stwierdzić, iż mikrośrodkowisko glejaka charakteryzuje się złożoną, dynamiczną interakcją między czynnikami prozapalnymi a pronowotworowymi, a zrozumienie jej jest kluczowe dla opracowania nowatorskich terapii.

Próby zmiany kierunku polaryzacji fenotypu GAMs stanowią jeden z obszarów prac nad rozwojem nowatorskich terapii GBM (*sekcja 1.3.*). Na podstawie wyników przedstawionych w niniejszej pracy można wnioskować, iż zablokowanie funkcji SorLA mogłoby zwiększać prozapalny charakter mikrogleju w mikrośrodkowisku glejaka i aktywować go w kierunku walki z guzem. W przypadku receptorów z domeną VPS10P przeprowadzano już próby mające na celu zablokowanie ich funkcji, głównie poprzez uniemożliwienie zajścia interakcji między receptorami a ich białkowymi ligandami, co najlepiej zostało udokumentowane w przypadku sortiliny. W przebiegu otępienia czołowo-skroniowego, sortilina stanowi kluczowy czynnik wpływający na obniżenie zewnątrzkomórkowego poziomu progranuliny, glikoproteiny odgrywającej istotną rolę w zapobieganiu rozwojowi choroby (H. Du i in., 2022). Zablokowanie interakcji między sortiliną a progranuliną wiąże się z zahamowaniem lizosomalnej degradacji glikoproteiny, dzięki czemu może ona pełnić swoje neuroprotektoryjne funkcje (Lee i in., 2014), a podejście to testowane było na poziomie badań klinicznych (Ward i in., 2024). Można zatem wnioskować, iż próby mające na celu zablokowanie funkcji SorLA w mikrogleju byłyby możliwe do zrealizowania w praktyce klinicznej. Ciekawą perspektywę badań w tym obszarze stanowiłoby podejście mające na celu zablokowanie domeny EGF/βp, wiążącej

TNF- α (*sekcja 4.3.1.*), dzięki czemu potencjalnie mogłoby dochodzić do wzmożonego uwalniania cytokiny przez mikroglej i rozwoju odpowiedzi przeciwnowotworowej. Zastosowanie takiego podejścia wymaga jednak stworzenia specyficznych narzędzi blokujących dostęp do tej domeny oraz weryfikację, czy nie wpłynęłoby to na wiązanie innych białkowych ligandów przez SorLA.

VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie roli receptora sortującego SorLA w kształtowaniu właściwości mikrogleju poddanego wpływowi komórek glejaka. Przeprowadzone doświadczenia *in vitro* oraz *in vivo* pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

1. Ekspresja genu *Sor11* w mysim mikrogleju zależy od polaryzacji fenotypu komórek.
2. Stymulacja prozapalna mikrogleju z wykorzystaniem LPS powoduje obniżenie transkrypcji genu *Sor11*, podczas gdy stymulacja komórek przy użyciu CX3CL1 indukuje ekspresję genu kodującego SorLA.
3. Brak SorLA w mysim mikrogleju powoduje nasilone wydzielanie białek odpowiedzi prozapalnej.
4. SorLA wiąże TNF- α za pośrednictwem domeny EGF/ β p, co prawdopodobnie przyczynia się do ograniczenia wydzielania cytokiny przez mikroglej.
5. W warunkach współhodowli z komórkami mysiej linii glejaka GL261, mikroglej pozbawiony SorLA charakteryzuje się wyższym poziomem białek związanych z odpowiedzią zależną od IFN oraz fagocytozą w porównaniu do komórek WT, co świadczy o jego aktywacji prozapalnej.
6. Mikroglej SorLA-KO pod wpływem pożywki hodowlanej pochodzącej z komórek mysiej linii glejaka GL261 wykazuje wyższą aktywność fagocytarną zależną od receptorów Fc γ niż komórki WT.
7. Myszy pozbawione SorLA rozwijają mniejsze guzy mózgu w porównaniu z myszami WT, co może być związane z indukcją nekroptozy komórek glejaka.
8. Mikroglej występujący w mikrośrodowisku glejaka myszy SorLA-KO wykazuje cechy morfologiczne wskazujące na aktywację prozapalną. Komórki te charakteryzują się również obniżoną ekspresją genów związanych z funkcjami pronowotworowymi, podwyższoną ekspresją genów aktywowanych w odpowiedzi na IFN oraz większymi zdolnościami do proliferacji.

9. Prozapalny charakter mikrośrodowiska glejaka myszy SorLA-KO wywołuje zmiany w proporcjach napływających w obręb nowotworu komórek układu odpornościowego linii mielo- i limfoidalnej.

Otrzymane wyniki pozwalają twierdzić, iż zablokowanie funkcji receptora SorLA może wpływać na zwiększenie prozapalnych właściwości GAMs, co może stanowić nowy kierunek badań nad terapiami glejaków mających na celu przeprogramowanie fenotypu tej populacji komórek. Co więcej, zaprezentowane wyniki po raz pierwszy wykazały nieznana dotąd rolę receptora SorLA w mikrogleju udowadniając, iż receptor ten w OUN pełni ważną funkcję nie tylko w komórkach nerwowych.

VII. WYKAZ PIŚMIENICTWA

1. Abdelfattah, N., Kumar, P., Wang, C., Leu, J.-S., Flynn, W. F., Gao, R., Baskin, D. S., Pichumani, K., Ijare, O. B., Wood, S. L., Powell, S. Z., Haviland, D. L., Parker Kerrigan, B. C., Lang, F. F., Prabhu, S. S., Huntoon, K. M., Jiang, W., Kim, B. Y. S., George, J., & Yun, K. (2022). Single-cell analysis of human glioma and immune cells identifies S100A4 as an immunotherapy target. *Nature Communications*, 13(1), 767. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28372-y>
2. Abdelwahab, M. G., Sankar, T., Preul, M. C., & Scheck, A. C. (2011). Intracranial implantation with subsequent 3D in vivo bioluminescent imaging of murine gliomas. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 57, e3403. <https://doi.org/10.3791/3403>
3. Abel, S., Hundhausen, C., Mentlein, R., Schulte, A., Berkhout, T. A., Broadway, N., Hartmann, D., Sedlacek, R., Dietrich, S., Muetze, B., Schuster, B., Kallen, K.-J., Saftig, P., Rose-John, S., & Ludwig, A. (2004). The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(10), 6362–6372. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6362>
4. Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., & Chen, H. (2013). Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3834–3842. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834>
5. Al-Akhrass, H., Conway, J. R. W., Poulsen, A. S. A., Paatero, I., Kaivola, J., Padzik, A., Andersen, O. M., & Ivaska, J. (2021). A feed-forward loop between SorLA and HER3 determines heregulin response and neratinib resistance. *Oncogene*, 40(7), 1300–1317. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01604-5>
6. Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C. A. F., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K. R., Cappai, R., Masters, C. L., Gliemann, J., Mufson, E. J., Hyman, B. T., Paul, S. M., Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(38), 13461–13466. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503689102>
7. Arvey, A., van der Veen, J., Samstein, R. M., Feng, Y., Stamatoyannopoulos, J. A., & Rudensky, A. Y. (2014). Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nature Immunology*, 15(6), 580–587. <https://doi.org/10.1038/ni.2868>
8. Atai, N. A., Bansal, M., Lo, C., Bosman, J., Tigchelaar, W., Bosch, K. S., Jonker, A., De Witt Hamer, P. C., Troost, D., McCulloch, C. A., Everts, V., Van Noorden, C. J. F., & Sodek, J. (2011). Osteopontin is up-regulated and associated with neutrophil and

- macrophage infiltration in glioblastoma. *Immunology*, 132(1), 39–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03335.x>
9. Aw, E., Zhang, Y., & Carroll, M. (2020). Microglial responses to peripheral type 1 interferon. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 340. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02003-z>
 10. Bach, E. A., Aguet, M., & Schreiber, R. D. (1997). The IFN gamma receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology*, 15, 563–591. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.563>
 11. Bazan, N. G., Reid, M. M., Flores, V. A. C., Gallo, J. E., Lewis, W., & Belayev, L. (2021). Multiprong control of glioblastoma multiforme invasiveness: Blockade of pro-inflammatory signaling, anti-angiogenesis, and homeostasis restoration. *Cancer Metastasis Reviews*, 40(3), 643–647. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09987-x>
 12. Bazil, V., & Strominger, J. L. (1991). Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 147(5), 1567–1574.
 13. Bekinschtein, P., & von Bohlen Und Halbach, O. (2020). Editorial: Cellular and Molecular Mechanisms of Neurotrophin Function in the Nervous System. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 101. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00101>
 14. Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallières, N., Lessard, M., Janelle, M.-E., Vernoux, N., Tremblay, M.-È., Fuehrmann, T., Shoichet, M. S., & Lacroix, S. (2019). Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nature Communications*, 10(1), 518. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08446-0>
 15. Bertani, F. R., Mozetic, P., Fioramonti, M., Iuliani, M., Ribelli, G., Pantano, F., Santini, D., Tonini, G., Trombetta, M., Businaro, L., Selci, S., & Rainer, A. (2017). Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 8965. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08121-8>
 16. Beschorner, R., Nguyen, T. D., Gözalan, F., Pedal, I., Mattern, R., Schluesener, H. J., Meyermann, R., & Schwab, J. M. (2002). CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathologica*, 103(6), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s00401-001-0503-7>
 17. Biedroń, R., Konopiński, M. K., Marcinkiewicz, J., & Józefowski, S. (2015). Oxidation by neutrophils-derived HOCl increases immunogenicity of proteins by converting them into ligands of several endocytic receptors involved in antigen uptake by dendritic cells and macrophages. *PloS One*, 10(4), e0123293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123293>

