



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

“Delineation of the role of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of severe asthma”

Μαρκάτος Χρήστος,

Λάρισα 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΞΑΝΘΟΥ-ΤΣΙΓΚΟΓΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ, PhD, ερευνήτρια Γ' στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του ΙΙΒΕΑΑ.**
- **ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**
- **ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Άσθμα.....	8
Ορισμός του άσθματος	8
Περιγραφή του άσθματος.....	8
Φαινότυποι του άσθματος.....	8
Σοβαρό άσθμα.....	9
Φλεγμονή και προσαρμοστική ανοσία	10
Κύτταρα των αεραγωγών - Διαθρωτικές ανωμαλίες.....	10
1.2 Φλεγμονώδης δραστηριότητα	11
Φλεγμονή και Σοβαρό Άσθμα	11
Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (PRRs)	11
1.3 NOD-like receptors	12
Φλεγμονόσωμα	12
Κασπάση-1.....	13
Πυρόπτωση	13
1.4 Φλεγμονόσωμα NLRP3.....	14
Δομή	14
Προτεινόμενα μοριακά μοντέλα NLRP3	14
Ενεργοποίηση του NLRP3.....	15
Κανονικό μονοπάτι.....	15
Μη κανονική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος	16
Εναλλακτικό μονοπάτι	16
Ρύθμιση της φλεγμονώδους δραστηριότητας.....	17
Ο μηχανισμός πρόκλησης της φλεγμονής	17
Ασθένειες που συμμετέχει το φλεγμονόσωμα.....	18
Καπνός τσιγάρου	18
1.5 Το φλεγμονόσωμα NLRP3 στις φλεγμονώδεις ασθένειες στον πνεύμονα	19
Φλεγμονόσωμα στο άσθμα	19

Η ενεργοποίηση της IL-1β και της IL-18 στον πνεύμονα	20
Ρόλος των ASC specks στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις.....	20
Προηγούμενες μελέτες	21
Υπόθεση	21
Σκοπός	21
2.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	22
Μεθοδολογία	23
Εμπορικά Αντιδραστήρια:	24
2.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)	25
2.2 Μέτρηση κυττάρων	27
2.3 Μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων με τη μεθοδολογία MACS (θετική επιλογή).....	28
2.4 Καλλιέργεια των CD14+ μονοκυττάρων για ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονώδους σώματος.	29
2.5 Διερεύνηση της έκφρασης των NLRP3, ASC και IL-1β με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού (IMF)	30
2.6 Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκκρισης των κυτταροκινών IL1-β και IL-10 με ELISA....	31
2.7 Απομόνωση RNA	32
2.8 Μέτρηση συγκέντρωσης RNA και καθαρότητα	33
2.9 Καθαρισμός του RNA από DNA (DNases treatment).....	33
2.10 Σύνθεση του cDNA	34
2.11 quantitative RT-PCR.....	35
2.12 Στατιστική Ανάλυση	36
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1 Αυξημένη ενεργοποίηση του NLRP3 σε μονοκύτταρα ασθενών με Σοβαρό Άσθμα.....	38
3.2 Αυξημένη έκφραση των NLRP3 και IL-1β μεταγράφων σε μονοκύτταρα ασθενών με Σοβαρό Άσθμα.....	40
3.3 Μειωμένη έκκριση της IL-10 σε μονοκύτταρα ασθενών με Σοβαρό Άσθμα μετά από ενεργοποίηση του NLRP3.....	41
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άσθμα αντιπροσωπεύει τη συχνότερη ανθρώπινη φλεγμονώδη νόσο των πνευμόνων. Μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως ηωσινοφιλικό, ουδετεροφιλικό ή ακυτταρικό άσθμα. Το πιο σοβαρό είναι το ουδετερόφιλο άσθμα, καθώς είναι ανθεκτικό στα στεροειδή. Το σοβαρό άσθμα (SA) αντιπροσωπεύει μια χρόνια φλεγμονώδη πνευμονική νόσο χαρακτηριζόμενη από υποτροπιάζοντα συμπτώματα αναστρέψιμης απόφραξης της ροής αέρα, από υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών και αναδιαμόρφωση αεραγωγού. Η φλεγμονή των αεραγωγών στο ουδετεροφιλικό άσθμα χαρακτηρίζεται από αυξημένη παραγωγή IL-1β και IL-18. Ένα βασικό ρόλο έχει ένα έμφυτο ανοσοποιητικό ενδοκυτταρικό πολυμερικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που ονομάζεται φλεγμονόσωμα. Το NLRP3 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3) φλεγμονόσωμα και η IL-1β σχετίζονται με άσθμα ανθεκτικό στα στεροειδή (SR). Όμως, ο ρόλος του NLRP3 και των συστατικών σηματοδότησης του στο σοβαρό άσθμα παραμένει ασαφής. Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η ενεργοποίηση του NLRP3 και των καθοδικών συστατικών σηματοδότησής του, σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με SA, σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (HC). Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών με SA και υγιών μαρτύρων (HC). Απομονώθηκαν CD14⁺ μονοκύτταρα με μαγνητικά σφαιρίδια και ενεργοποιήθηκαν με LPS και ATP. Μελετήθηκε η ενεργοποίηση και έκφραση των NLRP3, ASC και της IL-1β. Μετρήθηκαν επίσης οι κυτταροκίνες (IL-1β, IL-10, IL1-ra) στα υπερκείμενα με ELISA. Παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργοποίηση του NLRP3 (ASC specks) στα μονοκύτταρα ασθενών με SA, και αυξημένη έκφραση της IL-1β, σε σύγκριση με τους HC. Ο ανταγωνιστής της, IL1-ra, και η αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-10, ήταν σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τους HC. Η μελέτη αυτή αποκαλύπτει για πρώτη φορά υπέρμετρη ενεργοποίηση του NLRP3 στα περιφερικά μονοκύτταρα ασθενών με SA, καθιστώντας το NLRP3 ως νέο θεραπευτικό στόχο για το SA.

ABSTRACT

Asthma represents the most common human inflammatory disease of the lungs. It can be categorized as eosinophilic, neutrophilic or paucigranulocytic asthma. The most severe is the neutrophilic asthma, as it is steroid-resistant. Severe asthma (SA) represents a chronic inflammatory lung disease characterized by recurring symptoms of reversible airflow obstruction, airway hyperresponsiveness and remodeling. Neutrophilic airway inflammation, is characterized by increased IL-1 β and IL-18 production. A key role plays an innate immune intracellular multimeric protein complex, called inflammasome. The NLRP3 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3) inflammasome and IL-1 β are associated with steroid-resistant (SR) asthma. Still, the role of NLRP3 and its signaling components in severe asthma remains elusive. In the present studies, we investigated the activation of NLRP3 and its downstream effects in peripheral blood monocytes of patients with SA, compared to healthy controls (HC). We used peripheral blood samples of patients with SA and HC. We isolated CD14⁺ monocytes with magnetic spheres and activated them with LPS and ATP. The activation and expression of NLRP3, ASC and IL-1 β were investigated. Cytokines (IL-1 β , IL-10, IL1-ra) were also measured in supernatants by ELISA. The activation of NLRP3 (spec ASC) in monocytes of patients with SA was upregulated and the expression of IL-1 β was also increased, compared to HC. Its antagonist, IL1-ra, and the anti-inflammatory cytokine IL-10, were significantly lower than HC. This study reveals for the first time an excessive activation of NLRP3 in peripheral monocytes of SA patients, making NLRP3 a new therapeutic target for SA.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Άσθμα

Ορισμός του άσθματος

Το άσθμα είναι μια ετερογενής ασθένεια, που συνήθως χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών. Ορίζεται από την ύπαρξη ιστορικού αναπνευστικών συμπτωμάτων, όπως είναι ο συριγμός, η δύσπνοια, το σφίξιμο στο θώρακα και ο βήχας. Τα συμπτώματα αυτά ποικίλλουν τόσο όσον αφορά στην έντασή τους αλλά και με την πάροδο του χρόνου. Συνδυάζονται με μεταβαλλόμενο περιορισμό της ροής του αέρα κατά τη διάρκεια της εκπνοής¹.

Περιγραφή του άσθματος

Το άσθμα είναι μια κοινή, χρόνια αναπνευστική ασθένεια που επηρεάζει το 1-18% του πληθυσμού σε διάφορες χώρες. Το άσθμα χαρακτηρίζεται από μεταβλητά συμπτώματα συριγμού, δύσπνοιας, σφίξιματος στο θώρακα ή/και βήχα ταυτόχρονα με περιορισμό της ροής του αέρα στην εκπνοή. Τόσο τα συμπτώματα όσο και ο περιορισμός της ροής του αέρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικές διακυμάνσεις στο χρόνο αλλά και στην ένταση. Αυτές οι αλλαγές προκαλούνται συχνά από παράγοντες όπως η άσκηση, η έκθεση σε αλλεργιογόνους ή η ερεθιστικούς παράγοντες, η αλλαγές του καιρού ή οι ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού¹.

Τα συμπτώματα και ο περιορισμός της ροής του αέρα μπορούν να εξαλείφουν χωρίς χρήση φαρμάκου ή ως απάντηση στη φαρμακευτική αγωγή. Μερικές φορές τα συμπτώματα μπορεί να απουσιάζουν για εβδομάδες ή και μήνες. Από την άλλη πλευρά, οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν επεισοδιακές εξάρσεις της νόσου (παροξύνσεις). Το άσθμα μπορεί να γίνει ακόμη και απειλητικό για τη ζωή και να επιβαρύνει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών¹.

Το άσθμα συνδέεται συνήθως με την ύπαρξη υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών ως απάντηση σε άμεσους ή έμμεσους ερεθιστικούς παράγοντες, όπως επίσης και με χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών. Αυτά τα χαρακτηριστικά συνήθως παραμένουν, ακόμη και όταν τα συμπτώματα απουσιάζουν ή η πνευμονική λειτουργία είναι φυσιολογική, ή ακόμη και όταν εξομαλύνεται με την κατάλληλη θεραπεία.

Φαινότυποι του άσθματος

Έχουν εντοπιστεί πολλοί φαινότυποι στο άσθμα². Μερικοί από τα πιο κοινούς περιλαμβάνουν:

- *Αλλεργικό άσθμα*: αυτός είναι ο πιο εύκολα αναγνωρίσιμος φαινότυπος του άσθματος, ο οποίος αρχίζει συχνά στην παιδική ηλικία και σχετίζεται με ένα θετικό ατομικό ή/και οικογενειακό ιστορικό αλλεργικής νόσου όπως είναι το έκζεμα, η αλλεργική ρινίτιδα ή η αλλεργία σε τρόφιμα ή φάρμακα. Η εξέταση των προκλητών πτυέλου αυτών των ασθενών πριν την έναρξη της

θεραπείας συχνά αποκαλύπτει την ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών. Οι ασθενείς με αυτόν τον ασθματικό φαινότυπο συνήθως ανταποκρίνονται καλά στην θεραπεία με εισπνεόμενα κορτικοστεροειδή (ICS).

- *Μη αλλεργικό άσθμα*: Μερικοί ενήλικες έχουν άσθμα που δεν σχετίζεται με αλλεργία. Το κυτταρικό προφίλ των προκλητών πτυέλων αυτών των ασθενών μπορεί να είναι ουδετεροφιλικό, ηωσινοφιλικό ή να περιέχουν μόνο μερικά φλεγμονώδη κύτταρα (paucigranulocytic). Οι ασθενείς με μη αλλεργικό άσθμα συχνά ανταποκρίνονται λιγότερο καλά στα ICS.
- *Άσθμα με καθυστερημένη έναρξη*: Μερικοί ενήλικες, ιδιαίτερα γυναίκες, παρουσιάζουν για πρώτη φορά άσθμα στην ενήλικη ζωή. Αυτοί οι ασθενείς τείνουν να είναι μη αλλεργικοί και συχνά απαιτούν υψηλότερες δόσεις ICS ή είναι σχετικά ανθεκτικοί στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή.
- *Άσθμα με σταθερό περιορισμό της ροής του αέρα*: Ορισμένοι ασθενείς με μακροχρόνιο άσθμα αναπτύσσουν σταθερό περιορισμό της ροής του αέρα ο οποίος πιστεύεται ότι οφείλεται στην αναδιαμόρφωση του τοιχώματος των αεραγωγών (airway remodeling).
- *Άσθμα με παχυσαρκία*: Μερικοί παχύσαρκοι ασθενείς με άσθμα έχουν εμφανή αναπνευστικά συμπτώματα και ήπια ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών.

Σοβαρό άσθμα

Το άσθμα που απαιτεί θεραπεία σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Παγκόσμιας Πρωτοβουλίας για το Άσθμα (Global Initiative for Asthma, GINA) βήματος 4-5 (δηλαδή υψηλή δόση εισπνεόμενου κορτικοειδούς (Inhaled Corticosteroid, ICS) και μακράς δράσης β2 διεγέρτη (Long Acting Beta Agonist, LABA) ή λευκοτριένιου το προηγούμενο έτος ή συστηματικά κορτικοειδή (CS) για τουλάχιστον το 50% του προηγούμενου έτους για να αποφευχθεί να είναι «μη ελεγχόμενο» ή παραμένει «μη ελεγχόμενο» παρά τη θεραπεία αυτή ³.

Το μη ελεγχόμενο άσθμα ορίζεται ως το άσθμα το οποίο παρουσιάζει τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα:

- 1) Πτωχός έλεγχος των συμπτωμάτων: Δείκτης ACQ σταθερά > 1.5, ACT < 20
- 2) Συχνές σοβαρές παροξύνσεις: δύο ή περισσότερες χορηγήσεις συστηματικών κορτικοστεροειδών (>3 ημέρες η κάθε φορά) κατά το προηγούμενο έτος
- 3) Σοβαρές παροξύνσεις: τουλάχιστον μία νοσηλεία στο νοσοκομείο, παραμονή στη ΜΕΘ ή μηχανικός αερισμός κατά το προηγούμενο έτος
- 4) Περιορισμός ροής αέρα: μετά από την κατάλληλη βρογχοδιασταλτική αγωγή παραμονή του δείκτη FEV1 < 80% του προβλεπόμενου (με συνύπαρξη αποφρακτικού τύπου μείωση της ροής του εκπνεόμενου αέρα, με το λόγο FEV1 / FVC κατώτερο του φυσιολογικού ³).

Το ελεγχόμενο άσθμα που επιδεινώνεται μετά από τη μείωση των υψηλών δόσεων ICS ή των συστηματικών CS (ή επιπλέον βιολογικών).

Φλεγμονή και προσαρμοστική ανοσία

Η φλεγμονή σε σοβαρό άσθμα έχει μετρηθεί με την απαρίθμηση φλεγμονωδών κυττάρων σε πτύελα προερχόμενα από τους αεραγωγούς με εισπνοή υπερτονικού φυσιολογικού ορού, καθώς και μέσω ενδοβρογχικών βιοψιών και βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης. Αυτή η φλεγμονή έχει κατηγοριοποιηθεί σε ηωσινοφιλική, ουδετεροφιλική, και / ή ακοκκιοκυτταρική⁴. Η ταυτόχρονη παρουσία τόσο ηωσινοφίλων όσο και ουδετεροφίλων (μικτή κυτταρικότητα) έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με πιο σοβαρή ασθένεια. Ωστόσο, ο αριθμός τόσο των ηωσινοφίλων όσο και των ουδετεροφίλων στα πτύελα παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα στο σοβαρό άσθμα, με τους ασθενείς να έχουν από πολύ χαμηλά έως πολύ υψηλά επίπεδα του ενός ή και του άλλου κυτταρικού πληθυσμού, παρά τις υψηλές λαμβανόμενες δόσεις κορτικοστεροειδών.

