Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Johana Moravcová

Imunomodulační vlastnosti helminty produkovaných molekul a jejich efekt při autoimunitních a chronických zánětlivých onemocnění

Immunomodulatory properties of helminth-produced molecules and their effect during autoimmune and chronic inflammatory diseases

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Šmídová

Konzultant práce: RNDr. Tomáš Macháček, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 4. 2022

Podpis

Poděkování

Z celého srdce bych chtěla nejprve poděkovat své školitelce Mgr. Barboře Šmídové a konzultantovi RNDr. Tomášovi Macháčkovi, PhD. za jejich nadšení, trpělivost, podporu, rady a připomínky, které vedly k ukončení této práce. Dále bych také chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Parazitičtí helminti produkují exkrečně/sekreční produkty (ESP), které ovlivňují imunitní systém hostitele, aby zabránily poškození nebo vyloučení parazita. V posledních desetiletí jsou pro jejich imunomodulační potenciál jednotlivé molekuly ESP předmětem výzkumu léčby autoimunitních a chronických zánětlivých onemocnění. Mezi onemocnění, které jsou v tomto kontextu zkoumána, patří ulcerózní kolitida, roztroušená skleróza, diabetes 1.typu, revmatoidní artritida a alergické astma. Z plejády helmintů a jejich imunomodulačních molekul stojí za zmínku *Acanthocheilonema viteae* (Av17), *Ancylostoma caninum* (NIF), *Ascaris lumbricoides* (Al-CPI), *Brugia Malayi* (BMCys), *Clonorchis sinensis* (CsStefin-1), *Fasciola hepatica* (FhHDM-1), *Heligmosomoides polygyrus* (HpTGM), *Schistosoma japonicum* (SjCystatin) a *Schistosoma mansoni* (omega-1). K hlavním účinkům těchto molekul na imunitní systém hostitele se řadí ovlivnění funkce dendritických buněk a makrofágů, ovlivnění produkce cytokinů a snížení Th1 imunitní odpovědi, což většinou vede k zmírnění příznaků nemoci. Podle současného stavu poznání zatím není jisté, jak budou molekuly fungovat při léčbě pacientů a jestli budou mít stejný účinek i při dlouhodobém podávání. Navzdory tomu díky výzkumu jejich využití při léčbě autoimunitních a chronických onemocnění vzniká řada slibných kandidátů na léčiva.

Klíčová slova: helminti, imunomodulační molekuly, autoimunitní onemocnění, alergická onemocnění, terapie, profylaxe

Abstract

Parasitic helminths produce excretion/secretion products (ESP) that affect the host´s immune system to prevent damage or exclusion of the parasite. In recent decades, individual ESP molecules have been the focus of research for the treatment of autoimmune and chronic inflammatory diseases due to their immunomodulatory potential. Diseases that have been investigated in this context include ulcerative colitis, multiple sclerosis, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis and allergic asthma. Among the pleiad of helminths and their immunomodulatory molecules, it is worth mentioning *Acanthocheilonema viteae* (Av17), *Ancylostoma caninum* (NIF), *Ascaris lumbricoides* (Al-CPI), *Brugia malayi* (BMCys), *Clonorchis sinensis* (CsStefin-1), *Fasciola hepatica* (FhHDM-1), *Heligmosomoides polygyrus* (HpTGM), *Schistosoma japonicum* (SjCystatin) and *Schistosoma mansoni* (Omega-1). The main effects of these molecules on the host immune system include affecting the function of dendritic cells and macrophages, influencing cytokine production and reducing the Th1 immune response, which usually leads to alleviation of disease symptoms. Based on the current state of knowledge, it is not yet certain how the molecules will work in treating patients and whether they will have the same effect when administered in the long term. Despite this, research into their use in the treatment of autoimmune and chronic diseases is yielding a number of promising drug candidates.

Keywords: helminths, immunomodulatory molecules, autoimmune diseases, allergic diseases, therapy, prophylaxis

Seznam zkratek

Al-CPI	*Ancylostoma caninum* cysteine protease inhibitor
APC	antigen prezentující buňka
Av17	*Ascaris lumbricoides* cystatin
BALF	bronchoalveolární tekutina
BCR	B buněčný receptor
BMCys	*Brugia malayi* cystatin
BSA	hovězí sérový albumin
CIA	kolagen indukovaná artritida
CNS	centrální nervová soustava
CsStefin-1	*Clonorchis sinensis* stefin-1
DC	dendritická buňka
DSS	dextran sodium sulfát
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
FhHDM-1	*Fasciola hepatica* helminth defense molecule 1
HES	exkrečně/sekreční produkty Heligmosomoides polygyrus
HpARI	*Heligmosomoides polygyrus* alarmin release inhibitor
HpBARI	*Heligmosomoides polygyrus* binds alarmin receptor and inhibits
Hp-TGM	*Heligmosomoides polygyrus* TGF-β mimic
IBD	idiopatické střevní záněty
ILC2	přirozené lymfoidní buňky typu II
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoprotein
NIF	neutrofil inhibující faktor
NOD	neobézní diabetické
OVA	ovalbumin
PAMP	molekulární vzor rozpoznávaný patogenem
PC	fosforylcholin
PKC	proteinkináza C
PLP	myelinový proteolipidový protein
RA	kyselina retinová
SEA	vaječný antigen
SjCystatin	*Schistosoma japonicum* cystatin

SMA	malé molekulární analogy
TGF-β	transformující růstový faktor beta
Th	T pomocné buňky
TLR	Toll-like receptor
Treg	T regulační buňky

Obsah

1 Úvod ... 1
2 Onemocnění ... 2
2.1 Ulcerózní kolitida ... 2
2.2 Roztroušená skleróza ... 3
2.3 Diabetes I. typu ... 4
2.4 Revmatoidní artritida ... 5
2.5 Alergické astma ... 5
3 Cystatiny ... 7
3.1 Av17 ... 7
3.2 BMCys ... 8
3.3 Al-CPI ... 9
3.4 CsStefin-1 ... 9
3.5 SjCystatin ... 9
4 ES-62 ... 10
5 FhHDM-1 ... 12
6 Hp-TGM ... 14
7 HpARI a HpBARI ... 17
8 NIF ... 18
9 Omega-1 ... 19
10 Závěr ... 21
11 Seznam literatury ... 24

1 Úvod

V posledních sto letech je pozorován velmi silný nárůst prevalence autoimunitních a alergických onemocnění. Epidemiologické výsledky ukazují, že jedním z mnoha faktorů ovlivňujících výskyt těchto onemocnění jsou infekce helminty (Aravindhan et al., 2010; Fleming & Cook, 2006; Zaccone et al., 2006). Tyto výsledky jsou v souladu s „old friends“ hypotézou, která popisuje dlouhé vzájemné evoluční adaptace mezi parazity a lidmi mající zásadní vliv na fungování lidského imunitního systému. Pokud jsou parazité odstraněni z lidských populací, které jsou na ně přizpůsobeny, vzniká nerovnováha v lidském imunitním systému a zvyšuje se náchylnost k imunitou zprostředkovaným onemocněním (Lund et al., 2016; Rook, 2010). Další důležitou hypotézou je hygienická hypotéza formulována Strachanem roku 1989, která vysvětluje původ alergických onemocnění (Strachan, 1989). Od té doby prošla mnohými úpravami a stala se z ní komplexní hypotéza zahrnující imunologické, mikrobiologické a evoluční aspekty, a objasňuje dopad postmoderního životního stylu na člověka, který se prvotně vyvíjel v těsné blízkosti přírodního prostředí (Pfefferle et al., 2021). Tato hypotéza říká, že nedostatek běžných alergenů zvýšil výskyt alergií a autoimunitních onemocnění v zemích, kde jsou kvalitní hygienické podmínky (Okada et al., 2010). Podpořena je několika epidemiologickými studiemi, které ukazují, že v rozvojových zemích, kde je výskyt helmintů stále poměrně vysoký, je výskyt alergických a autoimunitních onemocnění výrazně nižší v porovnání s vyspělými zeměmi (Fleming & Cook, 2006; Okada et al., 2010; Panda et al., 2013; Rook, 2012; Yazdanbakhsh et al., 2001).

Infekce helminty jsou zkoumané jako potenciální terapie autoimunitních a chronických onemocnění, ale použití živých parazitů není ideální. Nákaza helminty je spojena s nevýhodami jako je například nutnost časté kolonizace, možný přenos terapeutických helmintů do prostředí a vznik vedlejších účinků způsobených migrací parazita tkáněmi a možnou kontaminací dalšími patogeny (Bager et al., 2011; Kruiningen & West, 2005). Proto je kladen velký důraz na bezpečnější i případně účinnější alternativní léčbu pomocí imunomodulačních molekul produkovaných helminty.

Cílem práce je shrnutí základních poznatků o vybraných molekulách helmintů a jejich efektu na autoimunitní a chronická zánětlivá onemocnění. Pro svou práci jsem si vybrala dostatečně prostudované molekuly, které byly zároveň testované na zvířecích modelech daných onemocnění.

2 Onemocnění

Tato kapitola je souhrnem autoimunitních a chronických onemocnění, u nichž byl zkoumán vliv imunomodulačních molekul produkovaných helminty na průběh nemoci. Kromě symptomů a patogenezí souvisejících s imunitou jsou u každé nemoci popsány experimentální modely, které se využívají ve výzkumu daného onemocnění.

Experimenty, při kterých byl zkoumán vliv imunomodulačních molekul helminta na modelové onemocnění, probíhaly dvojím způsobem. Buď se jednalo o preventivní model, kdy byla molekula podána před vyvoláním onemocnění, a tím pádem se zkoumalo, zda by tato molekula mohla fungovat jako profylaktická léčba. Nebo se jednalo o terapeutický model, kdy byla molekula podána již po vyvolání onemocnění.

2.1 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida se společně s Crohnovou chorobou řadí mezi idiopatické střevní záněty (inflammatory bowel disease; IBD). Jedná se o zánětlivé onemocnění střevní sliznice, které může být akutní nebo chronické (Ordás et al., 2012). Výskyt ulcerózní kolitidy je vyšší v industrializovaných rozvinutých zemích, více ve městech oproti venkovským oblastem, což naznačuje, že rozhodující vliv na vznik onemocnění mají enviromentální faktory, ale také to může být ovlivněno lepší dostupností zdravotní péče a lepšími lékařskými záznamy (Bernstein et al., 2006; López-Serrano et al., 2010; Ordás et al., 2012). Zajímavostí je, že velmi významným faktorem ovlivňující onemocnění je kouření. Bylo prokázáno, že kouření má protektivní účinek proti kolitidě v porovnání s nekuřáky, a také že u kuřáků bývá průběh onemocnění mírnější (Beaugerie et al., 2001; Mahid et al., 2006). Mezi projevy kolitidy řadíme bolesti břicha, vodnatý průjem, krev ve stolici, tenesmus, horečky, ztrátu váhy a únavu.

Při kolitidě dochází k narušení těsných spojů, což vede k zvýšené propustnosti střevního epitelu a zvýšenému vstřebávání antigenů z lumen střeva. V lamina propria se makrofágy a dendritické buňky mění z tolerogenního stavu na aktivovaný, dochází k aktivaci NF-κB dráhy, čímž se zvýší produkce prozánětlivých cytokinů TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 a IL-23 (Ordás et al., 2012). Po zpracování antigenů je dendritické buňky a makrofágy prezentují $CD4^+$ T buňkám a podporují tak jejich diferenciaci v Th2 buňky produkující IL-4. V lamina propria je také zvýšené množství NK T-lymfocytů, které produkují IL-13 (Ordás et al., 2012). IL-13 je klíčový cytokin působící přímo na epiteliální buňky a iniciuje apoptózu, čímž podporuje ničení střevního epitelu (Heller et al., 2005, 2008).

Jedním z modelů ulcerózní kolitidy je kolitida indukovaná dextran sodium sulfátem (DSS), kdy se DSS přidává v různém množství do pitné vody podávané myším (Perše & Cerar, 2012). Dextran sodium sulfát je chemická látka způsobující poškození slizničního epitelu a funkce slizniční bariéry (Chassaing et al., 2014). Výhodami daného modelu je možnost ovlivnění, zda bude onemocnění akutní, chronické nebo recidivující v závislosti na množství a frekvenci podaného DSS (Perše & Cerar, 2012). Jedná se o jednoduchý a levný model, u kterého bylo prokázano, že může být použit pro relevantní převod výsledků z myší na ulcerózní kolitidu u lidí, a proto se jedná o nejčastější využívaný model pro

studium ulcerózní kolitidy (Melgar et al., 2008; Perše & Cerar, 2012). Akutní DSS-indukovaná kolitida se projevuje úbytkem mucinu, poničením epitelu, nekrózou vedoucí k úbytku epiteliálních buněk a infiltrací neutrofily v lamina propria a submukóze. Mezi projevy chronické DSS-indukované kolitidy patří poničení struktury krypt a zvětšení mezer mezi kryptami a *muscularis mucosae*, zvýšení množství lymfocytů ve sliznici a infiltrace leukocyty (Perše & Cerar, 2012). Mezi symptomy DSS indukované kolitidy patří ztráta tělesné hmotnosti, průjem a rektální krvácení, připomínající symptomy lidské ulcerózní kolitidy (Okayasu et al., 1990; Wirtz et al., 2007). Je tedy zřejmé, že klinické a histopatologické projevy DSS-indukované kolitidy jsou do velké míry totožné s projevy ulcerózní kolitidy.

2.2 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza je autoimunitní zánětlivé onemocnění vznikající v důsledku infiltrace centrální nervové soustavy (CNS) autoreaktivními T-lymfocyty z periferního imunitního systému, demyelinizace a neurodegenerace šedé a bílé hmoty v mozku a míše (Lassmann et al., 2007). Riziko vzniku onemocnění je částečně dáno genetickými faktory spojenými s fungováním imunitního systému a faktory prostředí, ale definitní příčina vzniku roztroušené sklerózy není známa (Ascherio & Munger, 2007; Gourraud et al., 2012). U většiny pacientů začíná onemocnění relaps-remitentní formou, která se po několika letech mění v progresivní formu (Lublin & Reingold, 1996). Současné protizánětlivé nebo imunosupresivní terapie jsou účinné pouze u pacientů s relaps-remitentní formou, ale ne u těch s progresivní formou onemocnění (Wiendl & Hohlfeld, 2009). Roztrošená skleróza má velké množství symptomů, které se s průběhem onemocnění progresivně zhoršují. Patří mezi ně únava, ovlivnění motoriky (např. slabost, problémy s koordinací pohybů a křeče), problémy s řečí a polykáním, ovlivnění zraku (např. rozmazané vidění, dvojité vidění a ztráta zraku), ovlivnění kognitivních funkcí (např. ztráta paměti a problémy s udržením pozornosti), deprese, úzkosti a narušená funkce močového měchýře a střev.

Relaps-remitentní forma roztroušené sklerózy je spojena s výskytem ložiskových plaků v bílé hmotě, kortikální demyelinizací a difúzním postižením bílé a šedé hmotě (Lucchinetti et al., 2011). Progresivní forma je spojena s aktivací mikroglií, axonálním poškozením a vznikem atrofie mozku (Mahad et al., 2015). Tyto změny jsou pozorovány i z počátku onemocnění, ale s vývojem onemocnění se jejich závažnost zhoršuje (Mahad et al., 2015). Odhad celkových ztrát axonů u pacientů s chronickou roztroušenou sklerózou dosahuje 60-70 % (Bjartmar et al., 2000; Mews et al., 1998).

