

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET



Isidora I. Protić-Rosić

**Ispitivanje imunoremodulatornog efekta  
himernog proteina Bet v 1-BanLec i  
njegovih mutanata na ćelijama urođenog  
imunskog sistema**

Doktorska disertacija

Beograd 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY



Isidora I. Protić-Rosić

**Evaluation of the immunoremodulatory  
effect of the chimeric protein Bet v 1-  
BanLec and its mutants on cells of the  
innate immune system**

Doctoral Dissertation

Belgrade 2024.

**Mentor:**

---

Dr Marija Gavrović-Jankulović  
Redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

---

Dr Tanja Ćirković-Veličković  
Redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu  
Dopisni član SANU

---

Dr Milica Popović  
Vanredni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Marijana Stojanović  
Naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju  
Univerzitet u Beogradu

**Datum odbrane:**

---

**Zahvalnica**

Zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Mariji Gavrović-Jankulović redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Zahvalna sam joj što me je primila u svoju istraživačku grupu i omogućila mi da upoznam čari imunologije. Njena podrška, saveti i kritike su mi bile od neprocenljive vrednosti. Takođe, želim da izrazim zahvalnost na svim prilikama koje mi je omogućila, prenesenom znanju, razmenjivanju ideja, kao i na slobodi u istraživanju i na ukazanom poverenju. Zahvaljujući njenom mentorstvu stekla sam značajne akademske veštine, naučila sam da prepoznam, ali i prevaziđem svoje granice, što je doprinelo mom naučnom, ali i ličnom razvoju.

Želela bih da izrazim iskreno poštovanje i zahvalnost dr Tanji Ćirković-Veličković, redovnom profesoru Hemijskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu i dopisnom članu SANU, za dragoceno znanje koje sam stekla tokom njenog kursa na master studijama koje mi je pomoglo u izradi ove doktorske disertacije. Hvala joj na podršci, izdvojenom vremenu, konstruktivnim komentarima i prihvatanju uloge člana Komisije za odbranu i ocenu mog rada.

Dr Milici Popović, vanrednom profesoru Hemijskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu bih zahvalila za njen neizmeran doprinos i za inspiraciju da se uopšte odlučim na ovaj put. Zahvalna sam joj na nesebičnom deljenju znanja, podršci i pomoći od prvog dana pa na dalje tokom svih narednih godina. Takođe, hvala na svim iskrenim savetima, razmeni iskustva i prijatnoj saradnji koju smo imale. Velika mi je čast što je pristala da bude član Komisije za odbranu i ocenu ove doktorske disertacije.

Dr Marijani Stojanović, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja, „Siniša Stanković”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu dugujem posebnu zahvalnost na neizmernoj pomoći koju mi je pružila tokom izrade ove doktorske disertacije. Bez njene podrške, ovaj rad ne bi bio ovako oblikovan. Takođe, želim da se zahvalim na konstruktivnim komentarima, asistenciji sa eksperimentima, tumačenju rezultata i pisanju disertacije. Posebno sam zahvalna što je pristala da bude član Komisije za odbranu i ocenu mog rada.

Zahvalila bih se i dr Marini Atanasković-Marković, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Gordanu Blagojeviću imunologu sa Instituta za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ na pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala svim članovima Katedre za biohemiju, profesorima sa drugih katedri, asistentima, saradnicima i tehničarima na kolegijalnosti, podršci, razgovorima, savetima. Zahvalna sam im što smo delili lepe, ali i izazovne radne dane. Takođe, hvala svim studentima koje sam imala priliku da upoznam prethodnih godina kroz laboratorijske vežbe. Oni su zaslužni za rečenicu „Zbog ovoga volim svoj posao“. Hvala im za motivaciju i podsticaj da nastavim dalje.

Veliko hvala svim mojim kolegama sa kojima sam duže ili kraće radila u laboratoriji 429. Hvala vam na razmenjivanju znanja, podršci, ali i svim šalama, pauzama za kafu i druženjima koji su doprineli prijatnoj atmosferi. Želim da se zahvalim i sestrijskim laboratorijama 434 i 483 na svojoj pomoći i podršci. Posebno želim da se zahvalim mom lab partneru, Zorani Lopandić na timskom radu, savetima, motivaciji, inspiraciji, pomoći, ali najvažnije, hvala na prijateljstvu koje smo izgradile.

Veliko hvala dugujem mojim dragim prijateljima van Hemijskog fakulteta. Hvala vam što ste bili uz mene sve vreme, što ste me slušali i na svoj način učestvovali i doprineli završetku ovog važnog poglavlja mog života. Hvala vam za sve trenutke posle posla tokom kojih ste mi

bili podrška i pomogli mi da skrenem misli sa neuspelih eksperimenata i teških dana. Hvala vam za sve savete koje ste mi davali iako vam tematika nije bila bliska. Hvala za bezrezervno prijateljstvo koje imamo i hvala što ste uvek tu za mene.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici za svu ljubav i podršku koju mi pružaju bez obzira na sve. Srećna sam što ih imam. Posebno hvala mom dedi za svaki životni savet koji mi je dao, za reči pune ljubavi i na tome koliko je ponosan na svaki moj uspeh. Najveće hvala mojoj mami. Zahvalna sam što je uvek verovala u mene, što je moj vetar u leđa i što na svoj način uspeva da otera sve moje strahove. Zahvala sam što me je naučila da se borim kako bih ostvarila svoje snove. Hvala na ogromnoj ljubavi.

Na kraju bih se zahvalila jednoj osobi koja nažalost više nije tu, mojoj baki. Znam da bi bila ponosna na mene!