18. Björnsdóttir, H., Welin, A., Michaëlsson, E., Osla, V., Berg, S., Christenson, K., Sundqvist, M., Dahlgren, C., Karlsson, A., & Bylund, J. (2015). Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 89, 1024–1035. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398>
19. Blomberg, E., Silginer, M., Roth, P., & Weller, M. (2023). Differential roles of type I interferon signaling in tumor versus host cells in experimental glioma models. *Translational Oncology*, 28, 101607. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101607>
20. Böttcher, J. P., & Reis e Sousa, C. (2018). The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends in Cancer*, 4(11), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.09.001>
21. Bournazos, S., Gupta, A., & Ravetch, J. V. (2020). The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nature Reviews. Immunology*, 20(10), 633–643. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
22. Buonfiglioli, A., & Hambardzumyan, D. (2021). Macrophages and microglia: The cerberus of glioblastoma. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01156-z>
23. Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory Granule Exocytosis. *Physiological Reviews*, 83(2), 581–632. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2002>
24. Burzyn, D., Benoist, C., & Mathis, D. (2013). Regulatory T cells in nonlymphoid tissues. *Nature Immunology*, 14(10), 1007–1013. <https://doi.org/10.1038/ni.2683>
25. Byun, Y. H., & Park, C.-K. (2022). Classification and Diagnosis of Adult Glioma: A Scoping Review. *Brain & NeuroRehabilitation*, 15(3), e23. <https://doi.org/10.12786/bn.2022.15.e23>
26. Caglayan, S., Takagi-Niidome, S., Liao, F., Carlo, A.-S., Schmidt, V., Burgert, T., Kitago, Y., Füchtbauer, E.-M., Füchtbauer, A., Holtzman, D. M., Takagi, J., & Willnow, T. E. (2014). Lysosomal sorting of amyloid- β by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation. *Science Translational Medicine*, 6(223), 223ra20. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007747>
27. Cao, D., Li, X.-H., Luo, X.-G., Yu, H.-M., Wan, L.-S., Wei, L., & Ren, Y. (2020). Phorbol myristate acetate induces cellular senescence in rat microglia in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(1), 415–426. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4587>
28. Cardona, A. E., Pioro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J.-C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R., & Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, 9(7), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nn1715>

29. Chaitanya, G. V., Steven, A. J., & Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 8, 31. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>
30. Chan, A., Magnus, T., & Gold, R. (2001). Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: Mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia*, 33(1), 87–95. [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(20010101\)33:1<87::aid-glia1008>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/1098-1136(20010101)33:1<87::aid-glia1008>3.0.co;2-s)
31. Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R., & Kettenmann, H. (2012). The brain tumor microenvironment. *Glia*, 60(3), 502–514. <https://doi.org/10.1002/glia.21264>
32. Charlton, T., Prowse, N., McFee, A., Heiratifar, N., Fortin, T., Paquette, C., & Hayley, S. (2023). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has direct anti-inflammatory effects on microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1188672. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1188672>
33. Chen, D., Varanasi, S. K., Hara, T., Traina, K., Sun, M., McDonald, B., Farsakoglu, Y., Clanton, J., Xu, S., Garcia-Rivera, L., Mann, T. H., Du, V., Chung, H. K., Xu, Z., Tripple, V., Casillas, E., Ma, S., O'Connor, C., Yang, Q., ... Kaeck, S. M. (2023). CTLA-4 blockade induces a microglia-Th1 cell partnership that stimulates microglia phagocytosis and anti-tumor function in glioblastoma. *Immunity*, 56(9), 2086-2104.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.07.015>
34. Chen, N., Peng, C., & Li, D. (2022). Epigenetic Underpinnings of Inflammation: A Key to Unlock the Tumor Microenvironment in Glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 13, 869307. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.869307>
35. Chen, Y., Fang, Z.-M., Yi, X., Wei, X., & Jiang, D.-S. (2023). The interaction between ferroptosis and inflammatory signaling pathways. *Cell Death & Disease*, 14(3), 205. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05716-0>
36. Chen, Z., Ross, J. L., & Hambardzumyan, D. (2019). Intravital 2-photon imaging reveals distinct morphology and infiltrative properties of glioblastoma-associated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28), 14254–14259. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902366116>
37. Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C.-X., Herrera, D. G., Nykjaer, A., Hempstead, B. L., & Lee, F. S. (2005). Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(26), 6156–6166. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1017-05.2005>
38. Chien, C.-H., Hsueh, W.-T., Chuang, J.-Y., & Chang, K.-Y. (2021). Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00717-7>

39. Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K.-M. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, *137*(6), 1112–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037>
40. Choi, J.-S., Kim, H.-Y., Cha, J.-H., Choi, J.-Y., & Lee, M.-Y. (2007). Transient microglial and prolonged astroglial upregulation of osteopontin following transient forebrain ischemia in rats. *Brain Research*, *1151*, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.016>
41. Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *78*(4), 1233–1261. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>
42. Coënon, L., Geindreau, M., Ghiringhelli, F., Villalba, M., & Bruchard, M. (2024). Natural Killer cells at the frontline in the fight against cancer. *Cell Death & Disease*, *15*(8), 614. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06976-0>
43. Colopi, A., Fuda, S., Santi, S., Onorato, A., Cesarini, V., Salvati, M., Balistreri, C. R., Dolci, S., & Guida, E. (2023). Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management. *Mechanisms of Ageing and Development*, *211*, 111801. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111801>
44. Conlon, D. M., Schneider, C. V., Ko, Y.-A., Rodrigues, A., Guo, K., Hand, N. J., & Rader, D. J. (2022). Sortilin restricts secretion of apolipoprotein B-100 by hepatocytes under stressed but not basal conditions. *The Journal of Clinical Investigation*, *132*(6), e144334. <https://doi.org/10.1172/JCI144334>
45. Cornell, J., Salinas, S., Huang, H.-Y., & Zhou, M. (2021). Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. *Neural Regeneration Research*, *17*(4), 705–716. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.322423>
46. Daria, A., Colombo, A., Llovera, G., Hampel, H., Willem, M., Liesz, A., Haass, C., & Tahirovic, S. (2017). Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *The EMBO Journal*, *36*(5), 583–603. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694591>
47. Dhananjayan, K., Gunawardena, D., Hearn, N., Sonntag, T., Moran, C., Gyengesi, E., Srikanth, V., & Münch, G. (2017). Activation of Macrophages and Microglia by Interferon- γ and Lipopolysaccharide Increases Methylglyoxal Production: A New Mechanism in the Development of Vascular Complications and Cognitive Decline in Type 2 Diabetes Mellitus? *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *59*(2), 467–479. <https://doi.org/10.3233/JAD-161152>
48. Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>

49. Dionísio, F., Tomas, L., & Schulz, C. (2023). Glycolytic side pathways regulating macrophage inflammatory phenotypes and functions. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 324(2), C558–C564. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00276.2022>
50. Dodson, S. E., Andersen, O. M., Karmali, V., Fritz, J. J., Cheng, D., Peng, J., Levey, A. I., Willnow, T. E., & Lah, J. J. (2008). Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: Evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(48), 12877–12886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4582-08.2008>
51. Dong, Y., Sun, Y., Huang, Y., Dwarakanath, B., Kong, L., & Lu, J. J. (2019). Upregulated necroptosis-pathway-associated genes are unfavorable prognostic markers in low-grade glioma and glioblastoma multiforme. *Translational Cancer Research*, 8(3), 821–827. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.05.01>
52. Du, H., Zhou, X., Feng, T., & Hu, F. (2022). Regulation of lysosomal trafficking of progranulin by sortilin and prosaposin. *Brain Communications*, 4(1), fcab310. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab310>
53. Du, Z., Cai, C., Sims, M., Boop, F. A., Davidoff, A. M., & Pfeffer, L. M. (2017). The effects of type I interferon on glioblastoma cancer stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(2), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.098>
54. Dumanis, S. B., Burgert, T., Caglayan, S., Füchtbauer, A., Füchtbauer, E.-M., Schmidt, V., & Willnow, T. E. (2015). Distinct Functions for Anterograde and Retrograde Sorting of SORLA in Amyloidogenic Processes in the Brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(37), 12703–12713. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0427-15.2015>
55. Dumas, A. A., Pomella, N., Rosser, G., Guglielmi, L., Vinel, C., Millner, T. O., Rees, J., Aley, N., Sheer, D., Wei, J., Marisetty, A., Heimberger, A. B., Bowman, R. L., Brandner, S., Joyce, J. A., & Marino, S. (2020). Microglia promote glioblastoma via mTOR-mediated immunosuppression of the tumour microenvironment. *The EMBO Journal*, 39(15), e103790. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103790>
56. El Andaloussi, A., & Lesniak, M. S. (2006). An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, 8(3), 234–243. <https://doi.org/10.1215/15228517-2006-006>
57. Ellert-Miklaszewska, A., Dabrowski, M., Lipko, M., Sliwa, M., Maleszewska, M., & Kaminska, B. (2013). Molecular definition of the pro-tumorigenic phenotype of glioma-activated microglia. *Glia*, 61(7), 1178–1190. <https://doi.org/10.1002/glia.22510>

58. Ellert-Miklaszewska, A., Pasierbinska, M., Poleszak, K., & Kamińska, B. (2018). Molecular interactions between tumor and its microenvironment in malignant gliomas. *Postepy Biochemii*, 64(2), 129–140. https://doi.org/10.18388/pb.2018_123
59. Ellert-Miklaszewska, A., Pilanc, P., Poleszak, K., Roura, A.-J., Cyranowski, S., Ghosh, M., Baluszek, S., Pasierbinska, M., Gielniewski, B., Swatler, J., Hovorova, Y., Wojnicki, K., & Kaminska, B. (2025). 7aaRGD - a novel SPP1/integrin signaling-blocking peptide reverses immunosuppression and improves anti-PD-1 immunotherapy outcomes in experimental gliomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 44(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s13046-025-03393-9>
60. Ellert-Miklaszewska, A., Wisniewski, P., Kijewska, M., Gajdanowicz, P., Pszczolkowska, D., Przanowski, P., Dabrowski, M., Maleszewska, M., & Kaminska, B. (2016). Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene*, 35(50), 6366–6377. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.55>
61. Escoubas, C. C., Dorman, L. C., Nguyen, P. T., Lagares-Linares, C., Nakajo, H., Anderson, S. R., Barron, J. J., Wade, S. D., Cuevas, B., Vainchtein, I. D., Silva, N. J., Guajardo, R., Xiao, Y., Lidsky, P. V., Wang, E. Y., Rivera, B. M., Taloma, S. E., Kim, D. K., Kaminskaya, E., ... Molofsky, A. V. (2024). Type-I-interferon-responsive microglia shape cortical development and behavior. *Cell*, 187(8), 1936–1954.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.020>
62. Faisal, S. M., Comba, A., Varela, M. L., Argento, A. E., Brumley, E., Abel, C., Castro, M. G., & Lowenstein, P. R. (2022). The complex interactions between the cellular and non-cellular components of the brain tumor microenvironmental landscape and their therapeutic implications. *Frontiers in Oncology*, 12, 1005069. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1005069>
63. Fensterl, V., & Sen, G. C. (2015). Interferon-induced Ifit proteins: Their role in viral pathogenesis. *Journal of Virology*, 89(5), 2462–2468. <https://doi.org/10.1128/JVI.02744-14>
64. Fermi, V., Warta, R., Wöllner, A., Lotsch, C., Jassowicz, L., Rapp, C., Knoll, M., Jungwirth, G., Jungk, C., Dao Trong, P., von Deimling, A., Abdollahi, A., Unterberg, A., & Herold-Mende, C. (2023). Effective Reprogramming of Patient-Derived M2-Polarized Glioblastoma-Associated Microglia/Macrophages by Treatment with GW2580. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 29(22), 4685–4697. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-0576>
65. Fitzer-Attas, C. J., Lowry, M., Crowley, M. T., Finn, A. J., Meng, F., DeFranco, A. L., & Lowell, C. A. (2000). Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(4), 669–682. <https://doi.org/10.1084/jem.191.4.669>