Η ηωσινοφιλική φλεγμονή, για παράδειγμα, είναι πιθανό να έχει ένα ανοσοποιητικό πρότυπο Th2, μια αντανάκλαση της προσαρμοστικής ανοσίας, όπως αποδεικνύεται από μελέτες που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της IL-5 στο ηωσινοφιλικό οξύ άσθμα σε ενήλικες.

Οι μηχανισμοί για την ουδετεροφιλία των αεραγωγών είναι λιγότερο σαφείς. Τα ίδια τα κορτικοστεροειδή μπορούν να συμβάλλουν στην ουδετεροφιλία σε κάποιο βαθμό και ακόμη και οι παράγοντες Th1 μπορεί να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο. Η ανοσία Th17 φαίνεται να εμπλέκεται ως αιτία ουδετεροφιλίας, πρωτίστως σε μοντέλα άσθματος σε επίμυες, με ορισμένα δεδομένα που υποστηρίζουν το μηχανισμό της και στο σοβαρό άσθμα⁵.

Κύτταρα των αεραγωγών - Διαρθρωτικές ανωμαλίες

Τα κύτταρα των αεραγωγών όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες και τα κύτταρα των λείων μυών αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ως διαμορφωτές της φλεγμονής και της αναδιαμόρφωσης⁶. Οι δομικές αλλοιώσεις μπορούν να επηρεάσουν τη μηχανική των αεραγωγών, ενώ δομικά κύτταρα μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στις φλεγμονώδεις διεργασίες μέσω απελευθέρωσης κυταροκινών, χημειοκινών, αυξητικών παραγόντων και στοιχείων του εξωκυττάρου δικτύου. Πρώτον, το επιθήλιο στο σοβαρό άσθμα ανευρίσκεται παχύτερο από ότι στο ήπιο έως μέτριο άσθμα, με αυξημένη απόπτωση και αυξημένη απελευθέρωση προφλεγμονωδών παραγόντων. Δεύτερον, μελέτες βιοψιών έχουν συνδέσει την αυξημένη ποσότητα του λείου μυϊκού ιστού των αεραγωγών με τη σοβαρότητα του άσθματος, την απόφραξη της ροής του αέρα και την βρογχική υπεραντιδραστικότητα. Τέλος, τα ινοκύτταρα, τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυοϊνοβλάστες, αυξάνονται στο αίμα και στους λείους μυες σε ασθματικούς με σταθερή απόφραξη των αεραγωγών και / ή σοβαρό άσθμα.

1.2 Φλεγμονώδης δραστηριότητα

Φλεγμονή και Σοβαρό Ασθμα

Η φλεγμονή, η διαδικασία που αποσκοπεί στην αποκατάσταση της ομοιόστασης μετά από προσβολή, μπορεί να είναι πιο επιζήμια από την ίδια την προσβολή, αν είναι ανεξέλεγκτη, υπερβολική ή παρατεταμένη⁷. Η χρόνια φλεγμονή, η οποία εμπλέκεται σε μια σειρά χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών, μπορεί να οδηγήσει στην παθογένεση χρόνιων αναπνευστικών ασθενειών όπως το σοβαρό άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια⁸ (εικόνα 1). Η παθογένεια του SA σχετίζεται με υπέρμετρη φλεγμονή που προκαλείται από διήθηση και ενεργοποίηση Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων (Helper cells) τύπου Th1, Th2 και Th17, και από συσσώρευση ηωσινόφιλων και ουδετερόφιλων στους αεραγωγούς⁹.

Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (PRRs)

Η απόκριση του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος δρα ως πρώτη γραμμή άμυνας κατά την έκθεση σε δυνητικά επιβλαβή ερεθίσματα. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα έχει αναπτύξει πολυάριθμους ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς υποδοχείς που αναλαμβάνουν επιτήρηση για πιθανώς επιβλαβή σωματίδια⁸. Η φλεγμονή είναι μια προσαρμοστική απόκριση σε βλαβερά ερεθίσματα. Η έμφυτη ανοσία περιλαμβάνει ένα σύστημα κωδικοποιημένων με βλαστική σειρά υποδοχέων οι οποίοι επιθεωρούν τα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά διαμερίσματα για σημεία λοίμωξης και αναγνωρίζουν εξαιρετικά διατηρημένα μικροβιακά μοτίβα ή "σχετιζόμενα με παθογόνο μοριακά μοτίβα" (PAMPs). Αυτοί οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (PRRs) εκφράζονται από τα κύτταρα στην πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή έναντι μόλυνσης, όπως μακροφάγα, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα⁷. Αυτοί οι υποδοχείς εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, στην ενδοσωμική μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα¹⁰. Όλα τα κύτταρα που εκφράζουν PRRs ταυτοποιούν αμέσως τα μικρόβια που εκφράζουν PAMP ως πιθανή απειλή⁷. Οι μεμβρανικοί υποδοχείς (TLRs) και οι λεκτίνες τύπου C είναι οι PRR που ανιχνεύουν το εξωκυτταρικό περιβάλλον και τα ενδοσωματικά διαμερίσματα για PAMPs, ενώ το κυτοσόλιο σαρώνεται συνεχώς με ενδοκυτταρικούς αισθητήρες νουκλεϊνικού οξέος, όπως η διεγερόμενη από ιντερφερόνη πρωτεΐνη (AIM2) και επαγώγιμες από ρετινοϊκό οξύ γονιδιακές ελικάσες. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων προκαλεί προ-φλεγμονώδη παραγωγή κυτοκινών και τύπου I ιντερφερόνο-εξαρτώμενες αντι-ικικές αποκρίσεις μέσω του παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ¹¹.

1.3 NOD-like receptors

Οι υποδοχείς τύπου νουκλεοτιδικού ολιγομερισμού (NOD), NLRs, είναι ένας ιδιαίτερος τύπος ενδοκυτταρικού PRR που αναγνωρίζει τα PAMPs και τα προερχόμενα από τον ξενιστή σήματα που ονομάζονται DAMPs (μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με τον κίνδυνο)⁷. Οι NLRs αποτελούνται από μία διατηρημένη κεντρική περιοχή, η οποία μεσολαβεί στη νουκλεοτιδική σύνδεση και στον ολιγομερισμό (NACHT), μια COOH-τελική περιοχή πλούσια σε λευκίνη (LRR), η οποία αισθάνεται NLR αγωνιστές και έχει αυτο-ανασταλτική επίδραση κατά την απουσία τους¹², και μια NH₂-τελική περιοχή, η οποία απαιτείται για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η ανθρώπινη οικογένεια των NLR γονιδίων αποτελείται από 22 μέλη, τα οποία, ανάλογα με τις NH₂-τερματικές περιοχές τους, ταξινομούνται σε 4 υποοικογένειες: NLRA, NLRB, NLRC και NLRP. Η NLRA περιέχει μία όξινη περιοχή διενεργοποίησης, η NLRB μία περιοχή αναστολής βακουλοϊού, η NLRC μία περιοχή πρόσληψης κασπάσης (CARD) και η NLRP μια περιοχή πυρίνης (PYD). Η ενεργοποίηση ορισμένων NLRs (NLRP1, NLRP3 και NLRC4) οδηγεί στη συναρμολόγηση του φλεγμονοσώματος, μιας πλατφόρμας υψηλού μοριακού βάρους, για την ενεργοποίηση της κασπάσης-1, η οποία απαιτείται για πρωτεολυτική ωρίμανση και απελευθέρωση των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-1β και IL-18^{7,13}.

Φλεγμονόσωμα

Τα φλεγμονοσώματα έχουν ταυτοποιηθεί πρόσφατα ως κρίσιμοι και ισχυροί επαγωγείς της φλεγμονής. Τα φλεγμονοσώματα είναι συμπλέγματα πολυπρωτεϊνών που σηματοδοτούν και ελέγχουν την ωρίμανση και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυταροκινών ως απάντηση σε πολυάριθμα ενδογενή, εξωγενή ή από παθογόνα σήματα κινδύνου. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί πέντε κύρια φλεγμονοσώματα: τα NLRP1, NLRC4, RIG-I, AIM2 και NLRP3⁸. Οι υποδοχείς τύπου NOD και οι υποδοχείς τύπου AIM2 μπορούν να σχηματίσουν ένα φλεγμονόσωμα. Ως αποτέλεσμα της αξιοσημείωτης ικανότητας αναγνώρισης των μικροβιακών μοτίβων και της φυσιολογικής εκτροπής, το φλεγμονόσωμα είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία του ξενιστή από τις μολυσματικές ασθένειες και την ανάπτυξη του καρκίνου. Αντίθετα, η ακατάλληλη αναγνώριση των ενδογενών ενεργοποιητών από τους υποδοχείς φλεγμονοσώματος προκαλεί φλεγμονή, μια επιζήμια διαδικασία που συχνά οδηγεί σε αυτοφλεγμονώδεις, μεταβολικές και άλλες χρόνιες διαταραχές. Ενώ τα γενετικά μοντέλα των ποντικών έχουν αποκαλύψει τις μηχανιστικές λεπτομέρειες που στηρίζουν τις δραστηριότητες που προκαλούν φλεγμονή, οι γενετικές μελέτες στον ανθρώπινο πληθυσμό αποκαλύπτουν μεταλλάξεις σε φλεγμονώδη συστατικά που σχετίζονται με ολέθριες συνέπειες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης συχνά αυτοάνοσων μολυσματικών

καταστάσεων και καρκίνου¹⁰. Η ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων οδηγεί στη διάσπαση της προ-IL-1β και απελευθέρωση της προ-φλεγμονώδους κυταροκίνης, IL-1β, η οποία πυροδοτεί προ-φλεγμονώδεις αντιδράσεις οξείας φάσης. Η ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων πυροδοτεί και άλλες μηχανισμούς (IL-18, πυρόπτωση)⁸.

Κασπάση-1

Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες που συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις ή αποπτωτικές οδούς. Η κασπάση-1 είναι η περισσότερο χαρακτηρισμένη και συντίθεται ως ανενεργό ζυμογόνο. Κατά την διέγερσή του, το NLRP3 προσλαμβάνει το ASC και την προκασπάση-1 για τον σχηματισμό του φλεγμονοσώματος. Η προκασπάση-1 διασπάται σε θραύσμα p10 και p35. Η p35 μεταποιείται στη συνέχεια στην υπομονάδα p20 και στην επικράτεια CARD. Δύο μόρια του p20 ετεροδιμερίζονται με δύο μόρια του p10 για να σχηματίσουν το ώριμο και δραστικό/ενεργό ένζυμο. Στη συνέχεια, η ενεργή κασπάση-1 διασπά τα πρόδρομα δύο ισχυρών προφλεγμονωδών κυτοκινών, των IL-1β και IL-18, στο κυτταρόπλασμα. Με αυτό τον τρόπο οι IL-1β και IL-18 απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Ο μηχανισμός τους δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα⁷.

Αν και η ενεργοποίηση της κασπάσης-1 μπορεί να παρατηρηθεί απουσία PAMPs, τα προκύπτοντα επίπεδα ενεργού IL-1β είναι ελάχιστα. Συνεπώς, η μέγιστη παραγωγή ώριμης IL-1β απαιτεί τουλάχιστον δύο διακριτά σήματα, PAMP και DAMP¹⁴.

Πυρόπτωση

Μία σημαντική συνέπεια της ενεργοποίησης των φλεγμονοσωμάτων στα μυελοειδή κύτταρα είναι η πυρόπτωση. Έχει προταθεί ότι η πυρόπτωση των μολυσμένων μακροφάγων απομακρύνει την ενδοκυτταρική θέση για τα ενδοκυτταρικά βακτήρια, τα οποία στη συνέχεια προσλαμβάνονται και θανατώνονται από τα ουδετερόφιλα¹⁰. Η πυρόπτωση μοιράζεται χαρακτηριστικά με άλλους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, δεδομένου ότι είναι προφλεγμονώδης προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, αλλά διακρίνεται από απόπτωση λόγω κυτταρικής λυτικής βλάβης. Έτσι, μοιράζεται κυτταρικά χαρακτηριστικά κοινά τόσο με την απόπτωση όσο και με τη νέκρωση. Η πυρόπτωση φαίνεται επίσης να παίζει ρόλο ως απάντηση στις τοξίνες και τη μόλυνση¹⁵.

1.4 Φλεγμονόσωμα NLRP3

Το NLRP3 είναι το καλύτερα χαρακτηρισμένο φλεγμονόσωμα. Είναι ένα ενδοκυτταρικό σύμπλεγμα πρωτεϊνών που ελέγχει την αυτοενεργοποίηση της κασπάσης-1. Κατά την ενεργοποίηση, η κασπάση-1 διασπά τις αδρανείς προ-μορφές της IL-1 β και της IL-18 σε βιοενεργές κυτοκίνες που ενεργοποιούν καθοδικά φλεγμονώδεις οδούς στον αεραγωγό¹⁶. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-1 προκαλεί επίσης θάνατο των λυτικών κυττάρων μέσω πυρόπτωσης, ενός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που δεν έχει ερευνηθεί επαρκώς στο πλαίσιο του άσθματος. Το NLRP3 εκφράζεται σε κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, T κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιείται από σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (PAMPs), όπως το LPS, το βακτηριακό και το ιικό RNA και τα σχετιζόμενα με το κίνδυνο μοριακά πρότυπα (DAMPs) που περιλαμβάνουν ROS, ATP και κρυστάλλους ουρικού μονονατρίου (MSU)¹⁷. Το NLRP3 εκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων του ανοσοποιητικού και κυττάρων του πνεύμονα και πολλοί προσδέτες του επάγονται στους φλεγμονώδεις αεραγωγούς. Έτσι, γίνεται φανερό ότι η ανώμαλη/παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση του NLRP3 μπορεί να διαδραματίσει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του SA.

Δομή

Το NLRP3 φλεγμονόσωμα αποτελείται από τον προαναφερθέντα υποδοχέα NLRP3, την πρωτεΐνη προσαρμογής ASC (Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain) και την κασπάση-1. Το ASC, επίσης γνωστό ως Pycard, είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής που συνδέει το NLRP3 με την κασπάση-1⁷. Η ενεργοποίηση του NLRP3 οδηγεί σε αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ των πεδίων PYD του NLRP3 και ASC. Στη συνέχεια, ο τομέας CARD του ASC συνδέεται με την CARD της κασπάσης-1, η οποία ολοκληρώνει τη συναρμολόγηση του NLRP3 (εικόνα 2). Αυτό συσχετίζεται με τον ολιγομερισμό του ASC σε ένα ενδοκυτταρικό μακρομοριακό συσσωμάτωμα που είναι γνωστό ως ASC speck¹⁷. Σε νεκρά μονοκύτταρα και μακροφάγα, η ASC απομονώνεται στον πυρήνα. Οι φλεγμονώδεις διεγέρτες προκαλούν ανακατανομή ASC στο κυτοσόλιο (9), όπου αλληλεπιδρά με το NLRP3 μέσω της περιοχής PYD και με την κασπάση-1 μέσω της περιοχής CARD (σχήμα 1)⁷.

