



## Општи подаци и протокол истраживања

### Назив Пројекта :

УЛОГА ST2 РЕЦЕПТОРА У РЕГУЛАЦИЈИ СИГНАЛНОГ ПУТА IL-33 У TH-2 ИМУНОМ ОДГОВОРУ И У КОНКАНАВАЛИН-А (CON-A) ИНДУКОВАНОМ ХЕПАТИТИСУ

### Кључне речи :

ST2, IL-33, Th-2 имуни одговор, Конканавалин-А индукованом хепатитису

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак:

TLR (Toll-like receptor) представљају фамилију трансмембранских гликопротеина који активирају урођени имуни одговор изазван патогенима. ST2, члан TIR суперфамилије, регулише продукцију два облика протеина, краћи солубилни sST2 и дужи трансмембрански ST2L рецептор. sST2, исказан преодминантно на фибробластима, се везује за површину мишијих макрофага и супримира продукцију инфламаторних цитокина индуковану липополисахаридом (LPS). ST2L, исказан на мастоцитима и Th2 лимфоцитима, негативно регулише Th1 имуни одговор, игра важну улогу у регулацији Th2 ћелијске диференцијације и развоју Th2 имуног одговора *in vivo*, као и у моделу алергијског запаљења дисајних путева, хепатичне исхемије и аутоимуног дијабетеса. Тек скорије IL-33, цитокин из IL-1 фамилије, је идентификован као прави лиганд ST2L рецептора. Иако је стално експримиран у великом броју ћелија, мали ниво IL-33 је нађен у неактивним дендритичним ћелијама, активираним макрофагама и Th2 лимфоцитима у облику прекурсора чију активацију индукује каспаза-1. IL-33 везује ST2 рецептор и активира NFκB и MAPK сигналне путеве, индукује Th2 имуни одговор, укључујући продукцију IL-4, IL-5, IL-13, патолошке промене на плућима и гастроинтестиналном тракту праћеним еозинофилијом, спленомегалијом и повећаним серумским IgE и IgA. Хепатитис, као светски здравствени проблем, који се експериментално индукује са Con-A и активира Т лимфоците доводи до активације Th1 и Th2 имуног одговора.

У циљу испитивања и разумевања потенцијалне улоге ST2 у сигналном путу IL-33 и Con-A индукованом хепатитису, испитиваћемо да ли је ST2 рецептор есенцијалан за регулацију и активацију IL-33 сигналног пута користећи BALB/c ST2<sup>-/-</sup> мишеве. У истраживању ће бити коришћене следеће методе: FACS, имунофлуоресценција, Western blot, ELISA, и TUNEL.



### Циљ истраживања:

1. Испитати да ли је присуство ST2 рецептора на ћелијској мембрани Т лимфоцита неопходно за везивање IL-33 за лимфоците.
2. Испитати могућност интеракције IL-33 са другим IL-1 рецепторима осим ST2.
3. Испитати улогу ST2 у нижим сигналним путевима после третмана са IL-33 у ST2/- нокаут мишевима, укључујући активацију NFκB, MAPK, и PI3K/AKT.
4. Испитати ефекте IL-33 на индукцију Th2 имунског одговора у ST2/- нокаут мишевима у присуству или одсуству солубилног ST2.
5. Испитати улогу ST2 у продукцији Th1 и Th2 цитокина у моделу Cop A индукованог хепатитиса.
6. Испитати улогу солубилног IL-33 у Cop A индукованом хепатитису

