

## نقش های پروتئین هسته ای HMGB1 و دمین های اصلی آن در زمینه های مختلف

### بیولوژی

سمیه طالبی<sup>۱</sup>، اعظم بوالحسنی<sup>۲\*</sup>، طلعت مختاری آزاد<sup>۳</sup>، آرش آرش کیا<sup>۴</sup>، محمد حسین مدرس<sup>۵</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. بخش هیاتیت و ایدز، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران
۳. گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. بخش ویروس شناسی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران
۵. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده:

پروتئین HMGB1 (High mobility group box 1)، پروتئین داخل سلولی است که به هسته انتقال می یابد و بیان ژن ها را تنظیم می کند. پروتئین HMGB1 به عنوان یک پروتئین چند عملکردی نقش خود را از طریق نوترکیبی، تنظیم رونویسی و التهاب ایفا می کند. پروتئین HMGB1 به کیناز وابسته به سایکلین مانند CDK2 متصل می شود که رونویسی ژن های مرتبط با پیشرفت چرخه سلولی را کنترل می کند. به علاوه HMGB1 به عنوان سایتوکاین جدید نقش مهمی در التهاب و بیماری هایی نظیر آرتрит دارد. به تازگی، نقش پروتئین HMGB1 به عنوان ادجوانت (یاور) و محرک هر دو پاسخ ایمنی سلولی و همورال (سرمی) در عفونت های ویروسی نظیر HIV-1 و آنفلوانزا به اثبات رسیده است. برخی مطالعه ها نشان دادند که Hp91، پپتید مشتق شده از پروتئین HMGB1، به عنوان محرک مؤثر و قوی برای بلوغ دندریتیک سل (DC) عمل کرده و توانسته است پاسخ های ایمنی سلولی و همورال را تحت شرایط درون تنی تقویت کند. یافته های اخیر ما نیز نشان داد که پپتید Hp91 و طول کامل ژن HMGB1 توانسته اند به عنوان ادجوانت مؤثر به منظور بهبود کارایی واکسن های درمانی پروتئینی و DNA یی در مقابل عفونت ویروس پاپیلوما ی انسانی به ترتیب عمل کنند. در این مطالعه، خلاصه ای از ساختار و عملکردهای HMGB1 در بیولوژی مولکولی و پزشکی شرح داده می شود.

**واژه های کلیدی:** ادجوانت اندوژنوس، HMGB1، Hp91، فعالیت بیولوژیکی

### مقدمه

(۸۸،۷۳،۶۳). انواع ادجوانت های اندوژنوس شامل پروتئین های شوک حرارتی، ترکیب های باکتریایی (توکسین، لیپوپلی ساکارید، پپتیدوگلیکان)، ادجوانت های براساس اسید ، سایتوکاین ها و (CFA) نوکلئیک، ادجوانت های فروند کامل ها است (۶۲،۵۶). در بین این ادجوانت ها، پروتئین های HMG HMGB1 شوک حرارتی و پروتئین های داخل هسته ای نظیر ، در HSPs اهمیت زیادی دارند. پروتئین های شوک حرارتی یا سیتوپلاسم، میتوکندری، هسته سلول وجود دارند و به عنوان چاپرون برای پروتئین ها فعالیت می کنند. عملکرد آن ها به عنوان چاپرون مولکولی در فرایندهای متنوع مانند تاخوردگی پروتئین ها، سرهم بندی و انتقال، پردازش آنتی-ژن تحت شرایط استرس و فیزیولوژیکی می باشد. از مهم- می باشد (۷۲،۳۶). Gp96 و HSP70 ترین انواع آن ها، پروتئین HMG یا پروتئین های دارای حرکت الکتروفورزی بالا روی ژل SDS-PAGE به سه زیر خانواده براساس دمین های عملکردی انتهای N تقسیم می شوند به نام های (HMGA, HMGB, HMGN) که همه دارای ظرفیت اتصال و خم

به معنی کمک یا یاور adjuvare لغت ادجوانت از کلمه لاتین که قادر به افزایش یا تعدیل پاسخ های ایمنی منشأ گرفته است همورال یا سلولی در مقابل آنتی ژن مورد نظر می باشد (۷۴). برخی ادجوانت های استفاده شده با کارایی بالا از اجزای میکروارگانیزم ها نظیر لیپوپلی ساکاریدها به دست آمده اند. بررسی ها نشان داده اند که در سیتوپلاسم سلولی، ادجوانت های اندوژنوس وجود دارند که منجر به تقویت پاسخ لنفوسیت در برابر آنتی ژن های خاص می شوند. (CTL) سایتوتوکسیک این ادجوانت ها در زمان آسیب سلولی یا نکروز، آزاد می شوند

نویسنده مسئول: بخش هیاتیت و ایدز، انستیتوپاستور ایران، تهران،

ایران

پست الکترونیکی: azam.bolhassani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۲۸

علیه پاتوژن مورد نیاز است (۱۶،۱۷). به علاوه، این پروتئین به دلیل نقش های مختلفش در نوترکیبی، تنظیم رونویسی و التهاب، اهمیت زیادی در جنبه های ایمونولوژی و پزشکی نظیر سرطان و واکنش پیدا کرده است (۸۶،۲۵). هدف از مطالعه حاضر، بررسی نقش های مختلف HMGB1 در زمینه های مختلف بیولوژی و پزشکی می باشد.

تکنیک ها و روش های مختلفی به منظور تعیین ساختار و اثرهای بیولوژیکی و ایمونولوژیکی HMGB1 توسط گروه های مختلف استفاده شده اند. به عنوان مثال، ترنسفکشن (تراگیشن) رده های مختلف سلولی پستانداران از قبیل HEK-293T و COS-7 با ساختارهای DNA یی HMGB1 با استفاده از معرف های ترنسفکشن پلیمری نظیر توربوفکت و پلی اتیلن ایمین توسط گروه ما انجام شد و بیان آن توسط آنالیز فلوسایتومتری و وسترن بلات تحت شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد (۷۹). به علاوه، خواص تحریک پاسخ ایمنی آن در واکنش های بر اساس پروتئین و DNA در مدل موشی ارزیابی شدند (۸۱).

### ۳ DAMPs (الگوی مولکولی وابسته به خطر)

مولکول های زیستی میزبان هستند که می توانند باعث شروع و تداوم یک پاسخ التهابی غیر عفونی شوند. در مقابل، الگوی مولکولی وابسته به پاتوژن (PAMPs) باعث شروع و تداوم پاسخ التهابی تحریک شده توسط پاتوژن عفونی می شوند (۸۲). زیر مجموعه ای از DAMPs پروتئین هسته ای یا سیتوزولی هستند. زمانی که آن ها در پی آسیب بافتی به خارج از سلول رها می شوند یا در معرض سطح سلول قرار می گیرند، به دلیل تغییر شرایط محیطی، تجزیه می شوند (۴۷).

### انواع DAMP ها

DAMP ها بسیار وابسته به انواع سلول (اپی تلیال یا مزانشیمی) و بافت زخمی هستند. پروتئین های DAMP شامل پروتئین های داخل سلولی مانند پروتئین های شوک حرارتی، HMGB1 و پروتئین های مشتق از ماتریکس خارج سلولی هستند که در پی آسیب به بافت مانند قطعه های هیالورونان تولید می شوند. نمونه هایی از DAMP های غیر پروتئینی شامل ATP، اسید اوریک، هپارین سولفات و DNA هستند (۳۷).

کردن DNA هستند اما به خودی خود فاکتورهای رونویسی نیستند (۹۸). پروتئین HMGA عضوی از خانواده پروتئین HMG است که در فرآیندهای هسته ای و نیز به عنوان فاکتور رونویسی نقش دارد و بیان ژن های متعدد تحت شرایط درون تنی<sup>۱</sup> را تنظیم می کند (۳۱،۲۴،۹۷). پروتئین HMGN به نوکلئوزومها بدون هیچ اختصاصیتی برای توالی DNA متصل می شود و در همه سلول های مهره داران بیان می شوند (۸۵). پروتئین HMGB1 و پروتئین های شوک حرارتی اولین پروتئین های شناخته شده از الگوی مولکولی مرتبط با خطر (DAMP) می باشند (۷۶). گزارش ها نشان دادند که DAMP ها شامل پروتئین های شوک حرارتی، سایتوکاین و پروتئین HMGB1 می باشند (۳). در مطالعه ای توسط Bolhassani و همکاران نشان داده شد که HSP ها عملکرد ادجوانتی در گسترش واکنش های پیشگیری کننده و درمانی دارند (۹). در مطالعه دیگری توسط این محققان از استراتژی های مختلف برای افزایش کارایی DNA واکنش با استفاده از ادجوانت پروتئین شوک حرارتی مثل GP96 با سیستم های انتقالی مختلف فیزیکی استفاده شد و نتایج حاکی از افزایش پاسخ های ایمنی طولانی مدت تحت شرایط درون تنی بود (۱۱،۸). به علاوه، با بررسی وجود آنتی بادی بر علیه HPV16 E7 و GP96 در بیماران مبتلا به سرطان سرویکس، به این نتیجه رسیدند که فعالیت سرولوژیکی بر علیه سه پروتئین نوترکیب (rNT-gp96، rCT-gp96) به طور معنی داری در بیماران دارای کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC) نسبت به گروه کنترل سطوح بالایی را نشان داد (۱۰).

