



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ.Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ  
ΑΛΔΡΜΙΝΩΝ ΗΜGB1 ΚΑΙ IL-33 ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ  
ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΟΥΣ sRAGE ΚΑΙ sST2  
ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ, ΣΤΟ ΠΛΕΥΡΙΤΙΚΟ ΥΓΡΟ  
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ  
ΠΟΙΚΙΛΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ».**

**ΟΥΡΑΝΙΑ Σ. ΚΩΤΣΙΟΥ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ - ΦΥΜΑΤΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, Φεβρουάριος 2018

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- **ΖΩΗ ΔΑΝΙΗΛ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ**  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- **ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΛΟΜΕΝΙΔΗΣ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ Α ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΕΚΠΑ

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- **ΖΩΗ ΔΑΝΙΗΛ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- **ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΛΟΜΕΝΙΔΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ Α ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΕΚΠΑ,  
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ “Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ”
- **ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΓΕΡΜΕΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ**  
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- **ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-  
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**
- **ΧΡΥΣΗ ΧΑΤΖΟΓΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- **ΣΩΤΗΡΙΟΣ Γ. ΖΑΡΟΓΙΑΝΝΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**  
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Copyright © Ουρανία Σ. Κώτσιου, 2018.  
Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

ΛΑΡΙΣΑ, Φεβρουάριος 2018

*Στη μνήμη του Πατέρα μου*  
*Σωτηρίου Κώτσιου, Ειδικού Παθολόγου*

*Στην Οικογένειά μου*

*Στους καθηγητές μου,*

*Καθηγητή Πνευμονολογίας  
Κωνσταντίνο Ι. Γουργουλιάνη*

*και*

*Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας  
Σωτήριο Γ. Ζαρογιάννη*

*με σεβασμό και ευγνωμοσύνη*

**Ανακοινώσεις – Δημοσιεύσεις**  
**που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη**

**Ελληνικά Συνέδρια**

- **Ελεύθερη ανακοίνωση:** Ο ρόλος της αλαρμίνης HMGB1 και του διαλυτού υποδοχέα sRAGE σε υπεζωκοτικές συλλογές ποικίλης αιτιολογίας. **Κώτσιου Ο.,** Jagirdar R., Χατζόγλου Χ., Γουργουλιάνης Κ., Ζαρογιάννης Σ. 26<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 11/11/2017.
- **Αναρτημένη ανακοίνωση:** Μελέτη της Ιντερλευκίνης 33 (IL-33) και του διαλυτού υποδοχέα της (sST2) σε υπεζωκοτικές συλλογές. **Κώτσιου Ο.,** Jagirdar R., Χατζόγλου Χ., Γουργουλιάνης Κ., Ζαρογιάννης Σ. 24<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 27/11/2015.

**Διεθνή Συνέδρια**

- **Kotsiou O.S.,** Jagirdar R., Hatzogou C., Gourgoulisianis K.I., Zarogiannis S. The axis of HMGB1 and soluble RAGE levels in pleural effusions from various etiologies. European Respiratory Journal. 2017 50: PA4295; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA4295.
- **Kotsiou O.S.,** Jagirdar R., Hatzogou C., Gourgoulisianis K.I., Zarogiannis S. IL-33 levels in pleural fluids from various etiologies differentially alter mesothelial cell adhesion and migration. European Respiratory Journal. 2016 48: PA5078; DOI: 10.1183/13993003.congress-2016.PA5078.

**Δημοσιεύσεις**

1. IL-33/sST2 axis levels in pleural effusions and effects of clinically relevant IL-33 concentrations on human mesothelial cell adhesion and migration. **Kotsiou O. S.,** Jagirdar R. M., Papazoglou E. D., Hatzoglou C., Gourgoulisianis K. I., Zarogiannis S.G. Front. Physiol. - Membrane Physiology and Membrane Biophysics. Submitted on: 27 Nov 2017. Under review.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	11
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	15
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Αλαρμίνες ή DAMPs</b>	18
1.1 Αλαρμίνες	18
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο άξονας IL-33/ST2</b>	27
2.1 Ιντερλευκίνη (IL)-33	27
2.1.1 Χαρακτηριστικά των μελών της υπερικογένειας της IL-1.	27
2.1.2 IL-1R και TLR υποομάδες	31
2.1.3 Ιστορική αναδρομή για την IL-33	33
2.1.4 Μοριακά χαρακτηριστικά της IL-33	34
2.1.5 Κυτταρική προέλευση της IL-33	38
2.1.6 Έκφραση της IL-33 στο αναπνευστικό σύστημα	38
2.1.7 Επεξεργασία και απελευθέρωση της IL-33	39
2.2 Υποδοχέας ST2	45
2.2.1 Ιστορική αναδρομή	45
2.2.2 Μοριακά χαρακτηριστικά του ST2	45
2.2.3 Ισομορφές του ST2	49
2.2.4 Κυτταρική προέλευση του ST2	51
2.3 Ο άξονας IL-33/ST2	51
2.4 Βιολογικές λειτουργίες που συμμετέχει ο άξονας IL-33/ST2	54
2.4.1 Ο άξονας IL-33/ST2 στην έμφυτη ανοσιακή απάντηση	55
2.4.2 Ο άξονας IL-33/ST2 στην επίκτητη ανοσιακή απάντηση	57
2.4.3 Άξονας IL-33/ST2 και χρόνια φλεγμονή αεραγωγών	61
2.4.4 Άξονας IL-33/ST2 και επαναμιοντελοποίηση αεραγωγών	62
2.5 Ο ρόλος του άξονα IL-33/ST2 στην πνευμονική νόσο	64
2.6 Ο ρόλος του άξονα IL-33/ST2 στην υπεζωκοτική νόσο	69
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ο άξονας HMGB1/RAGE</b>	74
3.1 Πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας ομάδας B1 – High mobility group box 1 protein - HMGB1	74
3.1.1 Ιστορική αναδρομή	74
3.1.2 Οικογένεια HMGB	75
3.1.3 Μοριακά χαρακτηριστικά της HMGB1	75
3.1.4 Κυτταρική έκφραση της HMGB1	84
3.1.5 Επεξεργασία και απελευθέρωση της HMGB1	85
3.1.6 Οικογένεια υποδοχέων HMGB1	90
3.2 Υποδοχέας RAGE	91
3.2.1 Ιστορική αναδρομή	91
3.2.2 Μοριακά χαρακτηριστικά –Δομή του RAGE	94
3.2.3 Ισομορφές του RAGE	96
3.2.4 Κυτταρική έκφραση του RAGE	98
3.3 Ο άξονας HMGB1/RAGE	100

3.4 Βιολογικές λειτουργίες που συμμετέχει ο άξονας HMGB1/RAGE	103
3.4.1 Ο άξονας HMGB1/RAGE στην κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση	103
3.4.2 Ο ρόλος του άξονα HMGB1/RAGE στην ιστική βλάβη και αναγέννηση	105
3.5 Ο ρόλος του άξονα HMGB1/RAGE στην ιστική βλάβη και αναγέννηση	107
3.6 Ο ρόλος του άξονα HMGB1/RAGE στην υπεζωκοτική νόσο	111

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Εισαγωγή – Σκοπός της μελέτης</b>	116
4.1 Εισαγωγή	116
4.2 Σκοπός της μελέτης	116
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Υλικά και μέθοδοι</b>	118
5.1 Ασθενείς και συλλογή δειγμάτων	118
5.2 Μετρήσεις στο υπεζωκοτικό υγρό	121
5.2.1 Μετρήσεις της IL-33 και του sST2	121
5.2.2 Μετρήσεις της HMGB1 και του sRAGE	122
5.3 Συσχέτιση επιπέδων IL-33, sST2 και HMGB1, sRAGE με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος και τα χαρακτηριστικά των ΥΣ	123
5.4 <i>In vitro</i> Δοκιμασίες	123
5.4.1 Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης (Cell adhesion assay)..	124
5.4.2 Δοκιμασία επούλωσης πληγής (Wound healing assay ή scratch assay)	125
5.4.3 Αξιολόγηση σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών (Sphere formation assay)	126
5.5 <i>In vitro</i> μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων με χρήση ανασυνδυασμένης IL-33, HMGB1	127
5.5.1 <i>In vitro</i> μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων με χρήση ανασυνδυασμένης IL-33	127
5.5.2 <i>In vitro</i> μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων με χρήση ανασυνδυασμένης HMGB1	127
5.6 Στατιστική επεξεργασία	128
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα</b>	129
6.1 Επίπεδα της IL-33 και του διαλυτού υποδοχέα sST2 σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ	129
6.2 Επίπεδα της HMGB1 και του διαλυτού υποδοχέα sRAGE σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ	130
6.3 Συσχέτιση της IL-33 και του sST2 με δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος	136
6.4 Συσχέτιση της HMGB1 και του sRAGE με δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος.	136
6.5 Συσχέτιση της IL-33 και του sST2 με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ	138
6.6 Συσχέτιση της HMGB1 και του sRAGE με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ	139



6.7 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 του ΥΥ στην κυτταρική μορφολογία και κυτταρική προσκόλληση σε MeT-5A κυτταρική σειρά	141
6.8 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 του ΥΥ στην κυτταρική μορφολογία και κυτταρική προσκόλληση σε MeT-5A Κυτταρική σειρά	143
6.9 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 στη μετανάστευση των MeT-5A κυττάρων	144
6.10 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 στη μετανάστευση των MeT-5A κυττάρων	147
6.11 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών MeT-5A κυττάρων	149
6.12 <i>In vitro</i> επιδράσεις της ανασυνδυασμένης IL-33 στην προσκόλληση και μετανάστευση των MeT-5A κυττάρων	150
6.13 <i>In vitro</i> επιδράσεις της ανασυνδυασμένης HMGB1 στην πρόσκόλληση, μετανάστευση και στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών των MeT-5A κυττάρων	152
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συζήτηση</b>	154
7.1 Κύρια συμπεράσματα	154
7.2 Επίπεδα της IL-33 και του διαλυτού υποδοχέα sST2 σε διδρωματικές, κακοήθεις, παραπνευμονικές ΥΣ	156
7.3 Επίπεδα της HMGB1 και του διαλυτού υποδοχέα sRAGE σε διδρωματικές, κακοήθεις, παραπνευμονικές ΥΣ	157
7.4 Συσχέτιση των IL-33 / sST2 καθώς και των HMGB1 /sRAGE με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος	159
7.5 Συσχέτιση της IL-33 και του sST2 με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ	161
7.6 Συσχέτιση της HMGB1 και του sRAGE με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ	164
7.7 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 καθώς και της ανασυνδυασμένης IL-33 στην κυτταρική προσκόλληση σε MeT-5A κυτταρική σειρά..	165
7.8 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 καθώς και της ανασυνδυασμένης IL-33 στην κυτταρική μετανάστευση σε MeT-5A κυτταρική σειρά.	168
7.9 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 καθώς και της ανασυνδυασμένης HMGB1 στην κυτταρική προσκόλληση σε MeT-5A κυτταρική σειρά.	171
7.10 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 καθώς και της ανασυνδυασμένης HMGB1 στην κυτταρική μετανάστευση σε MeT-5A κυτταρική σειρά	172
7.11 <i>In vitro</i> επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 καθώς και της ανασυνδυασμένης HMGB1 στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών σε MeT-5A κυτταρική σειρά	175
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Συμπεράσματα</b>	176
SUMMARY	180
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	182

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στις 17/11/1984 στη Θεσσαλονίκη και κατοικώ στη Λάρισα. Αποφοίτησα από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το Φεβρουάριο του 2010, όπου κατέλαβα την πρώτη θέση μεταξύ των αποφοίτων και ανέγνωσα τον Όρκο του Ιπποκράτη με βαθμό πτυχίου 7.82/10. Την περίοδο 12/2010 - 12/2011 εκπλήρωσα την υπηρεσία υπαίθρου ως υπόχρεος ιατρός στο Κέντρο Υγείας Φαρκαδόνας, Γενικό Νοσοκομείο Τρικάλων. Ακολούθως, εργάστηκα για 6 μήνες σε Ιδιωτικό Κέντρο Αποκατάστασης και Αποθεραπείας. Άσκησα την Ειδικότητα της Πνευμονολογίας αρχικά στην Πνευμονολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Χανίων για εννέα μήνες (10/07/2012 - 02/04/2013) και στη συνέχεια στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας από όπου έλαβα τον τίτλο της Ειδικότητας μετά από επιτυχείς εξετάσεις, στις 18/04/2017. Έκτοτε συνεργάζομαι με την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας ως ακαδημαϊκή υπότροφος, συμμετέχοντας ενεργά στο ερευνητικό και κλινικό πρόγραμμα της Κλινικής, στην εκπαίδευση νέων ιατρών και μεταπτυχιακών φοιτητών. Κατά το διάστημα: 01/04/2016 - 30/09/2016 εκπαιδεύτηκα στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την διεύθυνση του Καθηγητή Επαμεινώνδα Ζακυνθινού. Την περίοδο 11/2013-11/2017 εκπόνησα την παρούσα Διδακτορική Διατριβή που σχετίζεται με τα νοσήματα του υπεζωκότα και τη μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων. Έχω συμμετάσχει σε 2 ερευνητικά προγράμματα, ενώ μέχρι στιγμής έχω 11 πρόσφατες δημοσιεύσεις στο διεθνή τύπο όλες ως πρώτη ή δεύτερη συγγραφέας, 9 από τις οποίες σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά που ευρετηριάζονται στο SCOPUS και PUBMED με συνολικό Impact Factor: 40.061. Επίσης, έχω παρακολουθήσει 60 διεθνή και ελληνικά συνέδρια και εκπαιδευτικά σεμινάρια, σε 15 από τα οποία έχω συμμετάσχει ενεργά ως ομιλήτρια για διάφορα επιστημονικά θέματα, ενώ έχω παρουσιάσει 34 προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις.

## Δημοσιεύσεις:

1. **Kotsiou O.S.**, Zouridis S., Kosmopoulos M., Gourgoulianis K.I. Impact of financial crisis on COPD burden: Greece as a case study. *Eur Respir Rev.* 2018;27:170106.
2. **Kotsiou O.S.** Gourgoulianis K.I. Fractional exhaled nitric oxide: signaling lung function changes in obstructive lung diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017: ANA12395, accepted for publication on 12 Dec 2017.
3. Stafyla E., **Kotsiou O.S.**, Deskata K., Gourgoulianis K.I. Missed diagnosis and overtreatment of COPD among smoking primary care population in Central Greece: Old problems persist. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2017;13:487-498.
4. **Kotsiou O.S.**, Tzortzi P., Beta R., Kyritsis A., Gourgoulianis K.I. Repeatability of pleural adenosine deaminase measurements in diagnostic evaluation of pleural effusions. *J Clin Lab Anal.* 2017 Dec 7. doi: 10.1002/jcla.22371. [Epub ahead of print].
5. **Kotsiou O.S.**, Gourgoulianis K.I. Letter by Kotsiou and Gourgoulianis Regarding Article, "Pathophysiology of Takotsubo Syndrome". *Circulation.* 2017 Dec 5;136(23):2291-2292. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030361.
6. **Kotsiou O.S.**, Xirogiannis I.K., Gourgoulianis K.I. Kounis Syndrome: is it really a Takotsubo-Like Syndrome? *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology.* *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2017 Jun;27(3):198-200. doi: 10.18176/jiaci.0145.
7. **Kotsiou O.S.**, Zarogiannis S.G., Gourgoulianis K.I. Prehospital NSAIDs use prolong hospitalization in patients with pleuro-pulmonary infection. *Respir Med.* 2017 Feb 1;123:28-33. doi: 10.1016/j.rmed.2016.12.005.
8. **Kotsiou O.S.**, Douras A., Makris D., Mpaka N., Gourgoulianis K.I. Takotsubo cardiomyopathy: a known unknown foe of asthma. *J Asthma.* Oct;54(8):880-886. doi: 10.1080/02770903.2016.1276586.
9. **Kotsiou O.S.**, Gourgoulianis K.I. A rare presentation of tuberous sclerosis complex: Complicated renal cyst leads to sepsis. *Int J Case Rep Images.* 2016;7(2):106–110.
10. **Kotsiou O.S.**, Daniil Z., Gourgoulianis K.I. Pneumomediastinum in MDA5-associated Clinically Amyopathic Dermatomyositis. *Rheumatology Advances in Practice.* 2017 Jan 1;1(1): <https://doi.org/10.1093/rap/rkx003>.
11. **Kotsiou O.** Pasparaki I., Bibaki E., Damianaki A., Kotsios V., Ntaoukakis E., Gourgoulianis K.I. Drowning and near drowning victims in Chania area. *Pneumon.* 2014;27(3):231-5.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Σκοπός αυτής ήταν ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αλαρμινών IL-33 και των διαλυτών τους υποδοχέων sRAGE και sST2 αντίστοιχα στο πλευριτικό υγρό ασθενών με διδρωματικές, κακοήθειες και παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι δυο προαναφερθέντες σηματοδοτικοί άξονες εμπλέκονται στη διαδικασία της ιστικής αναδιαμόρφωσης κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της *in vitro* επίδρασης της HMGB1 και IL-33 σε τρεις βασικούς κυτταρικούς φαινότυπους που εμπλέκονται στη διαδικασία της ιστικής επισκευής, δηλαδή στην κυτταρική προσκόλληση, κυτταρική μετανάστευση και στην ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών.

Από την έναρξη της παρούσας μελέτης μέχρι και το τέλος αυτής η παρουσία και συμβολή καθηγητών, συναδέλφων και φίλων ήταν καταλυτική και η ανάγκη για θερμές ευχαριστίες σε όλους είναι ιδιαίτερα έντονη.

Η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης δε θα ήταν δυνατή χωρίς τη καθοδήγηση του Δασκάλου μου και επιβλέποντα αυτής της διδακτορικής διατριβής, Καθηγητή Πνευμονολογίας κυρίου **Κωνσταντίνου Ι. Γουργουλιάνη**. Ιδίως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την αδιάκοπη και ανεξάντλητη παροχή γνώσεων και γένεση πρωτότυπων ιδεών, την εμπιστοσύνη του και τη συνεχή ηθική υποστήριξή του.

Βαθύτατες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας κύριο **Σωτήριο Γ. Ζαρογιάννη** για την ουσιαστική επιστημονική βοήθειά του, την αρχική οργάνωση και τελική διόρθωση της μελέτης, τις εύστοχες και εποικοδομητικές παρατηρήσεις που συνετέλεσαν ουσιαστικά στη βελτίωση και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Καθηγήτρια Πνευμονολογίας κυρία **Ζωή Δανιήλ** για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση, αδιάλειπτη παρότρυνση και τις πολύτιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πνευμονολογίας **Ιωάννη Καλομενίδη** για τις πολύτιμες συμβουλές στην τελική διόρθωση της διατριβής.

Ευχάριστο καθήκον μου είναι να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή Εργαστηριακής Φυσιολογίας κύριο **Αναστάσιο Γερμενή**, Καθηγητή Νεφρολογίας κύριο **Ιωάννη Στεφανίδη** και την Καθηγήτρια Φυσιολογίας κυρία **Χρυσή Χατζόγλου** για τη συμμετοχή τους στην κρίση αυτής της διατριβής. Το διεθνώς αναγνωρισμένο επιστημονικό τους κύρος και η εμπειρία τους συνετέλεσε σημαντικά στην τελική διαμόρφωση αυτής της έρευνας.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστώ σε όλο το προσωπικό του Τμήματος Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ιδιαίτερα στον συνεργάτη και φίλο **Raj Jagirdar** για την αμέριστη συμπαράσταση, τη συνεχή ανταλλαγή ιδεών και επιστημονικών απόψεων, την εκπαίδευση και την ουσιαστική συμβολή του στο τεχνικό μέρος της μελέτης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τόσο η ιντερλευκίνη (IL)-33 όσο και η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1 (HMGB1) συνιστούν πολυλειτουργικές πρωτεΐνες που εκφράζονται ιδιοσυστατικά στα κύτταρα των ιστικών φραγμών. Σηματοδοτούν μέσω του υποδοχέα καταστολής της ογκογένεσης 2 (ST2) και του υποδοχέα για τα τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (RAGE), αντίστοιχα. Ο ρόλος των δυο πρωτεϊνών διαφοροποιείται ανάλογα με το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εδράζονται. Εξωκυτταρίως, δρουν ως DAMPs (μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με καταστροφή) ή αλαρμίνες, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση, ιστική επισκευή και αναδιαμόρφωση. Η ενδοκυττάρια σήμανση παρεμποδίζεται από την παγίδευση των IL-33 και HMGB1 από τις διαλυτές εξωκυττάρια ισομορφές sST2 και sRAGE, αντίστοιχα. Τόσο οι αλαρμίνες IL-33 και HMGB1 όσο και οι διαλυτές ισομορφές των υποδοχέων τους, sST2 και sRAGE αντίστοιχα, εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων του αναπνευστικού συστήματος. Εντούτοις, ο ρόλος τους στα νοσήματα του υπεζωκότα είναι ελάχιστα μελετημένος. Οι κυριότεροι στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν πρώτον ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των IL-33 και HMGB1 καθώς και των διαλυτών υποδοχέων τους σε διδρωματικές, κακοήθειες και παραπνευμονικές υπεζωκοτικές συλλογές (ΥΣ). Δεύτερον, η διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων των IL-33 και HMGB1 από κάθε τύπο ΥΣ, σε τρεις σημαντικούς κυτταρικούς φαινότυπους που εμπλέκονται στην ιστική αναδιαμόρφωση. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν η κυτταρική προσκόλληση, κυτταρική μετανάστευση και ικανότητα σχηματισμού σφαιροειδών σε κυτταρική σειρά καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A. Τέλος, αξιολογήθηκε η επίδραση της χρήσης ανασυνδυασμένων IL-33 και HMGB1 στους τρεις ανωτέρω κυτταρικούς φαινότυπους με χρήση κυτταρικής σειράς MeT-5A. Από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των IL-33 και sST2 μεταξύ των διδρωματικών, κακοήθων και παραπνευμονικών ΥΣ. Αξιοσημείωτα, τα επίπεδα της HMGB1 και sRAGE φάνηκε πως μπορούν να διακρίνουν αποτελεσματικά τα διδρώματα από τα εξιδρώματα με οριακές τιμές (cut-off values) που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια εξαρτώμενη από την ηλικία διαφοροποίηση των επιπέδων HMGB1 και sRAGE στις ΥΣ. Πιθανολογείται ότι η IL-33 συνιστά προϊόν

τραυματισμού και δείκτη κυτταρικού στρες των μεσοθηλιακών κυττάρων στις διδρωματικές ΥΣ, ενώ στις κακοήθεις ΥΣ προϊόν αιμόλυσης. Επίσης, εικάζεται ότι η HMGB1 συνιστά προϊόν των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων στις κακοήθεις ΥΣ. Όσον αφορά τις *in vitro* επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 και HMGB1 στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών, τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ανάλογα με το χρόνο της φλεγμονώδους διαδικασίας και τον τύπο της ΥΣ. Τέλος, όσον αφορά τις *in vitro* επιδράσεις της ανασυνδυσμένης IL-33, παρατηρήθηκε ότι η κυτταρική μετανάστευση των καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για τιμές >1 ng/mL). Η χρήση ανασυνδυσμένης HMGB1 σε συγκέντρωση 50 ng/mL μείωσε σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση και σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες των 100 ng/mL μείωσε σημαντικά την περίμετρο κυτταρικών σφαιροειδών. Τα ευρημάτα μας υπογραμμίζουν έναν αναδυόμενο ρόλο των σηματοδοτικών αξόνων IL-33/sST2 και HMGB1/sRAGE στην παθοφυσιολογία των μελετούμενων ΥΣ. Φαίνεται πως είτε αυτόνομα είτε και σε συνδυασμό με άλλα σηματοδοτικά μόρια επιδρούν στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς της τραυματισμένης μεσοθηλιακής στιβάδας όπως στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και ικανότητα σχηματισμού σφαιροειδών. Η σε βάθος κατανόηση του ρόλου των αλαρμινών σε μηχανισμούς ιστικής επιδιόρθωσης μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια νόσο του υπεζωκότα.

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Αλαρμίνες ή DAMPs

## 1.1 Αλαρμίνες

Το αναπνευστικό σύστημα εκτίθεται καθημερινά σε πληθώρα μικροβίων, ερεθιστικών ουσιών, αλλεργιογόνων, πιθανόν ακραίες θερμοκρασίες και οξέα, ως εκ τούτου ο βλεννογόνος των αεραγωγών συνιστά ένα σημαντικό φυσικό αμυντικό φραγμό έναντι παθογόνων και ποικίλων ερεθισμάτων. Η ιστική βλάβη και ο κυτταρικός θάνατος σηματοδοτείται από ενδοκυττάρια μόρια που απελευθερώνονται εξωκυτταρίως παθητικά από τους τραυματισμένους ή νεκρωμένους ιστούς, είτε εκκρίνονται ενεργητικά μετά από έντονο στρες των ζώντων κυττάρων [1]. Τα μόρια αυτά ονομάζονται μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με καταστροφή (damage associated molecular patterns, DAMPs) ή αλαρμίνες (alarmins) (**Εικόνα 1**) [1-4]. Το ανοσοποιητικό σύστημα ανιχνεύει και απαντά στα DAMPs με τον ίδιο τρόπο που ανιχνεύει και αντιμετωπίζει τα μοριακά μοτίβα που εντοπίζονται σε μικροβιακά παθογόνα (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) [5]. Τα DAMPs όμως σε αντίθεση με τα PAMPs είναι ενδογενείς, ιδιοσυστατικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες/πεπτίδια που ενεργοποιούνται ως αποτέλεσμα αποκοκκιοποίησης, κυτταρικής βλάβης ή νέκρωσης (**Πίνακας 1**) [1, 5]. Με άλλα λόγια πρόκειται για μόρια που έχουν φυσιολογικό ρόλο εντός του κυττάρου, αλλά αποκτούν πρόσθετες λειτουργίες όταν εκτίθενται στο εξωκυττάριο περιβάλλον: προειδοποιούν τα γειτνιάζοντα κύτταρα για τον κίνδυνο (αλαρμίνες), διεγείρουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις ως ενεργοποιητές του ανοσοποιητικού συστήματος, δρουν χημειοτακτικά και τελικά προωθούν τη διαδικασία κυτταρικής και/ή ιστικής αναγέννησης (**Πίνακας 1**) [1-6].

Ωστόσο, όταν τα DAMPs απελευθερώνονται σε περίσσεια από σοβαρά τραυματισμένους ιστούς, η μέγιστη ανοσολογική διέγερση που προκαλούν μπορεί να καταλήξει σε μια δυνητικά θανατηφόρο “καταιγίδα κυτοκινών” [7-9]. Αυξημένα επίπεδα DAMPs στον ορό έχουν συσχετισθεί με φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως σήψη [10, 11], αθηροσκλήρυνση [12], συστηματικό ερυθματώδη λύκο [13, 14], ρευματοειδή αρθρίτιδα [15, 16] νόσο του Crohn [17] και το μεταστατικό δυναμικό ενός καρκίνου [1, 10, 12, 18-21].

Τα DAMPs πρωτοπεριγράφησαν από τους Robert Lehrer και συν. το 1985 ως “αντιμικροβιακά πεπτίδια” (antimicrobial peptides, AMPs) και έλαβαν το όνομα “αμυντίνες” (defensins) [22]. Στη συνέχεια, το 2004, οι Yang και Orpenheim [23], αναγνώρισαν ότι τα μόρια αυτά απελευθερώνονται ταχέως ως η αρχική απόκριση του οργανισμού έναντι της λοίμωξης και του μη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου σηματοδοτώντας τον ιστικό κίνδυνο και έλαβαν το όνομα “αλαρμίνες”. Πλήθος μελετών στην πορεία αποκάλυψαν ότι οι αλαρμίνες έχουν χημειοτακτική ικανότητα και ικανότητα ενεργοποίησης τόσο των κυττάρων του έμφυτου ή ενδογενούς (innate) όσο και αυτών του επίκτητου ή προσαρμοστικού (adaptive) ανοσοποιητικού συστήματος [23-31]. Είναι σημαντικό επίσης να τονισθεί ότι τα DAMPs είναι κεντρικοί διαμεσολαβητές στην επισκευή- επιδιόρθωση- επούλωση ιστών μετά από παντός είδους φλεγμονή- στείρα ή λοιμώδη [5, 21, 32-50] .

**Πίνακας 1.** Κύριες κατηγορίες, υποδοχείς και βιολογικά αποτελέσματα των αλαρμινών.

Προέλευση	Αλαρμίνες	Υποδοχέας	Δράση
Προερχόμενες από αποκοκκίωση	Αμυντίνες (α,β)	CCR2,CCR6,TLR4	Αντιμικροβιακή δράση
	Καθελιντίνη (LL37/CRAMP)	CXCR2, FPRL1,TLR7,8,9, P2X7, EGFR, MrgX2,	Στρατολόγηση λευκοκυττάρων
	Ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (EDN)	TLR2	Ενεργοποίηση Μφ και DCs
	Κοκκιολυσίνη	TLR4	Προαγωγή ανοσοαντιδράσεων
Πυρήνας	HMGB1*	CXCR4, RAGE, TLR2,4,9	Ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής
	HMGN1	TLR4	Στρατολόγηση λευκοκυττάρων
	IL-1α	IL-1R	Ενεργοποίηση Μφ και DCs
	IL-33*	ST2	Προαγωγή ανοσοαντιδράσεων
Κυτταρόπλασμα	HSP60,70,90,96	TLR2,4, CD91	Ομοίωση κυττάρων
	Πρωτεΐνες S100	RAGE, TLR4	Στρατολόγηση λευκοκυττάρων
	ATP	P2Y2,6,12, P2X1,3,7	Ενεργοποίηση Μφ και DCs
	Ουρικό Οξύ	P2X7	Προαγωγή ανοσοαντιδράσεων

\*Επισημαίνονται οι υπο μελέτη αλαρμίνες

**Συνομογραφίες:** **ATP**, Adenosine triphosphate; τριφωσφορική αδενοσίνη; **CRAMP**, Cathelin-related antimicrobial peptide, αντιμικροβιακό πεπτίδιο σχετιζόμενο με την καθελίνη; **CCR**, Cysteine/cysteine (C-C) motif chemokine receptor, CC υποδοχέας χημειοκίνης; **CXCR**, Cystein/X aminoacid/cystein (C-X-C) motif chemokine receptor, υποδοχέας CXC χημειοκινών; **DCs**: Dendritic cells, δενδριτικά κύτταρα; **EDN**, eosinophil-derived neurotoxin, ηωσινοφιλική νευροτοξίνη; **EGFR**, Epidermal growth factor receptor, υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα; **FPRL1**, Formyl peptide receptor-like 1, υποδοχέας τύπου 1 φορμυλ-πεπτιδίων; **HMGB1**, High-mobility group box 1 protein, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1; **HMGN1**, High-mobility group nucleosome-binding domain 1 protein, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας δέσμευσης νουκλεοσώματος τύπου 1; **HSP**, Heat shock protein, πρωτεΐνη θερμικού στρες; **MrgX2**, Mas-related gene X2; Mas σχετιζόμενος συζευγμένος με πρωτεΐνη G υποδοχέας X2; **Μφ**, μακροφάγα; **P2Y2**, P2Y purinoreceptor 2, πουρινοϋποδοχέας P2Y2; **P2X**, P2X purinoreceptor, πουρινοϋποδοχέας P2X; **RAGE**, receptor for advanced glycation end-products, υποδοχέας τελικών προϊόντων προχωρημένης μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης; **ST2**, suppression of tumorigenicity 2, υποδοχέας καταστολής της ογκογένεσης τύπου 2 **TLR**, Toll-like receptor, υποδοχείς τύπου Toll

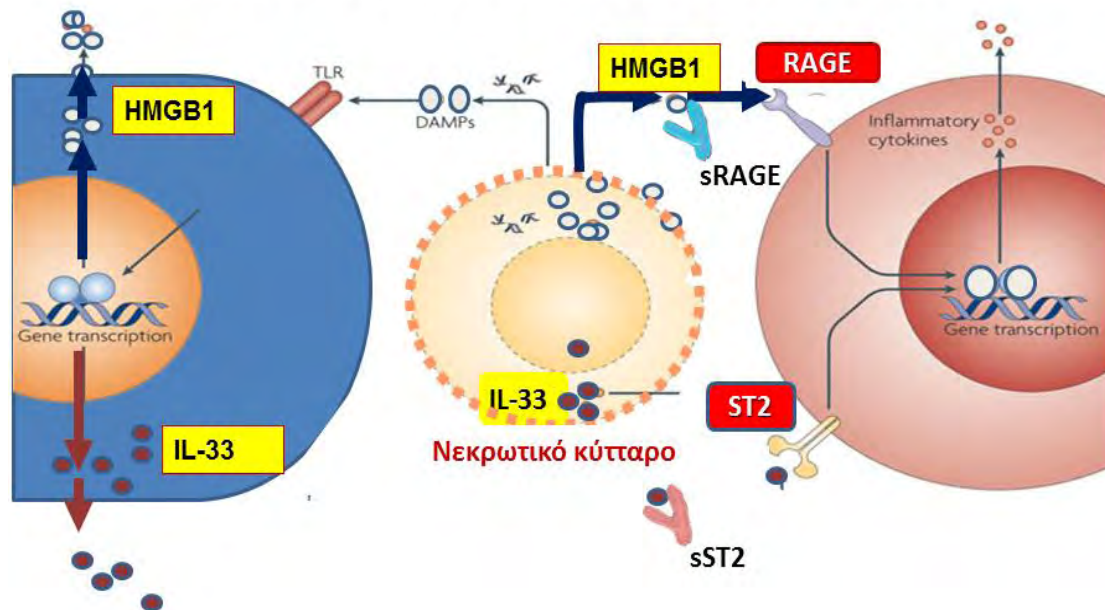
Τροποποιημένο από: Yang G, Han Z, Orpenheim JJ. Alarmins and immunity. Immunol Rev. 2017;280:41-56.

Η έκκριση των αλαρμινών εκκινεί από τοπικό ιστικό τραυματισμό, έχει ωστόσο παρατηρηθεί ότι τα DAMP δρουν και σε απομακρυσμένες από τη βλάβη θέσεις, και ιδίως στον πνευμονικό παρέγχυμα [1, 11, 51-54]. Σε αυτή την αρχή βασίζεται και ο ορισμός της πολυοργανικής ανεπάρκειας μετά από ιστικό τραυματισμό απότοκο λοίμωξης, όπου ουσιαστικά υπάρχει μια υπέρμετρη φλεγμονώδης ανοσιακή απάντηση μέσω της υπερπαραγωγής DAMPs ή μέσω μιας “καταιγίδας κυτοκινών” [1, 11, 51-54].

Είναι ενδιαφέρον επίσης ότι η ψυχολογική και/ή οξεία έντονη έκθεση σε στρεσογόνο παράγοντα, ελλείπει εμφανούς κυτταρικής καταστροφής, μπορεί να προκαλέσει τοπικές και συστηματικές στείρες φλεγμονώδεις αποκρίσεις [38, 45-57]. Τα DAMPs μπορεί να διαδραματίσουν ρόλο στην έκταση αυτών, υποδηλώνοντας ότι οι αλαρμίνες δρουν γενικότερα ως σήματα κινδύνου και όχι μόνο ως σήματα ιστικής καταστροφής [33, 46, 51-57]. Η επαγόμενη από στρες στείρα φλεγμονή προκαλεί την παραγωγή DAMPs που είναι ανιχνεύσιμα στους ιστούς και στην συστηματική κυκλοφορία όπως έχει φανεί από *ex vivo* και *in vivo* μελέτες [33, 46, 51-57]. Στείρα φλεγμονή προκαλείται από ποικιλία ερεθισμάτων όπως: το μηχανικό τραύμα, η ισχαιμία, το εγκεφαλικό τραύμα, το ψυχολογικό στρες, περιβαλλοντικές καταστάσεις (για παράδειγμα η υπεριώδης ακτινοβολία) και η φυσιολογική γήρανση [33, 46, 52-57]. Η γήρανση μάλιστα σχετίζεται με μια χρόνια, ήπια σε ένταση, στείρα φλεγμονή που χαρακτηρίζεται από την έκκριση DAMPs [46, 55]. Γενικότερα, η στείρα φλεγμονή μπορεί να είναι ευεργετική ή επιβλαβής για τον ξενιστή [51-56]. Τοπικά στείρα φλεγμονώδης αποκρίση μπορεί είτε να προάγει την ομοιόσταση, είτε όπως έχει παρατηρηθεί σε χρόνιες παθήσεις, όπως η οστεοαρθρίτιδα [15], μπορεί να οδηγήσει σε παροξυσμούς της νόσου μέσω μιας “καταιγίδας κυτοκινών” η οποία μπορεί δυνητικά να αποβεί θανατηφόρος [53, 57].

Οι αλαρμίνες ενεργοποιούν το ανοσιακό σύστημα και ασκούν το χημειοτακτικό τους ρόλο είτε αφού συνδεθούν με υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs) [1, 6], είτε αφού υποστούν ενδοκυττάρωση [6, 53-60]. Τα DAMPs διαφοροποιούνται και διακρίνονται εξ' αιτίας της σύνδεσής τους με διάφορους υποδοχείς, όπως υποδοχείς τύπου Toll (Toll like receptors, TLRs), τύπου NOD (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors), υποδοχείς τύπου ALRs (absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors, υποδοχείς τύπου RIG-I (retinoic acid inducible gene) και υποδοχείς NLRP3 (nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3) κ.α. **(Πίνακας 1, Εικόνα 1)** [1, 6, 53-65].

## ΑΞΟΝΑΣ HMGB1 / RAGE και IL-33 / ST2



**Εικόνα 1.** Σηματοδοτικός άξονας αλαρμινών HMGB1, IL-33 με τους υποδοχείς τους RAGE και ST2, αντίστοιχα. Οι αλαρμίνες HMGB1 και IL-33 απελευθερώνονται από τον κυτταρικό πυρήνα όπου κυρίως εδράζονται, προς τον εξωκυττάριο χώρο με δύο τρόπους: είτε παθητικά από νεκρωμένα κύτταρα είτε εκκρίνονται ενεργητικά από ζώντα κύτταρα κάτω από συνθήκες στρες. Ακολούθως συνδέονται με υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs), στη συγκεκριμένη περίπτωση με τους RAGE και ST2 αντίστοιχα. Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί ενδοκυττάριους καταράκτες με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή κυτοκινών και χημειοκινών, τη στρατολόγηση κυττάρων και φλεγμονή. Στην πορεία της σηματοδότησης εμπλέκονται οι διαλυτές ισομορφές των υποδοχέων sRAGE και sST2 αντίστοιχα, μπλοκάροντας τη σύνδεση των αλαρμινών με τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς τους.

**Συνομογραφίες:** *Gene transcription*; γονιδιακή μεταγραφή; **HMGB1**, *High mobility group box 1 protein*, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1; **IL**, *Interleukin*, ιντερλευκίνη; **PRRs**, *pattern recognition receptors*, υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων; **RAGE**, *receptor for advanced glycation end products*, υποδοχέας τελικών προϊόντων προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης, **sRAGE**, *soluble RAGE*, διαλυτή ισομορφή υποδοχέα RAGE; **sST2**, *soluble ST2*, διαλυτή ισομορφή υποδοχέα ST2; **ST2**, *suppression of tumorigenicity 2 receptor*, υποδοχέας καταστολής της ογκογένεσης τύπου 2

Τροποποιημένο από: Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:826-837.

Η σύνδεση των αλαρμινών με τους PRPs εκκινεί ποικίλες οδούς μεταγωγής σήματος ως αμυντική απόκριση του οργανισμού. Συγκεκριμένα, η απελευθέρωση αλαρμινών από κατεστραμμένους ιστικούς φραγμούς του ξενιστή οδηγεί σε ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων όπως μακροφάγων, δενδριτικών κυττάρων (DCs) ώστε να παραχθεί από αυτά μια πληθώρα φλεγμονωδών μεσολαβητών π.χ. αγγειοδραστικές αμίνες και πεπτίδια, μεταβολίτες λιπιδίων (π.χ. λευκοτριένια και προσταγλανδίνες), χημειοκίνες και κυτοκίνες, που με τη σειρά τους θα ενορχηστρώσουν την χημειοταξία περισσότερων λευκοκυττάρων (π.χ. ουδετεροφίλων, μονοκυττάρων και DCs) και την ενεργοποίηση τελεστών (π.χ. συμπλήρωμα, φαγοκύτταρα κλπ) για την απομάκρυνση ή απομόνωση των εισβολέων ή τραυματισμένων ιστών [1-3, 6, 24-27, 37, 60-65]. Έτσι επιτρέπεται στον ξενιστή να αποκαταστήσει τη λειτουργικότητα και ομοιόσταση των κυττάρων και ιστών του. Χαρακτηριστικά, επειδή η προσκόλληση στα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελεί προϋπόθεση για την εξαγγείωση και μετακίνηση των λευκοκυττάρων σε θέσεις φλεγμονής [1, 63-65], οι αλαρμίνες αυξάνοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα προάγουν την πρόσληψη των λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια της ανοσοαπόκρισης [1, 6, 25, 63-65].

Επιπρόσθετα, οι αλαρμίνες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν κύτταρα της επίκτητης ανοσολογικής απάντησης, με κύριους μεσολαβητές, τα DCs, η βασική λειτουργία των οποίων έγκειται στην προώθηση αντιγόνων και την παρουσίασή αυτών στην επιφάνεια άλλων ανοσολογικώς δρώντων κυττάρων όπως των T λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την επαγωγή επίκτητων ανοσολογικών αποκρίσεων [1, 25, 36, 66-73]. Κατά την άφιξη στους λεμφαδένες, τα ώριμα DCs επάγουν την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των παρθένων (naïve) CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T κυττάρων, σε κύτταρα τελεστές: CD4<sup>+</sup> T βοηθητικά κύτταρα και CD8<sup>+</sup> T

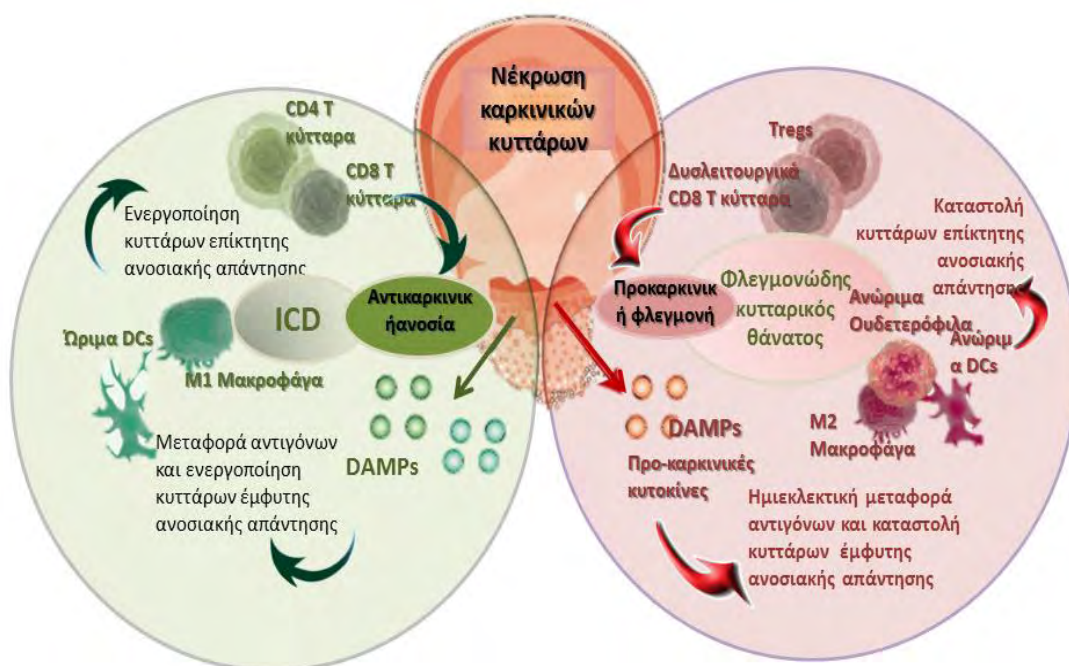
κυτταροτοξικά κύτταρα, αντίστοιχα [1, 25, 67-73]. Τα δραστικά T κύτταρα με τη σειρά τους συνεργάζονται με τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος [κοκκιοκύτταρα, μακροφάγα, φυσικά κύτταρα φονείς (NK)] και το σύστημα του συμπληρώματος με στόχο την περαιτέρω εξάλειψη των παθογόνων, των κατεστραμμένων ιστών ή των ογκογόνων κυττάρων, ώστε στη συνέχεια να εκκινήσει η επισκευή των ιστών [1, 71-73].

Επιπλέον, τα DAMPs εμπλέκονται στην ανοσία του καρκίνου όπου έχει φανεί πως ο ρόλος τους είναι διττός (**Εικόνα 2**). Από τη μία πλευρά, ο ανοσογενής κυτταρικός θάνατος των καρκινικών κυττάρων (immunogenic cancer cell death - ICD) χαρακτηρίζεται από την απελευθέρωση αλαρμινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου που οδηγούν στην απομάκρυνση των εναπομεινάντων, ανθεκτικών στη θεραπεία καρκινικών κυττάρων μέσω της διεργασίας ευαισθητοποίησης των ανοσοκυττάρων από τα DAMPs (αντικαρκινική δράση αλαρμινών) [1]. Από την άλλη πλευρά, αναφέρεται ότι τα νεκρά καρκινικά κύτταρα δια της μεσολάβησης των DAMPs είναι ικανά να ενορχηστρώνουν μια απάντηση που μιμείται την άμυνα του ξενιστή έναντι παθογόνου, προκαλώντας επιπλέον ιστική βλάβη (προκαρκινική δράση αλαρμινών) (**Εικόνα 2**) [1, 10, 12, 18-21].

Συνοπτικά, πρόσφατα κατέστη σαφές ότι οι αλαρμίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως εκκινήτες και διαμεσολαβητές σε ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών διεργασιών όπως στην άμυνα του ξενιστή, ρύθμιση έκφρασης γονιδίων, κυτταρική ομοιόσταση, επούλωση πληγών, φλεγμονή, αλλεργία, αυτοανοσία και ογκογένεση [1-21, 35-44]. Τα DAMPs έχουν συνδεθεί τόσο με τη διατήρηση της ιστικής ομοιόστασης όσο και με φλεγμονώδεις διαταραχές και κυτταρικό θάνατο. Ως εκ τούτου, η αναστολή των υπέρμετρων φλεγμονωδών αποκρίσεων που προκαλούνται από τα DAMPs είναι μια πολλά υποσχόμενη



θεραπευτική στρατηγική. Αναμφίβολα, η εξιχνίαση των οδών μεταγωγής σήματος της εκάστοτε αλαρμίνης καθώς και η ανίχνευση των αγωνιστών και ανταγωνιστών τόσο των αλαρμινών όσο και των υποδοχέων τους μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές θεραπευτικές δυνατότητες [1-21, 35-70].



**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση του ανοσολογικού προφίλ κατά τη διάρκεια του ανοσοποιητικού καρκινικού κυτταρικού θανάτου (immunogenic cancer cell death, ICD), όπου απεικονίζεται ο διττός ρόλος των DAMPs (ή αλαρμινών). Επεξηγείται η αντικαρκινική (πράσινος κύκλος) και προκαρκινική δράση (κόκκινος κύκλος) των DAMPs.

**Συνομογραφίες:** **DAMPs**, damage-associated molecular patterns, μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με καταστροφή; **DCs**, dendritic cells, δενδριτικά κύτταρα; **M1**, type-1 polarized macrophages, κλασικά ενεργοποιημένα πολωμένα μακροφάγα τύπου 1; **M2**, type-2 polarized macrophages, εναλλακτικά ενεργοποιημένα πολωμένα μακροφάγα τύπου 2; **Treg**, regulatory T cells, T ρυθμιστικά κύτταρα

Τροποποιημένο από: Garg AD, Agostinis P. Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. *Immunol Rev.* 2017;280:126-148.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο άξονας IL-33/ST2

### 2.1 Ιντερλευκίνη (IL)-33

#### 2.1.1 Χαρακτηριστικά των μελών της υπεροικογένειας της IL-1

Τα μέλη της οικογένειας της ιντερλευκίνης (IL)-1 είναι γνωστό ότι κατέχουν έναν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων σε λοιμώδη ή στείρα φλεγμονή [74-78] (Πίνακας 2). Τα πιο γνωστά μέλη αυτής της υπεροικογένειας είναι οι: IL-1α , IL-1β, IL-1Ra, η IL-18 και η πιο πρόσφατη σε σειρά περιγραφής IL-33 (Πίνακας 2) [74-78]. Τα γονίδια για τις κυτοκίνες της υπεροικογένειας της IL-1, εδράζονται στο σύνολό τους στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 2, με εξαίρεση το γονίδιο της IL-33 που εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 και το γονίδιο της IL-18 που εδράζεται στο γονίδιο 11 (Πίνακας 2) [79]. Δυσλειτουργία της έκφρασης των μελών της υπεροικογένειας της IL-1 μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρά παθοβιολογικά αποτελέσματα.

**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά των μελών της υπεροικογένειας της IL-1.

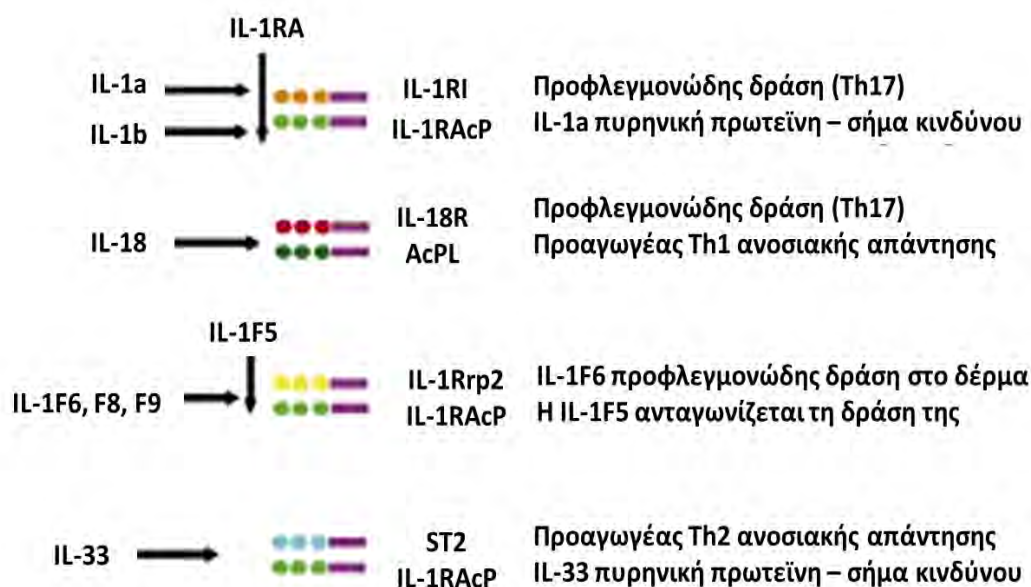
Όνομα	Κυτοκίνη	Γονίδιο *	Κυτταρική προέλευση	Δράση
IL-1F1	IL-1α	2q14	Mo, neu, EpC, EnC,	Προφλεγμονώδης
IL-1F2	IL-1β	2q14	Mo, DC, EpC, Fib, B, NK	Προφλεγμονώδης
IL-1F3	IL-1Ra	2q14.2	Mo, neu, Fib, EpC	Αντιφλεγμονώδης
IL-1F4	IL-18	11q23.1	Mo, DC, EpC	Προφλεγμονώδης
IL-1F5	IL-36Ra	2q14	EpC, DC, Mo, Ker	Αντιφλεγμονώδης
IL-1F6	IL-36α	2q12-q14.1	EpC, Ker, Mo, T	Προφλεγμονώδης
IL-1F7	IL-37	2q12-q14.1	Mo, EpC	Αντιφλεγμονώδης
IL-1F8	IL-36β	2q14	EpC, Ker, Mo, T	Προφλεγμονώδης
IL-1F9	IL-36g	2q12-q21	EpC, Ker, Mo	Προφλεγμονώδης
IL-1F10	IL-38	2q13	EpC, B	Αντιφλεγμονώδης
IL-1F11	IL-33	9p24.1	EpC, EnC, Myo, Fib, Mo	Προφλεγμονώδης

\*USA National Library of Medicine-National Center of Biotechnology Information

**Συντομογραφίες:** **B**, B λεμφοκύτταρα; **DC**, δενδριτικά κύτταρα; **EnC**, ενδοθηλιακά κύτταρα; **EpC**; επιθηλιακά κύτταρα; **Fib**, ινοβλάστες; **Ker**, κερατινοκύτταρα; **Mo**, μονοκύτταρα/μακροφάγα; **Myo**, μυοκύτταρα; **neu**, ουδετερόφιλα; **NK**, φυσικά κύτταρα φονείς; **T**, T λεμφοκύτταρα.

Τροποποιημένο από: Striz I. Cytokines of the IL-1 family: recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations. Clin Sci (Lond). 2017;131:2241-2256.

Η δράση τους καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τους διαλυτούς υποδοχείς και τους φυσικούς ανταγωνιστές τους (π.χ. ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1, IL-1 receptor antagonist, IL-1Ra) οι οποίοι μπλοκάρουν τη σηματοδότηση του άξονα συνδέτη-υποδοχέα (**Εικόνα 3**) [80-83].



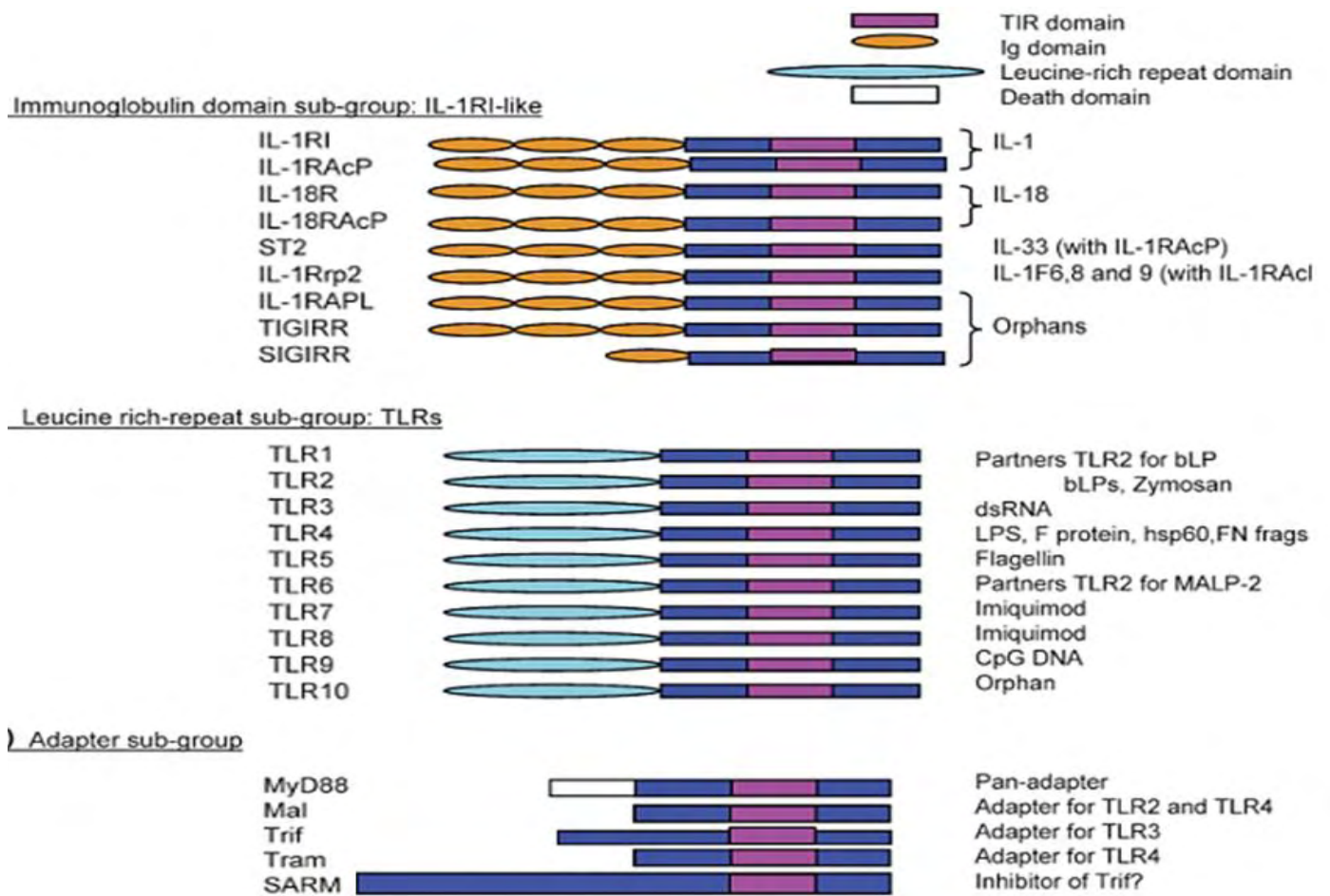
**Εικόνα 3.** Οι πιο πρόσφατα ανακαλυφθέντες συνδέτες για τους υποδοχείς της υποοικογένειας IL-1R. Απεικονίζονται τα σύμπλοκα υποδοχέων για τις ιντερλευκίνες IL-1a και IL-1b (καθώς και ο ανταγωνιστής IL-1RA), IL-18, IL-1F6-F9 (καθώς και ο ανταγωνιστής IL-1F5) και IL-33. Κάθε μέλος της υπεροικογένειας της IL-1 φαίνεται να ενεργοποιεί διαφορετικά υποσύνολα T-κυττάρων.

*IL-1RAcP, IL-18RAcP: βοηθητικές πρωτεΐνες (accessory proteins)*

Τροποποιημένο από: O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. Immunol Rev. 2008;226:10-18.

Οι κυτοκίνες της υπεροικογένειας της IL-1 ασκούν το ρόλο τους μέσω σύνδεσης με υποδοχείς που ανήκουν στην υπεροικογένεια Interleukin-1 receptors/Toll-like receptors (IL-1R/TLR) [80, 81].

Οι υποδοχείς αυτής της ομάδας χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας όμοιας ενδοκυττάριας μονάδας TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor) μήκους ~200 αμινοξέων που συνίσταται από μία κεντρική β-δομή με πέντε β-έλικες, η οποία με τη σειρά της περιβάλλεται από πέντε α-έλικες κείμενες στο κυτταροπλασματικό άκρο της πρωτεΐνης (**Εικόνα 4**) [80, 81]. Η περιοχή TIR θεωρείται υπεύθυνη για τη σηματοδότηση. Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας της αλληλουχίας TIR στις δυο ομάδες αναγνωρίζει την περιοχή TIR ως πρωτεϊνικό μοτίβο που εμπλέκεται στη φλεγμονή και στην άμυνα του ξενιστή [80, 81]. Συνοπτικά, η υπεροικογένεια των IL-1R/TLR υποδοχέων, αντιπροσωπεύει ένα αρχέγονο σύστημα σηματοδότησης που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε εγγενείς ανοσολογικές, φλεγμονώδεις αποκρίσεις [80, 81].



**Εικόνα 4.** Η υπερικογένεια IL-1R/TLR υποδοχών. Υπάρχουν 24 μέλη της υπερικογένειας των υποδοχών IL-1R/TLR. Όλα τα μέλη έχουν μια κυτταροπλασματική περιοχή Toll-IL-1R (TIR) υπεύθυνη για τη σηματοδότηση. Η υπερικογένεια χωρίζεται σε τρεις υποικογένειες. Η υπο-οικογένεια τύπου IL-1RI (A) περιέχει εξωκυττάριας περιοχές Ig υπεύθυνες για τη δέσμευση των συνδετών. Οι συνδέτες απεικονίζονται στη δεξιά στήλη. Οι υποδοχείς TIGIRR, SIGIRR και IL-1RAPL παραμένουν ορφανοί. Η υποικογένεια των Toll Like Receptors (TLR) (B) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη (leucine-rich repeat LRRs) και εκφράζονται σε πολλά είδη ζώων αλλά και στον άνθρωπο. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 12 TLR υποδοχείς από τους οποίους οι TLRs 1-10 βρίσκονται στον άνθρωπο και οι TLRs 1-9, TLR11, TLR12 σε αρουραίους. Στην εικόνα εμφανίζονται οι συνδέτες για τον κάθε υποδοχέα (δεξιά στήλη). Ο TLR10 παραμένει ορφανός. Τέλος, υπάρχουν πέντε πρωτεΐνες-προσαρμογείς σηματοδότησης (C) που προσλαμβάνονται από τους υποδεικνυόμενους υποδοχείς.

**Συνομογραφίες:** **IL-1R**, interleukin 1 receptor, υποδοχείς της ιντερλευκίνης-1; **IL-1RAcP**, IL-18RAcP, συμπληρωματικές πρωτεΐνες; **MAL**: MyD88-Adaptor-Like protein, πρωτεΐνη ομοιάζουσα με τον προσαρμογέα του MyD88; **MyD88**, Myeloid Differentiation factor 88, παράγοντας 88 μυελοειδούς διαφοροποίησης; **SARM**, Sterile  $\alpha$ - and ARmadillo-Motif containing protein, πρωτεΐνη στερούμενη  $\alpha$ -μοτίβων και εμπεριέχουσα μοτίβα αρμαντίλο; **SIGIRR**, single immunoglobulin IL-1-receptor related, μονήρης ανοσοσφαιρίνη σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1; **TLR**, Toll-like υποδοχείς; **TRAM** TRIF - related adaptor

*molecule – μόριο-προσαρμογέας σχετιζόμενο με την TRIF; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β, πρωτεΐνη - προσαρμογέας εμπεριέχουσα την TIR περιοχή που επάγει την ιντερφερόνη INF-β*

*Τροποποιημένο από: O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. Immunol Rev. 2008;226:10-18.*

## 2.1.2 IL-1R και TLR υποομάδες

Επομένως, είναι δυνατόν να διαιρέσουμε την υπεροικογένεια της IL-1R/TLR σε δύο κύριες υποομάδες με βάση την εξωκυττάρια αλληλουχία τους.

Οι ομάδες αυτές είναι οι υποδοχείς της οικογένειας της IL-1 (IL-1R) και οι υποδοχείς της μορφής Toll (TLRs) [80, 81] (**Εικόνα 4**). Αναφορικά με την πρώτη ομάδα αυτή έχει ως αρχικό μέλος τον IL-1RI υποδοχέα ή αλλιώς γνωστό ως CD121a (Cluster of Differentiation 121a) υποδοχέα, στον οποίο συνδέεται η IL-1a. Χαρακτηριστικά τα μέλη αυτής της ομάδας φέρουν εξωκυττάρια αλληλουχία ανοσοσφαιρίνης (Ig) που είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση των συνδετών. Μέλος της ομάδας IL-1R είναι ο διαμεμβρανικός ST2L υποδοχέας της IL-33 [80, 81] (**Εικόνα 4**). Τα μέλη της δεύτερης ομάδας φέρουν όπως αναφέρθηκε την κυτταροπλασματική TIR υπομονάδα, όμως εξωκυττάρως διαφοροποιούνται καθώς χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας αλληλουχίας επαναλήψεων λευκίνης (LRRs) αντί του τμήματος Ig [80, 81] (**Εικόνα 4**). Το αρχικό μέλος αυτής της ομάδας είναι ο Toll υποδοχέας που ανακαλύφθηκε αρχικά στη *Drosophila melanogaster* [80, 81].

Αναλυτικότερα, η οικογένεια υποδοχέων της IL-1 (IL-1R) έχει σήμερα 10 μέλη [80, 81]. Οι κυτοκίνες της υπεροικογένειας της IL-1 είναι οι συνδέτες αυτών των υποδοχέων. Συγκεκριμένα αυτές προσδένονται στο εξωκυττάριο τμήμα των ανοσοσφαιρινών οδηγώντας σε δημιουργία συμπλόκων των υποδοχέων με τις συμπληρωματικές πρωτεΐνες τους (Εικόνα 3) [80, 81]. Για παράδειγμα, η IL-33

σηματοδοτεί μέσω της δημιουργίας ετεροδιμερούς συμπλόκου του υποδοχέα ST2 με τη συμπληρωματική πρωτεΐνη του υποδοχέα της IL-1 (IL-1RAcP) (**Εικόνα 3**) [80-83].

Η οικογένεια υποδοχέων της μορφής Toll, περιλαμβάνει την Toll πρωτεΐνη της *Drosophila melanogaster*, και 10 ακόμα υποδοχείς TLRs, (TLR-1 έως TLR-10), οι οποίοι δεσμεύονται με μικροβιακά αντιγόνα, ενεργοποιώντας αντιδράσεις άμυνας του ξενιστή [60, 80, 81] (**Εικόνα 4**). Πρόκειται όπως προαναφέρθηκε για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πλούσιες σε λευκίνη εξωκυτταρίως [80, 81]. Οι υποδοχείς αυτοί είναι πανταχού παρόντες καθώς εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού και του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, κυψελιδικά και βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα, κερατινοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα του καρδιαγγειακού συστήματος [60, 80, 81]. Μετά τη σύνδεσή τους με τους συνδέτες, οι TLRs υποβάλλονται σε διαμορφωτικές αλλαγές που απαιτούνται για την ενεργοποίησή τους, μέσω της δράσης πρωτεϊνών-προσαρμογών.

Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν τέσσερα μόρια-προσαρμογείς που προσλαμβάνονται στους υποδοχείς τύπου Toll και συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των υποδοχέων ώστε να επιτευχθεί η ενδοκυττάρια σήμανση (**Εικόνα 4**) [80, 81]. Πρόκειται για τις πρωτεΐνες α) MyD88 (παράγοντας 88 μυελοειδούς διαφοροποίησης) [84, 85], β) TIRAP ή Mal (πρωτεΐνη ομοιάζουσα με τον προσαρμοστή του MyD88) [86], γ) TRIF γνωστή και ως TICAM1 (πρωτεΐνη που εμπεριέχει την TIR περιοχή και επάγει την ιντερφερόνη INF-β [87] και δ) TRAM γνωστή και ως TICAM2 (μόριο-προσαρμογέας σχετιζόμενος με την TRIF) [81]. Αυτές συνιστούν την τρίτη υποομάδα πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από την

ύπαρξη της κυτταροπλασματικής περιοχής TIR [80, 81]. Αρχικά, η MyD88 ήταν η μόνη γνωστή πρωτεΐνη στα θηλαστικά που περιείχε την ενδοκυττάρια μονάδα TIR [80, 81, 84, 85]. Στη συνέχεια, η αποκωδικοποίηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος έφερε στην επιφάνεια την αναγνώριση και των υπόλοιπων μορίων. Επίσης, η πρωτεΐνη SARM (πρωτεΐνη στερούμενη α-μοτίβων και εμπεριέχουσα μοτίβα αρμαντίλο) περιγράφηκε ως αναστολέας της TRIF που περιέχει την TIR υπομονάδα (**Εικόνα 4**) [88].

Συνολικά, πρέπει να αναφερθεί πως το σήμα κατατεθέν των υποδοχέων που χαρακτηρίζονται από τις κυτταροπλασματικές περιοχές TIR είναι: η μέσω φωσφορυλίωσης ενεργοποίηση της οδού των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs): p38, ERK1/2 (κινάση που ρυθμίζεται από εξοκυτταρικά σήματα), JNK (τελική κινάση του αμινοτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun) κ.α και η σηματοδότηση μέσω ενεργοποίησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) [80-83]. Το αναφερόμενο περίπλοκο μονοπάτι σηματοδότησης οδηγεί στη σύνθεση ποικίλων προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών.

### 2.1.3 Ιστορική αναδρομή για την IL-33

Η IL-33 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1999 ως προϊόν της κωδικοποίησης (DV27 πρωτεΐνη) του μέχρι τότε άγνωστου *DVS27* γονιδίου, η οποία υπερεκφραζόταν σε εγκεφαλικές αρτηρίες σκύλου που βρισκόταν σε αγγειοσύσπαση ακόλουθης υπαρχνοειδούς αιμορραγίας [89]. Το 2003 περιγράφηκε εκ νέου ως ο πρώτος πυρηνικός παράγοντας που εκφραζόταν στα ενδοθηλιακά κύτταρα μετατριχοειδικών φλεβιδίων (nuclear factor from high endothelial venules, NF-HEV)



ανθρωπίνων χρονίως φλεγμαινουσών αμυγδαλών [90]. Σ αυτή τη μελέτη το *DV27* γονίδιο των σκύλων θεωρήθηκε το ορθόλογο γονίδιο του ανθρώπινου *NFHEV* γονιδίου [90]. Έκφραση *DV27* ανιχνεύθηκε ακολούθως και σε καλλιεργούμενα λεία μυϊκά κύτταρα που διεγείρονταν από κυτοκίνες όπως η *IL-1* ή η ιντερφερόνη  $\gamma$  (*INF- $\gamma$* ). Ωστόσο ο μηχανισμός δράσης της νεοανευρισκόμενης πρωτεΐνης παρέμενε άγνωστος. Τελικά, το 2005, οι Schmitz και συν. [82] και Dinarello και συν. [78], σε αναζήτηση βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αναγνώρισαν την ανωτέρω πρωτεΐνη ως μέλος της υπερικογένειας της *IL-1*. Την εποχή εκείνη δόθηκε το επίσημο όνομα “ιντερλευκίνη 33” (*IL-33*) [82] ή *IL-1F11* ακολουθώντας τη σειρά της ονοματολογίας των μελών της υπερικογένειας της *IL-1* που υποδείκνυε ότι δεν επρόκειτο απλά για ένα λειτουργικό αντίγραφο της *IL-1 $\alpha$*  και *IL-1 $\beta$* , αλλά για μια διακριτή πολυλειτουργική πρωτεΐνη [78, 79, 82]. Οι *DVS27*, *NF-HEV* και *IL-33* εμφάνιζαν 100% ταυτόσημη αλληλουχία αμινοξέων, περιέγραφαν λοιπόν τα ίδιο μόριο [78, 79, 82]. Επίσης, από τους ίδιους ερευνητές περιγράφηκε ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός δράσης της *IL-33* και στοιχειοθετήθηκε ότι αποτελεί τον προσδέτη του μέχρι τότε ορφανού, σχετιζόμενου με την *IL-1* υποδοχέα καταστολής της ογκογένεσης τύπου 2, *ST2* (suppression of tumorigenicity 2 receptor) [82].