### Актуелност истраживања

TLR (Toll-like receptor) представљају фамилију трансмембранских гликопротеина који учествују у активирању урођеног имуног одговора према инвазивним патогенима. ST2, члан TIR суперфамилије регулише продукцију две mRNK, краћу и дужу. Краћој одговара солубилни облик (sST2), који је присутан у ембрионалним ткивима, туморима дојке и предоминантно експримиран на фибробластима. sST2 се везује за површину мишићних макрофага и супримира продукцију инфламаторних цитокина индуковану третманом ћелија липополисахаридом (LPS). Рецептор на макрофагима за који се везује sST2 још није откривен. Дужа mRNA генерише продукцију трансмембранског облика ST2 рецептора, ST2L, исказан на мастоцитима и Th2 лимфоцитима. Истраживања на wild type и ST2 нокаут мишевима третираним анти-ST2 антителима или ST2-фузионим протеинима показују важну улогу ST2 у регулацији Th2 ћелијске диференцијације и развоју Th2 имуног одговора *in vivo*, као у моделу алергијског запаљења дисајних путева, аутоимуног дијабетеса и хепатичне исхемије. За разлику од осталих чланова Toll-IL-1R суперфамилије, ST2 не доводи до развоја инфламаторног одговора нити активације NF-κB, иако активира MAPK. ST2 везује и секвестира адапторе Toll-IL-1R, Mal и Myd88, чиме негативно регулише IL1β регулише Th1 имуни одговор и активира Th2 одговор индукованим IL1α LPS, TLR4 и TLR2 лигандима, бактеријским липопротеином. Раније, два наводна лиганда ST2 рецептора су описана, али скорије прави лиганд је идентификован као цитокин из IL-1 фамилије, назван IL-33.

Чланови IL-1 фамилије, укључујући IL-18, играју значајну улогу у запаљенским, инфективним и аутоимуним болестима. IL-33 је нови члан IL1 фамилије који индукује Th2 имуни одговор, укључујући продукцију IL-4, IL-5, IL-13, интеракцијом и трансмисијом кроз ST2 рецептор. Ово је у контрасту са IL1β и IL-18 који доводе до развоја Th1 имуног одговора. IL-33 индукује патолошке промене на плућима и гастроинтестиналном тракту праћеним еозинофилијом, спленомегалијом и повећаним серумским IgE и IgA. Иако је стално експримиран у великом броју ћелија, IL-33 се продукује у одговарајућим ћелијама, укључујући плућни паренхим и кератиноцити, и IL1-β. Мали ниво IL-33 нађен је у неактивним након активације са TNF-α дендритичним ћелијама, активираним макрофагима и Th2 лимфоцитима у облику прекурсора чију активацију индукује каспаза-1, као и код IL1β и



IL-18. Везивањем за ST2 рецептор, IL-33 активира Myd88, IRAK4, TRAF6, као и NFkB и MAPK аналогно IL-18. Скорије је, IL-1 $\beta$ , другим цитокинима IL-1 фамилије, укључујући IL-1 $\alpha$  откривено да је IL-33 проинфламаторни цитокин и интрацелуларни једарни фактор. укључен у негативну регулацију транскрипције, слично као IL-1 $\alpha$ . Хепатитис представља светски здравствени проблем. За испитивање молекуларних механизма хепатитиса, постављен је конканавалином (Con-A) индукован модел хепатитиса код мишева где је показано да је активација Т лимфоцита конканавалином неопходна за Con-A индукован имуни одговор и оштећење јетре. Активација и инфилтрација Т лимфоцита, еозинофила, Купферових ћелија, и NKT ћелија у паренхим јетре доводи, IL-2, IL-6, до секреције Th1 проинфламаторних цитокина укључујући TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  IL-1, и цитокина Th2 имуног одговора као што су IL-4 и IL-5. Цитокини Th1 имуног одговора узрокују ћелијску смрт хепатоцита посредовану FAS лигандом. Многи цитокини имају значајну улогу у оштећењу јетре као IL-6, IL-10, IL-11, IL-22 и, IL-12 и IL-15 који показују хепатопротективне ефекте, док су TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  IL-18 медијатори Con-A индукованог хепатитиса. Улоге многих других цитокина у регулацији Con-A индукованог хепатитиса још нису утврђене, укључујући и IL-33.