Προτεινόμενα μοριακά μοντέλα NLRP3

Έχουν προταθεί τέσσερα πιθανά μοριακά μοντέλα για τον σχηματισμό του συμπλέγματος του φλεγμονοσώματος NLRP3: α) οδοντωτό τροχό (spoked wheel), β) διακλαδούμενο δέντρο (branching tree), γ) στρωματωμένη κηλίδα (layered speck), δ) σάντουιτς (sandwich) . α) Παραδοσιακά, το NLRP3 φλεγμονόσωμα έχει “μοντελοποιηθεί” μετά το αποπτώσωμα και θεωρείται ότι αποτελείται από

περιφερειακές ακτίνες NLRP3 που αλληλεπιδρούν έμμεσα με κασπάση-1 στον κεντρικό κόμβο μέσω του προσαρμογέα ASC. β) Το φλεγμονόσωμα μοιάζει με ένα δέντρο, με ρίζα τον επταμερικό πυρήνα NLRP3, με κορμό ινώδη ASC και κλαδιά την κασπάση-1 που προσλαμβάνεται στο σύμπλοκο πολυμερίζεται πλευρικά. γ) Η κηλίδα ASC είναι ένα φλεγμονόσωμα στο οποίο τα μόρια του NLRP3 περιέχονται μέσα σε ένα συσσωμάτωμα ASC και η κασπάση-1 και η IL-1β περιορίζονται στον πυρήνα του συμπλόκου. δ) Το φλεγμονόσωμα σχηματίζεται από την ένωση τύπου σάντουιτς της NLRP3 που συνδέεται με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και με το ASC στο εξωτερικό¹⁷.

Ενεργοποίηση του NLRP3

Το φλεγμονόσωμα NLRP3 μπορεί να ενεργοποιηθεί με πολλαπλά ερεθίσματα: ολόκληρα παθογόνα (βακτηρίδια, ιούς και μύκητες), PAMPs, DAMPs (εξωκυτταρικό ATP και κρυστάλλους ουρικού μονοατρίου) και περιβαλλοντικά ερεθίσματα (silica, asbestos και ακτινοβολία UVB)⁷.

Υπάρχουν 3 γνωστά, διαφορετικά μονοπάτια ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3. Το κανονικό μονοπάτι, το μη-κανονικό μονοπάτι και το εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης.

Κανονικό μονοπάτι

Δύο σήματα απαιτούνται για την ενεργοποίηση: ένα "σήμα εκκίνησης", το οποίο επάγει τη μεταγραφή της προ-IL-1β και προ-IL-18 και την έκφραση του NLRP3 μετά από διέγερση TLR και ένα "δεύτερο σήμα", το οποίο ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός που ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη συναρμολόγηση παραμένει ασαφής. Ένα από τα προτεινόμενα μοντέλα ενεργοποίησης είναι ο σχηματισμός πόρων από το κανάλι της πανεξίνης-1 που εξαρτάται από τον πουρινεργικό υποδοχέα r2X7 σε απόκριση σε εξωκυτταρικό ATP και εκροή K, η οποία επιτρέπει εξωκυτταρικά PAMPs και / ή DAMPs να έχουν πρόσβαση στο κυτοσόλιο και να ενεργοποιήσουν άμεσα το NLRP3⁷. Ένα άλλο μοντέλο είναι η λυσοσωμική ρήξη. Μετά την κατακρήμνιση σωματιδιακών ή κρυσταλλικών αγωνιστών, όπως το silica και ο asbestos, το φαγόσωμα αποσταθεροποιείται και απελευθερώνει τα συστατικά του στο κυτταρόπλασμα, τα οποία ανιχνεύονται από το NLRP3 και προκαλείται η ενεργοποίησή του²⁰. Τέλος, η παραγωγή αντιδραστικών ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) φαίνεται να είναι ένα κρίσιμο γεγονός για τη συναρμολόγηση του φλεγμονοσώματος¹⁹. Οι ROS ανιχνεύονται από τη θειορεδοξίνη και το σύμπλοκο πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με θειορεδοξίνη (TXNIP), προκαλώντας διάσπαση του συμπλόκου και επακόλουθη δέσμευση του TXNIP στο NLRP3. Αυτό οδηγεί στην πρόσληψη του ASC και της προκασπάσης-1 από το NLRP3 και στη συναρμολόγηση του φλεγμονοσώματος¹⁸ (εικόνα 3).

Μη κανονική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος

Ένας εναλλακτικός τρόπος ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3, γνωστός επίσης ως «μη κανονική» ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3, είναι μια οδός που καθορίζεται από την απαίτησή του για κασπάση-11¹⁰. Έχει πρόσφατα ανακαλυφθεί ένας μηχανισμός παρακολούθησης/επιτήρησης για Gram-αρνητικές βακτηριακές λοιμώξεις που έχει βάση το φλεγμονόσωμα. Αυτό το μη κανονικό μονοπάτι βασίζεται στην ανίχνευση του κυτοσολίου για παρουσία λιποπολυσακχαρίτη (LPS) από Gram-αρνητικά βακτήρια (όπως *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* και *Burkholderia thailandensis*) μέσω φλεγμονωδών κασπασών όπως η κασπάση-4, -5 και -11. Στο μη-κανονικό μονοπάτι, η κασπάση-11 δρα ως υποδοχέας LPS που αποκτά πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιείται²². Κατά την αναγνώριση του LPS, η κασπάση-11 υφίσταται ενεργοποίηση με αποτέλεσμα τον πυροπτικό κυτταρικό θάνατο. Η ενεργή κασπάση-11 διευκολύνει επίσης την ενεργοποίηση του NLRP3 που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και στην έκκριση της IL-1β και της IL-18. Οι άνθρωποι στερούνται του γονιδίου caspase-11 αλλά έχουν τα γονίδια caspase-4 και caspase-5, τα οποία θεωρούνται ως ομόλογα γονιδίου προγονικής κασπάσης-11. Όπως η κασπάση-11, τόσο η κασπάση-4 και η κασπάση-5 είναι ικανές να δεσμεύονται με LPS και να υφίστανται ενεργοποίηση. Είναι πιθανό ότι η κασπάση-4 και η κασπάση-5 συνεργάζονται κατά τη διάρκεια μολύνσεων για να ενεργοποιήσουν το μη κανονικό φλεγμονώδες. Για να ενεργοποιηθεί η κασπάση-11 πρέπει το LPS να εισέλθει στο κυττασόλιο. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια εκκρίνουν κυστίδια εξωτερικής μεμβράνης (OMVs), και χρησιμοποιούνται από βακτήρια για να μεταφέρουν τα περιεχόμενα τους σε κύτταρα ξενιστές. Τα OMVs λειτουργούν ως όχημα για την παροχή LPS στο κυττασόλιο του ξενιστή²¹. Η ενεργή κασπάση-11 διασπά την gasdermin D, το οποίο εκτελεί τον θάνατο των λυτικών κυττάρων. Η κασπάση-4 και η κασπάση-5 μπορούν επίσης να διασπασούν την gasdermin D για να ξεκινήσουν πυρόπτωση στους ανθρώπους²³. Η κασπάση-1 διασπά επίσης την gasdermin D μετά από την κανονική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Η ενεργοποίηση της κασπάσης-11 από Gram-αρνητικά βακτηριακά έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 μέσω της πτώσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων K⁺ και που οδηγεί σε πρωτεολυτική ενεργοποίηση της κασπάσης-1, της IL-1β και της IL-18²¹.

Εναλλακτικό μονοπάτι

Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι το LPS ενεργοποιεί μια εναλλακτική οδό φλεγμονοσώματος μόνο σε ανθρώπινα μονοκύτταρα, αλλά όχι σε μακροφάγα και δενδριτικά. Το LPS από μόνο του προκαλεί την έκκριση της IL-1β στον άνθρωπο, αλλά όχι στα μονοκύτταρα των ποντικών. Αυτή η ειδική οδός δεν απαιτεί κασπάση-4/5, αλλά εξαρτάται από την σηματοδότηση TLR-4 TRIF-RIPK1-FADD-CASP8, καθώς και από την κανονική οδό NLRP3, ASC και κασπάσης-1. Αυτή η εναλλακτική

ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 συμβαίνει ανεξάρτητα από την εκροή καλίου (K^+) και τον σχηματισμό πυροπτοσώματος. Ένα επιπλέον μοναδικό χαρακτηριστικό αυτού του μονοπατιού είναι ότι δεν πυροδοτεί την πυρόπτωση. Αυτά τα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι ο TLR4 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση του NLRP3 στο ανθρώπινο σύστημα και τοποθετούν τον TLR4 μηχανισμό ανοδικά της ενεργοποίησης του φλεγμονώδους NLRP3 στα ανθρώπινα μονοκύτταρα²⁴.

Ρύθμιση της φλεγμονώδους δραστηριότητας

Η δραστηριότητα του φλεγμονοσώματος απαιτεί ακριβή ρύθμιση για να αποφευχθεί η υπερβολική παραγωγή κυτοκινών και οι επιβλαβείς επιδράσεις της. Η ρύθμιση λαμβάνει χώρα σε μεταγραφικά και μετα-μεταγραφικά επίπεδα. Για παράδειγμα, το NLRP3 εκφράζεται σε περιορισμένα επίπεδα στα μακροφάγα και είναι εξαιρετικά επαγωγίμο σε απόκριση σε προφλεγμονώδη ερεθίσματα όπως LPS ή ROS. Επιπλέον, το διαφορικό μάτισμα της ASC μπορεί να παράγει παραλλαγές πρωτεΐνης με ανασταλτική λειτουργία, αντί του κλασικού μορίου προσαρμογέα. Ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης είναι η υποκυτταρική θέση των φλεγμονωδών συστατικών· ένα παράδειγμα είναι η προαναφερθείσα ανακατανομή της ASC από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα σε ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα. Επίσης, ρύθμιση της φλεγμονώδους δραστηριότητας μπορεί να επιτευχθεί και με τους εκκρινόμενους παράγοντες. Για παράδειγμα, οι ιντερφερόνες τύπου I μπορεί να καταστέλλουν την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους και την επακόλουθη παραγωγή της IL-1 β , η οποία μπορεί να συμβάλει στον αυξημένο κίνδυνο δευτερογενών βακτηριακών λοιμώξεων μετά από γρίπη ή άλλες ιογενείς λοιμώξεις. Η αυτοφαγία, δηλαδή η διαδικασία με τη μεσολάβηση λυσοσωμάτων που απαιτείται για τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων σε απόκριση στο στρες, παίζει επίσης ρόλο στην ρύθμιση της φλεγμονώδους δραστηριότητας. Τα κύτταρα με έλλειψη ειδικών πρωτεϊνών της αυτοφαγίας, έχουν ενισχυμένη φλεγμονώδη ενεργοποίηση σε απόκριση ερεθισμάτων, η οποία μπορεί να εξηγηθεί από την αύξηση των κυτταρικών επιπέδων ROS που προκαλούνται από ανεπαρκή κάθαρση ελαττωματικών μιτοχονδρίων.^{7,25}

Ο μηχανισμός πρόκλησης της φλεγμονής

Η πρωτεολυτική διάσπαση της pro-IL-1 β δημιουργεί βιοενεργή IL-1 β η οποία απελευθερώνεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και ασκεί την προ-φλεγμονώδη δράση της δεσμευόμενη στο εξωκυτταρικό τομέα του υποδοχέα IL-1, τύπου 1 (IL-1R)-1. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συνδέτη-υποδοχέα έχουν ως αποτέλεσμα την συναρμολόγηση της δευτερογενούς αλυσίδας του υποδοχέα IL-1Racp. Αυτό ενεργοποιεί τη σύσταση ενός συμπλόκου υποδοχέα που ενεργοποιεί το γονίδιο πρωτογενούς απάντησης μυελοειδούς διαφορισμού (MyD) 88, τη σχετιζόμενη με IL-

1R κινάση 1 (IRAK) και τον παράγοντα που σχετίζεται με τον υποδοχέα TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκου), TRAF 6. Αυτό με τη σειρά του, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ. Έτσι επάγεται η απελευθέρωση του TNF-α και της IL-6, προάγεται η πρόσληψη και η ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, και επάγεται περαιτέρω έκφραση της προ-IL-1β. Επειδή η δραστική IL-1β εκκρίνεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον μπορεί να ασκήσει προ-φλεγμονώδη δράση μέσω τόσο των αυτοκρινών όσο και των παρακρινών μηχανισμών και, ανάλογα με τα επίπεδα κυκλοφορίας, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή συστηματική φλεγμονή⁸.

Ασθένειες που συμμετέχει το φλεγμονόσωμα

Πρόσφατες ενδείξεις αποδεικνύουν ότι η υπερβολική ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων είναι ένα χαρακτηριστικό πολυάριθμων φλεγμονωδών ασθενειών, όπως η ΧΑΠ, το ουδετεροφιλικό άσθμα, η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση, η κυστική ίνωση, το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) και οι αναπνευστικές λοιμώξεις. Οι λοιμώξεις είναι οι πιο ευρέως αναγνωρισμένοι ενεργοποιητές των φλεγμονώδων¹⁴.

Καπνός τσιγάρου

Ο καπνός του τσιγάρου όχι μόνο περιέχει επιβλαβείς χημικές ουσίες αλλά και σημαντικές ποσότητες μικροβιακών συστατικών και προκαλεί βλάβη ιστών στους αεραγωγούς, οι οποίες πιθανώς συμβάλλουν στην παθογένεση της ΧΑΠ και του ουδετερόφιλου άσθματος σε καπνιστές. Πράγματι, εφόσον τα μικροβιακά PAMPs και τα DAMPs είναι τα βασικά ερεθίσματα για τη φλεγμονώδη δραστηριότητα, η έκθεση στον καπνό τσιγάρων μπορεί να είναι επαρκής για τη δραστηριότητα και την αυξημένη παραγωγή της IL-1β. Επιπλέον, τόσο η ΧΑΠ όσο και οι σοβαρές μορφές κορτικο-ανθεκτικού ουδετερόφιλου άσθματος έχουν συσχετιστεί με ιογενείς και βακτηριακές αναπνευστικές λοιμώξεις, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια παροξυσμών της νόσου^{14,26}.

1.5 Το φλεγμονόσωμα NLRP3 στις φλεγμονώδεις ασθένειες στον πνεύμονα

Το NLRP3 είναι το φλεγμονόσωμα που εμπλέκεται περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο στις φλεγμονώδεις ασθένειες του πνεύμονα. Η ενεργοποίηση του NLRP3 συμπλέγματος είναι σημαντική για την αντιμετώπιση των αναπνευστικών λοιμώξεων, ωστόσο, η υπερβολική ενεργοποίηση μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη σοβαρών νοσημάτων.

Στον πνεύμονα, το φλεγμονόσωμα NLRP3 μπορεί να ενεργοποιηθεί με μια ποικιλία μικροβιακών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των ευκαιριακών βακτηρίων (*Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* και άλλα spp. και *Haemophilus influenzae*), των άτυπων βακτηρίων (*Chlamydia*) και ιών (συμπεριλαμβανομένων του ιού της γρίπης Α (IAV), τον ιό της φυσαλιδώδους στοματίτιδας (VSV) και τον αδενοϊό (AdV)).

Παραμένει πιθανό ότι ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η ατμοσφαιρική ρύπανση ενεργοποιεί το φλεγμονόσωμα στον πνεύμονα, είναι μέσω της οξειδωτικής ικανότητας των συστατικών που έχουν τα εισπνεόμενα σωματίδια στην ατμόσφαιρα (π.χ., μέταλλα και πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες)⁸.