## **2.1.4 Μοριακά χαρακτηριστικά της *IL-33***

Το γονίδιο της ανθρώπινης *IL-33* (*IL33*) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p24.1 [82, 91]. Οι αλληλουχίες cDNA της ανθρώπινης *IL-33* κωδικοποιούν ένα πολυπεπτίδιο πλήρους μήκους 270 αμινοξέων με μοριακό βάρος 30 kDa [91]. Το γονίδιο της *IL-33* του αρουραίου βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19qC1. Οι αλληλουχίες cDNA της *IL-33* αρουραίου κωδικοποιούν πολυπεπτίδιο πλήρους μήκους 266

αμινοξέων και με υπολογιζόμενο μέγεθος 29.9 kDa [91]. Η IL-33 του ανθρώπου και του αρουραίου είναι 55% ταυτόσημες σε επίπεδο αμινοξέων [82, 91]. Σε επίμυες, δύο διαφορετικοί προαγωγοί έχουν βρεθεί να εκκινούν τη μεταγραφή γονιδίου *IL33*. Τα μετάγραφα της IL-33, IL33a και IL33b, διαφέρουν στις 5'-αμετάφραστες περιοχές τους αλλά κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Η έκφραση των IL33a και IL33b μεταγράφων εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το είδος του ερεθίσματος [92-94].

Το ανθρώπινο *IL33* γονίδιο περιέχει οκτώ εξώνια, με το εξώνιο 1 να μην κωδικοποιεί και τα εξώνια 2-8 να κωδικοποιούν την πρωτεΐνη IL-33 [82, 92, 93] (**Εικόνα 5**). Εκτός από την πλήρους μήκους πρωτεΐνη ή πρόδρομη μορφή της IL-33 (pro-IL-33), έχουν ταυτοποιηθεί πολλές παραλλαγές ματίσματος της IL-33 σε ανθρώπινα κύτταρα. Έχει αναφερθεί εναλλακτικό μάτισμα μερικών η όλων των εξωνίων: 3, 4 και 5 [82, 92-95].

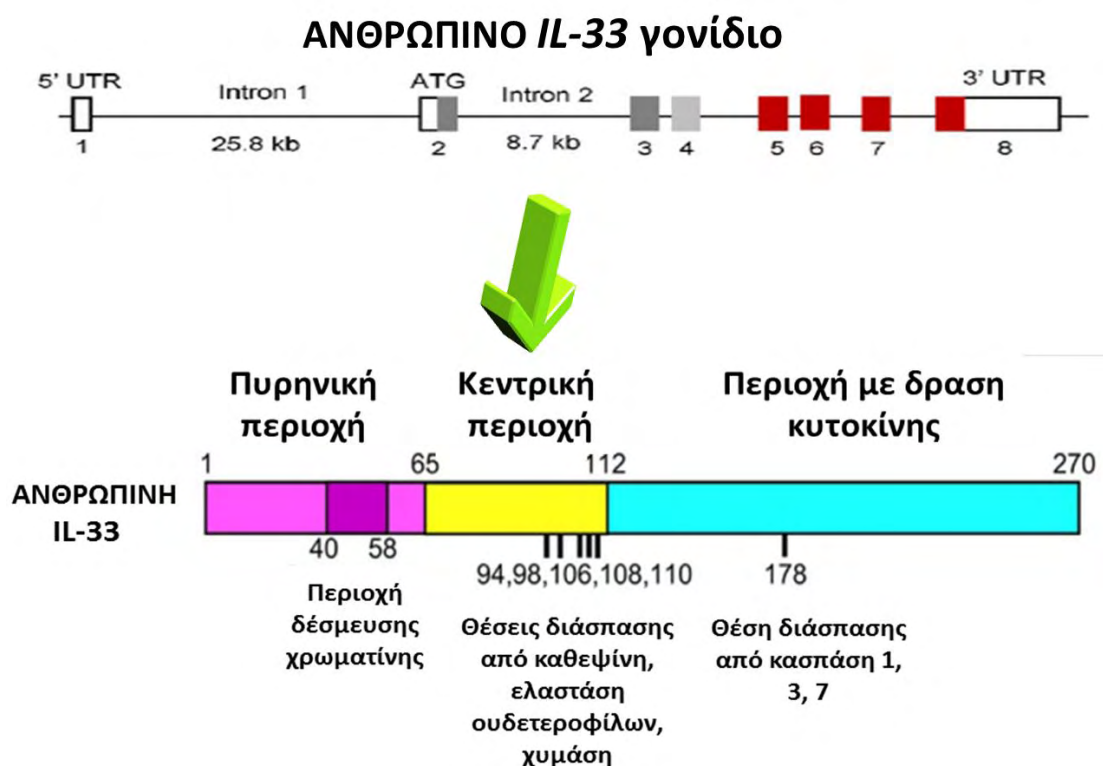
Η πρωτεΐνη IL-33 μπορεί να χωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές: την πυρηνική περιοχή, την κεντρική περιοχή και περιοχή κυτοκίνης τύπου IL-1 (**Εικόνα 5**) [95].

**Η πυρηνική περιοχή** (αμινοξέα 1-65 στους ανθρώπους) κωδικοποιείται από τα εξώνια 2-3 και περιέχει ένα μοτίβο δέσμευσης της χρωματίνης (αμινοξέα 40-58) [95-97]. Υπό βασικές συνθήκες, το μοτίβο δέσμευσης χρωματίνης συγκρατεί την πρωτεΐνη IL-33 στον πυρήνα αλληλεπιδρώντας με το ετεροδιμερές των H2A-H2B ιστονών [97].

**Η κεντρική περιοχή** (αμινοξέα 66-111 σε ανθρώπους) της IL-33 κωδικοποιείται από το εξώνιο 4 και περιέχει θέσεις διάσπασης από πρωτεάσες. Οι θέσεις αυτές είναι ευαίσθητες κυρίως σε πρωτεάσες ουδετεροφίλων και πρωτεάσες προερχόμενες από ιστιοκύτταρα–μαστοκύτταρα [98, 99]. Το N-τερματικό άκρο

(αμινοξέα 66-109) της κεντρικής περιοχής μπορεί να αλληλεπιδρά με τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ [100].

Τέλος, η περιοχή κυτοκίνης τύπου IL-1 (αμινοξέα 112-270 στους ανθρώπους) της IL-33 κωδικοποιείται από τα εξώνια 5-8, συνδέεται με τον υποδοχέα ST2 σε κύτταρα στόχους και ευθύνεται για τη δραστηριότητα κυτοκίνης που εμφανίζει η IL-33 εξωκυτταρίως [82, 101].

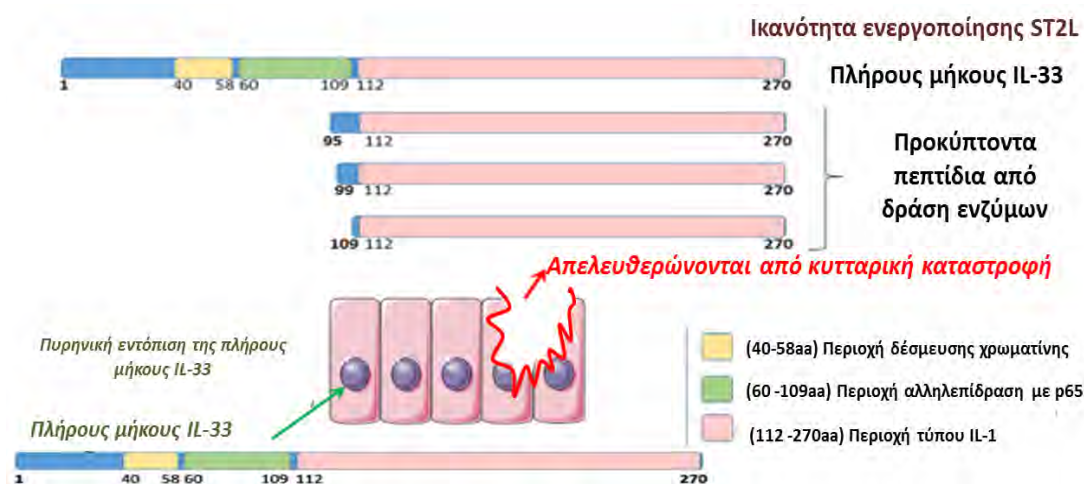


**Εικόνα 5.** Δομή ανθρώπινου *IL33* γονιδίου και ανθρώπινης IL-33. Το γονίδιο *IL33* περιέχει 8 εξώνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9 (9p24.1). Η ανθρώπινη IL-33 αποτελείται από δύο εξελικτικά διατηρημένες περιοχές, την πυρηνική περιοχή (nuclear domain) και περιοχή κυτοκίνης (cytokine domain) που διαχωρίζονται από την εξαιρετικά αποκλίνουσα κεντρική περιοχή (central domain). Το μοτίβο δέσμησης χρωματίνης και οι θέσεις διάσπασης από φλεγμονώδεις και αποπτωτικές πρωτεάσες (κασπάσες) υποδεικνύονται.

*Calrain, καλπαΐνη*

Τροποποιημένο από: Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev.* 2017;278:173-184.

Επιπλέον, έχουν περιγραφεί πολλές επεξεργασμένες (ώριμες) μορφές της IL-33 (Εικόνα 6). Για παράδειγμα *in vitro* επώαση της μεταφρασμένης IL-33 με κασπάση 1 οδήγησε στην παραγωγή μιας ώριμης μορφής (mature form) IL-33 με μοριακό βάρος 18 kDa. Το πεπτίδιο αυτό αποδείχθηκε στην πορεία του χρόνου πως είναι λειτουργικά ανενεργό (IL-33<sub>178-270</sub>) [82, 90, 91]. Αντίθετα, η επεξεργασία της πρωτεΐνης με πρωτεάσες ουδετεροφίλων οδηγεί σε εξαιρετικά δραστικές μορφές IL-33 (πχ IL-33<sub>95-270</sub>, IL-33<sub>110-266</sub>). Κατά τη διάρκεια της πρωτεολυτικής επεξεργασίας συνολικά, η IL-33 απωλεί τους τομείς πυρηνικού εντοπισμού και σύνδεσης με το DNA [82, 92, 93].



Μετάγραφα	Προέλευση	Λειτουργία
IL-33 <sub>1-270</sub>	Προμορφή - Μη επεξεργασμένη μορφή	Ιδιοσυστασιακά εκφράζεται και εδράζεται στον πυρήνα των ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων. Σχετίζεται με την ετεροχρωματίνη, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση κυτοκινών. Απελευθερώνεται κατά τη νέκρωση των κυττάρων παθητικά. Η μορφή αυτή είναι ικανή να ενεργοποιήσει τον διαμεμβρανικό υποδοχέα ST2L
IL-33 <sub>178-200</sub>	Προκύπτει από διάσπαση της πρωτεΐνης από την Κασπάση 1	Το πεπτίδιο αυτό είναι ανίκανο να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα ST2L
IL-33 <sub>95-270</sub>	Προϊόν επεξεργασίας από ελαστάσες ουδετεροφίλων	Η μορφή αυτή, ενισχύει τη δραστικότητα της IL-33
IL-33 <sub>99-270</sub>		
IL-33 <sub>109-270</sub>		

**Εικόνα 6.** Παραλλαγές της IL-33 ανάλογα με τις θέσεις διάσπασης της μη επεξεργασμένης μορφής (pro-IL-33) και αντίστοιχη λειτουργία των διαφόρων επεξεργασμένων (mature, ώριμων) μορφών της.

Τροποποιημένο από: De la Fuente M, MacDonald TT, Hermoso MA. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26:615-623.

## 2.1.5 Κυτταρική προέλευση της IL-33

Αν και η έκφραση της IL-33 αρχικά υποστηρίχθηκε ότι περιορίζεται μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι πλέον σαφές ότι εκφράζεται από ποικίλους ιστούς σε μεγάλη αφθονία [102-120]. Η IL-33 εκφράζεται από όλα τα κύτταρα ιστών-φραγμών, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών, ενδοθηλιακών κυττάρων, στρωματικών κυττάρων του γαστρεντερικού, μικρογλοιακών κυττάρων, λιποκυττάρων και οστεοβλαστών [91, 102-105] (Πίνακας 2). Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι η έκφραση της IL-33 μπορεί να επάγεται σε διάφορα ανοσοκύτταρα, όπως μακροφάγα, μαστοκύτταρα, DCs και γιγαντοκύτταρα [111-117]. Για παράδειγμα, η έκθεση σε διάφορα μικροβιακά συστατικά (PolyIC-TLR3 και flagellin-TLR5) φαίνεται πως αυξάνει την έκφραση της IL-33 τόσο σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς [118] όσο και σε μακροφάγα σε μοντέλα επίμυων [93, 117, 119, 120]. Ωστόσο, η λειτουργική σημασία της IL-33 που προέρχεται από ανοσοκύτταρα δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι η IL-33 που παράγεται από κύτταρα ιστού, και όχι εκείνη που παράγεται από ανοσοκύτταρα, είναι υπεύθυνη για την φλεγμονή του αεραγωγού που προκαλείται από αλλεργιογόνα [121]. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να καθορίσει αν η δραστηριότητα της αλαρμίνης διαφοροποιείται ανάλογα με το κυτταρική πηγή της.

## 2.1.6 Έκφραση της IL-33 στο αναπνευστικό σύστημα

Η IL-33 έχει θεωρηθεί ως μια αλαρμίνη που αποθηκεύεται και απελευθερώνεται γρήγορα ως απόκριση σε κυτταρική βλάβη ή τραυματισμό ιστού [103]. Ωστόσο στον ανθρώπινο αεραγωγό, παρατηρείται μια βασική έκκριση της IL-33 από βρογχικά επιθηλιακά και ιδίως από πνευμονοκύτταρα τύπου II (ATII) καθώς και ενδοθηλιακά κύτταρα φλεβιδίων τα οποία προτείνεται ότι συνιστούν κύριες πηγές

της αλαρμίνης στον πνευμονικό ιστό [108, 113, 122, 124]. Άλλες κυτταρικές πηγές της αλαρμίνης στο αναπνευστικό σύστημα είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών, τα μαστοκύτταρα, τα μακροφάγα, DCs, τα CD4+ T κύτταρα [122, 123]. Αντίθετα στους αρουραίους, υποστηρίζεται, πως η IL-33 δεν εκφράζεται ιδιοσυστατικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά η έκφρασή της διεγείρεται σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής [104, 122-123]. Η IL-33 αρουραίου εκφράζεται κυρίως από τα πνευμοκύτταρα τύπου II. Επιπρόσθετα, πηγή της IL-33 είναι τα αιμοπετάλια τόσο σε ανθρώπους όσο και αρουραίους [124]. Αυτές οι διαφορές των ειδών είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη όταν μεταφράζουμε τα αποτελέσματα πειραματικών μελετών με χρήση ζωικών μοντέλων [124].

Η άφθονη βασική έκφραση IL-33 στους ανθρώπινους ιστούς αυξάνεται περαιτέρω σε συνθήκες παρατεταμένης φλεγμονής ή στρες όπως για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια λοιμώξεων αναπνευστικού από ιό της γρίπη, έκθεση των αεραγωγών σε καπνό τσιγάρων ή σε αλλεργιογόνα [108, 111-116, 125-130].

### **2.1.7 Επεξεργασία και απελευθέρωση της IL-33**

Η δραστηριότητα της IL-33 ρυθμίζεται ανάλογα με το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο βρίσκεται και ανάλογα με τις βιοχημικές μεταβολές της (**Εικόνα 6**). Υπό βασικές συνθήκες, η IL-33 αποθηκεύεται στον πυρήνα του κυττάρου ως πρωτεΐνη πλήρους μήκους (IL-33<sub>1-270</sub>) [90, 131]. Το μοτίβο έλικα-στροφή-έλικα (Helix-Turn-Helix, HTH) αναγνωρίστηκε ως επικρατής τρόπος πρόσδεσής της στο DNA. Το ομοιοεπικρατές (homeodomain) μοτίβο στο N-άκρο της, είναι μείζονος σημασίας για τον πυρηνικό εντοπισμό της και τη σύνδεσή της με την ετεροχρωματίνη. Η πυρηνική σύνδεση προσδίδει στην πλήρους μήκους IL-33 την ιδιότητα να δρα ως μεταγραφικός καταστολέας, επιδρώντας στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB [91, 102, 131,

132] και εξασθενώντας την ενεργοποίηση γονιδίων που εκφράζουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες [91, 100]. Συγκεκριμένα, αναφέρεται πως στον πυρήνα δεσμεύει το N-τελικό άκρο της υπομονάδας p65 του NF-κB, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τη σύνδεση της υπομονάδας με την αλληλουχία της προαγωγού περιοχής, αναστέλλοντας τη μεταγραφή. Συνεπώς, ο πυρηνικός εντοπισμός της IL-33 παίζει ρόλο στην ομοίωση μέσω της τροποποίησης της έκφρασης γονιδίων και προλαμβάνει επιζήμιες επιδράσεις στον ξενιστή από υπέρμετρη έκκριση κυτοκινών. Η λειτουργία αυτή είναι αποκλειστική για την πρωτεΐνη IL-33 πλήρους μήκους. Υπάρχουν ωστόσο και αντιφατικές μελέτες που αναφέρουν ότι η αναστολή της έκφρασης (knock down) της πυρηνικής IL-33 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχει σαν αποτέλεσμα αυτά τα κύτταρα να παρουσιάσουν αναλλοίωτα πρωτεώματα και έκφραση NF-κB, υποστηρίζοντας ότι η ενδογενής πυρηνική IL-33 δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή μεταγραφή [134]. Ξεχωριστά, όταν το πλήρες μόριο βρίσκεται εξωκυτταρίως δρα ως αλαρμίνη μέσω σηματοδότησης με τον υποδοχέα ST2 [91, 102].

Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της IL-33 είναι ότι επεξεργασία της ολικού μήκους πρωτεΐνης που οδηγεί σε διάσπαση της κεντρικής περιοχής και απομάκρυνση των N-τερματικών πεπτιδίων (ώριμη μορφή), αυξάνει την εξωκυττάρια δραστηριότητά της κατά 30 φορές [91, 98, 99, 130]. Για παράδειγμα, όταν η περιοχή σύνδεσης της IL-33 στη χρωματίνη εξαλείφθηκε σε μοντέλο αρουραίου, η IL-33 απελευθερώθηκε εξωκυτταρίως, οδηγώντας σε ST2-εξαρτώμενη θανατηφόρο πολυσυστηματική ηωσινοφιλική και ουδετεροφιλική φλεγμονή [135].

Επιπλέον, οι εξωγενείς πρωτεάσες που προέρχονται από φλεγμονώδη κύτταρα, όπως η καθεψίνη G, ελαστάση ουδετεροφίλων και οι πρωτεάσες σερίνης των ιστιοκυττάρων, είναι ικανές να επεξεργάζονται την IL-33 προσδίδοντας

διαφορετική βιολογική δραστικότητα στο μόριο (**Εικόνα 6**). Πράγματι, αποδείχθηκε ότι όταν η IL-33<sub>1-270</sub> υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από την καθεψίνη G ή ελαστάση των ουδετεροφίλων, τα προκύπτοντα πεπτίδια (IL-33<sub>95-270</sub>, IL-33<sub>99-270</sub> και IL-33<sub>109-270</sub>) είχαν μεγαλύτερη βιολογική δραστικότητα από την προμορφή IL-33<sub>1-270</sub> (**Εικόνα 6**) [98, 99]. Δεν είναι ακόμη γνωστό αν και ποιες ενδογενείς πρωτεάσες έχουν παρόμοια ικανότητα διάσπασης της αρχικής προμορφής IL-33<sub>1-270</sub> [91, 98, 99]. Μία ενδογενής ασβεστιο-εξαρτώμενη πρωτεάση κυστεΐνης η καλπαΐνη (calpain) έχει επίσης εμπλακεί στην διάσπαση της προμορφής της IL-33 σε ώριμη μορφή (IL-33<sub>112-270</sub>). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο περιγραφόμενος μηχανισμός διάσπασης του πεπτιδίου σ αυτή την περίπτωση: το φλεγμονώδες ερέθισμα ή η στείρα φλεγμονή επί των στρωματικών κυττάρων οδηγεί σε αύξηση των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου είτε λόγω εισροής εξωκυττάρου ιόντος είτε ως προϊόν απελευθέρωσης από ενδοκυττάρια αποθήκη ασβεστίου, με αποτέλεσμα την περίσσεια ιόντων ασβεστίου που ενεργοποιούν την καλπαΐνη. Αυτή στη συνέχεια διασπά το πλήρες μήκους πεπτίδιο IL-33. Μέχρι στιγμής, δεν γνωρίζουμε εάν η διάσπαση της pro-IL-33 συμβαίνει στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή και στα δύο [136].

Επιπρόσθετα, οι κασπάσες που είναι ενεργές κατά τη διάρκεια της κυτταρικής απόπτωσης, όπως η κασπάση 3, 7 και η κασπάση 1, ρυθμίζουν με αντίθετο τρόπο τη δράση της IL-33 [137-139]. Πράγματι, η μη επεξεργασμένη πρωτεΐνη IL-33<sub>1-270</sub> περιέχει μία θέση διάσπασης από τις κασπάσες στην περιοχή κυτοκίνης της (cytokine domain) (**Εικόνα 4, 5**), αλλά σε αντίθεση με τις πρωτεάσες, οι κασπάσες αδρανοποιούν την IL-33 διαχωρίζοντάς την σε βιολογικά ανενεργά θραύσματα [91, 96, 138, 140, 141] (**Εικόνα 6**).

Συμπληρωματικά, η δράση της IL-33 *in vivo* ρυθμίζεται από μεταβολές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του μορίου. Όταν η πρωτεΐνη οξειδώνεται, υφίσταται



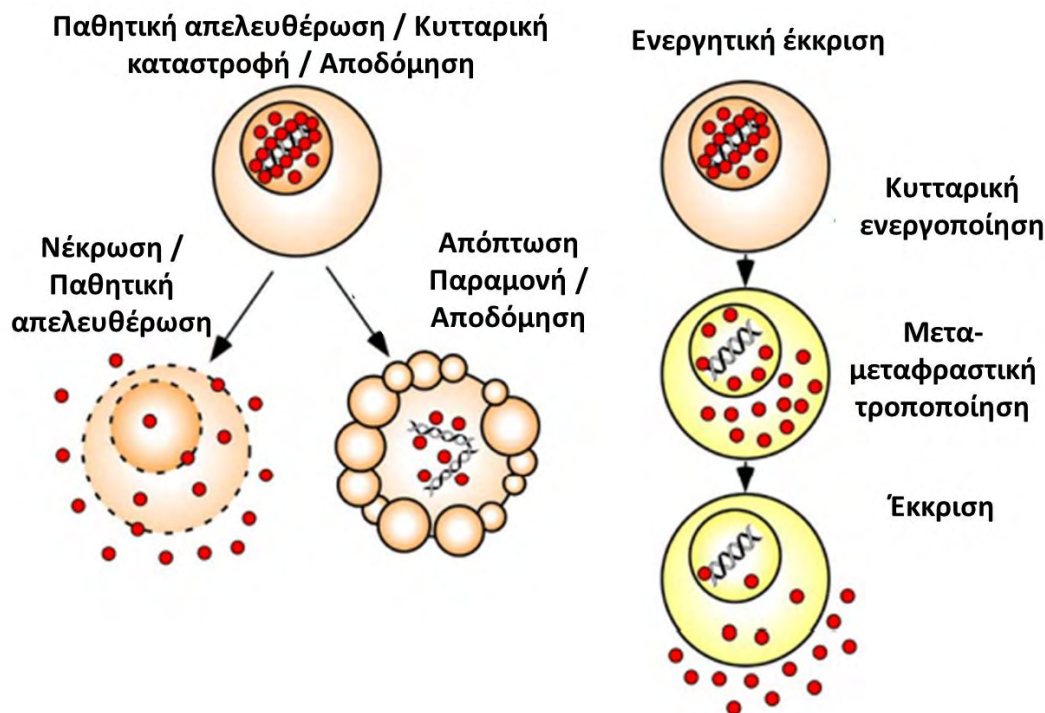
μια ταχεία μεταβολή της διαμόρφωσής της που περιλαμβάνει τον σχηματισμό δύο δισουλφιδικών δεσμών που μετατρέπουν την IL-33 από μια ενεργή μορφή σε μια ανενεργή πρωτεΐνη [78, 82, 91]. Έτσι υποστηρίζεται ότι η δραστηριότητα της IL-33 ρυθμίζεται ποικιλοτρόπως είτε με πρωτεολυτική διάσπαση είτε με οξείδωση [78, 82, 91, 103].

Όπως ήδη έχει περιγραφεί χαρακτηριστικά για όλες τις αλαρμίνες, η IL-33 μεταφέρεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον με δύο μηχανισμούς: α) παθητική απελευθέρωση μετά από κυτταρική καταστροφή και β) ενεργός έκκριση από ζώντα κύτταρα (**Εικόνα 1, Εικόνα 7**) [91, 142]. Η πυρηνική IL-33 απελευθερώνεται παθητικά κατά τη διάρκεια νέκρωσης όταν απωλεσθεί η ακεραιότητα της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής μεμβράνης [3, 33, 91, 96, 135]. Ξεχωριστά, η IL-33 μπορεί να εκκρίνεται από ζώντα κύτταρα υπό συνθήκες κυτταρικού στρες χωρίς κυτταρική καταστροφή [91]. Για παράδειγμα, όταν ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (Human Bronchial Epithelial Cells, NHBE) εκτέθηκαν σε αλλεργιογόνα (όπως εκχυλίσματα από μύκητα *Alternaria* ή ουρικό οξύ, παρατηρήθηκε η μετατόπιση της IL-33 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και η ακόλουθη εξωκυττάρια απελευθέρωση της πρωτεΐνης χωρίς εμφανή σημάδια κυτταρικού θανάτου [91, 143-147]. Επιπρόσθετα, διέγερση ανθρώπινων τραχειοβρογχικών επιθηλιακών κυττάρων από εξωγενές ATP που δρα ως DAMP, προκάλεσε μη κυτταροτοξική απελευθέρωση της IL-33 από τα συγκεκριμένα κύτταρα [91, 127, 138, 144]. Τέλος, η εφαρμογή μηχανικής καταπόνησης σε ανθρώπινους ιστούς, κατέληξε σε έκκριση IL-33 από τους ινοβλάστες απουσία κυτταρικής νέκρωσης [148]. Επομένως, είναι επιβεβαιωμένη η έκκριση IL-33 από τα επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών μετά από έκθεση αυτών σε εκχυλίσματα φυσικών αλλεργιογόνων τόσο *in vitro* και *in vivo*. Ας σημειωθεί ωστόσο ότι οι οδοί ενεργητικής έκκρισης δεν είναι μέχρι στιγμής πλήρως

κατανοητοί. Το βέβαιο είναι ότι δεν έχει ανιχνευθεί κάποια κλασική αλληλουχία σημάτων που μπορεί να κατευθύνει την κυτοκίνη IL-33 στην οδό έκκρισης μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου Golgi και εναλλακτικές μέθοδοι ενεργητικής έκκρισης διερευνώνται.

Πιθανοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί είναι οι εξής: η οξεία εξωκυττάρια συσσώρευση ATP, η ενεργοποίηση των P2 πουρινεργικών υποδοχέων και η επακόλουθη αύξηση των ενδοκυττάρων συγκεντρώσεων  $Ca^{2+}$  [91, 138, 139, 144]. Σημαντικός αριθμός μελετών υποστηρίζει ότι το ενδοκυττάριο ασβέστιο και οι P2 πουρινεργικοί υποδοχείς είναι βασικοί παράγοντες που επλέκονται στην έκκριση IL-33 από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών που εκτίθενται σε μυκητιασικά αλλεργιογόνα [139, 91]. Μάλιστα, η χορήγηση: χηλωτών  $Ca^{2+}$ , η κυτταρική θεραπεία με ανταγωνιστές του P2 πουρινεργικού υποδοχέα ή το γενετικό knockdown των P2 πουρινεργικών υποδοχέων, φάνηκε ότι αναστέλλουν την μετά από έκθεση σε μύκητα *Alternaria*, απελευθέρωση IL-33 από τα επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών [145, 147].

Η ενεργοποίηση του NLRP3 (nucleotide-binding domain leucinerich repeat-containing protein) φλεγμονοσώματος φαίνεται επίσης να διαδραματίζει ρόλο στην ενεργητική έκκριση της IL-33, καθώς το knockdown αυτού με χρήση υδροξειδίου του αργιλίου (alum soda), φάνηκε να οδηγεί σε εξασθενημένη έκκριση της IL-33 από τα μακροφάγα και ενεργοποίηση της αποπτωτικής κασπάσης 1 [149].



**Εικόνα 7.** Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την απελευθέρωση εξωκυττάριας IL-33. Η IL-33 που παράγεται ιδιοσυστατικά και αποθηκεύεται στον πυρήνα απελευθερώνεται παθητικά κατά τη διάρκεια νέκρωσης όταν τα κύτταρα χάνουν την ακεραιότητα του πλάσματος και της πυρηνικής μεμβράνης. Επίσης, μετά την απόπτωση, η IL-33 διατηρείται εντός των κυττάρων και απενεργοποιείται με τη δράση αποπτωτικών πρωτεασών, όπως η κασπάση 1, 3 και κασπάση 7. Εναλλακτικά, η κυτταρική καταπόνηση που προκαλείται από έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως πρωτεάσες και ATP, επάγει την κυτταρική ενεργοποίηση και τροποποίηση της πυρηνικής IL-33 για την απομάκρυνση της πυρηνικής και κεντρικής περιοχής. Η επεξεργασμένη IL-33 (ώριμη μορφή) που προκύπτει πιθανότατα εκκρίνεται δραστικά εξωκυτταρίως από τα δομικά κύτταρα

Τροποποιημένο από: Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev.* 2017;278:173-184.

Συνοπτικά, παραμένει άγνωστο υπό ποιες συνθήκες η IL-33 εκκρίνεται ως πρωτεΐνη πλήρους μήκους ή ως επεξεργασμένη (ώριμη) μορφή. Αρκετές μορφές της IL-33 ανιχνεύονται στους ιστούς του βλεννογόνου σε συνθήκες ηρεμίας και φλεγμονής [91, 150-152]. Επίσης απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστεί εάν οι επεξεργασμένες μορφές της IL-33 παράγονται από τις δράσεις ενδογενών πρωτεασών ή μόνο από εξωγενείς πρωτεάσες. Τέλος, οι οδοί ενεργητικής έκκρισης της IL-33 στο εξωκυττάριο διαμέρισμα χρήζουν περαιτέρω αποσαφήνισης.

## 2.2 Υποδοχέας ST2

### 2.2.1 Ιστορική αναδρομή

Ο υποδοχέας καταστολής της ογκογένεσης 2 (Suppression of tumorigenicity 2, ST2 ή IL-1RL1), ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το 1989 ως μια πρωτεΐνη που μοιραζόταν ομόλογη αλληλουχία με τον υποδοχέα της IL-1 [82, 153-156]. Το 2005, οι Schmitz και συν. αναγνώρισαν την IL-33 ως μοναδικό συνδέτη του ορφανού μέχρι τότε υποδοχέα ST2 [82]. Σύμφωνα με τη Human Gene Nomenclature Database ο ST2 αποτελεί μέλος της οικογένειας των υποδοχέων της IL-1 (αύξων αριθμός Genbank AC007248), εξού και η εναλλακτική ονομασία IL1RL1 (Interleukin-1 receptor-like-1). Κατ επέκταση, ο ST2 ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των υποδοχέων IL-1R/TLR [80, 83, 154-156].

### 2.2.2 Μοριακά χαρακτηριστικά του ST2

Το γονίδιο *ST2* ή *IL1RL1* (γονίδιο τύπου 1 σχετιζόμενο με τον υποδοχέα ιντερλευκίνης-1) αρχικά κλωνοποιήθηκε το 1989, από τον Tominaga, ως ένα από τα πρωτεύοντα γονίδια απόκρισης κατά τη μεταβατική φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου των κλωνικών κυττάρων BALB/c-3T3 (κλώνος A31), μετά από διέγερση με αυξητικούς παράγοντες [153]. Αργότερα χαρακτηρίστηκε ως *T1* γονίδιο που επάγεται στην NIH3T3 κυτταρική σειρά ινοβλαστών επίμυων ως ένα αντιδρών σε μιτογόνα γονίδιο μετά από την, υπό όρους, έκφραση των *HA-RAS* ΚΑΙ *V-MOS* ογκογονιδίων [157]. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός του ως ένα γονίδιο που ανταποκρίνεται στη δράση ενός εναλλακτικού υποκινητή του c-Fos, εκφραζόμενο ως ισόμορφο δεσμευμένο στην κυτταρική μεμβράνη [158, 159]. Το 1992, το *ST2* γονίδιο κλωνοποιήθηκε εκ νέου σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών επίμυων από ανεξάρτητη

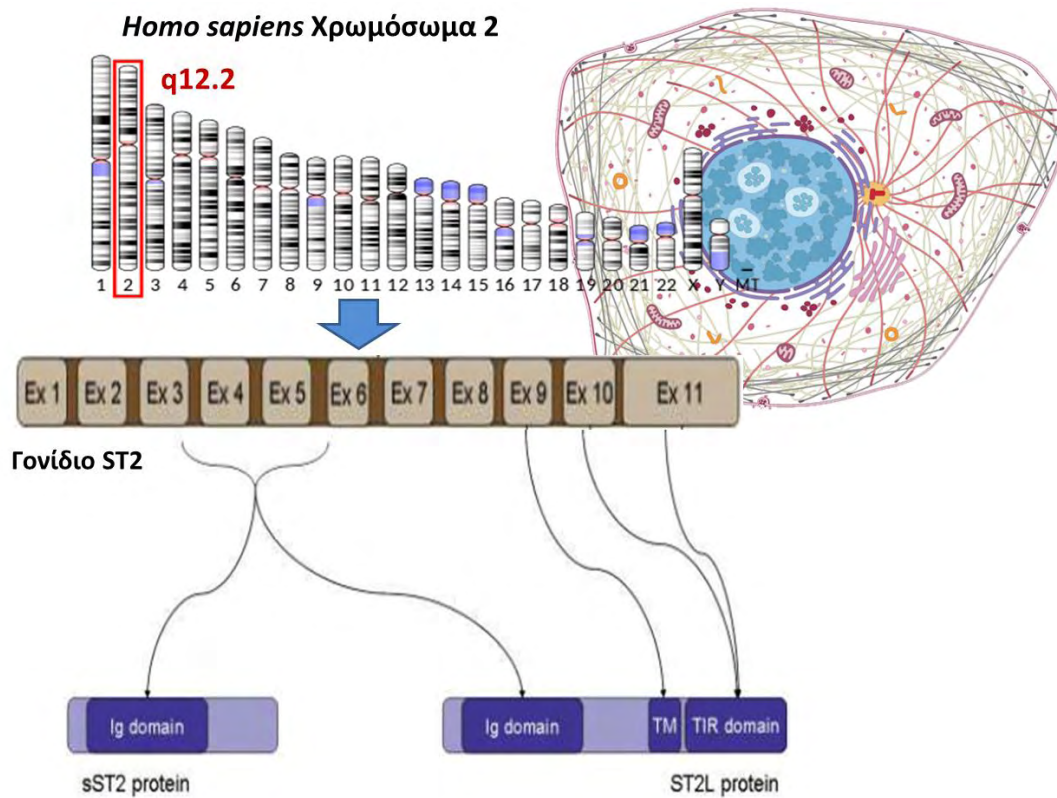
ομάδα ερευνητών, ως γονίδιο καθυστερημένης έγκαιρης αντίδρασης (Delayed early response gene), χαρακτηριζόμενο ως *DER4* [160].

Σύντομα περιγράφηκε ένα προϊόν μεταγραφής μεγέθους 2,7 kb που κωδικοποιούσε μία μη γλυκοζυλιωμένη εκκρινόμενη πρωτεΐνη μεγέθους περίπου 38 kD όπου εκ των υστέρων αποδείχθηκε ότι αντιπροσωπεύει τη διαλυτή ισομορφή του ST2, sST2 [161, 162]. Το 1993 αναγνωρίστηκε ένα προϊόν μεταγραφής μεγέθους 5 kb [163]. Το πρωτεϊνικό παράγωγο αυτού του μεταγραφικού προϊόντος αποδείχθηκε ότι ήταν ο διαμεμβρανικός υποδοχέας ST2L [163]. Μεταγενέστερα το 1994, πειράματα σε επίμυες αποκάλυψαν ότι δύο διαφορετικά mRNAs παράγονται από το *ST2* γονίδιο (ονομάστηκε *FIT1* γονίδιο στους επίμυες) μέσω μηχανισμού εναλλακτικού ματίσματος [159, 163]. Τα δυο ανιχνευθέντα mRNAs κωδικοποιούσαν μια διαλυτή πρωτεΐνη, την sST2 (Fit-1S σε επίμυες), και μια δεσμευμένη στην κυτταρική μεμβράνη πρωτεΐνη, την ST2L (Fit-1M σε επίμυες), αντίστοιχα. Η διαμεμβρανική μορφή περιείχε μια κοινή εξωκυττάρια περιοχή με τη διαλυτή sST2 [159, 163]. Μεταγενέστερα, το γονίδιο *ST2* ταξινομήθηκε δομικά ως μέλος της οικογένειας IL-1R λαμβάνοντας την ονομασία *ST2/IL-1RL1* [154] και επετεύχθη η κλωνοποίηση ενός γονιδίου που κωδικοποιούσε τη διαμεμβρανική μορφή του ST2 (ST2L) και στον άνθρωπο [154]. Στην πορεία περιγράφηκε σαφέστερα και μια νέα ST2V ισομορφή του υποδοχέα [164].

Παράλληλα, το *ST2* γονίδιο αποδείχθηκε ότι εκφράζεται σε Th2 και όχι Th1 κύτταρα, υποδηλώνοντας ότι ο υποδοχέας ST2 έχει έναν εξέχοντα ρόλο στην ανοσοαπόκριση και την εκκίνηση Th2 μεσολαβούμενων ανοσοαποκρίσεων [165, 166]. Ερευνητικές ομάδες συμπληρωματικά κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο sST2 πιθανόν να παρακωλύει την αλληλεπίδραση μεταξύ του ST2L και του υποθετικού, άγνωστου μέχρι τότε, συνδέτη του, με αποτέλεσμα τη μείωση των τελούμενων από τα

κύτταρα Th2 λειτουργιών [165]. Ανέπτυξαν μάλιστα πρώιμα την εικασία ότι η προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος που δεσμεύει τον sST2 ή η χρήση πρωτεΐνης σύντηξης ST2-IgG που δεσμεύει τον υποθετικό προσδέτη, δυνητικά θα μπορούσε να αναστείλει την Th2 ανοσοαπόκριση [165, 166].

Το γονίδιο *ST2* (*T1*, *Fit-1*, *DER4*, *IL1RL1*) βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 2q12.2. Πολλαπλοί προαγωγείς του ανθρώπινου *ST2* γονιδίου έχουν ανιχνευθεί [159, 167-173]. Η έκφραση του ρυθμίζεται κυρίως μέσω μεταγραφικών ρυθμίσεων σε δύο υποκινητές, έναν άπω και έναν εγγύς υποκινητή που καθορίζουν την έκφραση των ST2L, sST2 και ST2V ισομορφών [167] (**Εικόνα 8**). Συγκεκριμένα, ο άπω υποκινητής δρα στα αιμοποιητικά κύτταρα, τα ιστιοκύτταρα και βασεόφιλα, ενώ ο εγγύς δρα στους ινοβλάστες [167, 171]. Πρόσφατα έχει περιγραφεί πως οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA1 και GATA2 ελέγχουν τη μεταγραφή του ανθρώπινου *ST2* γονιδίου επιδρώντας στον άπω υποκινητή, ο πρώτος εμποδίζοντας και ο δεύτερος επάγοντας τη μεταγραφή, αντίστοιχα [170]. Αντίθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας GATA 3 ενεργοποιεί τον υποκινητή του *ST2* γονιδίου στα T κύτταρα επίμυων [171]. Άλλες μελέτες εμπλέκουν τον μεταγραφικό παράγοντα PU.1 στη μεταγραφή του *ST2* στα βασεόφιλα/μαστοκύτταρα, υποστηρίζοντας πως δρουν συνεργικά με το συμπλεγμα GATA 1/2 [169]. Επίσης, πολυμορφισμοί στην περιοχή του εκάστοτε υποκινητή έχουν συσχετισθεί με φλεγμονώδεις διαταραχές, για παράδειγμα, ένας μοναδικός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) 226999 A/G έχει ανιχνευθεί στην ατοπική δερματίτιδα [172].



**Εικόνα 8.** Σχηματική απεικόνιση της δομής των ιντρονίων-εξωνίων του *ST2* ή *IL1RL1* (*Interleukin 1 receptor-like 1*) γονιδίου, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2. Επίσης, παρατίθεται σχηματικά η δομή της διαλυτής (sST2) και της διαμεμβρανικής (ST2L) ισομορφής. Διακρίνεται η εξωκυττάρια περιοχή των ανοσοσφαιρινών (Ig domain) που είναι κοινή στις δύο ισομορφές (sST2 και ST2L), καθώς και η διαμεμβρανική (TM) και η ενδοκυττάρια TIR περιοχή (TIR domain) που χαρακτηρίζει την οικογένεια των υποδοχέων Toll-like/IL-1, οι οποίες ανευρίσκονται μόνο στην ST2L ισομορφή.

Τροποποιημένο από: Kakkar R, Lee RT. *ST2 and adrenomedullin in heart failure. Heart Fail Clin.* 2009;5:515-527.

## 2.2.3 Ισομορφες του ST2

Το προϊόν κωδικοποίησης του *ST2/IL-1RL1* γονιδίου είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη ST2L [153, 154]. Συνολικά όμως υπάρχουν τρεις ακόμα ισομορφές του υποδοχέα [167-170, 174] (**Εικόνα 9**).

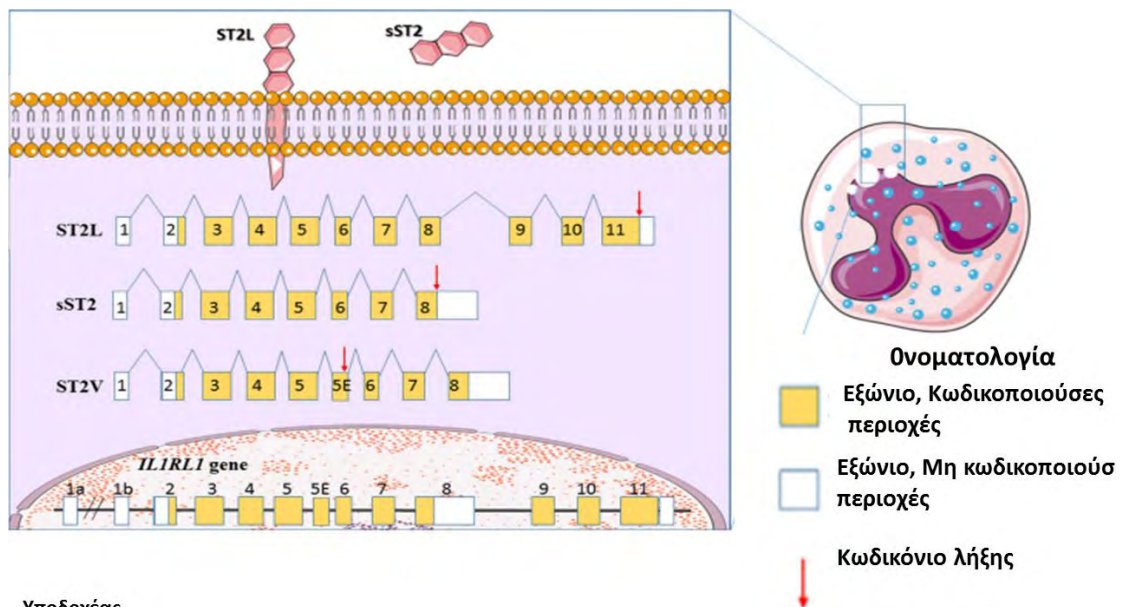
Αναλυτικά, οι 4 ισομορφές είναι:

- Η διαμεμβρανική ισομορφή του υποδοχέα **ST2L**, (επίσης γνωστή ως IL1RL1-b, T1M), που είναι ομόλογη με τους υποδοχείς της IL-1. Συνίσταται από μια εξωκυττάρια περιοχή που αποτελείται από 3 συνδεδεμένες περιοχές ανοσοσφαιρίνης G (IgG), μία μονήρη διαμεμβρανική περιοχή και μία σχετικά ευμεγέθη ενδοκυττάρια TIR περιοχή, ομόλογη με αυτή που ανευρίσκεται στους υποδοχείς της ομάδας Toll-like/IL-1Rs υποδοχέων[154, 159, 163] .
- Ο **sST2** (soluble ST2) διαλυτός υποδοχέας που είναι μια διαλυτή εκκρινόμενη ισομορφή (IL1RL1-a, T1S) που αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή ταυτόσημη με την ST2L ισομορφή, αλλά στερείται της διαμεμβρανικής και κυτταροπλασματικής μονάδας. Περιλαμβάνει μια μοναδική C-τελική αλληλουχία εννέα και πέντε επιπλέον αμινοξέων σε επίμυες και ανθρώπους, αντίστοιχα. Η sST2 ισομορφή δρα σαν υποδοχέας-παγίδα που δεσμεύει την ελεύθερη IL-33 εμποδίζοντας την ενδοκυττάρια σήμανση [159, 161-163, 174].
- Ο **ST2V** υποδοχέας (IL1RL1-c), που είναι μια ισομορφή παρόμοια με τον sST2 αλλά με απώλεια της ομάδας Ig από την εξωκυττάρια περιοχή [164, 175]. Το εναλλακτικό μάτισμα στο C-καρβοξυτελικό άκρο του ST2 δημιουργεί μια μοναδική υδρόφοβη ουρά [164]. Ενώ οι ST2 και sST2 ισομορφές εκφράζονται ευρέως σε όλους τους ιστούς, η έκφραση του ST2V περιορίζεται κυρίως στο στόμαχο, το λεπτό έντερο και το κόλον [164]. Ο ακριβής ρόλος του ST2V *in vivo* απαιτεί



διερεύνησης, πιθανολογείται ωστόσο πως εμπλέκεται στην τροποποίηση της σηματοδότησης του συμπλέγματος IL-33/ST2L [164].

- Τέλος, ο **ST2VL** υποδοχέας στερείται του διαμεμβρανικού τομέα της ST2L ισομορφής και έχει περιγραφεί αποκλειστικά στο είδος *Gallus-gallus* και όχι στον άνθρωπο [176]. Εκκρίνεται από τους ιστούς των οφθαλμών, της καρδιάς, των πνευμόνων και του ήπατος των πουλερικών και εμφανίζεται στα μεταγενέστερα στάδια εμβρυογένεσης. Άλλες πληροφορίες σχετικά με το ST2LV δεν είναι γνωστές μέχρι στιγμής [176].



#### Υποδοχέας

ST2L	Εναλλακτική σύζευξη	Δημιουργείται ετεροδιμερές σύμπλοκο του διαμεμβρανικού υποδοχέα με το IL-1RAcP ως απάντηση στην IL-33 σηματοδότηση
sST2	Εναλλακτική σύζευξη	Εξωκυττάριο τμήμα πανομοιότυπο με αυτό του ST2L, αλλά με 5 επιπλέον αμινοξέα. Δρα ως υποδοχέας-παγίδα, μειώνοντας την IL-33 σηματοδότηση. Τα μετρούμενα επίπεδα έχουν προγνωστικό χαρακτήρα σε ορισμένα νοσήματα

Εικόνα 9. Οι τρεις κυριότερες ισομορφές υποδοχέα ST2. Όλες οι ισομορφές παράγονται μέσω εναλλακτικών οδών ματίσματος και 3' επεξεργασίας με προσθήκη πολυαδενυλικών ομάδων σε διαφορετικές θέσεις της 3' περιοχής του γονιδίου στο επίπεδο του προαγωγέα.

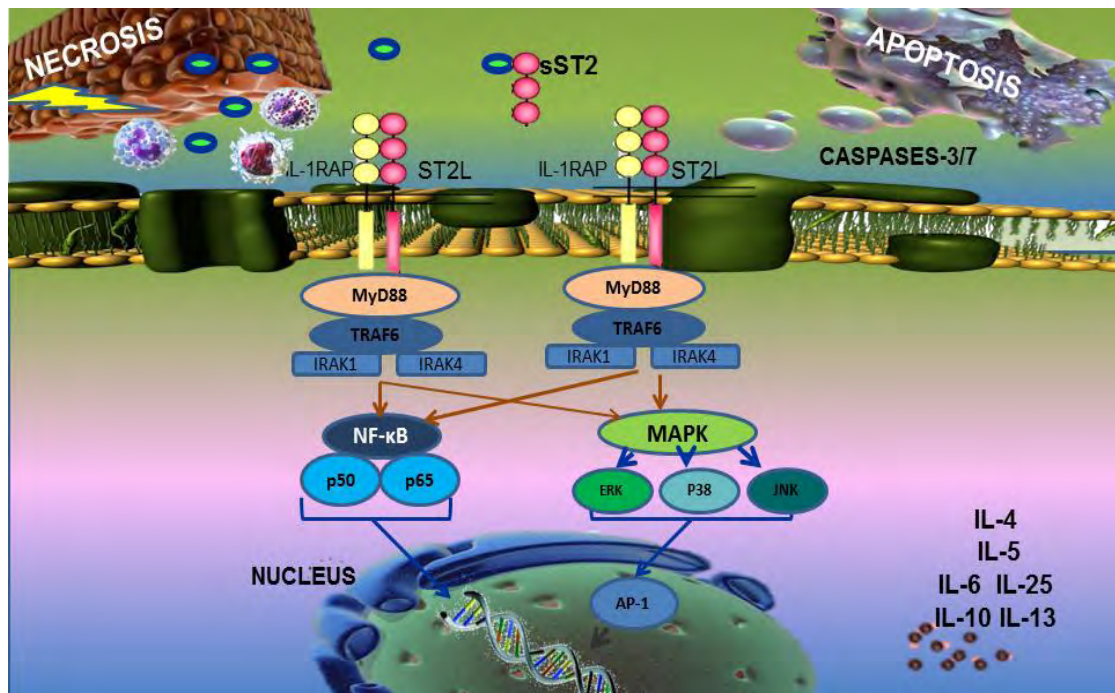
Τροποποιημένο από: De la Fuente M, MacDonald TT, Hermoso MA. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26:615-523.

## 2.2.4 Κυτταρική προέλευση του ST2

Οι IL-33 και ST2 έχουν διαφορετική κυτταρική προέλευση. Ο υποδοχέας ST2 εκφράζεται κυρίως από ανοσοκύτταρα που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία, συμπεριλαμβανομένων των: μαστοκυττάρων/ιστιοκυττάρων [165, 177], λεμφοειδών κυττάρων τύπου 2 (ILC2s) [178, 179], μακροφάγων [180], DCs [181], ηωσινοφίλων [182, 183], βασεοφίλων [183, 184], φυσικών κυττάρων φονέων (NK) [184] και φυσικών φονέων T κυττάρων (NKT) [184]. Επιπλέον, ο υποδοχέας εκφράζεται και από κύτταρα που εμπλέκονται στην επίκτητη ανοσία, δηλαδή από τα CD4+ [185], CD8+ T λεμφοκύτταρα [110, 186] και από τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Regulatory T cells, Tregs) [187, 188].

## 2.3 Ο άξονας IL-33/ST2

Από την ανακάλυψη της IL-33 μέχρι σήμερα, έχει σημειωθεί τεράστια πρόοδος στην κατανόηση των βιολογικών λειτουργιών της αλαρμίνης καθώς και του άξονα IL-33/ST2. Η δέσμευση της IL-33 με τον ST2L οδηγεί σε μεταβολή της αρχιτεκτονικής διαμόρφωσης του υποδοχέα και δημιουργία ετεροδιμερούς συμπλόκου με τη IL-1RacP (συμπληρωματική πρωτεΐνη του υποδοχέα της IL-1) (**Εικόνα 10**) [189-191]. Οι Palmer και συν., τεκμηρίωσαν ότι η IL-33 συνδέεται άμεσα με τον ST2L και όχι με την IL-1RacP [189]. Το επακόλουθο αυτής της σύνδεσης είναι η ενεργοποίηση του MyD88/NF-κB σηματοδοτικού καταρράκτη [82, 187-192] και η μέσω φωσφορυλίωσης ενεργοποίηση των κινασών της οικογένειας MAPKs: p38, ERK1/2, και JNKs [82, 190, 191]. Τελικό αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση χημειοκινών και κυτοκινών της Th2 ανοσιακής απάντησης [190-195] (**Εικόνα 10**).



**Εικόνα 10.** Σχηματική απεικόνιση του άξονα σηματοδότησης IL-33/ST2 και του επαγόμενου ενδοκυττάριου καταρράκτη.

Η ιντερλευκίνη (IL)-33 είναι ο προσδέτης του υποδοχέα ST2L. Η σύνδεση της IL-33 στον ST2L πυροδοτεί την ενεργοποίηση του NF-κB και της πρωτεΐνης AP-1, που με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στις διαδικασίες της φλεγμονής, της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Η IL-33 προσδένεται στον ST2L, ο οποίος ετεροδιμερίζεται με την IL-1RacP και ακολούθως σηματοδοτεί με τη δράση των προσαρμογέων MyD88, IRAK και TRAF6. Απαιτείται η παρουσία του TRAF6 για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης p38, της c-Jun N-τελικής κινάσης και του παράγοντα NF-κB, όχι όμως και για την ενεργοποίηση των ERK κινασών. Η έκφραση του TRAF6, που εμφανίζει ειδικότητα για κάθε κυτταρικό τύπο, καθορίζει την ενεργοποίηση συγκεκριμένων κάθε φορά οδών του σηματοδοτικού καταρράκτη IL-33/ST2. Τα στρωματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των ενδοθηλιακών και επιθηλιακών κυττάρων καθώς και ορισμένα ανοσοκύτταρα, εκκρίνουν τη διαλυτή μορφή του ST2 (sST2) ως απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες και φλεγμονώδη ερεθίσματα. Ο sST2 είναι ένας υποδοχέας-αναστολέας ή υποδοχέας εξουδετέρωσης (decoy receptor) που παρεμποδίζει τη σύνδεση της IL-33 με τον ST2L.

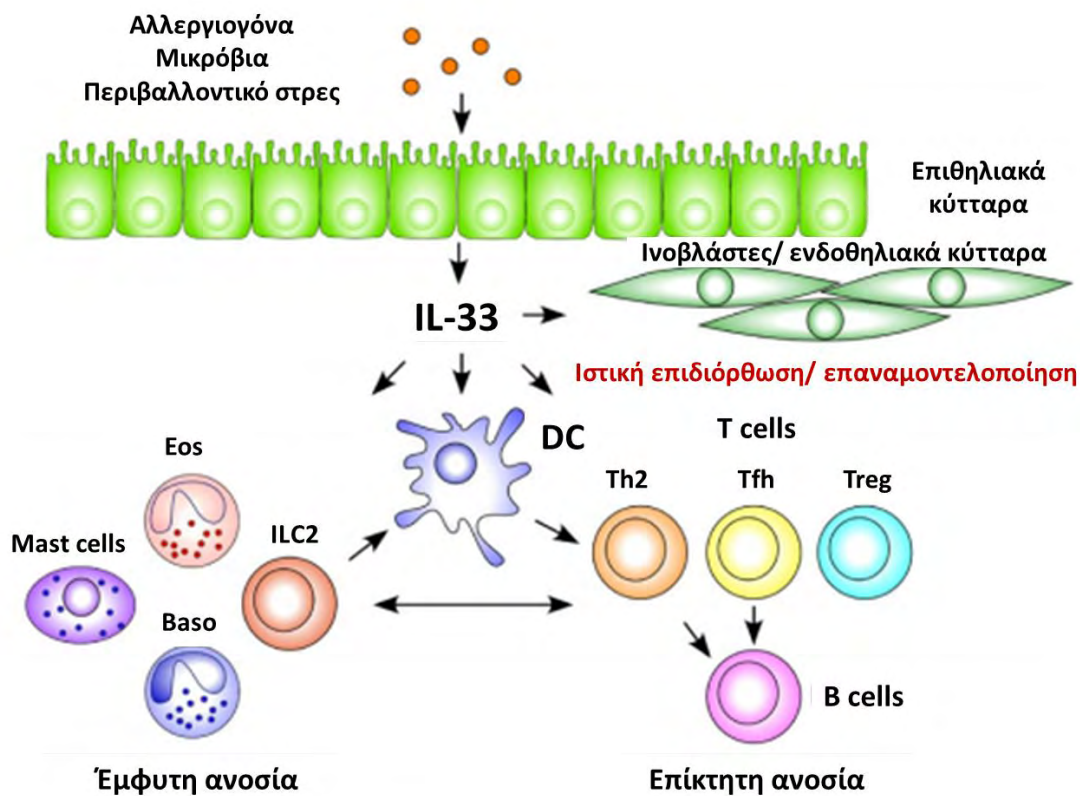
**Συνομογραφίες:** *AP-1*, activator protein, πρωτεΐνη ενεργοποιητής 1, *ERK*, Extracellular Signal-regulated Kinase; Κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά σήματα; *Caspases*, κασπάσες; *IL-RacP*, IL-1 receptor accessory protein, βοηθητική πρωτεΐνη του υποδοχέα της IL-1; *IRAK*, IL-1 receptor-associated kinase, κινάση σχετιζόμενη με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1; *JNK*, c-Jun N-terminal kinases; πρωτεϊνικές κινάσες του αμινοτελικού

άκρου του μεταγραφικού παράγοντα *c-Jun*, **MAPKs**, *mitogen-activated protein kinase*, ενεργοποιημένων από μιτογόνο πρωτεϊνικών κινασών; **MyD88**, *Myeloid differentiation primary response 88*, παράγοντας μυελοειδούς διαφοροποίησης 88; **NF-κB**, *nuclear factor kappa b*, πυρηνικός παράγοντας κB; **ST2L**, διαμεμβρανικός υποδοχέας ST2; **sST2**, *soluble ST2*, διαλυτός υποδοχέας ST2; **TRAF6**, *TNF receptor associated factor 6*, παράγοντας 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF

Από την άλλη πλευρά, πολλές μελέτες καταδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο του διαλυτού υποδοχέα sST2 στην καταστολή της φλεγμονής [165, 196, 197]. Η προφλεγμονώδης δράση της σηματοδοτικού οδού IL-33/ST2L μπορεί κάτω από ορισμένες συνθήκες να αναχαιτίζεται από τον sST2 με ευεργετικό ή βλαπτικό αντίκτυπο (**Εικόνα 10**) [197, 198]. Σε μαστοκύτταρα που εξέφραζαν τον ST2L και τη βοηθητική πρωτε IL-1RAcP, ο sST2 ανέστειλλε την παραγωγή της IL-6, μιας κατ'εξοχήν προφλεγμονώδους Th2 κυτοκίνης η έκφραση της οποίας επάγεται από την IL-33, υποδεικνύοντας την ικανότητα του sST2 να καταστέλλει τις Th2 ανοσιακές απαντήσεις ως υποδοχέας παγίδευσης-εξουδετέρωσης (decoy receptor) της IL-33 [189]. Αξιοσημείωτο είναι ότι υψηλά επίπεδα sST2 έχουν ανευρεθεί σε πληθώρα νοσημάτων όπως σε ασθενείς με ενεργό ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, οξεία απόρριψη αλλομοσχεύματος, σε καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος, σε ιογενείς γαστρεντερίτιδες, καρδιακή ή αναπνευστική νόσο [187, 197]. Από την άλλη πλευρά έχει φανεί ότι ενώ η χορήγηση ανασυνδυασμένης IL-33 προστατεύει το μυοκάρδιο από την υπερτροφία και την ίνωση σε καλλιέργειες νεογνικών μυοκαρδιακών κυττάρων, ο sST2 προκαλεί απώλεια των αντιυπερτροφικών ιδιοτήτων της IL-33 στις ίδιες καλλιέργειες κυττάρων, αναχαιτίζοντας τη δράση της αλαρμίνης [199]. Συνεπώς, η δράση του υποδοχέα sST2 μπορεί να έχει ευεργετικό ή επιβλαβές αντίκτυπο [200-202].

## 2.4 Βιολογικές λειτουργίες του άξονα IL-33/ST2

Η σύνδεση της IL-33 με τον ST2L διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης, επισκευή και αναδιαμόρφωση των ιστών και εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία μεγάλου αριθμού ανθρώπινων ασθενειών [130, 187, 192, 200-202]. Πιο συγκεκριμένα, κατευθύνει τις ανοσολογικές απαντήσεις ενισχύοντας την έμφυτη ανοσιακή απάντηση [125, 145, 203-205], επιστρατεύοντας το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα [110, 186] και συμμετέχοντας στη χρόνια και επίμονη φλεγμονή των ιστών και αεραγωγών. (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11.** Οι ρόλοι της IL-33 στην ανοσιακή απάντηση στους βλεννογόνους. Η έκθεση σε αλλεργιογόνα, μικρόβια και περιβαλλοντικό στρες επάγει την απελευθέρωση της IL-33 από τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών που συνιστούν την κύρια κυτταρική πηγή της IL-33 [ιδίως τα πνευμονοκύτταρα τύπου II (ATII)]. Η IL-33 ενεργοποιεί τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος (συμπεριλαμβανομένων των ILC2s, βασεόφιλων, ηωσινοφίλων και μαστοκυττάρων) καθώς και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος (Th2, Tfh, Treg). Μία συνεχής αλληλεπίδραση υπάρχει μεταξύ των κυττάρων των δυο συστημάτων, ενώ τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ αυτών. Τα δενδριτικά κύτταρα οδηγούν σε Th2 διαφοροποίηση των CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων. Τελικά, η

χρόνια φλεγμονώδης απάντηση οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές στην αρχιτεκτονική των αεραγωγών.

**Συνομογραφίες:** *Baso*, Βασεόφιλα; *DC*, δενδριτικά κύτταρα; *Eos*, Ηωσινόφιλα, *ILC2*, έμφυτα λεμφοειδή κύτταρα τύπου 2; *Treg*, T ρυθμιστικά κύτταρα; *Tfh*, θυλακιδώδη βοηθητικά T κύτταρα

Τροποποιημένο από: Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev.* 2017;278:173-184.

## 2.4.1 Ο άξονας IL-33 / ST2 στην έμφυτη ανοσιακή απάντηση

Στις θέσεις επιθηλιακού φραγμού η IL-33 αποτελεί μια σημαντική κυτοκίνη που συμβάλλει στην άμεση έναρξη ανοσοαποκρίσεων κατά των εισβαλλόντων παθογόνων και ποικίλων περιβαλλοντικών αντιγόνων. Μάλιστα στους αεραγωγούς, έχει παρατηρηθεί πως η απελευθέρωση της IL-33, ως απάντηση στην έκθεση σε αλλεργιογόνα, είναι άμεση. Για παράδειγμα, σε πρόσφατη μελέτη, όταν πειραματικά μοντέλα επίμυων εκτέθηκαν σε μυκητιασικά αλλεργιογόνα (παπαΐνη και βρομελίνη), διαπιστώθηκε πως η IL-33 απελευθερώθηκε ταχέως στον αεραγωγό εντός 1 ώρας και η μεταγραφή του IL-33 mRNA στους πνεύμονες ενισχύθηκε εντός 6 ωρών [91, 143, 146, 203]. Η σημασία του άξονα IL-33/ST2 στην αλλεργική φλεγμονή των αεραγωγών έχει αποδειχθεί από πληθώρα μελετών [91, 105, 203, 205]. Για παράδειγμα, η έκθεση στην παπαΐνη, στην αλτενάρια, στον ιό της γρίπης προκαλεί οξεία Th2 φλεγμονή των αεραγωγών που σε σημαντικό βαθμό διαμεσολαβείται από τον άξονα IL-33/ST2 [114, 119, 203, 206]. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι ταχείες ανοσοαποκρίσεις που προκαλούνται από την IL-33 παρατηρούνται ακόμη και εν απουσία των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας [91, 143, 146, 203]. Για παράδειγμα, η IL-33-επαγόμενη διέγερση των βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων οδήγησε σε παραγωγή Th2 κυτοκινών και ηωσινοφίλων στους αεραγωγούς επίμυων παρόλλο που

είχαν έλλειμμα T και B κυττάρων [205]. Ο κρίσιμος ρόλος του άξονα στις αλλεργικές αντιδράσεις των αεραγωγών έχει καταδειχθεί από πολυάριθμες σειρές πειραματικών μελετών που προκάλεσαν έλλειμμα του ST2 ή της IL-33 [143, 146, 203, 206, 207].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο πρωταρχικός στόχος της IL-33 στον αεραγωγό είναι τα ILC2s που εμπλουτίζουν τους βλεννογόνους και τις επιφάνειες-φραγμούς (**Εικόνα 11**) [105, 108, 113, 114, 123, 151, 185, 203, 208]. Έχει φανεί πως αν και ο αριθμός των ILC2 κυττάρων είναι μικρός στον αεραγωγό των επίμυων, τα ILC2s πολλαπλασιάζονται και παράγουν μια μεγάλη ποσότητα κυτοκινών τύπου 2, όπως η IL-5 και η IL-13, ως απόκριση στην IL-33.

Εντούτοις, εκτός από τα ILC2s, η IL-33 μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει και άλλα ανοσοκύτταρα όπως τα μακροφάγα, ηωσινόφιλα, ιστιοκύτταρα και βασεόφιλα (**Εικόνα 11**) [91, 129, 177-184, 209 -211]. *In vitro* μελέτες αποδεικνύουν ότι η IL-33 οδηγεί στην ενεργοποίηση και παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών, Th2 κυτοκινών και χημειοκινών από όλους αυτούς τους τύπους κυττάρων, δεδομένου ότι τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τον ST2L [91, 129, 177-184, 209, 211]. Χαρακτηριστικά, η απόκριση των ανθρώπινων ηωσινοφίλων στην IL-33 περιγράφεται πιο ισχυρή συγκριτικά με αυτή που προκαλείται από τη δράση της IL-5 [182]. Ακόμα, στα IL-33-διεγερμένα μαστοκύτταρα πυροδοτείται αυξημένη απελευθέρωση ισταμίνης στην πρόιμη φάση της αλλεργικής ρινίτιδας [212]. Επίσης η IL-33 σε αεραγωγούς επίμυων οδηγεί σε μια εξαρτώμενη από IL-13 πόλωση M1 μακροφάγων συμβάλλοντας στην ενίσχυση της φλεγμονής των αεραγωγών [91, 129].

Τοιουτρόπως, η άμεση απελευθέρωση IL-33 από το κατεστραμμένο επιθήλιο των αεραγωγών λόγω έκθεσης σε αλλεργιογόνα ή άλλα ερεθίσματα, επάγει την έμφυτη Th2 ανοσία μέσω αλληλεπίδρασης κυρίως με τα ILC2s καθώς και με άλλα εγγενή ανοσοκύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος [91].

## 2.4.2 Ο άξονας IL-33/ST2 στην επίκτητη ανοσιακή απάντηση

Ο ρόλος του άξονα IL-33/ST2 στην επίκτητη ανοσία είναι πολύ καλά μελετημένος [118, 125, 143, 213]. Γενικά, η IL-33 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας μέσω δύο οδών. Πρώτον έμμεσα, μέσω ενεργοποίησης εγγενών ανοσοκυττάρων, όπως των DCs και των ILC2s, τα οποία μεταφράζουν τα σήματα της έμφυτης ανοσίας στα κύτταρα του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος [185] και δεύτερον μέσω άμεσης ενεργοποίησης των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας δια του IL-33/ST2L άξονα σηματοδότησης [213].

