

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie



Bc. Miroslava Kardošová

Regulácia tvorby cytokínu IL-33 a jeho biologické účinky
Regulation of the cytokine IL-33 production and its biological effects

Diplomová práca

Vedoucí diplomové práce: prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

máj 2012

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som diplomovú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 11.05.2012

Podpis

Pod'akovanie

Ďakujem svojmu školiteľovi, prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc., za vedenie mojej diplomovej práce. Ďalej sa chcem poďakovať Mgr. Eve Brabcovej za cenné rady a trpezlivosť, s akou mi pomáhala pri práci v laboratóriu. Taktiež by som sa chcela poďakovať aj celému kolektívu klinickej imunológie IKEM, predovšetkým RNDr. Alene Sekerkovej. Vďaka patrí aj mojim blízkym, ktorí ma podporovali po celú dobu mojich štúdií.

Abstract:

IL-33 is a dual function protein that may function as both a proinflammatory cytokine and an intracellular nuclear factor. In a role of cytokine IL-33 signals via receptor ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines in its target cells including mast cells, basophils, eosinophils and natural killer cells. Additionally, it acts as chromatin-associated nuclear factor with transcriptional regulator properties affecting expression of some proinflammatory cytokines. Regulation of this processes is poorly understood, mechanisms underlying synthesis, processing and secretion of IL-33 also remain to be fully explored. The aim of our study was to examine mechanisms probably involved in regulation of IL-33 production and its secretion outside the cell. First, we investigated possibility that IL-33 secretion is affected by stimulation with cytokines TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-13, IL-33, TGF- β and IL-10 or stimulation with LPS isolated from *E. coli*. Next we investigated hypothesis that IL-33 is released from cells during cell damage or necrosis and serve as „alarmin“. Necrosis was induced in LPS-stimulated cells by freeze-thawing cycles. Besides the presence of IL-33 we tested levels of IL-1 α and IL-1 β . In our experimental model, we used A549 cell line (alveolar type II-like cells), THP-1 promonocytic cell line and monocytic THP-1dif cells converted from THP-1 cells by incubation with vitaminD3. Cell differentiation was confirmed by upregulated expression of cell surface molecule CD-14, measured with flow cytometer. Cytokine levels were measured by Luminex technology or ELISA. Despite our effort we didn't detect IL-33 in cell supernatants. Our data shows that neither cytokines nor LPS have the ability to induce IL-33 secretion in the cells. Effect of necrosis on IL-33 presence in supernatants was not confirmed. IL-1 β was constitutively produced by epithelial A549 cells with no influence by LPS or necrosis. Concentration of IL-1 β was affected by stimulation with LPS in both cell lines, THP-1 and THP-1 dif, respectively. Necrosis upregulated levels of IL-1 β in supernatants. Dynamics of the IL-1 α expression in our experiments confirmed its role as alarmin.

Key words:

interleukin 33 (IL-33), secretion, lipopolysaccharide, necrosis, THP-1 cells

Abstrakt:

Interleukín 33 je proteín s duálnou funkciou, ktorý slúži súčasne ako prozápalový cytokín a zároveň funguje ako intracelulárny jadrový faktor. V úlohe cytokínu sa IL-33 naväzuje na ST-2 receptor a v cieľových bunkách, medzi ktoré patria napr. mastocyty, bazofily, eozinofily, a NK-bunky indukuje produkciu cytokínov spojených s Th2 typom imunitnej odpovede. Ako jadrový faktor sa naväzuje na chromatín a reguluje transkripciu niektorých prozápalových génov. Regulácia týchto procesov zatiaľ nie je známa, uspokojivo objasnené nie sú ani mechanizmy zodpovedné za syntézu, štiepenie a sekréciu IL-33. Cieľom našej práce bolo preveriť viaceré mechanizmy, ktoré by sa mohli podieľať na regulácii produkcie IL-33 a jeho sekrécie mimo bunku. Najskôr sme zisťovali, či má na sekréciu IL-33 vplyv stimulácia prostredníctvom cytokínov $TNF\alpha$, $IFN\ \gamma$, IL-1 β , IL-13, IL-33, TGF- β a IL-10 alebo stimulácia prostredníctvom LPS izolovaného z *E. coli*. Ďalej sme overovali, či IL-33 patrí medzi tzv. alarmíny, takže by mal byť z buniek uvoľňovaný pri poškodení či nekróze. Bunky boli stimulované prostredníctvom LPS a nekrózu sme indukovali pomocou viacerých cyklov zmrazovania a rozmrazovania. Okrem prítomnosti IL-33 bola testovaná aj prítomnosť cytokínov IL-1 α a IL-1 β . V našich experimentoch sme ako modelové bunky používali bunkovú líniu A549 (alveolar type II-like cells) a THP-1 promonocytovú bunkovú líniu, ktorú sme diferencovali prostredníctvom kalcitriolu na monocytovú líniu THP-1dif. Úspešnosť diferenciacie sme potvrdili testovaním buniek na prítomnosť povrchovej molekuly CD-14, merania prebiehali pomocou prietokového cytometra. Hladiny cytokínov v supernatantoch buniek boli merané technológiou Luminex alebo metódou ELISA. Napriek mnohým experimentom sa nám nepodarilo v supernatantoch buniek identifikovať IL-33. Naše dáta ukázali, že cytokíny ani LPS nemajú schopnosť indukovať u buniek sekréciu IL-33. Vplyv nekrózy na prítomnosť IL-33 mimo bunky nebol potvrdený. Epiteliálne bunky A549 konštitutívne produkovali IL-1 β . Stimulácia prostredníctvom LPS ani nekróza neovplyvnili množstvo IL-1 β v supernatantoch A549. U oboch monocytových línií bol zistený významný efekt stimulácie prostredníctvom LPS na koncentráciu IL-1 β v supernatantoch, taktiež vďaka nekróze sa hladina IL-1 β v supernatantoch zvýšila. Dynamika expresie IL-1 α zistená našimi experimentami potvrdila, že IL-1 α slúži ako alarmín.

Kľúčové slová:

interleukín 33 (IL-33), sekrécia, nekróza, lipopolysacharid, THP-1 bunky

Obsah

1	Zoznam použitých skratiek.....	8
2	Úvod.....	12
3	Literárny prehľad	14
3.1	IL-1 rodina – cytokíny podobné interleukínu 1	14
3.1.1	Interleukín 1 α (IL-1 α)	15
3.1.2	Interleukín 1 β (IL-1 β)	16
3.1.3	Interleukín 33	17
3.1.4	Štruktúra IL-33	20
3.1.5	Expresia IL-33	20
3.1.6	IL-33 ako nukleárny faktor	24
3.1.7	IL-33 ako extracelulárny cytokín	24
3.1.8	ST-2 receptor.....	25
3.1.9	Štiepenie a sekrécia IL-33.....	26
3.1.10	Signálne kaskády	29
3.2	Stimulans použité v našich experimentoch	30
3.2.1	TNF- α	31
3.2.2	TGF- β	31
3.2.3	IFN- γ	32
3.2.4	IL-10.....	32
3.2.5	Kalcitriol (1 α , 25 – dihydroxy-vitamín D3)	33
3.2.6	Lipopolysacharid (LPS)	33
4	Cieľ práce	35
5	Materiál a metódy.....	36
5.1	Práca s tkanivovými kultúrami.....	36
5.1.1	Použité tkanivové línie: THP-1 bunková línia.....	36
5.1.2	Použité tkanivové línie: A549 bunková línia	37
5.1.3	Uchovávanie tkanivových línií.....	37
5.1.4	Rozmrazovanie buniek.....	38
5.1.5	Stanovenie počtu buniek v suspenzii pomocou Bürkerovej komôrky	38
5.1.6	Určenie viability buniek pomocou Trypánovej modrej.....	38
5.2	Stanovenie expresie IL-33 u bunčných línií A549 a THP-1 po stimulácii prostredníctvom rôznych cytokínov a LPS.....	38
5.2.1	Stimulácia buniek A549 prostredníctvom širokého spektra cytokínov	39

5.2.2	Stimulácia buniek THP-1 prostredníctvom LPS a rôznych cytokínov	39
5.3	Stanovenie IL-33 v supernatantoch buniek – metóda ELISA	40
5.4	Stimulácia THP-1 buniek pomocou kalcitriolu (1α , 25 – dihydroxy-vitamín D3)	41
5.5	Stanovenie CD-14 na THP-1 bunkách pomocou metódy prietokovej cytometrie	41
5.6	Indukcia nekrózy u buniek prostredníctvom opakovaného zmrazovania	41
5.7	Stanovenie IL-1 α a IL-1 β v supernatantoch buniek metódou LUMINEX	42
6	Výsledky	44
6.1	Efekt rôznych cytokínov a LPS na sekréciu interleukínu 33 bunkami THP-1 a A549 ..	44
6.2	Diferenciácia THP-1 promonocytov prostredníctvom kalcitriolu (1α , 25 – dihydroxy- vitamín D3) na maturované monocyty	44
6.3	Efekt pôsobenia vitamínu D3 a LPS na expresiu molekuly CD14.....	44
6.4	Vplyv nekrózy na koncentráciu cytokínov IL-33, IL-1 α a IL-1 β v supernatante THP-1 a A549 buniek	45
6.4.1	IL-1 α	45
6.4.2	IL-1 β	47
6.4.3	IL-33.....	50
7	Diskusia	51
8	Použitá literatúra	55

1 Zoznam použitých skratiek

<i>Ala</i>	zvyšok aminokyseliny alanínu
<i>AP-1</i>	activator protein-1
<i>APC</i>	bunky prezentujúce antigén (antigen presenting cells)
<i>AR</i>	alergická rinitída
<i>Asp</i>	zvyšok kyseliny asparágovej
<i>ATP</i>	adenozíntrifosfát
<i>calpain</i>	neutrálna proteáza aktivovaná vápnikom (calcium-activated neutral protease)
<i>CBM</i>	motív viažuci sa na chromatín (chromatin-binding motív)
<i>CD</i>	diferenciačný antigén (cluster of differentiation)
<i>cDNA</i>	komplementárna deoxyribonukleová kyselina (complementary deoxyribonucleic acid)
<i>COX-2</i>	cyklooxygenáza 2
<i>DAMP</i>	štruktúra asociovaná so situáciou, keď dôjde v organizme k poškodeniu (damage associated molecular pattern)
<i>DC</i>	dendritické bunky (dendritic cells)
<i>DMSO</i>	dimethylsulfoxid
<i>EAE</i>	experimentálna autoimunitná encefalomyelitída
<i>EDTA</i>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<i>ELISA</i>	z ang. enzyme-linked immunoabsorbent assay
<i>ERK</i>	kináza regulovaná extracelulárnym signálom (extracellular signal-regulated kinase)
<i>FBS</i>	fetálne bovinne sérum (fetal bovine serum)
<i>FGF</i>	rastový faktor fibroblastov (fibroblast growth factor)
<i>FMF</i>	familiárna stredomorská horúčka (familial Mediterranean fever)

GPI	glykosylfosfatidylinositol
HEV	cievy s vysokým endotelom (high endothelial venules)
HLA	hlavný ľudský (histokompatibilný) antigén (human leukocyte antigen)
HMGB1	z ang. high mobility group box 1 protein
IBD	idiopatické črevné zápalové ochorenia (inflammatory bowel disease)
ICAM-1	medzibunková adhezívna molekula-1 (intercellular adhesive molecule-1)
ICE	enzým štiepiaci IL-1 β (IL-1 β converting enzyme)
IFN	interferón
Ig	imunoglobulín
IκBα	α inhibítor nukleárneho faktoru κ B (inhibitor of NF- κ B α)
IL	interleukín
IRAK	kináza viažuca sa na IL-1 receptor (IL-1R associated kinase)
IL-1R	IL-1 receptor typu I., alebo aj označenie pre rodinu receptorov viažucich sa na IL-1
IL-1Ra	antagonista receptoru pre IL-1 (IL-1 receptor antagonist)
IL-1RAcP	prídavný proteín IL-1R (IL-1 receptor accessory protein)
IMDM	z ang. Iscove's modified Dulbecco's medium
iNOS	indukovateľná syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
IRAK	kináza asociujúca s IL-1 receptorom (IL-1R Associated Kinase)
JNK	c-Jun N-terminálna kináza
kDa	kilodalton (jednotka molekulovej hmotnosti)
KSHV	z ang. Kaposi sarcoma herpesvirus
LAP	peptid spojovaný s latenciou (latency associated peptide)
LPS	lipopolysacharid
LTBP	proteín viažuci sa na latentný TGF- β (latent TGF- β -binding protein)

<i>Mal</i>	adaptorová molekula podobná MyD88 (MyD88-adapter-like)
<i>MAPK</i>	mitogénom aktivovaná proteínkináza (mitogen-activated protein kinase)
<i>MHC</i>	hlavný histokompatibilný komplex (major histocompatibility complex)
<i>mRNA</i>	informačná ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
<i>MyD88</i>	faktor podieľajúci sa na diferenciacii myeloidnej línie buniek-88 (myeloid differentiation primary response protein 88)
<i>NF-κB</i>	jadrový faktor κB (nuclear factor-κB)
<i>NF-HEV</i>	jadrový faktor ciev s vysokým endotelom (nuclear factor of high endothelial venules)
<i>NK</i>	prirodzený zabíjač (natural killer)
<i>NLS</i>	jadrová lokalizačná sekvencia nuclear localization sequence)
<i>PAF</i>	faktor aktivujúci krvné doštičky (platelet activating factor)
<i>PAMP</i>	štruktúra charakteristická pre patogénne mikroorganizmy (pathogen-associated molecular pattern)
<i>PBMC</i>	mononukleárne bunky periférnej krvi (peripheral blood mononuclear cells)
<i>PBS</i>	fosfátový izotonický roztok (phosphate buffered saline)
<i>PE</i>	fýkoerytrín
<i>PGE2</i>	prostaglandín E2
<i>PLD</i>	fosfolipáza D (phospholipase D)
<i>PRR</i>	receptor rozpoznávajúci určité štruktúry (pattern recognition receptor)
<i>ROS</i>	reaktívne kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
<i>RPMI</i>	z angl. Roswell Park Memorial Institute medium
<i>SIF</i>	stredná intenzita fluorescencie
<i>SIGIRR</i>	molekula príbuzná IL-1R obsahujúca jednu imunoglobulínovú doménu (single

	immunoglobulin interleukin-1 receptor related-molecule)
<i>sIL-1R</i>	solubilná molekula IL-1R
<i>SLE</i>	systemový lupus erytematodes
<i>SPHK</i>	z ang. sphingosine kinase
<i>TIR</i>	Toll/Interleukin-1 receptor doména
<i>TGF</i>	transformujúci rastový faktor (transforming growth factor)
<i>Th</i>	pomocný T lymfocyt (T helper lymphocyte)
<i>THP-1dif</i>	THP-1 bunky diferencované prostredníctvom vitamínu D3
<i>TLR</i>	receptor skupiny Toll (Toll-like receptor)
<i>TNF</i>	faktor nekrotizujúci nádory (tumor necrosis factor)
<i>TRAF6</i>	faktor- 6 asociovaný s TNF receptorom (TNF-receptor associated factor 6)
<i>VCAM-1</i>	cievna adhezívna molekula -1 (vascular cell adhesion molecule-1)
<i>VEGF</i>	rastový faktor cievneho epitelu (vascular endothelial growth factor)
<i>wt</i>	pôvodný, nemutovaný (napr. gén, myšia línia) (wild type)

2 Úvod

Cytokíny sú základnými regulátormi imunitného systému. Je o nich dobre známe, že na bunky pôsobia naviazaním sa na špecifické membránové receptory. V poslednej dobe však pribúdajú dôkazy, že to nie je jediná cesta, ako prejavujú svoju biologickú aktivitu. Interleukín 33 (IL-33) je jedným z mála proteínov, ktoré majú tzv. „duálnu“ funkciu. V jeho amino-terminálnej časti sa nachádza sekvencia, vďaka ktorej môže byť translokovaný do jadra. Tu interaguje s transkripčným faktorom NF- κ B (z ang. Nuclear Factor- κ B), čím mu znemožní naviazať sa na svoju cieľovú DNA. Pôsobí teda ako represor génovej transkripcie závislej na faktore NF- κ B. Okrem toho na cieľové bunky pôsobí aj ako cytokín - naviazaním sa na svoj špecifický receptor ST-2 (rodina IL-1 receptorov) spúšťa signálne dráhy, ktoré naopak vedú k aktivácii molekúl NF- κ B a AP-1 (z ang. Activator Protein) a taktiež k aktivácii MAPK signalizácie (z ang. Mitogen-Activated Protein Kinase). Aktivácia týchto jadrových faktorov vedie k zvýšeniu expresie génov prozápalových cytokínov IL-1 β , IFN- γ či TNF- α , a taktiež zabezpečuje prežívanie, adhéziu či degranuláciu cieľových buniek. IL-33 môže teda pôsobiť na NF- κ B dvoma mechanizmami s opačným účinkom- pri intrakrinnom pôsobení jeho aktivitu tlmí, pri parakrinnom pôsobení ju naopak stimuluje. Regulácia týchto procesov zostáva zatiaľ neobjasnená.

Mechanizmy zodpovedné za syntézu, štiepenie a sekréciu IL-33 sú predmetom mnohých štúdií, do dnešného dňa však neboli uspokojivo odhalené. Výsledky sú často rozporuplné a vzájomne si odporujú. Táto práca sa snaží poskytnúť ucelený pohľad na dosiaľ známe poznatky o IL-33 a experimentálne overuje viaceré mechanizmy, ktoré by sa na základe znalostí iných cytokínov a na základe faktov známych o IL-33 mohli podieľať na regulácii jeho produkcie a sekrécie mimo bunku.

Máloktorý cytokín je produkovaný do extracelulárneho priestoru konštitutívne, bunky ich zvyčajne začnú sekretovať až ako odpoveď na konkrétny podnet. Tým býva zväčša pôsobenie iného cytokínu či molekuly endogénneho alebo aj exogénneho pôvodu. V experimentálnej časti tejto práce sme sa preto rozhodli najskôr zistiť, či je ovplyvňovaná sekrécia interleukínu 33 po stimulácii epiteliálnych buniek a monocyto-makrofágovej línie prostredníctvom cytokínov TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-13, IL-33, TGF- β a IL-10 či prostredníctvom LPS.

Ďalšia časť tejto práce je venovaná overovaniu hypotézy, že IL-33 funguje ako tzv. alarmín. Počas posledných 15 rokov sa vedci snažia pochopiť, ako je imunitný systém schopný rozpoznať prítomnosť cudzích patogénov prípadne zistiť, že došlo k poškodeniu tkaniva. Mnohobunecné organizmy detegujú patogény vďaka skupine receptorov PRR (z ang. Pattern Recognition Receptors), ktoré rozpoznávajú tzv. PAMP (z ang. Pathogen-Associated Molecular Patterns) štruktúry. Tieto štruktúry sú evolučne veľmi konzervované, zdieľané viacerými

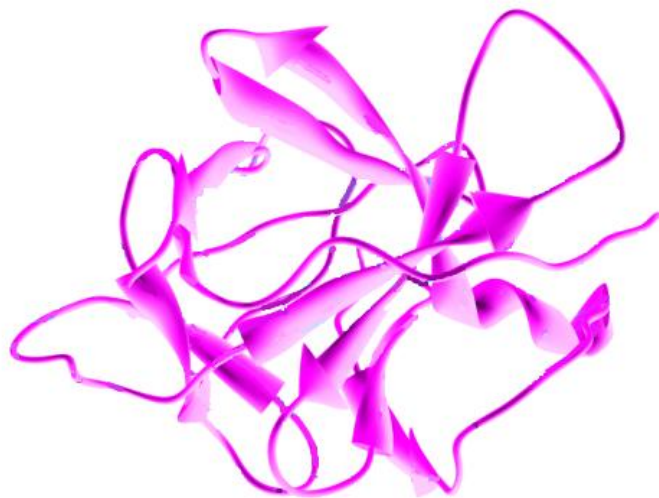
mikroorganizmami, sú často nevyhnutné pre ich život. Vyskytujú sa výlučne na povrchu mikroorganizmov, nie sú však prítomné na bunkách organizmu vlastných. Sú teda spoľahlivým signálom pre aktiváciu imunitného systému. Alarmíny sú zasa molekulami endogénneho pôvodu, ktoré sú uvoľňované z poškodených alebo mŕtvych buniek. Pri kludovom stave sa v extracelulárnom priestore vôbec nenachádzajú. Tak je umožnené bunkám imunitného systému detegovať zničené bunky či tkanivá. Endogénne alarmíny a exogénne PAMP tak fungujú ako spúšťače imunitnej reakcie a dohromady sú označované ako molekulárne štruktúry prítomné pri poškodení organizmu, tzv. DAMP (z ang. Damage-Associated Molecular Patterns). Interleukín 33 je považovaný za alarmín, ktorý sa z buniek uvoľňuje pri nekróze. Cieľom mojej práce bolo zistiť, či nekróza indukovaná u monocyto-makrofágovej línie THP-1 pomocou zmrazovania umožňuje interleukínu 33 dostať sa do extracelulárneho priestoru. Taktiež som sa pokúsila vyriešiť otázku, či je rozdiel v produkcii IL-33 u neaktivovaných THP-1 buniek a u buniek diferencovaných prostredníctvom vitamínu D3, ktoré boli aktivované prostredníctvom LPS. Pre porovnanie bol sledovaný vplyv nekrózy, diferenciácie a aktivácie buniek aj na uvoľňovanie príbuzných cytokínov IL-1 α a IL-1 β .

IL-33 je považovaný za pleiotropný cytokín. Má schopnosť stimulovať bunky nešpecifickej, ale aj špecifickej imunitnej odpovede a zohráva dôležitú úlohu pri patogenéze viacerých chorôb, ako je napr. reumatoidná artritída, roztrúsená skleróza, chronické zápalové ochorenia čriev, astma či alergické reakcie. Porozumenie jeho biológii má preto praktický význam z dôvodu jeho možného terapeutického využitia v budúcnosti.