Při roztroušené skleróze vznikají na mozku léze, v kterých probíhají imunopatologické procesy. Léze jsou infiltrovány B buňkami, T buňkami a makrofágy. $CD4^+$ T lymfocyty se nacházejí v okolí cév, jsou aktivovány pomocí antigenů nacházejících se na dendritických buňkách a mikrogliích a produkují cytokiny, čímž lákají do lézí makrofágy. $CD8^+$ T lymfocyty napadají neurony a oligodendrocyty (Hemmer et al., 2006). B lymfocyty produkují IgG protilátky, které se vážou na povrch neuronů a oligodendrocyty. Tyto protilátky pak mohou vázat komplement, a tím zahájit komplementovou kaskádu

nebo fagocytózu zprostředkovanou makrofágy (Hemmer et al., 2006). Aktivované makrofágy produkují zánětlivé a toxické molekuly (např. NO), které ničí neurony a oligodendrocyty (Hemmer et al., 2006).

Modelem pro studium roztroušené sklerózy je experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE), což je zánětlivé onemocnění mozku způsobené T buňkami s různými stupni axonálního poškození a demyelinizace (Zamvil & Steinman, 1990). B buňky a protilátky nejsou potřebné pro vznik EAE (Linington et al., 1988). Hlavním rozdílem od roztroušené sklerózy je to, že k rozvoji EAE je potřeba vnější imunizace MOG peptidem (Bruno Gran et al., 2007). Další důležitou odlišností EAE od roztroušené sklerózy jsou rozdíly v imunologii onemocnění – u EAE jsou za vznik zánětu zodpovědné Th1 buňky a za demyelinizaci B buňky produkující protilátky, zatímco u roztroušené sklerózy způsobují zánět Th17 buňky a demyelinizace je způsobena cytotoxickými T buňkami (Hart, 2019).

EAE je jediný dostupný model pro studium roztroušené sklerózy a není ten nejideálnější, což je dáno rozdíly v imunitní reakci (Farooqi et al., 2010). Velkou slabinou modelu je také to, že nereplikuje dobře onemocnění u lidí, jelikož je EAE jednorázové onemocnění, zatímco lidské onemocnění je chronické.

2.3 Diabetes I. typu

Diabetes prvního typu je autoimunitní onemocnění, během kterého jsou poškozovány β buňky pankreatu, které produkují insulin. Poškození způsobují $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty a makrofágy infiltrující Langerhansovy ostrůvky (Foulis et al., 1991). V roce 2019 byl celosvětový nárůst incidence 9 % a předpokládá se, že roční incidence se zvedne o 3 % (Saeedi et al., 2019). Tyto změny jsou až moc rychlé na to, aby byly způsobené změnami v genetickém materiálu, a proto je rychlý nárůst zřejmě dán vlivem životního prostředí (Saeedi et al., 2019). Mezi symptomy diabetes I. typu patří hlad, nevolnost, ztráta tělesné hmotnosti, vyčerpání a rozmazané vidění.

Patogeneze onemocnění je dána komplexem interakcí mezi pankreatickými β buňkami a buňkami vrozeného a adaptivního imunitního systému (Hull et al., 2017). Předpokládá se, že vývoj diabetes je zahájen prezentací β buněčných peptidů antigen prezentujícím buňkám (antigen presenting cell; APC). APC nesou tyto autoantigeny a migrují do pankreatických lymfatických uzlin. Zde reagují s autoreaktivními $CD4^+$ T lymfocyty, které aktivují autoreaktivní $CD8^+$ T lymfocyty (DiMeglio et al., 2018). Aktivní $CD8^+$ T lymfocyty se vracejí do ostrůvků a ničí β buňky. Poškození β buněk je dále podpořeno uvolňováním prozánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku z makrofágů, neutrofilů a NK (natural killer) buněk. Celý tento proces je zesílen poruchami regulačních T buněk (Treg), které nejsou schopné potlačit autoimunitu (DiMeglio et al., 2018).

Ke studiu diabetes I. typu se využívají non-obese diabetic (NOD) myši, především samičky, protože u nich začíná vývoj diabetes dříve než u samců (Anderson et al., 2005). Buňky vrozené imunity, konkrétně dendritické buňky, makrofágy a neutrofily, mohou infiltrovat slinivku NOD myší již ve věku 3 týdnů (Bouma et al., 2005; Diana et al., 2013; Jansen et al., 1994; Pearson et al., 2016). K infiltraci $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytů dochází od věku 4-6 týdnů a oba typy buněk jsou potřeba pro vývoj

onemocnění (Pearson et al., 2016; Serreze et al., 1994; Wicker et al., 1994). NOD myši vykazují úbytek hmotnosti, infiltraci Langerhansonových ostrůvků leukocyty a přítomnost glukózy v krvi, a proto se jedná o vhodný model ke studiu diabetes I. typu (Makino et al., 1980).

2.4 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida je chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, na jehož vzniku se podílí jak genetické tak enviromentální rizikové faktory a pro vznik onemocnění jich je potřeba větší množství (Smolen et al., 2018). Symptomy revmatoidní artritidy jsou bolest a otoky kloubů, ztuhlost kloubů především v ranních hodinách, omezení pohybu, vyčerpání a ztráta tělesné hmotnosti. Po delší době je onemocnění spojeno se systémovými poruchami, včetně kardiovaskulárních, plicních, kožních, kosterních a psychických (McInnes & Schett, 2011).

Během revmatoidní artritidy dochází k několika imunopatologickým dějům. Prvním z nich je produkce autoprotilátek, konkrétně revmatoidního faktoru a protilátek proti cyklickým citrulinovaným peptidům, které se v těle běžně vyskytují, a tyto autoprotilátky aktivují buňky imunitního systému, podporují zánět a poškození kloubní tkáně (McInnes & Schett, 2011). Dále pak dochází k aktivaci buněk vrozeného imunitního systému, konkrétně makrofágů a neutrofilů, produkujících prozánětlivé cytokiny TNF-α, IL-1 a IL-6, které dále podporují zánět a poškození tkáně v kloubech. Aktivovány jsou také buňky adaptivního imunitního systému. T lymfocyty produkují prozánětlivé cytokiny a aktivují další buňky imunitního systému. B lymfocyty produkují autoprotilátky a podporují tak zánět (McInnes & Schett, 2011). T a B buňky, které se dostanou do synoviální membrány, zvýší proliferaci synoviálních fibroblastů a ty začnou produkovat zvýšené množství cytokinů a chemokinů podporující zánět, poškození chrupavky a rozpad kosti. Jedním z těchto cytokinů je RANKL, který podporuje diferenciaci osteoklastů vedoucí k poničení kosti (McInnes & Schett, 2011).

Nejčastěji využívaným modelem pro studium patogenních mechanismů, vývoje a testování léčiv proti revmatoidní artritidě je kolagen-indukovaná artritida (collagen-induced arthritis; CIA). CIA je vyvolána u myší imunizací kolagenem typu II. (Brand et al., 2007). CIA se liší od revmatoidní artritidy tím, že u CIA není přítomen revmatoidní faktor, který se využívá jako marker pro diagnostiku revmatoidní artritidy. Společné znaky revmatoidní artritidy a CIA jsou synoviální hyperplázie, infiltrace mononukleárními buňkami a degradace chrupavky, a proto se jedná o vhodný model (Boissier et al., 1987; Holmdahl et al., 1986).

2.5 Alergické astma

Alergické astma je zánětlivé onemocnění plic charakteristické omezením průtoku vzduchu, nepřiměřenou imunitní odpovědí a zánětem dýchacích cest (Wills-Karp, 1999). Mezi hlavní symptomy onemocnění patří bolesti na hrudníku, kašel, potíže s dýcháním, zrychlené dýchaní, dušnost, sípavé dýchání a vyčerpanost (Lambrecht & Hammad, 2015).

Imunitní odpověď je spuštěna reakcí Th2 lymfocytů na alergen. Endotel je stimulován prostřednictvím Th2 cytokinu IL-13 k expresi VCAM-1 (vascular cell adhesion protein 1), a díky vazbě na VLA-4 (very late antigen-4) je umožněna migrace eozinofilů skrz endotel (Moser et al., 1992, 1993). Eosinofily jsou hlavním buněčným typem podílejícím se na patogenezi alergického astmatu. Uvolňují cytokiny a chemokiny, které přispívají k zánětu, sekreci hlenu a zúžení dýchacích cest (Wills-Karp, 1999). Jedinci trpící astmatem mají vyšší hodnoty IgE oproti zdravým jedincům. Na patogenezi se také podílejí mastocyty a basofily produkující zánětlivé molekuly (např. histamin a leukotrien), které způsobují kontrakce hladkého svalstva, produkci hlenu a zvyšují propustnost cév (Wills-Karp, 1999). Dalšími charakteristickými znaky je zvětšení tloušťky submukózy a zvýšení počtu pohárkových buněk (Beasley et al., 1989).

Pro studium astma se využívá model alergického astmatu indukovaný ovalbuminem (OVA). Imunitní systém reaguje na OVA jakožto na škodlivou látku, což aktivuje $CD4^+$ T lymfocyty a spouští produkci prozánětlivých cytokinů (Casaro et al., 2019). Myši ošetřené OVA vykazují klasické znaky alergického astmatu jako jsou vysoké hodnoty IgE, zvýšená produkce hlenu, zánět a nepřiměřenou odpověď dýchacích cest, a tak se jedná o vhodný model (Casaro et al., 2019; Kim et al., 2019). Alergický zánět může být kromě OVA také způsoben vystavením alergenu *Alternaria alternata* a extraktu z roztočů (Chauché et al., 2022). Oproti tomu je astma způsobeno velkou škálou faktorů, jako jsou například virové infekce, alergeny a znečištěné ovzduší (Lambrecht & Hammad, 2015).

Při studiu vlivu imunomodulačních molekul na alergické astma se využívají dva modely. Při preventivním modelu je imunomodulační molekula podána myši ještě před vystavením alergenu a spuštěním alergické reakce. Jedná se tedy o model vhodný ke studiu profylaktické léčby. Druhým modelem je „prechallenge“ model, kdy je nejprve provedena senzibilizace, poté je podána imunomodulační molekula a teprve pak je myši podán alergen. Hlavním rozdílem je tedy načasování podání molekuly vzhledem k vystavení alergenu.

Výše zmíněné zvířecí modely jsou vhodné pro studium lidských onemocnění, jelikož jsou téměř všechny symptomy totožné se symptomy u lidských onemocnění, a jedná se o jediné známé modely. Zároveň to ale nejsou nejideálnější modely, protože se často liší v imunologických procesech způsobující a doprovázející onemocnění.

3 Cystatiny

Cystatiny jsou reverzibilní, pevně se vázající inhibitory tvořící pevný komplex s cysteinovou proteázou, čímž blokují její aktivní centrum (Nicklin, Barrett, 1984). Cysteinové proteázy se nacházejí ve všech organismech a podílejí se na různých biologických procesech včetně katabolismu proteinů, zpracování antigenů a zánětu (Hartmann et al., 1997).

Cystatiny produkované hlísticemi mají velké množství specifických imunomodulačních funkcí v závislosti na konkrétním parazitovi a působí souběžně na různé imunitní mechanismy hostitele (Hartmann, Lucius, 2003). První popsaný cystatin parazitárního původu byl onchocystatin filárie *Onchocerca volvulus* (Lustigman et al., 1992). Dalším popsaným byl cystatin filárie *Acanthocheilonema viteae* (Hartmann et al., 1997). Tyto dva cystatiny ovlivňují makrofágy a indukují jejich protizánětlivé účinky (Hartmann et al., 1997; Hartmann, Lucius, 2003; Schönemeyer et al., 2001). Mezi další filárie produkující cystatiny patří například *Brugia malayi* a *Litomosoides sigmodontis* podporující tvorbu protizánětlivých cytokinů, například IL-10 (Manoury et al., 2001; Pfaff et al., 2002). Cystatiny jsou vytvářeny i gastrointestinálními parazity, například *Haemonchus contortus* a *Nippostrongylus brasiliensis*, které potlačují produkci prozánětlivých cytokinů a podporují produkci protizánětlivých cytokinů (Dainichi et al., 2001; Newlands et al., 2001).

V této kapitole se budu konkrétně zabývat cystatiny Av17 (cystatin produkovaný *Acanthocheilonema viteae*), BMCys (Brugia malayi cystatin), Al-CPI (Ascaris lumbricoides cystein protease inhibitor) a CsStefin-1 (cystatin produkovaný *Clonorchis sinensis*). Tyto molekuly mají vliv na alergický zánět dýchacích cest a DSS-indukovanou kolitidu. Dále se pak budu zabývat SjCystatinem (Schistosoma japonicum cystatin), který ovlivňuje vývoj CIA. Nejedná se o kompletní výčet všech cystatinů produkovaných helminty, pouze o výběr zkoumaný v kontextu autoimunitních onemocnění.

3.1 Av17

K experimentům týkajícím se alergického zánětu dýchacích cest použili v experimentu Schnoeller et al., 2008 dva modely – preventivní model, ve kterém byl rekombinantní Av17 (rAv17) podán během indukce alergické reakce, a „prechallenge“ model, ve kterém byl rAv17 podán po indukci alergické reakce. Během experimentů využili metodu bronchoalveolární laváže a množství buněk bylo zkoumáno ze získané bronchoalveolární tekutiny (bronchoalveolar lavage fluid; BALF). Cílem experimentů bylo zjistit, jakým způsobem dochází k inhibici astma, zda je IL-10 odpovědný za snížení patologie a které buňky IL-10 produkují.

Astmatické myši ošetřené rAv17 vykazovaly mnohem vyšší hodnoty IL-10 oproti kontrolním skupinám. Ke zjištění, zda je inhibice alergické odpovědi závislá na IL-10, použili anti-IL-10 receptor protilátky. Zablokováním IL-10 receptoru u astmatických myší s rAv17 byl kompletně obnoven počet buněk v BALF, který byl srovnatelný s počtem buněk u kontrolních skupin astmatických myší (Schnoeller et al., 2008). Z toho můžeme odvodit, že je IL-10 klíčovou molekulou pro imunomodulaci zprostředkovanou rAv17. Jelikož jsou makrofágy i Treg buňky zdrojem IL-10, Schnoeller et al., 2008

také zkoumali, která z těchto buněk je primárně zodpovědná za produkci IL-10 při ošetření rAv17, a využili k tomu selektivní odstranění těchto buněk. Po odstranění makrofágů produkce IL-10 výrazně klesla u astmatických myší ošetřených rAv17, zatímco u Treg buněk nebyl tento pokles pozorován. Je tedy zřejmé, že jsou makrofágy hlavním zdrojem IL-10 a podílejí se na imunomodulaci astmatu zprostředkované rAv17 (Schnoeller et al., 2008).

Použití rAv17 také vedlo k inhibici infiltrace eozinofilů do plic, které tím pádem neprodukovaly tolik molekul (například IL-4, IL-5 a IL-13) podílející se na poškození plic (Rothenberg, Hogan, 2006; Trivedi, Lloyd, 2007; Schnoeller et al., 2008). U obou modelů byla také snížena produkce Th2 cytokinu IL-4 (Schnoeller et al., 2008). Došlo rovněž k snížení IgE u preventivního modelu, zatímco u prechallenge modelu nebyla redukce IgE tak výrazná (Schnoeller et al., 2008).

Výsledky této studie tedy ukazují, že ošetření astmatických myší pomocí rAv17 během indukce alergické reakce nebo po ní působilo proti mechanismům odpovědným za alergické astma. rAv17 výrazně snížil nábor eozinofilů do plic, snížil produkci IgE a také IL-4. IL-10 je klíčovou molekulou v imunomodulaci zprostředkované rAv17 a zvýšení produkce IL-10 makrofágy je hlavním mechanismem imunomodulace astmatu prostřednictvím tohoto cystatinu (Schnoeller et al., 2008).