## Ispitivanje imunomodulatornog efekta himernog proteina Bet v 1-BanLec i njegovih mutanata na ćelijama urođenog imunskog sistema

### Sažetak

Kao jedna od najčešćih hroničnih bolesti, alergija predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, koji osim toga utiče i na socioekonomski aspekt obolele osobe. Za razliku od farmakoterapije koja omogućava samo kratkoročno uklanjanje simptoma, alergen- specifična imunoterapija (AIT) je jedino dugoročno rešenje za problem alergija. U cilju poboljšanja AIT, istraživanja se usredsređuju na inovativne strategije koje obuhvataju zamenu konvencionalnih alergeničkih ekstrakata dobijenih iz prirodnih izvora. Ovaj pristup uključuje korišćenje rekombinantno proizvedenih alergena, alergeničkih peptida, ili hipoalergeničkih izoformi alergena, kao i primenu odgovarajućih adjuvanasa radi smanjenja potrebne doze alergena. Odabir idealnog adjuvansa u kombinaciji sa alergenom je ključan, te se teži pronalaženju adjuvansa koji će efikasno aktivirati ćelije urođenog imunskog sistema, što bi dalje moduliralo adaptivni imunski odgovor. Na ovaj način bi se unapredila efikasnost i sigurnost AIT. Lektin banane (rBLwt) je protein koji specifično prepoznaje manozu i modulira imunski odgovor mišijih makrofaga, najverovatnije kroz vezivanje za oligosaharidne komponente na površini TLR2 i CD14. U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan imunomodulatorni efekat lektina banane kao potencijalnog adjuvansa na modelu glavnog alergena polena breze (rBet v 1 a; rBv1a). Rekombinantne himere koju čine rBLwt i rBv1a (rBv1a-BLwt; Cwt), kao i hipoalergena izoforma Bet v 1 (Bv11) i mutant BLH84T (rBv11-BLH84T (C1) i rBLH84T-Bv11 (C2)) su uspešno dizajnirane in silico nakon čega su eksprimirane u *Escherichia coli* ekspresionom sistemu. Nakon prečišćavanja, biohemijske i imunološke karakterizacije testiran je imunomodulatorni efekat proteina na peritonealnim mišjim makrofagima kao i na humanim ćelijskim linijama uključujući i ćelijske kokulture. Među testiranim himerama, Cwt je pokazala imunomodulatorni potencijal kroz stimulaciju sekrecije IL-10 i povećanjem odnosa izlučenih IFN- $\gamma$ /IL-4. Ova studija ukazuje da Cwt himera ima najveći potencijal među analiziranim proteinima za primenu u sublingvalnoj terapiji pacijenata alergičnih na polen breze.

**Ključne reči:** alergije, alergen-specifična imunoterapija, adjuvansi, lektin banane, Bet v 1, makrofagi, Caco-2 epitelne ćelije

**Naučna oblast:** Hemijske nauke

**Uža naučna oblast:** Biohemija

## Evaluation of the immunomodulatory effect of the chimeric protein Bet v 1-BanLec and its mutants on cells of the innate immune system

### Abstract

As one of the most common chronic diseases, allergy represents a serious health issue, which further affects the socio-economic aspect of allergic individuals. Unlike pharmacotherapy, which provides short-term relief of symptoms, allergen-specific immunotherapy (AIT) is currently the only long-term solution to the problem of allergies. To advance AIT, novel research focuses on innovative strategies involving the replacement of conventional allergenic extracts obtained from natural sources. This approach includes the use of recombinantly produced allergens, allergenic peptides, or hypoallergenic isoforms of allergens, as well as the use of appropriate adjuvants to reduce the therapeutic allergen dose. The selection of an ideal adjuvant in combination with the allergen is crucial. The aim is to find adjuvants that effectively activate cells of the innate immune system, thereby modulating the adaptive immune response, likely through binding to oligosaccharide components on the surface of TLR2 and CD14. In this doctoral dissertation, the immunomodulatory effect of banana lectin as a potential adjuvant was investigated on the model of the major birch pollen allergen (rBet v 1a; rBv1a). The recombinant chimeras consisting of rBLwt and rBv1a (rBv1a-BLwt; Cwt), as well as chimeras composed of a hypoallergenic isoform of Bet v 1 (rBv11) and mutant banana lectin (BLH84T) (rBv11-BLH84T (C1) and rBLH84T-Bv11 (C2)), were successfully designed in silico, expressed in *Escherichia coli* expression system. After purification, biochemical, and immunological characterization the immunomodulatory ability of chimeras was examined on peritoneal murine macrophages and on human cell lines including the cell co-culture. Among tested chimeras, Cwt showed immunomodulatory potential through the stimulation of IL-10 secretion and increase of IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio. This study suggests that among analysed chimeras, the Cwt chimera is the most suitable for further testing for the application in sublingual therapy for birch pollen allergic patients.

**Keywords:** allergy, allergen-specific immunotherapy, adjuvants, banana lectin, Bet v 1, macrophages, Caco-2 epithelial cells

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Biochemistry

**Lista skraćenica**

AIT	Alergen-specifična imunoterapija
ANOVA	Analiza varijanse (Analysis of variance)
APC	Antigen-prikazujuće ćelije
APS	Amonijum persulfat
ATCC	Američka zbirka tipičnih kultura
BanLec	Lektin banane
BCIP	5-bromo-4-hloro-3-indolil-fosfat
BSA	Goveđi serum-albumin
CD	Klaster diferencijacije
cDNK	Komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
CDR	Dijagnostika razdvojena na komponente
DC	Dendritske ćelije
ELISA	Imunosorbentni esej povezan sa enzimom
FBS	Fetalni goveđi serum
FDA	Administracija za hranu i lekove ( <i>eng. Food and drug administration</i> )
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
HRP	Peroksidaza iz hrena
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleukin
Ig	Imunoglobulin
IMAC	Afinitetna hromatografija sa imobilisanim metalnim jonima
IPTG	Izopropil- $\beta$ -D-galaktopiranozid
ISS-ODN	Imunostimulatorni oligodeoksinukleotidi



