



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

wplyns10

12.11.2024r.

SEKRETARIAT
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
/ mgr Małgorzata Malinowska /
starszy specjalista

Justyna Karabowicz

**Określenie roli nowo poznanych
pasożytniczych czynników hamujących
migrację makrofagów w układzie
Dirofilaria repens – żywiciel**

Determination of the role of newly discovered parasitic
macrophage migration inhibitory factors in the *Dirofilaria repens*
- host system interactions

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

ks. dr hab. inż. Marcina Wiśniewskiego, prof. SGGW

Katedra Nauk Przedklinicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Promotor pomocniczy:

dr hab. inż. Ewa Długosz

Katedra Nauk Przedklinicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Warszawa, 2024

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 12.11.2024.....

Czytelny podpis promotora x. Marcin Lisowski.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 12.11.2024.....

Czytelny podpis autora rozprawy J. Kmbawin.....

Szczególne podziękowania składam

*ks. dr hab. inż. Marcinowi Wiśniewskiemu, prof. SGGW oraz dr hab. inż. Ewie Długosz
za umożliwienie rozwoju, opiekę naukową i wiarę w moje możliwości*

*dr hab. Małgorzacie Gieryńskiej, prof. SGGW
za życzliwość, poświęcony czas i cenne uwagi merytoryczne*

*Współautorom publikacji
za wniesiony wkład i wskazówki przy przygotowywaniu artykułów*

*Współpracownikom z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
za pomocne rady i wesołą atmosferę w pracy*

*Mojemu Mężowi
za wyrozumiałość i wiarę w powodzenie tego przedsięwzięcia*

*Moim Rodzicom oraz Dziadkom
za miłość i wsparcie na każdym etapie mojej edukacji*

Spis treści

Streszczenie	9
Summary.....	11
Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi	13
Objaśnienie zastosowanych skrótów	15
1. Wstęp	17
1.1. <i>Dirofilaria repens</i> – biologia pasożyta, patogenesa inwazji, rozprzestrzenienie w Europie	17
1.2. Odpowiedź układu immunologicznego żywiciela w przebiegu inwazji wywołanych przez filarie	19
1.3. Czynniki hamujące migrację makrofagów	22
1.4. Homologi czynnika hamującego migrację makrofagów obecne u nicieni	23
1.5. Omówienie składu dysertacji	26
2. Hipotezy badawcze, cele oraz zakres pracy doktorskiej.....	26
3. Materiały i metody.....	28
3.1. Materiały i metody opublikowane	28
3.2. Materiały i metody nieopublikowane.....	29
3.2.1. Hodowla monocytów ustalonej linii komórkowej THP-1 i różnicowanie ich do makrofagów	29
3.2.2. Przygotowanie białek do stymulacji komórek	30
3.2.3. Ocena wpływu rDre-MIF-1 na żywotność makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1	31
3.2.4. Analiza fosforylacji kinaz w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem rDre-MIF-1	31
3.2.5. Ocena aktywności makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem rDre-MIF-1 przy braku i po wstępnej inkubacji z LPS wyrażona syntezą cytokin i ekspresją określonych genów markerów komórkowych	32
3.2.5.1. Stymulacja komórek	32
3.2.5.2. Oznaczenie stężenia cytokin po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 w podłożu hodowlanym.....	33
3.2.5.3. Ocena ekspresji wybranych genów po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 białkiem rDre-MIF-1.....	33
3.2.5.3.1. Izolacja RNA, trawienie genomowego DNA i uzyskanie cDNA	33

3.2.5.3.2. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR).....	34
3.2.6. Opracowanie statystyczne i graficzne wyników	35
4. Wyniki.....	36
4.1. Wyniki opublikowane.....	36
4.2. Wyniki nieopublikowane.....	36
4.2.1. Przygotowanie białek do stymulacji komórek	36
4.2.2. Ocena wpływu rDre-MIF-1 na żywotność makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1	37
4.2.3. Analiza fosforylacji kinaz w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 po stymulacji białkiem rDre-MIF-1.....	38
4.2.4. Ocena aktywności makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem rDre-MIF-1 przy braku i po wstępnej inkubacji z LPS wyrażona syntezą cytokin i ekspresją określonych genów markerów komórkowych	40
4.2.4.1. Oznaczenie stężenia cytokin po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 w podłożu hodowlanym	40
4.2.4.2. Ocena ekspresji wybranych genów po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 białkiem rDre-MIF-1	41
5. Dyskusja	43
6. Podsumowanie i wnioski.....	49
7. Piśmiennictwo	50
8. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu oraz oświadczenia współautorów	62

Streszczenie

Dirofilaria repens jest czynnikiem etiologicznym dirofilariozy podskórnej. Choroba ta występuje u psów i innych zwierząt mięsożernych, a także u człowieka. *D. repens* jest szeroko rozpowszechniony w Europie, a jego zasięg występowania stale się rozszerza. Pomimo rosnącego zagrożenia, jakie stwarza ten pasożyt dla ludzi i zwierząt, wiedza na temat jego oddziaływania na układ immunologiczny żywiciela nie jest dokładnie poznana. Jedną ze strategii nicieni, pozwalającą im przeżyć w tkankach przez długi czas, jest wytwarzanie białek o właściwościach immunomodulacyjnych. Celem pracy była molekularna charakterystyka dwóch homologów czynnika hamującego migrację makrofagów *D. repens* (*Dirofilaria repens* - macrophage migration inhibitory factor; Dre-MIF), analiza ekspresji genów badanych homologów w mikrofilariach i osobniku dorosłym *D. repens*, uzyskanie białek rekombinowanych Dre-MIF-1 i Dre-MIF-2 w bakteryjnym systemie ekspresji, ocena ich immunogenności u myszy oraz reaktywności z przeciwciałami psów naturalnie zarażonych *D. repens* i określenie roli badanych białek na aktywność makrofagów człowieka w modelu *in vitro*.

Przeprowadzono bioinformatyczną analizę sekwencji dwóch homologów MIF *D. repens*. Zbadano poziom ekspresji genów *Dre-mif-1* i *Dre-mif-2* w różnych stadiach rozwojowych pasożyta. Uzyskano rekombinowane białka rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 w bakteryjnym systemie ekspresji oraz dopracowano metodykę ich oczyszczania przy użyciu chromatografii powinowactwa. Oceniono immunogenność rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 u myszy oraz reaktywność tych białek z przeciwciałami surowicy psów naturalnie zarażonych *D. repens* z wykorzystaniem testu ELISA. Zbadano wpływ rDre-MIF-1 na aktywność makrofagów zróżnicowanych z ustalonej linii komórkowej THP-1, poprzez sprawdzenie fosforylacji wybranych kinaz, profilu wydzielanych cytokin oraz zmian w poziomie ekspresji wybranych markerów pro- i przeciwzapalnych po stymulacji białkiem.

Z analizy bioinformatycznej wynika, że Dre-MIF-1 charakteryzuje się wyższym poziomem podobieństwa sekwencji aminokwasów do MIF człowieka i psa niż Dre-MIF-2. Stwierdzono wyższy poziom ekspresji *Dre-mif-1* i *Dre-mif-2* w dorosłych osobnikach *D. repens* w porównaniu do mikrofilarii. rDre-MIF-1 jest bardziej immunogenny niż rDre-MIF-2 u myszy. U zarażonych psów odnotowano podwyższony poziom przeciwciał podklasy IgG1 rozpoznających zarówno rDre-MIF-1, jak i rDre-MIF-2. rDre-MIF-1 wpływa na aktywność makrofagów, m.in. hamuje

wydzielanie cytokin prozapalnych przez makrofagi pobudzone lipopolisacharydem (LPS), co świadczy o jego właściwościach przeciwzapalnych i potwierdza jego immunomodulacyjne działanie.

Słowa kluczowe: dirofilarioza podskórna, czynnik hamujący migrację makrofagów, makrofag, właściwości immunomodulacyjne

Summary

Dirofilaria repens is the etiological agent of subcutaneous dirofilariasis, a disease that affects dogs, other carnivores, and humans. *D. repens* is widely distributed in Europe, and its range continues to expand. Despite the increasing threat posed by this parasite to human and veterinary health, the mechanisms of its interactions with the host's immune system remain poorly understood. One of the strategies employed by nematodes to survive for extended periods in host tissues involves the production of immunomodulatory proteins. The aim of this study was the molecular characterization of two homologues of the *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factor (*Dre*-MIF), analysis of gene expression of the homologues in microfilariae and adult *D. repens*, production of recombinant *Dre*-MIF-1 and *Dre*-MIF-2 proteins in a bacterial expression system, assessment of their immunogenicity in mice, evaluation of their reactivity with antibodies from dogs naturally infected with *D. repens*, and determination of the role of these proteins in macrophage activity in an *in vitro* model.

A bioinformatic analysis of the sequences of the two *D. repens* MIF homologues was conducted. The expression levels of *Dre-mif-1* and *Dre-mif-2* genes were examined at different parasite developmental stages. Recombinant r*Dre*-MIF-1 and r*Dre*-MIF-2 proteins were produced in a bacterial expression system, and their purification was optimized using affinity chromatography. The immunogenicity of r*Dre*-MIF-1 and r*Dre*-MIF-2 in mice, as well as their reactivity with sera from naturally infected dogs, were assessed using ELISA. The second part of the study investigated the effect of r*Dre*-MIF-1 on THP-1 macrophages through analysis of kinase phosphorylation, cytokine secretion profiles, and changes in the expression of selected pro- and anti-inflammatory markers following stimulation.

The bioinformatic analysis revealed that *Dre*-MIF-1 shares a higher level of amino acid sequence similarity with human and canine MIF than *Dre*-MIF-2. *Dre-mif-1* and *Dre-mif-2* showed higher expression levels in adult *D. repens* compared to microfilariae. r*Dre*-MIF-1 is more immunogenic than r*Dre*-MIF-2 in mice. In infected dogs, elevated levels of IgG1 subclass antibodies against both proteins were detected. r*Dre*-MIF-1 impacts macrophage activity; it inhibits pro-inflammatory cytokine release by LPS-stimulated macrophages, which confirms its anti-inflammatory and immunomodulatory effects.

Keywords: subcutaneous dirofilariasis, macrophage migration inhibitory factor, macrophage, immunomodulatory properties

Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi:

Publikacja 1

Karabowicz J*, Długosz E, Baska P, Wiśniewski M. (2022). Nematode Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential Therapeutic Targets. *Pathogens*. 11 (2): 258 <https://doi.org/10.3390/pathogens11020258>

IF=3,3

100 pkt MNiE

Udział własny: 85%

Publikacja 2

Karabowicz J*, Długosz E, Baska P, Pękacz M, Wysmołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M. (2024). Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-parasite interactions. *Journal of Veterinary Research*. 68 (3) : 381–388. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2024-0038>

IF=1,3

140 pkt MNiE

Udział własny: 70%

Łączny IF publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi **IF=4,6 i 240 pkt.** wg punktacji Ministra Nauki. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports oraz komunikatem Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

*autor korespondencyjny

Objaśnienie zastosowanych skrótów

Akt – kinaza białkowa B

AP-1 – (ang. activator protein 1) białko aktywatorowe AP-1

CD - (ang. cluster of differentiation) kompleks różnicowania

CHI3L1 – (ang. chitinase-3-like protein 1) chitynaza 3-podobna 1

CHI3L2 - (ang. chitinase-3-like protein 2) chitynaza 3-podobna 2

CXCR – (ang. C-X-C chemokine receptor) receptor chemokiny CXC

DDT – (ang. D-dopachrome tautomerase) tautomeraza D-dopachromu

Dre-MIF – (ang. *Dirofilaria repens* - macrophage migration inhibitory factor -1) czynnik hamujący migrację makrofagów *Dirofilaria repens*

ERK – (ang. extracellular signal-regulated kinase) kinaza ERK

ETS – (ang. E-twenty-six transcription factor family) – rodzina czynników transkrypcyjnych ETS

FBS – (ang. fetal bovine serum) płodowa surowica bydlęca

Fgr – (ang. Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog) kinaza Fgr

IL – (ang. interleukin) interleukina

ILC – (ang. innate lymphoid cells) wrodzone komórki limfoidalne

IFN – interferon

INOS – (ang. inducible nitric oxide synthase) indukowalna syntaza tlenku azotu

JAB-1 - (z ang. Jun-activating binding protein 1) białko wiążące aktywujące Jun 1

JUN – (ang. transcription factor Jun) czynnik transkrypcyjny Jun

KIP1 – (ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) inhibitor kinazy zależnej od cyklin

Lck – (ang. tyrosine-protein kinase Lck) kinaza tyrozynowa Lck

LPS – (ang. lipopolysaccharide) lipopolisacharyd

Lyn – (ang. tyrosine-protein kinase Lyn) kinaza tyrozynowa Lyn

MAPK – (ang. mitogen-activated protein kinase) kinaza białkowa aktywowana mitogenem

MHC – (ang. major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej

MIF – (ang. macrophage migration inhibitory factor) czynnik hamujący migrację makrofagów

NO – (ang. nitric oxide) tlenek azotu

p53 – białko p53

PBS - (ang. phosphate buffered saline) buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PBMC – (z ang. peripheral blood mononuclear cells) jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

PGE2 – (ang. prostaglandin E2) prostaglandyna E2

PI3K – (ang. phosphoinositide 3-kinase) kinaza fosfatidyloinozytolu 3

PMA – (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate) forbol 12-mirystynian 13-octanu

SDS-PAGE – (ang. sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności soli sodowej kwasu dodecylosiarkowego

Src – (ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src) kinaza tyrozynowa Src

STAT – (ang. signal transducers and activators of transcription) przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji

TGF- β – (z ang. transforming growth factor beta) transformujący czynnik wzrostu beta

TLR – (ang. toll-like receptor) receptor Toll-podobny

TNF - (ang. tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu

XTT – (ang. 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) 2,3-bis-(2-metoksy-4-nitro-5-sulfobenzenylo)-2H-tetrazolowy-5-karboksyanilid

Yes – (ang. tyrosine-protein kinase Yes) kinaza tyrozynowa Yes

1. Wstęp

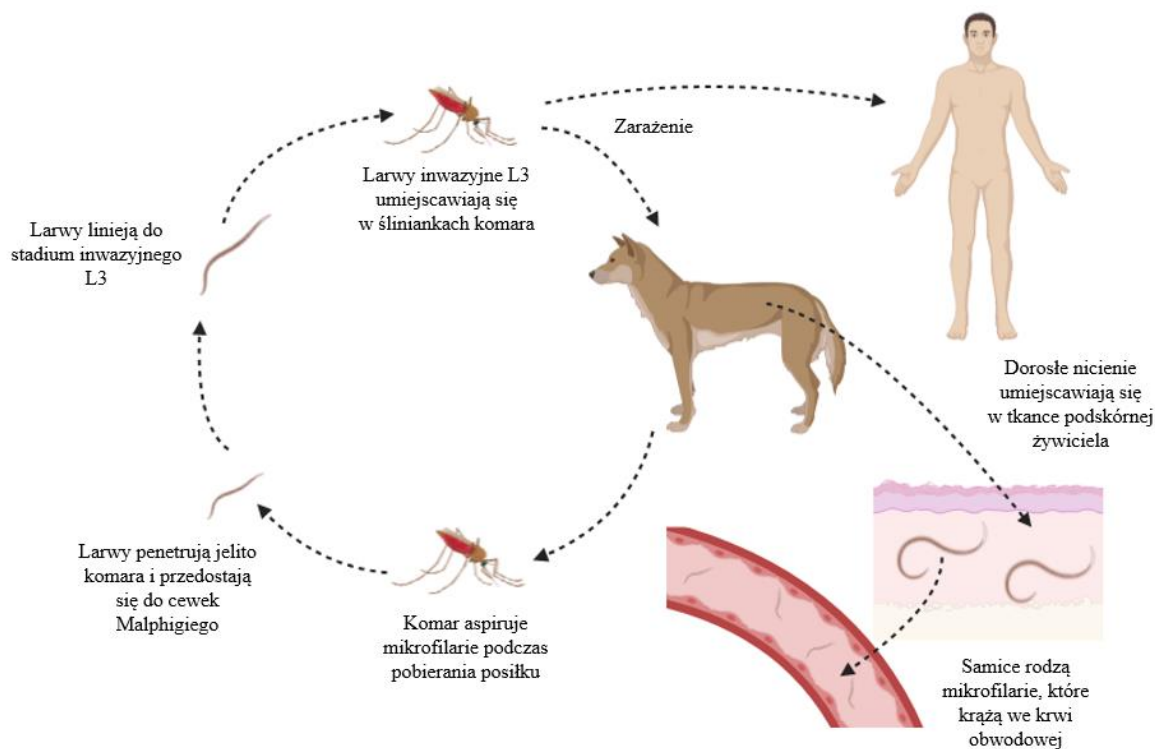
Dirofilaria repens to nicien pasażujący głównie u psowatych (Canidae) i kotowatych (Felidae). Jest pasożytem o potencjale zoonotycznym, co oznacza, że może stanowić zagrożenie również dla ludzi. W trakcie rozwoju w żywicielu ostatecznym dochodzi do powstawania guzków robaczych w tkance podskórnej i skórze zarażonych osobników, w których pasożyt ukrywa się przed układem immunologicznym żywiciela przez długie lata (Petrocheilou i wsp. 1998; Mendoza-Roldan i wsp. 2021). Pomimo rosnącego zagrożenia, jakie stwarza ten pasożyt, wiedza na temat molekularnych mechanizmów interakcji pasożyt-żywiciel w przebiegu dirofilariozy pozostaje ograniczona.

Pasożytnicze nicienie wytworzyły wiele mechanizmów pozwalających im przeżyć w organizmie żywiciela. Mają zdolność modyfikowania odpowiedzi immunologicznej, np. poprzez wydzielanie cząsteczek o właściwościach immunomodulacyjnych, w tym takich, które są podobne do cząsteczek żywiciela (Hewitson, Grainger, i Maizels 2009). Przykładem takiego białka jest czynnik hamujący migrację makrofagów (*macrophage migration inhibitory factor*; MIF), który jest cytokiną ssaków o pleiotropowym działaniu, uczestniczącą w odpowiedzi prozapalnej (Calandra i Roger 2003). Homologi tego białka zostały opisane u wielu gatunków pasożytów, ale ich funkcje nie są jeszcze wystarczająco poznane. Badania sugerują, że wykazują one właściwości immunomodulacyjne, między innymi wpływają na obniżenie poziomu prozapalnych cytokin wydzielanych przez makrofagi (Vermeire i wsp. 2008). Ponieważ w literaturze nie opisano roli tych białek podczas inwazji *D. repens*, została podjęta próba uzyskania ich w bakteryjnym systemie ekspresji oraz scharakteryzowania ich wpływu na układ immunologiczny żywiciela.

1.1. *Dirofilaria repens* – biologia pasożyta, patogeneza inwazji, rozprzestrzenienie w Europie

D. repens jest nicieniem należącym do rzędu Rhabditida, rodziny Onchocercidae, przenoszonym przez komary z rodzajów: *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, które w cyklu rozwojowym pełnią rolę wektora oraz żywiciela pośredniego. Żywicielem ostatecznym są ssaki mięsożerne, przede wszystkim psy domowe. Do zarażenia dochodzi w momencie odżywiania się krwią przez komara, kiedy larwy inwazyjne L3 wnikają do organizmu żywiciela (Ryc.1). Okres prepatentny jest długi, trwa 6-9 miesięcy, a dorosłe nicienie umiejscawiają się najczęściej w tkance podskórnej, gdzie się rozmnażają. Zapłodnione

samice rodzą do krwiobiegu mikrofilarie. Dalszy rozwój cyklu jest możliwy, jeśli komar pobierze mikrofilarie wraz z krwią i w jego organizmie larwy dojrzeją do stadium inwazyjnego L3 (Simón i wsp. 2012).



Ryc. 1 Cykl rozwojowy *Dirofilaria repens*. Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com wg www.cdc.gov/dpdx/dirofilariasis/index.html.

Pies domowy jest typowym żywicielem *D. repens*, ale pasożyt ten może występować też u kotów, dzikich ssaków mięsożernych oraz człowieka. W literaturze opisano przypadki z potwierdzoną mikrofilariemią u ludzi, co świadczy o tym, że pasożyt może w sprzyjających warunkach osiągnąć dojrzałość płciową w organizmie człowieka (Kłudowska i wsp. 2018; Pupiń-Bakrać i wsp. 2021).

U psów dorosłe osobniki umiejscawiają się w tkance podskórnej i skórze, mosznie, jamach ciała, gruczole mlekowym, krezce, worku osierdziowym, ścięgnie kolana oraz w guzach nowotworowych. Podobnie, jak u psów, u ludzi nicienie mogą migrować do tkanki podskórnej różnych części ciała (najczęściej głowy, okolicy oczodołowej, szyi), ale także płuc, powrózków nasiennych, najądrzy, piersi, węzłów chłonnych. Wszystko wskazuje na to, że nicienie te mogą wielokrotnie migrować w organizmie żywiciela w trakcie swojego życia (Borkowski i wsp. 2015; Capelli i wsp. 2018; Wysmołek i wsp. 2020a). Inwazje *D. repens* bardzo często przebiegają

bezobjawowo lub skąpo-objawowo i diagnozowane są przypadkowo. Opisane są jednak przypadki psów z wysoką mikrofilarią, u których występowało zapalenie otrzewnej, żółtaczkę, zwyrodnienie wątroby, niewydolność nerek (Mircean i wsp. 2017). Badania hematologiczne i biochemiczne krwi wykazują ponadto, że u zarażonych psów klinicznie zdrowych, występuje stan przewlekłego stresu związanego z wysokim poziomem glikokortykosteroidów (Wysmołek i wsp. 2020a). W diagnostyce dirofilariozy u psów podstawą jest znalezienie we krwi mikrofilarii. Zalecaną metodą jest zmodyfikowany test Knott'a. Obecnie na rynku nie ma testu serologicznego wykrywającego inwazję *D. repens*. W związku z tym nie ma możliwości potwierdzenia metodami laboratoryjnymi zarażenia w trakcie okresu prepatentnego, ani inwazji jednopłciowej.

D. repens występuje głównie w klimatach tropikalnym i subtropikalnym, na terenie Afryki, Azji oraz południowej Europy. W wyniku działalności człowieka oraz zmian klimatu zasięg występowania znacznie się poszerzył, szczególnie w Europie Środkowej, w tym m.in. Polsce, Litwie, Ukrainie, Słowacji i Niemczech. Pojedyncze przypadki opisano w Danii, Finlandii, Norwegii i Szwecji (Genchi i Kramer 2017; Fuehrer i wsp. 2021). Pierwsze doniesienia na temat występowania inwazji *D. repens* u psów w Polsce opublikowano w latach 2009-2010 (Demiaszkiewicz i wsp. 2009, Sapiernyński i wsp. 2010). Natomiast, pierwsze przypadki u ludzi zostały opisane na przełomie 2007/2008 roku (Żarnowska-Prymek, Cielecka, i Sałamatin 2008). Od tego czasu systematycznie pojawiają się nowe doniesienia o polskich pacjentach, u których wykryto *D. repens* w różnych, czasami zaskakujących, lokalizacjach ciała (Fuehrer i wsp. 2021). Inwazje *D. repens* u psów i ludzi stanowią istotny problem medyczny, dlatego szersze poznanie przebiegu dirofilariozy, w tym interakcji, jakie zachodzą na poziomie pasożyt-żywiciela, są niezbędne dla zrozumienia patogenyzy oraz opracowania nowych metod leczenia i zwalczania tej parazytozy.

1.2. Odpowiedź układu immunologicznego żywiciela w przebiegu inwazji wywołanych przez filarie

Helminty mają zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej żywiciela, dzięki czemu inwazje z reguły są długotrwałe i mogą prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych, a nawet śmierci żywiciela. Częściej jednak obserwujemy przewlekłe zarażenie bezobjawowe lub o małym stopniu nasilenia objawów. Co więcej, w krajach, gdzie ekstensywność zarażenia pasożytami jelitowymi jest wysoka, obserwuje się niższą częstotliwość występowania chorób autoimmunologicznych i alergii (Vercelli

2006). Helminty, aby móc przeżyć w organizmie żywiciela, wydzielają różne cząsteczki, takie jak przeciwtleniacze, proteazy, inhibitory proteaz, ortologi cytokin, które mogą wyciszać stan zapalny (Hewitson, Grainger, i Maizels 2009).

Zarówno u ludzi, jak i u zwierząt filariozy często przebiegają bez wyraźnych objawów klinicznych, co może wskazywać, że nicienie te mają wyjątkową zdolność modulowania odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Głównymi komórkami zaangażowanymi we wczesną inicjację odpowiedzi immunologicznej żywiciela związanej z nicieniami pasożytniczymi są komórki dendrytyczne, makrofagi, granulocyty zasadochłonne (bazofile) i wrodzone komórki limfoidalne (*innate lymphoid cells*; ILC). Jednak szczegółowy mechanizm wciąż pozostaje niewyjaśniony. Komórki dendrytyczne odgrywają kluczową rolę w prezentowaniu antygenów filarii limfocytom T w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej. U ludzi różnicowanie i dojrzewanie tych komórek w obecności antygenów filarii może stymulować odpowiedź zależną od limfocytów Th2 (MacDonald i Maizels 2008; Kwarteng i Ahuno 2017). Badania wskazują także na to, że żywe pasożyty są w stanie indukować śmierć komórek dendrytycznych, a także hamować ich zdolność do syntezy interleukiny (*interleukin*; IL)-10 i IL-12, zmniejszając tym samym ich zdolność do aktywacji limfocytów T posiadających na powierzchni kompleks różnicowania (*cluster of differentiation*; CD) 4 (limfocyty T CD4⁺) (Semnani i wsp. 2003).

Jak już wspomniano, z badań dotyczących filarioz limfatycznych wynika, że promowana jest głównie odpowiedź zależna od limfocytów pomocniczych Th2. Ten typ odpowiedzi jest najczęściej opisywany w przypadku inwazji nicieni. Charakteryzuje się wzrostem stężenia cytokin IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13 oraz przeciwciał klasy IgG1, IgG4 i IgE. Dochodzi do zwiększenia populacji komórek tucznych (mastocytów), granulocytów kwasochłonnych (eozynofilów) oraz makrofagów typu M2 (Neill i wsp. 2010; Sharma i wsp. 2012; Gazzinelli-Guimaraes i Nutman 2018). Makrofagi M2 wydzielają znaczne ilości cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 i transformujący czynnik wzrostu beta (*transforming growth factor beta*; TGF- β) (Strizova i wsp. 2023). Ponadto, aktywnie przyczyniają się do naprawy tkanek poprzez wydzielanie czynników wzrostu, chemokin oraz składników budulcowych do syntezy kolagenu. Zapobiegają także zmianom patologicznym wywołanym nadmierną aktywacją eozynofilów, komórek tucznych, bazofilów, limfocytów Th2, ILC2 i limfocytów B syntetyzujących IgE. Makrofagi M2 mogą zabić lub uwięzić larwy pasożytniczych robaków lub stymulować wydalanie dorosłych osobników z organizmu. Uwięzienie pasożytów zapobiega

rozległym uszkodzeniom zarażonych tkanek (Minutti i wsp. 2017; Lechner, Bohnacker, i Esser-von Bieren 2021).

Zaobserwowano, że odpowiedź immunologiczna przeciwko filariom zależy w dużej mierze od intensywności inwazji i od tego, czy we krwi obecne są mikrofilarie. W przypadku filarioz limfatycznych u pacjentów z nasilonymi objawami w postaci obrzęków limfatycznych (słoniowacizny), w badaniu krwi bardzo często nie stwierdza się mikrofilarii. Natomiast pacjenci z wysoką mikrofilaremią zazwyczaj nie wykazują objawów klinicznych (Kwarteng i Ahuno 2017). Podobną zależność zaobserwowano u ludzi zarażonych *Onchocerca volvulus*. Wyróżnia się onchocerkozę uogólnioną, która dotyczy pacjentów z wysoką intensywnością inwazji. Charakteryzuje się niskim stopniem nasilenia objawów i powstawaniem łagodnych guzków podskórnych. Znacznie rzadziej występuje onchocerkozę hiperaktywną, gdzie nicieni jest mało, ale objawy skórne są znacznie nasilone. U pacjentów z hiperaktywną onchocerkozą zaobserwowano zwiększoną aktywację limfocytów Th17 i Th2, którym towarzyszyła zmniejszona liczba regulatorowych limfocytów T Foxp3⁺ (Katawa i wsp. 2015).

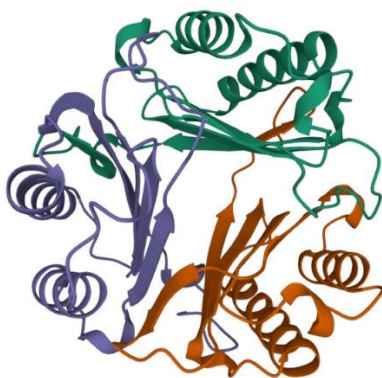
Odpowiedź immunologiczna w zarażeniach filariami jest bardzo złożona, ponieważ pasożyty w organizmie żywiciela mogą przeżyć wiele lat, nie manifestując przy tym wyraźnych objawów klinicznych. Odpowiedź zależy od gatunku nicienia, od jego umiejscowienia, a także od tego, czy w krwiobiegu obecne są mikrofilarie (Maizels, Blaxter, i Scott 2001; Sahoo i wsp. 2018; Wysmołek i wsp. 2020b). W przypadku inwazji *D. repens* charakteryzujących się brakiem mikrofilarii we krwi zaobserwowano wyższy stosunek przeciwciał podklasy IgG2 niż IgG1, co jest charakterystyczne dla odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th1, podczas gdy, u psów z mikrofilaremią ten stosunek był odwrotny (charakterystyczny dla odpowiedzi zależnej od limfocytów Th2) (Wysmołek i wsp. 2022).

D. repens osiąga dorosłość głównie u psów, ale może występować sporadycznie u innych żywicieli, co wskazuje na jego zdolność do modulowania odpowiedzi immunologicznej różnych gatunków ssaków. Strategie, które pozwalają *D. repens* przeżyć w tkankach wciąż nie są do końca poznane, dlatego konieczne są bardziej zaawansowane badania proteomiczne. Identyfikacja białek charakterystycznych dla różnych stadiów rozwojowych pasożytów powiązanych z procesami biologicznymi i określenie ich funkcji na poziomie molekularnym, jest kluczowe dla lepszego zrozumienia mechanizmów molekularnych zachodzących między pasożytem a żywicielem (Zawistowska-Deniziak i wsp. 2021). Poznanie tych mechanizmów

pozwole dokładniej zrozumieć przebieg inwazji oraz opracować strategie leczenia i zapobiegania inwazji u ludzi i zwierząt.