3.1.1 Interleukín 1 α (IL-1 α)

Podobne ako IL-33, aj IL-1 α (Obr. č.2) patrí medzi duálne cytokíny žijúce akoby dvojité život-sú uvoľňované, aby mohli sprostredkovať svoju autokrinnú či parakrinnú funkciu, ale taktiež majú intrakrinnú úlohu, pôsobia na materskú bunku ako jadrové faktory. IL-1 α je prvým cytokínom, u ktorého bola zistená takáto aktivita. Po stimulácii IL-1 α bolo pozorované naakumulovanie IL-1 α v jadre (*Mizel et al. 1987*). IL-1 α v úlohe jadrového faktoru podnecuje transkripciu génov prozápalových cytokínov. Ako IL-1 β a IL-18, aj IL-1 α je syntetizovaný vo forme prekursorového proteínu. Pro-IL-1 α je dlhý 31 kDa a je štiepený calpain proteázou (z ang. calcium-activated neutral protease). Calpain proteáza odstráni N-terminálnu prodoménu a tak vzniká 17 kDa dlhý maturovaný proteín (*Kobayashi et al. 1990*). Ten je pri poškodení bunky uvoľňovaný do extracelulárneho priestoru, kde pôsobí ako alarmín (*Eigenbrod et al. 2008*). V niektorých typoch buniek (napr. endoteliálne bunky) k tomuto štiepeniu nedochádza a v bunke sa hromadí prekursor IL-1 α . A pretože na N-terminálnej doméne sa nachádza jadrová lokalizačná sekvencia (NLS, z ang. Nuclear Localization Sequence), prekursor sa dostávajú do jadra a tu sa prostredníctvom N-terminálnej kyslej domény viažu na rôzne jadrové cieľové proteíny vrátane histónových acetyltransferáz p300 a PCAF a rozbiehajú expresiu prozápalových génov (*Buryskova et al. 2004*), (*Maier et al. 1994*), (*Werman et al. 2004*).

IL-1 α sa v extracelulárnom priestore nachádza len po uvoľnení z nekrotizujúcich buniek, za kľudových podmienok ho nájdeme v cytoplazme či jadre buniek, kde plní svoju intrakrinnú úlohu, alebo je viazaný k cytoplazmatickej membráne. Nachádza sa na povrchu monocytov a makrofágov po stimulácii in vitro. Táto membránová forma je biologicky aktívna, napr. zvyšuje produkciu IL-8 (*Dinarello 1996*), (*Kaplanski et al. 1994*).



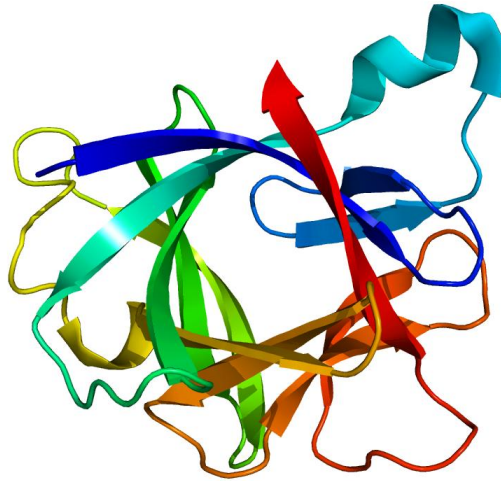
Obr. č. 2: Stužkový diagram znázorňujúci štruktúru IL- α . (Upravené podľa obrázka na stránke <http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/135>)

3.1.2 Interleukín 1 β (IL-1 β)

IL-1 β je multifunkčný cytokín, ktorý má vplyv na takmer všetky typy buniek. Pôsobí samostatne, ale aj v kombinácii s inými cytokínmi. Je predovšetkým hlavným mediátorom zápalu a iniciuje a/alebo amplifikuje široké spektrum mechanizmov spojených s prirodzenou imunitou a so schopnosťou organizmu odpovedať na prítomnosť mikroorganizmov a tkanivového poškodenia. Má aj pyrogénne účinky, už v minimálnych koncentráciách spôsobuje horúčku, hypotenziu, produkciu proteínov akútnej fázy a produkciu prozápalových cytokínov ako je napríklad IL-6. Produkovaný je najmä krvnými monocytmi.

IL-1 β iniciuje aktivitu cyklooxygenázy 2 (COX-2), fosfolipázy typu 2 a indukovateľnej syntázy oxidu dusnatého (iNOS, z ang. inducible Nitric Oxide Synthase). Pre bunky to znamená, že po pôsobení IL-1 β začnú produkovať veľké množstvo prostaglandínu E2 (PGE2), faktoru aktivujúceho krvné doštičky (PAF, z ang. Platelet Activating Factor) a oxidu dusnatého (NO). Zvyšuje aj produkciu adhezívnych molekúl ako je intercelulárna adhezívna molekula 1 (ICAM-1, z ang. InterCellular Adhesive Molecule-1) na mezenchymálnych bunkách alebo vaskulárna adhezívna molekula 1 (VCAM-1, z ang. Vascular Cell Adhesion Molecule-1) na epiteliálnych bunkách. To umožňuje vstup zápalových a imunokompetentných buniek do extravaskulárneho priestoru. Funguje aj ako angiogenetický faktor - zvyšuje expresiu vaskulárneho endotelového rastového faktoru (VEGF, z ang. Vascular Endothelial Growth Factor) a tak podporuje rast ciev. To znamená, že sa podieľa na kontrole angiogenézy nádorov a ovplyvňuje aj invazívnosť rôznych nádorových buniek (*Voronov et al. 2003*). Taktiež hrá úlohu pri chorobách poškodzujúcich kĺby a kosti, pretože indukuje produkciu kolagenáz synoviálnymi bunkami a metaloproteináz chondrocytmi (*Verbruggen 2006*). Zvýšené hladiny tohto cytokínu boli nájdené v sérach pacientov viacerých dedičných chronických autoimunitných syndrómov- napr. familiárna stredomorská horúčka (FMF, z ang. Familial Mediterranean Fever), dna, systémová juvenilná idiopatická artritída, Muckle –Wellsov syndróm a mnohé iné (*Church et al. 2008*). U všetkých týchto chorôb bolo potvrdené, že nadmerná produkcia IL-1 β je nielen príznakom, ale aj samotnou príčinou týchto chorôb.

Transkripčia IL-1 β môže byť spustená rôznymi podnetmi, napríklad cez PAMP ako je napríklad LPS, alebo je indukovaná rôznymi prozápalovými cytokínmi ako TNF α , IFN α , IFN β a aj samotným IL-1 β . Bunky ako napr. monocyty vyžadujú ešte aj pomocný signál- nestačí im len indukcia jedným z PAMP. Napríklad stimulácia LPS spôsobí len nízku hladinu sekrécie IL-1 β , zatiaľ čo v cytoplazme sa nahromadí množstvo pro-IL-1 β . Pomocným signálom môže byť extracelulárne ATP, ktoré cez receptor P2X7R spôsobí eflux K⁺ kationov a tak aktivuje ICE (z ang. IL-1 β Converting Enzyme) a následnú masívnu sekréciu IL-1 β (*Ferrari et al. 2006*).



Obr.č.3: Stužkový diagram znázorňujúci štruktúru IL-1 β (<https://www.ucytech.com/interleukin-1>)

3.1.3 Interleukín 33

Stredom záujmu našich experimentov je interleukín-33, nevšedný člen IL-1 rodiny, ktorý sa v mnohých ohľadoch vymyká predstavám o typickom cytokíne. Má totiž duálnu funkciu - okrem toho, že pôsobí ako klasický cytokín, funguje po translokácii do jadra ako transkripčný represor. Možnosť, že cytokíny môžu pôsobiť dvoma tak rozdielnymi mechanizmami bola objavená nedávno, medzi ďalšie známe duálne cytokíny patrí aj IL-1 α a HMGB-1 (z ang. High Mobility Group Box 1 protein). Rúškom tajomstva je neustále zahalený aj spôsob, ako je IL-33 uvoľňovaný do extracelulárneho priestoru. V našich pokusoch sme sa snažili nájsť dôkazy podporujúce teóriu o tom, že IL-33 je vylučovaný iba pri nekróze buniek a slúži tak ako alarmín - proteín upozorňujúci organizmus na možné nebezpečenstvo.

Prvýkrát sa s IL-33 vedci stretli už v roku 1999, keď porovnávali expresiu génov vo vazospastických mozgových artériách psov pred subarachnoidálnym krvácaním a po ňom. Označili ho ako „DVS-27“ (*Onda et al. 1999*). O štyri roky neskôr bol IL-33 identifikovaný inou skupinou ako nukleárny proteín exprimovaný v bunkách HEV (z ang. High Endothelial Venules – venuly s vysokým endotelom; sú to venuly so špecializovaným endotelom umožňujúcim efektívnu migráciu lymfocytov cez cievnú stenu, nachádzajú sa v sekundárnych lymfatických orgánoch), v tomto prípade ho pomenovali NF-HEV (z ang. Nuclear Factor from HEV) (*Baekkevold et al. 2003*). V roku 2005 bol IL-33 znovuobjavený pomocou metód bioinformatiky - profil „typického člena IL-1 rodiny“ vytvorený vďaka známym sekvenciám ostatných členov IL-1 rodiny bol vyhľadávaný v sekvenčnej databáze GenBank. Bolo taktiež zistené, že IL-33 je ligandom ST-2 receptora (*Schmitz et al. 2005*). V súlade s nomenklatúrou IL-1 rodiny, ktorú v roku 2001 navrhol J. Sims (*Sims et al. 2001*), je tento proteín systematicky nazývaný aj IL-1F11, v literatúre sa však takmer výlučne používa pomenovanie interleukín 33 (IL-33).

U ľudí je gén pre IL-33 lokalizovaný na chromozóme 9p24.1, u myši na chromozóme 19qC1 (*Schmitz et al. 2005*).

IL-33 hrá dôležitú rolu v mechanizmoch viacerých zápalových, infekčných či autoimunitných chorôb. Pre predstavu, že IL-33 je naozaj pleiotropným cytokínom, tzn. že má v organizme uplatnenie v rozmanitých procesoch, uvádzam zopár príkladov chorôb a chorobných stavov, pri ktorých sa IL-33 podieľa na patogenéze, prípadne naopak svojim pôsobením mierni ich priebeh.

Roztrúsená skleróza

Zvýšená hladina mRNA IL-33 a aj ST-2 receptoru bola nameraná v mieche myši, ktoré trpeli tzv. EAE (experimentálna autoimunitná encefalomyelitída, slúži ako zvierací model pre roztrúsenú sklerózu). Pokiaľ bola myšiam v počiatočnej fáze vývoja EAE intraperitoneálne podaná neutralizačná protilátka anti-IL-33, došlo k pomalšiemu vývoju choroby, taktiež klinické a patologické prejavy boli potlačené (*Li et al. 2012*).

Reumatoidná artritída

Bolo preukázané, že u ľudí trpiacich reumatoidnou artritídou sa IL-33 nachádza v synoviálnych tkanivách postihnutých kĺbov vo zvýšenom množstve. IL-33 posúva reakciu organizmu k Th1/Th17 imunitnej odpovedi pravdepodobne aktiváciou mastocytov. Mastocyty exprimujú na svojom povrchu receptor ST-2 (*Gächter et al. 1996*), po aktivácii prostredníctvom IL-33 začnú produkovať IL-1, IL-6, IL-13 a viaceré chemokíny (*Allakhverdi et al. 2007*), (*Ho et al. 2007*), (*Moulin et al. 2007*). IL-1 a IL-6 indukujú bunky Th17, ktoré sú kľúčovou bunkovou líniou spôsobujúcou patologické zmeny pri artritíde (*Nakae et al. 2003*). IL-33 tak významne prispieva k vývoju tejto choroby (*Xu et al. 2008*).

Astma

Podľa najnovších poznatkov astma nemá jediný fenotyp, ale existuje viacero mechanizmov, ktoré môžu spôsobiť symptómy typické pre túto chorobu. U jedného typu astmy hrajú významnú rolu práve cytokíny IL-33 a IL-5 (*Poon et al. 2012*). IL-33 je schopný nasmerovať vývoj naivných T lymfocytov smerom k Th2 lymfocytom produkujúcim IL-5, a to dokonca nezávisle na IL-4 (*Kurowska-Stolarska et al. 2008*). Cytokín IL-5 je zasa aktivátorom eozinofilov, ktoré sú hlavnou bunkovou líniou zodpovednou za prejavy astmy.

Zápalové ochorenia čriev (Crohnova choroba, ulcerózna kolitída)

Myšiam s experimentálne vyvolanou chronickou kolitídou bol intraperitoneálne podávaný IL-33 počas začiatkových fáz vývoja nemoci aj v jej chronickom štádiu. Pre chronické zápalové ochorenia čriev je charakteristický Th1 typ imunitnej odpovede. Pôsobením IL-33 došlo

k posunutiu rovnováhy smerom k Th2 odpovedi (zníženie hladiny IFN- γ , naopak zvýšenie hladiny cytokínov spojených s Th2 imunitnou reakciou) a tým k došlo k potlačeniu zápalových prejavov (*Groß et al. 2012*). Expresia mRNA IL-33 bola taktiež preukázaná u endoteliálnych buniek odobraných z chronicky zapálených tkanív pacientov trpiacich Crohnovou chorobou (*Carriere et al. 2007*) či u kolonocytov odobraných pacientom s ulceróznou kolitídou (*Seidelin et al. 2010*). Ďalšia štúdia preukázala expresiu IL-33 u myofibroblastov zo subepiteliálnej vrstvy čreva postihnutého ulceróznou kolitídou (*Kobori et al. 2010*).

Systémový lupus erytematodes (SLE)

U pacientov trpiacich SLE bola zisťovaná závislosť medzi závažnosťou ochorenia a koncentráciou proteínu IL-33 a solubilného ST2 receptora (sST2) v sére. Bolo zistené, že hladina sST2 je u pacientov so závažnejšou formou ochorenia zvýšená, zatiaľ čo hladina proteínu IL-33 nebola vo väčšine vzoriek merateľná, prípadne bola veľmi nízka (*Mok et al. 2010*). Hladina IL-33 v sére pacientov trpiacich SLE bola meraná aj v ďalšej štúdii, ktorá bola zameraná na čínsku populáciu, výsledky boli obdobné. Proteín bol v sérach nameraný, opäť však len v nízkych koncentráciách a nie vo všetkých prípadoch (*Yang et al. 2010*).

Alergická rinitída

V experimente skúmajúcom súvislosť IL-33 s alergickou rinitídou (AR) boli využité IL-33 knock-out myši. V porovnaní s kontrolnými myšami boli prejavy alergickej rinitídy indukovanej prostredníctvom peľu ambrózie (*Ambrosia artemisiifolia*) u IL-33 $-/-$ myši značne potlačené (*Haenuki et al. 2012*). Pokiaľ sú nazálne epiteliálne bunky vystavené peľu ambrózie, dochádza k okamžitému uvoľneniu IL-33, ktorý stimuluje eozinofily, bazofily a aj mastocyty. Tie sú zodpovedné za uvoľnenie mediátorov alergického zápalu, ktoré spôsobujú symptómy AR (*Haenuki et al. 2012*).

Infarkt myokardu

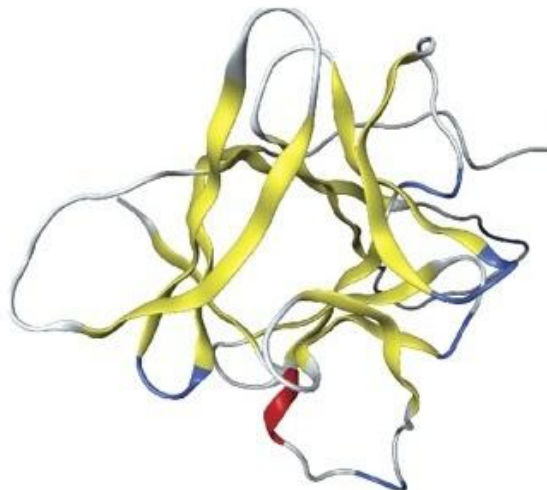
Zaujímavú úlohu zohráva IL-33 aj pri srdcovom infarkte. Kardiomyocyty vystavené pôsobeniu IL-33 *in vitro* sú pri hypoxii menej náchylné k apoptóze. IL-33 teda pôsobí protektívne pri infarkte myokardu (*Seki et al. 2009*). Iná štúdia odhalila, že signalizácia IL-33/ST-2 sa spúšťa pri mechanickom preťažení obehového systému a jeho úlohou je zmierniť následky možného poškodenia (*Sanada et al. 2007*). IL-33 je však v tomto prípade dvojsečnou zbraňou. U myši dochádza po vystavení rekombinantnému IL-33 k zvýšenému výskytu eozinofilov v perikarde, a k prejavom autoimunity (*Abston et al. 2012*).

Anafylaktický šok

Zvýšená hladina IL-33 bola nameraná u atopických pacientov s akútnou anafylaktickou reakciou,. Taktiež u myších modelov vhodných pre experimenty skúmajúce mechanizmy anafylaktického šoku spôsobilo podanie IL-33 na antigéne nezávislý systémový anafylaktický šok (*Pushparaj et al. 2009*).

3.1.4 Štruktúra IL-33

IL-33 obsahuje rovnako ako ostatní členovia IL-1 rodiny evolučne konzervovanú štrukturálnu doménu utvorenú z 12 β -strandov. Tie sú usporiadané do charakteristického β -trojlístkového (ang. β -trefoil) motívu (*Priestle et al. 1988*), (*Zhang et al. 1991*). IL-1/FGF doména sa skladá zo šiestich β -strandov, ktoré tvoria štruktúru vyzerajúcu ako súdok. Tá je stabilizovaná veľkými vnútornými hydrofóbnymi zvyškami. Ďalších 6 β -strandov tvorí akoby viečko na jednom konci (*Lingel et al. 2009*). Aminokyselinové zvyšky, ktoré sa nachádzajú na povrchu a ktoré tvoria slučky medzi jednotlivými β -strandami nie sú pre celkovú stabilitu štruktúry kľúčové a tak mohli v rámci evolúcie divergovať. Táto divergencia umožňuje evolúciu proteín : proteín interakcií, predovšetkým interakcií medzi ligandom a receptorom. Zaujímavé je, že v štruktúre IL-33 sa nachádza evolučne konzervovaná sekvencia ~8 aminokyselín vnútri slučky spájajúcej štvrtý a piaty β -strand (*Carriere et al. 2007*). Táto slučka sa neúčastní naväzovania na ST-2 receptor (*Lingel et al. 2009*), takže pravdepodobne môže byť dôležitá pre interakciu s iným proteínom.



Obr.č.4: Stužkový diagram štruktúry IL-33 (Smith 2011)

3.1.5 Expresia IL-33

IL-33 je exprimovaný v rozličných typoch buniek, rôznorodé príklady expresie mRNA aj proteínu IL-33 sú uvedené v tabuľke č.1.

Vedecký článok	Druh	Detegovaná forma	Vzorky	Podrobné informácie
Schmitz et al. 2005	myš	mRNA	orgán	Vysoká hladina: žalúdok, pľúca, miecha, mozog, koža Nízka hladina: lymfatické uzliny, slezina, pankreas, obličky, srdce
		mRNA	bunky	Dendritické bunky kultivované z kostnej drene Makrofágy kultivované z kostnej drene, stimulované pomocou LPS
	človek	mRNA	bunky	Bunky hladkého svalstva v prieduškách, epiteliálne bunky priedušiek a periférnych dýchacích ciest Fibroblasty a keratinocyty z pľúc a kože, stimulované pomocou TNF- α a IL-1
Carriere et al. 2007	človek	mRNA	bunky	Endoteliálne bunky mandlí, endoteliálne bunky z čreva pacientov s Crohnovou chorobou, bunky zo synovia pacientov s RA, expresia v jadre buniek
Sanada et al. 2007	potkan	mRNA proteín proteín	bunky bunky orgán	Fibroblasty srdca Fibroblasty srdca, metóda Western blot Tkanivo zo stien srdcovej komory, Imunohistochemické metódy
Hayakawa et al. 2007	myš	mRNA	orgán	Týmus, pľúca, lymfatické uzliny, vaječníky, semenníky
Xu et al. 2008	človek	mRNA	bunky	Synoviálne fibroblasty pacientov s RA: stimulované pomocou TNF- α alebo TNF- α +IL-1
		proteín	orgán	Synoviálne membrány odobrané pacientom s RA, detekcia pomocou imunohistochemických metód na tkanivových rezoch
Küchler et al. 2008	človek	proteín	orgán	Endoteliálne bunky ciev kože, tenkého čreva, pupočnej vény a pľúc, HUVEC bunky
Kurowska-Stolarska et al. 2008	myš	proteín	bunky	Bunečná línia F4/80+ CCR – alveolárne makrofágy
Moussion et al. 2008	človek	proteín	bunky	Endoteliálne bunky veľkých a malých ciev (hrubé črevo, tenké črevo, žalúdok, obličky, pľúca, pečeň, vajíčkovody, prostata, kostrové svaly, koža) Epiteliálne bunky (žalúdok, tonzilárne krypty a slinné žľazy) HEV endoteliálne bunky, fibroblastické retikulárne bunky (interfolikulárna T-bunečná oblasť) a keratinocyty
Sakashita et al. 2008	človek	proteín	sérum	Sérum pacientov so sennou nádchou (ang. Japanese cedar pollinosis)
Chapuis et al. 2009	človek	mRNA	orgán	Mozog z pacientov s Alzheimerovou chorobou
		proteín	orgán	Malé cievky mozgových blán a povrchovej časti mozgovej kôry
			bunky	Mozgové endoteliálne bunky a bunky hladkého svalstva v cievach