Schnoeller et al., 2008 také zkoumali efekty Av17 na DSS indukovanou kolitidu, protože chtěli zjistit, zda má Av17 účinek pouze na Th2 zprostředkovanou imunopatologii nebo i na jiné typy zánětů. Zjistili, že po podání Av17 byl index zánětu střeva výrazně snížen. Myši s kolitidou ošetřené Av17 vykazovaly snížené poškození epitelu a nižší úbytek pohárkových buněk ve srovnání s kontrolní skupinou kolitických myší. Av17 tedy potlačuje DSS indukovanou kolitidu. Schnoeller et al., 2008 navrhují, že zvýšená produkce IL-10 makrofágů se pravděpodobně podílí na regulaci imunitních reakcí u akutní DSS indukované kolitidy. Je důležité zmínit, že ve studii Schnoeller et al., 2008 nebylo, na rozdíl od astmatu, experimentům s DSS indukovanou kolitidou věnováno takové množství pozornosti a nebyly zkoumány konkrétní buňky, které Av17 ovlivňuje. Zato se věnovali počtu pohárkových buněk, které opomněli při zkoumání astmatu.

3.2 BMCys

Dalším cystatinem, jehož vliv na DSS indukovanou kolitidu byl zkoumán, je BMCys. Khatri et al., 2015 ve své studii použili rekombinantní BMCys (rBMCys), po jehož podání se neprojevil úbytek hmotnosti a nedošlo k výraznému zkrácení střeva ve srovnání s kontrolní skupinou kolitických myší. Výsledkem pozorování bylo též to, že pozitivní efekt rBMCys na onemocnění je závislý na množství použité dávky (Khatri et al., 2015). Zjistili rovněž, že rBMCys zajistil zachování strukturální celistvosti tlustého střeva a snížil tak závažnost histopatologického poškození. Při kolitidě je zvýšené množství cytokinů INF-γ, TNF-α, IL-5, IL-6, IL-17, a právě u těchto cytokinů došlo k výraznému snížení naměřeného v séru myší ošetřených rBMCys. Zároveň byla pozorována zvýšená exprese IL-10 u splenocytů (Khatri et al., 2015). V této studii se na rozdíl od Schnoeller et al., 2008 nezaměřovali na to, které konkrétní buňky IL-10 produkují. Závěrem této studie je, že léčba DSS indukované kolitidy

pomocí rBMCys zmírnila celkovou závažnost onemocnění, konkrétně menší úbytek hmotnosti, snížení edému sliznice a poškození tlustého střeva, snížení produkce Th1 a Th17 cytokinů spojených s kolitidou a zvýšení množství IL-10 (Khatri et al., 2015).

3.3 Al-CPI

Coronado et al., 2017 ve svém experimentu aplikovali rekombinantní Al-CPI (rAl-CPI) s cílem zjistit jeho efekt na DSS indukovanou kolitidu. Během pokusu došlo ke znatelnému zlepšení zdravotního stavu kolitických myší ošetřených rAl-CPI. V porovnání s kontrolní skupinou nemocných myší méně hubly, měly méně střevních potíží a méně krve ve stolici. Kromě toho léčba rAl-CPI vedla k menšímu zkrácení střev ve srovnání s kontrolní skupinou nemocných myší. Histologické rozbory střevní tkáně ukázaly snížení zánětu a zároveň významné obnovení střevní tkáně společně s obnovou epitelu a snížením buněčné infiltrace (Coronado et al., 2017). U kolitických myší ošetřených rAl-CPI byla zjištěna zvýšená exprese protizánětlivých cytokinů TGF-β a IL-10 a snížená exprese prozánětlivých cytokinů, nejvíce IL-6 a TNF-α, a také IL-12 a INF-γ. Výsledkem je, že rAl-CPI zmírnil střevní zánět vyvolaný DSS, především potlačením prozánětlivých cytokinů a podporou protizánětlivých cytokinů. Přesný mechanismus, který je základem těchto účinků stále není dopodrobna prozkoumán (Coronado et al., 2017).

3.4 CsStefin-1

Bylo prokázáno, že CsStefin-1 má také pozitivní vliv na léčbu DSS indukované kolitidy (Jang et al., 2011). Při použití rekombinantního CsStefinu-1 (rCsStefin) u myší s DSS indukovanou kolitidou nebyla ztráta hmotnosti tak výrazná jako u kontrolní skupiny, nedošlo ke zkrácení střeva, většina střevního epitelu zůstala neporušena a byla zvýšena produkce IL-10 makrofágy (Jang et al., 2011). V daném experimentu také naměřili sníženou produkci TNF-α, což je hlavní cytokin podílející se na patogenezi IBD a nejčastěji využívanou terapií jsou protilátky proti TNF-α (Fiorino et al., 2011; Jang et al., 2011). Výsledky studie od Jang et al., 2011 jsou podobné s výsledky předchozích studií a CsStefin-1 je také schopný potlačit DSS indukovanou kolitidu.

3.5 SjCystatin

Liu et al., 2016 se ve své studii zaměřili na to, jestli rekombinantní SjCystatin (rSjCystatin) dokáže zamezit destrukci chrupavky a zánětu kloubů, a zda má rozdílný účinek při preventivním a terapeutickém modelu léčby. Při preventivní dávce rSjCystatinu byly výskyt artritidy a klinické skóre značně sníženo. U preventivního modelu došlo k snížení infiltrace zánětlivými buňkami v kloubu, synoviální hyperplázie a destrukci kostí u myší s CIA oproti terapeutickému modelu (Liu et al., 2016). U preventivního modelu byl pozorován snížený počet splenocytů a lymfocytů ve slezině, zatímco u terapeutického modelu byly počty splenocytů a lymfocytů srovnatelné s kontrolní skupinou. U preventivní aplikace rSjCystatinu došlo ve slezině k zvýšení podílu Th2 buněk a k poklesu Th1 a Th17 buněk (Liu et al., 2016). S tím souvisí i ovlivnění produkce cytokinů směrem k protizánětlivému profilu. U preventivního modelu byla zvýšená produkce IL-4 a IL-10 a snížená produkce IFN-γ, TNF-α, IL-6 a

IL-17, jejichž zvýšená produkce je typická pro CIA (Liu et al., 2016). Výsledkem této studie je zjištění, že podání rSjCystatinu před zahájením CIA významně zmírnilo strukturální patologii kloubů u nemocných myší. Hlavním imunomodulačních mechanismem je potlačení Th1 a Th17 imunitní odpovědi a podpora Th2 imunitní odpovědi. I přesto, že výsledky této studie u preventivního modelu jsou pozitivní a dochází k potlačení onemocnění, u terapeutického modelu tomu tak není. Aplikace rSjCystatinu při již vyvinuté artritidě nesnižuje degradaci chrupavky, protože rSjCystatin neovlivnil diferenciaci T buněk, infiltraci zánětlivých buněk a synoviální hyperplázii (Liu et al., 2016). Pro praktické využití při léčbě artritidy by tedy bylo potřeba, aby samotné onemocnění bylo diagnostikováno ještě před vyvinutím.

Parazitárních cystatinů je velké množství a v této kapitole byl zmíněn pouze zlomek, který je relevantní pro zaměření této práce. Hlavním zjištěním je, že u všech výše zmíněných cytokinů se vyskytuje zvýšená produkce IL-10, který může inhibovat uvolňování prozánětlivých cytokinů a expresi MHC II. třídy (Neurath, 2014). rAv17 je schopen redukovat alergické onemocnění dýchacích cest jak v preventivním, tak terapeutickém modelu, z čehož můžeme usoudit, že je velmi vhodným kandidátem pro vývoj léčiva. Jak je vidět rAv17, rBMCys, rAl-CPI a rCsStefin mají podobné účinky na DSS-indukovanou kolitidu, s tím že zvýšení produkce IL-10 je pravděpodobně hlavním mechanismem imunomodulace těmito cystatiny, a můžeme říct, že se jedná o dobré kandidáty pro vývoj léčiva (Coronado et al., 2017; Jang et al., 2011; Khatri et al., 2015; Schnoeller et al., 2008; Ziegler et al., 2015). Výsledky těchto studií mají význam pro vývoj nových terapií pro zánětlivá onemocnění jako je astma a kolitida. Oproti tomu rSjCystatin byl schopen potlačit CIA pouze u preventivního modelu, a tím pádem je důležité se zamyslet, jestli se jedná o vhodného kandidáta pro vývoj léčiva a do jaké míry by se musela zlepšit diagnostika onemocnění. Jak je již výše zmíněno, mezi další cystatiny, které ovlivňují fungování makrofágů patří onchocystatin a cystatin filárie *Acanthocheilonema viteae*, a je možné, že by mohly fungovat podobně jako Av17 a CsStefin. Je to ukázkou toho, jak moc velký potenciál tyto imunomodulační molekuly mají a jak málo pozornosti se jim věnuje ve výzkumu.

4 ES-62

ES-62 je jedna z nejlépe definovaných imunomodulačních molekul hlístic. Je produkován larvami L4 a dospělci filárie *Acanthocheilonema viteae*. Homology můžeme nalézt u dalších filárií parazitujících u lidí, například *Brugia malayi* a *Onchocerca volvulus* (Harnett et al., 2003). Jedná se o tetramerický glykoprotein složený z monomerů o velikosti 62 kDa (odtud 62 v názvu) (Harnett et al., 2003). ES-62 obsahuje fosforylcholin (phosphorylcholine; PC) patřící mezi molekulární vzory asociované s patogeny (pathogen-associated molecular pattern; PAMP), které umožňují rozpoznání parazita hostitelem a zároveň spouští imunitní odpověď hostitele (Harnett et al., 2010).

Buňkami, které ES-62 ovlivňuje, jsou B a T lymfocyty. V případě B lymfocytů indukuje proteolýzu PKC -α, -β a -ι/ λ, které patří mezi enzymy nezbytné pro proliferaci B buněk a v důsledku toho není B buněčná odpověď adekvátní (Deehan et al., 1997, 1998). Omezená proliferace způsobená ES-62 byla popsána i u T lymfocytů, kde dochází k narušení vazby T buněčného receptoru na fosfolipázu D, PKC a PI 3-K (Harnett et al., 1998). U T lymfocytů kromě nižší proliferaci pozorovali také menší počet buněk migrujících do B buněčných folikulů v lymfatických uzlinách (Marshall et al., 2005). Podle těchto výsledků se předpokládalo, že ES-62 ovlivňuje funkci B a T lymfocytů kvůli obratu imunitní odpovědi k Th2 fenotypu, což bylo vyvráceno studií Marshall et al., 2008. Th2 buněčná polarizace je závislá na vlivu ES-62 na APC jako jsou makrofágy a dendritické buňky (Goodridge et al., 2005; Whelan et al., 2000).

Th2 buněčná polarizace pomocí ES-62 je dána modulací aktivace Toll-like receptorů (TLR) a MyD88-dependentní dráhy (Goodridge et al., 2005; Whelan et al., 2000). Za normálních podmínek TLR rozpoznávají PAMPs a indukují signalizační kaskádu vedoucí k aktivaci MAP kináz a transkripčního faktoru NF-κB a to následně vede k produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-12 a TNF-α (Kawai & Akira, 2010). ES-62 je rozpoznán TLR4 a po vazbě na receptor dochází k snížení exprese MyD88, v důsledku toho nedojde k translokaci NF-κB do jádra a produkce prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-12 a TNF-α je snížena (Goodridge et al., 2005; Pineda, Lumb, et al., 2014). Tímto způsobem ES-62 moduluje antigen prezentující buňky a navozuje Th2 imunitní odpověď.

Corbet et al., 2021 se ve své studii zabývali potlačením CIA pomocí ES-62 a tím, jaké mechanismy se na tom podílejí. Ochrana před CIA je spojená se schopností ES-62 změnit patogenní populace synoviálních fibroblastů, které ničí kosti, na populaci buněk s neškodným fenotypem, a ovlivnit autoimunitní reakce vyvolané IL-17 a IL-1β, které by jinak způsobovaly patogenitu v kloubu (Corbet et al., 2021; Nakae et al., 2003; Sharma et al., 2016). Součástí procesu ochrany je výše zmíněné rozpoznání ES-62 pomocí TLR4 vedoucí k downregulaci MyD88 signalizace, potlačení T buněčné produkce IL-17 a obnově množství B regulačních buněk (Doonan et al., 2019; Pineda et al., 2012; Pineda, Rodgers, et al., 2014; Rodgers et al., 2014).

ES-62 také zabraňuje osteoklastogenezi, která je projevem CIA a revmatoidní artritidy (Doonan et al., 2018). ES-62 ovlivňuje populace progenitorových buněk, zabraňuje fúzi a zrání osteoklastů, a to i v pozdějším stádiu onemocnění, a tak zabraňuje odbourávání kostní hmoty (Doonan et al., 2018).

Imunomodulační schopnost ES-62 je do určité míry závislá na PC. To bylo doloženo studiemi, ve kterých byl pozorován pouze PC navázaný na hovězí sérový albumin (bovine serum albumin; BSA), což je neutrální bílkovina, nebo ovalbumin (OVA), což je alergen (Harnett et al., 2008; W. Harnett & Harnett, 1999). Výsledkem bylo, že PC navázaný na BSA nebo OVA napodoboval funkční vlastnosti ES-62, například ovlivnění funkce B buněk a zrání antigen prezentujících buněk *in vitro* (Harnett et al., 2008; W. Harnett & Harnett, 1999). Ke zkoumání, zda samotné PC je schopné inhibovat zánět způsobený CIA, byly myši ošetřeny ES-62, PC navázaným na OVA (PC-OVA) a rES-62, což je

rekombinantní ES-62 bez PC (Harnett et al., 2008). Při použití rES-62, ES-62 nebo OVA-PC nebyl ovlivněn průměrný počet populací buněk lymfatických uzlin a buněk sleziny. Splenocyty méně reagovaly na stimulaci skrz BCR receptor u myší ošetřených rES-62 nebo ES-62. Harnett et al., 2008 ve svých experimentech také zkusili ošetřit CIA myši OVA-PC teprve až v moment, kdy byly pozorovány klinické příznaky, a zjistili, že došlo k omezení vývoje zánětu (Harnett et al., 2008). Při použití OVA-PC byla tedy závažnost zánětu snížena, což potvrzuje fakt, že OVA-PC je schopný mimikovat protizánětlivé funkce ES-62 u CIA a lidských vzorků revmatoidní artritidy a že se jedná o velmi klíčovou složku ES-62. Zároveň ale není ES-62 plně nahraditelná PC, protože ne všechny efekty ES-62 jsou závislé na PC, například signalizace skrz BCR (Harnett et al., 2008).

Podle PC z ES-62 byly vytvořené malé molekulové analogy (small molecule analoge, SMA). Konkrétně SMA 11a a SMA 12b byly schopné mimikovat ochranu kostí a protizánětlivé efekty ES-62 a úspěšně bránily vzniku a vývoji poškození kloubů u CIA (Al-Riyami et al., 2013; Lumb et al., 2017; Rzepecka et al., 2015). SMA by tedy mohly být vhodnými kandidáty místo ES-62. Jejich výhodou je malá velikost, zlepšené cílení na konkrétní buňky imunitního systému a levnější výroba (Lumb et al., 2017).

ES-62 je molekula, která ovlivňuje proliferaci B a T buněk, antigen prezentující buňky a vyvolává Th2 imunitní odpověď. Je však třeba zdůraznit, že imunomodulační schopnosti ES-62 jsou závislé na navázaném PC. Kromě toho, ES-62 má také vliv na autoimunitní reakce vyvolané IL-17. Tento vliv je velmi důležitý, protože ES-62 je schopný přeprogramovat synoviální fibroblasty a omezit osteoklastogenezi, což vede k potlačení závažnosti artritidy.

5 FhHDM-1

Fasciola hepatica helminth defense molecule 1 (FhHDM-1) je peptid, který je hojně produkován a sekretován zvířecím a lidským parazitem *Fasciola hepatica* během vývoje v savčím hostiteli (Robinson et al., 2011; A. Tanaka et al., 2018). Migrace helminta skrz játra hostitele vede k poškození tkání a molekuly sekretované parazitem mohou vyvolat buněčnou smrt hepatocytů (Andrews, 1999; Bąska et al., 2013; Rojas-Caraballo et al., 2015; Wesołowska et al., 2012). Mrtvé buňky hostitele spouští zánětlivou imunitní odpověď, která může poškodit parazita. *F. hepatica* proto produkuje FhHDM-1, která je klíčová pro zastavení prozánětlivých imunitních reakcí hostitele s migrujícími parazity, aby zánět nepoškodil parazita (Alvarado et al., 2017). Tato teorie je podpořena i tím, že FhHDM-1 je produkována především jaterním stádiem parazita (Robinson et al., 2012).