Όσον αφορά την πρώτη οδό, η ικανότητά των DCs να ανταποκρίνονται στα DAMPs, φέροντας κατάλληλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς και η ακόλουθη αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα της ενδογενούς ανοσίας είναι καλά αναγνωρισμένη. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο μέσω της αντιγονοπαρουσίασης στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των παρθένων CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων [25, 71-73, 181, 213, 214] προς έναν Th2 φαινότυπο, επαγόντας και υποστηρίζοντας ταυτόχρονα την κυτταροτοξική δράση των CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων, συνιστώντας έναν θεμελιώδους σημασίας συνδετικό κρίκο ανάμεσα στην έμφυτη και επίκτητη ανοσία [25, 31, 68, 71-73]. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες αναφέρουν ότι αν και η βασική έκφραση του υποδοχέα επιφανείας ST2L είναι σχετικά χαμηλή σε DCs, η διέγερση με IL-33 επάγει την έκφραση του υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Έχει φανεί πως η μετανάστευσή τους στους περιοχικούς λεμφαδένες καθοδηγεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των παρθένων CD4<sup>+</sup> T κύτταρων προς ένα Th2 κυτταροκινικό προφίλ όταν τα DCs εκτίθενται σε IL-33 [181]. Επιπρόσθετα η ωρίμανση, μετανάστευση και δράση των DCs



παρατηρήθηκε να είναι εξασθενημένη σε επίμυες με ανεπάρκεια του υποδοχέα ST2, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αλλεργιογόνα [214].

Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψιν την ταχεία και μαζική παραγωγή ορισμένων κυτοκινών από τα ILC2s, αναγνωρίζεται η πιθανότητα έμμεσα να προωθούν τη διαφοροποίηση των T βοηθητικών κυττάρων [185, 215]. Είναι γνωστό επίσης ότι τα ILC2s ενεργοποιούν πρώτον τα DCs ώστε να ασκήσουν τη δράση τους επί των T-κυττάρων και δεύτερον τα NK κύτταρα ώστε να παράγουν INF- $\gamma$  κατευθύνοντας προς έναν Th2 και Th1 κυτταροκινικό φαινότυπο, αντίστοιχα [185]. Πέραν του προαναφερθέντος ρόλου, οι άμεσες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ILC2 και των λεμφοκυττάρων επίσης υποστηρίζονται από μελέτες [99, 113, 114, 123, 150, 151, 185, 207]. Ο ρόλος τους στην Th2 απάντηση είναι ευκρινής. Έχει παρατηρηθεί πως η εξάντληση των ILC2s εξασθενεί σημαντικά την Th2 απόκριση που αναμένεται μετά από έκθεση σε παπαΐνη [215]. Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα επίμυων υποστηρίζουν το βασικό ρόλο των IL-33-ενεργοποιημένων ILC2s στη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των CD4<sup>+</sup> T κυττάρων προς ένα Th2 κυτταροκινικό προφίλ με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [215-217]. Μάλιστα παρατηρήθηκε πως η κοινή μεταφορά τόσο πληθυσμού ILC2 όσο και CD4<sup>+</sup> T κυττάρων, οδήγησε σε επαγωγή μιας ισχυρής αντιγόνο-ειδικής Th2 φλεγμονής των αεραγωγών, η οποία δεν παρατηρήθηκε όταν μεταφέρθηκε κάθε πληθυσμός κυττάρων ξεχωριστά εντός των αεραγωγών.

Όσον αφορά τη δεύτερη οδό με την οποία ο άξονας IL-33/ST2 εμπλέκεται στην επίκτητη ανοσία, έχει φανεί ότι τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα εκφράζουν περιορισμένο αριθμό ST2L υποδοχέων στην επιφάνειά τους [165]. Ο αριθμός των υποδοχέων αυξάνεται υπό την επίδραση της IL-33, καθιστώντας τα κύτταρα αυτά ικανά να ανταποκριθούν εξαιρετικά στη σύνδεση της αλαρμίνης. Όταν τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα

καλλιεργήθηκαν με IL-33, παρήγαγαν IL-5 και IL-13 [129, 218]. Σε μια άλλη μελέτη παρατηρήθηκε πως ενώ η εκθεση των αεραγωγών σε αβλαβή αντιγόνα, όπως η αιμοκυανίνη (keyhole limpet hemocyanin), προκάλεσε ανοσολογική ανοχή, όταν οι επίμυες εκτέθηκαν στα ίδια αντιγόνα σε συνδυασμό με την IL-33, ανέπτυξαν ισχυρή και μακροχρόνια Th2 CD4+ T ανοσοαπόκριση και παθολογία πνευμόνων [219], όπως ηωσινοφιλία των αεραγωγών, υπερπλασία του βλεννογόνου, υπεραντιδραστικότητα [220] και παραγωγή αντισωμάτων IgE [221, 222], δηλαδή παθοφυσιολογικά ισοδύναμα του άσθματος. Επίσης, σε *in vivo* μελέτες, φάνηκε ότι η IL-33 επήγαγε ταχέως την έκφραση της IL-4 σε CD4+ T κύτταρα [129, 218]. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική διότι η ενδογενής IL-4 φαίνεται να είναι κρίσιμη για τη διαφοροποίηση του Th2 CD4+ T κυττάρου, ενώ η εξάντληση της IL-4 οδηγεί στην ανάπτυξη Th17 CD4+ T κυττάρου [220].

Παράλληλα, πρόσφατες παρατηρήσεις έδειξαν ότι η IL-33 συμμετέχει στην ενεργοποίηση των θυλακιωδών βοηθητικών T (follicular helper T, Tfh) κυττάρων [223, 224]. Τα Tfh κύτταρα διακρίνονται από τα υπόλοιπα CD4+ T κύτταρα διαδραματίζοντας επιλεκτικό ρόλο στην ενορχήστρωση αποκρίσεων στο βλαστικό λεμφικό κέντρο, προάγοντας την ανάπτυξη B κυττάρων μνήμης μεγάλης διάρκειας ζωής [223, 224]. Πράγματι, η συνχορήγηση IL-33 και οβαλβουμίνης στην αναπνευστική οδό, οδήγησε σε δύο ξεχωριστά υποσύνολα CD4+ T κυττάρων, τύπου Th2 και τύπου Tfh, στον πνευμονικό ιστό [220]. Αποδείχθηκε ότι τα Th2 CD4+ T κύτταρα μεσολαβούσαν στην ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών και την παροδική παραγωγή αντιγόνου ειδικού IgE αντισώματος, ενώ τα κύτταρα Tfh μεσολαβούσαν στην παρατεταμένη παραγωγή IgE [220]. Είναι ενδιαφέρον ότι η ενεργοποίηση των Tfh CD4+ T κυττάρων απαιτήσε χαμηλότερες δόσεις της IL-33 σε σύγκριση με εκείνες που απαιτήθηκαν για την επαγωγή των Th2 CD4+ T κυττάρων.

Τα Treg κύτταρα εμπλέκονται επίσης στην ανοσολογική ομοιόσταση και στην ανοσολογική ανοχή απέναντι σε αβλαβή αντιγόνα [225-227]. Μια ιδιοσυστατική έκφραση ST2 παρατηρήθηκε σε υποσύνολα Treg κύτταρων σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων του πνεύμονα και του γαστρεντερικού. Όταν τα ST2+ T Treg κύτταρα, εκτέθηκαν σε IL-33, πολλαπλασιάστηκαν [228-230]. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι αυτά τα ST2+ T Treg κύτταρα εξέφραζαν τον παράγοντα μεταγραφής Th2 GATA3 [228-230]. Φάνηκε μάλιστα ότι αυτή η συνάπαρξη είναι σημαντική, καθώς τα διεγερμένα με IL-33 GATA3+ Treg κύτταρα, και όχι τα GATA3- Treg κύτταρα, εξέφραζαν mRNA και πρωτείνες IL-5 και IL-13 [130]. Η IL-33 επίσης ρυθμίζει τα Treg κύτταρα έμμεσα, μέσω ενεργοποίησης των ILC2s, DCs ή ιστιοκυττάρων καθώς αυτά τα κύτταρα παράγουν IL-2 που προάγει την ανάπτυξη και λειτουργία των Treg κυττάρων [231-233]. Περαιτέρω, χρησιμοποιώντας μια *in vitro* δοκιμασία συνκαλλιέργειας, η IL-33 αποδείχθηκε ότι εξασθενεί την ικανότητα των κυττάρων Treg να υποβοηθούν τον πολλαπλασιασμό των CD4+ T κυττάρων τελεστών [228, 229, 231-233]. Τέλος, έχει υποστηριχθεί ότι η IL-33 εμπλέκεται σε ανοσοαποκρίσεις που μεσολαβούν CD8+ T κύτταρα [186].

Συνοπτικά, στην επίκτητη ανοσία, η IL-33 ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα τη λειτουργία των CD4+, Tfh, Tregs και CD8+ T κυττάρων [213-233]. Η IL-33 μπορεί έμμεσα να προάγει και να ρυθμίζει την επίκτητη ανοσιακή απάντηση δια της μεσολάβησης ποικίλων κυτταρικών πληθυσμών (δια μέσω των DCs ή ILC2s), ανάλογα με τις συνθήκες έκθεσης και/ή το ιστικό περιβάλλον. Μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για την περαιτέρω αποσαφήνιση των μηχανισμών που η IL-33 υπαγορεύει την κατεύθυνση αυτών των ανοσολογικών αποκρίσεων.

### 2.4.3 Άξονας IL-33/ST2 και χρόνια φλεγμονή αεραγωγών

Αναδυόμενα δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο άξονας IL-33/ST2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην οξεία αλλά και στη χρόνια, επίμονη φλεγμονή των αεραγωγών. Πειραματικά μοντέλα αλλεργικού άσθματος έχουν χρησιμοποιηθεί προς τεκμηρίωση αυτής της σύνδεσης δεδομένου ότι το άσθμα χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή, υπεραντιδραστικότητα και αναδιαμόρφωση των αεραγωγών [91, 234, 235]. Έχει φανεί λοιπόν πως η έκφραση της IL-33 αυξάνεται δραματικά κατά τη διάρκεια όχι μόνο της οξείας αλλά και της χρόνιας έκθεσης σε αλλεργιογόνα και συνοδεύεται από αύξηση του αριθμού CD4<sup>+</sup> T και ILC2s κυττάρων, στον πνευμονικό ιστό [91, 125, 151]. Σε επίμυες με ανεπάρκεια του υποδοχέα ST2 ή σε περιπτώσεις χορήγησης αντισώματος έναντι της IL-33, προκλήθηκε εξασθένηση των προκαλούμενων από αλλεργιογόνα ανοσοαποκρίσεων [91, 125, 151]. Συγκεκριμένα αποκαλύφθηκε ότι μετά από μακρά έκθεση στην IL-33, ο φαινότυπος του CD4<sup>+</sup> Th2 T κυττάρου τροποποιείτο περαιτέρω σε φαινότυπο CD4<sup>+</sup> Th2 κυττάρου "μνήμης" που θεωρείται εξαιρετικά παθογόνος. Ο συγκεκριμένος κυτταρικός φαινότυπος ενοχοποιείτο για την έκκριση IL-5 δια μέσω φωφορυλίωσης της MAPK p38, ως ακόλουθο της IL-33/ST2 σηματοδότησης [236]. Αντίθετα, οι IL33 -/- επίμυες έδειξαν εξασθενημένη ανάπτυξη των CD4<sup>+</sup> Th2 κυττάρων μνήμης και εξασθενημένη ηωσινοφιλική φλεγμονή των αεραγωγών [91, 236]. Στους ανθρώπους, τα Th2 κύτταρα μνήμης παίζουν κρίσιμους ρόλους στην καθοδήγηση και παθολογία της αλλεργικής βρογχικής φλεγμονής [91, 236, 237]. Μια άλλη μελέτη διατύπωσε ότι τα IL-33-ενεργοποιημένα ILC2s παραμένουν στους λεμφαδενικούς σταθμούς για αρκετές εβδομάδες ακόμη και χωρίς την παρουσία IL-33 [187, 238], με μακροχρόνιες επιπτώσεις ιδίως μέσω της παραγωγής IL-13 [187, 91, 151]. Η IL-13 είναι γνωστό ότι πυροδοτεί περαιτέρω τη δράση της IL-33 στο επιθήλιο της αναπνευστικής οδού [91,

151]. Τέλος, η IL-33 πιθανότατα μπορεί να προάγει μακροχρόνια Th2 φλεγμονή ενεργοποιώντας επι μακρόν βασεόφιλα και μαστοκύτταρα, όπως φαίνεται από την παρουσία αυξημένων βασεόφιλων και μαστοκυττάρων σε δείγματα πτυέλων και βιοψιών από αεραγωγούς ασθενών με άσθμα [91, 95, 239]. Συνοπτικά τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αυξημένη έκφραση της IL-33 στον πνεύμονα μπορεί να παίζει ένα ρόλο κλειδί στη διατήρηση της χρόνιας φλεγμονώδους απόκρισης των αεραγωγών.

#### **2.4.4 Άξονας IL-33/ST2 και επαναμοντελοποίηση αεραγωγών**

Η χρόνια φλεγμονή των αεραγωγών συνοδεύεται συχνά από αναδιαμόρφωση των αεραγωγών που χαρακτηρίζεται από αυξημένο πάχος τοιχώματος, πάχυνση λείων μυϊκών κυττάρων, μη φυσιολογική σύνθεση εξωκυττάριας ουσίας και αυξημένη αγγείωση και αγγειοδιαπερατότητα [240, 241]. Πολλοί κυτταρικοί πληθυσμοί και φλεγμονώδεις μεσολαβητές συμβάλλουν στην παθολογική διαδικασία της επαναμοντελοποίησης, ενώ πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει ο άξονας των IL-33/ST2L [240]. Για παράδειγμα, η χορήγηση αντισώματος έναντι του υποδοχέα ST2 ή ο γενετικός αποκλεισμός του υποδοχέα ST2 προκαλεί εξασθενημένη αναδιαμόρφωση των αεραγωγών επίμυων μετά από έκθεση σε αλλεργιογόνα [242, 243]. Επιπλέον, αναφέρεται πως η αναπάρκεια του ST2 υποδοχέα ή η χορήγηση αντισώματος έναντι της IL-33 ελαττώνει την πνευμονική ίνωση που προκαλείται από μπλεομυκίνη [244]. Η IL-33 μπορεί να ρυθμίζει την αναδιαμόρφωση του αεραγωγού διεγείροντας κατευθείαν τους ινοβλάστες για παραγωγή κολλαγόνου [127] ή μέσω της αναχαίτισης της δράσης των εναλλακτικά ενεργοποιημένων μακροφάγων M2 και των ILC2s [244]. Η IL-33 μπορεί επίσης να εμπλέξει Treg κύτταρα που μεσολαβούν στην αναδιαμόρφωση του αεραγωγού.

Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι τα Treg κύτταρα είναι απαραίτητα για την αποκατάσταση της βλάβης ορισμένων ιστών [187, 230, 245, 246]. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε πως μετά από μόλυνση από τον ιό της γρίπης, η απελευθερούμενη IL-33 προκάλεσε την παραγωγή αμφιρεγουλίνης, ενός επιδιορθωτικού παράγοντα, από τα κύτταρα Treg και ILC2s ώστε να επιτευχθεί η επισκευή του πνευμονικού ιστού [245-247]. Από τα ανωτέρω δεδομένα διαφαίνεται ο σημαντικός ρόλος του άξονα IL-33/ST2 στην αναδιαμόρφωση των αεραγωγών ως απότοκο της ανισορροπίας μεταξύ της εκτεταμένης φλεγμονής και της ιστικής αποκατάστασης.

Επιπροσθέτως, αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης IL-33 έχουν παρατηρηθεί στο επιφανειακά τραυματισμένο δέρμα (δοκιμασία wound healing), υποδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο της IL-33 δια μέσω της ST2L σηματοδότησης στην επούλωση τραυμάτων [248, 249]. Η ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου καταρράκτη MyD88/NF-κB οδηγεί στην επιστράτευση ποικιλών επιδιορθωτικών μηχανισμών μέσω Th2 ανοσιακής απάντησης [250].

Ο ρόλος του άξονα στην αναδιαμόρφωση του ιστού γίνεται καλύτερα κατανοητός, δεδομένων των κρίσιμων ανοσολογικών αποκρίσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη των ιστών. Αξιοσημείωτα, έχει αναφερθεί αυξημένη παραγωγή της επιθηλιακής IL-33 και συσσώρευση ILC2s κατά τη διάρκεια της περιόδου κυψελιδικής ανάπτυξης του πνεύμονα, δηλαδή κατά την περίοδο της μέγιστης αναδιαμόρφωσης του οργάνου [251].

Συμπερασματικά, όλο και περισσότερα δεδομένα φωτίζουν τους ρόλους της IL-33 και τους κυτταρικούς της στόχους, όπως τα ILC2s και τα Th2 κύτταρα μνήμης, σε ανθρώπινους αεραγωγούς. Μέσω της αναγνώρισης των εμπλεκόμενων μελών μπορούμε να κατανοήσουμε καλύτερα το ρόλο του άξονα στην φλεγμονή και στην

ιστική αποκατάσταση. Εξακολουθούν να υπάρχουν όμως ποικίλα ερωτήματα. Οι βιολογικές ιδιότητες της IL-33 δεν είναι πλήρως κατανοητές. Δεν είναι γνωστό ποια είναι η σταθερότητα και η δραστικότητα των ποικίλων ώριμων μορφών της IL-33, ή πως επηρεάζει το διαφορετικό οξειδοαναγωγικό status της πρωτεΐνης τα ανωτέρω. Οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες σχετικά με το εάν οι ποικίλες ανοσολογικές αντιδράσεις διαφοροποιούνται ανάλογα με την κυτταρική πηγή της IL-33 και το όργανο στο οποίο διαδραματίζεται η φλεγμονώδης αντίδραση. Επιπρόσθετα η εξιχνίαση των μηχανισμών κυτταρικής στρατολόγησης χρήζει περαιτέρω έρευνας.

## **2.5 Ο ρόλος του άξονα IL-33/ST2 στην πνευμονική νόσο**

Πολυάριθμα δεδομένα υπάρχουν σχετικά με τη συμμετοχή του άξονα IL-33/ST2 στην παθογένεια πολλών νοσημάτων του αναπνευστικού συστήματος [252-299]. Για παράδειγμα σε ασθενείς με άσθμα, η εξέταση προκλητών πτυέλων, ορού, και βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) έδειξε αυξημένη έκφραση mRNA και πρωτεΐνης IL-33. Αυξημένη έκφραση παρατηρήθηκε και στα επιθηλιακά κύτταρα βρογχικού ιστού [126, 151, 243, 252-262]. Τα επίπεδα της αλαρμίνης μάλιστα συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα της νόσου σε αυτές τις μελέτες [126, 151, 243, 252-260]. Η έκφραση ώριμης IL-33, συσχετίστηκε με έντονη Th2 φλεγμονή σε ασθενείς με άσθμα [95]. ]. Ειδικότερα, προτείνεται ότι IL-33 ενεργοποιεί τα ILC2s ώστε να εκκρίνουν Th2 κυτοκίνες σ αυτούς τους ασθενείς [262]. Μάλιστα ο αριθμός των ILC2s στο αίμα συσχετίστηκε θετικά με το μέγεθος της ηωσινοφιλίας των ιστών και τη κλινικά ασταθή νόσο [263 -266]. Μάλιστα, τα ILC2s τα οποία ανιχνεύθηκαν στους αεραγωγούς και στον ορό ασθενών με άσθμα ήταν πιο ευαίσθητα στην δράση της IL-33 σε σύγκριση με τα ILC2s των υγιών μαρτύρων [264-266]. Πρόσφατα, ο σηματοδοτικός καταρράκτης IL-33/θυμικής στρωματικής λεμφοποιητίνης (TSLP)–

βασεόφιλων-ILC2s-IL-5/IL-13 περιγράφηκε στην παθογένεια του άσθματος [95, 26-265]. Παρομοίως, τα επίπεδα του sST2 ανευρέθησαν αυξημένα στον ορό ασθενών με άσθμα [260, 261]. Συνολικά, η IL-33 εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία του άσθματος, και η μέχρι τώρα γνώση δικαιολογεί την ανάγκη ανεύρεσης φαρμακολογικών και βιολογικών παραγόντων που μπορούν να ελέγξουν τα επίπεδα της [252-267].

Επίσης, σύμφωνα με μια σειρά μελετών, η έκφραση ST2 mRNA, ST2 πρωτεΐνης και IL-33 mRNA είναι σταθερά αυξημένη στο ρινικό επιθήλιο ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα σε σύγκριση με υγιή άτομα [121, 128, 212, 268]. Ωστόσο, υπάρχουν αντιφατικές αναφορές σχετικά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης IL-33 [121, 128, 264]. και των ILC2s στους ασθενείς [264, 268-270]. Φαίνεται πως η βιοχημική φύση των ποικίλων αλλεργιογόνων μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των ILC2s και IL-33 στους πάσχοντες [121, 128, 264, 268-270].

Αυξημένη έκφραση mRNA και πρωτεΐνης IL-33 παρατηρήθηκε σε δείγματα ρινικής βιοψίας ασθενών με χρόνια παραρινοκολπίτιδα και ρινικούς πολύποδες που ήταν ανθεκτικοί στη θεραπεία [271-274]. Ομοίως, ο αριθμός των ILC2s στις βιοψίες του βλεννογόνων των κόλπων ήταν αυξημένος στους ανωτέρω ασθενείς [275]. Μάλιστα τα επίπεδα των ILC2s συσχετίστηκαν με τη σοβαρότητα των ρινικών συμπτωμάτων και παρουσίασαν μείωση μετά από συστηματική θεραπεία με κορτικοστεροειδή [275]. Επιπλέον, παρουσία της IL-33, οι ιστοί εμπλουτίστηκαν με υψηλή τιμή CD4<sup>+</sup> T κύτταρων σε ασθενείς με ηωσινοφιλική χρόνια παραρινοκολπίτιδα και ρινικούς πολύποδες [238, 276].

Ο άξονας εμπλέκεται και στη παθολογία της ΧΑΠ [127, 277]. Η IL-33 και ο sST2 ήταν αυξημένα σε δείγματα ορού ασθενών με ΧΑΠ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες [127, 277]. Επίσης, η έκφραση της IL-33 στα επιθηλιακά κύτταρα των



βρόγχων ήταν αυξημένη στους ασθενείς με ΧΑΠ [127, 277]. Η έκφραση των IL-33 και sST2 ενισχύθηκε σημαντικά στον πνευμονικό ιστό αρουραίων που εκτέθηκε σε καπνό τσιγάρου, σε συνδυασμό με αυξημένη διείσδυση ουδετερόφιλων και μακροφάγων, αυξημένη έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών [278]. Είναι σημαντικό ότι όλες οι παθολογικές μεταβολές εξασθένησαν μετά από χορήγηση εξουδετερωτικού αντίσωματος της IL-33 [278]. Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η IL-33 παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη φλεγμονή των αεραγωγών που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου [279]. Μία ακόλουθη μελέτη αναγνώρισε επίσης ότι η IL-33 εκφράζεται σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ως απόκριση σε κάπνισμα σε επίμυες [280]. Οι Kearley και συν., χρησιμοποίησαν έναν συνδυασμό καπνού τσιγάρου και μολύνσεως από παθογόνο προκαλώντας πρόδρομες παροξύνσεις ΧΑΠ σε ζωικά μοντέλα αποδεικνύοντας ότι η φλεγμονή είναι εντελώς εξασθενημένη απουσία σηματοδότησης από την IL-33, *in vivo* [108]. Οι συγγραφείς κατέληξαν επίσης στο συμπέρασμα ότι στη ΧΑΠ, ο καπνός μεταβάλλει το μικροπεριβάλλον του πνεύμονα για να διευκολύνει την IL-33-εξαρτώμενη φλεγμονώδη αντίδραση απέναντι στο λοιμώδες αίτιο, επιδεινώνοντας τελικά την ασθένεια [108]. Τα μειωμένα επίπεδα IL-33 έχουν επίσης συσχετισθεί με την έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας των ασθενών [281]. Η δυνατότητα στοχοθέτησης της IL-33 ως θεραπευτικής επιλογής στη ΧΑΠ έχει συζητηθεί πρόσφατα [282].

Η πνευμονική ίνωση είναι μια προοδευτική και απειλητική για τη ζωή ινοπολλαπλασιαστική ασθένεια. Η οδός IL-33/ST2 συμμετέχει στην ινωτική διαδικασία πολλών ζωτικών οργάνων, επιδρώντας στην αγγειογένεση, παραγωγή συστατικών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως εναπόθεση κολλαγόνου και στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial-mesenchymal transition, EMT) [283-

285]. Τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης IL-33 έχουν βρεθεί σημαντικά υψηλότερα στο BAL ασθενών με ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (interstitial pulmonary fibrosis, IPF) ή σκληρόδερμα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες [285-288]. Τα επίπεδα sST2 ομοίως αυξήθηκαν σχεδόν 7 φορές περισσότερο στον ορό ασθενών με IPF σε περιπτώσεις παροξύνσης [289, 290]. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση των επιπέδων sST2 με τα επίπεδα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) που συνιστά δείκτη ιστικής βλάβης και τα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) που συνιστά δείκτη συστηματικής φλεγμονής [291]. Επιπροσθέτως, οι Li και συν., έδειξαν ότι οι επίμυες με έλλειψη ST2 περιόρισαν την πνευμονική ίνωση που προκαλείται από μπλεομυκίνη και αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε επίσης μετά από θεραπεία με εξουδετερωτικά αντισώματα της IL-33 [244]. Είναι καλά εδραιωμένο ότι το προινωτικό αποτέλεσμα της IL-33 αποδίδεται κυρίως στην ικανότητα πόλωσης των μακροφάγων προς τον M2 φαινότυπο, αυξάνοντας έτσι την έκφραση των IL-13, TGF- $\beta$  που αποτελούν ισχυρούς ενεργοποιητές των ινοβλαστών, και συνεπώς διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου [122, 286, 290, 292, 293]. Έχει υποστηριχθεί πως ο ρόλος του IL-33/ST2 άξονα είναι πρωτίστως αντιφλεγμονώδης και αντιπολλαπλασιαστικός, εντούτοις η χρονιότητα μιας φλεγμονώδους διαδικασίας οδηγεί σε προινωτικά αποτελέσματα [122, 286, 290, 292, 293].

Ο άξονας IL-33/ST2 κατέχει κεντρικό ρόλο και στις περιπτώσεις λοιμώξεων του αναπνευστικού [294, 295]. Η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης για παράδειγμα, προκαλεί αυξημένη έκφραση της IL-33 από τα επιθηλιακά βρογχικά κύτταρα *in vivo* [294]. Το ιικό RNA που απελευθερώνεται μετά από καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων, οδηγεί σε ταυτόχρονη απελευθέρωση IL-33 από τα νεκρωμένα κύτταρα [294]. Τα ανοσοκύτταρα που επιστρατεύονται για την κάθαρση του ιού

απελευθερώνουν IL-13 που ενοχοποιείται για την αύξηση της βρογχικής υπεραντιδραστικότητας [294]. Τα ILC2s, Th2 και Tregs κύτταρα που είναι παρόντα εκφράζουν με τη σειρά τους αμφιρεγουλίνη (AREG) –μόριο που ανήκει στην οικογένεια του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα- η οποία επιδρά στην αποκατάσταση του πνευμονικού ιστού. Άλλη μελέτη έδειξε ότι σε πειραματικά ζωικά μοντέλα σήψης, η παραμονή του σηπτικού προφίλ συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sST2 ορού (συνδεδεμένα με την IL-33) και κατα συνέπεια χαμηλότερα επίπεδα ελεύθερης IL-33 υποδεικνύοντας τον ζωτικής σημασίας ομοιοστατικό ρόλο της αλαρμίνης στην αντιμετώπιση της συστηματικής φλεγμονής [296].

Επιπρόσθετα, ο ρόλος του άξονα IL-33/ST2 είναι σημαντικός στον καρκίνο του πνεύμονα. Η IL-33 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε καρκινικά κύτταρα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (non small cell lung cancer, NSCLC), υποστηρίζοντας μια πιθανή εμπλοκή της IL-33 στην ανάπτυξη και στο μεταστατικό δυναμικό του όγκου [297]. Τα αυξημένα επίπεδα IL-33 πλάσματος έχουν συσχετισθεί με το προχωρημένο στάδιο του καρκίνου του πνεύμονα. Αντίθετα, η μείωση των επιπέδων της IL-33 σηματοδοτεί τη μείωση του όγκου του πνεύμονα και αυτή η συσχέτιση μπορεί να αποδοθεί στη μείωση του βρογχικού επιθηλιακού ιστού και του αγγειακού ενδοθηλιακού ιστού ως πηγές της IL-33 [298]. *In vivo* προκλινικές μελέτες μαρτυρούν ότι η έκφραση της IL-33 συσχετίζεται θετικά με τον ανοσοϊστοχημικό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και ότι ο αποκλεισμός της IL-33 καταστέλλει την ικανότητα ανάπτυξης των ανθρωπίνων NSCLC κυττάρων σε ξενομοσχεύματα [298]. Συνολικά, η IL-33 λειτουργεί ως ένας εγγενής μοριακός μηχανισμός που υποστηρίζει την ανάπτυξη του NSCLC αλλά και ως ένας παράγοντας που προέρχεται από τον όγκο και που επιστρατεύει την ανοσολογική κάθαρσή του

[299]. Ο αποκλεισμός της IL-33 διαμορφώνει ένα περιβάλλον μειωμένης ανοσολογικής επιτήρησης όπως μαρτυράται από την κατάργηση της συσσώρευσης πολωμένων M2 μακροφάγων και Tregs κυττάρων [299].

Αντίθετα, οι Qin L και συν. έδειξαν ότι η συστηματική χορήγηση ανασυνδυασμένης IL-33 ανέστειλε *in vivo* σημαντικά την ανάπτυξη της λευχαιμίας και παρέτεινε την επιβίωση αυξάνοντας την παραγωγή IFN- $\gamma$  από τα λευχαιμικά CD8+ T κύτταρα που ανιχνεύτηκαν στο μικροπεριβάλλον του όγκου [300-302]. Επίσης ο ρόλος της IL-33 έχει μελετηθεί στον καρκίνο του μαστού, όπου τα αυξημένα επίπεδα της αλαρμίνης φαίνεται να προάγουν την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού μέσω μείωσης της ανοσολογικής επιτήρησης [303]. Τα ανωτέρω ευρήματα αναγνωρίζουν την IL-33 ως σημαντικό παράγοντα στην ανοσολογία του καρκίνου, δίνοντας έμφαση στη χρήση του ως έναν μελλοντικό θεραπευτικό αντικαρκινικό στόχο [299].

## **2.6 Ο ρόλος του άξονα IL-33/ST2 στην υπεζωκοτική νόσο**

Ο ρόλος της IL-33 και του υποδοχέα ST2 στην παθογένεση των υπεζωκοτικών συλλογών (ΥΣ) και οι επιπτώσεις τους στη λειτουργία των υπεζωκοτικών μεσοθηλιακών κυττάρων είναι ελάχιστα μελετημένα. Ο Lee και οι συν, πρώτοι το 2013, ανέφεραν ότι τα επίπεδα της IL-33 είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με φυματιώδη υπεζωκοτική συλλογή σε σύγκριση με αυτά των ασθενών με κακοήθεις ή παραπνευμονικές ΥΣ [304]. Οι Li και συν. στη συνέχεια ανέφεραν ότι η IL-33 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός βιοδείκτης σε συνδυασμό με την απαμινάση της αδενοσίνης (adenosine deaminase, ADA) για τη διάγνωση των φυματιωδών ΥΣ [305]. Σ αυτά τα πλαίσια, οι Xuan και συν. προτείνουν ότι τα επίπεδα της αλαρμίνης στο υπεζωκοτικό υγρό μπορούν ικανοποιητικά να

διακρίνουν τις φυματιώδεις από τις κακοήθειες ΥΣ όπου η συγκέντρωση IL-33 θα είναι υψηλή και χαμηλή, αντίστοιχα [306].

Η IL-33 ενισχύει την έκφραση της INF- $\gamma$ , μιας Th1 κυτοκίνης η οποία με τη σειρά της είναι γνωστό ότι παίζει κεντρικό ρόλο στον σχηματισμό του υπεζωκοτικού νεκρωτικού κοκκιώματος και στην προστασία έναντι του *Mycobacterium tuberculosis* [304, 307-317]. Είναι γνωστό ότι στις φυματιώδεις ΥΣ επικρατεί η Th1 έναντι της Th2 ανοσιακής απάντησης [307, 308]. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η παράδοξη προ-Th1 δράση της IL-33 στις φυματιώδεις ΥΣ μπορεί να εξηγηθεί πρώτον από την άμεση επίδραση της IL-33 επί των NKT κύτταρων που θα οδηγήσουν σε ένα Th1 κυτταροκινικό προφίλ [304, 307-317] και δεύτερον έμμεσα μέσω της IL-12-ενεργοποίησης των Th1 κυττάρων ώστε να παράγουν INF- $\gamma$  [304, 307-317]. Αντίστροφα, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η έκφραση της IL-33 επάγεται από την INF- $\gamma$  ή την TNF του υπεζωκοτικού υγρού οι οποίες παράγονται από Th1 κυτταρα, NKT και NK κύτταρα [38, 110, 307]. Εντούτοις, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση συνοψίζει ότι η μεμονωμένη χρήση της IL-33 δεν παρουσιάζει επαρκή ευαισθησία και ειδικότητα ως διαγνωστικός βιοδείκτης των φυματιωδών ΥΣ [318].

Συγχρόνως, οι Kwon και συν., διαπίστωσαν ότι στις ηωσινοφιλικές ΥΣ εξαιτίας πρωτοπαθούς αυτόματου πνευμοθώρακα, δηλαδή σε περιπτώσεις οξείας υπεζωκοτικής μη λοιμώδους αιτιολογίας φλεγμονής, τα επίπεδα της IL-33 στο υπεζωκοτικό υγρό ήταν σημαντικά αυξημένα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στην οποία ανήκαν ασθενείς με κακοήθη, φυματιώδη, παραπνευμονική και διδρωματική ΥΣ [319]. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε στη μηχανική καταπόνηση του υπεζωκότα και οδήγησε σε μια μη-Th2 αλλά ILC2-εξαρτώμενη ανοσιακή απάντηση με παραγωγή IL-5. Δεν εξακριβώθηκε σε αυτή την περίπτωση επομένως, η επιστράτευση της επίκτητης ανοσιακής απάντησης ως επιδιορθωτικός μηχανισμός. Έχει αποδειχθεί

άλλωστε ότι η καταπόνηση των ανθρώπινων ιστών, καταλήγει σε έκκριση IL-33 από τα επιθηλιακά κύτταρα απουσία κυτταρικής νέκρωσης [148].

Άλλες μελέτες που διερευνούν το ρόλο της IL-33 στην παθοφυσιολογία υπεζωκοτικών νοσημάτων αναφέρουν πως η χορήγηση της αλαρμίνης *in vivo* επάγει τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων στην υπεζωκοτική κοιλότητα στην οποία αυτά εδράζονται έτσι ώστε τελικά να αυτοδιατηρούνται χωρίς ανάγκη αναπλήρωσής τους από τα μονοκύτταρα του αίματος [320-323]. Πιο αναλυτικά, η IL-33 επιστρατεύει ηωσινόφιλα αλλά και τα ενεργοποιεί ώστε να παράγουν IL-4 η οποία ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό των μακροφάγων [324-326]. Επιπρόσθετα, η IL-33 επάγει Th2 αποκρίσεις μέσω των προϊόντων έκκρισης IL-5 και IL-13 από τα ILC2s κύτταρα [82]. Η κυτοκίνη IL-13 που παράγεται, συνιστά προσδέτη για τον υποδοχέα της IL-4 (IL-4Ra), οδηγώντας επίσης σ έναν ανεξάρτητο από την IL-4 πολλαπλασιασμό των μακροφάγων στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Έτσι, εντός της ορογόνου κοιλότητας παρατηρήθηκε μια IL-33-διαμεσολαβούμενη δυνατότητα ανάπτυξης εγγενών μακροφάγων σημαντικών για την αντιμικροβιακή και την επιδιορθωτική ικανότητά της. Επίσης, είναι γνωστό ότι όλες οι ορογόνες κοιλότητες αποτελούν σημαντικές δεξαμενές υποομάδων B κυττάρων, που ονομάζονται B1 κύτταρα, η κύρια λειτουργία των οποίων είναι η εξασφάλιση πρώιμης ανοσοπροστασίας από μόλυνση με ταχεία έκκριση της ανοσοσφαιρίνης IgM [330]. Στα πλαίσια αυτά έχει παρατηρηθεί ότι η IL-33 που παράγεται από το FALC κυτταρικό υπόστρωμα (δομές που υποστηρίζουν την ταχεία έμφυτη ανοσιακή απόκριση) έχει κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση των B1 κυττάρων των πετάλων του υπεζωκότα και στην ακόλουθη τοπική έκκριση IgM ανοσοσφαιρίνης.

Όσον αφορά τον υποδοχέα ST2, μελέτες υπάρχουν μόνο όσον αφορά τη διαλυτή μορφή του (sST2) [304, 331]. Συγκεκριμένα μια μελέτη ανέφερε σημαντικά

υψηλότερα επίπεδα sST2 σε κακοήθεις ΥΣ απ ότι στις φυματιώδεις και διδρωματικές ΥΣ [331]. Στην ίδια μελέτη φάνηκε ότι τα επίπεδα του ST2 mRNA συσχετίζονται θετικά με το ποσοστό των CD4+ T κυττάρων που απομονώνονται από κακοήθεις ΥΣ [331]. Έτσι προτάθηκε, ότι τα CD4+ T κύτταρα στην κακοήθη ΥΣ μετατοπίζονται προς έναν Th2 φαινότυπο [331, 332]. Η Th2 επικράτηση στις κακοήθεις ΥΣ μαρτυράται άλλωστε και από τις συγκεντρώσεις άλλων πιο διαδεδομένων κυτοκινών και συγκεκριμένα από τα χαμηλότερα επίπεδα της IL-12 και τα υψηλότερα επίπεδα της Th2 κυτοκίνης, IL-10 [331]. Επίσης οι συγγραφείς αναφέρουν υψηλότερα επίπεδα της Th2 κυτοκίνης, IL-4, κυτταρική πηγή των οποίων είναι τα CD4+ T κύτταρα [331]. Περαιτέρω, έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα από μεταστατικούς όγκους μαστού εκκρίνουν υψηλότερα επίπεδα sST2 συγκριτικά με τα πρωτογενή κύτταρα του όγκου [333]. Τα επίπεδα αυτά ανιχνεύονται υψηλά στον ορό και σχετίζονται με το μεταστατικό δυναμικό του όγκου [333]. Τέλος, τα υψηλότερα επίπεδα sST2 στο υπεζωκοτικό υγρό έχουν συσχετιστεί με τη σοβαρότητα της καρδιακής ανεπάρκειας [334] χωρίς ωστόσο μέχρι στιγμής να έχει τεκμηριωθεί η διαγνωστική ή θεραπευτική του αξία στη νόσο [335].

Συμπερασματικά, παρά το μικρό αριθμό μελετών, διαφαίνεται ότι η IL-33 είναι παρούσα σε περιπτώσεις μηχανικής καταπόνησης (ηωσινοφιλικές ΥΣ μετά από πνευμοθώρακα) της υπεζωκοτικής μεμβράνης [319]. Τα επίπεδα της IL-33 ανιχνεύονται αυξημένα στις περιπτώσεις φυματιωδών ΥΣ [305-307]. Εμπλέκεται στην ομοίωση της υπεζωκοτικής κοιλότητας μέσω αυτοδιατήρησης των μακροφάγων [324-326], ενεργοποίησης ηωσινοφίλων [319, 324-326] καθώς και ενεργοποίησης B1 κυττάρων ώστε να παράγουν IgM ανοσοσφαιρίνη. Όσον αφορά τον sST2 πιθανολογείται ότι σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής (κακοήθεις ΥΣ) μπλοκάρει τη σηματοδότηση μέσω του ST2L και δρα αμβλύνοντας τις

προστατευτικές δράσεις του IL33/ST2 άξονα, συνιστώντας επιπρόσθετα δείκτη μεταστατικού δυναμικού [331, 333]. Επίσης στις κακοήθειες ΥΣ (χρόνια φλεγμονή του υπεζωκότα), τα υψηλά επίπεδα sST2 ερμηνεύουν την πιθανή επικράτηση ενός Th2 κυτταρικού φαινότυπου [331, 332].



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Μελέτη του άξονα HMGB1/RAGE**

### **3.1 Πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1 – High mobility group box 1 protein -HMGB1.**

#### **3.1.1 Ιστορική αναδρομή**

Η πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1 (High mobility group box 1 protein, HMGB1) είναι μια μη ιστονική χρωμοσωμική πρωτεΐνη που απομονώθηκε από τους Goodwin και Johns το 1973, από το θύμο αδένα βοός [336]. Η «ομάδα υψηλής κινητικότητας» των πυρηνικών πρωτεϊνών οφείλει το όνομά της στις ιδιότητες ταχείας κινητικότητας που επιδεικνύουν αυτές κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου [30]. Οι ερευνητές που την ανακάλυψαν παρατήρησαν ότι ενώ πρόκειται μια ομάδα μικρών σε μοριακό βάρος πρωτεϊνών σε σύγκριση με τις ιστόνες, το σύνολο όλων των πρωτεϊνών αυτής της ομάδας συνιστούσε περίπου το 30% του συνολικού μοριακού βάρους του DNA [30, 337]. Η ποσότητά τους ήταν σχετικά μεγάλη σε σύγκριση με την ποσότητα πρωτεΐνης που θα περίμενε κάποιος εάν επρόκειτο για ειδικούς καταστολείς γονιδίων [30, 337]. Γι' αυτό τον λόγο υπέθεσαν ότι οι πρωτεΐνες της "ομάδας υψηλής κινητικότητας", όπως και οι ιστόνες, συνιστούν δομικές πρωτεΐνες του DNA [30, 37].

Η HMGB1 αποτελούσε το πρώτο αναγνωρισμένο μέλος της οικογένειας HMGB και αναγνωρίστηκε ως το πρώτο και αρχέτυπο μόριο που συσχετίζεται με την καταστροφή (DAMP) [338-344]. Μεταγενέστερα το 1995, η αναζήτηση ενδογενών πρωτεϊνών δέσμησης για τον ιστικό υποδοχέα RAGE (υποδοχέας για τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης), οδήγησε στην ανίχνευση της αμφοτερίνης [345]. Η αμφοτερίνη αρχικά απομονώθηκε από τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο ως πρωτεΐνη σύνδεσης της ηπαρίνης που ενισχύει την ανάπτυξη νευραξόνων στους εγκεφαλικούς νευρώνες [346]. Η "αμφοτερίνη" θεωρήθηκε ένα

μόριο με ευεργετικά αλλά και τοξικά αποτελέσματα. Ο χαρακτηρισμός "HMG" χρησιμοποιήθηκε αρχικά ώστε να διαχωρίσει τις πυρηνικές πρωτεΐνες, από τη μέχρι τότε περιγραφόμενη "αμοτερίνη" που θεωρούταν πρωτεΐνη που δρα αποκλειστικά εξωκυτταρίως [346]. Στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι έχει την ίδια αλληλουχία αμινοξέων με την πρωτεΐνη HMGB1 [347, 348] και υπήρξε ταύτιση της ονοματολογίας των μορίων (HMGB1, HMG1, HMG-1, HMG 1, αμοτερίνη, ρ30). Οι εξωκυτταρικές λειτουργίες της HMGB1/αμοτερίνης έχουν μελετηθεί εκτενώς σε πολλά νοσημάτα [27, 30, 37, 41, 60-62, 130, 339, 343, 348, 349].

### **3.1.2 Οικογένεια HMGB**

Η οικογένεια HMGB αποτελείται από τις πρωτεΐνες: HMGB1, HMGB2 και HMGB3. (η HMGB4 αναγνωρίστηκε αρχικά ως νέο μέλος της οικογένειας όμως αργότερα βρέθηκε ότι είναι μορφολογικά πανομοιότυπη με την HMGB3 και έτσι μετονομάστηκε σε HMGB3) [342, 350]. Η δομή όλων των πρωτεϊνών HMGB είναι εξαιρετικά συντηρημένη στην οικογένεια HMGB (> 80% ταυτόσημη αλληλουχία αμινοξέων). Η HMGB1 είναι η πιο συχνά εκφραζόμενη από όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας HMG [351]. Η έκφραση της HMGB1 είναι παρούσα σε όλους σχεδόν τους τύπους κυττάρων, ενώ η έκφραση της HMGB2 περιορίζεται στους λεμφικό ιστό και στους όρχεις σε ενήλικα ζώα. Η έκφραση της HMGB3 περιορίζεται στα έμβρυα και στα αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα [338-342]. Η HMGB1 επίμυος και ανθρώπου παρουσιάζει ταυτόσημη αλληλουχία σε ποσοστό μεγαλύτερο από 98%.

### **3.1.3 Μοριακά χαρακτηριστικά της HMGB1**

Η HMGB1 είναι μια, πολυλειτουργική πυρηνική πρωτεΐνη που υπάρχει σε όλους σχεδόν τους τύπους κυττάρων όπως αναφέρθηκε ανωτέρω και που έχει

διαφορετικό ρόλο ανάλογα με το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εδράζεται [30] (**Πίνακας 3**). Κωδικοποιείται από το ανθρώπινο χρωμόσωμα 13q12-13 και χαρακτηρίζεται από χαμηλό μοριακό βάρος 30 kD, όξινη διαλυτότητα και υψηλή περιεκτικότητα φορτισμένων αμινοξέων [336, 337, 351]. Στον πυρήνα, όπου κυρίως εντοπίζεται, δεσμεύει το DNA και συμμετέχει σε όλες σχεδόν τις πυρηνικές διεργασίες (σταθεροποίηση χρωματίνης, επισκευή, μεταγραφή και μεταφορά μεταγράφων, συντήρηση του αριθμού και της θέσης των νουκλεοσωμάτων, συντήρηση των τελομερών κλπ.) ως δομικός παράγοντας του DNA [338, 352-359].

Εξωκυτταρίως, η HMGB1 διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο, ενεργεί ως αλαρμίνη ή DAMP, διαμεσολαβεί σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών και παθολογικών αποκρίσεων που πυροδοτούνται από τη φλεγμονή και τον κυτταρικό θάνατο [360]. Δρα συνδεδεμένη με μεγάλο αριθμό διαμεμβρανικών υποδοχέων, η σηματοδότηση όμως μέσω του υποδοχέα RAGE έχει ένα μοναδικό πρότυπο και έχει επαρκώς μελετηθεί σε πολλά νοσήματα. Η HMGB1 θεωρείται υπεύθυνη για πολλές ανοσολογικές διεργασίες, όπως η αυτοφαγία [361], η απόπτωση και η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση επιθηλιακών κυττάρων αεραγωγών, διεργασίες που είναι κρίσιμες για την ιστική αναγέννηση και νεοπλασματική εξέλιξη [362-373] όπως περιγράφονται στον **Πίνακα 3**.

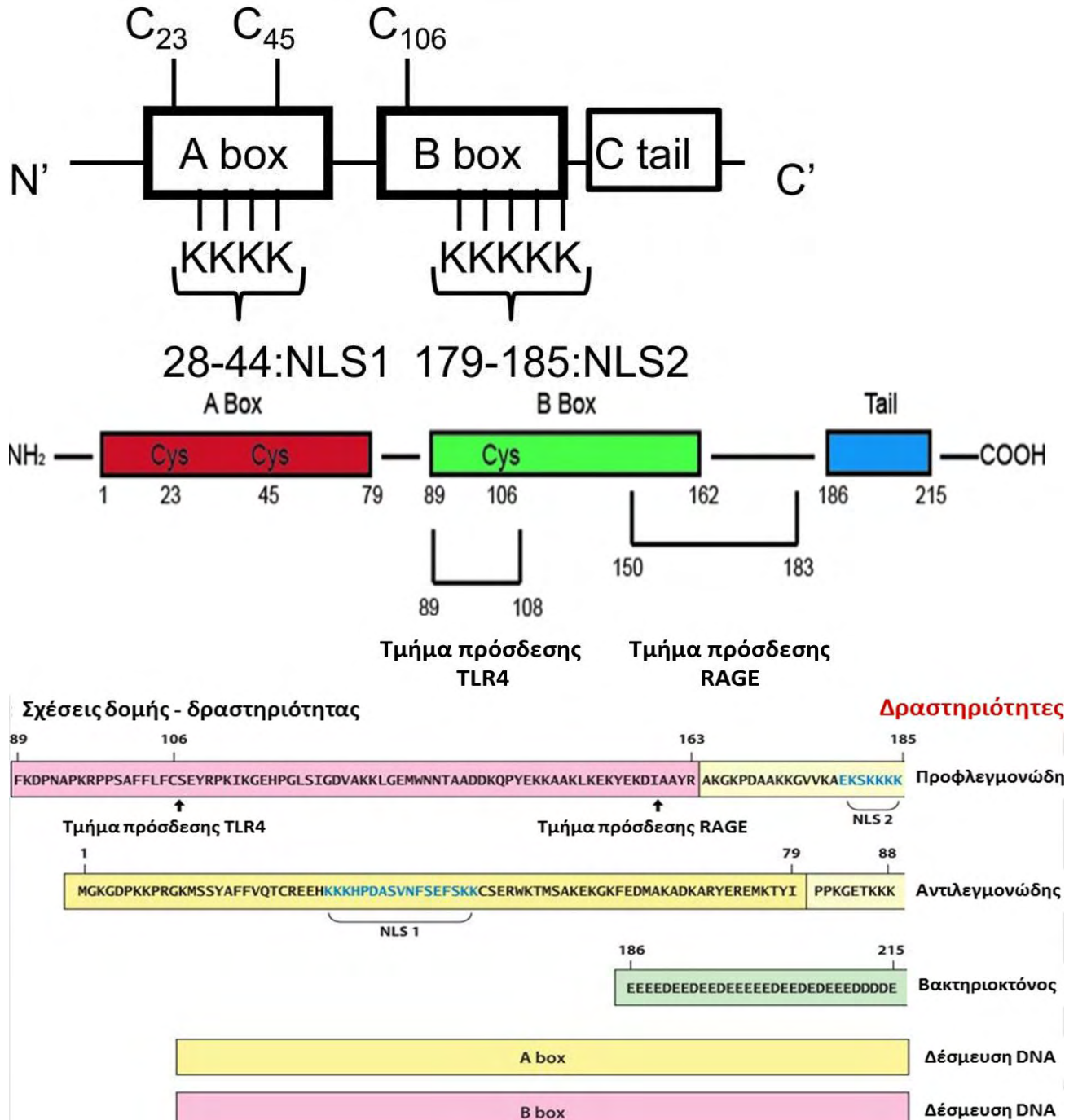
### Πίνακας 3. Ειδικές λειτουργίες της HMGB1 ανα κυτταρικό διαμέρισμα

Πυρήνας	Δέσμευση DNA: ρύθμιση μεταγραφής <sup>356</sup> Σταθεροποίηση χρωματίνης <sup>357</sup> Συναρμολόγηση γονιδιώματος <sup>358</sup> Κυτταρική αντιγραφή <sup>356</sup> Επιδιόρθωση DNA και διατήρηση μήκους τελομερών <sup>359</sup>
Ενδοκυτταρίως	Ενεργοποίηση PKR/inflammasome <sup>361</sup> Αυτοφαγία: Η κυστεΐνη C106 απαιτείται για την επαγωγή αυτοφαγίας <sup>366</sup> Κυστεΐνες, δεσμευμένες με δισουλφίδιο, απαιτούνται για την αυτοφαγία <sup>366</sup> Κατά τη διαδρομή έκκρισης [: έκκριση μέσω σχηματισμού κυστιδίων <sup>339, 353, 367</sup>
Εξωκυτταρίως	Διαμεμβρανικά: ανάπτυξη των νευραξόνων <sup>348</sup> Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων <sup>368</sup>  Εξωκυτταρίως: προαγγειακός ρόλος <sup>369</sup> , αντιμικροβιακός ρόλος <sup>370</sup> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ανηγγμένες κυστεΐνες: φλεγμονώδης, χημειοκινητική, χημειοτακτική δράση<sup>371, 372</sup></li><li>• Κυστεΐνες οξειδωμένες: μη φλεγμονώδης δράση<sup>371, 373</sup></li><li>• Κυστεΐνες, συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό: φλεγμονώδης δράση, δράση κυτοκίνης, επαγωγή κυτοκινών<sup>60, 373</sup></li><li>• Υπερακετυλιωμένες λυσίνες: φλεγμονώδης δράση, επάγουν έκκριση κυτοκινών<sup>361</sup></li></ul>

Τροποποιημένο από: Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2013;93:865–873.

Η HMGB1 αποτελείται από δύο ομόλογα ελικοειδή μοτίβα πρόσδεσης στο DNA, το πλαίσιο A και το πλαίσιο B, καθώς και μία όξινη αμινοτελική ουρά που περιέχει μια σειρά από γλουταμικά και ασπαρτικά οξέα (**Εικόνα 12**) [347, 367]. Το πλαίσιο A περιέχει δύο γειτονικές κυστεΐνες (Cys23 και Cys45), ενώ το πλαίσιο B φέρει μία κυστεΐνη στη θέση 106 (Cys106) [366]. Μελέτες της λειτουργικής δομής

της αποκάλυψαν ότι το πλαίσιο B της HMGB1 εκφράζει δραστικότητα κυτοκίνης, ενώ το πλαίσιο A δρα ως ένας ειδικός ανταγωνιστής της HMGB1 αλλά με ανεπαρκώς μελετημένο μηχανισμό μέχρι στιγμής [26, 29, 374].



**Εικόνα 12.** Δομή HMGB1 και σχέση δομής-βιολογικής δραστηριότητας. Η HMGB1 περιέχει δύο ομόλογα μοτίβα δέσμευσης στο DNA, που ονομάζονται πλαίσιο A (Box A) και B (Box B). Έχει μια όξινη ουρά που αποτελείται από αλληλουχία γλουταμικού και ασπαρτικού οξέος. Η HMGB1 έχει τρεις κυστεΐνες: δύο τοποθετημένες στις θέσεις 23 και 45 στο πλαίσιο A και μία στη θέση 106 στο πλαίσιο B. Τα τρία κατάλοιπα κυστεΐνης είναι εμφανή στις θέσεις 23, 45

και 106. Οι περιοχές δέσμευσης TLR4 και RAGE επίσης επισημαίνονται. Επιπλέον, η HMGB1 περιέχει δύο πυρηνικές ακολουθίες εντοπισμού (nuclear localization sequences NLSs), μια στο πλαίσιο A (αα 28-44) και μια στο πλαίσιο B (αα 179-185).

**Συνομογραφίες.** **HMGB1**, Πρωτεΐνη ομάδας υψηλής κινητικότητας τύπου B1; **K**, Υπερκετυλιωμένη λυσίνη πλαισίου; **NLSs**, Πυρηνικά σήματα εντοπισμού; **RAGE**, Υποδοχέας για τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης; **TLR4**, Υποδοχέας τύπου Toll 4; **Cys**, Κυστεΐνη

*Τροποποιημένο από: Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. J Leukoc Biol. 2013;93:865–873 και Andersson U, Tracey K J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. Annu. Rev. Immunol.2011;29:139–162.*

Η HMGB1 μπορεί να υποβληθεί σε εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της αναστρέψιμης κυστεϊνικής οξειδωσης, ακετυλίωσης ή μεθυλίωσης, δημιουργία δισουλφιδικού δεσμού, φωσφορυλίωσης κ.α [338, 339, 353]. Μερικές από αυτές τις τροποποιήσεις έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη δέσμευση της στη χρωματίνη και τη σταθερότητα του DNA, τον πυρηνικό ή ενδοκυττάριο εντοπισμό της και τη μεταγραφική ρύθμιση [338].

Πρόσφατες μελέτες υπογραμμίζουν ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση (redox state) των τριών διατηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης της HMGB1 -δηλαδή της Cys23 και Cys45 του πλαισίου A και της Cys106 του πλαισίου B- ρυθμίζει την ικανότητα δέσμευσης της HMGB1 με τους ποικίλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς [375, 376]. Ως εκ τούτου, έτσι καθορίζεται η βιοδραστικότητα της εξωκυττάριας HMGB1, ο ρόλος της στη φλεγμονή και την ανοσία και η επακόλουθη βιολογική έκβαση (**Πίνακας 3, Πίνακας 4**) [365, 366, 371, 373, 376-379]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση της ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας HMGB1 είναι δυναμική και αναστρέψιμη υποδηλώνοντας τα πολλά πρόσωπα της αλαρμίνης απέναντι στη φλεγμονή, την κυτταρική “καταπόνηση” και τον κυτταρικό θάνατο, επιτρέποντας στην HMGB1 να ενεργεί άλλοτε ως χημειοτακτικός παράγοντας και

άλλοτε ως κυτοκίνη ανάλογα με τις συνθήκες που μεταβάλλουν την κυτταρική ομοιόσταση. Υπάρχουν τρεις κύριες διακριτές μορφές οξειδοαναγωγικής κατάστασης της HMGB1 (**Εικόνα 13, 14**) [361, 375-380].

- Αναλυτικότερα, προκειμένου η HMGB1 να επάγει την έκκριση κυτοκινών απαιτείται οξείδωση των σουλφυδρυλίων των δύο κυστεϊνών Cys23 και Cys45 ώστε να σχηματιστεί ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των ατόμων θείου (ή «γέφυρα θείου»,  $R_1-S-S-R_2$ ). Ο δισουλφιδικός αυτός δεσμός είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς δημιουργεί διασυνδέσεις στην γραμμική πολυπεπτιδική αλυσίδα, μεταβολές στην αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής ακολουθίας επομένως μεταβολές στη τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης που καθορίζουν τη μετέπειτα σύνδεσή της με τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Ταυτόχρονα απαιτείται η κυστεΐνη Cys106 να παραμένει σε ανηγμένη θειολο-μορφή (GSH) [29, 365, 373]. Αυτή η διακριτή μοριακή διαμόρφωση (**disulfide HMGB1**) επιτρέπει στην εξωκυττάρια HMGB1 να δεσμευθεί και να σηματοδοτήσει μέσω του συμπλόκου TLR4/MD-2 (υποδοχέας τύπου Toll 4/παράγοντας διαφοροποίησης μυελοειδούς 2), δρώντας ως κυτοκίνη. Αντίθετα οποιαδήποτε εναλλαγή της μορφής της ανηγμένης κυστεΐνης Cys106 εμποδίζει την αλληλεπίδραση της HMGB1 με το σύμπλοκο TLR4/MD-2 και την επακόλουθη δράση κυτοκίνης (**Πίνακας 4, Εικόνα 14**) [38].

- Επιπρόσθετα, για να δράσει η HMGB1 ως χημειοτακτικός μεσολαβητής, και οι τρεις κυστεΐνες πρέπει να είναι σε ανηγμένη μορφή [371]. Αυτή η **fully reduced ή all-thiol HMGB1** σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τον προερχόμενο από τα κύτταρα του στρώματος παράγοντα 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF1 ή αλλιώς C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) και δεσμεύεται αποκλειστικά από τον υποδοχέα χημειοκινών CXCR4 (C-X-C chemokine receptor 4) για να ξεκινήσει με ένα συνεργικό τρόπο η χημειοταξία (**Εικόνα 13**). Σ αυτή τη μορφή η πρωτεΐνη

συνδέεται με τον υποδοχέα RAGE (Πίνακας 4, Εικόνα 13, 14) [371]. Προκειμένου να επιτελεσθεί ο χημειοτακτικός ρόλος δεν απαιτούνται οι κυστεΐνες καθ' εαυτές, καθώς μπορούν να υποκατασταθούν με σερίνες, με διατηρημένη ή ακόμα και ενισχυμένη απόδοση όσον αφορά την χημειοταξία των λευκοκυττάρων [371].

- Ξεχωριστά, η σύνδεση της HMGB1 με τον CXCR4 ή τον TLR4 εμποδίζεται πλήρως όταν υπάρξει οξείδωση των θειολικών ομάδων των κυστεϊνών. Αυτό συμβαίνει σε ένα περιβάλλον με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) που καταργούν πλήρως τη φλεγμονώδη δράση της HMGB1 (**oxidized ή sulfonated HMGB1**) (Πίνακας 4, Εικόνα 13, 14) [371].

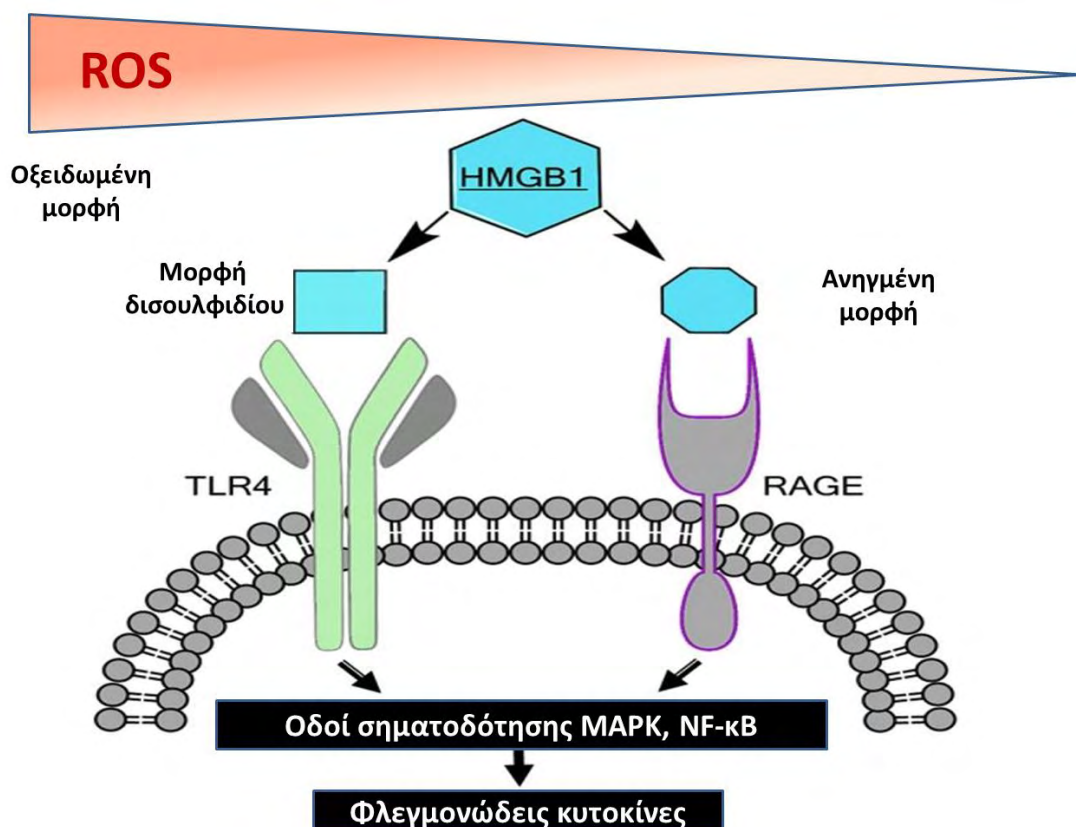
Τέλος, η ακετυλίωση των βασικών καταλοίπων λυσίνης εντός των πυρηνικών σημάτων εντοπισμού (nuclear localization signals, NLSs) της HMGB1, μετατοπίζει την αλαρμίνη από τον πυρήνα που κυρίαρχα εντοπίζεται, προς το κυτταρόπλασμα με την επακόλουθη συσσώρευσή της, εμποδίζοντας την επανείσοδο της στον πυρήνα [27, 39, 380]. Η ακετυλίωση των λυσινών της HMGB1, έχει περιγραφεί ως ένας βασικός ρυθμιστικός μηχανισμός όχι μόνο για την ενδοκυττάρια μετακίνηση της HMGB1 αλλά και για την ενεργό έκκριση της από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και πιθανώς και από άλλους κυτταρικούς τύπους. Η ακετυλίωση δεν φαίνεται να μεταβάλλει τη δυνατότητα δέσμευσης της HMGB1 με τους διάφορους υποδοχείς ή την εξωκυττάρια δραστηριότητά της [27, 39, 380].



Οξειδοαναγωγική κατάσταση	Δομή	Χρόνος ημίσειας ζωής	Βιολογική Δραστηριότητα
Ανηγγμένη - All Thiol μορφή	$  \begin{array}{ccc}  \text{SH} & \text{SH} & \text{SH} \\    &   &   \\  \text{C} & \text{---C} & \text{-----C} \\  23 & 45 & 106  \end{array}  $	17 λεπτά	RAGE-εξαρτώμενη οδός φλεγμονής και χημειοταξίας
Μορφή δισουλφιδίου	$  \begin{array}{ccc}  \text{S} & \text{---S} & \text{SH} \\    &   &   \\  \text{C} & \text{---C} & \text{-----C} \\  23 & 45 & 106  \end{array}  $	642 λεπτά	TLR4-εξαρτώμενη οδός Δράση κυτοκίνης Ενεργοποίηση λευκοκυττάρων Ο δισουλφιδικός δεσμός αυξάνει την πρωτεϊνική σταθερότητα
Οξειδωμένη μορφή	$  \begin{array}{ccc}  \text{HSO}_3 & \text{HSO}_3 & \text{HSO}_3 \\    &   &   \\  \text{C} & \text{---C} & \text{-----C} \\  23 & 45 & 106  \end{array}  $	Αδρανής	Παρούσα όταν η φλεγμονή υποχωρεί Προϊόν απόπτωσης

**Πίνακας 4.** Μορφές της HMGB1 με βάση τη διαφορετική θειολική οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυστεϊνών της. Περιγράφεται ο χρόνος ημίσειας ζωής στον ορό και η αντίστοιχη βιολογική δραστηριότητα της κάθε μορφής. 1) Στη ανηγμένη ή all-thiol μορφή και τα τρία κατάλοιπα κυστεΐνης βρίσκονται σε ανηγμένη θειολο-μορφή. Ο χρόνος ημίσειας ζωής αυτής της μορφής είναι 17 λεπτά. Αυτή η μορφή είναι ικανή να δεσμεύει τον υποδοχέα RAGE και να ενεργοποιεί φλεγμονώδεις οδούς δρώντας χημειοτακτικά. 2) Η δισουλφιδική μορφή (disulfide) περιέχει δεσμό δισουλφιδίου μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης στις θέσεις 23 και 45. Ενώ η κυστεΐνη στη θέση 106 βρίσκεται σε ανηγμένη θειολο-μορφή. Αυτός ο δεσμός αυξάνει τη σταθερότητα και το χρόνο ημίσειας ζωής στα 642 λεπτά. Αυτή η μορφή σηματοδοτεί μέσω του υποδοχέα TLR4 και δρα ως κυτοκίνη. 3) Η οξειδωμένη (sulfonated) μορφή χαρακτηρίζεται από οξείδωση των θειολικών ομάδων των κυστεϊνών και στις τρεις θέσεις, πρόκειται για μία αδρανοποιημένη μορφή, προϊόν απόπτωσης που προάγει την ανοσολογική ανοχή και είναι η κυρίαρχη όταν η φλεγμονή έχει αρχίσει να υποχωρεί.

*Τροποποιημένο από: Weber DJ, Allette YM, Wilkes DS, White FA. The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction. Antioxid Redox Signal. 2015;23:1316-1328.*



**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδραση της HMGB1 με τους υποδοχείς RAGE/TLR4 ανάλογα με την θειολική οξειδοαναγωγική κατάσταση της πρωτεΐνης. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση και στις δύο περιπτώσεις διαμεσολαβείται από: την κινάση p53, άλλες ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK) και το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Η ενεργοποίηση αυτών των οδών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών: TNFα, IL-1, IL-6 και IL-8, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων.

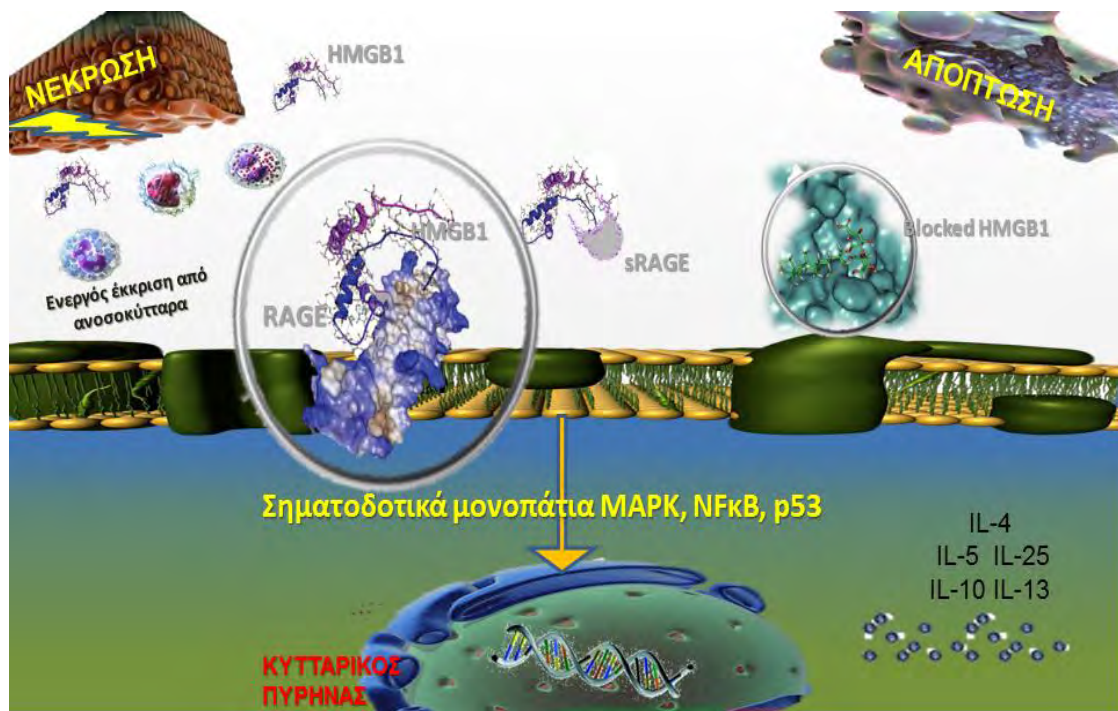
**Συνοτομογραφίες:** **HMGB1**, Πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1; **RAGE**, Υποδοχέας για τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης; **ROS**, Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου; **TLR4**, Υποδοχέας τύπου Toll 4

Τροποποιημένο από Weber DJ, Allette YM, Wilkes DS, White FA. *The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction. Antioxid Redox Signal.* 2015;23:1316-1328.