در سال ۱۹۷۳، Goodwin یافت که پروتئین های غیر هیستونی هسته ای توسط حرکت زیادشان در ژل الکتروفورز پلی آکریل امید مشخص می شوند که ویژگی سوپر خانواده HMG است و آن ها را گروه پروتئین های بسیار متحرک نامید. این پروتئین بیش از ۳۰ سال پیش، اولین بار در تیموس گوساله به عنوان پروتئین هسته ای که دارای دومین منحصر به فرد متصل شونده به DNA است کشف شد (۲۶). نام دیگر HMGB1 آمفوترین می باشد که از نظر تکاملی بسیار حفاظت شده است و در انواع سلول ها حتی در بسیاری از انگل ها بیان می شود (۵۴). پروتئین HMGB1 انسانی توسط ژن HMGB1 کد شده است و دارای ۱۴ اینترون (2 gt-ag، 12 gt-ag) و ۱۵ اگزون است (۱۰۱،۴۹). پروتئین HMGB1 به عنوان مولکول DAMPs برای پاسخ های اکتسابی مؤثر بر

<sup>3</sup> Damage-associated molecular patterns

<sup>4</sup> Pathogen-associated molecular patterns

<sup>1</sup> In vivo

<sup>2</sup> Damage-associated molecular patterns

مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را تحریک می‌کند. این پروتئین به‌عنوان ادجوانت برای به تأخیر انداختن رشد تومور فعالیت می‌کند (۳۲،۲۲). در سیتوپلاسم، HMGB1 به پروتئین beclin1 متصل می‌شود، اتوفازی را افزایش می‌دهد، آپوپتوز را مهار می‌کند و مورفولوژی میتوکندری و فعالیتش را تنظیم می‌کند (۹۴،۵). در اصل HMGB1 می‌تواند آدنوزین تری فسفات و دیگر مولکول‌های التهابی را از سلول‌های نکروتیک آزاد کند اما نمی‌تواند از سلول‌های آپوپتوز شده آزاد کند (۴۲). در مطالعه Talebi و همکاران، با بررسی بیان ژن E7 و بیروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ کوژوگه شده با HMGB1 تحت شرایط آزمایشگاهی در سلول‌های پستانداران به این نتیجه رسیدند که پروتئین فیوزن می‌تواند به‌طور مؤثر در سلول‌های پستانداران برای استفاده در ایمونوتراپی بیان شود (۷۹). شکل ۲، برخی از فعالیت‌های بیولوژیکی HMGB1 را نشان می‌دهد.

HMGB1 و Treg: تعدادی از آزمایش‌ها پیشنهاد کردند که HMGB1 آزاد شده از سلول تومور ممکن است سلول T<sup>CD8+</sup> مرتبط با ایمنی ضد تومور را با ازدیاد سلول‌های T تنظیمی (Tregs) مهار کند که منجر به تولید اینترلوکین ۱۰ (IL-10) می‌شوند (۳۹).

HMGB1 و DCها: به‌تازگی بررسی‌ها نشان دادند که عملکرد DCها شامل توانایی آن‌ها برای فعال کردن سلول‌های CD4+T است که نیازمند رهاسازی اتوکراین/پاراکراین پروتئین هسته‌ای HMGB1 می‌باشد. پروتئین HMGB1 به‌عنوان فعال کننده DCها عمل می‌کند و ممکن است پاسخ‌های التهابی را با واسطه DC توسط افزایش بیان TLR4 و فعالیت دوباره آن و دیگر مولکول‌های DAMP یا الگوی مولکولی وابسته به خطر هدایت کند (۱۴). بررسی‌ها نشان دادند که HMGB1، رهاسازی اینترفرون گاما از ماکروفاژ (اما نه از سلول دندریتیک) افزایش می‌دهد. این تنها هنگامی مؤثر است که با دیگر سیتوکین‌های پیش التهابی به‌خصوص با IL-2 و در ترکیب با IL-1 و یا IL-12 باشد (۵۳). HMGB1 ماکروفاژها: HMGB1 فاگوسیتوز را از طریق اتصال به فسفاتیدیل سرین (PS) در معرض قرار گرفته در سطح نوتروفیل‌های آپوپتوز شده کاهش می‌دهد. در مونوسیت/ماکروفاژهای سلول‌های انسانی، HMGB1 محرک قوی رهاسازی چندین سایتوکاین پیش التهابی شامل TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\alpha$ ، IL-1 $\beta$ ، IL-1ra، IL-6، IL-8، MIP-1 $\alpha$ ، و MIP-1 $\beta$  اما نه IL-10 و IL-12 است (۴۳).

## ساختار HMGB1

خانواده HMGB شامل سه عضو HMGB1، HMGB2 و HMGB3 با یک تشابه آمینواسیدی ۸۰٪ در میان سه پروتئین می‌باشد. پروتئین HMGB1 یک پروتئین هسته‌ای ۳۰ کیلودالتونی است که از بافت مغز جداسازی شده است و شامل ۲۱۵ آمینو اسید می‌باشد. این پروتئین شامل دو دامین اتصال به DNA می‌باشد: A box و B box (جعبه A و B هر کدام دارای طول ۷۵ آمینواسید می‌باشند) و یک انتهای C ترمینال با بار منفی دارای زیر واحدهای پیوسته گلوآمات و آسپارات است. ناحیه A box (۱-۸۹) به‌عنوان یک آنتاگونیست ویژه عمل می‌کند در صورتی که فعالیت سایتوکاین HMGB1 توسط B box (۹۰-۱۷۶) تعیین می‌شود (۹۱،۵۲،۱۱،۳،۲). در مقابل، HMGB مخمر (Nhp6-a) و (b) تنها یک دامین HMG دارد و بدون دم اسیدی است. پروتئین HMG می‌تواند به DNA به شکل صلیب، تک رشته یا دو رشته با تمایل بالا از طریق جعبه HMG و انتهای C اسیدی متصل شود. ارتباط بین DNA و HMG با واسطه زیر واحدهای آمینواسیدی بازی پروتئین است. مطالعه‌های ساختاری با استفاده از طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای ثابت می‌کند که دامین اتصال به DNA در HMG دارای ساختار L شکل ساخته شده از سه مارپیچ است که سطوحی برای تداخل‌های با DNA و پروتئین فراهم می‌کند (۷۵،۳۳). شکل ۱، ساختار HMGB1 را نشان می‌دهد.

## نقش‌های HMGB1

### ایمونولوژی

در شرایط *in vivo* HMGB1 پاسخ‌های آنتی‌بادی اولیه در برابر آنتی‌ژن‌های محلول را افزایش می‌دهد. سلول‌های آسیب دیده و نکروز شده HMGB1 را رها می‌کنند (۹۹). این پروتئین خارج سلولی فاقد سیگنال پپتید ترشحی است و به سیستم گلژی/ شبکه اندوپلاسمی نمی‌تواند مهاجرت کند. در یک بررسی نشان داده شد که فعال سازی مونوسیت‌ها منجر به تجمع HMGB1 در وزیکول‌های سیتوپلاسمی می‌شود (۳۳). پروتئین HMGB1 به‌طور فعالانه به محیط خارج سلولی ترشح می‌شود و به‌عنوان سایتوکاین، کموکاین و فاکتورهای رشدی که مهاجرت سلولی و التهاب را تقویت می‌کند، ایفای نقش می‌کند. زمانی که HMGB1 از سلول رها می‌شود به عنوان سیگنال خطر درونی، رهاسازی سایتوکاین از

را خم می کند و اتصال دیگر پروتئین ها را تسهیل می کند. ارتباط آن با هیستون های مرکزی، ساختار نوکلئوزوم را تغییر می دهد به صورتی که DNA بسته بندی شده را سست کند و منجر به بازسازی کروماتین شود. در موجودات عالی، HMGB1 در هسته سلول بیان می شود و به عنوان DNA چاپرون عمل می کند که چندین فرایند سلولی نظیر رونویسی، همانندسازی، نوترکیبی، ترمیم DNA و پایداری ژنوم را تحت تأثیر قرار می دهد (۹۳،۵۸،۳۵). نقش HMGB1 در ترمیم DNA توسط مکانیزم های مختلفی مانند ترمیم از نوع برداشت نوکلئوتید (NER) و ترمیم عدم تطابق ( DNA mismatch repair) است (۶۵). بررسی ها نشان دادند که HMGB1 نو ترکیب اتصال p53 به DNA را تحت شرایط آزمایشگاهی افزایش می دهد. پروتئین HMGB1 ساختار DNA مناسب را برای اتصال به p53 از طریق خم کردن مولکول DNA فراهم می کند. به علاوه، HMGB1 فعالیت RB را سرکوب می کند و رونویسی هر دو cyclin-A و E2F را افزایش می دهد (۶۸). این پروتئین به طور ویژه با اعضای خانواده REL از فاکتورهای رونویسی واکنش می دهد. پروتئین c-Rel، پروتئینی است که در انسان توسط ژن REL کد می شود و عضوی از خانواده NF-κB می باشد (۸۷). محققان نشان دادند که در درمان سرطان با cisplatin، HMGB1 کارایی ضد سرطان cisplatin را توسط محافظت از آسیب DNA افزایش می دهد. مطالعه های اخیر نشان داد که حضور HMGB1 در هسته وابسته به تغییرهای پس از ترجمه است. زمانی که پروتئین غیر استیل شده است، در هسته باقی می ماند، اما هایپر استیلاسیون واحدهای لیزین منجر به انتقال آن به سیتوزول می شود (۱،۳۴).