Vedecký článok	Druh	Detegovaná forma	Vzorky	Podrobné informácie
Palmer et al. 2009	myš	mRNA	orgán	Zápalové lézie u myší s artritídou (model artritídy indukovanej prostredníctvom kolagénu)
	človek	mRNA proteín	bunky orgán bunky	Synoviálne fibroblasty: stimulácia pomocou IL-1, TNF, alebo TNF+IL-1 Synovium pacientov s RA HEV endoteliálne bunky a bunky výstelky synovia odobrané zo synovia pacientov s RA Synoviálne fibroblasty: stimulované pomocou TNF a IL-1
Wood et al. 2009	človek	mRNA	bunky	Preadipocyty, adipocyty: stimulované pomocou TNF, Preadipocyty vystavené hypoxii(1%O ₂)
Matsuda et al. 2009	človek	mRNA	bunky	Imortalizované spojovkové bunečné línie, spojovkové fibroblasty: stimulované pomocou IL1
		proteín	orgán bunky	Bunky odobrané z papíl pacientov s atopickou keratokonjunktivitídou Cievne endoteliálne a epiteliálne bunky odobrané z papíl pacientov s atopickou keratokonjunktivitídou Spojovkové fibroblasty: stimulované pomocou IL-1 alebo IL-1+IFN γ (pro-IL-33) Imortalizované spojovkové bunečné línie, spojovkové fibroblasty (štiepený IL-33)
Pushparaj et al. 2009	človek	mRNA proteín	orgán sérum orgán	Koža odobraná pacientom s atopickou dermatitídou Atopickí pacienti majúci anafylaktický šok Koža odobraná pacientom s atopickou dermatitídou
Préfontaine et al. 2009	človek	mRNA	orgán bunky	Plúca pacientov s astmou Bunky hladkého svalstva z dýchacích ciest pacientov s astmou, primárne bunky hladkého svalstva z dýchacích ciest pacientov s astmou: stimulované pomocou TNF
		proteín	bunky	Bunky hladkého svalstva z dýchacích ciest pacientov s astmou, primárne bunky hladkého svalstva z dýchacích ciest pacientov s astmou: stimulované pomocou TNF
Lüthi et al. 2009	človek	proteín	bunky	THP-1 bunečná línia: stimulovaná pomocou LPS, nekrotické bunky
Kurowska-Stolarska et al. 2008	človek	proteín	bunky	Epiteliálne bunky pľúc odobrané pacientom s astmou
Seidelin et al. 2010	človek	mRNA	bunky	Kolonocyty odobrané pacientom s ulceróznou kolitídou
		proteín	bunky	Kolonocyty odobrané pacientom s ulceróznou kolitídou (Western blot)
Matsuyama et al. 2011	človek	proteín	sérum	Sérum pacientov s RA
			orgán	Synoviálna tekutina odobraná pacientom s RA
			bunky	Synoviocyty podobné fibroblastom odobrané pacientom s RA

Vedecký článok	Druh	Detegovaná forma	Vzorky	Podrobné informácie
Ohno et al. 2009	myš	mRNA	bunky	Peritoneálne makrofágy, slezinné dendritické bunky: stimulované pomocou LPS
		proteín	bunky	Mastocyty kultivované z kostnej drene: stimulované pomocou IgE alebo IgE+antigén Peritoneálne makrofágy: stimulované pomocou LPS, Mastocyty kultivované z kostnej drene: stimulované pomocou IgE+antigén
Nishida et al. 2010	človek	proteín	bunky	Myofibroblasty odorané pacientom s chronickou pankteatitídou Pankreatické myofibroblasty: stimulované pomocou IL-1, TNF a LPS
Kobori et al. 2010	človek	mRNA, proteín	orgán	Lézie pacientov trpiacich ulceróznou kolitídou, proteín identifikovaný pomocou metódy Western blot a imunohistochemicky
Beltrán et al. 2009	človek	proteín	sérum	Sérum pacientov trpiacich ulceróznou kolitídou, Metóda ELISA
Marvie et al. 2009	myš	mRNA, proteín	orgán	Fibrotizovaná pečeň
	človek	mRNA, proteín proteín	orgán bunky	Fibrotizovaná pečeň Supernatanty pečeňových hviezdicových buniek stimulovaných prostredníctvom TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ
Masamune et al. 2010	človek		bunky	Pankreatické hviezdicovité bunky (stellate cells, SC), expresia IL-33 v jadre buniek, expresia zvýšená po stimulácii pomocou IL-1 β , TNF- α , PDGF, and IFN- γ
Yang et al. 2010	človek	proteín	sérum	Sérum pacientov trpiacich SLE, IL-33 nameraný len u niektorých pacientov,
Mok et al. 2010	človek	proteín	sérum	Sérum pacientov trpiacich SLE, IL-33 nameraný len u niektorých pacientov
Haenuki et al. 2012	myš	proteín	bunky	Nazálne epiteliálne bunky
	človek	mRNA	bunky	Nazálne epiteliálne bunky odobrané pacientom s AR x zdravá kontrola
	človek	proteín	bunky	Nazálne epiteliálne bunky odobrané pacientom s AR x zdravá kontrola
M Li et al. 2012	myš	mRNA	orgán	Miecha myši s EAE (experimentálna autoimunitná encefalomyelitída, slúži ako zvierací model pre roztrúsenú sklerózu)

Použitie skratky: PDGF- rastový faktor produkovaný krvnými doštičkami; RA- reumatoidná artritída; AR- atopická rinitída; SLE- systémový lupus erytematodes; HUVEC bunky- z ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells, čiže ľudské endotelálne bunky pochádzajúce z pupočnej cievy; HEV bunky- bunky pochádzajúce z ciev s vysokým endotelom (ang. high endothelial venules)

Tabuľka č. 1: Expresia IL-33. V tabuľke sú uvedené príklady expresie IL-33 vo forme mRNA aj proteínu, početnosť rôznych druhov buniek exprimujúcich IL-33 ukazuje jeho pleiotropný charakter.

3.1.6 IL-33 ako nukleárny faktor

Ako nukleárny proteín bol IL-33 identifikovaný ešte skôr, než bolo zistené, že funguje extracelulárne ako cytokín. Intrakrinne pôsobí napr. na epiteliálne bunky, pričom interaguje s nukleárnym chromatinom (*Baekkevold et al. 2003*).

Expresia endogénneho IL-33 bola popísaná aj u širokého spektra endoteliálnych buniek v rámci celého tela. Jednalo sa v zásade o nukleárnu, 30,7 kDa dlhú pro-IL-33 formu (*Carriere et al. 2007*), (*Küchler et al. 2008*), (*Moussion et al. 2008*). Aj N-terminálny fragment, ktorý vzniká štiepením pro-IL-33 prostredníctvom kaspázy-3, je schopný translokácie do jadra (*Ali et al. 2010*), ale jeho úloha zatiaľ nebola zistená. V prípade, že je pro-IL-33 v bunkách nadmerne exprimovaný, funguje ako transkripčný represor (*Carriere et al. 2007*). IL-33 prostredníctvom asociačnej domény (nachádza na amino-konci) interaguje s chromatinom a mitotickými chromozómami. Pomocou tejto domény sa naviaže do acidického vaku utvoreného z diméru histónov H2A-H2B na povrchu nukleozómu (*Roussel et al. 2008*). Veľmi zaujímavou skutočnosťou je, že rovnakým mechanizmom sa na mitotické chromozómy prichytáva genóm vírusu KSHV (z ang. Kaposi Sarcoma Herpes Virus) (*Barbera et al. 2006*). Zneužíva tak motív CBM (z ang. Chromatin-Binding Motiv) určený pre IL-33. Vďaka tomuto mimikry triku môže vírus latentne infikovať ľudské bunky a nepozorovaný v nich pretrvávajú dlhé obdobie (*Roussel et al. 2008*).

Najnovšie výskumy preukázali, že pro-IL-33 (teda neštiepená forma IL-33) po translokácii do jadra interaguje s transkripčným faktorom NF- κ B. Interakcia prebieha medzi N-terminálnou časťou IL-33 a N-terminálnou Rel homologickou doménou p65 patriacou NF- κ B. Vytvorenie tohto komplexu znemožní faktoru NF- κ B naviazať sa na svoje cieľové gény (I κ B α , TNF- α a C-REL). IL-33 vďaka vyviazaniu NF- κ B znižuje expresiu týchto génov a tým tlmí prozápalovú signalizáciu (*Ali et al. 2011*).

3.1.7 IL-33 ako extracelulárny cytokín

Interleukín 33 zohráva dôležitú úlohu pri imunitnej odpovedi realizovanej prostredníctvom CD4⁺ Th2 lymfocytov. Tento typ imunitnej odpovede je zodpovedný za vznik atopických chorôb (napr. astma či alergické reakcie) (*Umetsu et al. 2002*), ale na druhej strane je nevyhnutný pri obrane proti helmintovým infekciám (*Anthony et al. 2007*). Ako väčšina procesov, ktoré sú súčasťou obrany nášho organizmu, aj Th2 špecifická odpoveď je dvojsečnou zbraňou a mechanizmy odlišujúce „zdravú“ reakciu od tej patologickej zatiaľ nie sú preskúmané v dostatočnej miere (*Maizels 2005*).

Už pri objavení bol IL-33 spojovaný s Th2 imunitnou odpoveďou. Pôsobenie IL-33 na polarizované Th2 lymfocyty viedlo k produkcii cytokínov spojených s Th2 bunčnou odpoveďou. U myši bolo po intraperitoneálnom podaní IL-33 pozorovaná eozinofília,

splenomegália a zvýšená hladina imunoglobulínov. Taktiež došlo k histopatologickým zmenám v pľúcach a v gastrointestinálnom trakte (*Schmitz et al. 2005*). Na Th-2 lymfocyty pôsobí IL-33 aj ako chemoatraktant (*Komai-Koma et al. 2007*). IL-33 je schopný indukovať produkciu cytokínov účastniacich sa Th2 typu imunitnej odpovede u viacerých bunecných línii, nielen u Th2 lymfocytov (Kondo et al. 2008). Sú to napr. mastocyty (*Ho et al. 2007*), (*Allakhverdi et al. 2007*), bazofily (*Kondo et al. 2008*), (*Smithgall et al. 2008*), eozinofily (*Matsuba-Kitamura et al. 2010*), (*Stolarski et al. 2010*) či NKT a NK bunky (*Bourgeois et al. 2009*). Nedávne výskumy identifikovali bunecné populácie, ktoré sú súčasťou nešpecifickej imunity a pritom sa podieľajú na procesoch, ktoré vedú k spusteniu imunitnej odpovede závislej na CD4⁺ Th2 bunkách a taktiež vedú k zápalovým procesom na mukózných povrchoch. U dvoch z nich bol interleukín 33 identifikovaný ako jeden z hlavných aktivátorov. NH bunecná populácia (ang. Natural Helper cells) a tzv. nuocyty majú na svojom povrchu ST-2 receptor a na stimuláciu prostredníctvom IL-33 reagujú produkciou IL-5 a IL-13 (*Koyasu and Moro 2011*), (*Neill et al. 2010*). Toto priam ukážkové prepojenie nešpecifickej a špecifickej imunitnej odpovede nám opäť dokazuje, že tieto dva evolučne odlišne staré mechanizmy sú úzko prepojené.

3.1.8 ST-2 receptor

Gén ST-2 receptoru bol pôvodne identifikovaný ako gén, ktorý je indukovaný pri primárnej imunitnej odpovedi u línie BALB/c-3T3 (myšie fibroblasty). Exprimoval sa po pridaní séra alebo pri expresii onkogénnu (*Klemenz et al. 1989*), (*S Tominaga 1989*). V tom istom období ho objavili aj iné tímy vedcov a nazvali ho napríklad T1 (*Werenskiold et al. 1989*), Fit -1 (*Superti-Furga et al. 1991*) či DER4 (*Lanahan et al. 1992*). ST2 receptor je exprimovaný na povrchu mastocytov (*Gächter et al. 1996*), (*Moritz et al. 1998*) a taktiež sa nachádza na Th2 CD4⁺ lymfocytoch (*Löhning et al. 1998*). Neskôr bol ST-2 dokonca charakterizovaný ako špecifický bunkový marker, ktorý sa nachádza na Th2 lymfocytoch (a tak ich odliší od Th1 lymfocytov) a bola preukázaná jeho rola pri aktivácii Th2 lymfocytov (*Meisel et al. 2001*). Klinické a experimentálne pozorovania preukázali, že receptor ST-2 sa zúčastňuje zápalových procesov a je stimulovaný pri viacerých chorobách ako napríklad astma, pľúcna fibróza, reumatoidná artritída, kolagénová cievna choroba a septický šok. Dlhé roky bol ST-2 receptor skúmaný bez toho, aby bol známy jeho ligand. To sa zmenilo až v roku 2005, kedy bol identifikovaný práve IL-33.

ST-2 receptor je členom štruktúrnej rodiny IL-1R (receptory podobné IL-1 receptoru), ktorá je charakterizovaná tromi extracelulárnymi Ig-like opakovaniami a patrí do štruktúrnej superrodiny Toll-like/IL-1 receptorov. Všetky receptory tejto superrodiny obsahujú intracelulárnu Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) doménu. TIR doména tvorená ~160 aminokyselinami je zložená z centrálného β -skladaného listu (ang. B-sheet), ktorý má päť reťazcov. β -skladaný list je obklopený piatimi α -helixami, ktoré sú umiestnené na

cytozolickom konci proteínu (*Xu et al. 2000*). ST2 receptor má štyri izoformy: sST2, ST2L, ST2V a ST2LV. Solubilná (sST2) a transmembránová (ST2L) izoforma vznikajú z toho istého génu pôsobením odlišných promótorov, čím dochádza k expresii rozdielnej mRNA. Transmembránová izoforma ST2L je inkorporovaná v membráne, je zložená z troch extracelulárnych IgG domén, jednej transmembránovej domény a intracelulárnej TIR domény. Solubilný sST2 funguje podobne ako IL-1R typu II- vyvážuje IL-33 a pôsobí tak ako negatívny receptor. Nemá transmembránovú ani Toll-homologickú doménu (*Iwahana et al. 1999*). Pôsobenie sST2 na signalizáciu IL-33 je teda inhibičné - to sa potvrdilo zníženou produkciou Th2 cytokínov uvoľňovaných Th2 bunkami v prítomnosti sST2 (*Hayakawa et al. 2007*). ST2V a ST2LV vznikajú alternatívnym zostrihom (ang. splicing) pre-mRNA. U ST2V tak chýba tretina imunoglobulínového motívu a v C-terminálnej časti vzniká vďaka zostrihu hydrofóbny koniec (*Tominaga et al. 1999*), ST2LV má vystrihnutú transmembránovú doménu (*Iwahana et al. 2004*).

3.1.9 Štiepenie a sekrécia IL-33

Interleukín 33 je syntetizovaný ako 270 aminokyselín obsahujúca 30,7-kDa dlhá molekula. Pôvodne sa vedci domnievali, že sa jedná o prekursor IL-33, avšak viaceré novšie štúdie dokazujú, že práve táto forma je biologicky aktívna (*Talabot-Ayer et al. 2009*). Záhadou však ostáva, ako je IL-33 sekretovaný z buniek. Aby sa mohol naviazať na ST-2 receptor, musí byť uvoľnený do extracelulárneho priestoru. Avšak IL-33 mRNA je prepísaná bez signálnej sekvencie a pro-IL-33 vo svojej štruktúre neobsahuje signálny peptid rovnako ako prekursor takmer všetkých členov rodiny IL-1. Výnimkou je iba IL-1Ra (ang. IL-1 Receptor antagonist). Signálny peptid je nevyhnutný pre sekréciu proteínov cestou cez endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, ktorá je typická pre väčšinu sekretovaných cytokínov. To naznačuje, že v rámci evolúcie mali tieto proteíny pôvodne intracelulárne funkcie, ktoré môžu pretrvávať dodnes (*Werman et al. 2004*).

IL-33 nie je pravdepodobne sekretovaný ani prostredníctvom ďalšieho známeho mechanizmu, ktorý využívajú dvaja členovia IL-1 rodiny, IL-1 β a IL-18. Tie sú syntetizované ako 33 kDa dlhý prekursor pro-IL-1 β a 23 kDa dlhý prekursor pro-IL-18. Následne zotrývajú v cytozole, až kým nedôjde k aktivácii multiproteínového komplexu – inflamazómu, ktorý poskytne potrebný stimul pre zymogén pro-kaspázu-1. Vďaka tomuto stimulu sa pro-kaspáza-1 autokatalyticky rozštiepi na aktívny enzým kaspázu-1 (*Martinon et al. 2002*). Prostredníctvom kaspázy-1 sú prekursor pro-IL-1 β a pro-IL-18 štiepené na maturovanú formu a sekretované (*Black et al. 1989*), (*Akita et al. 1997*).

Prvé výskumy preukázali, že ľudský pro-IL-33 je in vitro štiepený prostredníctvom kaspázy-1, pričom vzniká C-terminálny 18-kDa dlhý fragment. Tento fragment bol dlho považovaný za

maturovanú formu, ktorá sa viaže na receptor ST2 a spúšťa bunecnú signalizáciu (*Schmitz et al. 2005*). Predpokladalo sa, že IL-33 je teda rovnako ako jeho blízki príbuzní štiepený kaspázou-1 aktivovanou cez inflamazóm. Podozrivé však bolo, že miesto štiepenia kaspázou-1 je evolučne konzervované len veľmi slabo (*Carriere et al. 2007*). Navyše toto štiepenie bolo pozorované len in vitro, in vivo nebolo potvrdené. Spojitosť kaspázy-1 s IL-33 a jeho sekréciou u živých buniek bola naznačovaná v dvoch štúdiách, po bližšom pohľade na experimenty je však zrejmé, že ani jedna štúdia priamo nedokazuje, že by IL-33 bol štiepený kaspázou-1 na biologicky aktívnu formu. V jednej boli kultivované myšie gliové bunky stimulované pomocou aktivátorov kaspázy-1. Došlo k sekrécii bioaktívnej formy IL-33 do supernatantov, ale veľkosť tejto formy nebola špecifikovaná (*Hudson et al. 2008*). Je teda možné, že k štiepeniu IL-33 vôbec nedošlo a aktivátory kaspázy-1 nepriamo ovplyvňujú sekréciu IL-33. V druhej štúdii bola aktivovaná kaspáza-1 u bunecnej línie THP-1 a supernatanty sa následne analyzovali pomocou metódy Western blot. S anti-IL-33 protilátkou reagovali 3 bandy. Najvýraznejšie reagoval produkt dlhý ~31 kDa, produkty dlhé 17 kDa a 20 kDa reagovali tiež, avšak iba minimálne (*Li et al. 2008*). Prítomnosť štiepných produktov, i keď nízka, naznačuje určitú mieru štiepenia, nie je však jasné, v akom rozsahu sa na tomto štiepení podieľa kaspáza-1.

Ďalší experiment jasne ukázal, že IL-33 nie je substrátom pre kaspázu-1 (*Talabot-Ayer et al. 2009*). Kaspáza-1 funguje ako endoproteináza, ktorá štiepi proteíny špecificky v mieste, kde sa nachádzajú aminokyseliny Asp-Xaa, pričom Xaa predstavuje malý, veľmi často hydrofóbny zvyšok. Nevyhnutne teda potrebuje pre svoju aktivitu prítomnosť zvyšku Asp (zvyšok kyseliny asparágovej) na pozícii -1 od miesta štiepenia. V tomto experimente bol pro-IL-33 nadmerne exprimovaný v myších bunkách 293T a následne boli bunecné lyzáty vystavené pôsobeniu kaspázy-1. Ako v predchádzajúcej štúdii, aj tu prevládala 30 kDa dlhá forma, bola však prítomná aj 20 kDa dlhá forma. Preto boli vytvorené 2 mutantné formy pro-IL-33, v ktorých bol Asp zvyšok nahradený Ala (alanínový zvyšok), kaspáza-1 teda prišla o svoje miesto štiepenia. Výsledky Western blotu po pridaní kaspázy-1 k mutovaným formám a wt pro-IL-33 sa však vôbec neodlišovali. Navyše bolo dokázané, že pro-IL-33 nepotrebuje pre svoju aktiváciu proteolytické štiepenie, biologicky aktívna je už pro-IL-33 forma (*Talabot-Ayer et al. 2009*), (*Lüthi et al. 2009*), (*Cayrol and Girard 2009*) Štiepenie kaspázou-1 skôr biologickú aktivitu IL-33 znižuje (*Cayrol and Girard 2009*).

Ďalšou kaspázou, ktorá bola skúmaná v súvislosti so štiepením IL-33 je calpain proteáza (z ang. calcium-activated neutral protease). Je to vápnikom aktivovaná cysteínová proteáza, ktorá je zodpovedná za štiepenie príbuzného cytokínu IL-1 α . V jednej štúdii bolo preukázané, že calpain proteáza štiepi pro-IL-33 in vivo (*Hayakawa et al. 2009*), v experimente boli použité epiteliálne aj endoteliálne bunecné línie. Na druhej strane dochádzalo k normálnemu uvoľňovaniu IL-33 aj u makrofágov, ku ktorým boli pridané inhibítory calpain proteázy prípadne boli deficientné pre

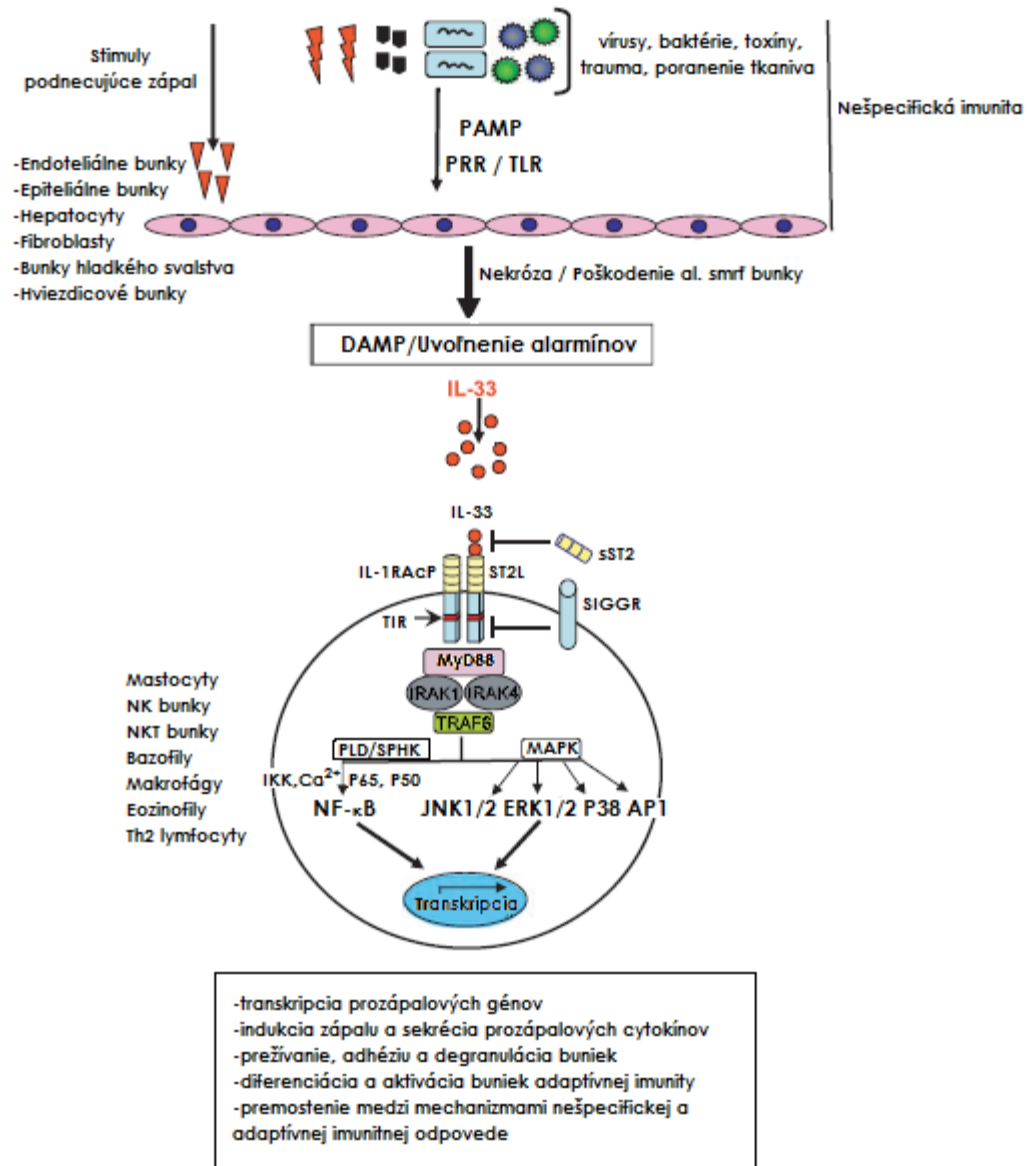
kaspázu-1. To naznačuje, že tieto endoproteázy nie sú nevyhnutné pre uvoľnenie IL-33 (*Ohno et al. 2009*).