### 3.1.4 Κυτταρική έκφραση της HMGB1

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ινοβλάστες αποτελούν τις πρώτες κυτταρικές πηγές της HMGB1 που έχουν περιγραφεί. Πλέον είναι γνωστό ότι η HMGB1 ανευρίσκεται σε όλους τους κυτταρικού τύπους [27, 39, 381]. Ως το αντιπροσωπευτικότερο DAMP απελευθερώνεται παθητικά από όλα τα νεκρωτικά κύτταρα. Η HMGB1 διαχέεται έξω από τον πυρήνα όταν η ακεραιότητα της μεμβράνης χαθεί. Επίσης, εκρίνεται ενεργητικά από ανοσοκύτταρα όπως τα μακροφάγα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, NK κύτταρα, DCs, αλλά και από ενδοθηλιακά, βρογχικά επιθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα όπως αιμοπετάλια, κάτω από συνθήκες κυτταρικού στρες (**Εικόνα 14**) [27, 39, 368, 381].

Είναι γνωστό ότι για να εκκρίνουν ενεργά την αλαρμίνη HMGB1 πρέπει να έχει προηγηθεί η διέγερσή των ανοσοκυττάρων από φλεγμονώδεις παράγοντες όπως οι: INF- $\gamma$ , TNF, 1L-1 [27, 39, 368, 381]. Η επακόλουθη HMGB1 σηματοδότηση είναι τόσο ισχυρή ώστε η κυτταρική ενεργοποίηση που προκαλείται υπερτερεί της καταστολής που προκύπτει από τη δέσμευσή της HMGB1 με τους ανοσοκατασταλτικούς υποδοχείς CD2410 και TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain) [39]. Όσον αφορά τα αποπτωτικά κύτταρα αυτά απελευθερώνουν σημαντικά μικρότερη ποσότητα HMGB1 σε σύγκριση με τα νεκρωτικά κύτταρα. Η φαγοκύτωση ωστόσο των αποπτωτικών κυττάρων από τα μακροφάγα μπορεί ακολούθως να προκαλέσει σημαντική απελευθέρωση HMGB1 [382-383].



**Εικόνα 14.** Σηματοδοτικό μονοπάτι HMGB1/RAGE. Η HMGB1 όπως και τα άλλα σχετιζόμενα με την καταστροφή μοριακά πρότυπα (DAMPs), εκκρίνονται ενεργητικά από φλεγμονώδη κύτταρα και απελευθερώνονται παθητικά από νεκρωτικά κύτταρα σε όλους τους ιστούς. Αντίθετα, η HMGB1 δεσμεύεται μη αναστρέψιμα στη χρωματίνη των αποπτωτικών κυττάρων και δεν απελευθερώνεται. Η δράση της ασκείται μέσω της σηματοδότησης του διαμεμβρανικού υποδοχέα RAGE με την επακόλουθη ενεργοποίηση ενός ενδοκυττάριου καταρράκτη που διαμεσολαβείται από την κινάση p53, άλλες κινάσες MAPK και τον NF-κB. Τελικό αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση κυτοκινών και χημειοκινών. Εξωκυτταρίως η HMGB1 μπλοκάρεται από τη διαλυτή μορφή του RAGE υποδοχέα (sRAGE) που αποτελεί έναν υποδοχέα εξουδετέρωσης (decoy receptor) της HMGB1.

### 3.1.5 Επεξεργασία και απελευθέρωση της HMGB1

Οι δεσμοί της HMGB1 με το DNA είναι χαλαρότεροι σε σχέση με τις ιστόνες. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε καταστάσεις κυτταρικού στρες όπως σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης/απόψυξης ή σε μεταβολική δηλητηρίαση, παρατηρείται απελευθέρωση HMGB1 εξωκυτταρίως ακόμη και χωρίς να επέλθει κυτταρικός θάνατος. Έτσι, η απελευθέρωση της HMGB1 φαίνεται πως συνιστά έναν μεταφραστή του κυτταρικού στρες [39, 384-386].

Η HMGB1 δεν έχει εκκριτικό οδηγό πεπτίδιο, όπως αρμόζει σε μια πυρηνική πρωτεΐνη και η έκκρισή της δεν πραγματοποιείται μέσω της κλασικής οδού μεταφοράς από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύμπλεγμα Golgi. Τουναντίον, η ενεργός έκκριση της HMGB1 διαμεσολαβείται από άλλες μη συμβατικές οδούς [397-404]. Πρέπει ωστόσο να καταστεί σαφές ότι ρυθμιζόμενη έκκριση της HMGB1 εξωκυτταρίως συμβαίνει ως απότοκο κυτταρικής διέγερσης και στρες [361, 386-388].

Είναι ενδιαφέρον ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του μορίου καθορίζουν τον κυτταρικό εντοπισμό της HMGB1 [380, 389] και την ενεργητική έκκρισή της. Η HMGB1 μεταφέρεται διαρκώς μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, αν και υπό φυσιολογικές συνθήκες η εντόπισή της είναι στον πυρήνα [39]. Η ακετυλίωση των λυσινών όπως περιγράφηκε ανωτέρω ή η φωσφορυλίωση των σερινών στα NLSs αποκλείουν την επανεισδοχή της HMGB1 στον πυρήνα [39]. Η πρωτεΐνη ως εκ τούτου συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και τελικά εκκρίνεται ως εξαιρετικά δραστική μορφή [39]. Η ακετυλίωση των λυσινών συγκεκριμένα, διαμεσολαβείται μέσω της οδού των έσω κυτταροπλασματικών τυροσινικών κινασών JAK και των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας STAT1 (μεταγωγείς σημάτων και ενεργοποιητές της μεταγραφής) [39]. Βάση των στοιχείων αυτών, η ακετυλιωμένη HMGB1 θα μπορούσε να είναι ένας βιοδείκτης της εξωκυττάριας έκκρισης της HMGB1. Δυστυχώς, μέχρι στιγμής δεν έχουν ανιχνευθεί ειδικά αντισώματα εναντίον αυτής και η διαφοροποίηση μεταξύ ακετυλιωμένων και μη ακετυλιωμένων μορφών επιτυγχάνεται από τη φασματομετρία μάζας [39].

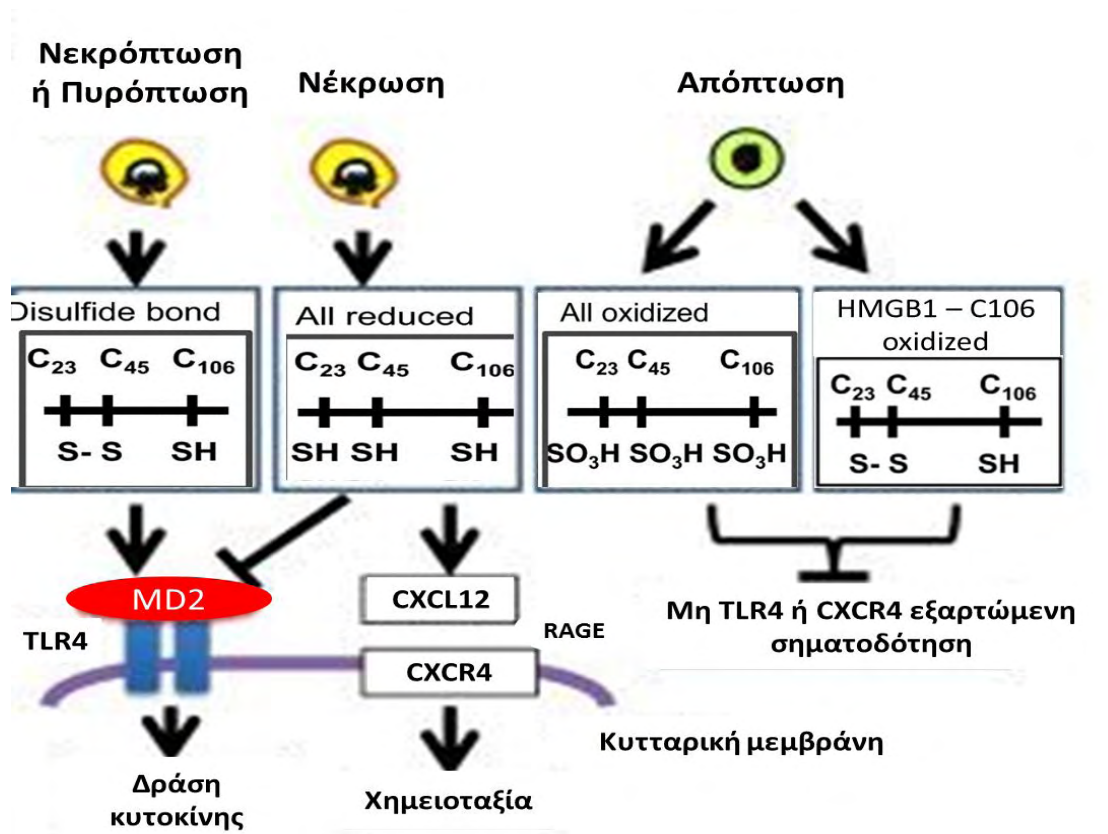
Πολύ πρόσφατα, έχει προταθεί ακόμα ένα μη συνηθισμένο εκκριτικό μονοπάτι με βάση την αυτοφαγία το οποίο διευκολύνει την εξαγωγή μιας υποομάδας ή ολόκληρης της αλληλουχίας κυτοσολικών πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο [387].

Η IL-1β και η HMGB1 προτάθηκαν ως μόρια που εκκρίνονται μέσω του μηχανισμού αυτοφαγίας [366, 377, 378, 390-392]. Πρόκειται για μια συντηρημένη εξελικτικά διαδικασία λυσοσωματικής αποικοδόμησης του κυτταροπλασματικού περιεχομένου των ευκαρυωτικών κυττάρων, η οποία ενεργοποιείται κάτω από συνθήκες αποστέρησης τροφής (starvation) για το κύτταρο, αλλά και κατά την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση [366, 377, 378, 390-392]. Αποτελεί ένα φυσικά ρυθμιζόμενο, καταστρεπτικό μηχανισμό του κυττάρου που αποσυναρμολογεί τα περιττά ή δυσλειτουργικά του συστατικά [366, 377, 378, 390-392]. Κατά τη διαδικασία της αυτοφαγίας, τμήματα του κυτταροπλάσματος εγκλείονται από μια δομή διπλής μεμβράνης, το αυτοφαγόσωμα, το οποίο στη συνέχεια συντήκεται με λυσοσώματα και ακολουθεί η υδρόλυσή τους από τις υδρολάσες των λυσοσωμάτων [366, 377, 378, 390-392]. Τα ερεθίσματα που ενισχύουν τις ελεύθερες ρίζες ROS μπορούν να αυξήσουν την μετατόπιση της HMGB1 από τον πυρήνα στο κυτοσόλιο και έτσι να αυξήσουν την αυτοφαγική ροή [391]. Τροποποιήσεις στις κυστεΐνες της HMGB1 μπορούν να επάγουν την αυτοφαγία [366, 377, 378, 391]. Για παράδειγμα μια μετάλλαξη κυστεΐνης με σερίνη στη θέση 106 (106C/S) της HMGB1 προάγει την κυτταροδιαστολή και την αυτοφαγία [390-392].

Τα ευρήματα των Lu και συν. [361] καταδεικνύουν επίσης ότι η υπερακετυλιωμένη HMGB1 είναι ένας σημαντικός βιολογικός δείκτης της πυρόπτωσης. Η πυρόπτωση, έχει πρόσφατα καταδειχθεί ως μια σημαντική οδός για την ενεργό απελευθέρωση HMGB1 που οδηγείται από την οδό της εξαρτώμενης από RNA πρωτεϊνικής κινάσης, PKR και των φλεγμοσώματων [365, 361, 393-400] (**Εικόνα 15**). Η ενεργοποίηση της κασπάσης 1 προκαλεί πυρόπτωση και απελευθέρωση HMGB1 [365, 385, 399, 400]. Ο όρος “πυρόπτωση” προτάθηκε το 2000 από τους Brennan και Cookson, για να περιγράψουν λειτουργικά τον ιδιόμορφο

θάνατο των μακροφάγων που ήταν μολυσμένα από *Salmonella typhimurium* [393]]. Πρόκειται για μια εξαιρετικά φλεγμονώδη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που αποτελεί μέρος της αντιμικροβιακής απόκρισης έναντι ιδίως ενδοκυτταρικών παθογόνων [365,393, 394]. Ωστόσο, η πυρόπτωση δεν πυροδοτείται μόνο από βακτηριακή μόλυνση αλλά και απο στείρα φλεγμονή όπως το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο [398]. Έχουν προταθεί δυο μοριακά μονοπάτια που οδηγούν στην πυρόπτωση: α) το μονοπάτι κανονικού φλεγμονωσώματος (canonical inflammasome pathway) και β) το μονοπάτι μη κανονικής ενεργοποίησης του φλεγμονωσώματος (non-canonical inflammasome pathway), τα οποία συγκλίνουν στην διάσπαση της gasdermin D, ενός μορίου τελεστή της πυρόπτωσης (**Εικόνα 15**) [149, 361, 365, 389-404].

Αναμφίβολα, τα αποτελέσματα αυτά έχουν πρόδηλο ενδιαφέρον στην έρευνα των περίπλοκων οδών απέκκρισης της HMGB1. Στο πλαίσιο αυτό, η στόχευση της αλαρμίνης παραμένει μία πρόκληση, ακόμα περισσότερο αν λάβουμε υπ' όψιν τη μεταβαλλόμενη οξειδοαναγωγική κατάσταση της πρωτεΐνης και την πληθώρα των κυτταρικών πηγών της.



**Εικόνα 15.** Σχηματική απεικόνιση της απελευθέρωσης HMGB1 κατά τη νέκρωση, πυρόπτωση και την κυτταρική απόπτωση με βάση τη θειολική οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυστεϊνών. Η επαγόμενη από νέκρωση και πυρόπτωση HMGB1 (δισουλφιδική μορφή) αλληλεπιδρά απευθείας με το σύμπλεγμα TLR4/MD-2 για να προκαλέσει φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η πλήρως ανηγμένη HMGB1 δεσμεύεται με τη χημειοκίνη CXCL12 και δρα μέσω του υποδοχέα CXCR4 ή RAGE (βλέπε κείμενο). Μέσω αυτής της οδού επάγεται η πρόσληψη λευκοκυττάρων και η χημειοταξία. Η Cys106-οξειδωμένη μορφή HMGB1 (που απελευθερώνεται από αποπτωτικά κύτταρα) παρεμποδίζει την HMGB1 να έχει δράση κυτοκίνης ή χημειοτακτική δράση.

Τροποποιημένο από: Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2013;93:865–873.



### 3.1.6 Οικογένεια υποδοχέων HMGB1

Η HMGB1 εξωκυτταρίως δεσμεύεται με πληθώρα υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας. Οι υποδοχείς αυτοί περιλαμβάνουν: τον RAGE, τους TLR2, TLR4 και TLR9, τον LFA-1 (αντιγόνο 1 που σχετίζεται με τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων), τη συνδεκίνη 3, το σύμπλοκο CD24-Siglec-10, τον υποδοχέα CXCR4 και την TIM-3 [339, 371, 372, 375, 393, 405-407].

Εκτός από την άμεση αλληλεπίδραση με υποδοχείς, η HMGB1 μπορεί να σχηματίζει ετεροσυμπλέγματα με άλλα μόρια, όπως: IL-1, CXCL12, DNA, RNA, ιστόνες ή λιποπολυσακχαρίτες (LPS), που οδηγούν σε συνεργικές αποκρίσεις. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι η HMGB1 παρουσιάζεται ως σύμπλεγμα πρωτεϊνών υπό βασικές συνθήκες. Αποκαλύφθηκαν 14 συνδετικές πρωτεΐνες που προσδένονται με την HMGB1 όπως: η πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς (APP), η πρωτεΐνη κάλυψης F-ακτίνης [ $\alpha$ -capping protein (actin filament) muscle Z-line, CAPZA1], η αφυδρογονάση φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης-3 (GAPDH), η οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPA8, HSP90B1, HSP90AA1), οι XRCC5 και XRCC6, η ομάδα υψηλής κινητικότητας της ομάδας A1 (HMGA1), η ιστόνη 3 (H3P3B), το σύμπλοκο FACT που διευκολύνει τη μεταγραφή χρωματίνης. Αυτές οι μελέτες φωτίζουν περαιτέρω την εξωκυττάρια λειτουργία της HMGB1, αποκαλύπτοντας παράλληλα μονοπάτια θεραπευτικής στόχευσης [408-412].

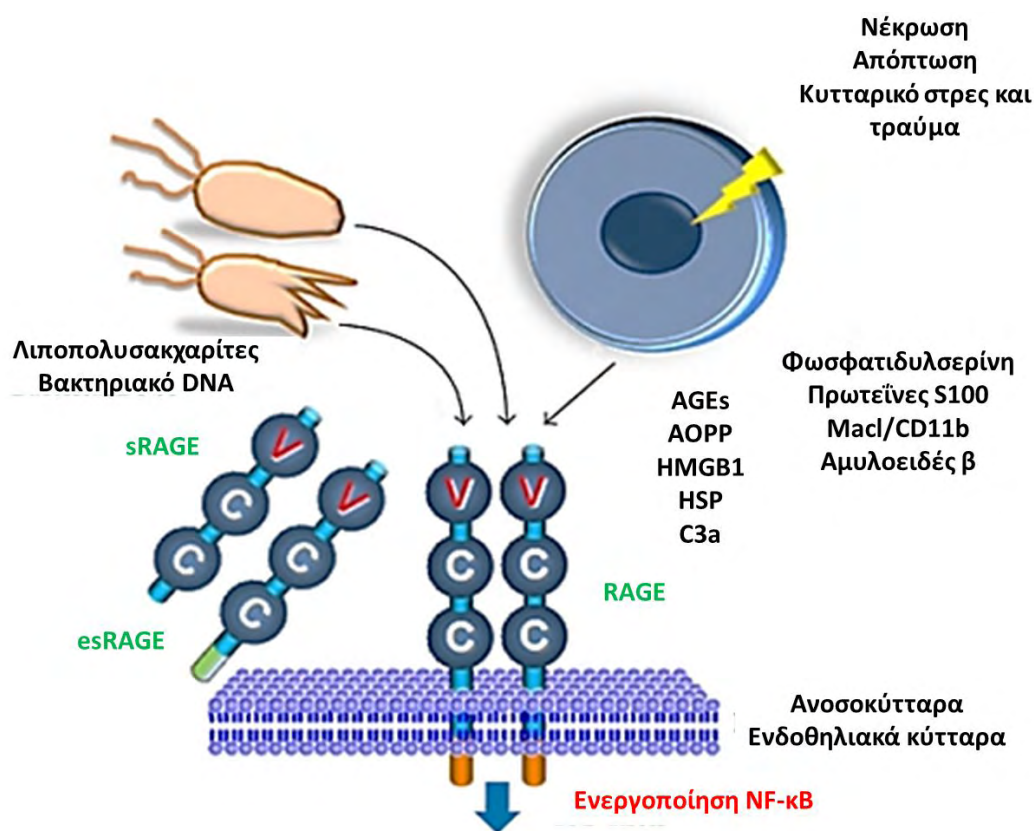
## 3.2 Υποδοχέας RAGE

### 3.2.1 Ιστορική αναδρομή

Ο πρώτος υποδοχέας που περιγράφηκε για την HMGB1 είναι ο υποδοχέας για τα τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (receptor for advanced glycation end products, RAGE, αποκαλούμενος και AGER). Ανακαλύφθηκε το 1992 σε ενδοθηλιακά κύτταρα και συνιστά μια πολυλειτουργική διαμεμβρανική πρωτεΐνη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών [412]. Το όνομά του υποδοχέα προέρχεται από την ικανότητά του να δεσμεύει τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products, AGEs) τα οποία περιλαμβάνουν κυρίως γλυκοπρωτεΐνες, οι γλυκάνες των οποίων έχουν τροποποιηθεί μη ενζυματικά μέσω της αντίδρασης Maillard [413, 414]. Κατά την αντίδραση αυτή, όλα τα αναγωγικά σάκχαρα, μεταξύ αυτών και η γλυκόζη, αντιδρούν μη ενζυματικά με ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων και μέσω μιας σειράς χημικών αντιδράσεων, με ενδιάμεσα προϊόντα τις βάσεις του Schiff και τα παράγωγα Amadori, σχηματίζουν τελικά τα μόρια των AGEs [413, 414]. Η μελέτη των AGEs άρχισε στις αρχές του 1900 [413, 414]. Πρόκειται για μια εξαιρετικά ανομοιογενή ομάδα μορίων. Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί την κύρια πηγή AGEs [413, 414]. Η νεφρική ανεπάρκεια, το γήρας χαρακτηρίζονται επίσης από εναποθέσεις AGEs και η παρουσία τους αποτελεί ένδειξη μη αναστρέψιμης πορείας των βλαβών για τον οργανισμό [415]. Η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση στα πρώτα στάδια εξαρτάται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης, αργότερα όμως, με το σχηματισμό σταθερών προϊόντων, εξελίσσεται ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης γλυκόζης [416, 417]. Επίσης, δεν είναι γνωστό ποια AGEs έχουν τη μεγαλύτερη δραστηριότητα και ικανότητα δέσμευσης με τον RAGE,

αλλά φαίνεται ότι μεγαλύτερη σημασία έχει το ποσοστό κορεσμού του RAGE από διάφορα AGEs και λιγότερο από το ποια είναι αυτά με τα οποία έχει συνδεθεί [416-419].

Ο υποδοχέας RAGE εκτός από τα AGEs αναγνωρίζει ποικίλους ακόμα προσδέτες, συμπεριλαμβανομένων: μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών S100/καλγκρανουλινών που είναι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, β2-ιντεγκρίνες (όπως η Mac-1), γλυκοζαμινογλυκάνες (πολυσακχαριτικές αλυσίδες), τη φωσφατιδυλσερίνη, πρωτεΐνες θερμικού στρες, πεπτίδια β αμυλοειδούς, ινώδη συσσωματώματα και τη μελετούμενη HMGB1 (Εικόνα 16) [416-419].



**Εικόνα 16.** Εξωκυττάριοι συνδέτες του υποδοχέα RAGE και μονοπάτια σηματοδότησης. Οι εξωκυττάριοι συνδέτες δεσμεύονται στην περιοχή V1 που είναι η κύρια περιοχή πρόσδεσης συνδέτη στον RAGE. Η πρόδεση προκαλεί διαμεσολαβούμενες από κυτταροδιαλυτές πρωτεϊνικές κινάσες αλληλουχίες σηματοδότησης.

**Συνομογραφίες:** AGEs, advanced glycation end products, τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης; **Amyloid β**, πεπτίδια β αμυλοειδούς; **AOPPs**, advanced oxidation protein products, προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης πρωτεϊνών; **HMGB1**, High

*mobility group box 1 protein, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1; HSP, Heat shock proteins, πρωτεΐνες θερμικού στρες; NFkB: Nuclear factor Kb, πυρηνικός παράγοντας Kb; Phosphatidylserine, φωσφατιδυλσερίνη*

Τροποποιημένο από: Yamamoto Y, Yamamoto H. Controlling the receptor for advanced glycation end-products to conquer diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig.* 2012;3:107-114.

Μελέτες φανερώνουν κοινές αλληλουχίες στο διαφορετικό σύνολο συνδετών του RAGE [420]. Η απομακρυσμένη περιοχή Ig (περιοχή V1) του RAGE έχει ένα θετικά φορτισμένο πόλο, η γεωμετρία του οποίου ομοιάζει με τις αρνητικά φορτισμένες αλληλουχίες που παρατηρούνται σε ένα ποσοστό προσδετών.

Η ενεργοποίηση του RAGE καθοδηγεί τη μετανάστευση διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών και έχει σημαντικές επιδράσεις στο μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων, έχει μελετηθεί ως παθογενετικός παράγοντας πολλών ασθενειών καθώς εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας, στην οξεία και χρόνια φλεγμονή [398, 418, 421, 422]. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του υποδοχέα RAGE είναι ότι δρα μέσω μιας οδού θετικής ανάδρασης, δηλαδή στις περιοχές όπου τα AGEs στο αίμα είναι αυξημένα, όπως σε σημεία αθηρωμάτωσης των αγγείων, παρατηρείται παράλληλα τοπική υπερέκφραση των υποδοχέων στα μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, κατα συνέπεια μια αυξημένη φλεγμονώδη δράση [420].

Ο άξονας HMGB1/RAGE είναι άμεσα υπεύθυνος για την έκφραση μορίων προσκόλλησης όπως των: αγγειακού κυτταρικού προσκολλητικού μορίου 1 (Vascular cell adhesion protein 1, VCAM-1), του μορίου ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 1 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), καθώς και την έκκριση χημειοκινών, ιδιαίτερα της CXCL12 που σχηματίζει ετεροσύμπλεγμα με την HMGB1 [420, 423].

Προεξάρχουσας σημασίας είναι ο ομοιοστατικός ρόλος του RAGE στους ιστούς, για παράδειγμα στη διατήρηση φυσιολογικής πνευμονικής λειτουργίας και

απρόσκοπτης νευρωνικής σηματοδότησης, παρά ταύτα εμπλέκεται επιπλέον και στην διαμεσολαβούμενη από την HMGB1, παθογένεια πολλών νοσημάτων [420].

### 3.2.2 Μοριακά χαρακτηριστικά – Δομή του RAGE

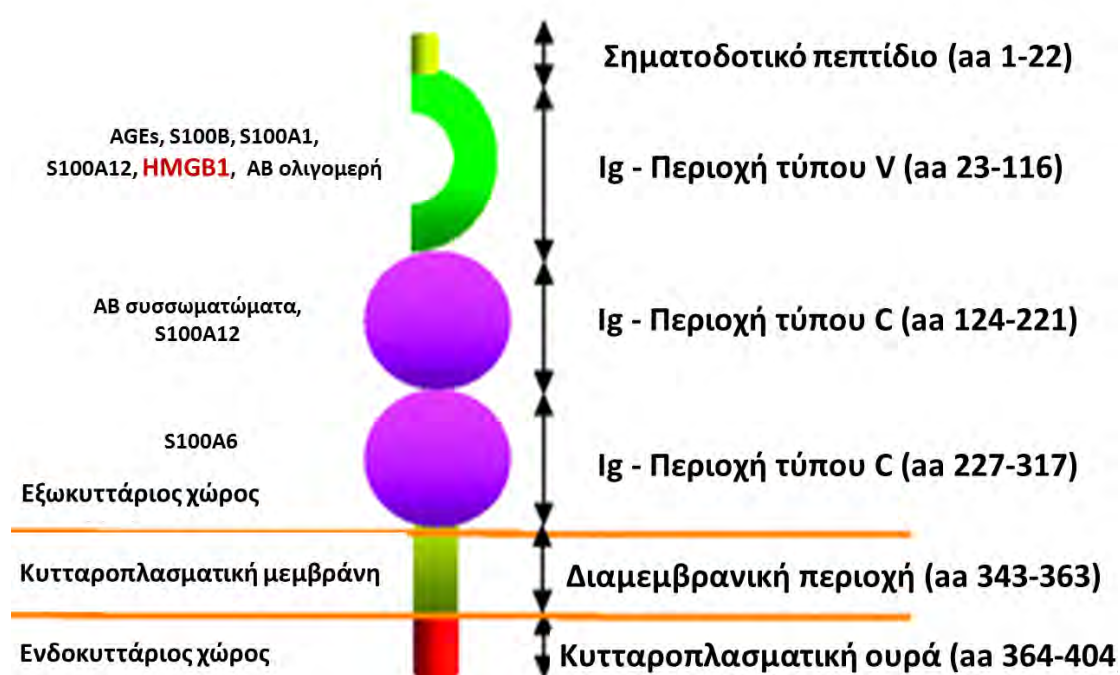
Ο RAGE εκφράζεται μόνο σε θηλαστικά, κωδικοποιείται από το γονίδιο *AGER* που βρίσκεται στην περιοχή όπου εδράζονται τα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας HLA (MHC κατηγορίας III), στο χρωμόσωμα 6p21.31 [424-428]. Το γονίδιο *AGER* έχει 11 εξώνια και 10 βραχεία ιντρόνια και αποτελείται από μια 5' περιοχή που ρυθμίζει τη μεταγραφή του και μια μικρή 3' UTR περιοχή που προσδίδει σταθερότητα. Το mRNA των 1,4 kb που προκύπτει μεταφράζεται σε μια πρωτεΐνη 404 αμινοξέων με μοριακό βάρος περίπου 35 kDa [424-435].

Συνιστά μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρίνης. Ο υποδοχέας RAGE αποτελείται από έναν αριθμό ξεχωριστών περιοχών (domains) (**Εικόνα 17**):

- 1) μια εξωκυττάρια περιοχή (αμινοξέα 1-342) που περιλαμβάνει: α) ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (αμινοξέα 1-22), ακολουθούμενο από β) τρεις περιοχές ανοσοσφαιρίνης, μια μεταβλητή περιοχής τύπου V, η οποία περιέχει τουλάχιστον εν μέρει την περιοχή πρόσδεσης των προσδετών (αμινοξέα 23-116) και δύο σταθερές περιοχές τύπου C (C1: αμινοξέα 124-221 και C2: 227-317).
- 2) Ακολουθείται από μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή (αμινοξέα 343-363).
- 3) Τέλος, αποτελείται από μια μικρή υψηλά φορτισμένη κυτταροπλασματική περιοχή (αμινοξέα 364-404) που είναι απαραίτητη για τη μεταβίβαση του σήματος μετά από τη σύνδεση των προσδετών [425-435]. Δεδομένου ότι η κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE δεν έχει ενδογενή δραστηριότητα κινάσης

τυροσίνης, ένας μηχανισμός με τον οποίο επάγεται η μετάδοση του σήματος και η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, είναι μέσω διασύνδεσης της κυτταροπλασματικής μονάδας με τους ενδοκυττάριους προσαρμογείς (πχ mammalian diaphanous-1, mDia-1) έτσι ώστε για να γεφυρωθούν τα γεγονότα φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης που απαιτούνται για να προχωρήσει η σηματοδότηση [422, 428].

Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι ποικίλοι προσδέτες του RAGE μπορούν να αλληλεπιδρούν με μία ή περισσότερες από τις περιγραφόμενες περιοχές του υποδοχέα. Η τρισδιάστατη δομή των εξωκυττάριων περιοχών RAGE, έχει εξακριβωθεί σε αρκετές πρόσφατες μελέτες [430-435]. Αυτές οι δομικές μελέτες δείχνουν ότι οι περιοχές V1 και C1 σχηματίζουν σε συνδυασμό μια συμπαγή μονάδα που μεσολαβεί στη δέσμευση των περισσότερων συνδετών RAGE ενώ η περιοχή C2 εμφανίζεται ως μία ξεχωριστή δομική μονάδα [412, 436-438].



**Εικόνα 17.** Σχηματική απεικόνιση του διαμεμβρανικού υποδοχέα RAGE και των περιοχών σύνδεσης των ποικίλων προσδετών. Οι διάφορες περιοχές του υποδοχέα RAGE παρουσιάζονται με τους αντίστοιχους αριθμούς αμινοξέων. Η πλέον άφθονη μορφή πρωτεΐνης RAGE που κωδικοποιείται στους ανθρώπους αποτελείται από 404 αμινοξέα. Συνίσταται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, τρεις περιοχές ανοσοσφαιρίνης (τύπου V,

τύπου C1 και τύπου C2), μια διαμεμβρανική έλικα και μια βραχεία κυτταροπλασματική ουρά. Η εξωκυττάρια περιοχή δεσμεύει διάφορους συνδέτες και η κυτταροπλασματική περιοχή διαμεσολαβεί την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος.

*Τροποποιημένο από: Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. FASEB J. 2008;22: 1572–1580.*

### 3.2.3 Ισομορφές του RAGE

Ο RAGE δρα ως υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων (PRR) που εμπλέκεται στην επίλυση φλεγμονών και σε ανοσολογικές αντιδράσεις που οδηγούν σε ιστική αποκατάσταση ή εναλλακτικά στην διαιώνιση της φλεγμονής, οδηγώντας σε χρόνια νόσο [424, 437, 438]. Ο υποδοχέας έχει περιγραφεί σε θηλαστικά αλλά όχι σε άλλα είδη [429].

Υπάρχουν δυο είδη του υποδοχέα RAGE που ανιχνεύονται *in vivo* (**Εικόνα 18**):

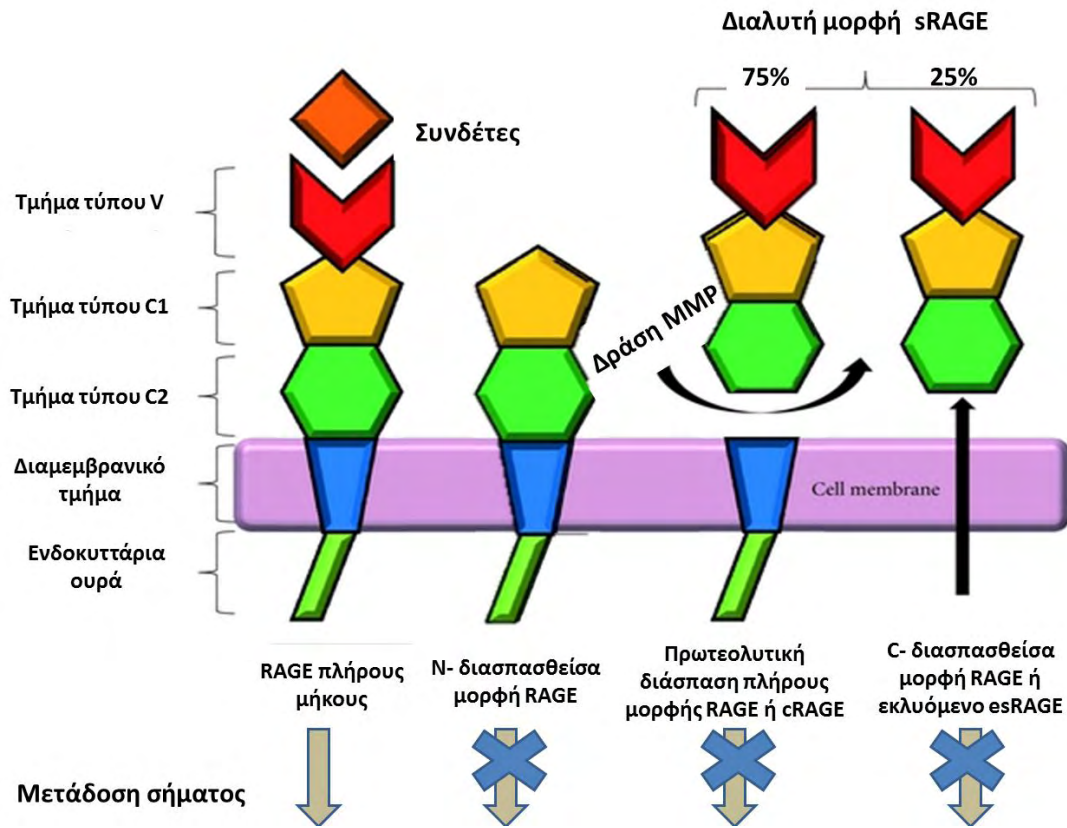
1. ο πλήρης υποδοχέας **RAGE** όπως περιγράφηκε ανωτέρω που αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή με δυο σταθερές περιοχές και μια μεταβλητή μονάδα, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική μονάδα και μια υψηλά φορτισμένη κυτταροπλασματική μονάδα που είναι απαραίτητη για τις διαμεσολαβούμενη από το RAGE επαγωγή σήματος [428] και
2. η διαλυτή μορφή **sRAGE** που στερείται της διαμεμβρανικής και κυτταροπλασματικής περιοχής (**Εικόνα 19**) [428, 439-442].

Η διαλυτή μορφή του RAGE (sRAGE) περιλαμβάνει έναν ετερογενή πληθυσμό:

- α) τον υποδοχέα RAGE που αποκόπτεται από την επιφάνεια των κυττάρων μετά την πρωτεολυτική δράση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) και αποτελεί το 75% του ολικού sRAGE, περιγράφεται ως cRAGE. Το προϊόν αυτό απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος και β) από τον υποδοχέα RAGE που εκκρίνεται ως προϊόν

εναλλακτικού ματίσματος από το κύτταρο προς το πλάσμα και αποκαλείται **esRAGE** (endogenous secretory RAGE) και αποτελεί το 25% του ολικού sRAGE (**Εικόνα 18**)

[442].



**Εικόνα 18.** Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα RAGE και των διάφορων ισομορφών του: Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται: η πλήρης διαμεμβρανική μορφή, η N-διασπασθείσα μορφή στην οποία απουσιάζει το τμήμα τύπου V που αποτελεί τομέα σύνδεσης μεγάλου μέρους προσδετών, το sRAGE που προκύπτει μετά από τη διάσπαση του πλήρους μήκους υποδοχέα απότοκο της δράσης των μεταλλοπρωτεϊνών και το εκλυόμενο esRAGE. Η διαλυτή μορφή sRAGE μπορεί να προέρχεται είτε μέσω της πρωτεολυτικής διάσπασης του πλήρους μήκους RAGE από την κυτταρική επιφάνεια (cRAGE) σε ποσοτό 75% ή ως προϊόν διάσπασης του RAGE mRNA (esRAGE) σε ποσοτό 25%. Οι δυο τελευταίες μορφές αποτελούν το ολικό sRAGE που κυκλοφορεί στο πλάσμα.

**Συνοτομογραφίες:** *MMP*, μεταλλοπρωτεϊνές; *C*, σταθερό; *V*, μεταβλητό

Τροποποιημένο από: *Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. Int J Inflam. 2013;2013:403460.*



Ο RAGE δρα και επάγει τις ενδοκυττάρειες λειτουργίες του μετά από διμερισμό του. Προς το παρόν, δεν είναι σαφές εάν ο ολιγομερισμός του υποδοχέα συμβαίνει εντός της συσκευής ER-Golgi ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μελέτες της δομής των V και C1 περιοχών του επιβεβαιώνουν ότι οι μη-ομοιοπολικοί δεσμοί συνεισφέρουν επίσης στην διμερή δομή του RAGE ενώ και η πρόσδεση των συνδετών μπορεί να ενισχύσει ή να ισχυροποιήσει την ολιγομερή δομή του RAGE στην κυτταρική επιφάνεια [426, 435, 443-448].

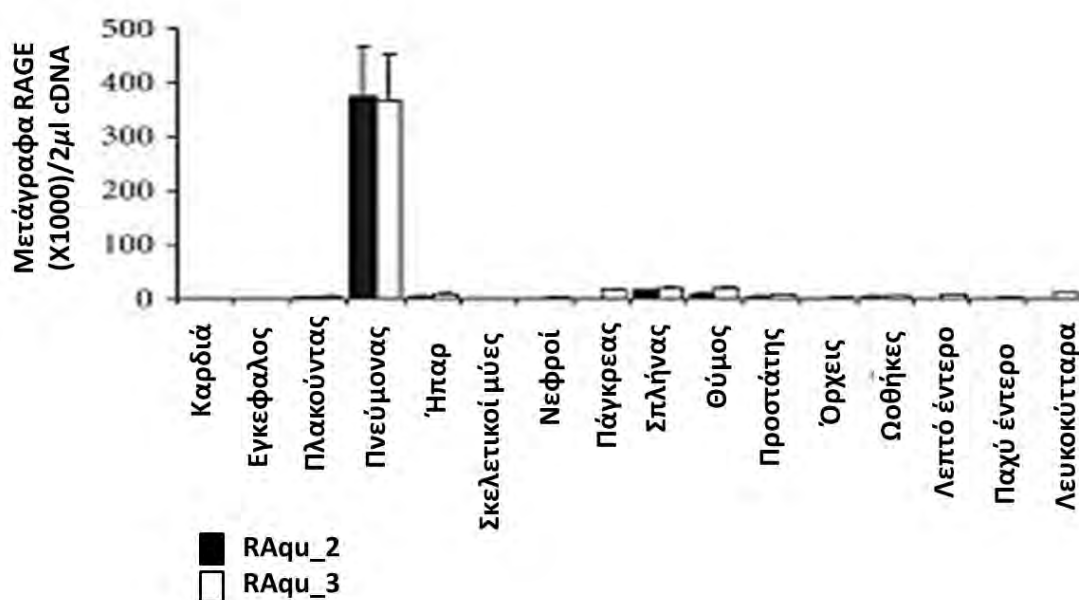
Τέλος ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί, στην μελέτη των πολυμορφισμών του γονιδίου *AGER*, που επηρεάζουν την λειτουργικότητα του υποδοχέα, και οδηγούν σε ποικίλα νοσήματα [449]. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 25 πολυμορφισμοί, από τους οποίους οι 5 εμφανίζονται σε συχνότητα πάνω από 10% [449, 450]. Ο κατάλογος με τους πολυμορφισμούς του RAGE διευρύνεται ολοένα αποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το γονιδιακό υπόστρωμα στην έκφραση και στην λειτουργικότητα του RAGE [449-456].

### **3.2.4 Κυτταρική έκφραση του RAGE**

Ο υποδοχέας RAGE εκφράζεται στα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά κύτταρα, φλεγμονώδη κύτταρα όπως στα μονοκύτταρα, στα λεμφοκύτταρα, στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, στα πειραματικά επιθηλιακά κύτταρα, στα ποδοκύτταρα και στους νευρώνες. Γενικότερα στους ιστούς, τα επίπεδά του είναι χαμηλά σε συνθήκες ηρεμίας αλλά αυτά αυξάνονται σημαντικά σε καταστάσεις φλεγμονής και μηχανικής ιστικής καταπόνησης [418, 419, 422, 438, 457-459]. Εξαίρεση συνιστά το πνευμονικό παρέγχυμα, στο οποίο έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα έκφρασης RAGE και σε συνθήκες ηρεμίας (**Εικόνα 19**) [460-468]. Ως εκ τούτου, ο τύπος του ιστού υπαγορεύει και το ποσό έκφρασης [428, 465, 466].

Συγκεκριμένα, παρατηρείται εντοπισμένη έκφραση RAGE στη βασική μεμβράνη των κυψελίδων και συγκεκριμένα στα πνευμονοκύτταρα τύπου I (ATI). Μάλιστα ο RAGE έχει οριστεί ως ειδικός δείκτης των κυττάρων ATI [469–472]. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι ο RAGE μπορεί επίσης να εκφραστεί και σε κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II (ATII) [473]. Ο RAGE επίσης ιδιοσυστατικά εκφράζεται στα μεσαγγειακά κύτταρα [461], στα κύτταρα των λείων μυϊκών μυών των αεραγωγών [474, 475], στα ενδοθηλιακά κύτταρα (πνευμονικό ενδοθήλιο) [461], στο σπλαγγικό υπεζωκότα [461], στους νευρώνες [345, 461] και σε ανοσοκύτταρα όπως στα μακροφάγα [461], στα DCs [476], στα ηωσινόφιλα [477], στα T και B κύτταρα [478-481].

Ιδιαίτερα, η έκφραση του RAGE ενισχύεται όταν υπάρχει τοπική υπερέκφραση των συνδετών του λόγω φλεγμονής [467]. Χαρακτηριστικά, υψηλή έκφραση RAGE έχει παρατηρηθεί στο σακχαρώδη διαβήτη, σε αγγειακές παθήσεις, σε καρκίνους και σε νευροεκφυλιστικά νοσήματα [418, 419, 422, 438, 482-485].



**Εικόνα 19.** Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης mRNA RAGE σε υγιή ιστό και πρωτογενή κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σειρές RAGE-ειδικών εκκινήτων, RAqu\_2 (μαύρο) και RAqu\_3 (λευκό), για να συγκριθεί η έκφραση RAGE σε 16 ανθρώπινους ιστούς υγιείς δότες

με ποσοτική ανάλυση real-time PCR. Παρατηρείται ότι ο πνευμονικός ιστός εκφράζει υψηλά βασικά επίπεδα mRAGE υποδηλώνοντας ότι ο υποδοχέας μπορεί να έχει εξέχουσα λειτουργία στον πνεύμονα σε σύγκριση με τους άλλους ιστούς.

*Τροποποιημένο από: Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. Cell Tissue Res 2006;323:475–488.*

### 3.3. Άξονας HMGB1/RAGE

Η HMGB1 (all-thiol μοφή) δεσμεύεται μέσω της C-τερματικής περιοχής (αμινοξέα 150-183) του πλαισίου B (Box B), στην V1 περιοχή του υποδοχέα RAGE [486]. Η HMGB1 σ αυτή τη μορφή έχει μία αλυσίδα 33 αμινοξέων που περιέχει 12 κατιονικά και 5 ανιονικά τμήματα. Αυτή η πολυανιονική ουρά ευθύνεται για ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την περιοχή V1, ενισχύοντας τη δέσμευσή της στο συγκεκριμένο τμήμα υποδοχέα [486, 487, 488].

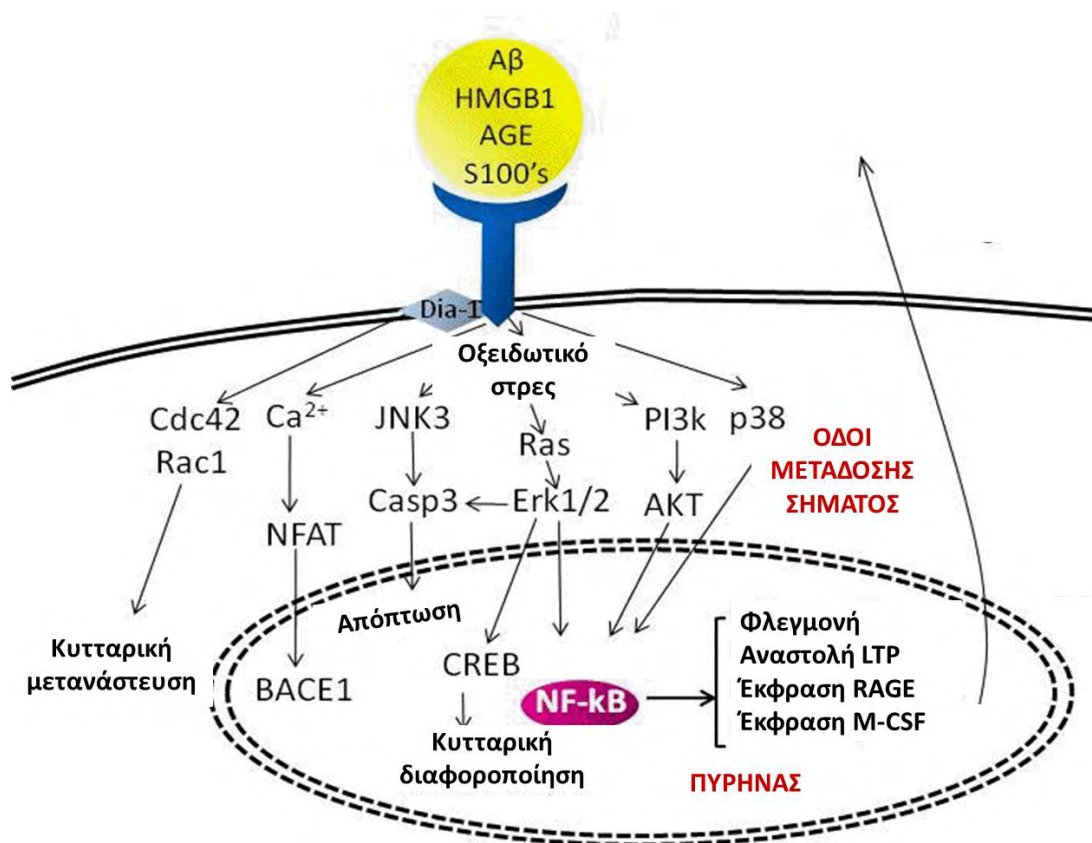
Ένα σημαντικό παραπροϊόν της σηματοδότησης του RAGE είναι η δημιουργία αντιδραστικών ριζών οξυγόνου ROS, η οποία τουλάχιστον εν μέρει φαίνεται να συνδέεται με την ενεργοποίηση του συστήματος της NAD(P)H οξειδάσης [489]. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου με τη σειρά τους μπορούν να ενεργοποιήσουν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, έναν πλειοτροπικό ρυθμιστή γονιδίων και να προάγουν ποικίλες φλεγμονώδεις απαντήσεις [421, 483, 490].

Το μονοπάτι σηματοδότησης που θα ενεργοποιηθεί μετά τη σύνδεση του προσδέτη εξαρτάται από την ταυτότητα του συνδέτη και τον τύπο ιστού στον οποίο εκφράζεται ο υποδοχέας RAGE.

Όπως αναφέρθηκε το καρβοξυ (C)-τελικό άκρο του RAGE (κυτταροπλασματική περιοχή) δεν έχει δραστηριότητα κινάσης, υποδεικνύοντας ότι ο RAGE πρέπει να αλληλεπιδράσει άμεσα με ενδιάμεσα μεσολαβητικά μόρια όπως για

παράδειγμα το μόριο mDia-1 και η ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά σήματα) για να ενεργοποιηθούν τα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια (**Εικόνα 19, Εικόνα 20**) [94, 489, 491-497].

Οι διάφοροι ενδοκυττάριοι άξονες που ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση RAGE–προσδετών συνοψίζονται στην **Εικόνα 20**. Η HMGB1 δεσμεύει τον RAGE με υψηλή ειδικότητα και συγγένεια. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση μπορεί να διακοπεί από αντισώματα έναντι του RAGE ή των προσδετών του.



**Εικόνα 20.** Οδοί ενδοκυττάριας σηματοδότησης προσδετών με τον RAGE. Παρατηρείται η πολυπλοκότητα των οδών μετάγωγής σήματος μετά τη σύνδεσή τους με τον RAGE. Η C-κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE συνδέεται με το μόριο mDia-1 και η αλληλεπίδραση είναι άμεση. Μάλιστα, η ενεργοποίηση των Rho GTPασων, Rac-1 και Cdc42 απαιτεί την άμεση σύνδεση του Dia-1 με το C-τελικό άκρο του RAGE. Αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η κυτταρική μετανάστευση. Επίσης, η C-τερματική κυτταροπλασματική περιοχή του RAGE (ειδικά το συστατικό του πιο κοντά στη διαμεμβρανική περιοχή)

αλληλεπιδρά άμεσα με την ERK 1/2. Μέσω της ERK διαμεσολαβείται η συσσώρευση υποδοχέων RAGE. Τελική κατάληξη είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Η **HMGB1** πρωτίστως επάγει την ενεργοποίηση των οδών Rac-Cdc42 και ERK1/2. Η δέσμευση RAGE-HMGB1 ενεργοποιεί ωστόσο πολλά ακόμα μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων αυτό των MAPK κινασών p44/42, p38 και των SAP/JNK τα οποία οδηγούν στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων και την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών.

**Συνομογραφίες:** **AGEs**, advanced end glycation products, τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης; **Akt ή PKB**, protein kinase B, πρωτεϊνική κινάση B; **BACE 1**, Beta-secretase 1, βήτα σεκρεταση 1; **Casp3**, Caspase-3, κασπάση 3; **ERK**, extracellular-regulated kinase, κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά σήματα; **JNK3**, c-Jun N-terminal kinase 3, τελική κινάση του αμινοτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun 3; **LTP**, long-term potentiation, μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση; **MAPK**, mitogen-activated protein, κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο; **M-CSF**, Macrophage colony-stimulating factor, Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων; **mDia-1**, mammalian diaphanous-1, διαφανές-1 θηλαστικών; **HMGB1**, High mobility group box 1 protein, πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας της ομάδας B1; **NFAT1**, nuclear factor of activated T-cells 1, πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T-κυττάρων 1

Τροποποιημένο από: Han SH, Kim YH, Mook-Jung. RAGE: The Beneficial and Deleterious Effects by Diverse Mechanisms of Actions. *Mol Cells*. 2011;31:91-97.

Τελική κατάληξη της σύνδεσης της HMGB1/RAGE είναι η ενεργοποίηση του NF-κΒ. Ο NF-κΒ ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ποικίλων παραγόντων πως: η ενδοθηλίνη-1, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο TGF-β, ο ιστικός παράγοντας, διάφορες φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL- 1α, IL-6 και TNF-α. Οδηγεί σε αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως των: VCAM-1, ICAM-1, καθώς επίσης και εξωκυττάρων πρωτεϊνών, όπως της λαμνίνης και κολλαγόνου τύπου IV. Βιολογικά επακόλουθα είναι η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, αγγειογένεση, κυτταρική απόπτωση [496, 498-500]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η σύνδεση του NF-κΒ με το γονίδιο *AGER* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα RAGE, καταλήγει σ έναν άξονα θετικής ανάδρασης και σε χρόνια φλεγμονή [451].

## **3.4 Βιολογικές λειτουργίες που συμμετέχει ο άξονας HMGB1/RAGE**

### **3.4.1 Άξονας HMGB1/RAGE στην κυτταρική μετανάστευση και προσκόλληση**

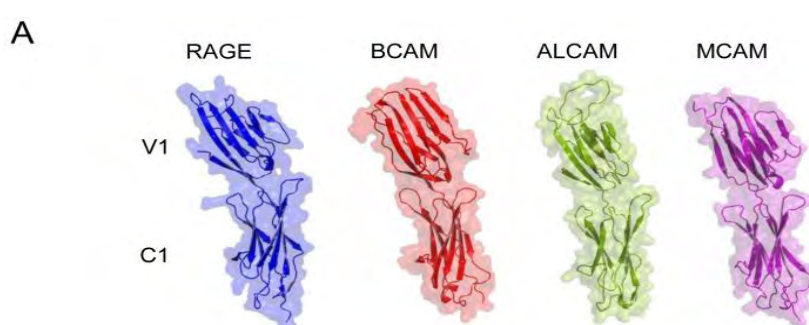
Η μετανάστευση των κυττάρων ως αποτέλεσμα της σηματοδότησης HMGB1/RAGE έχει ευρέως μελετηθεί [364, 372, 396, 486, 491]. Η ανάπτυξη νευραξόνων είναι η πρώτη μορφή κυτταρικής μετανάστευσης που περιγράφηκε [37, 483, 496]. Επίσης, εμπλέκεται στη μετανάστευση πολλών άλλων κυτταρικών πληθυσμών όπως των ενδοθηλιακών κυττάρων [501, 502], των κοκκιοκυττάρων [503], των μονοκυττάρων [504 -507], των δενδριτικών κυττάρων [503-507] και των λείων μυϊκών κυττάρων [508, 509]. Η σηματοδότηση μέσω του RAGE διαδραματίζει επιπρόσθετα σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του πνευμονικού παρεγχύματος, επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση τόσο μεταξύ των κυττάρων (cell to cell interaction) όσο και των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (cell to matrix interaction) [364, 398, 468, 510]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ο άξονας HMGB1/RAGE ρυθμίζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [362-364, 449, 468, 510, 511].

Επιπρόσθετα, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την αξία της σηματοδότησης του RAGE στην κυτταρική προσκόλληση, ιδίως των λευκοκυττάρων και στην στρατολόγηση αυτών σε φλεγμονώδεις ιστούς [515]. Σε ζωικό μοντέλο με οξεία περιτονίτιδα αποδείχθηκε ότι ο RAGE σηματοδοτείται και αλληλεπιδρά με το αντιγόνο μακροφάγου-1 (Mac-1) του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης, που εντοπίζεται στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων. Απότοκο αυτής της σύνδεσης είναι η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στους σηπτικούς ιστούς [514]. Σε

μεταγενέστερη μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο RAGE αλληλεπιδρά τόσο με τη Mac-1 όσο και με το μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 1 (ICAM-1) επάγοντας με αυτόν τον τρόπο τη χημειοταξία λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο [515, 516].

Υψηλή έκφραση RAGE έχει παρατηρηθεί και σε αιμοποιητικά κύτταρα νεαρών, αναπτυσσόμενων ζώων που οδηγεί σε προσκόλληση των λευκοκυττάρων [517]. Η προσκόλληση φλεγμονωδών κυττάρων επάγεται επίσης μέσω διέγερσης της έκφρασης του VCAM-1 σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και περιτοναϊκά μεσοθηλιακά κύτταρα [518, 519].

Άλλωστε, ο RAGE υποστηρίζεται πως εξελίχθηκε από μια οικογένεια μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs) [512]. Μάλιστα, σημαντική ομοιότητα παρατηρείται μεταξύ της αλληλουχίας των αμινοξέων και της τρισδιάστατης δομής του με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία και δομή των CAMs. Πιο συγκεκριμένα, τα CAMs με τα οποία έχει συγκριθεί είναι: το ενεργοποιημένο μόριο προσκόλλησης λευκοκυττάρων (ALCAM), το μόριο πρόσφυσης βασικού κυττάρου (BCAM) και το μόριο προσκόλλησης κυττάρων μελανώματος (MCAM) όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 21** [423, 513].



**Εικόνα 21.** 3D δομή HMGB1 και κυτταρικών μορίων προσκόλλησης (CAM).

Οι περιοχές Ig V1 και C1 του RAGE που παρουσιάζονται με μπλε χρώμα, βρίσκονται πιο μακριά από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και υιοθετούν μια ελαφρώς λυγισμένη δομή. Αυτή η χωρική διάταξη είναι πολύ καλά διατηρημένη στις περιοχές Ig1 και Ig2 του κοντινού ομόλογου BCAM (κόκκινο χρώμα). Τα 3D μοντέλα των ALCAM (πράσινο χρώμα)

και MCAM (μωβ χρώμα) υποδηλώνουν ότι και αυτά τα μόρια προσκόλλησης υιοθετούν μια πολύ παρόμοια δομή που ενδεχομένως να απαιτείται για την δράση προσκόλλησης.

**Συνομογραφίες:** **ALCAM**, Ενεργοποιημένο μόριο προσκόλλησης λευκοκυττάρων; **BCAM**, Μόριο πρόσφυσης βασικού κυττάρου; **MCAM**, Μόριο προσκόλλησης κυττάρων μελανώματος; **RAGE**, Υποδοχέας για τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης

*Τροποποιημένο από: Sessa L. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). PLoS One. 2014;9:e86903.*

### 3.4.2 Ο άξονας HMGB1/RAGE στην ιστική βλάβη και αναγέννηση

Ο HMGB1/RAGE άξονας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση της έμφυτης και επίκτητης ανοσολογικής απάντησης [393, 481, 482, 520, 521]. Η HMGB1 διεγείρει μακροφάγα και άλλα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας για την απελευθέρωση προαγγειακών κυτοκινών, όπως ο VEGF, TNF-α, και η IL-8. Όσον αφορά την επίκτητη ανοσία έχει φανεί, ότι οδηγεί σε ωρίμανση και ενεργοποίηση των DCs και ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T κυττάρων ιδίως προς ένα Th1 κυτταροκινικό φαινότυπο [476, 479, 481, 522].

Αναλυτικά, στην ιστική βλάβη, η HMGB1 οδηγεί σε στρατολόγηση λευκοκυττάρων και σε ενεργοποίηση αυτών ώστε να εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Σε μοντέλα μυϊκού τραυματισμού, παρατηρήθηκαν διαφορετικές οξειδοαναγωγικές μορφές της HMGB1 να είναι παρούσες εξωκυτταρίως διαδοχικά [521]. Αναφέρεται πως αρχικά απελευθερώνεται η πλήρως ανηγμένη (all-thiol) μορφή της HMGB1 η οποία αργότερα μετατρέπεται σε δισουλφίδική μορφή (disulfide) HMGB1 [521]. Είναι γνωστό ότι και οι δυο μορφές απελευθερώνονται από νεκρά ή έντονα καταπονημένα κύτταρα. Χαρακτηριστικά, η δισουλφίδική HMGB1 σχηματίζει ένα ετεροσύμπλεγμα με τη χημειοκίνη CXCL12 που είναι πάντα



παρούσα εξωκυτταρίως [521]. Το HMGB1-CXCL12 ετεροσύμπλεγμα στρατολογεί λευκοκύτταρα από τη μικροκυκλοφορία αφού συνδεθεί με τον υποδοχέα RAGE των κυττάρων του τραύματος. Εισερχόμενα λευκοκύτταρα θα ενεργοποιηθούν από τη δισουλφιδική μορφή του HMGB1, για να αρχίσει η παραγωγή κυτοκινών, χημειοκινών και ROS [521]. Οι ROS αρχικά θα μετατρέψουν την HMGB1 σε δισουλφιδική μορφή ενισχύοντας τη φλεγμονώδη απόκριση, αλλά με το χρόνο θα οξειδώσουν περαιτέρω τις κυστεΐνες και θα απενεργοποιήσουν την HMGB1 (sulfonated HMGB1) [521]. Έτσι, η HMGB1 θα στρατολογήσει αρχικά τα λευκοκύτταρα, θα τα ενεργοποιήσει και στη συνέχεια θα απενεργοποιηθεί από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου του μικροπεριβάλλοντος του τραύματος [521].

Η HMGB1 διαδραματίζει επίσης, σημαντικό ρόλο στα γεγονότα που έπονται της φλεγμονής όπως στην επισκευή και αναγέννηση των ιστών [521]. Η HMGB1 προσλαμβάνει μονοκύτταρα και μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC) τα οποία συμβάλλουν στην ιστική επισκευή (μυών, ενδοθηλίου, νευρώνων) και προάγει τη νεοαγγειογένεση [502, 521]. Ο HMGB1/RAGE άξονας παίζει σημαντικό ρόλο στη νεοαγγειογένεση των ισχαιμικών τραυματισμένων περιοχών δια μέσω της αυξημένης έκφρασης ιντεγκρινών, επάγοντας με αυτό τον τρόπο τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων [372, 396, 502, 521].

Από την άλλη πλευρά, η υπερδραστηριότητα του άξονα μπορεί να οδηγήσει σε υπέρμετρη ενεργοποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων και σε παθολογία των ιστών. Ο αντιομοιοστατικός ρόλος της HMGB1 έχει φανεί σε επίμυες όταν η εξουδετέρωση της αλαρμίνης με χρήση ανταγωνιστών ανέστειλε δοσοεξαρτώμενα το ενδοτοξικό σοκ, τη σήψη, απέτρεψε την βλάβη οργάνων και αύξησε την επιβίωση [520-523].

### 3.5 Ο ρόλος του άξονα HMGB1/RAGE στη πνευμονική νόσο

Πληθώρα μελετών έχουν διερευνήσει το ρόλο του άξονα HMGB1/RAGE στην παθογένεια νοσημάτων του αναπνευστικού συστήματος. Δεδομένου ότι ο RAGE υπερεκφράζεται στο πνευμονικό παρέγχυμα υποστηρίζεται ότι ο ασκεί εγγενώς έναν σημαντικό ομοιοστατικό ρόλο. Έχει φανεί ότι τα άτομα με σοβαρό άσθμα έχουν υψηλότερα επίπεδα HMGB1 στα πτύελα και στον ορό συγκριτικά με τους υγιείς και τους ασθενείς με μερικώς ελεγχόμενη νόσο [523-528]. Τα επίπεδά της συσχετίστηκαν θετικά με τη σοβαρότητα της ασθένειας και τον αριθμό των φλεγμονωδών κυττάρων των πτυέλων [523-528]. Επίσης, ο υποδοχέας RAGE φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του άσθματος στους ανθρώπους ενώ ο sRAGE μελετάται ως θεραπευτικός στόχος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της μείωσης του δυναμικά εκπνεόμενου όγκου στο πρώτο δευτερόλεπτο (FEV1), με έναν μοναδικό νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό (SNP) (rs2070600) του γονιδίου *AGER* [529-532]. Ο πολυμορφισμός αυτός υποστηρίχθηκε πως οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης της HMGB1 με τον RAGE και ενισχυμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις [529-532]. Η σημαντική εμπλοκή του υποδοχέα RAGE στην Th2 ανοσιακή απάντηση αποδεικνύεται σε πολλές πειραματικές μελέτες [533-538]. Η πρόκληση με μεταχολίνη προκάλεσε ηωσινοφιλία των αεραγωγών, υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων και εξασθένιση της πνευμονικής λειτουργίας, παθολογία η οποία δεν παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις ελλείμματος του υποδοχέα. Επί ελλείμματος του υποδοχέα παρατηρήθηκαν επίσης χαμηλά επίπεδα των Th2 κυτοκινών, IL-5 και IL-13. Πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι ο RAGE είναι απαραίτητος για τη συσσώρευση των ILC2s στον πνεύμονα επίμυων

μετά από πρόκληση με αλλεργιογόνο [535, 539-541]. Επιπλέον, ο RAGE φάνηκε να προάγει την έκφραση της IL-33 στον πνευμονικό ιστό [535].

Μελέτες σε καπνιστές με ΧΑΠ αποκάλυψαν υψηλότερα επίπεδα HMGB1 στο BAL και στον ορό συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες, ιδίως κατά την παρόξυνση της νόσου [474, 542-550]. Τα υψηλότερα επίπεδα της αλαρμίνης συσχετίστηκαν θετικά με μεγαλύτερο βαθμό απόφραξης των αεραγωγών [545]. Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα μακροφάγα, τα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών στους πάσχοντες, εξέφραζαν σε υψηλά επίπεδα την HMGB1 και προτάθηκαν ως κυτταρικές πηγές της στη νόσο [474]. Επίσης τα υψηλά επίπεδα HMGB1 σε πτύελα και πλάσμα ασθενών με ΧΑΠ συσχετίστηκαν με ουδετεροφιλική φλεγμονή καθώς έχει περιγραφεί ένας μηχανισμός θετικής ανάδρασης μεταξύ της έκφρασης HMGB1 και του αριθμού των ουδετεροφίλων [402, 543]. Το κάπνισμα τσιγάρων, ο πιο γνωστός αιτιολογικός παράγοντας της ΧΑΠ, προκαλεί θάνατο και νέκρωση ουδετερόφιλων με ακόλουθη απελευθέρωση HMGB1, η οποία προσελκύει περισσότερα ουδετερόφιλα σε μια διαδικασία συνεχούς αυτοδιατήρησης του ουδετεροφιλικού προφίλ, αιτιολογώντας την παρόξυνση της νόσου [551-553]. Η αναδιαμόρφωση των αεραγωγών, χαρακτηριστικό της ΧΑΠ έχει συσχετισθεί με την υπερέκφραση της HMGB1 [544, 551]. Η μεσολαβούμενη από τον RAGE αναδιαμόρφωση των αεραγωγών μαρτυράται από τη μελέτη των Ojo και συν. που απέδειξε ότι η αναστολή της σηματοδότησης του υποδοχέα εξασθενεί τη δράση της HMGB1 επί των επιθηλιακών κυττάρων [552]. Επιπρόσθετα, η χρήση αναστολέων του NF-κΒ σε επίμυες με ΧΑΠ οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης της HMGB1 στον ιστό του πνεύμονα [546]. Η μόνη μελέτη που, που δεν ανίχνευσε σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων HMGB1 στο BAL ασθενών με ΧΑΠ και υγιών ατόμων προέρχεται από την ομάδα του Di Stefano [554]. Ο προστατευτικός

ρόλος του υποδοχέα υποστηρίζεται περαιτέρω από την ενισχυμένη έκφραση του διαμεμβρανικού υποδοχέα RAGE [474, 543, 554-560] και τη μειωμένη έκφραση του sRAGE [560-565], στους πνεύμονες ασθενών που εισπνέουν εξωτερικούς ρύπους [561-566].

Πολυμορφισμοί του γονιδίου *AGER* έχουν συσχετιστεί με αυξημένη σοβαρότητα νόσου σε ασθενείς με κυστική ίνωση [567]. Για παράδειγμα, ο πολυμορφισμός 429T/C έχει συσχετισθεί με μειωμένη τιμή FEV<sub>1</sub> και αυξημένη έκφραση RAGE στους ασθενείς αυτούς [567]. Ο πολυμορφισμός 374T/A έχει συσχετισθεί με αυξημένη έκφραση του RAGE και αυξημένα επίπεδα IgE στους πνεύμονες των ασθενών με κυστική ίνωση [568]. Επίσης αναφέρεται ότι οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα RAGE είναι πιο ευαίσθητοι σε περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα και παθογόνα όπως ο *Aspergillus* [566, 568]. Ως εκ τούτου, η υπερέκφραση του RAGE και των συνδετών του σε συνδυασμό με την παραγωγή ελαττωματικού sRAGE προκαλεί φλεγμονώδεις αποκρίσεις και επιδείνωση της αναπνευστικής λειτουργίας σε ασθενείς με κυστική ίνωση [565, 569].