Mezi hlavní imunomodulační funkce FhHDM-1 patří inhibice lysozomálního okyselení a inhibice sestavení NLRP3 inflamazomu, což následně ovlivňuje fungování makrofágů a reguluje jejich roli v prozánětlivé odpovědi (Alvarado et al., 2015; Lund et al., 2016; Robinson et al., 2012; A. Tanaka et al., 2018).

FhHDM-1 se váže na makrofágy a je internalizována do endolysozomů (Robinson et al., 2012). V endolysozomech je rozštěpena lysozomálním katepsinem L a C-terminální fragment FhHDM-1 inhibuje funkci v-ATPázy (Alvarado et al., 2015; Robinson et al., 2012) což zabrání okyselení endolysozomu a nedojde k aktivaci lysozomálního katepsinu B (Alvarado et al., 2017). Po destabilizaci endolysozomální membrány je inaktivní katepsin B uvolněn do cytoplasmy, není schopný aktivovat NLRP3 inflamazom, a tak je snížena sekrece IL-1β makrofágy (Alvarado et al., 2017). Deriváty FhHDM-1, které nemění lyzozomální pH, neinhibují sekreci IL-1β , takže vliv FhHDM-1 na produkci IL-1β je nepřímý přes kontrolu pH v lysozomu. V nepřítomnosti IL-1β nemůže dojít k vytvoření Th1 prozánětlivé odpovědi, protože je IL-1β nezbytný pro diferenciaci Th1 buněk, a tím pádem převažuje Th2 imunitní odpověď (Alvarado et al., 2017). Inhibice funkce makrofágů je dostatečná pro ochranu myší před poruchami imunity způsobenými auto-reaktivními T-lymfocyty, viz dále (Lund et al., 2016).

Vzhledem k tomu, že FhHDM-1 ovlivňuje funkci makrofágů, je logické, že se jeho terapeutický potenciál testoval v modelech diabetes I. typu, EAE a artritidy, pro jejichž zahájení a progres jsou makrofágy důležité (Calderon et al., 2008; Dungan et al., 2014).

FhHDM-1 zabraňuje vývoji diabetes I. typu. Důkazem toho jsou experimenty, při kterých byly samičky NOD myší ošetřeny FhHDM-1 ve věku 4 týdnů (Lund et al., 2016). Polovina myší ošetřených FhHDM-1 byla chráněna před rozvojem diabetes I. typu a zůstaly normoglykemické do věku 30 týdnů (konec experimentu). Při vyšetření řezů slinivky z 13 týdenních myší ošetřených FhHDM-1 se ukázalo snížení zánětu Langerhansových ostrůvků ve srovnání s řezy z kontrolní skupiny myší bez FhHDM-1 (Lund et al., 2016).

V případě EAE má FhHDM-1 podobné protektivní účinky jako u NOD myší. Podání proteinu myším zmírnilo klinické symptomy EAE včetně snížení počtů relapsů u jednotlivých myší. Sedmdesát dní po indukci EAE a šedesát dní od poslední injekce FhHDM-1 více než 50 % ošetřených myší prožilo pouze jeden záchvat a 20 % myší zůstalo zcela bez příznaků onemocnění (Lund et al., 2016). U EAE úbytek periferních makrofágů nebo snížení produkce TNF myeloidními buňkami nestačily k ovlivnění vývoje autoantigenně specifických Th1 buněk, ale zabránily infiltraci lymfocytů do parenchymu CNS, a tím pádem FhHDM-1 inhiboval demyelinizaci a onemocnění (Kruglov et al., 2011; Lund et al., 2016). Podobně jako u diabetes můžeme říct, že za zmírnění vývoje EAE je zodpovědná snížená prozánětlivá aktivita makrofágů způsobená FhHDM-1.

Lund et al., 2016 ve svém experiment zkoumali, zda FhHDM-1 u modelu EAE snižuje specifickou T buněčnou odpověď. V experimentu odebrali lymfatické uzliny ze dvou skupin EAE myší, jedna ošetřená FhHDM-1 a druhá ošetřená PBS, v moment, kdy se u skupiny ošetřené PBS projevily první příznaky onemocnění a změřili PLP specifickou T buněčnou odpověď. U EAE myší s PBS oproti FhHDM-1 nebyla pozorována žádná změna v množství prozánětlivých cytokinů (IFNγ, TNF a IL-17) a nedošlo ke zvýšení množství IL-4, IL-5 a IL-10, což potvrzuje, že ochrana před onemocněním zprostředkovaná FhHDM-1 není dána inhibicí autoantigen-specifických zánětlivých T buněk nebo

přechodem k Th2 imunitní odpovědi, ale souvisí se snížením prozánětlivého působení makrofágů (Lund et al., 2016). Výsledkem tedy je, že léčba FhHDM-1 u modelu EAE nesnižuje specifickou T buněčnou odpověď v reakci na autoantigen PLP (myelinový proteolipidový protein).

Při zkoumání, zda FhHDM-1 ovlivňuje vývoj artritidy, využil Khan et al., 2020 syntetický peptid odpovídající 34aa C-terminální doméně FhHDM-1 (C-FhHDM-1). C-FhHDM-1 inhibuje diferenciaci osteoklastů z makrofágům, která je závislá na signalizaci přes RANKL/RANKL (Khan et al., 2020). Ta reguluje tvorbu, aktivaci a přežití osteoklastů při modelaci a remodelaci kostní tkáně za normálních podmínek a při patologických stavech je spojena se zvýšením kostního obratu (Boyce & Xing, 2008). Diferenciace osteoklastů je spjata se zvýšeným lysozomálním okyselením. C-FhHDM-1 inhibuje lyzozomální okyselení, a to pravděpodobně následně potlačuje resorpční schopnosti osteoklastů (Khan et al., 2020). V neposlední řadě C-FhHDM-1 inhibuje produkci RANKL osteoblasty, což je způsobeno potlačením produkce IL-1β (Khan et al., 2020). C-FhHDM-1 zároveň inhibuje CIA indukovanou produkci TNF, IL-17 a IFN-γ v kloubech, ale ne v séru. Díky svému protizánětlivému působení tak C-FhHDM-1 zlepšuje klinické skóre u myšího modelu artritidy indukované CIA, chrání před poničením chrupavky, zachovává kostní hmotu a stavbu kloubů (Khan et al., 2020).

Schopnost FhHDM-1 tlumit prozánětlivou Th1 odpověď přispívá ke schopnosti helminta zabránit vývoji autoimunitních onemocnění, jako je diabetes I. typu, roztroušená skleróza a revmatoidní artritida (Alvarado et al., 2017). FhHDM-1 chrání celistvost hostitelské tkáně a zabraňuje rozvoji dysregulačních prozánětlivých reakcí, které iniciují autoimunitní onemocnění, a díky tomu ho můžeme považovat za potencionální nové léčivo odvozené od parazitů využitelné pro lidská autoimunitní onemocnění (Lund et al., 2016). Je ale důležité brát na vědomí, v jaký moment byl FhHDM-1 v experimentech podán, abychom mohli rozlišit, zda je vhodný k léčbě daného onemocnění nebo pouze jako prevence. Příkladem je experiment s EAE myšmi, u kterých byla nemoc indukována 10 dní před prvním podáním FhHDM-1, ale první symptomy EAE byly pozorovatelné cca po 14 dnech od indukce. Nabízí se tedy otázka, zda by byla FhHDM-1 schopná zmírnit onemocnění při podání až po projevení symptomů. Pokud ne, muselo by prvotně dojít ke zlepšení diagnostiky nemoci, aby mohla být identifikovatelná před prvními příznaky, a rovnou se mohlo začít s léčbou.

6 Hp-TGM

Heligmosomoides polygyrus TGF-β mimic (Hp-TGM) je součástí exkrečně/sekrečních produktů *Heligmosomoides polygyrus* (H. polygyrus excretory/secretory products; HES) (Johnston et al., 2017). *H. polygyrus* žije v trávícím traktu hlodavců (Johnston et al., 2017). Parazit má největší produkci Hp-TGM, když je v dospělém stádiu a nachází se ve střevech hostitele (White et al., 2021). *H. polygyrus* je schopen u svého hostitele zvětšit populaci Treg buněk tím, že sekretuje produkty aktivující TGF-β signalizaci (Johnston et al., 2017). Hp-TGM je tvořen pěti doménami, které se vážou na TβRI a TβRII receptory, s tím že se Hp-TGM váže na podobné strukturní motivy na daných receptorech jako

transforming growth factor-beta (TGF-β) (Mukundan et al., 2022). Produkci Hp-TGM můžeme tedy zařadit mezi molekulární mimikry, což naznačuje konvergentní evoluci imunosupresivních mediátorů parazita a hostitele. Zajímavé je, že Hp-TGM není homologní se savčím TGF-β nebo s jinými zástupci TGF-β rodiny, ale patří do nadrodiny „complement control“ proteinů (Johnston et al., 2017).

Savčí TGF-β ovlivňuje mnohé nepostradatelné biologické funkce v růstu, vývoji a regulaci imunitního systému. Imunitní homeostázi a zánět kontroluje TGF-β prostřednictvím regulace přeměny naivních $CD4^+$ T buněk na $Foxp3^+$ Treg buňky (Sanjabi et al., 2017). Dysregulace TGF-β dráhy se podílí na patogenezi několika lidských onemocnění včetně například zánětlivých onemocnění střev (Ihara et al., 2017).

Mezi $Foxp3^+$ Treg buňkami indukovanými TGF-β a Hp-TGM jsou určité rozdíly. $Foxp3^+$ Treg buňky indukované Hp-TGM měly mnohem větší stabilitu v přítomnosti zánětlivých cytokinů *in vitro* oproti Treg buňkám indukovanými TGF-β (Cook et al., 2021). Dalším rozdílem je, že podle studie Cook et al., 2021 je potřeba pětkrát větší koncentrace Hp-TGM k indukci $Foxp3^+$ Treg buněk než u indukce pomocí TGF-β, což ale není v souladu s výsledky studie Coakley et al., 2017 na myších T buňkách. Oproti TGF-β, byl Hp-TGM schopný indukovat silnější expresi CTLA-4, což je důležitý receptor pro fungování Treg buněk (Cook et al., 2021; Yamaguchi et al., 2013). Hp-TGM indukované $Foxp3^+$ Treg buňky měly mnohem výraznější supresivní účinek oproti buňkám indukovaným TGF-β (Cook et al., 2021).

Hp-TGM indukuje kanonickou signalizaci skrz TGF-β dráhu, indukuje epigenetické změny na Foxp3 lokusu $CD4^+$ T buněk a indukuje $Foxp3^+$ Treg buňky *in vitro* a *in vivo*, které jsou schopné potlačit T buněčnou odpověď (Cook et al., 2021; Johnston et al., 2017; White et al., 2021).

Ve studii Cook et al., 2021 indukovali $Foxp3^+$ Treg buňky pomocí Hp-TGM jak z naivních, tak paměťových lidských $CD4^+$ T buněk, k čemuž dochází prostřednictvím TβRI a SMAD2/3 signalizace. Při indukci z naivních buněk měly $Foxp3^+$ Treg buňky vyšší expresi CD25 a CTLA-4, nesekretovaly efektorové cytokiny a byly schopné potlačit T buněčnou proliferaci. Při indukci $Foxp3^+$ Treg buněk z paměťových Th1 buněk pomocí Hp-TGM, měly buňky sníženou sekreci IFN-γ (Cook et al., 2021).

Hp-TGM byl využit ve studiích spojených s EAE, DSS indukovanou kolitidou a myším modelem alergického astma (Chauché et al., 2022; Smyth et al., 2021; White et al., 2020).

Ve studii White et al., 2020 zkoumali, zda jsou rozdíly mezi infekcí *H. polygyrus* nebo použitím HES a Hp-TGM na vývoj a průběh EAE. Zároveň je také zajímalo, zda je potlačení onemocnění dáno především vyvoláním Th2 imunitní odpovědi nebo indukcí Treg buněk. Při infekci živým parazitem ve stejný moment, kdy proběhla indukce EAE, došlo k vyvolání Th2 imunitní odpovědi, produkci IL-4, potlačení IL-17A, mírnému nárůstu Treg buněk, zpoždění nástupu a snížení závažnosti EAE (White et al., 2020). Pokud proběhla infekce parazitem 4 týdny po indukci EAE, tedy v době klinicky manifestní patologie, nebyly myši výrazně chráněny před onemocněním. Při použití HES a Hp-TGM došlo pouze

k mírnému zpoždění nástupu onemocnění a mírné redukci IL-17A (White et al., 2020). Při podání HES a Hp-TGM při indukci onemocnění nebo v průběhu onemocnění nebyla pozorována žádná změna v počtu Treg buněk (White et al., 2020). Výsledkem tedy je, že použití HES a Hp-TGM hraje pouze malou roli v potlačení EAE, zatímco infekce *H. polygyrus,* způsobená zároveň v moment indukce EAE, onemocnění a jeho závažnost potlačila. Tento výsledek může být ovlivněn nízkou dávkou HES a Hp-TGM, kterou ve studii podávali myším (2µg/myš/den) oproti jiný studiím s jinými parazitickými molekulami, ve kterých byla velikost dávky 250 µg/myš ob den (Kuijk et al., 2012; Peón et al., 2017; Quinn et al., 2019; White et al., 2020).

Infekce *H. polygyrus* tedy chrání myši před rozvojem EAE prostřednictvím vyvolání Th2 imunitní odpovědi spíše než pomocí indukce Treg buněk, a pro potlačení EAE je klíčové správné načasování infekce (White et al., 2020). Důležité také je, že infekce potlačuje produkci IL-17A, který snižuje regulaci proteinů těsných spojů, což vede ke zvýšení permeability hematoencefalitické bariéry a umožňuje infiltraci imunitních buněk do CNS (Setiadi et al., 2019). Předpokládá se také, že IL-17A rekrutuje aktivní neutrofily a monocyty do CNS, což usnadňuje další poškození a demyelinizaci, které nadále zhoršují příznaky EAE (McGinley et al., 2020). Výsledek studie White et al., 2020 je tedy poměrně překvapivý, protože Hp-TGM a HES nedokázali zajistit stejnou ochranu před onemocněním jako tomu bylo u infekce živým parazitem.

Ke studii efektů na DSS indukovanou kolitidu provedli Smyth et al., 2021 sérii experimentů, při kterých využili jedlou řasu *Chlamydomonas reinhardtii* k produkci Hp-TGM ve formě, která mohla být konzumována. Hp-TGM z řas vyžaduje delší dobu kultivace nebo vyšší koncentraci pro stejný účinek jako Hp-TGM produkovaný *H. polygyrus* (Smyth et al., 2021). Při perorálním podání Hp-TGM z řas myším došlo k zmenšení ztráty tělesné hmotnosti a zmírnění symptomů u myšího modelu DSS indukované kolitidy. U kontrolní skupiny myší, kterým nebylo podáno Hp-TGM, byly ztráty tělesné hmotnosti mnohem výraznější. Po ukončení podávání DSS nebyly myši, které nedostávaly Hp-TGM, schopné plně obnovit ubytek hmotnosti, zatímco u myší s Hp-TGM došlo k navrácení do původního stavu (Smyth et al., 2021).