Viacere štúdie odhalili, že IL-33 je štiepený apoptotickými kaspázami. Apoptotická kaspáza-3 sa podieľa na štiepení IL-1 β za určitých podmienok (Maelfait et al. 2008), preto bol skúmaný aj jej vzťah k IL-33. Viaceré vedecké tímy našli v sekvencii pro-IL-33 miesto vhodné pre štiepenie prostredníctvom kaspázy-3 a následne dokázali, že kaspáza-3 naozaj IL-33 štiepi. Kaspáza-3 rozštípe IL-33 na dva fragmenty, N-terminálny fragment aa1-175 a C-terminálny aa 176-266. Pozoruhodné je, ako toto štiepenie ovplyvňuje biologickú aktivitu IL-33. Ani jeden zo štiepných produktov sa nie je schopný aktivovať ST-2 receptor, ale majú schopnosť sa naň naviazať (*Ali et al. 2010*), (*Lüthi et al. 2009*). IL-33 má ako duálny cytokín ešte jednu funkciu - môže byť translokovaný do jadra a tu interaguje s nukleárnym faktorom NF- κ B a tak moduluje expresiu viacerých génov. Po rozštípení prostredníctvom kaspázy-3 je N-terminálny fragment schopný translokácie do jadra (*Ali et al. 2010*), avšak nemá schopnosť interagovať s NF- κ B (*Ali et al. 2011*). V približne rovnakom období bolo zistené, že okrem kaspázy-3 štiepi IL-33 aj ďalšia apoptotická kaspáza-7. Naopak IL-33 je odolný voči štiepeniu prostredníctvom tzv. zápalových (ang. inflammatory) kaspáz ako je kaspáza-1, -4 a -5 (*Lüthi et al. 2009*).

Neštiepený pro-IL-33 je pravdepodobne uvoľnený z nekrotizujúcich buniek ako tzv. alarmín. Takto sú označované proteíny alebo molekuly, ktoré sú uvoľňované z mŕtvych alebo sekretované z umierajúcich buniek počas traumy alebo infekcie. Pre imunitný systém je ich výskyt mimo bunku dôležitým signálom pre spustenie imunitnej odpovede. Pri apoptóze (vyvolanej látkami poškodzujúcimi DNA, či prostredníctvom molekúl anti-Fas, TRAIL alebo TNF- α +cykloheximid) je IL-33 rozštípený apoptotickými kaspázami a tým zbavený schopnosti asociovať s ST-2 receptorom (*Cayrol a Girard 2009*), (*Lüthi et al. 2009*). Popri už známych mechanizmoch pôsobenia cytokínov na bunky (autokrinne, parakrinne, intrakrinne, juxtakrinne a retrokrinne) je uvoľňovanie z nekrotizujúcich buniek ďalšou možnou cestou, ako cytokíny môžu prejavovať svoju aktivitu. Bolo navrhnuté, aby bol tento spôsob pomenovaný ako nekrokrinný (*Zhao a Hu 2010*).

3.1.10 Signálne kaskády

IL-1 cytokíny vrátane IL-33 spúšťajú signalizáciu v efektorových bunkách vytvorením heterotrimérneho signalizačného komplexu, ktorý sa skladá zo samotného cytokínu a dvoch IL-1 receptorových reťazcov. Na jeden z nich sa cytokín priamo naviaže (vysokoafinitný primárny receptor) a druhý s nimi následne vytvorí komplex schopný signalizácie (nízkoafinitný koreceptor). IL-33 sa naviaže priamo na ST-2 receptor, k signalizácii dochádza po asociácii s nízkoafinitným koreceptorom IL-1RAcP (ang. IL-1R Accessory Protein) (*Chackerian et al. 2007*). Práve IL-1RAcP proteín má TIR-doménu, na ktorú sa naviaže cytoplazmatická adaptorová molekula MyD88 (ang. Myeloid Differentiation primary response protein 88, proteín podieľajúci sa na diferenciácii myeloidnej línie buniek 88) (*Wesche et al. 1997*). Ďalej sa k tomuto komplexu naviažu kinázy IRAK 1 a IRAK4 (ang. IL-1R Associated Kinase, kinázy asociujúce s IL-1R), ktoré môžu byť následne fosforylované (*Kanakaraj et al. 1999*). Fosforyláciou dôjde ku konformačnej zmene, vďaka ktorej sa IRAK uvoľnia z receptorového komplexu a spoja sa s faktorom TRAF6 (ang. TNF-receptor associated factor 6, faktor 6 asociujúci s TNF receptorom) (*Funakoshi-Tago et al. 2008*). Pomocou zatiaľ neznámeho mechanizmu tento komplex aktivuje dve na sebe nezávislé signálne kaskády. Prvá z nich zahŕňa fosfolipázu D (PLD, z ang. PhosphoLipase D) a kinázu SPHK (z ang. SPHingosine Kinase), dochádza k uvoľneniu vápenatých kationov Ca^{2+} do cytoplazmy. Dochádza k fosforylácii molekuly I κ B α (ang. Inhibitor of NF- κ B α), ktorá je za normálnych okolností naviazaná na molekulu NF- κ B. Inhibitor je následne degradovaný ubiquitínovou cestou a NF- κ B môže fungovať ako transkripčný faktor. Druhá signálna dráha vedie cez kaskádu MAPK kináz. Aktivované sú napr. ERK kináza (ang. Extracellular signal-Regulated Kinase) proteín p38, JNK kináza (ang. c-JUN N-terminal Kinase) či AP-1 proteín. Obe signálne dráhy pravdepodobne pôsobia synergicky a vedú k indukcii génovej expresie prozápalových cytokínov či chemokínov. Solubilný receptor sST2 sa viaže priamo na IL-33. Pôsobí teda ako negatívny receptor a inhibuje účinok IL-33. Ďalšou molekulou, ktorá vyvážuje IL-33 a je teda jeho negatívnym receptorom je transmembránový proteín SIGIRR (z ang. Single ImmunoGlobulin Interleukin-1 Receptor Related-molecule) (*Bulek et al. 2009*). Signálne kaskády aktivované naviazaním IL-33 na ST-2 receptor sú schematicky znázornené na obrázku č. 5.



Obr. č. 5: IL-33 v úlohe alarmínu, schematické znázornenie signálnych kaskád aktivovaných po naviazaní sa IL-33 na ST-2 receptor. PAMP štruktúry patriace vírusom, baktériám a iným patogénom sú rozpoznávané mechanizmami nešpecifickej imunity – prostredníctvom PRR a TLR receptorov na imunitných bunkách. Endotelidiálne, epiteliálne bunky alebo napríklad hepatocyty po zasiahnutí infekciou alebo pôsobením patogénov umierajú a do okolia uvoľňujú alarmíny, medzi nimi aj IL-33. Uvoľnený IL-33 interaguje s cieľovými bunkami (mastocyty, NK bunky, NKT lymfocyty, bazofily, makrofágy, eozinofily, Th2-bunky, B- a T-lymfocyty, dendritické bunky, neutrofilny, epiteliálne and endotelidiálne bunky) naviazaním sa na svoj špecifický receptor ST-2. Následne dochádza k vytvoreniu komplexu s proteínom IL-1RAcP a signalizácii cez molekuly MyD88, MAPK, TRAF6, IRAK1, IRAK4 a NF-κB, ktorá spúšťa transkripciu prozápalových génov. Upravené podľa *Arshad et al. (2012)*

3.2 Stimulans použité v našich experimentoch

Aby sme mohli experimentálne sledovať rozdiel medzi nestimulovanými kontrolnými bunkami a bunkami aktivovanými, ktoré *in vivo* predstavujú napr. bunky napadnuté baktériami, je potrebné zvoliť pre experiment vhodný stimulans. Na začiatku nášho výskumu sme chceli zistiť,

či bude epiteliálne línia buniek A549 sekretovať IL-33 po stimulácii nejakým cytokínom prípadne pri ich kombinácii. Použité boli cytokíny reprezentujúce rôzne typy imunitnej odpovede. Ich podrobnejšia charakteristika je uvedená nižšie.

3.2.1 TNF- α

TNF- α (z ang. Tumor Necrosis Factor α) je silný prozápalový cytokín, uplatňuje sa pri iniciácii zápalovej odpovede a patrí medzi molekuly indukujúce akútnu fázu zápalu (*Aggarwal et al. 1985*). Tento pleiotropný cytokín pôsobí pri nižšej koncentrácii ako autokrinný a parakrinný regulátor funkcií monocytov, makrofágov, polymorfonukleárných leukocytov a endoteliálnych buniek. Ak je iniciačný stimul dostatočne silný, môže vstupovať do krvného riečišťa a pôsobiť aj endokrinne. TNF- α je produkovaný hlavne bunkami monocyto-makrofágového pôvodu, ale zdrojom môžu byť aj B- a T-lymfocyty, neutrofily, NK bunky, keratinocyty či endoteliálne bunky. TNF- α funguje ako endogénny pyrogén, tzn. že má schopnosť indukovať zvýšenú telesnú teplotu. Taktiež podnecuje expresiu adhezívnych molekúl (ICAM-1, VCAM-1, E-selektíny, P-selektíny) na endoteliálnych bunkách a leukocytoch, čo umožňuje imunokompetentným bunkám priľnúť na endotel ciev a následne sa prostredníctvom diapedézy dostať do miest, kde prebieha zápal. TNF- α stimuluje produkciu IL-6, IL-1, IL-8, IFN- γ a proteínov akútnej fázy, čím taktiež prispieva k rozvoju zápalovej odpovede.

3.2.2 TGF- β

TGF- β (ang. Transforming Growth Factor) sa podieľa na kontrole mnohých bunkových procesov vrátane rastu, proliferácie, diferenciácie, syntézy a degradácie extracelulárnej matrix či apoptózy. V rámci imunitného systému funguje ako modulačný cytokín, exprimujú ho všetky typy buniek imunitného systému od lymfocytov cez makrofágy až po dendritické bunky. Má dôležitú rolu pri potlačovaní zápalovej reakcie a následných procesoch spojených s hojením a obnovou poškodených tkanív, účastní sa procesov spojených s udržiavaním homeostázy a tolerancie. TGF- β existuje v troch izoformách: TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3, všetky sú syntetizované ako inaktívne prekurzory. Po syntéze sa na TGF- β naviaže proteín LAP (ang. Latency Associated Peptide), vytvorený komplex zostáva v bunke. Ku sekrécii dochádza až po vytvorení komplexu s ďalším proteínom, tzv. LTBP (ang. Latent TG- β -Binding Protein) (*Rifkin 2005*). Biologicky aktívne homodiméry TGF- β vznikajú rôznymi mechanizmami zahrňujúcimi proteolytické štiepenie rôznymi enzýmami napr. metalloproteinázami (*Yu a Stamenkovic 2000*), zmenu pH (*Lyons 1988*), či pôsobenie ROS (ang. Reactive Oxygen Species). Regulačné T lymfocyty (Treg) sú jedným z hlavných producentov TGF- β , pričom TGF- β je naviazaný na membráne. Existuje viacero typov Treg buniek, v zdravom organizme je najhojnejšie zastúpený typ nTreg (ang. natural Treg), charakterizovaný expresiou membránových molekúl CD4⁺CD25⁺ a expresiou FoxP3 (*Nakamura et al. 2004*). Práve tieto nTreg bunky suprimujú pri priamom kontakte T naivné lymfocyty či fagocyty prostredníctvom

priameho kontaktu bunka : bunka a jednou z kľúčových molekúl účastniacich sa tohto procesu je TGF- β (*Oida et al. 2006*). TGF- β je taktiež nevyhnutný pre diferenciáciu Th17 lymfocytov (*Veldhoen et al. 2006*).

3.2.3 IFN- γ

IFN- γ (Interferon- γ) je homodimérny glykoproteín, produkovaný predovšetkým cytotoxickými CD8⁺ T-lymfocytmi, NK bunkami a NKT bunkami (*Farrar and Schreiber 1993*). Jeho syntéza je indukovaná stimuláciou buniek prostredníctvom antigénov a je zvyšovaná pôsobením IL-2, IL-12 a IL-18. Vykazuje významné imunomodulačné a protinádorové účinky. Zosilňuje expresiu molekúl HLA I. aj II. triedy na APC bunkách (ang. Antigen Presenting Cells, bunky prezentujúce antigén) (*Billiau 1996*), zvyšuje aktivitu cytotoxických T-lymfocytov, NK buniek a predovšetkým má významný vplyv na funkciu makrofágov. U makrofágov podporuje syntézu lyzozómových enzýmov (hydroláz, esteráz a neutrálnych proteáz), čím zvyšuje ich baktericidnú a tumoricidnú aktivitu. IFN- γ zvyšuje aj sekréciu niektorých cytokínov, predovšetkým IL-1 β a TNF- α .

IFN- γ aktivuje aj NK bunky. Jeho pôsobením vzrastá ich metabolická aktivita, zvyšuje sa expresia adhezívnych molekúl a produkcia cytotoxických molekúl. Neutrofilý vďaka jeho pôsobeniu zvyšujú produkciu kyslíkových radikálov. IFN- γ aktivuje aj cievne endotelové bunky, uľahčuje adhéziu lymfocytov k stene ciev a tým podporuje ich penetráciu do okolitých tkanív.

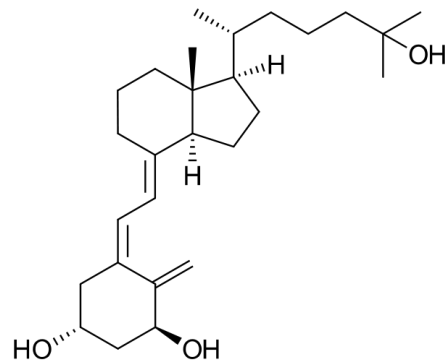
3.2.4 IL-10

Interleukín 10 patrí medzi tzv. protizápalové cytokíny. Produkujú ho najmä monocyty a makrofágy, T- a B-lymfocyty a keratinocyty. Jeho biologický účinok spočíva predovšetkým v inhibícii produkcie prozápalových cytokínov, ako sú napr. IL-1 β , IL-6 a TNF- α , IFN- γ a IL-12. Ďalej inhibuje aj produkciu niektorých chemokínov (IL-8). Takto vlastne tlmí aktivitu NK buniek a expanziu T-lymfocytov. U makrofágov potlačuje expresiu MHC-molekúl II. triedy, kostimulačných a adhezívnych molekúl a tak obmedzuje ich schopnosť prezentovať antigén. V organizme je vlastne prirodzeným kontrolným faktorom, ktorý zabráňuje vzniku prehnanej imunitnej odpovede.

IL-10 však nie je čisto antizápalovým a inhibičným cytokínom. Podieľa sa napr. na stimulácii a diferenciácii B-lymfocytov a indukuje u nich syntézu konkrétnych tried protilátok (IgG1 a IgG3). Ďalej pôsobí chemotakticky na CD8⁺ lymfocyty a podporuje fagocytózu neutrofilov.

3.2.5 Kalcitriol (1 α , 25 – dihydroxy-vitamín D3)

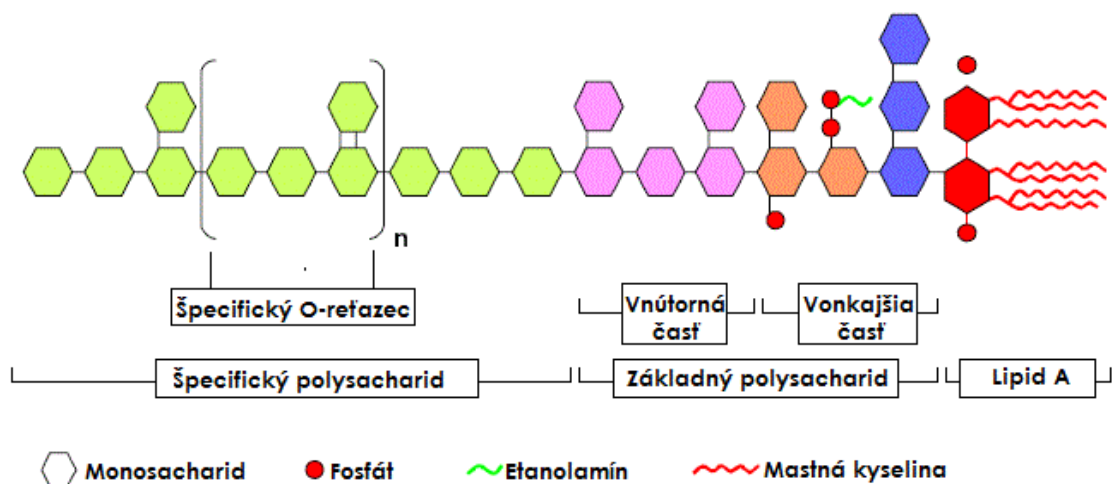
1 α ,25-Dihydroxyvitamín D3 je biologicky aktívna forma vitamínu D3, ktorá zohráva dôležitú úlohu pri absorpcii a ukladaní vápniku (Ca).



Obr. č.6: Štruktúra 1 α ,25-Dihydroxyvitamínu D3.

3.2.6 Lipopolysacharid (LPS)

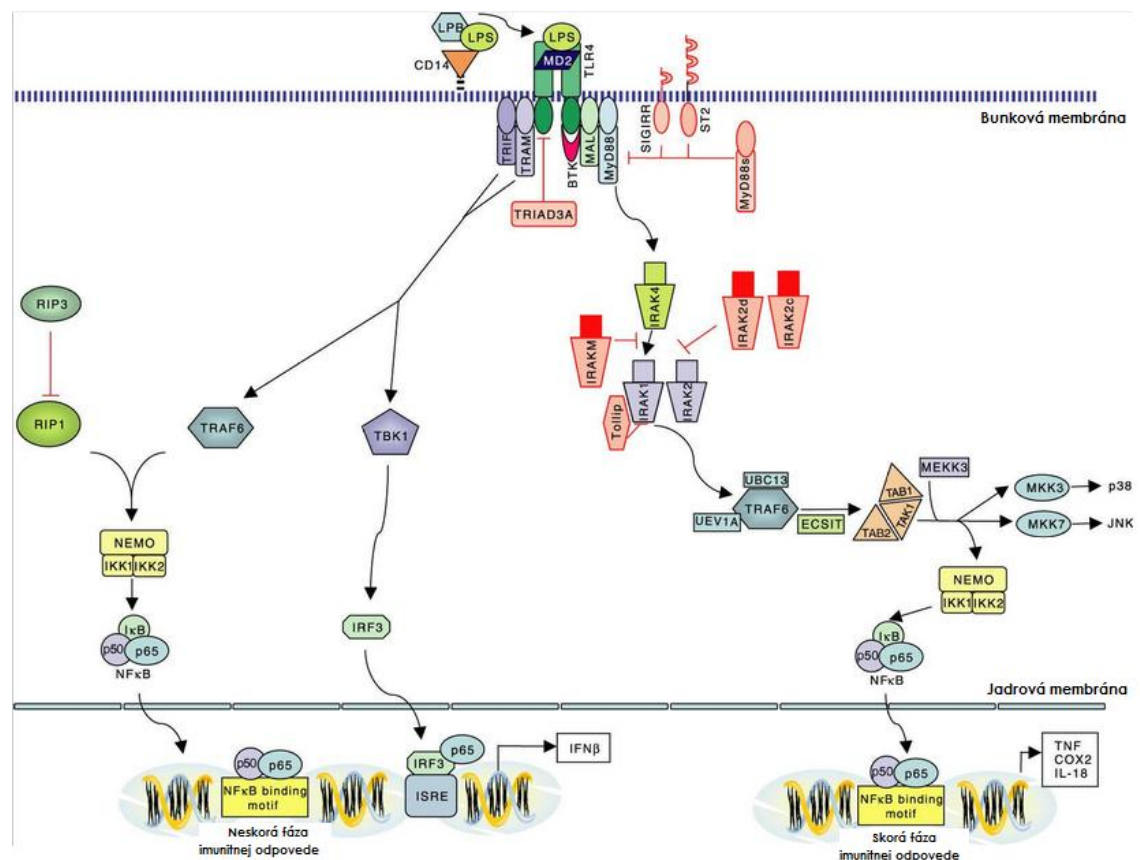
Lipopolysacharid (LPS), taktiež nazývaný endotoxín, je hlavnou zložkou podieľajúcou sa na stavbe bunecnej steny gram negatívnych baktérií. Obsahuje tri štruktúrne oblasti: lipid A, základný polysacharid tvoriaci stredovú oblasť (ang. core) a špecifický polysacharid (Obr. č.7). Lipid A tvorí hydrofóbnu časť LPS, zvyšný reťazec je hydrofilný. Základný polysacharid je spoločný v rámci príbuzných druhov, môžeme ho rozdeliť na dve časti, vnútornú a vonkajšiu. Špecifický polysacharid je polymér zložený z opakujúceho sa o-špecifického reťazca. O-špecifický reťazec je antigénne veľmi rozmanitý a špecifický pre jednotlivé druhy či kmene baktérií. Polysacharidová časť sa podieľa na virulencii baktérie (môže prispievať k adhézii, aktivovať komplement), lipid A je zodpovedný za toxicitu.