Φλεγμονόσωμα στο άσθμα

Πολύ πρόσφατο έργο έχει καταδείξει ότι το άσθμα είναι μια ετερογενής ασθένεια. Ενώ μερικοί ασθενείς παρουσιάζουν έναν Th2 ηωσινοφιλικό φλεγμονώδη ενδότυπο, πρόσφατες κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μέτριες έως σοβαρές μορφές άσθματος μπορούν να συνδεθούν με αυξημένες αντιδράσεις Th1 και / ή Th17 και μη -ηωσινοφιλικούς υποτύπους της νόσου που χαρακτηρίζονται από επικρατούσα μονοκυτταρική ή ουδετεροφιλική, και όχι ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών. Γονίδια που σχετίζονται με την οδό σηματοδότησης της IL-1β (π.χ. IL1B, IRAK2, IRAK3, IL1R2) αυξήθηκαν σημαντικά στο ουδετερόφιλο άσθμα. Μία μετέπειτα μελέτη παρείχε ισχυρές ενδείξεις ότι αυτές οι αυξημένες ανταποκρίσεις της IL-1β σε ουδετερόφιλα σε σύγκριση με άλλες μορφές άσθματος μπορούν να οδηγηθούν από αυξημένη ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 και ότι οι ουδετερόφιλοι ασθματικοί είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα NLRP3, κασπάσης-1 και IL-1β στα πτύελα τους σε σχέση με τους ηωσινοφιλικούς και τους ακυτταρικούς ασθματικούς. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες NLRP3 και κασπάσης-1 εμπλουτίστηκαν σε μακροφάγα και ουδετερόφιλα στο πτύελο του ουδετεροφιλικού, αλλά όχι του ηωσινοφιλικού ή του ακυτταρικού άσθματος. Πολλοί ουδετερόφιλοι ασθματικοί, είναι αλλεργικοί / ατοπικοί¹⁴.

Η IL-1β επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων T που παράγουν IL-17 σε συνεργασία με την IL-23. Σε αντίθεση με την IL-1β, η σηματοδότηση της IL-18 επηρεάζει την παραγωγή INF-γ και παράγει διαφοροποιημένα Th1 κύτταρα σε συνδυασμό με την

IL-12 και με την IL-13. Μεταξύ των πολλαπλών υπομονάδων λεμφοκυττάρων, η IL-1β και η IL-18 σε συνδυασμό με άλλες κυταροκίνες μπορούν να ασκήσουν βιολογικά αποτελέσματα στην ενίσχυση της διαφοροποίησης κυττάρων Th17 στον πνεύμονα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ουδετεροφιλικής φλεγμονής.

Οι ασθματικοί με ουδετεροφιλία έχουν αυξημένα επίπεδα NLRP3, Casp1 και έκφρασης IL-1β στους αεραγωγούς και τις κυρίαρχες κυτταρικές πηγές των NLRP3 και Casp1 αποτελούν τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Αυτοί οι ασθματικοί έχουν επίσης αυξημένη έκφραση των TLR2 και TLR4 και αυξημένα επίπεδα LPS υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του έμφυτου ανοσοποιητικού στο άσθμα μπορεί να οδηγήσει σε παθολογική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος²⁷ (εικ. 4).

Η ενεργοποίηση της IL-1β και της IL-18 στον πνεύμονα

Σε αντίθεση με την IL-1β, η IL-18 εκφράζεται ιδιοσυστατικά σε μεσεγχυματικά κύτταρα, αλλά όταν ενεργοποιηθεί ανευρίσκεται κυρίως στα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Είναι μια πλειοτροπική κυταροκίνη που είναι ικανή να διεγείρει αποκρίσεις τύπου Th1 ή Th2 ανάλογα με το περιβάλλον των λοιπών κυταροκινών στο οποίο βρίσκεται. Στο πλαίσιο της κάθαρσης των παθογόνων, η ενεργοποίηση της IL-18, ιδιαίτερα παρουσία της IL-12, είναι απαραίτητη για την καταστροφή των παθογόνων από τα λεμφοκύτταρα και την επαγωγή αντιικής ανοσίας μέσω της επαγωγής του IFN γ . Ωστόσο, όσον αφορά τον πνεύμονα, η IL-18 έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με σοβαρές νόσους όπως το άσθμα και η ΧΑΠ⁸.

Ρόλος των ASC specks στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις

Κατά τη διάρκεια του πυροπρωτικού κυτταρικού θανάτου που ακολουθεί την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, οι κηλίδες ASC απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα και συσσωρεύονται σε εξωκυττάριους χώρους. Οι ASC διατηρούν την ικανότητα να ωριμάζουν την προ-IL-1β στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Φαγοκυτταρώνονται εύκολα από τα μακροφάγα και προάγουν την παραγωγή της IL-1β σε αυτά τα κύτταρα. Οι ASC είναι ικανές να στρατολογήσουν ουδετερόφιλα και φλεγμονώδη μονοκύτταρα όταν εγχέονται σε ποντίκια. Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι οι κηλίδες ASC έχουν τη δυνατότητα να διαιωνίσουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, μετά από την αρχική ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Μελέτες δείχνουν χαρακτηριστικά ότι η βρογχοκυψελιδική έκπλυση (BAL - bronchoalveolar lavage) που συλλέγεται από ασθενείς με ΧΑΠ αλλά και από πρότυπα ποντικών με ΧΑΠ, πειραματικά προκαλούμενη από κάπνισμα, ήταν πολύ εμπλουτισμένη με εξωκυττάρια κηλίδες ASC σε σύγκριση με BAL από υγιείς. Αυτή και αρκετές άλλες μελέτες υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και η μετέπειτα συσσώρευση κηλίδων ASC, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις διεργασίες στους πνεύμονες^{8,26}.

Προηγούμενες μελέτες

Προηγούμενες μελέτες σχετικά με το ρόλο του NLRP3 στην αλλεργική φλεγμονή των αεραγωγών έχουν δημιουργήσει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Στους ευαισθητοποιημένους ποντικούς και προκλημένους με ovalbumin (OVA), υπάρχει ενισχυμένη ενεργοποίηση της NLRP3 και της κασπάσης-1 με αυξημένη IL-1β και TNF-α από επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγού και μακροφάγα, σε σύγκριση με ποντίκια ελέγχου που υποβλήθηκαν σε αγωγή/θεραπεία με PBS. Τα ποντίκια NLRP3 -/- έχουν μειωμένη πνευμονική φλεγμονή με σημαντικά κατασταλασμένη έκκριση βλέννας, παραγωγή κυτοκίνης και αποκρίσεις IgE στους πνεύμονες που προκαλούνται από OVA. Η έκφραση των IL-13, IL-5 και IL-33, επίσης μειώθηκε σημαντικά σε IL-1β -/- και IL-1R1 -/- ποντικούς²⁸. Το NLRP3 εμπλέκεται έντονα σε ένα μοντέλο αλλεργικής φλεγμονής του αεραγωγού που προκαλείται από serum amyloid A. Αντίθετα, άλλες αναφορές έδειξαν ότι στους ποντικούς με NLRP3 -/-, Casp -/- ή PYCARD -/-, δεν επηρεάστηκαν οι αλλεργικές αποκρίσεις στις οποίες μεσολάβησαν τα Th2 κύτταρα²⁹. Αντίθετα, αυτοί οι ποντικοί είχαν μειωμένη απελευθέρωση IL-1β και IL-33 στους αεραγωγούς. Έρευνες έχουν αποκαλύψει επίσης έναν βασικό ρόλο για το NLRP3 στην οδήγηση της υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών (AHR - airway hyper reactivity) και της φλεγμονής του αεραγωγού, σε ένα μοντέλο ποντικού με άσθμα, σχετιζόμενο με την παχυσαρκία¹⁶.

Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα ανταποκρίνονται ταχέως στην ενεργοποίηση NLRP3 και έτσι μπορούν να αντιπροσωπεύσουν μία ισχυρή πηγή απελευθέρωσης IL-1β και IL-18 επαγόμενης από NLRP3 στους αλλεργικούς αεραγωγούς^{24,30}.

Υπόθεση

Η ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 και των καθοδικών συστατικών σηματοδότησής του ενισχύεται στους αεραγωγούς των ασθενών με SA και εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου.

Σκοπός

Η εργασία αυτή έχει ως στόχο να μελετήσει/διερευνήσει την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και των καθοδικών συστατικών σηματοδότησής του, στα μονοκύτταρα περιφερειακού αίματος (μονοκύτταρα από τα PBMCs) των ασθενών με σοβαρό άσθμα SA, σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (HC).

Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι: (α) υπάρχει σημαντική αύξηση της πυρόπτωσης, ενδεικτική της ενεργοποίησης του NLRP3, στους αεραγωγούς των SA ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (HC), και (β) η ex vivo ενεργοποίηση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) ασθενών με SA, προκαλεί αυξημένη διέγερση του μονοπατιού του NLRP3. Συνεπώς, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της ενεργοποίησης του μονοπατιού του NLRP3 στους αεραγωγούς των ασθενών με SA.

2.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Μεθοδολογία

- Στην μελέτη αυτή, διερευνήσαμε την ενεργοποίηση του NLRP3 σε ex vivo καλλιέργειες πρωτογενών μονοκυττάρων που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα ατόμων με SA και υγιών μαρτύρων. Η ενεργοποίηση του NLRP3 απαιτεί δύο σήματα. (i) ένα αρχικό ερέθισμα, όπως το LPS, το οποίο αυξάνει τη μεταγραφή των NLRP3 και της προ-IL-1β και (ii) ένα δεύτερο σήμα ενεργοποίησης, όπως το ATP, που επάγει τη συναρμολόγηση του NLRP3 με το ASC και την κασπάση, στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, και οδηγεί στην απελευθέρωση της IL-1β.
- Τα πρωτογενή μονοκύτταρα ελήφθησαν από το κλάσμα PBMC ασθενών με SA, χρησιμοποιώντας μικροσφαιρίδια CD14 MACS. Τα μονοκύτταρα τοποθετήθηκαν σε 5×10^5 κύτταρα / πηγαδάκι σε επικαλυμμένα με πολυ-Lornithin μ-διαφάνειες και διεγέρθηκαν με καθαρό LPS (200 ng / ml) για 3 ώρες. Μετά, προστέθηκε 5 mM ATP για 1 ώρα.
- Μετά την διέγερση, τα ανθρώπινα μονοκύτταρα σταθεροποιήθηκαν (fix) και τα δείγματα ανοσοφθορισμού (IMF stainings) παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Οι χρώσεις έγιναν με πρώτα αντισώματα αντι-NLRP3, αντι-ASC, αντι-IL-1β και δεύτερα φθορίζοντα αντισώματα έναντι των πρώτων.
- Επίσης, ύστερα από κάθε στάδιο διέγερσης, τα υπερκείμενα συλλέχτηκαν και εξετάστηκε i) η ποσότητα των IL-1β με τη μέθοδο Elisa και ii) πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA για μετέπειτα ποσοτική RT-PCR.

Εμπορικά Αντιδραστήρια:

- Εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS) (Gibco, Invitrogen)
 - Phosphate Buffered Saline (PBS), (L1825, Gibco, Invitrogen)
 - Φικόλη (Ficoll-Hypaque) (1.077 gr/ml) (SIGMA, RNBD8600)
 - RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Paisley, UK, 61870-010)
 - Bovine serum albumine (BSA) – Cat. Numb. 11930 (Serva, 100g)
 - DMEM (GIBCO, Invitrogen, 41966-029)
 - Tripan blue (SIGMA, T8154)
 - Mounting buffer (IMM-ibidi mounting medium, 50101)
 - Trizol (Applichem, Invitrogen, A1391,0100, 10296-010)
 - Triton (Applichem, A4975,0500)
 - Topro (ThermoFisher, T3605)
 - DAPI
 - Donkey Serum DS (SIGMA, D9663)
 - Tween 20 (SIGMA-ALDRICH, P1379)
 - PFA (SIGMA-ALDRICH, P6148)
 - LPS E.Coli (SIGMA-ALDRICH)
 - ATP (Jena bioscience, nu-1010-1g)
 - ASC B-3 sc-514414 (santa cruz biotechnology, inc)
 - CD14 Microbeads (human) (Mittenyi Biotec, 130-050-201)
 - Anti-IL-1 β antibody (Abcam, ab2105, rabbit)
 - Anti-NLRP3 antibody (Abcam, ab4207, goat)
 - Anti-ASC antibody (Abcam, ab19498, rabbit)
 - 2nd Ab donkey anti-goat 555 (LifeTechnologies, A21432)
 - 2nd Ab donkey anti-rabbit 555 (LifeTechnologies, A31572)
 - 2nd Ab donkey anti-rabbit 488 (LifeTechnologies, A21206)

 - **Θρεπτικό Υλικό Καλλιέργειας: DMEM, 1% P/S, 10% FBS**
 - **Διάλυμα MACS buffer (PBS, pH 7.2, 1% FCS or FBS, 2mM EDTA)**
- **Πληθυσμός μελέτης:** ορός από ασθενείς με σοβαρό άσθμα (SA) και από υγιείς μάρτυρες (HC) που δεν πάσχουν από αλλεργίες.

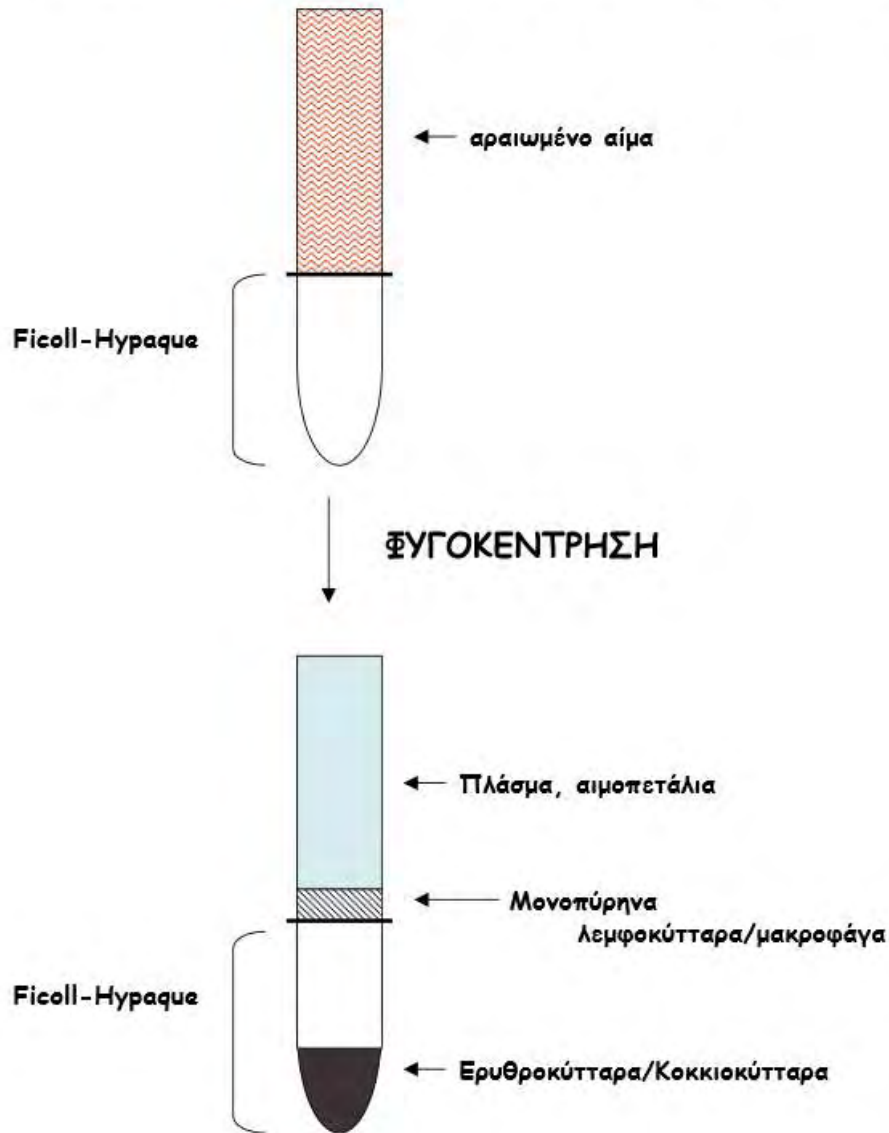
2.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

Μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος μπορούν να απομονωθούν από ολικό αίμα με φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας με τη χρήση φικόλης (Ficoll-Hydraque).