### نقش های بیماری زایی یا پاتوژنیک

شواهدی وجود دارد که از نقش بیماری زایی برای HMGB1 خارج سلولی در التهاب ناشی از عفونت یا آسیب حمایت می کند. برای مثال، HMGB1 دخیل در بیماری های مختلف مثل سپسیس، ایسکمی، آرتریت، مننژیت و سرطان است (۹۹،۳۳،۲۸). برخی مطالعه های حیوانی نشان دادند که مایکو باکتریوم توبرکلوزیس می تواند به طور مؤثر ترشح HMGB1 را تحریک کند و منجر به فعال کردن بیش از حد سایتوکاین و آسیب بافت ریه شود. به تازگی، افزایش HMGB1 در سرم بیماران آلوده شده با مایکو باکتریوم توبرکلوزیس گزارش شده اما اهمیت آن نامشخص است. در بیماران با سل ربوی پیشرفته، سایتوکاین های پیش التهابی و سیگنالینگ

گیرنده های HMGB1 و ارتباط با آنها: چندین رسپتور در عملکرد HMGB1 نظیر رسپتورهای RAGE، TLR2، TLR4، TLR9 و CD24/Siglec-10 نقش دارند. گیرنده HMGB1، RAGE است که از عصاره اندوتلیال گاو به عنوان گیرنده AGE، تخلیص می شود. RAGE عضوی از ژن های وابسته به تهاجم، گیرنده سطح سلولی، متعلق به خانواده ایمونوگلوبولین است. گزارش های متعددی بر ارتباط بین بیان RAGE و سرطان منتشر شده است. RAGE بسیار وابسته به رشد سلولی، تهاجم سلولی از طریق فعال سازی MAPK و بیان MMP-21-9 در سلول های گلیوما است. بیان بالای RAGE در سرطان های کولون و دهان در جوندگان مشاهده شده است (۱۶). پروتئین های HMGB1 و HMGB2 با گیرنده های هورمون استروئیدی هسته ای شامل رسپتورهای استروژن، آندروژن و گلوکوکورتیکوئید تسهیل کننده اتصال به DNA هدفشان، واکنش می دهد. پروتئین HMGB1 هم-چنین با توپوایزومراز ۲ آلفا واکنش می دهد که در تومورها بسیار بیان می شود و درگیر در تکثیر و تفکیک کروموزوم و نوترکیبی هست و فعالیت کاتالیتیکی آن را تحریک می کند (۵۰). این پروتئین با TLR4 از طریق پیوند دی سولفیدی در موقعیت C23 و C45 و C106 فاقد تیول ارتباط برقرار می کند. این پروتئین می تواند با لیگاند TLR4 واکنش دهد و نیز سایتوکاین ها و سلول ها را از طریق گیرنده های سلولی چندتایی که شامل TLR2، TLR4 و RAGE است، فعال کند (۷۰،۱۹). پروتئین HMGB1 خارج سلولی به TLR4 متصل می شود و باعث پاسخ اولیه تمایز میلوئیدی ژن ۸۸ (MyD88) می شود تا فاکتور هسته ای تقویت کننده زنجیر سبک کاپای سلول های B (NF-κB) را فعال کند. فاکتور NF-κB فعال شده از سیتوپلاسم به هسته منتقل می شود و بیان فاکتور التهابی، تمایز سلولی را تحریک می کند. بنابراین نقش مهمی در پیدایش تومور و پیشرفت آن ایفا می کند. بنابراین HMGB1 نقش مهمی در بیماری های خودایمنی و سرطان ایفا می کند و HMGB1، TLR4 و NF-κB همگی در پیشرفت تومور و متاستاز و بدخیمی تومور شرکت می کنند، اگرچه اثرهای این واسطه ها در آسیب های پیش سرطانی، کارسینوم سلول های سنگفرشی به طور کامل روشن نشده است (۴۴،۱۷).

### ارتباط با ژنوم

پروتئین هسته ای HMGB1، DNA را سازمان دهی می کند و رونویسی را تنظیم می کند. بعد از اتصال، HMGB1، DNA

برون تنی مهار می‌کند. این پروتئین ترشح VEGF (فاکتور رشد اندوتلیال عروقی) را در سلول‌های سرطان دهان انسان تحریک می‌کند اما نمی‌تواند VEGF-C را تحریک کند. فاکتورهای VEGF-C و VEGF-D وابسته به متاستاز غده لنفاوی است. القای تمایز VEGF از VEGF-C از طریق فعال سازی رسپتور RAGE توسط HMGB1 ممکن است دلیل آن باشد که بیان RAGE وابسته به آنژیوژنز لنفی نیست. مسیر سیگنالینگ داخل سلولی RAGE، بیان VEGF را از طریق فعال سازی NF- $\kappa$ B، فعال کننده پروتئین 1 (AP-1) و فاکتور القایی هایپوکسیا 1 $\alpha$  (HIF)-1 فعال می‌کند (۱۰۵،۳۰).

### نقش در سرطان

پروتئین HMGB1، پروتئین چند کاره است و دارای فعالیت بیولوژیک متنوع در سلول‌های طبیعی است. نقش HMGB1 در سرطان متنوع است. به‌طور اصول HMGB1، به‌عنوان لیز کننده سلولی (۳۰KDa) متاستاز سلول‌های سرطانی را تسریع می‌کند. این پروتئین در ارتباط با افزایش فعالیت‌های فاکتورهای رونویسی دخیل در توسعه سرطان، شامل p53، p73، پروتئین رتینوبلاستوما، اعضای Rel/NF- $\kappa$  و گیرنده‌های هورمون هسته‌ای مثل گیرنده استروژن است. درمان ضد سرطان مانند رادیوتراپی و شیمی درمانی باعث مرگ سلول و تقویت آزاد سازی فعال HMGB1 است. لوکوسیت‌های فعال شده به‌طور فعال HMGB1 را ترشح می‌کند. پروتئین HMGB1 خارج سلولی واسطه در فعالیت‌های مهم، شامل تحریک کردن رهاسازی فاکتور TNF- $\alpha$  و اینترلوکین بتا و دیگر محصول‌های التهابی، فعال کردن سلول‌های اندوتلیال، فعال سازی ایمنی ذاتی است و همچنین بلوغ سلول دندریتیک که در زمینه سرطان منجر به پاسخ‌های التهابی مزمن می‌شود. HMGB1 مسیرهای سیگنالینگ درگیر در پروتئین کیناز B (AKT)، پروتئین کیناز فعال کننده میتوزن (MAPKs) و NF- $\kappa$ B را فعال می‌کند که نقش مهمی در رشد توموری دارد. بیان بالای Hsp72 به‌طور مؤثری HMGB1 را مهار می‌کند که القا کننده بیان سایتوکاین (TNF -  $\alpha$  و اینترلوکین-1 بتا) است و مهار مسیر NF- $\kappa$ B با Hsp72 قوی است (۱۰۷،۷۸،۲۰). پروتئین HMGB1 اغلب نه تنها در سلول‌های سرطانی مانند کارسینومای سینه، واژن، دستگاه گوارشی، سر و گردن، نازوفارنکس و لنفوما بسیار بیان می‌شود بلکه در سلول‌های اندوتلیال فعال شده که در داخل بافت‌های سرطانی یافت می‌شود، بیان می‌شود. سلول‌های سرطانی معده و کلون، بیان هم‌زمان مربوط به

HMGB1/RAGE ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز و تظاهرات بیماری ایفا می‌کند (۶). تنظیم بالای HMGB1 در طی فیبروز کبد ممکن است دخیل در بازسازی بافت و فیبروژنز از طریق فعال سازی سلول‌های ستاره‌ای کبد (HSCs) شود. شواهد نشان می‌دهند که HMGB1 در پاتوژنز آسیب حاد کبدی نشأت گرفته از محرک‌های گوناگون، نقش دارد (۹۲،۵۱). در حضور میکروارگانسیم خارجی یا آسیب داخلی، HMGB1 امکان دارد به خارج از سلول به-عنوان سیگنال استرس و واسطه التهابی رها شود. پروتئین HMGB1 به‌عنوان شاخص آسیب به کبد شناخته شده است و سطوح HMGB1 در سرم بیماران با هیپاتیت مزمن و سیروز به میزان قابل توجهی بالا است (۹۵،۴۸).

