

Regulacja odpowiedzi immunologicznej myszy BALB/c zarażonych *Heligmosomoides polygyrus*

Regulation of the immune response in BALB/c mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*

Justyna Rzepecka

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Parazytologii Instytutu Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski i obroniona 27 listopada 2006 r.

Promotor: dr hab. Maria Doligalska, prof. UW

Recenzenci: prof. dr hab. Halina Wędrychowicz
dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska, prof. UW

ABSTRACT. The aim of the studies was to identify the regulatory mechanisms that act at different levels of the ongoing immune response in BALB/c mice infected with intestinal nematode *H. polygyrus*. The role of TGF- β during the course of *H. polygyrus* infection and an immunosuppressive action of the nematode against eosinophil response in allergic pulmonary inflammation has been studied. An attempt to identify the immunoregulatory proteins of the parasite has been performed as well.

The obtained results proved: (1) for the first time the direct role of TGF- β in the regulation of the immune response during helminth infections. Neutralization of TGF- β *in vivo* increased concentration of IL-12, TNF- α and IL-10 in serum of infected mice and restored the control number of eosinophils in the intestinal mucosa. The mobilization of the immune response after neutralization of TGF- β led to persistent decrease of nematode egg production and faster rejection of the worm from mouse intestine; (2) for the first time it was shown that the reduction of eosinophil number was due to the lower production of eotaxin and reduced expression of CCR3 receptor, playing an essential role in the chemotaxis of these leukocytes in Ova-related asthma; (3) significant decrease of T cell proliferation by one of the *H. polygyrus* protein fraction. With the use of mass spectrometry seven proteins have been identified: two heat shock proteins, disulfide isomerase, calreticulin, calumenin, fructose-bisphosphate aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. From the bibliographic data it may be supposed that calreticulin could mediate the downregulation of lymphocytes proliferation. The fraction with calreticulin stimulated also production of specific IgE.

Key words: allergy, chemokines, coinfection, eosinophils, *Heligmosmoides polygyrus*, immunosuppression, *Toxocara canis*.

Streszczenie

Zarażenia nicieniami jelitowymi wzbudzają supresję odpowiedzi immunologicznej i mogą modulować przebieg reakcji układu odpornościowego w chorobach autoimmunizacyjnych, nowotworowych i wywołanych przez patogeny, a także w alergii. Wzbudzany przez nie stan tolerancji immunologicznej prawdopodobnie przyczynia się do obniżenia nadmiernej reaktywności układu odpornościo-

wego. Mechanizm tych oddziaływań nie jest poznany. Liczne badania epidemiologiczne wykazały, że istnieje odwrotna korelacja częstotliwości występowania alergii i parazytoz. Wnioskuje się zatem, że przewlekłe zarażenia mogą hamować objawy alergiczne. Sugeruje się, że w obniżaniu odpowiedzi immunologicznej żywiciela, obok czynników pochodzenia pasożytniczego, biorą udział także limfocyty regulatorowe. W akcji immunosupresji ważną funkcję zapewne odgrywają produkowane przez te

limfocyty cytokiny IL-10 i TGF- β , modulujące odpowiedź subpopulacji limfocytów Th1 i Th2.

Celem pracy było wskazanie potencjalnych mechanizmów regulacyjnych, na różnych poziomach odpowiedzi immunologicznej u myszy BALB/c, zarażonych nicieniem jelitowym *Heligmosomoides polygyrus*. Nicień ten hamuje stan zapalny w jelicie cienkim oraz moduluje obwodową odpowiedź immunologiczną myszy przez wiele miesięcy. Przejawia się to m. in. zmniejszeniem nacieku eozynofiliów i komórek tłuszczowych w błonie śluzowej jelita. Jednym z czynników kontrolujących aktywność komórek układu odpornościowego, w tym eozynofiliów, jest TGF- β , wzbudzający tolerancję na antygeny.

W celu określenia wpływu TGF- β na odpowiedź immunologiczną i przebieg zarażenia *H. polygyrus* u myszy, przeprowadzono neutralizację tego czynnika *in vivo* za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Założono, że zahamowanie aktywności TGF- β przyczyni się do zablokowania mechanizmu regulacyjnego i spowoduje nasilenie obronnej odpowiedzi immunologicznej, doprowadzającej do osłabienia inwazji nicienia.

Następnie badano, czy zarażenie *H. polygyrus* obniża naciek eozynofiliów w modelu astmy u myszy BALB/c. Oznaczano liczebność tych komórek w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym myszy po immunizacji owoalbuminą (Ova). Zmiany w poziomie aktywacji, zależne od IL-5, eotaksyny i ekspresji receptorów powierzchniowych eozynofiliów, świadczyłyby o modulacji odpowiedzi tych granulocytów podczas zarażenia *H. polygyrus*.