Obr. č.7: Štruktúra LPS. (Prevzaté a upravené z *Pupo a Hardy, 2009*)

Mechanizmus, ktorým je LPS schopný spustiť imunitnú reakciu, je pomerne komplikovaný. LPS najskôr vytvorí komplex so sérovým proteínom LBP (ang. LPS-Binding Protein). Vďaka LBP sa tento komplex následne viaže na molekulu CD 14 (*Wright et al. 1990*), ktorá je v membráne myeloidných buniek (LPS dokáže stimulovať aj iné bunkové typy, mechanizmus je však odlišný) pripútaná pomocou glykosylfosfatidylinositolovej (GPI) kotvy. CD-14 umožní transfer LPS molekuly na neukotvený MD-2 proteín. Monomérny komplex LPS:MD-2 sa následne viaže na receptor TLR-4 (ang. Toll-Like Receptor) a aktivuje signálnu dráhu vedúcu cez intracelulárne molekuly MyD88, IRAK, TRAF6 až k transkripčnému faktoru NF- κ B (*Pålsson-McDermott a O'Neill 2004*) (Obr. č. 8).

LPS pôsobí na živočíšne bunky monocytického pôvodu (makrofágy a monocyty), ale aj na polymorfonukleárne bunky a B lymfocyty a jeho hlavnou úlohou je indukcia prozápalových procesov v organizme. Pri pokusoch in vitro teda slúži ako veľmi účinné stimulant. Expresia IL-33 bola potvrdená u monocytov s neznámym fenotypom, ktoré boli aktivované prostredníctvom LPS (*Schmitz et al. 2005*). Pri iných experimentoch sa uplatnil aj ako vhodný aktivátor epiteliálnych buniek (*Pugin et al. 1993*), takže sme ho vyskúšali aj u A549 bunkovej línie.



Obr. č.8: Stimulácia monocytov prostredníctvom LPS aktivuje signálne dráhy vedúce k expresii prozápalových cytokínov. (Pevzaté a upravené z Pålsson-McDermott a O'Neill, 2004)

4 Cieľ práce

- 1) posúdiť efekt cytokínov $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN } \gamma$, $\text{IL-1}\beta$, IL-13 , IL-33 , $\text{TGF-}\beta$ a IL-10 a efekt LPS izolovaného z *E. coli* na sekréciu IL-33 u bunkových línii A549 a THP-1
- 2) overiť hypotézu, že IL-33 funguje ako alarmín
- 3) testovať efekt stimulácie prostredníctvom LPS a následnej nekrózy na uvoľnenie $\text{IL-1}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ u bunkových línii A549, THP-1 a THP-1dif

5 Materiál a metódy

Táto práca sa zaoberá viacerými mechanizmami, ktoré môžu viesť k zvýšeniu koncentrácie IL-33 v extracelulárnom prostredí, čiže mimo bunku. Najskôr sme sa pokúsili stimulovať monocyto-makrofágovú líniu THP-1 a alveolárne epiteliálne bunky A549 prostredníctvom rôznych cytokínov. IL-33 v supernatantoch sme následne merali pomocou metódy ELISA. Ďalším možným mechanizmom umožňujúcim zvýšenie koncentrácie IL-33 v extracelulárnom priestore bolo uvoľňovanie IL-33 pri nekróze buniek. Aby sme nekrotizovali bunky, tak sme ich zmrazovali a rozmrazovali v piatich cykloch. Po odstránení debris pomocou centrifugácie sme zmerali prítomnosť IL-33 v supernatantoch. IL-33 však nebol v supernatantoch identifikovateľný. Možnou príčinou mohla byť príliš nízka koncentrácia, tak sme skúsili diferencovať THP-1 líniu prostredníctvom vitamínu D3 a bunky sme ešte stimulovali prostredníctvom LPS izolovaného z *E. coli*. Bunky boli následne opäť zmrazované a prítomnosť IL-33 bola meraná metódou ELISA. Aby sme sa uistili, že bunky podstúpili diferenciáciu, bola zmeraná prítomnosť CD-14 na povrchu adherovaných THP-1 buniek. Vplyv nekrózy a efekt stimulácie prostredníctvom LPS sme si overili aj stanovením IL-1alfa a IL-1 beta v supernatantoch buniek použitých v zmrazovacom experimente pomocou metódy Luminex.

5.1 Práca s tkanivovými kultúrami

5.1.1 Použité tkanivové línie: THP-1 bunková línia

THP-1 línia bola úspešne využívaná pri experimentoch skúmajúcich sekréciu cytokínov IL-1 β a IL-18 (*Akita et al. 1997*), ktoré sú blízkymi príbuznými IL-33, navyše bola u nej preukázaná aj prítomnosť mRNA IL-33 (*Nile et al. 2010*). Táto permanentná bunečná kultúra bola odvodená z buniek periférnej krvi 1 rok starého chlapca s akútnou monocytickou leukémiou. Vyznačuje sa prítomnosťou Fc a C3b receptorov, naopak u nich chýbajú povrchové aj cytoplazmatické imunoglobulíny. Neaktivované bunky majú znížené množstvo povrchovej molekuly CD-14 (receptor pre LPS), u aktivovaných buniek dôjde k zvýšeniu jej prítomnosti. Tento povrchový znak sme u THP-1 buniek stanovovali pomocou metódy prietokovej cytometrie.

THP-1 bunky (American Tissue Culture Collection) sme kultivovali v RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) médiu obsahujúcom L-glutamín(RPMI + GlutaMAX TM –I, Gibco Invitrogen) s 10% obsahom FBS - fetálneho bovínneho séra (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum, Gibco Invitrogen) v termostate (CO₂ inkubátor MCO-17 AIC, Sanyo, Japonsko) pri teplote 37°C s obsahom CO₂ 5%. Pri pasážovaní tejto suspenznej bunkovej línie bola najskôr meraná viabilita buniek. Pokiaľ v danej kultivačnej nádobe nebolo mnoho mŕtvych buniek, časť obsahu nádoby bola odliata a novým médiom bola doplnená na pôvodný objem. Pri každej tretej

pasáži bolo potrebné odstrániť mŕtve bunky, obsah kultivačnej nádoby bol 2× premytý a centrifugovaný (1200 rpm, 5 minút). Využíva sa menšej rýchlosti sedimentácie mŕtvych buniek, ktoré zostanú v starom médiu, ktoré sa odstráni. Po odstránení supernatantu bol sediment buniek resuspendovaný v 15 ml čerstvého média RPMI s 10% FBS. Pasážované boli každé 2-3 dni, pričom denzita nikdy nepresiahla $1 \cdot 10^6$ buniek/ml. Pretože vlastnosti THP-1 bunečnej línie sa môžu po dlhšom kultivovaní dramaticky zmeniť, po každej 25 pasáži boli bunky nahradené. Aby sme zabránili bakteriálnej kontaminácii, do média sme pridávali antibiotiká penicilín, gentamicín a streptomycín (Biochrom AG).

5.1.2 Použité tkanivové línie: A549 bunková línia

Expresia IL-33 bola preukázaná aj u širokého spektra epiteliálnych buniek (*Schmitz et al. 2005*), preto sme sa rozhodli testovať mechanizmy, ktoré by mohli viesť k produkcii IL-33, aj na bunkovej línii A549 (American Tissue Culture Collection). Táto adherentná alveolárna bunková línia bola odvodená z tkaniva adenokarcinómu pľúc. Využíva sa pri molekulárnych štúdiách skúmajúcich napr. priepustnosť buniek pre lieky s protinádorovými účinkami, pri zisťovaní imunotoxicity liečiv voči respiračnému systému, pri štúdiách bunečného starnutia a taktiež pri štúdiu expresie rôznych cytokínov. Bunky boli pestované v kultivačných fľaškách Cornig Flask (Cornig, USA) v IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) médiu obsahujúcom L-glutamín (IMDM + GlutaMAX TM-I, Gibco, Invitrogen), s 10% obsahom FBS - fetálneho bovinneho séra (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum, Gibco Invitrogen). Kultivácia prebiehala v termostate (CO₂ inkubátor MCO-17 AIC, Sanyo, Japonsko) pri teplote 37°C s obsahom CO₂ 5%. Aby sme zabránili kontaminácii bunkových kultúr baktériami, do média boli pridávané antibiotiká penicilín, streptomycín a gentamicín (Biochrom, AG). Bunky boli pasážované vždy tesne pred vytvorením konfluentnej vrstvy. Médium bolo odsaté pipetou, bunky boli následne 2× premyté PBS (ang. Phosphate Buffered Saline - fosfátový izotonický roztok) a inkubované približne 4 minúty s trypsinom (Trypsin-EDTA solution, Sigma Aldrich, USA). Po odlúčení buniek od povrchu doštičky bola reakcia trypsinu zastavená pridaním nadbytku média, čím došlo k vyviazaniu trypsinu na sérum obsiahnuté v médiu. Následne sme bunky centrifugovali pri 1200 rpm (ang. revolutions per minute, otáčky za minútu) v priebehu 5 minút. Supernatant obsahujúci Trypsin-EDTA a FBS bol odobraný, bunky ešte 2× premyté čistým médiom a resuspendované vo vhodnom objeme média s 5% FBS a antibiotikami.

5.1.3 Uchovávanie tkanivových línií

Aby sa zabránilo starnutiu buniek, charakterizovanému genetickou nestabilitou a zmenami fenotypu, bunečné línie sme uchovávali zamrazené v ampulách s kryoprotektívnym roztokom (FBS 450 µl/ml, 450 µl/ml rastového média a 100 µl/ml DMSO) pri teplote -180°C.

5.1.4 Rozmrazovanie buniek

Zamrazovacia ampula bola vložená do vodného kúpeľa s teplotou približne 37°C. Za občasného trepania došlo po chvíli k rozpusteniu zmesi, ktorá bola následne prepipetovaná do 50 ml centrifugačnej skúmavky. K bunkám bolo pozvoľna prikvapávané 20 ml vhodného kultivačného média s 20% obsahom FBS a teplotou 37°C. Bunky boli následne centrifugované (1200 rpm, 10 min), supernatant odobraný a pelet resuspendovaný vo zvyšnom médiu. Bunky boli ešte raz premyté, tentokrát médiom s obsahom FBS 10%, centrifugované (1200rpm, 5 min), po resuspendácii doplnené médiom na požadovaný objem a kultivované.

5.1.5 Stanovenie počtu buniek v suspenzii pomocou Bürkerovej komôrky

Zmes suspenzie buniek a farbiva Trypánová modrá v pomere 1:1 o objeme približne 10 µl bola nanosená do Bürkerovej komôrky. Bolo spočítané množstvo buniek v jednom poli o objeme 0,004 µl. Celkový počet buniek bol následne stanovený pomocou vzorca:

$$n = x/0,04 * 1000$$

n počet buniek v 100 µl bunečnej suspenzie

x priemerný počet buniek na jedno pole

5.1.6 Určenie viability buniek pomocou Trypánovej modrej

Pri experimentoch bola neustále kontrolovaná viabilita buniek, obzvlášť pri indukcii nekrózy prostredníctvom opakovaného zmrazovania (viabilita musela byť nižšia než 5%). K tomuto účelu bol využitý test preukazujúci viabilitu buniek pomocou farbiva Trypánová modrá. Táto metóda je založená na princípe, že živé bunky majú intaktnú bunečnú membránu, cez ktorú sa farbivo nedostane do cytozolu. Do mŕtvych buniek s porušenou cytoplazmatickou membránou sa farbivo naopak dostane a zafarbí ich. Pomocou svetelného mikroskopu Fluovert (Leitz, Nemecko) a Bürkerovej komôrky bolo určené percento živých (priehľadných) a mŕtvych (tmavomodro sfarbených) buniek.

5.2 Stanovenie expresie IL-33 u bunečných línií A549 a THP-1 po stimulácii prostredníctvom rôznych cytokínov a LPS

Cytokíny môžu byť produkované bunkami konštitutívne, u väčšiny však dochádza k ich vylučovaniu do extracelulárneho priestoru až po stimulácii či aktivácii bunky. Aktivovať či stimulovať bunky môžeme nespočetnými spôsobmi, či už zmenou fyzikálnych podmienok (teplota, pH, UV žiarenie, zmrazovanie), alebo pôsobením chemických látok vyskytujúcich sa v organizme ale aj mimo neho. IL-33 patrí medzi len nedávno objavené cytokíny a podnet, ktorý by vyvolal jeho sekréciu do extracelulárneho priestoru bol dlho neznámy.

5.2.1 Stimulácia buniek A549 prostredníctvom širokého spektra cytokínov

Pre mnohé cytokíny je charakteristické, že pôsobia v kaskáde, tzn. že jeden cytokín indukuje tvorbu druhého. Pri prvých sériách našich experimentov sme preto pozorovali vplyv viacerých cytokínov na expresiu IL-33 v tkanivových kultúrach alveolárnej bunkovej línie A549 in vitro.

Bunky A549 boli pre potreby tohto pokusu pestované v 6-jamkových doštičkách (Costar, Cornig, USA). Po vytvorení konfluentnej vrstvy bolo médium odstránené pipetou a bunky boli 2× opláchnuté v roztoku PBS. Tak došlo k odstráneniu zvyškov FBS, ktoré môžu mať vedľajší vplyv na výsledok experimentov. Následne boli k bunkám pridané 2 ml čistého média bez séra a antibiotík a bunky boli stimulované. K stimulácii boli použité jednak prozápalové cytokíny (TNF α), ale aj cytokíny súvisiace s Th1/Th2 rovnováhou: IFN γ , IL-1 β (Th1 odpoveď), IL-13 (Th2 odpoveď) a cytokíny s prevažne inhibičným účinkom na zápalové reakcie TGF- β a IL-10. K bunkám sme skúsili pridať aj IL-33. Jedná sa o rekombinantné cytokíny (všetky R&D Systems, USA), ich krátke charakteristiky sú uvedené vyššie (viď kapitola 3.2, IL-1 β : kapitola 3.1.2). Všetky cytokíny boli pridané v rôznych koncentráciách (1, 10, 20, 50 ng/ml). Ako negatívnu kontrolu sme použili nestimulované bunky. Po 24 hodinách boli supernatanty odobrané a testované na prítomnosť IL-33 pomocou metódy ELISA (DuoSet Human IL-33, R&D Systems).

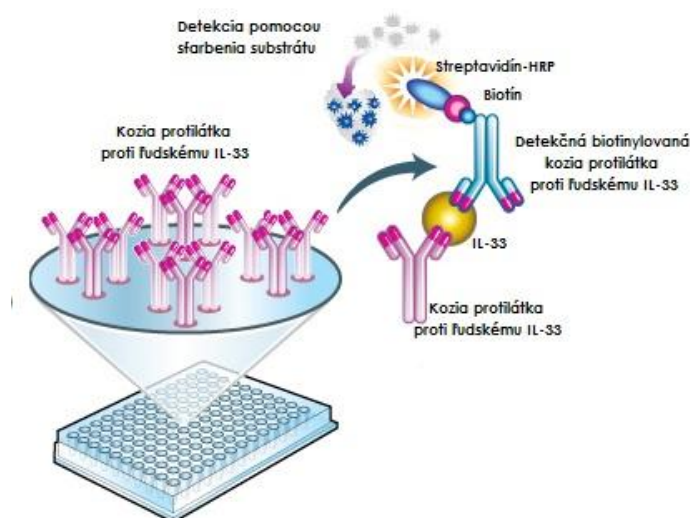
5.2.2 Stimulácia buniek THP-1 prostredníctvom LPS a rôznych cytokínov

Okrem cytokínov použitých v experimente s A549 epiteliálnou líniou bola monocytomakrofágová línia THP-1 navyše stimulovaná prostredníctvom LPS z E. Coli (Sigma Aldrich, USA). Jedná sa totiž o imunokompetentné bunky, ktoré sú v organizme často stimulované práve prítomnosťou cudzorodých molekúl. THP-1 sú navyše suspenznou bunkovou líniou, preto aj ich príprava na experimenty prebiehala odlišne od buniek A549. Bunky boli prenesené do centrifugačnej skúmavky a centrifugované pri 1200 rpm počas 5 min. Po odstránení supernatantu boli bunky vo zvyšku média resuspendované a doplnené čistým RPMI médiom bez FBS a antibiotík. Premytie sme zopakovali ešte jeden raz, pričom sme bunky zriedili tak, aby sme dosiahli koncentráciu 10⁶ buniek/ml. Správnu koncentráciu sme overili pomocou Bürkerovej komôrky. Takto pripravená suspenzia bola napipetovaná do 6-jamkových doštičiek (Costar, Cornig, USA). Bunky sme stimulovali rôznymi druhmi cytokínov (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-13, IL-33, TGF- β a IL-10, ktoré boli pridávané v rôznych koncentráciách (1, 10, 20, 50 ng/ml). Stimulovali sme aj prostredníctvom LPS v koncentráciách 5, 50, 100, 500 ng/ml. Po 24 hod boli bunky centrifugované a supernatanty testované na prítomnosť IL-33 pomocou metódy ELISA.

5.3 Stanovenie IL-33 v supernatantoch buniek – metóda ELISA

Najčastejšie využívanou metódou v tejto diplomovej práci bola tzv. sendvičová ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Je jednou z najpoužívanejších imunologických metód, ktoré sú schopné detegovať špecifické protilátky a antigény. My sme detegovali IL-33 obsiahnutý v supernatantoch buniek THP-1 a A549 po stimulácii prostredníctvom rôznych cytokínov a LPS. Použili sme k tomu sadu DuoSet ELISA kit pre ľudský IL-33 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Najskôr sme si deň vopred pripravili 96-jamkovú mikrotitračnú doštičku. Do každej jamky sme napipetovali 100 µl kozej protilátky proti ľudskému IL-33, ktorá sa naviazala na povrch jamky. Nechali sme inkubovať cez noc pri laboratórnej teplote. Pomocou premývacieho roztoku sme prostredníctvom premývačky mikrotitračnú doštičku 3× premyli a následne ju blokovali pomocou 1% albumínu z bovinneho séra rozpusteného v PBS. Inkubácia prebiehala pri laboratórnej teplote a trvala 1 hod. Po trojnásobnom premytí sme do jamiek napipetovali 100 µl vzorky či štandardu a nechali sme inkubovať 2 hod. Po premytí sme pridali detekčnú protilátku-biotinylovanú koziu protilátku proti ľudskému IL-33 a inkubovali 2 hod. Znova sme premývali a tentoraz sme pridali streptavidín konjugovaný s chrenovou peroxidázou. Inkubácia prebiehala tentokrát 20 min pri laboratórnej teplote a v tme. Po premytí sme do jamiek napipetovali substrát obsahujúci peroxid vodíka H₂O₂ a tetrametylbendizín. Mikrotitračnú doštičku sme znova umiestnili do tmy a inkubovali 20 min. Reakciu sme zastavili pridaním stop roztoku, kyseliny sírovej. Absorbancie sú následne odčítané pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 450 nm a referenčnej vlnovej dĺžke 570 nm. Vzorky boli analyzované v tripletoch. Náš ELISA kit je schopný detekovať prítomnosť približne 3 ng/ml IL-33.



Obr. č.9: Schéma metódy ELISA. Znázornený je finálny komplex schopný rozložiť substrát a zmeniť jeho farbu. (Prevzaté a upravené z <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=13855>)

5.4 Stimulácia THP-1 buniek pomocou kalcitriolu (1 α , 25 – dihydroxy-vitamín D3)

Po sérii neúspešných pokusov prinútiť THP-1 bunky produkovať IL-33 prostredníctvom cytokínov a LPS sme skúsili THP-1 bunky najskôr aktivovať pomocou kalcitriolu (1 α , 25 – dihydroxy-vitamín D3) (Sigma Aldrich USA). THP-1 bunky sú vlastne promonocytárnou líniou. Prostredníctvom pôsobenia vitamínu D3 dochádza k ich diferenciacii na monocyty. Bunky boli s vitamínom D3 inkubované 48 prípadne 72 hodín v 6-jamkovej doštičke v RPMI médiu bez FBS, počiatočná denzita buniek bola 2-5 x 10⁵ buniek/ml. Neaderované bunky boli odmyté, adherované boli testované na viabilitu pomocou trypanovej modrej. Dôkazom aktivácie THP-1 buniek, ktoré sú suspenznou líniou, je práve adherencia a prítomnosť povrchovej molekuly CD-14, ktorú sme stanovili pomocou metódy prietokovej cytometrie. Takto diferencované THP-1 bunky sme použili pri zisťovaní, či bude IL-33 uvoľnený do extracelulárneho priestoru po indukcii nekrózy.

5.5 Stanovenie CD-14 na THP-1 bunkách pomocou metódy prietokovej cytometrie

K meraniu molekuly CD-14 bol využitý cytometer Beckman Coulter CYTOMICS FC 500. Do skúmavky určenej na meranie pomocou prietokového cytometra sme napipetovali 100 μ l bunečnej suspenzie a pridali sme 5 μ l monoklonálnej protilátky reagujúcej špecificky s membránovou molekulou CD-14. Následne sme mohli detekovať prítomnosť CD-14 na jednotlivých bunkách a zmeraním strednej intenzity fluorescencie (SIF) sme mohli porovnať množstvo CD-14 na jednotlivých populáciách buniek.

Expresia molekuly CD-14 bola meraná na povrchu THP-1 buniek pred a po diferenciacii prostredníctvom vitamínu D3. Taktiež bol zisťovaný efekt pôsobenia LPS na expresiu tohto znaku. LPS bol pridaný k nediferencovaným THP-1 bunkám v koncentrácii 100 ng/ml a inkubácia prebiehala 4 hodiny. K diferencovaným THP-1 bunkám bol pridaný v rovnakej koncentrácii 100 ng/ml, inkubácia trvala 4 alebo 24 hodín.

5.6 Indukcia nekrózy u buniek prostredníctvom opakovaného zmrazovania

V súčasnosti je IL-33 radený medzi alarmíny. Sú to molekuly endogénneho pôvodu, ktoré sú produkované umierajúcimi bunkami alebo sú uvoľňované z už mŕtvych buniek. Za kľudového stavu sa v extracelulárnom priestore nenachádzajú, sú teda ideálnym signálom upozorňujúcim imunitný systém na prítomnosť poškodenia buniek či tkaniva. Rozhodli sme sa overiť, či je IL-33 naozaj uvoľňovaný z buniek až vtedy, keď zomierajú nekrotickou smrťou. Pri apoptóze je

IL-33 rozštiepený prostredníctvom proapoptotických kaspáz a deaktivovaný. Preto sme museli indukovať u buniek nekrotickú smrť. Overeným spôsobom je viacnásobné zmrazovanie.