### نقش در التهاب

پروتئین HMGB1 توسط سلول‌های ایمنی (مثل ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و سلول‌های دندریتیک) از طریق مسیر ترشحی ترشح می‌شود. ماکروفاژهای فعال شده و مونوسیت‌ها HMGB1 را به‌عنوان سایتوکاینی که واسطه در التهاب است ترشح می‌کند. بیان بیش از حد HMGB1 منجر به التهاب گسترده مرتبط با بیماری‌های آترواسکلروز، آرتریت و عفونت است. به‌تازگی HMGB1 واسطه التهابی مهم در انواع بیماری‌های ایجاد شده توسط پاسخ‌های التهابی ایمنی افزایش یافته غیر عادی شناخته شده است (۹۰،۳۸).

### نقش در آپوپتوز

پروتئین HMGB1 نقش مهمی در آپوپتوز، وابسته به نوع سلول دارد. این پروتئین به‌عنوان مهارکننده مرگ سلول مخمر تحریک شده توسط اعضای خانواده پیش آپوپتوز Bcl-2 همانند Bak است. مهار HMGB1 توسط siRNA در سلول‌های لوکمیای K562/A02 نتیجه‌اش معکوس کردن مقاومت به آدریامایسین (ADM) است و به‌طور معناداری، رهاسازی Smac/ DIABLO تحریک شده توسط آدریامایسین از میتوکندری به سیتوپلاسم را تقویت می‌کند و فعال کردن کاسپاز ۳ را افزایش می‌دهد (۸۴،۱۳).

### نقش در متاستاز و رگزایی

اثر HMGB1 توسط تنظیم پایین RAGE با استفاده از مولکول‌های آنتی سنس مهار می‌شود. آنتی‌بادی مورد هدف قرار دهنده HMGB1 رگزایی را تحت شرایط درون تنی و

تحریک شده توسط Hp91، منجر به افزایش ترشح سایتوکاین و کموکاین های پیش التهابی نظیر IL-12 می شود. در حقیقت، DC های در معرض قرار گرفته با پپتیدهای مشتق از HMGB1 تکثیر سلول های T اختصاصی آنتی ژن در شرایط *in vitro* را تحریک می کند. این ویژگی های Hp91 مربوط به تحریک کنندگی سیستم ایمنی است و چون که پپتیدها آسان تولید می شوند، کاندید مناسبی به عنوان ادجوانت برای توسعه واکسن در نظر گرفته می شوند (۷۱،۶۹). به تازگی، بررسی ها نشان دادند که Hp91 به عنوان ادجوانت پاسخ های ایمنی سلولی و همورال را در *in vivo* تقویت می کند. این پپتید دارای زیرواحد سیستمین در آمینواسید موقعیت ۱۶ مطابق با Cys106 در پروتئین HMGB1 است که برای اتصال HMGB1 به TLR4 و نیز القای ترشح TNF توسط ماکروفاژها ضروری است (۶۷). Fagone و همکارانش با بررسی اثر HMGB1 بر آنفولانزا در طی DNA واکسیناسیون به این نتیجه رسیدند که HMGB1 ایمنی بر علیه آنفولانزا را افزایش می دهد (۲۱). به علاوه در مطالعه Muthumani و همکاران با ادغام پلاسمید کد کننده Gag و HIV-1 Env با پلاسمید HMGB1 به- عنوان ادجوانت DNA در موش BALB/c و اندازه گیری پاسخ های همورال و سلولی به این نتیجه رسیدند که ادغام این دو به عنوان ادجوانت تحریک کننده سیستم ایمنی به طور مؤثر پاسخ های اینترفرون گاما و نیز پاسخ ایمنی همورال را در موش افزایش می دهد و محققان نشان دادند که HMGB1 عنوان ادجوانت مؤثر در واکسیناسیون DNA بر علیه HIV-1 می تواند مورد استفاده قرار گیرد (۵۹).

در مطالعه Talebi و همکاران نشان دادند که پپتید تحریک کننده ایمنی مشتق شده از HMGB1 به عنوان ادجوانت اندوزنوس بسیار موثرتر از دمنین انتهای N پروتئین Gp96 به منظور بهبود واکسن های پروتئینی بود (۸۰).

## بحث

پروتئین HMGB1 به طور وسیعی در بافت های پستانداران بیان می شود و در هسته همه مهره داران وجود دارد. قرارگیری هسته ای HMGB1 به خاطر وجود توالی های آمینواسیدهای ویژه در نواحی ۲۷-۴۳ و ۱۷۸-۱۸۴ می باشد (۴۶، ۲۸). در درون هسته، HMGB1 به عنوان تنظیم کننده ژن فعالیت می کند. به عنوان مثال، این پروتئین منجر به اتصال فاکتورهای تنظیمی مانند ریکامبینازهای V(D)J یا گیرنده-

HMGB1 و RAGE را نشان دادند که بسیار وابسته به تنظیم آتوکراین/پاراکراین، حرکت سلولی و تهاجم سلول های سرطانی است (۷۷،۱۲). مهار ارتباط RAGE-HMGB1، فعال کردن کینازهای p38، p44/p42 و SAP/JNK MAP را مهار می کند. مکانیسم این مولکول ها در ارتباط با تکثیر تومور، تهاجم و بیان متالوپروتئیناز است. مهار DCs توسط HMGB1 در ارتباط با متاستاز غده لنفاوی سرطان کولون انسان مشخص شده است (۶۶).

متاستاز کبد یکی از شرایط اصلی سرطان کولون است که پیش آگهی بیماری و زندگی بیمار را مشخص می کند. از بیماران دارای سرطان کولون از متاستاز کبد می میرند. پروتئین HMGB1 از تومورهای اولیه سرطان کولون ترشح می شود و غلظت HMGB1 در تومورهای اولیه یافت می شود (۱۱۰). پروتئین HMGB1 نقش ضد آپوپتوزی در سرطان توسط افزایش بیان مهار کننده آپوپتوز سلولی ۲ (c-IAP2) ایفا می کند، بدین منظور ژن هدف NF-κB فعال شده و ارتباط با فعال سازی آپوپتوزومی کاسپاز ۹ دارد. به تازگی HMGB1 وابسته به فعال کردن سیگنال اتوفژی است که زنده ماندن سلولی را تقویت می کند. سلول های کشته شده سرطانی توسط شیمی درمانی یا رادیوتراپی HMGB1 را به صورت ضربان دار زمانیکه تومور رشد می کند، رها می کند (۷). پروتئین HMGB1 فاکتور پیش بینی کننده برای پاسخ رادیوتراپی در سرطان مثانه است. نتایج نشان می دهد که رابطه مثبت با سطوح بالاتری از پروتئین HMGB1 و مقاومت در برابر اشعه در انواعی از رده های سلولی مختلف وجود دارد. هم چنین نتایج نشان می دهد که اتوفژی بیش از ۳ برابر ( $p < 0.01$ ) بعد از تخریب پروتئین HMGB1، مهار می شود که حاکی از دخالت نقش آن در اتوفژی به عنوان یکی از عوامل سرطان مثانه است (۶۷).

## نقش در واکسن

پروتئین HMGB1 از هسته ماکروفاژهای فعال شده یا سلول های نکروتیک رها می شود و می تواند به عنوان ادجوانت داخلی از طریق فعال سازی سلول های دندریتیک، ماکروفاژها و سلول های T عمل نماید (۱۰۲، ۸۳). اولین ۲۰ آمینواسید دومین B پروتئین HMGB1، پپتید کوچک حفاظت شده ای است که فعالیت سایتوکاین را نشان می دهد. این پپتید کوچک تحت عنوان Hp91 فعال سازی سلول های دندریتیک انسان و موش را تحریک می کند. سلول های دندریتیک

ایمنی سلولی و همورال ویژه آنتی ژن را تحت شرایط درون تنی (*in vivo*) تقویت می کند. پپتید Hp91 تولید شده تحت شرایط درون تنی، سایتوکاین های تنظیم کننده سیستم ایمنی و فعال سازی سلول های T CD8+ اختصاصی آنتی ژن را تقویت می کند (۱۰۸،۵۷،۴۰). در ارتباط با نقش پر اهمیت آن به عنوان ادجوانت، یافته های اخیر ما نشان داد که پپتید Hp91 و طول کامل ژن HMGB1 توانستند به عنوان ادجوانت مؤثر به منظور بهبود کارایی واکسن های درمانی پروتئینی و DNAی در مقابل عفونت ویروس پاپیلومای انسانی به ترتیب عمل کنند. در حقیقت، ایمونیزاسیون هم-زمان پروتئین HPV16E7 با پپتید Hp91، ترشح اینترفرون گاما و آنتی بادی IgG2a را به میزان قابل ملاحظه ای افزایش داد و ۱۰۰ درصد موش ها را در مقابل چالش تومور TC-1 حفاظت کرد (۸۱).