66. Fjorback, A. W., Seaman, M., Gustafsen, C., Mehmedbasic, A., Gokool, S., Wu, C., Militz, D., Schmidt, V., Madsen, P., Nyengaard, J. R., Willnow, T. E., Christensen, E. I., Mobley, W. B., Nykjær, A., & Andersen, O. M. (2012). Retromer binds the FANSHY sorting motif in SorLA to regulate amyloid precursor protein sorting and processing. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(4), 1467–1480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2272-11.2012>
67. Flores-Toro, J. A., Luo, D., Gopinath, A., Sarkisian, M. R., Campbell, J. J., Charo, I. F., Singh, R., Schall, T. J., Datta, M., Jain, R. K., Mitchell, D. A., & Harrison, J. K. (2020). CCR2 inhibition reduces tumor myeloid cells and unmasks a checkpoint inhibitor effect to slow progression of resistant murine gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(2), 1129–1138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910856117>
68. Foreman, P. M., Friedman, G. K., Cassady, K. A., & Markert, J. M. (2017). Oncolytic Virotherapy for the Treatment of Malignant Glioma. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 14(2), 333–344. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0516-0>
69. Franco-Bocanegra, D. K., Gourari, Y., McAuley, C., Chatelet, D. S., Johnston, D. A., Nicoll, J. A. R., & Boche, D. (2021). Microglial morphology in Alzheimer's disease and after A β immunotherapy. *Scientific Reports*, 11(1), 15955. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95535-0>
70. Frautschy, S. A. (2021). CR3 ruffles Fc γ R's claim over phagocytic cups. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100801. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100801>
71. Fu, M., Zhou, Z., Huang, X., Chen, Z., Zhang, L., Zhang, J., Hua, W., & Mao, Y. (2023). Use of Bevacizumab in recurrent glioblastoma: A scoping review and evidence map. *BMC Cancer*, 23(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11043-6>
72. Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J. J., & Tang, Y. (2014). Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Molecular Neurobiology*, 49(3), 1422–1434. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8620-6>
73. Föger, P., Hefendehl, J. K., Veeraraghavalu, K., Wendeln, A.-C., Schlosser, C., Obermüller, U., Wegenast-Braun, B. M., Neher, J. J., Martus, P., Kohsaka, S., Thunemann, M., Feil, R., Sisodia, S. S., Skodras, A., & Jucker, M. (2017). Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging. *Nature Neuroscience*, 20(10), 1371–1376. <https://doi.org/10.1038/nn.4631>
74. Gabrusiewicz, K., Rodriguez, B., Wei, J., Hashimoto, Y., Healy, L. M., Maiti, S. N., Thomas, G., Zhou, S., Wang, Q., Elakkad, A., Liebelt, B. D., Yaghi, N. K., Ezhilarasan, R., Huang, N., Weinberg, J. S., Prabhu, S. S., Rao, G., Sawaya, R., Langford, L. A., ... Heimberger, A. B. (2016). Glioblastoma-infiltrated innate

- immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight*, 1(2). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85841>
75. Gao, C., Jiang, J., Tan, Y., & Chen, S. (2023). Microglia in neurodegenerative diseases: Mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–37. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01588-0>
 76. Garcia, G. E., Truong, L. D., Li, P., Zhang, P., Johnson, R. J., Wilson, C. B., & Feng, L. (2007). Inhibition of CXCL16 attenuates inflammatory and progressive phases of anti-glomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephritis. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1485–1496. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060065>
 77. Geraldo, L. H., Xu, Y., Jacob, L., Pibouin-Fragner, L., Rao, R., Maissa, N., Verreault, M., Lemaire, N., Knosp, C., Lesaffre, C., Daubon, T., Dejaegher, J., Solie, L., Rudewicz, J., Viel, T., Tavitian, B., De Vleeschouwer, S., Sanson, M., Bikfalvi, A., ... Mathivet, T. (2021). SLIT2/ROBO signaling in tumor-associated microglia and macrophages drives glioblastoma immunosuppression and vascular dysmorphia. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(16), e141083. <https://doi.org/10.1172/JCI141083>
 78. Gieryng, A., Pszczolkowska, D., Bocian, K., Dabrowski, M., Rajan, W. D., Kloss, M., Mieczkowski, J., & Kaminska, B. (2017). Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Scientific Reports*, 7(1), 17556. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17752-w>
 79. Giulian, D., & Ingeman, J. E. (1988). Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(12), 4707–4717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-12-04707.1988>
 80. Glerup, S., Bolcho, U., Mølgaard, S., Bøggild, S., Vaegter, C. B., Smith, A. H., Nieto-Gonzalez, J. L., Ovesen, P. L., Pedersen, L. F., Fjorback, A. N., Kjolby, M., Login, H., Holm, M. M., Andersen, O. M., Nyengaard, J. R., Willnow, T. E., Jensen, K., & Nykjaer, A. (2016). SorCS2 is required for BDNF-dependent plasticity in the hippocampus. *Molecular Psychiatry*, 21(12), 1740–1751. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.108>
 81. Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., & Liu, C. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, 18(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>
 82. Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N. G., Holtman, I. R., Schlachetzki, J. C. M., Sajti, E., Jaeger, B. N., O'Connor, C., Fitzpatrick, C., Pasillas, M. P., Pena, M., Adair, A., Gonda, D. D., Levy, M. L., Ransohoff, R. M., Gage, F. H., & Glass, C. K. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6344), eaal3222. <https://doi.org/10.1126/science.aal3222>

83. Gottfried-Blackmore, A., Kaunzner, U. W., Idoyaga, J., Felger, J. C., McEwen, B. S., & Bulloch, K. (2009). Acute in vivo exposure to interferon-gamma enables resident brain dendritic cells to become effective antigen presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20918–20923. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911509106>
84. Grewal, E. P., Nahed, B. V., Carter, B. S., Gerstner, E. R., Curry, W. T., Maus, M. V., & Choi, B. D. (2025). Clinical progress in the development of CAR T cells to treat malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 171(3), 571–579. <https://doi.org/10.1007/s11060-024-04909-7>
85. Guimarães, G. R., Maklouf, G. R., Teixeira, C. E., de Oliveira Santos, L., Tessarollo, N. G., de Toledo, N. E., Serain, A. F., de Lanna, C. A., Pretti, M. A., da Cruz, J. G. V., Falchetti, M., Dimas, M. M., Filgueiras, I. S., Cabral-Marques, O., Ramos, R. N., de Macedo, F. C., Rodrigues, F. R., Bastos, N. C., da Silva, J. L., ... Boroni, M. (2024). Single-cell resolution characterization of myeloid-derived cell states with implication in cancer outcome. *Nature Communications*, 15(1), 5694. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49916-4>
86. Güngör, N., Knaapen, A. M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G. R., Chiu, R. K., Godschalk, R. W. L., & van Schooten, F. J. (2010). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*, 25(2), 149–154. <https://doi.org/10.1093/mutage/gep053>
87. Hagita, S., Rogers, M. A., Pham, T., Wen, J. R., Mlynarchik, A. K., Aikawa, M., & Aikawa, E. (2018). Transcriptional control of intestinal cholesterol absorption, adipose energy expenditure and lipid handling by Sortilin. *Scientific Reports*, 8(1), 9006. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27416-y>
88. Hajji, N., Garcia-Revilla, J., Soto, M. S., Perryman, R., Symington, J., Quarles, C. C., Healey, D. R., Guo, Y., Orta-Vázquez, M. L., Mateos-Cordero, S., Shah, K., Bomalaski, J., Anichini, G., Tzakos, A. G., Crook, T., O'Neill, K., Scheck, A. C., Venero, J. L., & Syed, N. (2022). Arginine deprivation alters microglial polarity and synergizes with radiation to eradicate non-arginine-auxotrophic glioblastoma tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(6), e142137. <https://doi.org/10.1172/JCI142137>
89. Han, S., Liu, Y., Cai, S. J., Qian, M., Ding, J., Larion, M., Gilbert, M. R., & Yang, C. (2020). IDH mutation in glioma: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1580–1589. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0814-x>
90. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
91. Hao, Q., Idell, S., & Tang, H. (2021). M1 Macrophages Are More Susceptible to Necroptosis. *Journal of Cellular Immunology*, 3(2), 97–102. <https://doi.org/10.33696/immunology.3.084>