Pri tomto experimente sme použili vlastne 3 druhy buniek- THP-1 promonocytárna líniu, THP-1 bunky diferencované prostredníctvom vitamínu D3 a epiteliálne A549 bunky. Navyše sme všetky tri druhy buniek stimulovali prostredníctvom LPS (100 ng/ml) po dobu 3, 6, 9, 12 a 24 hodín. Nekrózu sme vyvolali pomocou zmrazovania na -70°C a následného rýchleho rozmrazovania na 38°C , zmrazovanie a opätovné rozmrazovanie sme opakovali v piatich cykloch. Ako kontrola nám poslúžili supernatanty buniek odobrané ešte pre zmrazovaním (bunky podstúpili aktiváciu prostredníctvom LPS, ale neboli nekrotizované). Taktiež sme zmrazovali aj bunky nestimulované prostredníctvom LPS. Výsledná viabilita u zmrazovaných buniek bola vždy menšia ako 5%. To sme si overili pomocou testu viability Trypánovou modrou. Supernatanty boli následne analyzované metódou ELISA na prítomnosť IL-33 a taktiež metódou Luminex boli stanovené koncentrácie cytokínov IL-1 α a IL-1 β .

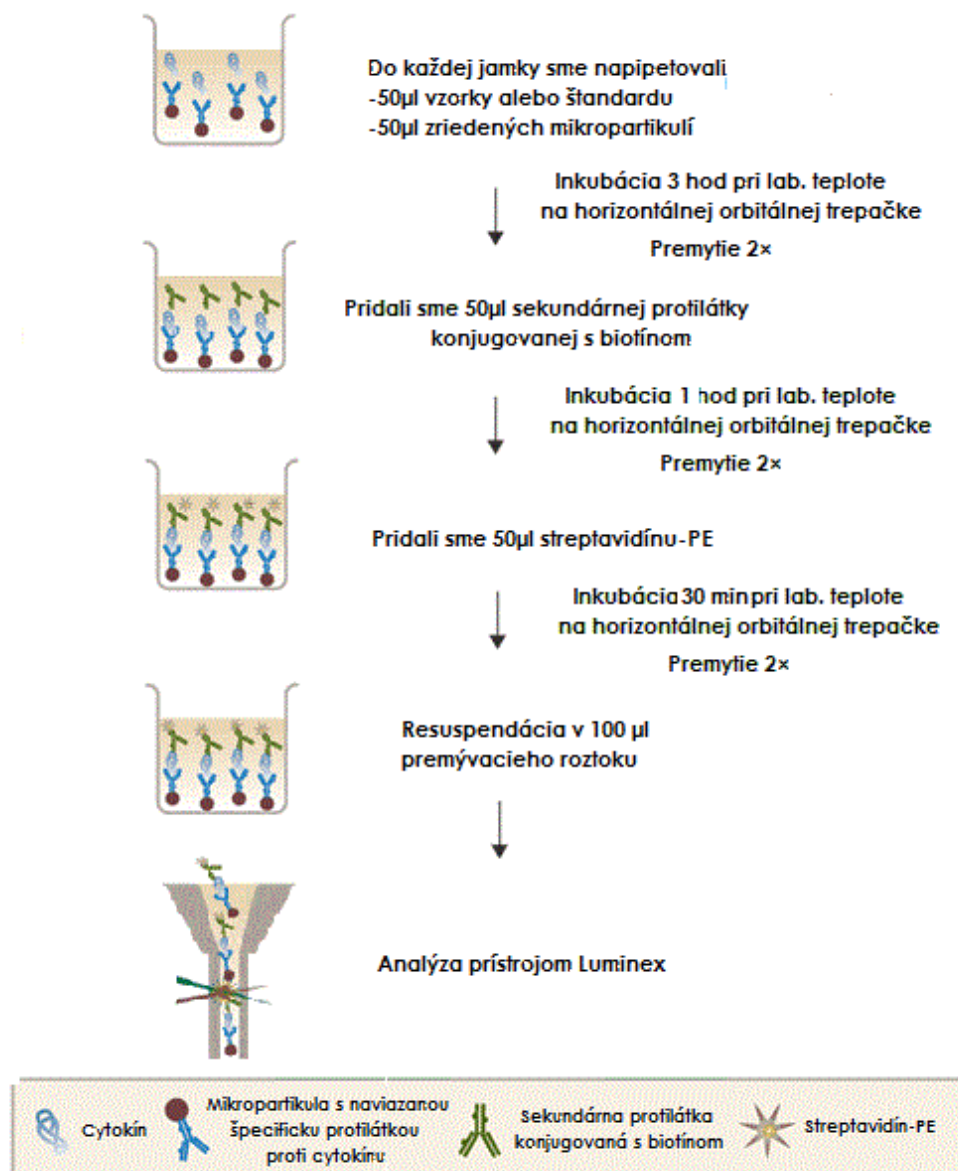
5.7 Stanovenie IL-1 α a IL-1 β v supernatantoch buniek metódou LUMINEX

Supernatanty získané pri experimentoch s indukciou nekrózy u oboch našich bunkových línií boli vyšetřované metódou Luminex. Zisťovali sme množstvo prítomného IL-1 α a IL-1 β .

Metóda Luminex je založená na laserovej analýze mikropartikulí pokrytých protilátkami, na ktoré sa špecificky viažu molekuly analyzovanej látky. Každá „populácia“ mikropartikulí má unikátnu intenzitu fluorescencie, vďaka čomu je ich prístroj schopný rozpoznať a určiť, ktorý cytokín je na konkrétnej mikropartikule naviazaný a môže ho analyzovať. Preto je možné analyzovať naraz až desiatky rozdielnych mikropartikulí vyznačujúcich sa rozdielnou intenzitou fluorescencie a v jednej reakčnej skúmavke.

Pre tento experiment bol využitý prístroj Luminex¹⁰⁰ System (Luminex Corporation, USA) a komerčný kit Fluorokine MAP (MultiAnalyte Profiling) Human Base Kit A určený na detekciu ľudských cytokínov IL-1 α a IL-1 β (R&D Systems, USA). Najskôr sme si pripravili špeciálnu 96-jamkovú doštičku, ktorá má namiesto dna filter. Do nej sme napipetovali 50 μl vzorky a 50 μl zriedených mikropartikulí. Doštičku sme nechali inkubovať 3 hodiny pri laboratórnej teplote na horizontálnej orbitálnej trepačke. Analyzovaný cytokín zo vzorky sa naviaže na špecifickú protilátku, ktorou je pokrytá každá mikropartikula. Filter na dne neprepustí mikropartikule a ani nedochádza k pretekaniu tekutiny v jamkách pri inkubácii. Tekutinu vysajeme až vytvorením podtlaku pomocou vákuovej pumpy Mada Vac II. (Madamedical products, USA). Mikropartikule ostávajú na svojom mieste a týmto mechanizmom sú dôkladne premývané. Po odmytí nenaviazaného substrátu sme pridali

sekundárnu protilátku konjugovanú s biotínom. Vzorky sa následne inkubujú 1 hod pri laboratórnej teplote na trepačke. Po inkubácii a odmytí nenaviazanej sekundárnej protilátky sa pridal streptavidín-PE, ktorý sa viaže na biotín konjugovaný na sekundárnej protilátke. Po 30 min inkubácie sa vzorky premyli a resuspendovali v 100 μ l premývacieho roztoku. Naznačené vzorky sa preniesli na meraciu doštičku a boli analyzované na prístroji Luminex, ktorý špeciálnou vákuovou pumpou odoberá z jamiek tekutinu so vzorkami pre meranie. Schematické znázornenie priebehu prípravy doštičky na analýzu je na obr. č.9. Výsledné koncentrácie jednotlivých cytokínov sú počítané na základe štandardných kriviek. Prístroj obsahuje 635nm diódový laser a 523nm neodým/yttrium-hlinito granátový laser. Prvý laser excituje červené a infračervené fluorochrómy, ktoré sú obsiahnuté v mikropartikulách a druhý laser excituje fluorochrom fykoerytrín (PE), ktorý je konjugovaný so streptavidínom.



Obr. č. 10: Priebeh stanovenia koncentrácie cytokínov pomocou metódy Luminex.

6 Výsledky

6.1 Efekt rôznych cytokínov a LPS na sekréciu interleukínu 33 bunkami THP-1 a A549

Napriek testovaniu širokého spektra cytokínov a aj veľmi účinného stimulans LPS sa nám nepodarilo ani u jednej bunkovej línie indukovať sekréciu IL-33 do supernatantu. IL-33 bol detegovaný jedine v supernatante buniek stimulovaných prostredníctvom seba samého a to v nižšej koncentrácii, než v akej bol pridávaný.

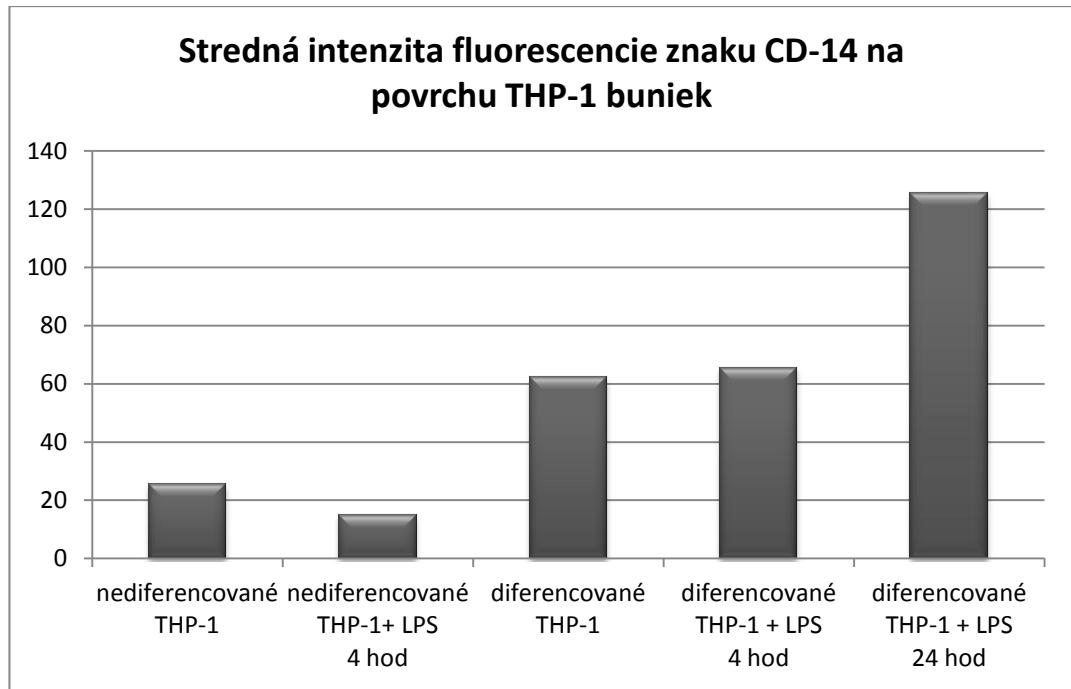
6.2 Diferenciácia THP-1 promonocytov prostredníctvom kalcitriolu (1 α , 25 – dihydroxy-vitamín D3) na maturované monocyty

Diferenciácia THP-1 promonocytov prostredníctvom vitamínu D3 na maturované monocyty bola potvrdená vizuálne zmenou adhezívnych vlastností buniek – nediferencované bunky sú suspenznou bunečnou líniou, zatiaľ čo diferencované THP-1(THP-1dif) monocyty sú adherované na povrchu kultivačných misiek.

6.3 Efekt pôsobenia vitamínu D3 a LPS na expresiu molekuly CD14

Expresia molekuly CD-14 bola meraná na povrchu THP-1 buniek pred a po diferenciácii prostredníctvom vitamínu D3. Taktiež bol zisťovaný efekt pôsobenia LPS *E.coli* na expresiu tohto znaku, všetky bunky boli stimulované rovnakou koncentráciou LPS (100 ng/ml). Hodnotená bola stredná intenzita fluorescencie (SIF).

Nediferencované bunky exprimovali molekulu CD-14 na svojom povrchu so strednou intenzitou fluorescencie 25,5. Diferencované THP-1 (THP-1dif) monocyty vykazovali zvýšenú expresiu tejto molekuly (SIF 62). Pokiaľ sme pomocou LPS stimulovali THP-1dif lymfocyty, efekt aktivácie sa po 4 hodinách neprejavil (SIF 65,5) ale po 24 hodinách bola expresia CD-14 markantne zvýšená (SIF 125,5). Pri stimulácii nediferencovaných THP-1 promonocytov prostredníctvom LPS došlo dokonca k poklesu expresie CD-14 (SIF 15). Výsledky jasne dokazujú, že THP-1 bunkovú líniu sme úspešne diferencovali. LPS na diferencované bunky pôsobí ako účinný stimulans, jeho efekt sa však prejavuje až po dlhšom čase (24 hod).



Graf č.1: Graf stredných hodnôt fluorescencie pre znak CD-14, porovnanie THP-1 nediferencovaných a diferencovaných prostredníctvom vitamínu D3, efekt stimulácie prostredníctvom LPS. Bunky boli značené antiCD-14-PE, merania prebiehali na prietokovom cytometri.

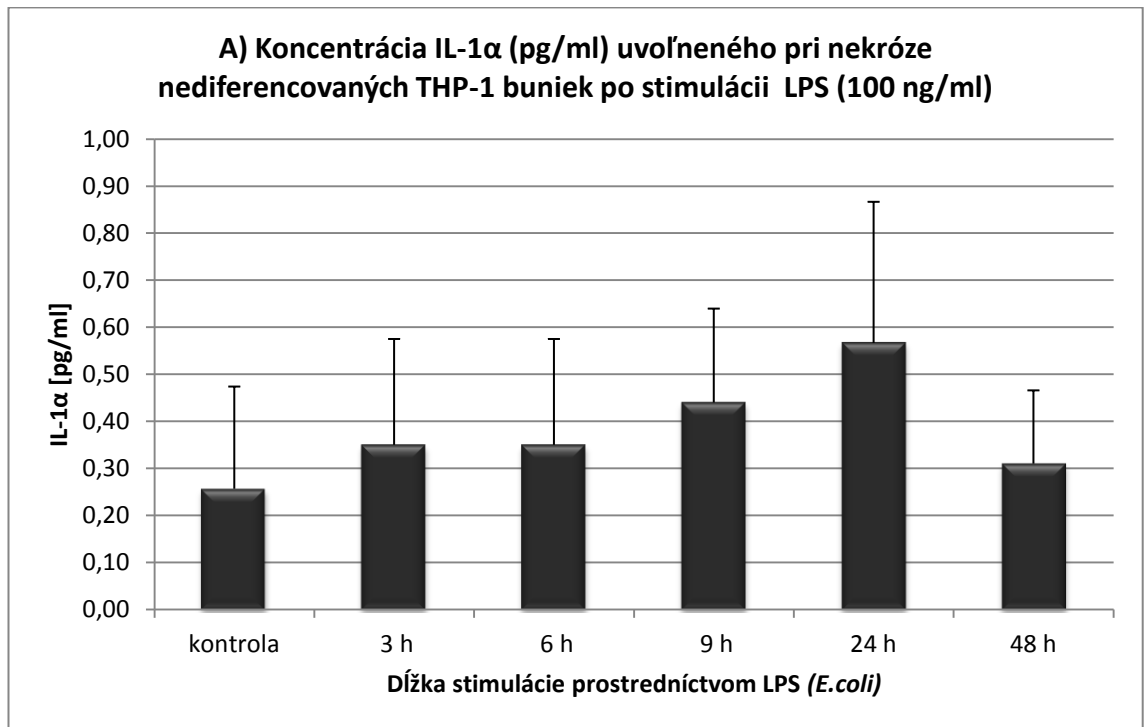
6.4 Vplyv nekrózy na koncentráciu cytokínov IL-33, IL-1 α a IL-1 β v supernatante THP-1 a A549 buniek

Všetky tri bunkové línie (THP-1, THP-1dif, A549) boli stimulované prostredníctvom LPS (100 ng/ml) počas 3, 6, 9, 24 a 48 hodín a bola sledovaná koncentrácia cytokínov IL-33, IL-1 α a IL-1 β uvoľnených do supernatantu pred nekrozou a po nej.

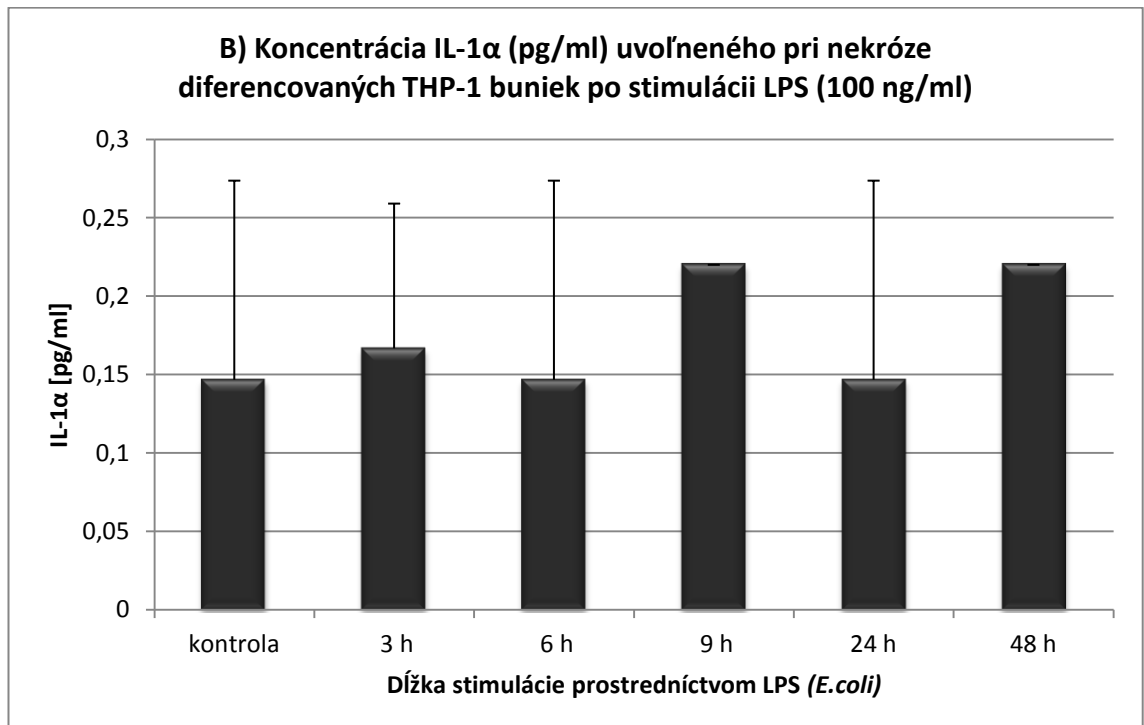
6.4.1 IL-1 α

Prítomnosť IL-1 α v supernatante buniek bola nameraná len u THP-1 a THP-1dif buniek, ktoré podstúpili zmrazovanie a bola u nich indukovaná nekróza. U nenekrotizovaných buniek a epiteliálnej línie nebol IL-1 α identifikovaný v supernatantoch vôbec alebo s nízkou frekvenciou boli namerané koncentrácie pri dolnej hranici citlivosti metódy. Tieto výsledky potvrdzujú, že IL-1 α funguje ako alarmín a do extracelulárneho priestoru je uvoľňovaný pri nekroze buniek.

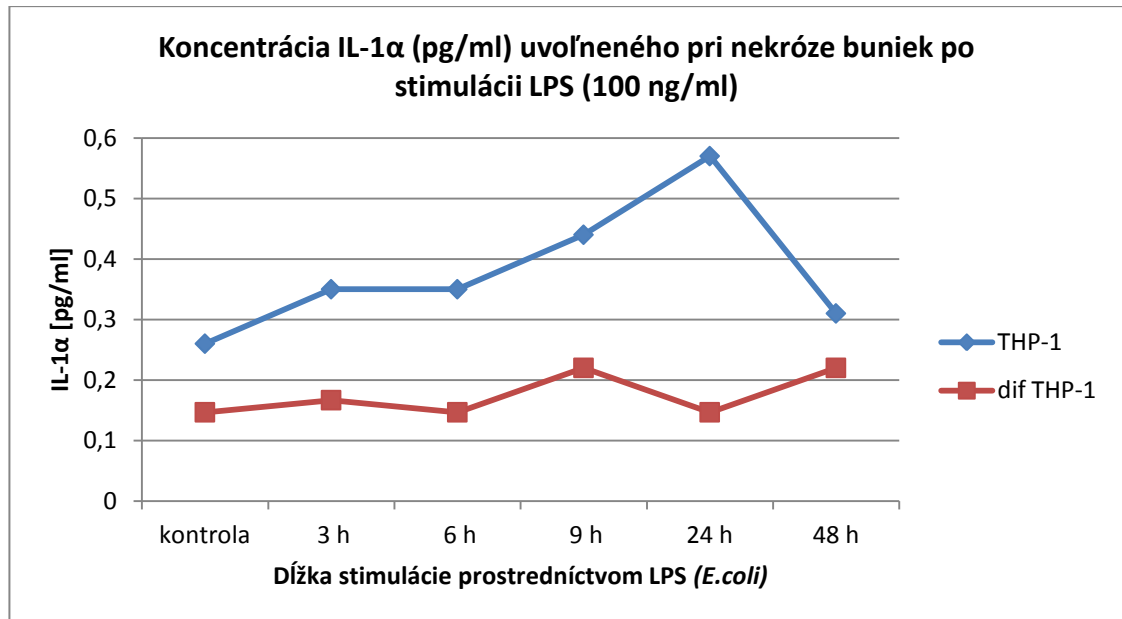
Ďalej bol sledovaný vplyv LPS na koncentráciu IL-1 α u týchto buniek. Všetky bunky boli stimulované rovnakou koncentráciou LPS 100 ng/ml. Účinok LPS na produkciu IL-1 α je viditeľný u nediferencovaných THP-1 buniek, najvyššia koncentrácia IL-1 α v bola nameraná po 24 hod inkubácii. U THP-1dif nedošlo v porovnaní s kontrolnými nestimulovanými bunkami ku zmene sekrécie IL-1 α do supernatantu.



Graf č. 2: Koncentrácia IL-1 α (pg/ml) uvoľneného pri nekróze po stimulácii prostredníctvom LPS (100 ng/ml) u nediferencovaných THP-1 buniek. Merané metódou Luminex.



Graf č. 3: Koncentrácia IL-1 α (pg/ml) uvoľneného pri nekróze po stimulácii prostredníctvom LPS (100 ng/ml) u THP-1 buniek diferencovaných prostredníctvom vitamínu D3. Merané metódou Luminex.