1.3. Czynn timer hamujący migrację makrofagów

MIF został po raz pierwszy opisany w 1966 roku, jako białko wydzielane przez limfocyty T, hamujące specyficznie migrację makrofagów (Bloom i Bennett 1966; David 1966). Białko to zbudowane jest ze 114 aminokwasów, a jego masa wynosi 12,5 kDa. U człowieka gen kodujący MIF umiejscowiony jest na chromosomie 22, zawiera 3 eksony i 2 introny (Bloom i Bennett 1966; Sun i wsp. 1996). MIF jest zbudowany z trzech identycznych podjednostek (Ryc. 2) (Suzuki i wsp. 1996). Jego konformacja jest dobrze zachowana u organizmów eukariotycznych: pierwotniaków, zwierząt i roślin. U różnych gatunków ssaków podobieństwo sekwencji aminokwasów tych cząsteczek jest bardzo wysokie i wynosi powyżej 90% (Sparkes i wsp. 2017).



Ryc. 2. Struktura przestrzenna MIF człowieka (<https://www.rcsb.org/structure/1mif>)

W przeciwieństwie do większości cytokin, MIF wykazuje aktywność enzymatyczną tautomerazy fenylopirogrońianowej oraz oksydoreduktazy (Lubetsky i wsp. 1999; Cournia i wsp. 2009). Czynn timer ten syntetyzowany jest przez różnego rodzaju komórki, w tym: makrofagi, monocyty (Calandra i wsp. 1994), neutrofile (Daryadel i wsp. 2006), eozynofile (Rossi i wsp. 1998), limfocyty (Bacher i wsp. 1996), komórki śródbłónka (Nishihira, Koyama, i Mizue 1998), komórki nabłónka (Shimizu 2005) i komórki mięśniowe (Verschuren i wsp. 2005).

MIF jest cytokiną o pleiotropowym działaniu, uczestniczącą w wielu procesach biologicznych. Zewnątrzkomórkowy MIF aktywuje kompleks sygnalizacyjny poprzez wiązanie się z białkiem CD74. Wiąże się również z receptorami dla chemokin CXC (*C-X-C chemokine receptor*): CXCR2, CXCR4 i CXCR7 włączając określone szlaki

wewnątrzkomórkowe prowadzące do modulacji stanu zapalnego, proliferacji i migracji komórek (Mangano i wsp. 2018; Jankauskas i wsp. 2019).

Mediator ten stymuluje wydzielanie różnych cytokin prozapalnych: czynnik martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor*; TNF) - α , IL-1 β , IL-6 i IL-12, zwiększenie poziomu receptora Toll-podobnego (*Toll-like receptor*; TLR) -4, wydzielanie tlenku azotu (*nitric oxide*; NO), stymuluje syntezę metaloproteinaz macierzy, cyklooksygenazy 2 i prostaglandyny E2 (PGE2) oraz hamuje przeciwzapalne i immunosupresyjne działanie glikokortykosteroidów (Calandra 2003; Bozza i wsp. 2012; Harris i wsp. 2019). Cytokina ta odgrywa kluczową rolę w reakcjach zapalnych oraz w procesie kancerogenezy. Ma zdolność do rekrutacji komórek zarówno wrodzonej, jak i nabytej odporności do miejsca stanu zapalnego. Dodatkowo umożliwia przyleganie monocytów, migrację przez śródbłonek naczyń, fagocytozę oraz aktywuje i zwiększa uwalnianie prozapalnych cytokin poprzez makrofagi, wywołując silną odpowiedź zapalną (Stojanovic, Saksida, i Stosic-Grujicic 2012; Nobre i wsp. 2017).

W 1997 roku opisano drugie białko z rodziny MIF, czyli tautomerazę D-dopachromu (*D-dopachrome tautomerase*; D-DT) (Sugimoto i wsp. 1997). Podobieństwo sekwencji aminokwasów MIF i D-DT wynosi 34%, a struktura przestrzenna jest podobna, zbudowana z trzech podjednostek. D-DT, podobnie jak MIF, aktywuje kompleks CD74/CD44 (Cavalli i wsp. 2020). Funkcje tego białka są jednak znacznie mniej poznane.

1.4. Homologi czynnika hamującego migrację makrofagów obecne u nicieni

Homologi MIF zidentyfikowano u wielu gatunków roślin, kręgowców i bezkręgowców (Sparkes i wsp. 2017). Stwierdzono je u ponad 20 gatunków nicieni pasożytniczych, w tym także u filarii. U większości z nich opisano dwa paralogi MIF-1 i MIF-2 (Vermeire i wsp. 2008), a część z nich uzyskano za pomocą metod inżynierii genetycznej (Tabela 1), co pozwoliło poznać ich strukturę i potencjalne właściwości. Wciąż jednak nie do końca wiadomo, jaką pełnią rolę w przebiegu inwazji pasożytniczych. Homologi MIF opisane u nicieni mają podobną strukturę przestrzenną oraz aktywność enzymatyczną (tautomerazy i oksydoreduktazy) do MIF człowieka, a ich obecność zaobserwowano zarówno w postaciach dorosłych, jak i stadiach larwalnych pasożytów (Vermeire i wsp. 2008).

Jak wynika z badań, omawiane białka mają istotny wpływ na układ immunologiczny żywiciela. MIF aktywuje komórki poprzez receptor powierzchniowy

CD74. CD74 (łańcuch niezmienny Ii) bierze udział w prezentacji antygenów z udziałem cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*; MHC) klasy II. Badania pokazują, że homologi MIF z pasożytów również mogą wiązać się z tym receptorem, ale efekt tej interakcji nie jest do końca poznany (Cho i wsp. 2007; Younis i wsp. 2012; Qu i wsp. 2014; Huang i wsp. 2022). Udowodniono jednak, że białka pasożytnicze mogą łączyć się z komórkami żywiciela i wpływać na ich migrację. Wykazano, że MIF *Brugia malayi* (Bm-MIF) ma wpływ na aktywność chemotaktyczną i blokuje monocyty/makrofagi, hamując ich przypadkową migrację (Pastrana i wsp. 1998). Podobne wyniki wskazujące na hamowanie migracji pod wpływem MIF otrzymano w przypadku jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cell*; PBMC) człowieka stymulowanych rekombinowanym MIF z *Trichinella spiralis* (TsMIF) (Tan i wsp. 2001) oraz *Thelazia callipaeda* (T.cp-MIF) w badaniach z wykorzystaniem ustalonej linii THP-1 (Cai i wsp. 2021).

Z badań wynika, że homologi MIF mogą promować różnicowanie makrofagów w kierunku M2, które są zaangażowane w przebieg odpowiedzi zależnej od limfocytów Th2 i charakterystyczne dla przewlekłych inwazji pasożytniczych (Prieto-Lafuente i wsp. 2009). Ponadto, po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 zaobserwowano, że T.cp-MIF może indukować dynamiczną zmianę polaryzacji makrofagów z fenotypu M1 do M2, prawdopodobnie poprzez wiązanie się z TLR4 i aktywację szlaku sygnałowego zależnego od kinazy fosfatydylinozytolu 3 (*phosphoinositide 3-kinase*; PI3K) i kinazy białkowej B (*protein kinase B*; Akt) (Cai i wsp. 2021). Zmiana fenotypu może być korzystna w kontekście przetrwania pasożyta w organizmie, ponieważ makrofagi M1 mają właściwości prozapalne (wydzielają cytokiny prozapalne oraz dużą ilość reaktywnych form tlenu i azotu) (Peng i wsp. 2023). Wykazano także w badaniach *in vitro*, że pasożytnicze homologi MIF mają działanie przeciwzapalne, wpływając na obniżenie poziomu wydzielania cytokin prozapalnych przez monocyty i makrofagi (Younis i wsp. 2012; Wang i wsp. 2017). Przeciwzapalne właściwości homologów MIF z nicieni były badane na modelach zwierzęcych w kontekście astmy oraz stanu zapalnego jelita grubego. Uzyskane wyniki sugerują, że białka te mogą mieć potencjał terapeutyczny w chorobach autoimmunologicznych, poprzez hamowanie istniejącego stanu zapalnego (Park i wsp. 2009; Cho, Lee, i Yu 2011; Ramani i wsp. 2020). Zagadnienie to jest szerzej opisane w pracy przeglądowej stanowiącej część omawianej dysertacji (Publikacja 1).

Z literatury przedmiotu wynika, że homologi MIF odgrywają istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej żywiciela, zarówno poprzez hamowanie procesów prozapalnych, jak i indukcję różnicowania w kierunku makrofagów typu M2, co może sprzyjać przetrwaniu pasożyta w organizmie żywiciela. Niezbędne są dalsze badania, aby dokładnie zrozumieć mechanizmy molekularne odpowiedzialne za te zjawiska.

Tabela 1. Homologi czynnika hamującego migrację makrofagów nicieni pasożytniczych uzyskane w postaci białek rekombinowanych (opracowanie własne na podstawie dostępnej literatury).

Gatunek nicienia	Numer dostępu (GenBank)	Akronim	Bibliografia
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	EF410151.1	AceMIF	(Cho i wsp. 2007)
<i>Anisakis simplex</i>	EF165010.1	As-MIF	(Park i wsp. 2009; Cho, Lee, i Yu 2011; Park i wsp. 2017)
<i>Brugia malayi</i>	U88035.1	Bm-MIF Bm-MIF-1	(Pastrana i wsp. 1998; Falcone i wsp. 2001; Zang i wsp. 2002; Prieto-Lafuente i wsp. 2009)
	AY004865.1	Bm-MIF-2	(Zang i wsp. 2002; Prieto-Lafuente i wsp. 2009)
<i>Haemonchus contortus</i>	CB012470.1	HcMIF-1	(Wang i wsp. 2017)
<i>Onchocerca volvulus</i>	AF384027.1	OvMIF-1	(Marson, Tarr, i Scott 2001; Ajonina-Ekoti i wsp. 2013)
	AF384028.1	OvMIF-2	(Marson, Tarr, i Scott 2001; Ajonina-Ekoti i wsp. 2013)
<i>Ostertagia ostertagii</i>	BQ457911	Oos-MIF-1.1	(Qu i wsp. 2014)
<i>Strongyloides ratti</i>	FJ026392.1	Sra-MIF	(Younis i wsp. 2012)
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	FN599526.1	Tci-MIF-1	(Nisbet i wsp. 2010)
<i>Thelazia callipaeda</i>	brak danych	T.cp-MIF	(Cai i wsp. 2021)
<i>Trichinella spiralis</i>	AJ012740.1 AY050661.1	TsMIF	(Tan i wsp. 2001; Huang i wsp. 2022)
<i>Wuchereria bancrofti</i>	AF040629.1	Wb-MIF Wb-MIF-1	(Pastrana i wsp. 1998; Sharma i wsp. 2012)
	KJ939449.1	Wba-MIF-2	(Chauhan, Sharma, i Hoti 2015; Chauhan i Hoti 2016)

1.5. Omówienie składu dysertacji

W skład dysertacji wchodzi dwa artykuły (Publikacja 1, Publikacja 2) oraz wyniki badań, które jeszcze nie zostały opublikowane. W pierwszej publikacji dokonano szczegółowego przeglądu literatury w celu poznania aktualnego stanu wiedzy na temat homologów MIF wydzielanych przez nicienie, ich struktury, aktywności enzymatycznej, wpływu na układ odpornościowy żywiciela oraz potencjalnego zastosowania w leczeniu chorób pasożytniczych, zapalnych i autoimmunologicznych. Druga publikacja omawia wyniki badań, w których skład wchodzi analiza sekwencji aminokwasów dwóch homologów MIF *D. repens*, ich otrzymanie i oczyszczenie w bakteryjnym systemie ekspresyjnym, zbadanie ich immunogenności oraz sprawdzenie czy są one rozpoznawane przez przeciwciała psów naturalnie zarażonych. Część nieopublikowana skupia się na poznaniu wpływu rekombinowanego białka *Dre*-MIF-1 (r*Dre*-MIF-1) na aktywność makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1, w tym zbadaniu profilu wydzielanych przez nie cytokin i zmian w poziomie wybranych markerów pro- i przeciwzapalnych po stymulacji. Badania te dotyczą tylko r*Dre*-MIF-1, ponieważ, pomimo wielu prób, nie udało się uzyskać oczyszczonego z endotoksyn białka r*Dre*-MIF-2, co uniemożliwiło przeprowadzenie testów komórkowych z jego wykorzystaniem.

2. Hipotezy badawcze, cele oraz zakres pracy doktorskiej

Hipotezy badawcze:

1. Homologi MIF *D. repens* wykazują właściwości immunomodulacyjne wpływając na aktywność makrofagów poprzez hamowanie ich prozapalnego działania, co sprzyja przeżyciu dorosłych pasożytów w tkance żywiciela;
2. r*Dre*-MIF-1 i r*Dre*-MIF-2 są rozpoznawane przez surowice psów naturalnie zarażonych *D. repens*.

Cele:

1. Molekularna charakterystyka homologów czynnika hamującego migrację makrofagów *D. repens*;
2. Analiza ekspresji mRNA *Dre-mif-1* i *Dre-mif-2* w mikrofilariach i osobniku dorosłym;
3. Uzyskanie homologów MIF *D. repens* w bakteryjnym systemie ekspresji;
4. Ocena immunogenności r*Dre*-MIF-1 i r*Dre*-MIF-2 u myszy oraz określenie reaktywności badanych białek z przeciwciałami surowicy psów naturalnie zarażonych *D. repens*;
5. Określenie wpływu homologów MIF *D. repens* na aktywność makrofagów człowieka w modelu *in vitro*.

Zakres pracy:

1. Analiza bioinformatyczna sekwencji *Dre*-MIF-1 i *Dre*-MIF-2;
2. Zbadanie poziomu ekspresji genów kodujących *Dre*-MIF-1 i *Dre*-MIF-2 w mikrofilariach i stadium dorosłym *D. repens*;
3. Uzyskanie r*Dre*-MIF-1 i r*Dre*-MIF-2 w bakteryjnym systemie ekspresji oraz ich oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa;
4. Porównanie immunogenności r*Dre*-MIF-1 i r*Dre*-MIF-2 po immunizacji myszy badanymi antygenami;
5. Ocena reaktywności r*Dre*-MIF-1 i r*Dre*-MIF-2 z przeciwciałami surowicy psów naturalnie zarażonych z wykorzystaniem testu ELISA;
6. Ocena wpływu r*Dre*-MIF-1 na żywotności makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 – model *in vitro*;
7. Analiza fosforylacji wybranych kinaz w makrofagach zróżnicowanych z monocytów ustalonej linii komórkowej THP-1 po stymulacji r*Dre*-MIF-1;
8. Zbadanie profilu wydzielanych cytokin oraz poziomu ekspresji wybranych markerów komórkowych makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych r*Dre*-MIF-1 przy braku LPS i po wstępnej stymulacji LPS.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały i metody opublikowane

W pierwszym etapie pracy wykonano bioinformatyczną analizę sekwencji nukleotydów kodujących dwa nowe homologi MIF *D. repens* zdeponowanych w ogólnodostępnej bazie GenBank o numerach MT071087.1 i MT071088.1. Sekwencje te porównano z sekwencjami kodującymi MIF żywicieli *D. repens*, czyli człowieka oraz psa. Dzięki modelowaniu przestrzennemu wygenerowano także potencjalne struktury przestrzenne białek. Określono poziom ekspresji genów *Dre-mif-1* i *Dre-mif-2* w różnych stadiach rozwojowych pasożyta. W tym celu wyizolowano całkowity RNA z mikrofilarii i osobnika dorosłego oraz przepisano go w reakcji odwrotnej transkrypcji na cDNA, który następnie był matrycą w ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (*quantitative polymerase chain reaction*; qPCR).

Kolejnym etapem było uzyskanie białek rekombinowanych. W tym celu wykorzystano wektor ekspresyjny pET28a i dwa szczepy *Escherichia coli* (SoluBL21 i BL21). Białka oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa do jonów niklu.

Oczyszczonymi białkami rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 immunizowano myszy BALB/c w celu otrzymania surowicy poliklonalnej. Na przeprowadzenie eksperymentu zgodę wyraziła II Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy SGGW w Warszawie (nr WAW2/142/2021). Testem ELISA zbadano reaktywność przeciwciał (klasy IgG, IgM i IgE oraz podklas IgG1 i IgG2) w surowicy immunizowanych myszy przeciwko badanym białkom z uwzględnieniem możliwości występowania reakcji krzyżowych. Aby potwierdzić możliwość reakcji krzyżowej wykonano także badanie techniką Western blot.

Białka rekombinowane przetestowano z surowicami psów niezarażonych oraz naturalnie zarażonych *D. repens*. Psy zarażone klasyfikowano na podstawie dodatniego wyniku zmodyfikowanego testu Knott'a podczas badań prowadzonych w Weterynaryjnym Laboratorium Diagnostycznym Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych, Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Przy wykorzystaniu testu ELISA zbadano obecność swoistych przeciwciał klasy IgG, IgM, IgE oraz podklas IgG1 i IgG2 skierowanych przeciwko rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2.

Szczegółowy opis materiałów oraz metod znajduje się w publikacji nr 2 w sekcji „Materials and methods”.

3.2. Materiały i metody nieopublikowane

Opis materiałów i metod nieopublikowanych dotyczy realizacji 5. celu badawczego: Określenie wpływu homologów MIF *D. repens* na aktywność makrofagów człowieka w modelu *in vitro*.

3.2.1. Hodowla monocytów ustalonej linii komórkowej THP-1 i różnicowanie ich do makrofagów

Monocyty człowieka ustalonej linii komórkowej THP-1 (European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC) przechowywano w krioprobówkach o objętości 2 ml w ciekłym azocie aż do momentu doświadczenia zgodnie z zaleceniami producenta.

Zawiesinę komórek rozmrażano w 37°C, a następnie przenoszono do 10 ml kompletnego podłoża hodowlanego składającego się z Roswell Park Memorial Institute (RMPI) 1640 z dodatkiem glutaminy (2 mM), 10% surowicy płodowej bydlęcej (*fetal bovine serum* ; FBS) i 1% mieszaniny antybiotyków (amfoterycyny B 0,25 µg/ml, penicyliny 100 U/ml i streptomycyny 100 µg/ml) (Biowest™). Komórki wirowano (5 min, 200 × g), usuwano supernatant i dodawano nową pożywkę, a następnie zawieszano w 5 ml świeżego podłoża, oceniano ich żywotność i zagęszczenie w komorze Neubauera, z użyciem testu wychwytu błękitu trypanu (Sigma-Aldrich). Monocyty zawieszano w podłożu (3×10^5 komórek/ml) i hodowano w butelce do hodowli o powierzchni 25 cm² w inkubatorze w wilgotnej atmosferze z dodatkiem 5% CO₂ w temperaturze 37°C. Komórki pasażowano co 3 dni, utrzymując zagęszczenie komórek na poziomie $2-8 \times 10^5$ komórek/ml. Po zwiększeniu liczby komórek hodowlę prowadzono w większych butelkach o powierzchni 75 cm².

Namnożone monocyty różnicowano w makrofagi w zagęszczeniu zależnym od planowanego eksperymentu:

- $7,5 \times 10^5$ komórek/ml zawieszono w podłożu wzbogaconym o forbol 12-mirystynian 13-octanu (*phorbol 12-myristate 13-acetate*; PMA) o stężeniu końcowym 100 ng/ml i hodowano w płytce 6-dołkowej w objętości 4 ml/dołek,

- 5×10^5 komórek/ml zawieszono w podłożu wzbogaconym o PMA (100 ng/ml) i hodowano w płytce 24-dołkowej w objętości 1 ml/dołek,

- $2,5 \times 10^5$ komórek/ml zawieszono w podłożu wzbogaconym o PMA (100 ng/ml) i hodowano w płytce 96-dołkowej w objętości 200 µl/dołek,

i hodowano przez 72 h. Po tym czasie pożywkę odciągano, a komórki płukano 3-krotnie w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (*phosphate buffered saline*;

PBS). Po ostatnim płukaniu do komórek dodawano pełne podłoże hodowlane. Tak przygotowane komórki były gotowe do przeprowadzania poszczególnych eksperymentów.

3.2.2. Przygotowanie białek do stymulacji komórek

Białko rDre-MIF-1 uzyskiwano w szczepie ekspresyjnym *E. coli* SoluBL21, a rDre-MIF-2 w *E. coli* BL21. Oba uzyskane białka oczyszczano przy użyciu chromatografii powinowactwa do jonów niklu, jak opisano w publikacji wchodzącej w skład dysertacji. W celu zminimalizowania wytrącania się białka w obecności wysokiego stężenia imidazolu, 2 ml frakcji elucyjnej dializowano od razu po oczyszczaniu do PBS przy użyciu kolumn do wymiany buforu (Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 2 ml, Thermo Scientific) zgodnie z instrukcją producenta. Czystość białka sprawdzano elektroforetycznie, dokonując rozdziału eluatu w żelu poliakrylamidowym o stężeniu 15%.

Endotoksyny usuwano z roztworu białka rekombinowanego przy użyciu Triton X-114. Pod wpływem Triton X-114, LPS tworzy micelle, które następnie agregują w fazę wzbogaconą o środek powierzchniowo czynny. Po rozdzieleniu faz, lipofilna frakcja bogata w LPS może być oddzielona od hydrofilnej fazy białkowej w trakcie wirowania. Roztwory białek (0,5 ml) mieszano z Triton X-114 (Sigma) w końcowym stężeniu 1% poprzez wytrząsanie w probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Próbkę umieszczano w łaźni lodowej (4°C) na 5 minut w celu otrzymania jednorodnej zawiesiny. Po wytrząsaniu schłodzonych próbek, próbki ogrzewano do 37°C przez 5 minut, aby umożliwić wytworzenie się dwóch faz. Próbkę wirowano przez 30 s ($12000 \times g$) w mikrowirówce w temperaturze 37°C. Po odwirowaniu faza lipofilna była widoczna jako oleisty osad na dnie próbki. Górną fazę pobierano do dalszych analiz. Opisaną procedurę powtarzano 3-krotnie (Aida i Pabst 1990; Teodorowicz i wsp. 2017).

W związku z tym, że Triton X-114 jest toksyczny dla komórek, przeprowadzano każdorazowo procedurę usuwania jego śladowych ilości z roztworu białek. W tym celu inkubowano roztwory białek z niepolarnym absorbentem polistyrenowym Bio-Beads SM-2 (BioRad) składającym się z neutralnych, makroporowatych kulek polimerowych wykorzystywanych w chromatografii oddziaływań hydrofobowych. Kulki te służą do adsorpcji substancji niepolarnych lub środków powierzchniowo czynnych z roztworów wodnych. Roztwory białek z kulkami absorbującymi mieszano (w stosunku: 1 ml roztworu do 0,2 g kulek), kołysano na mieszkadle hematologicznym w temperaturze

pokojujowej przez 120 min zgodnie z zaleceniami producenta (Teodorowicz i wsp. 2017). Po tym czasie próbki wirowano ($12000 \times g$) i pobierano roztwór oczyszczonego białka. Białko dializowano do PBS.

Obecność białek w roztworze kontrolowano po każdym etapie przy użyciu techniki SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*). Ponieważ białko rDre-MIF-2 degradowało w trakcie procedury usuwania endotoksyn, nie mogło zostać wykorzystane do planowanych eksperymentów na komórkach. Skuteczność usuwania endotoksyn z rDre-MIF-1 sprawdzano za pomocą zestawu do mierzenia zawartości endotoksyn Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Scientific). Stężenie białka do doświadczeń z wykorzystaniem hodowli komórkowych oceniano przy użyciu zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Wyniki odczytywano za pomocą czytnika mikropłytek BioTek Synergy H1.

3.2.3. Ocena wpływu rDre-MIF-1 na żywotność makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1

W celu sprawdzenia, czy rekombinowane białko wpływa na żywotność makrofagów oraz wykluczenia jego cytotoksycznego działania, przeprowadzono test proliferacji i żywotności komórek z wykorzystaniem zestawu Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche) zgodnie z procedurą producenta.

Makrofagi ustalonej linii komórkowej THP-1 hodowano w 96-dołkowych płytkach hodowlanych w zagęszczeniu 5×10^4 komórek w 200 μ l podłoża. Do komórek dodawano rDre-MIF-1 i LPS w stężeniu 0,1 μ g/ml. Kontrolę ujemną stanowiły komórki utrzymywane w podłożu hodowlanym. Zastosowano 4 czasy inkubacji: 24, 48, 72, 96 h. Wszystkie warianty doświadczenia wykonywano w sześciu powtórzeniach. Po upływie określonego czasu do hodowli dodawano odczynnik XTT (2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboksyanilid) zgodnie z zaleceniami producenta. Wyniki odczytywano przy użyciu czytnika mikropłytek BioTek Synergy H1.

3.2.4. Analiza fosforylacji kinaz w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem rDre-MIF-1

Makrofagi hodowano w 6-dołkowych płytkach hodowlanych w zagęszczeniu 3×10^6 komórek w 4 ml podłoża hodowlanego. Do komórek dodawano rDre-MIF-1 (0,1 μ g/ml) i prowadzono hodowlę w dwóch czasach: 30 min oraz 24 h. Kontrolą ujemną

w eksperymencie były makrofagi stymulowane buforem, w którym było zawieszone białko (PBS). Po inkubacji komórki 3-krotnie płukano buforem PBS, a następnie postępowano zgodnie z protokołem załączonym przez producenta zestawu Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems) w celu sprawdzenia, czy białko wpływa na fosforylację wybranych kinaz.

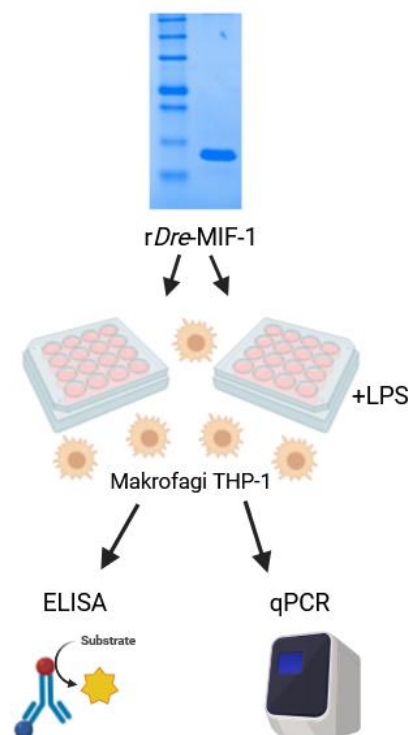
Wizualizacji wyników dokonywano z wykorzystaniem substratu chemiluminescencyjnego (West Pico Chemiluminescent substrate, Thermo Scientific) oraz światłoczułych klisz radiograficznych (Kodak). Intensywność sygnału analizowano przy użyciu programu komputerowego ImageJ.

3.2.5. Ocena aktywności makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem rDre-MIF-1 przy braku i po wstępnej inkubacji z LPS wyrażona syntezą cytokin i ekspresją określonych genów markerów komórkowych

3.2.5.1. Stymulacja komórek

Makrofagi ustalonej linii komórkowej THP-1 hodowano w 24-dołkowych płytkach hodowlanych w zagęszczeniu 5×10^5 komórek/ml. Doświadczenie podzielono na dwa eksperymenty (Ryc. 3). W pierwszym wariancie doświadczenia do hodowli makrofagów dodawano rDre-MIF-1 zawieszone w 10 μ l PBS w 3 stężeniach: 0,001; 0,01 i 0,1 μ g/ml. Kontrolę stanowiła hodowla z dodatkiem takiej samej objętości buforu PBS. W drugim doświadczeniu, do hodowli komórek dodawano LPS (0,1 μ g/ml), a następnie po 2 h dodawano białko w stężeniach podanych powyżej. Kontrolę stanowiła hodowla makrofagów stymulowanych 0,1 μ g/ml LPS. Stymulację prowadzono przez 24 h w inkubatorze (37°C, z dodatkiem 5% CO₂).

Po upływie 24 h odciągano pożywki hodowlane i przechowywano je w probówkach w temperaturze -20°C w celu oznaczenia stężenia cytokin. Komórki w dołkach zawieszano w 200 μ l Fenozolu (A&A Biotechnology), odciągano do probówek, a następnie mrożono w -20°C w celu zabezpieczenia materiału do izolacji RNA. Wszystkie warianty doświadczenia wykonywano w czterech technicznych powtórzeniach. Eksperymenty powtórzono trzykrotnie.



Ryc. 3. Ocena aktywności makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem *rDre-MIF-1* wyrażona syntezą cytokin i ekspresją określonych genów markerów komórkowych – schemat metodyki. Opracowanie własne przy pomocy programu BioRender.com.

3.2.5.2. Oznaczenie stężenia cytokin po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 w podłożu hodowlanym

W podłożach hodowlanych badano stężenie cytokin: $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 oraz IL-10 . W tym celu wykorzystywano zestawy: Human $\text{TNF-}\alpha$ DuoSet ELISA, Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, Human IL-6 DuoSet ELISA, Human IL-10 DuoSet ELISA (R&D Systems). Wyniki odczytywano za pomocą czytnika mikropłytek BioTek Synergy H1.

3.2.5.3. Ocena ekspresji wybranych genów po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 białkiem *rDre-MIF-1*

3.2.5.3.1. Izolacja RNA, trawienie genomowego DNA i uzyskanie cDNA

Z komórek zawieszonych w fenozolu wyizolowano całkowity RNA przy użyciu zestawu do izolacji (A&A Biotechnology). Ponieważ po izolacji RNA w próbkach mogą znajdować się niewielkie ilości DNA genomowego, który mógłby zaburzać wyniki reakcji qPCR, przeprowadzono trawienie genomowego DNA z użyciem DNazy I zgodnie

z protokołem producenta (Thermo Scientific). Roztwory RNA (wolne od zanieczyszczeń DNA) użyto do syntezy cDNA z wykorzystaniem zestawu RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific).

3.2.5.3.2. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR)

Reakcje qPCR przeprowadzano w objętości 12 μ l w 96-dołkowej płytce PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiał się następująco: 2 μ l 40 $\times$ rozcieńczonego cDNA, 1 $\times$ Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), ROX (10 nM), 0,3 μ M mieszaniny starterów (F i R) dla konkretnego genu: *CD206*, *CD163*, *CD80*, *CD86*, *CHI3L1* (*chitinase-3-like protein 1*), *CHI3L2* (*chitinase-3-like protein 2*) i *INOS* (*inducible nitric oxide synthase*) (Tabela 2). Startery do reakcji zostały zaprojektowane w oparciu o sekwencje dostępne w GenBank. W kontroli ujemnej zamiast matrycy użyto 2 μ l buforu, w którym zawieszony był cDNA badanych prób. Oceny ekspresji genu dokonano wykorzystując do obliczeń metodę $\Delta\Delta C_t$ (Livak i Schmittgen 2001). Jako gen referencyjny zastosowano gen kodujący aktynę β (Tabela 2). Warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 2. Wykaz zaprojektowanych starterów użytych w reakcji qPCR

Marker	Sekwencje starterów
<i>CD206</i>	F: 5' GAC ACA AGG AAG ATG GAC CC 3' R: 5' CAG CAC CCG TTA AAA TCA GGA 3'
<i>CD163</i>	F: 5' CAC AAA AAG CCA CAA CAG GTC 3' R: 5' TCC TCT TGA GGA AAC TGC AAG 3'
<i>CD80</i>	F: 5' CCT CTC CTG GTT GGA AAA TGG 3' R: 5' CAT GAA GCT GTG GTT GGT TGT C 3'
<i>CD86</i>	F: 5' GTA ATA AGG GGG CTC CAG G 3' R: 5' GTC TCC TCT TGG CAT ACG G 3'
<i>CHI3L1</i>	F: 5' TCT GTC GGA GGA TGG AAC TT 3' R: 5' GGC GGT ACT GAC TTG ATG AA 3'
<i>CHI3L2</i>	F: 5' TCT TGA CTG CGG GCG TAT CT 3' R: 5' CTT GCT CAG AGG GCT GTT G 3'
<i>INOS</i>	F: 5' ACA GGA GGG GTT AAA GCT GC 3' R: 5' AGA GGA GGC TCC GAT CAA TC 3'
<i>Aktyna β</i>	F: 5' GAG CAT CCC CCA AAG TTC AC 3' R: 5' ACT TCC TGT AAC AAC GCA TCT C 3'

F – forward, R – reverse

Tabela 3. Warunki reakcji qPCR

Etap	Temperatura [°C]	Czas
Aktywacja glikozylazy-DNA usuwającej uracyl	50	2 min
Denaturacja wstępna	95	10 min
Denaturacja	95	15 s
Przyłączanie i wydłużanie starterów	60	60 s
Krzywa topnienia	Zgodnie z protokołem producenta (Stratagene Mx3005P Quantative PCR Instrument)	

40 cykli

3.2.6. Opracowanie statystyczne i graficzne wyników

Wszystkie opracowania statystyczne i graficzne wyników zostały wykonane za pomocą programu GraphPad Prism 9. Do analizy statystycznej zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA) z testem post-hoc (test Tukey’a lub test Dunnett’a).