92. Hattermann, K., Sebens, S., Helm, O., Schmitt, A. D., Mentlein, R., Mehdorn, H. M., & Held-Feindt, J. (2014). Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. *Oncology Reports*, 32(1), 270–276. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3214>
93. He, C., Sheng, L., Pan, D., Jiang, S., Ding, L., Ma, X., Liu, Y., & Jia, D. (2021). Single-Cell Transcriptomic Analysis Revealed a Critical Role of SPP1/CD44-Mediated Crosstalk Between Macrophages and Cancer Cells in Glioma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 779319. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.779319>
94. He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 137(6), 1100–1111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>
95. Hefter, D., Ludewig, S., Draguhn, A., & Korte, M. (2020). Amyloid, APP, and Electrical Activity of the Brain. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 26(3), 231–251. <https://doi.org/10.1177/1073858419882619>
96. Held-Feindt, J., Hattermann, K., Mürköster, S. S., Wedderkopp, H., Knerlich-Lukoschus, F., Ungefroren, H., Mehdorn, H. M., & Mentlein, R. (2010). CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Experimental Cell Research*, 316(9), 1553–1566. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.018>
97. Herda, S., Raczkowski, F., Mittrücker, H.-W., Willmsky, G., Gerlach, K., Kühl, A. A., Breiderhoff, T., Willnow, T. E., Dörken, B., Höpken, U. E., & Rehm, A. (2012). The Sorting Receptor Sortilin Exhibits a Dual Function in Exocytic Trafficking of Interferon- γ and Granzyme A in T Cells. *Immunity*, 37(5), 854–866. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.012>
98. Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(16), 2677–2689. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0043-1>
99. Hermey, G., Plath, N., Hübner, C. A., Kuhl, D., Schaller, H. C., & Hermans-Borgmeyer, I. (2004). The three sorCS genes are differentially expressed and regulated by synaptic activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(6), 1470–1476. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2004.02286.x>
100. Hermey, G., Sjøgaard, S. S., Petersen, C. M., Nykjaer, A., & Gliemann, J. (2006). Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members. *The Biochemical Journal*, 395(2), 285–293. <https://doi.org/10.1042/BJ20051364>
101. Herskowitz, J. H., Offe, K., Deshpande, A., Kahn, R. A., Levey, A. I., & Lah, J. J. (2012). GGA1-mediated endocytic traffic of LR11/SorLA alters APP intracellular distribution and amyloid- β production. *Molecular Biology of the Cell*, 23(14), 2645–2657. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-01-0014>

102. Herz, J. (2001). The LDL receptor gene family: (Un)expected signal transducers in the brain. *Neuron*, 29(3), 571–581. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00234-3)
103. Holland, E. C. (2000). Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6242–6244. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6242>
104. Hu, F., Ku, M.-C., Markovic, D., Dzaye, O. D. a, Lehnardt, S., Synowitz, M., Wolf, S. A., & Kettenmann, H. (2014). Glioma-associated microglial MMP9 expression is upregulated by TLR2 signaling and sensitive to minocycline. *International Journal of Cancer*, 135(11), 2569–2578. <https://doi.org/10.1002/ijc.28908>
105. Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., & Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization—New prospects for brain repair. *Nature Reviews. Neurology*, 11(1), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.207>
106. Huang, C., Luo, Y., Zhao, J., Yang, F., Zhao, H., Fan, W., & Ge, P. (2013). Shikonin kills glioma cells through necroptosis mediated by RIP-1. *PloS One*, 8(6), e66326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066326>
107. Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
108. Hur, E. M., Youssef, S., Haws, M. E., Zhang, S. Y., Sobel, R. A., & Steinman, L. (2007). Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nature Immunology*, 8(1), 74–83. <https://doi.org/10.1038/ni1415>
109. Ikeshima-Kataoka, H., Matsui, Y., & Uede, T. (2018). Osteopontin is indispensable for activation of astrocytes in injured mouse brain and primary culture. *Neurological Research*, 40(12), 1071–1079. <https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1517995>
110. Indira Chandran, V., Gopala, S., Venkat, E. H., Kjolby, M., & Nejsum, P. (2024). Extracellular vesicles in glioblastoma: A challenge and an opportunity. *NPJ Precision Oncology*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00600-2>
111. Jacobsen, L., Madsen, P., Jacobsen, C., Nielsen, M. S., Gliemann, J., & Petersen, C. M. (2001). Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22788–22796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100857200>
112. Janova, H., Böttcher, C., Holtman, I. R., Regen, T., Van Rossum, D., Götz, A., Ernst, A.-S., Fritsche, C., Gertig, U., Saiepour, N., Gronke, K., Wrzos, C., Ribes, S., Rolfes, S., Weinstein, J., Ehrenreich, H., Pukrop, T., Kopatz, J., Stadelmann, C., ... Hanisch, U.-K. (2016). CD14 is a key organizer of microglial responses to CNS infection and injury: CD14 Organizes Microglial TLR4 Activation. *Glia*, 64(4), 635–649. <https://doi.org/10.1002/glia.22955>

113. Jin, J.-K., Na, Y.-J., Moon, C., Kim, H., Ahn, M., Kim, Y.-S., & Shin, T. (2006). Increased expression of osteopontin in the brain with scrapie infection. *Brain Research*, 1072(1), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.013>
114. Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. *Biomarker Research*, 8(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
115. Kaminska, P., Cyranowski, S., Pilanc, P., & Malik, A. R. (2024). Syngeneic Mouse Model of Glioblastoma: Intracranial Implantation of GL261 Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2746, 135–146. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3585-8_11
116. Kaminska, P., Ovesen, P. L., Jakiel, M., Obrebski, T., Schmidt, V., Draminski, M., Biliska, A. G., Bieniek, M., Anink, J., Paterczyk, B., Jensen, A. M. G., Piatek, S., Andersen, O. M., Aronica, E., Willnow, T. E., Kaminska, B., Dabrowski, M. J., & Malik, A. R. (2024). SorLA restricts TNF α release from microglia to shape a glioma-supportive brain microenvironment. *EMBO Reports*, 25(5), 2278–2305. <https://doi.org/10.1038/s44319-024-00117-6>
117. Kaminska, P., Tempes, A., Scholz, E., & Malik, A. R. (2024). Cytokines on the way to secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 79, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.08.003>
118. Kamińska, P., Piątek, S., Bieniek, M., & Malik, A. (2023). [Everything on the right place – the role of VPS10P receptors in intracellular protein sorting]. *Postępy Biochemii*, 69(1), 26–41. https://doi.org/10.18388/pb.2021_473
119. Kann, O., Almouhanna, F., & Chausse, B. (2022). Interferon γ : A master cytokine in microglia-mediated neural network dysfunction and neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*, 45(12), 913–927. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.10.007>
120. Karimi, E., Yu, M. W., Maritan, S. M., Perus, L. J. M., Rezanejad, M., Sorin, M., Dankner, M., Fallah, P., Doré, S., Zuo, D., Fiset, B., Kloosterman, D. J., Ramsay, L., Wei, Y., Lam, S., Alsajjan, R., Watson, I. R., Roldan Ugoiti, G., Park, M., ... Walsh, L. A. (2023). Single-cell spatial immune landscapes of primary and metastatic brain tumours. *Nature*, 614(7948), 555–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05680-3>
121. Khan, F., Pang, L., Dunterman, M., Lesniak, M. S., Heimberger, A. B., & Chen, P. (2023). Macrophages and microglia in glioblastoma: Heterogeneity, plasticity, and therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 133(1), e163446. <https://doi.org/10.1172/JCI163446>
122. Khan, M., Huang, X., Ye, X., Zhang, D., Wang, B., Xu, A., Li, R., Ren, A., Chen, C., Song, J., Zheng, R., Yuan, Y., & Lin, J. (2024). Necroptosis-based glioblastoma prognostic subtypes: Implications for TME remodeling and therapy response. *Annals of Medicine*, 56(1), 2405079. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2405079>

123. Klemm, F., Maas, R. R., Bowman, R. L., Kornete, M., Soukup, K., Nassiri, S., Brouland, J.-P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Brennan, C., Tabar, V., Gutin, P. H., Daniel, R. T., Hegi, M. E., & Joyce, J. A. (2020). Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell*, 181(7), 1643-1660.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.007>
124. Klinger, S. C., Glerup, S., Raarup, M. K., Mari, M. C., Nyegaard, M., Koster, G., Prabakaran, T., Nilsson, S. K., Kjaergaard, M. M., Bakke, O., Nykjær, A., Olivecrona, G., Petersen, C. M., & Nielsen, M. S. (2011). SorLA regulates the activity of lipoprotein lipase by intracellular trafficking. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 7), 1095–1105. <https://doi.org/10.1242/jcs.072538>
125. Kricha, A., Bouchmaa, N., Ben Mkaddem, S., Abbaoui, A., Ben Mrid, R., & El Fatimy, R. (2024). Glioblastoma-associated macrophages: A key target in overcoming glioblastoma therapeutic resistance. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 80, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.10.009>
126. Larsen, J. V., & Petersen, C. M. (2017). SorLA in Interleukin-6 Signaling and Turnover. *Molecular and Cellular Biology*, 37(11), e00641-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.00641-16>
127. Lauro, C., Catalano, M., Trettel, F., & Limatola, C. (2015). Fractalkine in the nervous system: Neuroprotective or neurotoxic molecule? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351, 141–148. <https://doi.org/10.1111/nyas.12805>
128. Lauro, C., & Limatola, C. (2020). Metabolic Reprograming of Microglia in the Regulation of the Innate Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology*, 11, 493. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00493>
129. Lee, W. C., Almeida, S., Prudencio, M., Caulfield, T. R., Zhang, Y.-J., Tay, W. M., Bauer, P. O., Chew, J., Sasaguri, H., Jansen-West, K. R., Gendron, T. F., Stetler, C. T., Finch, N., Mackenzie, I. R., Rademakers, R., Gao, F.-B., & Petrucelli, L. (2014). Targeted manipulation of the sortilin-progranulin axis rescues progranulin haploinsufficiency. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1467–1478. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt534>
130. Lee-Chang, C. (2022). Understanding the relationship between gliomas and T cells: Paving the way for effective immunotherapy. *Neuro-Oncology*, 24(10), 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac152>
131. Lehrke, M., Millington, S. C., Lefterova, M., Cumararatunge, R. G., Szapary, P., Wilensky, R., Rader, D. J., Lazar, M. A., & Reilly, M. P. (2007). CXCL16 is a marker of inflammation, atherosclerosis, and acute coronary syndromes in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(4), 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.034>

132. Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews. Neurology*, 17(3), 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
133. Lévêque, M., Simonin-Le Jeune, K., Jouneau, S., Moulis, S., Desrues, B., Belleguic, C., Brinchault, G., Le Trionnaire, S., Gangneux, J.-P., Dimanche-Boitrel, M.-T., & Martin-Chouly, C. (2017). Soluble CD14 acts as a DAMP in human macrophages: Origin and involvement in inflammatory cytokine/chemokine production. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(5), 1891–1902. <https://doi.org/10.1096/fj.201600772R>
134. Li, J., Wang, Y., Matye, D. J., Chavan, H., Krishnamurthy, P., Li, F., & Li, T. (2017). Sortilin 1 Modulates Hepatic Cholesterol Lipotoxicity in Mice via Functional Interaction with Liver Carboxylesterase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(1), 146–160. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762005>
135. Li, Q., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 18(4), 225–242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
136. Li, T., Pang, S., Yu, Y., Wu, X., Guo, J., & Zhang, S. (2013). Proliferation of parenchymal microglia is the main source of microgliosis after ischaemic stroke. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 12), 3578–3588. <https://doi.org/10.1093/brain/awt287>
137. Lim, J., La, J., Kim, H. C., Kang, I., Kang, B. H., Ku, K. B., Kim, Y., Kwon, M. S., & Lee, H. K. (2024). Type I interferon signaling regulates myeloid and T cell crosstalk in the glioblastoma tumor microenvironment. *iScience*, 27(9), 110810. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110810>
138. Lin, W., Chen, H., Chen, X., & Guo, C. (2024). The Roles of Neutrophil-Derived Myeloperoxidase (MPO) in Diseases: The New Progress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 13(1), 132. <https://doi.org/10.3390/antiox13010132>
139. Lisi, L., Ciotti, G. M. P., Braun, D., Kalinin, S., Currò, D., Dello Russo, C., Coli, A., Mangiola, A., Anile, C., Feinstein, D. L., & Navarra, P. (2017). Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neuroscience Letters*, 645, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.076>
140. Liu, H., Sun, Y., Zhang, Q., Jin, W., Gordon, R. E., Zhang, Y., Wang, J., Sun, C., Wang, Z. J., Qi, X., Zhang, J., Huang, B., Gui, Q., Yuan, H., Chen, L., Ma, X., Fang, C., Liu, Y., Yu, X., & Feng, S. (2021). Pro-inflammatory and proliferative microglia drive progression of glioblastoma. *Cell Reports*, 36(11), 109718. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109718>
141. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors

- of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
142. Ma, Q.-L., Galasko, D. R., Ringman, J. M., Vinters, H. V., Edland, S. D., Pomakian, J., Ubeda, O. J., Rosario, E. R., Teter, B., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2009). Reduction of SorLA/LR11, a sorting protein limiting beta-amyloid production, in Alzheimer disease cerebrospinal fluid. *Archives of Neurology*, 66(4), 448–457. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.22>
 143. Ma, W., Oswald, J., Rios Angulo, A., & Chen, Q. (2024). Tmem119 expression is downregulated in a subset of brain metastasis-associated microglia. *BMC Neuroscience*, 25(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12868-024-00846-3>
 144. Ma, Y., Fan, P., Zhao, R., Zhang, Y., Wang, X., & Cui, W. (2022). Neuregulin-1 regulates the conversion of M1/M2 microglia phenotype via ErbB4-dependent inhibition of the NF- κ B pathway. *Molecular Biology Reports*, 49(5), 3975–3986. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07249-9>
 145. Malik, A. R., Lips, J., Gorniak-Walas, M., Broekaart, D. W. M., Asaro, A., Kuffner, M. T. C., Hoffmann, C. J., Kikhia, M., Dopatka, M., Boehm-Sturm, P., Mueller, S., Dirnagl, U., Aronica, E., Harms, C., & Willnow, T. E. (2020). SorCS2 facilitates release of endostatin from astrocytes and controls post-stroke angiogenesis. *Glia*, 68(6), 1304–1316. <https://doi.org/10.1002/glia.23778>
 146. Malik, A. R., & Willnow, T. E. (2020). VPS10P Domain Receptors: Sorting Out Brain Health and Disease. *Trends in Neurosciences*, 43(11), 870–885. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.08.003>
 147. Manderson, A. P., Kay, J. G., Hammond, L. A., Brown, D. L., & Stow, J. L. (2007). Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF α . *Journal of Cell Biology*, 178(1), 57–69. <https://doi.org/10.1083/jcb.200612131>
 148. Mantovani, A., Marchesi, F., Jaillon, S., Garlanda, C., & Allavena, P. (2021). Tumor-associated myeloid cells: Diversity and therapeutic targeting. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(3), 566–578. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00613-4>
 149. Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E., & Emr, S. D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell*, 77(4), 579–586. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90219-4)
 150. Markovic, D. S., Glass, R., Synowitz, M., Rooijen, N. van, & Kettenmann, H. (2005). Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(9), 754–762. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000178445.33972.a9>

151. Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K., & Schlitzer, A. (2023). Tissue-specific macrophages: How they develop and choreograph tissue biology. *Nature Reviews. Immunology*, 23(9), 563–579. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y>
152. Mattison, H. A., Nie, H., Gao, H., Zhou, H., Hong, J.-S., & Zhang, J. (2013). Suppressed pro-inflammatory response of microglia in CX3CR1 knockout mice. *Journal of Neuroimmunology*, 257(1–2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.02.008>
153. McGuinness, B., Gibney, S. M., Beumer, W., Versnel, M. A., Sillaber, I., Harkin, A., & Drexhage, H. A. (2016). Exaggerated Increases in Microglia Proliferation, Brain Inflammatory Response and Sickness Behaviour upon Lipopolysaccharide Stimulation in Non-Obese Diabetic Mice. *Neuroimmunomodulation*, 23(3), 137–150. <https://doi.org/10.1159/000446370>
154. Mehmedbasic, A., Christensen, S. K., Nilsson, J., Rüetschi, U., Gustafsen, C., Poulsen, A. S. A., Rasmussen, R. W., Fjorback, A. N., Larson, G., & Andersen, O. M. (2015). SorLA Complement-type Repeat Domains Protect the Amyloid Precursor Protein against Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 290(6), 3359–3376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619940>
155. Mercurio, D., Fumagalli, S., Schafer, M. K.-H., Pedragosa, J., Ngassam, L. D. C., Wilhelmi, V., Winterberg, S., Planas, A. M., Weihe, E., & De Simoni, M.-G. (2022). Protein Expression of the Microglial Marker Tmem119 Decreases in Association With Morphological Changes and Location in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 820127. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.820127>
156. Miller, J. J., Gonzalez Castro, L. N., McBrayer, S., Weller, M., Cloughesy, T., Portnow, J., Andronesi, O., Barnholtz-Sloan, J. S., Baumert, B. G., Berger, M. S., Bi, W. L., Bindra, R., Cahill, D. P., Chang, S. M., Costello, J. F., Horbinski, C., Huang, R. Y., Jenkins, R. B., Ligon, K. L., ... Wen, P. Y. (2023). Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutant gliomas: A Society for Neuro-Oncology (SNO) consensus review on diagnosis, management, and future directions. *Neuro-Oncology*, 25(1), 4–25. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac207>
157. Mishra, S., Morshed, N., Sidhu, S. B., Kinoshita, C., Stevens, B., Jayadev, S., & Young, J. E. (2025). The Alzheimer's Disease Gene SORL1 Regulates Lysosome Function in Human Microglia. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.70009>
158. Moffet, J. J. D., Fatunla, O. E., Freytag, L., Kriel, J., Jones, J. J., Roberts-Thomson, S. J., Pavenko, A., Scoville, D. K., Zhang, L., Liang, Y., Morokoff, A. P., Whittle, J. R., Freytag, S., & Best, S. A. (2023). Spatial architecture of high-grade glioma reveals tumor heterogeneity within distinct domains. *Neuro-Oncology Advances*, 5(1), vdad142. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdad142>
159. Montoya, M., Collins, S. A., Chuntova, P., Patel, T. S., Nejo, T., Yamamichi, A., Kasahara, N., & Okada, H. (2024). Interferon regulatory factor 8-driven reprogramming of the immune microenvironment enhances antitumor adaptive

- immunity and reduces immunosuppression in murine glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 26(12), 2272–2287. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae149>
160. Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific Reports*, 7(1), 13211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13581-z>
 161. Mortensen, M. B., Kjolby, M., Gunnarsen, S., Larsen, J. V., Palmfeldt, J., Falk, E., Nykjaer, A., & Bentzon, J. F. (2014). Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(12), 5317–5322. <https://doi.org/10.1172/JCI76002>
 162. Moslemizadeh, A., Nematollahi, M. H., Amiresmaili, S., Faramarz, S., Jafari, E., Khaksari, M., Rezaei, N., Bashiri, H., & Kheirandish, R. (2022). Combination therapy with interferon-gamma as a potential therapeutic medicine in rat's glioblastoma: A multi-mechanism evaluation. *Life Sciences*, 305, 120744. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120744>
 163. Munck Petersen, C., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S. K., & Madsen, P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *The EMBO Journal*, 18(3), 595–604. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.595>
 164. Nakajima, Y., Chamoto, K., Oura, T., & Honjo, T. (2021). Critical role of the CD44^{low}CD62L^{low} CD8⁺ T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(23), e2103730118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103730118>
 165. Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., Hebert, C. M., Dewitt, J., Gritsch, S., Perez, E. M., Gonzalez Castro, L. N., Lan, X., Druck, N., Rodman, C., Dionne, D., Kaplan, A., ... Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835–849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
 166. Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11), a028423. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>
 167. Nielsen, M. S., Keat, S. J., Hamati, J. W., Madsen, P., Gutzmann, J. J., Engelsberg, A., Pedersen, K. M., Gustafsen, C., Nykjaer, A., Gliemann, J., Hermans-Borgmeyer, I., Kuhl, D., Petersen, C. M., & Hermey, G. (2008). Different motifs regulate trafficking of SorCS1 isoforms. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(6), 980–994. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00731.x>