DSS způsobuje poškození slizniční bariéry, což může vést k infekci komenzálními bakteriemi, které stimulují imunitní systém k produkci a sekreci zánětlivých cytokinů (Smyth et al., 2021). Jedním z důsledků střevního zánětu je zvětšení mezenteriálních lymfatických uzlin, které bylo pozorováno u myší ošetřených DSS. Myši, které byly ošetřeny Hp-TGM z řas, vykazovaly větší počet $Foxp3^{+}$ buněk v Peyerových placích, v mezenteriálních lymfatických uzlinách a tenkém a tlustém střevě, což ovlivnilo velikost uzlin, které se nezvětšily (Smyth et al., 2021).

Z těchto výsledků můžeme říct, že řasou produkovaný Hp-TGM efektivně chránil myši před střevními potížemi a ztrátou hmotnosti. Mezi výhody tohoto přístupu (tj. perorálního podání Hp-TGM produkovaného v řasách) patří přímé působení na zanícené sliznici a ekonomická výhodnost v porovnání s anti-TNF terapií, která je často využívána při léčbě IBD (Smyth et al., 2021).

Chauché et al., 2022 ve svých experimentech zkoumali, zda je Hp-TGM schopný zmírnit alergický zánět dýchacích cest způsobený vystavením myší alergenu *Alternaria alternata,* extraktu z roztočů a OVA. U modelu s *A. alternata* došlo k silnému potlačení eozinofilie po 24 hodinách od vystavení alergenu. Podobný efekt byl pozorován u modelu s extraktem z roztočů a OVA. U testovaných populací neměl Hp-TGM vliv na počet Th2 buněk a měl pouze mírný efekt na $Foxp3^+$ T buňky. Výsledkem studie Chauché et al., 2022 tedy je, že podání Hp-TGM u modelů alergického astmatu potlačilo eozinofilii dýchacích cest, aniž by vyvolalo silnou reakci Treg buněk. Hp-TGM má tedy velký terapeutický potenciál v léčbě lidských alergických onemocnění dýchacích cest, protože cílení na eozinofily v plících se již v rámci jiných klinických studií ukázalo jako efektivní při potlačování astmatu (De Groot et al., 2015; Jacobsen et al., 2008; Lambrecht & Hammad, 2015; Landolina & Levi-Schaffer, 2014; Rothenberg & Hogan, 2006) . I přesto je potřeba mechanismus a klinické využití prozkoumat více do hloubky.

Tato kapitola popisuje Hp-TGM, který má biologické a funkční vlastnosti jako TGF-β, mezi které patří vazba na TGF-β receptory (TβRI a TβRII) a indukce $Foxp3^+$ Treg buněk. Výsledky studií týkajících se onemocnění ukazují, že Hp-TGM má velký terapeutický potenciál v léčbě ulcerózní kolitidy a alergického astmatu, ale ne roztroušené sklerózy. Pro terapeutické využití, je potřeba prozkoumat více do detailu vazbu domén Hp-TGM na TGF-β receptory a také zda se Hp-TGM neváže i na jiné receptory, což by mohlo ovlivnit efekt při léčbě onemocnění. Určitě stojí také za zmínku, že H. *polygyrus* je parazit hlodavců, a tím pádem jsou jeho efekty přizpůsobeny na jejich imunitní systém. Je tedy potřeba brát v potaz, že efekty na lidská onemocnění mohou být odlišná od experimentálních myších modelů a jejich výsledků, které byly v této kapitole zmíněny.

7 HpARI a HpBARI

Součástí HES produkovaných *Heligmosomoides polygyrus* jsou, kromě Hp-TGM, další dvě imunomodulační molekuly. Jedná se o „heligmosomoides polygyrus alarmin release inhibitor“ (HpARI) a „heligmosomoides polygyrus binds alarmin receptor and inhibits“ (HpBARI) (Osbourn et al., 2017; Vacca et al., 2020).

HpARI snižuje zánět a podporuje přežití parazita tím, že dvěma způsoby potlačuje imunitní reakci v hostiteli. Je schopný se dostat do nekrotických buněk, protože mají poškozenou buněčnou membránu. Zde se váže na jadernou DNA a vyvazuje IL-33, čímž zabraňuje jeho uvolňování z poškozených buněk (Osbourn et al., 2017). Druhým způsobem je, že se HpARI váže na extracelulární IL-33 a tak zabraňuje vazbě na ST2 receptor na přirozených lymfoidních buňkách typu II (innate lymphoid cells type 2; ILC2) (Osbourn et al., 2017). Při astmatu je důležitá právě vazba IL-33 na ST2 receptor na ILC2, která vede k produkci IL-5 a IL-13, eosinofilii a zvýšené sekreci hlenu v dýchací soustavě (Bartemes et al., 2012). Tím, že HpARI potlačil Th2 imunitní odpověď indukovanou IL-33,

zabránil tak rozvoji alergického zánětu dýchacích cest. U lidských buněk nebyla vazba HpARI na IL-33 tak silná, jako u myších buněk, ale stále byla dostatečná k zabránění rozvoje astmatu (Osbourn et al., 2017).

Vacca et al., 2020 ve své studii popsali HpBARI, který se silně váže na ST2 receptor, blokuje ho a inhibuje tak imunitní odpověď způsobenou IL-33, jelikož se IL-33 na ST2 receptor nemůže navázat (Vacca et al., 2020). Při podání samotného HpBARI nebo v kombinaci s *Alternaria alternata* došlo k silnému snížení signalizace pomocí ST2 receptoru s tím, že HpBARI potlačil rozpoznání ST2 receptoru, ale ne jeho transkripci (Vacca et al., 2020). Podání HpBARI zároveň s *A. alternata* u OVA indukovaných myší vedlo k potlačení aktivace ILC2 a omezení eozinofilie v plicích (Vacca et al., 2020). Můžeme tedy říct, že je HpBARI schopen potlačit Th2 imunitní odpověď vyvolanou alergenem *A. alternata.*

Výsledným efektem HpARI a HpBARI je potlačení Th2 imunitní odpovědi vyvolané IL-33, potlačení eozinofilie a sekrece hlenu v dýchací soustavě u alergického zánětu. Každá molekula ale funguje odlišným způsobem. HpARI působí přímo na IL-33, ale vyvazuje ho jen v nekrotických buňkách a zabraňuje jeho uvolňování z buňky ven a zároveň se přímo váže na extracelulární IL-33 a zamezuje tak vazbě na ST2 receptor na ILC2 (Osbourn et al., 2017). Oproti tomu HpBARI se váže na ST2 receptor i nepoškozených buněk potlačuje jeho rozpoznání, čímž nemůže dojít k navázání IL-33 na něj. Hlavním rozdílem tedy je, že HpBARI funguje i u nepoškozených buněk, zatímco HpArI funguje až v nekrotických buňkách. Výhodou cílení na ST2 receptor je, že může být blokován ještě před poškozením buněk a uvolněním IL-33 (Vacca et al., 2020). Teoreticky by tedy HpBARI měl být účinnější při léčbě astmatu, ale je otázkou dalšího výzkumu, jestli tomu tak opravdu je.

8 NIF

Neutrophil inhibitory factor (NIF) je glykoprotein produkovaný hlísticí *Ancylostoma caninum* a váže se na CD11b/CD18 (Moyle et al., 1994; Muchowski et al., 1994). Integrin CD11b/CD18 je adhezivní receptor nacházející se na povrchu neutrofilů, eosinofilů, bazofilů, NK buněk, monocytů a makrofágů a hraje důležitou roli při adhezi, migraci a fagocytóze, a podílí se na zvýšené reaktivitě dýchacích cest u alergického astmatu (Albelda et al., 1994; Muchowski et al., 1994; Schnyder-Candrian et al., 2012; T. Tanaka, 2016). Na těchto funkcích se podílí primárně A-doména, na kterou se NIF váže s vysokou specifitou a afinitou (Schnyder-Candrian et al., 2012).

Schnyder-Candrian et al., 2012 ve své studii použili kontrolní skupinu myší ošetřených fyziologickým roztokem, myši ošetřené rekombinantním NIF (rNIF), astmatické myši a astmatické myši ošetřené rNIF za účelem zkoumat migraci eozinofilů a ovlivnění pohárkových buněk. Astmatické myši, kterým bylo podáno rNIF, měly méně eozinofilů v plicích než kontrolní astmatické myši. U vzorků byla zároveň zkoumána produkce IL-4 a IL-5, jejichž zvýšené množství bylo pozorováno u astmatických myší. Po podání rNIF byla produkce IL-4 a IL-5 výrazně redukována, což je pravděpodobně ovlivněno

menším počtem eozinofilů. rNIF silně redukoval hyperplázii pohárkových buněk, s tím související nadměrnou sekreci mukusu, a také infiltraci peribronchiálními eozinofily (Schnyder-Candrian et al., 2012). Důležité je, že u neastmatických myší ošetřených pouze rNIF nedošlo ke změně v počtu eozinofilů, změně množství daných interleukinů a nebyla pozorována hyperplázie pohárkových buněk, což znamená, že samotný rNIF nezpůsobuje žádné patologie (Schnyder-Candrian et al., 2012).

Schnyder-Candrian et al., 2012 v té stejné studii také zkoumali, zda rNIF ovlivňuje migraci eozinofilů a neutrofilů skrz endotel *in vitro*. Proces migrace eozinofilů je závislý na CD11b/CD18 a podporován IL-4 a IL-14. Omezení migrace eozinofilů je způsobeno inhibicí sekrece IL-14 pomocí rNIF a také vazbou rNIF na A-doménu CD11b. Inhibice migrace eozinofilů je závislá na dávce rNIF, čím větší množství rNIF bylo podáno, tím větší inhibice byla. Oproti tomu inhibice transendoteliální migrace u neutrofilů nebyla ovlivněna, ani při vyšších dávkách rNIF. rNIF tedy inhibuje *in vitro* migraci eozinofilů, ale ne neutrofilů, skrz endotel (Schnyder-Candrian et al., 2012). Tyto výsledky odpovídají pozorování *in vivo*, že rNIF výrazně snižuje akumulaci eozinofilů v peribronchiálním prostoru (Schnyder-Candrian et al., 2012)

Výsledkem je, že rNIF ovlivňuje imunitní odpověď hostitele zásahem do migrace eozinofilů, ovlivněním zmnožení pohárkových buněk a sekrece mukusu a potlačení produkce Th2 cytokinů u OVA-indukovaného zánětu plic. Žádná další navazující studie na efekty rNIF na astma nebyla provedena.

9 Omega-1

Omega-1 je jedna z molekul hojně se vyskytujících ve vaječném antigenu (*soluble egg antigen*; SEA), motolice *Schistosoma mansoni* (Dunne et al., 1988; Everts et al., 2009). Je to monomerní glykoprotein a jedná se o aktivní glykosylovanou T2 ribonukleázu (RNázu) (Dunne et al., 1988; Everts et al., 2012; Fitzsimmons et al., 2005).

Dendritické buňky hrají velmi důležitou roli v iniciaci T buněčné odpovědi, protože prezentují antigeny, poskytují kostimulační molekuly CD40, CD80 a CD86 a produkují IL-4, IL-10 a TGF-β, které podporují diferenciaci Th2 buněk (Murphy & Weaver, 2017). Omega-1 je schopná se navázat prostřednictvím svých glykanů na manosový receptor dendritických buněk a přes něj se do nich internalizovat (Everts et al., 2012). V dendritických buňkách narušuje proteosyntézu díky své RNázové aktivitě, kdy dochází k degradaci ribosomální a messenger RNA, a dojde k podmínění dendritických buněk k navození Th2 odpovědi (Everts et al., 2009; Steinfelder et al., 2009). Zajímavé je, že pokud jsou Th2 buňky indukované omega-1, není potřebná IL-4 signalizace, bez které se fyziologická indukce Th2 odpovědi neobejde. Omega-1 sama poskytuje počáteční spouštěcí faktory pro diferenciaci Th2 buněk a zesiluje proces (Everts et al., 2009).

Ve studii Zaccone et al., 2011 naměřily u myší ošetřených omega-1 zvýšenou produkci Th2 cytokinů IL-4 a IL-13, což potvrzuje výsledky ze studie Everts et al., 2009, že omega-1 vyvolává Th2 imunitní odpověď. V této studii dále zkoumaly zda, omega-1 zvyšuje výskyt $Foxp3^+$ Treg buněk z NOD

myší. Po jednorázovém podání omega-1 byl v lymfatických uzlinách NOD myší zvýšen počet Foxp3$^+$ Treg buněk (Zaccone et al., 2011). Zaccone et al., 2011 také zkoumaly, zda je indukce Foxp3$^+$ Treg buněk pomocí omega-1 závislá na TGF- β a kyselině retinové (RA), protože několik studií prokázalo, že TGF-β ve spojení s RA má schopnost indukovat expresi Foxp3 u CD4$^+$ T buněk (Andersson et al., 2008; Partridge et al, 2004). Inhibice TGF-β nebo RA vedla k redukci exprese Foxp3$^+$ indukované omega-1, což znamená že je indukce Foxp3$^+$ pomocí omega-1 závislá na TGF-β a RA (Zaccone et al., 2011). Výsledkem této studie je potvrzení, že omega-1 navozuje Th2 imunitní odpověď, že zvyšuje expresi Foxp3$^+$ a že je tato exprese závislá na TGF-β a RA (Zaccone et al., 2011).

Imunomodulační funkce omega-1 byly také zkoumány ve studii Hagen et al., 2014 na myších, které byly infikovány vajíčky se sníženou expresi omega-1 (knockdown omega-1). U těchto myší byl pozorován pokles dendritických buněk a T buněk ve srovnání s kontrolní skupinou ošetřenou neupravenou omega-1 (Hagen et al., 2014), což potvrzuje výsledky ze studie Zaccone et al., 2011.

Pro využití omega-1, a také dalších imunomodulačních molekul, v terapii onemocnění je nezbytné, abychom byli schopní tyto dané molekuly produkovat efektivně a ve velkém množství. Wilbers et al., 2017 ve své studii využili N-glykosylační mechanismus rostliny *Nicotiana benthamiana* k syntéze LewisX (LeX) motivu nacházejícího se na N-glykanech omega-1. Jejich cílem bylo zjistit, zda LeX motiv ovlivňuje imunomodulační vlastnosti omega-1 produkované rostlinou, a zda jsou imunomodulační vlastnosti rostlinné omega-1 shodné s omega-1 produkovanou *S. mansoni*. Výsledkem je, že je *N. benthamiana* efektivní v produkci rostlinné omega-1 (Wilbers et al., 2017). Bylo potvrzeno, že je rostlinná omega-1 funkční RNáza, což odpovídá výsledkům studie Everts et al., 2012 a že způsobuje Th2 polarizaci srovnatelnou s omega-1 produkovanou *S. mansoni.* U omega-1 s LeX motivy byla naměřena vyšší produkce IL-4, oproti omega-1 bez LeX motivu, ale nebyl pozorován žádný rozdíl v množství Foxp3$^+$ Treg buněk u těchto dvou modelů (Wilbers et al., 2017). Z toho můžeme vyvodit, že LeX motivy omega-1 silně zvyšují schopnost Th2 polarizace imunitní odpovědi.

Jak již bylo řečeno, omega-1 je dominantní molekula, která je součástí SEA, a sdílí spolu spoustu funkčních mechanismů, pomocí kterých ovlivňují imunitní systém hostitele jako je třeba indukce Th2 imunitní odpovědi a zvýšení množství Foxp3$^+$ Treg buněk. Jsou mezi nimi ale určité odlišnosti. SEA ochuzená o omega-1 vykazuje zhoršenou schopnost vyvolání Th2 odpovědi, s čímž souvisí i LeX motivy na omega-1.

I přesto, že má omega-1 velký potenciál v léčbě autoimunitních onemocnění, tak není využívána v klinických studiích. V klinických studiích je preferována SEA před omega-1 z několika důvodů. Jelikož je SEA tvořena plejádou různých molekul, má mnohem širší spektrum imunomodulačních účinků než samotná omega-1. I přesto, že může být omega-1 produkována pomocí *Nicotiana benthamiana,* je tento proces zdlouhavý a drahý.