4. Wyniki

4.1. Wyniki opublikowane

Analiza porównawcza sekwencji aminokwasów (Publikacja 2; Fig. 3) wykazała, że *Dre*-MIF-1 ma wyższy stopień identyczności (40%) z MIF żywiciela (zarówno człowieka, jak i psa) niż *Dre*-MIF-2 (27%). Pomimo że sekwencje aminokwasów *Dre*-MIF-1 i *Dre*-MIF-2 wykazują niski stopień identyczności 27,8% (Publikacja 2; Tabela 2), ich potencjalne struktury trzeciorzędowe wykazują wysoki poziom podobieństwa (Publikacja 2; Fig. 4). Zaobserwowano znacznie wyższy poziom ekspresji genów *Dre*-*mif*-1 i *Dre*-*mif*-2 w stadium dorosłym, w porównaniu do mikrofilarii (Publikacja 2; Fig 2).

Oba białka otrzymano w bakteryjnym systemie ekspresji, przy czym zaobserwowano, że r*Dre*-MIF-1 powstaje w większej ilości i jest skuteczniej oczyszczany w szczepie *E. coli* SoluBL21, a r*Dre*-MIF-2 w BL21 (Publikacja 2; Fig. 1).

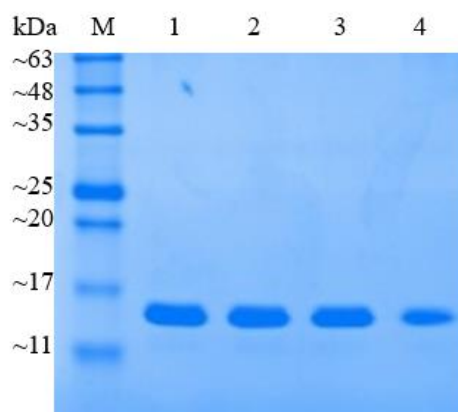
Wykazano, że białko r*Dre*-MIF-1 jest bardziej immunogenne niż r*Dre*-MIF-2 (Publikacja 2; Fig. 5). Surowica myszy immunizowanej r*Dre*-MIF-1 reaguje jednak mniej specyficznie, tworzy reakcje krzyżowe z antygenem r*Dre*-MIF-2, na co wskazują zarówno wyniki testu ELISA (Publikacja 2; Fig. 5), jak i Western blot (Publikacja 2; Fig. 6). Jedynie w przypadku podklasy IgG2 nie obserwuje się reakcji krzyżowych.

U zarażonych psów stwierdzono podwyższony poziom przeciwciał podklasy IgG1 rozpoznających zarówno r*Dre*-MIF-1, jak i r*Dre*-MIF-2 (Fig. 7 Publikacja 2). Nie zaobserwowano istotnych różnic w przypadku całkowitych przeciwciał IgG, IgG2, IgE i IgM u psów zarażonych i niezarażonych *D. repens*.

4.2. Wyniki nieopublikowane

4.2.1. Przygotowanie białek do stymulacji komórek

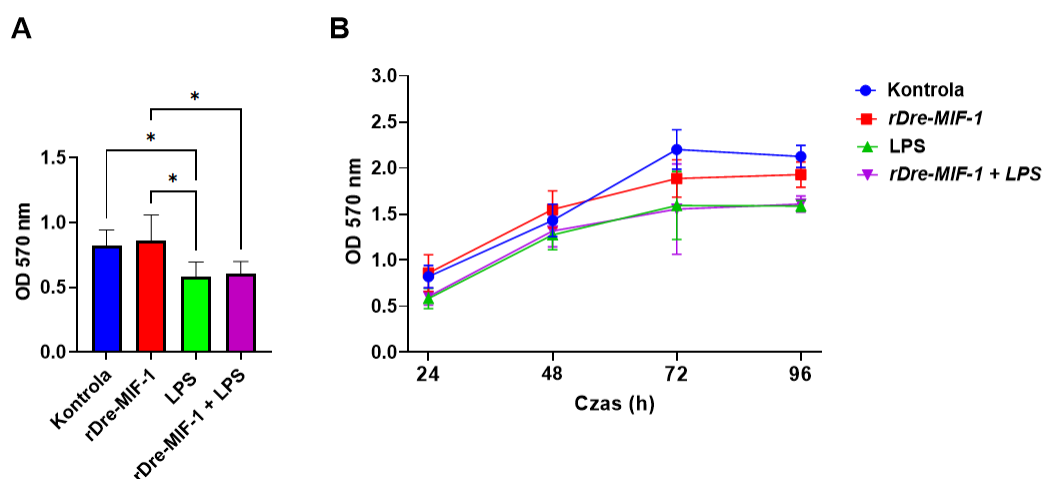
Pełną procedurę oczyszczania białka z endotoksyn udało się przeprowadzić tylko w przypadku r*Dre*-MIF-1. Zauważono nieznaczną stratę białka w kolejnych etapach oczyszczania (Ryc. 4), ale potwierdzono przy użyciu zestawu Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit, że uzyskane białko jest wolne od endotoksyn. Białko r*Dre*-MIF-2 ulegało degradacji na etapie procedury oczyszczania endotoksyn przy użyciu Triton X-114. Przeprowadzenie dalszych analiz z wykorzystaniem tego białka było niemożliwe.



Ryc. 4. Analiza SDS-PAGE obecności białka *rDre-MIF-1* po każdym etapie przygotowania roztworu do stymulacji komórek. Ścieżka 1 - białko (10 μ l) po dializie frakcji elucyjnej do PBS; ścieżka 2 - białko (10 μ l) po oczyszczaniu z endotoksyn przy użyciu Tritonu X-114; ścieżka 3 - białko (10 μ l) po usuwaniu z roztworu Tritonu X-114 przy użyciu Bio-Beads SM-2 Absorbent; ścieżka 4 - białko (10 μ l) oczyszczone z endotoksyn po dializie do PBS; M - wzorzec mas cząsteczkowych (Perfect Tricolor Protein Ladder, EurX).

4.2.2. Ocena wpływu *rDre-MIF-1* na żywotność makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1

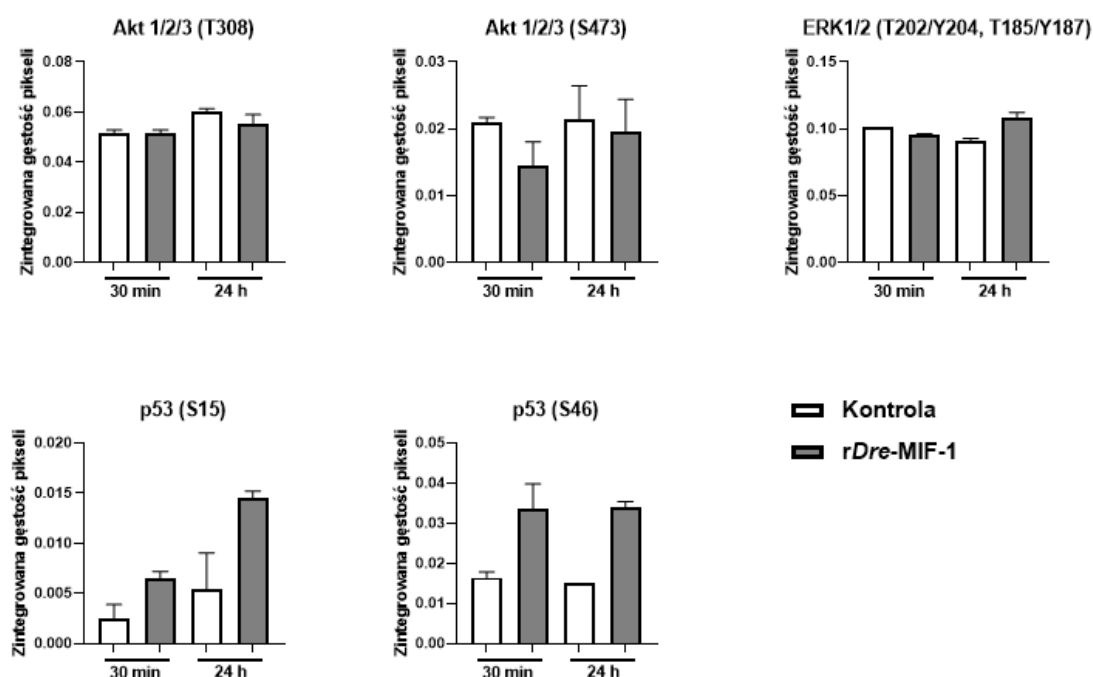
Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie proliferacji i żywotności komórek pomiędzy makrofagami z grupy kontrolnej, a stymulowanymi białkiem *rDre-MIF-1* po 24 h. Zaobserwowano niższą żywotność komórek stymulowanych LPS oraz LPS i białkiem (Ryc. 5). Trend ten utrzymał się do 96 godziny hodowli.



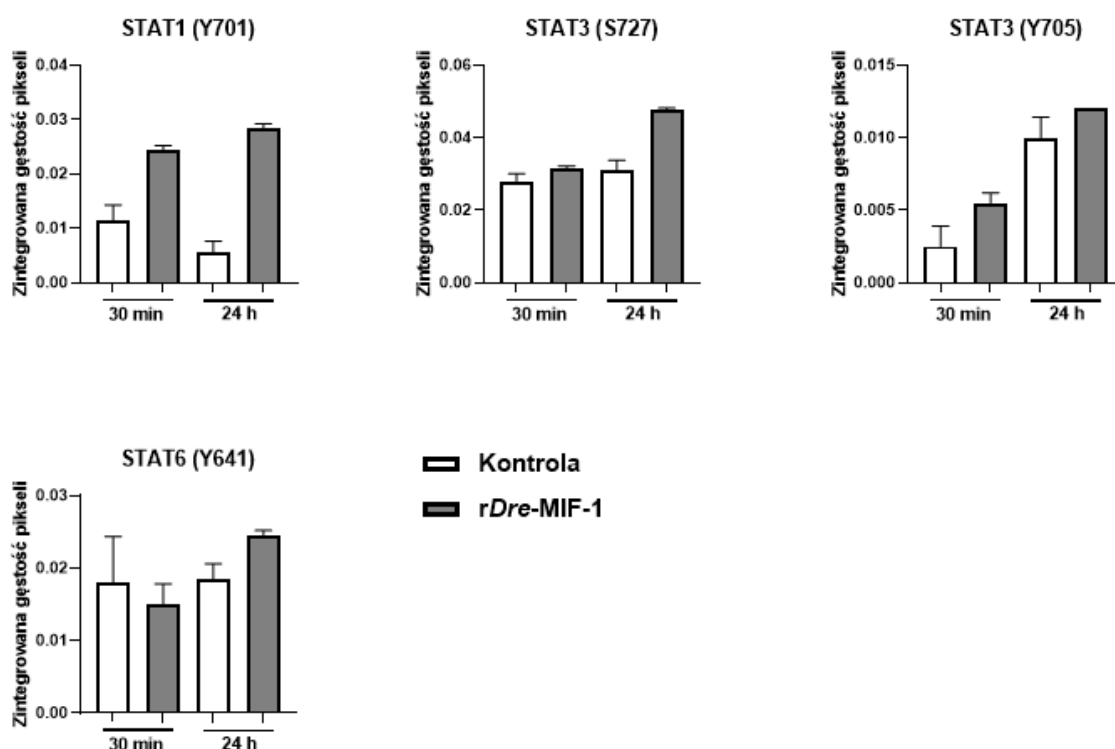
Ryc. 5. Analiza żywotności makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 po stymulacji za pomocą białka *rDre-MIF-1*, LPS oraz *rDre-MIF-1* w obecności LPS. Stężenie *rDre-MIF-1* i LPS 0,1 μ g/ml. Analiza statystyczna wykonana testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Tukey'a) * $p < 0,05$. **A**: stymulacja 24 h; **B**: stymulacja 24, 48, 72, 96 h.

4.2.3. Analiza fosforylacji kinaz w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 po stymulacji białkiem rDre-MIF-1

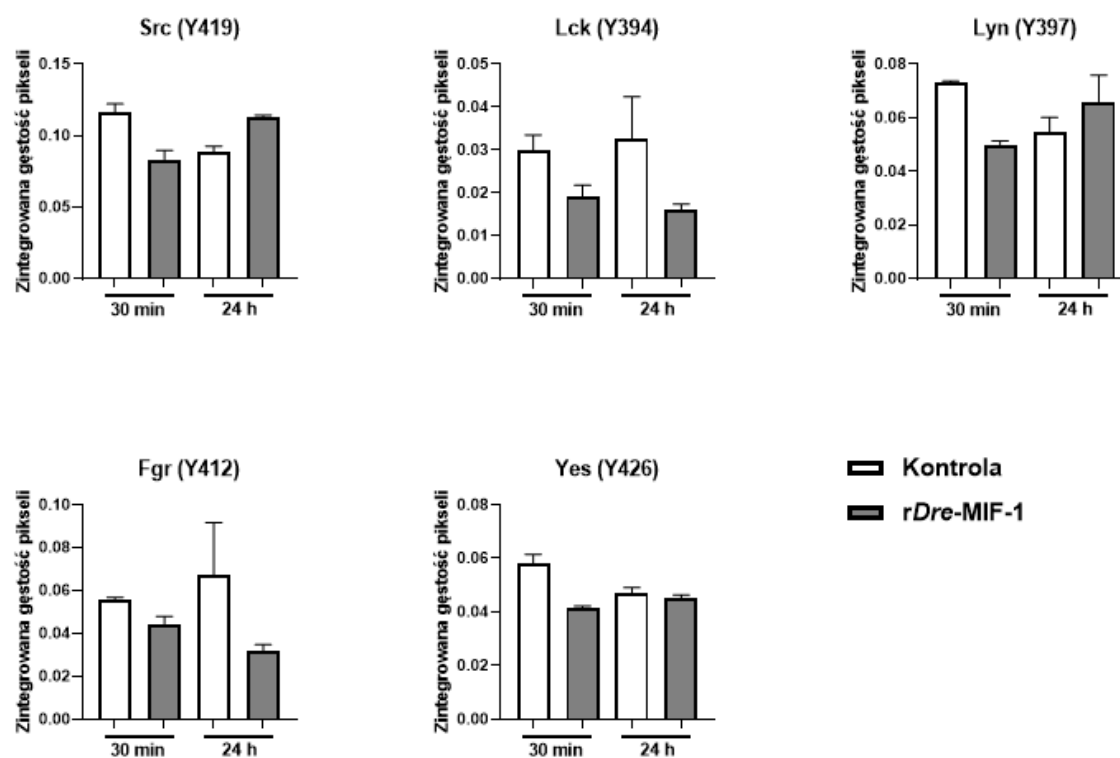
Wykorzystanie testu Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit umożliwiło jednoczesną analizę fosforylacji 37 kinaz komórkowych oraz 2 powiązanych białek. Spośród nich do dalszych analiz wybrano te cząsteczki sygnałowe, które według literatury naukowej są zaangażowane w przebieg sygnału wewnątrzkomórkowego po przyłączeniu się MIF do receptora CD74, w tym kinazy tyrozynowe (*tyrosine-protein kinase*) z rodziny Src, ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), Akt oraz białko p53 (Calandra i Roger 2003; Xu i wsp. 2013) i te, których fosforylacja zmieniała się po stymulacji komórek homologami MIF innych pasożytów. Stymulacja makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 białkiem rDre-MIF-1 po 30 min i 24 h nie powoduje zmian w fosforylacji kinaz Akt1/2/3 oraz ERK1/2, wpływa jednak na wzrost poziomu fosforylacji białka p53 (Ryc. 6). Po 30 min zauważalny jest także niższy poziom fosforylacji kinaz tyrozynowych z rodziny Src (Src, Lyn, Lck, Fgr, Yes) (Ryc. 8). Spośród innych cząsteczek, największe zmiany fosforylacji otrzymano w przypadku przekaźników sygnału i aktywatorów transkrypcji (*signal transducer and activator of transcription*; STAT). Po 30 min i 24 h poziom fosforylacji STAT1 wzrósł, a po 24 h zaobserwowano podwyższony poziom fosforylacji STAT3 oraz STAT6 (Ryc. 7).



Ryc. 6. Analiza fosforylacji kinaz Akt 1/2/3, ERK1/2 i białka p53 w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 po stymulacji rDre-MIF-1.



Ryc. 7. Analiza fosforylacji STAT1, STAT3 i STAT6 w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 po stymulacji rDre-MIF-1.

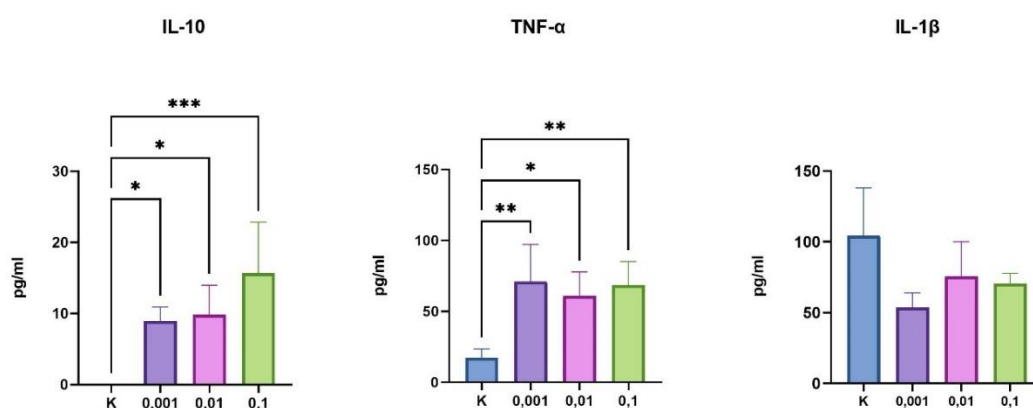


Ryc. 8. Analiza fosforylacji kinaz rodziny Src w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 po stymulacji rDre-MIF-1.

4.2.4. Ocena aktywności makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem *rDre*-MIF-1 przy braku i po wstępnej inkubacji z LPS wyrażona syntezą cytokin i ekspresją określonych genów markerów komórkowych

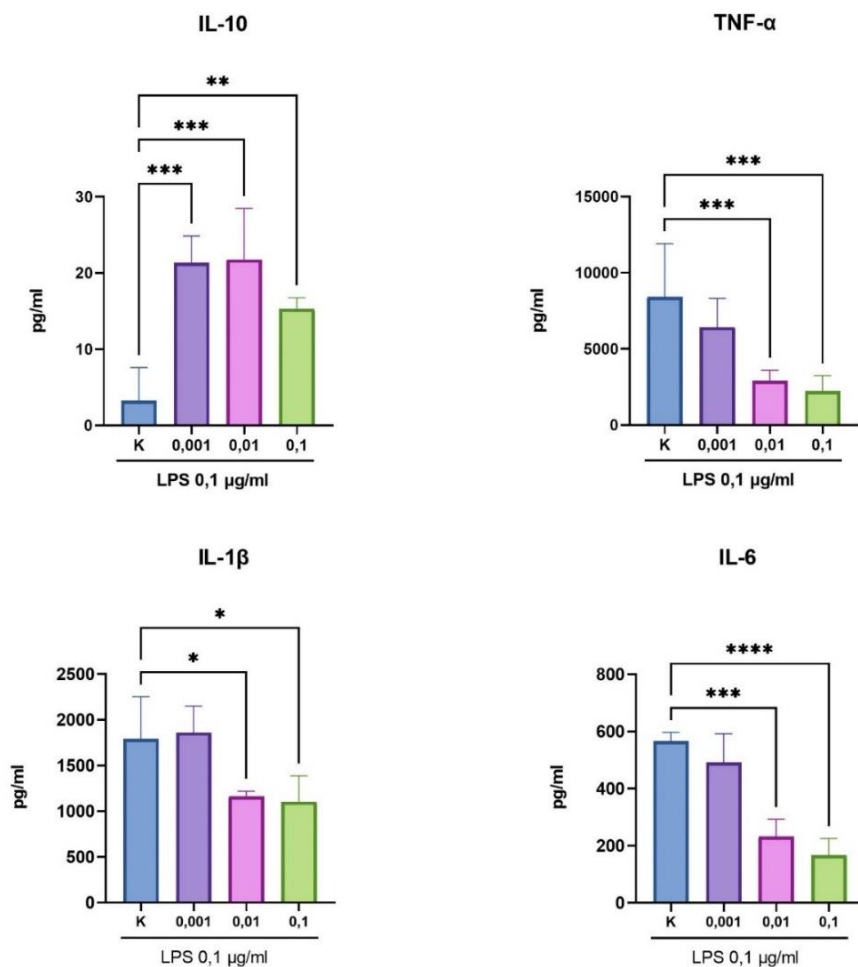
4.2.4.1. Oznaczenie stężenia cytokin po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 w podłożu hodowlanym

Analizę profilu cytokin przeprowadzono w podłożu hodowlanym pobranym po 24 h stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 za pomocą *rDre*-MIF-1 przy braku obecności LPS i po wstępnej stymulacji z LPS. W podłożu hodowlanym po stymulacji komórek *rDre*-MIF-1 wzrósł poziom IL-10 oraz TNF- α . Nie zaobserwowano różnicy w wydzielaniu IL-1 β (Ryc. 9). Zarówno w podłożu po hodowli komórek z kontroli, jak i stymulowanych *rDre*-MIF-1 nie odnotowano wydzielania IL-6. Komórki zareagowały na stymulację LPS, co jest widoczne na Rycinie 10.



Ryc. 9. Wydzielanie cytokin w modelu *in vitro* przez makrofagi ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowane białkiem *rDre*-MIF-1 przez 24 h. Stężenie białka: 0,001 μ g/ml, 0,01 μ g/ml, 0,1 μ g/ml. Analiza statystyczna wykonana jednoczynnikowym testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Dunnett'a) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Wyniki reprezentatywne z trzech niezależnych eksperymentów.

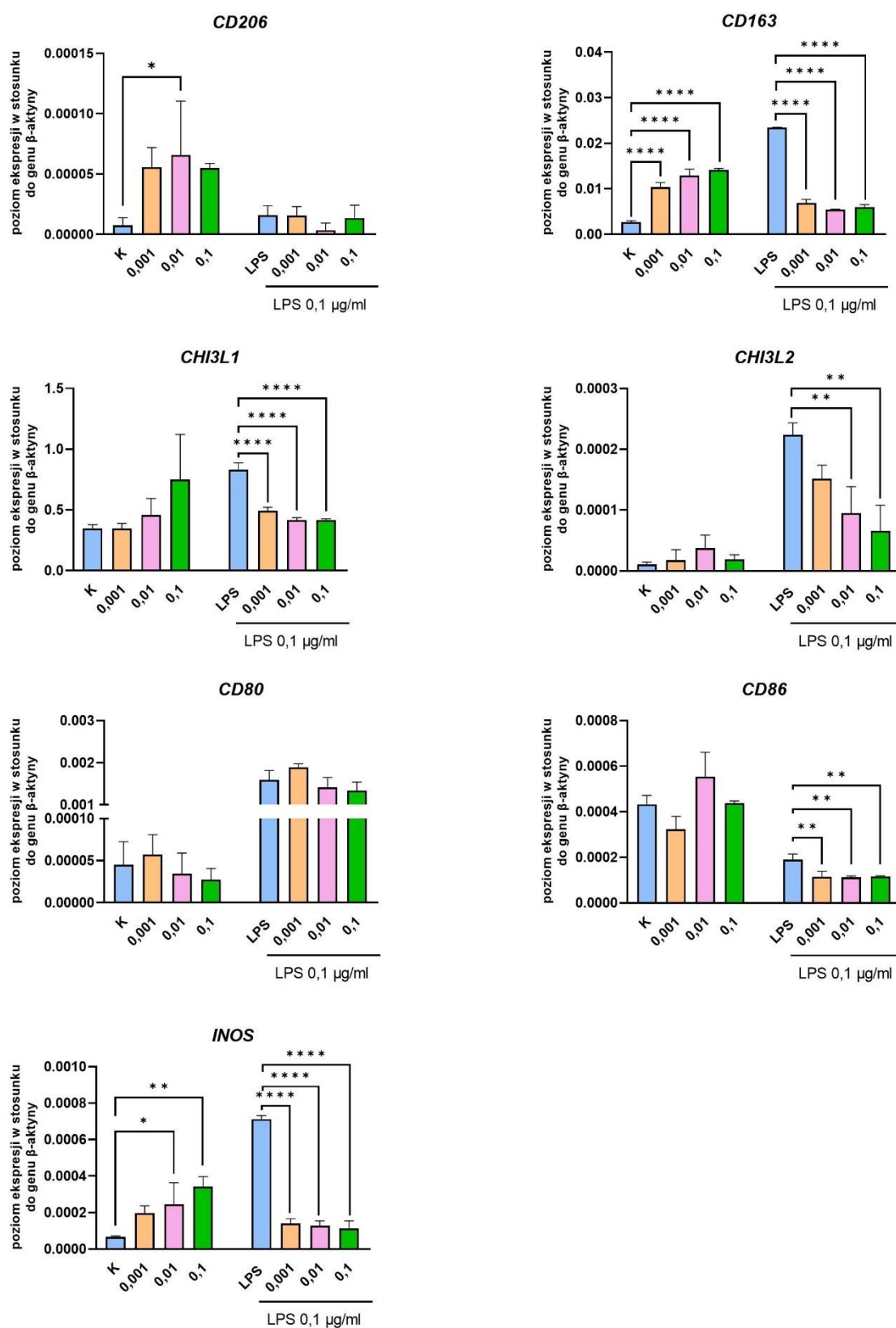
Po stymulacji *rDre*-MIF-1 komórek wstępnie pobudzonych LPS, zaobserwowano wzrost wydzielania IL-10 przy każdym stężeniu białka. Poziom TNF- α , IL-1 β oraz IL-6 spadł w porównaniu do kontroli, ale efekt był zauważalny dopiero przy stężeniu 0,01 μ g/ml i wyższym (Ryc. 10).



Ryc. 10. Wydzielanie cytokin w modelu *in vitro* przez makrofagi wstępnie stymulowane LPS przez 2 h, a następnie białkiem rDre-MIF-1 (24h). Stężenie białka: 0,001 μg/ml, 0,01 μg/ml, 0,1 μg/ml. Stężenie LPS: 0,1 μg/ml. Analiza statystyczna wykonana testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Dunnett'a); * $p < 0,05$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Wyniki reprezentatywne z trzech niezależnych eksperymentów.

4.2.4.2. Ocena ekspresji wybranych genów po stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 białkiem rDre-MIF-1

Po stymulacji komórek rDre-MIF-1 zaobserwowano w makrofagach wzrost ekspresji *CD206*, *CD163* oraz *INOS* w porównaniu do kontroli z PBS. W drugim wariancie doświadczenia, komórki zareagowały na LPS, co widoczne jest we wzroście ekspresji genów wszystkich markerów poza *CD206* i *CD86*. Największy, ponad 35-krotny wzrost, zaobserwowano w przypadku genu kodującego białko *CD80*. Natomiast, dodanie do hodowli białka rDre-MIF-1 po 2 godzinach inkubacji z LPS, spowodowało wyraźny spadek ekspresji *CD163*, *CHI3L1*, *CHI3L2*, *CD86* oraz *INOS* w stosunku do komórek stymulowanych wyłącznie za pomocą LPS (Ryc. 11).



Ryc. 11. Analiza ekspresji wybranych genów w makrofagach ustalonej linii komórkowej THP-1 stymulowanych białkiem rDre-MIF-1 przy braku i po wstępnej inkubacji z LPS. Stężenie białka: 0,001 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml; stężenie LPS (0,1 µg/ml). Analiza statystyczna wykonana testem ANOVA (one-way Anova) z testem post-hoc (test Dunnett'a); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Wyniki reprezentatywne z trzech niezależnych eksperymentów.

5. Dyskusja

Celem niniejszej pracy było określenie roli homologów MIF *D. repens* w układzie pasożyt-żywiciel. Homologi tej konserwatywnej ewolucyjnie cząsteczki wykryto u wielu gatunków pasożytów, głównie u pierwotniaków i nicieni, a ich funkcje wciąż nie są do końca poznane. U większości z nich zidentyfikowano dwa różne homologi (MIF-1 i MIF-2) na podstawie ich podobieństwa do analogicznych białek z modelowego nicienia *Caenorhabditis elegans* (Marson, Tarr, i Scott 2001; Vermeire i wsp. 2008). Opisano je m.in. u blisko spokrewnionych z *D. repens* filarii: *B. malayi* (Pastrana i wsp. 1998), *O. volvulus* (Ajonina-Ekoti i wsp. 2013) i *W. bancrofti* (Sharma i wsp. 2012; Chauhan, Sharma, i Hoti 2015). Z analizy bioinformatycznej wynika, że *Dre*-MIF-1 wykazuje wyższy poziom podobieństwa sekwencji aminokwasów do MIF człowieka i psa, w porównaniu z *Dre*-MIF-2, jednak analiza ich potencjalnych struktur przestrzennych wskazała na wysoki stopień podobieństwa, co może świadczyć o ich podobnym wpływie na układ immunologiczny żywiciela. Mniejsze podobieństwo sekwencji aminokwasów MIF-2 nicieni do MIF człowieka może wskazywać na to, że są one bliżej spokrewnione ewolucyjnie z tautomerazą D-dopachromu (Sato i wsp. 2003; Miska i wsp. 2007).