168. Noch, E. K., Ramakrishna, R., & Magge, R. (2018). Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurgery*, 116, 505–517. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.022>
169. Nott, A., Holtman, I. R., Coufal, N. G., Schlachetzki, J. C. M., Yu, M., Hu, R., Han, C. Z., Pena, M., Xiao, J., Wu, Y., Keulen, Z., Pasillas, M. P., O'Connor, C., Nickl, C. K., Schafer, S. T., Shen, Z., Rissman, R. A., Brewer, J. B., Gosselin, D., ... Glass, C. K. (2019). Brain cell type-specific enhancer-promoter interactome maps and disease-risk association. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6469), 1134–1139. <https://doi.org/10.1126/science.aay0793>
170. Ochocka, N., Segit, P., Walentynowicz, K. A., Wojnicki, K., Cyranowski, S., Swatler, J., Mieczkowski, J., & Kaminska, B. (2021). Single-cell RNA sequencing reveals functional heterogeneity of glioma-associated brain macrophages. *Nature Communications*, 12(1), 1151. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21407-w>
171. Offe, K., Dodson, S. E., Shoemaker, J. T., Fritz, J. J., Gearing, M., Levey, A. I., & Lah, J. J. (2006). The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(5), 1596–1603. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4946-05.2006>
172. Olmos-Alonso, A., Schettters, S. T. T., Sri, S., Askew, K., Mancuso, R., Vargas-Caballero, M., Holscher, C., Perry, V. H., & Gomez-Nicola, D. (2016). Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain: A Journal of Neurology*, 139(Pt 3), 891–907. <https://doi.org/10.1093/brain/awv379>
173. Ooi, Y. C., Tran, P., Ung, N., Thill, K., Trang, A., Fong, B. M., Nagasawa, D. T., Lim, M., & Yang, I. (2014). The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 119, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.12.004>
174. Opel, D., Westhoff, M.-A., Bender, A., Braun, V., Debatin, K.-M., & Fulda, S. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, 68(15), 6271–6280. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6769>
175. Ortiz, R., Perazzoli, G., Cabeza, L., Jiménez-Luna, C., Luque, R., Prados, J., & Melguizo, C. (2021). Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Current Neuropharmacology*, 19(4), 513–537. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200626204005>
176. Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., Weil, S., Horstmann, H., Wiestler, B., Syed, M., Huang, L., Ratliff, M., Karimian Jazi, K., Kurz, F. T., Schmenger, T., Lemke, D., Gömmel, M., Pauli, M., Liao, Y., ... Winkler, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580), 93–98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>

177. Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro-Oncology*, 23(12 Suppl 2), iii1–iii105. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab200>
178. Ovesen, P. L., Juul-Madsen, K., Telugu, N. S., Schmidt, V., Frahm, S., Radbruch, H., Louth, E. L., Korshøj, A. R., Heppner, F. L., Diecke, S., Kettenmann, H., & Willnow, T. E. (2025). Alzheimer's Disease Risk Gene SORL1 Promotes Receptiveness of Human Microglia to Pro-Inflammatory Stimuli. *Glia*, 73(4), 857–872. <https://doi.org/10.1002/glia.24659>
179. Pagano, C., Navarra, G., Coppola, L., Avilia, G., Pastorino, O., Della Monica, R., Buonaiuto, M., Torelli, G., Caiazzo, P., Bifulco, M., & Laezza, C. (2022). N6-isopentenyladenosine induces cell death through necroptosis in human glioblastoma cells. *Cell Death Discovery*, 8(1), 173. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00974-x>
180. Panagopoulos, V., Leach, D. A., Zinonos, I., Ponomarev, V., Licari, G., Liapis, V., Ingman, W. V., Anderson, P., DeNichilo, M. O., & Evdokiou, A. (2017). Inflammatory peroxidases promote breast cancer progression in mice via regulation of the tumour microenvironment. *International Journal of Oncology*, 50(4), 1191–1200. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3883>
181. Park, Y. W., Vollmuth, P., Foltyn-Dumitru, M., Sahm, F., Ahn, S. S., Chang, J. H., & Kim, S. H. (2023). The 2021 WHO Classification for Gliomas and Implications on Imaging Diagnosis: Part 1-Key Points of the Fifth Edition and Summary of Imaging Findings on Adult-Type Diffuse Gliomas. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 58(3), 677–689. <https://doi.org/10.1002/jmri.28743>
182. Pilanc, P., Wojnicki, K., Roura, A.-J., Cyranowski, S., Ellert-Miklaszewska, A., Ochocka, N., Gielniewski, B., Grzybowski, M. M., Błaszczyk, R., Stańczak, P. S., Dobrzański, P., & Kaminska, B. (2021). A Novel Oral Arginase 1/2 Inhibitor Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Experimental Gliomas by Altering the Immunosuppressive Environment. *Frontiers in Oncology*, 11, 703465. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.703465>
183. Podleśny-Drabiniok, A., Marcora, E., & Goate, A. M. (2020). Microglial Phagocytosis: A Disease-Associated Process Emerging from Alzheimer's Disease Genetics. *Trends in Neurosciences*, 43(12), 965–979. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.10.002>
184. Pombo Antunes, A. R., Scheyltjens, I., Lodi, F., Messiaen, J., Antoranz, A., Duerinck, J., Kancheva, D., Martens, L., De Vlaminck, K., Van Hove, H., Kjølner Hansen, S. S., Bosisio, F. M., Van der Borght, K., De Vleeschouwer, S., Sciôt, R., Bouwens, L., Verfaillie, M., Vandamme, N., Vandenbroucke, R. E., ... Movahedi, K. (2021). Single-cell profiling of myeloid cells in glioblastoma across species and disease stage reveals macrophage competition and specialization. *Nature Neuroscience*, 24(4), 595–610. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00789-y>

185. Pong, W. W., Higer, S. B., Gianino, S. M., Emmett, R. J., & Gutmann, D. H. (2013). Reduced microglial CX3CR1 expression delays neurofibromatosis-1 glioma formation. *Annals of Neurology*, 73(2), 303–308. <https://doi.org/10.1002/ana.23813>
186. Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>
187. Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), 300–312. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>
188. Prokopowicz, Z. M., Arce, F., Biedroń, R., Chiang, C. L.-L., Ciszek, M., Katz, D. R., Nowakowska, M., Zapotoczny, S., Marcinkiewicz, J., & Chain, B. M. (2010). Hypochlorous acid: A natural adjuvant that facilitates antigen processing, cross-priming, and the induction of adaptive immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(2), 824–835. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902606>
189. Prowse, N., & Hayley, S. (2021). Microglia and BDNF at the crossroads of stressor related disorders: Towards a unique trophic phenotype. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 131, 135–163. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.09.018>
190. Puré, E., & Cuff, C. A. (2001). A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 7(5), 213–221. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(01\)01963-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(01)01963-3)
191. Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F., Olson, O. C., Quick, M. L., Huse, J. T., Teijeiro, V., Setty, M., Leslie, C. S., Oei, Y., Pedraza, A., Zhang, J., Brennan, C. W., Sutton, J. C., Holland, E. C., Daniel, D., & Joyce, J. A. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine*, 19(10), 1264–1272. <https://doi.org/10.1038/nm.3337>
192. Quistgaard, E. M., Madsen, P., Grøftehauge, M. K., Nissen, P., Petersen, C. M., & Thirup, S. S. (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(1), 96–98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1543>
193. Richard, S. A. (2022). The Pivotal Immunoregulatory Functions of Microglia and Macrophages in Glioma Pathogenesis and Therapy. *Journal of Oncology*, 2022, 8903482. <https://doi.org/10.1155/2022/8903482>
194. Ries, C. H., Cannarile, M. A., Hoves, S., Benz, J., Wartha, K., Runza, V., Rey-Giraud, F., Pradel, L. P., Feuerhake, F., Klamann, I., Jones, T., Jucknischke, U., Scheiblich, S., Kaluza, K., Gorr, I. H., Walz, A., Abiraj, K., Cassier, P. A., Sica, A., ... Rüttinger, D. (2014). Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell*, 25(6), 846–859. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.016>

195. Rivas-Fuentes, S., Salgado-Aguayo, A., Arratia-Quijada, J., & Gorocica-Rosete, P. (2021). Regulation and biological functions of the CX3CL1-CX3CR1 axis and its relevance in solid cancer: A mini-review. *Journal of Cancer*, 12(2), 571–583. <https://doi.org/10.7150/jca.47022>
196. Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K. L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L. A., Cuenco, K. T., Green, R. C., ... St George-Hyslop, P. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics*, 39(2), 168–177. <https://doi.org/10.1038/ng1943>
197. Rohe, M., Synowitz, M., Glass, R., Paul, S. M., Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor reduces amyloidogenic processing through control of SORLA gene expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(49), 15472–15478. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3960-09.2009>
198. Rokita, E., & Menzel, E. J. (1997). Characteristics of CD14 shedding from human monocytes. Evidence for the competition of soluble CD14 (sCD14) with CD14 receptors for lipopolysaccharide (LPS) binding. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 105(7), 510–518. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1997.tb05048.x>
199. Rollo, E. E., Laskin, D. L., & Denhardt, D. T. (1996). Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 60(3), 397–404. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.3.397>
200. Rovelet-Lecrux, A., Feuillet, S., Miguel, L., Schramm, C., Pernet, S., Quenez, O., Ségalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Rousseau, S., Riou, G., Frébourg, T., Champion, D., Nicolas, G., & Lecourtis, M. (2021). Impaired SorLA maturation and trafficking as a new mechanism for SORL1 missense variants in Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01294-4>
201. Roy, E. R., Wang, B., Wan, Y.-W., Chiu, G., Cole, A., Yin, Z., Propson, N. E., Xu, Y., Jankowsky, J. L., Liu, Z., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Ginsberg, S. D., Butovsky, O., Zheng, H., & Cao, W. (2020). Type I interferon response drives neuroinflammation and synapse loss in Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(4), 1912–1930. <https://doi.org/10.1172/JCI133737>
202. Saavedra-López, E., Roig-Martínez, M., Cribaro, G. P., Casanova, P. V., Gallego, J. M., Pérez-Vallés, A., & Barcia, C. (2020). Phagocytic glioblastoma-associated microglia and macrophages populate invading pseudopalisades. *Brain Communications*, 2(1), fcz043. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcz043>
203. Sadzak, I., Schiff, M., Gattermeier, I., Glinitzer, R., Sauer, I., Saalmüller, A., Yang, E., Schaljo, B., & Kovarik, P. (2008). Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain.