---

JRL	Lektini slični žakalinu
LC	Langerhansove ćelije
LPS	Lipopolisaharid
MHC	Glavni kompleks tkivne podudarnosti
NBT	Nitroblutetrazolijum
NC	Nitroceluloza
NOD	Receptori slični domenu koji vezuje nukleotide
NMR	Nuklearna magnetna rasonancija
OPD	<i>o</i> -fenilendiamin
PAMP	Molekulski obrazac karakterističan za patogen
PBMCs	Mononuklearne ćelije periferene krvi
PBS	Puferisan fiziološki rastvor
PCR	Lančana reakcija polimeraze
PMA	Forbol-12-miristat-13-acetat
PNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfat
PR	Proteini povezani sa patogenezom
PRR	Receptori koji prepoznaju patogene
RT-PCR	Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija
SDS-PAGE	Natrijum dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza
TBS	Trisom puferisan fiziološki rastvor
TEER	Transepitelni električni otpor
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamin
TGF- $\beta$	Transformišući factor rasta beta
Th1	Pomoćničke T ćelije tipa 1

Th2	Pomoćničke T ćelije tipa 2
TLR	Receptor sličan „toll-u”
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TNF- $\alpha$	Faktor nekroze tumora alfa
Treg	Regulatorne T ćelije
TSLP	Limfopoietin strome timusa
WHO	Svetska zdravstvena organizacija ( <i>eng. World health organisation</i> )

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DEO</b> .....	<b>3</b>
2.1. ALERGIJE .....	3
2.1.1. Faza senzitivacije i epitelna barijera .....	3
2.1.2. Efektorska faza: rana i kasna faza alergijske reakcije .....	4
2.1.3. Hronična alergijska inflamacija.....	5
2.1.4. Inhalatorni alergeni.....	5
2.1.5. Alergija na polen breze.....	6
2.1.6. Glavni alergen polena breze - Bet v 1.....	7
2.2. TERAPIJE ALERGIJE .....	9
2.2.1. Pasivni oblici terapija alergije .....	9
2.2.2. Alergen-specifična imunoterapija .....	10
2.2.2.1. Mehanizam alergen-specifične imunoterapije.....	11
2.2.2.2. Načini dostave alergena u alergen-specifičnoj imunoterapiji .....	11
2.3. NOVE STRATEGIJE U RAZVOJU AIT .....	12
2.3.1. Molekularna alergologija .....	13
2.3.2. Imunomodulatorni agensi kao adjuvansi.....	13
2.4. ANTIGEN-PRIKAZUJUĆE ČELIJE U ALERGEN-SPECIFIČNOJ IMUNOTERAPIJI .....	15
2.4.1. Makrofagi.....	16
2.5. LEKTIN BANANE KAO IMUNOMODULATORNI AGENS U ALERGEN-SPECIFIČNOJ IMUNOTERAPIJI .....	18
2.6. MODEL SISTEMI ZA TESTIRANJE IMUNOMODULATORNIH EFEKATA.....	20
2.6.1. Čelijske linije kao model sistemi.....	21
2.6.2. Životinjski model-sistemi .....	22
2.6.3. Čelijske kokulture kao model-sistemi za testiranje potencijalnih terapeutika .....	22
<b>3. CILJEVI</b> .....	<b>25</b>
<b>4. NAŠI RADOVI</b> .....	<b>26</b>
4.1. <i>IN SILICO</i> DIZAJN, KLONIRANJE, EKSPRESIJA I PREČIŠĆAVANJE RBV1A-BLWT .....	26
4.1.1. <i>In silico</i> dizajn rBv1a-BLwt.....	26
4.1.2. Kloniranje rBv1a-BLwt iz pUC57 u pET23b vektor.....	27
4.1.3. Ekspresija i prečišćavanje rBv1a-BLwt.....	28
4.2. KARKATERIZACIJA RBV1A-BLWT.....	29
4.2.1. Određivanje molekulske mase rBv1a-BLwt u rastvoru.....	29
4.2.2. CD spektroskopska analiza rBv1a-BLwt.....	30
4.2.3. IgE reaktivnost rBv1a-BLwt.....	31
4.2.4. Enzimski test povezan sa lektinom (ELLA).....	33
4.3. FUNKCIONALNI TESTOVI: STIMULACIJA MIŠIJIH PERITONEALNIH MAKROFAGA RBV1A-BLWT HIMEROM .	34
4.3.1. Aktivnost mijeloperoksidaze.....	34
4.3.2. Proizvodnja NO .....	35
4.3.3. Obrazac lučenja pro- i anti- inflamatornih citokina.....	36
4.4. <i>IN SILICO</i> DIZAJN, KLONIRANJE, EKSPRESIJA I PREČIŠĆAVANJE RBV1L-BL <sub>H84T</sub> I RBL <sub>H84T</sub> -BV1L .....	38
4.4.1. <i>In silico</i> dizajn rBv1l-BL <sub>H84T</sub> i rBL <sub>H84T</sub> -Bv1l.....	38
4.4.2. Kloniranje rBv1l-BL <sub>H84T</sub> i rBL <sub>H84T</sub> -Bv1l rekombinantnih proteina .....	41
4.4.3. Ekspresija i prečišćavanje rBv1l-BL <sub>H84T</sub> i rBL <sub>H84T</sub> -Bv1l .....	43
4.5. ODREĐIVANJE KAPACITETA VEZIVANJA IGE ANTITELA ZA HIMERE RBV1A-BLWT, RBV1L-BL <sub>H84T</sub> I RBL <sub>H84T</sub> -BV1L.....	44
4.6. ISPITIVANJE IMUNOMODULATORNOG EFEKTA RBV1L-BL <sub>H84T</sub> I RBL <sub>H84T</sub> -BV1L U KOKULTURI CACO-2/THP-1 MAKROFAGA .....	46
4.6.1. Razvoj kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi i tretman antigenima .....	46
4.6.2. Određivanje relativne genske ekspresije u Caco-2 epitelnim ćelijama nakon tretiranja kokulture Caco-2/THP-1 makrofaga antigenima .....	48
4.6.3. Određivanje relativne genske ekspresije citokina u THP-1 makrofagima nakon tretiranja kokulture Caco-2/THP-1 makrofaga antigenima .....	51
4.7. ANALIZA IZLUČENIH CITOKINA NAKON TRETMANA THP-1 DIFERENCIRANIH MAKROFAGA.....	53