W przewlekłych zarażeniach nicieniami obserwuje się zahamowanie odpowiedzi limfocytów T i zmniejszenie produkcji cytokin. Produkty wydzielane przez helminty mogą bezpośrednio osłabiać aktywność układu odpornościowego, jak na przykład antygenowo-specyficzną proliferację limfocytów T. Za pomocą chromatografii żelowej sprzężonej z FPLC dokonano rozdziału mieszaniny białek sekrecyjnych pasożyta na frakcje. Badano następnie, które z nich hamują proliferację splenocytów myszy Ova-TCR transgenicznych, silnie proliferujących pod wpływem Ova w hodowli *in vitro*. Wskazanie frakcji białkowych, ich składu molekularnego i immunogenności mierzonej poziomem swoistego IgE, służyło identyfikacji czynników aktywnych w mechanizmie immunosupresji.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano:

i. udział TGF- β w utrzymaniu zarażenia *H. polygyrus* u myszy BALB/c oraz hamowaniu reakcji im-

munologicznych żywiciela. Jest to pierwsza praca, która potwierdza bezpośredni udział tego czynnika w regulacji odpowiedzi układu odpornościowego w czasie zarażenia helmintami. Neutralizacja TGF- β zwiększyła poziom IL-12, TNF- α i IL-10 w surowicy myszy zarażonych *H. polygyrus* oraz przywróciła kontrolny poziom eozynofiliów w błonie śluzowej jelita cienkiego. Tak wzmożona aktywność układu odpornościowego przyczyniła się do trwałego obniżenia produkcji jaj pasożyta i szybszego usuwania nicieni z jelita myszy;

ii. zahamowanie nacieku eozynofiliów wzbudzonego po immunizacji myszy owoalbuminą. Po raz pierwszy wykazano, że redukcja liczby eozynofiliów w czasie zarażeń helmintami jest spowodowana obniżeniem stężenia eotaksyny i zmniejszeniem ekspresji receptora CCR3, odgrywających nadrzędną rolę w chemotaksji tych leukocytów w astmie;

iii. istotne obniżenie Ova-specyficznego proliferacji limfocytów przez cztery spośród przebadanych dwudziestu frakcji mieszaniny białek *H. polygyrus*. Jedna z frakcji zawierająca kilkanaście białek o masie molekularnej 30-175 kDa hamowała proliferację splenocytów aż o 39%. W obrębie tej frakcji przy użyciu spektrometrii mas zidentyfikowano homologię siedmiu białek, wśród nich: dwa białka szoku cieplnego, izomerazę dwusiarczkową, białko podobne do kalretikuliny, białko podobne do kalumeniny, aldolazę fruktozo-1,6-bisfosforanu i dehydrogenazę aldehyd 3-fosoglicerynową. Po porównaniu profilów białkowych wszystkich frakcji immunosupresyjnych sugeruje się, że za obniżenie odpowiedzi immunologicznej w zarażeniu *H. polygyrus* może odpowiadać kalretikulina. Interesujące jest, że frakcja zawierająca kalretikulinę wzbudzała produkcję specyficznych przeciwciał IgE u myszy zarażonych *H. polygyrus*. Białko to posiadałoby zatem unikatową cechę, gdyż mogłoby zarówno hamować jak i indukować odpowiedź immunologiczną żywiciela.

Szczegółowe badania właściwości kalretikuliny, jak i innych białek immunoregulacyjnych helmintów, mogą okazać się bardzo ważne wobec rosnącego zainteresowania badaczy zastosowaniem tych związków w terapiach chorób alergicznych i autoimmunizacyjnych. Istotne jest nie tylko wytypowanie białek pasożyta o właściwościach immunomodulacyjnych, ale również określenie jego ważnych funkcji w odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Wiele produktów wydzielanych przez helminty może posłużyć do opracowania szczepionek terapeutycznych np. w zapaleniu jelita grubego i alergii.

Podsumowując, mechanizm regulacji odpowiedzi immunologicznej myszy BALB/c w czasie zarażenia *H. polygyrus* polega na hamowaniu proliferacji limfocytów i odpowiedzi eozynofilów oraz obniżeniu produkcji cytokin Th1- i Th2-zależnych. W regulację odpowiedzi obronnej żywiciela włą-

czony jest TGF- β . Wskazano na potencjalny udział niektórych białek nicienia w tym procesie.

Wpłynęło 8 grudnia 2006

Zaakceptowano 15 grudnia 2006