10 Závěr

Cílem této práce bylo zpracovat a shrnout poznatky o konkrétních imunomodulačních molekulách helmintů a jejich vlivu na autoimunitní a chronická zánětlivá onemocnění. Helminti jsou preferováni ve výzkumu léčby těchto onemocnění, jelikož dlouhá koexistence helmintů a člověka vedla k vytvoření komplexních mechanismů imunologické modulace. A právě tyto imunomodulační vlastnosti helmintů mohou být využity při léčbě autoimunitních a chronických onemocnění. Prevalence těchto onemocnění v posledních desítkách let roste a nejčastější léčbou je imunosuprese, která je spojena s řadou vedlejších účinků. Proto je kladen důraz na vývoj a studium nových terapií, mezi které patří terapie pomocí imunomodulačních molekul helmintů. Molekuly, u kterých byl zkoumán terapeutický efekt, jsou zahrnuty v této práci a shrnuty v tabulce č.1. Jedná se o cílenou terapii, protože se molekuly mohou zaměřit přímo na imunitní buňky zapojené do onemocnění a regulovat jejich aktivitu. Další výhodou je, že narozdíl od současných terapií, které se zaměřují primárně na léčbu příčin, použití imunomodulačních molekul může navíc potencionálně změnit průběh a závažnost onemocnění. Tento způsob terapie ale má i své nevýhody, jelikož vzájemné interakce mezi parazity, hostiteli a jejich mikroflórou vyvinuté během dlouhé koevoluce nelze nahradit použitím jedné nebo několika imunomodulačních molekul. Nevýhodou také je, že dlouhodobé účinky použití imunomodulačních molekul helmintů pro léčbu onemocnění nejsou doposud známy, jelikož se myši nemohou dožít tak vysokého věku, abychom mohli nějaké pozorovat.

Experimenty, které byly zmíněné v předchozích kapitolách, měly vždy podobné sestavení skupin jedinců – kontrolní skupina zdravých myší, zdravé myši ošetřené imunomodulační molekulou, nemocné myši a nemocné myši ošetřené imunomodulační molekulou. Uspořádání experimentů, ve kterých byly tyto molekuly zkoumány, často vypadalo takto – použití molekuly, indukce onemocnění a pozorování – jednalo se tedy o preventivní model. Velkou otázkou je, zda by molekuly fungovaly stejným způsobem, i pokud by byly použity u již vyvinutého onemocnění, tedy v terapeutickém modelu. U některých molekul, např. FhHDM-1 a Hp-TGM, jsme se dozvěděli, že pokud byly použity až po indukci a vyvinutí symptomů, tak již nezabraňovaly onemocnění. Pokud budeme chtít v budoucnu tyto molekuly využívat v léčbě onemocnění, je stěžejní, aby se zlepšil preventivní screening, čímž podchytíme nástup onemocnění a molekuly podáme profylakticky.

Efektivita molekul je také ovlivněna způsobem jejich podání. Intranazální podání je vhodné u molekul, jejichž místem působení je dýchací soustava. Nevýhodou je, že absorpce molekuly nemusí být vždy konzistentní, čímž mohou vzniknout výkyvy v dávkování. Perorální podání je vhodné naopak u molekul, které mají působit v trávící soustavě. Zde je nevýhodou to, že může být molekula degradována v trávicím traktu a tak je snížena její efektivita. Intraperitoneální a intravenózní podání je přímé a rychle, ale jedná se o invazivní metodu, a tím pádem zde roste riziko infekce nebo dalších komplikací.

Problematika využití těchto molekul je stále v počáteční fázi. Překážkami ve vývoji je náročná izolace molekul z parazitů, jelikož mají složité životní cykly a molekuly nemusí být produkovány všemi

životními stádii. Jsou tedy zapotřebí vhodné expresní systémy, které by mohly produkovat rekombinantní molekuly ve velkém množství. Ideální imunomodulační molekula produkovaná helmintem pro použití při léčbě autoimunitních onemocnění by měla mít schopnost ovlivňovat imunitní odpověď tak, aby podporovala protizánětlivé cytokiny a potlačovala prozánětlivé cytokiny. Měla by mít vysokou specifitu pro imunitní buňky, které se podílejí na autoimunitní reakci, a zároveň nezpůsobovat žádné vedlejší účinky. Také by měla být efektivně a levně produkována, jednoduše skladována a být stabilní po delší dobu.

Důležité je také zmínit, že výzkumy jednotlivých imunomodulačních molekul jsou často vedeny totožnými týmy. Do budoucna by určitě bylo příhodné, aby se studie provedly znovu u konkurenčních týmu a výsledky tak mohly být validovány.

Pro úplné pochopení potenciálních přínosů a rizik v léčbě autoimunitních a chronicky zánětlivých onemocnění je zapotřebí dalších studií molekul helmintů k lepšímu poznání mechanismů fungování, k optimalizaci dávkování a podávání a k případné kombinaci s jinými terapiemi pro maximální léčebný účinek. Kromě toho by měly poznatky ze zvířecích modelů sloužit jako podklady pro sestavení klinických studií u lidí, ale jak již bylo zmíněno, je potřeba dbát na to, že modely nejsou přesnými kopiemi onemocnění u lidí a dávat důraz na jejich rozdíly.

Tabulka č.1 - souhrnná tabulka imunomodulačních molekul helmintů zmíněných v této práci a jejich efektů na imunitní systém hostitele během vybraných onemocnění

Název molekuly		Parazit	Mechanismus účinku	Onemocnění (model), na kterém byla molekula testována
Cystatiny	**Ascaris lumbricoides cystein protease inhibitor**	*Ascaris lumbricoides*	Zvýšená produkce IL-10 a TGF-β Snížená produkce IL-6, IL-12, TNF-α a INF-γ	Ulcerózní kolitida (DSS kolitida)
	Av17	*Acanthocheilonema viteae*	Zvýšená produkce IL-10 makrofágy Omezení infiltrace eosinofilů do plic Snížená produkce IL-4 Snížení IgE	Ulcerózní kolitida (DSS kolitida) Astma (OVA indukované astma)
	Clonorchis sinensis stefin-1	*Clonorchis sinensis*	Zvýšená produkce IL-10 makrofágy Snížená produkce TNF-α	Ulcerózní kolitida (DSS kolitida)
	Brugia malayi cystatin	*Brugia malayi*	Zvýšená produkce IL-10 Snížená produkce IL-5, IL-6, IL-17, TNF-α a INF-γ	Ulcerózní kolitida
	Schistosoma japonicum cystatin	*Schistosoma japonicum*	Zvýšení počtu Th2 buněk Zvýšená produkce IL-10 a IL-4 Snížená produkce IL-6, IL-17, TNF-α a INF-γ	Revmatoidní artritida (CIA)
ES-62		*Acanthocheilonema viteae*	Th2 buněčná polarizace aktivací TLR a MyD88-dependentní dráhy Nefunkčnost B a T buněčných receptorů, snížená proliferace lymfocytů Snížení produkce IL-6, IL-12 a TNF-α	Revmatoidní artritida (CIA)
Fasciola hepatica helminth defense molecule 1		*Fasciola hepatica*	Snížena sekrece IL-1β makrofágy Zabránění acidifikace endolysosomu Zabránění aktivace NLRP3 inflamazomu Snížení produkce IL-6, IL-1β a TNF-α	Revmatoidní artritida (CIA) Roztroušená skleróza (EAE) Diabetes I. typu ((NOD model)
Heligmosomoides polygyrus TGF-β mimic		*Heligmosomoides polygyrus*	Indukce Foxp3+ Treg buněk	Ulcerózní kolitida (DSS kolitida) Roztroušená skleróza (EAE) Astma (OVA indukované astma)
Neutrophil inhibitory factor		*Ancylostoma caninum*	Redukce eosinofilů Omezení hyperplázii pohárkových buněk Snížení produkce IL-4 a IL-5	Astma (OVA indukované astma)
Omega-1		*Schistosoma mansoni*	Podmínění dendritických buněk k navození Th2 odpovědi Indukce Foxp3+ Treg buněk	Diabetes I. typu (NOD model)

11 Seznam literatury

Albelda, S. M., Smith, C. W., & Ward, P. A. (1994). Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb Journal*.

Al-Riyami, L., Pineda, M. A., Rzepecka, J., Huggan, J. K., Khalaf, A. I., Suckling, C. J., Scott, F. J., Rodgers, D. T., Harnett, M. M., & Harnett, W. (2013). Designing anti-inflammatory drugs from parasitic worms: a synthetic small molecule analogue of the Acanthocheilonema viteae product ES-62 prevents development of collagen-induced arthritis. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(24), 9982–10002. https://doi.org/10.1021/JM401251P

Alvarado, R., O'Brien, B., Tanaka, A., Dalton, J. P., & Donnelly, S. (2015). A parasitic helminth-derived peptide that targets the macrophage lysosome is a novel therapeutic option for autoimmune disease. *Immunobiology*, *220*(2), 262–269. https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2014.11.008

Alvarado, R., To, J., Lund, M. E., Pinar, A., Mansell, A., Robinson, M. W., O'Brien, B. A., Dalton, J. P., & Donnelly, S. (2017). The immune modulatory peptide FhHDM-1 secreted by the helminth Fasciola hepatica prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting endolysosomal acidification in macrophages. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *31*(1), 85–95. https://doi.org/10.1096/FJ.201500093R

Anderson, M. S., & Bluestone, J. A. (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual Review of Immunology*, *23*, 447–485. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.23.021704.115643

Andersson, J., Tran, D. Q., Pesu, M., Davidson, T. S., Ramsey, H., O'Shea, J. J., & Shevach, E. M. (2008). CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(9), 1975–1981. https://doi.org/10.1084/JEM.20080308

Andrews, S. (1999). The Life Cycle of Fasciola hepatica. *Undefined*.

Aravindhan, V., Mohan, V., Surendar, J., Rao, M. M., Ranjani, H., Kumaraswami, V., Nutman, T. B., & Babu, S. (2010). Decreased Prevalence of Lymphatic Filariasis Among Subjects with Type-1 Diabetes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *83*(6), 1336. https://doi.org/10.4269/AJTMH.2010.10-0410

Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of Neurology*, *61*(4), 288–299. https://doi.org/10.1002/ANA.21117

Bager, P., Kapel, C., Roepstorff, A., Thamsborg, S., Arnved, J., Rønborg, S., Kristensen, B., Poulsen, L. K., Wohlfahrt, J., & Melbye, M. (2011). Symptoms after Ingestion of Pig Whipworm Trichuris

suis Eggs in a Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Clinical Trial. *PLoS ONE*, *6*(8), 22346. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0022346

Bartemes, K. R., Iijima, K., Kobayashi, T., Kephart, G. M., McKenzie, A. N., & Kita, H. (2012). IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *188*(3), 1503–1513. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1102832

Bąska, P., Norbury, L. J., Wiśniewski, M., Januszkiewicz, K., & Wędrychowicz, H. (2013). Excretory/secretory products of Fasciola hepatica but not recombinant phosphoglycerate kinase induce death of human hepatocyte cells. *Acta Parasitologica*, *58*(2), 215–217. https://doi.org/10.2478/S11686-013-0126-X

Beasley, R., Roche, W. R., Roberts, J. A., & Holgate, S. T. (1989). Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *The American Review of Respiratory Disease*, *139*(3), 806–817. https://doi.org/10.1164/AJRCCM/139.3.806

Beaugerie, L., Massot, N., Carbonnel, F., Cattan, S., Gendre, J.-P., & Cosnes, J. (2001). Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, *96*(7), 2113–2116. https://doi.org/10.1111/J.1572-0241.2001.03944.X

Bernstein, C. N., Rawsthorne, P., Cheang, M., & Blanchard, J. F. (2006). A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *The American Journal of Gastroenterology*, *101*(5), 993–1002. https://doi.org/10.1111/J.1572-0241.2006.00381.X

Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, & Trapp BD. (2000). *Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reducedN-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients*. https://www.researchgate.net/publication/246898753_Neurological_disability_correlates_with_spinal_cord_axonal_loss_and_reducedN-acetyl_aspartate_in_chronic_multiple_sclerosis_patients

Boissier, M. C., Feng, X. Z., Carlioz, A., Roudier, R., & Fournier, C. (1987). Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *46*(9), 691–700. https://doi.org/10.1136/ARD.46.9.691

Bouma, G., Coppens, J. M. C., Mourits, S., Nikolic, T., Sozzani, S., Drexhage, H. A., & Versnel, M. A. (2005). Evidence for an enhanced adhesion of DC to fibronectin and a role of CCL19 and CCL21 in the accumulation of DC around the pre-diabetic islets in NOD mice. *European Journal of Immunology*, *35*(8), 2386–2396. https://doi.org/10.1002/EJI.200526251

Boyce, B. F., & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *473*(2), 139. https://doi.org/10.1016/J.ABB.2008.03.018

Brand, D. D., Latham, K. A., & Rosloniec, E. F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*, *2*(5), 1269–1275. https://doi.org/10.1038/NPROT.2007.173

Bruno Gran, Kate O'Brien, Denise Fitzgerald, & A.M. Rostami. (2007). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 19. https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS

Calderon, B., Suri, A., Pan, X. O., Mills, J. C., & Unanue, E. R. (2008). IFN-gamma-dependent regulatory circuits in immune inflammation highlighted in diabetes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(10), 6964–6974. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.181.10.6964

Casaro, M., Souza, V. R., Oliveira, F. A., & Ferreira, C. M. (2019). OVA-Induced Allergic Airway Inflammation Mouse Model. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1916*, 297–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_28

Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, *104*(SUPPL.104). https://doi.org/10.1002/0471142735.IM1525S104

Chauché, C., Rasid, O., Donachie, A. M., McManus, C. M., Löser, S., Campion, T., Richards, J., Smyth, D. J., McSorley, H. J., & Maizels, R. M. (2022). Suppression of airway allergic eosinophilia by Hp-TGM, a helminth mimic of TGF-β. *Immunology*, *167*(2), 197–211. https://doi.org/10.1111/IMM.13528

Coakley, G., McCaskill, J. L., Borger, J. G., Simbari, F., Robertson, E., Millar, M., Harcus, Y., McSorley, H. J., Maizels, R. M., & Buck, A. H. (2017). Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. *Cell Reports*, *19*(8), 1545–1557. https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.05.001

Cook, L., Reid, K. T., Häkkinen, E., de Bie, B., Tanaka, S., Smyth, D. J., White, M. P. J., Wong, M. Q., Huang, Q., Gillies, J. K., Ziegler, S. F., Maizels, R. M., & Levings, M. K. (2021). Induction of stable human FOXP3+ Tregs by a parasite-derived TGF-β mimic. *Immunology and Cell Biology*, *99*(8), 833–847. https://doi.org/10.1111/imcb.12475

Corbet, M., Pineda, M. A., Yang, K., Tarafdar, A., McGrath, S., Nakagawa, R., Lumb, F. E., Suckling, C. J., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2021). Suppression of inflammatory arthritis by the parasitic worm product ES-62 is associated with epigenetic changes in synovial fibroblasts. *PLoS Pathogens*, *17*(11). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1010069

Coronado, S., Barrios, L., Zakzuk, J., Regino, R., Ahumada, V., Franco, L., Ocampo, Y., & Caraballo, L. (2017). A recombinant cystatin from Ascaris lumbricoides attenuates inflammation of DSS-induced colitis. *Parasite Immunology*, *39*(4). https://doi.org/10.1111/PIM.12425

Dainichi, T., Maekawa, Y., Ishii, K., Zhang, T., Fawzy Nashed, B., Sakai, T., Takashima, M., & Himeno, K. (2001). Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from Nippostrongylus brasiliensis, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infection and Immunity*, *69*(12), 7380–7386. https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7380-7386.2001

De Groot, J. C., Brinke, A. Ten, & Bel, E. H. D. (2015). Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. *ERJ Open Research*, *1*(1). https://doi.org/10.1183/23120541.00024-2015