Επίσης, ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της οξείας πνευμονικής βλάβης (ALI) και του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS) είναι η κυτταρική βλάβη των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων, και τα επίπεδα του sRAGE έχουν συσχετισθεί με το βαθμό της πνευμονικής καταστροφής [472, 570]. Είναι ενδιαφέρον ακόμη ότι η στόχευση του υποδοχέα προστατεύει τον πνεύμονα από την οξείας πνευμονική βλάβη *in vivo* [571]. Επομένως, ο sRAGE συνιστά έναν δείκτη σοβαρότητας της πνευμονικής νόσου εμπνέοντας την θεραπευτική στόχευση [572, 573].

Στην πνευμονική ίνωση η έκφραση της πρωτεΐνης RAGE μειώνεται στον πνευμονικό ιστό ενώ χαμηλά επίπεδα sRAGE ανευρίσκονται στο BAL των ασθενών

συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό [463, 574-576]. Η έκφραση του υποδοχέα RAGE εξασθενεί επίσης σε ασθενείς με IPF που βρίσκονται παρόξυνση της νόσου [463, 577]. Σε ηλικιωμένους επίμυες, η απουσία του RAGE οδηγεί σε αυτόματη γένεση ινωδών αλλοιώσεων, υποδηλώνοντας τον προστατευτικό αντινωτικό ρόλο που ασκεί ο υποδοχέας RAGE στο πνευμονικό παρέγχυμα. Η έκφραση του RAGE μειώνεται επίσης στους πνεύμονες των επίμυων με ίνωση λόγω έκθεσης σε μπλεομυκίνη [464], αμίαντο [463] και διοξείδιο του πυριτίου [578]. Ωστόσο, ο ρόλος του RAGE στην κυτταρική προσκόλληση και ιστική επούλωση διαφοροποιείται σε αυτά τα μοντέλα και εξαρτάται από το είδος της παρεγχυματικής βλάβης. Η έλλειψη RAGE έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση στην αμιάντωση [579, 580]. Ο RAGE παίζει ρόλο στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), η οποία έχει αναδειχθεί ως βασικός μηχανισμός για την προαγωγή ενός προινωτικού περιβάλλοντος [581]. Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν απαιτείται ο RAGE για την EMT ή εάν η ανεπάρκειά του προωθεί την EMT [468]. Η μείωση του RAGE σε περιβάλλον ίνωσης μπορεί να οφείλεται σε υποέκφραση του γονιδίου του, σε διαφοροποίηση των ΑΤΠ πνευμονοκυττάρων, μηχανισμοί που μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρική δυσλειτουργία και ινωτικό προφίλ [460, 463, 523].

Ο κυτταρικός θάνατος των καρκινικών κυττάρων λόγω ανεπαρκούς αγγειογένεσης, θα προκαλέσει απελευθέρωση HMGB1 και κατα συνέπεια στρατολόγηση μακροφάγων και ουδετεροφίλων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ο ICD είναι στην πραγματικότητα ένα εξελικτικά διατηρημένο πρόγραμμα αντιμετώπισης παθογόνων, με μονοπάτια απόκρισης παρόμοια με εκείνα που ενεργοποιούνται για την αντιμετώπιση ιών [582, 583]. Μελέτες αναφέρουν ότι ο ICD χαρακτηρίζεται από την εκπομπή καλρετικουλίνης (ως σήμα eat me), HMGB1 και ATP (ως σήμα find me), που ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα και εμπλέκονται στη

φλεγμονή [583]. Υποστηρικτικά, η εξουδετέρωση της έκφρασης της HMGB1 επηρεάζει αρνητικά την πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που λαμβάνουν θεραπεία με ανθρακυκλίνες. Είναι σαφές ότι η καλά ενορχηστρωμένη απελευθέρωση καλρετικουλίνης, HMGB1 και ATP είναι σημαντική για την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων [583]. Αντιφατικές μελέτες αναφέρουν ότι ο άξονας HMGB1/RAGE ρυθμίζει τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [36, 364, 396, 486, 491, 584] και η επαγόμενη από HMGB1 σηματοδότηση του RAGE ενισχύει την εξέλιξη του καρκίνου σε εμφυτευμένους και εν γένει καρκινικούς όγκους [362, 584]. Η υπερέκφραση της HMGB1 συνδέεται με φτωχότερη πρόγνωση σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου. Όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα υποστηρίζεται ότι ο RAGE και τα επίπεδα sRAGE ορού μειώνονται στη νόσο [461, 467, 554]. Οι ερευνητές τονίζουν την καρκινογόνο επίδραση της μικρότερης συγκέντρωσης sRAGE, τεκμηριώνοντας ότι η μειωμένη έκφραση του RAGE και sRAGE οδηγεί σε κυτταρική διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στον πνεύμονα [585].

### **3.6 Ο ρόλος του άξονα HMGB1/RAGE στην υπεζωκοτική νόσο**

Όσον αφορά το ρόλο του άξονα HMGB1/RAGE στην υπεζωκοτική νόσο, αναδυόμενα δεδομένα μαρτυρούν ότι τα επίπεδα HMGB1 στον ορό και στο πλάσμα είναι σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με κακόηθες μεσοθηλιώμα συγκριτικά με τα άτομα που έχουν εκτεθεί σε αμίαντο και τους υγιείς μάρτυρες, προτείνοντας πειστικά τη χρήση της αλαρμίνης HMGB1 ως πρώιμο διαγνωστικό (screening tool) και προγνωστικό δείκτη στο κακόηθες μεσοθηλιώμα [586-596]. Υποστηρίζεται ότι τα κακοήθη κύτταρα του μεσοθηλιώματος εκφράζουν και εκκρίνουν ενεργητικά την

HMGB1 σε υψηλά επίπεδα *in vitro* [586-596] ενώ η HMGB1 συμβάλλει στην κυτταρική προσκόλληση στο υπόστρωμα (adhesion) και την ανάπτυξη του όγκου [595].

Ο αμίαντος είναι κυτταροτοξικός για τα ανθρώπινα μεσοθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, ο προκαλούμενος από αμίαντο κυτταρικός θάνατος είναι μια ρυθμιζόμενη μορφή κυτταρικής νέκρωσης που συνδέεται με την καρκινογένεση. Η καρκινογένεση έχει συνδεθεί με την απελευθέρωση κυτοκινών όπως η HMGB1 και μεταλλαξιόγόνων αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) από φλεγμονώδη κύτταρα [588]. Ειδικότερα, ο αμίαντος μετατοπίζει την HMGB1 από τον πυρήνα των μεσοθηλιακών κυττάρων προς το κυτταρόπλασμα και ακολούθως στον εξωκυττάριο χώρο. Η ενεργητική έκκριση της HMGB1 διεγείρει τα μακροφάγα να απελευθερώσουν TNF- $\alpha$ , IL- 1 $\beta$  μέσω ενεργοποίησης της οδού του NF- $\kappa$ B, με στόχο την ομοίωση και την προστασία της μεσοθηλιακής στιβάδας [596]. Απόρροια αυτού είναι η γένεση μιας χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας που τελικά ευνοεί τον μετασχηματισμό των μεσοθηλιακών κυττάρων σε καρκινικά. Έτσι η απελευθέρωση της HMGB1 περιγράφεται ως ένα κρίσιμο αρχικό βήμα για την παθογένεση της νόσου που σχετίζεται με τον αμίαντο και συνιστά το συνδετικό κρίκο του κυτταρικού θανάτου, της χρόνιας φλεγμονής [593] και της καρκινογένεσης [588, 596, 597]

Ως εκ τούτου νέες στρατηγικές που παρεμβαίνουν στη φλεγμονή που προκαλείται από τον αμίαντο θα μπορούσαν να αποτρέψουν ή να καθυστερήσουν την εμφάνιση μεσοθηλιώματος σε ομάδες υψηλού κινδύνου, συμπεριλαμβανομένων των γενετικά προδιατεθειμένων ατόμων και/ή να εμποδίσουν την ανάπτυξη του όγκου βελτιώνοντας την κάκιστη μέχρι στιγμής πρόγνωση των ασθενών. Προκλινικές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα επίμυων απέδειξαν ότι η μεσολαβούμενη από αντίσωμα αποκοπή της HMGB1 ή η χρήση πυροσταφυλικού αιθυλίου, ενός

αιθυλεστέρα που δρα ως αναστολέας του NF-κB και του RAGE, είναι επαρκή για να οδηγήσουν σε θεραπευτικό αποτέλεσμα [595, 598]. Ομοίως η στόχευση της HMGB1 στο πλαίσιο Α αναφέρεται πως δρα αντικαρκινικά [599].

Όσον αφορά τις βιολογικές ιδιότητες του άξονα στις υπεζωκοτικές συλλογές (ΥΣ) τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ελάχιστα καθώς υπάρχουν μόνο τρεις σχετικές μελέτες.

Η πρώτη μελέτη παρατήρησε αυξημένα επίπεδα της HMGB1 σε κακοήθειες και παραπνευμονικές ΥΣ συγκριτικά με τις διδρωματικές ΥΣ [600]. Επίσης, πρόσφατη μελέτη ανίχνευσε αυξημένα επίπεδα της HMGB1 σε ΥΣ ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (non small lung cancer, NSCLC), σε συνδυασμό με αυξημένα επίπεδα και άλλων κυτοκινών όπως η IL-6 και η IL-8 [601]. Αυξημένα επίσης ήταν τα επίπεδα της πρωτεΐνης και του mRNA HMGB1 στους καρκινικούς ιστούς του συγκεκριμένου καρκινικού τύπου. Στην ίδια μελέτη αποκαλύφθηκε επίσης ότι η ανασυνδυασμένη HMGB1 μείωνε σημαντικά την ευαισθησία της κυτταρικής σειράς A549 στη χορήγηση σισπλατίνης [601].

Η τρίτη μελέτη ανέφερε ότι οι μετρήσεις των επιπέδων του υποδοχέα sRAGE στον ορό και το πλάσμα μπορεί να συνιστούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διάγνωση διαφορούμενων εξιδρωματικών ΥΣ, σημειώνοντας ότι υψηλότερα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα ανευρίσκονται σε φυματιώδεις και κακοήθους αιτιολογίας ΥΣ [602], δηλαδή σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονώδους διαδικασίας παρά σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονής της μεσοθηλιακής στιβάδας (παραπνευμονικές ΥΣ). Με άλλα λόγια, δεδομένου ότι η ενίσχυση της έκφρασης του υποδοχέα RAGE ενισχύει την επιβίωση των κυττάρων σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η επί μακρόν χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες οδηγούν σε ενίσχυση της έκφρασης του sRAGE στο πλευριτικό υγρό συγκριτικά με τις



περιπτώσεις οξείας φλεγμονής λόγω πνευμονίας [602]. Τέλος η ίδια μελέτη υποστήριξε ότι τα επίπεδα του sRAGE στο πλευριτικό υγρό ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα sRAGE των ίδιων ασθενών στα δείγματα ορού [602]. Αυτό είναι λογικό αν λάβουμε υπ όψιν τα υψηλότερα εν γένει, επίπεδα RAGE και sRAGE στον πνευμονικό ιστό και στο σπλαγγικό υπεζωκότα [602].

# ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Εισαγωγή – Σκοπός της μελέτης

### 4.1 Εισαγωγή

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αποκαλύπτει ότι ο διαγνωστικός, προγνωστικός και δυνητικά θεραπευτικός ρόλος των σηματοδοτικών αξόνων IL-33/ST2 και HMGB1/RAGE έχει επαρκώς μελετηθεί σε πολλά αναπνευστικά νοσήματα όπως στο άσθμα, στη ΧΑΠ, στην πνευμονική ίνωση, στον καρκίνο του πνεύμονα. Εντούτοις, ο ρόλος τους στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία των νοσημάτων του υπεζωκότα είναι ελάχιστα μελετημένος. Βάσιμα μπορεί να υποστηρίξει κανείς πως υπάρχει ένα σημαντικό βιβλιογραφικό και ερευνητικό κενό όσον αφορά τον παθοφυσιολογικό ρόλο των αλαρμινών IL-33 και HMGB1 καθώς και των διαλυτών τους υποδοχέων sST2 και sRAGE στην υπεζωκοτική νόσο. Διαμορφώνεται έτσι πρόσφορο έδαφος για τη διατύπωση υποθέσεων και τη διεξαγωγή μελετών.

### 4.2 Σκοπός της μελέτης

Οι στόχοι της παρούσας διατριβής είναι:

1. Να υπολογισθούν οι συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης IL-33 και του διαλυτού της υποδοχέα sST2 καθώς και τα επίπεδα της πρωτεΐνης HMGB1 και του διαλυτού της υποδοχέα sRAGE σε ανθρώπινες διδρωματικές (TrPE), κακοήθειες (MPE) και παραπνευμονικές (PPE) ΥΣ.
2. Να γίνει συσχέτιση των επιπέδων των IL-33/sST2 και HMGB1/sRAGE με την ηλικία και το φύλο του δείγματος.

3. Να γίνει συσχέτιση των επιπέδων των IL-33/sST2 και HMGB1/sRAGE με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των μελετούμενων ΥΣ [Κριτήρια Light: επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), γλυκόζης, ολικών λευκωμάτων και λευκωματίνης και γενική υπεζωκοτικού υγρού (YY)].
4. Να χρησιμοποιηθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε τύπο ΥΣ, δηλαδή δείγματα με τις υψηλότερες και χαμηλότες συγκεντρώσεις IL-33 ή HMGB1 αντίστοιχα, ώστε να διερευνηθεί η επίδρασή τους σε φαινότυπους ανθρώπινων καλοήθων μεσοθηλιακών MeT-5A κυττάρων. Μελετήθηκε η επίδρασή τους στην κυτταρική προσκόλληση, κυτταρική μετανάστευση και στην ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών.
5. Να μελετηθούν οι *in vitro* επιδράσεις της χορήγησης ανασυνδυασμένης IL-33 στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A.
6. Να μελετηθούν οι *in vitro* επιδράσεις της χορήγησης ανασυνδυασμένης HMGB1 στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και στην ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών σε καλοήθη μεσοθηλιακά κύτταρα MeT-5A.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 5.1 Ασθενείς και συλλογή δειγμάτων

Η μελέτη συμπεριέλαβε 40 ασθενείς με διεγνωσμένες ΥΣ (14 ασθενείς με διδρωματικές, 13 με κακοήθειες και 13 με παραπνευμονικές ΥΣ) από μια τράπεζα δειγμάτων 230 ασθενών. Οι ασθενείς επιλέχθηκαν με τυχαία δειγματοληψία. Επρόκειτο για άτομα που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας από τον Ιανουάριο του 2014 έως τον Μάρτιο του 2015. Η διάκριση των διδρωματικών από τις εξιδρωματικές ΥΣ βασίστηκε στα εδραιωμένα κριτήρια του Light [603]. Έτσι για τον ορισμό των εξιδρωμάτων απαιτούνταν ένα από τα παρακάτω: λόγος ολικών λευκοματων ΥΥ προς ολικά λευκώματα ορού μεγαλύτερος από 0,5 και/ή λόγος LDH ΥΥ προς LDH ορού μεγαλύτερος από 0,6 και/ή τιμή LDH ΥΥ μεγαλύτερη από τα 2/3 του ανώτερου ορίου των φυσιολογικών επιπέδων LDH στον ορό.

Η διάγνωση των παραπνευμονικών συλλογών τέθηκε όταν υπήρχε: α) κλινική εικόνα συμβατή με παρουσία πνευμονικής λοίμωξης, δηλαδή χαρακτηριζόμενη από οξείας έναρξης εμπύρετο και συνοδό πυώδη απόχρεμψη, β) συμβατή ακτινολογική εικόνα με παρουσία κυψελιδικού ή πυκνωτικού τύπου πνευμονικών σκιάσεων, γ) απομόνωση παθογόνου σε καλλιέργεια ΥΥ, δ) βελτίωση της κλινικοεργαστηριακής εικόνας μετά από χορήγηση αντιβιοτικής αγωγής. Κριτήριο για τη διάγνωση των κακοήθων ΥΣ ήταν η θετική κυτταρολογική του ΥΥ και/ή η θετική για κακοήθεια βιοψία του υπεζωκότα.

Τα δείγματα ΥΥ συλλέχθηκαν με θωρακοκέντηση υπό άμεση υπερηχογραφική καθοδήγηση. Το ΥΥ συλλέχθηκε σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες και φυγοκεντρήθηκε (1.200g για 10 λεπτά) μέσα στα πρώτα

60 λεπτά από τη συλλογή του σύμφωνα με την ισχύουσα βιβλιογραφία [304]. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή του. Η Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ενέκρινε όλες τις διαδικασίες και οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης.

Τα βασικά δημογραφικά και τα εργαστηριακά χαρακτηριστικά ορού και ΥΣ του δείγματος των ασθενών της μελέτης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**.

**Πίνακας 5.** Δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά πληθυσμού μελέτης, ως σύνολο ασθενών και ανάλογα με τον τύπο της υπεζωκοτικής συλλογής.

	Σύνολο ασθενών n=40	Διιδρωματικές ΥΣ n=14	Κακοήθειες ΥΣ n=13	Παραπνευμονικές ΥΣ n=13	p-value
<b>Φύλο</b>					
Άντρες	28 (70)	9 (64.3)	8 (61.5)	11 (84.6)	0.371
Γυναίκες	12 (30)	5 (35.7)	5 (38.5)	2 (15.4)	0.371
<b>Ηλικία</b>	67.7 ± 15.0	72.8 ± 13.1	69.2 ± 10.4	60.8 ± 18.7	0.063
<b>Πλευριτικό Υγρό</b>					
Σάκχαρο (g/dL)	92.6 ± 48.3	121.6 ± 28.1*	73.4 ± 49.3	73.5 ± 53.0*	<b>0.016</b>
Ολικά λευκώματα (g/dL)	3.8 ± 1.3	2.4 ± 0.7*	4.7 ± 0.6*	4.5 ± 1.0*	<b>&lt;0.001</b>
Αλβουμίνη (g/dL)	2.1 ± 0.7	1.5 ± 0.6*	2.8 ± 0.4*	2.1 ± 0.5*	<b>&lt;0.001</b>
LDH (IU/L)	822 ± 1187	118 ± 39*	952 ± 1069*	1450 ± 1551*	<b>&lt;0.001</b>
ADA (U/L)	11.0 ± 8.7	4.1 ± 1.8*	12.2 ± 6*	17.4 ± 10.4*	<b>&lt;0.001</b>
pH	7.4 ± 0.1	7.4 ± 0.0	7.4 ± 0.1	7.3 ± 0.1	0.162
N κυττάρων/mm <sup>3</sup>	2823 ± 5277	1152 ± 1210	4338 ± 8543	3107 ± 3176	0.065
N ερυθροκυττάρων/mm <sup>3</sup>	73624 ± 183329	15574 ± 30497*	135720 ± 273635*	74148 ± 158824*	<b>0.014</b>
N πολυμορφοπύρηνων/mm <sup>3</sup>	1188 ± 1779	339 ± 475*	1090 ± 1431*	2200 ± 2455*	<b>0.005</b>
N λεμφοκυττάρων/mm <sup>3</sup>	1429 ± 4275	712 ± 696	2901 ± 7414	728 ± 649	0.303
<b>Ορός</b>					
Ολικά λευκώματα (g/dL)	6.7 ± 0.7	6.4 ± 0.5*	7.1 ± 0.4*	6.7 ± 0.9	<b>0.027</b>
Αλβουμίνη (g/dL)	2.1 ± 0.7	3.2 ± 0.7	3.6 ± 0.5*	2.7 ± 0.7*	<b>0.006</b>
LDH (IU/L)	273 ± 154	278 ± 128	279 ± 81	284 ± 226	0.951
<b>Τύπος κακοήθους ΥΣ</b>					
Μεταστατικό καρκίνωμα <sup>Α</sup>	2 (15.4)				
Καρκίνος πνεύμονα	9 (69.2)				
Μεσοθηλίωμα	1(7.7)				
Λέμφωμα	1(7.7)				

<sup>Α</sup>Τα έντονα μαύρα γράμματα επισημαίνουν την ύπαρξη στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων

\*Post hoc analysis, «Εκ των Υστέρων» Δοκιμασίες ελέγχου συσχετίσεων μεταξύ των χαρακτηριστικών των διαφόρων τύπων ΥΣ

*^Μεταστατικά καρκινώματα από πρωτοπαθές καρκίνωμα μαστού.*

**Συντομογραφίες:** *ΥΣ*, Υπεζωκοτική συλλογή; **ADA**, Απαμινάση της αδενοσίνης; **LDH**, Γαλακτική δεϋδρογενάση

## **5.2. Μετρήσεις στο υπεζωκοτικό υγρό**

Χαρακτηριστικό των υποδοχέων ST2 και RAGE είναι ότι εκφράζονται σε διαλυτή μορφή (soluble form) εξωκυτταρίως, δρώντας ως υποδοχείς-αναστολείς ή ως υποδοχείς εξουδετέρωσης (decoy receptors) των αλαρμινών IL-33 και HMGB1 αντίστοιχα και προσδιορίζονται μέσω χρήσης της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA.

### **5.2.1 Μετρήσεις της IL-33 και του sST2**

Η μέτρηση των επιπέδων της IL-33 και του sST2 πραγματοποιήθηκε με Sandwich ELISA. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια #ab119547 και #ab100563 αντίστοιχα (Abcam, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το εύρος ανίχνευσης για την IL-33: ήταν 7,8 pg/mL - 500 pg/mL και για τον sST2: 1,65 pg/mL - 1200 pg/mL). Το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) υπολογίστηκε [(LOD=Mean Blank Value +3σ)] σε 1,05 pg/mL για την IL-33 και 148,24 pg/mL για τον sST2. Συγκεντρώσεις ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης ίσες ή μικρότερες από το LOD, καταγράφησαν ως μη ανιχνεύσιμες και για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτά τα δείγματα συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας με τιμές ίσες με το LOD. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν. Κατά τη μέτρηση του sST2, τα δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από τη μέγιστη γραμμική απόκριση (maximum linear response), αραιώθηκαν κατάλληλα και αναλύθηκαν εκ νέου.

Οι μετρήσεις ELISA με το αντιδραστήριο #ab119547 ανιχνεύουν την ώριμη μορφή IL-33<sub>112-270</sub> η οποία έχει υποστεί εναλλακτικό μάτισμα με δράση του



πρωτεολυτικού ενδογενούς ενζύμου καλπαΐνη (calpain) [139]. Το ώριμο πεπτίδιο που προσδιορίζεται έχει εκκριθεί ενεργητικά ως απότοκο κυτταρικού στρες και έχει ικανότητα σηματοδότησης μέσω του διαμεμβρανικού ST2L. Επίσης, το αντιδραστήριο #ab100563 είχε τη δυνατότητα αναγνώρισης την εξωκυττάριας περιοχής του ST2 υποδοχέα (αμινοξέα:19-328).

## 5.2.2 Μετρήσεις της HMGB1 και του sRAGE

Η μέτρηση των επιπέδων HMGB1 και sRAGE πραγματοποιήθηκε με Sandwich ELISA (#ST51011, IBL International, Germany και #ab100632 Abcam, UK, αντίστοιχα) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το εύρος ανίχνευσης για την HMGB1 ήταν: 2,5 ng/mL - 80 ng/mL και για τον sRAGE: 2,06 pg/mL - 1500 pg/mL. Το όριο ανίχνευσης (LOD) ήταν 2,51 ng/mL για την HMGB1 και 83,63 pg/mL για τον sRAGE. Συγκεντρώσεις ανιχνεύσιμης πρωτεΐνης ίσες ή μικρότερες από το LOD, καταγράφησαν ως μη ανιχνεύσιμες και για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτά τα δείγματα συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας με τιμές ίσες με το LOD. Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν. Κατά τη μέτρηση του sRAGE, στα δείγματα με τιμές μεγαλύτερες από τη μέγιστη γραμμική απόκριση (maximum linear response), πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις και αναλύθηκαν εκ νέου.

Αξίζει να αναφερθεί σύμφωνα με πληροφορίες που παρείχαν οι κατασκευαστές ότι το αντιδραστήριο #ST51011, αναγνωρίζει εξίσου την πλήρως ανηγμένη (all thiol) HMGB1 όσο και την δισουλφιδική μορφή της (disulfide HMGB1). Ο διαλυτός υποδοχέας sRAGE που προσδιορίζεται με το χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο περιέχει 3 περιοχές ανοσοσφαιρίνης (μια περιοχή τύπου V και δύο περιοχές τύπου C, μορφής) και είναι τύπου esRAGE εκκρινόμενης μορφής (προϊόν εναλλακτικού ματίσματος).

## **5.3 Συσχέτιση επιπέδων IL-33, sST2 και HMGB1, sRAGE με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος και τα χαρακτηριστικά των ΥΣ**

Για την επίτευξη των στόχων 2,3, τα επίπεδα των IL-33, sST2 και HMGB1, sRAGE συσχετίστηκαν με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης (φύλο, ηλικία), τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του ΥΥ βάση των κριτηρίων του Light (γλυκόζη, LDH, ολικά λευκώματα, επίπεδα λευκωματίνης) [603] και τον απόλυτο αριθμό των ολικών κυττάρων και των κυτταρικών υποπληθυσμών των μελετούμενων ΥΣ.

## **5.4 *In vitro* Δοκιμασίες**

Στις *in vitro* δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα από κάθε τύπο ΥΣ. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν ήταν αυτά που είχαν την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγκέντρωση IL-33 και HMGB1 αντίστοιχα από κάθε τύπο ΥΣ (ανώτερη και κατώτερη τιμή σε σχέση με τη διάμεση τιμή). Για τη μελέτη των κυτταρικών φαινοτύπων χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A.

## 5.4.1 Δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης (Cell adhesion assay)

Για τη δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MeT-5A που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (10% FBS, 1% L-glutamine και 1% penicillin - streptomycin) και πλάκες 48 βοθρίων που είχαν προεπικαλυφθεί με φμπρονεκτίνη πλάσματος βοός (FN, 50μg/ml; #341631, Calbiochem, USA). Συγχρονισμένα MeT-5A κύτταρα (με αποστέρηση ορού για 24 ώρες), φυγοκεντρήθηκαν και επαναδιαλύθηκαν στα δείγματα υπεζωκοτικών υγρών και τοποθετήθηκαν στην πλάκα των 48 βοθρίων ( $12.5 \times 10^5$  κύτταρα/mL υπεζωκοτικού υγρού/βοθρίο). Τα κύτταρα παρέμειναν για 90 λεπτά σε κλίβανο επώασης 37° C, 5% CO<sub>2</sub>, ώστε να προσκολληθούν στο υπόστρωμα των πλακών. Η δοκιμασία κυτταρικής προσκόλλησης τερματίστηκε με απομάκρυνση (μέσω αναρρόφησης) των υπεζωκοτικών υγρών και ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος PBS (Phosphate Buffered Saline), μονιμοποίηση με διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδης και χρώση με 0.5% κρυσταλλικό ιώδες για 10 λεπτά. Τα βοθρία αφού πλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης, στέγνωσαν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε αποχρωματισμός τους με χρήση 10% οξικού οξέος. Τελικά έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) του διαλύματος που προέκυψε σε κάθε βοθρίο σε φασματοφωτόμετρο στα 570 nm. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Παράλληλα πρό της διαδικασίας του αποχρωματισμού ελήφθησαν μικροφωτογραφίες των κεχρωσμένων με κρυσταλλικό ιώδες κυττάρων προς εξέταση της μορφολογίας τους σε ανάστροφο μικροσκόπιο (Nikon Eclipse TS100) στο οποίο είχε ενσωματωθεί κάμερα (Leica Application Suite Version 3.4.0). Η μικροσκοπική απεικόνιση έγινε με χρήση LAS V3 λογισμικού. Σαν

πειράματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MeT-5A που επώαστηκαν με το θρεπτικό υλικό που προαναφέρθηκε.

## 5.4.2 Δοκιμασία επούλωσης πληγής (wound healing assay, scratch assay)

Για τη δοκιμασία κυτταρικής μετανάστευσης (επούλωσης πληγής) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MeT-5A ( $1.5 \times 10^5$  κύτταρα/mL) που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) (10% FBS, 1% L-glutamine και 1% penicillin - streptomycin) σε πλάκες 48 βοθρίων που είχαν προεπικαλυφθεί με φιμπρονεκτίνη πλάσματος βοός (FN, 50μg/ml; #341631, Calbiochem, USA). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι να σχηματιστεί μια πλήρης μονοστιβάδα και έπειτα συγχρονίστηκαν (με αποστέρηση ορού για 24 ώρες). Έπειτα, με το άκρο ενός ρύγχους 20μl, δημιουργήθηκε μία ασυνέχεια ή αλλιώς μία τεχνητή πληγή (wound) στη μονοστιβάδα των κυττάρων κατά μήκος της επιφάνειας της καλλιέργειας. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και ακολούθησε πλύση με διάλυμα PBS ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που είχαν αποκολληθεί. Προστέθηκαν τα υπεζωκοτικά υγρά των ασθενών σε κάθε βοθρίο και ελήφθη μία φωτογραφία από κάθε βοθρίο ( $A_0$ ) με ανάστροφο μικροσκόπιο (Nikon Eclipse TS100) στο οποίο είχε ενσωματωθεί κάμερα (Leica Application Suite Version 3.4.0). Η μικροσκοπική απεικόνιση έγινε με χρήση LAS V3 λογισμικού. Αφού ελήφθησαν φωτογραφίες από όλα τα βοθρία, η πλάκα μεταφέρθηκε στον κλίβανο και επώαστηκε για 8 ώρες. Εν συνεχεία ελήφθη εκ νέου μία φωτογραφία στο ίδιο ακριβώς σημείο ( $A_8$ ). Η μετανάστευση αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο:  $(A_0 - A_8) / A_0$  για τον υπολογισμό του δείκτη μετανάστευσης (Migration Index, MI). Το  $A_0$  αντιπροσωπεύει το εμβαδό της περιοχής του τραύματος στο χρόνο 0 και το  $A_8$

αντιπροσωπεύει την αντίστοιχη περιοχή στις 8 ώρες. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Σαν πειράματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MeT-5A που επωάστηκαν με το θρεπτικό υλικό που προαναφέρθηκε.

### **5.4.3 Αξιολόγηση σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών (Sphere formation assay)**

Συγχρονισμένα κύτταρα MeT-5A καλλιεργήθηκαν με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας σε 25  $\mu\text{L}$  υπεζωκοτικού υγρού ασθενών (50 κύτταρα/25 $\mu\text{L}$ ) για 48 ώρες [604]. Τα μεμονωμένα σφαιροειδή που προέκυψαν φωτογραφήθηκαν με ανάστροφο μικροσκοπίου (Leica Application Suite Version 3.4.0) στο οποίο είχε ενσωματωθεί κάμερα (Leica Application Suite Version 3.4.0). Η μικροσκοπική απεικόνιση έγινε με χρήση LAS V3 λογισμικού. Αξιολογήθηκε η ικανότητα σχηματισμού σφαιροειδών και μετρήθηκε η περίμετρος αυτών. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Σαν πειράματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MeT-5A που επωάστηκαν με το θρεπτικό υλικό που προαναφέρθηκε.

## **5.5 *In vitro* μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων με χρήση ανασυνδυασμένων IL-33 και HMGB1**

### **5.5.1 *In vitro* μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων με χρήση ανασυνδυασμένης IL-33**

Για την *in vitro* μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη (recombinant) IL-33 (#O95760, R&D Systems, Minneapolis). Μελετήθηκε η κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A. Για τα πειράματα προσκόλλησης χρησιμοποιήσαμε συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης IL-33 που κυμαίνονταν από 2,5-10 pg/mL και 1-100 ng/mL σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα [300, 605]. Κάθε πείραμα είχε 8 επαναλήψεις (replicates) και εκτελέστηκε δύο φορές. Για τα πειράματα κυτταρικής μετανάστευσης χρησιμοποιήσαμε συγκεντρώσεις 2,5, 5, 7,5 και 10 pg/mL καθώς και 1, 10 και 100 ng/mL ανασυνδυασμένης IL-33. Κάθε πείραμα είχε 6 ή 8 επαναλήψεις και εκτελέστηκε δυο φορές.

### **5.5.2. *In vitro* μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων με χρήση ανασυνδυασμένης HMGB1**

Για την *in vitro* μελέτη κυτταρικών φαινοτύπων χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη (recombinant) HMGB1 (#P09429, R&D Systems, Minneapolis) και μελετήθηκε η κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και ικανότητα σχηματισμού

κυτταρικών σφαιροειδών σε καλοήγη κυτταρική σειρά μεσοθηλιακών κυττάρων MeT-5A. Για τα πειράματα με ανασυνδυασμένη HMGB1, χρησιμοποιήσαμε συγκεντρώσεις 1 έως 250 ng/mL (1, 10, 50, 100, 200 και 250 ng/mL) σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [606]. Κάθε πείραμα είχε 6 ή 8 επαναλήψεις και εκτελέστηκε δυο ως τέσσερις φορές.

## 5.6 Στατιστική επεξεργασία

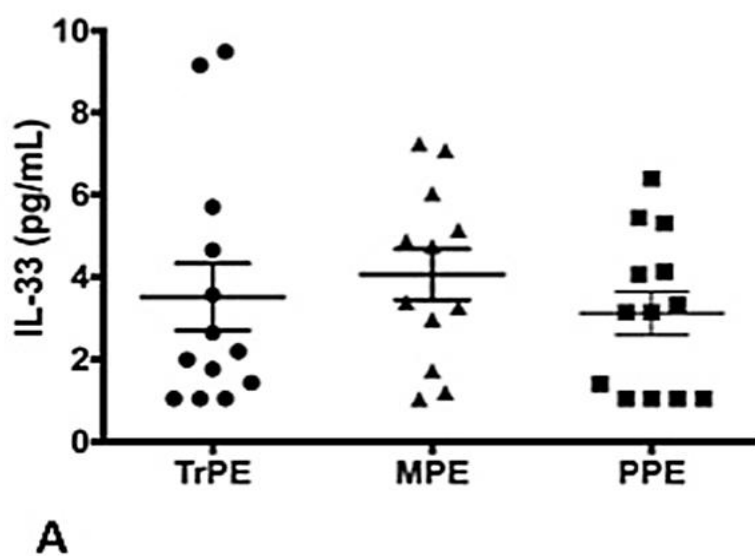
Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή±τυπική απόκλιση (SD) ενώ οι ποιοτικές ως συχνότητα (ποσοστό). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με unpaired t-test ή με μονόδρομη δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων One-way ANOVA και ακόλουθη Tukey post hoc analysis. Η φόρμουλα του Spearman χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση της συσχέτισης μεταξύ των ποσοτικών μεταβλητών. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν όπου απαιτείτο ο έλεγχος Fisher's Exact και ο μη παραμετρικός Kruskal-Wallis έλεγχος. Τιμή  $p < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Ανάλυση των καμπύλων λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (Receiver Operating Characteristic curves, ROC analysis) διενεργήθηκε όπου χρειάστηκε ώστε να χαρακτηριστεί η διαγνωστική ακρίβεια των υπο μελέτη βιοδεικτών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα

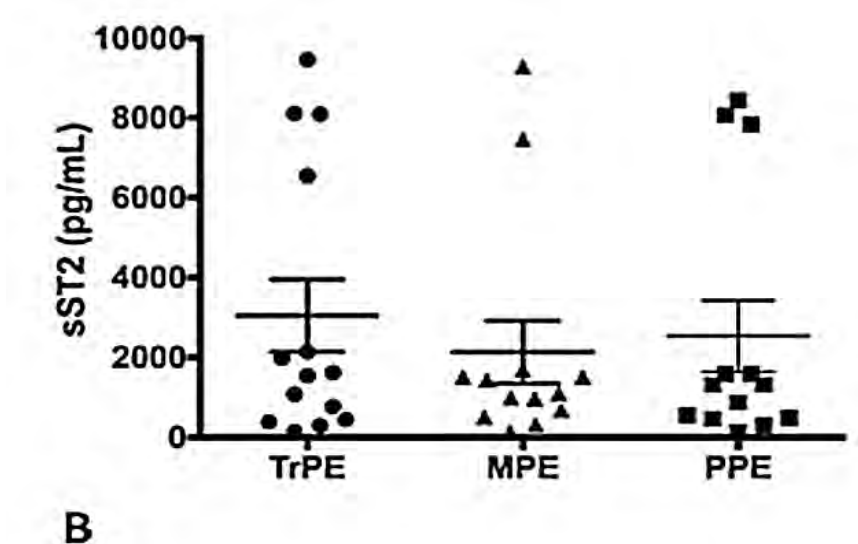
### 6.1 Επίπεδα της IL-33 και του διαλυτού υποδοχέα sST2 σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ

Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της IL-33 μεταξύ των διδρωματικών ( $3,52 \pm 2,94$  pg/mL), των κακοήθων ( $4,07 \pm 2,14$  pg/mL) και των παραπνευμονικών ΥΣ ( $3,12 \pm 1,89$  pg/mL) (Εικόνα 22Α).

Παρομοίως δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του sST2 μεταξύ των διδρωματικών ( $3044 \pm 3390$  pg/mL), των κακοήθων ΥΣ ( $2132 \pm 2837$  pg/mL) και των παραπνευμονικών ( $2538 \pm 3215$  pg/mL) ΥΣ (Εικόνα 22Β).







Εικόνα 22.

**A.** Επίπεδα της IL-33 σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ. **B.** Επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα sST2 σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ.

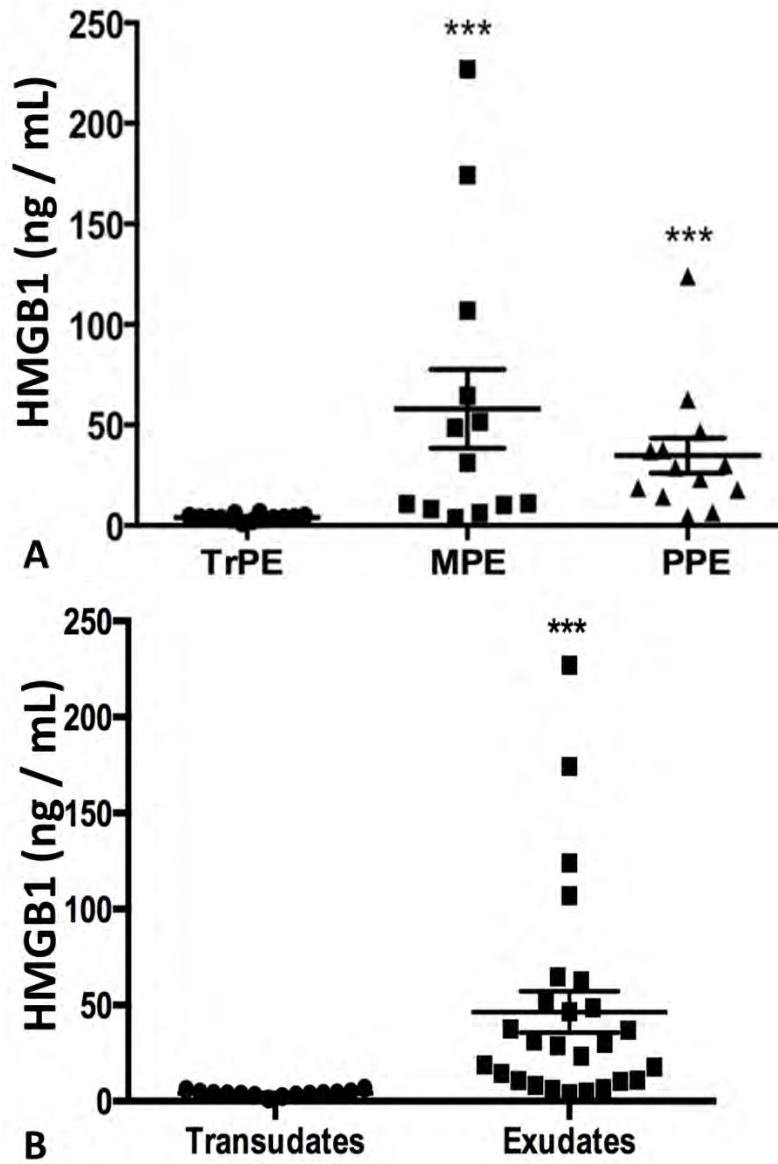
<sup>a</sup> Απεικονίζεται η μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ^ Kruskal-Wallis

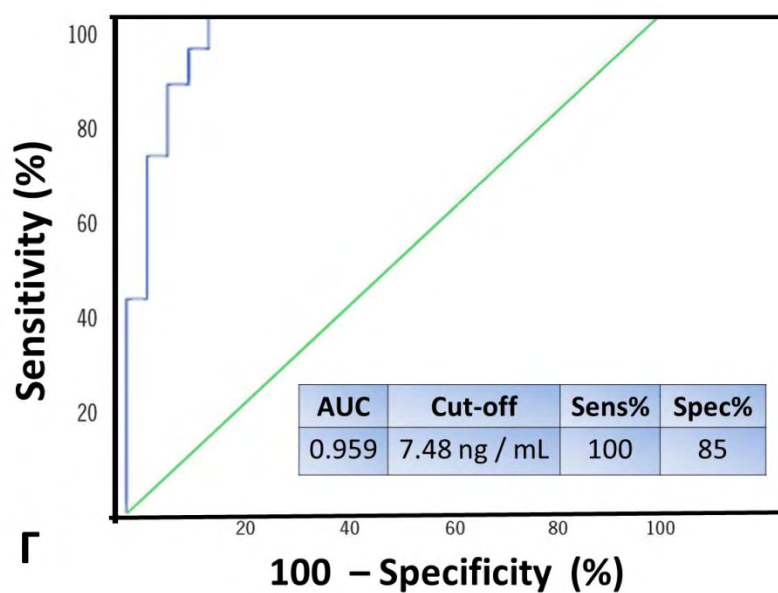
**Συνομογραφίες:** **ΥΣ**, Υπεζωκοτικές συλλογές; **MPE**, Malignant pleural effusions, κακοήθεις ΥΣ; **PPE**, Parapneumonic pleural effusions, παραπνευμονικές ΥΣ; **TrPE**, Transudative pleural effusions, διδρωματικές ΥΣ; **Transudates**, Διδρώματα; **Exudates**, Εξιδρώματα

## 6.2 Επίπεδα της HMGB1 και του διαλυτού υποδοχέα sRAGE σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ

Τα επίπεδα της HMGB1 ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις διδρωματικές ΥΣ ( $3,99 \pm 1,42$  ng/mL) σε σύγκριση με τις κακοήθεις ( $58,0 \pm 70,8$  ng/mL) και/ή παραπνευμονικές ΥΣ ( $34,79 \pm 31,28$  ng/mL) (Εικόνα 23A). Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα HMGB1 μπορούν να διαφοροποιήσουν αποτελεσματικά τα διδρώματα από τα εξιδρώματα ( $3,99 \pm 1,42$  ng/mL έναντι  $46,41 \pm 59,92$  αντίστοιχα,  $p < 0,001$ ) (Εικόνα 23B). Η ανάλυση ROC ανίχνευσε ότι η τιμή HMGB1: 7,48 ng/mL, είναι σημαντικά

ευαίσθητη (100%) σε επίπεδο ειδικότητας 85% με εμβαδόν περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area Under Curve, AUC): 0,959 για τη διάκριση των διδρωματικών από τις εξιδρωματικές ΥΣ (Εικόνα 23Γ).





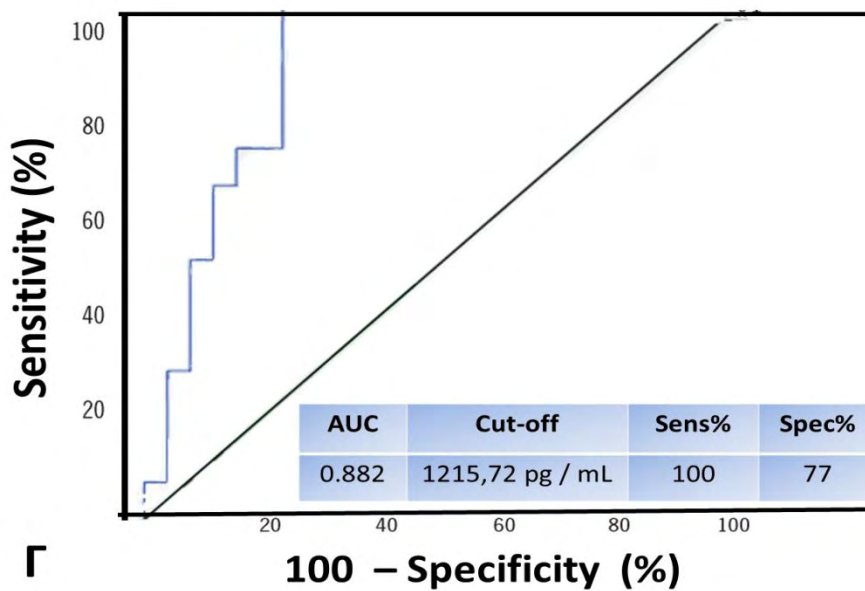
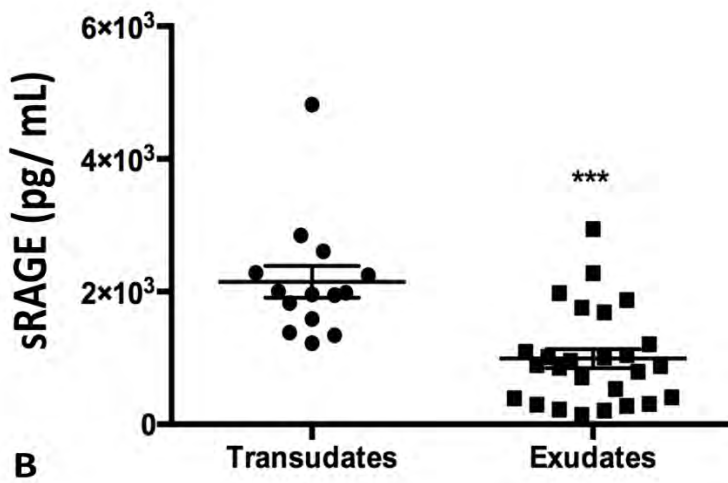
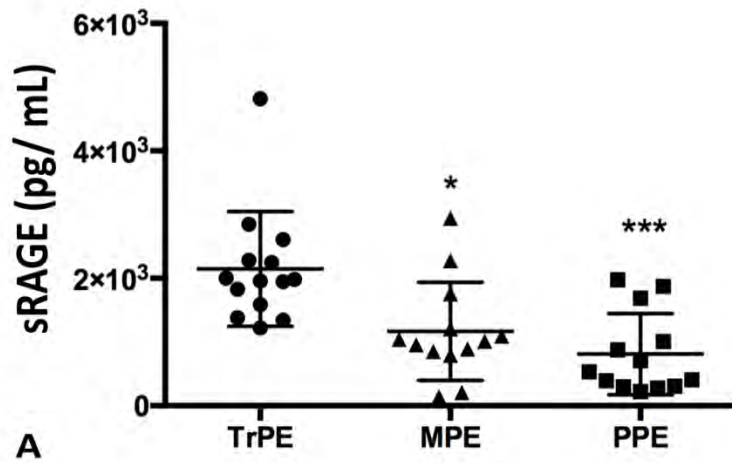
**Εικόνα 23. Α.** Επίπεδα της HMGB1 σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ. **Β.** Επίπεδα της HMGB1 στις διδρωματικές και στο σύνολο των εξιδρωματικών (κακοήθων και παραπνευμονικών) ΥΣ. **Γ.** Ανάλυση ROC για τη διαγνωστική αξία της HMGB1.

<sup>a</sup> Απεικονίζεται η μέση τιμή±τυπική απόκλιση (SD) <sup>^</sup>Kruskal-Wallis (A) και Students t test (B) \*\*\*p<0.001

**Συνομογραφίες:** **AUC**, Area Under Curve, εμβαδόν περιοχής κάτω από την καμπύλη; **Exudates**, Εξιδρώματα; **MPE**, Malignant pleural effusions, κακοήθεις ΥΣ; **PPE**, Parapneumonic pleural effusions, παραπνευμονικές ΥΣ; **Sens**, Ευαισθησία; **Spec**, Ειδικότητα; **Transudates**, Διδρώματα; **TrPE**, Transudative pleural effusions, διδρωματικές ΥΣ; **ΥΣ**, Υπεζωκοτικές συλλογές

Αντίστροφη κατεύθυνση παρατηρήθηκε για τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα sRAGE, καθώς φάνηκε πως η συγκέντρωσή του ήταν σημαντικά υψηλότερη στις διδρωματικές ΥΣ (2146,58±898,83 pg/mL) συγκριτικά με τις κακοήθεις (1167,64±770,02 pg/mL) και/ή παραπνευμονικές ΥΣ (812,42±637,42 pg/mL) (**Εικόνα 24Α**). Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα sRAGE ήταν σημαντικά υψηλότερα στα διδρώματα συγκριτικά με το σύνολο των εξιδρωμάτων (2146,58±898,83 pg/mL έναντι 990,03±715,85 pg/mL αντιστοίχως, p<0,001)

(**Εικόνα 24B**). Μάλιστα, από την ανάλυση ROC τα επίπεδα του sRAGE φάνηκε ότι μπορούν να διαφοροποιήσουν αποτελεσματικά τα διδρώματα από τα εξιδρώματα, με την τιμή 1215,72 pg/mL, να είναι σημαντικά ευαίσθητη (100%) σε επίπεδο ειδικότητας 77% και με εμβαδόν περιοχής κάτω από την καμπύλη AUC: 0.882 για τη διάκριση των διδρωματικών από τις εξιδρωματικές ΥΣ (**Εικόνα 24Γ**).

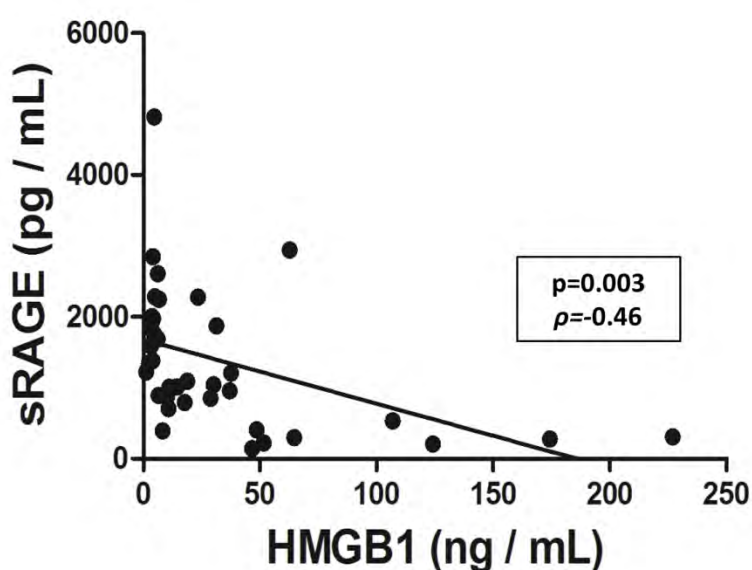


**Εικόνα 24. Α.** Επίπεδα του sRAGE σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ . **Β.** Σύγκριση των επιπέδων του sRAGE στις διδρωματικές και εξιδρωματικές ΥΣ. **Γ.** Ανάλυση ROC για τη διαγνωστική αξία του sRAGE.

<sup>α</sup> Απεικονίζεται η μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD)\* Kruskal-Wallis (A) και Students t test (B). \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$

**Συντομογραφίες:** **AUC**, Area Under Curve, εμβαδόν περιοχής κάτω από την καμπύλη; **Exudates**, εξιδρώματα; **MPE**, Malignant pleural effusions, κακοήθεις ΥΣ; **PPE**, Parapneumonic pleural effusions, παραπνευμονικές ΥΣ; **Sens**, Ευαισθησία; **Spec**, Ειδικότητα; **Transudates**, Διδρώματα; **TrPE**, Transudative pleural effusions, διδρωματικές ΥΣ; **ΥΣ**, Υπεζωκοτικές συλλογές

Τέλος, στο σύνολο των ΥΣ διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα HMGB1 σχετίζονταν αρνητικά με τα επίπεδα sRAGE ( $r = -0.399$ ,  $p = 0.043$ ) (**Εικόνα 25**).



**Εικόνα 25.** Αρνητική συσχέτιση επιπέδων HMGB1 και sRAGE στο σύνολο των ΥΣ.

**Συντομογραφίες:**  $\rho$ , Συντελεστής συσχέτισης Spearman

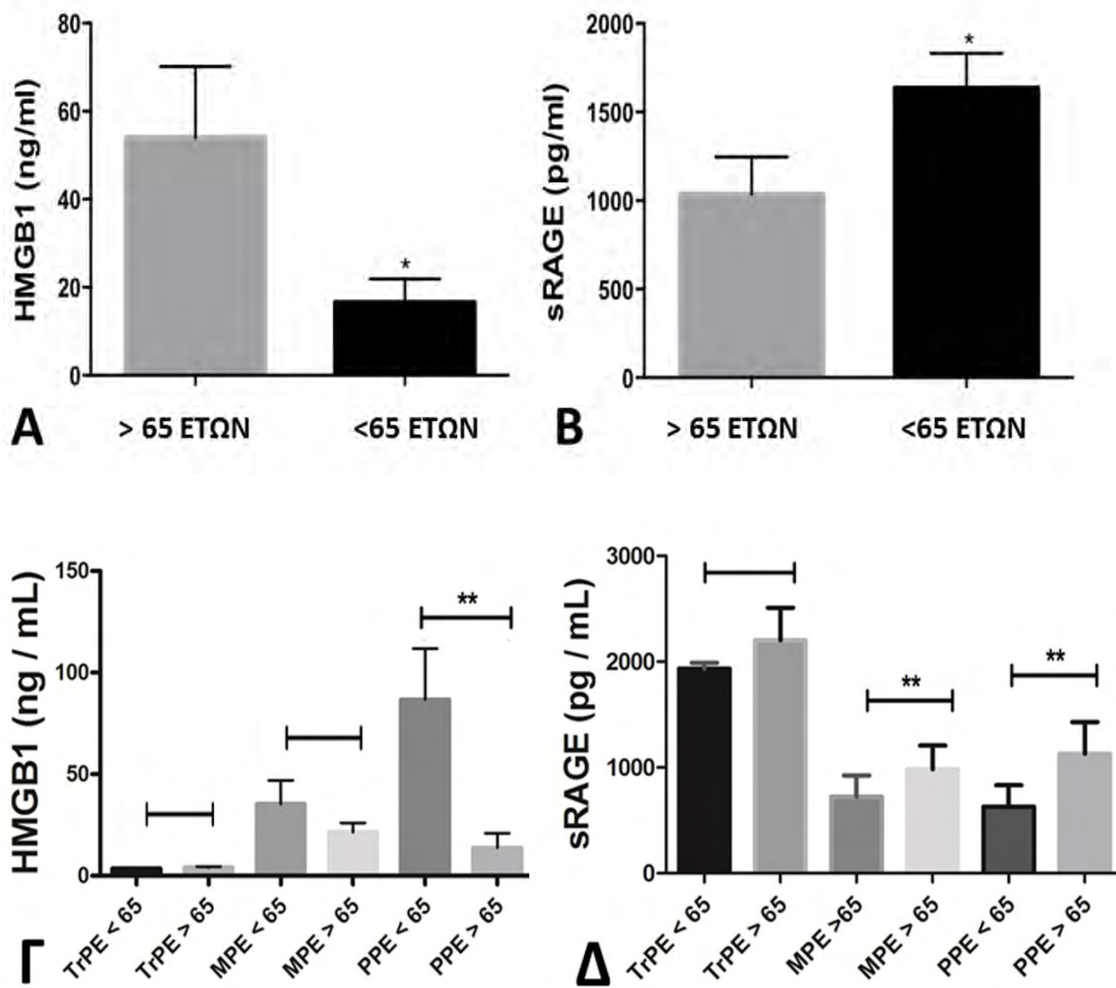
### 6.3 Συσχέτιση της IL-33 και του sST2 με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων της IL-33 ή του sST2 σε σχέση με την ηλικία ή το φύλο των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη ( $p > 0.005$ ).

### 6.4 Συσχέτιση της HMGB1 και του sRAGE με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μια εξαρτώμενη από την ηλικία διαφοροποίηση των επιπέδων HMGB1 και sRAGE στο σύνολο των ΥΣ. Πιο αναλυτικά, οι ασθενείς άνω των 65 ετών είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα HMGB1 και σημαντικά υψηλότερα sRAGE επίπεδα σε σύγκριση με τους ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 65 ετών (**Εικόνα 26Α, 26Β**, αντίστοιχα). Περαιτέρω ανάλυση υποομάδων ανάλογα με τον τύπο της ΥΣ, αποκάλυψε ότι η ηλικιακή διαφοροποίηση των επιπέδων HMGB1 αφορούσε μόνο τους ασθενείς με παραπνευμονικές ΥΣ ( $p=0,03$ ) (**Εικόνα 26Γ**). Ενώ όσον αφορά τα επίπεδα sRAGE, ηλικιακή διαφοροποίηση παρατηρήθηκε για το σύνολο των εξιδρωματικών ΥΣ (κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ) (**Εικόνα 26Δ**).

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές των επιπέδων των HMGB1 και sRAGE σε σχέση με το φύλο ( $p > 0.05$ ).



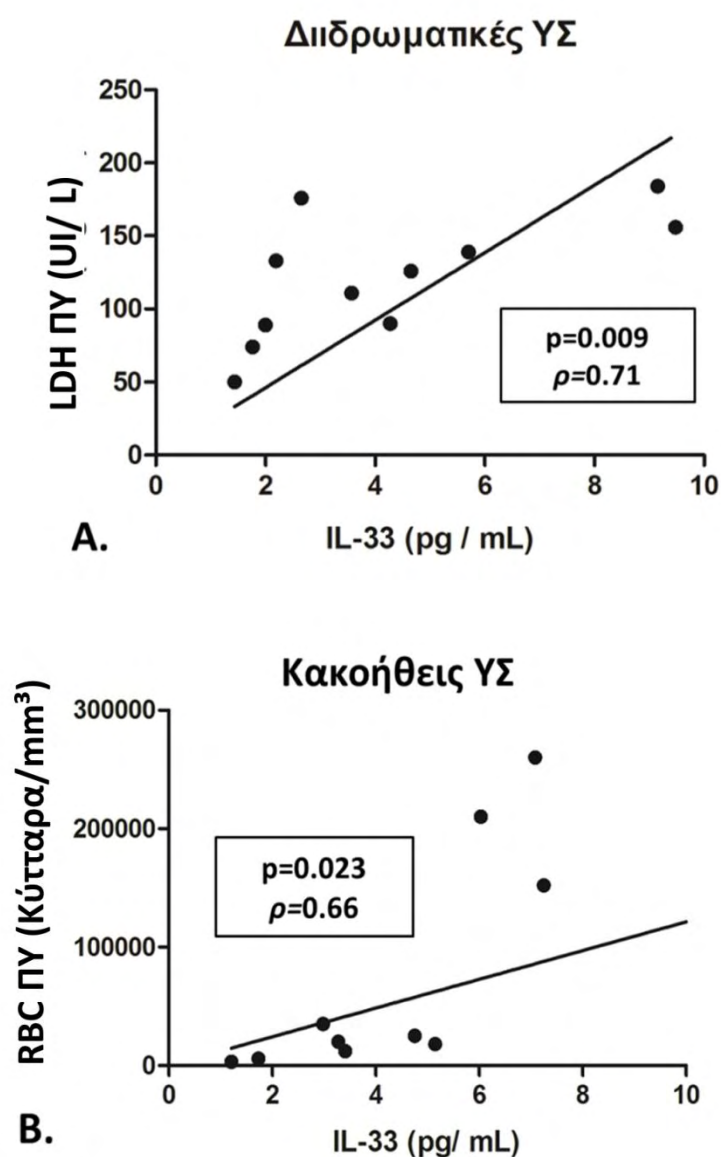
**Εικόνα 26.** **A.** Συσχέτιση των επιπέδων HMGB1 με την ηλικία. **B.** Συσχέτιση των επιπέδων sRAGE με την ηλικία. **Γ.** Συσχέτιση των επιπέδων HMGB1 με την ηλικία, ανάλογα με τον τύπο της ΥΣ. **Δ.** Συσχέτιση των επιπέδων sRAGE με την ηλικία, ανάλογα με τον τύπο της ΥΣ.  
 \* Students t test \* $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

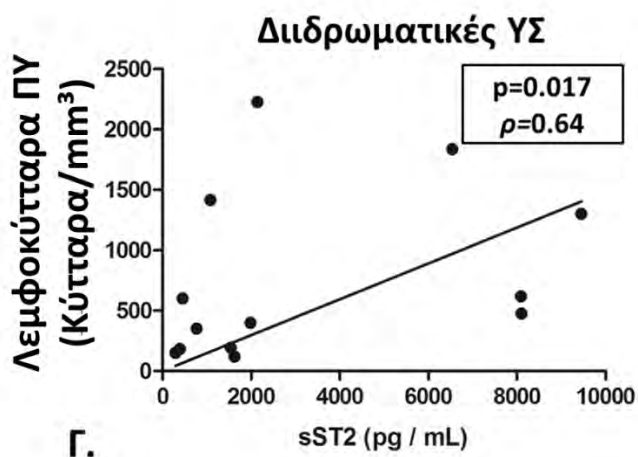
**Συνομογραφίες:** **MPE**, Malignant pleural effusions, κακοήθεις ΥΣ; **PPE**, Parapneumonic pleural effusions, παραπνευμονικές ΥΣ; **TrPE**, Transudative pleural effusions, διδρωματικές Υ; **ΥΣ**, Υπεζωκοτικές συλλογές



## 6.5 Συσχέτιση της IL-33 και του sST2 με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ.

Η συγκέντρωση της IL-33 συσχετίστηκε θετικά με την LDH του ΥΥ ( $r=0,71$ ,  $p=0,008$ ) στις διδρωματικές ΥΣ (Εικόνα 27Α), ενώ στις κακοήθεις ΥΣ συσχετίστηκε θετικά με τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) του ΥΥ ( $r=0,66$ ,  $p=0,024$ ) (Εικόνα 27Β). Στις διδρωματικές ΥΣ επίσης, τα επίπεδα του sST2 συσχετίστηκαν θετικά με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων του ΥΥ ( $r=0,64$ ,  $p=0,017$ ) (Εικόνα 27Γ).





**Εικόνα 27. Α.** Θετική συσχέτιση επιπέδων IL-33 με την LDH του υπεζωκοτικού υγρού στις διδρωματικές ΥΣ. **Β.** Θετική συσχέτιση επιπέδων IL-33 με τον αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων του υπεζωκοτικού υγρού στις κακοήθεις ΥΣ. **Γ.** Θετική συσχέτιση των επιπέδων sST2 με το αριθμό λεμφοκυττάρων του υπεζωκοτικού υγρού στις διδρωματικές ΥΣ.

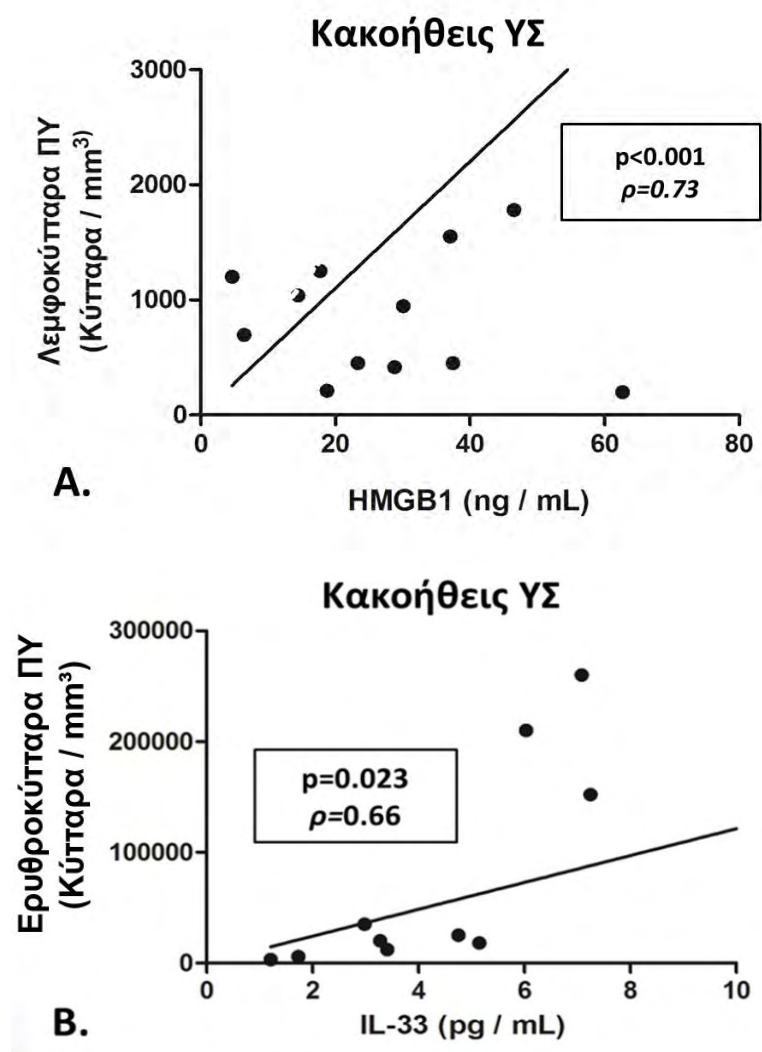
*\*Pearson's Correlation*

**Συνοτομογραφίες:** *ΥΥ*, Υπεζωκοτικό υγρό; *ρ*, Συντελεστής συσχέτισης Spearman; *ΥΣ*, Υπεζωκοτικές συλλογές; *RBC*, Ερυθρά αιμοσφαίρια

## 6.6 Συσχέτιση της HMGB1 και του sRAGE με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ.

Όσον αφορά τις κακοήθεις ΥΣ, τα επίπεδα της HMGB1 συσχετίστηκαν θετικά με τον απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων του ΥΥ ( $r=0,73$ ,  $p<0,001$ ) (**Εικόνα 28Α**) και τον απόλυτο αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων του ΥΥ ( $r=0,75$ ,  $p<0,001$ ) (**Εικόνα 28Β**). Όσον αφορά τον sRAGE δεν ανιχνεύθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του και των βιοχημικών και κυτταρολογικών χαρακτηριστικών του ΥΥ, στις κακοήθεις ΥΣ. Ομοίως, στις παραπνευμονικές και διδρωματικές ΥΣ, δεν

ανιχνεύθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων HMGB1 και sRAGE με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ.



**Εικόνα 28. A.** Θετική συσχέτιση επιπέδων HMGB1 με τον αριθμό λεμφοκυττάρων του υπεζωκοτικού υγρού στις κακοήθειες ΥΣ.

**B.** Θετική συσχέτιση επιπέδων HMGB1 με τον αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων του υπεζωκοτικού υγρού στις κακοήθειες ΥΣ,

**Συνοτομογραφίες:** ΥΥ, Υπεζωκοτικό υγρό;  $\rho$ , Συντελεστής συσχέτισης Spearman; ΥΣ, Υπεζωκοτικές συλλογές;

## 6.7 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 στην κυτταρική μορφολογία και κυτταρική προσκόλληση των κυττάρων MeT-5A.