4.8. ANALIZA IZLUČENIH CITOKINA NAKON STIMULACIJE PBMCS ALERGIČNIH PACIJENATA NA BREZU ANTIGENIMA .....	54
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>57</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>63</b>
<b>7. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>65</b>
7.1. BIOINFORMATIČKI ALATI ZA <i>IN SILICO</i> DIZAJN REKOMBINANTNIH HIMERA rBV1A-BLWT, rBV1L-BL <sub>H84T</sub> I RBL <sub>H84T</sub> -BV1L.....	65
7.2. METODE TEHNOLOGIJE REKOMBINANTE DNK ZA KLONIRANJE I EKSPRESIJU REKOMBINANTNIH PROTEINA .....	65
7.2.1. Priprema medijuma za rast mikroorganizama .....	65
7.2.2. Priprema rastvora antibiotika .....	65
7.2.3. Priprema hemijski kompetentnih DH5 $\alpha$ i BL21 ćelija .....	66
7.2.4. Kloniranje gena rBv1a-BLwt, rBv1l-BL <sub>H84T</sub> i rBL <sub>H84T</sub> -Bv1l iz pUC57 vektora u pET23b vektor .....	66
7.2.5. Ekspresija rekombinantnih himera rBv1a-BLwt, rBv1l-BL <sub>H84T</sub> i rBL <sub>H84T</sub> -Bv1l.....	67
7.3. ELEKTROFORETSKE METODE.....	68
7.3.1. Metoda agarozne elektroforeze .....	68
7.3.2. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE).....	68
7.4. METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA.....	69
7.4.1. Bradfordova metoda određivanja koncentracije proteina.....	69
7.4.2. Određivanje koncentracije proteina merenjem A <sub>280</sub> .....	69
7.5. METODE PREČIŠĆAVANJA REKOMBINANTNIH HIMERA .....	70
7.5.1. Prečišćavanje rekombinantne himere rBv1a-BLwt .....	70
7.5.2. Prečišćavanje rekombinantnih himera rBv1l-BL <sub>H84T</sub> i rBL <sub>H84T</sub> -Bv1l.....	71
7.6. UKLANJANJE ENDOTOKSINA IZ UZORAKA I ODREĐIVANJE NJEGOVE KONCENTRACIJE.....	72
7.6.1. Uklanjanje endotoksina na matriksu sa vezanim $\epsilon$ -poli-L-lizinom.....	72
7.6.2. Određivanje koncentracije endotoksina .....	72
7.7. INSTRUMENTALNE METODE ZA KARAKTERIZACIJU PROTEINA .....	72
7.7.1. Gel-filtracija za određivanje molekulske mase.....	72
7.7.2. CD spektroskopska analiza sekundarnih struktura proteina.....	73
7.8. IMUNOLOŠKE METODE ZA KARAKTERIZACIJU REKOMBINANTNIH HIMERA .....	73
7.8.1. Izolovanje seruma alergičnih pacijenata .....	73
7.8.2. Immunoblot za proveru IgE reaktivnosti.....	73
7.8.3. ELISA inhibicija.....	75
7.9. <i>EX VIVO</i> TRETMAN MIŠJIH PERITONEALNIH MAKROFAGA.....	76
7.9.1. Izolovanje mišijih peritonealnih makrofaga .....	76
7.9.2. Stimulacija mišijih peritonealnih makrofaga.....	76
7.10. DIFERENCIJACIJA I TRETMAN THP-1 MAKROFAGA .....	77
7.10.1. Održavanje THP-1 monocita u ćelijskoj kulturi .....	77
7.10.2. Diferencijacija THP-1 monocita u makrofage .....	77
7.11. RAZVOJ I TRETMAN KOKULTURE CACO-2/THP-1 MAKROFAGA .....	77
7.11.1. Održavanje ćelijskih kultura Caco-2 i THP-1.....	78
7.11.2. Uspostavljanje ćelijske kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi.....	78
7.11.3. Stimulacija kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi antigenima .....	79
7.12. IZOLOVANJE I TRETMAN MONONUKLEARNIH ĆELIJA PERIFERNE KRVI .....	79
7.13. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI MIJELOPEROKSIDAZE NAKON TRETMANA MIŠJIH MAKROFAGA .....	80
7.14. ODREĐIVANJE PROIZVODNJE AZOT (II) OKSIDA NAKON TRETMANA MIŠJIH MAKROFAGA .....	80
7.15. ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE CITOKINA PCROM U REALNOM VREMENU.....	81
7.14.1. Izolovanje ukupne RNK iz ćelija .....	81
7.15.2. Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija (RT-PCR) .....	81
7.16. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE IZLUČENIH CITOKINA NAKON TRETMANA ĆELIJSKIH LINIJA.....	82
7.17. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	84
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>85</b>



## 1. Uvod

Alergija predstavlja hroničnu, inflamatornu bolest koja se karakteriše preteranim imunskim odgovorom na bezopasne biomolekule prisutne u okolini koji se nazivaju alergeni. Alergija pogađa 30% svetskog stanovništva, značajno utiče na kvalitet života pacijenata i predstavlja ozbiljan teret za zdravstveni sistem [1]. Karakteristika alergijske reakcije je aktivacija mastocita i bazofila posredovana imunoglobulinom E (IgE) što dovodi do simptoma koji mogu varirati od blagih do opasnih po život [2]. Razni hemijski alergeni (boje, kreme, mirisi za kosu i proizvodi za negu kože), alergeni hrane (mleko, jaja, riba, morski plodovi, žitarice), kao i aeroalergeni (polen, kućna prašina, insekti, krzno domaćih životinja) mogu uzrokovati alergijske simptome kao što su kožne reakcije, alergijski rinitis, astma ili anafilaksija [3]

Respiratorne alergije su u stalnom porastu u industrijski razvijenim zemljama [4]. Alergija na polen pogađa 20-25% evropskog stanovništva. Najčešći uzročnik alergija na polen drveća su polen breze (*Betula verucosa*) i polen drveća iz reda *Fagales* koji uključuje rodove *Corylus* (lešnik), *Fagus* (bukva), *Quercus* (hrast), *Carpinus* (grab) i *Castanea* (kesten) [5]. Glavni alergen polena breze je Bet v 1 (Bv1) koji je ukršteno reaktivan sa homologim alergenima srodnih biljaka .