Graf č. 4: Porovnanie koncentrácie IL-1 α nameranej v supernatantoch buniek THP-1 a THP-1dif zhodne stimulovaných prostredníctvom LPS (100 ng/ml) a následne nekrotizovaných opätovným zmrazovaním a rozmrazovaním. Merané metódou Luminex.

6.4.2 IL-1 β

IL-1 β bol narozdiel od IL-1 α identifikovaný v supernatantoch buniek všetkých sledovaných bunkových typov pred nekrózou aj po nej. Vplyv LPS na koncentráciu IL-1 β u týchto buniek sa líšil v závislosti od pozorovanej línie.

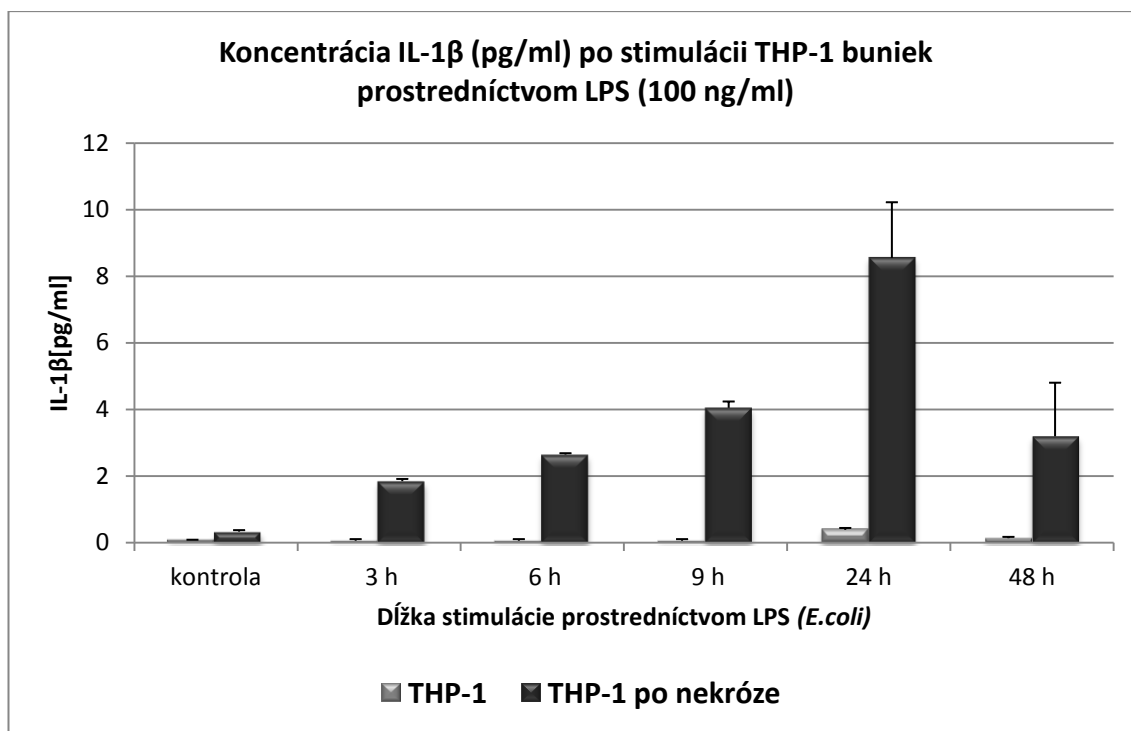
THP-1 promonocyty a diferencované THP-1 monocyty (THP-1dif) uvoľnili po nekróze vyššie množstvo IL-1 β . U oboch líní bol pozorovaný aj účinok LPS na zvýšenie koncentrácie IL-1 β , pričom u nediferencovaných THP-1 buniek bol efekt či už nekrózy alebo stimulácie prostredníctvom LPS výraznejší.

U kontrolných THP-1 buniek bola nameraná koncentrácia IL-1 β pred nekrózou 0,08 ng/ml, zatiaľ čo u kontrolných buniek po nekróze to bolo množstvo štvornásobne vyššie - 0,33 ng/ml. Pred nekrózou dosiahli THP-1 bunky maximálnej produkcie 0,37 ng/ml IL-1 β po 24 hodinách, po nekróze bola koncentrácia IL-1 β v supernatante po rovnako dlhej inkubácii výrazne vyššia (8,54 ng/ml). Vplyv nekrózy na koncentráciu IL-1 β v supernatante je teda zrejмый, porovnanie množstva IL-1 β v supernatante buniek pred nekrózou a po nej vidíme v grafe č.5. Po nekróze sa do supernatantu vlastne dostal IL-1 β , ktorý sa pôvodne nachádzal v bunke. Prenesene teda môžeme vďaka nekróze zistiť, či sa daný cytokín nachádza vnútri bunky. U nenekrotizovaných THP-1 buniek vidíme, že k zvýšeniu koncentrácie IL-1 β v porovnaní s kontrolou nastalo až po 24 hodinovej inkubácii. U buniek nekrotizovaných môžeme vidieť, že k zvýšeniu koncentrácie došlo už po 3 hodinách. Na základe predpokladu, že vďaka nekróze sa dostane do supernatantu

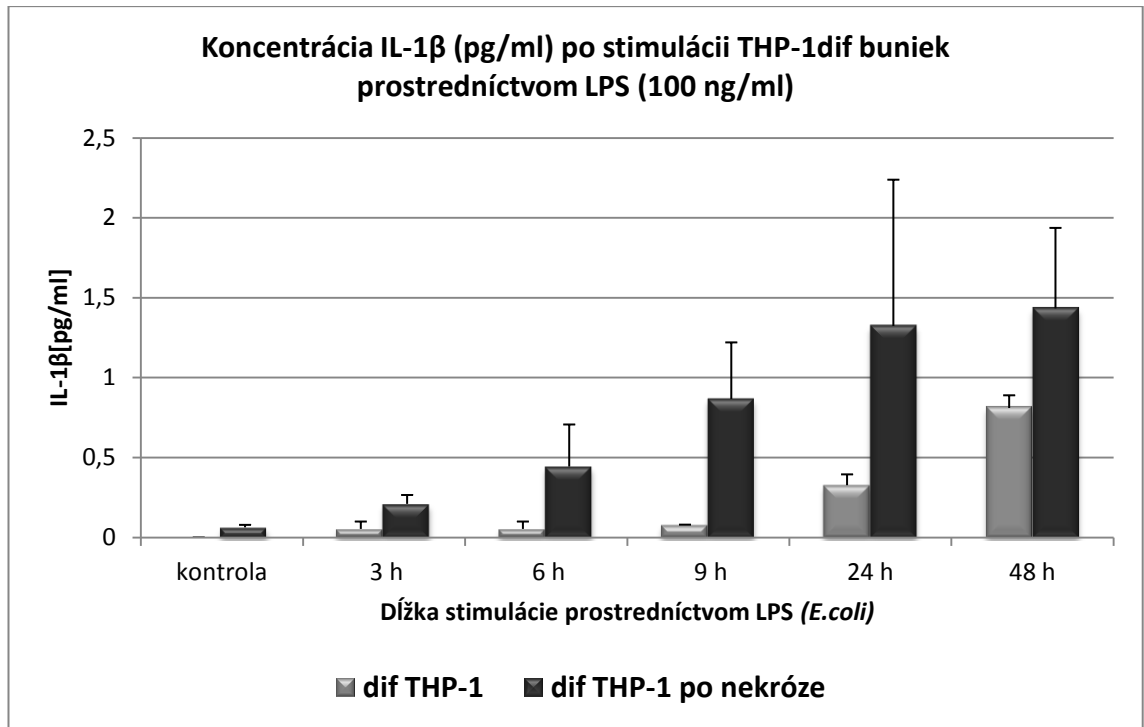
aj obsah bunky, môžeme predpokladať, že THP-1 bunky začnú exprimovať IL-1 β už po troch hodinách, ale až po 24 hodinách dochádza k jeho sekrécii do extracelulárneho priestoru.

THP-1 dif bunky vykazovali rovnaký vplyv nekrózy a aj LPS ako THP-1 bunky nediferencované. Po nekróze boli namerané vyššie koncentrácie IL-1 β ako pred ňou, napr. po 24 hodinovej inkubácii s LPS bola nameraná koncentrácia IL-1 β 0,33 ng/ml, po nekróze to bol štvornásobok (1,32 ng/ml). Viditeľný je aj skorší nástup efektu LPS na koncentráciu IL-1 β v supernatantoch nekrotizovaných THP-1 dif, k zvýšeniu koncentrácie IL-1 β došlo oproti kontrole už po 3 hodinách, zatiaľ čo u buniek, ktoré nepodstúpili zmrazovanie, došlo k zvýšeniu až po 24 hod inkubácii (Graf č. 6). Maximálnej koncentrácie IL-1 β v supernatante bolo dosiahnuté po 48 hod inkubácii (1,43 ng/ml).

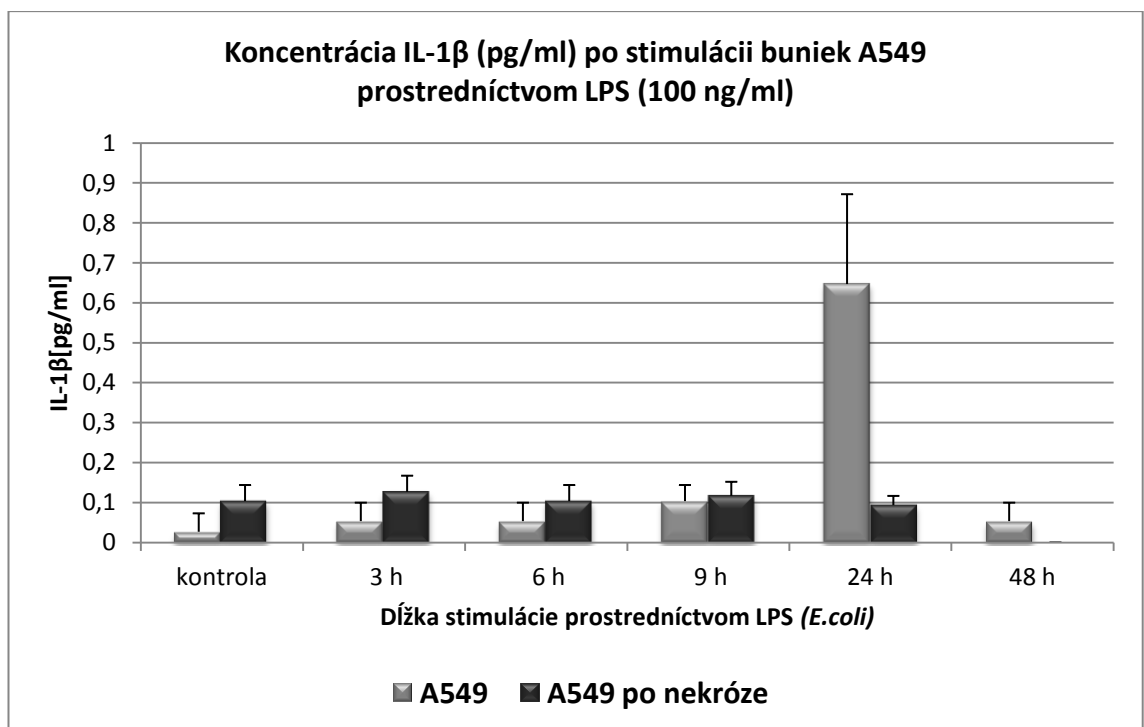
U epiteliálnych alveolárnych buniek A549 nebol pozorovaný vplyv nekrózy na koncentráciu IL-1 β , kontrolné bunky a aj bunky po nekróze vykazovali len nízku hladinu sekrécie IL-1 β , ktorá nepresiahla hranicu 0,7 ng/ml. Koncentráciu IL-1 β u A549 buniek po nekróze neovplyvnila ani stimulácia prostredníctvom LPS (Graf č.7).



Graf č. 5: Porovnanie koncentrácie IL-1 α nameranej v supernatantoch buniek THP-1 a THP-1 dif zhodne stimulovaných prostredníctvom LPS (100 ng/ml) a následne nekrotizovaných opätovným zmrazovaním a rozmrazovaním. Merané metódou Luminex.

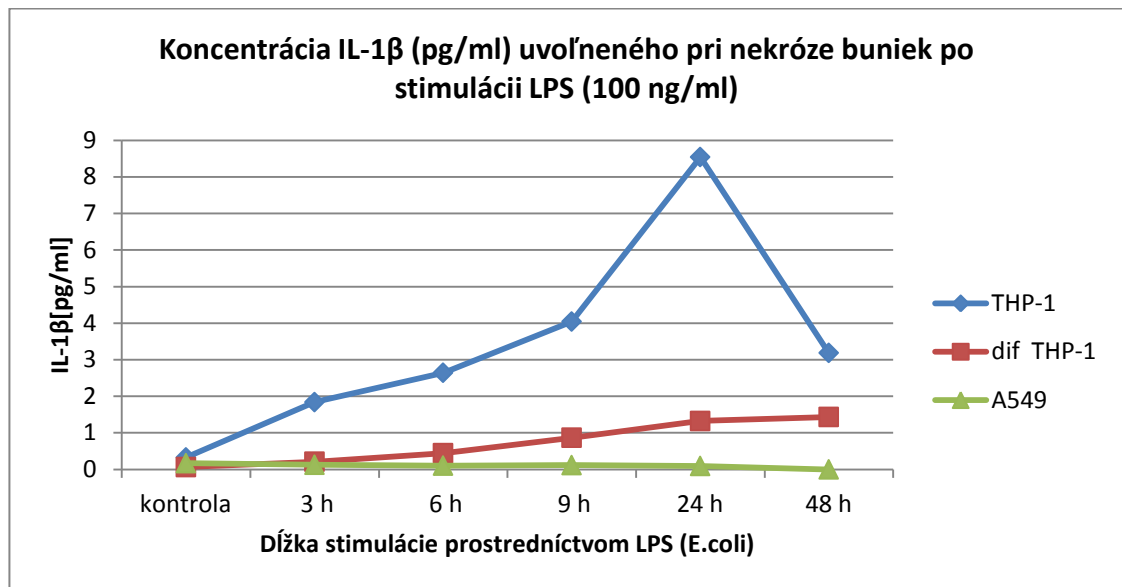


Graf č. 6: Porovnanie koncentrácie IL-1 α nameranej v supernatantoch buniek THP-1 a THP-1dif zhodne stimulovaných prostredníctvom LPS (100 ng/ml) a následne nekrotizovaných opätovným zmrazovaním a rozmrazovaním. Merané metódou Luminex.



Graf č. 7: Porovnanie koncentrácie IL-1 α nameranej v supernatantoch buniek THP-1 a THP-1dif zhodne stimulovaných prostredníctvom LPS (100 ng/ml) a následne nekrotizovaných opätovným zmrazovaním a rozmrazovaním. Merané metódou Luminex.

Porovnanie účinku LPS na jednotlivé bunkové línie, ktoré boli nekrotizované, vidíme na grafe č.8. Zatiaľ čo u epiteliálnych buniek sme žiaden účinok nepozorovali, u THP-1 a THP-1dif buniek je vidno, že LPS zvyšuje produkciu IL-1 β v supernatantoch, funguje teda ako stimulant. Silnejší účinok má na nediferencované THP-1 promonocyty, maximálna nameraná koncentrácia IL-1 β bola po 24 hod inkubácii 8,54 ng/ml, zatiaľ čo maximálna koncentrácia IL-1 β u THP-1dif bola nameraná po 48 hod inkubácii a mala hodnotu 1,43 ng/ml.



Graf č. 8: Porovnanie koncentrácie IL-1 β nameranej v supernatantoch buniek THP-1, THP-1dif a A549 zhodne stimulovaných prostredníctvom LPS (100 ng/ml) a následne nekrotizovaných opätovným zmrazovaním a rozmrazovaním. Merané metódou Luminex.

6.4.3 IL-33

Ani po indukcii nekrózy, či už u THP-1 buniek diferencovaných alebo nediferencovaných sa nám IL-33 v supernatante buniek nepodarilo identifikovať. Počas všetkých experimentov sme namerali IL-33 iba v dvoch vzorkách, hodnoty koncentrácie boli 3,64 ng/ml a 5,79 ng/ml. Keďže sa nám po mnohých experimentoch stále nedarilo identifikovať IL-33, rozhodli sme sa overiť správnosť protokolu. Vyšetované boli všetky supernatanty odobrané počas celého priebehu experimentu. Po tom, ako sme diferencovali THP-1 bunky prostredníctvom vitamínu D3 bol z kultivačnej misky odobraný supernatant s plávajúcimi, teda nediferencovanými THP-1 bunkami a experimenty prebiehali ďalej len na adherovaných bunkách. IL-33 bol nameraný práve v tomto supernatante. Po zopakovaní experimentu a premeraní „pozitívneho“ supernatantu sa nám však nepodarilo IL-33 znova namerať. Taktiež sme skúsili upraviť protokol experimentu. K adherovaným THP-1 bunkám sme po odstránení supernatantu s nediferencovanými bunkami nepridávali čisté médium, ale supernatant sme centrifugovali, aby sme odstránili bunky a vrátili sme ho k bunkám. Ani tento postup však nebol úspešný.

7 Diskusia

Interleukín 33 je syntetizovaný ako 270 aminokyselín obsahujúca 30,7-kDa dlhá molekula. Pôvodne sa vedci domnievali, že sa jedná o prekursor IL-33, avšak viaceré novšie štúdie dokazujú, že práve neštiepená forma pro-IL-33 je biologicky aktívna (*Talabot-Ayer et al. 2009*). Pokiaľ dôjde k jeho štiepeniu napr. apoptotickými kaspázami, stratí schopnosť účinne sa naviazať na ST-2 receptor (*Cayrol a J-philippe Girard 2009*), (*Lüthi et al. 2009*). Záhadou však ostáva, ako je IL-33 sekretovaný z buniek. Aby mohol IL-33 fungovať ako cytokín musí byť uvoľnený do extracelulárneho priestoru, kde sa naväzuje na svoj špecifický receptor a tak aktivuje cieľové bunky. Avšak IL-33 mRNA je prepísaná bez signálnej sekvencie a pro-IL-33 vo svojej štruktúre neobsahuje signálny peptid rovnako ako precursori takmer všetkých členov rodiny IL-1. Výnimkou je iba IL-1Ra (ang. IL-1 Receptor antagonist). Signálny peptid je nevyhnutný pre sekreciu proteínov cestou cez endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát, ktorá je typická pre väčšinu sekretovaných cytokínov. Neprítomnosť signálnej sekvencie naznačuje, že v rámci evolúcie mali tieto proteíny pôvodne intracelulárne funkcie, ktoré môžu pretrvávajúť dodnes (*Werman et al. 2004*).

IL-33 nie je pravdepodobne sekretovaný ani prostredníctvom ďalšieho známeho mechanizmu, ktorý využívajú dvaja členovia IL-1 rodiny, IL-1 β a IL-18. Tie sú syntetizované ako 33 kDa dlhý precursor pro-IL-1 β a 23 kDa dlhý precursor pro-IL-18. Následne zotrávajú v cytozole, až kým nedôjde k aktivácii multiproteínového komplexu – inflamazómu, ktorý poskytne potrebný stimul pre zymogén pro-kaspázu-1. Vďaka tomuto stimulu sa pro-kaspáza-1 autokatalyticky rozštiepi na aktívny enzým kaspázu-1 (*Martinon et al. 2002*). Prostredníctvom kaspázy-1 sú precursori pro-IL-1 β a pro-IL-18 štiepené na maturovanú formu a sekretované (*Black et al. 1989*), (*Akita et al. 1997*).

Cieľom mojej práce bolo experimentálne overiť viaceré mechanizmy, ktoré by sa na základe znalostí iných cytokínov a na základe faktov známych o IL-33 mohli podieľať na regulácii jeho produkcie a sekrecie mimo bunku.

Máloktoý cytokín je produkovaný do extracelulárneho priestoru konštitutívne, bunky ich zvyčajne začnú sekretovať až ako odpoveď na konkrétny podnet. Tým býva zväčša pôsobenie iného cytokínu či molekuly endogénneho alebo aj exogénneho pôvodu. Možnosť, že nejaký cytokín stimuluje u buniek sekreciu IL-33 bola prvým mechanizmom, ktorý sme skúmali. Napriek testovaniu širokého spektra cytokínov TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-13, IL-33, TGF- β a IL-10 a aj veľmi účinného stimulans LPS sa nám nepodarilo ani u jednej bunkovej línie indukovať sekreciu IL-33 do supernatantu. IL-33 bol detegovaný jedine v supernatante buniek stimulovaných prostredníctvom seba samého a to v nižšej koncentrácii, než v akej bol pridávaný. Tieto výsledky sú vlastne v súlade so súčasnými poznatkami o IL-33. Keď som

začínala vypracovávať diplomovú prácu, existovalo len zopár štúdií naznačujúcich, že so sekréciou IL-33 to nie je také jednoduché. Medzičasom sa vplyvom cytokínov na sekréciu IL-33 zaoberali viaceré štúdie, a len jedna jediná z nich zistila, že by nejaký cytokín dokázal stimulovať sekréciu IL-33. Jednalo sa o pečeneové hviezdicové bunky stimulované prostredníctvom TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IFN- γ (*Marvie et al. 2009*). Vplyv tohto mechanizmu sa môže líšiť u rozdielnych bunkových typov. Jedna štúdia skúmala produkciu IL-33 na bunkovej línii THP-1. Ukázala, že THP-1 bunky neprodukurujú IL-33 po stimulácii prostredníctvom IL-1 β a TNF- α (Nile et al. 2010). Vďaka meraniu mRNA IL-33 pomocou metódy PCR však viaceré štúdie dokázali, že cytokíny majú vplyv na produkciu IL-33 v bunkách, chýba teda nejaký krok, ktorý by umožnil sekréciu naprodukovaného IL-33 do okolia buniek. K zvýšenej expresii mRNA IL-33 došlo napr. u makrofágov stimulovaných prostredníctvom LPS (*Schmitz et al. 2005*), u fibroblastov stimulovaných prostredníctvom IL-1- β a TNF- α (*Schmitz et al. 2005*), u synoviálnych fibroblastov pacientov s reumatoidnou artritídou stimulovaných prostredníctvom TNF- α alebo TNF- α +IL-1 (*Xu et al. 2010*), (*Palmer et al. 2009*) či u buniek hladkého svalstva z dýchacích ciest pacientov s astmou stimulovaných prostredníctvom TNF. Stimulácia prostredníctvom LPS taktiež bola schopná zvýšiť produkciu mRNA IL-33, dokonca u THP-1 línie (*Nile et al. 2010*).