204. Sankowski, R., Süß, P., Benkendorff, A., Böttcher, C., Fernandez-Zapata, C., Chhatbar, C., Cahueau, J., Monaco, G., Gasull, A. D., Khavaran, A., Grauvogel, J., Scheiwe, C., Shah, M. J., Heiland, D. H., Schnell, O., Markfeld-Erol, F., Kunze, M., Zeiser, R., Priller, J., & Prinz, M. (2024). Multiomic spatial landscape of innate immune cells at human central nervous system borders. *Nature Medicine*, 30(1), 186–198. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02673-1>
205. Sarret, P., Krzywkowski, P., Segal, L., Nielsen, M. S., Petersen, C. M., Mazella, J., Stroh, T., & Beaudet, A. (2003). Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 461(4), 483–505. <https://doi.org/10.1002/cne.10708>
206. Schiff, D. E., Rae, J., Martin, T. R., Davis, B. H., & Curnutte, J. T. (1997). Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood*, 90(8), 3187–3194.
207. Schmidt, V., Schulz, N., Yan, X., Schürmann, A., Kempa, S., Kern, M., Blüher, M., Poy, M. N., Olivecrona, G., & Willnow, T. E. (2016). SORLA facilitates insulin receptor signaling in adipocytes and exacerbates obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2706–2720. <https://doi.org/10.1172/JCI84708>
208. Schmidt, V., Sporbert, A., Rohe, M., Reimer, T., Rehm, A., Andersen, O. M., & Willnow, T. E. (2007). SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32956–32964. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705073200>
209. Schmidt, V., Subkhangulova, A., & Willnow, T. E. (2016). Sorting receptor SORLA: Cellular mechanisms and implications for disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(8), 1475–1483. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2410-z>
210. Schonfeld, E., Choi, J., Tran, A., Kim, L. H., & Lim, M. (2024). The landscape of immune checkpoint inhibitor clinical trials in glioblastoma: A systematic review. *Neuro-Oncology Advances*, 6(1), vdae174. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdae174>
211. Scott, C. C., Vacca, F., & Gruenberg, J. (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 31, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2014.03.034>
212. Segura-Collar, B., Hiller-Vallina, S., de Dios, O., Caamaño-Moreno, M., Mondejar-Ruescas, L., Sepulveda-Sanchez, J. M., & Gargini, R. (2023). Advanced immunotherapies for glioblastoma: Tumor neoantigen vaccines in combination with immunomodulators. *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01569-y>

213. Sharma, P., Aaroe, A., Liang, J., & Puduvalli, V. K. (2023). Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neuro-Oncology Advances*, 5(1), vdad009. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdad009>
214. Sharma, V., Dixit, D., Koul, N., Mehta, V. S., & Sen, E. (2011). Ras regulates interleukin-1 β -induced HIF-1 α transcriptional activity in glioblastoma. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 89(2), 123–136. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0683-5>
215. Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., & Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: Beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00006>
216. Silvin, A., Qian, J., & Ginhoux, F. (2023). Brain macrophage development, diversity and dysregulation in health and disease. *Cellular & Molecular Immunology*, 20(11), 1277–1289. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01053-6>
217. Simmons, D. P., Wearsch, P. A., Canaday, D. H., Meyerson, H. J., Liu, Y. C., Wang, Y., Boom, W. H., & Harding, C. V. (2012). Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(7), 3116–3126. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101313>
218. Simmons, L. J., Surles-Zeigler, M. C., Li, Y., Ford, G. D., Newman, G. D., & Ford, B. D. (2016). Regulation of inflammatory responses by neuregulin-1 in brain ischemia and microglial cells in vitro involves the NF-kappa B pathway. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 237. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0703-7>
219. Sivo, J., Politis, A. D., & Vogel, S. N. (1993). Differential effects of interferon-gamma and glucocorticoids on Fc gamma R gene expression in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 54(5), 451–457. <https://doi.org/10.1002/jlb.54.5.451>
220. Snyder, A. G., Hubbard, N. W., Messmer, M. N., Kofman, S. B., Hagan, C. E., Orozco, S. L., Chiang, K., Daniels, B. P., Baker, D., & Oberst, A. (2019). Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. *Science Immunology*, 4(36), eaaw2004. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw2004>
221. Stupack, J., Xiong, X.-P., Jiang, L.-L., Zhang, T., Zhou, L., Campos, A., Ranscht, B., Mobley, W., Pasquale, E. B., Xu, H., & Huang, T. Y. (2020). Soluble SORLA Enhances Neurite Outgrowth and Regeneration through Activation of the EGF Receptor/ERK Signaling Axis. *The Journal of Neuroscience*, 40(31), 5908–5921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0723-20.2020>
222. Sun, S., Qi, G., Chen, H., He, D., Ma, D., Bie, Y., Xu, L., Feng, B., Pang, Q., Guo, H., & Zhang, R. (2023). Ferroptosis sensitization in glioma: Exploring the regulatory mechanism of SOAT1 and its therapeutic implications. *Cell Death & Disease*, 14(11), 754. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06282-1>

223. Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: More than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
224. Swiech, L., Blazejczyk, M., Urbanska, M., Pietruszka, P., Dortland, B. R., Malik, A. R., Wulf, P. S., Hoogenraad, C. C., & Jaworski, J. (2011). CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(12), 4555–4568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6582-10.2011>
225. Szulzewsky, F., Pelz, A., Feng, X., Synowitz, M., Markovic, D., Langmann, T., Holtman, I. R., Wang, X., Eggen, B. J. L., Boddeke, H. W. G. M., Hambardzumyan, D., Wolf, S. A., & Kettenmann, H. (2015). Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. *PloS One*, 10(2), e0116644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116644>
226. Szulzewsky, F., Schwendinger, N., Güneykaya, D., Cimino, P. J., Hambardzumyan, D., Synowitz, M., Holland, E. C., & Kettenmann, H. (2018). Loss of host-derived osteopontin creates a glioblastoma-promoting microenvironment. *Neuro-Oncology*, 20(3), 355–366. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox165>
227. Tabung, F. K., Birmann, B. M., Epstein, M. M., Martínez-Maza, O., Breen, E. C., Wu, K., & Giovannucci, E. L. (2017). Influence of Dietary Patterns on Plasma Soluble CD14, a Surrogate Marker of Gut Barrier Dysfunction. *Current Developments in Nutrition*, 1(11), e001396. <https://doi.org/10.3945/cdn.117.001396>
228. Tan, W., Su, P.-Y. P., Leff, J., Gao, X., Chen, J., Guan, A. K., Kalyanasundaram, G., Ma, A., & Guan, Z. (2022). Distinct phases of adult microglia proliferation: A Myc-mediated early phase and a Tnfaip3-mediated late phase. *Cell Discovery*, 8(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00377-3>
229. Unterkircher, T., Cristofanon, S., Vellanki, S. H. K., Nonnenmacher, L., Karpel-Massler, G., Wirtz, C. R., Debatin, K.-M., & Fulda, S. (2011). Bortezomib primes glioblastoma, including glioblastoma stem cells, for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(12), 4019–4030. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0075>
230. Vaegter, C. B., Jansen, P., Fjorback, A. W., Glerup, S., Skeldal, S., Kjolby, M., Richner, M., Erdmann, B., Nyengaard, J. R., Tessarollo, L., Lewin, G. R., Willnow, T. E., Chao, M. V., & Nykjaer, A. (2011). Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nature Neuroscience*, 14(1), 54–61. <https://doi.org/10.1038/nn.2689>
231. Valadez-Cosmes, P., Raftopoulou, S., Mihalic, Z. N., Marsche, G., & Kargl, J. (2022). Myeloperoxidase: Growing importance in cancer pathogenesis and potential drug target. *Pharmacology & Therapeutics*, 236, 108052. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108052>

232. Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., De Vlaminck, K., Pombo Antunes, A. R., De Prijck, S., Vandamme, N., De Schepper, S., Van Isterdael, G., Scott, C. L., Aerts, J., Berx, G., Boeckxstaens, G. E., Vandenbroucke, R. E., Vereecke, L., Moechars, D., Williams, M., Van Ginderachter, J. A., Saeys, Y., & Movahedi, K. (2019). A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nature Neuroscience*, 22(6), 1021–1035. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0393-4>
233. Vidal-Itriago, A., Radford, R. A. W., Aramideh, J. A., Maurel, C., Scherer, N. M., Don, E. K., Lee, A., Chung, R. S., Graeber, M. B., & Morsch, M. (2022). Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in Immunology*, 13, 997786. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.997786>
234. Vladimer, G. I., Górna, M. W., & Superti-Furga, G. (2014). IFITs: Emerging Roles as Key Anti-Viral Proteins. *Frontiers in Immunology*, 5, 94. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00094>
235. von Roemeling, C. A., Wang, Y., Qie, Y., Yuan, H., Zhao, H., Liu, X., Yang, Z., Yang, M., Deng, W., Bruno, K. A., Chan, C. K., Lee, A. S., Rosenfeld, S. S., Yun, K., Johnson, A. J., Mitchell, D. A., Jiang, W., & Kim, B. Y. S. (2020). Therapeutic modulation of phagocytosis in glioblastoma can activate both innate and adaptive antitumour immunity. *Nature Communications*, 11(1), 1508. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15129-8>
236. Vyas, D., Laput, G., & Vyas, A. K. (2014). Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 7, 1015–1023. <https://doi.org/10.2147/OTT.S60114>
237. Walentynowicz, K. A., Ochocka, N., Pasierbinska, M., Wojnicki, K., Stepniak, K., Mieczkowski, J., Ciechomska, I. A., & Kaminska, B. (2018). In Search for Reliable Markers of Glioma-Induced Polarization of Microglia. *Frontiers in Immunology*, 9, 1329. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01329>
238. Wang, J., Pan, H., Lin, Z., Xiong, C., Wei, C., Li, H., Tong, F., & Dong, X. (2021). Neuroprotective Effect of Fractalkine on Radiation-induced Brain Injury Through Promoting the M2 Polarization of Microglia. *Molecular Neurobiology*, 58(3), 1074–1087. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02138-3>
239. Wang, S., Mustafa, M., Yuede, C. M., Salazar, S. V., Kong, P., Long, H., Ward, M., Siddiqui, O., Paul, R., Gilfillan, S., Ibrahim, A., Rhinn, H., Tassi, I., Rosenthal, A., Schwabe, T., & Colonna, M. (2020). Anti-human TREM2 induces microglia proliferation and reduces pathology in an Alzheimer's disease model. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(9), e20200785. <https://doi.org/10.1084/jem.20200785>
240. Wang, Z., Ding, Y., Wang, X., Lu, S., Wang, C., He, C., Wang, L., Piao, M., Chi, G., Luo, Y., & Ge, P. (2018). Pseudolaric acid B triggers ferroptosis in glioma cells via activation of Nox4 and inhibition of xCT. *Cancer Letters*, 428, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.04.021>