Izbegavanje izvora alergena nije uvek izvodljivo, posebno kada se govori o aeroalergenima, dok je farmakoterapija efikasna u kontroli simptoma samo tokom primene leka i ne leči samu bolest [6]. Alergen-specifična imunoterapija (AIT) podrazumeva ponavljajuću primenu rastućih doza ekstrakta alergena tokom nekoliko godina što dovodi do smanjenja simptoma alergije, ali i lečenja osnovnog uzroka bolesti [6]. Za razliku od farmakoterapije, AIT ima dugoročan efekat i nakon završetka terapije. Od 1911. godine, kada su Noon i saradnici [7] uveli AIT dosta se radilo na razumevanju mehanizma njenog delovanja i na unapređenju same terapije. Osnovni princip AIT podrazumeva modulaciju imunskog odgovora od prevalencije pro-alergenih Th2 ćelija ka ravnoteži između Th1 i Th2 (Th1/Th2) ćelija i aktivaciji T regulatornih (Treg) ćelija [8]. Još jedan značajan efekat koji se postiže tokom AIT je proizvodnja alergen-specifičnih IgG4 antitela koja blokiraju vezivanje alergena za IgE čime se sprečava aktivacija mastocita i bazofila [1]. Pored svojih prednosti AIT ima i određene nedostatke koji podrazumevaju neželjene reakcije posredovane alergen-specifičnim IgE antitelima, nedovoljnu efikasnost koja se ogleda u dugom trajanju lečenja, ali i visoke troškove terapije [9]. Kako bi se unapredila AIT radi se na razvoju novih strategija koje podrazumevaju zamenu alergenih ekstrakata dobijenih iz prirodnih izvora, rekombinantno proizvedenim alergenima, alergenim peptidima koji sadrže T ćelijske epitope ili hipoalergenim izoformama alergena [1], kao i upotrebu odgovarajućih adjuvanasa kako bi se smanjila neophodna doza alergena. Idealan adjuvans u kombinaciji sa alergenom bi trebalo da aktivira ćelije urođenog imunskog sistema koje bi potom modulirale adaptivni imunski odgovor.

Makrofagi su ćelije urođenog imunskog sistema koje obavljaju fagocitozu, predstavljaju antigen-prikazujuće ćelije (APC) i sekretuju citokine. Na svojoj površini makrofagi ekspimiraju širok spektar receptora koji prepoznaju patogene (PRRovi) preko evolutivno konzerviranih molekulskih obrazaca karakterističnih za patogene (PAMPovi) [10]. Među PRRovi posebno se izdvajaju receptori slični tolu (engl. Toll-like receptors; TLRovi) [11]. Aktivacija makrofaga može izazvati pro-, ali i anti-inflamatorni imunski odgovor i tako doprineti uspostavljanju homeostaze [12]. Ova plastičnost čini makrofage potencijalnim kandidatom za aktivaciju adjuvansima tokom AIT [12]. Citokini Th2 tipa (interleukin (IL) -4,

-5 i -13) omogućavaju alternativni način aktivacije makrofaga koji rezultuje diferencijacijom makrofaga u M2 podtip. M2 podtip makrofaga karakteriše anti-inflamatorni odgovor koji uključuje sekreciju IL-10 i transformišući faktora rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ ) [12]. Podgrupa M2 makrofaga je podeljena na: M2a, M2b, M2c i M2d na osnovu različitih stimulusa koji ih indukuju i citokina koje luče nakon diferencijacije [12]. Alergen-specifična IgG4 antitela koja nastaju tokom AIT u *in vitro* uslovima trigeruju koverziju M2a u fenotip sličan M2b koji posledično proizvodi regulatorni IL-10 [12].

Lektin banane (BLwt) je protein koji se nalazi u pulpi banana i specifično prepoznaje i vezuje terminalne  $\alpha$ -D-manozne/glukozne jedinice, unutrašnje  $\alpha$ -1,3- manozne/glukozne jedinice, kao i redukujuće  $\beta$ -1,3-glukozne ostatke [13]. Pokazano je da ovaj protein ima imunomodulatorni efekat *in vitro* [14], a takođe moduliše i imunski odgovor peritonealnih mišijih makrofaga najverovatnije preko vezivanja za ugljenohidratne komponente na TLR2 i CD14 [15]. Dodatno je potvrđeno i da BLwt stimuliše sekreciju IgG4 antitela [16].