### **Предмет и опис истраживања, задаци, методологија, очекивани резултати**

У циљу испитивања и разумевања потенцијалне улоге ST2 у сигналном путу IL-33 и Con-A индукованом хепатитису, биће изведени следећи експерименти:

1. Испитати да ли присуство ST2 рецептора на ћелијској мембрани Т лимфоцита неопходно за везивање IL-33 за лимфоците. Култивисаћемо Т лимфоците ST2  $-/-$  нокаут мишева са рекомбинантним солубилним IL-33 и анализирати их FACS и имунофлуоресцентном методом.
2. Испитати могућност интеракције IL-33 са другим IL-1 рецепторима осим ST2. Испитаћемо модел везивања солубилног IL-33 на Т лимфоцитима у присуству/одсуству различитих антитела за IL-1 и IL-18 рецепторе имунофлуоресцентном методом.
3. Испитати улогу ST2 у нижим сигналним путевима после третмана са IL-33 у ST2  $-/-$  нокаут мишевима. Истражићемо који је ефекат солубилног IL-33 на његове ниже сигналне таргете, као што су NFkB, and MAPK, у ST2  $-/-$  нокаут мишевима у присуству или одсуству солубилног ST2 користећи Western Blot методу.
4. Испитати улогу активације ST2 преко IL-33 у нижем сигналном путу укључујући активацију PI3K и АКТ. Испитаћемо ефекат солубилног IL-33 на активацију PI3K и АКТ и у wild type и ST2 нокаут мишевима користећи Western Blot методу.
5. Испитати ефекте IL-33 на индукцију Th2 имуноског одговора у ST2  $-/-$  нокаут мишевима у присуству или одсуству солубилног ST2. Истражићемо IL-33 индуковану продукцију Th1 и Th2 цитокина у Т лимфоцитима ST2  $-/-$  нокаут мишева ELISA методом.
6. Испитати улогу ST2 у продукцији Th1 и Th2 цитокина у моделу Con A индукованог хепатитиса. Концентрације ових цитокина ће се одређивати у плазми Con A третираних



контролних (wild type) BALB/c и ST2 -/- нокаут мишева. Испитаћемо и ефекат Cop A на in vitro и in vivo продукцију IL-33 ELISA методом.

7. Испитати улогу солубилног IL-33 у Cop A индукованом хепатитису. Wild type BALB/c и ST2-/- нокаут мишеви ће се третирати солубилним IL-33 или плацебо пре индукције са Cop A. У циљу доказивања Cop-A индукованог хепатитиса у јетри, мерићемо ниво AST и ALT у серуму. Ефекат IL-33 на Cop-A индукован хепатитис ће се анализирати хистолошким методама. Annexin-V тест нам омогућава да одредимо степен апоптозе изазване Cop-A пре и после третмана са IL-33. Western Blot методом одређиваћемо експресију апоптотичких протеина Bcl-2, BAX, као и излазак цитохрома Ц из митохондрије и активацију каспазе 3.

### Материјал и методе

Експерименталне животиње су мишеви соја BALB/C (ST2 -/-, односно wild type).

CopA индуковани хепатитис:

CopA се апликује интравенски у репну вену, у концентрацији 16mg/kg у физиолошком раствору. Инкубациони период износи 24h. Следи жртвовање животиња, узимање крви, јетре, слезине и перипанкреасних лимфних чворова. Један део ткива се оставља за имунохистохемијска бојења, а остатак ткива се хомогенизује. Хомогенат се припрема тако да би се добила суспензија Т лимфоцита. У експериментима се користе и перитонеални макрофаги.

### Значај истраживања

ST2, као важан фактор регулације Th2 ћелијске диференцијације, активације Th2 и инхибиције Th1 имуног одговора редукијући продукцију и активност IL1 има широку примену у клиничкој медицини. IL-33, везује ST2L и индукује Th2 имуни одговор. Хепатитис, као светски здравствени проблем, који се експериментално индукује са Cop-A и активира Т лимфоците доводи до активације Th1 и Th2 имуног одговора. Откриће IL-33 као лиганда ST2L даје велики значај даљим истраживањима у циљу разумевања улоге ST2 у сигналном путу IL-33 и потенцијалне улоге у Cop-A индукованом хепатитису, као и разумевања односа између ST2L и sST2 у регулацији Th2 имуног одговора.

### Руководилац пројекта:

асс. Марина Стојановић

### Главни истраживач:

асс. Иван Јовановић

### Ангажовани истраживачи:

проф . др Мирослав Фолић

проф . др Татјана Годоровић

асс. Иванка Зелен

асс. Немања Здравковић

асс. Гордана Радосављевић

Сузана Поповић, истраживач- сарадник