V ďalšej časti práce overovali, či IL-33 patrí medzi tzv. alarmíny, takže by mal byť z buniek uvoľňovaný pri poškodení či nekróze. To bol druhý skúmaný mechanizmus. Bunky boli stimulované prostredníctvom LPS a nekrózu sme indukovali pomocou viacerých cyklov zmrazovania a rozmrazovania. V tomto prípade sa naše výsledky rozchádzajú so súčasným pohľadom na to, ako sa IL-33 dostáva do extracelulárneho priestoru. V štúdií Christophera J. Nila bol potvrdený vplyv nekrózy na produkciu IL-33 konkrétne u THP-1 buniek diferencovaných prostredníctvom vitamínu D3 (*Nile et al. 2010*). Touto štúdiou sme sa inšpirovali a aj naše THP-1 bunky sme úspešne diferencovali na tzv. THP-1 dif bunky. Bohužiaľ sa nám nepodarilo dosiahnuť obdobné výsledky.

Počas všetkých experimentov sme namerali IL-33 iba v dvoch vzorkách, hodnoty koncentrácie boli 3,64 ng/ml a 5,79 ng/ml. Keďže sa nám po mnohých experimentoch stále nedarilo identifikovať IL-33, rozhodli sme sa overiť správnosť protokolu. Vyšetrované boli všetky supernatanty odobrané počas celého priebehu experimentu. Po tom, ako sme diferencovali THP-1 bunky prostredníctvom vitamínu D3, bol z kultivačnej misky odobraný supernatant s plávajúcimi, teda nediferencovanými THP-1 bunkami a experimenty prebiehali ďalej len na adherovaných bunkách. IL-33 bol nameraný práve v tomto supernatante. Po zopakovaní experimentu a premeraní „pozitívneho“ supernatantu sa nám však nepodarilo IL-33 znova namerať. Taktiež sme skúsili upraviť protokol experimentu. K adherovaným THP-1 bunkám sme po odstránení supernatantu s nediferencovanými bunkami nepridávali čisté médium, ale

supernatant sme centrifugovali, aby sme odstránili bunky a vrátili sme ho k bunkám. Ani tento postup však nebol úspešný.

Viacere štúdie sa domnievajú, že proteín IL-33 je do extracelulárneho priestoru uvoľňovaný len vo veľmi nízkych koncentráciách, ktoré sú často nemerateľné. Ak by bol IL-33 vylučovaný v takých veľmi nízkych koncentráciách, znamenalo by to, že pôsobí len lokálne na najbližšie bunky. Ďalšou možnosťou je, že IL-33 sa z buniek neuvolní a pôsobí intrakrinne, ako nukleárny faktor (*Carriere et al. 2007*). My sme merali IL-33 pomocou metódy ELISA citlivou natoľko aby zmerala IL-33 už pri koncentrácii približne 3ng/ml. Pri experimentoch realizovaných tímom Christophera J. Nila však boli namerané koncentrácie okolo 50 ng/ml, takže tento argument neobstojí. V ďalšej štúdií bola nameraná koncentrácia proteínu IL-33 v supernatantoch pečeneňových hviezdicových buniek stimulovaných prostredníctvom TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ okolo 30 pg/ml (*Marvie et al. 2009*).

Produkcia proteínu IL-33 do extracelulárneho priestoru bola preukázaná len v zopár štúdiách. Vedecký tím Atsushiho Nishidy identifikoval proteín IL-33 v cytoplazme pankreatických myofibroblastov odobraných pacientom s chronickou pankreatitídou, bola dokázaná aj sekrécia IL-33(*Nishida et al. 2010*). V rozpore s týmito výsledkami je štúdia, pri ktorej na rovnakom type buniek prevádzal podobné experimenty tím Atsushiho Masamuna. Ten zistil prítomnosť proteínu IL-33 hlavne v jadre pankreatických myofibroblastov a proteín IL-33 mimo bunky vôbec nebol identifikovaný (Masamune et al. 2010). Rozdielna prítomnosť proteínu IL-33 v cytoplazme či v jadre buniek sa dá vysvetliť pomocou výsledkov ďalšej štúdie. V nej bol IL-33 distribuovaný v cytoplazme buniek odobraných zo zdravého tkaniva, zatiaľ čo v tkanive postihnutom IBD (idiopatické črevné zápalové ochorenie) bol IL-33 identifikovaný v jadre. Je možné, že v zdravých tkanivách je IL-33 distribuovaný v cytoplazme. Po zahájení zápalu dochádza k zvýšenej produkcii, ktorá umožní translokáciu IL-33 do jadra buniek. Tento mechanizmus pôsobenia (translokácia do jadra pri zvýšenej produkcii a následné pôsobenie ako represor pre určité gény) bol pozorovaný aj u príbuznej molekuly IL-1 α . Spolu s HMGB1 proteínom je momentálne IL-33 radený medzi už spomínané alarmíny. Ďalšia štúdia preukazuje prítomnosť proteínu IL-33 v sére pacientov trpiacich ulceróznou kolitídou prostredníctvom ELISA metódy (*Beltrán et al. 2009*). Napriek tomu, že namerané hladiny IL-33 sú nízke (3-8 ng/ml,), sú štatisticky významné v porovnaní so zdravými kontrolami. Aj ďalšia štúdia preukázala expresiu proteínu IL-33 u myofibroblastov zo subepiteliálnej vrstvy čreva postihnutého ulceróznou kolitídou. IL-33 bol meraný prostredníctvom ELISA metódy(*Kobori et al. 2010*). Hladiny boli tentokrát vyššie, okolo 20 ng/ml, pravdepodobne preto, že experimentátori rozlišovali pacientov s aktívnou a inaktívnou formou ulceratívnej kolitídy. Práve u pacientov s aktívnou formou bolo zvýšenie hladiny IL-33 výraznejšie.

Prítomnosť proteínu IL-33 vo všetkých ostatných štúdiách uvedených v tabuľke č.1 bola meraná pomocou metódy Western blot, pri ktorej musia byť bunky homogenizované a teda nie je zrejmé, či IL-33 pochádza z extracelulárneho priestoru alebo z vnútra bunky. Takisto pri imunohistochemických metódach je bunková membrána často porušená a IL-33 tak vôbec nemusí byť mimo bunky.

V tejto práci sa nám teda nepodarilo prinútiť bunky sekretovať IL-33 do supernatantu, ani po indukciu nekrózy nedošlo k jeho uvoľneniu. Jedným z vysvetlení by mohlo byť, že THP-1 bunková línia je náchylná na genetické zmeny a jej vlastnosti sa môžu po dlhšom kultivovaní dramaticky zmeniť. My sme sa tomu snažili zabrániť tým, že po každej 25 pasáži boli bunky nahradené novými. S podobným problémom sa stretol aj tím Gabyho Palmera, ktorý skúmal vplyv kaspázy-1 na štiepenie IL-33. Nepodarilo sa im u THP-1 bunkovej línie indukovať ani len expresiu mRNA IL-33. Experimenty boli prevádzané na THP-1 bunkách transdukovaných pomocou lentivirálného vektora, ktorý umožnil bunkám produkovať IL-33 (*Talbot-Ayer et al. 2009*).

Ako je IL-33 sekretovaný do extracelulárneho priestoru teda stále nie je dostatočne objasnené. Poznanie týchto mechanizmov a aj ďalších vlastností IL-33 môže byť užitočných hlavne preto, že IL-33 sa účastní na patológii rôznych infekčných a autoimunitných chorôb, takže môže byť vhodným terapeutickým cieľom.

8 Použitá literatura

Abston ED, Barin JG, Cihakova D, Bucek A, Coronado MJ, Brandt JE, Bedja D, Kim JB, Georgakopoulos D, Gabrielson KL, Mitzner W, Fairweather D. 2012. IL-33 Independently Induces Eosinophilic Pericarditis and Cardiac Dilatation: ST2 Improves Cardiac Function. *Circulation. Heart failure*.

Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. 1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry* **260**: 2345-54.

Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, Takakura-Yamamoto R, Torigoe K, Gu Y, Su MS, Fujii M, Satoh-Itoh M, Yamamoto K, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M. 1997. Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 26595-26603.

Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R, Schmitz ML, Martin MU. 2011. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF- κ B to dampen NF- κ B-stimulated gene transcription. *The Journal of Immunology* **187**: 1609-1616.

Ali S, Nguyen DQ, Falk W, Martin MU. 2010. Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochemical and biophysical research communications* **391**: 1512-6.

Allakhverdi Z, Smith Dirk E, Comeau MR, Delespesse G. 2007. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**: 2051-4.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature reviews. Immunology* **7**: 975-87.

Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. 2012. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. *Liver International*: n/a-n/a.

Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard J-P. 2003. Molecular Characterization of NF-HEV, a Nuclear Factor Preferentially Expressed in Human High Endothelial Venules. *The American journal of pathology* **163**: 69-79.

Barbera AJ, Chodaparambil JV, Kelley-Clarke B, Joukov V, Walter JC, Luger K, Kaye KM. 2006. The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science* **311**: 856-861.

Beltrán CJ, Núñez LE, Díaz-Jiménez D, Farfan N, Candia E, Heine C, López F, González MJ, Quera R, Hermoso M a. 2009. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*: 1-11.

Billiau A. 1996. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Advances in Immunology* **62**: 61-130.

Black RA, Kronheim SR, Sleath PR. 1989. Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Letters* **247**: 386-390.

Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, Gombert J-M, Schneider E, Dy M, Gourdy P, Girard J-P, Herbelin A. 2009. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *European journal of immunology* **39**: 1046-55.

Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, Min B, Kastelein Robert A, Aronica M, Kosz-Vnenchak M, Li X. 2009. The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *The Journal of Immunology* **182**: 2601-2609.

Buryskova M, Pospisek M, Grothey A, Simmet T, Burysek L. 2004. Intracellular interleukin-1alpha functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 4017-4026.

Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre D-A, Americh L, Aguilar L, Bouche G, Girard J-P. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 282-7.

Cayrol C, Girard J-philippe. 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9021-6.

Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein Robert A. 2007. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**: 2551-5.

Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S, Hubans C, Maurage CA, Huot L, Bensemain F, Laumet G, Ayrat AM, Fievet N, Hauw JJ, DeKosky ST, Lemoine Y, Iwatsubo T, Wavrant-Devrièze F, Dartigues JF, Tzourio C, Buée L, Pasquier F, Berr C, Mann D, Lendon C, Alpérovitch A, Kamboh MI, Amouyel P, Lambert JC. 2009. Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry* **14**: 1004-16.

Church LD, Cook GP, McDermott MF. 2008. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nature Clinical Practice Rheumatology* **4**: 34-42.

Dinarello C A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-147.

Eigenbrod T, Park J-H, Harder J, Iwakura Y, Núñez G. 2008. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *The Journal of Immunology* **181**: 8194-8198.

Farrar MA, Schreiber RD. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review of Immunology* **11**: 571-611.

Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *The Journal of Immunology* **176**: 3877-3883.

Funakoshi-Tago M, Tago Kenji, Hayakawa M, Tominaga S-I, Ohshio T, Sonoda Y, Kasahara T. 2008. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cellular signalling* **20**: 1679-86.

Groß P, Doser K, Falk W, Obermeier F, Hofmann C. 2012. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases*.

Gächter T, Werenskiold AK, Klemenz R. 1996. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 124-9.

Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura Shizue, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda Shigeharu, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi Kenji, Yoshimoto Tomohiro. 2012. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*.

Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S-ichi. 2007. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *The Journal of biological chemistry* **282**: 26369-80.

Hayakawa M, Hayakawa H, Matsuyama Y, Tamemoto H, Okazaki H, Tominaga S-ichi. 2009. Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* **387**: 218-22.

Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Suto H, Iikura M, Okayama Y, Akira S, Saito H, Galli SJ, Nakae S. 2007. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals. *Journal of leukocyte biology* **82**: 1481-90.

Iwahana Hiroyuki, Hayakawa M, Kuroiwa Kenji, Tago Kenji, Yanagisawa Ken, Noji S, Tominaga S-ichi. 2004. Molecular cloning of the chicken ST2 gene and a novel variant form of the ST2 gene product, ST2LV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1681**: 1-14.

Iwahana H, Yanagisawa K, Ito-Kosaka A, Kuroiwa K, Tago K, Komatsu N, Katashima R, Itakura M, Tominaga S. 1999. Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* **264**: 397-406.

Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, Angulo A, Ghazal P, Harris CA, Siekierka JJ, Peterson PA, Fung-Leung W-P. 1999. Defective Interleukin (IL)-18-mediated Natural Killer and T Helper Cell Type 1 Responses in IL-1 Receptor-associated Kinase (IRAK)-deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine* **189**: 1129-1138.

Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, Dinarello C A. 1994. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* **84**: 4242-4248.

Klemenz R, Hoffmann S, Werenskiold AK. 1989. Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 5708-5712.

Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. 1990. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 5548-5552.

Kobori A, Yagi Y, Imaeda H, Ban H, Bamba S, Tsujikawa T, Saito Y, Fujiyama Y, Andoh A. 2010. Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology* **45**: 999-1007.

Komai-Koma M, Xu D, Li Yubin, McKenzie Andrew N J, McInnes IB, Liew FY. 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *European journal of immunology* **37**: 2779-86.

Kondo Y, Yoshimoto Tomohiro, Yasuda Koubun, Futatsugi-Yumikura Shizue, Morimoto M, Hayashi N, Hoshino T, Fujimoto J, Nakanishi Kenji. 2008. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *International immunology* **20**: 791-800.

Koyasu S, Moro K. 2011. Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology* **132**: 475-81.

Kurowska-Stolarska M, Kewin Pete, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, Komai-Koma M, Pitman N, Li Yubin, McKenzie Andrew N. J., Teixeira MM, Liew FY, Xu D. 2008. IL-33 Induces Antigen-Specific IL-5+ T Cells and Promotes Allergic-Induced Airway Inflammation Independent of IL-4. *J. Immunol.* **181**: 4780-4790.

Küchler AM, Pollheimer J, Balogh J, Sponheim J, Manley L, Sorensen DR, De Angelis PM, Scott H, Haraldsen G. 2008. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *The American journal of pathology* **173**: 1229-42.

Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. 1992. Growth factor-induced delayed early response genes. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 3919-3929.

Li M, Li Yan, Liu X, Gao X, Wang Y. 2012. IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Journal of neuroimmunology*.

Lingel A, Weiss TM, Niebuhr M, Pan B, Appleton B a, Wiesmann C, Bazan J Fernando, Fairbrother WJ. 2009. Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure (London, England : 1993)* **17**: 1398-410.

Lyons RM. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *The Journal of Cell Biology* **106**: 1659-1665.

Löhning Max, Stroehmann A, Coyle Anthony J, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos J-C, Levinson D, Radbruch Andreas, Kamradt Thomas. 1998. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6930-6935.

Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* **31**: 84-98.

Maelfait J, Vercammen E, Janssens S, Schotte P, Haegman M, Magez S, Beyaert R. 2008. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 β maturation by caspase-8. *The Journal of Experimental Medicine* **205**: 1967-1973.

Maier JA, Statuto M, Ragnotti G. 1994. Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 1845-1851.

Maizels RM. 2005. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Current opinion in immunology* **17**: 656-61.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* **10**: 417-426.

Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, Bourd-Boittin K, Théret N, Gascan H, Piquet-Pellorce C, Samson M. 2009. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**: 1726-1739.

Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, Satoh K, Kanno A, Shimosegawa T. 2010. Nuclear expression of interleukin-33 in pancreatic stellate cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **299**: G821-32.

Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T., Yasuda K., Futatsugi-Yumikura S., Taki Y, Muto T, Ikeda T, Mimura O, Nakanishi K. 2010. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. *International Immunology* **22**: 479-489.

Matsuda A, Okayama Y, Terai N, Yokoi N, Ebihara N, Tanioka H, Kawasaki S, Inatomi T, Katoh N, Ueda E, Hamuro J, Murakami A, Kinoshita S. 2009. The role of interleukin-33 in chronic allergic conjunctivitis. *Investigative ophthalmology & visual science* **50**: 4646-52.

Matsuyama Y, Okazaki H, Hoshino M, Onishi S, Kamata Y, Nagatani K, Nagashima T, Iwamoto M, Yoshio T, Ohto-Ozaki H, Tamemoto H, Komine M, Sekiya H, Tominaga S-I, Minota S. 2011. Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 β signaling and a poor clinical response. *Rheumatology international*.

Meisel C, Bonhagen K, Löhning M, Coyle A J, Gutierrez-Ramos JC, Radbruch A, Kamradt T. 2001. Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *The Journal of Immunology* **166**: 3143-3150.

Mizel SB, Kilian PL, Lewis JC, Paganelli KA, Chizzonite RA. 1987. The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *The Journal of Immunology* **138**: 2906-2912.

Mok MY, Huang FP, Ip WK, Lo Y, Wong FY, Chan EYT, Lam KF, Xu D. 2010. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford, England)* **49**: 520-7.

Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R. 1998. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *The Journal of Immunology* **161**: 4866-4874.

Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, Mézin F, Palmer G, Gabay C. 2007. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* **40**: 216-25.

Moussion C, Ortega N, Girard J-P. 2008. The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel "Alarmin"? (D Unutmaz, Ed.). *PLoS ONE* **3**: 8.

Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **171**: 6173-7.

Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. 2004. TGF- β 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4+CD25+ Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice. *J. Immunol.* **172**: 834-842.

Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TKA, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie Andrew N J. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**: 1367-1370.

Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. 2010. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology*: 1-9.

Nishida A, Andoh A, Imaeda H, Inatomi O, Shiomi H, Fujiyama Y. 2010. Expression of interleukin 1-like cytokine interleukin 33 and its receptor complex (ST2L and IL1RAcP) in human pancreatic myofibroblasts. *Gut* **59**: 531-541.

Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Morii E, Aozasa K, Flavell R a, Okumura K, Saito H, Nakae S. 2009. Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**: 7890-7.

Oida T, Xu L, Weiner HL, Kitani A, Strober W. 2006. TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**: 2331-9.

Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. 1999. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **19**: 1279-88.

Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, Finckh A, Smith Dirk E, Gabay C. 2009. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism* **60**: 738-49.

Poon AH, Eidelman DH, Martin J G, Laprise C, Hamid Q. 2012. Pathogenesis of severe asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **42**: 625-37.

Priestle JP, Schär HP, Grütter MG. 1988. Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta. *The European Molecular Biology Organization Journal* **7**: 339-343.

Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, Lemièrre C, Martin James G, Hamid Qutayba. 2009. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**: 5094-103.

Pugin J, Schürer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. 1993. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 2744-8.

Pupo E, Hardy E. 2009. Complejidad y soluciones al problema de aislamiento de las especies moleculares de los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas. *Bioteconología Aplicada* **26**: 9-15.

Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, Liew FY, Melendez AJ. 2009. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9773-8.

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**: 153-162.

Rifkin DB. 2005. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *The Journal of biological chemistry* **280**: 7409-12.

Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard J-P. 2008. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO reports* **9**: 1006-12.

Sakashita M, Yoshimoto T, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura Y, Yasuda K, Nakanishi K, Tamari M. 2008. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **38**: 1875-81.

Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie Andrew N J, Lee RT. 2007. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *The Journal of clinical investigation* **117**: 1538-49.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan J Fernando, Kastelein Robert A. 2005. 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* **23**: 479-90.

Seidelin JB, Bjerrum JT, Coskun M, Widjaya B, Vainer B, Nielsen OH. 2010. IL-33 is upregulated in colonocytes of ulcerative colitis. *Immunology letters* **128**: 80-5.

- Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhäuser ML, Handa V, Gannon J, Lee RT. 2009.** Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circulation. Heart failure* **2**: 684-91.
- Sims JE, Nicklin MJ, Bazan J F, Barton JL, Busfield SJ, Ford JE, Kastelein R A, Kumar S, Lin H, Mulero JJ, Pan J, Pan Y, Smith D E, Young PR. 2001.** A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends in immunology* **22**: 536-7.
- Smith Dirk E. 2011.** The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. *Journal of Leukocyte Biology* **89**: 383-392.
- Smithgall MD, Comeau MR, Yoon B-RP, Kaufman D, Armitage R, Smith Dirk E. 2008.** IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *International immunology* **20**: 1019-30.
- Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin Peter, Xu D, Liew FY. 2010.** IL-33 Exacerbates Eosinophil-Mediated Airway Inflammation. *The Journal of Immunology* **185**: 3472-3480.
- Superti-Furga G, Bergers G, Picard D, Busslinger M. 1991.** Hormone-dependent transcriptional regulation and cellular transformation by Fos-steroid receptor fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 5114-5118.
- Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. 2009.** Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *The Journal of biological chemistry* **284**: 19420-6.
- Tominaga S. 1989.** 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 Letters* **258**: 301-304.
- Tominaga S-ichi, Kuroiwa Kenji, Tago Kenji, Iwahana Hiroyuki, Yanagisawa Ken, Komatsu Norio. 1999.** Presence and Expression of a Novel Variant Form of ST2 Gene Product in Human Leukemic Cell Line UT-7/GM. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **264**: 14-18.
- Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. 2002.** Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature immunology* **3**: 715-20.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. 2006.** Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nature immunology* **7**: 1151-6.
- Verbruggen G. 2006.** Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology Oxford England* **45**: 129-138.
- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello Charles A, Apte RN. 2003.** IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2645-2650.
- Werenskiold AK, Hoffmann S, Klemenz R. 1989.** Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 5207-5214.

Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee J-K, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello Charles A, Apte RN. 2004. The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2434-2439.

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**: 837-47.

Wood IS, Wang B, Trayhurn P. 2009. IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **384**: 105-9.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-1433.

Xu D, Jiang H-R, Li Yubin, Pushparaj PN, Kurowska-Stolarska M, Leung BP, Mu R, Tay HK, McKenzie Andrew N J, McInnes IB, Melendez AJ, Liew FY. 2010. IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**: 2620-6.

Xu D, Jiang H-R, Kewin Peter, Li Yubin, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie Andrew N J, McInnes IB, Liew FY. 2008. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10913-8.

Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**: 111-115.

Yang Z, Liang Y, Xi W, Li C, Zhong R. 2010. Association of increased serum IL-33 levels with clinical and laboratory characteristics of systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Clinical and experimental medicine*.

Yu Q, Stamenkovic I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Dev.* **14**: 163-176.

Zhang JD, Cousens LS, Barr PJ, Sprang SR. 1991. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 3446-50.

Zhao W, Hu Z. 2010. The enigmatic processing and secretion of interleukin-33. *Cellular molecular immunology* **7**: 260-262.