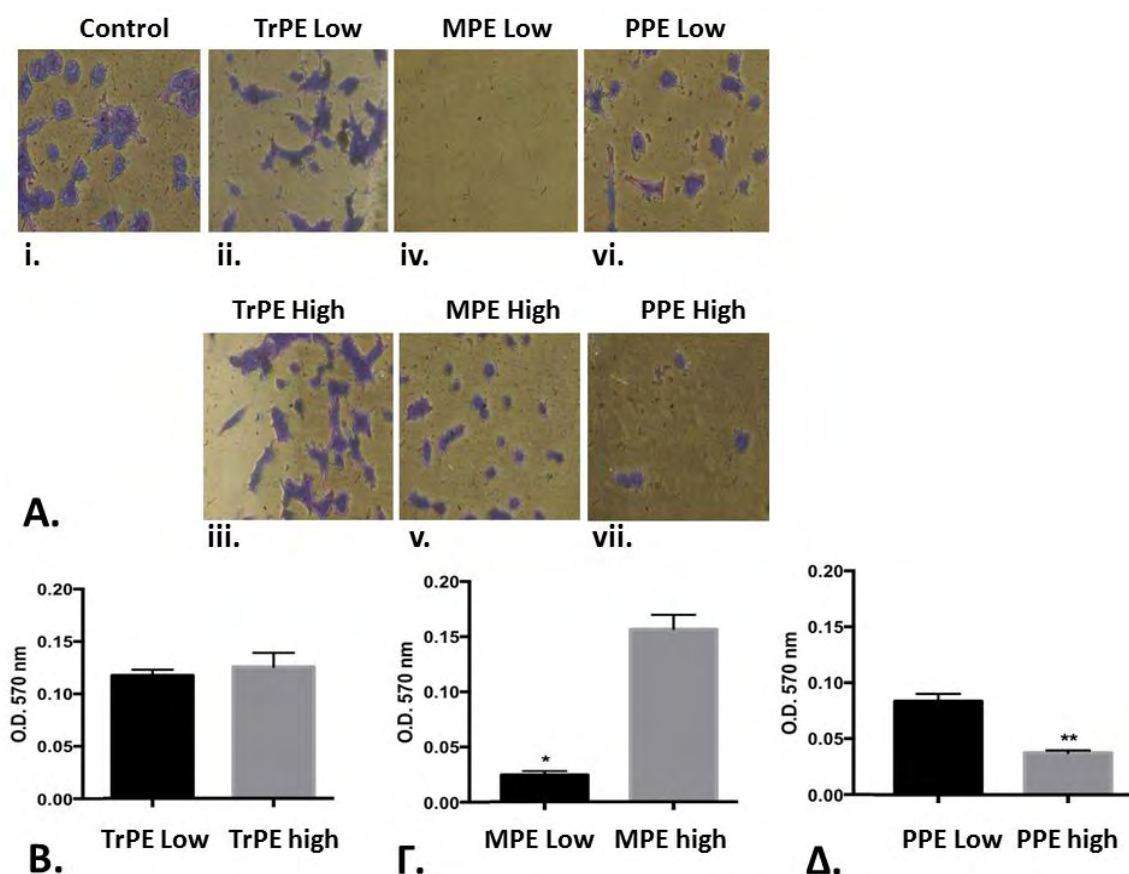
Στη συνέχεια της μελέτης, επιλέχθηκαν τα δείγματα από κάθε τύπο ΥΣ με τα υψηλότερα και χαμηλότερα επίπεδα IL-33 (πάνω και κάτω από τη διάμεση τιμή όπως ορίστηκαν από τις μετρήσεις με ELISA) ώστε να μελετηθεί *in vitro* η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της IL-33 σε κυτταρικούς φαινοτύπους. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων IL-33 στην κυτταρική προσκόλληση MeT-5A μεσοθηλιακής κυτταρικής σειράς. Παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στη μορφολογία των κυττάρων.

Στις διδρωματικές ΥΣ η υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση IL-33 δεν οδήγησαν σε διαφορές στη μορφολογία των MeT-5A κυττάρων συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (control), η μορφή των κυττάρων παρέμενε πολυγωνική (**Εικόνα 29 Aii, 28 Aiii**). Επίσης δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην κυτταρική προσκόλληση μεταξύ των δειγμάτων με την υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση IL-33 ( $p>0,05$ ) (**Εικόνα 29B**).

Στις κακοήθειες ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη προσκόλληση των κύτταρων MeT-5A συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλά επίπεδα IL-33 (**Εικόνα 29Γ**), ενώ υπήρξε διαφοροποίηση ως προς τη μορφολογία των κυττάρων όπου ήταν στρογγυλόμορφα (**Εικόνα 29 Aiv, 29Av**) ( $0,16\pm 0,02$  vs  $0,03\pm 0,01$ ,  $p<0,001$ ). Εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι ότι στο δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 δεν προσκολλήθηκαν τα κύτταρα.

Στην περίπτωση των παραπνευμονικών συλλογών, τα κύτταρα MeT-5A που επώαστηκαν με ΥΥ χαμηλής συγκέντρωσης IL-33 προσκολλήθηκαν σημαντικά

περισσότερο σε σύγκριση με αυτά που επώαστηκαν με ΥΥ υψηλής συγκέντρωσης IL-33, ενώ ήταν στρογγυλόμορφα και στις δύο περιπτώσεις ( $0,08 \pm 0,01$  έναντι  $0,04 \pm 0,01$ ,  $p < 0,01$ ) (Εικόνα 29Αvi, 29Αvii και 29Δ).



**Εικόνα 29. Α.** Μικροφωτογραφίες στις οποίες απεικονίζεται η μορφολογία των MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων κατά την κυτταρική προσκόλληση στους διάφορους τύπους υπεζωκοτικών συλλογών (ΥΣ) με χρήση χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 αντίστοιχα. **i)** Κυτταρική προσκόλληση σε δείγμα κυτταρικού πληθυσμού ελέγχου (control). **ii, iii)** Κυτταρική προσκόλληση στα δείγματα διδρωματικής ΥΣ με χαμηλή (TrPE Low) και υψηλή συγκέντρωση (TrPE High) IL-33. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην προσκόλληση ή τη μορφολογία των κυττάρων. **iv, v).** Στις κακοήθεις ΥΣ, στο δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 (MPE Low) δεν απεικονίσθηκαν κύτταρα σε σύγκριση με το δείγμα με υψηλά επίπεδα IL-33 (MPE High) στο οποίο απεικονίσθηκαν στρογγυλόμορφα κύτταρα. **vi, vii)** Στις παραπνευμονικές ΥΣ, στο δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 (PPE High) παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός πολυγωνικών κυττάρων σε σύγκριση με το δείγμα με χαμηλά επίπεδα IL-33 (PPE Low).

**Β.** Διαγράμματα που απεικονίζουν την κυτταρική προσκόλληση σε κάθε τύπο ΥΣ με χρήση δειγμάτων χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης IL-33. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην κυτταρική προσκόλληση μεταξύ των δειγμάτων με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα IL-33 στις διδρωματικές ΥΣ.

**Γ.** Στις κακοήθεις ΥΣ, το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 έδειξε μειωμένη προσκόλληση κυττάρων MeT-5A σε σύγκριση με το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33.

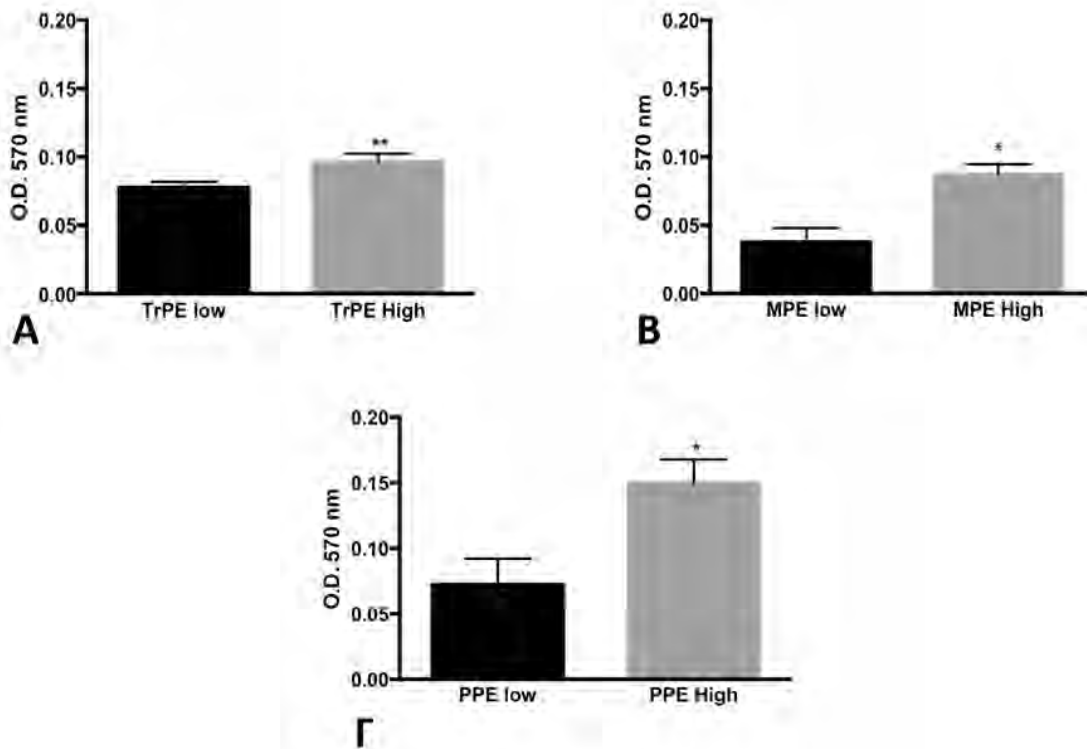
**Δ.** Στις παραπνευμονικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 έδειξε μειωμένη προσκόλληση MeT-5A κυττάρων σε σύγκριση με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33.

(Αριθμός πειραμάτων: 3; Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση IL-33: 8).

<sup>a</sup>Student's *t*-test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$

## **6.8 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 στην κυτταρική μορφολογία και κυτταρική προσκόλληση των κυττάρων MeT-5A.**

Στις διδρωματικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 παρουσίασε μεγαλύτερη προσκόλληση κυττάρων σε σύγκριση με το δείγμα με χαμηλότερη συγκέντρωση HMGB1 ( $0,096 \pm 0,017$  έναντι  $0,078 \pm 0,012$  αντίστοιχα,  $p < 0,00,1$ ) (**Εικόνα 30Α**). Παρομοίως, στην περίπτωση των κακοήθων ΥΣ, τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε ΥΥ με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 προσκολλήθηκαν σημαντικά περισσότερο σε σύγκριση με αυτά που εκτέθηκαν σε ΥΥ με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 ( $0,087 \pm 0,022$  έναντι  $0,038 \pm 0,029$  αντίστοιχως,  $p < 0,05$ ) (**Εικόνα 30Β**). Όσον αφορά τις παραπνευμονικές ΥΣ, τα MeT-5A κύτταρα που επώασθηκαν με ΥΥ με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 προσκολλήθηκαν σημαντικά περισσότερο σε σύγκριση με τα MeT-5A κύτταρα που επώασθηκαν με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 ( $0.150 \pm 0.047$  έναντι  $0.072 \pm 0.048$  αντίστοιχα,  $p < 0.05$ ) (**Εικόνα 30Γ**).



**Εικόνα 30.** Διαγράμματα που απεικονίζουν την κυτταρική προσκόλληση σε κάθε τύπο υπεζωκοτική συλλογής (ΥΣ) με χρήση δειγμάτων χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης HMGB1. **A.** Στις διδρωματικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (TrPE Low) παρουσίαζε μεγαλύτερη κυτταρική προσκόλληση συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλότερη συγκέντρωση HMGB1 (TrPE High) **B.** Στις κακοήθεις ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (MPE High) έδειξε μεγαλύτερη προσκόλληση κυττάρων MeT-5A σε σύγκριση με το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (MPE Low). **Γ.** Στις παραπνευμονικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (PPE High) έδειξε μειωμένη προσκόλληση MeT-5A κυττάρων σε σύγκριση με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 (PPE Low).

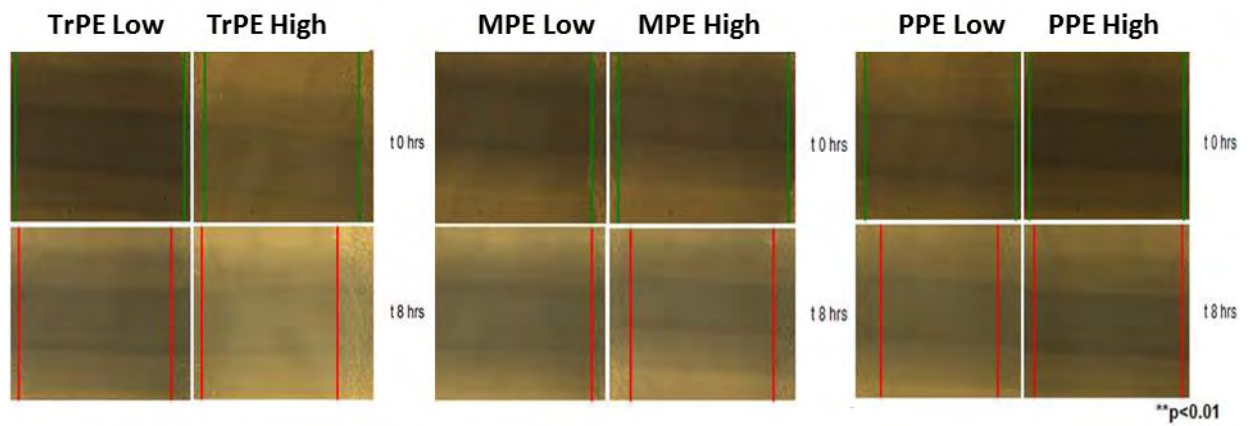
(Αριθμός πειραμάτων: 3. Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης IL-33 σε κάθε πείραμα: 8. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν ανεξάρτητα και στα 3 πειράματα).

<sup>a</sup>Student's *t-test* \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$

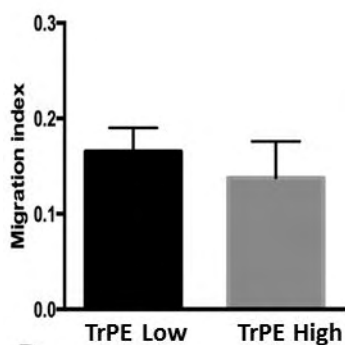
## 6.9 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 στη μετανάστευση των MeT-5A κυττάρων.

Όπως φαίνεται στις **Εικόνες 30Α και 30Β**, στις διδρωματικές ΥΣ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά το δείκτη μετανάστευσης ανάμεσα στα δείγματα με χαμηλή ή υψηλή συγκέντρωση της IL-33. Αντίθετα, στις κακοήθεις ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 εμφάνισε μεγαλύτερη κυτταρική μετανάστευση συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 ( $0,21\pm 0,07$  έναντι  $0,02\pm 0,02$ ,  $p=0,009$ ) (**Εικόνα 31Γ και 31Δ**). Αντίθετα, στην περίπτωση των παραπνευμονικών ΥΣ, το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33, παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη κυτταρική μετανάστευση συγκριτικά με το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 ( $0,22\pm 0,01$  έναντι  $0,01\pm 0,02$ ,  $p<0,001$ ) (**Εικόνα 31Ε, 31Ζ**).



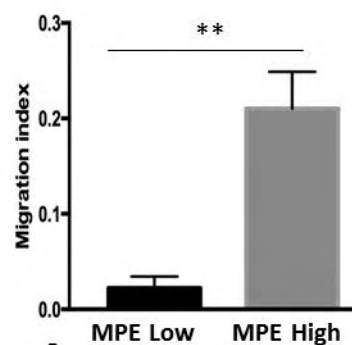


**A.**



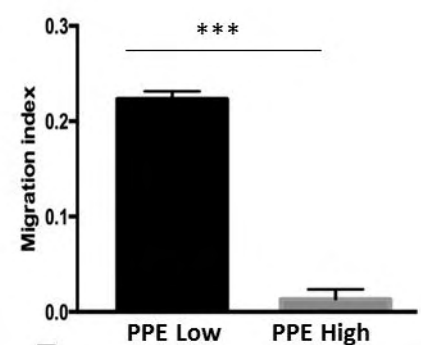
**B.**

**Γ.**



**Δ.**

**Ε.**



**Z.**

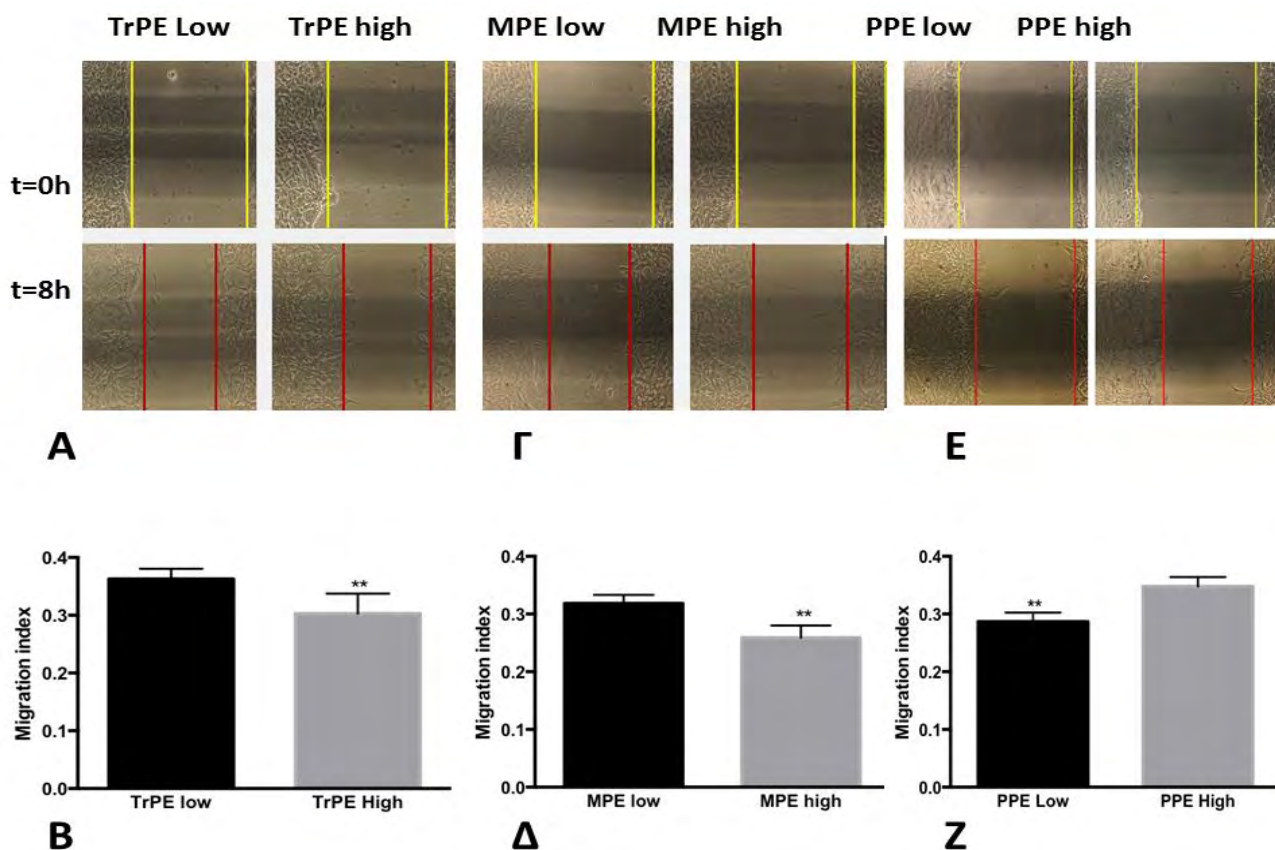
**Εικόνα 31.** Μικροφωτογραφίες που απεικονίζουν τη μετανάστευση κυττάρων (MI, Migration Index) MeT-5A κατά την επούλωση τραύματος στα διάφορα δείγματα ΥΣ και σύγκριση του δείκτη μετανάστευσης μεταξύ των δειγμάτων με χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση IL-33 σε κάθε τύπο ΥΣ. **A, B.** Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κυτταρική μετανάστευση όσον αφορά τα δείγματα διδρωματικών ΥΣ με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα (TrPE High vs TrPE Low) IL-33. **Γ, Δ.** Στις κακοήθεις ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 (MPE High) οδήγησε σε μεγαλύτερη μετανάστευση κυττάρων MeT-5A συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 (MPE Low). **Ε, Z.** Στις παραπνευμονικές ΥΣ, το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 (PPE Low) παρουσίασε αυξημένη μετανάστευση κυττάρων σε σύγκριση με το δείγμα με υψηλά επίπεδα IL-33 (PPE High).

(Αριθμός πειραμάτων: 3, Αριθμός επαναλήψεων σε κάθε πείραμα: 8).

<sup>a</sup>Student's t-test \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

## 6.10 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 στη μετανάστευση των κυττάρων MeT-5A.

Στις διδρωματικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 εμφάνιζε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη μετανάστευση σε σύγκριση με το δείγμα που είχε χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 ( $0.303 \pm 0.060$  έναντι  $0.363 \pm 0.030$  αντίστοιχα,  $p < 0.001$ ) (Εικόνα 32Α, 32Β). Ομοίως, στις κακοήθεις ΥΣ στο δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 παρατητήθηκε χαμηλότερο ΜΙ σε σύγκριση με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 ( $0.258 \pm 0.037$  έναντι  $0.31 \pm 0.026$  αντίστοιχα,  $p < 0.001$ ) (Εικόνα 32Γ, 32Δ). Αντιστρόφως, στις παραπνευμονικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 παρουσίαζε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο δείκτη μετανάστευσης σε σύγκριση με το δείγμα με υψηλά επίπεδα HMGB1 ( $0.348 \pm 0.028$  έναντι  $0.287 \pm 0.027$   $p < 0.001$ ) (Εικόνα 32Ε, 32Ζ).

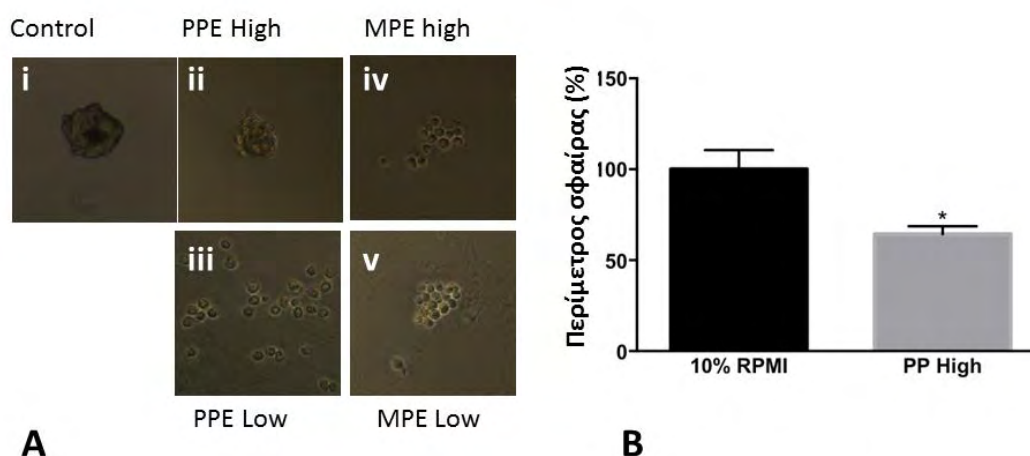


**Εικόνα 32.** Μικροφωτογραφίες που απεικονίζουν τη μετανάστευση κυττάρων (MI, Migration Index) MeT-5A κατά την επούλωση τραύματος στα διάφορα δείγματα ΥΣ και σύγκριση του δείκτη μετανάστευσης μεταξύ των δειγμάτων με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 σε κάθε τύπο ΥΣ. **A, B.** Στις διδρωματικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (TrPE High) επήγαγε λιγότερο την κυτταρική μετανάστευση συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 (TrPE Low). **Γ, Δ.** Στις κακοήθεις ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (MPE High) οδήγησε σε μειωμένη μετανάστευση κυττάρων MeT-5A συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 (MPE Low) **E, Z.** Στις παραπνευμονικές ΥΣ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (PPE High) παρουσίασε αυξημένη μετανάστευση κυττάρων σε σύγκριση με το δείγμα με χαμηλά επίπεδα HMGB1 (PPE Low). (Αριθμός πειραμάτων: 3, Αριθμός επαναλήψεων σε κάθε πείραμα: 8).

<sup>a</sup>Student's t-test \*\* $p < 0.01$

## 6.11 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών κυττάρων MeT-5A.

Αξιοσημείωτο είναι ότι μόνο το δείγμα παραπνευμονικής ΥΣ με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 είχε σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό κυτταρικού σφαιροειδούς (Εικόνα 33Aii). Μάλιστα, υπολογίζοντας τη διάμετρο της σφαίρας ήταν σημαντικά μειωμένη συγκριτικά με τη διάμετρο που διαμορφώθηκε στην ομάδα ελέγχου ( $64,3 \pm 13,8\%$  έναντι  $100 \pm 21,3\%$ ) (Εικόνα 33B). Στις υπόλοιπες ΥΣ δεν σχηματίστηκαν κυτταρικά σφαιροειδή (Εικόνα 33Aiii - 33Av) και στις 3 επαναλήψεις του πειράματος.



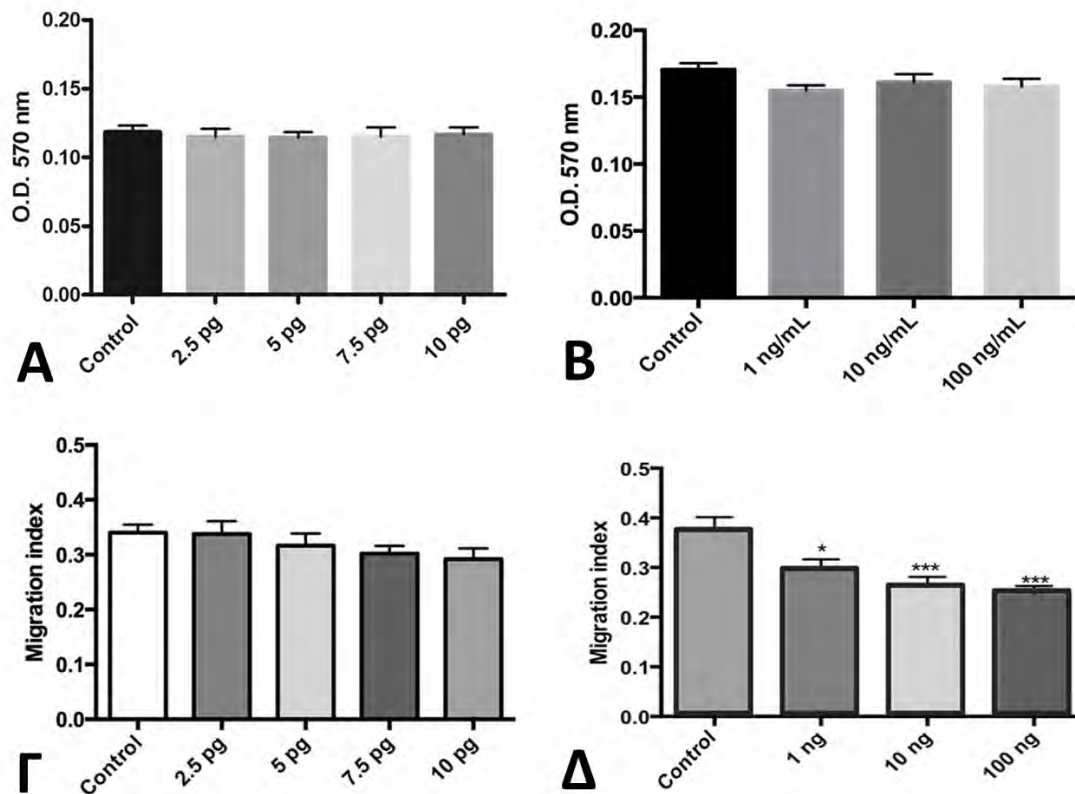
**Εικόνα 33. A.** Μικροφωτογραφίες που απεικονίζουν την ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών στα δείγματα ΥΥ με υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις HMGB1 από κάθε τύπο ΥΣ. **i)** Σχηματισμός κυτταρικού σφαιροειδούς στο δείγμα ελέγχου, **ii)** Σχηματισμός κυτταρικού σφαιροειδούς στο δείγμα παραπνευμονικής ΥΣ με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 (PPE High), **iii)** Αδυναμία σχηματισμού κυτταρικού σφαιροειδούς στο δείγμα της παραπνευμονικής ΥΣ με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 (HMGB1 Low). **iv, v)** Αδυναμία σχηματισμού κυτταρικού σφαιροειδούς στα δείγματα με υψηλή και χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 κακοήθων ΥΣ. (Αριθμός πειραμάτων: 3, Αριθμός επαναλήψεων σε κάθε πείραμα: 8).

<sup>a</sup>Student's t-test \* $p < 0.05$

^Στις διδρωματικές ΥΣ παρατηρήθηκε πλήρης διασκορπισμός των μεσοθηλιακών κυττάρων χωρίς την ικανότητα λήψης αντιπροσωπευτικής μικροφωτογραφίας.

## **6.12. In vitro επιδράσεις της ανασυνδυσμένης IL-33 στην προσκόλληση και μετανάστευση MeT-5A κυττάρων.**

Στη συνέχεια της μελέτης μας ελέγχθησαν η κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση της καλοήθους κυτταρικής μεσοθηλιακής σειράς MeT-5A με χρήση ανασυνδυσμένης IL-33. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την κυτταρική προσκόλληση ( $p > 0,05$ ; **Εικόνα 34A**) και κυτταρική μετανάστευση ( $p > 0,05$ ; **Εικόνα 34B**) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (χρήση RPMI ως μέσου) για τις συγκεντρώσεις των 2,5, 5, 7,5 και 10 pg/mL της ανασυνδυσμένης IL-33. Ομοίως, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την κυτταρική προσκόλληση με χρήση των συγκεντρώσεων: 1, 10, 100 ng/mL της ανασυνδυσμένης IL-33 όπως φαίνεται στην **Εικόνα 34Γ** ( $p > 0.05$  σε όλες τις περιπτώσεις). Σημαντικά μειωμένος δείκτης μετανάστευσης παρατηρήθηκε με χρήση των παρακάτω συγκεντρώσεων ανασυνδυσμένης IL-33: 1 ng/mL ( $p < 0,05$ ), 10 ng/mL ( $p < 0,001$ ) και 100 ng/mL ( $p < 0,001$ ) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 34Δ** ( $0,38 \pm 0,06$  έναντι  $0,30 \pm 0,05$ ;  $0,26 \pm 0,05$  και  $0,25 \pm 0,05$  αντιστοίχως).



**Εικόνα 34. Α.** Διάγραμμα που απεικονίζει την κυτταρική προσκόλληση MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης IL-33 (2,5, 5, 7,5, 10 pg/mL). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την προσκόλληση των κυττάρων MeT-5A μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων που θεραπεύτηκαν με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις της ανασυνδυασμένης IL-33. (Αριθμός πειραμάτων: 2, Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης IL-33 σε κάθε πείραμα: 8).

**Β.** Διάγραμμα που απεικονίζει την κυτταρική προσκόλληση με χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης IL-33 (1, 10, 100 ng/mL). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την προσκόλληση των κυττάρων MeT-5A μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων που θεραπεύτηκαν με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις της ανασυνδυασμένης IL-33. (Αριθμός πειραμάτων: 2, Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης IL-33 σε κάθε πείραμα: 8).

**Γ.** Διάγραμμα που απεικονίζει την κυτταρική μετανάστευση MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης IL-33 (2,5, 5, 7,5, 10 pg/mL). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την μετανάστευση των κυττάρων MeT-5A μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων που θεραπεύτηκαν με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις της ανασυνδυασμένης IL-33. (Αριθμός πειραμάτων: 2,

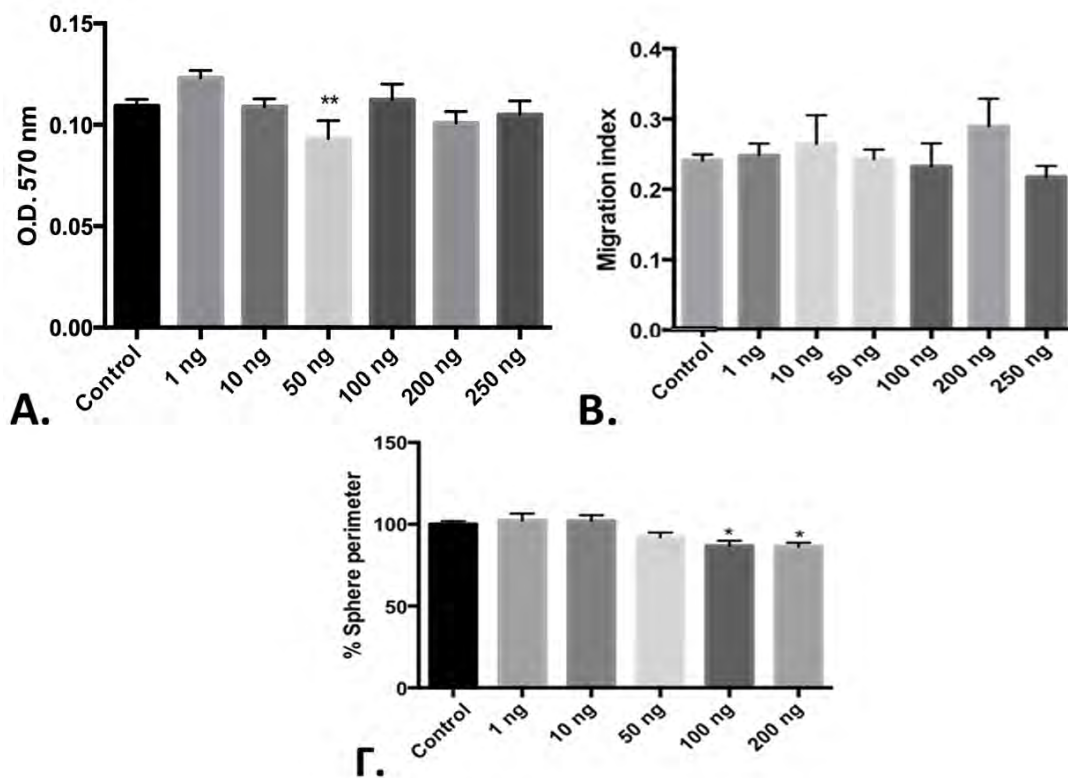
Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης IL-33 σε κάθε πείραμα: 8).

**Δ.** Διάγραμμα που απεικονίζει την κυτταρική μετανάστευση MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων με χρήση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης IL-33 (1, 10, 100 ng/mL). Τα δείγματα που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης IL-33: 1, 10, 100 ng/mL, παρουσίασαν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο σημαντική μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. (Αριθμός πειραμάτων: 2, Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης IL-33 σε κάθε πείραμα: 8).

<sup>a</sup>One Way ANOVA \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

### **6.13. In vitro επιδράσεις της ανασυνδυασμένης HMGB1 στην προσκόλληση, μετανάστευση και στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών των κυττάρων MeT-5A.**

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης των MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων κατά τη χρήση 50 ng/mL ανασυνδυασμένης HMGB1 (**Εικόνα 35A**). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη μετανάστευση των MeT-5A κυττάρων με χρήση των ποικίλων συγκεντρώσεων της ανασυνδυασμένης HMGB1 (1, 10, 100, 200, 250 ng/mL) όπως φαίνεται στην **Εικόνα 35B** (σε όλες τις περιπτώσεις,  $p > 0,05$ ). Ωστόσο, όσον αφορά τη δοκιμασία σχηματισμού σφαιροειδών, τα κύτταρα MeT5-A που επώαστηκαν με 100 ng και 200 ng ανασυνδυασμένης HMGB1 κατάφεραν να δημιουργήσουν σφαιροειδή με σημαντικά χαμηλότερη περίμετρο συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 35Γ**).



**Εικόνα 35. Α.** Διάγραμμα που απεικονίζει την κυτταρική προσκόλληση MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης HMGB1 (1, 10, 50, 100, 200, 250 ng/mL). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης των MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων κατά χρήση 50 ng/mL ανασυνδυασμένης HMGB1. [Αριθμός πειραμάτων: 4; Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης HMGB1 σε κάθε πείραμα: 8. Αποτέλεσμα συνδυασμού των αποτελεσμάτων δύο πειραμάτων (pooled data analysis), μετρήθηκαν συνολικά 14 επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση ανασυνδυασμένης HMGB1].

**Β.** Διάγραμμα που απεικονίζει την κυτταρική μετανάστευση MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης HMGB1 (1, 10, 50, 100, 200, 250 ng/mL). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο δείκτη μετανάστευσης για τις διάφορες συγκεντρώσεις HMGB1. (Αριθμός πειραμάτων: 2; Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης HMGB1 σε κάθε πείραμα: 8).

**Γ.** Διάγραμμα που απεικονίζει την ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών MeT-5A μεσοθηλιακών κυττάρων με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης HMGB1. Η επώαση των κυττάρων με 100 ng και 200 ng ανασυνδυασμένης HMGB1 (1, 10, 50, 100, 200, 250 ng/mL), οδήγησε στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών με στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη περίμετρο συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου. (Αριθμός πειραμάτων: 2; Αριθμός επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης HMGB1 σε κάθε πείραμα: 8).<sup>a</sup>One Way ANOVA \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

## Συζήτηση

### 7.1 Κύρια συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση της IL-33 και του διαλυτού υποδοχέα sST2 καθώς και τη συγκέντρωση της HMGB1 και του διαλυτού υποδοχέα sRAGE σε YY ασθενών με διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ. Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των IL-33 και sST2 δεν διαφοροποιείται στα τρία είδη των ΥΣ. Αξιοσημείωτο εύρημα ήταν ότι τα επίπεδα της αλαρμίνης HMGB1 και του διαλυτού υποδοχέα της sRAGE μπορούν να διακρίνουν τις εξιδρωματικές από τις διδρωματικές ΥΣ, με cut-off τιμές που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί επίσης η ανίχνευση μιας εξαρτώμενης από την ηλικία διαφοροποίησης των μετρούμενων τιμών HMGB1 και sRAGE στο YY των ασθενών.

Από τη μελέτη συσχετίσεων παρατηρήθηκε ότι η IL-33 συνιστά πιθανότατα προϊόν κυτταρικής νέκρωσης στις διδρωματικές ΥΣ και προϊόν αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων στις κακοήθεις ΥΣ. Όσον αφορά τον υποδοχέα sST2 πιθανολογείται ότι συνιστά προϊόν απελευθέρωσης των λεμφοκυττάρων στις διδρωματικές ΥΣ, λαμβάνοντας υπόψιν ότι δε παρατηρήθηκε καμία άλλη σημαντική συσχέτιση με άλλη κυτταρικό πληθυσμό ή βιοχημικό δείκτη του YY. Όσον αφορά την HMGB1, οι συγκεντρώσεις της συσχετίστηκαν με τον απόλυτο αριθμό των ερυθροκυττάρων και τον απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων του YY. Για τον sST2 δεν ανιχνεύθηκε συσχέτιση με κάποιο βιοχημικό ή κυτταρολογικό δείκτη του YY, στους τρεις τύπους ΥΣ.

Το επόμενο βήμα της μελέτης ήταν να διερευνήσουμε την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των IL-33 και HMGB1 σε τρεις κυτταρικούς

φαινότυπους σε περιβάλλον διδρώματος, κακοήθους και παραπνευμονικής ΥΣ, χρησιμοποιώντας MeT-5A κυτταρική σειρά. Συγκεκριμένα αξιολογήσαμε την επίδραση των υψηλών και χαμηλών συγκεντρώσεων των IL-33 και HMGB1 από κάθε τύπο ΥΣ, στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών. Συνοπτικά, **όσον αφορά τις κακοήθεις ΥΣ**, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 επήγαγε σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων συγκριτικά με το δείγμα με τη χαμηλή συγκέντρωση IL-33. Επίσης, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 ενίσχυσε σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση αλλά μείωσε σημαντικά την κυτταρική μετανάστευση των MeT-5A κυττάρων, συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1. **Όσον αφορά τις παραπνευμονικές ΥΣ**, το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 ενίσχυσε σημαντικά τη κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση συγκριτικά με το δείγμα με την υψηλή συγκέντρωση IL-33. Ενώ, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 επήγαγε σημαντικά τόσο την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση όσο και την ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών. **Τέλος, στις διδρωματικές ΥΣ**, τα διαφορετικά επίπεδα της IL-33 δεν διαφοροποίησαν την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση. Όσον αφορά τα υψηλά επίπεδα της HMGB1 αυτά επήγαγαν την κυτταρική προσκόλληση αλλά μείωσαν την ικανότητα κυτταρικής μετανάστευσης.

Δεδομένου ότι το εκάστοτε δείγμα ΥΣ περιέχει πληθώρα επιπλέον σηματοδοτικών μορίων (κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων κ.τ.λ.), θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί εάν οι παρατηρούμενες επιδράσεις στους κυτταρικούς φαινοτύπους αναπαράγονται μόνο με χρήση γνωστών συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης IL-33 ή HMGB1. Διαπιστώθηκε πως η προσθήκη ανασυνδυασμένης IL-33 σε συγκέντρωση ιδίως άνω του 1 ng/mL επάγει την

κυτταρική μετανάστευση των MeT-5A κυττάρων με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της ανασυνδυασμένης IL-33 στην κυτταρική προσκόλληση. Επιπλέον, η HMGB1 σε συγκέντρωση 50 ng/mL μείωσε στατιστικά σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση ενώ σε συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερης των 100 ng/mL επήγαγε την ικανότητα σχηματισμού σφαιροειδών. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της ανασυνδυασμένης HMGB1 στην κυτταρική μετανάστευση.

## **7.2 Επίπεδα της IL-33 και του διαλυτού υποδοχέα sST2 σε διδρωματικές, κακοήθεις, παραπνευμονικές ΥΣ.**

Πρώτοι οι Lee και συν. συνέκριναν τις μέσες συγκεντρώσεις των IL-33 και sST2 μεταξύ διδρωμάτων, κακοήθων, παραπνευμονικών και φυματιωδών ΥΣ [304]. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της IL-33 στις φυματιώδεις ΥΣ, χωρίς να διαπιστωθεί κάποια διαφορά στα επίπεδα της IL-33 μεταξύ των υπόλοιπων ΥΣ [304]. Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις μετρούμενες συγκεντρώσεις του sST2 μεταξύ των διαφορετικών ΥΣ [304]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τη μελέτη των Lee και συν., καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα μετρούμενα επίπεδα των IL-33 και sST2 μεταξύ των διδρωματικών, κακοήθων και παραπνευμονικών ΥΣ. Αντίθετα, οι Oshikawa και συν. παρατήρησαν ότι η διάμεση τιμή του υποδοχέα sST2 ήταν σημαντικά υψηλότερη στο ΥΥ ασθενών με κακοήθη ΥΣ σε σύγκριση με τις μετρούμενες τιμές του διαλυτού υποδοχέα στο ΥΥ ασθενών με φυματιώδεις και διδρωματικές ΥΣ [331]. Αυτό το εύρημα δεν επιβεβαιώθηκε από την παρούσα διατριβή καθώς δεν εντόπισαμε υψηλότερα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα στις κακοήθεις ΥΣ συγκριτικά με τις διδρωματικές ΥΣ. Αξίζει να σημειωθεί ότι με το

αντιδραστήριο ELISA που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, υπήρχε η δυνατότητα προσδιορισμού μιας μόνο ώριμης μορφής IL-33, προϊόν πρωτεόλυσης από την ενδογενή πρωτεάση καλπαΐνη. Είναι βέβαιο ότι εντός των ΥΣ ανευρίσκονται επιπλέον: πλήρους μήκους IL-33 ως προϊόν κυτταρικής νέκρωσης καθώς και άλλες ώριμες μορφές IL-33 ως προϊόντα πρωτεόλυσης τα οποία δε προσδιορίστηκαν. Προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών καθώς και προσδιορισμός των ποικίλων μορφών της IL-33 εντός του ΥΥ, απαιτούνται.

Τα ευρήματά μας δεν υποστηρίζουν την χρήση των IL-33 και sST2 για τη διαφορική διάγνωση ΥΣ αντίστοιχης αιτιολογίας. Εντούτοις, από προηγούμενες μελέτες έχει αποκαλυφθεί ο σημαντικός ρόλος της IL-33 στην ομοίωση της υπεζωκοτικής κοιλότητας [328, 329, 332]. Επιπλέον, η ανιχνευθείσα συμμετοχή του συγκεκριμένου σηματοδοτικού καταρράκτη στην παθοφυσιολογία πολυάριθμων πνευμονικών νοσημάτων θέτει τις βάσεις για περαιτέρω και σε βάθος μελέτη του ρόλου του άξονα και στις συχνότερα απαντώμενες ΥΣ.

### **7.3 Επίπεδα της HMGB1 και του διαλυτού υποδοχέα sRAGE σε διδρωματικές, κακοήθειες, παραπνευμονικές ΥΣ.**

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα HMGB1 ήταν σημαντικά υψηλότερα στις εξιδρωματικές συγκριτικά με τις διδρωματικές ΥΣ. Υπάρχει μία μόνο προηγούμενη μελέτη που μέτρησε τα επίπεδα HMGB1 σε διαφορετικούς τύπους ΥΣ με ανάλογα αποτελέσματα [600]. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της HMGB1 ήταν υψηλότερα σε ανθρώπινες κακοήθειες ή παραπνευμονικές υπεζωκοτικές και περιτοναϊκές συλλογές συγκριτικά με τις διδρωματικές ΥΣ [600] και μάλιστα η συγκέντρωση της HMGB1 των εξιδρωματικών ΥΣ ανευρέθη περίπου τριπλάσια από αυτή των διδρωματικών ΥΣ

[300]. Οι μέσες συγκεντρώσεις HMGB1 που υπολογίστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν υψηλότερες από τις τιμές της παρούσας διατριβής. Η ανοσοενζυμική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αλαρμίνης διαφέρει όμως μεταξύ των μελετών. Αξιοσημείωτο είναι, ότι βάση της παρούσας διατριβής, η συγκέντρωση της HMGB1 στα εξιδρώματα είναι δεκαπλάσια από αυτή των διδρωμάτων. Η διαγνωστική ακρίβεια της HMGB1 για τη διάκριση μεταξύ των δυο τύπων συλλογών αξιολογήθηκε για πρώτη φορά με οριακές τιμές που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει ότι η HMGB1 μπορεί να είναι ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο που μπορεί να διακρίνει τα διδρώματα από τα εξιδρώματα.

Αντίστροφα, όσον αφορά τον sRAGE, σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ανιχνεύθηκαν στις διδρωματικές συγκριτικά με τις εξιδρωματικές ΥΣ. Η ανάλυση ROC, επίσης σε αυτή την περίπτωση, έδειξε ότι ο sRAGE μπορεί να διαφοροποιήσει τις διδρωματικές από τις εξιδρωματικές ΥΣ με οριακές τιμές που χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Η διαγνωστική ακρίβεια του sRAGE αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη. Υπάρχει μόνο μία προηγούμενη αναφορά που συνέκρινε τα επίπεδα του sRAGE μεταξύ των διαφόρων εξιδρωματικών ΥΣ [586] και διαπίστωσε ότι τα επίπεδα του sRAGE ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με πνευμονία (οξεία φλεγμονή της υπεζωκοτικής στιβάδας) σε σύγκριση με ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (χρόνια φλεγμονή της υπεζωκοτικής στιβάδας) [586]. Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματά μας, αν και η διαφορά των συγκεντρώσεων του sRAGE δεν ήταν στατιστικά σημαντική στις μετρήσεις μας.

Ενδιαφέρον εύρημα συνιστά ότι τα επίπεδα HMGB1 συσχετίστηκαν αρνητικά με τα επίπεδα sRAGE στο σύνολο των ΥΣ. Παρόλο που η HMGB1 έχει την

ικανότητα πρόσδεσης με πολλούς υποδοχείς, και ο sRAGE αντίστροφα έχει πολλούς προσδέτες, η δυναμική του άξονα διαφαίνεται δεδομένου ότι ο sRAGE δρα ως υποδοχέας-παγίδα της HMGB1 που είναι ικανός να τη δεσμεύει αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της εξωκυτταρίως και μειώνοντας τα επίπεδά της.

#### **7.4 Συσχέτιση των IL-33/sST2 καθώς και των HMGB1/sRAGE με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος.**

Απροσδόκητα, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα HMGB1 και sRAGE διαφοροποιούνται μεταξύ εξιδρωματικών ΥΣ κατά τρόπο εξαρτώμενο από την ηλικία. Οι ασθενείς ηλικίας άνω των 65 ετών με συνυπάρχουσα οξεία φλεγμονή (παραπνευμονική ΥΣ) είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα HMGB1 αλλά υψηλότερα επίπεδα sRAGE σε σύγκριση με τη νεότερη ηλικιακή ομάδα (ασθενείς <65 ετών). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θέτουν τις ενδείξεις της βλάβης των συστημάτων υπεζωκοτικής αναδιαμόρφωσης (επισκευής και επιδιόρθωσης) με την αύξηση της ηλικίας, ιδίως δε όταν συνυπάρχει οξεία φλεγμονή (παραπνευμονικές ΥΣ) όπου απαιτείται η επιστράτευση επιπλέον επιδιορθωτικών μηχανισμών. Εξάλλου, τα αυξημένα επίπεδα του sRAGE στους ασθενείς άνω των 65 ετών με συνυπάρχουσα οξεία ή χρόνια φλεγμονή (παραπνευμονική ή κακοήθη ΥΣ), υποδεικνύουν τη διακοπή του επιδιορθωτικού άξονα HMGB1/RAGE.

Μεγάλος αριθμός μελετών αναφέρει ότι η συσσώρευση μεταλλάξεων του DNA είναι υποψήφιος μηχανισμός για πρόκληση φυσικής γήρανσης και νευροεκφυλιστικής νόσου [418,607-609]. Ο κρίσιμος ρόλος της HMGB1 ως πυρηνικός δομικός παράγοντας που ρυθμίζει τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA έχει ήδη τονισθεί [607-609]. Επομένως, η HMGB1 μπορεί να είναι μια νέα παράμετρος που θα πρέπει ενδεχομένως να αξιολογείται κατά τη διάρκεια της

γήρανσης [607, 608]. Προς στήριξη των ευρημάτων μας, πρόσφατα παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα ορού της HMGB1 μειώνονται σημαντικά με την ηλικία ακόμα και σε υγιή άτομα [609]. Μια άλλη μελέτη υποστήριξε ότι η ισχύς του σηματοδοτικού άξονα HMGB1/RAGE, εξαρτάται από την ηλικία και από το όργανο που μελετάται [610]. Για παράδειγμα, η σύνδεση της HMGB1 με τον RAGE στους νεφρούς και στο ήπαρ αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας παράλληλα με την ενεργοποίηση και πόλωση των μακροφάγων προς έναν προφλεγμονώδη φαινότυπο (M1 μακροφάγα). Αντίθετα η δέσμευση υποδοχέα-συνδέτη στον σκελετικό μυ δεν μεταβάλλεται με την αύξηση της ηλικίας [610]. Επομένως, ο υπεζωκότας είναι ένα όργανο που ενδεχομένως επηρεάζεται από το γήρας, όπως προκύπτει από τις διαφοροποιήσεις των επιπέδων HMGB1 και sRAGE στο ΥΥ στις διαφορετικές ηλικιακές ομάδες. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης περιγράψει τις μεταβολές στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία του υπεζωκοτικής κοιλότητας με τη γήρανση και τη χρόνια νόσο [611, 612]. Τα ευρήματά μας επισημαίνουν μια ξεκάθαρη μείωση της επιδιορθωτικής ικανότητας της HMGB1 εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας στους ασθενείς άνω των 65 ετών, ιδίως σε περιπτώσεις συνυπάρχουσας οξείας φλεγμονής όπου οι ανάγκες ιστικής επισκευής είναι αυξημένες [485].

Αφ' ετέρου, μεγάλος όγκος της βιβλιογραφίας συνδέει το RAGE με την παθοβιολογία της χρόνιας ασθένειας και τη φυσική γήρανση [418, 613-620]. Τα επίπεδα του RAGE αυξάνονται κατά το φυσιολογικό γήρας πιθανώς λόγω των αυξημένων απαιτήσεων για επισκευή-επιδιόρθωση. Μάλιστα σύμφωνα με δεδομένα που προέρχονται από τη σύγκριση μεταξύ ισχαιμικού και μη ισχαιμικού εγκεφαλικού ιστού [614], αναφέρεται ότι η επακόλουθη της γήρανσης ιστική ισχαιμία οδηγεί σε ενίσχυση της έκφρασης του RAGE mRNA [615]. Αντιφατικά στοιχεία από τους Casselmann και συν. αναφέρουν ότι η έκφραση του RAGE mRNA ήταν υψηλότερη

στον καρδιακό ιστό παιδιών και παρουσίασε έκπτωση στον ισχαιμικό καρδιακό ιστό των ενηλίκων και των υπερηλίκων ασθενών [615]. Τα υψηλά επίπεδα mRNA στα παιδιά στοιχειοθετήθηκαν από το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα HMGB1 και RAGE στην κυτταρική μετανάστευση και ανάπτυξη [615].

## **7.5 Συσχέτιση της IL-33 και του sST2 με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ.**

Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν κάποιες ενδιαφέρουσες συσχετίσεις τόσο της IL-33 όσο και της sST2 με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ, ώστε να εικάσουμε τις πιθανές κυτταρικές πηγές της αλαρμίνης και του διαλυτού υποδοχέα σε κάθε τύπο ΥΣ.

Αναλυτικά, στις διδρωματικές ΥΣ, παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση των επιπέδων της IL-33 με τα επίπεδα της LDH του ΥΥ, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία άλλη συσχέτιση με βιοχημικά ή κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ. Ως γνωστόν, η LDH συνιστά έναν ρυθμιστή της υποξίας και *in vitro* μελέτες μαρτυρούν ότι η υποξία επηρεάζει την ανάπτυξη των μεσοθηλιακών κυττάρων [621]. Επιπλέον αποτελεί δείκτη ιστικής καταστροφής [622]. Συνεπώς, πιθανότατα η IL-33 συνιστά προϊόν των τραυματισμένων μεσοθηλιακών κυττάρων αλλά και δείκτη του κυτταρικού στρες δεδομένου ότι το πεπτίδιο που προσδιορίσαμε είναι μια ώριμη μορφή που εκκρίνεται μετά από δράση μιας ενδογενούς πρωτεάσης που ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες [139]. Αξίζει να αναφερθεί πως στην περίπτωση νέκρωσης των μεσοθηλιακών κυττάρων, η ρήξη της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής μεμβράνης θα οδηγούσε σε απελευθέρωση της πλήρους μήκους IL-33 η οποία δεν προσδιορίστηκε [139].

Επιπροσθέτως, ανιχνεύθηκε σημαντική θετική συσχέτιση των επιπέδων της IL-33 με τον απόλυτο αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων του ΥΥ ασθενών με



κακοήθη ΥΣ. Προς ερμηνεία αυτού του ευρήματος και άλλες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η IL-33 απελευθερώνεται ως προϊόν αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων [623]. Αυξημένα επίπεδα ερυθρών αιμοσφαιρίων παρατηρούνται συχνότερα σε κακοήθεις ΥΣ και τα επίπεδα τους συνιστούν έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη κακοήθειας κατά τη διαχείριση μαζικών ή αγνώστου αιτιολογίας ΥΣ [624]. Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ερυθροκυττάρων στις κακοήθεις ΥΣ συγκριτικά με τους άλλους δυο μελετούμενους τύπους ΥΣ, ανιχνεύσαμε και στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 5). Από την άλλη πλευρά, η IL-33 έχει φανεί πως υποβαθμίζει τις λειτουργίες φραγμού του ανθρώπινου αγγειακού ενδοθηλίου μειώνοντας την ενδοθηλιακή ακεραιότητα μέσω μείωσης της έκφρασης της οκλουδίνης και της ενδοθηλιακής πρωτεΐνης VE-καντερίνης σε επίπεδο mRNA. Η αποσταθεροποίηση του ενδοθηλιακού φραγμού οδηγεί σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας [625]. Μια άλλη μελέτη σε μοντέλα επίμυων έδειξε ότι η IL-33 μειώνει τις διακυτταρικές συνδέσεις μέσω καντερίνης στο αγγειακό ενδοθήλιο προκαλώντας αγγειακή διαρροή, διεγείροντας την παραγωγή ενδοθηλιακού NO μέσω της οδού σηματοδότησης ST2/TRAF6–Akt-eNOS [613]. Επίσης, προηγούμενα ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο άξονας IL-33/ST2 εμπλέκεται στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων επάγωντας την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) σε καρκινικά κύτταρα [626-633]. Γίνεται αντιληπτό επομένως ότι η IL-33 δεν είναι απλώς ένα προϊόν της αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αλλά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των κακοήθων ΥΣ, συντηρώντας μια αιμορραγική κακοήθη ΥΣ μέσω μείωσης της ενδοθηλιακής ακεραιότητας, αύξησης της αγγειακής και μεσοθηλιακής διαπερατότητας και επαγωγής της κυτταρικής προσκόλλησης [634].

Τα επίπεδα της IL-33 έχουν διερευνηθεί σε καταστάσεις οξεία μηχανικής καταπόνησης της υπεζωκοτικής κοιλότητας, όπως σε ηωσινοφιλικές συλλογές που αναπτύσσονται μετά από αυτόματο πνευμοθώρακα. Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι σε αυτές τις περιπτώσεις τα αυξημένα επίπεδα IL-33 απελευθερώνονται από τα μεσοθηλιακά κύτταρα μέσω στείρας φλεγμονής και οδηγούν σε μια μη-Th2 αλλά ILC2-εξαρτώμενη ανοσιακή απάντηση [319]. Με άλλα λόγια, σε συνθήκες μηχανικής καταπόνησης του υπεζωκότα δεν ανιχνεύθηκε επιστράτευση κυττάρων της επίκτητης ανοσίας, παρα μόνο της έμφυτης δια της μεσολάβησης της IL-33 [319]. Εξάλλου για την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας απαιτείται πρώτα η αναγνώριση του στόχου εναντίον του οποίου θα οργανωθεί η επίθεση του ανοσολογικού συστήματος. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση της IL-33 με τη βιοχημεία ή κυτταρολογία του υγρού όσον αφορά τις παραπνευμονικές ΥΣ. Ωστόσο, ο υποπληθυσμός ILC2s δεν προσδιορίστηκε. Περαιτέρω κυτταρομετρικές μελέτες μπορούν να ρίξουν φως στο ρόλο των IL-33-ενεργοποιούμενων ILC2s στην υπεζωκοτική νόσο.

Όσον αφορά τα επίπεδα του sST2, εντοπίσαμε μια στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση των επιπέδων του υποδοχέα με τον απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων του ΥΥ στις διδρωματικές ΥΣ. Εικάζεται ότι τα λεμφοκύτταρα αποτελούν πιθανή κυτταρική πηγή για τον sST2 στα διδρώματα. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι ο υποδοχέας ST2 είναι υποδοχέας επιφανείας των T λεμφοκυττάρων, επιβεβαιώνοντας άλλωστε την άμεση IL-33 επαγόμενη εμπλοκή της επίκτητης ανοσίας στην ομοιόσταση των ιστών [635]. Η κυτταρική πηγή του sST2 δεν καθορίστηκε για τις παραπνευμονικές και κακοήθεις ΥΣ στη μελέτη μας, παρόλο που έχει αναφερθεί ότι το ST2 mRNA εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα βοηθητικά CD4+ T λεμφοκύτταρα στις κακοήθεις ΥΣ [331].

Μάλιστα οι Oshikawa και συν. υποστηρίζουν ότι ο ST2 διαμεσολαβεί μια Th2 ανοσιακή απάντηση στις κακοήθειες ΥΣ και η παραπάνω παρατήρηση συνιστά εύρημα κατεσταλμένης ανοσίας, που μαρτυρά την αναχαίτιση μιας αντικαρκινικής Th1 απάντησης [331]. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι στην ίδια μελέτη, οι Oshikawa και συνεργάτες, δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν καμία συσχέτιση των επιπέδων του διαλυτού υποδοχέα του ΥΥ με το ποσοστό ή τον απόλυτο αριθμό των Τ λεμφοκυττάρων του ΥΥ (όπως αυτά προέκυπταν από την γενική εξέταση του ΥΥ) όπως συνέβη και στην παρούσα διατριβή [331]. Βάση των ανωτέρω, κυτταρομετρικές αναλύσεις απαιτούνται ώστε να αποκαλύψουν πιθανή συσχέτιση των επιπέδων sST2 με τους διάφορους υποπληθυσμούς των Τ κυττάρων στις κακοήθειες ΥΣ.

## **7.6 Συσχέτιση της HMGB1 και του sRAGE με τα βιοχημικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά των ΥΣ.**

Βάση των ευρημάτων μας διαπιστώθηκε μια θετική συσχέτιση των επιπέδων HMGB1 με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων του υπεζωκοτικού υγρού στις κακοήθειες ΥΣ. Είναι αποδεδειγμένο ότι τα Τ λεμφοκύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν HMGB1 ως απόκριση σε αρκετά ερεθίσματα [636-638]. Από την άλλη πλευρά, η HMGB1 δρα ως αλαρμίνη που μεσολαβεί στον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων [624], ενώ δρα χημειοτακτικά για τα Tregs προάγοντας την ανοσολογική επιτήρηση [624].

Επιπρόσθετα, τα επίπεδα HMGB1 συσχετίστηκαν θετικά με τον αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων στις κακοήθειες ΥΣ. Πρόσφατα έχει τεκμηριωθεί ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχουν HMGB1 [639-641]. Έχει βρεθεί πως η HMGB1 εκφράζεται ευρέως στις κυτταρικές επιφάνειες των ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων ομφάλιου λώρου [639]. Μάλιστα υποστηρίζεται πως η HMGB1 που συλλέγεται από το υπερκείμενο αποθηκευμένων (από 4 ως 42 ημέρες) και κατάλληλα

συντηρημένων ανθρώπινων ερυθρών αιμοσφαιρίων αναστέλλει την βακτηριακή κάθαρση. Συγκεκριμένα αναφέρεται από τους ερευνητές ότι αναπτύσσονται εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι της HMGB1 καταστέλλοντας τη σηματοδοτική της δράση έναντι των μακροφάγων και ως εκ τούτου μειώνεται η αντιμικροβιακή ικανότητά τους [640]. Συνεπώς υποστηρίζεται ότι η HMGB1 που προέρχεται από αιμόλυση μπορεί να εμπλέκεται στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος [640] και την ανοσολογία του καρκίνου [641]. Επιπρόσθετα, έχουν περιγραφεί αυξημένα *in vivo* επίπεδα της HMGB1 στον πνεύμονα σε περιπτώσεις μετάγγισης ερυθρών αιμοσφαιρίων [639]. Τα ανωτέρω βιβλιογραφικά δεδομένα σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης οδήγησαν στην υπόθεση, ότι η παρουσία της HMGB1 στις κακοήθεις ΥΣ προκύπτει ως προϊόν της αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και/ή κυτταρόλυσης ή ενεργού έκκρισης από τα λεμφοκύτταρα του υπεζωκοτικού υγρού. Επισημαίνεται ωστόσο η ανάγκη περαιτέρω έρευνας για την αποσαφήνιση της κυτταρικής πηγής της HMGB1 στις κακοήθεις ΥΣ.

### **7.7 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 καθώς και της ανασυνδυσασμένης IL-33 στην κυτταρική προσκόλληση στα κύτταρα MeT-5A.**

Η ιστική αποκατάσταση του υπεζωκοτικού τραύματος απαιτεί την επαναμεσοθηλιοποίηση με εστιακή προσκόλληση των ελεύθερων αιωρούμενων στην υπεζωκοτική κοιλότητα μεσοθηλιακών κυττάρων και την μετέπειτα δισδιάστατη μετανάστευσή τους. Δεν υπάρχουν δεδομένα για τις επιδράσεις της IL-33 και του sST2 στην ομοιόσταση της υπεζωκοτικής μεσοθηλιακής μονοστιβάδας. Μια καινοτομία της παρούσας μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός της επίδρασης της IL-33 στην προσκόλληση των μεσοθηλιακών κυττάρων σε υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης και στην κυτταρική μετανάστευση σε περιβάλλον διδρωματικών, κακοήθων και

παραπνευμονικών ΥΣ. Μελετήθηκαν δηλαδή δύο κυτταρικοί φαινότυποι μείζονος σημασίας για την αποκατάσταση της τραυματισμένης μεσοθηλιακής στιβάδας.

Όσον αφορά την κυτταρική προσκόλληση των αιωρούμενων μεσοθηλιακών κυττάρων στο υπόστρωμα φιβρονεκτίνης (cell to matrix interaction), παρατηρήθηκε ότι στις κακοήθεις ΥΣ, δηλαδή σε κατάσταση χρόνιας φλεγμονής, το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33, επήγαγε σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων MeT-5A στο υπόστρωμα, συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλά επίπεδα IL-33. Αντίθετα στις παραπνευμονικές ΥΣ, δηλαδή σε κατάσταση οξείας υπεζωκοτικής φλεγμονής, το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση της IL-33 παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη κυτταρική προσκόλληση των καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων. Αυτά τα δεδομένα συντείνουν στο ότι η IL-33 αλληλεπιδρώντας με ένα ετερογενές πληθυσμό σηματοδοτικών μορίων εντός της υπεζωκοτικής κοιλότητας, οδηγεί σε αυξημένη ή μειωμένη προσκόλληση των μεσοθηλιακών κυττάρων με αποτελέσματα που διαφοροποιούνται ανάλογα με την ασθένεια και το χρόνο φλεγμονής.

Προηγούμενες μελέτες επιβεβαιώνουν την εμπλοκή της IL-33 στην κυτταρική προσκόλληση [642, 643], ωστόσο τα στοιχεία είναι αντιφατικά. Καταρχήν, τα επίπεδα της αλαρμίνης έχουν συσχετιστεί θετικά με την υψηλή έκφραση του VEGF στις κακοήθεις ΥΣ [614-620]. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο άξονας IL-33/sST2 εμπλέκεται στην ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου διευκολύνοντας την έκφραση του VEGF σε καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας σε ενισχυμένη αγγειο- και ιστική-διαπερατότητα και εξέλιξη του όγκου μέσω κυτταρικής προσκόλλησης [614]). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η IL-33 επάγει την έκφραση μορίων προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1, E-σελεκτίνης, χημειοκίνης MCP-1) *ex vivo* και *in vitro* σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αθηροσκлерωτικών πλακών [638], προκαλώντας πρόσληψη λευκοκυττάρων καθώς και ισχυρή διέγερση για προσκόλληση

ηωσινόφιλων [605, 644, 645] και ανθρώπινων ιστιοκυττάρων μέσω ST2-σηματοδότησης [644-647]. Από την άλλη πλευρά, πρόσφατα περιγράφηκε πως η χρήση ανασυνδυασμένης IL-33 καταστέλλει την προσκόλληση τροφοβλαστικών κυττάρων υπορυθμίζοντας την έκφραση μορίων επιφανειακής προσκόλλησης. Η δράση αυτή παραδόξως φάνηκε να έχει ομοιοστατικό αντίκτυπο συμβάλλοντας στον σχηματισμό του πλακούντα κατά τη διάρκεια της πρώιμης εγκυμοσύνης [645].

Στην παρούσα μελέτη, η χρήση ποικίλων συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης IL-33 δεν κατέδειξε κάποια διαφοροποίηση στο βαθμό κυτταρικής προσκόλλησης των καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων στο υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης. Κατα συνέπεια, εικάζεται ότι αρκετοί κυτταρικοί και αυξητικοί παράγοντες στο υπεζωκοτικό υγρό, οι οποίοι διαφοροποιούνται ανάλογα με τη νόσο και το χρόνο της φλεγμονώδους διαδικασίας, είναι απαραίτητοι και δρουν συνεργικά προάγοντας την κυτταρική προσκόλληση. Πράγματι, η IL-33 όπως ήδη αναφέρθηκε, επιδρά στη διατήρηση της ομοιόστασης της υπεζωκοτικής κοιλότητας με έμμεσους μηχανισμούς όπως για παράδειγμα μέσω IL-4 διέγερσης του πολλαπλασιασμού των εγγενών μακροφάγων στην υπεζωκοτική κοιλότητα [329]. Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που κατευθύνουν την κυτταρική προσκόλληση στην υπεζωκοτική νόσο απαιτούν περαιτέρω χαρακτηρισμό.

## **7.8 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 καθώς και της ανασυνδυασμένης IL-33 στην κυτταρική μετανάστευση MeT-5A κυττάρων.**

Η φυσική επούλωση πληγών περιλαμβάνει το φλεγμονώδες στάδιο, το στάδιο του πολλαπλασιασμού και το τελικό στάδιο ωρίμανσης ή αναδιαμόρφωσης τα οποία διαμεσολαβούνται από ποικίλους αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και αναστολείς

μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs). Τα μόρια αυτά κατευθύνουν τις βιολογικές λειτουργίες των κυττάρων τραύματος όπως των ουδετεροφίλων, μακροφάγων και ινοβλαστών κ.α που εμπλέκονται στην καταρράκτη επούλωσης πληγών [648]. Η IL-33 έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί την ανακατασκευή των ιστών επάγοντας την επιθηλιακή αποκατάσταση κατά την επούλωση πληγών σε εντερικό επιθήλιο, δέρμα ανθρώπων και επίμυον [644, 645]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο αναστολέας του υποδοχέα ST2 διατηρεί τη φλεγμονή του τραύματος, καθυστερεί την επούλωση και αυξάνει την ίνωση [649]. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται η επίδραση της IL-33 στην μετανάστευση των μεσοθηλιακών κυττάρων στις εξιδρωματικές ΥΣ (κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ).

Συγκεκριμένα στις κακοήθεις ΥΣ δηλαδή σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής, τα κύτταρα MeT-5A που εκτέθηκαν σε υπεζωκοτικό υγρό με υψηλή συγκέντρωση IL-33, μετανάστευσαν περισσότερο από τα αντίστοιχα μεσοθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις IL-33. Η IL-33 έχει αποδειχθεί ότι προάγει τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων στο καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, στο γλοιώμα, στον γαστρικό καρκίνο, συνεπώς επιβεβαιώνεται βιβλιογραφικά ο σημαντικός ρόλος της IL-33 στην εξέλιξη ενός καρκινικού όγκου και στο μεταστατικό δυναμικό του [644, 647-650]. Σε πρόσφατη μελέτη τα υψηλά επίπεδα IL-33 στον ορό περιγράφησαν ως ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [651-654]. Επιπρόσθετα, σε περιπτώσεις χρόνιας νόσου, όπως στην περίπτωση ρευματοειδούς αρθρίτιδας, η IL-33 επήγαγε τη μετανάστευση ουδετεροφίλων έμμεσα μέσω ενεργοποίησης των μακροφάγων αλλά και μέσω άμεσης επίδρασης της επί των ουδετεροφίλων που φέρουν τον υποδοχέα ST2L [248, 655-657].