W badaniach własnych, zgodnie z hipotezą badawczą, potwierdzono ekspresję mRNA kodujących *Dre-mif-1* oraz *Dre-mif-2* zarówno w mikrofilariach, jak i osobniku dorosłym, przy czym jest ona znacznie wyższa w dorosłych nicieniach niż w mikrofilariach. Podobny wynik otrzymano w przypadku MIF *B. malayi*, ale różnica w poziomie ekspresji nie była tak wyraźna (Pastrana i wsp. 1998). Przy użyciu technik immunohistochemicznych potwierdzono także obecność OvMIF-1 w dorosłym nicieniu *O. volvulus* (Ajonina-Ekoti i wsp. 2013). Wysoka ekspresja MIF w dorosłych filiariach sugeruje, że białka te podczas inwazji odgrywają głównie rolę na etapie, gdy dorosłe nicienie umiejscowione są lub wędrują w tkance podskórnej żywiciela. Udział pasożytniczych homologów MIF w modulowaniu odpowiedzi układu immunologicznego żywiciela zdaje się potwierdzać także fakt, że u nicieni, których część cyklu życiowego odbywa się w środowisku zewnętrznym, poziom tych białek jest wysoki tylko w stadium inwazyjnym oraz dorosłym. Jest to szczególnie zauważalne u nicieni, u których do inwazji dochodzi przez skórę. Zaobserwowano, że MIF *A. ceylanicum* był obecny w larwach L3 (stadium inwazyjne) oraz dorosłych osobnikach bytujących w jelicie cienkim. Nie wykryto go jednak w jajach ani larwach L1, które występują w glebie (Cho i wsp. 2007). W przypadku nicienia, u którego występuje przemiana pokoleń, *S. ratti*,

najwyższy poziom białka *SraMIF* zaobserwowano w larwach inwazyjnych, które penetrują tkanki żywiciela (Younis i wsp. 2012).

Rekombinowane *Dre-MIF-1* i *Dre-MIF-2* uzyskano w dwóch szczepach ekspresyjnych *E. coli*: BL21 i SoluBL21, przy czym zaobserwowano, że oczyszczanie *rDre-MIF-1* jest bardziej wydajne po ekspresji w SoluBL21, a *rDre-MIF-2* w BL21. Otrzymano białka o wielkości około 17 kDa. Procedurę uzyskiwania i oczyszczania białek dopracowano tak, aby proces był powtarzalny. Podjęto także próby syntezy białek w eukariotycznym systemie ekspresji z wykorzystaniem trzech szczepów drożdży *Pichia pastoris* (X-33, GS115, KM71H), ale pomimo potwierdzenia skuteczności transformacji cDNA kodującymi badane białka, komórki drożdży nie wytwarzały ani *rDre-MIF-1*, ani *rDre-MIF-2*. Z tego powodu w niniejszej pracy nie zamieszczono opisu tej części badań. Należy jednak podkreślić fakt, że wszystkie homologi MIF nicieni opisane dotychczas w literaturze zostały uzyskane z wykorzystaniem systemu prokariotycznego (*E. coli*). Natomiast, brak jest doniesień dotyczących uzyskania tych białek z zastosowaniem drożdży lub innego systemu eukariotycznego.

rDre-MIF-1 i *rDre-MIF-2* zostały wykorzystane do immunizacji myszy w celu otrzymania surowicy poliklonalnej. Surowice te użyto do oceny immunogenności badanych białek. Wykazano, że *rDre-MIF-1* jest bardziej immunogenny niż *rDre-MIF-2*. Przeciwciała IgG anty-*rDre-MIF-1* rozpoznawały jednak oba białka oraz zaobserwowano silną reakcję krzyżową, podczas gdy, przeciwciała IgG anty-*rDre-MIF-2* reagowały bardziej swoiście, co uwidacznia analiza Western blot. Takich reakcji krzyżowych nie zaobserwowano w badaniach dotyczących MIF *O. volvulus* i *S. ratti* (Younis i wsp. 2012; Ajonina-Ekoti i wsp. 2013). Podobnie jednak potwierdzono, że *OvMIF-1* był znacznie bardziej immunogenny niż *OvMIF-2* (Ajonina-Ekoti i wsp. 2013).

Przeprowadzono ocenę obecności przeciwciał IgG, IgG1, IgG2, IgM oraz IgE specyficznych dla cząsteczek MIF *D. repens* w surowicy psów naturalnie zarażonych. Istotną różnicę między zarażonymi i niezarażonymi psami zaobserwowano jedynie w przypadku przeciwciał IgG1 specyficznych dla obu białek. Wyniki te są zgodne z ustaleniami innych autorów, którzy zauważyli, że w surowicy psów naturalnie zarażonych *D. immitis* występowały zarówno przeciwciała IgG1, jak i IgG2 specyficzne dla białek pasożyta, jednak IgG1 były dominującą podklasą (Deplazes i wsp. 1995).

W innych badaniach zauważono różnicę w poziomie przeciwciał podklas IgG1 i IgG2 skierowanych przeciwko antygenom somatycznym *D. repens* u psów,

u których we krwi obecne były mikrofilarie i u tych, u których inwazja była utajona (znajdowano jedynie dorosłe nicienie w tkankach). U psów z potwierdzoną mikrofilarią poziom IgG1 był wyższy w stosunku do IgG2, co jest charakterystyczne dla odpowiedzi zależnej od limfocytów Th2 (Wysmołek i wsp. 2022). W badaniach własnych psy dodatnie klasyfikowano na podstawie dodatniego wyniku testu Knott'a, czyli w ich krwi obecne były mikrofilarie. Podwyższony poziom IgG1 skierowanych przeciwko rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2 u psów zarażonych może świadczyć o istotnym udziale tej podklasy przeciwciał w przebiegu dirofilariozy u żywicieli, w których krwiobieg krąży mikrofilarie. Wyższy poziom tych przeciwciał u psów dodatnich może być także związany z tym, że rozpuszczalne antygeny białkowe i białka błonowe indukują głównie IgG1, podczas gdy przeciwciała podklasy IgG2 obserwowane są głównie w reakcji na polisacharydy bakteryjne (Jefferis i Kumararatne 1990; Vidarsson, Dekkers, i Rispiens 2014; Andualet i wsp. 2020).

Wciąż trwają badania mające na celu opracowanie testu serologicznego, który miałby zastosowanie w okresie prepatentnym inwazji lub w przypadku inwazji jednopłciowych, ponieważ obecne metody opierają się głównie na wykrywaniu mikrofilarii lub ich materiału genetycznego we krwi. Badane antygeny, rDre-MIF-1 i rDre-MIF-2, okazały się zbyt mało specyficzne, aby mogły zostać użyte w opracowaniu nowego narzędzia diagnostycznego. Uzyskane dane pokazują jednak, że różne podklasy IgG wykazują odmienne powinowactwo i specyficzność wobec analizowanych antygenów. Należy zatem wziąć to pod uwagę przy opracowywaniu testów diagnostycznych, które zwykle opierają się jedynie na wykrywaniu całkowitych IgG.

Kolejnym celem niniejszej pracy było określenie wpływu dwóch homologów MIF *D. repens* na aktywność makrofagów człowieka w modelu *in vitro*. Przygotowanie rekombinowanych białek pozyskanych w bakteryjnym systemie ekspresji do tego typu badań wymaga procesu ich oczyszczania z endotoksyn. Procedura usuwania endotoksyn z roztworu białka okazała się skuteczna jedynie w przypadku rDre-MIF-1. Białko rDre-MIF-2 ulegało degradacji na tym etapie badań, więc jego wykorzystanie do stymulacji makrofagów nie było możliwe. Założony cel zrealizowano więc z wykorzystaniem białka rDre-MIF-1.

Badania dotyczące pasożytniczych homologów MIF wskazują na to, że białka te wpływają na aktywność monocytów i makrofagów, czyli komórek efektorowych odporności nieswoistej, niezbędnych do rozpoznawania i eliminowania patogenów, hamując np. ich losową migrację oraz zmieniając poziom wydzielanych przez nie cytokin

i tlenu azotu. Wciąż jednak nie do końca wiadomo, czy są antagonistami MIF żywiciela, jaki jest dokładny mechanizm ich działania oraz czy spełniają podobną rolę w przebiegu inwazji różnych gatunków pasożytów. Zewnątrzkomórkowy MIF ssaków łączy się z receptorem CD74 i aktywuje kinazy z rodziny Src oraz ERK/MAPK, a następnie PI3K/Akt, cykliny D1, czynniki transkrypcyjne ETS (*E-twenty-six transcription factor family*) i AP-1 (*activator protein 1*), co wpływa na cykl komórkowy, migrację, proliferację komórek oraz działanie prozapalne (m.in. wydzielanie TNF- α , IL-1 β i PGE2). Interakcja MIF z receptorem CD74 może także zahamować, zależną od białka p53, apoptozę co przedłuża życie komórek uczestniczących w stanie zapalnym (Calandra i Roger 2003; Xu i wsp. 2013; Xia i wsp. 2023). Homologi MIF nicieni mogą łączyć się z receptorem CD74, co zostało udowodnione w przypadku podobnych białek np. z *A. ceylanicum* (Cho i wsp. 2007), *S. ratti* (Younis i wsp. 2012), *T. spiralis* (Huang i wsp. 2022), co mogłoby sugerować, że działają podobnie, jak MIF żywiciela. Po stymulacji makrofagów rDre-MIF-1 nie zaobserwowano wzrostu poziomu fosforylacji kinaz Akt oraz ERK1/2 przy jednoczesnym spadku fosforylacji kinaz z rodziny Src (Src, Fgr, Lyn, Yes, Lck) oraz wzroście fosforylacji białka p53, co sugeruje, że ma on odmienny mechanizm działania niż MIF ssaków.

W przypadku stymulacji makrofagów ustalonej linii komórkowej THP-1 rekombinowanym białkiem *T.cp*-MIF stwierdzono fosforylację kinaz PI3K i Akt, ale dopiero po 48 i 72 h hodowli (Cai i wsp. 2021). Po stymulacji makrofagów myszy *Ts*MIF stwierdzono fosforylację ERK1/2, ale była ona znacznie mniej intensywna niż po stymulacji MIF człowieka (Huang i wsp. 2022). W badaniach własnych nie zaobserwowano różnicy w poziomie żywotności makrofagów pod wpływem rDre-MIF-1. Białko to nie wpływało także na zahamowanie działania wywołanego przez LPS, który powodował niewielkie obniżenie żywotności badanych komórek.

W badaniach dotyczących homologów MIF *A. simplex* (Park i wsp. 2017) oraz *T. spiralis* (Huang i wsp. 2022) potwierdzono, że białka te mogą wchodzić w interakcję z białkiem wiążącym aktywującym Jun 1 (*Jun-activating binding protein 1*; JAB-1). MIF ssaków po endocytozie łączy się z JAB-1, co skutkuje zahamowaniem aktywacji czynnika transkrypcyjnego JUN (*transcription factor Jun*; JUN) i degradacji białka KIP1 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy (Kleemann i wsp. 2000; Calandra i Roger 2003). Nie można więc wykluczać, że rDre-MIF-1 wnika do komórek i łączy się z JAB-1 przez co zniesione zostaje zahamowanie apoptozy zależne od białka p53, co widoczne jest w podwyższonym

poziomie fosforylacji tego białka (badania własne). Aby to potwierdzić potrzebne są jednak dalsze badania ukierunkowane na poszczególne ścieżki sygnałowe (np. z wykorzystaniem analizy Western blot) oraz badania, które pozwoliłyby potwierdzić, że rDre-MIF-1 wnika do makrofagów i łączy się z białkiem JAB-1.

Liczne badania dotyczące antygenów pasożytów sugerują, że mogą one wpływać na polaryzację makrofagów w kierunku M2, które mają zdolność naprawy i przebudowy tkanek oraz ograniczania nadmiernego stanu zapalnego poprzez wydzielanie cytokin immunomodulujących (Prieto-Lafuente i wsp. 2009; Zhu i wsp. 2014; Coakley i Harris 2020; Cai i wsp. 2021). Co więcej, niektóre badania pokazują, że mogą one stymulować przejście zróżnicowanych prozapalnie makrofagów M1 do M2 (Zhu i wsp. 2014; He i wsp. 2017). Wydaje się więc, że homologi MIF nicieni polaryzują makrofagi w kierunku M2 i mają przeciwzapalne działanie (Pastrana i wsp. 1998; Prieto-Lafuente i wsp. 2009; Ramani i wsp. 2020; Cai i wsp. 2021; Yin i wsp. 2023). W celu sprawdzenia wpływu rDre-MIF-1 na kierunek polaryzacji makrofagów zbadano ekspresję genów kodujących białka specyficzne dla makrofagów M1 (INOS, CD80, CD86) oraz M2 (CD206, CD163) (Stöger i wsp. 2012; Wei i wsp. 2023; Peng i wsp. 2023). Analizie poddano również geny kodujące białka podobne do chitynazy: CHI3L1 i CHI3L2, których podwyższony poziom jest obserwowany w przewlekłych chorobach zapalnych i autoimmunologicznych (Park, Drazen, i Tschumperlin 2010; Di Rosa i wsp. 2013; Tizaoui i wsp. 2022; Yu i wsp. 2024). Ponadto, określono stężenie cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1 β i IL-6) oraz przeciwzapalnej (IL-10). Po stymulacji makrofagów rDre-MIF-1 zaobserwowano wzrost wydzielania IL-10 i TNF- α . Odnotowano wzrost poziomu ekspresji genów M2: CD206, CD163 oraz M1: INOS, a także podniesiony poziom fosforylacji zarówno STAT1 (obserwowany w makrofagach M1) i STAT3 (obserwowany w makrofagach M2) (Peng i wsp. 2023). Podwyższony poziom ekspresji INOS w swoich badaniach potwierdził także po 24 h zespół badający wpływ *T.cp*-MIF na makrofagi ustalonej linii komórkowej THP-1. Po wydłużeniu czasu hodowli do 48 i 72 h zaobserwowali oni jednak wzrost poziomu ekspresji markerów M2 (Cai i wsp. 2021). Obserwując zarówno wzrost ekspresji markerów M1, jak i M2 trudno określić więc fenotyp badanych komórek po stymulacji rDre-MIF-1. Makrofagi są na tyle plastyczne, że mogą znajdować się w stanie przejściowym, tworzyć stadia hybrydowe lub zmieniać fenotyp pod wpływem różnych czynników (Locati, Curtale, i Mantovani 2020; Avila-Ponce de León i wsp. 2021).

W kolejnym etapie doświadczenia, makrofagi ustalonej linii komórkowej THP-1 inkubowano z LPS. Zaobserwowano ich prozapalną aktywację wyrażoną poprzez

wielokrotny wzrost ekspresji genów wszystkich badanych markerów, oprócz *CD206* i *CD86*, oraz zwiększenie wydzielania IL-6, IL-1 β , TNF- α . Tak aktywowane makrofagi stymulowano rDre-MIF-1, co spowodowało zahamowanie ekspresji genów *CD163*, *CHI3L1*, *CHI3L2*, *CD86*, *INOS* oraz istotny spadek poziomu cytokin prozapalnych. Wyniki te pokazują, że rDre-MIF-1 ma immunomodulacyjne właściwości, a dokładniej, znosi działanie prozapalne wywołane przez LPS. Podobne wyniki uzyskano w badaniach dotyczących MIF *H. contortus* w doświadczeniu z wykorzystaniem monocytów kozy (Wang i wsp. 2017). Takie działanie wydaje się być korzystne dla przeżycia pasożyta w tkankach. Przeciwwzapalne właściwości białek nicieni pasożytniczych mogą zostać wykorzystane w terapiach chorób autoimmunologicznych i alergicznych. Park i wsp. (2009) przeprowadzili badanie, w którym wykazali, że rekombinowany homolog MIF *A. simplex* (rAs-MIF) redukuje stan zapalny w drogach oddechowych u myszy wywołany owalbuminą. Rekombinowany As-MIF hamował także zapalenie jelit i wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, TNF- α i IFN- γ (Cho, Lee, i Yu 2011). Podobne badania przeprowadzono z użyciem rekombinowanego MIF *W. bancrofti*. Ekspresja genów kodujących cytokiny prozapalne (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A) została znacznie wyciszona w tkance jelita grubego i makrofagach otrzewnowych myszy, którym podawano rWba-MIF-2, co sugeruje, że jest on silnym czynnikiem immunoregulacyjnym, który może zahamować stan zapalny (Ramani i wsp. 2020). Zahamowanie wydzielania cytokin prozapalnych przez makrofagi pobudzone przez LPS pod wpływem rDre-MIF-1 sugeruje więc, że białko to może mieć potencjał leczniczy w chorobach związanych z nadmierną aktywacją układu immunologicznego. Warto więc w przyszłości przeprowadzić badania z wykorzystaniem tego białka na modelu zwierzęcym.

6. Podsumowanie i wnioski

1. Pomimo umiarkowanej identyczności sekwencji aminokwasów *Dre*-MIF-1 i *Dre*-MIF-2 (27,8%), ich potencjalne struktury trzeciorzędowe wykazują wysoki poziom podobieństwa, co może wskazywać na ich podobny wpływ na układ immunologiczny żywiciela.
2. Poziom ekspresji genów *Dre-mif-1* i *Dre-mif-2* jest znacznie wyższy w osobnikach dorosłych niż w mikrofilariach, co może wskazywać na to, że badane białka pełnią funkcje immunomodulacyjne, pozwalające na przeżycie dorosłych osobników w tkance podskórnej żywiciela.
3. Prokariotyczny system ekspresyjny pET umożliwia uzyskanie rekombinowanych białek *Dre*-MIF-1 oraz *Dre*-MIF-2.
4. r*Dre*-MIF-1 jest bardziej immunogenny niż r*Dre*-MIF-2 u myszy.
5. Rekombinowane homologi MIF są specyficznie rozpoznawane jedynie przez przeciwciała podklasy IgG1 psów naturalnie zarażonych *D. repens*.
6. Badane antygeny rekombinowane nie są wystarczająco specyficzne, aby mogły być użyte do opracowania nowego narzędzia diagnostycznego. Uzyskane wyniki sugerują jednak, że przy projektowaniu testu serologicznego do wykrywania inwazji pasożytniczych należy wziąć pod uwagę różnice w specyficzności i reaktywności poszczególnych klas przeciwciał z analizowanymi antygenami, zwłaszcza przeciwciał IgG1 i IgG2.
7. r*Dre*-MIF-1 wpływa na aktywność makrofagów, jednak na podstawie otrzymanych wyników nie można stwierdzić, czy powoduje ich polaryzację do w kierunku fenotypu M1 lub M2.
8. r*Dre*-MIF-1 hamuje wydzielanie cytokin prozapalnych przez makrofagi wstępnie pobudzone LPS, co świadczy o jego przeciwzapalnych właściwościach i potwierdza jego immunomodulacyjne działanie.
9. Dokładny mechanizm działania *Dre*-MIF-1, w przebiegu inwazji, pozostaje nieznany, ale wyniki badań własnych w połączeniu z danymi literaturowymi wskazują na jego właściwości hamujące stan zapalny. Działanie to może być korzystne dla przetrwania dorosłych nicieni *D. repens* w tkankach żywiciela.

7. Piśmiennictwo

1. Aida, Y., Pabst, M.J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. (1990). *Journal of Immunological Methods*, 132(2):191-5. doi: 10.1016/0022-1759(90)90029-u.
2. Ajonina-Ekoti, I., Kurosinski, M.A., Younis, A.E., Ndjonka, D., Tanyi, M.K., Achukwi, M., Eisenbarth, A., Ajonina, C., Lüersen, K., Breloer, M., Brattig, N.W., Liebau, E. (2013). Comparative analysis of macrophage migration inhibitory factors (MIFs) from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus* and the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology Research*, 112(9):3335-46. doi: 10.1007/s00436-013-3513-1.
3. Andualem, H., Kiros, M., Getu, S., Hailemichael, W. (2020). Immunoglobulin G2 Antibody as a Potential Target for COVID-19 Vaccine. *ImmunoTargets and Therapy*, 9:143-149. doi: 10.2147/ITT.S274746.
4. Avila-Ponce de León, U., Vázquez-Jiménez, A., Matadamas-Guzman, M., Pelayo, R., Resendis-Antonio, O. (2021). Transcriptional and Microenvironmental Landscape of Macrophage Transition in Cancer: A Boolean Analysis. *Frontiers in Immunology*, 12:642842. doi: 10.3389/fimmu.2021.642842.
5. Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gems, D., Donnelly, T., Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(15):7849-54. doi: 10.1073/pnas.93.15.7849.
6. Bloom, B.R., Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, 153(3731):80-82. doi:10.1126/science.153.3731.80.
7. Borkowski, P.K., Rymkiewicz, G., Gołbiewska, J., Nestoros, N., Romejko-Jarosińska, J., Żarnowska-Prymek, H., Masny, A., Pałucki, J., Cielecka D. (2015). The first case of human autochthonous subconjunctival dirofilariosis in Poland and MALT lymphoma as possible consequence of this parasitosis, *Infectious Agents and Cancer*. 10(1):1. doi: 10.1186/1750-9378-10-1.
8. Bozza, M.T., Martins, Y.C., Carneiro, L.A., Paiva, C.N. (2012). Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections. *Journal of Parasitology Research*, 2012:413052. doi: 10.1155/2012/413052.

9. Cai, J., Huang, L., Tang, H., Xu, H., Wang, L., Zheng, M., Yu, H., Liu, H. (2021). Macrophage migration inhibitory factor of *Thelazia callipaeda* induces M2-like macrophage polarization through TLR4-mediated activation of the PI3K-Akt pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(9):e21866. doi: 10.1096/fj.202100676R.
10. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Bucala, R. (1994). The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 179(6):1895-902. doi: 10.1084/jem.179.6.1895.
11. Calandra, T., Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3(10):791-800. doi: 10.1038/nri1200.
12. Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., Danesi, P., Fuehrer, H.P., Giannelli, A., Ionică, A.M., Maia, C., Modrý, D., Montarsi, F., Krücken, J., Papadopoulos, E., Petrić, D., Pfeffer, M., Savić, S., Otranto, D., Poppert, S., Silaghi, C. (2018). Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 11(1):663. doi: 10.1186/s13071-018-3205-x.
13. Cavalli, E., Ciurleo, R., Petralia, M.C., Fagone, P., Bella, R., Mangano, K., Nicoletti, F., Bramanti, P., Basile, M.S. (2020). Emerging Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor Family of Cytokines in Neuroblastoma. Pathogenic Effectors and Novel Therapeutic Targets? *Molecules*, 25(5):1194. doi: 10.3390/molecules25051194.
14. Chauhan, N., Hoti, S.L. (2016). Role of cysteine-58 and cysteine-95 residues in the thiol di-sulfide oxidoreductase activity of Macrophage Migration Inhibitory Factor-2 of *Wuchereria bancrofti*. *Acta Tropica*, 153:14-20. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.09.017.
15. Chauhan, N., Sharma, R., Hoti, S.L. (2015). Identification and biochemical characterization of macrophage migration inhibitory factor-2 (MIF-2) homologue of human lymphatic filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*. *Acta Tropica*, 142:71-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.10.009.
16. Cho, Y., Jones, B.F., Vermeire, J.J., Leng, L., DiFedele, L., Harrison, L.M., Xiong, H., Kwong, Y.K., Chen, Y., Bucala, R., Lolis, E., Cappello, M. (2007). Structural and functional characterization of a secreted hookworm Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) that interacts with the human MIF receptor CD74. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(32):23447-56. doi: 10.1074/jbc.M702950200

17. Cho, M.K., Lee, C.H., Yu, H.S. (2011). Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through toll-like receptor 2. *Parasite Immunology*, 33(5):265-75. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01276.x.
18. Coakley, G., Harris, N.L. (2020). Interactions between macrophages and helminths. *Parasite Immunology*, 42(7):e12717. doi: 10.1111/pim.12717.
19. Cournia, Z., Leng, L., Gandavadi, S., Du, X., Bucala, R., Jorgensen, W.L. (2009). Discovery of human macrophage migration inhibitory factor (MIF)-CD74 antagonists via virtual screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(2):416-24. doi: 10.1021/jm801100v.
20. Daryadel, A., Grifone, R.F., Simon, H.U., Yousefi, S. (2006). Apoptotic neutrophils release macrophage migration inhibitory factor upon stimulation with tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(37):27653-61. doi: 10.1074/jbc.M604051200.
21. David, J.R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(1):72-7. doi: 10.1073/pnas.56.1.72.
22. Demiaszkiewicz, A.W., Polańczyk, G., Pyziel, A.M., Kuligowska, I., Lachowicz, J. (2009). Pierwsze ogniska dirofilariozy psów wywołanej przez *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 w centralnej Polsce [The first foci of dirofilariosis of dogs evoked by *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 in central Poland]. *Wiadomości Parazytologiczne*. 55(4):367-70.
23. Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J. (1995). Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunology*. 17(9):451-8. doi: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb00914.x.
24. Di Rosa, M., Tibullo, D., Malaguarnera, M., Tuttobene, M., Malaguarnera, L. (2013). Comparison of YKL-39 and CHIT-1 expression during macrophages differentiation and polarization. *Modern Research in Inflammation*, 2(4):82-89. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/mri.2013.24011>

25. Falcone, F.H., Loke, P., Zang, X., MacDonald, A.S., Maizels, R.M., Allen, J.E. (2001). A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(9):5348-54. doi: 10.4049/jimmunol.167.9.5348.
26. Fuehrer, H.P., Morelli, S., Unterköfler, M.S., Bajer, A., Bakran-Lebl, K., Dwużnik-Szarek, D., Farkas, R., Grandi, G., Heddergott, M., Jokelainen, P., Knific, T., Leschnik, M., Miterpáková, M., Modrý, D., Petersen, H.H., Skírnisson, K., Vergles Rataj, A., Schnyder, M., Strube, C. (2021). *Dirofilaria* spp. and *Angiostrongylus vasorum*: Current Risk of Spreading in Central and Northern Europe. *Pathogens*, 10(10):1268. doi: 10.3390/pathogens10101268.
27. Gazzinelli-Guimaraes, P.H., Nutman, T.B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research*, 7:F1000 Faculty Rev-1685. doi: 10.12688/f1000research.15596.1.
28. Genchi, C., Kramer, L. (2017). Subcutaneous dirofilariosis (*Dirofilaria repens*): an infection spreading throughout the old world. *Parasites & Vectors*, 10(Suppl 2):517. doi: 10.1186/s13071-017-2434-8.
29. Harris, J., VanPatten, S., Deen, N.S., Al-Abed, Y., Morand, E.F. (2019). Rediscovering MIF: New Tricks for an Old Cytokine. *Trends in Immunology*, 40(5):447-462. doi: 10.1016/j.it.2019.03.002.
30. Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1):1-11. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.04.008.
31. He, X., Gong, P., Wei, Z., Liu, W., Wang, W., Li, J., Yang, Z., Zhang, X. (2017). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated polarization of macrophages in *Neospora caninum* infection. *Experimental Parasitology*, 178:37-44. doi: 10.1016/j.exppara.2017.05.002.
32. Huang, S., Qiu, Y., Ma, Z., Su, Z., Hong, W., Zuo, H., Wu, X., Yang, Y. (2022). A secreted MIF homologue from *Trichinella spiralis* binds to and interacts with host monocytes. *Acta Tropica*, 234:106615. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106615.
33. Jankauskas, S.S., Wong, D.W.L., Bucala, R., Djudjaj, S., Boor, P. (2019). Evolving complexity of MIF signaling. *Cell Signalling*, 57:76-88. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.01.006.

34. Jefferis, R., Kumararatne, D.S. (1990). Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical and Experimental Immunology*, 81(3):357-67. doi: 10.1111/j.1365-2249.1990.tb05339.x.
35. Katawa, G., Layland, L.E., Debrah, A.Y., von Horn, C., Batsa, L., Kwarteng, A., Arriens, S., W Taylor, D., Specht, S., Hoerauf, A., Adjobimey, T. (2015). Hyperreactive onchocerciasis is characterized by a combination of Th17-Th2 immune responses and reduced regulatory T cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1):e3414. doi: 10.1371/journal.pntd.0003414.
36. Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentscher, A., Flieger, O., Johannes, F.J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H., Bernhagen, J. (2000). Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, 408(6809):211-6. doi: 10.1038/35041591.
37. Kłudkowska, M., Pielok, Ł., Frąckowiak, K., Masny, A., Gołąb, E., Paul, M. (2018). *Dirofilaria repens* infection as a cause of intensive peripheral microfilariemia in a Polish patient: process description and cases review. *Acta Parasitologica*, 63(3):657-663. doi: 10.1515/ap-2018-0077.
38. Kwarteng, A., Ahuno, S.T. (2017). Immunity in Filarial Infections: Lessons from Animal Models and Human Studies. *Scandinavian Journal of Immunology*, 85(4):251-257. doi: 10.1111/sji.12533.
39. Lechner, A., Bohnacker, S., Esser-von Bieren, J. (2021). Macrophage regulation & function in helminth infection. *Seminars in Immunology*, 53:101526. doi: 10.1016/j.smim.2021.101526.
40. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
41. Locati, M., Curtale, G., Mantovani, A. (2020). Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology*, 15:123-147. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
42. Lubetsky, J.B., Swope, M., Dealwis, C., Blake, P., Lolis, E. (1999). Pro-1 of macrophage migration inhibitory factor functions as a catalytic base in the phenylpyruvate tautomerase activity. *Biochemistry*. 38(22):7346-54. doi: 10.1021/bi990306m.

43. MacDonald, A.S., Maizels, R.M. (2008). Alarming dendritic cells for Th2 induction. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(1):13-7. doi: 10.1084/jem.20072665.
44. Maizels, R.M., Blaxter, M.L., Scott, A.L. (2001). Immunological genomics of *Brugia malayi*: filarial genes implicated in immune evasion and protective immunity. *Parasite Immunology*, 23(7):327-44. doi: 10.1046/j.1365-3024.2001.00397.x.
45. Mangano, K., Mazzon, E., Basile, M.S., Di Marco, R., Bramanti, P., Mammana, S., Petralia, M.C., Fagone, P., Nicoletti, F. (2018). Pathogenic role for macrophage migration inhibitory factor in glioblastoma and its targeting with specific inhibitors as novel tailored therapeutic approach. *Oncotarget*. 9(25):17951-17970. doi: 10.18632/oncotarget.24885.
46. Marson, A.L., Tarr, D.E., Scott, A.L. (2001). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) transcription is significantly elevated in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae. *Gene*, 278(1-2):53-62. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00706-5.
47. Mendoza-Roldan, J.A., Gabrielli, S., Cascio, A., Manoj, R.R.S., Bezerra-Santos, M. A., Benelli, G., Brianti, E., Latrofa, M.S., Otranto, D. (2021). Zoonotic *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* infection in humans and an integrative approach to the diagnosis. *Acta Tropica*, 223:106083. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.106083.
48. Minutti, C.M., Jackson-Jones, L.H., García-Fojeda, B., Knipper, J.A., Sutherland, T.E., Logan, N., Ringqvist, E., Guillaumat-Prats, R., Ferenbach, D.A., Artigas, A., Stamme, C., Chroneos, Z.C., Zaiss, D.M., Casals, C., Allen, J.E. (2017). Local amplifiers of IL-4R α -mediated macrophage activation promote repair in lung and liver. *Science*, 356(6342):1076-1080. doi: 10.1126/science.aaj2067.
49. Mircean, M., Ionică, A.M., Mircean, V., Györke, A., Codea, A.R., Tăbăran, F.A., Taulescu, M., Dumitrache, M.O. (2017). Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitology International*, 66(3):331-334. doi: 10.1016/j.parint.2017.02.003.
50. Miska, K.B., Fetterer, R.H., Lillehoj, H.S., Jenkins, M.C., Allen, P.C., Harper, S.B. (2007). Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 151(2):173-83. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.10.020.
51. Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., Jolin, H.E., McKenzie, A.N. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*, 464(7293):1367-70. doi: 10.1038/nature08900.