به هر حال، نقش های متضادی در ارتباط با پروتئین HMGB1 مطرح می باشد. برای نمونه، پروتئین HMGB1 می تواند تکثیر ویروس را در عفونت حاد توسط القای مهارکننده های ورود ویروسی کاهش دهد، اما ممکن است باعث تکثیر ویروس در سلول های دچار عفونت، از جمله در سلول های بیماران آلوده به HIV شود (۲۷). این پروتئین تکثیر HIV در سلول های میلونید را تنظیم می کند (۸۹). پروتئین HMGB1 تکثیر ویروسی را توسط اتصال به پروتئین های ویروس HCV افزایش می دهد اما اثری بر ترجمه این ویروس ندارد. عفونت HCV باعث انتقال پروتئین HMGB1 از هسته به سیتوپلاسم می شود، که در آنجا با ژنوم HCV تعامل می کند (۱۰۴،۴۱). در موش های ترنس ژن دارای HBV، HMGB1 ممکن است دخیل در تکثیر لنفوسیت های T سایتوتوکسیک (CTLs) - آغاز کننده آسیب های کبدی باشد، در صورتی که در التهاب، HMGB1 می تواند از سلول های نکروز شده و نوتروفیل واسطه در آسیب کبدی رها شود. این نتایج نشان دادند که درمانی که مهارکننده HMGB1 باشد ممکن است یک استراتژی بالقوه برای مبارزه با HCC-هیپاتیت ایجاد کند. با این حال، نقش HMGB1 در ایمنی بر علیه سرطان کبد نیازمند مطالعه های بیش تر است (۴۶).

### نتیجه گیری

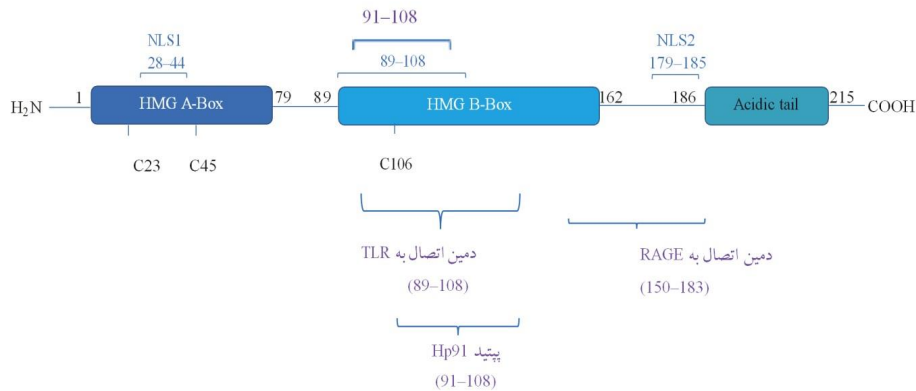
پروتئین HMGB1 به عنوان پروتئین هسته ای حفاظت شده دارای نقش های مختلفی در زمینه های ایمونولوژی، ژنوم، واکسن و بیماری زایی است. به طور کلی، پروتئین HMGB1 و

های هورمون های هسته ای می شود (۱۸). تحت شرایط فیزیولوژی، HMGB1 در هسته به عنوان چاپرون DNA با نقش ترمیم، نوترکیبی، تنظیم رونویسی، تکثیر و پایداری ژنوم فعالیت می کند (۴۵،۳۳،۶۰). با توجه به تحقیق های به عمل آمده، به تازگی گزارش هایی حاکی از نقش های خارج سلولی HMGB1 منتشر شده است برای مثال، فعالیت HMGB1 به عنوان واسطه در التهاب و دخیل در پاتوژن سپسیس به اثبات رسیده است (۶۱). به علاوه، HMGB1 الگوی مولکولی وابسته به خطر است و می تواند به طور فعالانه به محیط خارج سلولی ترشح شود و به عنوان سایتوکاین، کموکاین و فاکتورهای رشدی در چندین فرایند مانند مهاجرت سلولی، تمایز سلولی، تکثیر سلولی فعالیت کند (۴). HMGB1 در چندین بیماری التهابی مانند سرطان، تروما، آرتریت، سپسیس، دیابت و بیماری های خود ایمن نقش دارد (۵۶،۱۵). اگرچه گیرنده اختصاصی برای HMGB1 شناسایی نشده است اما به نظر می رسد که عملکرد مؤثر آن در اثر اتصال به گیرنده های متنوعی مانند RAGE، TLR2 یا TLR4 رخ می دهد (۱۰۳،۹۶). بررسی ها نشان دادند که تغییرهای سطح HMGB1 در پاسخ به ایمونوترابی به عنوان مارکر می باشد. بیان HMGB1 در نمونه های بالینی اولین بار توسط Kuniyasu و همکارانش مطرح شد. بیان بالای HMGB1 در ارتباط با هر نشانه ای از سرطان، شامل قابلیت تکثیر نامحدود، توانایی گسترش رگ های خونی (آنژیوژنز)، فرار از مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) است (۶۴). بیان بالای HMGB1 در انواعی از بدخیمی ها نظیر سرطان روده بزرگ، سرطان سینه، سرطان کبد، سرطان لوزالمعده، سرطان پروستات و سرطان دهانه رحم مشاهده شده است (۱۰۰). همچنین، HMGB1 برای توسعه درمان های هدفمند نظیر ادجوانت درمانی به منظور به تأخیر انداختن رشد تومور مطرح شده است (۱۰۹،۲۹،۱۰۶). گزارش شده است که HMGB1 نه تنها القا کننده پاسخ ایمنی ذاتی از طریق اتصال به گیرنده های شبه Toll ۴/۲ (TLR2/۴) و یا گیرنده برای محصول های پیشرفته گلیکوزیله شدن (RAGE) است بلکه تعدیل کننده پاسخ ایمنی اکتسابی توسط تحریک تکثیر سلولی و فعال سازی سلول های T می باشد. این ویژگی نشان می دهد که HMGB1 ممکن است به عنوان ادجوانت استفاده شود (۳۲). در یک بررسی، یک پپتید مشتق از دومین B-box از HMGB1 به نام Hp91 به عنوان محرک مؤثر و قوی بلوغ DC عمل کرده و توانسته است سایتوکاین های القا کننده پاسخ نوع Th1 را تولید کند. در حقیقت Hp91 پاسخ های

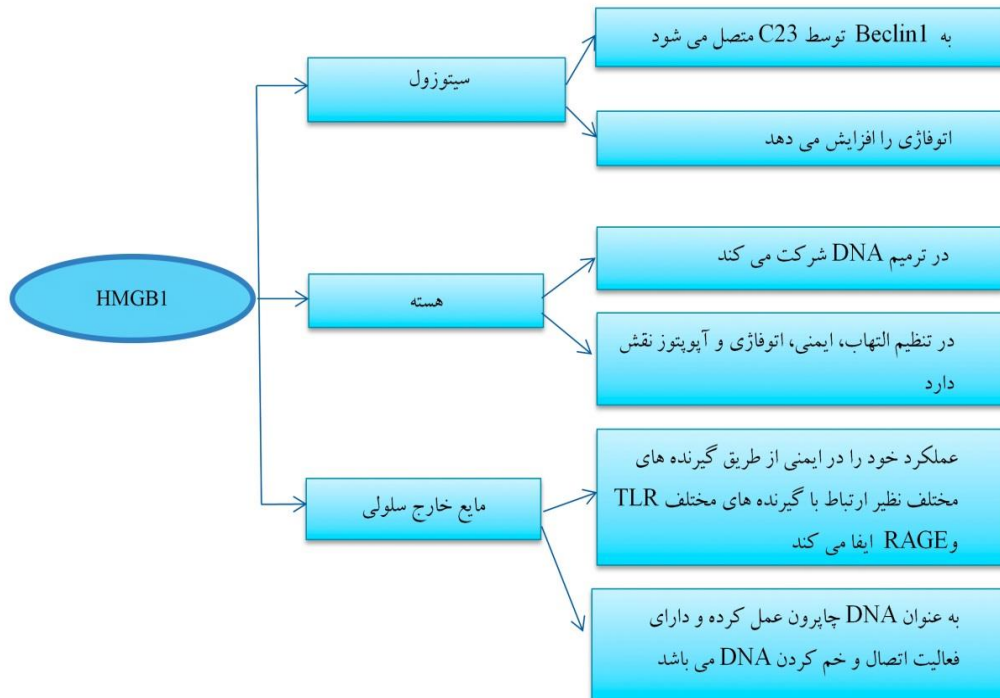
در مقابل عفونت ویروس پاپیلوما ی انسانی به ترتیب عمل کنند.