## 2. Teorijski deo

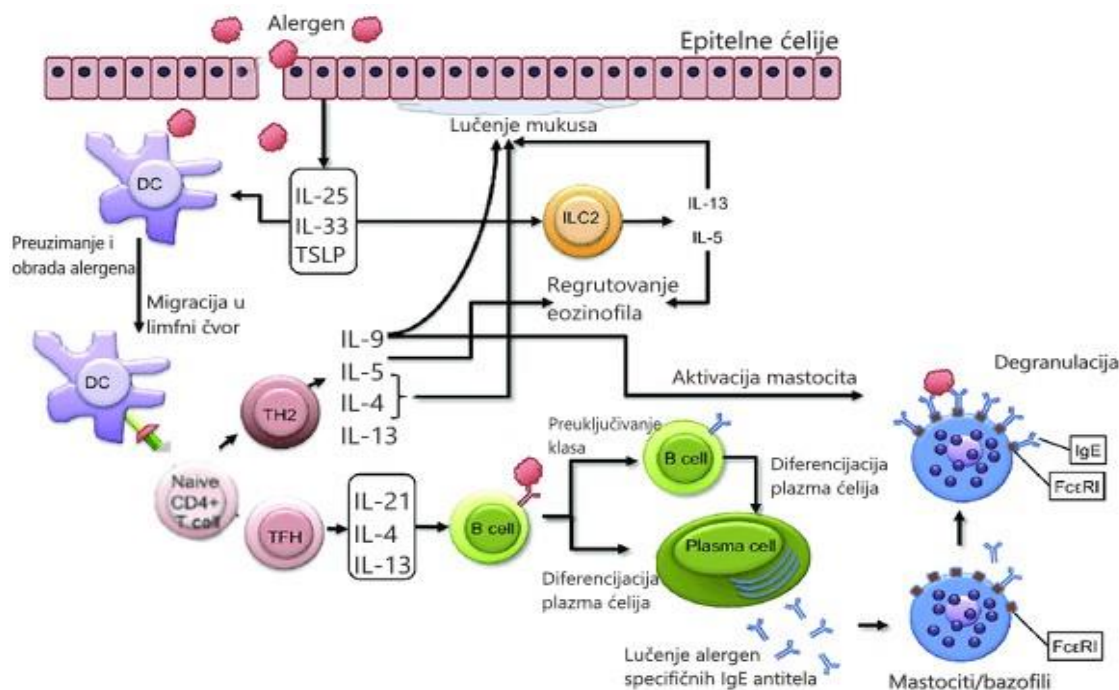
### 2.1. Alergije

Adaptivni imunski sistem obezbeđuje zaštitu od različitih patogena, kao što su bakterije, virusi i paraziti. Međutim, u nekim situacijama može doći do preteranog imunskog odgovora i tada se govori o reakcijama preosetljivosti imunskog sistema. Coombs i Gell su 1963. godine predložili klasifikaciju reakcija preosetljivosti na četiri grupe. Po ovoj klasifikaciji, alergije ili atopije se svrstavaju u reakcije preosetljivosti tipa I (tzv. rana preosetljivost) i karakterišu se proizvodnjom specifičnih IgE antitela na strane, bezopasne proteine iz okoline koji se nazivaju alergeni [2]. Alergeni su najčešće proteini mase 10-40 kDa, rastvorni u vodenim rastvorima i različitih funkcija (enzimi, kalcini, transportni ili skladišni proteini i proteini povezani sa patogenezom) [2]. Patogeneza alergija je kompleksna i uključuje brojne faktore kao što su genetika, epigenetika, faktori sredine, mikroekologija i stanje imunskog sistema [17].

#### 2.1.1. Faza senzitivacije i epitelna barijera

Prva faza u nastanku alergijske reakcije je faza senzitivacije. Faza senzitivacije (slika 1) započinje kada APC vežu alergen dospeo u organizam (inhalacijom, ingestijom, ili ubodom), nakon čega migriraju u najbliži limfni čvor gde će se obrađeni alergeni peptid prikazati u kontekstu MHC molekula klase II naivnim T ćelijama [18]. U prisustvu IL-4 koji se prvi oslobodi, naivne T ćelije se diferenciraju u pomoćničke ćelije tipa 2 (Th2) [18]. Nakon diferencijacije, Th2 ćelije počinju da luče IL-4 i IL-13 koji stimulišu preuključivanje klasa imunoglobulina u alergen-specifičnim B ćelijama u IgE klasu [18]. Proizvedeni alergen-specifični IgE se vezuje za visoko-afinitetni receptor (FcεRI) na efektorskim ćelijama - bazofilima i mastocitima. Na ovaj način se efektorske ćelije senzitivuju i postaju reaktivne na alergen [18]. Važno je napomenuti da tokom senzitivacije ne dolazi do pojave simptoma, već se simptomi javljaju tek po ponovnom izlaganju alergenu čime se započinje efektorska faza alergijske reakcije.





Slika 1. Faza senzitivacije [19].

Epitelne ćelije su važna komponenta urođene imunosti jer predstavljaju ključnu vezu između organizma i spoljašnje sredine [17]. Epitelne ćelije učestvuju u koordinaciji imunskog odgovora na različite povrede kroz proizvodnju brojnih imunomodulatornih i inflamatornih faktora pod kontrolom NF- $\kappa$ B signalnog puta [17]. Na epitel utiču brojni genetski faktori i faktori iz spoljašnje sredine. Neki od ovih faktora mogu izazvati veću propustljivost epitela za alergene i na taj način favorizovati razvoj Th2 imunskog odgovora [18]. Primer uticaja genetskih faktora je mutacija i gubitak funkcije *FLG* gena (kodirajući gen za filagrin, protein odgovoran za organizaciju srednjih filamenata skvamoznih ćelija u snopove za kasnije umrežavanje pomoću transglutaminaze), što dovodi do smanjene funkcije kože i razvoja nasledne bolesti *ichthyosis vulgaris*. Brojni pacijenti koji boluju od ove bolesti razviju i atopijski dermatitis [18]. Pored toga, neki od alergena su proteaze (Der p 1 glavni alergen grinja kućne prašine [20], Act d 1 glavni alergen kivića [21]). Neke od ovih proteaza mogu direktno smanjiti funkciju epitela razgradnjom čvrstih veza između epitelne ćelije [21], ili hidrolizom substrata čiji proizvodi učestvuju u Th2 imunskom odgovoru kao što su CD23, CD25 i CD40.