241. Ward, M., Carter, L. P., Huang, J. Y., Maslyar, D., Budda, B., Paul, R., & Rosenthal, A. (2024). Phase 1 study of latozinemab in progranulin-associated frontotemporal dementia. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 10(1), e12452. <https://doi.org/10.1002/trc2.12452>
242. Wei, J., Marisetty, A., Schrand, B., Gabrusiewicz, K., Hashimoto, Y., Ott, M., Grami, Z., Kong, L.-Y., Ling, X., Caruso, H., Zhou, S., Wang, Y. A., Fuller, G. N., Huse, J., Gilboa, E., Kang, N., Huang, X., Verhaak, R., Li, S., & Heimberger, A. B. (2019). Osteopontin mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration and is a potential therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(1), 137–149. <https://doi.org/10.1172/JCI121266>
243. Westergaard, U. B., Sørensen, E. S., Hermey, G., Nielsen, M. S., Nykjær, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., & Petersen, C. M. (2004). Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50221–50229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408873200>
244. Whittle, A. J., Jiang, M., Peirce, V., Relat, J., Virtue, S., Ebinuma, H., Fukamachi, I., Yamaguchi, T., Takahashi, M., Murano, T., Tatsuno, I., Takeuchi, M., Nakaseko, C., Jin, W., Jin, Z., Campbell, M., Schneider, W. J., Vidal-Puig, A., & Bujo, H. (2015). Soluble LR11/SorLA represses thermogenesis in adipose tissue and correlates with BMI in humans. *Nature Communications*, 6(1), 8951. <https://doi.org/10.1038/ncomms9951>
245. Witkos, T. M., & Lowe, M. (2017). Recognition and tethering of transport vesicles at the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology*, 47, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.003>
246. Wong, C. C. Y., Gao, L. Y., Xu, Y., Chau, M. K. M., Zhang, D., Yap, D. Y. H., Ying, S. K. Y., Lee, C. K., Yung, S., & Chan, T. M. (2024). Cluster of differentiation-44 as a novel biomarker of lupus nephritis and its role in kidney inflammation and fibrosis. *Frontiers in Immunology*, 15, 1443153. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1443153>
247. Xiang, Y., Liu, T., Yang, H., Gao, F., Xiang, H., Manyande, A., Tian, Y., & Tian, X. (2015). NRG1-ErbB signalling promotes microglia activation contributing to incision-induced mechanical allodynia. *European Journal of Pain (London, England)*, 19(5), 686–694. <https://doi.org/10.1002/ejp.590>
248. Xiong, Z., Raphael, I., Olin, M., Okada, H., Li, X., & Kohanbash, G. (2024). Glioblastoma vaccines: Past, present, and opportunities. *EBioMedicine*, 100, 104963. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104963>
249. Xuan, W., Lesniak, M. S., James, C. D., Heimberger, A. B., & Chen, P. (2021). Context-Dependent Glioblastoma-Macrophage/Microglia Symbiosis and Associated Mechanisms. *Trends in Immunology*, 42(4), 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.02.004>

250. Xue, R., Zhao, Y., & Chen, P. (2009). Involvement of PKC alpha in PMA-induced facilitation of exocytosis and vesicle fusion in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(2), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.105>
251. Yabo, Y. A., Moreno-Sanchez, P. M., Pires-Afonso, Y., Kaoma, T., Nosirov, B., Scafidi, A., Ermini, L., Lipsa, A., Oudin, A., Kyriakis, D., Grzyb, K., Poovathingal, S. K., Poli, A., Muller, A., Toth, R., Klink, B., Berchem, G., Berthold, C., Hertel, F., ... Golebiewska, A. (2024). Glioblastoma-instructed microglia transition to heterogeneous phenotypic states with phagocytic and dendritic cell-like features in patient tumors and patient-derived orthotopic xenografts. *Genome Medicine*, 16(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13073-024-01321-8>
252. Yang, F., He, Z., Duan, H., Zhang, D., Li, J., Yang, H., Dorsey, J. F., Zou, W., Nabavizadeh, S. A., Bagley, S. J., Abdullah, K., Brem, S., Zhang, L., Xu, X., Byrne, K. T., Vonderheide, R. H., Gong, Y., & Fan, Y. (2021). Synergistic immunotherapy of glioblastoma by dual targeting of IL-6 and CD40. *Nature Communications*, 12(1), 3424. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23832-3>
253. Yang, Y., Jiang, G., Zhang, P., & Fan, J. (2015). Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research*, 2, 12. <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0039-0>
254. Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Barreira da Silva, R., Reis e Sousa, C., Green, D. R., Oberst, A., & Albert, M. L. (2015). RIPK1 and NF-κB signaling in dying cells determines cross-priming of CD8⁺ T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6258), 328–334. <https://doi.org/10.1126/science.aad0395>
255. Yeini, E., Ofek, P., Pozzi, S., Albeck, N., Ben-Shushan, D., Tiram, G., Golan, S., Kleiner, R., Sheinin, R., Israeli Dangoor, S., Reich-Zeliger, S., Grossman, R., Ram, Z., Brem, H., Hyde, T. M., Magod, P., Friedmann-Morvinski, D., Madi, A., & Satchi-Fainaro, R. (2021). P-selectin axis plays a key role in microglia immunophenotype and glioblastoma progression. *Nature Communications*, 12(1), 1912. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22186-0>
256. Yim, A., Smith, C., & Brown, A. M. (2022). Osteopontin/secreted phosphoprotein-1 harnesses glial-, immune-, and neuronal cell ligand-receptor interactions to sense and regulate acute and chronic neuroinflammation. *Immunological Reviews*, 311(1), 224–233. <https://doi.org/10.1111/imr.13081>
257. Young, J. E., Boulanger-Weill, J., Williams, D. A., Woodruff, G., Buen, F., Revilla, A. C., Herrera, C., Israel, M. A., Yuan, S. H., Edland, S. D., & Goldstein, L. S. B. (2015). Elucidating Molecular Phenotypes Caused by the SORL1 Alzheimer's Disease Genetic Risk Factor Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell stem cell*, 16(4), 373–385. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.004>
258. Zhang, L., Alizadeh, D., Van Handel, M., Kortylewski, M., Yu, H., & Badie, B. (2009). Stat3 inhibition activates tumor macrophages and abrogates glioma growth in mice. *Glia*, 57(13), 1458–1467. <https://doi.org/10.1002/glia.20863>

259. Zhang, X., Zeng, L., Yu, T., Xu, Y., Pu, S., Du, D., & Jiang, W. (2014). Positive feedback loop of autocrine BDNF from microglia causes prolonged microglia activation. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 34(3), 715–723. <https://doi.org/10.1159/000363036>
260. Zhou, Z., Hamming, O. J., Ank, N., Paludan, S. R., Nielsen, A. L., & Hartmann, R. (2007). Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *Journal of Virology*, 81(14), 7749–7758. <https://doi.org/10.1128/JVI.02438-06>
261. Zhu, P., Li, S.-Y., Ding, J., Fei, Z., Sun, S.-N., Zheng, Z.-H., Wei, D., Jiang, J., Miao, J.-L., Li, S.-Z., Luo, X., Zhang, K., Wang, B., Zhang, K., Pu, S., Wang, Q.-T., Zhang, X.-Y., Wen, G.-L., Liu, J. O., ... He, Y.-W. (2023). Combination immunotherapy of glioblastoma with dendritic cell cancer vaccines, anti-PD-1 and poly I:C. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(6), 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.04.012>
262. Zhu, Y., Bujo, H., Yamazaki, H., Ohwaki, K., Jiang, M., Hirayama, S., Kanaki, T., Shibasaki, M., Takahashi, K., Schneider, W. J., & Saito, Y. (2004). LR11, an LDL receptor gene family member, is a novel regulator of smooth muscle cell migration. *Circulation Research*, 94(6), 752–758. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000120862.79154.0F>
263. Zujovic, V., Benavides, J., Vigé, X., Carter, C., & Taupin, V. (2000). Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia*, 29(4), 305–315.
264. Zusso, M., Methot, L., Lo, R., Greenhalgh, A. D., David, S., & Stifani, S. (2012). Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(33), 11285–11298. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6182-11.2012>

VIII. PUBLIKACJE DOKTORANTKI

1. **Kaminska P**, Ovesen PL, Jakiel M, Obrebski T, Schmidt V, Draminski M, Biliska AG, Bieniek M, Anink J, Paterczyk B, Jensen AMG, Piątek S, Andersen OM, Aronica E, Willnow TE, Kaminska B, Dabrowski MJ, & Malik AR. (2024). SorLA restricts TNF α release from microglia to shape a glioma-supportive brain microenvironment. *EMBO Reports*, 25(5), 2278–2305.
2. **Kaminska P**, Tempes A, Scholz E, & Malik AR. (2024). Cytokines on the way to secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 79, 52–65.
3. **Kaminska P**, Cyranowski S, Pilanc P, & Malik AR. (2024). Syngeneic Mouse Model of Glioblastoma: Intracranial Implantation of GL261 Cells. *Methods in Molecular Biology* (135–146). Clifton, N.J. Springer Nature.
4. **Kamińska P**, Piątek S, Bieniek M, & Malik A. (2023). Wszystko na swoim miejscu – rola receptorów VPS10P w komórkowej segregacji białek. *Postępy Biochemii*, 69(1), 26–41.
5. Zaręba-Kozioł M, Bartkowiak-Kaczmarek A, Roszkowska M, Bijata K, Figiel I, Halder AK, **Kamińska P**, Müller FE, Basu S, Zhang W, Ponimaskin E, & Włodarczyk J. (2021). S-Palmitoylation of Synaptic Proteins as a Novel Mechanism Underlying Sex-Dependent Differences in Neuronal Plasticity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6253.