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, όσον αφορά τις παραπνευμονικές ΥΣ, δηλαδή σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονώδους υπεζωκοτικής βλάβης, τα κύτταρα MeT-5A που εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις IL-33 μετανάστευσαν σημαντικά λιγότερο συγκριτικά με τα μεσοθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις IL-33. Δεδομένου ότι οι παραπνευμονικές ΥΣ είναι λοιμώδους αιτιολογίας δύναται να πιθανολογήσουμε ότι η σηματοδοτική δράση της IL-33 μπορεί να καταναλώνεται αρχικά στην στρατολόγηση φλεγμονωδών μηχανισμών έναντι του μικροβιακού παθογόνου και λιγότερο στην ιστική αποκατάσταση.

Πράγματι, αναφέρθηκε ήδη ότι στην οξεία φλεγμονή ο ρόλος του άξονα είναι κατα βάση αντιπολλαπλασιαστικός και αντινωτικός, ενώ η χρονιότητα της φλεγμονώδους διαδικασίας επάγει στην πορεία της ένα επουλωτικό και πιθανά προινωτικό αποτέλεσμα [609]. Έτσι είναι πιθανόν σε περιπτώσεις οξείας στρεσογόνου διαδικασίας που χαρακτηρίζει μια παραπνευμονική ΥΣ, να υπερτερεί ένα περισσότερο αντιφλεγμονώδες πρότυπο με ελεγχόμενη ιστική αναδιαμόρφωση. Αντίθετα η χρονιότητα του φλεγμονώδους ερεθίσματος, όπως στην περίπτωση κακοήθους ΥΣ, επάγει ένα προινωτικό πρότυπο που διαμεσολαβείται από την κυτταρική μετανάστευση.

Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει ότι σε ένα στείρο περιβάλλον –όπως αυτο των *in vitro* πειραμάτων μας με χρήση ανασυνδυασμένης IL33- η χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αλαρμίνης, οδήγησε σε σταδιακή μείωση της μετανάστευσης των καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο ιδίως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις ανιχνευθείσες στις ΥΣ των υπο μελέτη ασθενών (στατιστικά σημαντική σε χορηγούμενη συγκέντρωση >1ng/mL). Πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι η χορήγηση ανασυνδυασμένης IL-33 επιδρά στην αναδιαμόρφωση του ιστού με εξασθένηση της επούλωσης πληγών, μέσω μείωσης της



μετανάστευσης ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων αμιβληστροειδικών μικροαγγείων σε περιπτώσεις εκφύλισης ωχράς κυλίδας [657]. Η μελέτη αυτή είναι σύμφωνη με τα ευρήματά μας. Αντιφατικά αποτελεσματα προκύπτουν από την ομάδα των Bianchetti και συν. που παρατήρησαν πως η χορήγηση ανασυνδυσμένης IL-33 σε συγκεντρώσεις 0.1 και 10 ng/mL, επήγαγε τη μετανάστευση των κυκλοφορούντων ινοβλαστών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο σε ασθενείς με αλλεργικό άσθμα [658]. Επίσης, πρόσφατα οι Numata και συν. στα πλαίσια διερεύνησης της φυσιολογίας της δερματικής φλεγμονής, παρατήρησαν ότι η ενδοδερμική χορήγηση ανασυνδυσμένης IL-33 σε επίμυες, επήγαγε μετά από 6 ώρες την έκφραση του ενδοκυττάρου μόριου προσκόλλησης ICAM-1 που είναι απαραίτητο για την κυτταρική μετανάστευση στο βιοπτικό υλικό [605]. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να φωτίσουν τον ακριβή ρόλο του σηματοδοτικού άξονα IL-33/ST2 στην κυτταρική μετανάστευση.

Στις διδρωματικές ΥΣ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση από την επίδραση των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων της IL-33, ως αναμένετο, δεδομένου ότι το αίτιο γένεσης αυτών είναι η ανισορροπία πιέσεων εκατέρωθεν της ενδοθηλιακής μεμβράνης των τριχοειδών του πνευμονικού παρεγχύματος και του υπεζωκότα και απουσιάζει το φλεγμονώδες ερέθισμα.

## **7.9 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 καθώς και της ανασυνδυσμένης HMGB1 στην κυτταρική προσκόλληση των MeT-5A κυττάρων.**

Στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίστηκαν οι *in-vitro* επιδράσεις της HMGB1 στην μεσοθηλιακή κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και σχηματισμό σφαιροειδών σε διδρωματικές, κακοήθεις και παραπνευμονικές ΥΣ.

Όσον αφορά την κυτταρική προσκόλληση, φάνηκε ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις HMGB1 ενίσχυσαν την προσκόλληση μεσοθηλιακών κυττάρων με το υπόστρωμα (cell to matrix interaction) σε διδρωματικές και εξιδρωματικές ΥΣ.

Έχει αναφερθεί ότι η HMGB1 στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση [659, 660]. Περαιτέρω, η σηματοδότηση του υποδοχέα RAGE έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών και αγγειογόνων παραγόντων, που προωθούν τη χημειοταξία, μετανάστευση και προσκόλληση των ανοσοκυττάρων στοχεύοντας στην επίλυση της φλεγμονής [659, 660]. Εξάλλου ο υποδοχέας RAGE της HMGB1 προέρχεται εξελικτικά από οικογένεια μορίων προσκόλλησης όπως προαναφέρθηκε, και δρα ως μόριο προσκόλλησης σε κύτταρα θηλαστικών [423, 513]. Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει αξιολογήσει το ρόλο της HMGB1 στην κυτταρική προσκόλληση [659, 660]. Στις αρχές του 1993, είχε προταθεί ότι η HMGB1 προωθεί τη έκφραση της συνδεδεμένης στην επιφάνεια των κυττάρων πλασμίνης, η οποία διαμεσολαβεί την κυτταρική προσκόλληση [385]. Ομοίως, έχει αναφερθεί ότι η εξωγενής χορήγηση HMGB1 έχει την ικανότητα να επάγει την προσκόλληση ηωσινοφίλων [477]. Έχει τεκμηριωθεί ότι ο αποκλεισμός της HMGB1 με χρήση ανταγωνιστή αποτρέπει την προσκόλληση και τον αποικισμό καρκινικών κυττάρων στον πνευμονικό ιστό, μέσω μείωσης της αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα και της διακυτταρικής αλληλεπίδρασης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [660-664]. Τα δεδομένα αυτά είναι ενδεικτικά του κρίσιμου ρόλου της HMGB1 στην ανοσία, τη φλεγμονή και τον καρκίνο μέσω επιδράσεων σε σημαντικούς κυτταρικούς φαινοτύπους όπως η προσκόλληση.

Η χρήση ανασυνδυσμένης HMGB1 σε συγκέντρωση 50 ng/mL φάνηκε να μειώνει σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες

συγκεντρώσεις της ανασυνδυσμένης αλαρμίνης. Πιθανολογούμε ότι η HMGB1 εμφανίζει ένα μέγιστο αποτέλεσμα δράσης μέχρι μια συγκεκριμένη συγκέντρωση πέρα από την οποία δεν επιδρά περαιτέρω στο συγκεκριμένο φαινότυπο.

### **7.10 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 καθώς και της ανασυνδυσμένης HMGB1 στην κυτταρική μετανάστευση MeT-5A κυττάρων.**

Όσον αφορά την *in vitro* επίδραση της HMGB1 στην μεσοθηλιακή κυτταρική μετανάστευση, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις της HMGB1 οδήγησαν σε υψηλό δείκτη μετανάστευσης στις περιπτώσεις οξείας φλεγμονής (παραπνευμονικές συλλογές) αλλά σε χαμηλό δείκτη μετανάστευσης σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής (κακοήθειες ΥΣ) ή ήσσονος σημασίας φλεγμονής (διυδροματικές ΥΣ).

Βιβλιογραφικά υποστηρίζεται ότι η εξωγενής χορήγηση HMGB1 συμβάλλει στη μετανάστευση των εγγενών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως των μονοκυττάρων, ουδετεροφίλων, ηωσινοφίλων σε περιοχές λοίμωξης και τραυματισμού [502-507]. Η μετανάστευση κυττάρων μπορεί να προστατεύει τους ιστούς, ενισχύοντας την επούλωση του τραύματος [502-507], την αναγέννηση ιστών και την αγγειογένεση [502-507]. Η HMGB1 προάγει επίσης την αναγέννηση ιστών με χημειοτακτική ενεργοποίηση των βλαστοκυττάρων και με πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση ινοβλαστών, κερατινοκυττάρων, ενδοθηλιακών [662] και αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων [663], τα οποία επίσης στρατολογεί. Μάλιστα, έχει περιγραφεί πως η εξωγενής χορήγηση HMGB1 προκαλεί μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων με δοδοεξαρτώμενο τρόπο [664]. Μάλιστα, αναφέρεται πως η HMGB1-επαγόμενη μετανάστευση κυττάρων ολοκληρώνεται μέσω

σηματοδότησης με το διαμεμβρανικό υποδοχέα RAGE στην επιφάνεια των κυττάρων [577, 660-666]. Είναι γνωστές ακόμη, οι HMGB1-μεσολαβούμενες αποκρίσεις στη σήψη, όπως η αγγειακή και ιστική υπερδιαπερατότητα, προσκόλληση και μετανάστευση λευκοκυττάρων και έκφραση μορίων προσκόλλησης [520-523]. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η έναρξη δράσης της HMGB1 απαιτεί την ύπαρξη προϋπάρχουσων φλεγμονωδών μεσολαβητών από τα κύτταρα του τραύματος [520-523]. Έτσι ερμηνεύεται ο υψηλός δείκτης μετανάστευσης στο δείγμα με υψηλά επίπεδα HMGB1 στην περίπτωση οξείας φλεγμονής (παραπνευμονικές συλλογές). Επιπλέον, η απουσία προφλεγμονωδών παραγόντων ερμηνεύει τη μειωμένη μετανάστευση που παρατηρήθηκε στις διδρωματικές ΥΣ. Πράγματι, στην παρούσα μελέτη, απουσία κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος δεν παρατηρήθηκε επίσης καμία επίδραση της χορηγούμενης ανασυνδυασμένης HMGB1 στην κυτταρική μετανάστευση.

Όσον αφορά την μειωμένη κυτταρική μετανάστευση επί υψηλών επιπέδων HMGB1 στις κακοήθεις ΥΣ (χρόνια φλεγμονή), είναι γνωστό ότι η εξωκυττάρια HMGB1 έχει διττό ρόλο στον καρκίνο: αφενός ενεργοποιεί και προσλαμβάνει ανοσοκύτταρα απαραίτητα για την καρκινική κάθαρση διεγείροντας την αποκατάσταση ιστών (αντικαρκινική δράση), και αφετέρου, προάγει τη φλεγμονή, μετανάστευση και καρκινική μετάσταση ως “υπότροφος” του καρκίνου (προκαρκινική δράση). [620, 667-669].

Συμπληρωματικά, υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν τα μειωμένα και όχι αυξημένα επίπεδα HMGB1 με αύξηση της ιστικής αποκατάστασης σε πειραματικά μοντέλα επίμυων [670]. Άλλη μελέτη αναφέρει ότι η μείωση των επιπέδων HMGB1 στο περιβάλλον του τραύματος με χρήση πυρουβικού αιθυλεστέρα (ανταγωνιστή HMGB1) οδηγεί σε σημαντική αύξηση της ιστικής αποκατάστασης, της σύνθεσης

κολλαγόνου και της δύναμης μη-θραύσης του τραύματος. Έχει προταθεί μάλιστα ότι η επώαση των ινοβλαστών επίμυος *in vitro* με ανασυνδυσμένη HMGB1 μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της σύνθεσης κολλαγόνου [670]. Επιπλέον περιγράφεται ότι, η εξωγενής HMGB1 αναστέλλει επιλεκτικά τη VEGF-εξαρτώμενη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων πνευμονικής αρτηρίας [509]. Επομένως η HMGB1 που εκλύεται από τραύμα ιστού ως αλαρμίνη, μπορεί να εξασθενήσει τελικά την επούλωση του τραύματος.

Για την ερμηνεία των παραπάνω ευρημάτων, οι Zhang και συν. [670] προτείνουν ότι η HMGB1 εκκρίνεται ενεργητικά από τα κύτταρα τραύματος μετά από διέγερση αυτών από άλλους φλεγμονώδεις παράγοντες (όπως TNF-α ή IL-6) δρώντας ως αλαρμίνη και διεγείροντας με τη σειρά της τα κύτταρα τραύματος να απελευθερώσουν περισσότερους φλεγμονώδεις μεσολαβητές (όπως TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-6, IL-8) [670]. Τελικό αποτέλεσμα είναι να εμποδίζεται τελικά η σύγκλιση λόγω μιας παρατεταμένης φλεγμονώδους διαδικασίας [670]. Επιπρόσθετα η HMGB1 έχει αναφερθεί ότι επάγει την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης (MMP)-9 η οποία είναι ένα από τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στη διάσπαση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στην αποικοδόμηση του κολλαγόνου [670]. Η HMGB1 μειώνει τη σύνθεση και/ή αυξάνει την αποικοδόμηση του κολλαγόνου μέσω ενός μηχανισμού που διαμεσολαβείται από τον RAGE [667].

Η σε βάθος κατανόηση του ρόλου της αλαρμίνης σε μηχανισμούς ιστικής επιδιόρθωσης μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια νόσο του υπεζωκότα.

### **7.11 In vitro επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 καθώς και της ανασυνδυσμένης HMGB1 στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών MeT-5A κυττάρων.**

Η γνώση όσον αφορά την επίδραση της HMGB1 στην ικανότητα των μεσοθηλιακών κυττάρων να διαμορφώνουν κυτταρικά σφαιροειδή, είναι ελλιπής. Ο φαινότυπος αυτός αντανακλά την ικανότητα διακυτταρικής (cell to cell interaction) αλληλεπίδρασης και προσδίδει το μοναδικό πλεονέκτημα της τρισδιάστατης απεικόνισης. Στη μελέτη μας, μόνο στην περίπτωση οξείας φλεγμονής δηλαδή στο δείγμα της παραπνευμονικής ΨΣ με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 φάνηκε η ικανότητα σχηματισμού σφαιροειδών τα οποία χαρακτηριστικά είχαν σημαντικά μειωμένη περίμετρο κατά 40% σε σύγκριση με το σφαιροειδές που διαμορφώθηκε από την ομάδα ελέγχου. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι τα υψηλά επίπεδα HMGB1 σε περιπτώσεις οξείας φλεγμονής μπορούν να οδηγήσουν στην διακυτταρική αλληλεπίδραση που είναι σημαντική για την επούλωση τραύματος και επαναμεσοθηλιοποίηση της υπεζωκοτικής στιβάδας. Σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν ότι η χορήγηση ανασυνδυσμένης HMGB1 επέδρασε στην ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (στατιστικά σημαντική επίδραση σε συγκεντρώσεις >100 ng/ mL). Υπάρχει μόνο μια βιβλιογραφική αναφορά στα πλαίσια αξιοποίησης του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος -των αντιγόνων ομάδας αίματος- για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, στην οποία περιγράφεται ότι η έκφραση αντιγόνου της ομάδας A της επιφάνειας των ερυθρών αιμοσφαιρίων θα μπορούσε να προκαλέσει ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο που διαμεσολαβείται και εκπροσωπείται από τα υψηλά επίπεδα HMBA1 εξωκυτταρίως που οδηγούν με τη σειρά τους σε σημαντική μείωση της ικανότητας σχηματισμού σφαιροειδών από τα καρκινικά κύτταρα [671].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Συμπεράσματα

Ανακεφαλαιώνοντας, οι αλαρμίνες IL-33 και HMGB1 είναι πολυλειτουργικές πρωτεΐνες με ρόλο που ποικίλει ανάλογα με το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εδράζονται. Συμμετέχουν σε ποικιλία βιολογικών λειτουργιών, όπως στη ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων, στη διατήρηση της ομοιόστασης, στην ιστική επισκευή και αναδιαμόρφωση. Η σηματοδοτική τους δράση ολοκληρώνεται μετά από σύνδεσή τους με PRPs όπως με τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς ST2 και RAGE, αντίστοιχα. Εξωκυτταρίως οι διαλυτές ισομορφές sST2 και sRAGE δεσμεύουν τις αλαρμίνες εμποδίζοντας την ενδοκυττάρια σήμανση.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μελετούμενων πρωτεϊνών σε διδρωματικές, κακοήθειες και παραπνευμονικές ΥΣ, από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της IL-33 και του sST2 μεταξύ των τριών τύπων ΥΣ. Ωστόσο, τα επίπεδα της HMGB1 ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις διδρωματικές ΥΣ σε σύγκριση με τις εξιδρωματικές ΥΣ. Αντίστροφο ήταν το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε για τα επίπεδα του υποδοχέα sRAGE. Είναι ενδιαφέρον μάλιστα ότι οι HMGB1 και sRAGE μπορούν να διακρίνουν τα διδρώματα από τα εξιδρώματα. Για πρώτη φορά αξιολογήθηκε η διαγνωστική ακρίβεια αυτών στα νοσήματα του υπεζωκότα. Η ROC ανάλυση ανέχνευσε πως η τιμή 7,48 ng/mL για την HMGB1, είναι σημαντικά ευαίσθητη (100%) σε επίπεδο ειδικότητας 85% για τη διάκριση των διδρωματικών από τις εξιδρωματικές ΥΣ. Επίσης, η τιμή 1215,72 pg/mL για τον sRAGE, είναι σημαντικά ευαίσθητη (100%) σε επίπεδο ειδικότητας 77% για τη διάκριση των διδρωματικών από τις εξιδρωματικές ΥΣ.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων της IL-33 ή του sST2 του υπεζωκοτικού υγρού σε σχέση με την ηλικία ή το φύλο των

ασθενών. Αξιοσημείωτα, παρατηρήθηκε μια εξαρτώμενη από την ηλικία διαφοροποίηση των επιπέδων HMGB1 και sRAGE στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Διαφαίνεται ως εκ τούτου ότι με την αύξηση της ηλικίας επηρεάζονται οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του υπεζωκότα. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές των επιπέδων των HMGB1 και sRAGE σε σχέση με το φύλο.

Επιπρόσθετα, η IL-33 πιθανότατα προκύπτει ως προϊόν τραυματισμού των μεσοθηλιακών κυττάρων στις διδρωματικές ΥΣ και ως προϊόν αιμόλυσης στις κακοήθεις ΥΣ. Επίσης, η HMGB1 συσχετίστηκε με τα επίπεδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των λεμφοκυττάρων στις κακοήθεις ΥΣ.

Όσον αφορά τις *in vitro* επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων IL-33 στους υπο μελέτη κυτταρικούς φαινότυπους των κυττάρων MeT-5A, παρατηρήθηκε ότι: στις κακοήθεις ΥΣ το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33 οδήγησε σε σημαντικά μεγαλύτερη προσκόλληση και μετανάστευση των κύτταρων MeT-5A συγκριτικά με το δείγμα με χαμηλά επίπεδα IL-33. Αντίστροφα, στις παραπνευμονικές ΥΣ, το δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση IL-33 οδήγησε σε σημαντικά μεγαλύτερη προσκόλληση και μετανάστευση των κύτταρων MeT-5A συγκριτικά με το δείγμα με υψηλή συγκέντρωση IL-33. Στις διδρωματικές ΥΣ, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση μεταξύ των δειγμάτων με υψηλή ή χαμηλή συγκέντρωση IL-33. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η επίδραση της IL-33 επί των κυτταρικών φαινοτύπων διαφοροποιείται ανάλογα με το χρόνο της φλεγμονώδους διαδικασίας και τον τύπο της ΥΣ.

Αναφορικά με τις *in vitro* επιδράσεις των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 στους κυτταρικούς φαινοτύπους των κυττάρων MeT-5A, στα δείγματα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1 παρατηρήθηκε: σημαντικά αυξημένη



κυτταρική προσκόλληση σε σύγκριση με τα δείγματα που επώασθηκαν με χαμηλή συγκέντρωση HMGB1 και στους τρεις τύπους ΥΣ.

Διαφοροποίηση παρατηρήθηκε όσον αφορά την *in vitro* επίδραση των χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων HMGB1 στη μετανάστευση των κυττάρων MeT-5A ανάλογα με τον τύπο της ΥΣ και το χρόνο φλεγμονής. Συγκεκριμένα, στις διδρωματικές και κακοήθεις ΥΣ παρατηρήθηκε χαμηλότερος δείκτης μετανάστευσης στα δείγματα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1, ενώ στις παραπνευμονικές ΥΣ, παρατηρήθηκε μεγαλύτερος δείκτης μετανάστευσης στα δείγματα με υψηλή συγκέντρωση HMGB1. Τέλος, μόνο το δείγμα της παραπνευμονικής ΥΣ με αυξημένη συγκέντρωση HMGB1 κατόρθωσε να διαμορφώσει κυτταρικό σφαιροειδές.

Όσον αφορά τις *in vitro* επιδράσεις της ανασυνδυασμένης IL-33 στην προσκόλληση και μετανάστευση των κυττάρων MeT-5A παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ανασυνδυασμένης IL-33 μείωσε την κυτταρική μετανάστευση των καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για τιμές  $>1$  ng/mL). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης IL-33 στην κυτταρική προσκόλληση.

Σχετικά με τις *in vitro* επιδράσεις της ανασυνδυασμένης HMGB1 στην προσκόλληση, μετανάστευση και στο σχηματισμό κυτταρικών σφαιροειδών των κυττάρων MeT-5A, παρατηρήθηκε ότι η χρήση ανασυνδυασμένης HMGB1 σε συγκέντρωση 50 ng/mL μείωσε σημαντικά την κυτταρική προσκόλληση των καλοήθων μεσοθηλιακών κυττάρων, ενώ σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες των 100 ng/mL μείωσε την ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών σφαιροειδών. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι τα υψηλά επίπεδα HMGB1 μπορούν να οδηγήσουν στην διακυτταρική αλληλεπίδραση που είναι σημαντική για την επούλωση τραύματος και

επαναμεσοθηλιοποίηση της υπεζωκοτικής στιβάδας. Δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση των χορηγούμενων συγκεντρώσεων της ανασυνδυασμένης HMGB1 στην κυτταρική μετανάστευση.

Τα ευρημάτα αυτής της μελέτης υπογραμμίζουν έναν αναδυόμενο ρόλο των σηματοδοτικών αξόνων IL-33/sST2 και HMGB1/sRAGE στην παθοφυσιολογία των μελετούμενων ΥΣ. Φαίνεται πως αυτόνομα ή σε συνδυασμό με άλλα σηματοδοτικά μόρια επιδρούν στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς της τραυματισμένης μεσοθηλιακής στιβάδας όπως στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και ικανότητα σχηματισμού σφαιροειδών. Είναι βέβαιο ότι οι πρωτεΐνες αποτελούν αναπόσπαστο μέρος μιας σύνθετης φλεγμονώδους απάντησης που έχει ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση ιστών ή τη βλάβη του υπεζωκότα. Η φαρμακολογική στόχευση αυτών των DAMPs μπορεί συνεπώς να είναι επωφελής. Ωστόσο, οι αλαρμίνες έχουν περίπλοκους τοπικούς ρόλους οι οποίοι εξαρτώνται από τη μετα-μεταφραστική τους τροποποίηση, την οξειδοαναγωγική κατάστασή τους, την κυτταρική πηγή τους, τη δέσμευσή τους με διαφορετικούς διαμεμβρανικούς ή διαλυτούς υποδοχείς. Με τη νέα γνώση σαφώς αναδύονται και νέα ερωτήματα σχετικά με τον ακριβή παθοφυσιολογικό ρόλο των αλαρμινών IL-33 και HMGB1 καθώς και των διαλυτών υποδοχέων τους sST2 και sRAGE στη νόσο του υπεζωκότα, που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

## Summary

Interleukin 33 (IL-33) is a nuclear cytokine from the IL-1 family which is constitutively highly expressed in barrier sites, acting via the suppression of tumorigenicity 2 (ST2) receptor. On the other hand, high-mobility group box 1 protein (HMGB1) is a chromosomal multifunctional redox sensitive protein. Many actions of HMGB1 are mediated through the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE). Both molecules serve various roles in different cellular compartments. Extracellularly, they act as alarmins with multiple roles in immunity and cell homeostasis. Productions of IL-33, HMGB1 and soluble forms of the receptors (sST2 and sRAGE, respectively) have been implicated in several pulmonary diseases. Both axes have been scarcely investigated in pleural diseases. The aims of this thesis were to determine the levels of IL-33 and sST2 as well as HMGB1 and sRAGE in transudative (TrPEs), malignant (MPEs) and parapneumonic (PPEs) pleural effusions (PEs) and investigate the effect of PE fluids with low and high IL-33 or HMGB1 levels on MeT-5A cell adhesion, migration and sphere formation. Further, recombinant IL-33 and HMGB1 were separately used to assess effects on MeT-5A adhesion, migration and sphere formation. IL-33 and sST2 levels were similar among TrPEs, MPEs and PPEs. However, HMGB1 and sRAGE levels were significantly higher and lower, respectively in exudative pleural effusions compared to TrPEs. HMGB1 and sRAGE levels can effectively discriminate transudates from exudates. Remarkably, HMGB1 and sRAGE levels are differentiated between various PEs in an age-dependent manner. A significant positive correlation was found between IL-33 and LDH in TrPEs and between IL-33 and red blood cells (RBCs) in MPEs, while sST2 correlated with lymphocytes in TrPEs. HMGB1 was positively correlated with RBCs and lymphocytes in MPEs. No correlation was found between sRAGE and

cellular or specific biochemical characteristics of PEs. Furthermore, we found that in exudates (MPEs and PPEs) high or low levels of IL-33 had significant differential effects on MeT-5A adhesion and migration, while no effect in both cell 33 phenotypes was determined for TrPEs. Further, based on etiology high or low levels of HMGB1 have differential effects on mesothelial cell adhesion, migration and sphere formation. Moreover, significantly decreased MeT-5A cell migration was found when higher concentrations of recombinant IL-33 were used. 50 ng/mL and 100ng/mL of recombinant HMGB1 significantly decreased cell adhesion and sphere size, respectively. These results highlight the emerging role of the IL-33/ST2 and HMGB1/sRAGE axes in pathophysiology of pleural disease. However, further research to improve our understanding of both signaling pathways in pleural homeostasis and disease will be essential to translate aforementioned findings into clinical practice and be able to predict benefits and risks of evolving therapies.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Yang G, Han Z, Oppenheim JJ. Alarmins and immunity. *Immunol Rev.* 2017;280:41-56.
2. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296:301-305.
3. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
4. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:469-478.
5. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol.* 2015;6:422.
6. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:359-365.
7. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, Panoskaltzis N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 2006 355:1018-1028.
8. Hussell T, Goulding J. Structured regulation of inflammation during respiratory viral infection. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:360-366.
9. Jennifer R. Tisoncik, Marcus J. Korth, Cameron P. Simmons, Jeremy Farrar, Thomas R. Martin, Michael G. Katze. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76:16–32.
10. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012;122:2711–2719.
11. Ma KC, Schenck EJ, Pabon MA, Choi AMK. The Role of Danger Signals in the Pathogenesis and Perpetuation of Critical Illness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; Epub ahead of print
12. Boteanu RM, Suica VI, Uyy E, Ivan L, Dima SO, Popescu I, Simionescu M, Antohe F. Alarmins in chronic noncommunicable diseases: Atherosclerosis, diabetes and cancer. *J Proteomics.* 2017;153:21-29.
13. Schaper F, Westra J, Bijl M. Recent developments in the role of high-mobility group box 1 in systemic lupus erythematosus. *Mol Med.* 2014;20:72-79.
14. Yu SL, Wong CK, Tam LS. The alarmin functions of high-mobility group box-1 and IL-33 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013;9:739-749.
15. Taniguchi N, Kawakami Y, Maruyama I, Lotz M. HMGB proteins and arthritis. *Hum Cell.* 2018;31:1-9.
16. Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C. The danger from within: alarmins in arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12:669-683.

17. Coretti L, Natale A, Cuomo M, Florio E, Keller S, Lembo F, Chiariotti L, Pero R. The Interplay between Defensins and Microbiota in Crohn's Disease. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8392523.
18. Garg AD, Agostinis P. Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. *Immunol Rev.* 2017;280:126-148.
19. Nie Y, Yang D, Oppenheim JJ. Alarmins and Antitumor Immunity. *Clin Ther.* 2016;38:1042-1053.
20. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene.* 2016;35:5931-5941.
21. Pandolfi F, Altamura S, Frosali S, Conti P. Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. *Clin Ther.* 2016;38:1017-1028.
22. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer L. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1985;76:1427-1435.
23. Yang D, Oppenheim JJ. Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3401-3403.
24. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:181-315.
25. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naïve T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2000;68:9-14.
26. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med.* 2000;192:565-570.
27. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418:191-195.
28. Park JS, Arcaroli J, Yum HK, Yang H, Wang H, Yang KY, Choe KH, Strassheim D, Pitts TM, Tracey KJ, Abraham E. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C870-C879.
29. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L, Wang H, Warren HS, Moldawer LL, Fink MP, Andersson U, Tracey KJ, Yang H. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med.* 2003;9:37-45.
30. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:296-301.

31. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, Tracey KJ, Chiorazzi N. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol.* 2004;173:307-313.
32. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420:846-852.
33. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:826-837.
34. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev.* 2008;223:20-38.
35. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81:1-5.
36. Yang D, Wei F, Tewary P, Howard OM, Oppenheim JJ. Alarmin induced cell migration. *Eur J Immunol.* 2013;43:1412-1418.
37. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:331-342.
38. Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, Voronov E, Martin MU, Dinarello CA, Apte RN. Differential release of chromatin bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:2574-2579.
39. Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P, Venereau E. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol Rev.* 2017;280:74-82.
40. Boehme JD, Bruder D. IL-33: a jack of all trades in the orchestration of respiratory antibacterial immunity. *Cell Mol Immunol.* 2017: Epub ahead of print
41. Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther.* 2008;10:209.
42. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012;122:2711-2719.
43. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol.* 2016;17:122-131.
44. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1alpha, IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol.* 2017;14:43-64.
45. Fleshner M. Stress-evoked sterile inflammation, danger associated molecular patterns (DAMPs), microbial associated molecular patterns (MAMPs) and the inflammasome. *Brain Behav Immun.* 2010;27:1-7.
46. Rock K.L. Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:321-342.
47. Fleshner M, Nguyen KT, Cotter CS, Watkins LR, Maier SF. Acute stressor exposure both suppresses acquired immunity and potentiates innate immunity. *Am J Physiol.* 1998;275:R870-8.

48. Campisi J, Fleshner M. Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. *J Appl Physiol*. 2003;94:43–52.
49. Maslanik T, Mahaffey L, Tannura K, Beninson L, Greenwood BN, Fleshner M. The inflammasome and danger associated molecular patterns (DAMPs) are implicated in cytokine and chemokine responses following stressor exposure. *Brain Behav. Immun*. 2013;28:54–62.
50. Li H, Itagaki K, Sandler N, Gallo D, Galenkamp A, Kaczmarek E, Livingston DH, Zeng Y, Lee YT, Tang IT, Isal B, Otterbein L, Hauser CJ. Mitochondrial damage-associated molecular patterns from fractures suppress pulmonary immune responses via formyl peptide receptors 1 and 2. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015;78: 272–279.
51. Hu PJ, Pittet JF, Kerby JD, Bosarge PL, Wagener BM. Acute brain trauma, lung injury, and pneumonia: more than just altered mental status and decreased airway protection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313:L1-L15.
52. Nicolls MR, and Laubach VE. Traumatic brain injury: lungs in a RAGE. *Sci Transl Med*. 2014;6:252fs34.
53. Schneider EM, Flacke S, Liu F, Lorenz MR, Schilling P, Nass ME, Foehr KJ, Huber-Lang M, Weiss ME. Autophagy and ATP-induced antiapoptosis in antigen presenting cells (APC) follows the cytokine storm in patients after major trauma. *J. Cell Commun. Signal*. 2011;5:145–156.
54. Cederberg D, Siesjö P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs Nerv Syst*. 2010;26:221-226.
55. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev*. 2015;24:29-39.
56. Samy RP, Lim LH. DAMPs and influenza virus infection in ageing. *Ageing Res Rev*. 2015; 24:83-97.
57. Fleshner M, Crane CR. Exosomes, DAMPs and miRNA: Features of Stress Physiology and Immune Homeostasis. *Trends Immunol*. 2017;38:768-776.
58. Liu Y, Chen GY, Zheng P. CD24-Siglec G/10 discriminates danger from pathogen-associated molecular patterns. *Trends Immunol*. 2009;30:557–561.
59. Tang D, Kang R, Coyne C, BZeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012;249:158-175.
60. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, Lu B, Chavan S, Rosas-Ballina M, Al-Abed Y, Akira S, Bierhaus A, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Tracey KJ. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11942-11947.
61. Su Z, Zhang P, Yu Y, Lu H, Liu Y, Ni P, Su X, Wang D, Liu Y, Wang J, Shen H, Xu W, Xu H. HMGB1 facilitated macrophage reprogramming towards a proinflammatory M1-like phenotype in experimental autoimmune myocarditis development. *Sci Rep*. 2016;6:21884.
62. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, Nawroth P, Andersson U, Harris RA, Harris HE. RAGE is the major receptor



- for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol.* 2005;61:1-9.
63. Germain RN, Robey EA, Cahalan MD. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science.* 2012;336:1676-1681.
  64. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:678-689.
  65. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990;346:425-434.
  66. Lillard JW Jr, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:651-656.
  67. Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem.* 1996;271:2935-2940.
  68. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. b-Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999;286:525-528.
  69. Hubert P, Herman L, Maillard C, Caberg JH, Nikkels A, Pierard G, Foidart JM, Noel A, Boniver J, Delvenne P. Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed in vitro and transplanted in vivo. *FASEB J.* 2007;21:2765-2775.
  70. Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Molecular and functional characterization of the gilthead seabream beta-defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity. *Mol Immunol.* 2011;48:1432-1438.
  71. Eickhoff S, Brewitz A, Gerner MY, Klauschen F, Komander K, Hemmi H, Garbi N, Kaisho T, Germain RN, Kastenmüller W. Robust anti-viral immunity requires multiple distinct T cell-dendritic cell interactions. *Cell.* 2015;162:1322-1337.
  72. Gerner MY, Torabi-Parizi P, Germain RN. Strategically localized dendritic cells promote rapid T cell responses to lymph-borne particulate antigens. *Immunity.* 2015;42:172-185.
  73. Kitano M, Yamazaki C, Takumi A, Ikeno T, Hemmi H, Takahashi N, Shimizu K, Fraser SE, Hoshino K, Kaisho T, Okada T. Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:1044-1049.
  74. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw.* 1994;5:517-531.

75. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11:483–486.
76. Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 1995;378:88–91.
77. Striz I. Cytokines of the IL-1 family: recognized targets in chronic inflammation underrated in organ transplantations. *Clin Sci (Lond).* 2017;131:2241-2256.
78. Dinarello CA. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. *Immunity.* 2005;23:461–462.
79. Sims JE, Nicklin MJ, Bazan JF, Barton JL, Busfield S, Ford JE, Kastelein RA, Kumar S, Lin H, Mulero JJ, Pan J, Pan Y, Smith DE, Young PR. A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends Immunol.* 2001;22:536–537.
80. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008;226:10-18.
81. Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Tolllike receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE.* 2003;2003:re3.
82. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1- like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005;23:479-490.
83. Debets R, Timans JC, Homey B, Zurawski S, Sana TR, Lo S, Wagner J, Edwards G, Clifford T, Menon S, Bazan JF, Kastelein RA. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol.* 2001;167:1440–1446.
84. Wesche H, Henzel WH, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 1997;7:837-847.
85. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott AM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E., Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88- adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* 2001;413:78-83.
86. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol.* 2001;9:835-841.
87. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002;169: 6668-6672.
88. Peng J, Yuan Q, Lin B, Panneerselvam P, Wang X, Luan XL, Lim SK, Leung BP, Ho B, Ding JL. SARM inhibits both TRIF- and MyD88-mediated AP-1 activation. *Eur J Immunol.* 2010;40:1738-1747.

89. Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cerebr Blood F Met.* 1999;19:1279-1288.
90. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003;163:69-79.
91. Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev.* 2017;278:173-184.
92. Tsuda H, Komine M, Karakawa M, Etoh T, Tominaga S, Ohtsuki M. Novel splice variants of IL-33: Differential expression in normal and transformed cells. *J Invest Dermatol.* 2012;132:2661-2664.
93. Polumuri SK, Jayakar GG, Shirey KA, Roberts ZJ, Perkins DJ, Pitha PM, Vogel SN. Transcriptional regulation of murine IL-33 by TLR and non-TLR agonists. *J Immunol.* 2012;189:50-60.
94. Talabot-Ayer D, Calo N, Vigne S, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. The mouse interleukin (Il)33 gene is expressed in a cell type- and stimulus-dependent manner from two alternative promoters. *J Leukoc Biol.* 2012;91:119-125.
95. Gordon ED, Simpson LJ, Rios CL, Ringel L, Lachowicz-Scroggins ME, Peters MC, Wesolowska-Andersen A, Gonzalez JR, MacLeod HJ, Christian LS, Yuan S, Barry L, Woodruff PG, Ansel KM, Nocka K, Seibold MA, Fahy JV. Alternative splicing of interleukin-33 and type 2 inflammation in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:8765-8770.
96. Cayrol C, Girard JP. IL-33: An alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2014;31:31-37.
97. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 2008;9:1006-1012.
98. Lefrancais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, Cayrol C. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:1673-1678.
99. Lefrancais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C, Girard JP. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:15502-15507.
100. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kB to dampen NF-kB-stimulated gene transcription, *J Immunol.* 2011;187:1609-1616.
101. Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, Pan B, Appleton BA, Wiesmann C, Bazan JF, Fairbrother WJ. Structure of IL-33 and its interaction with the ST2

- and IL-1RAcP receptors—insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure*. 2009;17:1398-1410.
102. De la Fuente M, MacDonald TT, Hermoso MA. The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26:615-623.
  103. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel 'alarmin'? *PLoS ONE*. 2008;3:e3331.
  104. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, Girard JP. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: In situ analysis using a novel Il-33- LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol*. 2012;188:3488-3495.
  105. Barlow JL, Peel S, Fox J, Panova V, Hardman CS, Camelo A, Bucks C, Wu X, Kane CM, Neill DR, Flynn RJ, Sayers I, Hall IP, McKenzie AN. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:933-941.
  106. Smith DE. IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2010; 40:200-8.
  107. Guo XJ, Thomas PG. New fronts emerge in the influenza cytokine storm. *Semin Immunopathol*. 2017;39:541-550.
  108. Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N, Mori M, Pham TH, Ward CK, Criner GJ, Marchetti N, Mustelin T, Erjefalt JS, Kolbeck R, Humbles AA. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity*. 2015;42:566–579.
  109. Meehansan J, Tsuda H, Komine M, Tominaga S, Ohtsuki M. Regulation of IL-33 expression by IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2012;132:2593-600.
  110. Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Löhning M, Pinschewer DD. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Science*. 2012;335:984-989.
  111. Hsu CL, Bryce PJ. Inducible IL-33 expression by mast cells is regulated by a calcium-dependent pathway. *J Immunol*. 2012;189:3421-3429.
  112. Hardman CS, Panova V, McKenzie AN. IL-33 citrine reporter mice reveal the temporal and spatial expression of IL-33 during allergic lung inflammation. *Eur J Immunol*. 2013;43:488-498.
  113. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33- activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:3451-3456.

114. Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie AN, Smith DE, Dekruyff RH, Umetsu DT. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2011;12:631-638.
115. Hsu CL, Neilsen CV, Bryce PJ. IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. *PLoS ONE.* 2010;5:e11944.
116. Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology.* 2010;130:172-180.
117. Zhao WH, Hu ZQ. Up-regulation of IL-33 expression in various types of murine cells by IL-3 and IL-4. *Cytokine.* 2012;58:267-73.
118. Zhang L, Lu R, Zhao G, Pflugfelder SC, Li DQ. TLR-mediated induction of pro-allergic cytokine IL-33 in ocular mucosal epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43:1383-91.
119. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int.* 2010;59:143-160.
120. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy.* 2012; 67:1203-1214.
121. Nakanishi W, Yamaguchi S, Matsuda A, Suzukawa M, Shibui A, Nambu A, Kondo K, Suto H, Saito H, Matsumoto K, Yamasoba T, Nakae S. IL-33, but not IL-25, is crucial for the development of house dust mite antigen-induced allergic rhinitis. *PLoS ONE.* 2013;8:e78099.
122. Yagami A., Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, Matsuda A. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells, *J Immunol.* 2010;185:5743–5750.
123. Mirchandani AS, Salmond RJ, Liew FY. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends Immunol.* 2012;33:389-396.
124. Takeda T, Unno H, Morita H, Futamura K, Emi-Sugie M, Arae K, Shoda T, Okada N, Igarashi A, Inoue E, Kitazawa H, Nakae S, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A Platelets constitutively express IL- 33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:1395-1403 e1396.
125. Iijima K, Kobayashi T, Hara K, Kephart GM, Ziegler SF, McKenzie AN, Kita H. IL-33 and thymic stromal lymphopoietin mediate immune pathology in response to chronic airborne allergen exposure. *J Immunol.* 2014;193:1549-1559.
126. Prefontaine D, Nadigel J, Chouiali F, Audusseau S, Semlali A, Chakir J, Martin JG, Hamid Q. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:752-754.
127. Byers DE, Alexander-Brett J, Patel AC, Agapov E, Dang-Vu G, Jin X, Wu K, You Y, Alevy Y, Girard JP, Stappenbeck TS, Patterson GA, Pierce RA, Brody SL, Holtzman MJ. Long-term IL-33- producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J Clin Invest.* 2013;123:3967-3982.

128. Kamekura R, Kojima T, Takano K, Go M, Sawada N, Himi T. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2012;42:218-228.
129. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana Bvan Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009;183:6469-6477.
130. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. 2017;14: 43–64.
131. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard JP. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:282-287.
132. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka Y, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules, *Am J Pathol*. 2003;163:69–79.
133. Martin MU. Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Semin Immunol*. 2013; 25:449-457.
134. Gautier V, Cayrol C, Farache D, Roga S, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Gonzalez de Peredo A, Girard JP. Extracellular IL-33 cytokine, but not endogenous nuclear IL-33, regulates protein expression in endothelial cells. *Sci Rep*. 2016;6:34255.
135. Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, Cote-Sierra J. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun*. 2014;55:33-41.
136. Hayakawa M, Hayakawa H, Matsuyama Y, Tamemoto H, Okazaki H, Tominaga S. Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387:218-222.
137. Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009;31:84-98.
138. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9021-9026.
139. Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage, *J Biol Chem*. 2009;284:19420–19426.
140. Shao D, Perros F, Caramori G, Meng C, Dormuller Chou PC, Church C, Papi A, Casolari P, Welsh D, Peacock A, Humbert M, Adcock IM, Wort SJ. Nuclear IL-33 regulates soluble ST2 receptor and IL-6 expression in primary human arterial endothelial cells and is decreased in idiopathic

- pulmonary arterial hypertension, *Biochem. Biophys Res Commun.* 2014;451:8–14.
141. Hammad H, Lambrecht BN. Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity. *Immunity.* 2015;43:29-40.
  142. Kaczmarek A, Vandenaabeele P, Krysko DV. Necroptosis the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* 2013;38:209–223.
  143. Hara K, Iijima K, Elias MK, Seno S, Tojima I, Kobayashi T, Kephart GM, Kurabayashi M, Kita H. Airway uric acid is a sensor of inhaled protease allergens and initiates type 2 immune responses in respiratory mucosa. *J Immunol.* 2014;192:4032-4042.
  144. Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, O’Grady SM, Kita H. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol.* 2011;186:4375-4387.
  145. Snelgrove RJ, Gregory LG, Peiro T, Akthar S, Campbell GA, Walker SA, Lloyd CM. *Alternaria*-derived serine protease activity drives IL-33-mediated asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:583-592 e586
  146. Doherty TA, Khorram N, Chang JE, Kim HK, Rosenthal P, Croft M, Broide DH. STAT6 regulates natural helper cell proliferation during lung inflammation initiated by *Alternaria*. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303:L577-L588.
  147. Hristova M, Habibovic A, Veith C, Janssen-Heininger YM, Dixon AE, Geiszt M, van der Vliet A. Airway epithelial dual oxidase 1 mediates allergen-induced IL-33 secretion and activation of type 2 immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:1545-1556.
  148. Kakkar R, Hei H, Dobner S, Lee RT. Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells. *J Biol Chem.* 2012;287:6941-6948.
  149. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: Inflammasome activation by alum and alum’s adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.* 2008;181:17-21.
  150. Mohapatra A, Van Dyken SJ, Schneider C, Nussbaum JC, Liang HE, Locksley RM. Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2016;9:275-286.
  151. Christianson CA, Goplen NP, Zafar I, Irvin C, Good JT Jr, Rollins DR, Gorentla B, Liu W, Gorska MM, Chu H, Martin RJ, Alam R. Persistence of asthma requires multiple feedback circuits involving type 2 innate lymphoid cells and IL-33. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:59-68 e14.
  152. Cohen ES, Scott IC, Majithiya JB, Rapley L, Kemp BP, England E, Rees DG, Overed-Sayer CL, Woods J, Bond NJ, Veyssier CS, Embrey KJ, Sims DA, Snaith MR, Vousden KA, Strain MD, Chan DT, Carmen S, Huntington CE, Flavell L, Xu J, Popovic B, Brightling CE, Vaughan TJ,

- Butler R, Lowe DC, Higazi DR, Corkill DJ, May RD, Sleeman MA, Mustelin T. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Comm*. 2015;6:8327.
153. Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett*. 1989;258:301-304.
154. Li H, Tago K, Io K, Kuroiwa K, Arai T, Iwahana H, Tominaga S, Yanagisawa K. The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA. *Genomics*. 2000; 67:284-290.
155. Yates B, Braschi B, Gray KA, Seal RL, Tweedie S, Bruford EA. Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2017. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D619-D625.
156. Tominaga S, Inazawa J, Tsuji S. Assignment of the human ST2 gene to chromosome 2 at q11.2. *Hum Genet*. 1996; 97:561-563.
157. Werenskiold AK, Hoffmann S, Klemenz R. Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1989;9:5207-5214.
158. Superti-Furga G, Bergers, Picard D, Busslinger M. Hormone-dependent transcriptional regulation and cellular transformation by Fos-steroid receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:5114-5118.
159. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J*. 1994;13:1176-1188.
160. Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol*. 1992;12:3919-3929.
161. Werenskiold AK. Characterization of a secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily inducible by mitogen and oncogene. *Eur J Biochem*. 1992;20:1041-1047.
162. Takagi T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Tetsuka T, Nagata S, Tominaga S. Identification of the product of the murine ST2 gene. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1178:194-200.
163. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett*. 1993; 318:83-87.
164. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285:1377-1383.
165. Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med*. 1998;187:787-794.
166. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, Kamradt T. T1/ST2 is preferentially



- expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6930.
167. Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, Katashima R, Itakura M, Tominaga S. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *Eur J Biochem*. 1999; 264:397-406.
  168. Gächter T, Werenskiold AK, Klemenz R. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *J Biol Chem*. 1996;271:124-129.
  169. Baba Y, Maeda K, Yashiro T, Inage E, Niyonsaba F, Hara M, Suzuki R, Ohtsuka Y, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C. Involvement of PU.1 in mast cell/basophil-specific function of the human IL1RL1/ST2 promoter. *Allergol Int*. 2012;61:461-467.
  170. Baba Y, Maeda K, Yashiro T, Inage E, Kasakura K, Suzuki R, Niyonsaba F, Hara M, Tanabe A, Ogawa H, Okumura K, Ohtsuka Y, Shimizu T, Nishiyama C. GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/ basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J. Biol. Chem*. 2012;287:32689–32696.
  171. Gächter T, Moritz DR, Gheyselinck J, Klemenz R. GATA-Dependent expression of the interleukin-1 receptor-related T1 gene in mast cells. *Mol Cell Biol*. 1998;18:5320-5331.
  172. Shimizu M, Matsuda A, Yanagisawa K, Hirota T, Akahoshi M, Inomata N, Ebe K, Tanaka K, Sugiura H, Nakashima K, Tamari M, Takahashi N, Obara K, Enomoto T, Okayama Y, Gao PS, Huang SK, Tominaga S, Ikezawa Z, Shirakawa T. Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. *Hum. Mol. Genet*. 2005;14:2919–2927.
  173. Thomassen E, Kothny G, Haas S, Danescu J, Hültner L, Dörmer P, Werenskiold AK. Role of cell type-specific promoters in the developmental regulation of T1, an interleukin 1 receptor homologue. *Cell Growth Differ*. 1995;6:179-184.
  174. Tominaga S, Yokota T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Takagi Y, Tetsuka T. Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1171:215–218.
  175. Tominaga S, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N. Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264:14–18.
  176. Iwahana H, Hayakawa M, Kuroiwa K, Tago K, Yanagisawa K, Noji S, Tominaga S. Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1681:1-14.

177. Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol*. 1998;161:4866-4874.
178. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010;463:540-544.
179. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eislely CJ, Erle DJ, Locksley RM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:11489-11494.
180. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, Liew FY. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol*. 2004;5:373-379.
181. Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:1047-1054.
182. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121:1484-1490.
183. Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*. 2009;113:1526-1534.
184. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*. 2008;20:1019-1030.
185. Withers DR. Innate lymphoid cell regulation of adaptive immunity. *Immunology*. 2016;149:123-130.
186. Peine M, Marek RM, Löhning M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol*. 2016;37:321-33.
187. Braun H, Afonina IS, Mueller C, Beyaert R. Dichotomous function of IL-33 in health and disease: From biology to clinical implications. *Biochem Pharmacol*. 2018;148:238-252.
188. Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J. 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43:2155-2169.
189. Palmer G, Lipsky BP, Smithgall MD, Meininger D, Siu S, Talabot-Ayer D, Meininger D, Siu S, Talabot-Ayer D, Gabay C, Smith DE. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. *Cytokine*. 2008;42:358-64.
190. Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. 104:18660-18665.

191. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol.* 2007;179:2551-2555.
192. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB stimulated gene transcription. *J Immunol.* 2011;187:1609-1616.
193. Tanabe T, Shimokawaji T, Kanoh S, Rubin BK. IL-33 stimulates CXCL8/IL-8 secretion in goblet cells but not normally differentiated airway cells. *Clin Exp Allergy.* 2014;44:540-552.
194. Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Ohara G, Ota K, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N. Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells. *Allergy.* 2012;67:744-750.
195. Ganesan S, Pham D, Jing Y, Farazuddin M, Hudy M, HUNger B, Comstock AT, Proud D, Lauring AS, Sajjan US. TLR2 Activation Limits Rhinovirus Stimulated CXCL-10 by Attenuating IRAK-1-Dependent IL-33 Receptor Signaling in Human Bronchial Epithelial Cells. *J Immunol.* 2016;197:2409-2420.
196. Fattori V, Borghi SM, Verri WA Jr. IL-33/ST2 signaling boosts inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E10034-E10035.
197. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:475.
198. Fagundes CT, Amaral FA, Souza AL, Vieira AT, Xu D, Liew FY, Souza DG, Teixeira MM. ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion. *J Leukoc Biol.* 2007;81:492-499.
199. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signalling system. *J Clin Invest.* 2007;117:1538-1549.
200. Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity.* 2015;42:1005-1019.
201. Martin NT, Martin MU. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol.* 2016;17:122-131
202. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:676-689.
203. Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol.* 2012;188:1503-1513.
204. Willart MA, Deswarte K, Pouliot P, Braun H, Beyaert R, Lambrecht BN, Hammad H. Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. *J Exp Med.* 2012;209:1505-1517.

205. Kondo Y, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Morimoto M, Hayashi N, Hoshino T, Fujimoto J, Nakanishi K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol*. 2008;20:791-800.
206. Hung LY, Lewkowich IP, Dawson LA, Downey J, Yang Y, Smith DE, Herbert DR. IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:282-287.
207. Kamijo S, Takeda H, Tokura T, Suzuki M, Inui K, Hara M, Matsuda H, Matsuda A, Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S, Sudo K, Suto H, Ichikawa S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2013;190:4489-4499.
208. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: Emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:647-675.
209. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol*. 2007;179:2051-2054.
210. Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, Nakae S, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol*. 2008;181:5981-5989.
211. Yang Z, Grinchuk V, Urban JF, Bohl J, Sun R, Notari L, Yan S, Ramalingam T, Keegan AD, Wynn TA, Shea-Donohue T, Zhao A. Macrophages as IL-25/IL-33-responsive cells play an important role in the induction of type 2 immunity. *PLoS ONE*. 2013;8:e59441.
212. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:184-194 e111.
213. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;311:17-58.
214. Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41:1675-1686.
215. Halim TY, Steer CA, Matha L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM, McKenzie AN, Takei F. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*. 2014;40:425-435.
216. Drake LY, Iijima K, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy*. 2014;69:1300-1307.

217. Mirchandani AS, Besnard AG, Yip E, Scott C, Bain CC, Cerovic V, Salmond RJ, Liew FY. Type 2 innate lymphoid cells drive CD4<sup>+</sup> Th2 cell responses *J Immunol*. 2014;192:2442-2448.
218. Guo L, Wei G, Zhu J, Liao W, Leonard WJ, Zhao K, Paul W. IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:13463-13468.
219. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*. 2001;2:725-731.
220. Kobayashi T, Iijima K, Checkel JL, Kita H. IL-1 family cytokines drive Th2 and Th17 cells to innocuous airborne antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49:989-998.
221. Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature*. 1999;402:B18-B23.
222. Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: Refining strategies to induce tolerance. *Nat Med*. 2012;18:736-749
223. King C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:757-766.
224. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-663.
225. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, Umetsu DT, Rudensky AY Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*. 2012;482:395-399.
226. Duan W, So T, Croft M. Antagonism of airway tolerance by endotoxin/lipopolysaccharide through promoting OX40L and suppressing antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol*. 2008;181:8650-8659.
227. Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, Mikulski Z, Khorram N, Rosenthal P, Broide DH, Croft M. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med*. 2013;210:775-788
228. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelman K, Wohlfert EA, Pott J, Griseri T, Bollrath J, Hegazy AN, Harrison OJ, Owens BM, JLöhning M, Belkaid Y, Fallon PG, Powrie F. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*. 2014;513:564-568
229. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, Fagarasan S, Mielke LA, Afshar-Sterle S, Masters SL, Nakae S, Saito H, Wentworth JM, Li P, Liao W, Leonard WJ, Smyth GK, Shi W, Nutt SL, Koyasu S, Kallies A. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2015;16:276-285.
230. Chen CC, Kobayashi T, Iijima K, Hsu FC, Kita H. IL-33 dysregulates regulatory T (Treg) cells and impairs established immunological tolerance in the lungs. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:1351-1363.

231. Molofsky AB, Van Gool F, Liang HE, Van Dyken S, JNussbaum JC, Lee J, Bluestone JA, Locksley RM. Interleukin-33 and Interferon-gamma Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity*. 2015;43:161-174.
232. Matta BM, Lott JM, Mathews LR, Liu Q, Rosborough BR, Blazar BR, Turnquist HR. IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2014;193:4010-4020.
233. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity*. 2015;43:175-186.
234. Simpson A, Tan VY, Winn J, Svensén M, Bishop CM, Heckerman DE, Buchan I, Custovic A. Beyond atopy: Multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:1200-1206.
235. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22: 789-815.
236. Endo Y, Hirahara K, Linuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou HK, Matsugae N, Obata-Ninomiya K, Yamamoto H, Motohashi S, Oboki K, Nakae S, Saito H, Okamoto Y, Nakayama T. The interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity*. 2015;42:294-308.
237. Prussin C, Lee J, Foster B. Eosinophilic gastrointestinal disease and peanut allergy are alternatively associated with IL-5+ and IL-5(-) T(H)2 responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:1326-1332 e1326.
238. Martinez-Gonzalez I, Matha L, Steer CA, Ghaedi M, Poon GF, Takei F. Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation. *Immunity*. 2016;45:198-208.
239. Dougherty RH, Sidhu SS, Raman K, Solon M, Solberg OD, Caughey GH, Woodruff PG, Fahy JV. Accumulation of intraepithelial mast cells with a unique protease phenotype in T(H)2-high asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:1046-1053 e1048.
240. Homer RJ, Elias JA. Airway remodeling in asthma: Therapeutic implications of mechanisms. *Physiology*. 2005;20:28-35.
241. Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: An overview. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:477-486; quiz 487.
242. Ramaprakash H, Shibata T, Duffy KE, Ismailoglu UB, Bredernitz RM, Moreira AP, Coelho AL, Das AM, Fursov N, Chupp GL, Hogaboam CM.

- Targeting ST2L potentiates CpG-mediated therapeutic effects in a chronic fungal asthma model. *Am J Pathol.* 2011;179:104-115.
243. Saglani S, Lui S, Ullmann N, Campbell GA, Sherburn RT, Mathie SA, Denney L, Bossley CJ, Oates T, Walker SA, Bush A, Lloyd CM. IL-33 promotes airway remodeling in pediatric patients with severe steroid-resistant asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:676-685 e613.
244. Li D, Guabiraba R, Besnard AG, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, Graham GJ, Kurowska-Stolarska M, Liew FY, McSharry C, Xu D. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:1422-1432 e1411
245. Arpaia N, Green JA, Moliterno B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, Treuting PM, Rudensky AY. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell.* 2015;162:1078-1089.
246. Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ, Benoist C, Mathis D. Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity.* 2016;44:355-367
247. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CG, Doering TA, Angelosanto JM, Laidlaw BJ, Yang CY, Sathaliyawala T, Kubota M, Turner D, Diamond JM, Goldrath AW, Farber DL, Collman RG, Wherry EJ, Artis D. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol.* 2011;12:1045-1054.
248. Yin H, Li X, Hu S, Liu T, Yuan B, Gu H, Ni Q, Zhang X, Zheng F. IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. *Mol Immunol* 2013;56:347-353
249. Lee JS, Seppanen E, Patel J, Rodero MP, Khosrotehrani K. ST2 receptor invalidation maintains wound inflammation, delays healing and increases fibrosis. *Exp Dermatol.* 2016;25:71-74.
250. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:583-594.
251. de Klerk IM, Kool M, de Bruijn MJ, Willart M, van Moorleggem J, Schuijs MJ, Plantinga M, Beyaert R, Hams E, Fallon PG, Hammad H, Hendriks RW, Lambrecht BN. Perinatal Activation of the Interleukin-33 Pathway Promotes Type 2 Immunity in the Developing Lung. *Immunity.* 2016;45:1285-1298.
252. Bonnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Møller E, Mercader JM, Belgrave D, den Dekker HT, Husby A, Sevelsted A, Faura-Tellez G, Mortensen LJ, Paternoster L, Flaaten R, Mølgaard A, Smart DE, Thomsen PF, Rasmussen MA, Bonàs-Guarch S, Holst C, Nohr EA, Yadav R, March ME, Blicher T, Lackie PM, Jaddoe VW, Simpson A, Holloway JW, Duijts L, Custovic A, Davies DE, Torrents D, Gupta R, Hollegaard MV, Hougaard DM, Hakonarson H, Bisgaard H. A genome-wide association study identifies

- CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nat Genet.* 2014;46:51-55
253. Gudbjartsson DF, Bjornsdottir US, Halapi E, Helgadottir A, Sulem P, Jonsdottir GM, Thorleifsson G, Helgadottir H, Steinthorsdottir V, Stefansson H, Williams C, Hui J, Beilby J, Warrington NM, James A, Palmer LJ, Koppelman GH, Heinzmann A, Krueger M, Boezen HM, Wheatley A, Altmuller J, Shin HD, Uh ST, Cheong HS, Jonsdottir B, Gislason D, Park CS, Rasmussen LM, Porsbjerg C, Hansen JW, Backer V, Werge TJ, Jansson C, Jönsson UB, Ng MC, Chan J, So WY, Ma R, Shah SH, Granger CB, Quyyumi AA, Levey AI, Vaccarino V, Reilly MP, Rader DJ, Williams MJ, van Rij AM, Jones GT, Trabetti E, Malerba G, Pignatti PF, Boner A, Pescollderung L, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Ludviksson BR, Ludviksdottir D, Eyjolfsson GI, Arnar D, Thorgeirsson G, Deichmann KT, Hompson PJ, Wjst M, Hall IP, Postma DS, Gislason T, Gulcher J, Kong A, Jonsdottir I, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet.* 2009;41:342-347.
254. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WOCM, GABRIEL Consortium. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010;363:1211-1221.
255. Savenije OE, Mahachie JM, Granell R, Kerkhof M, Dijk FN, de Jongste JC, Smit HA, Brunekreef B, Postma DS, Van Steen K, Henderson J, Koppelman GH. Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:170-177.
256. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, Himes BE, Levin AM, Mathias RA, Hancock DB, Baurley JW, Eng C, Stern DA, Celedón JC, Rafaels N, Capurso D, Conti DV, Roth LA, Soto-Quiros M, Togiias A, Li X, Myers RA, Romieu I, Van Den Berg DJ, Hu D, Hansel NN, Hernandez R, DIsrael E, Salam MT, Galanter J, Avila PC, Avila L, Rodriguez-Santana JR, Chapela R, Rodriguez-Cintron W, Diette GB, Adkinson NF, Abel RA, Ross KD, Shi M, Faruque MU, Dunston GM, Watson HR, Mantese VJ, Ezurum SC, Liang L, Ruczinski I, Ford JG, Huntsman S, Chung KF, Vora H, Li X, Calhoun WJ, Castro M, Sienra-Monge JJ, del Rio-Navarro B, Deichmann KA, Heinzmann A, Wenzel SE, Busse WW, Gern JE, Lemanske RF Jr, Beaty TH, Bleecker ER, Raby BA, Meyers DA, London SJ, Mexico City Childhood Asthma Study (MCAAS), Gilliland FD Children's Health Study (CHS) and HARBORS study, Burchard EG, Genetics of Asthma in Latino Americans (GALA) Study, Study of Genes-Environment and Admixture in Latino Americans (GALA2) and Study of African Americans, Asthma, Genes & Environments (SAGE), Martinez FD, Childhood Asthma Research and Education (CARE) Network Weiss ST, Childhood Asthma Management Program (CAMP), Williams LK, Study of Asthma Phenotypes



- and Pharmacogenomic Interactions by Race-Ethnicity (SAPPHIRE), Barnes KC, Genetic Research on Asthma in African Diaspora (GRAAD) Study, Ober C, Nicolae DL. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet.* 2011;43:887-892.
257. Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K, Tamari M. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy.* 2008;38:1875-1881.
258. Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: A new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:978-988.
259. Castanhinha S, Sherburn R, Walker S, Gupta A, Bossley CJ, Buckley JU, Ilmann N, Grychtol R, Campbell G, Maglione M, Koo S, Fleming L, Gregory L, Snelgrove RJ, Bush A, Lloyd CM, Saglani S. Pediatric severe asthma with fungal sensitization is mediated by steroid-resistant IL-33. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:312-322 e317.
260. Hamzaoui A, Berraies A, Kaabachi W, Haifa M, Ammar J, Kamel H. Induced sputum levels of IL-33 and soluble ST2 in young asthmatic children. *J Asthma.* 2013;50:803-809.
261. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga SI, Sugiyama Y. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:277-281.
262. Saglani S. Innate helper cells: a novel cell type essential in the initiation of asthma? *Thorax.* 2011;66:834-835.
263. Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, Fokkens WJ, Cupedo T, Spits H. Human IL-25- and IL-33- responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol.* 2011;12:1055-1062.
264. Bartemes KR, Kephart GM, Fox SJ, Kita H. Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:671-678 e674.
265. Jia Y, Fang X, Zhu X, Bai C, Zhu L, Jin M, Wang X, Hu M, Tang R, Chen Z. IL-13+ type 2 innate lymphoid cells correlate with asthma control status and treatment response. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55:675-683.
266. Liu T, Wu J, Zhao J, Wang J, Zhang Y, Liu L, Cao L, Liu Y, Dong L. Type 2 innate lymphoid cells: A novel biomarker of eosinophilic airway inflammation in patients with mild to moderate asthma. *Respir Med.* 2015;109:1391-1396.
267. Jackson DJ, Makrinioti H, Rana BM, Shamji BW, Trujillo-Torralbo MB, Footitt J, Jerico Del-RosarioTelcian AG, Nikonova A, Zhu J, Aniscenko J, Gogsadze L, Bakhsoliani E, Traub S, Dhariwal J, Porter J, Hunt D, Hunt T, Hunt T, Stanciu LA, Khaitov M, Bartlett NW, Edwards MR, Kon OM, Mallia P, Papadopoulos NG, Akdis CA, Westwick J, Edwards MJ, Cousins DJ,

- Walton RP, Johnston SL. IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbation in vivo. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190:1373-1382.
268. Doherty TA, Scott D, Walford HH, Khorram N, Lund S, Baum R, Chang J, Rosenthal P, Beppu A, Miller M, Broide DH. Allergen challenge in allergic rhinitis rapidly induces increased peripheral blood type 2 innate lymphoid cells that express CD84. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:1203-1205.
269. Lao-Araya M, Steveling E, Scadding GW, Durham SR, Shamji MH. Seasonal increases in peripheral innate lymphoid type 2 cells are inhibited by subcutaneous grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:1193-1195 e1194
270. Fan D, Wang X, Wang M, Zhang L, Li Y, Fan E, Cao F, Van Crombruggen K, Zhang L. Allergen-Dependent Differences in ILC2s Frequencies in Patients With Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2016;8:216-222.
271. Shaw JL, Fakhri S, Citardi MJ, Porter PC, Corry DB, Kheradmand F, Liu YJ, Luong A. IL-33-responsive innate lymphoid cells are an important source of IL-13 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188:432-439.
272. Liao B, Cao PP, Zeng M, Zhen Z, Wang H, Zhang YN, Hu CY, Ma J, Li ZY, Song J, Liu JX, Peng LY, Liu Y, Ning Q, Liu Z. Interaction of thymic stromal lymphopoietin, IL-33, and their receptors in epithelial cells in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy.* 2015;70:1169-1180.
273. Lam M, Hull L, Imrie A, Snidvongs K, Chin D, Pratt E, Kalish L, Sacks R, Earls P, Sewell W, Harvey RJ. Interleukin-25 and interleukin-33 as mediators of eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2015;29:175-181.
274. Kim DK, Jin HR, Eun KM, Mo JH, Cho SH, Oh S, Cho D, Kim DW. The role of interleukin-33 in chronic rhinosinusitis. *Thorax.* 2017;72:635-645.
275. Ho J, Bailey M, Zaunders J, Mrad N, Sacks R, Sewell W, Harvey RJ. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clin Exp Allergy.* 2015;45:394-403.
276. Walford HH, Lund SJ, Baum RE, White AA, Bergeron CM, Husseman J, Bethel KJ, Scott DR, Khorram N, Miller M, Broide DH, Doherty TA. Increased ILC2s in the eosinophilic nasal polyp endotype are associated with corticosteroid responsiveness. *Clin Immunol.* 2014;155:126-135.
277. Xia J, Zhao J, Shang J, Li M, Zeng Z, Zhao J, Wang J, Xu Y, Xie J. Increased IL-33 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308:619-627.
278. Shang J, Zhao J, Wu X, Xu Y, Xie J, Zhao J. Interleukin-33 promotes inflammatory cytokine production in chronic airway inflammation. *Biochem Cell Biol.* 2015;93:359-366.