Πειραματική πορεία

- Αραίωση του αίματος με PBS σε αναλογία 1:1
- Προσθήκη φικόλης σε αναλογία 2:1 (περιφερικό αίμα/φικόλη) σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρου (ειδικό βάρος φικόλης = 1.078).
- Προσεκτικά επιστοιβάζεται το αίμα επάνω στο στρώμα της φικόλης.
- Φυγοκέντρηση σε 2000 rpm/min (400g) για 30 λεπτά με 0 brake και σε θερμοκρασία 18 °C.
- Παρατήρηση του διαχωρισμού των κυττάρων σε ζώνες. Λήψη της στοιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων (αναρρόφηση ενδιάμεσης στοιβάδας) και μεταφορά της σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρου.
- Προσθήκη ίσης ποσότητας PBS και φυγοκέντρηση σε 1250 rpm/min για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
- Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 1-2 ml Macs Buffer, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer).

Διαχωριστική φυγοκέντρηση για απομόνωση λεμφοκυττάρων

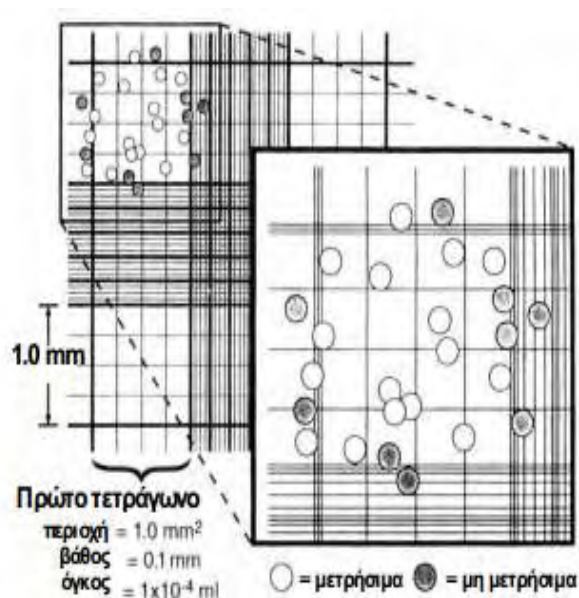


Εικόνα 5: Παρουσιάζεται σχηματικά ο διαχωρισμός των λεμφοκυττάρων με τη χρήση φικόλης.

2.2 Μέτρηση κυττάρων

Πειραματική πορεία

- Για την παρατήρηση και μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων που συλλέξαμε στο θρεπτικό μέσο, αραιώνουμε τα κύτταρα ως εξής:
10 μl αιώρημα κυττάρων, 190 ή 90μl διάλυμα Trypan blue (αραίωση 1:20 ή 1:10) (το Trypan blue χρωματίζει μπλε τα νεκρά κύτταρα)
- Τοποθετούμε 10 μl στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, στην ειδική εσοχή κάτω από την καλυπτρίδα.
- Μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται στα πολύ μικρά τετράγωνα στο κέντρο του σταυρού όπως δείχνει η **Εικόνα 13**. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στις 4 αντιδιαμετρικές περιοχές της πλάκας Neubauer.



Εικόνα 13: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Παρουσιάζεται σχηματικά και ο τρόπος υπολογισμού των κυττάρων.

Υπολογισμός συγκέντρωσης των κυττάρων: Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα ανά ml υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο

$$(\text{Αριθμός κυττάρων}/4) \times 20 \text{ (συντελεστής αραιώσεως)} \times 10^4 \text{ κύτταρα/ml}$$

$$*\text{όπου } 10^4 = 10 \text{ (όγκος τετραγώνου)} \times 10^3 \text{ (αναγωγή στο ml)}$$

Ακολουθεί αναγωγή στον όγκο του κυτταρικού διαλύματος.

2.3 Μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων με τη μεθοδολογία MACS (θετική επιλογή)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή πραγματοποιείται σε 3 βήματα:

1. *μαγνητική ταυτοποίηση:*
2. *μαγνητικός διαχωρισμός:*
3. *εξαγωγή του ταυτοποιημένου κυτταρικού κλάσματος:*

Πειραματική πορεία

Σήμανση των κυττάρων

1. Τα κύτταρα βρίσκονται σε ίζημα (pellet).
2. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων σε 80μl buffer ανά 107 κύτταρα. Προσθήκη 20 μl CD14 MicroBeads ανά 107 κύτταρα. Ανάδευση και επώαση για 15 λεπτά στους 4oC.
3. Πλύση με προσθήκη 2 ml buffer ανά 107 κύτταρα και φυγοκέντρηση στα 1250 rpm για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
4. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 500 μl όγκο Macs Buffer.

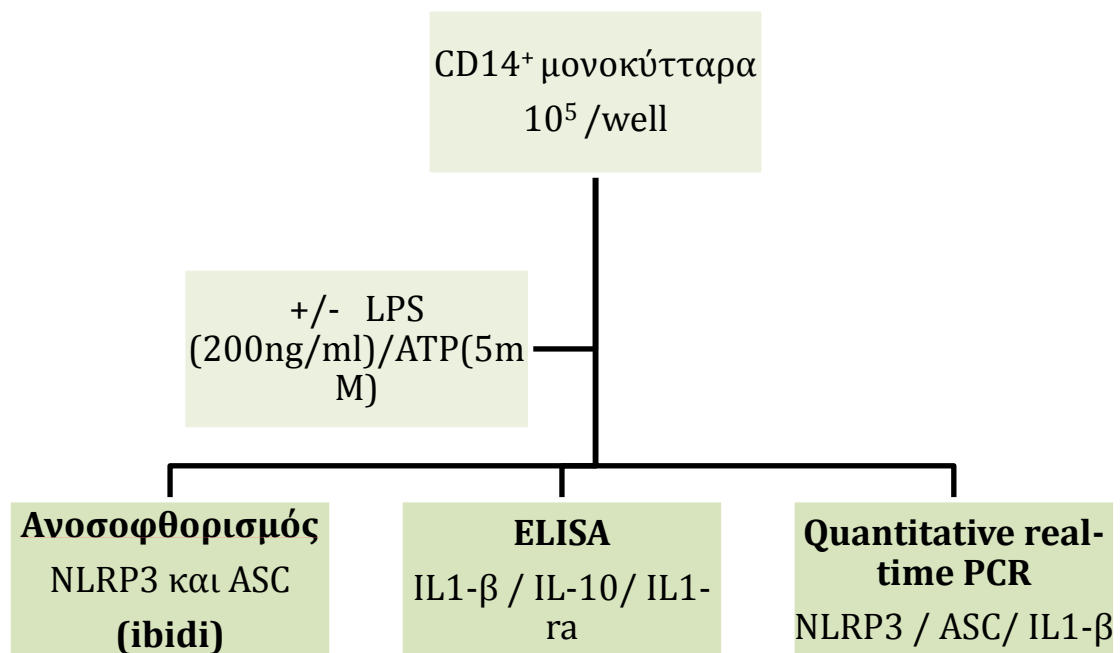
Μαγνητικός διαχωρισμός

5. Επιλογή της κατάλληλης στήλης (MS ή LS) ανάλογα με τον αριθμό των ολικών μη διαχωρισμένων κυττάρων και τοποθέτηση αυτής στο μαγνητικό πεδίο του MACS διαχωριστή.
6. Προσθήκη 500 μl buffer στη στήλη για να υγραθεί. Προσθήκη του δείγματος αφού αδειάσει η στήλη.
7. Προθήκη 500 μl buffer αφού αδειάσει η στήλη (x3).
8. Απομάκρυνση της στήλης από τον διαχωριστή και τοποθέτηση της στήλης σε νέο falcon.
9. Προσθήκη 1 ml buffer και με το έμβολο έκλουση των CD14+ μονοκυττάρων.
10. Φυγοκέντρηση και μέτρηση των CD14+ μονοκυττάρων.

2.4 Καλλιέργεια των CD14⁺ μονοκυττάρων για ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος.

Στα απομονωμένα CD14⁺ μονοκύτταρα έγινε *ex vivo* ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Η ενεργοποίηση του NLRP3 απαιτεί δύο σήματα. (i) ένα αρχικό ερέθισμα, όπως το LPS, το οποίο αυξάνει τη μεταγραφή των NLRP3 και της προ-IL-1β και (ii) ένα δεύτερο σήμα ενεργοποίησης, όπως το ATP, που επάγει τη συναρμολόγηση του NLRP3 με το ASC και την κασπάση 1, στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, και οδηγεί στην απελευθέρωση της IL-1β.

Πειραματικός Σχεδιασμός



2.5 Διερεύνηση της έκφρασης των NLRP3, ASC και IL-1β με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού (IMF)

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν σε ibidi (μ-slide 8), παρουσία ή απουσία LPS και ATP, μονιμοποιήθηκαν με PFA 4% για 10 λεπτά. Έπειτα, έγινε χρώση των κυττάρων για NLRP3 και ASC, ώστε να διερευνηθεί η έκφραση και ο συνεντοπισμός τους. Επιπλέον εξετάστηκε η έκφραση της IL-1β με τον ίδιο τρόπο.

Πειραματική Πορεία

- Επώαση με διάλυμα Blocking (10% DS, 0,5% Triton X σε PBS 1x) για 30 λεπτά.
- Επώαση των κυττάρων με πρώτο αντίσωμα (overnight).
- (τα αρνητικά controls δεν έχουν πρώτο αντίσωμα, αλλά σκέτο PBS).

Αντισώματα	Είδη	Συγκεντρώσεις
NLRP3	Goat anti-human	1:100, 2% DS, 0,1% Triton X σε PBS 1x
ASC	Mouse anti-human	1:50, 2% DS, 0,1% Triton X σε PBS 1x

Αντίσωμα	Είδος	Συγκέντρωση
IL-1β	Rabbit anti-human	1:200, 2% DS, 0,1% Triton X σε PBS 1x

- Πλύση των κυττάρων με PBS 1x για 10 λεπτά (3x).
- Επώαση των κυττάρων με δεύτερο αντίσωμα για 45 λεπτά.
(Το δεύτερο αντίσωμα είναι φωτοευαίσθητο, γι αυτό από εδώ και πέρα τα δείγματα καλύπτονται με αλουμινόχαρτο)

Αντισώματα	Συγκεντρώσεις
Anti-mouse GREEN	(1:1000) 2% DS, 0,1% Triton X σε PBS 1x
Anti-goat RED	(1:1000) 2% DS, 0,1% Triton X σε PBS 1x

Αντίσωμα	Συγκέντρωση
Anti-rabbit RED	(1:1000) 2% DS, 0,1% Triton X σε PBS 1x

- Πλύση των κυττάρων με PBS 1x για 10 λεπτά (3x).
- Επώαση των κυττάρων με Topro3/DAPI (1:1000) σε PBS 1x για 10 λεπτά.
- Πλύση των κυττάρων με PBS 1x για 10 λεπτά (3x)
- Προσθήκη 2-3 σταγόνες mounting buffer ανά πηγαδάκι.
- Παρατήρηση των κυττάρων σε Συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal microscope) και λήψη φωτογραφιών.

2.6 Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκκρισης των κυτταροκινών IL1-β και IL-10 με ELISA

- Αρχικά γίνεται η επώαση της plate με το αρχικό αντίσωμα (capture antibody) για overnight (100ml/well)
- Πλύση με wash buffer (0,05%Tween20 σε PBS) 400 ml/well (x3)
- Προσθήκη του blocking buffer (PBS, 1%BSA) 300 ml/well για 1 ώρα
- Πλύση με wash buffer (0,05%Tween20 σε PBS) 400 ml/well (x3)
- Επώαση της plate με τα δείγματα 100 ml/well για 2 ώρες και με standard σε 1% BSA σε PBS για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Οι οροί προστίθενται με αραίωση 1:3 σε PBS, 1%BSA σε duplicate ενώ τα υπερκείμενα προστίθενται σε triplicate.
- Πλύση με wash buffer (0,05%Tween20 σε PBS) 400 ml/well (x3)
- Επώαση με 100 ml/well detection antibody (διαλυμένο σε PBS, 1%BSA) για 2 ώρες
- Πλύση με wash buffer (0,05%Tween20 σε PBS) 400 ml/well (x3)
- Επώαση με 100 ml/well Streptavidin-HRP (διαλυμένη σε PBS, 1%BSA) για 20 λεπτά, υπό σκιά
- Πλύση με wash buffer (0,05%Tween20 σε PBS) 400 ml/well (x3)
- Επώαση με 100 ml/well υπόστρωμα (substrate solution H₂O₂ and Tetramethylbenzidine) για 20 λεπτά, υπό σκιά
- Προσθήκη 50 ml/well stop solution (2N H₂SO₄)
- Μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm

2.7 Απομόνωση RNA

Πειραματική πορεία

1. Φάση διαχωρισμού

- Ομογενοποίηση σε 1 ml Trizol για 10^7 κύτταρα (για μικρότερες ποσότητες κυττάρων λιγότερη ποσότητα Trizol και αναλογική χρήση των υπόλοιπων αντιδραστηρίων).
- Επώαση για 10 min σε T δωματίου . Πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.
- Προσθέτουμε 0,2 ml χλωροφορμίου και ανακινούμε για 15 sec (vortex). Το χλωροφόρμιο συμβάλλει στον αποτελεσματικό διαχωρισμό του μίγματος σε δυο διακριτές φάσεις: μιας υδατικής- υπερκείμενης φάσης και μιας οργανικής φάσης. Στην υδατική φάση περιέχεται το RNA, ενώ στην οργανική οι πρωτεΐνες, η φαινόλη και το χλωροφόρμιο. Ενδιάμεσα βρίσκεται το DNA.
- Επώαση για 5 min στους 4 οC
- Φυγοκέντρηση στις 12.300 rpm για 15 min στους 4 οC

2. Φάση κατακρήμνισης

- Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε καθαρούς σωλήνες
- Προσθήκη 500 μl Ισοπροπυλικής αλκοόλης και επώαση για 10 λεπτά στους 4 οC
- Φυγοκέντρηση στις 12.300 rpm για 15 min στους 4 οC
- Σχηματισμός ιζήματος στον πυθμένα

3. Φάση πλυσίματος RNA

- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Προσθήκη 1 ml 75% αιθανόλης (ανάδευση)
- Φυγοκέντρηση στις 9780 rpm για 5 min στους 4 οC

4. Φάση διαλυτοποίησης του RNA

- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Προσθήκη 22 μl H₂O RNase free (55 οC) και ανακίνηση

2.8 Μέτρηση συγκέντρωσης RNA και καθαρότητα

Η **απόδοση της απομόνωσης** προσδιορίζεται φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm, όπου μια μονάδα απορρόφησης (A_{260}) ισοδυναμεί με 40 μg μονόκλωνου RNA/mL ($1 A_{260}\text{unit} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$). Το RNA για να θεωρηθεί καθαρό δεν πρέπει να περιέχει προσμίξεις DNA ή πρωτεϊνών. Το καθαρό RNA έχει λόγο $A_{260}/A_{280} = 2$. Όταν ο λόγος αυτός είναι μεταξύ 1.7-2.0 τότε το RNA θεωρείται ικανοποιητικής καθαρότητας. Αν ο παραπάνω λόγος είναι πολύ διαφορετικός συνίσταται επανεκχύλιση του RNA με συνέπεια χαμηλή απόδοση στην απομόνωση.