Deehan, M. R., Frame, M. J., Michael, R., Parkhouse, E., Seatter, S. D., Reid, S. D., Harnett, M. M., & Harnett, W. (1998). A Phosphorylcholine-Containing Filarial Nematode-Secreted Product Disrupts B Lymphocyte Activation by Targeting Key Proliferative Signaling Pathways. *The Journal of Immunology*, *160*(6), 2692–2699. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.160.6.2692

Deehan, M. R., Harnett, M. M., & Harnett, W. (1997). A filarial nematode secreted product differentially modulates expression and activation of protein kinase C isoforms in B lymphocytes. *The Journal of Immunology*, *159*(12), 6105–6111. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.159.12.6105

Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., & Lehuen, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature Medicine*, *19*(1), 65–73. https://doi.org/10.1038/NM.3042

DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*, *391*(10138), 2449–2462. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5

Doonan, J., Lumb, F. E., Pineda, M. A., Tarafdar, A., Crowe, J., Khan, A. M., Suckling, C. J., Harnett, M. M., & Harnett, W. (2018). Protection Against Arthritis by the Parasitic Worm Product ES-62, and Its Drug-Like Small Molecule Analogues, Is Associated With Inhibition of Osteoclastogenesis. *Frontiers in Immunology*, *9*(MAY). https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01016

Doonan, J., Tarafdar, A., Pineda, M. A., Lumb, F. E., Crowe, J., Khan, A. M., Hoskisson, P. A., Harnett, M. M., & Harnett, W. (2019). The parasitic worm product ES-62 normalises the gut microbiota bone marrow axis in inflammatory arthritis. *Nature Communications*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-019-09361-0

Dungan, L. S., Mcguinness, N. C., Boon, L., Lynch, M. A., & Mills, K. H. G. (2014). Innate IFN-γ promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for NK cells and M1 macrophages. *European Journal of Immunology*, *44*(10), 2903–2917. https://doi.org/10.1002/EJI.201444612

Dunne, D. W., Hillyer, G. V., & Vazquez, G. (1988). Schistosoma mansoni cationic egg antigens (CEF6): immunoserology with oxamniquine-treated patients and involvement of CEF6 in the circumoval precipitin reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *38*(3), 508–514. https://doi.org/10.4269/AJTMH.1988.38.508

Everts, B., Hussaarts, L., Driessen, N. N., Meevissen, M. H. J., Schramm, G., van der Ham, A. J., van der Hoeven, B., Scholzen, T., Burgdorf, S., Mohrs, M., Pearce, E. J., Hokke, C. H., Haas, H., Smits, H. H., & Yazdanbakhsh, M. (2012). Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization

by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(10), 1753–1767. https://doi.org/10.1084/JEM.20111381/VIDEO-1

Everts, B., Perona-Wright, G., Smits, H. H., Hokke, C. H., Van Der Ham, A. J., Fitzsimmons, C. M., Doenhoff, M. J., Van Der Bosch, J., Mohrs, K., Haas, H., Mohrs, M., Yazdanbakhsh, M., & Schramm, G. (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by Schistosoma mansoni eggs, drives Th2 responses. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(8), 1673. https://doi.org/10.1084/JEM.20082460

Farooqi, N., Gran, B., & Constantinescu, C. S. (2010). Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? *Journal of Neurochemistry*, *115*(4), 829–844. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.06982.X

Fiorino, G., Cesarini, M., & Danese, S. (2011). Biological therapy for ulcerative colitis: what is after anti-TNF. *Current Drug Targets*, *12*(10), 1433–1439. https://doi.org/10.2174/138945011796818225

Fitzsimmons, C. M., Schramm, G., Jones, F. M., Chalmers, I. W., Hoffmann, K. F., Grevelding, C. G., Wuhrer, M., Hokke, C. H., Haas, H., Doenhoff, M. J., & Dunne, D. W. (2005). Molecular characterization of omega-1: A hepatotoxic ribonuclease from Schistosoma mansoni eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *144*(1), 123–127. https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2005.08.003

Fleming, J. O., & Cook, T. D. (2006). Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*, *67*(11), 2085–2086. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000247663.40297.2D

Foulis, A. K., McGill, M., & Farquharson, M. A. (1991). Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *The Journal of Pathology*, *165*(2), 97–103. https://doi.org/10.1002/PATH.1711650203

Goodridge, H. S., Marshall, F. A., Else, K. J., Houston, K. M., Egan, C., Al-Riyami, L., Liew, F.-Y., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2005). Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *174*(1), 284–293. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.1.284

Gourraud, P. A., Harbo, H. F., Hauser, S. L., & Baranzini, S. E. (2012). The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological Reviews*, *248*(1), 87–103. https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2012.01134.X

Green, A., & Patterson, C. C. (2001). Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia*, *44*(SUPPL. 3). https://doi.org/10.1007/pl00002950

Hagen, J., Young, N. D., Every, A. L., Pagel, C. N., Schnoeller, C., Scheerlinck, J. P. Y., Gasser, R. B., & Kalinna, B. H. (2014). Omega-1 knockdown in Schistosoma mansoni eggs by lentivirus

transduction reduces granuloma size in vivo. *Nature Communications*, *5*. https://doi.org/10.1038/NCOMMS6375

Harnett, M. M., Deehan, M. R., Williams, D. M., & Harnett, W. (1998). Induction of signalling anergy via the T-cell receptor in cultured Jurkat T cells by pre-exposure to a filarial nematode secreted product. *Parasite Immunology*, *20*(11), 551–563. https://doi.org/10.1046/J.1365-3024.1998.00181.X

Harnett, M. M., Kean, D. E., Boitelle, A., McGuiness, S., Thalhamer, T., Steiger, C. N., Egan, C., Al-Riyami, L., Alcocer, M. J., Houston, K. M., Gracie, J. A., McInnes, I. B., & Harnett, W. (2008). The phosphorycholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *67*(4), 518–523. https://doi.org/10.1136/ard.2007.073502

Harnett, M. M., Melendez, A. J., & Harnett, W. (2010). The therapeutic potential of the filarial nematode-derived immunodulator, ES-62 in inflammatory disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *159*(3), 256–267. https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2009.04064.X

Harnett, W., Harnett, M., & Byron, O. (2003). Structural/functional aspects of ES-62--a secreted immunomodulatory phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein. *Current Protein & Peptide Science*, *4*(1), 59–71. https://doi.org/10.2174/1389203033380368

Harnett, W., & Harnett, M. M. (1999). Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *Immunology Today*, *20*(3), 125–129. https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01419-4

Hart, B. A. T. (2019). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset: a translationally relevant model for the cause and course of multiple sclerosis. *Primate Biology*, *6*(1), 17–58. https://doi.org/10.5194/PB-6-17-2019

Hartmann, S., Kyewski, B., Sonnenburg, B., & Lucius, R. (1997). A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *European Journal of Immunology*, *27*(9), 2253–2260. https://doi.org/10.1002/EJI.1830270920

Hartmann, S., & Lucius, R. (2003). Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *International Journal for Parasitology*, *33*(11), 1291–1302. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00163-2

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., & Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, *129*(2), 550–564. https://doi.org/10.1016/J.GASTRO.2005.05.002

Heller, F., Fromm, A., Gitter, A. H., Mankertz, J., & Schulzke, J. D. (2008). Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-

inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunology*, *1 Suppl 1*, 58–61. https://doi.org/10.1038/MI.2008.46

Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B., & Hartung, H. P. (2006). Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature Clinical Practice Neurology*, *2*(4), 201–211. https://doi.org/10.1038/NCPNEURO0154

Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, E., Rubin, K., & Klareskog, L. (1986). Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis and Rheumatism*, *29*(1), 106–113. https://doi.org/10.1002/ART.1780290114

Hull, C. M., Peakman, M., & Tree, T. I. M. (2017). Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia*, *60*(10), 1839–1850. https://doi.org/10.1007/S00125-017-4377-1

Ihara, S., Hirata, Y., & Koike, K. (2017). TGF-β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *Journal of Gastroenterology*, *52*(7), 777–787. https://doi.org/10.1007/S00535-017-1350-1

Jacobsen, E. A., Ochkur, S. I., Pero, R. S., Taranova, A. G., Protheroe, C. A., Colbert, D. C., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2008). Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(3), 699–710. https://doi.org/10.1084/JEM.20071840

Jang, S. W., Cho, M. K., Park, M. K., Kang, S. A., Na, B. K., Ahn, S. C., Kim, D. H., & Yu, H. S. (2011). Parasitic Helminth Cystatin Inhibits DSS-Induced Intestinal Inflammation Via IL-10+F4/80+ Macrophage Recruitment. *The Korean Journal of Parasitology*, *49*(3), 245. https://doi.org/10.3347/KJP.2011.49.3.245

Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P. J., Dardenne, M., & Drexhage, H. A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*, *43*(5), 667–675. https://doi.org/10.2337/DIAB.43.5.667

Johnston, C. J. C., Smyth, D. J., Kodali, R. B., White, M. P. J., Harcus, Y., Filbey, K. J., Hewitson, J. P., Hinck, C. S., Ivens, A., Kemter, A. M., Kildemoes, A. O., Le Bihan, T., Soares, D. C., Anderton, S. M., Brenn, T., Wigmore, S. J., Woodcock, H. V., Chambers, R. C., Hinck, A. P., … Maizels, R. M. (2017). A structurally distinct TGF-β mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells. *Nature Communications*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-017-01886-6

Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, *11*(5), 373–384. https://doi.org/10.1038/NI.1863

Khan, Y. A., Maurya, S. K., Kulkarni, C., Tiwari, M. C., Nagar, G. K., & Chattopadhyay, N. (2020). Fasciola helminth defense molecule-1 protects against experimental arthritis by inhibiting osteoclast formation and function without modulating the systemic immune response. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *34*(1), 1091–1106. https://doi.org/10.1096/FJ.201901480RR

Khatri, V., Amdare, N., Tarnekar, A., Goswami, K., & Reddy, M. V. R. (2015). Brugia malayi cystatin therapeutically ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Journal of Digestive Diseases*, *16*(10), 585–594. https://doi.org/10.1111/1751-2980.12290

Kim, D. I., Song, M. K., & Lee, K. (2019). Comparison of asthma phenotypes in OVA-induced mice challenged via inhaled and intranasal routes. *BMC Pulmonary Medicine*, *19*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/S12890-019-1001-9/FIGURES/8

Kruglov, A. A., Lampropoulou, V., Fillatreau, S., & Nedospasov, S. A. (2011). Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *187*(11), 5660–5670. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1100663

Kuijk, L. M., Klaver, E. J., Kooij, G., van der Pol, S. M. A., Heijnen, P., Bruijns, S. C. M., Kringel, H., Pinelli, E., Kraal, G., de Vries, H. E., Dijkstra, C. D., Bouma, G., & van Die, I. (2012). Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular Immunology*, *51*(2), 210–218. https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2012.03.020

Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, *16*(1), 45–56. https://doi.org/10.1038/NI.3049

Landolina, N. A. C., & Levi-Schaffer, F. (2014). Eosinophils as a pharmacological target for the treatment of allergic diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, *17*(1), 71–80. https://doi.org/10.1016/J.COPH.2014.07.014

Lassmann, H., Brück, W., & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *17*(2), 210–218. https://doi.org/10.1111/J.1750-3639.2007.00064.X

Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., & Vass, K. (1988). Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *The American Journal of Pathology*, *130*(3), 443. /pmc/articles/PMC1880661/?report=abstract

Liu, F., Cheng, W., Pappoe, F., Hu, X., Wen, H., Luo, Q., Wang, S., Deng, F., Xie, Y., Xu, Y., & Shen, J. (2016). Schistosoma japonicum cystatin attenuates murine collagen-induced arthritis. *Parasitology Research*, *115*(10), 3795–3806. https://doi.org/10.1007/S00436-016-5140-0

López-Serrano, P., Pérez-Calle, J. L., Pérez-Fernández, M. T., Fernández-Font, J. M., Boixeda De Miguel, D., & Fernández-Rodríguez, C. M. (2010). Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *45*(12), 1464–1471. https://doi.org/10.3109/00365521.2010.510575

Lublin, F. D., & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, *46*(4), 907–911. https://doi.org/10.1212/WNL.46.4.907

Lucchinetti, C. F., Popescu, B. F. G., Bunyan, R. F., Moll, N. M., Roemer, S. F., Lassmann, H., Brück, W., Parisi, J. E., Scheithauer, B. W., Giannini, C., Weigand, S. D., Mandrekar, J., & Ransohoff, R. M. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, *365*(23), 2188–2197. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1100648

Lumb, F. E., Doonan, J., Bell, K. S., Pineda, M. A., Corbet, M., Suckling, C. J., Harnett, M. M., & Harnett, W. (2017). Dendritic cells provide a therapeutic target for synthetic small molecule analogues of the parasitic worm product, ES-62. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-017-01651-1

Lund, M. E., Greer, J., Dixit, A., Alvarado, R., McCauley-Winter, P., To, J., Tanaka, A., Hutchinson, A. T., Robinson, M. W., Simpson, A. M., O'Brien, B. A., Dalton, J. P., & Donnelly, S. (2016). A parasite-derived 68-mer peptide ameliorates autoimmune disease in murine models of Type 1 diabetes and multiple sclerosis. *Scientific Reports*, *6*. https://doi.org/10.1038/SREP37789

Lustigman, S., Brotman, B., Huima, T., Prince, A. M., & McKerrow, J. H. (1992). Molecular cloning and characterization of onchocystatin, a cysteine proteinase inhibitor of Onchocerca volvulus. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(24), 17339–17346. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41931-X

Mahad, D. H., Trapp, B. D., & Lassmann, H. (2015). Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet. Neurology*, *14*(2), 183–193. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70256-X

Mahid, S. S., Minor, K. S., Soto, R. E., Hornung, C. A., & Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, *81*(11), 1462–1471. https://doi.org/10.4065/81.11.1462

Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., & Tochino, Y. (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu. Experimental Animals*, *29*(1), 1–13. https://doi.org/10.1538/EXPANIM1978.29.1_1

Manoury, B., Gregory, W. F., Maizels, R. M., & Watts, C. (2001). Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite Brugia malayi, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Current Biology : CB*, *11*(6), 447–451. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00118-X

Marshall, F. A., Grierson, A. M., Garside, P., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2005). ES-62, an immunomodulator secreted by filarial nematodes, suppresses clonal expansion and modifies effector function of heterologous antigen-specific T cells in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(9), 5817–5826. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.9.5817

Marshall, F. A., Watson, K. A., Garside, P., Harnett, M. M., & Harnett, W. (2008). Effect of activated antigen-specific B cells on ES-62-mediated modulation of effector function of heterologous antigen-specific T cells in vivo. *Immunology*, *123*(3), 411–425. https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2007.02706.X

McGinley, A. M., Sutton, C. E., Edwards, S. C., Leane, C. M., DeCourcey, J., Teijeiro, A., Hamilton, J. A., Boon, L., Djouder, N., & Mills, K. H. G. (2020). Interleukin-17A Serves a Priming Role in Autoimmunity by Recruiting IL-1β-Producing Myeloid Cells that Promote Pathogenic T Cells. *Immunity*, *52*(2), 342-356.e6. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2020.01.002

McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*, *365*(23), 2205–2219. https://doi.org/10.1056/NEJMRA1004965

Melgar, S., Karlsson, L., Rehnström, E., Karlsson, A., Utkovic, H., Jansson, L., & Michaëlsson, E. (2008). Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *International Immunopharmacology*, *8*(6), 836–844. https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2008.01.036

Mews, I., Bergmann, M., Bunkowski, S., Gullotta, F., & Brück, W. (1998). Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *4*(2), 55–62. https://doi.org/10.1177/135245859800400203

Moser, R., Fehr, J., & Bruijnzeel, P. L. (1992). IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *149*(4), 1432–1438.