52. Nisbet, A.J., Bell, N.E., McNeilly, T.N., Knox, D.P., Maizels, R.M., Meikle, L.I., Wildblood, L.A., Matthews, J.B. (2010). A macrophage migration inhibitory factor-like tautomerase from *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Strongylida). *Parasite Immunology*, 32(7):503-11. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01215.x.
53. Nishihira, J., Koyama, Y., Mizue, Y. (1998). Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide. *Cytokine*, 10(3):199-205. doi: 10.1006/cyto.1997.0276.
54. Nobre, C.C., de Araújo, J.M., Fernandes, T.A., Cobucci, R.N., Lanza, D.C., Andrade, V.S., Fernandes, J.V. (2017). Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. *Pathology Oncology Research : POR*, 23(2):235-244. doi: 10.1007/s12253-016-0138-6.
55. Park, S.K., Cho, M.K., Park, H.K., Lee, K.H., Lee, S.J., Choi, S.H., Ock, M.S., Jeong, H.J., Lee, M.H., Yu, H.S. (2009). Macrophage migration inhibitory factor homologs of *Anisakis simplex* suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cell recruitment. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 182(11):6907-14. doi: 10.4049/jimmunol.0803533.
56. Park, J.A., Drazen, J.M., Tschumperlin, D.J. (2010). The chitinase-like protein YKL-40 is secreted by airway epithelial cells at base line and in response to compressive mechanical stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39):29817-25. doi: 10.1074/jbc.M110.103416.
57. Park, Y.H., Jeong, M.S., Ha, K.T., Yu, H.S., Jang, S.B. (2017). Structural characterization of As-MIF and hJAB1 during the inhibition of cell-cycle regulation. *BMB Reports*, 50(5):269-274. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.5.201.
58. Pastrana, D.V., Raghavan, N., FitzGerald, P., Eisinger, S.W., Metz, C., Bucala, R., Schleimer, R.P., Bickel, C., Scott, A.L. (1998). Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infection and Immunity*, 66(12):5955-63. doi: 10.1128/IAI.66.12.5955-5963.1998.
59. Peng, Y., Zhou, M., Yang, H., Qu, R., Qiu, Y., Hao, J., Bi, H., Guo, D. (2023). Regulatory Mechanism of M1/M2 Macrophage Polarization in the Development of Autoimmune Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2023:8821610. doi: 10.1155/2023/8821610.

60. Petrocheilou, V., Theodorakis, M., Williams, J., Prifti, H., Georgilis, K., Apostolopoulou, I., Mavrikakis, M. (1998). Microfilaremia from a *Dirofilaria*-like parasite in Greece. Case report. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 106(2):315-8.
61. Prieto-Lafuente, L., Gregory, W.F., Allen, J.E., Maizels, R.M. (2009). MIF homologues from a filarial nematode parasite synergize with IL-4 to induce alternative activation of host macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(5):844-54. doi: 10.1189/jlb.0808459.
62. PupiĆ-Bakraĉ, A., PupiĆ-Bakraĉ, J., Beck, A., Jurković, D., Polkinghorne, A., Beck, R. (2021). *Dirofilaria repens* microfilaremia in humans: Case description and literature review. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 13:100306. doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100306.
63. Qu, G., Fetterer, R., Leng, L., Du, X., Zarlenga, D., Shen, Z., Han, W., Bucala, R., Tuo, W. (2014). *Ostertagia ostertagi* macrophage migration inhibitory factor is present in all developmental stages and may cross-regulate host functions through interaction with the host receptor. *International Journal for Parasitology*. 44(6):355-67. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.01.009.
64. Ramani, S., Chauhan, N., Khatri, V., Vitali, C., Kalyanasundaram, R. (2020). *Wuchereria bancrofti* macrophage migration inhibitory factor-2 (rWbaMIF-2) ameliorates experimental colitis. *Parasite Immunology*. 42(4):e12698. doi: 10.1111/pim.12698.
65. Rossi, A.G., Haslett, C., Hirani, N., Greening, A.P., Rahman, I., Metz, C.N., Bucala, R., Donnelly, S.C. (1998). Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *The Journal of Clinical Investigation*. 101(12):2869-74. doi: 10.1172/JCI1524.
66. Sahoo, P.K., Panda, S.K., Satapathy, A.K., Pati, S. (2018). Anti-filarial immunity blocks parasite development and plays a protective role. *PLoS One*, 13(6):e0199090. doi: 10.1371/journal.pone.0199090.
67. Sapiernyński, R., Fabisiak, M., Sałamaszyńska, A. (2010). Several cases of dirofilariosis accidentally diagnosed in dogs from Poland, including two PCR positive *Dirofilaria repens* cases. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(3):545-7.

68. Sato, A., Uinuk-ool, T.S., Kuroda, N., Mayer, W.E., Takezaki, N., Dongak, R., Figueroa, F., Cooper, M.D., Klein, J. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) of jawed and jawless fishes: implications for its evolutionary origin. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(5):401-12. doi: 10.1016/s0145-305x(02)00136-2.
69. Semnani, R.T., Liu, A.Y., Sabzevari, H., Kubofcik, J., Zhou, J., Gilden, J.K., Nutman, T.B. (2003). *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4⁺ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(4):1950-60. doi: 10.4049/jimmunol.171.4.1950.
70. Sharma, R., Hoti, S.L., Meena, R.L., Vasuki, V., Sankari, T., Kaliraj, P. (2012). Molecular and functional characterization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) homolog of human from lymphatic filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. *Parasitology Research*, 111(5):2035-47. doi: 10.1007/s00436-012-3051-2.
71. Shimizu, T. (2005). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. *Journal of Dermatological Science*. 37(2):65-73. doi: 10.1016/j.jdermsci.2004.08.007.
72. Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. (2012). Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3):507-44. doi: 10.1128/CMR.00012-12.
73. Sparkes, A., De Baetselier, P., Roelants, K., De Trez, C., Magez, S., Van Ginderachter, J.A., Raes, G., Bucala, R., Stijlemans, B. (2017). The non-mammalian MIF superfamily. *Immunobiology*, 222(3):473-482. doi: 10.1016/j.imbio.2016.10.006.
74. Stöger, J.L., Gijbels, M.J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C.M., Biessen, E.A., Daemen, M.J., Lutgens, E., de Winther, M.P. (2012). Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 225(2):461-8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.013.
75. Stojanovic, I., Saksida, T., Stosic-Grujicic, S. (2012). Beta cell function: the role of macrophage migration inhibitory factor. *Immunologic Research*. 52(1-2):81-8. doi: 10.1007/s12026-012-8281-y.
76. Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecrdlova, E., Foley, L.K, Striz, I. (2023). M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? *Clinical Science (London, England : 1979)*, 137(15):1067-1093. doi: 10.1042/CS20220531.

77. Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M., Nishihira, J. (1997). Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase. *Journal of Structural Biology*, 120(1):105-8. doi: 10.1006/jsbi.1997.3904.
78. Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., Lolis, E. (1996). Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11):5191-6. doi: 10.1073/pnas.93.11.5191.
79. Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J., Sakai, M. (1996). Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nature Structural Biology*, 3(3):259-66. doi: 10.1038/nsb0396-259.
80. Tan, T.H., Edgerton, S.A., Kumari, R., McAlister, M.S., Roe, S.M., Nagl, S., Pearl, L. H., Selkirk, M.E., Bianco, A.E., Totty, N.F., Engwerda, C., Gray, C.A., Meyer, D.J. (2001). Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *The Biochemical Journal*, 357(Pt 2):373-83. doi: 10.1042/0264-6021:3570373.
81. Teodorowicz, M., Perdijk, O., Verhoek, I., Govers, C., Savelkoul, H.F., Tang, Y., Wichers, H., Broersen, K. (2017). Optimized Triton X-114 assisted lipopolysaccharide (LPS) removal method reveals the immunomodulatory effect of food proteins. *PLoS One*, 12(3):e0173778. doi: 10.1371/journal.pone.0173778.
82. Tizaoui, K., Yang, J.W., Lee, K.H., Kim, J.H., Kim, M., Yoon, S., Jung, Y., Park, J.B., An, K., Choi, H., Song, D., Jung, H., Ahn, S., Yuh, T., Choi, H.M., Ahn, J.H., Kim, Y., Jee, S., Lee, H., Jin, S., Kang, J.G., Koo, B., Lee, J.Y., Min, K.M., Yoo, W., Rhyu, H.J., Yoon, Y., Lee, M.H., Kim, S.E., Hwang, J., Koyanagi, A., Jacob, L., Park, S., Shin, J.I., Smith, L. (2022). The role of YKL-40 in the pathogenesis of autoimmune diseases: a comprehensive review. *International Journal of Biological Sciences*, 18(9):3731-3746. doi: 10.7150/ijbs.67587.
83. Vercelli, D. (2006). Mechanisms of the hygiene hypothesis-molecular and otherwise. *Current Opinion in Immunology*, 18(6):733-7. doi: 10.1016/j.coi.2006.09.002.
84. Vermeire, J.J., Cho, Y., Lolis, E., Bucala, R., Cappello, M. (2008). Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. *Trends in Parasitology*, 24(8):355-63. doi: 10.1016/j.pt.2008.04.007.

85. Verschuren, L., Lindeman, J.H., van Bockel, J.H., Abdul-Hussien, H., Kooistra, T., Kleemann, R. (2005). Up-regulation and coexpression of MIF and matrix metalloproteinases in human abdominal aortic aneurysms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(9-10):1195-202. doi: 10.1089/ars.2005.7.1195.
86. Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
87. Wang, Y., Lu, M., Wang, S., Ehsan, M., Yan, R., Song, X., Xu, L., Li, X. (2017). Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* acting at the parasite-host cell interface. *Oncotarget*, 8(25):40052-40064. doi: 10.18632/oncotarget.16675.
88. Wei, Q., Deng, Y., Yang, Q., Zhan, A., Wang, L. (2023). The markers to delineate different phenotypes of macrophages related to metabolic disorders. *Frontiers in Immunology*. 14:1084636. doi: 10.3389/fimmu.2023.1084636.
89. Wyszomolek, M.E., Dobrzyński, A., Długosz, E., Czopowicz, M., Wiśniewski, M., Jurka, P., Klockiewicz, M. (2020a). Hematological and Biochemical Changes in Dogs Naturally Infected With *Dirofilaria repens*. *Frontiers in Veterinary Science*, 7:590. doi: 10.3389/fvets.2020.00590.
90. Wyszomolek, M.E., Klockiewicz, M., Sobczak-Filipiak, M., Długosz, E., Wiśniewski, M. (2020b). Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor. *Frontiers in Veterinary Science*. 7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466.
91. Wyszomolek, M.E., Klockiewicz, M., Długosz, E., Wiśniewski, M. (2022). Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 86:101818. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101818.
92. Xia, T., Zhang, M., Lei, W., Yang, R., Fu, S., Fan, Z., Yang, Y., Zhang, T. (2023). Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, 14:1160719. doi: 10.3389/fimmu.2023.1160719.
93. Xu, L., Li, Y., Sun, H., Zhen, X., Qiao, C., Tian, S., Hou, T. (2013). Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors. *Drug Discovery Today*, 18(11-12):592-600. doi: 10.1016/j.drudis.2012.12.013.

94. Yin, C., Cai, J., Gou, Y., Li, D., Tang, H., Wang, L., Liu, H., Luo, B. (2023). Dynamic changes in human THP-1-derived M1-to-M2 macrophage polarization during *Thelazia callipaeda* MIF induction. *Frontiers in Immunology*, 13:1078880. doi: 10.3389/fimmu.2022.1078880.
95. Younis, A.E., Soblik, H., Ajonina-Ekoti, I., Erttmann, K.D., Luersen, K., Liebau, E., Brattig, N.W. (2012). Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Strongyloides* acting at the parasite-host cell interface. *Microbes and Infection*, 14(3):279-89. doi: 10.1016/j.micinf.2011.09.006.
96. Yu, J.E., Yeo, I.J., Han, S.B., Yun, J., Kim, B., Yong, Y.J., Lim, Y.S., Kim, T.H., Son, D.J., Hong, J.T. (2024). Significance of chitinase-3-like protein 1 in the pathogenesis of inflammatory diseases and cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(1):1-18. doi: 10.1038/s12276-023-01131-9.
97. Zang, X., Taylor, P., Wang, J.M., Meyer, D.J., Scott, A.L., Walkinshaw, M.D., Maizels, R.M. (2002). Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(46):44261-7. doi: 10.1074/jbc.M204655200.
98. Zawistowska-Deniziak, A., Powązka, K., Pękacz, M., Basałaj, K., Klockiewicz, M., Wiśniewski, M., Młocicki, D. (2021). Immunoproteomic analysis of *Dirofilaria repens* microfilariae and adult parasite stages. *Pathogens*, 10(2):174. doi: 10.3390/pathogens10020174.
99. Zhu, J., Xu, Z., Chen, X., Zhou, S., Zhang, W., Chi, Y., Li, W., Song, X., Liu, F., Su, C. (2014). Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Parasites & Vectors*, 7:122. doi: 10.1186/1756-3305-7-122.
100. Żarnowska-Prymek, H., Cielecka, D., Sałamatin, R. (2008). *Dirofilarioza-Dirofilaria repens*-po raz pierwszy opisana u polskich pacjentów [Dirofilariasis-*Dirofilaria repens*-first time described in Polish patients]. *Przegląd Epidemiologiczny*, 62(3):547-51.

Strony internetowe:

www.cdc.gov/dpdx/dirofilariasis/index.html (data dostępu 26.09.2024)

www.rcsb.org/structure/1mif (data dostępu 26.09.2024)

**8. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu oraz oświadczenia
współautorów**

Review

Nematode Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential Therapeutic Targets

Justyna Karabowicz ^{1,*} , Ewa Długosz ¹ , Piotr Baska ²  and Marcin Wiśniewski ¹ 

¹ Division of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, 02-786 Warsaw, Poland; ewa_dlugosz@sggw.edu.pl (E.D.); marcin_wisniewski@sggw.edu.pl (M.W.)

² Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, 02-786 Warsaw, Poland; piotr_baska@sggw.edu.pl

* Correspondence: justyna_karabowicz@sggw.edu.pl

Abstract: One of the adaptations of nematodes, which allows long-term survival in the host, is the production of proteins with immunomodulatory properties. The parasites secrete numerous homologs of human immune mediators, such as macrophage migration inhibitory factor (MIF), which is a substantial regulator of the inflammatory immune response. Homologs of mammalian MIF have been recognized in many species of nematode parasites, but their role has not been fully understood. The application of molecular biology and genetic engineering methods, including the production of recombinant proteins, has enabled better characterization of their structure and properties. This review provides insight into the current state of knowledge on MIF homologs produced by nematodes, as well as their structure, enzymatic activity, tissue expression pattern, impact on the host immune system, and potential use in the treatment of parasitic, inflammatory, and autoimmune diseases.

Keywords: macrophage migration inhibitory factor; Nematoda; immunomodulation; orthologous proteins



Citation: Karabowicz, J.; Długosz, E.; Baska, P.; Wiśniewski, M. Nematode Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential Therapeutic Targets. *Pathogens* **2022**, *11*, 258. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020258>

Academic Editors: Keqin Zhang and Roberto Paganelli

Received: 31 December 2021

Accepted: 14 February 2022

Published: 17 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Parasitic nematodes modulate the immune response to ensure their prolonged survival in the host. The long lifespan of parasites provides ample evidence that they are extremely adept at evading the immune system, and it is clear that interference and modulation are among the first events to occur during infection [1–3]. Molecules released by nematodes modulating the host immune response include antioxidants, proteases, protease inhibitors, and orthologs of cytokines and their receptors [4,5]. A strategy of particular interest is mimicking host immune system molecules. Nematodes release a number of homologs of human immune components, such as TGF- β and macrophage migration inhibitory factor (MIF) [6].

Mammalian MIF (mMIF) is a proinflammatory cytokine with pleiotropic functions and a significant regulator of the inflammatory immune response. Homologs of mMIF have been recognized in numerous parasite species belonging to protozoa and helminths. The role of MIF orthologs from these organisms is not fully understood yet, although several reports indicate they play an important role in host immune response evasion and immunomodulation strategies. A better comprehension of the nature of these molecules and mechanisms via which they affect the immune reactivity will be critical in comprehending immune-mediated pathogenesis and developing effective therapies [7,8] against the intruders.

This article reviews the existing knowledge about MIF homologs produced by parasitic nematodes. We focus especially on their immunomodulatory properties, which may be used in the treatment of parasitic diseases, allergies, and autoimmune diseases.

2. MIF Structure and Function

MIF was discovered in 1966 and described as a T-cell-derived mediator with the specific property of inhibiting the random movement of macrophages [9]. It is a pleiotropic proinflammatory protein with numerous biological functions [10,11]. The MIF gene in humans is located on chromosome 22, composed of 114 amino acids with a mass of 12.5 kDa [12–14]. MIF has a homotrimeric structure, with each monomer containing a β - α - β motif, as shown in Figure 1 [15–17].

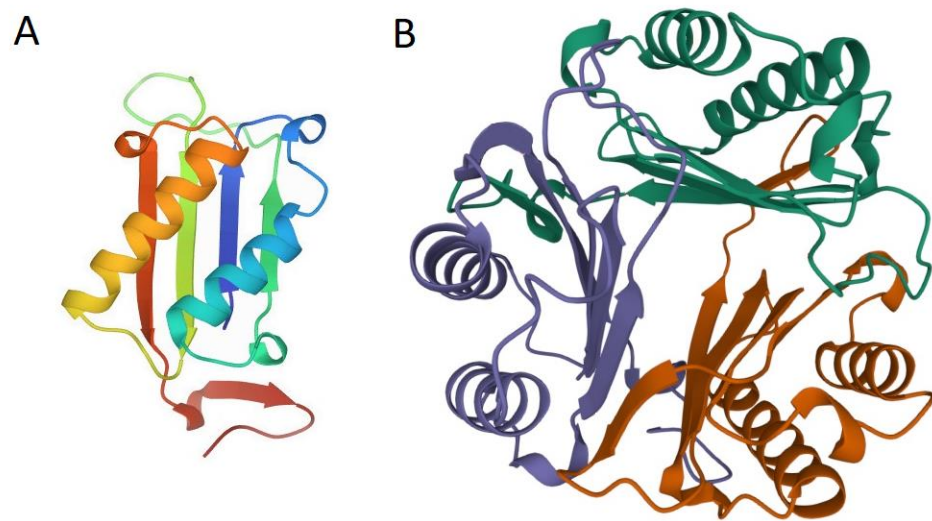


Figure 1. Human MIF monomer (A) and trimer (B) crystal structures retrieved from the Protein Data Bank (PDB 1MIF). Three subunits (green, violet, and orange) are shown (B). The α helices and β sheets are plotted.

Its conformation is well conserved in eukaryotes: protozoans, animals (from invertebrates to mammals), and plants. mMIFs (rat, mouse, human, bovine) show high homology (~90%) [18,19]. This molecule, unlike most cytokines, has enzymatic activity as a phenylpyruvate tautomerase. The conserved C-X-X-C motif is associated with oxidoreductase activity, and the N-terminal proline (Pro1) acts as a catalytic base for tautomerase activity [20–22], which may be inhibited by MIF inhibitor (ISO-1) and other small-molecule inhibitors [23,24]. Due to its tautomerase activity, MIF catalyzes tautomerization of D-dopachrome to generate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid [25]. It is still unknown whether MIF enzymatic activity holds a physiological role in mammals; perhaps it only reflects a residual property of these proteins originating from their ancestral position in invertebrate immunity. It was also proven that MIF tautomerase activity is not linked with its role as an inhibitor of monocyte chemotaxis and migration. Two murine MIF mutants in which the N-terminal proline was replaced with either a serine or a phenylalanine remained capable of inhibiting monocyte chemotaxis despite significantly reduced or no phenylpyruvate tautomerase activity [26].

MIF is produced by a variety of cell types including macrophages, monocytes [27], neutrophils [28], eosinophils [29], lymphocytes [30], endothelial cells [31], epithelial cells [32], and smooth muscle cells [33]. MIF, unlike most cytokines, is constitutively expressed and stored in preformed “intracellular pools” during homeostasis [34]. It can be immediately released from the cells under inflammatory and stress stimulation, and its secretion can be identified without de novo synthesis. Because MIF lacks an N-terminal secretory sequence, it is released from cells through unconventional ER/Golgi secretory pathways [35]. In humans, MIF expression varies due to polymorphism in the upstream promoter region of the gene. A changeable number of CATT nucleotide repeats exist in this region, with 5–8 such sequences determining alternative alleles. The number of CATT repeats corresponds with the constitutive and inducible expression of the mRNA and protein [36].

MIF may exert its biological effects on cells through various cell signaling pathways. MIF binds to its receptor CD74 (MHC class II invariant chain), followed by formation of a complex with CD44 and activation of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. This in turn increases macrophage survival through inhibition of p53 activity [37–39]. Additionally, formation of other receptor complexes, such as CD74/CD44, CD74/CXCR2, CD74/CXCR4, and CD74/CXCR4/CXCR7, has been described [40]. Generally, activation of these complexes leads to inhibition of apoptosis and autophagy and to stimulation of cell proliferation and migration. The molecular mechanisms underlying these effects have been thoroughly reviewed by Bilsborrow et al. [41] and Jankauskas et al. [40].

An opposite role of MIF in regulation of cell death process was reported in 2016 [42]. The study identified MIF as a PARP-1-dependent nuclease associated with apoptosis inducing factor (AIF). AIF is required for MIF recruitment to the cell nucleus, where MIF cleaves genomic DNA into large fragments. Therefore, MIF possesses nuclease activity that is critical for PARP-1-dependent DNA damage and cell death in the parthanatos pathway. Another study showed that MIF knockdown enabled neuronal protection against parthanatos under conditions of simulated in vivo oxidative stress after spinal cord injury (SCI) [43]. Inhibition of MIF nuclease activity is a possible treatment target in diseases induced by PARP-1 overactivation [42,43].

MIF stimulates the expression of various cytokines, e.g., TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-12, induces Toll-like receptor (TLR) 4 expression and release of nitric oxide, stimulates production of matrix metalloproteinases, cyclooxygenase 2, and prostaglandin E2, and inhibits the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids [11,18,44,45]. In the context of the mammalian immune system, MIF is a pluripotent and pleiotropic cytokine that plays critical roles in inflammatory and immune responses and in tumorigenesis. The most significant of MIF functions are its capacity to recruit cells of both innate and acquired immunity to the site of inflammation, and modulation of inflammatory activator (e.g., COX-2 nitric oxide, PGE2, and TLR4) expression along with the recruitment of inflammatory cells [10,46]. It also enables macrophage adherence, phagocytosis, and transendothelial migration, and it activates and enhances the release of proinflammatory cytokines via macrophages triggering a strong inflammatory response [47,48].

The proinflammatory properties of MIF make it a critical mediator of immune response against a wide range of pathogens, e.g., parasites [2]. Moreover, the detrimental role of this cytokine in various inflammatory and autoimmune conditions has been described in many studies. In humans, increased MIF expression has been linked to pathogenesis in several inflammatory conditions including cystic fibrosis, atherosclerosis, asthma, nephrotic syndrome, inflammatory bowel disease (IBD), multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus [11,13,41,49–53].

3. MIF Homologs (nMIFs) in Parasitic Nematodes

Given that MIF is an evolutionarily old molecule, it is not surprising that similar genes possibly related to the mMIF superfamily (i.e., MIF and its D-dopachrome tautomerase (D-DT) paralog) have been found in various prokaryotes and eukaryotes (e.g., plants, vertebrates such as fish, amphibians, birds, and mammals, and invertebrates such as protozoa, nematodes, mollusks, and arthropods) [19,54]. According to Michelet et al. [55], all known nematode species with publicly available genomic data contain MIF genes, except for the cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*. In the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, the MIF gene family contains four separate genes and the four corresponding proteins (Ce-MIF-1, -2, -3 and -4) with 15–32% amino-acid sequence identity to each other. The identity to human MIF (hMIF) is 22–35% [8,56].

MIF homologs have been recognized in parasitic helminths belonging to the four major clades of the phylum Nematoda (reviewed by Vermeire et al. [8]). Among parasitic nematodes, MIF cDNA sequences have been reported in over 20 species (Table 1). Two different types of MIF homologs have been identified in several nematode species based on

homology to *C. elegans* MIFs (*Ce*-MIF-1 and *Ce*-MIF-2) [8]. The homologs of *Ce*-MIF-1 have a higher level of amino-acid similarity to mMIFs than *Ce*-MIF-2 homologous proteins [8,56,57]. Some authors classified *Ce*-MIF-2 corresponding molecules from *B. malayi* and *O. volvulus* as D-DT homologs [58,59], which would explain the lower degree of similarity to their mammalian counterparts. Figure 2 shows an alignment of selected nematode MIF sequences with hMIF.

Table 1. Parasitic nematode MIFs (nMIFs) expressed as recombinant proteins. The table contains cDNA sequences of nMIFs expressed as recombinant proteins.

Order	Species	Accession Number	Acronym	References
Rhabditida: Onchocercidae	<i>Brugia malayi</i>	U88035.1	<i>Bm</i> -MIF <i>Bm</i> -MIF-1	[60–63]
	<i>Brugia malayi</i>	AY004865.1	<i>Bm</i> -MIF-2	[62,63]
	<i>Onchocerca volvulus</i>	AF384027.1	<i>Ov</i> MIF-1	[56,64]
	<i>Onchocerca volvulus</i>	AF384028.1	<i>Ov</i> MIF-2	[56,64]
	<i>Wuchereria bancrofti</i>	AF040629.1	<i>Wb</i> -MIF <i>Wb</i> -MIF-1	[60,65]
	<i>Wuchereria bancrofti</i>	KJ939449.1	<i>Wba</i> -MIF-2	[66]
Rhabditida: Thelaziidae	<i>Thelazia callipaeda</i>	No data	<i>T.ca</i> -MIF	[67]
Rhabditida: Anisakidae	<i>Anisakis simplex</i>	EF165010.1	<i>As</i> -MIF	[3,68,69]
Rhabditida: Strongyloididae	<i>Strongyloides ratti</i>	FJ026392.1	<i>Sra</i> -MIF	[57]
Trichinellida: Trichinellidae	<i>Trichinella spiralis</i>	AJ012740.1	<i>Ts</i> MIF	[70]
Strongylida: Ancylostomatidae	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	EF410151.1	<i>Ace</i> MIF	[71]
Strongylida: Haemonchidae	<i>Haemonchus contortus</i>	CB012470.1	<i>HCM</i> IF-1	[72]
	<i>Ostertagia ostertagii</i>	BQ457911	<i>Oos</i> -MIF-1.1	[22]
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	FN599526.1	<i>Tci</i> -MIF-1	[73]

4. nMIFs: Structure, Function, Activity, and Expression

The tertiary structures of most nMIFs show a high level of similarity, despite limited homology to the amino-acid sequence. Similarly to hMIF, its nematode homologs form a homotrimeric molecule, which is essential for the protein's catalytic activity [8]. The possibility of heterotrimer formation between hMIF and *Ace*MIF monomers was investigated to analyze whether parasitic MIFs could interfere with hMIF trimerization [71]. The probability of such heterotrimer formation was excluded.

Despite all MIF homologs described in nematodes showing enzymatic activity, the activity is weaker in comparison to hMIF [75]. The enzymatic activity of MIF tautomerase affects the amino-acid residues Pro-2, Lys-33, Ile-65, Tyr-96, and Asn-98. For the oxidoreductase activity of MIF, the motif C–X–X–C is required [76,77]. Similar to hMIF, nematode homologs of *Ce*-MIF-1 possess tautomerase and oxidoreductase activity. The conserved proline residue at the *N*-terminal end and the C–X–X–C motif are necessary for the two activities. This was confirmed, for example, for *Bm*-MIF-1, *Wb*-MIF-1, and *Tci*-MIF-1 [60,62,65,73]. Oxidoreductase activity is not a characteristic enzymatic activity of MIF homologs, and the C–X–X–C motif is not present in all helminth orthologs [8]. Sharma et al. [65] showed that r*Wba*-MIF-1 exhibits oxidoreductase activity against insulin, thus suggesting that it is functionally active and similar to the native protein. Surprisingly, *Wba*-MIF-2 lacks the C–X–X–C motif, but significant oxidoreductase activity also was found in the insulin reduction assay. This is probably due to the presence of other vicinal cysteine residues. Homology modeling showed that of two of three cysteine residues (Cys58 and Cys95) are

nearby (3.23 Å) in the tertiary structure with a pKa value of 9, indicating that they may play a role in the catalytic activity of disulfide oxidoreductase. Mutagenesis of these residues resulted in the lack of oxidoreductase activity in the insulin reduction assay, indicating that these two cysteines are crucial for the catalytic activity of *Wba*-MIF-2 [66,78].

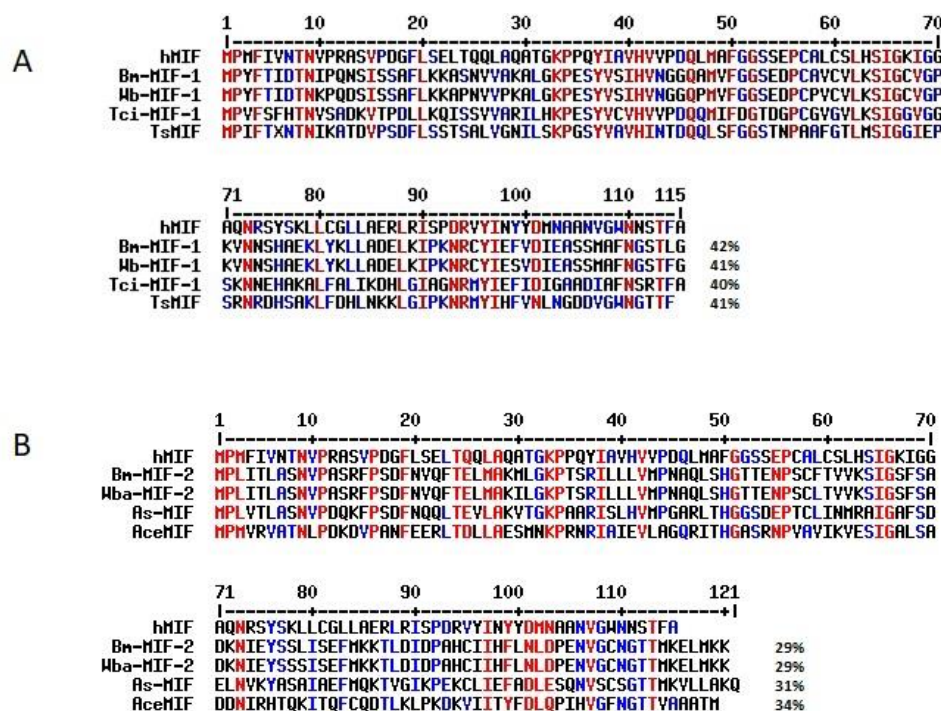


Figure 2. Alignment of selected nematode MIF-1 (A), MIF-2 (B), and hMIF protein sequences performed using MultiAlin tool [74]. Parasite MIF protein accession numbers are shown in Table 1; hMIF accession number: CAG30406.1. The protein identity (%) to hMIF calculated using BLASTp is indicated.