2.9 Καθαρισμός του RNA από DNA (DNases treatment)

Πειραματική Πορεία

Αντιδραστήρια	Όγκος
RQ1	1 μl
RNases out	1 μl
RNA	8
RQ1 DNase Stop Solution	1

Το πρόγραμμα που εφαρμόζουμε αποτελείται από 2 στάδια:

1^ο : 30 min στους 37 °C (RQ1, RNases out και RNA)

2^ο : 10 min στους 65 °C (προσθέτουμε το RQ1 DNase Stop Solution)

2.10 Σύνθεση του cDNA

Πειραματική Πορεία

1. Προσθήκη των αντιδραστηρίων σε ένα sterile, nuclease-free tube στον πάγο, με τη σειρά που φαίνεται.

Template RNA	Total RNA	1ng-5 μg
Primer	Oligo(dT)	1μl
dNTP		2μl
nuclease-free water		Μέχρι τα 12.5 μl

2. Επώαση στους 65 °C για 5 λεπτά και τοποθέτηση σε πάγο.
3. Προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων με την σειρά που φαίνεται.

5x FastGene® Scriptase II buffer	4μl
RNAse Inhibitor	0,5μl
0.1 M DTT	2μl
Συνολικός όγκος	20μl

Η αντίδραση πραγματοποιείται για 2 λεπτά στους 42 °C

FastGene® Scriptase II	1 μl
------------------------	------

Η αντίδραση πραγματοποιείται για 50 λεπτά στους 42 °C και στους 70 °C για 15 λεπτά.

2.11 quantitative RT-PCR

Πειραματική Πορεία

Αντιδραστήρια	Όγκος
Syber Green mix 2x	5 μ l
F Primer (300 nM)	0.06 μ l
R Primer (300 nM)	0.06 μ l
DEPC	3.88 μ l
cDNA	1 μ l
Total	10

Primers:

NLRP3

hu_NLRP3_F 5' GAT CTT CGC TGC GAT CAA CAG 3'

hu_NLRP3_R 5' CGT GCA TTA TCT GAA CCC CAG 3'

ASC

hu_PYCARD_F 5' TGG ATG CTC TGT ACG GGA AG 3'

hu_PYCARD_R 5' CCA GGC TGG TGT GAA ACT GAA 3'

IL-1 β

h_IL1b_F 5' CAG AAG TAC CTG AGC TCG CC 3'

h_IL1b_R 5' AGA TTC GTA GCT GGA TGC CG 3'

B2M

β 2mglo-F 5' TGAGTATGCCTGCCGTGTGA 3'

β 2mglo-R 5' TGATGCTGCTTACATGTCTCGAT 3'

Επισημάνση:

Η β_2 μικροσφαιρίνη, γνωστή και ως B₂M είναι ένα μόριο του MHC τάξης I, το οποίο εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα. Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη μικροσφαιρίνης β_2 κωδικοποιείται από το B₂M γονίδιο. Στην RT-PCR χρησιμοποιούμε το γονίδιο B₂M για εσωτερικό έλεγχο.

2.12 Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας παραμετρικές και μη παραμετρικές δοκιμές ελέγχου, με χρήση του λογισμικού *Graphpad prism*.

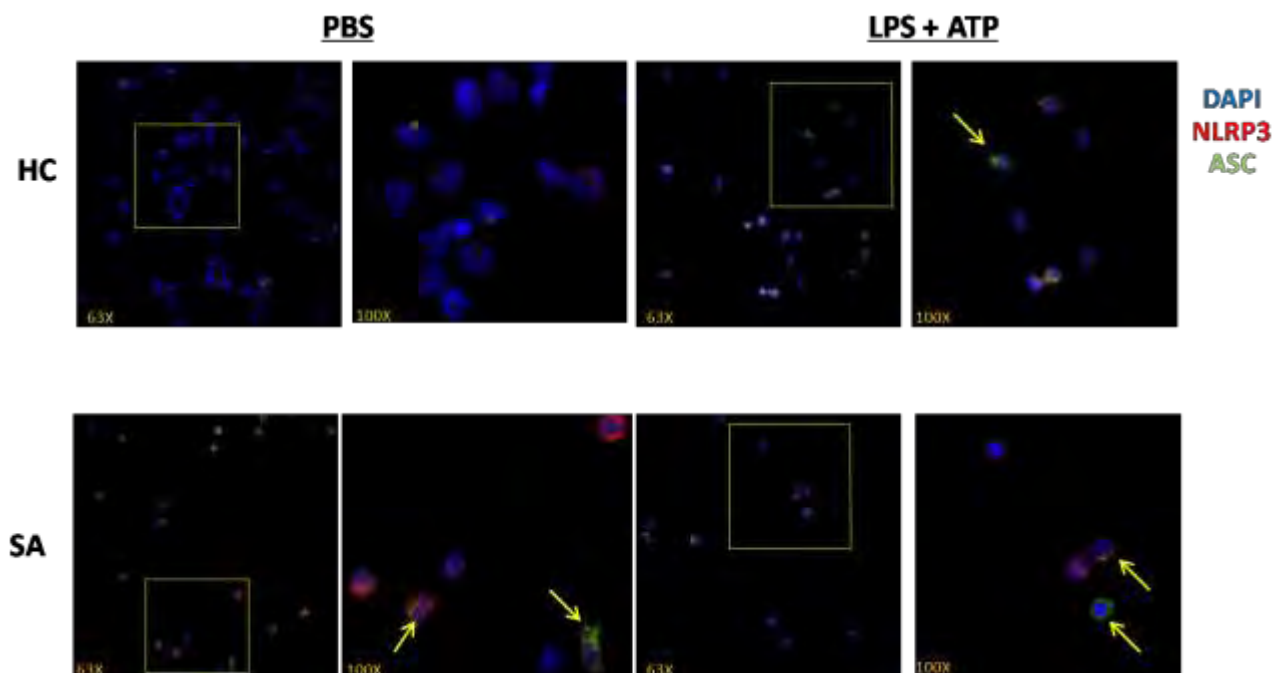
Οι φωτογραφίες ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica TCS SP5).

Η ανάλυση έγινε με την χρήση του λογισμικού *Image J*.

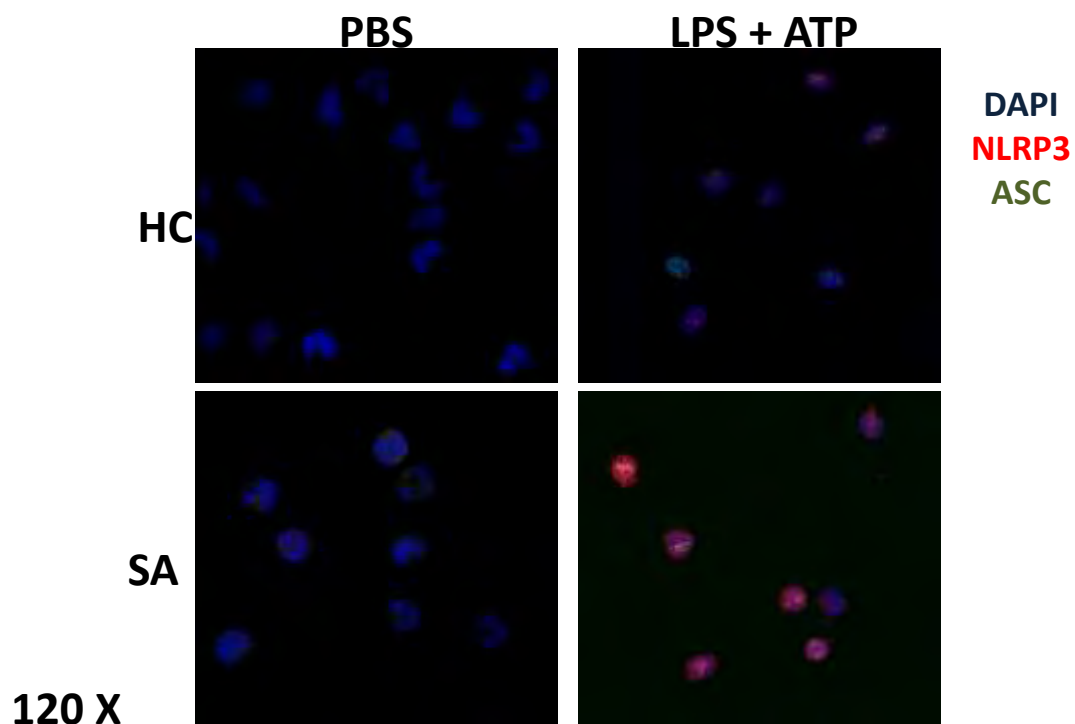
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αυξημένη ενεργοποίηση του NLRP3 σε μονοκύτταρα ασθενών με Σοβαρό Άσθμα

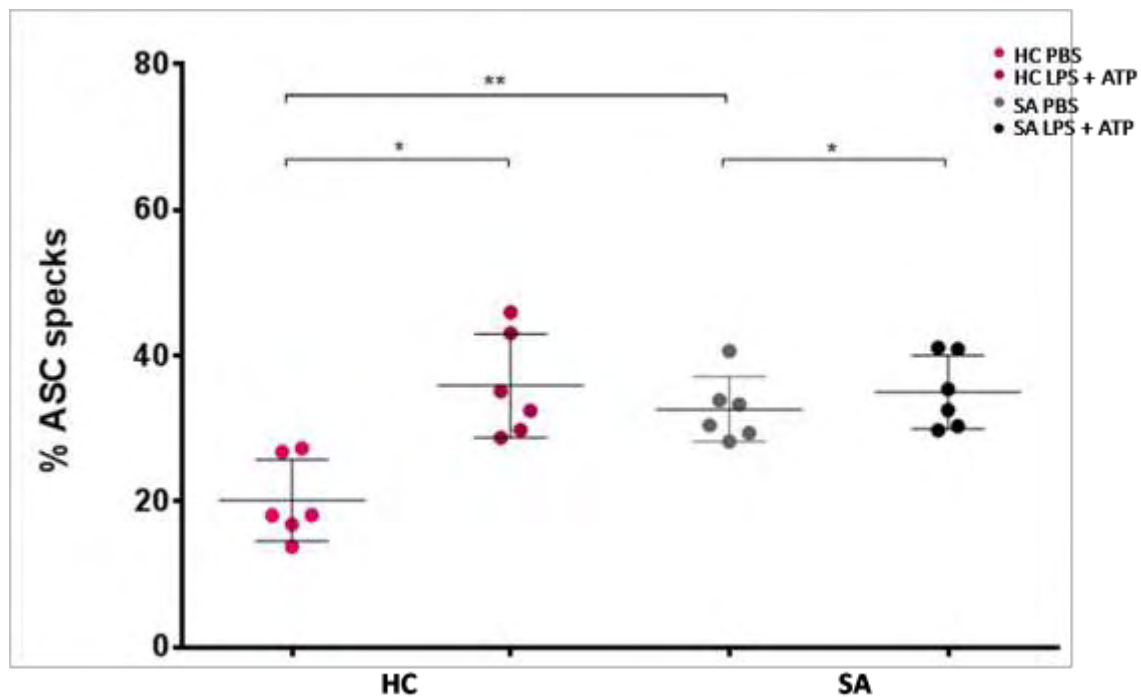
Απομονώθηκαν CD14⁺ μονοκύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με σοβαρό άσθμα (SA) και από υγιείς μάρτυρες (HC), προκειμένου να διερευνηθεί η έκφραση του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Απομονώθηκαν τα συγκεκριμένα κύτταρα, καθώς αυτά αντιπροσωπεύσουν μία ισχυρή πηγή απελευθέρωσης των κυτοκινών IL-1β και IL-18, οι οποίες επάγονται με την ενεργοποίηση του NLRP3 μετά από πρόσδεση των αντιγόνων ή αλλεργιογόνων ή DAMPs στους υποδοχείς TLRs. Τα απομονωμένα CD14⁺ μονοκύτταρα στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με LPS+ATP και μελετήθηκαν τα βασικά συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Έγινε χρώση των κυττάρων με DAPI και με αντισώματα έναντι των NLRP3 και ASC. Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του NLRP3 και των ASC specks (που είναι δείκτης ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος) στα μονοκύτταρα των ασθενών με SA σε σχέση με αυτά των HC, πριν την ενεργοποίηση των κυττάρων (επώαση με PBS). Μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των ASC specks στα κύτταρα των HC αλλά μικρότερη αύξηση στα κύτταρα των SA (Σχήμα 1, 2).



Σχήμα 1.α: Ανθρώπινα CD14⁺ μονοκύτταρα περιφερικού αίματος α) υγιών μαρτύρων(HC) και β) ατόμων με σοβαρό άσθμα (SA). Έγινε ex vivo διέγερση των μονοκυττάρων με LPS+ATP για να παρατηρηθούν οι διαφορές σε σχέση με τα control (PBS). Με DAPI (μπλε) παρατηρούμε τους πυρήνες των κυττάρων, με κόκκινο το NLRP3 και με πράσινο τα ASC specks. (X63,X100)



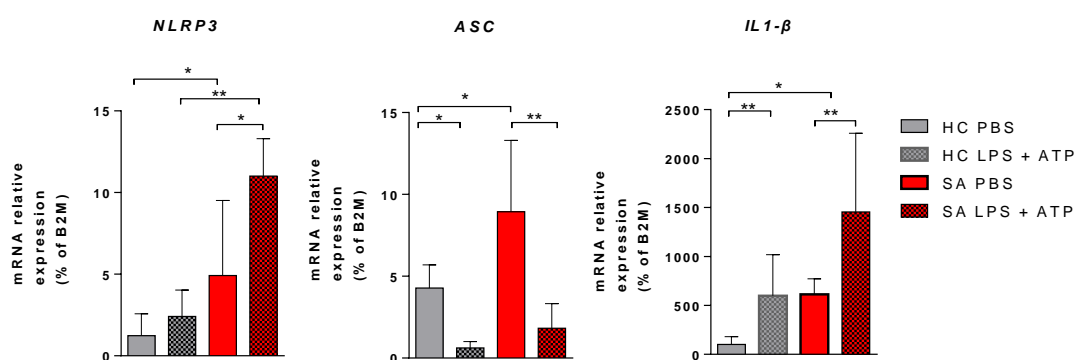
Σχήμα 1.β: Ανθρώπινα CD14⁺ μονοκύτταρα περιφερικού αίματος α) υγιών μαρτύρων(HC) και β) ατόμων με σοβαρό άσθμα (SA). Έγινε *ex vivo* διέγερση των μονοκυττάρων με LPS+ATP για να παρατηρηθούν οι διαφορές σε σχέση με τα control (PBS). Με DAPI (μπλε) παρατηρούμε τους πυρήνες των κυττάρων, με κόκκινο το NLRP3 και με πράσινο τα ASC specks. (X120)



Σχήμα 2: Ανθρώπινα CD14⁺ μονοκύτταρα περιφερικού αίματος που έχουν διεγερθεί *ex vivo*. Παρουσιάζονται τα ποσοστά των κυττάρων που σχηματίζουν ASC specks. Στατιστική ανάλυση με Mann-Whitney & Wilcoxon.