Moser, R., Groscurth, P., Carballido, J. M., Bruijnzeel, P. L., Blaser, K., Heusser, C. H., & Fehr, J. (1993). Interleukin-4 induces tissue eosinophilia in mice: correlation with its in vitro capacity to stimulate the endothelial cell-dependent selective transmigration of human eosinophils. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *122*(5), 567–575.

Moyle, M., Foster, D. L., McGrath, D. E., Brown, S. M., Laroche, Y., De Meutter, J., Stanssens, P., Bogowitz, C. A., Fried, V. A., Ely, J. A., Soule, H. R., & Vlasuk, G. P. (1994). A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(13), 10008–10015. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36982-X

Muchowski, P. J., Zhang, L., Chang, E. R., Soule, H. R., Plow, E. F., & Moyle, M. (1994). Functional interaction between the integrin antagonist neutrophil inhibitory factor and the I domain of CD11b/CD18. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(42), 26419–26423. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47210-9

Mukundan, A., Byeon, C. H., Hinck, C. S., Cunningham, K., Campion, T., Smyth, D. J., Maizels, R. M., & Hinck, A. P. (2022). Convergent evolution of a parasite-encoded complement control protein-scaffold to mimic binding of mammalian TGF-β to its receptors, TβRI and TβRII. *The Journal of Biological Chemistry*, *298*(6). https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.101994

Murphy Kenneth, & Weaver Casey. (2017). *Janeway´s Immunobiology* (9th ed.). Garland Science.

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*(11), 6173–6177. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.11.6173

Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(5), 329–342. https://doi.org/10.1038/NRI3661

Newlands, G. F. J., Skuce, P. J., Knox, D. P., & Smith, W. D. (2001). Cloning and expression of cystatin, a potent cysteine protease inhibitor from the gut of Haemonchus contortus. *Parasitology*, *122*(Pt 3), 371–378. https://doi.org/10.1017/S0031182001007302

Nicklin, M. J. H., & Barrett, A. J. (1984). Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase I by egg-white cystatin. *The Biochemical Journal*, *223*(1), 245–253. https://doi.org/10.1042/BJ2230245

Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., & Bach, J. F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology*, *160*(1), 1. https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2010.04139.X

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., & Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, *98*(3), 694–702. https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90290-H

Ordás, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Ulcerative colitis. *Lancet (London, England)*, *380*(9853), 1606–1619. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60150-0

Osbourn, M., Soares, D. C., Vacca, F., Cohen, E. S., Scott, I. C., Gregory, W. F., Smyth, D. J., Toivakka, M., Kemter, A. M., le Bihan, T., Wear, M., Hoving, D., Filbey, K. J., Hewitson, J. P., Henderson, H., Gonzàlez-Cìscar, A., Errington, C., Vermeren, S., Astier, A. L., … McSorley, H. J. (2017). HpARI Protein Secreted by a Helminth Parasite Suppresses Interleukin-33. *Immunity*, *47*(4), 739-751.e5. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.09.015

Panda, A. K., Ravindran, B., & Das, B. K. (2013). Rheumatoid arthritis patients are free of filarial infection in an area where filariasis is endemic: comment on the article by Pineda et al. *Arthritis and Rheumatism*, *65*(5), 1402–1403. https://doi.org/10.1002/ART.37883

Partridge, E. A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G. M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I. R., Wrana, J. L., & Dennis, J. W. (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5693), 120–124. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1102109

Pearson, J. A., Wong, F. S., & Wen, L. (2016). The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity*, *66*, 76–88. https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2015.08.019

Peón, A. N., Ledesma-Soto, Y., Olguín, J. E., Bautista-Donis, M., Sciutto, E., & Terrazas, L. I. (2017). Helminth Products Potently Modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Downregulating Neuroinflammation and Promoting a Suppressive Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/8494572

Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/718617

Pfaff, A. W., Schulz-Key, H., Soboslay, P. T., Taylor, D. W., MacLennan, K., & Hoffmann, W. H. (2002). Litomosoides sigmodontis cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis. *International Journal for Parasitology*, *32*(2), 171–178. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00350-2

Pfefferle, P. I., Keber, C. U., Cohen, R. M., & Garn, H. (2021). The Hygiene Hypothesis - Learning From but Not Living in the Past. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.635935

Pineda, M. A., Lumb, F., Harnett, M. M., & Harnett, W. (2014). ES-62, a therapeutic anti-inflammatory agent evolved by the filarial nematode Acanthocheilonema viteae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *194*(1–2), 1–8. https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2014.03.003

Pineda, M. A., McGrath, M. A., Smith, P. C., Al-Riyami, L., Rzepecka, J., Gracie, J. A., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2012). The parasitic helminth product ES-62 suppresses pathogenesis in collagen-induced arthritis by targeting the interleukin-17-producing cellular network at multiple sites. *Arthritis and Rheumatism*, *64*(10), 3168–3178. https://doi.org/10.1002/ART.34581

Pineda, M. A., Rodgers, D. T., Al-Riyami, L., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2014). ES-62 protects against collagen-induced arthritis by resetting interleukin-22 toward resolution of inflammation in the joints. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *66*(6), 1492–1503. https://doi.org/10.1002/ART.38392

Quinn, S. M., Cunningham, K., Raverdeau, M., Walsh, R. J., Curham, L., Malara, A., & Mills, K. H. G. (2019). Anti-inflammatory Trained Immunity Mediated by Helminth Products Attenuates the Induction of T Cell-Mediated Autoimmune Disease. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAY). https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01109

Robinson, M. W., Alvarado, R., To, J., Hutchinson, A. T., Dowdell, S. N., Lund, M., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., O'Brien, B. A., Dalton, J. P., & Donnelly, S. (2012). A helminth cathelicidin-like protein suppresses antigen processing and presentation in macrophages via inhibition of lysosomal vATPase. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(11), 4614–4627. https://doi.org/10.1096/FJ.12-213876

Robinson, M. W., Donnelly, S., Hutchinson, A. T., To, J., Taylor, N. L., Norton, R. S., Perugini, M. A., & Dalton, J. P. (2011). A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides. *PLoS Pathogens*, *7*(5). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002042

Rodgers, D. T., Pineda, M. A., Mcgrath, M. A., Al-Riyami, L., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2014). Protection against collagen-induced arthritis in mice afforded by the parasitic worm product, ES-62, is associated with restoration of the levels of interleukin-10-producing B cells and reduced plasma cell infiltration of the joints. *Immunology*, *141*(3), 457–466. https://doi.org/10.1111/IMM.12208

Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Fernández-Soto, P., Vicente, B., Collía, F., & Muro, A. (2015). Gene Expression Profile in the Liver of BALB/c Mice Infected with Fasciola hepatica. *PloS One*, *10*(8). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0134910

Romagnani, S. (2004). Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *113*(3), 395–400. https://doi.org/10.1016/J.JACI.2003.11.025

Rook, G. A. W. (2010). 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the "hygiene" or "old friends" hypothesis. *Clinical and Experimental Immunology*, *160*(1), 70–79. https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2010.04133.X

Rook, G. A. W. (2012). Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *42*(1), 5–15. https://doi.org/10.1007/S12016-011-8285-8

Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The eosinophil. *Annual Review of Immunology*, *24*, 147–174. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.24.021605.090720

Rzepecka, J., Pineda, M. A., Al-Riyami, L., Rodgers, D. T., Huggan, J. K., Lumb, F. E., Khalaf, A. I., Meakin, P. J., Corbet, M., Ashford, M. L., Suckling, C. J., Harnett, M. M., & Harnett, W. (2015). Prophylactic and therapeutic treatment with a synthetic analogue of a parasitic worm product prevents experimental arthritis and inhibits IL-1β production via NRF2-mediated counter-

regulation of the inflammasome. *Journal of Autoimmunity*, *60*, 59–73. https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2015.04.005

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *157*, 107843. https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2019.107843

Sanjabi, S., Oh, S. A., & Li, M. O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF-β: From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(6). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A022236

Schnoeller, C., Rausch, S., Pillai, S., Avagyan, A., Wittig, B. M., Loddenkemper, C., Hamann, A., Hamelmann, E., Lucius, R., & Hartmann, S. (2008). A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(6), 4265–4272. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.180.6.4265

Schnyder-Candrian, S., Maillet, I., Le Bert, M., Brault, L., Jacobs, M., Ryffel, B., Schnyder, B., & Moser, R. (2012). Neutrophil Inhibitory Factor Selectively Inhibits the Endothelium-Driven Transmigration of Eosinophils In Vitro and Airway Eosinophilia in OVA-Induced Allergic Lung Inflammation. *Journal of Allergy*, *2012*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2012/245909

Schönemeyer, A., Lucius, R., Sonnenburg, B., Brattig, N., Sabat, R., Schilling, K., Bradley, J., & Hartmann, S. (2001). Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode Onchocerca volvulus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(6), 3207–3215. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.6.3207

Serreze, D. V, Leiter, E. H., Christianson, G. J., Greiner, D., & Roopenian, D. C. (1994). Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulitis resistant. *Diabetes*, *43*(3), 505–509. https://doi.org/10.2337/DIAB.43.3.505

Setiadi, A. F., Abbas, A. R., Jeet, S., Wong, K., Bischof, A., Peng, I., Lee, J., Bremer, M., Eggers, E. L., DeVoss, J., Staton, T., Herman, A., von Büdingen, H. C., & Townsend, M. J. (2019). IL-17A is associated with the breakdown of the blood-brain barrier in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *332*, 147–154. https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2019.04.011

Sharma, A. R., Sharma, G., Lee, S. S., & Chakraborty, C. (2016). miRNA-Regulated Key Components of Cytokine Signaling Pathways and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Medicinal Research Reviews*, *36*(3), 425–439. https://doi.org/10.1002/MED.21384

Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V., & Yamamoto, K. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews. Disease Primers*, *4*. https://doi.org/10.1038/NRDP.2018.1

Smyth, D. J., Ren, B., White, M. P. J., McManus, C., Webster, H., Shek, V., Evans, C., Pandhal, J., Fields, F., Maizels, R. M., & Mayfield, S. (2021). Oral delivery of a functional algal-expressed TGF-β mimic halts colitis in a murine DSS model. *Journal of Biotechnology*, *340*, 1–12. https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2021.08.006

Steinfelder, S., Andersen, J. F., Cannons, J. L., Feng, C. G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P., Schwartzberg, P. L., Sher, A., & Jankovic, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(8), 1681–1690. https://doi.org/10.1084/JEM.20082462

Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ : British Medical Journal*, *299*(6710), 1259. https://doi.org/10.1136/BMJ.299.6710.1259

Tanaka, A., Allam, V. S. R. R., Simpson, J., Tiberti, N., Shiels, J., To, J., Lund, M., Combes, V., Weldon, S., Taggart, C., Dalton, J. P., Phipps, S., Sukkar, M. B., & Donnelly, S. (2018). The parasitic 68-mer peptide FhHDM-1 inhibits mixed granulocytic inflammation and airway hyperreactivity in experimental asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *141*(6), 2316–2319. https://doi.org/10.1016/J.JACI.2018.01.050

Tanaka, T. (2016). Leukocyte Adhesion Molecules. *Encyclopedia of Immunobiology*, *3*, 505–511. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.07015-6

Trivedi, S. G., & Lloyd, C. M. (2007). Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *64*(10), 1269–1289. https://doi.org/10.1007/S00018-007-6527-Y

Vacca, F., Chauché, C., Jamwal, A., Hinchy, E. C., Heieis, G., Webster, H., Ogunkanbi, A., Sekne, Z., Gregory, W. F., Wear, M., Perona-Wright, G., Higgins, M. K., Nys, J. A., Cohen, E. S., & McSorley, H. J. (2020). A helminth-derived suppressor of ST2 blocks allergic responses. *ELife*, *9*, 1–20. https://doi.org/10.7554/ELIFE.54017

Van Kruiningen, H. J., & West, A. B. (2005). Potential danger in the medical use of Trichuris suis for the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *11*(5), 515. https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000160369.47671.A2

Wesołowska, A., Gajewska, A., Smaga-Kozłowska, K., Kotomski, G., & Wędrychowicz, H. (2012). Effect of Fasciola hepatica proteins on the functioning of rat hepatocytes. *Parasitology Research*, *110*(1), 395–402. https://doi.org/10.1007/S00436-011-2504-3

Whelan, M., Harnett, M. M., Houston, K. M., Patel, V., Harnett, W., & Rigley, K. P. (2000). A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *164*(12), 6453–6460. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.164.12.6453

White, M. P. J., Johnston, C. J. C., Grainger, J. R., Konkel, J. E., O'Connor, R. A., Anderton, S. M., & Maizels, R. M. (2020). The Helminth Parasite Heligmosomoides polygyrus Attenuates EAE in an IL-4Rα-Dependent Manner. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01830

White, M. P. J., Smyth, D. J., Cook, L., Ziegler, S. F., Levings, M. K., & Maizels, R. M. (2021). The parasite cytokine mimic Hp-TGM potently replicates the regulatory effects of TGF-β on murine CD4+ T cells. *Immunology and Cell Biology*, *99*(8), 848–864. https://doi.org/10.1111/IMCB.12479

Wicker, L. S., Leiter, E. H., Todd, J. A., Renjilian, R. J., Peterson, E., Fischer, P. A., Podolin, P. L., Zijlstra, M., Jaenisch, R., & Peterson, L. B. (1994). Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulitis or diabetes. *Diabetes*, *43*(3), 500–504. https://doi.org/10.2337/DIAB.43.3.500

Wiendl, H., & Hohlfeld, R. (2009). Multiple sclerosis therapeutics: unexpected outcomes clouding undisputed successes. *Neurology*, *72*(11), 1008–1015. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000344417.42972.54

Wilbers, R. H. P., Westerhof, L. B., Van Noort, K., Obieglo, K., Driessen, N. N., Everts, B., Gringhuis, S. I., Schramm, G., Goverse, A., Smant, G., Bakker, J., Smits, H. H., Yazdanbakhsh, M., Schots, A., & Hokke, C. H. (2017). Production and glyco-engineering of immunomodulatory helminth glycoproteins in plants. *Scientific Reports*, *7*. https://doi.org/10.1038/SREP45910

Wills-Karp, M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual Review of Immunology*, *17*, 255–281. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.17.1.255

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., & Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*, *2*(3), 541–546. https://doi.org/10.1038/NPROT.2007.41

Yamaguchi, T., Kishi, A., Osaki, M., Morikawa, H., Prieto-Martin, P., Wing, K., Saito, T., & Sakaguchi, S. (2013). Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(23), E2116–E2125. https://doi.org/10.1073/PNAS.1307185110/SUPPL_FILE/PNAS.201307185SI.PDF

Yazdanbakhsh, M., Van Den Biggelaar, A., & Maizels, R. M. (2001). Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends in Immunology*, *22*(7), 372–377. https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01958-5

Zaccone, P., Burton, O. T., Gibbs, S. E., Miller, N., Jones, F. M., Schramm, G., Haas, H., Doenhoff, M. J., Dunne, D. W., & Cooke, A. (2011). The S. mansoni glycoprotein ω-1 induces Foxp3 expression in NOD mouse $CD4^+$ T cells. *European Journal of Immunology*, *41*(9), 2709–2718. https://doi.org/10.1002/EJI.201141429

Zaccone, P., Fehervari, Z., Phillips, J. M., Dunne, D. W., & Cooke, A. (2006). Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology*, *28*(10), 515. https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.2006.00879.X

Zamvil, S. S., & Steinman, L. (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual Review of Immunology*, *8*, 579–621. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IY.08.040190.003051

Ziegler, T., Rausch, S., Steinfelder, S., Klotz, C., Hepworth, M. R., Kühl, A. A., Burda, P.-C., Lucius, R., & Hartmann, S. (2015). A novel regulatory macrophage induced by a helminth molecule instructs IL-10 in CD4+ T cells and protects against mucosal inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *194*(4), 1555–1564. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1401217