پپتید مشتق از آن (Hp91) به عنوان بیومارکر و ادجوانت نقش های به سزایی ایفا کرده اند. با توجه به مطالعه های انجام شده، Hp91، پپتید مشتق شده از پروتئین HMGB1، به عنوان محرک مؤثر و قوی بلوغ DC عمل کرده و توانسته است پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال را تحت شرایط درون تنی تقویت کند. یافته های اخیر ما نیز نشان داد که پپتید Hp91 و طول کامل ژن HMGB1 توانستند به عنوان ادجوانت مؤثر به منظور بهبود کارایی واکسن های درمانی پروتئینی و DNA

شکل ها:



شکل ۱: ساختار HMGB1 شامل سه بخش جعبه A، جعبه B و دنباله اسیدی است.



شکل ۲: فعالیتهای بیولوژیکی مختلف HMGB1 در مکانهای سیتوزول، هسته و مایع خارج سلولی



## منابع:

1. Agresti A, Lupo R, Bianchi ME, Müller S. HMGB1 interacts differentially with members of the Rel family of transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003;302(2):421-6.
2. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*, 2000; 192: 565–570.
3. Bala AM. Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines - Implication in modification of radiation damage. *Redox Biol* 2014;4: 2832–846.
4. Baldrick P, Richardson D, Elliott G, Wheeler AW. Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2002; 35:398 – 413.
5. Barreiro-Alonso, A., Lamas-Maceiras, M., Rodríguez-Belmonte, E., Vizoso-Vázquez, Á., Quindós, M., Cerdán, M.E. High Mobility Group B Proteins, Their Partners, and Other Redox Sensors in Ovarian and Prostate Cancer. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. 2016: 5845061.
6. Benedetti G, Bonaventura P, Lavocat F, Miossec P. IL-17A and TNF- $\alpha$  Increase the Expression of the Antiapoptotic Adhesion Molecule Amigo-2 in Arthritis Synoviocytes *Front. Immunol* 2016; 7: 254.
7. Bi MR, Zhu LY, Yan BZ, Chen LY, Wang FX, Ma YJ, Yang BS. Association of Upregulated HMGB1 and c-IAP2 Proteins With Hepatocellular Carcinoma Development and Progression. *Hepat Mon*, 2014;14(12):e23552.
8. Bolhassani A, Mohit E, Ghasemi N, Salehi M, Taghikhani M, Rafati S. Enhancement of potent immune responses to HPV16 E7 antigen by using different vaccine modalities. *BMC Proceed*, 2011; 5(1):P19.
9. Bolhassani A, Rafati S. Potential immuno-stimulators in vaccine design. *Human Vaccines Immunotherap*, 2013; 9(1): 153–161.
10. Bolhassani A, Zahedifard F, Taslimi Y, Taghikhani M, Nahavandian B, Rafati S. Antibody detection against HPV16 E7 & GP96 fragments as biomarkers in cervical cancer patients. *Indian J Med Res*, 2009; 130: 533-541.
11. Bonaldi T, Talamo F, Scafdi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J*, 2003; 22 (20): 5551±5560.
12. Brezniceanu ML, Volp K, Bossier S, Solbach C, Lichter P, Joos S, Zörnig M. HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J*, 2003; 17: 1295–1297.
13. Chen Q, Bei J, Liu C, Feng Sh, Zhao W, Zhou Z, Yu Z, Du X, Hu H. HMGB1 Induces Secretion of Matrix Vesicles by Macrophages to Enhance Ectopic Mineralization. *PLoS One*, 2016; 11(5): e0156686.
14. Chen XL, Sun L, Guo F, Wang F, Liu S, Liang X, Wang RS, Wang YJ, Sun YX. High-Mobility Group Box-1 Induces Proinflammatory Cytokines Production of Kupffer Cells through TLRs-Dependent Signaling Pathway after Burn Injury. *PLoS ONE*, 2012; 7(11): e50668.
15. Chilton PM, Hadel DM, Thao T, Mitchell TC, Richard P, Darveauc. Adjuvant Activity of Naturally Occurring Monophosphoryl Lipopolysaccharide Preparations from Mucosa-Associated Bacteria. *Infection Immun*, 2013; 81(9): 3317–3325.
16. Czura CJ, Yang H, Tracey KJ. High Mobility Group Box-1 as a Therapeutic Target Downstream of Tumor Necrosis Factor. *J Infect Dis* 2003; 187(2):S391–6.
17. Dai Y, Wong B, Yen Y, Oettinger MA, Kwon J, Johnson JC. Determinants of HMGB Proteins Required To Promote RAG1/2-Recombination Signal Sequence Complex Assembly and Catalysis during V(D)J Recombination. *Molecular Cellular Biolog*, 2005; 25(11):4413–4425.
18. Daniels MJ, Brough D. Unconventional Pathways of Secretion Contribute to Inflammation. *Int J Mol Sci*, 2017;18(1).

19. Elfeky M, Kaede R, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K. Adiponectin Inhibits LPS-Induced HMGB1 Release through an AMP Kinase and Heme Oxygenase-1-Dependent Pathway in RAW 264 Macrophage Cells Mediators Inflamm, 2016; 2016: 5701959.
20. Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, Zeh HJ, Billiar T, Rubartelli A, Lotze MT. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. Clin Cancer Res, 2007;13:2836–2848.
21. Fagone P, Shedlock DJ, Bao H, Kawalekar OU, Yan J, Gupta D, Morrow MP, Patel A, Kobinger GP, Muthumani K, Weiner DB. Molecular adjuvant HMGB1 enhances anti-influenza immunity during DNA vaccination. Gene Ther, 2011; 18: 1070-1077.
22. Faham A, Bennett D, Altin JS. Liposomal Ag engrafted with peptides of sequence derived from HMGB1 induce potent Ag-specific and anti-tumour immunity. Vaccine, 2009; 27: 5846–5854.
23. Finkel P, Frey B, Mayer F, Bösl K, Werthmüller N, Mackensen A, Gaipl US, Ullrich E. The dual role of NK cells in antitumor reactions triggered by ionizing radiation in combination with hyperthermia. Oncoimmunol, 2016;5(6):e1101206.
24. Fujikane R, Komori K, Sekiguchi M, Hidaka M. Function of high-mobility group A proteins in the DNA damage signaling for the induction of apoptosis. Sci Rep, 2016;6:31714.
25. Garçon N, Chomez P, Van Mechelen M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. Expert Rev Vaccines, 2007;6(5):723-39.
26. Goodwin GH, Johns EW. Isolation and Characterisation of Two Calf-Thymus Chromatin Non-Histone Proteins with High Contents of Acidic and Basic Amino Acids. FEBS J, 1973; 40(1): 215–219 .
27. Gougeon ML, Melki MT, Saïdi H. HMGB1, an alarmin promoting HIV dissemination and latency in dendritic cells. Cell Death Differ, 2012;19(1):96-106.
28. Grover A, Trout J, Foster C, Basaraba R, Izzo A. High mobility group box 1 acts as an adjuvant for tuberculosis subunit vaccines. Immunol ,2014;142(1):111-23.
29. Guo ZS, Liu Z, Bartlett DL, Tang D, Lotze MT. Life after death: targeting high mobility group box 1 in emergent cancer therapies. Am J Cancer Res, 2013;3(1):1-20.
30. Han L, Zhang M, Wang M, Jia J, Zhao M, Fan Y. High Mobility Group Box-1 Promotes Inflammation-Induced Lymphangiogenesis via Toll-Like Receptor 4-Dependent Signalling Pathway. PLoS One, 2016; 11(4): e0154187.
31. Han X, Cao Y, Wang K, Zhu G. HMGA1 facilitates tumor progression through regulating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in endometrial cancer. Biomed Pharmacother 2016;82:312-8.
32. Harada S, Matsuura W, Liu K, Nishibori M, Tokuyama S. Possible involvement of the HMGB1/RAGE signaling mechanism in the induction of central post-stroke pain induced by acute global cerebral ischemia. Brain Res, 2016;1646:433-40.
33. Harris HE, Andersson U. The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. Eur J Immunol, 2004; 34: 1503–1512.
34. He Y , Ding Y , Wang D , Zhang W , Chen W , Liu X , Qin W , Qian X , Chen H , Guo Z. HMGB1 bound to cisplatin–DNA adducts undergoes extensive acetylation and phosphorylation in vivo. Chem Sci ,2015; 6: 2074-2078.
35. Hiraku Y, Guo F, Ma N, Yamada T, Wang S, Kawanishi S, Murata M. Multi-walled carbon nanotube induces nitrate DNA damage in human lung epithelial cells via HMGB1-RAGE interaction and Toll-like receptor 9 activation. Part Fibre Toxicol, 2015; 13: 16.
36. Hosseinzadeh S, Daemi A, Bolhassani A. Heat shock proteins as the efficient vehicle in cancer. J Solid Tumor, 2012; 2(3): 47-55.
37. Hou W, Zhang Q, Yan Z, Chen R, Zeh HJ, Kang R, Lotze MT. Tang D. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity Open. Cell Death Dis, 2013; 4: e966.
38. Huber R, Meier B, Otsuka A, Fenini G, Satoh T, Gehrke S, Widmer D, Levesque MP, Mangana J, Kerl K, Gebhardt C, Fujii H, Nakashima C, Nonomura Y, Kabashima K, Dummer R, Contassot E, Frenchb LE. Tumour hypoxia promotes melanoma growth and metastasis via High Mobility Group Box-1 and M2-like macrophages. Sci Rep, 2016; 6: 29914.

39. Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, Sitia G, Yap GS, Wan Y, Biron CA, Bianchi ME, Wang H, Chu WM. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood*, 2007;110(6):1970-81.
40. Jee SH, Kim K, Lee M. "A high mobility group B-1 box A peptide combined with an artery wall binding peptide targets delivery of nucleic acids to smooth muscle cells." *J Cellular Biochem*, 2009; 107(1):pp. 163-170.
41. Jung JH, Park JH, Jee MH, Keum SJ, Cho MS, Yoon SK, Jang SK. Hepatitis C virus infection is blocked by HMGB1 released from virus-infected cells. *J Virol*, 2011;85(18):9359-68.
42. Karuppagounder V, Giridharan VV, Arumugam S, Sreedhar R, Palaniyandi SS, Krishnamurthy P, Quevedo J, Watanabe K, Konishi T, Thandavarayan RA, Modulation of Macrophage Polarization and HMGB1-TLR2/TLR4 Cascade Plays a Crucial Role for Cardiac Remodeling in Senescence-Accelerated Prone Mice. *PLoS One*, 2016; 11(4): e0152922.
43. Kimura R, Mori N. Abundant expression of HMGB1 in human T-cell lymphotropic virus type I-infected T-cell lines and high plasma levels of HMGB1 in patients with adult T-cell leukemia. *Oncology Letter*, 2014; 7: 1239-1242.
44. Kim S, Kim SY, Pribis JP, Lotze M, Mollen KP, Shapiro R, Loughran P, Scott MJ, Billiar TR. Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol Med*, 2013;19:88-98.
45. Ko YB, Kim BR, Nam SL, Yang JB, Park SY, Rho SB. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein regulates tumor-associated cell migration through the interaction with BTB domain. *Cell Signal*, 2014;26(4):777-83.
46. Kuniyasu H, Sasahira T, Bhawal UK, Chihara Y, Kurihara M, Yamamoto K, Kirita T. The roles of HMGB1 related angiogenesis and lymphangiogenesis in oral cancer. *Oncol Rev*, 2011; 5(1): 49-55.
47. Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2015; 15(2): e157-e170.
48. Lai B, Kong M, Zheng Q, Zhang X, Liu X, Zu K, Chen Y, Zheng S, Li J, Ren F, Lou J, Liu S, Duan Z. Inhibition of the translocation and extracellular release of high-mobility group box 1 alleviates liver damage in fibrotic mice in response to D-galactosamine/lipopolysaccharide challenge. *Mol Med Rep*, 2016; 13(5): 3835-3841.
49. Lei H, Wen Q1, Li H, Du S, Wu JJ, Chen J, Huang H, Chen D, Li Y, Zhang S, Zhou J, Deng R, Yang Q. Paeonol Inhibits Lipopolysaccharide-Induced HMGB1 Translocation from the Nucleus to the Cytoplasm in RAW264.7 Cells. *Inflammation*, 2016;39(3):1177-87.
50. Liu G, Wang J, Park YJ, Tsuruta Y, Lorne EF, Zhao X, Abraham E. High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine. *J Immunol*, 2008; 181(6): 4240-4246.
51. Lui G, Wong CK, Margaret Ip, Chu YJ, Irene MH, Catherine S K, Zheng L, Lam SY, Wong KT, Winnie WY, Choi KW, Lee N. HMGB1/RAGE Signaling and Pro-Inflammatory Cytokine Responses in Non-HIV Adults with Active Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One*, 2016; 11(7): e0159132.
52. Liu H, Fan X, Huang J, Li N, Peng J, Li S, Wang H. Serum level of HMGB1 in patients with hepatitis B and its clinical significance. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2007;15(11):812-5.
53. Liu J, Zhang BL, Sun CL, Wang J, Li S, Wang JF. High mobility group box1 protein is involved in acute inflammation induced by Clostridium difficile toxin A. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016; 48(6):554-62.
54. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*, 2005;5:331-342.
55. Luan G, Gao Q, Zhai F, Chen Y, Li T. Upregulation of HMGB1, toll-like receptor and RAGE in human

56. Meshcheryakova E, Makarov E, Philpott D, Andronova T, Ivanov V, "Evidence for Correlation between the Intensities of Adjuvant Effects and NOD2 Activation by Monomeric, Dimeric and Lipophylic Derivatives of N-Acetylglucosaminyl-N-Acetylmuramyl Peptides." *Vaccine*, 2007; 25(23): 4515-4520.
57. Mohan T, Verma P, Nageswara Rao D. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res*, 2013; 138: 779-795.
58. Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianchi ME. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *Embo J*, 2001;20:4337-4340.
59. Muthumani G1, Laddy DJ, Sundaram SG, Fagone P, Shedlock DJ, Kannan S, Wu L, Chung CW, Lankaraman KM, Burns J, Muthumani K, Weiner DB. Co-immunization with an optimized plasmid-encoded immune stimulatory interleukin, high-mobility group box 1 protein, results in enhanced interferon-gamma secretion by antigen-specific CD8 T cells. *Immunol*, 2009;128(1):e612-20.
60. Nguyen AH, Detty SQ, Agrawal DK. Clinical Implications of High-mobility Group Box-1 (HMGB1) and the Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) in Cutaneous Malignancy: A Systematic Review. *Anticancer Res*. 2017;37(1):1-7.
61. Nguyen AH, Bhavsar SB, Riley EM, Caponetti GC, Agrawal DK. Association of high mobility group BOX-1 and receptor for advanced glycation endproducts with clinicopathological features of haematological malignancies: a systematic review. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2016;20(6):425-429.
62. Ogunniyi AD, Paton JC, Kirby AC, McCullers JA, Cook J, Hyodo M, Hayakawa Y, Karaolis DK. "c-di-GMP is an Effective Immunomodulator and Vaccine Adjuvant against Pneumococcal Infection." *Vaccine*, 2008; 26(36): 4676-4685.
63. O'Hagan DT, Rappuoli R. Novel Approaches to Vaccine Delivery. *Pharmaceut Res*, 2004; 21 (9): 1519-1530.
64. Pang X, Zhang Y, Wei H, Zhang J, Luo Q, Huang C, Zhang S. Expression and Effects of High-Mobility Group Box 1 in Cervical Cancer. *Int J Mol Sci*, 2014; 15, 8699-8712.
65. Passos KJ, Fiorini A, Rosado FR, Freitas DV, Lima Neto QA, Pattaro Junior JR, Gaspar VP, Fernandez MA. Ability of HMGB1 protein to bind to intrinsically bent and non-bent DNA sites in the AMPD2 gene amplicon. *Genet Mol Res*, 2016;15(2).
66. Pilzweiger, C., Holdenrieder, S. Circulating HMGB1 and RAGE as Clinical Biomarkers in Malignant and Autoimmune Diseases. *Diagnostics*, 2015; 5(2), 219-253.
67. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazon M, Dumitriu IE, Müller S, Iannacone M, Traversari C, Bianchi ME, Manfredi AA. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO reports*, 2004; 5 (8): 826.
68. Rowell JP, Simpson KL, Stott K, Watson M, Thomas JO. HMGB1-Facilitated p53 DNA Binding Occurs via HMG-Box/p53 Transactivation Domain Interaction, Regulated by the Acidic Tail. *Structure*, 2014; 20: 2014-2024.
69. Saenz R, da Silva Souza C, Huang C-T, Larsson M, Esener S, Messmer D. HMGB1-derived peptide acts as adjuvant inducing immune responses to peptide and protein antigen. *Vaccine*, 2010; 28(47): 7556-7562.
70. Saenz R, Futralan D, Leutenez L, Eekhout F, Fecteau JF, Sundelius S, Sundqvist S, Larsson M, Hayashi T, Minev B, Carson D, Esener S, Messmer B, Messmer D. TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *J Translat Med*, 2014; 12:211.
71. Saenz R, Messmer B, Futralan D, Tor Y, Larsson M, Daniels G, Esener S, Messmer D. Activity of the HMGB1-Derived Immunostimulatory Peptide Hp91 Resides in the Helical C-terminal Portion and is Enhanced by Dimerization. *Mol Immunol*, 2014; 57(2): 191-199.
72. Segal BH, Wang XY, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, Subjeck JR. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discov Today*, 2006;11(11-12):534-40.
73. Shi Y, Galusha SA, Kenneth L. Rock1 Cutting Edge: Elimination of an Endogenous Adjuvant Reduces the Activation of CD8 T Lymphocytes to Transplanted Cells and in an Autoimmune Diabetes Model. *J Immunol*, 2006;176(7):3905-8.