It is worth mentioning that MIF's ability to catalyze tautomerization of L-dopachrome methyl ester has contributed to the first study of native MIF orthologs in parasitic helminth species. MIF presence was detected in homogenate from L4 stage larvae of *T. spiralis*, as well as adults of *Trichuris muris* and *Brugia pahangi*, on the basis of dopachrome tautomerase activity. The activity was not detected in extracts from other helminth species tested: *Heligmosomoides polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Hymenolepis diminuta*, *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, and the free-living nematode *C. elegans* [79].

In addition to their action as a host cytokine mimics, MIF homologs may play a role in the nematode physiology which relies on dopachrome tautomerase activity. The tautomerization of L-dopachrome is one of the steps of melanin biosynthesis and melanotic encapsulation, which is a key process in innate immunity to invading pathogens in a number of invertebrates [25]. Moreover, Nisbet et al. [73] suggested that the process of melanization may play a role in the protection of free-living *T. circumcincta* parasitic stages from UV exposure.

MIFs are expressed in various stages of nematode development. Pastrana et al. [60] showed that *Bm*-MIF-1 is produced in all developmental stages, with transcript levels in microfilariae and adults approximately twice as high as in L3 and L4 stages. Presence of the protein in the hypodermis, in the uterine lining, and on the surface of the muscle bundles was detected by immunolocalization techniques. This distribution pattern in the tissues of adult *O. ostertagi* [22], *T. circumcincta* [73], and *C. elegans* [56] has also been confirmed. nMIFs were present in all *T. circumcincta* and *O. ostertagi* stages; however, *Oos*-MIF-1 expression was higher in adults. On the contrary, *Tci*-MIF-1 levels appear to be higher in the egg and L3 larva [22,73]. In the case of parasites which infect the host through

skin penetration, such as hookworms and threadworms, the highest level of nMIFs was noted in the infective stages. *Sra*-mif expression was higher in iL3 (infective third-stage larvae) than parasitic and free-living females [57], and *Ace*MIF was produced by L3 larvae (infective stage), but also by adult worms. It was not detected in eggs or newly hatched L1 larvae. The authors suggested that native *Ace*MIF is present only during those phases of the parasite's life cycle that meet the host's immune response, i.e., during migration within tissues and during attachment to the gut [71].

5. nMIFs and the Immune System of the Host

MIF activates cells by engaging its cell surface receptor CD74 [80]. A solid-phase binding assay showed *Ace*MIF also interacts with the hMIF receptor. Nevertheless, it was only partially effective in displacing hMIF from CD74. This suggests that hMIF and its homologs may bind to the receptor via different mechanisms. It is not entirely clear whether MIF homologs work as agonists, driving activation of downstream proinflammatory pathways, or as antagonists, engaging CD74 in a nonproductive or inhibitory manner [8,71]. Binding to the CD74 receptor was also confirmed for recombinant MIF homologs from *O. ostertagii* [22] and *S. ratti* [57]. Helminth secretion of MIF at the site of infection can also induce production of endogenous host MIF and lead to AP-1-mediated blocking of proinflammatory gene expression by binding of the transcription factor Jun activation domain-binding protein 1 (JAB1) [81]. Moreover, Wang et al. [72] showed that MIF from *H. contortus* is internalized by goat monocytes possibly inducing biological effects upon release from the endosome. Other studies proved that nMIFs are able to bind to human JAB1 molecule [62,69]. Whether this interaction leads to similar effects as endogenous MIF/JAB1 binding remains to be confirmed.

The first example of a parasite-derived molecule with significant homology to a host cytokine that functions to alter host cell behavior was described in *B. malayi* by Pastrana et al. [60]. To determine whether *Bm*-MIF had any direct effect on human peripheral blood monocytes/macrophages and to test the hypothesis that *Bm*-MIF could modify the activity of hMIF, a migration study was performed. Results of in vitro macrophage migration studies indicated that both hMIF and *Bm*-MIF showed chemoattractant activity and immobilized the cells, thereby inhibiting their random migration. This effect was confirmed via neutralizing anti-MIF antibodies which restored the migration of cells. Similarly to *Bm*-MIF, recombinant *T. spiralis* MIF (*Ts*MIF) inhibited the migration of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [70].

In a separate study, Zang et al. [62] expressed *Bm*-MIF-1 and *Bm*-MIF-2, as well as their site-directed mutants (*Bm*-MIF-1G and *Bm*-MIF-2G) with Pro-2 replaced with Gly. The results confirmed that both native MIFs can chemotactically mobilize macrophages in a similar way to hMIF. Interestingly, the mutant recombinant proteins, showed a 10-fold reduction in chemotactic activity for human monocytes, suggesting the crucial role of Pro-2. Another effect observed after *Bm*-MIF-1 and *Bm*-MIF-2 stimulation was the induction of Ca^{2+} influx in human monocytes and upregulation of TNF- α and IL-8 expression, which was about 10-fold lower for the mutant proteins. Other cytokine genes, IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-12(p40), IFN- γ , macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), remained at the same level after stimulation. Treatment of human monocytes with r*Bm*-MIF also induced the release of endogenous hMIF in vitro.

Chronic helminth infections are usually associated with a tissue-protective Th2 type of immune response with alternative M2 activation of macrophages, in contrast to classical M1 phenotype, which is characterized by the expression of high levels of proinflammatory cytokines, high production of reactive nitrogen and oxygen radicals, promotion of Th1 response, and strong microbicidal and tumoricidal activity [82]. M2 macrophages are induced by IL-4 and IL-13 [8,83], which leads to surface expression of IL-4R and CD206 (mannose receptor), upregulation of arginase-1 (Arg-1), chitinase-3-like protein (also known as Ym1 or ECF-L), and Resistin-like molecule (RELM α), and downregulation of NO production [84].

M2 macrophages are induced in the early stage of the anti-helminth immune response and are responsible for many actions leading to elimination of the parasite. First, they release a number of factors facilitating the development of type 2 immunity and recruitment of effector cells; moreover, they participate in parasite killing. Secondly, they are involved in tissue repair and tissue remodeling. Lastly, they limit excessive inflammation through the release of immunomodulatory cytokines. For an in-depth review of these mechanisms, please refer to Coakley and Harris [84].

A study by Filbey et al. [85] showed that the murine host MIF molecule plays a critical role in macrophage polarization into the M2 phenotype during *H. polygyrus* infection. MIF-deficient BALB/c mice were unable to reduce worm burdens or egg output following a primary infection due to insufficient M2 polarization. Interestingly, MIF activity was not detected in *H. polygyrus* extracts [79]. Other studies proved that nematode MIF analogs may also induce alternative activation of macrophages.

Surgical implantation of adult *B. malayi* worms into the peritoneal cavity of mice induced leukocyte progression, including M2 cells, as well as increased neutrophils and eosinophils [61]. Furthermore, the authors indicated that intraperitoneal injection of rBm-MIF-1 is sufficient for eosinophil recruitment and M2 activation by increasing Ym1/ECF-L expression in the absence of active filarial infection. Moreover, the results showed the significance of Bm-MIF-1 amino-terminal proline since the Bm-MIF-1G mutant failed to induce Ym1 transcription in macrophages or mediate eosinophil recruitment.

A separate study by Prieto-Lafuente et al. [63] analyzed the activity of two MIF homologs from the nematode *B. malayi* in comparison with mouse MIF and found that Bm-MIF-1 and Bm-MIF-2 promote IL-4-dependent alternative activation of functionally suppressive macrophages in vitro. In vivo administration of rBm-MIF-1/2 in mice induced the expression of markers that are specific for alternative macrophage activation, such as RELM- α and Ym1. Interestingly, murine MIF did not demonstrate similar effects, in contrast to the study by Filbey et al. [85], where murine MIF was indispensable for M2 polarization and parasite clearance. The authors suggested that, in *B. malayi* infection, parasite-released Bm-MIF may be the first stimulus for macrophages to initiate alternative differentiation, with host IL-4 being essential to complete this process [63].

A recent study confirmed the observation that nematode MIF molecules are responsible for M2 polarization. Recombinant MIF molecule from a nematode *Thelazia callipaeda* (Tcp-MIF) stimulated M2 differentiation in human THP-1 macrophages via TLR-4-mediated activation of the PI3K/AKT signaling pathway [67].

The effects of nematode MIFs on other aspects of the immune response were analyzed in various studies. Younis et al. [57] found that MIF released by *S. ratti* iL3 and parasitic females binds to host immune cells and generates distinct antibody responses, indicating its possible involvement in local parasite–host interaction. rSra-MIF was found to induce IL-10 but not TNF- α production by PBMCs, in the presence or absence of polymyxin B (PMB), ruling out a lipopolysaccharide (LPS) effect. These results were in agreement with Park et al. [3], who reported that IL-10 and TGF- β levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were substantially higher after mouse treatment with recombinant *A. simplex* MIF (rAs-MIF). In addition, rAs-MIF enhanced TGF- β and IL-10 production in the spleen and mesenteric lymph nodes, but there was no influence on the levels of IFN- γ , IL-6, and IL-13 [68]. rAs-MIF appears to ameliorate dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis, suggesting that this molecule may be useful as a treatment for inflammatory intestinal diseases, as further discussed in the next section.

A similar cytokine profile was observed by Wang et al. [72] using goat monocytes stimulated with recombinant *H. contortus* MIF-1 (rHCMIF-1). LPS-induced production of proinflammatory TNF- α , IL-1 β , and IL-12p40 was downmodulated, while IL-10 and TGF- β secretion was increased in a dose-dependent manner. This suggests that rHCMIF-1 contributes to the induction of an anti-inflammatory environment favorable for worm survival. In addition, this study showed that rHCMIF-1 significantly reduced NO production by LPS-treated goat monocytes. Furthermore, the phagocytic capacity, which is an early and

fundamental step for effective removal of pathogens, was decreased in a dose-dependent manner [72]. The results suggest that rHCMIF-1 induced the alternative activation of goat monocytes/macrophages.

The effects of nematode MIF on MHC-I and MHC-II molecules was analyzed in rHCMIF-treated goat monocytes [72]. rHCMIF-1 was capable of inhibiting MHC-II expression on monocytes in a dose-dependent pattern, and no changes in MHC-I expression were observed. MHC-II molecules are constitutively expressed on the surface of antigen-presenting cells (APCs), which enables them to present extracellular antigens and initiate an adaptive immune response. Perhaps, nMIFs affect the presentation of antigens by decreasing MHC-II expression. At the same time, the endogenous antigen presentation pathway is not hampered, as the major function of MHC-I is to present intracellular proteins to cytotoxic T lymphocytes [86,87]. However, more studies are necessary to confirm mechanisms involved in this phenomenon [72].

6. nMIFs in the Treatment of Autoimmune Diseases

There is a gradual increase in the prevalence of various immunological disorders in developed countries [88,89]. The link between parasites and allergies or autoimmune diseases has been described as the “hygiene hypothesis” [90,91]. This hypothesis suggests that lack of exposure to parasites in childhood suppresses an immature immune system, resulting in a higher frequency of allergic and immunological diseases: asthma, allergic diseases, RA, cardiovascular disease, multiple sclerosis, type 1 diabetes, and inflammatory bowel disease (IBD) [92–96]. Animal studies have shown that parasite homogenates or secretions can suppress the immune response in the host, suggesting that immunosuppressive activity is induced by the parasite [97]. Experimental studies in animal models have shown that infection with helminths such as *S. mansoni*, *H. diminuta*, and *T. spiralis* can ameliorate colitis [98–100]. Extracts from nematodes such as *Angiostrongylus cantonensis*, *Oesophagostomum dentatum*, and the already mentioned *T. spiralis* modulate the inflammatory reaction in allergic asthma models [101–103].

Several papers have shown that nematode-derived MIF homologs have immunomodulatory potential that can be used to treat allergies and autoimmune diseases. Park et al. [3] conducted a study in which they demonstrated that recombinant type 2 MIF homolog rAs-MIF reduces the ovalbumin (OVA)-induced allergic airway immune response in mice. Treatment with rAs-MIF in conjunction with OVA/alum during the provocation period induced total inhibition of eosinophilia and goblet cell hyperplasia in the lung and profoundly impaired the progression of pulmonary hyperreactivity. rAs-MIF significantly reduced Th2-related cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13) in BALF and allergen-specific IgG2a in serum. Levels of regulatory cytokines IL-10 and TGF- β in BALF in the rAs-MIF-treated group were substantially increased compared with the other groups. Additionally, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells (regulatory T cells) were recruited to the spleen and lungs of rAs-MIF-treated mice, and this recruitment was suppressed by anti-rAs-MIF antibody.

Cho et al. [68] also conducted a study using the same protein (rAs-MIF) to test whether it has the potential to attenuate DSS-induced colitis in a mouse model. They showed that rAs-MIF suppresses intestinal inflammation and the production of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ by recruiting Treg cells through binding to TLR2. The rAs-MIF was found to exert anti-inflammatory effects by inhibiting epithelial and crypt cell destruction. Increased secretion of IL-10 and TGF- β by splenocytes and mesenteric lymph node (MLN) cells was also observed. These results suggest that rAs-MIF appears to attenuate DSS-induced colitis and may be useful as a therapeutic agent for IBD.

Similar studies have been conducted using recombinant *W. bancrofti*-MIF-2 (rWba-MIF-2). Administration of rWba-MIF-2 markedly reduced the disease activity index (DAI) in mice with DSS-induced colitis. No blood in the stool was observed in mice treated with rWba-MIF-2, and the colon length was similar to the control with only minimal inflammation and histological changes. Proinflammatory cytokine genes (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A, and NOS2) were silenced in colon tissue and peritoneal macrophages of rWba-MIF-2-treated

mice, suggesting that r*Wba*-MIF-2 is a potent immunoregulatory molecule that can revert the inflammatory stimulus. Importantly, there was a significant increase in the number of IL-10-producing Treg and B1 cells in the colon and peritoneal cavity of mice treated with r*Wba*-MIF-2. The results indicate that r*Wba*-MIF-2 treatment can alleviate the clinical signs of DSS-induced colitis in mice by suppressing the inflammatory response in the colon [99].

7. nMIFs as a Potential Therapeutic Target

Vaccines or drugs targeting nMIFs may have therapeutic potential by prevention of infection or by facilitating expulsion of the parasite from the infected individual [8]. Only isolated reports of vaccine trials using nMIFs can be found in the literature. r*Tci*-MIF-1 was one of the components of a multi-antigen vaccine against *T. circumcincta*, which was administered to sheep. Although the vaccine was effective, the protective potential of the particular component of the vaccine is difficult to assess [104]. In a separate study, hamster vaccination with r*Ace*MIF provided partial protection from ancylostomiasis [105].

Differences in the three-dimensional molecular structure of human and parasitic MIFs molecules allow the efficient design of selective inhibitors. The study conducted by Cho et al. [71] proved that hMIF inhibitor ISO-1 did not inhibit *Ace*MIF tautomerase or chemoattractant activities. The catalytic site plays an essential role in the immunomodulatory activity of mammalian and nematode MIFs. Targeting this molecular interaction site provides a viable mechanism for blocking host and/or parasite cytokines [8,62,106]. Inhibitors of hMIF have been developed using rational drug design [107,108]. Similarly, selective nMIF inhibitors can also be designed on the basis of known active site and substrate structures. De novo identification of inhibitors or modification of currently available compounds can also be performed in silico [8,105]. Screening libraries of bioactive compounds can be an effective strategy for repositioning FDA-approved drugs or discovering new pharmacophores. Cho et al. [105] presented the results of a high-throughput screening (HTS) of a library of clinically active small molecules targeting *Ace*MIF on the basis of inhibition of tautomerase activity and found promising compounds for therapeutic use. The effects of each inhibitor were studied in three assays: inhibition of catalytic activity, binding to the MIF receptor CD74, and *Ace*MIF-mediated monocyte migration. Six inhibitors were identified. These inhibitors may facilitate the study of *Ace*MIF function in *A. ceylanicum* biology and serve as leading compounds for new chemotherapeutic agents for the treatment of hookworm and perhaps other parasitic infections [8].

8. Conclusions

MIF homologs are released by number of nematodes to manipulate and modulate the host immune response. The discovery of the coding sequences of parasitic MIFs and the derivation of recombinant proteins have allowed a closer understanding of their structure and function. nMIFs have structural, catalytic, and cell-migration-inhibitory properties, and they show similar activity to mMIFs; hence, they may be used as immunomodulators. These results will contribute to elucidating the molecular basis of parasite–host interactions, which are essential for understanding the course of parasitic infections. Further characterization of nMIFs is expected to contribute significantly to the development of novel therapeutic strategies in parasitic, inflammatory, and autoimmune diseases.

Author Contributions: Conceptualization, J.K. and M.W.; software, P.B.; investigation, J.K.; writing—original draft preparation, J.K.; writing—review and editing, P.B., E.D. and M.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Behnke, J.; Barnard, C.; Wakelin, D. Invited Review Article: Understanding Chronic Nematode Evolutionary Considerations, Current Infections: Hypotheses. *Int. J. Parasitol.* **1992**, *22*, 861–907. [\[CrossRef\]](#)
- Ghosh, S.; Jiang, N.; Farr, L.; Ngobeni, R.; Moonah, S. Parasite-Produced MIF Cytokine: Role in Immune Evasion, Invasion, and Pathogenesis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1995. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Park, S.K.; Cho, M.K.; Park, H.-K.; Lee, K.H.; Lee, S.J.; Choi, S.H.; Ock, M.S.; Jeong, H.J.; Lee, M.H.; Yu, H.S. Macrophage Migration Inhibitory Factor Homologs of *Anisakis simplex* Suppress Th2 Response in Allergic Airway Inflammation Model via CD4 + CD25 + Foxp3 + T Cell Recruitment. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6907–6914. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bungiro, R.; Cappello, M. Hookworm Infection: New Developments and Prospects for Control. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2004**, *17*, 421–426. [\[CrossRef\]](#)
- Hewitson, J.P.; Grainger, J.R.; Maizels, R.M. Helminth Immunoregulation: The Role of Parasite Secreted Proteins in Modulating Host Immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, *167*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Maizels, R.M.; Blaxter, M.L.; Scott, A.L. Immunological Genomics of *Brugia Malayi*: Filarial Genes Implicated in Immune Evasion and Protective Immunity. *Parasite Immunol.* **2001**, *23*, 327–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Calandra, T. Macrophage Migration Inhibitory Factor and Host Innate Immune Responses to Microbes. *Scand. J. Infect. Dis.* **2003**, *35*, 573–576. [\[CrossRef\]](#)
- Vermeire, J.J.; Cho, Y.; Lolis, E.; Bucala, R.; Cappello, M. Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor from Parasitic Nematodes. *Trends Parasitol.* **2008**, *24*, 355–363. [\[CrossRef\]](#)
- Bloom, B.R.; Bennett, B. Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity. *Science* **1966**, *153*, 80–82. [\[CrossRef\]](#)
- Kang, I.; Bucala, R. The Immunobiology of MIF: Function, Genetics and Prospects for Precision Medicine. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2019**, *15*, 427–437. [\[CrossRef\]](#)
- Harris, J.; VanPatten, S.; Deen, N.S.; Al-Abed, Y.; Morand, E.F. Rediscovering MIF: New Tricks for an Old Cytokine. *Trends Immunol.* **2019**, *40*, 447–462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bernhagen, J.; Mitchell, R.A.; Calandra, T.; Voelter, W.; Cerami, A.; Bucala, R. Purification, Bioactivity, and Secondary Structure Analysis of Mouse and Human Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Biochemistry* **1994**, *33*, 14144–14155. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, K.W.; Kim, H.R. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Potential Therapeutic Target for Rheumatoid Arthritis. *Korean J. Intern. Med.* **2016**, *31*, 634–642. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bloom, J.; Sun, S.; Al-Abed, Y. MIF, a Controversial Cytokine: A Review of Structural Features, Challenges, and Opportunities for Drug Development. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 1463–1475. [\[CrossRef\]](#)
- Suzuki, M.; Sugimoto, H.; Nakagawa, A.; Tanaka, I.; Nishira, J.; Sakai, M. Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 259–266. [\[CrossRef\]](#)
- Florez-Sampedro, L.; Soto-Gamez, A.; Poelarends, G.J.; Melgert, B.N. The Role of MIF in Chronic Lung Diseases: Looking beyond Inflammation. *Am. J. Physiol.—Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *318*, L1183–L1197. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, H.-W.; Bernhagen, J.; Bucala, R.; Lolis, E. Crystal Structure at 2.6-Å Resolution of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5191–5196. [\[CrossRef\]](#)
- Calandra, T.; Roger, T. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Regulator of Innate Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 791–800. [\[CrossRef\]](#)
- Sparkes, A.; de Baetselier, P.; Roelants, K.; de Trez, C.; Magez, S.; van Ginderachter, J.A.; Raes, G.; Bucala, R.; Stijlemans, B. The Non-Mammalian MIF Superfamily. *Immunobiology* **2017**, *222*, 473–482. [\[CrossRef\]](#)
- Bendrat, K.; Al-Abed, Y.; Callaway, D.J.E.; Peng, T.; Calandra, T.; Metz, C.N.; Bucala, R. Biochemical and Mutational Investigations of the Enzymatic Activity of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15356–15362. [\[CrossRef\]](#)
- Stamps, S.L.; Fitzgerald, M.C.; Whitman, C.P. Characterization of the Role of the Amino-Terminal Proline in the Enzymatic Activity Catalyzed by Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Biochemistry* **1998**, *37*, 10195–10202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Qu, G.; Fetterer, R.; Leng, L.; Du, X.; Zarlenga, D.; Shen, Z.; Han, W.; Bucala, R.; Tuo, W. Ostertagia Ostertagi Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Present in All Developmental Stages and May Cross-Regulate Host Functions through Interaction with the Host Receptor. *Int. J. Parasitol.* **2014**, *44*, 355–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lubetsky, J.B.; Dios, A.; Han, J.; Aljabari, B.; Ruzsicska, B.; Mitchell, R.; Lolis, E.; Al-Abed, Y. The Tautomerase Active Site of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Potential Target for Discovery of Novel Anti-Inflammatory Agents. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24976–24982. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cournia, Z.; Leng, L.; Gandavadi, S.; Du, X.; Bucala, R.; Jorgensen, W.L. Discovery of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)-CD74 Antagonists via Virtual Screening. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 416–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Merk, M.; Mitchell, R.A.; Endres, S.; Bucala, R. D-Dopachrome Tautomerase (D-DT or MIF-2): Doubling the MIF Cytokine Family. *Cytokine* **2012**, *59*, 10–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hermanowski-Vosatka, A.; Mundt, S.S.; Ayala, J.M.; Goyal, S.; Hanlon, W.A.; Czerwinski, R.M.; Wright, S.D.; Whitman, C.P. Enzymatically Inactive Macrophage Migration Inhibitory Factor Inhibits Monocyte Chemotaxis and Random Migration. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12841–12849. [\[CrossRef\]](#)

27. Calandra, T.; Bernhagen, J.; Mitchell, R.A.; Bucala, R. The Macrophage Is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 1895–1902. [\[CrossRef\]](#)
28. Daryadel, A.; Grifone, R.F.; Simon, H.U.; Yousefi, S. Apoptotic Neutrophils Release Macrophage Migration Inhibitory Factor upon Stimulation with Tumor Necrosis Factor- α . *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27653–27661. [\[CrossRef\]](#)
29. Rossi, A.G.; Haslett, C.; Hirani, N.; Greening, A.P.; Rahman, I.; Metz, C.N.; Bucala, R.; Donnelly, S.C. Human Circulating Eosinophils Secrete Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Potential Role in Asthma. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 2869–2874. [\[CrossRef\]](#)
30. Bacher, M.; Metz, C.N.; Calandra, T.; Mayert, K.; Chesney, J.; Lohofft, M.; Gerns, D.; Donnelly, T.; Bucala, R. An Essential Regulatory Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in T-Cell Activation (Cytokines/Glucocorticoid/Steroid/Interleukin 2/Interferon- γ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7849–7854. [\[CrossRef\]](#)
31. Nishihira, J.; Koyama, Y.; Mizue, Y. Identification of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Vascular Endothelial Cells and Its Induction by Lipopolysaccharide. *Cytokine* **1998**, *10*, 199–205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Shimizu, T. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the Skin. *J. Dermatol. Sci.* **2005**, *37*, 65–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Verschuren, L.; Lindeman, J.H.N.; van Hajo Bockel, J.; Abdul-Hussien, H.; Kooistra, T.; Kleemann, R. Up-Regulation and Coexpression of MIF and Matrix Metalloproteinases in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 1195–1202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Lang, T.; Foote, A.; Lee, J.P.W.; Morand, E.F.; Harris, J. MIF: Implications in the Pathoetiology of Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 577. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Flieger, O.; Engling, A.; Bucala, R.; Lue, H.; Nickel, W.; Bernhagen, J. Regulated Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Mediated by a Non-Classical Pathway Involving an ABC Transporter. *FEBS Lett.* **2003**, *551*, 78–86. [\[CrossRef\]](#)
36. Baugh, J.A.; Chitnis, S.; Donnelly, S.C.; Monteiro, J.; Lin, X.; Plant, B.J.; Wolfe, F.; Gregersen, P.K.; Bucala, R. A Functional Promoter Polymorphism in the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Gene Associated with Disease Severity in Rheumatoid Arthritis. *Genes Immun.* **2002**, *3*, 170–176. [\[CrossRef\]](#)
37. Bai, F.; Asojo, O.A.; Cirillo, P.; Ciustea, M.; Ledizet, M.; Aristoff, P.A.; Leng, L.; Koski, R.A.; Powell, T.J.; Bucala, R.; et al. A Novel Allosteric Inhibitor of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 30653–30663. [\[CrossRef\]](#)
38. Gore, Y.; Starlets, D.; Maharshak, N.; Becker-Herman, S.; Kaneyuki, U.; Leng, L.; Bucala, R.; Shachar, I. Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces B Cell Survival by Activation of a CD74-CD44 Receptor Complex. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2784–2792. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Hudson, J.D.; Shoaibi, M.A.; Maestro, R.; Carnero, A.; Hannon, G.J.; Beach, D.H. A Proinflammatory Cytokine Inhibits P53 Tumor Suppressor Activity. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1375–1382. [\[CrossRef\]](#)
40. Jankauskas, S.S.; Wong, D.W.L.; Bucala, R.; Djurdjaj, S.; Boor, P. Evolving Complexity of MIF Signaling. *Cell. Signal.* **2019**, *57*, 76–88. [\[CrossRef\]](#)
41. Bilsborrow, J.B.; Doherty, E.; Tilstam, P.V.; Bucala, R. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as a Therapeutic Target for Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Expert Opin. Ther. Targets* **2019**, *23*, 733–744. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Wang, Y.; An, R.; Umanah, G.K.; Park, H.; Nambiar, K.; Eacker, S.M.; Kim, B.; Bao, L.; Harraz, M.M.; Chang, C.; et al. A Nuclease That Mediates Cell Death Induced by DNA Damage and Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1. *Science* **2016**, *354*, aad6872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Yang, D.; Shu, T.; Zhao, H.; Sun, Y.; Xu, W.; Tu, G. Knockdown of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), a Novel Target to Protect Neurons from Parthanatos Induced by Simulated Post-Spinal Cord Injury Oxidative Stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *523*, 719–725. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Bifulco, C.; Mcdaniel, K.; Leng, L.; Bucala, R. Tumor Growth-Promoting Properties of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 3790–3801. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Bozza, M.T.; Martins, Y.C.; Carneiro, L.A.M.; Paiva, C.N. Macrophage Migration Inhibitory Factor in Protozoan Infections. *J. Parasitol. Res.* **2012**, *2012*, 413052. [\[CrossRef\]](#)
46. Bucala, R. MIF Rediscovered: Cytokine, Pituitary Hormone, and Glucocorticoid-induced Regulator of the Immune Response. *FASEB J.* **1996**, *10*, 1607–1613. [\[CrossRef\]](#)
47. Nobre, C.C.G.; de Araújo, J.M.G.; de Medeiros Fernandes, T.A.A.; Cobucci, R.N.O.; Lanza, D.C.F.; Andrade, V.S.; Fernandes, J.V. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **2017**, *23*, 235–244. [\[CrossRef\]](#)
48. Stojanovic, I.; Saksida, T.; Stosic-Grujicic, S. Beta Cell Function: The Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Immunol. Res.* **2012**, *52*, 81–88. [\[CrossRef\]](#)
49. Basile, M.S.; Battaglia, G.; Bruno, V.; Mangano, K.; Fagone, P.; Petralia, M.C.; Nicoletti, F.; Cavalli, E. The Dichotomic Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3023. [\[CrossRef\]](#)
50. Greven, D.; Leng, L.; Bucala, R. Autoimmune Diseases: MIF as a Therapeutic Target. *Expert Opin. Ther. Targets* **2010**, *14*, 253–264. [\[CrossRef\]](#)
51. Sauler, M.; Bucala, R.; Lee, P.J. Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Age-Related Lung Disease. *Am. J. Physiol.—Lung Cell. Mol. Physiol.* **2015**, *309*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