### 2.1.2. Efektorska faza: rana i kasna faza alergijske reakcije

Rana preosetljivost se uočava nekoliko minuta nakon izlaganja alergenu i najčešće je rezultat lokalnog oslobađanja medijatora iz mastocita na mestu kontakta organizma sa alergenom. Senzitivisane osobe na svojim mastocitima već imaju vezana alergen-specifična IgE antitela za Fc $\epsilon$ RI [18]. Kada dođe do umrežavanja susjednih IgE antitela multivalentnim alergenom započinje prenos signala koji dovode do oslobađanja medijatora iz granula mastocita [18]. Oslobođeni medijatori iz granula obuhvataju biogene amine (histamin), proteoglikane (heparin i hondroitin sulfat), serin proteaze (triptaze, himaze i karboksipeptidaze), kao i brojne druge enzime [18]. Pored medijatora iz granula, mastociti oslobađaju i medijatore lipidnog porekla. Oni utiču na metabolizam arahidonsku kiselinu kroz puteve ciklooksigenaze i lipoksigenaze, što dovodi do oslobađanja prostaglandina (naročito prostaglandina D2 (PGD2)), leukotriena B4 (LTB4) i cisteinil leukotriene (cis-LTs, posebno

LTC4)[18]. Simptomi do kojih dovode oslobođeni medijatori se dosta razlikuju i zavise od mesta gde se dešava reakcija, ali mogu podrazumevati vazodilataciju, povećanje vaskularne propustljivosti, kontrakciju glatkih bronhijalnih mišića, kao i povećano lučenje mukusa [18].

Nakon umrežavanja IgE antitela na površini mastocita, pored oslobađanja pomenutih medijatora, dolazi i do proizvodnje citokina, hemokina i faktora rasta koji se oslobađaju znatno sporije [18]. Neki od ovih medijatora (npr. TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, IL-8 (poznat i kao CXCL8), CC-hemokin ligand 2 (CCL2) kao i brojni drugi hemokini) mogu regrutovati druge ćelije imunskog sistema na mesto upale, ili aktivirati dendritske, T ili B ćelije (npr. IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ). Međutim, neki od ovih medijatora mogu imati i anti-inflamatorno ili supresivno dejstvo (IL-10, TGF $\beta$ ) [18]. Reakcije kasne faze započinju 2-6 h od izlaganja alergenu dok je pik reakcije između 6-9 h [18]. Još uvek nije razjašnjeno zašto se ne razvijaju kod svih senzitivisanih pacijenata, dok kod nekih pacijenata nema jasne kliničke slike koja razlikuje kraj rane faze i početka kasne faze [18].

### 2.1.3. Hronična alergijska inflamacija

Usled čestog izlaganja alergenima kod atopičnih osoba dolazi do čestih upala koje mogu dovesti do promena u strukturi i funkciji ćelija na pogođenom mestu [18]. Poznato je da zapaljenje kod pacijenata sa hroničnom astmom može zahvatiti sve slojeve disajnih puteva i obično je povezano sa promenama u epitelu, uključujući:

- (i) povećan broj peharastih ćelija koje proizvode sluz,
- (ii) povećanu proizvodnju citokina i hemokina, (iii)
- (iii) značajno zapaljenje submukoze sa povećanim taloženjem molekula ekstracelularnog matriksa u *lamina reticularis* (ispod epitelne bazalne membrane),
- (iv) promene u fibroblastima, i
- (v) povećanje debljine mišićnog sloja disajnih puteva, kao i povećanje broja i aktivnosti glatkih mišićnih ćelija [18].

Kod atopijskog dermatitisa, alergijskog rinitisa i astme, hronična alergijska inflamacija je povezana sa popravkom tkiva [18]. Ova popravka tkiva može podrazumevati dugoročne promene u strukturnim elementima pogođenog tkiva, a posledično i u promeni funkcije epitelne barijere [18].

### 2.1.4. Inhalatorni alergeni

Respiratorne alergije su čest oblik alergije širom sveta [22]. Epidemiološke studije pokazuju da je učestalost respiratornih alergija u različitim zemljama evropskog kontinenta 15-30% [22]. Senzitivizacija na inhalatorne alergene se smatra glavnim faktorom koji doprinosi razvoju bronhijalne astme i alergijskog rinitisa [23]. Alergijski rinitis je jedna od najčešćih bolesti respiratornih alergija sa prevalencijom od 20-40% među alergičnim pacijentima [22]. Ova bolest se nekad pogrešno smatra blagom, iako simptomi alergijskog rinitisa značajno utiču na kvalitet života pacijenata izazivajući umor, glavobolju, kognitivni poremećaj, a utiče i na fiziološko zdravlje i uzrokuje druge sistemske simptome [22]. Sa druge strane, astma se definiše kao heterogena bolest, koju najčešće karakteriše hronična upala disajnih puteva [24]. Definiše je istorija respiratornih simptoma, kao što su otežano disanje, stezanje u grudima i kašalj koji variraju u trajanju i u intenzitetu, što je praćeno ograničenjem protoka vazduha pri izdisaju [24]. Alergijski rinitis i astma mogu biti izazvani izlaganjem različitim izvorima

alergena koji mogu biti prisutni u spoljašnjoj sredini kao što je polen (drveća, trave, korova), ili u prostorima stanovanja kao što su buđi, kućna prašina ili krzno životinja [25].

### 2.1.5. Alergija na polen breze

Alergija na polen predstavlja ozbiljno individualno i društveno zdravstveno opterećenje, jer je jedan od glavnih uzročnika alergijskog rinitisa i alergijske astme [26]. Obe bolesti imaju ozbiljne posledice na kvalitet života pacijenta, dok astma utiče i na mortalitet [26]. Promena klimatskih uslova, povišen nivo atmosferskog ugljen-dioksida i povećanje geografskih domena alergenijskih polenskih taksona utiču na povećano izlaganje polenu [26]. Efikasna kontrola i lečenje alergija na polen predstavljaju globalni zdravstveni prioritet [26].

Polen drveća je značajan alergeni izvor koji utiče na ljudsko zdravlje. Najveći uzročnici alergija na polen drveća su biljke iz reda *Fagales*, *Lamiales*, *Proteales*, i *Pinales* [27].