74. Shi Y, Rock KL. Cell death releases endogenous adjuvants that selectively enhance immune surveillance of particulate antigens. *Eur J Immunol*, 2002;32(1):155-62.
75. Shrivastava S, Mansure JJ, Almajed W, Cury F, Ferbeyre G, Popovic M, Seuntjens J, Kassouf W. The Role of HMGB1 in Radioresistance of Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther*, 2016;15(3):471-9.
76. Sitia G, Iannacone M, Müller S, Bianchi ME, Guidotti LG. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol*, 2007;81(1):100-7.
77. Sohun M, Shen H. The implication and potential applications of high-mobility group box 1 protein in breast cancer. *Ann Transl Med*, 2016; 4(11): 217.
78. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med*, 2009;7:17.
79. Talebi S, Bolhassani A, Mokhtari Azad T, Arashkia A, Modaresi MH. In vitro expression of HPV16 E7 linked to HMGB1 immunoadjuvant in mammalian cells. *Bratislava Med J*, 2016;117 (10): 609–13.
80. Talebi S, Bolhassani A, Mokhtari Azad T, Arashkia A, Modaresi MH. Immuno-stimulating peptide derived from HMGB1 is more effective than the N-terminal domain of Gp96 as an endogenous adjuvant for improvement of protein vaccines. *Protein & Peptide Letters*, 2016; In Press
81. Talebi S, Bolhassani A, Sadat SM, Vahabpour R, Agi E, Shahbazi S. Hp91 immunoadjuvant: An HMGB1-derived peptide for development of therapeutic HPV vaccines. *Biomedicine and Pharmacotherapy* ,2016; 85:148-154.
82. Tang D, Kang R, Coyne CB., Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal that Spur Autophagy and Immunity. *Immunol Rev*, 2012; 249(1): 158–175.
83. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh C, Farka A, Loughran P, Hoppe G, Bianchi ME, Tracey KJ, Zeh HJ, Lotze MT. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol*, 2010.; 190(5): 881–892.
84. Tang D, Kang R, Zeh HJ, Lotze MT. High-mobility Group Box 1 [HMGB1] and Cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2010; 1799(1-2): 131.
85. Tessarollo L, Ovcherenko I, Landsman D, Bustin M. Functional compensation among HMGN variants modulates the DNase I hypersensitive sites at enhancers. *Genome Res*, 2015; 25(9): 1295–1308.
86. Thirugnanam S, Munirathinam G, Veerapathran A, Dakshinamoorthy G, Reddy MV, Ramaswamy K. Cloning and characterization of high mobility group box protein 1 (HMGB1) of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *Parasitol Res* , 2012;111(2):619-27.
87. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow, MK, Fitzgerald, KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*, 2007;8:487–496.
88. Toussi DN, Massari P. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. *Vaccin*, 2014; 2: 323-353.
89. Trøseid M, Sønnerborg A, Nowak P. High mobility group box protein-1 in HIV-1 infection. *Curr HIV Res*, 2011;9(1):6-10.
90. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med*, 2005;201:1135–1143.
91. Wan W, Cao L, Khanabdali R, Kalionis B, Tai X, Xia S. The Emerging Role of HMGB1 in Neuropathic Pain: A Potential Therapeutic Target for Neuroinflammation. *J Immunol Res*, 2016; 6430423:1-9.
92. Wang B, Yeh CB, Lein MY, Su CM, Yang SF, Liu YF, Tang CH. Effects of HMGB1 Polymorphisms on the Susceptibility and Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Med Sci*, 2016;13(4):304-9.
93. Wang J, He GZ, Wang YK, Zhu QK, Chen W, Guo T. TLR4-HMGB1-, MyD88- and TRIF-dependent signaling in mouse intestinal ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol* , 2015;21(27):8314-25.

94. Wang K, Huang J, Xie W, Huang L, Zhong C, Chen Z. Beclin1 and HMGB1 ameliorate the  $\alpha$ -synuclein-mediated autophagy inhibition in PC12 cells. *Diagn Pathol*, 2016;11:15.
95. Wang X, Xiang L, Li H, Chen P, Feng Y, Zhang J, Yang N, Li F, Wang Y, Zhang Q, Li F, Cao F. The Role of HMGB1 Signaling Pathway in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Int J Mol Sci*, 2015;16: 22527-22540.
96. Wang Y, Zhong J, Zhang X, Liu Z, Yang Y, Gong Q, Ren B. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res*. 2016;2016:2543268.
97. Wei L, Liu X, Zhang W, Wei Y, Li Y, Zhang Q, Dong R, Kwon JS, Liu Z, Zheng W, Kong B. Overexpression and oncogenic function of HMGA2 in endometrial serous carcinogenesis. *Am J Cancer Res*, 2016;6(2): 249–259.
98. Weir HM, Kraulis PJ, Hill CS, Raine ARC, Laue ED, Thomas JO. “Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1.” *EMBO J*, 1993; 12(4): 1311–1319.
99. Weng H, Deng Y, Xie Y, Liu H, Gong F. Expression and significance of HMGB1, TLR4 and NF- $\kappa$ B p65 in human epidermal tumors. *BMC Cancer*, 2013; 13:311.
100. Weng H, Liu H, Deng Y, Xie Y, Shen G. Effects of high mobility group protein box 1 and toll like receptor 4 pathway on warts caused by human papillomavirus. *Mol Med Rep*, 2014;10(4):1765-71.
101. Yang D, Oppenheims JJ. Alarmins and antimicrobial immunity. *Med Mycol*, 2009; 47 (1): 146-153.
102. Yang H, Lundback P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, Al-Abed Y, Andersson U, Tracey KJ, Antoine DJ. “Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1).” *Molecular Medicine*, 2012; 18(2): 250–259.
103. Yang R, Tenhunen J, Tonnessen TI. HMGB1 and Histones Play a Significant Role in Inducing Systemic Inflammation and Multiple Organ Dysfunctions in Severe Acute Pancreatitis. *Int J Inflam* 2017; 2017:1817564.
104. Youn, JH, Kwak, MS, Wu J, Kim ES, Ji Y, Min HJ, Yoo JH, Choi JE, Cho HS, Shin JS. Identification of lipopolysaccharide-binding peptide regions within HMGB1 and their effects on subclinical endotoxemia in a mouse model. *Eur J Immunol*, 2011; 41: 2753–2762.
105. Yu R, Yang D, Lei S, Wang X, Meng X, Xue B, Zhu H. HMGB1 Promotes Hepatitis C Virus Replication by Interaction with Stem-Loop 4 in the Viral 5' Untranslated Region. *J Virol*, 2016; 90(5): 2332–2344.
106. Yu Y, Xie M, He YL, Xu WQ, Zhu S, Cao LZ. Role of high mobility group box 1 in adriamycin-induced apoptosis in leukemia K562 cells. *Ai Zheng*, 2008;27(9):929-33.
107. Zabini D, Crnkovic S, Xu H, Tscherner M, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski A, Kwapiszewska G, Marsh LM. High-mobility group box-1 induces vascular remodelling processes via c-Jun activation. *J Cell Mol Med*, 2015;19(5):1151-61.
108. Zhang CL, Shu MG, Qi HW, Li LW. “Inhibition of tumor angiogenesis by HMGB1 A box peptide.” *Medl Hypothes*, 2008; 70(2): 343–345.
109. Zhang X, Yu J, Li M, Zhu H, Sun X, Kong L. The association of HMGB1 expression with clinicopathological significance and prognosis in Asian patients with colorectal carcinoma: a meta-analysis and literature review. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 4901–4911.
110. Zheng S, Yang J, Tang Y, Yang J, Shao Q, Guo L, Liu Q. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on the serum and liver HMGB1 expression in rats with acute liver failure. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015; 8(12): 15985–15992.