52. Sinitski, D.; Kontos, C.; Krammer, C.; Asare, Y.; Kapurniotu, A.; Bernhagen, J. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)-Based Therapeutic Concepts in Atherosclerosis and Inflammation. *Thromb. Haemost.* **2019**, *119*, 553–566. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Tong, X.; He, J.; Liu, S.; Peng, S.; Yan, Z.; Zhang, Y.; Fan, H. Macrophage Migration Inhibitory Factor -173G/C Gene Polymorphism Increases the Risk of Renal Disease: A Meta-Analysis. *Nephrology* **2015**, *20*, 68–76. [\[CrossRef\]](#)
54. Holowka, T.; Bucala, R. Role of Host and Parasite MIF Cytokines during *Leishmania* Infection. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2020**, *5*, 46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Michelet, C.; Danchin, E.G.J.; Jaouannet, M.; Bernhagen, J.; Panstruga, R.; Kogel, K.H.; Keller, H.; Coustau, C. Cross-Kingdom Analysis of Diversity, Evolutionary History, and Site Selection within the Eukaryotic Macrophage Migration Inhibitory Factor Superfamily. *Genes* **2019**, *10*, 740. [\[CrossRef\]](#)
56. Marson, A.L.; Ellen, D.; Tarr, K.; Scott, A.L. Macrophage Migration Inhibitory Factor (Mif) Transcription Is Significantly Elevated in *Caenorhabditis elegans* Dauer Larvae. *Gene* **2001**, *278*, 53–62. [\[CrossRef\]](#)
57. Younis, A.E.; Soblik, H.; Ajonina-Ekoti, I.; Erttmann, K.D.; Luerssen, K.; Liebau, E.; Brattig, N.W. Characterization of a Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Homologue of the Parasitic Nematode Strongyloides Acting at the Parasite-Host Cell Interface. *Microbes Infect.* **2012**, *14*, 279–289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Miska, K.B.; Fetterer, R.H.; Lillehoj, H.S.; Jenkins, M.C.; Allen, P.C.; Harper, S.B. Characterisation of Macrophage Migration Inhibitory Factor from Eimeria Species Infectious to Chickens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *151*, 173–183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Sato, A.; Uinuk-Ool, T.S.; Kuroda, N.; Mayer, W.E.; Takezaki, N.; Dongak, R.; Figueroa, F.; Cooper, M.D.; Klein, J. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) of Jawed and Jawless Fishes: Implications for Its Evolutionary Origin. *Dev. Comp. Immunol.* **2003**, *27*, 401–412. [\[CrossRef\]](#)
60. Pastrana, D.V.; Raghavan, N.; Fitzgerald, P.; Eisinger, S.W.; Metz, C.; Bucala, R.; Schleimer, R.P.; Bickel, C.; Scott, A.L. Filarial Nematode Parasites Secrete a Homologue of the Human Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 5955–5963. [\[CrossRef\]](#)
61. Falcone, F.H.; Loke, P.; Zang, X.; MacDonald, A.S.; Maizels, R.M.; Allen, J.E. A *Brugia Malayi* Homolog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Reveals an Important Link Between Macrophages and Eosinophil Recruitment During Nematode Infection. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 5348–5354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Zang, X.; Taylor, P.; Wang, J.M.; Meyer, D.J.; Scott, A.L.; Walkinshaw, M.D.; Maizels, R.M. Homologues of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor from a Parasitic Nematode: Gene Cloning, Protein Activity, and Crystal Structure. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44261–44267. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Prieto-Lafuente, L.; Gregory, W.F.; Allen, J.E.; Maizels, R.M. MIF Homologues from a Filarial Nematode Parasite Synergize with IL-4 to Induce Alternative Activation of Host Macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *85*, 844–854. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Ajonina-Ekoti, I.; Kurosinski, M.A.; Younis, A.E.; Ndjonka, D.; Tanyi, M.K.; Achukwi, M.; Eisenbarth, A.; Ajonina, C.; Lüersen, K.; Breloer, M.; et al. Comparative Analysis of Macrophage Migration Inhibitory Factors (MIFs) from the Parasitic Nematode *Onchocerca volvulus* and the Free-Living Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 3335–3346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Sharma, R.; Hoti, S.L.; Meena, R.L.; Vasuki, V.; Sankari, T.; Kaliraj, P. Molecular and Functional Characterization of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Homolog of Human from Lymphatic Filarial Parasite *Wuchereria bancrofti*. *Parasitol. Res.* **2012**, *111*, 2035–2047. [\[CrossRef\]](#)
66. Chauhan, N.; Sharma, R.; Hoti, S.L. Identification and Biochemical Characterization of Macrophage Migration Inhibitory Factor-2 (MIF-2) Homologue of Human Lymphatic Filarial Parasite, *Wuchereria bancrofti*. *Acta Trop.* **2015**, *142*, 71–78. [\[CrossRef\]](#)
67. Cai, J.; Huang, L.; Tang, H.; Xu, H.; Wang, L.; Zheng, M.; Yu, H.; Liu, H. Macrophage Migration Inhibitory Factor of *Thelazia callipaeda* Induces M2-like Macrophage Polarization through TLR4-Mediated Activation of the PI3K-Akt Pathway. *FASEB J.* **2021**, *35*, e21866. [\[CrossRef\]](#)
68. Cho, M.K.; Lee, C.H.; Yu, H.S. Amelioration of Intestinal Colitis by Macrophage Migration Inhibitory Factor Isolated from Intestinal Parasites through Toll-like Receptor 2. *Parasite Immunol.* **2011**, *33*, 265–275. [\[CrossRef\]](#)
69. Park, Y.H.; Jeong, M.S.; Ha, K.T.; Yu, H.S.; Jang, S.B. Structural Characterization of As-MIF and HJAB1 during the Inhibition of Cell-Cycle Regulation. *BMB Rep.* **2017**, *50*, 269–274. [\[CrossRef\]](#)
70. Tan, T.H.P.; Edgerton, S.A.V.; Kumari, R.; McAlister, M.S.B.; Rowe, S.M.; Nagl, S.; Pearl, L.H.; Selkirk, M.E.; Bianco, A.E.; Totty, N.F.; et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor of the Parasitic Nematode *Trichinella spiralis*. *Biochem. J.* **2001**, *357*, 373–383. [\[CrossRef\]](#)
71. Cho, Y.; Jones, B.F.; Vermeire, J.J.; Leng, L.; DiFedele, L.; Harrison, L.M.; Xiong, H.; Kwong, Y.K.A.; Chen, Y.; Bucala, R.; et al. Structural and Functional Characterization of a Secreted Hookworm Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) That Interacts with the Human MIF Receptor CD74. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23447–23456. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Wang, Y.; Lu, M.; Wang, S.; Ehsan, M.; Yan, R.; Song, X.; Xu, L.; Li, X. Characterization of a Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Homologue of the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus* Acting at the Parasite-Host Cell Interface. *Oncotarget* **2017**, *8*, 40052–40064. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Nisbet, A.J.; Bell, N.E.V.; McNeilly, T.N.; Knox, D.P.; Maizels, R.M.; Meikle, L.I.; Wildblood, L.A.; Matthews, J.B. A Macrophage Migration Inhibitory Factor-like Tautomerase from *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Strongylida). *Parasite Immunol.* **2010**, *32*, 503–511. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Corpet, F. Nucleic Acids Research Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucl. Acids Res.* **1988**, *16*, 10881–10890. [\[CrossRef\]](#)

75. Thiele, M.; Bernhagen, J. Link between Macrophage Migration Inhibitory Factor and Cellular Redox Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 1234–1248. [\[CrossRef\]](#)
76. Taylor, M.J.; Bilo, K.; Cross, H.F.; Archer, J.P.; Underwood, A.P. 16S rDNA Phylogeny and Ultrastructural Characterization of *Wolbachia* Intracellular Bacteria of the Filarial Nematodes *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Wuchereria bancrofti*. *Exp. Parasitol.* **1999**, *91*, 356–361. [\[CrossRef\]](#)
77. Lubetsky, J.B.; Swope, M.; Dealwis, C.; Blake, P.; Lolis, E. Pro-1 of Macrophage Migration Inhibitory Factor Functions as a Catalytic Base in the Phenylpyruvate Tautomerase Activity. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7346–7354. [\[CrossRef\]](#)
78. Chauhan, N.; Hoti, S.L. Role of Cysteine-58 and Cysteine-95 Residues in the Thiol Di-Sulfide Oxidoreductase Activity of Macrophage Migration Inhibitory Factor-2 of *Wuchereria bancrofti*. *Acta Trop.* **2016**, *153*, 14–20. [\[CrossRef\]](#)
79. Pennock, J.L.; Behnke, J.M.; Bickle, Q.D.; Devaney, E.; Grecis, R.K.; Isaac, R.E.; Joshua, G.W.P.; Selkirk, M.E.; Zhang, Y.; Meyer, D.J. Rapid Purification and Characterization of L-Dopachrome-Methyl Ester Tautomerase (Macrophage-Migration-Inhibitory Factor) from *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris* and *Brugia pahangi*. *Biochem. J.* **1998**, *335*, 495–498. [\[CrossRef\]](#)
80. Leng, L.; Metz, C.N.; Fang, Y.; Xu, J.; Donnelly, S.; Baugh, J.; Delohery, T.; Chen, Y.; Mitchell, R.A.; Bucala, R. MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 1467–1476. [\[CrossRef\]](#)
81. Kleemann, R.; Hausser, A.; Geiger, G.; Mischke, R.; Burger-Kentischer, A.; Flieger, O.; Johannes, F.J.; Roger, T.; Calandra, T.; Kapurniotu, A.; et al. Intracellular Action of the Cytokine MIF to Modulate AP-1 Activity and the Cell Cycle through Jab1. *Nature* **2000**, *408*, 211–216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Sica, A.; Mantovani, A. Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 787–795. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Gordon, S. Alternative Activation of Macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 23–35. [\[CrossRef\]](#)
84. Coakley, G.; Harris, N.L. Interactions between Macrophages and Helminths. *Parasite Immunol.* **2020**, *42*, e12717. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Filbey, K.J.; Varyani, F.; Hargus, Y.; Hewitson, J.P.; Smyth, D.J.; McSorley, H.J.; Ivens, A.; Nylén, S.; Rottenberg, M.; Löser, S.; et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Is Essential for Type 2 Effector Cell Immunity to an Intestinal Helminth Parasite. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Deretic, V.; Saitoh, T.; Akira, S. Autophagy in Infection, Inflammation and Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 722–737. [\[CrossRef\]](#)
87. Kaufmann, S.H.E.; Schaible, U.E. Antigen Presentation and Recognition in Bacterial Infections. *Curr. Opin. Immunol.* **2005**, *17*, 79–87. [\[CrossRef\]](#)
88. Grant, E.N.; Wagner, R.; Weiss, K.B. Observations on Emerging Patterns of Asthma in Our Society. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *104*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
89. Vercelli, D. Mechanisms of the Hygiene Hypothesis—Molecular and Otherwise. *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 733–737. [\[CrossRef\]](#)
90. De Ruiter, K.; Tahapary, D.L.; Sartono, E.; Soewondo, P.; Supali, T.; Smit, J.W.A.; Yazdanbakhsh, M. Helminths, Hygiene Hypothesis and Type 2 Diabetes. *Parasite Immunol.* **2017**, *39*, e12404. [\[CrossRef\]](#)
91. Loke, P.; Lim, Y.A.L. Helminths and the Microbiota: Parts of the Hygiene Hypothesis. *Parasite Immunol.* **2015**, *37*, 314–323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Cooke, A.; Zaccane, P.; Raine, T.; Phillips, J.M.; Dunne, D.W. Infection and Autoimmunity: Are We Winning the War, Only to Lose the Peace? *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 316–321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Feillet, H.; Bach, J.F. Increased Incidence of Inflammatory Bowel Disease: The Price of the Decline of Infectious Burden? *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2004**, *20*, 560–564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Fleming, J.; Fabry, Z. The Hygiene Hypothesis and Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **2007**, *61*, 85–89. [\[CrossRef\]](#)
95. Magen, E.; Borkow, G.; Bentwich, Z.; Mishal, J.; Scharf, S. Can Worms Defend Our Hearts? Chronic Helminthic Infections May Attenuate the Development of Cardiovascular Diseases. *Med. Hypotheses* **2005**, *64*, 904–909. [\[CrossRef\]](#)
96. Yang, J.; Zhao, J.; Yang, Y.; Zhang, L.; Yang, X.; Zhu, X.; Ji, M.; Sun, N.; Su, C. *Schistosoma japonicum* Egg Antigens Stimulate CD4⁺ CD25⁺ T Cells and Modulate Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma. *Immunology* **2007**, *120*, 8–18. [\[CrossRef\]](#)
97. Van Die, I.; Cummings, R.D. Glycan Gimmickry by Parasitic Helminths: A Strategy for Modulating the Host Immune Response? *Glycobiology* **2010**, *20*, 2–12. [\[CrossRef\]](#)
98. Khan, W.I.; Blennerhasset, P.A.; Varghese, A.K.; Chowdhury, S.K.; Omsted, P.; Deng, Y.; Collins, S.M. Intestinal Nematode Infection Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5931–5937. [\[CrossRef\]](#)
99. Ramani, S.; Chauhan, N.; Khatri, V.; Vitali, C.; Kalyanasundaram, R. *Wuchereria bancrofti* Macrophage Migration Inhibitory Factor-2 (RWbMIF-2) Ameliorates Experimental Colitis. *Parasite Immunol.* **2020**, *42*, e12698. [\[CrossRef\]](#)
100. Reardon, C.; Sanchez, A.; Hogaboam, C.M.; McKay, D.M. Tapeworm Infection Reduces Epithelial Ion Transport Abnormalities in Murine Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 4417–4423. [\[CrossRef\]](#)
101. Pascoal, V.F.; da Cunha, A.A.; Morassutti, A.L.; Antunes, G.L.; da Silveira, K.A.; Silveira, J.S.; Nuñez, N.K.; de Souza, R.G.; Graeff-Teixeira, C.; Pitrez, P.M. Immunomodulatory Effect of Different Extracts from *Angiostrongylus Cantonensis* on Airway Inflammation in an Allergic Asthma Model. *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 3719–3728. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

102. Schabussova, I.; Ul-Haq, O.; Hoflehner, E.; Akgün, J.; Wagner, A.; Loupal, G.; Joachim, A.; Ruttkowski, B.; Maizels, R.M.; Wiedermann, U. *Oesophagostomum dentatum* Extract Modulates T Cell-Dependent Immune Responses to Bystander Antigens and Prevents the Development of Allergy in Mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Sun, S.; Li, H.; Yuan, Y.; Wang, L.; He, W.; Xie, H.; Gao, S.; Cheng, R.; Qian, H.; Jiang, H.; et al. Preventive and Therapeutic Effects of *Trichinella spiralis* Adult Extracts on Allergic Inflammation in an Experimental Asthma Mouse Model. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 326. [[CrossRef](#)]
104. Nisbet, A.J.; McNeilly, T.N.; Wildblood, L.A.; Morrison, A.A.; Bartley, D.J.; Bartley, Y.; Longhi, C.; McKendrick, I.J.; Palarea-Albaladejo, J.; Matthews, J.B. Successful Immunization against a Parasitic Nematode by Vaccination with Recombinant Proteins. *Vaccine* **2013**, *31*, 4017–4023. [[CrossRef](#)]
105. Cho, Y.; Vermeire, J.J.; Merkel, J.S.; Leng, L.; Du, X.; Bucala, R.; Cappello, M.; Lolis, E. Drug repositioning and pharmacophore identification in the discovery of hookworm MIF inhibitors. *Chem Biol.* **2011**, *18*, 1089–1101. [[CrossRef](#)]
106. Swope, M.; Sun, H.W.; Blake, P.R.; Lolis, E. Direct Link between Cytokine Activity and a Catalytic Site for Macrophage Migration Inhibitory Factor. *EMBO J.* **1998**, *17*, 3534–3541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Crichlow, G.V.; Kai, F.C.; Dabideen, D.; Ochani, M.; Aljabari, B.; Pavlov, V.A.; Miller, E.J.; Lolis, E.; Al-Abed, Y. Alternative Chemical Modifications Reverse the Binding Orientation of a Pharmacophore Scaffold in the Active Site of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23089–23095. [[CrossRef](#)]
108. Dabideen, D.R.; Cheng, K.F.; Aljabari, B.; Miller, E.J.; Pavlov, V.A.; Al-Abed, Y. Phenolic Hydrazones Are Potent Inhibitors of Macrophage Migration Inhibitory Factor Proinflammatory Activity and Survival Improving Agents in Sepsis 1. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1993–1997. [[CrossRef](#)]

Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host–parasite interactions

Justyna Karabowicz[✉], Ewa Długosz, Piotr Baska, Mateusz Pękacz, Magdalena Elżbieta Wyszomłok, Maciej Klockiewicz, Marcin Wiśniewski

Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine,
Warsaw University of Life Sciences, 02-786 Warszawa, Poland
justyna_karabowicz@sggw.edu.pl

Received: April 2, 2024

Accepted: July 11, 2024

Abstract

Introduction: *Dirofilaria repens* is a zoonotic parasitic filarial nematode that infects carnivores and occasionally humans. Knowledge of the host–parasite molecular interactions enabling the parasite’s avoidance of the host immune response in subcutaneous dirofilariasis remains limited. Parasitic orthologues of host macrophage migration inhibitory factor (MIF) are molecules potentially involved in this process. **Material and Methods:** Complementary DNA encoding two *D. repens* MIF orthologues (rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2) was cloned into a pET-28a expression vector. The recombinant proteins were produced in *Escherichia coli* and purified using affinity nickel chromatography. The reactivity of both recombinant proteins was analysed with infected dog and immunised mouse sera. **Results:** Stronger antibody production was induced by rDre-MIF-1 in mice, as evidenced by significantly higher levels of anti-rDre-MIF-1 total IgG, IgG2 and IgE antibodies than of anti-rDre-MIF-2 immunoglobulins. Additionally, a significantly different level of antibodies specific to both proteins was noted between the sera of infected dogs and those of uninfected dogs. **Conclusion:** This study is the first attempt to characterise MIF orthologues from the filarial parasite *D. repens*, which may affect the immune response during infection.

Keywords: MIF, subcutaneous dirofilariasis, recombinant protein, humoral response, ELISA.

Introduction

Dirofilaria repens is a parasite primarily affecting carnivores, especially dogs, but displaying zoonotic potential (8). Dirofilariasis does not manifest strong, noticeable clinical symptoms, but studies suggest that it may induce a state of chronic stress in canine hosts, which may influence the outcome of the immune response (29). The most characteristic symptom is manifested by the formation of subcutaneous nodules, where the encapsulated parasite hides from the host’s immune system (22). Despite the increasing threat posed by these parasites to human and veterinary health, knowledge of the molecular mechanisms of the host–parasite interaction during the course of dirofilariasis remains limited.

Parasitic nematodes modulate the host immune response to ensure their survival, and one means by which they achieve this is by secreting immunomodulatory

molecules. A particularly intriguing strategy involves mimicking molecules from the host immune system. Nematodes release several orthologues of host immune components, including macrophage migration inhibitory factor (MIF) (3, 15, 17). Mammalian MIFs play a significant role in immune response regulation, serving as proinflammatory cytokines with diverse functions. One of the primary functions of MIFs is attracting cells engaged in both innate and adaptive immune responses. They can be synthesised by various cell types, including monocytes, macrophages, lymphocytes, neutrophils and endothelial and epithelial cells. Macrophage migration inhibitory factors bind to the CD74 receptor (major histocompatibility complex class II invariant chain), and form a complex with a CD44 molecule or other receptors from the CXC chemokine receptor family, leading to modulation of various intracellular signalling pathways (2, 6, 7, 24). This interference results in upregulation of Th1/Th17 type cytokine (tumour necrosis factor alpha

(TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-8 and IL-12) expression as well as upregulation of expression of other proteins engaged in the immune response: Toll-like receptor 4, matrix metalloproteinases, prostaglandin E2 and cyclooxygenase 2, additionally resulting in nitric oxide release (5, 12, 16).

Two different orthologues of MIF have been identified in nematodes based on their homology to free-living *Caenorhabditis elegans* MIFs (*Ce*-MIF-1 and *Ce*-MIF-2). They both share structural similarities and catalytic properties (tautomerase and oxidoreductase activity) with mammalian MIFs (9, 27) and are expressed in various developmental stages of filarial species such as *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus* (1, 20, 23). Various data suggest their involvement in evading host immune response (4, 28, 31), but their precise molecular function remains enigmatic.

The aims of the study were production of two recombinant MIF orthologues from *D. repens*, analysis of *Dre-mif-1* and *Dre-mif-2* mRNA expression in microfilariae and the adult stage, and evaluation of r*Dre*-MIF-1 and r*Dre*-MIF-2 immunogenicity in mice and reactivity with antibodies from infected dog sera.

Material and Methods

Expression and purification of r*Dre*-MIF-1 and r*Dre*-MIF 2. Complementary DNA encoding two proteins (GenBank accession numbers MT071087.1 and MT071088.1) was amplified using gene-specific primers containing restriction enzyme sites and cloned in the *E. coli* transformation pET28a plasmid (Novagen, San Diego, CA, USA) following *Bam*HI and *Xho*I digestion. The cloned insert was sequenced using the Sanger technique to confirm that no amino acids had changed by mutation and verify that the open reading frame was appropriate. The plasmids containing the verified insert sequences were transformed to two *E. coli* expression strains: SoluBL21 and BL21. To induce protein expression, isopropyl-1-thio- β -d-galactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 1mM was added to the bacterial culture at the log phase of growth. After 2 h, cells were centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min at room temperature. Bacterial pellets were either used immediately for protein purification or stored at -20°C .

The pellets were sonicated to disintegrate cell membranes and centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min at 4°C . The supernatants containing recombinant fusion proteins with $6 \times \text{His}$ tags were collected and the proteins were purified using a Ni^{2+} -charged affinity chromatography column (Cytiva, Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's protocol. The purity of the eluted proteins was assessed using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Perfect Tricolor Protein Ladder molecular weight marker was used for protein sizing (EURx, Gdańsk, Poland). The two elution fractions with the highest

protein concentrations were pooled, dialysed against Dulbecco's phosphate-buffered saline (Biowest, Nuaille, France) using 2 mL Zeba Spin 7 kDa molecular weight cut-off (7K MWCO) Desalting Columns (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and assessed for recombinant protein content by Western blotting using Anti-polyHistidine-Peroxidase antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The purity and concentration of the recombinant protein solutions were determined using SDS-PAGE and a bicinchoninic acid BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), respectively.

Bioinformatic analysis. Alignment of human MIF (hMIF), dog MIF (dMIF), *Dre*-MIF-1 and *Dre*-MIF-2 protein sequences was performed using the Multalin tool (10). The GenBank accession numbers of the analysed sequences were CAG30406.1 (hMIF), XP_038293371.1 (dMIF), MT071087.1 (*Dre*-MIF-1) and MT071088.1 (*Dre*-MIF-2). The protein identity (%) between them was calculated using ClustalW (25). The tertiary structures of *Dre*-MIF-1 and *Dre*-MIF-2 were predicted using Phyre2 (18). The structures were visualised and superimposed using Protein Imager (26).

***Dre-mif-1* and *Dre-mif-2* mRNA expression in microfilariae and adult *D. repens* stages.** Total RNA was isolated from microfilariae and adult worms using a Total RNA purification kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA contamination was removed using DNaseI (Thermo Scientific) and the efficiency of DNA cleavage was assessed using PCR. When free of DNA contamination, the RNA solution was used for cDNA synthesis using a RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific).

Table 1. Primers used in the reverse-transcriptase quantitative PCR to amplify *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factor (*Dre-mif*)-1 and -2

Primer	Sequence
<i>Dre-mif-1_F</i>	5' GGCTGATGAACT CAAAAT CCC 3'
<i>Dre-mif-1_R</i>	5' ACCCATGCGGAAGCACTAATA 3'
<i>Dre-mif-2_F</i>	5' GATTGGATCATTTTCGGCTGATA 3'
<i>Dre-mif-2_R</i>	5' CGTACCATTGCATCCACATTT 3'

F – forward; R – reverse

The qPCR was performed in a 12 μL volume in a 96-well PCR plate. The reaction components were as follows: 2 μL of cDNA template, $1 \times$ Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), ROX passive reference dye (10 nM) and a mixture of the primers *Dre-mif-1_F* and *Dre-mif-1_R* or *Dre-mif-2_F* and *Dre-mif-2_R* at 0.3 μM (Table 1). Due to the lack of data regarding a suitable reference gene for quantitative real-time PCR analyses in *D. repens*, the direct copy number was estimated for reaction evaluation. To achieve standard curves for both genes, pET28a/*Dre-mif-1* or pET28a/*Dre-mif-2* recombinant plasmid was 10-fold

serially diluted to contain from 10^8 to 10^2 copies per reaction and used as a matrix for qPCR. The PCR was performed as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min and a dissociation curve stage. The reaction was performed in triplicate.

Generation of anti-rDre-MIF-1 and anti-rDre-MIF-2 polyclonal mouse sera and analysis of antibody cross-reactivity. The antibodies were generated by subcutaneous injection into the neck tissue of two 10-week-old male BALB/c mice of 100 µg of either rDre-MIF-1 or rDre-MIF-2 precipitated with Inject Alum (Thermo Scientific) in a final volume ratio of 1:2, followed by two boosts at 14-day intervals. The experiments were conducted following the guidelines and regulations of the 2nd Local Ethics Committee for Animal Experimentation in Warsaw (Permit No. WAW2/142/2021). Polyclonal sera were collected from mice 14 days after the last immunisation.

Serum reactivity against the recombinant proteins was assessed using ELISA and Western blot. Ninety-six-well plates (Wuxi NEST Biotechnology, Wuxi, China) were incubated with rDre-MIF-1 or rDre-MIF-2 (2.5 µg/mL) diluted in bicarbonate buffer (100 µL/well of 0.015 M Na₂CO₃ and 0.035 M NaHCO₃ at pH 9.5) overnight at 4°C. The plates were rinsed three times with 250 µL of phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.05% Tween-20 and then blocked with 200 µL of 5% filtered skimmed milk in PBS buffer for 90 min at 20°C. The plates were rinsed as described above, and subsequently 100 µL of anti-rDre-MIF-1, anti-rDre-MIF-2 or negative control mouse serum (n = 2) appropriately diluted in PBS (1:51,200 for total IgG, IgG1, IgG2 and IgM and 1:5,120 for IgE) was added to the wells. Dilutions were established based on preliminary data obtained using a serum dilution series. The plates were incubated at room temperature for 1.5 h and washed three times. The subsequent step was a 1-h incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG solution (1:30,000), goat anti-mouse IgG1 (1:4,000), goat anti-mouse IgG2 (1:4,000), goat anti-mouse IgM (1:4,000) or goat anti-mouse IgE (1:4,000) (all from AbD Serotec, now Bio-Rad, Kidlington, UK). The reaction was developed with the TMB Substrate Kit (Thermo Scientific) and stopped after 30 min using 2 M H₂SO₄. Absorbance readings were recorded at 450 nm using a Synergy H1 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA).

To confirm the cross-reactivity between the sera, Western blot analyses were performed. A 5-µg mass of either rDre-MIF-1 or rDre-MIF-2 was resolved in polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with 5% skimmed milk in PBS (w/v) overnight with continuous shaking at 4°C. The membranes were probed with anti-rDre-MIF-1 or anti-rDre-MIF-2 sera (diluted 1:5,000), rinsed with PBS/0.05% Tween 20 buffer and incubated for 60 min with HRP-conjugated anti-mouse IgG solution (1:5,000, Sigma-Aldrich). The immunoreactive bands were

developed using West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) and visualised on radiography films.

Immune recognition of rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2 by sera from dogs naturally infected with *D. repens*. Samples from naturally infected and uninfected dogs were collected during the study by Wyszomolek *et al.* (29). Infected dogs were classified for the study based on a positive Knott's test result. The reactivity of rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2 with sera from infected (n = 17) and uninfected (n = 6) dogs with total IgG, IgG1, IgG2, IgE and IgM antibodies was measured using an indirect ELISA.

The secondary antibodies for this ELISA were HRP-conjugated rabbit anti-dog IgG (total) (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK), goat anti-dog IgG1, goat anti-dog IgG2, goat anti-dog IgM and goat anti-dog IgE (all from AbD Serotec). The ELISA procedure was the same as for the mouse sera except that the dog sera were diluted 1:400 for total IgG, IgG1 and IgG2; 1:20 for IgE; and 1:3,200 for IgM, and the secondary antibodies were diluted 1:30,000 for rabbit anti-dog IgG; 1:10,000 for goat anti-dog IgG1 and IgG2; and 1:1,000 for goat anti-dog IgM and IgE.

Statistical analysis. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 software (GraphPad, Boston, MA, USA).

Results

Expression and purification of rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2. Expression studies were conducted in two distinct *E. coli* strains: BL21 and SoluBL21. In both cases, cells produced soluble recombinant proteins with an approximate size of 15 kDa–17 kDa. However, there were differences between the purification efficiency from one strain and the efficiency from the other. Purification of rDre-MIF-1 was more efficient from the SoluBL21 strain, while better results for rDre-MIF-2 were achieved using the BL21 strain. Analyses by SDS-PAGE indicated that the purified rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2 were electrophoretically homogeneous and without impurities (Fig. 1).

Dre-mif-1 and Dre-mif-2 mRNA expression in microfilariae and adult *D. repens* stages. A significantly higher expression of both genes was observed in the adult stage. Interestingly, the expression level of *Dre-mif-1* was double that of *Dre-mif-2* in the adult stage (Fig. 2).

Bioinformatic analysis. The sequence comparison analysis (Fig. 3) revealed that *Dre-MIF-1* had higher identity (40 %) to host MIFs (human and dog) than *Dre-MIF-2* (27%). Despite *Dre-MIF-1* and *Dre-MIF-2* amino acid sequences having shown low identity of 27.8 % (Table 2), their potential tertiary structures showed a high level of similarity (Fig. 4).

Generation of anti-rDre-MIF-1 and anti-rDre-MIF-2 polyclonal sera and analysis of antibody cross-reactivity. The results suggest that rDre-MIF-1 was

more immunogenic, as the levels of anti-r*Dre*-MIF-1 total IgG, IgG2 and IgE antibodies were much higher than those of anti-r*Dre*-MIF-2 immunoglobulins (Fig. 5). At the same time, antibodies raised against r*Dre*-MIF-1 were less specific than these produced after r*Dre*-MIF-2 immunisation. Western blot analysis revealed that antibodies specific to r*Dre*-MIF-1 recognised both molecules with similar affinity, whereas anti-r*Dre*-MIF-2 IgG antibodies showed only weak reactions with r*Dre*-MIF-1 (Fig. 6). However, as shown in Fig. 5, only IgG1 antibodies were responsible for this cross-reactivity. Our results show that immunisation with MIFs favours the production of IgG1 subclass antibodies. In turn, IgG2 antibodies are produced only after r*Dre*-MIF-1 immunisation and do not cross-react with r*Dre*-MIF-2 molecules. A similar observation was made for the IgE class. Antibodies of the IgM class were found to be the least specific and the most cross-reactive of all the analysed classes.