279. Qiu C, Li Y, Li M, Li M, Liu X, McSharry C, Xu D. Anti-interleukin-33 inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *Immunology*. 2013;138:76-82.
280. Wu H, Yang S, Wu X, Zhao J, Zhao J, Ning Q, Xu Y, Xie J. Interleukin-33/ST2 signaling promotes production of interleukin-6 and interleukin-8 in systemic inflammation in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450:110-116.
281. Tang Y, Guan Y, Liu Y, Sun J, Xu L, Jiang Y. The role of the serum IL-33/sST2 axis and inflammatory cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *J Interferon Cytokine Res*. 2014;34:162-168.
282. Barnes PJ. Therapeutic approaches to asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:531-545.
283. Borthwick LA. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. *Semin Immunopathol*. 2016;38: 517–534.
284. Gao Q, Li Y, Li M. The potential role of IL-33/ST2 signaling in fibrotic diseases. *J Leukoc Biol*. 2015; 98:15-22.
285. Luzina IG, Pickering EM, Kopach P, Kang PH, Lockett V, Todd NW, Papadimitriou JC, McKenzie AN, Atamas SP. Full-length IL-33 promotes inflammation but not Th2 response in vivo in an ST2-independent fashion. *J Immunol*. 2012;189:403-410.
286. Luzina IG, Kopach P, Lockett V, Kang PH, Nagarsekar A, Burke AP, Hasday JD, Todd NW, Atamas SP. Interleukin-33 potentiates bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49:999-1008.
287. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, Guiducci S, Milia AF, Benelli G, Marrelli A, Conforti ML, Romano E, Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P. The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:598-605.
288. Lee JU, Chang HS, Lee HJ, Jung CA, Bae DJ, Song HJ, Park JS, Uh ST, Kim YH, Seo KH, Park CS. Upregulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin levels in the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2017;17:39.
289. Tajima S, Oshikawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2003;124:1206–1214
290. Tajima S, Bando M, Ohno S, Sugiyama Y, Oshikawa K, Tominaga S, Itoh K, Takada T, Suzuki E, Gejyo F. ST2 gene induced by type 2 helper T cell (Th2) and proinflammatory cytokine stimuli may modulate lung injury and fibrosis. *Exp. Lung Res*. 2007;33:81–97.
291. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure:

- prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 1997;96:509-516.
292. Gao Q, Li Y, Pan X, Yuan X, Peng X, Li M. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. Lentivirus expressing soluble ST2 alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2016;30:188-193.
293. Gao Q, Li Y, Pan X, Yuan X, Peng X, Li M. Lentivirus expressing soluble ST2 alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2016;30:188-193.
294. Le Goffic R, Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Delmas B, Piquet-Pellorce C, Samson M. Infection with influenza virus induces IL-33 in murine lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:1125–1132.
295. Heyen L, Müller U, Siegemund S, Schulze B, Protschka M, Alber G, Piehler D. Lung epithelium is the major source of IL-33 and is regulated by IL-33-dependent and IL-33-independent mechanisms in pulmonary cryptococcosis. *Pathog Dis*. 2016;74:pii:ftw086.
296. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010;16:708-712.
297. Wang C, Chen Z, Bu X, Han Y, Shan S, Ren T, Song W. IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479:461-468.
298. Kim MS, Kim E, Heo JS, Bae DJ, Lee JU, Lee TH, Lee HJ, Chang HS, Park JS, Jang AS, Koh ES, Hwang HG, Lim G, Kim S, Park CS. Circulating IL-33 level is associated with the progression of lung cancer. *Lung Cancer*. 2015;90:346-351.
299. Wang K, Shan S, Yang Z, Gu X, Wang Y, Wang C, Ren T. IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model. *Oncotarget*. 2017;8:68571-68582.
300. Qin L, Dominguez D, Chen S, Fan J, Long A, Zhang M, Fang D, Zhang Y, Kuzel TM, Zhang B. Exogenous IL-33 overcomes T cell tolerance in murine acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016; 7:61069-61080.
301. Gao K, Li X, Zhang L, Bai L, Dong W, Gao K, Shi G, Xia X, Wu L, Zhang L. Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett*. 2013;335:463-471.
302. Gao X, Wang X, Yang Q, Zhao X, Wen W, Li G, Lu J, Qin W, Qi Y, Xie F, Jiang J, Wu C, Zhang X, Chen X, Turnquist H, Zhu Y, Lu B. Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8+ T and NK cells. *J Immunol*. 2015;194:438-445.

303. Jovanovic IP1, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014;134:1669-1682.
304. Lee KS, Kim HR, Kwak S, Choi KH, Cho JH, Lee YJ, Lee MK, Lee JH, Park SD, Park DS. Association between elevated pleural interleukin-33 levels and tuberculous pleurisy. *Ann Lab Med*. 2013;33:45-51.
305. Li D, Shen Y, Fu X, Li M, Wang T, Wen F. Combined detections of interleukin-33 and adenosine deaminase for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:888-893.
306. Xuan WX, Zhang JC, Zhou Q, Yang WB, Ma LJ. IL-33 levels differentiate tuberculous pleurisy from malignant pleural effusions. *Oncol Lett*. 2014;8:449-453.
307. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, Gombert JM, Schneider E, Dy M, Gourdy P, Girard JP, Herbelin A. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol*. 2009;39:1046-1055.
308. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*. 2008;20:1019–1030.
309. Oshikawa K, Shi F, Rakhmievich AL, Sondel PM, Mahvi DM, Yang NS. Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1beta converting enzyme cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:13351-6.
310. Sneller MC. Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *Cleve Clin J Med*. 2002;69:SII40–SII43.
311. Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, Brenner MB, Behar SM. Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000239.
312. Schierloh P, Yokobori N, Aleman M, Landoni V, Geffner L, Musella RM, Castagnino J, Baldini M, Abbate E, de la Barrera SS, Sasiain MC. *Mycobacterium tuberculosis*-induced gamma interferon production by natural killer cells requires cross talk with antigen-presenting cells involving Toll-like receptors 2 and 4 and the mannose receptor in tuberculous pleurisy. *Infect Immun*. 2007;75:5325–5337.
313. Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hieny S, Young HA, Wynn TA, Sher A. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2006;177:7086–7093.

314. Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today*. 1999;20:307–312.
315. Pasquinelli V, Townsend JC, Jurado JO, Alvarez IB, Quiroga MF, Barnes PF, Samten B, García VE. IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis*. 2009;199:661–665.
316. Asano M, Nakane A, Minagawa T. Endogenous gamma interferon is essential in granuloma formation induced by glycolipid-containing mycolic acid in mice. *Infect Immun*. 1993;61:2872–2878.
317. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:294–309.
318. Zeng N, Wan C, Qin J, Wu Y, Yang T, Shen Y, Wen F, Chen L. Diagnostic value of interleukins for tuberculous pleural effusion: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med*. 2017;17:180.
319. Kwon BI, Hong S, Shin K, Choi EH, Hwang JJ, Lee SH. Innate type 2 immunity is associated with eosinophilic pleural effusion in primary spontaneous pneumothorax. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:577–585.
320. Murphy J, Summer R, Wilson AA, Kotton DN, Fine A. The prolonged life-span of alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38:380–385.
321. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 2011;332:1284–1288.
322. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, García-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38:792–804.
323. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*. 2013;342:1242974.
324. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011;332:243–247.
325. Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, Palmiter RD, Chawla A. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*. 2014;157:1292–1308.
326. Goh YP, Henderson NC, Heredia JE, Red Eagle A, Odegaard JI, Lehwald N, Nguyen KD, Sheppard D, Mukundan L, Locksley RM, Chawla A. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:9914–9919.

327. Zaiss MM, Kurowska-Stolarska M, Bohm C, Gary R, Scholtysek C, Stolarski B, Reilly J, Kerr S, Millar NL, Kamradt T, McInnes IB, Fallon PG, David J, PLiew FY, Schett G. IL-33 shifts the balance from osteoclast to alternatively activated macrophage differentiation and protects from TNF-alpha-mediated bone loss. *J Immunol.* 2011;186: 6097–6105.
328. Jackson-Jones LH, Rückerl D, Svedberg F, Duncan S, Maizels RM, Sutherland TE, Jenkins SJ, McSorley HJ, Bénézech C, MacDonald AS, Allen JE. IL-33 delivery induces serous cavity macrophage proliferation independent of interleukin-4 receptor alpha. *Eur J Immunol.* 2016;46:2311–2321.
329. Komai-Koma M, Gilchrist DS, McKenzie AN, Goodyear CS, Xu D, Liew FY. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J Immunol.* 2011;186:2584-2591.
330. Jackson-Jones LH, Duncan SM, Magalhaes MS, Campbell SM, Maizels RM, McSorley HJ, Allen JE, Bénézech C. Fat-associated lymphoid clusters control local IgM secretion during pleural infection and lung inflammation. *Nat Commun.* 2016;7:12651.
331. Oshikawa K, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga S, Sugiyama Y. Expression of ST2 in helper T lymphocytes of malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1005-1009.
332. Okamoto M, Hasegawa Y, Hara T, Hashimoto N, Imaizumi K, Shimokata K, Kawabe T. T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions. *Chest.* 2005;128:4030-4035.
333. Gillibert-Duplantier J, Duthey B, Sisirak V, Salaün D, Gargi T, Trédan O, Finetti P, Bertucci F, Birnbaum D, Bendriss-Vermare N, Badache A. Gene expression profiling identifies sST2 as an effector of ErbB2-driven breast carcinoma cell motility, associated with metastasis. *Oncogene.* 2012;31:3516-3524.
334. Rehman SU, Mueller T, Januzzi JL Jr. Characteristics of the novel interleukin family biomarker ST2 in patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1458 –1465.
335. Porcel JM, Martínez-Alonso M, Cao G, Bielsa S, Sopena A, Esquerda A. Biomarkers of heart failure in pleural fluid. *Chest.* 2009;136:671-677.
336. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *European Journal of Biochemistry.* *Eur J Biochem.* 1973;38:14-19.
337. Goodwin GH, Johns EW. Are the high mobility group non-histone chromosomal proteins associated with 'active' chromatin? *Biochim Biophys Acta.* 1978;519:279-84.
338. Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1799:101–113.

339. Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim. Biophys Acta*. 2010;799:149–156.
340. Ronfani L, Ferraguti M, Croci L, Ovitt CE, Schöler HR, Consalez GG, Bianchi ME. Reduced fertility and spermatogenesis defects in mice lacking chromosomal protein HMGB2. *Development*. 2001;128:1265–1273.
341. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol*. 1999;19:5237–5246.
342. Vaccari T, Beltrame M, Ferrari S, Bianchi ME. HMG4, a new member of the Hmg1/2 gene family. *Genomics*. 1998;49:247–252.
343. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999;285:248–251
344. Baker C, Isenberg I, Goodwin GH, Johns EW. Physical studies of the nonhistone chromosomal proteins HMG-U and HMG-2. *Biochemistry*. 1976;15:1645–1649.
345. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is a cellular-binding site for amphoterin—mediation of neurite outgrowth and coexpression of rage and amphoterin in the developing nervous-system. *J Biol Chem*. 1995;270:25752–25761.
346. Rauvala H, Pihlaskari R. Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons. *J Biol Chem*. 1987;262:16625–16635.
347. Bianchi ME, Beltrame M, Paonessa G. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science*. 1989;243:1056–1059.
348. Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth: amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem*. 1991;266:16722–16729.
349. Rauvala H, Rouhiainen A. Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799:164–170.
350. Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001;26,52–153.
351. Romani M, Rodman TC, Vidali G, Bustin M. Serological analysis of species specificity in the high mobility group chromosomal proteins. *J Biol Chem*. 1979;254:2918-2922.
352. Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianchi ME: New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *Embo J*. 2001;20:4337-4340.



353. Andersson U, Tracey K J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29:139–162.
354. Yanai H, Ban T, Taniguchi T. Essential role of high-mobility group box proteins in nucleic acid-mediated innate immune responses. *J Intern Med.* 2011;270:301–308.
355. Lange SS, Vasquez KM. HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol Carcinog.* 2009;48:571–580.
356. Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15:496–506.
357. Gerlitz G, Hock R, Ueda T, Bustin M. The dynamics of HMG protein-chromatin interactions in living cells. *Biochem Cell Biol.* 2009;87:127–137.
358. Celona B, Weiner A, Di Felice F, Mancuso FM, Cesarini E, Rossi RL, Gregory L, Baban D, Rossetti G, Grianti P, Pagani M, Bonaldi TR, Agoussis J, Friedman N, Camilloni G, Bianchi ME, Agresti A. Substantial histone reduction modulates genomewide nucleosomal occupancy and global transcriptional output. *PLoS Biol.* 2011;9:e1001086.
359. Lange SS, Mitchell DL, Vasquez KM. High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:10320–10325.
360. Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.* 2007; 17:72–79.
361. Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundbäck P, Valdes-Ferrer SI, Olofsson PS, Kalb T, Roth J, Zou Y, Erlandsson-Harris H, Yang H, Ting JP, Wang H, Andersson U, Antoine DJ, Chavan SS, Hotamisligil GS, Tracey KJ. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature.* 2012; 488:670–674.
362. Ugrinova I, Pasheva E. HMGB1 Protein: A Therapeutic Target Inside and Outside the Cell. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017;107:37–76.
363. Chen YC, Statt S, Wu R, Chang HT, Liao JW, Wang CN, Shyu WC, Lee CC. High mobility group box 1-induced epithelial mesenchymal transition in human airway epithelial cells. *Sci Rep.* 2016; 6:18815.
364. Liu P, Liu WL, Chang JM, Chen YH, Liu YP, Kuo HF, Hsieh CC, Ding YS, Chen WW, Chong IW. MicroRNA-200c inhibits epithelial-mesenchymal transition, invasion, and migration of lung cancer by targeting HMGB1. *PLoS One.* 2017;12:e0180844.
365. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2013;93:865–873.
366. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, Hoppe G, Bianchi ME, Tracey KJ, Zeh HJ 3rd, Lotze MT. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* 2010;190:881–892.
367. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi MB, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* 2002;3:995–1001.

368. Rouhiainen A, Imai S, Rauvala H, Parkkinen J. Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation. *Thromb Haemost.* 2000;84:1087–1094.
369. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, Melloni E, Presta M. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol.* 2006;176:12–15.
370. Zetterström CK., Bergman T, Rynnel-Dagöö B, Erlandsson-Harris H, Soder O, Andersson U, Boman HG. High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid. *Pediatr Res.* 2002;52:148–154.
371. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, Liu J, Antonelli A, Preti A, Raeli L, Shams SS, Yang H, Varani L, Andersson U, Tracey KJ, Bachi A, Uguccioni M, Bianchi ME. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or pro-inflammatory cytokine release. *J Exp Med.* 2012;209:1519–1528.
372. Venereau E, Schiraldi M, Uguccioni M, Bianchi ME. HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation. *Mol Immunol.* 2013;55:76-82.
373. Yang H, Lundbäck P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Bianchi ME, Venereau E, Al-Abed Y, Andersson U, Tracey KJ, Antoine DJ. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of HMGB1. *Mol Med.* 2012;18:250–259.
374. Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays.* 1993;15:539-546.
375. Tang D, Billiar TR, Lotze MT. A Janus tale of two active high mobility group box 1 (HMGB1) redox states. *Mol Med.* 2012;18:1360-1362.
376. Gerö D, Szoleczky P, Módis K, Pribis JP, Al-Abed Y, Yang H, Chevan S, Billiar TR, Tracey KJ, Szabo C. Identification of pharmacological modulators of HMGB1-induced inflammatory response by cell-based screening. *PLoS One.* 2013;8:e65994.
377. Tang D, Kang R, Zeh HJ, III, Lotze MT. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:1315–1335.
378. Tang D, Kang R, Cheh CW, Livesey KM, Liang X, Schapiro NE, Benschop R., Sparvero LJ, Amoscato AA, Tracey KJ, Zeh HJ, Lotze MT. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene.* 2010;29:5299–5310.
379. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 2007;28:429-436.
380. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 2003;22:5551-5560.

381. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:195-202.
382. Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Huston JM, Miller E, Lin X, Sherry B, Kumar A, Larosa G, Newman W, Tracey KJ, Yang H. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*. 2006; 203:1637-1642.
383. Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291:C1318-25.
384. Fages C, Nolo R, Huttunen HJ, Eskelinen E, Rauvala H. Regulation of cell migration by amphoterin. *J Cell Sci*. 2000;113:611-620.
385. Parkkinen J, Raulo E, Merenmies J, Nolo R, Kajander EO, Baumann M, Rauvala H. Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides: enhanced expression in transformed cells, leading edge localization and interactions with plasminogen activation. *J Biol Chem*. 1993;268:19726–19738.
386. Junying Ding, Xuran Cui, Qingquan Liu. Emerging role of HMGB1 in lung diseases: friend or foe. *J Cell Mol Med*. 2017; 21:1046–1057.
387. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP, McGill MR, Sharpe MR, Craig DG, Simpson KJ, Jaeschke H, Park BK. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *J Hepatol*. 2012;56:1070-1079.
388. Weber DJ, Allette YM, Wilkes DS, White FA. The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:1316-1328.
389. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem*. 2007;282:16336–16344.
390. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *EMBO J*. 2001;30:4701–4711.
391. Tang D, Kang R, Livesey KM, Zeh HJ 3<sup>rd</sup>, Lotze MT. High mobility group box 1 (HMGB1) activates an autophagic response to oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal*. 2011;15:2185–2189.
392. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6:463-477.
393. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*. 2000;38:31-40.
394. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol*. 2001;9:113-114.

395. Fink SL, Cookson BT. "Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages". *Cell Microbiol.* 2006;8:1812–1825.
396. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, Hunt PW, Hatano H, Sowinski S, Muñoz-Arias I, Greene WC. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature.* 2014;505:509-514.
397. Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host Microbe.* 2016;19:280-291
398. Kepp O, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Pyroptosis - a cell death modality of its kind? *Eur J Immunol.* 2010;40:627-630.
399. Chen Q, Jin Y, Zhang K, Li H, Chen W, Meng G, Fang X. Alarmin HNP-1 promotes pyroptosis and IL-1beta release through different roles of NLRP3 inflammasome via P2X7 in LPS-primed macrophages. *Innate Immun.* 2014;20:290-300.
400. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu J, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang Y, Bertram EM, Goodnow CC, Dixit VM. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature.* 2015;526:666-671.
401. Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, Brickey WJ, Huang MT, Taxman DJ, Duncan JA, Ting JP. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J Immunol.* 2009;183:2008-2015.
402. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, Tracey KJ, Kanneganti TD, Dixit VM. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol.* 2010;185:4385-4392.
403. Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol.* 2006;177:7889–7897.
404. Ditsworth D, Zong WX, Thompson CB. Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J Biol Chem.* 2007; 282:17845–17854.
405. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol.* 2007;8:487-496.
406. Tang D, Lotze MT. Tumor immunity times out: TIM-3 and HMGB1. *Nat Immunol.* 2012;13:808-810.
407. Gunasekaran MK, Virama-Latchoumy AL, Girard AC, Planesse C, Guérin-Dubourg A, Ottosson L, Andersson U, Césari M, Roche R, Hoareau L.

- TLR4-dependant pro-inflammatory effects of HMGB1 on human adipocyte. *Adipocyte*. 2016;5:384-388.
408. Wong SLI, To J, Santos J, Allam VSRR, Dalton JP, Djordjevic SP, Donnelly S, Padula MP, Sukkar MB. Proteomic analysis of extracellular HMGB1 identifies binding partners and exposes its potential role in airway epithelial cell homeostasis. *J Proteome Res*. 2018;17:33-45
409. Martinotti S, Patrone M, Ranzato E. Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer. *Immunotargets Ther*. 2015;4:101-109.
410. He SJ, Cheng J, Feng X, Yu Y, Tian L, Huang Q. The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer. *Oncotarget*. 2017;8:64534-64550.
411. Bajwa EK, Mebazaa A, Januzzi JL. ST2 in Pulmonary Disease. *Am J Cardiol*. 2015;115:44B-7B.
412. Neepner M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992;267:14998-5004.
413. Furth A. Glycated proteins in diabetes. *Br J Biomed Sci*. 1997;54:192-200.
414. McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;91:2470-2478.
415. Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty HHurley W, Clauss M. Isolation and characterization of 2 binding-proteins for advanced glycosylation end-products from bovine lung which are present on the endothelial-cell surface. *J Biol Chem* 267:14987-14997.
416. Chuyen NV. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs *Mol Nutr Food Res*. 2006;50:1140-1149.
417. Sebekova K, Somoza V. Dietary advanced glycation endproducts (AGEs) and their health effects--PRO *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51:1079-1084.
418. Ramasamy R, Shekhtman A, Schmidt AM. The Multiple Faces of RAGE - Opportunities for Therapeutic Intervention in Aging and Chronic Disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2016;20:431-446.
419. Yamamoto Y, Yamamoto H. Controlling the receptor for advanced glycation end-products to conquer diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig*. 2012;3:107-114.
420. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Tumova S, Rauvala H. RAGE-mediated cell signaling. *Methods Mol Biol*. 2013;963:239-63.
421. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern

- DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001;50:2792–2808.
422. Hudson BI, Lippman ME. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annu Rev Med*. 2017; Epub ahead of print.
423. Sessa L. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). *PLoS One*. 2014;9:e86903.
424. Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. Three genes in the human MHC class-III region near the junction with the class-II—gene for receptor of advanced glycosylation end-products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary-tumor gene int-3. *Genomics*. 1994;23:408–419.
425. Degani G, Altomare AA, Colzani M, Martino C, Mazzolari A, Fritz G, Vistoli G, Popolo L, Aldini G. A capture method based on the VC1 domain reveals new binding properties of the human receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Redox Biol*. 2017;11:275-285.
426. Yatime L, Betzer C, Jensen RK, Mortensen S, Jensen PH, Andersen GR. The Structure of the RAGE:S100A6 Complex Reveals a Unique Mode of Homodimerization for S100 Proteins. *Structure*. 2016;24:2043-2052.
427. Jules J, Maignel D, Hudson BI. Alternative splicing of the RAGE cytoplasmic domain regulates cell signaling and function. *PLoS One*. 2013;8:e78267.
428. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, Grant PJ, Schmidt AM. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*. 2008;22: 1572–1580.
429. Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ, mFritz G. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure*. 2010;18:1342–1352.
430. Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CW, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry*. 2007; 46:6957–6970.
431. Matsumoto S, Yoshida T, Murata H, Harada S, Fujita N, Nakamura S, Yamamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto HO, hkubo T, Kobayashi Y. Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: new insight into AGE-RAGE interaction. *Biochemistry*. 2008;47:12299–12311.
432. Park H, Adsit FG, Boyington JC. The 1.5 angstrom crystal structure of human receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ectodomains reveals unique features determining ligand binding (vol 285, pg 40762, 2010). *J Biol Chem*, 2011;286:19178–19178.

433. Sárkány Z, Ikonen TP, Ferreira-da-Silva F, Saraiva MJ, Svergun D, Damas AM. Solution structure of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *J Biol Chem*. 2011;286:37525–37534.
434. Xie JJ, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem*. 2008;283:27255–27269.
435. Xue J, Rai V, Singer D, Chabierski S, Xie J, Reverdatto S, Burz DS, Schmidt AM, Hoffmann R, Shekhtman A. Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs. *Structure*. 2011;19:722–732.
436. Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci*. 2011;36:625–632.
437. Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW, Heizmann CW. Crosstalk between calcium, amyloid beta and the receptor for advanced glycation endproducts in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2009;20:95–110
438. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging *Biochem Pharmacol*. 2010;79:1379-1386.
439. Malherbe P, Richards JG, Gaillard H, Thompson A, Diener C, Schuler A, Huber G. cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells coexpressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein *Brain Res Mol Brain Res*. 1999; 71:159-170.
440. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury *Biochem J*. 2003;370:1097-1109.
441. Schlueter C, Hauke S, Flohr AM, Rogalla P, Bullerdiek J. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? *Biochim Biophys Acta*. 2003;1630:1-6.
442. Park IH, Yeon SI, Youn JH, Choi JE, Sasaki N, Choi IH, Shin JS. Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells *Mol Immunol*. 2004;40:1203-1211.
443. Chuah YK, Basir R, Talib H, Tie TH, Nordin N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int J Inflam*. 2013;2013:403460.
444. Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, Heizmann CW, Kroneck PMH, Fritzet G. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J*. 2007;26:3868–3878.
445. Xue J, Manigrasso M, Scalabrin M, Rai V, Reverdatto S, Burz DS, Fabris D, Schmidt AM, Shekhtman A. Change in the Molecular Dimension of

- a RAGE-Ligand Complex Triggers RAGE Signaling. *Structure*. 2016;24:1509-1522.
446. Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2008;283:35507–35516.
447. Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H, Freeze. N-glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphoterin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem*. 2002;80:998–1008.
448. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, Nguyen MO, Isson A, Nawroth PP, Bierhaus A, Varki N, Kronenberg M, Freeze HH, Srikrishna G. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis* 29:2035–2043.
449. Yamaguchi K, Iwamoto H, Sakamoto S, Horimasu Y, Masuda T, Miyamoto S, Nakashima T, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Hattori N. *AGER* rs2070600 polymorphism elevates neutrophil-lymphocyte ratio and mortality in metastatic lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8:94382-94392.
450. Yamaguchi K, Iwamoto H, Horimasu Y, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Mazur W, Kohno N, Hattori N. *AGER* gene polymorphisms and soluble receptor for advanced glycation end product in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2017;22:965-971.
451. Li JF, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 1997;272:16498–16506.
452. Ahmad S, Akhter F, Shahab U, Rafi Z, Khan MS, Nabi R, Khan MS, Ahmad K, Ashraf JM, Moinuddin. Do all roads lead to the Rome? The glycation perspective. *Semin Cancer Biol*. 2017;pii:S1044-579X(17)30089-5.
453. Pichiule P, Chavez JC, Schmidt AM Vannucci SJ. Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. *J Biol Chem*. 2007;282:36330–36340.
454. Tohgi H, Utsugisawa K, Nagane Y, Yoshimura M, Ukitsu M, Genda Y. Decrease with age in methylcytosines in the promoter region of receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene in autopsy human cortex. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;65:124–128.
455. Caballero JJ, Girón MD, Vargas AM, Sevillano N, Suárez MD, Salto R. AU-rich elements in the mRNA 3' -untranslated region of the rat receptor for advanced glycation end products and their relevance to mRNA stability. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319:247–255.
456. Ohe K, Watanabe T, Harada S, Munesue S, Yamamoto Y, Yonekura H, Yamamoto H. Regulation of alternative splicing of the receptor for



- advanced glycation endproducts (RAGE) through G-rich cis-elements and heterogenous nuclear ribonucleoprotein H. *J Biochem.* 2010;147:651–659.
457. Khoo CP, Roubelakis MG, Schrader JB, Tsaknakis G, Konietzny R, Kessler B, Harris AL, Watt SM. miR-193a-3p interaction with HMGB1 downregulates human endothelial cell proliferation and migration. *Sci Rep.* 2017;7:44137.
458. Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt T, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W, Lu Y, Lee L, Stern DM, Naka Y, Ramasamy R, Yan SD, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM. Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders *Arch Biochem Biophys.* 2003; 419:80-88.
459. Sun-Ho Han, Yoon Hee Kim, Inhee Mook-Jung. RAGE: The Beneficial and Deleterious Effects by Diverse Mechanisms of Actions. *Mol Cells.* 2011;31: 91–97.
460. Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* 2006;323:475–488.
461. Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przywiecki C, Shaw AL. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* 1993;143:1699-1712.
462. Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, Imuta H, Fujiwara M, Kanma H, Yamashita K. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:512-516.
463. Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, Tobolewski JM, Tan RJ, Fattman CL, Ramsgaard L, Richards TJ, Loutaev I, Nawroth PP, Kasper M, Bierhaus A, Oury TD. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2008;172:583-591.
464. Hanford LE, Fattman CL, Shaefer LM, Enghild JJ, Valnickova Z, Oury TD. Regulation of receptor for advanced glycation end products during bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:S77-81.
465. Gefter JV, Shaufel AL, Fink MP, Delude RL. Comparison of distinct protein isoforms of the receptor for advanced glycation end-products expressed in murine tissues and cell lines. *Cell Tissue Res.* 2009;337:79-89.
466. Kalea AZ, Reiniger N, Yang H, Arriero M, Schmidt AM, Hudson BI. Alternative splicing of the murine receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene. *FASEB J.* 2009;23:1766-1774.
467. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of molecular medicine.* 2005;83:876-86.

468. Oczypok EA, Perkins TN, Oury TD. All the "RAGE" in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses. *Paediatr Respir Rev.* 2017;23:40-49.
469. Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Shearman MS, Schuh D, Muller M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1998;44:1147-1157.
470. Dahlin K, Mager EM, Allen L, Tighe Z, Goodglick L, Wadehra M, Dobbs L. Identification of genes differentially expressed in rat alveolar type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:309-316.
471. Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, Ohno H, Iida J, Makita K, Hata Y. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms.* 2004;9:165-174.
472. Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, Kojima K, Hata Y, Makita K, Mednick G, Matthay ZA, Matthay MA. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:1008-1015.
473. Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, Imuta H, Fujiwara M, Kanma H, Yamashita K. Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:512-516.
474. Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, Thibaudeau O, Grandsaigne M, Maret M, Dombret MC, Sims GP, Kolbeck R, Coyle AJ, Aubier M, Pretolani M. Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:917-27.
475. Dombret MC, Sims GP, Kolbeck R, Coyle AJ, Aubier M, Pretolani M. products in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:917-927.
476. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, Arnold B, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 2005;174:7506-7515.
477. Curran CS, Bertics PJ. Human eosinophils express RAGE, produce RAGE ligands, exhibit PKC-delta phosphorylation and enhanced viability in response to the RAGE ligand, S100B. *International immunology.* 2011;23:713-728.
478. Chen Y, Yan SS, Colgan J, Zhang HP, Luban J, Schmidt AM, Stern D, Herold KC. Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 2004;173:1399-1405.

479. Chen Y, Akirav EM, Chen W, Henegariu O, Moser B, Desai D, Shen JM, Webster JC, Andrews RC, Mjalli AM, Rothlein R, Schmidt AM, Clynes R, Herold KC. RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol*. 2008;181:4272-4278.
480. Moser B, Desai DD, Downie MP, Chen Y, Yan SF, Herold K, Schmidt AM, Clynes R. Receptor for advanced glycation end products expression on T cells contributes to antigen-specific cellular expansion in vivo. *J Immunol*. 2007;179:8051-8058.
481. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, Herold KC. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS One*. 2012;7:e34698.
482. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001;108:949-955.
483. Tóbon-Velasco JC, Cuevas E, Torres-Ramos MA. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF- $\kappa$ B pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13:1615-1626.
484. Banevicius M, Vilkeviciute A, Kriauciuniene L, Liutkeviciene R, Deltuva VP. The Association Between Variants of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Gene Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration. *Med Sci Monit*. 2018;24:190-199.
485. Enokido Y, Yoshitake A, Ito H, Okazawa H. Age-dependent change of HMGB1 and DNA double-strand break accumulation in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376:128-33.
486. Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res*. 2002;62:4805-4811.
487. Ishihara K, Tsutsumi K, Kawane S, Nakajima M, Kasaoka T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. *FEBS Lett*. 2003;550:107-113.
488. Banerjee S, Friggeri A, Liu G, Abraham E. The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis. *J Leukoc Biol*. 2010;88:973-979.
489. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Meta* 2001;280:E685-E694.
490. Peng Y, Kim JM, Park HS, Yang A, Islam C, Lakatta EG, Lin L. AGE-RAGE signal generates a specific NF- $\kappa$ B RelA "barcode" that directs collagen I expression. *Sci Rep*. 2016;6:18822.
491. Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, Harja E, Boulanger E, D'Agati V, Schmidt AM. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with

- diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*. 2008;283:34457-34468.
492. Han SH, Kim YH, Mook-Jung. RAGE: The Beneficial and Deleterious Effects by Diverse Mechanisms of Actions. *Mol Cells*. 2011;31:91-97.
493. Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated 26 protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem*. 1997;272:17810-17814.
494. Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem*. 1999;274:19919-19924.
495. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001;50:1495-1504.
496. Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, Backus C, Sastry AM, Lastoskie C, Feldman EL. Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology*. 2007;148:548-558.
497. Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2001;81:102-113.
498. Chen H, Liu W, Wu X, Gou M, Shen J, Wang H. Advanced glycation end products induced IL-6 and VEGF-A production and apoptosis in osteocyte-like MLO-Y4 cells by activating RAGE and ERK1/2, P38 and STAT3 signalling pathways. *Int Immunopharmacol*. 2017;52:143-149.
499. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994;269:9889-9897.
500. Basta G, Lazzerini G, Del Turco S, Ratto GM, Schmidt AM, De Caterina R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1401-1407.
501. Schmidt AM, Stern DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:368-375.
502. Tancharoen S, Gando S, Binita S, Nagasato T, Kikuchi K, Nawa Y, Dararat P, Yamamoto M, Narkpinit S, Maruyama I. HMGB1 Promotes Intraoral Palatal Wound Healing through RAGE-Dependent Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2016;17:pii: E1961.

503. Leavy O. Cell migration: HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:232
504. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrad R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products *J Clin Invest.* 1993;91:2155-2168.
505. Hoshina T, Kusuhara K, Ikeda K, Mizuno Y, Saito M, Hara T. High mobility group box 1 (HMGB1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Kawasaki disease. *Scand J Rheumatol.* 2008;37:445-449.
506. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepäntalo M, Carpén O, Parkkinen J, Rauvala H. Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). *Blood.* 2004;10:1174-1182.
507. Schiraldi M, Raucci A, Muñoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, Apuzzo T, De Marchis F, Pedotti M, Bachi A, Thelen M, Varani L, Mellado M, Proudfoot A, Bianchi ME, Uguccioni M. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med.* 2012;209:551-563.
508. Yang J, Chen L, Ding J, Fan Z, Li S, Wu H, Zhang J, Yang C, Wang H, Zeng P, Yang J. MicroRNA-24 inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting HMGB1. *Gene.* 2016;586:268-273.
509. Wang HL, Peng LP, Chen WJ, Tang SH, Sun BZ, Wang CL, Huang R, Xu ZJ, Lei WF. HMGB1 enhances smooth muscle cell proliferation and migration in pulmonary artery remodeling. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:3836-3844.
510. Liu Y, Hu X, Xia D, Zhang S. MicroRNA-181b is downregulated in non-small cell lung cancer and inhibits cell motility by directly targeting HMGB1. *Oncol Lett.* 2016;12:4181-4186.
511. Chung HW, Lim JB, Jang S, Lee KJ, Park KH, Song SY. Serum high mobility group box-1 is a powerful diagnostic and prognostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2012;103:1714-1721.
512. Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol* 2003;94:55–68.
513. Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med.* 1995; 81:2213–2220.
514. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med.* 2003;198:1507-1515.
515. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M, Lukic IK, Socher I, Zablotzskaya V, Buschmann K, Lange-Sperandio B, Schymeinsky J,

- Ryschich E, Poeschl J, Kupatt C, Nawroth PP, Moser M, Walzog B, Bierhaus A, Sperandio M. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood*. 2010;116:841-849.
516. Frommhold D, Kamphues A, Dannenberg S, Buschmann K, Zablotzkaya V, Tschada R, Lange-Sperandio B, Nawroth PP, Poeschl J, Bierhaus A, Sperandio M. RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner. *BMC immunology*. 2011;12:56.
517. Buschmann K, Tschada R, Metzger MS, Braach N, Kuss N, Hudalla H, Poeschl J, Frommhold D. RAGE controls leukocyte adhesion in preterm and term infants. *BMC immunology*. 2014;15:53.
518. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*. 1995;96:1395-1403.
519. Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, Boval B, Panis Y, Wernert N, Danze PM, Dequiedt P. AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney international*. 2002;61:148-156.
520. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Gröne HJ, Kurschus FC, Schmidt AM, Yan SD, Martin E, Schleicher E, Stern DM, Hämmerling G, Nawroth PP, Arnold B. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest*. 2004;113:1641-1650.
521. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:331-342.
522. Manfredi AA, Capobianco A, Esposito A, De Cobelli F, Canu T, Monno A, Raucci A, Sanvito F, Doglioni C, Nawroth PP, Bierhaus A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Del Maschio A. Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. *J Immunol*. 2008;180:2270-2275.
523. Oczypok Elizabeth A, Perkins Timothy N, Oury Tim D. All the “RAGE” in lung disease: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses. *Paediatr Respir Rev*. 2017;23:40-49.
524. Imbalzano E, Quartuccio S, Di Salvo E, Crea T, Casciaro M, Gangemi S.B. Association between HMGB1 and asthma: a literature review. *Clin Mol Allergy*. 2017;15:12.
525. Watanabe T, Asai K, Fujimoto H, Tanaka H, Kanazawa H, Hirata K. Increased levels of HMGB-1 and endogenous secretory RAGE in induced sputum from asthmatic patients. *Respir Med*. 2011;105:519-525.
526. El-Seify MY, Fouda EM, Nabih ES. Serum level of soluble receptor for advanced glycation end products in asthmatic children and its correlation to severity and pulmonary functions. *Clinical laboratory*. 2014;60:957-962

527. Bediwy AS, Hassan SM, El-Najjar MR. Receptor of advanced glycation end products in childhood asthma exacerbation. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*. 2016;65:15-18.
528. Shim EJ, Chun E, Lee HS, Bang BR, Kim TW, Cho SH, Min KU, Park HW. The role of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2012;42:958-965.
529. Repapi E, Sayers I, Wain LV, Burton PR, Johnson T, Obeidat M, hao JH, Ramasamy A, Zhai G, Vitart V, Huffman JE, Igl W, Albrecht E, Deloukas P, Henderson J, Granell R, McArdle WL, Rudnicka AR; Wellcome Trust Case Control Consortium, Barroso I, Loos RJ, Wareham NJ, Mustelin L, Rantanen T, Surakka I, Imboden M, Wichmann HE, Grkovic I, Jankovic S, Zgaga L, Hartikainen AL, Peltonen L, Gyllensten U, Johansson A, Zaboli G, Campbell H, Wild SH, Wilson JF, Gläser S, Homuth G, Völzke H, Mangino M, Soranzo N, Spector TD, Polasek O, Rudan I, Wright AF, Heliövaara M, Ripatti S, Pouta A, Naluai AT, Olin AC, Torén K, Cooper MN, James AL, Palmer LJ, Hingorani AD, Wannamethee SG, Whincup PH, Smith GD, Ebrahim S, McKeever TM, Pavord ID, MacLeod AK, Morris AD, Porteous DJ, Cooper C, Dennison E, Shaheen S, Karrasch S, Schnabel E, Schulz H, Grallert H, Bouatia-Naji N, Delplanque J, Froguel P, Blakey JD; NSHD Respiratory Study Team, Britton JR, Morris RW, Holloway JW, Lawlor DA, Hui J, Nyberg F, Jarvelin MR, Jackson C, Kähönen M, Kaprio J, Probst-Hensch NM, Koch B, Hayward C, Evans DM, Elliott P, Strachan DP, Hall IP, Tobin MD. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nature genetics*. 2010;42:36-44.
530. Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, Marcianti KD, Franceschini N, van Durme YM, Chen TH, Barr RG, Schabath MB, Couper DJ, Brusselle GG, Psaty BM, van Duijn C, Rotter JI, Uitterlinden AG, Hofman A, Punjabi NM, Rivadeneira F, Morrison AC, Enright PL, North KE, Heckbert SR, Lumley T, Stricker B, HO'Connor GT, London SJ. Metaanalyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nature genetics*. 2010;42:45-52.
531. Lyu Y, Zhao H, Ye Y, Liu L, Zhu S, Xia Y, Zou F, Cai S. Decreased soluble RAGE in neutrophilic asthma is correlated with disease severity and RAGE G82S variants. *Mol Med Rep*. 2017: Epub ahead of print
532. Osawa M, Yamamoto Y, Munesue S, Murakami N, Sakurai S, Watanabe T, Yonekura H, Uchigata Y, Iwamoto Y, Yamamoto H. De-Nglycosylation or G82S mutation of RAGE sensitizes its interaction with advanced glycation endproducts. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770:1468-1474.
533. Milutinovic PS, Alcorn JF, Englert JM, Crum LT, Oury TD. The receptor for advanced glycation end products is a central mediator of asthma pathogenesis. *Am J Pathol*. 2012;181:1215-1225.

534. Akirav EM, Henegariu O, Preston-Hurlburt P, Schmidt AM, Clynes R, Herold KC. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) affects T cell differentiation in OVA induced asthma. *PLoS One*. 2014;9:e95678..
535. Oczypok EA, Milutinovic PS, Alcorn JF, Khare A, Crum LT, Manni ML, Epperly MW, Pawluk AM, Ray A, Oury TD. Pulmonary receptor for advanced glycation end-products promotes asthma pathogenesis through IL-33 and accumulation of group 2 innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:747-756 e4.
536. Halayko AJ, Ghavami S. S100A8/A9: a mediator of severe asthma pathogenesis and morbidity? *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2009;87:743-755.
537. Yang Z, Yan WX, Cai H, Tedla N, Armishaw C, Di Girolamo N, Wang HW, Hampartzoumian T, Simpson JL, Gibson PG, Hunt J, Hart P, Hughes JM, Perry MA, Alewood PF, Geczy CL. S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:106-114.
538. Ullah MA, Loh Z, Gan WJ, Zhang V, Yang H, Li JH, Yamamoto Y, Schmidt AM, Armour CL, Hughes JM, Phipps S, Sukkar MB. Receptor for advanced glycation end products and its ligand high-mobility group box-1 mediate allergic airway sensitization and airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:440-50.
539. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015;517:293-301.
540. Doherty TA. At the bench: understanding group 2 innate lymphoid cells in disease. *Journal of leukocyte biology*. 2015;97:455-467.
541. Cayrol C, Girard JP. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family IL-33. *Immunol Rev*. 2018;281:154–168.
542. Lloyd CM, Saglani S. Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2015;34:52-58.
543. Shang G.-H., Jia C.-Q., Tian H., Xiao W, Li Y, Wang AH, Dong L, Lin DJ. Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respir Med*. 2009;103:1949–1953.
544. Hou C., Zhao H., Liu L., Li W, Zhou X, Lv Y, Shen X, Liang Z, Cai S, Zou F. High mobility group protein B1 (HMGB1) in asthma: comparison of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy controls. *Mol Med*.. 2011;17:807–815.
545. Bezerra FS, Valença SS, Pires KM, Lanzetti M, Pimenta WA, Schmidt AC, Porto LC, Zin WA. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. *Respir Physiol Neurobiol*.. 2011;177:120–126.
546. Kanazawa H., Tochino Y., Asai K., Ichimaru Y., Watanabe T., Hirata K. Validity of HMGB1 measurement in epithelial lining fluid in patients with COPD. *Eur J Clin Invest*. 2012;42:419–426.



547. Wang C. M., Jiang M., Wang H. J. Effect of NF- $\kappa$ B inhibitor on high-mobility group protein B1 expression in a COPD rat model. *Mol Med Rep.* 2013;7:499–502.
548. Ko H.-K., Hsu W.-H., Hsieh C.-C., Lien T.-C., Lee T.-S., Kou Y. R. High expression of high-mobility group box 1 in the blood and lungs is associated with the development of chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Respirology.* 2014;19:253–261.
549. Zhang Y., Li S., Wang G., Han D, Xie X, Wu Y, Xu J, Lu J, Li F, Li M.. Changes of HMGB1 and sRAGE during the recovery of COPD exacerbation. *J Thorac Dis.* 2014;6:734–741.
550. Zabini D., Crnkovic S., Xu H., Tscherner M, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski A, Kwapiszewska G, Marsh LM. High-mobility group box-1 induces vascular remodelling processes via c-Jun activation *J Cell Mol Med.* 2015;19:1151–1161.
551. Pouwels S. D., Nawijn M. C., Bathoorn E., Riezebos-Brilman A, van Oosterhout AJ, Kerstjens HA, Heijink IH. Increased serum levels of LL37, HMGB1 and S100A9 during exacerbation in COPD patients. *Eur Respir J.* 2015;45:1482–1485.
552. Ojo O. O., Ryu M. H., Jha A., Unruh H., Halayko A. J. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) promotes extracellular matrix synthesis and wound repair in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309:L1354–L1366.
553. Gangemi S, Casciaro M, Trapani G, Quartuccio S, Navarra M, Pioggia G, Imbalzano E. Association between HMGB1 and COPD: A Systematic Review. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:164913
554. Di Stefano A., Caramori G., Barczyk A., Vicari C, Brun P, Zanini A, Cappello F, Garofano E, Padovani A, Contoli M, Casolari P, Durham AL, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax.*2014;69:516–524.
555. Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto M, Inghilleri S, Luisetti M. The receptor for advanced glycation end products and its ligands: a new inflammatory pathway in lung disease? *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2006;19:1437-1445.
556. Sambamurthy N, Leme AS, Oury TD, Shapiro SD. The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Contributes to the Progression of Emphysema in Mice. *PLoS One.* 2015;10:e0118979.
557. Waseda K, Miyahara N, Taniguchi A, Kurimoto E, Ikeda G, Koga H, Fujii U, Yamamoto Y, Gelfand EW, Yamamoto H, Tanimoto M, Kanehiro A. Emphysema requires the receptor for advanced glycation end-products triggering on structural cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;52:482-491.
558. Reynolds PR, Kasteler SD, Schmitt RE, Hoidal JR. Receptor for advanced glycation endproducts signals through Ras during tobacco smoke-

- induced pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:411-418.
559. Wu L, Ma L, Nicholson LF, Black PN. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respir Med.* 2011;105:329-336.
560. Zemans RL, Jacobson S, Keene J, Kechris K, Miller BE, Tal-Singer R, Bowler RP. Multiple biomarkers predict disease severity, progression and mortality in COPD. *Respir Res.* 2017;18:117.
561. Gopal P, Reynaert NL, Scheijen JL, Schalkwijk CG, Franssen FM, Wouters EF, Rutten EP. Association of plasma sRAGE, but not esRAGE with lung function impairment in COPD. *Respiratory research.* 2014;15:24.
562. Gopal P, Rutten EP, Dentener MA, Wouters EF, Reynaert NL. Decreased plasma sRAGE levels in COPD: influence of oxygen therapy. *Eur J Clin Invest.* 2012 Aug;42(8):807-814.
563. Miniati M, Monti S, Basta G, Cocci F, Fornai E, Bottai M. Soluble receptor for advanced glycation end products in COPD: relationship with emphysema and chronic cor pulmonale: a case-control study. *Respiratory research.* 2011;12:37.
564. Iwamoto H, Gao J, Pulkkinen V, Toljamo T, Nieminen P, Mazur W. Soluble receptor for advanced glycation end-products and progression of airway disease. *BMC pulmonary medicine.* 2014;14:68.
565. Cheng DT, Kim DK, Cockayne DA, Belousov A, Bitter H, Cho MH, Duvoix AE, dwards LD, Lomas DA, Miller BE, Reynaert N, Tal-Singer R, Wouters EF, Agustí A, Fabbri LM, Rames A, Visvanathan S, Rennard SI, Jones P, Parmar H, MacNee W, Wolff G, Silverman EK, Mayer RJ, Pillai SGTESRA and ECLIPSE Investigators. Systemic soluble receptor for advanced glycation endproducts is a biomarker of emphysema and associated with AGER genetic variants in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188:948-957.
566. Smith DJ, Yerkovich ST, Towers MA, Carroll ML, Thomas R, Upham JW. Reduced soluble receptor for advanced glycation end-products in COPD. *Eur Respir J.* 2011;37:516-522.
567. Rowe S. M., Jackson P. L., Liu G., Hardison M, Livraghi A, Solomon GM, McQuaid DB, Noerager BD, Gaggari A, Clancy JP, O'Neal W, Sorscher EJ, Abraham E, Blalock JE. Potential role of high-mobility group box 1 in cystic fibrosis airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2008;178:822-831.
568. Beucher J, Boelle PY, Busson PF, Muselet-Charlier C, Clement A, Corvol H French CF, Modifier Gene Study Investigators. AGER -429T/C is associated with an increased lung disease severity in cystic fibrosis. *PLoS One.* 2012;7:e41913.
569. Iannitti RG, Casagrande A, De Luca A, Cunha C, Sorci G, Riuzzi F, Riuzzi F, Borghi M, Galosi C, Massi-Benedetti C, Tim D. Oury TD, Cariani L, Russo M, Porcaro L, Colombo C, Fabio Majo F, Lucidi V, Fiscarelli E,

- Ricciotti G, Lass-Flörl C, Ratclif L, Esposito A, De Benedictis FM, Donato R, Carvalho A, Romani L. Hypoxia promotes danger-mediated inflammation via receptor for advanced glycation end products in 31 cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:1338-1350.
570. Su X, Looney MR, Gupta N, Matthay MA. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an indicator of direct lung injury in models of experimental lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297:L1-5
571. Makam M, Diaz D, Laval J, Gernez Y, Conrad CK, Dunn CE, Davies ZA, Moss RB, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Tirouvanziam R Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:5779-5783.
572. Ramsgaard L, Englert JM, Manni ML, Milutinovic PS, Gefer J, Tobolewski J, Crum L, Coudriet GM, Piganelli J, Zamora R, Vodovotz Y, Enghild JJ, Oury TD. Lack of the receptor for advanced glycation end-products attenuates *E. coli* pneumonia in mice. *PLoS One*. 2011;6:e20132.
573. Reynolds PR, Schmitt RE, Kasteler SD, Sturrock A, Sanders K, Bierhaus A, Nawroth PP, Paine R 3<sup>rd</sup>, Hoidal JR. Receptors for advanced glycation end-products targeting protect against hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42:545-551.
574. Patel BV, Wilson MR, Takata M. Resolution of acute lung injury and inflammation: a translational mouse model. *Eur Respir J*. 2012;39:1162-1170
- Jabaudon M, Blondonnet R, Roszyk L, Bouvier D, Audard J, Clairefond G, Fournier M, Marceau G, Déchelotte P, Pereira B, Sapin V, Constantin JM. Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products Predicts Impaired Alveolar Fluid Clearance in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:191-199.
575. Bargagli E, Penza F, Bianchi N, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Rottoli P. Controversial role of RAGE in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009 ;165:119-120;
576. Queisser MA, Kouri FM, Konigshoff M, Wygrecka M, Schubert U, Eickelberg O, Preissner KT. Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39:337-345.
577. Buckley ST, Medina C, Kasper M, Ehrhardt C. Interplay between RAGE, CD44, and focal adhesion molecules in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300:L548-559.
578. Konishi K, Gibson KF, Lindell KO, Richards TJ, Zhang Y, Dhir R, Bisceglia M, Gilbert S, Yousem SA, Song JW, Kim DS, Kaminski N. Gene expression profiles of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:167-175.
579. Ramsgaard L, Englert JM, Tobolewski J, Tomai L, Fattman CL, Leme AS, Kaynar AM, Shapiro SD, Enghild JJ, Oury TD. The role of the receptor

- for advanced glycation end-products in a murine model of silicosis. *PLoS One*. 2010;5:e9604.
580. He M, Kubo H, Ishizawa K, Hegab AE, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamaya M. The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L1427-1436.
581. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L525-34.
582. Bartling B, Hofmann HS, Weigle B, Silber RE, Simm A. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*. 2005;26:293-301.
583. Sukkurwala AQ, Adjemian S, Senovilla L, Michaud M, Spaggiari S, Vacchelli E, Baracco EE, Galluzzi L, Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI Mechanistic Diversity Set. *Oncoimmunology*. 2014; 3: e28473.
584. Liu PL, Liu WL, Chang JM, Chen YH, Liu YP, Kuo HF, Hsieh CC, Ding YS, Chen WW, Chong IW. MicroRNA-200c inhibits epithelial-mesenchymal transition, invasion, and migration of lung cancer by targeting HMGB1. *PLoS One*. 2017;12:e0180844.
585. Wu T, Zhang W, Yang G, Li H, Chen Q, Song R, Zhao L. HMGB1 overexpression as a prognostic factor for survival in cancer: a meta-analysis and systematic review. *Oncotarget*. 2016;7:50417-50427.
586. Sim YS, Kim DG, Shin TR. The diagnostic utility and tendency of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in exudative pleural effusion. *J Thorac Dis*. 2016;8:1731-1737.
587. Tabata C, Kanemura S, Tabata R, Masachika E, Shibata E, Otsuki T, Nishizaki T, Nakano T. Serum HMGB1 as a diagnostic marker for malignant peritoneal mesothelioma *J Clin Gastroenterol*. 2013;47:684-688.
588. Yang H, Rivera Z, Jube S, Nasu M, Bertino P, Goparaju C, Franzoso G, Lotze MT, Krausz T, Pass HI, Bianchi ME, Carbone M. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:12611-1266.
589. Jube S, Rivera ZS, Bianchi ME, Powers A, Wang E, Pagano I, Pass HI, Gaudino G, Carbone M, Yang H. Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 2012;72:3290-3301.
590. Carbone M, Yang H. Mesothelioma: recent highlights. *Ann Transl Med*. 2017;5:238.
591. Ying S, Jiang Z, He X, Yu M, Chen R, Chen J, Ru G, Chen Y, Chen W, Zhu L, Li T, Zhang Y, Guo X, Yin X, Zhang X, Lou J. Serum HMGB1 as a Potential Biomarker for Patients with Asbestos-Related Diseases. *Dis Markers*. 2017;2017:5756102.

592. Chen Z, Gaudino G, Pass HI, Carbone M, Yang H. Diagnostic and prognostic biomarkers for malignant mesothelioma: an update. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6:259-269.
593. Napolitano A, Antoine DJ, Pellegrini L, Baumann F, Pagano I, Pastorino S, Goparaju CM, Prokrym K, Canino C, Pass HI, Carbone M, Yang H. HMGB1 and Its Hyperacetylated Isoform are Sensitive and Specific Serum Biomarkers to Detect Asbestos Exposure and to Identify Mesothelioma Patients *Clin Cancer Res.* 2016; 22:3087-3096.
594. Sun HH, Vaynblat A, Pass HI. Diagnosis and prognosis-review of biomarkers for mesothelioma. *Ann Transl Med.* 2017;5:244.
595. Jube S, Rivera ZS, Bianchi ME, Powers A, Wang E, Pagano I, Pass HI, Gaudino G, Carbone M, Yang H. Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 2012;72:3290-3301.
596. Carbone M, Yang H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2012;18:598-604.
597. Qi F, Okimoto G, Jube S, Napolitano A, Pass HI, Laczko R, Demay RM, Khan G, Tiirikainen M, Rinaudo C, Croce A, Yang H, Gaudino G, Carbone M. Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF- $\alpha$  signaling. *Am J Pathol.* 2013;183:1654-1666.
598. Pellegrini L, Xue J, Larson D, Pastorino S, Jube S, Forest KH, Saad-Jube ZS, Napolitano A, Pagano I, Negi VS, Bianchi ME, Morris P, Pass HI, Gaudino G, Carbone M, Yang H. HMGB1 targeting by ethyl pyruvate suppresses malignant phenotype of human mesothelioma. *Oncotarget.* 2017;8:22649-22661.
599. Yang H, Pellegrini L, Napolitano A, Giorgi C, Jube S, Preti A, Jennings CJ, De Marchis F, Flores EG, Larson D, Pagano I, Tanji M, Powers A, Kanodia S, Gaudino G, Pastorino S, Pass HI, Pinton P, Bianchi ME, Carbone M. Aspirin delays mesothelioma growth by inhibiting HMGB1-mediated tumor progression. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1786.
600. Winter N, Meyer A, Richter A, Krisponeit D, Bullerdiek J. Elevated levels of HMGB in cancerous and inflammatory effusions. *Anticancer Res.* 2009;29:5013-5017.
601. Ma Y, Kang S, Wu X, Han B, Jin Z, Guo Z. Up-regulated HMGB1 in the pleural effusion of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients reduces the chemosensitivity of NSCLC cells. *Tumori.* 2017: Epub ahead of print
602. Sim YS, Kim DG, Shin TR. The diagnostic utility and tendency of the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in exudative pleural effusion. *J Thorac Dis.* 2016;8:1731-1737.
603. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med.* 1972;77:507-513.

604. Jagirdar RM, Apostolidou E, Molyvdas PA, Gourgoulisanis KI, Hatzoglou C, Zarogiannis SG. Influence of AQP1 on cell adhesion, migration, and tumor sphere formation in malignant pleural mesothelioma is substratum- and histological-type dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310:L489-495.
605. Numata T, Ito T, Maeda T, Egusa C, Tsuboi R. IL-33 promotes ICAM-1 expression via NF- $\kappa$ B in murine mast cells. *Allergol Int*. 2016;65:158-165.
606. Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, Palumbo R, Battistini L, Rastaldo R, Müller S, Pompilio G, Anversa P, Bianchi ME, Capogrossi MC. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2005;97:e73-83.
607. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan XG, Yan Z, Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar TR, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2014;40:1-116.
608. Ahmad S, Khan H, Siddiqui Z, Khan MY, Rehman S, Shahab U, Godovikova T, Silnikov V, Moinuddin. AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. *Semin Cancer Biol*. 2017;pii:S1044-579X(17)30032-9.
609. Fu GX, Chen AF, Zhong Y, Zhao J, Gu YJ. Decreased serum level of HMGB1 and MyD88 during Human aging progress in healthy individuals. *Aging Clin Exp Res*. 2016;28:175-180.
610. Son M, Chung WJ, Oh S, Ahn H, Choi CH, Hong S, Park KY, Son KH, Byun K. Age dependent accumulation patterns of advanced glycation end product receptor (RAGE) ligands and binding intensities between RAGE and its ligands differ in the liver, kidney, and skeletal muscle. *Immun Ageing*. 2017;14:12.
611. Vavougiou G, Kerenidi T, Tsilioni I, Zarogiannis SG, Gourgoulisanis KI. Pleural effusion levels of DJ-1 are increased in elderly lung cancer patients with malignant pleural effusions. *Redox Rep*. 2015;20:254-258.
612. Tsilioni I, Kostikas K, Kalomenidis I, Oikonomidi S, Tsolaki V, Minas M, Gourgoulisanis KI, Kiropoulos TS. Diagnostic accuracy of biomarkers of oxidative stress in parapneumonic pleural effusions. *Eur J Clin Invest*. 2011;41:349-356.
613. Senatus LM, Schmidt AM. The AGE-RAGE Axis: Implications for Age-Associated Arterial Diseases. *Front Genet*. 2017;8:187.
614. Ma L, Carter RJ, Morton AJ, et al: RAGE is expressed in pyramidal cells of the hippocampus following moderate hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Brain Res* 2003;966:167-174
615. Casselmann C, Reimann A, Friedrich I, Schubert A, Silber RE, Simm A. Age-dependent expression of advanced glycation end product receptor genes in the human heart. *Gerontology*. 2004;50:127-134.
616. Hallam KM, Li Q, Ananthakrishnan R, Kalea A, Zou YS, Vedantham S, Schmidt AM, Yan SF, Ramasamy R. Aldose reductase and AGE-RAGE

- pathways: central roles in the pathogenesis of vascular dysfunction in aging rats. *Aging Cell*. 2010; 9:776-84.
617. LinSungha L, Edward P, Lakatta G. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Front Biosci*. 2009;14:1403–1413.
618. Prakash J, Pichchadze G, Trofimov S, Livshits G. Age and genetic determinants of variation of circulating levels of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the general human population. *Mech Ageing Dev*. 2015;145:18-25.
619. White RR, Milholland B, de Bruin A, Curran S, Laberge R, Mvan Steeg H, Campisi J, Maslov AY Vijn J. Controlled induction of DNA double-strand breaks in the mouse liver induces features of tissue ageing. *Nat Commun*. 2015;6:6790.
620. Villegas-Rodríguez ME, Uribarri JSolorio-Meza SE, Fajardo-Araujo ME, Cai W, Torres-Graciano S, Rangel-Salazar R, Wrobel K, Garay-Sevilla ME. The AGE-RAGE Axis and Its Relationship to Markers of Cardiovascular Disease in Newly Diagnosed Diabetic Patients. *PLoS One*. 2016;11:e0159175.
621. Goudarzi H, Hida Y, Takano H, Teramae H, Iizasa H, Hamada J Hypoxia affects in vitro growth of newly established cell lines from patients with malignant pleural mesothelioma. *Biomed Res*. 2013;34:13-21.
622. Zhuo Y, Lin L, Wei S, Zhang M. Pretreatment elevated serum lactate dehydrogenase as a significant prognostic factor in malignant mesothelioma: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e5706.
623. Wei J, Zhao J, Schrott V, Zhang Y, Gladwin M, Bullock G, Zhao Y. Red Blood Cells Store and Release Interleukin-33. *J Investig Med*. 2015;63:806-810.
624. Porcel JM, Vives M. Etiology and pleural fluid characteristics of large and massive effusions. *Chest*. 2003;124:978-983.
625. Chalubinski M, Wojdan K, Luczak E, Gorzelak P, Borowiec M, Gajewski A, Rudnicka K, Chmiela M, Broncel M. IL-33 and IL-4 impair barrier functions of human vascular endothelium via different mechanisms. *Vascul Pharmacol*. 2015;73:57-63.
626. Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, Kim J, Kim YM, Kwon YG. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood*. 2009;114:3117-3126.
627. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:18106-18115
628. Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, Alysandratos KD, Kalogeromitros D, Asadi S, Stavrianeas N,

- Peterson E, Leeman S, Conti P. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:4448-4453.
629. Acencio MMP, Puka J, Alvarenga VA, Martins V, de Carvalho MLP, Marchi E, Capelozzi VL, Teixeira LR. Intrapleural targeted therapies (anti-VEGF and anti-EGFR) in the model of malignant pleural effusion. *Oncotarget*. 2017;8:105093-105102.
630. Wu DW, Chang WA, Liu KT, Yen MC, Kuo PL. Vascular endothelial growth factor and protein level in pleural effusion for differentiating malignant from benign pleural effusion. *Oncol Lett*. 2017;14:3657-3662
631. Fafliora E, Hatzoglou C, Gourgoulisanis KI, Zarogiannis SG. Systematic review and meta-analysis of vascular endothelial growth factor as a biomarker for malignant pleural effusions. *Physiol Rep*. 2016;4:pii: e12978.
632. Liu J, Shen JX, Hu JL, Huang WH, Zhang GJ. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol*. 2014;5:141.
633. Atanackovic D, Cao Y, Kim JW, Brandl S, Thom I, Faltz CHildebrandt Y, Bartels K, de Weerth A, Hegewisch-Becker S, Hossfeld DK, Bokemeyer C. The local cytokine and chemokine milieu within malignant effusions. *Tumour Biol*. 2008;29:93-104.
634. Ampawong S, Chaisri U, Viriyavejakul P, Prapansilp P, Grau GE, Turner GD, Pongponratn EA. Potential role for interleukin-33 and  $\gamma$ -epithelium sodium channel in the pathogenesis of human malaria associated lung injury. *Malar J*. 2015;14:389.
635. Okamoto M, Hasegawa Y, Hara T, Hashimoto N, Imaizumi K, Shimokata K, Kawabe T. T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions. *Chest*. 2005;128:4030-4035.
636. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan XG, Yan Z, Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar TR, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2014;40:1-116.
637. Kawahara K, Setoyama K, Kikuchi K, Biswas KK, Kamimura R, Iwata M, Ito T, Morimoto Y, Hashiguchi T, Takao S, Maruyama I. HMGB1 release in co-cultures of porcine endothelial and human T cells. *Xenotransplantation*. 2007;14:636-634.
638. Ding J, Cui X, Liu Q. Emerging role of HMGB1 in lung diseases: friend or foe. *J Cell Mol Med*. 2017;21:1046-1057.
639. Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, Sauaia A, Silliman CC, Banerjee A, Abraham E. HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock*. 2009;32:17-22.



640. Zettel KR, Dyer M, Raval JS, Wu X, Klune JR, Gutierrez A, Triulzi DJ, Billiar TR, Neal MD. Aged Human Stored Red Blood Cell Supernatant Inhibits Macrophage Phagocytosis in an HMGB1 Dependent Manner After Trauma in a Murine Model. *Shock*. 2017;47:217-224.
641. Rakoff-Nahoum S. Why Cancer and Inflammation? *Yale J Biol Med*. 2006;79:123–130.
642. Demyanets S, Konya V, Kastl SP, Kaun C, Rauscher S, Niessner A, Pentz R, Pfaffenberger S, Rychli K, Lemberger C, Ede Martin R, Heine, mann A, Huk I, Gröger M, Maurer G, Huber K, Wojta J. Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2080-2089.
643. Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, Saito H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest*. 2008;88:1245-1253.
644. Wang XH, Liu W, Fan DX, Hu WT, Li MQ, Zhu X, YJin LP. IL-33 restricts invasion and adhesion of trophoblast cell line JEG3 by downregulation of integrin  $\alpha 4\beta 1$  and CD62L. *Mol Med Rep*. 2017;16:3887-3893.
645. Iikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Okayama Y, Saito H, Galli SJ, Nakae S. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest*. 2007;87:971-978.
646. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010;20:103-110.
647. Millar NL, O'Donnell C, McInnes IB, Brint E. Wounds that heal and wounds that don't – The role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;61:41-50.
648. Oshio T, Komine M, Tsuda H, Tominaga SI, Saito H, Nakae S, Ohtsuki M. Nuclear expression of IL-33 in epidermal keratinocytes promotes wound healing in mice. *J Dermatol Sci*. 2017;85:106-114.
649. He R, Yin H, Yuan B, Liu T, Luo L, Huang P, Dai L, Zeng K. IL-33 improves wound healing through enhanced M2 macrophage polarization in diabetic mice. *Mol Immunol*. 2017;90:42-49.
650. Liu J, Shen JX, Hu JL, Huang WH, Zhang GJ. Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front Immunol*. 2014;5:141.
651. Hu LA, Fu Y, Zhang DN, Zhang J. Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:2563–2566.
652. Tong X, Barbour M, Hou K, Gao C, Cao S, Zheng J, Zhao Y, Mu R, Jiang HR. Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian cancer

- cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways. *Mol Oncol*. 2016;10:113-125.
653. Yu XX, Hu Z, Shen X, Dong LY, Zhou WZ, Hu WH. IL-33 Promotes Gastric Cancer Cell Invasion and Migration Via ST2-ERK1/2 Pathway. *Dig Dis Sci*. 2015;60:1265-1272.
654. Macedo RB, Kakehasi AM, Melo de Andrade MV. IL33 in rheumatoid arthritis: potential contribution to pathogenesis. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2016;56:451-457.
655. Lavric M, Miranda-García MA, Holzinger D, Foell D, Wittkowski H. Alarmins firing arthritis: Helpful diagnostic tools and promising therapeutic targets.
656. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, Alves-Filho JC, Cunha TM, Guerrero AT, Mattos-Guimaraes RB, Oliveira FR, Teixeira MM, Silva JS, McInnes IB, Ferreira SH, Louzada-Junior P, Liew FY, Cunha FQ. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1697-703.
657. Theodoropoulou S, Copland DA, Liu J, Wu J, Gardner PJ, Ozaki E, Doyle SL, Campbell M, Dick AD. Interleukin-33 regulates tissue remodelling and inhibits angiogenesis in the eye. *J Pathol*. 2017;241:45-56.
658. Bianchetti L, Marini MA, Isgrò M, Bellini A, Schmidt M, Mattoli S. IL-33 promotes the migration and proliferation of circulating fibrocytes from patients with allergen-exacerbated asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;426:116-121.
659. Sessa L, Gatti E, Zeni F, Antonelli A, Catucci A, Koch M, Pompilio G, Fritz G, Raucci A, Bianchi ME. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). *PLoS One*. 2014;9:e86903.
660. Karsch-Bluman A, Amoyav B, Friedman N, Shoval H, Schwob O, Ella E, Wald O, Benny O. High mobility group box 1 antagonist limits metastatic seeding in the lungs via reduction of cell-cell adhesion. *Oncotarget*. 2017;8:32706-32721.
661. Palone F, Vitali R, Cucchiara S, Pierdomenico M, Negroni A, Aloï M, Nuti F, Felice C, Armuzzi A, Stronati L. Role of HMGB1 as a suitable biomarker of subclinical intestinal inflammation and mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20:1448-457.
662. Straino S, Di Carlo A, Mangoni A, De Mori R, Guerra L, Maurelli R, Panacchia L, Di Giacomo F, Palumbo R, Di Campli C, Uccioli L, Biglioli P, Bianchi ME, Capogrossi MC, Germani A. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1545-5153.

663. Ranzato E, Patrone M, Pedrazzi M, Burlando B. HMGB1 promotes scratch wound closure of HaCaT keratinocytes via ERK1/2 activation. *Mol Cell Biochem.* 2009;332:199-205.
664. Min G, Ku SK, Park MS, Park TJ, Lee HS, Bae JS. Anti-septic effects of pelargonidin on HMGB1-induced responses in vitro and in vivo. *Arch Pharm Res.* 2016;39:1726-1738.
665. Di Maggio S, Milano G, De Marchis F, D'Ambrosio A, Bertolotti M, Palacios BS, Badi I, Sommariva E, Pompilio G, Capogrossi MC, Raucci A. Non-oxidizable HMGB1 induces cardiac fibroblasts migration via CXCR4 in a CXCL12-independent manner and worsens tissue remodeling after myocardial infarction. *Biochim Biophys Acta.* 2017 pii: S0925-4439(17)30238-7.
666. Li S, Luo C, Zhou J, Zhang Y. MicroRNA-34a directly targets high-mobility group box 1 and inhibits the cancer cell proliferation, migration and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med.* 2017;14:5611-5618.
667. Seidu RA, Wu M, Su Z, Xu H. Paradoxical Role of High Mobility Group Box 1 in Glioma: A Suppressor or a Promoter? *Oncol Rev.* 2017;11:325.
668. Peng T, Hu M, Wu T, Chen Z, Zhang C, Huang S, Zhou X. Effects of high-mobility group box 1 knockdown on proliferation, migration and invasion of the HONE-1 human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Mol Med Rep.* 2015;12:7531-7537.
669. Yin K, Gribbin E, Wang H. Interferon-gamma inhibition attenuates lethality after cecal ligation and puncture in rats: implication of high mobility group box-1. *Shock.* 2005;24:396-401.
670. Zhang Q, O'Hearn S, Kavalukas SL, Barbul A. Role of high mobility group box 1 (HMGB1) in wound healing. *J Surg Res.* 2012;176:343-347.
671. Han W, Li W, Zhang X, Du Z, Liu X, Zhao X, Wen X, Wang G, Hu JF, Cui J. Targeted breast cancer therapy by harnessing the inherent blood group antigen immune system. *Oncotarget.* 2017;8:15034-15046.