3.2 Αυξημένη έκφραση των NLRP3 και IL-1β μεταγράφων σε μονοκύτταρα ασθενών με Σοβαρό Άσθμα

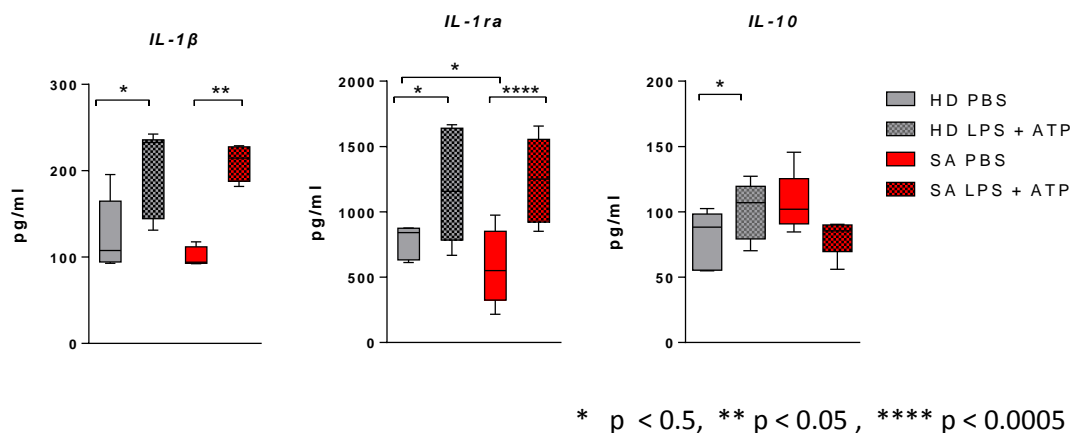
Πραγματοποιήθηκε ποσοτική RT-PCR, για τον έλεγχο της ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε επίπεδο mRNA στα CD14⁺ μονοκύτταρα. Τα γονίδια που εξετάστηκαν ήταν το NLRP3 και το ASC. Εξετάστηκε επίσης και η έκφραση της ιντερλευκίνης IL1-β, η οποία είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος. Παρατηρήθηκε ότι το mRNA του NLRP3 και της IL1-β είναι αυξημένο στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος των SA και αυξάνεται περαιτέρω μετά από ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Το mRNA του ASC εμφανίζεται αυξημένο στους SA πριν την ενεργοποίηση των κυττάρων σε σχέση με τους HC, αλλά αντίθετα με τα mRNA των NLRP3 και IL1-β, μειώνεται μετά την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων. (Σχήμα 3)



Σχήμα 3: Ανθρώπινα CD14⁺ μονοκύτταρα περιφερικού αίματος που έχουν διεγερθεί *ex vivo* με LPS+ATP. Παρουσιάζονται τα επίπεδα mRNA των NLRP3, ASC και IL-1β. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σχετικά με την β2 μικροσφαιρίνη. $n=5$ HC και $n=8$ SA. Στατιστική ανάλυση με Mann-Whitney U test analysis. * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$

3.3 Μειωμένη έκκριση της IL-10 σε μονοκύτταρα ασθενών με Σοβαρό Άσθμα μετά από ενεργοποίηση του NLRP3

Μελετήθηκε η έκκριση βασικών κυτταροκινών όπως η ιντερλευκίνη IL1-β, ο ανταγωνιστής της (IL1-ra) και η αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-10, στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών. Τα επίπεδα της κυτταροκίνης IL1-β βρέθηκαν αυξημένα μετά την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων τόσο στους ασθενείς (SA), όσο και στους υγιείς μάρτυρες (HC). Τα επίπεδα του ανταγωνιστή του υποδοχέα της εμφανίζονται μειωμένα στα CD14⁺ μονοκύτταρα των ασθενών με σοβαρό άσθμα σε σχέση με των υγιών δότες. Μετά την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, αυξάνεται ο IL-1ra και στους ασθενείς και στους υγιείς δότες. Τέλος, τα επίπεδα έκκρισης της αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνης IL-10 στα υπερκείμενα καλλιιεργειών μειώθηκαν στους ασθενείς μετά από ενεργοποίηση του NLRP3, ενώ στους υγιείς δότες αυξήθηκαν.

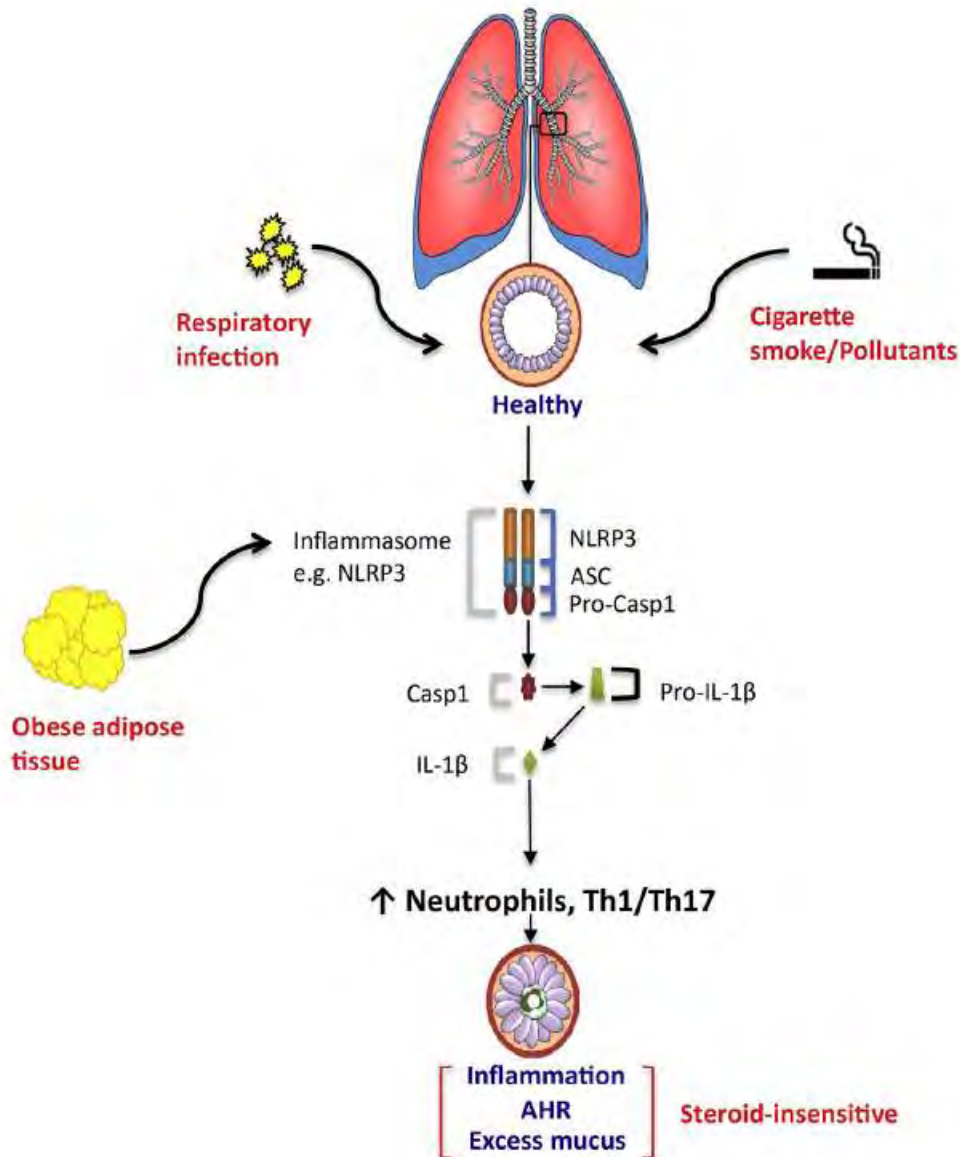


Σχήμα 4: Μέτρηση των επιπέδων έκκρισης της ιντερλευκίνης IL1-β, του ανταγωνιστή της IL-1ra και της ιντερλευκίνης IL-10. Η μέτρηση έγινε στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των ανθρώπινων CD14 μονοκυττάρων που απομονώθηκαν από ασθενείς με σοβαρό άσθμα (SA) και από υγιείς μάρτυρες (HC). Η διέγερση των κυττάρων αυτών έγινε ex vivo με χρήση LPS+ATP για να εντοπιστούν οι διαφορές σε σχέση με τα control (PBS). n=7 controls, n=5 SA patients. Στατιστική ανάλυση με paired T test. *p < 0.5, ** p < 0.05, **** p < 0.0005

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

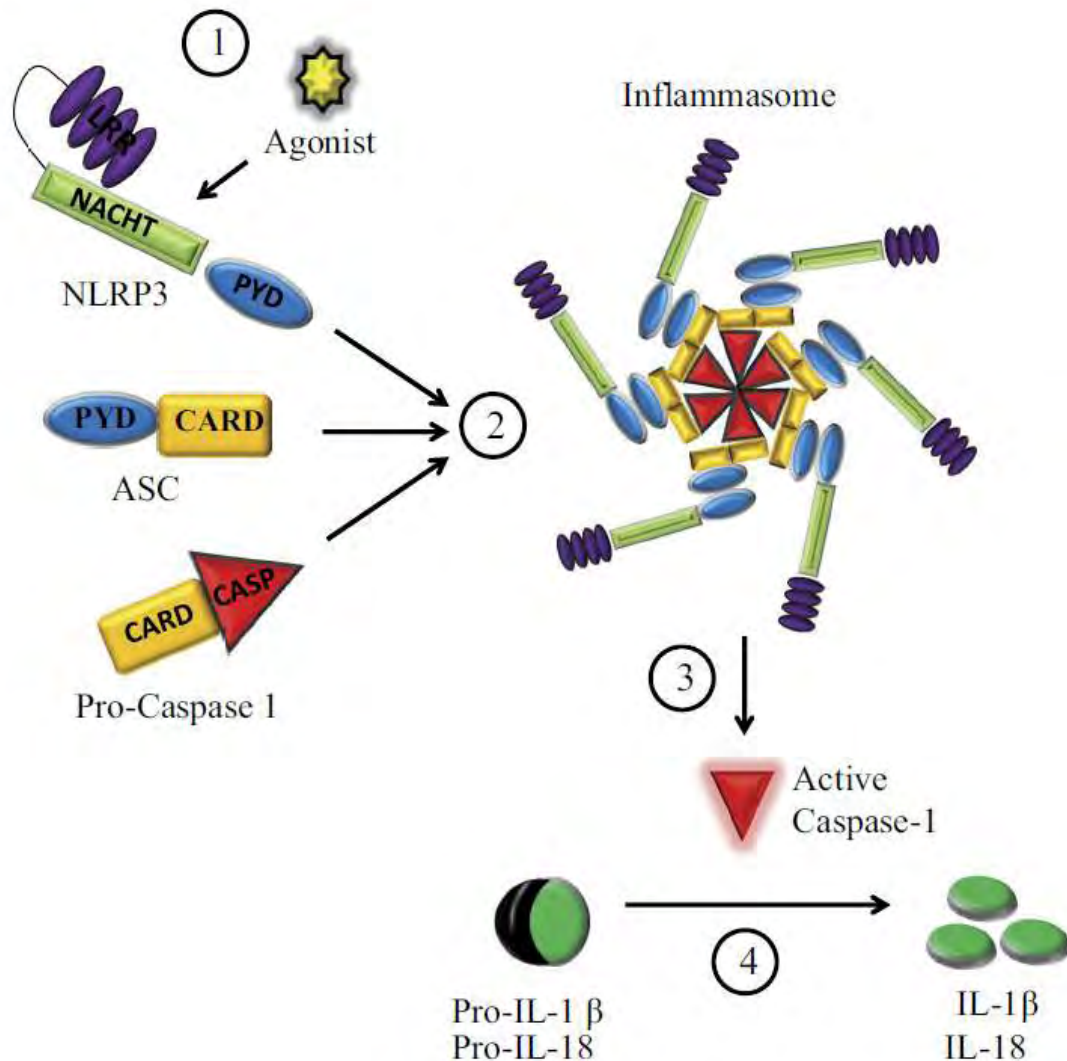
Οι αεραγωγοί των πνευμόνων είναι εκτεθειμένοι σε ένα μεγάλο εύρος από παθογόνα που μπορούν να ανιχνευτούν από διαφορετικούς PRRs. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών, οδηγεί σε ένα καταρράκτη αντιδράσεων για την προστασία των αεραγωγών. Η υπερενεργοποίηση των αμυντικών συστημάτων, μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια φλεγμονή. Το φλεγμονόσωμα NLRP3 επάγεται από παθογόνα σήματα και σήματα κινδύνου και οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-1. Η κασπάση-1 ενεργοποιεί τις IL-1β και IL-18 και οδηγεί σε πυρόπτωση του κυττάρου. Πολλές νέες έρευνες έχουν αρχίσει να μελετούν τον τρόπο και τις επιπτώσεις της ενεργοποίησης του NLRP3, αλλά επιπλέον στοιχεία είναι απαραίτητα για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου του στις ασθένειες των πνευμόνων.

Το φλεγμονόσωμα NLRP3 έχει κερδίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών το τελευταίο διάστημα λόγω της εμπλοκής του σε διάφορες ασθένειες των πνευμόνων, όπως το άσθμα. Αρκετές έρευνες έχουν ασχοληθεί με τους τρόπους ενεργοποίησης και τους μηχανισμούς δράσης του NLRP3. Τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του NLRP3 είναι η παραγωγή/ωρίμανση των κυτταροκινών IL-1β και IL-18. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ενεργοποίηση του NLRP3 και του καθοδικού παράγοντα που επάγει (IL-1β), σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με σοβαρό άσθμα και σε υγιείς μάρτυρες. Τα μονοκύτταρα είναι ο βασικός τύπος κυττάρου ενεργοποίησης του NLRP3 και σημαντική πηγή απελευθέρωσης της IL-1β. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στο ότι υπάρχει αυξημένη η ενεργοποίηση του NLRP3 και των ASC specks σε κύτταρα υγιών ατόμων μετά από διέγερσή του (προσθήκη LPS και ATP). Εδώ εξετάστηκε πρώτη φορά η ενεργοποίηση του NLRP3 σε μονοκύτταρα ασθενών με σοβαρό άσθμα. Αποδείχθηκε ότι υπάρχει αυξημένη ενεργοποίηση του NLRP3 και των ASC specks στα κύτταρα αυτά πριν την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος, σε σχέση με τα μονοκύτταρα των υγιών μαρτύρων. Επίσης αυξημένη βρέθηκε και η έκφραση της IL-1β στα μονοκύτταρα των ασθενών, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Μελετήθηκε επιπλέον και η αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-10, η οποία εμφανίστηκε σε υψηλά επίπεδα στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών ατόμων με σοβαρό άσθμα, σε σχέση με τους υγιείς. Τέλος, αποδείχτηκε ότι ο ανταγωνιστής της IL-1β, ο IL-1ra, αυξήθηκε κατά τη διέγερση των κυττάρων με LPS και ATP, τόσο στους ασθματικούς ασθενείς, όσο και στους υγιείς. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν έναν πρωταγωνιστικό ρόλο του φλεγμονοσώματος NLRP3 στα μονοκύτταρα των ασθενών με σοβαρό άσθμα και η εύρεση στρατηγικών για να μειώσουν τα επίπεδα του και/ή τα επίπεδα της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β, ίσως ανοίξουν νέους δρόμους για την καταπολέμηση του ουδετεροφιλικού άσθματος. Συνεπώς, ο ακριβής ρόλος του NLRP3 στην παθογένεια του άσθματος, μένει να εξεταστεί περαιτέρω.