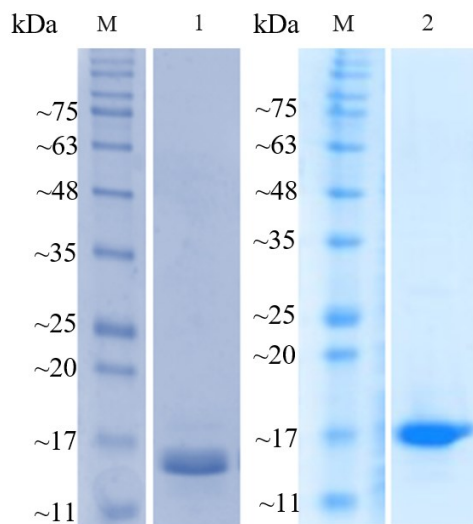


Fig. 1. Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis analysis of purified recombinant *Dirofilaria repens* (r*Dre*)-macrophage migration inhibitory factor (MIF)-1 (left) and r*Dre*-MIF-2 (right). Lane M – molecular weight marker; Lane 1 – r*Dre*-MIF-1 (10 µL); Lane 2 – r*Dre*-MIF-2 (10 µL)

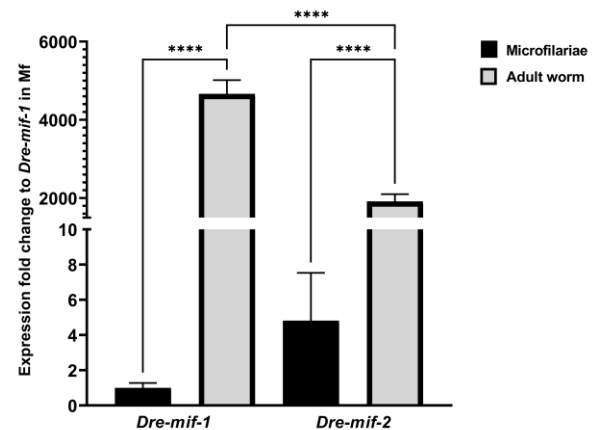


Fig. 2. *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factor (*Dre-mif*)-1 and *Dre-mif*-2 gene expression in microfilariae and the adult stage of *D. repens*. The fold increase in expression is shown over the level of expression of *Dre-mif*-1 in microfilariae. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance; **** – P-value <0.001

Table 2. The protein identity between human macrophage migration inhibitory factor (hMIF), dog MIF (dMIF), *Dirofilaria repens* (*Dre*)-MIF-1 and *Dre*-MIF-2

Protein	hMIF	dMIF	<i>Dre</i> -MIF-1	<i>Dre</i> -MIF-2
hMIF	-	93.9%	41.7%	27.8%
dMIF	93.9%	-	40.0%	26.9%
<i>Dre</i> -MIF-1	41.7%	40.0%	-	27.8%
<i>Dre</i> -MIF-2	27.8%	26.9%	27.8%	-

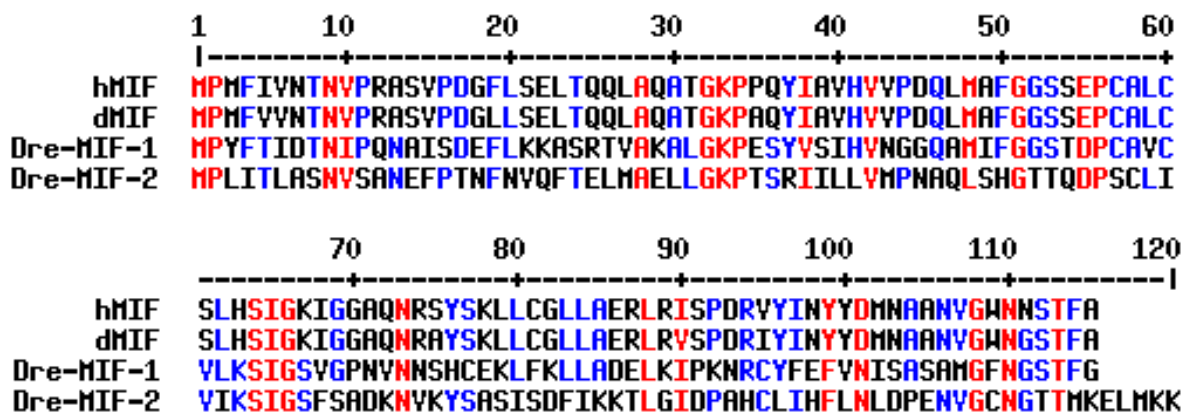


Fig. 3. Alignment of human macrophage migration inhibitory factor (hMIF), dog MIF (dMIF), *Dirofilaria repens* (*Dre*)-MIF-1 and *Dre*-MIF-2 amino acid sequences

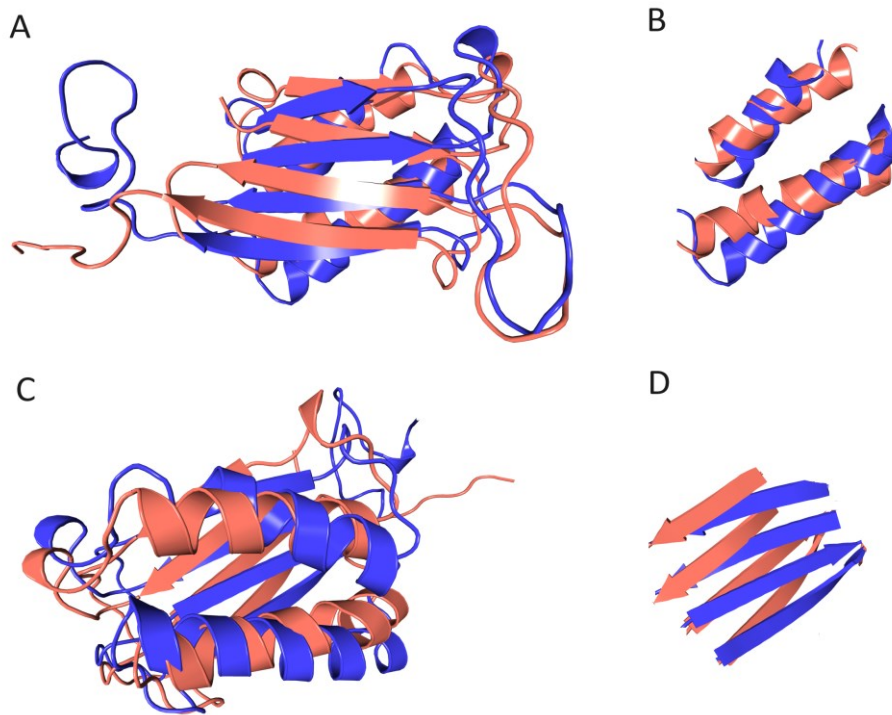


Fig. 4. The visualisation of superimposed potential structures of *Dirofilaria repens* (Dre)-macrophage migration inhibitory factor (MIF)-1 (red) and Dre-MIF-2 (blue). The complete structures are shown on fragments A) and C), whereas matching helices and strands are respectively shown on fragments B) and D)

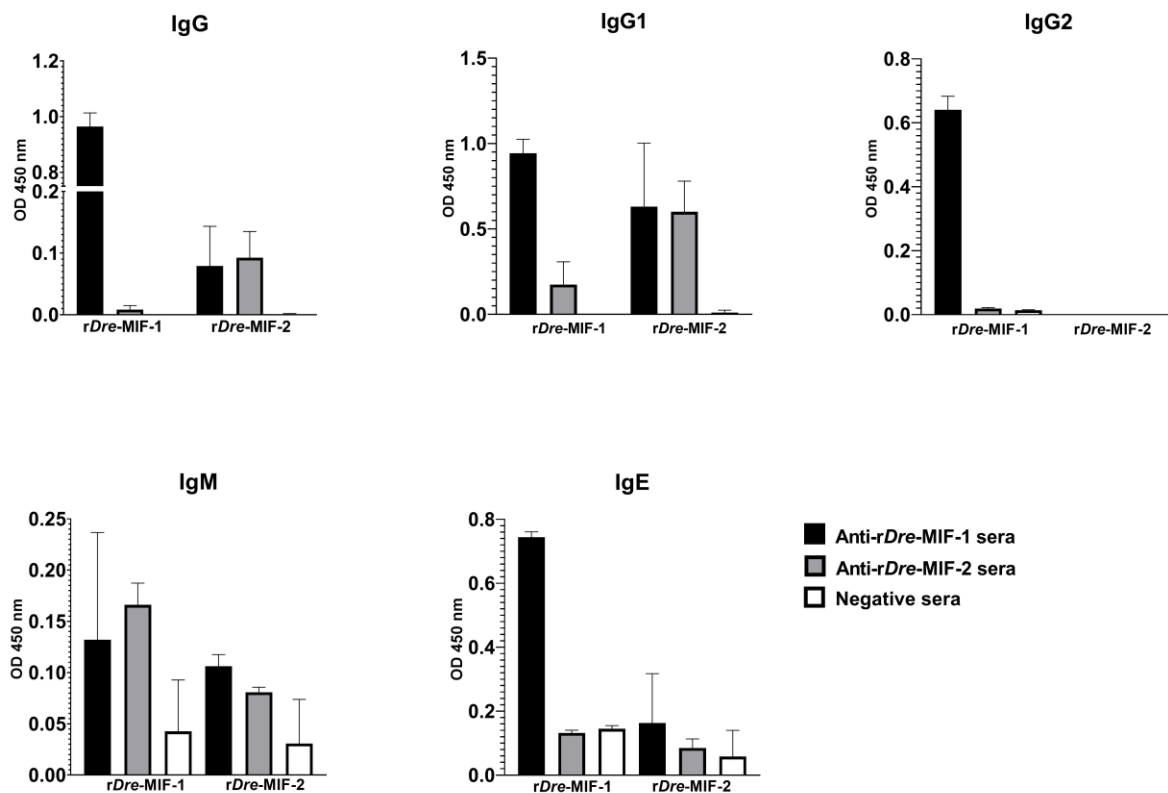


Fig. 5. Reactivity of mouse anti-recombinant *Dirofilaria repens* (rDre)-macrophage migration inhibitory factor (MIF)-1 and anti-rDre-MIF-2 sera with rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2. Serum dilutions for detection: immunoglobulin (Ig)G, IgG1, IgG2 and IgM – 1:51,200; IgE – 1:5,120. OD – optical density

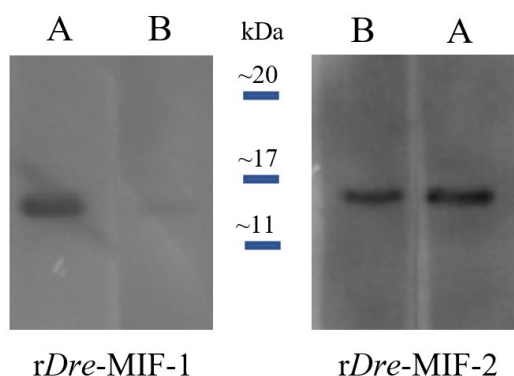


Fig. 6. Western blot cross-reactivity analysis of mouse anti-recombinant *Dirofilaria repens* (rDre)-macrophage migration inhibitory factor (MIF)-1 (A) and anti-rDre-MIF-2 (B) antibodies with rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2

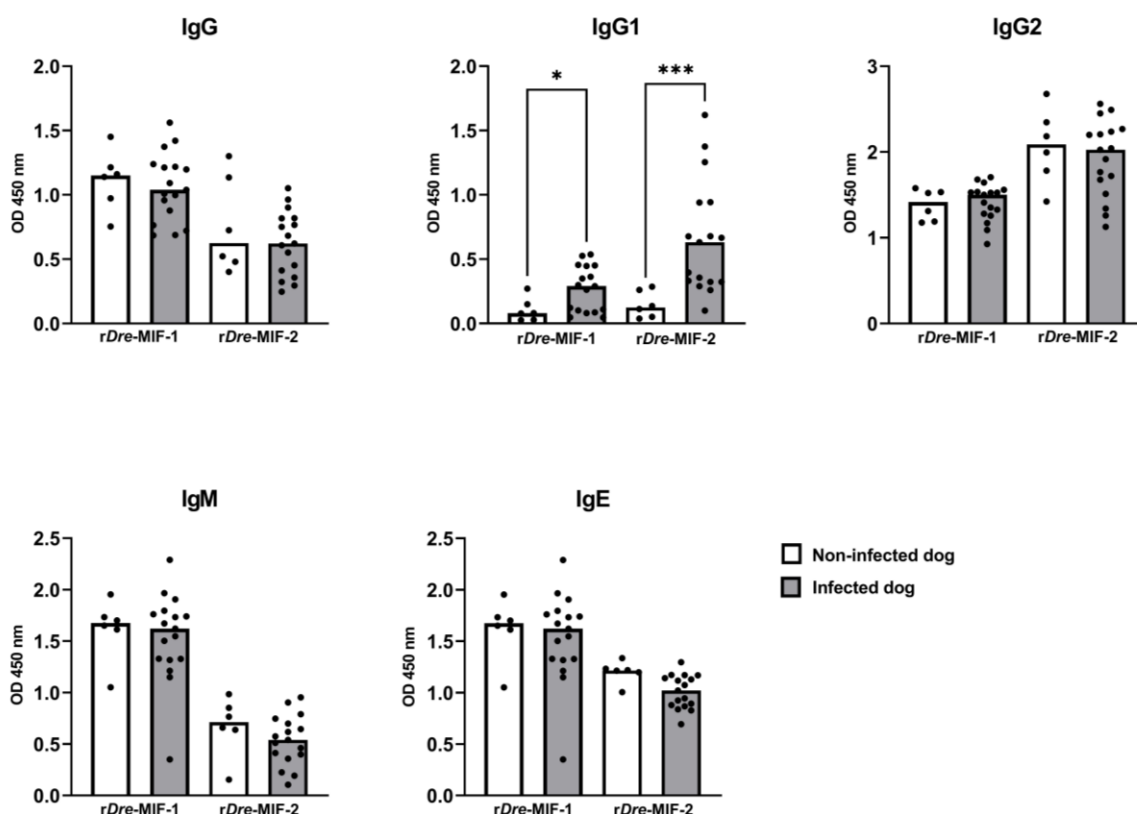


Fig. 7. Reactivity of different serum antibody classes in infected and non-infected dogs with recombinant *Dirofilaria repens* (rDre)-macrophage migration inhibitory factor (MIF)-1 and rDre-MIF-2. Serum dilutions for detection: immunoglobulin (Ig) G, IgG1, and IgG2 – 1:400; IgM – 1:3,200; IgE – 1:20. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test; * – P-value < 0.05; *** – P-value < 0.001

Immune recognition of rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2 by sera from dogs naturally infected with *D. repens*. The reactivity of rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2 was tested with sera of naturally infected and uninfected dogs. An elevated level of IgG1-subclass antibodies recognising both rDre-MIF-1 and rDre-MIF-2 was noted in infected dogs' sera (Fig. 7). No significant differences were observed in the levels of total IgG, IgG2, IgE or IgM antibodies between infected dogs' and uninfected dogs' sera.

Discussion

Subcutaneous dirofilariasis is a relatively new problem in human and veterinary medicine. Since the

diagnosis of this infection is currently imperfect, the zoonosis is spreading uncontrollably throughout the world (8). The molecular interactions between *D. repens* and the host immune system remain unknown.

Nematodes of various species secrete MIF homologues to influence and modulate the immune response of their hosts. Novel technologies allowing for rapid identification of MIF genes and their corresponding cDNA, coupled with the production of recombinant proteins, have facilitated comprehension of homologue expression patterns and functions in nematode parasitological infection. In the present study, two MIF paralogues from the parasitic nematode *D. repens* were described for the first time. As other nematode MIF orthologues also do, *Dre-MIF-1* showed a higher range of amino acid similarity to mammalian host MIFs than *Dre-MIF-2* (27). The amino

acid sequence similarity between *Dre*-MIF-1 and human or canine MIF is approximately 40%, while *Dre*-MIF-2 exhibits a similarity of about 27%, suggesting their unlike abilities to stimulate the host's immune system. Studies show that MIF-2 homologues from *B. malayi* and *O. volvulus* should rather be considered as D-dopachrome tautomerase homologues, which would explain the lower degree of similarity to their mammalian counterparts (19).

In our study, we observed highly upregulated expression of *Dre-mif-1* and *Dre-mif-2* in the adult worm compared to their expression in microfilariae. The results are in line with those of similar experiments of Pastrana *et al.* (20), who confirmed MIF expression in all *B. malayi* developmental stages, and of research by Ajonina-Ekoti *et al.* (1), who proved MIF expression in the adult stage of the parasitic filarial nematode *O. volvulus* using immunolocalisation. However, in *B. malayi* the expression in the adult stage was only slightly increased from that in microfilariae. The reason for this observation is not explained, but high MIF expression in various adult filarial nematodes suggests that these proteins may play a significant role in the course of filarial infection when adult nematodes reside in the host's subcutaneous tissue.

In the present study, we observed that mice immunised with r*Dre*-MIF-2 generated a more specific response, while mice immunised with r*Dre*-MIF-1 produced serum with cross-reactivity with r*Dre*-MIF-2, which may be explained by similar predicted tertiary structures of the proteins. Such cross-reactions were not noted in the case of *O. volvulus* or *C. elegans*; however, similarly to our results, *Ov*-MIF-1 was more immunogenic in rats than *Ov*-MIF-2 for Ajonina-Ekoti *et al.* (1). Another group of researchers also excluded cross-reactivity between antibodies specific to recombinant *Strongyloides ratti* MIF and human MIF (31).

Climate change and increased migration with pet dogs have led to dirofilariasis being more frequently described in Central and Eastern European countries: Germany, Poland, Slovakia and Ukraine. According to the latest data, cases of dirofilariasis have been reported in Northern Europe and Baltic countries, particularly in Lithuania, Latvia, and Finland (8, 13, 14). Moreover, the number of infections in humans is increasing because of the increased prevalence among dogs. This urges the characterisation of molecular interaction mechanisms between the worm and its natural host, the dog, which is a reservoir of the disease for humans. The knowledge will result in development of novel diagnostics, prophylaxis and treatment procedures (21). In our previous study, we confirmed that microfilaraemic infections were associated with higher levels of IgG1 antibodies specific to *D. repens* somatic antigens than of IgG2 immunoglobulins, whereas in occult infections IgG2 predominated over IgG1 (30). Here, we evaluated the presence of IgG, IgG1, IgG2, IgM and IgE antibodies specific to *D. repens* MIF molecules in naturally infected dog sera. A significant difference between infected and uninfected dogs was found only in the case

of IgG1 antibodies specific to both proteins. This corresponds to the findings reported by other authors who observed that in the sera of dogs naturally infected with *D. immitis*, although both parasite-specific IgG1 and IgG2 antibodies were present, IgG1 appeared to be the predominant type (11). Our data show that different IgG subclasses show different affinity for and specificity to the analysed antigens. This should be therefore taken into consideration in the development of diagnostic tests, which are usually based on total IgG detection.

Scientific research is still underway to create a serological test that would be particularly useful in the prepatent period of invasion. Novel approaches have been reported, such as the use of a phage display library to search for diagnostic peptides (21). In our study we used recombinant *D. repens* MIF molecules, but these were found to be non-specific and cannot be considered as potential diagnostic antigens.

Conclusion

The present study describes the first attempt at the characterisation of MIF homologues from *D. repens* as a significant filarial parasite of dogs. The proteins share low similarity at the amino acid level, but appear to have very similar tertiary structures. The noted cross-reactivity rather excludes their use in diagnostic tests, but the observation of the different serological responses they raise in the host provides new insights into naturally occurring events during dirofilariasis.

Conflict of Interests Statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Financial Disclosure Statement: The publication was financed by the Science Development Fund of the Warsaw University of Life Sciences – SGGW.

Animal Rights Statement: The experiment was approved by the 2nd Local Ethical Committee for Animal Experiments in Warsaw (approval no. WAW2/142/2021). All procedures were carried out according to the Polish Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes (Official Journal of Laws 2015, item 266 based on Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

References

1. Ajonina-Ekoti I., Kurosinski M.A., Younis A.E., Ndjonka D., Tanyi M.K., Achukwi M., Eisenbarth A., Ajonina C., Lüersen K., Breloer M., Brattig N.W., Liebau E.: Comparative analysis of macrophage migration inhibitory factors (MIFs) from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus* and the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Parasitol Res* 2013, 112, 3335–3346, doi: 10.1007/s00436-013-3513-1.

2. Bacher M., Metz C.N., Calandra T., Mayer K., Chesney J., Lohoff M., Gemsa D., Donnelly T., Bucala R.: An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 7849–7854, doi: 10.1073/pnas.93.15.7849.
3. Behnke J., Barnard C., Wakelin D.: Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypotheses and the way forward. *Int J Parasitol* 1992, 22, 861–907, doi: 10.1016/0020-7519(92)90046-n.
4. Cai J., Huang L., Tang H., Xu H., Wang L., Zheng M., Yu H., Liu H.: Macrophage migration inhibitory factor of *Thelazia callipaeda* induces M2-like macrophage polarization through TLR4-mediated activation of the PI3K-Akt pathway. *FASEB J* 2021, 35, e21866, doi: 10.1096/fj.202100676R.
5. Calandra T.: Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *Scand J Infect Dis* 2003, 35, 573–576, doi: 10.1080/00365540310016277.
6. Calandra T., Bernhagen J., Mitchell R.A., Bucala R.: The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 1994, 179, 1895–1902, doi: 10.1084/jem.179.6.1895.
7. Calandra T., Roger T.: Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003, 3, 791–800, doi: 10.1038/nri1200.
8. Capelli G., Genchi C., Baneth G., Bourdeau P., Brianti E., Cardoso L., Danesi P., Fuehrer H.-P., Giannelli A., Ionică A.M., Maia C., Modrý D., Montarsi F., Krücken J., Papadopoulos E., Petric D., Pfeffer M., Savić S., Otranto D., Poppert S., Silaghi C.: Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors* 2018, 11, 663, doi: 10.1186/s13071-018-3205-x.
9. Chauhan N., Hoti S.L.: Role of cysteine-58 and cysteine-95 residues in the thiol di-sulfide oxidoreductase activity of Macrophage Migration Inhibitory Factor-2 of *Wuchereria bancrofti*. *Acta Trop* 2016, 153, 14–20, doi: 10.1016/j.actatropica.2015.09.017.
10. Corpet F.: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acid Res* 1988, 16, 10881–10890, doi: 10.1093/nar/16.22.10881.
11. Deplazes P., Smith N.C., Lutz H., Eckert J.: Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 1995, 17, 451–458, doi: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb00914.x.
12. Flaster H., Bernhagen J., Calandra T., Bucala R.: The Macrophage Migration Inhibitory Factor-Glucocorticoid Dyad: Regulation of Inflammation and Immunity. *Mol Endocrinol* 2007, 21, 1267–1280, doi: 10.1210/me.2007-0065.
13. Fuehrer H.-P., Morelli S., Unterköfler M.S., Bajer A., Bakran-Lebl K., Dwużnik-Szarek D., Farkas R., Grandi G., Heddergott M., Jokelainen P., Knific T., Leschnik M., Míterpáková M., Modrý D., Huus Petersen H., Skirnisson K., Vergles Rataj A., Schnyder M., Strube C.: *Dirofilaria* spp. and *Angiostrongylus vasorum*: Current Risk of Spreading in Central and Northern Europe. *Pathogens* 2021, 10, 1268, doi: 10.3390/pathogens10101268.
14. Genchi C., Kramer L.H.: The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Vet Parasitol* 2020, 280, 108995, doi: 10.1016/j.vetpar.2019.108995.
15. Ghosh S., Jiang N., Farr L., Ngoben R., Moonah S.: Parasite-Produced MIF Cytokine: Role in Immune Evasion, Invasion, and Pathogenesis. *Front Immunol* 2019, 10, 1995, doi: 10.3389/fimmu.2019.01995.
16. Harris J., VanPatten S., Deen N.S., Al-Abed Y., Morand E.F.: Rediscovering MIF: New Tricks for an Old Cytokine. *Trends Immunol* 2019, 40, 447–462, doi: 10.1016/j.it.2019.03.002.
17. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M.: Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* 2009, 167, 1–11, doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.04.008.
18. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J.E.: The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nat Protoc* 2015, 10, 845–858, doi: 10.1038/nprot.2015.053.
19. Miska K.B., Fetterer R.H., Lillehoj H.S., Jenkins M.C., Allen P.C., Harper S.B.: Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens. *Mol Biochem Parasitol* 2007, 151, 173–183, doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.10.020.
20. Pastrana D.V., Raghavan N., FitzGerald P., Eisinger S.W., Metz C., Bucala R., Schleimer R.P., Bickel C., Scott A.L.: Filarial Nematode Parasites Secrete a Homologue of the Human Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Infect Immun* 1998, 66, 5955–5963, doi: 10.1128/IAI.66.12.5955-5963.1998.
21. Pękacz M., Basalaj K., Kalinowska A., Klockiewicz M., Stopka D., Bąska P., Długosz E., Karabowicz J., Młocicki D., Wiśniewski M., Zawistowska-Deniziak A.: Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. *Sci Rep* 2022, 12, 2288, doi: 10.1038/s41598-022-06116-8.
22. Petrocheilou V., Theodorakis M., Williams J., Prifti H., Georgilis K., Apostolopoulou I., Mavrikakis M.: Microfilaremia from a *Dirofilaria*-like parasite in Greece. *APMIS* 1998, 106, 315–318, doi: 10.1111/j.1699-0463.1998.tb01352.x.
23. Sharma R., Hoti S.L., Meena R.L., Vasuki V., Sankari T., Kaliraj P.: Molecular and functional characterization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) homolog of human from lymphatic filarial parasite *Wuchereria bancrofti*. *Parasitol Res* 2012, 111, 2035–2047, doi: 10.1007/s00436-012-3051-2.
24. Shimizu T.: Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. *J Dermatol Sci* 2005, 37, 65–73, doi: 10.1016/j.jdermsci.2004.08.007.
25. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res* 1994, 22, 4673–4680, doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
26. Tomasello G., Armenia I., Molla G.: The Protein Imager: A full-featured online molecular viewer interface with server-side HQ-rendering capabilities. *Bioinformatics* 2020, 36, 2909–2911, doi: 10.1093/bioinformatics/btaa009.
27. Vermeire J.J., Cho Y., Lolis E., Bucala R., Cappello M.: Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. *Trends Parasitol* 2008, 24, 355–363, doi: 10.1016/j.pt.2008.04.007.
28. Wang Y., Lu M.-M., Wang S., Ehsan M., Yan R.-F., Song X.-K., Xu L.-X., Li X.-R.: Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* acting at the parasite-host cell interface. *Oncotarget* 2017, 8, 40052–40064, doi: 10.18632/oncotarget.16675.
29. Wyszomolek M.E., Dobrzyński A., Długosz E., Czopowicz M., Wiśniewski M., Jurka P., Klockiewicz M.: Hematological and Biochemical Changes in Dogs Naturally Infected With *Dirofilaria repens*. *Front Vet Sci* 2020, 7, 590, doi: 10.3389/fvets.2020.00590.
30. Wyszomolek M.E., Klockiewicz M., Długosz E., Wiśniewski M.: Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2022, 86, 101818, doi: 10.1016/j.cimid.2022.101818.
31. Younis A.E., Soblik H., Ajonina-Ekoti I., Ertmann K.D., Luersen K., Liebau E., Brattig N.W.: Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode *Strongyloides* acting at the parasite-host cell interface. *Microbes Infect* 2012, 14, 279–289, doi: 10.1016/j.micinf.2011.09.006.

Warszawa, 29.10.2024 r.

Mgr Justyna Karabowicz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
justyna_karabowicz@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główny Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Baska P, Wiśniewski M. Nematode Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential Therapeutic Targets. Pathogens. 2022. 11 (2): 258

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji artykułu, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 85%.

.....*JKarabowicz*.....

Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Dr hab. inż. Ewa Długosz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
ewa_długosz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Baska P, Wiśniewski M. Nematode Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential Therapeutic Targets. Pathogens. 2022. 11 (2): 258

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

Ewa Długosz

Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Dr hab. inż. Piotr Bąska, prof. SGGW
Zakład Toksykologii i Farmakologii
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
piotr_baska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównnej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Bąska P, Wiśniewski M. Nematode Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential Therapeutic Targets. Pathogens. 2022. 11 (2): 258

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przygotowaniu abstraktu graficznego, rycin oraz krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

Piotr Bąska

Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Dr hab. inż. Marcin Wiśniewski, prof. SGGW
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
marcin_wiśniewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównnej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Baska P, Wiśniewski M. Nematode Orthologs of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Modulators of the Host Immune Response and Potential Therapeutic Targets. Pathogens. 2022. 11 (2): 258

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji artykułu oraz krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.



.....
Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Mgr Justyna Karabowicz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
justyna_karabowicz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównnej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

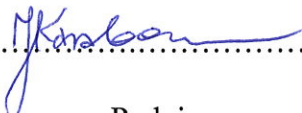
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Bąska P, Pękacz M, Wysmołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M.
Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-parasite interactions. Journal of Veterinary Research. 2024. 68:381–388

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaprojektowaniu eksperymentów, gromadzeniu, analizie i opracowywaniu danych, przygotowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 70%.

.....

Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Dr hab. inż. Ewa Długosz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
ewa_długosz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównnej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Baska P, Pękacz M, Wismołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M.
Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-
parasite interactions. Journal of Veterinary Research. 2024. 68:381–388

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w zaprojektowaniu części
eksperymentów oraz analizie danych, a także krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

.....*Ewa Długosz*.....

Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Dr hab. inż. Piotr Bąska, prof. SGGW
Zakład Toksykologii i Farmakologii
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
piotr_baska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Bąska P, Pękacz M, Wysmołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M.
Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-
parasite interactions. Journal of Veterinary Research. 2024. 68:381–388.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na modelowaniu potencjalnych struktur przestrzennych białek, pomocy w przeprowadzeniu części eksperymentów oraz krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.



.....
Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Mgr inż. Mateusz Pękacz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
mateusz_pekacz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Baska P, Pękacz M, Wysmołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M.
Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-
parasite interactions. Journal of Veterinary Research. 2024. 68:381–388.

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w przeprowadzeniu części
eksperymentów oraz krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

.....

Podpis

Fort Collins, 28 października 2024 r.

Magdalena E. Wysmołek
wysmolek.magdalena@gmail.com

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

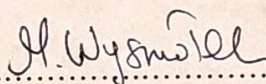
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J*, Długosz E, Bąska P, Pękacz M, Wysmołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski
M. Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-
parasite interactions. Journal of Veterinary Research. 2024. 68:381–388

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zgromadzeniu próbek krwi psów oraz
krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

.....


Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Dr hab. Maciej Klockiewicz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
maciej_klockiewicz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

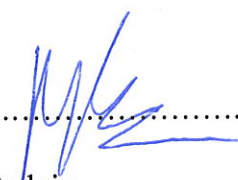
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J*, Długosz E, Baska P, Pękacz M, Wysmołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M.
Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-
parasite interactions. Journal of Veterinary Research. 2024. 68:381–388

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zgromadzeniu próbek krwi psów
oraz krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.

.....

Podpis

Warszawa, 29.10.2024 r.

Dr hab. inż. Marcin Wiśniewski, prof. SGGW
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
marcin_wiśniewski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

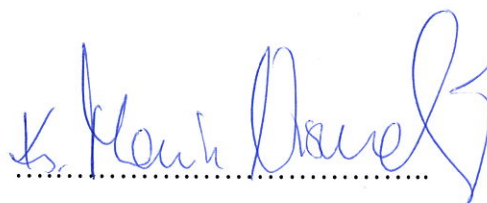
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Karabowicz J, Długosz E, Baska P, Pękacz M, Wismołek M, Klockiewicz M, Wiśniewski M.
Analysis of the role of *Dirofilaria repens* macrophage migration inhibitory factors in host-
parasite interactions. Journal of Veterinary Research. 2024. 68:381–388

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w zaprojektowaniu części
eksperymentów (w tym zaprojektowaniu starterów do konstrukcji wektora ekspresyjnego
niosącego cDNA *Dre-mif-1*) oraz krytycznej edycji manuskryptu.

Indywidualny wkład pracy w publikację wynosi 5%.



Podpis

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelnich Biblioteki SGGW
w tym w Archiwum Prac Dyplomowych SGGW

.....
(czytelny podpis autora pracy)