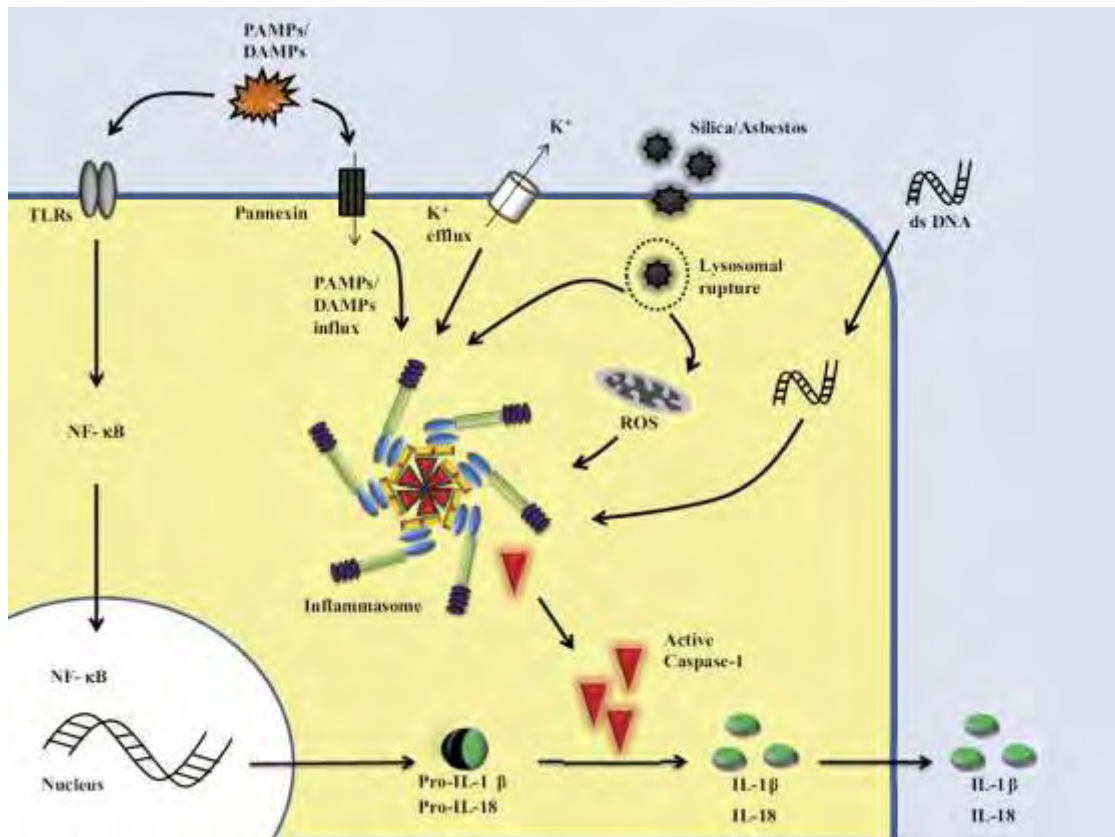
Εικόνα 1: Προτεινόμενο μοντέλο για την ενεργοποίηση των φλεγμονοσωμάτων που οδηγεί στην ανάπτυξη σοβαρού, κορτικοανθεκτικού άσθματος και δυνητικά άλλων αναπνευστικών παθήσεων. Η μόλυνση ή / και η έκθεση σε λοιμώδεις παράγοντες, αλλεργιογόνα, καπνό τσιγάρου, αέριους ρύπους ή άλλα επιβλαβή ερεθίσματα στον αεραγωγό του ασθματικού πυροδοτούν την ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 στον πνεύμονα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη ενεργοποίηση της προ-IL-1β σε δραστική IL-1β οδηγώντας σε αύξηση της Th1- και / ή Th17- απόκρισης και στην αύξηση των ουδετεροφίλων στους αεραγωγούς. Αυτό συμβάλλει στην ανάπτυξη φλεγμονής, στην υπερέκκριση βλέννας και στην υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών (AHR), τα οποία είναι ανθεκτικά στη θεραπεία με στεροειδή. Στον παχύσαρκο ασθματικό πνεύμονα, ο παχύσαρκος λιπώδης ιστός συνεισφέρει με συστηματικό τρόπο στην ενεργοποίηση του NLRP3. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συστηματικής φλεγμονής η οποία ενεργοποιεί το NLRP3 στον πνεύμονα, οδηγώντας σε κορτικοανθεκτικό άσθμα.

James W. Pinkerton^a, Richard Y. Kim, et al. *Inflammasomes in the lung*, *Molecular Immunology* 86 (2017) 44–55



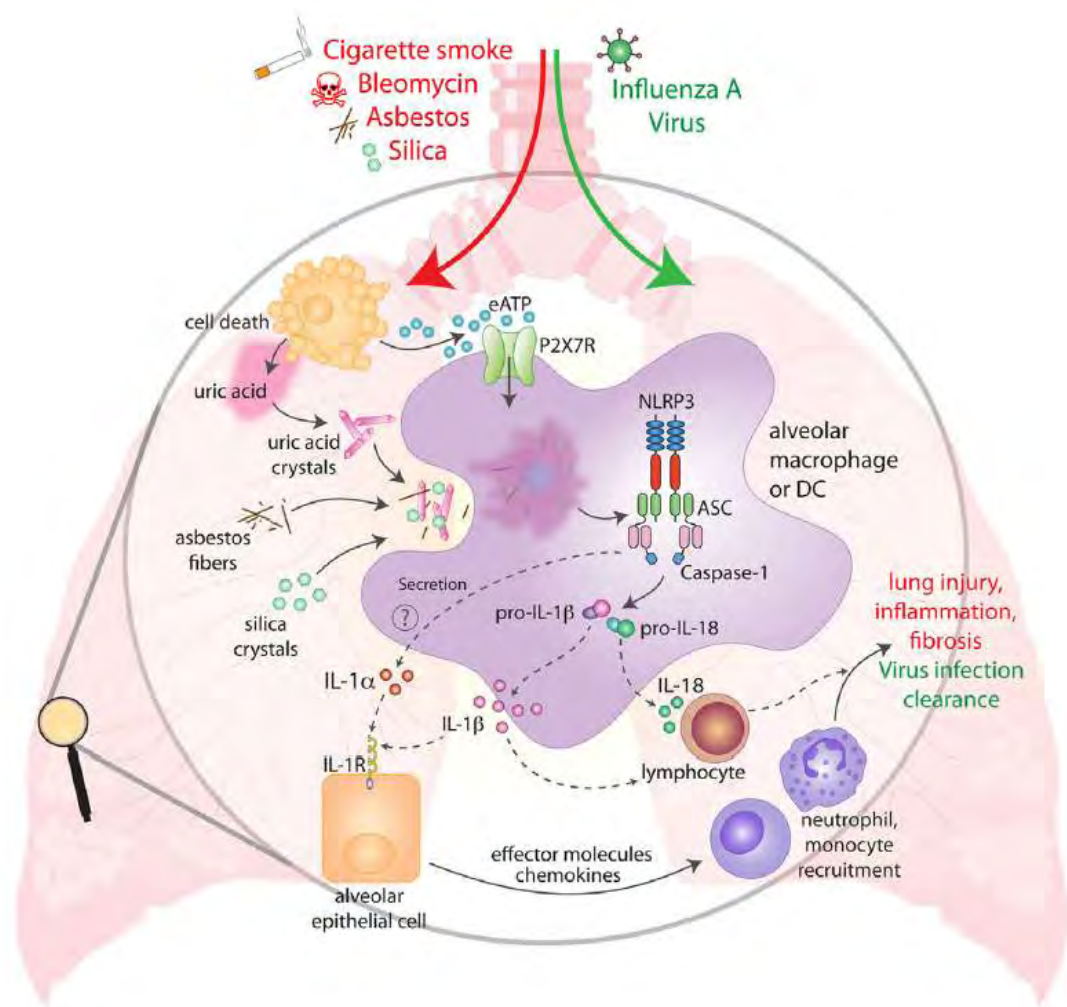
Εικόνα 2: Περιοχή νουκλεοτιδικού ολιγομερισμού (NOD)-like υποδοχέας που περιέχει μία περιοχή πυριδίνης φλεγμονοσώματος (NLRP3). Με την κατάλληλη διέγερση (1), το NLRP3 προσλαμβάνει την προκασπάση-1 μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής ASC [πρωτεΐνη που σχετίζεται με την απόπτωση που περιέχει μια περιοχή πρόσληψης κασπάσης (CARD)] για τον σχηματισμό του φλεγμονοσώματος (2). Εντός του φλεγμονοσώματος, η προκασπάση-1 υφίσταται αυτοκαταλυτική επεξεργασία, με αποτέλεσμα την ενεργή κασπάση-1 (3), η οποία με τη σειρά της διασπά τα πρόδρομα προ-IL-1β και προ-IL-18 στις ώριμες και ενεργές μορφές (4). PYD, περιοχή πυρίνης. LRR, επαναλαμβανόμενη περιοχή πλούσια σε λευκίνη.

Gimena dos Santos, Mikhail A. Kutuzov and Karen M. Ridge, The inflammasome in lung diseases, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 303: L627–L633, 2012



Εικόνα 3: Ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος. Η ωρίμανση και η έκκριση της IL-1β απαιτεί 2 σήματα: το "σήμα ενεργοποίησης" οδηγεί στη σύνθεση των προ-IL-1β, προ-IL-18, και άλλα συστατικά του φλεγμονοσώματος, όπως το NLRP3, και το δεύτερο σήμα έχει ως αποτέλεσμα τη συναρμολόγηση του φλεγμονοσώματος, την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και την απελευθέρωση των ώριμων κυτοκινών IL-1β και IL-18 στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επί του παρόντος, συζητείται η φύση του δεύτερου σήματος. Τα 3 προτεινόμενα μοντέλα ενεργοποίησης δείχνονται: 1) εξωκυτταρικό ATP, το οποίο ενεργοποιεί τον υποδοχέα της πουρινεργικής P2X7 και προκαλεί την επακόλουθη πρόσληψη της πανεξίνης-1 στη μεμβράνη πλάσματος και την εκροή K⁺ 2) λυσοσωμική ρήξη μετά από κατακρήμνιση κρυσταλλικών ή σωματιδιακών αγωνιστών και 3) αντιδραστικές ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες ρυθμίζουν προς τα πάνω την έκφραση NLRP3 και ενεργοποιούν το φλεγμονόσωμα. (PAMP: σχετιζόμενο με παθογόνο μοριακό πρότυπο. DAMP: σχετιζόμενο με τον κίνδυνο μοριακό πρότυπο. TLR: υποδοχέας τύπου Toll).

Gimena dos Santos, Mikhail A. Kutuzov and Karen M. Ridge, The inflammasome in lung diseases, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 303: L627–L633, 2012



Εικόνα 4: Το φλεγμονόσωμα NLRP3 σε φλεγμονή και τραυματισμό των πνευμόνων. Τα στοιχεία από ασθενείς με πνευμονικές παθήσεις και πειραματικά μοντέλα ζώων υποδηλώνουν ότι ένας αριθμός εισπνεόμενων ενεργοποιητών μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του NLRP3 στους πνεύμονες, συμπεριλαμβανομένου του καπνού τσιγάρου, του αμιάντου, του πυριτίου, της μπλεομυκίνης και του IAV. Οι εισπνεόμενοι πυριτικό κρύσταλλοι ή ίνες αμιάντου μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση NLRP3 απευθείας μέσω λυσοσωμικής βλάβης και παραγωγής ROS μετά από φαγοκυττάρωση από κυψελιδικά μακροφάγα. Το φλεγμονόσωμα NLRP3 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί έμμεσα στον πνεύμονα μετά την απελευθέρωση των σημάτων κινδύνου από κύτταρα που πέθαναν ή τραυματίστηκαν (π.χ. κρύσταλλοι eATP και ουρικού οξέος). Η ενεργοποίηση του φλεγμονόσωματος NLRP3 οδηγεί την παραγωγή κυτταροκινών IL-1β και IL-18 προκαλώντας την διείσδυση επιπρόσθετων ανοσοκυττάρων και λεμφοκυττάρων που υποστηρίζουν τη φλεγμονώδη αντίδραση που μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια πνευμονική βλάβη και πνευμονική ίνωση.

Dominic De Nardo, Christine M. De Nardo and Eicke Latz, New Insights into Mechanisms Controlling the NLRP3 Inflammasome and Its Role in Lung Disease, The American Journal of Pathology, Vol. 184, No. 1, January 2014

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention, 2018.
2. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012; 18:716-25.
3. Chung KF, Wenzel SE, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014; 43: 343–373.
4. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 218–224.
5. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1185–1187.
6. Cohen L, Xueping E, Tarsi J, et al. Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 138–145.
7. Gimena dos Santos, Mikhail A. Kutuzov and Karen M. Ridge, The inflammasome in lung diseases, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L627–L633, 2012.
8. James W. Pinkerton, Richard Y. Kim, et al. Inflammasomes in the lung, *Molecular Immunology* 86 (2017) 44–55.
9. Lang DM. Severe asthma: epidemiology, burden of illness, and heterogeneity. *Allergy Asthma Proc.* 2015;36(6):418-24.
10. Thirumala-Devi Kanneganti, The inflammasome: firing up innate immunity, *Immunol Rev.* 2015 May ; 265(1): 1–5.
11. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 140: 821–832, 2010.
12. Dagenais M, Skeldon A, Saleh M. The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ* 19: 5–12, 2012.
13. Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12: 199–200, 2011.
14. Kim RY, et al. Inflammasomes in COPD and neutrophilic asthma, *Thorax* 2015;70:1199–1201.
15. H. Im and A. J. Ammit, The NLRP3 inflammasome: role in airway inflammation, *Clinical & Experimental Allergy*, 2014 (44) 160–172.
16. Simpson JL. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. *Eur Respir J.* 2014; 4: 1067-76.
17. Elliott EI et al. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev.* 2015; 265(1):35-52
18. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxininteracting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 11: 136–140, 2011.

19. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221–225, 2011.
20. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9: 847–856, 2008.
21. Ashley J. Russo, et al. Emerging Insights into Noncanonical Inflammasome Recognition of Microbes, *J Mol Biol* (2018) 430, 207–216.
22. J. Shi, Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, et al., Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS, *Nature* 514 (2014) 187–192.
23. N. Kayagaki, I.B. Stowe, B.L. Lee, K. O'Rourke, K. Anderson, S. Warming, et al., Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signaling, *Nature* 526 (2015) 666–671.
24. Moritz M. Gaidt, Thomas S. Ebert, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway, Gaidt et al., 2016, *Immunity* 44, 833–846.
25. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221–225, 2011.
26. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, et al. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 2014;15:727–37.
27. Tae-Hyeong Lee¹, Hyun Ji Song¹, et al. Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma, *Asia Pac Allergy* 2014;4:187-196.
28. Besnard AG et al. NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy*. 2011; 66(8):1047-57
29. Allen IC et al. Analysis of NLRP3 in the development of allergic airway disease in mice. *J Immunol*. 2012; 6: 2884-93.
30. Viganò E et al. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nat Commun*. 2015;6:8761.
31. Dominic De Nardo, Christine M. De Nardo and Eicke Latz, New Insights into Mechanisms Controlling the NLRP3 Inflammasome and Its Role in Lung Disease, *The American Journal of Pathology*, Vol. 184, No. 1, January 2014.