U centralnoj i istočnoj Evropi, kao i na Balkanskom poluostrvu, najčešći uzročnik alergija na polen drveća je polen breze (*Betula verrucosa*) iz reda *Fagales*. Alergijske reakcije na polen *Fagales* mogu pokrenuti proteina povezanih sa patogenezom klase 10 (PR-10) proteini iz polena svih članova porodica *Betulaceae* i *Fagaceae* (**Tabela 1 A**). Usled strukturne sličnosti ovog proteina sa proteinima iz drugih biljaka, antitela specifična za njega mogu prepoznati druge proteine odnosno može doći do ukrštene reaktivnosti antitela. Bet v 1 je glavni alergen polena breze i pripada PR-10 proteinima. Antitela na Bet v 1 su ukršteno reaktivna sa homologim alergenima iz srodnih porodica *Betulaceae* i *Fagaceae* [5]. Osim ukrštene reaktivnosti sa PR-10 proteinima iz polena, Bet v 1 pokazuje i visok stepen homologije sa proteinima hrane biljnog porekla (**Tabela 1 B**) [28].

**Tabela 1 A. Homologi alergeni Bet v 1 iz drveća reda *Fagales* [5].**

Porodica biljaka	Podporodica	Izvor alergena	Alergen
<i>Betulaceae</i>	<i>Betuloideae</i>	Breza ( <i>Betula pendula</i> )	Bet v 1.0101
		Jova ( <i>Alnus glutinosa</i> )	Aln g 1.0101
	<i>Coryloideae</i>	Lešnik ( <i>Corylus avellana</i> )	Cor a 1.0101
		Grab ( <i>Carpinus betulus</i> )	Car b 1.0101
		Virginijski grab ( <i>Ostrya carpinifolia</i> )	Ost c 1.0101
<i>Fagaceae</i>	<i>Fagoideae</i>	Breskva ( <i>Fagus silvatica</i> )	Fag s 1.0101
	<i>Quercoideae</i>	Hrast ( <i>Quercus alba</i> )	Que a 1.0201

		Testerasti hrast ( <i>Quercus acutissima</i> )	Que ac 1.0101
		Crnika ( <i>Quercus ilex</i> )	Que i 1.0101
	<i>Castanoideae</i>	Kesten ( <i>Castanea sativa</i> )	Cas s 1.0101

Tabela 2 B. Homolozi Bet v 1 koji potiču iz hrane biljnog porekla [28].

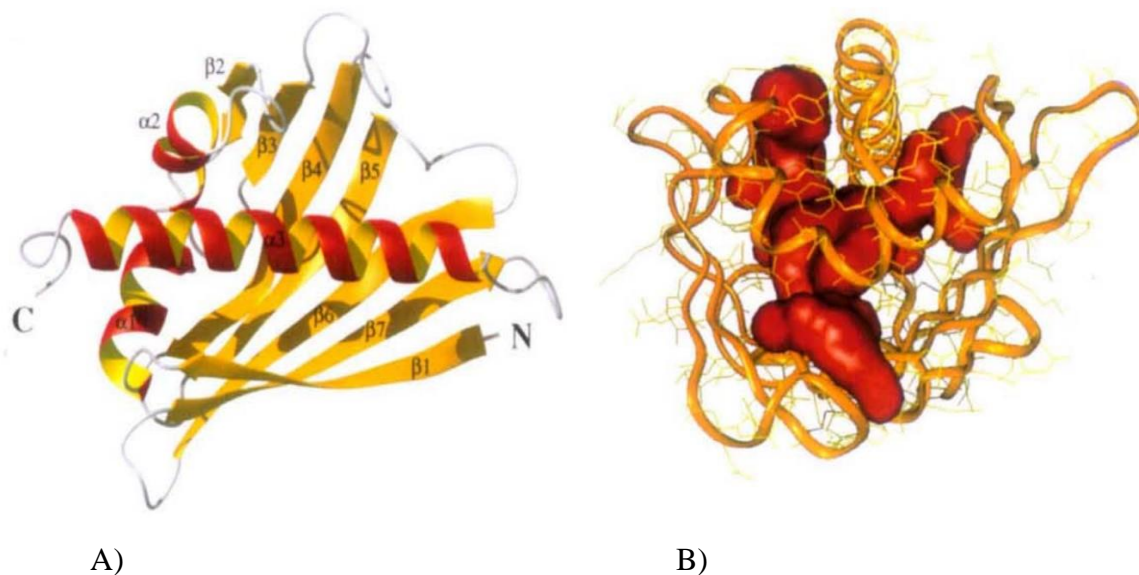
Hrana biljnog porekla	Alergen
Jabuka ( <i>Malus domestica</i> )	Mal d 1.0101
Trešnja ( <i>Prunus avium</i> )	Pru av 1.0101
Breskva ( <i>Prunus armeniaca</i> )	Pru ar 1.0101
Kruška ( <i>Pyrus communis</i> )	Pyr c 1.0101
Soja ( <i>Glycine max</i> )	Gly m 4.0101
Paradajz ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Sola l 4.0101
Celer ( <i>Apium graveolens</i> )	Api g 1.0101
Šargarepa ( <i>Daucus carota</i> )	Dau c 1.0101
Kikiriki ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Ara h 8.0101
Orah ( <i>Juglans regia</i> )	Jug r 5.0101
Badem ( <i>Prunus dulcis</i> )	Pru du 1.0101
Grašak ( <i>Pisum sativum</i> )	-
Sočivo ( <i>Lens culinaris</i> )	-

### 2.1.6. Glavni alergen polena breze - Bet v 1

Kao što je istaknuto u prethodnom poglavlju, Bet v 1 je glavni alergen polena breze i pripada familiji PR-10. PR proteini su klasifikovani u 17 klasa na osnovu sličnosti u biološkoj funkciji, fizičko-hemijskim osobinama i homologiji amino-kiselinskih sekvenci [29]. Proteini iz PR-10 grupe su visoko konzervirani, kiseli proteini otporni na proteaze, molekulske mase oko 17 kDa (154-163 amino kiseline) [29]. Tačna funkcija PR-10 proteina nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da obavljaju zaštitnu ulogu u biljkama u kojima se eksprimiraju [5]. Iako nema jasnih dokaza o njihovoj ulozi u biljnim ćelijama, njihova konzerviranost i rasprostranjenost u različitim biljnim vrstama govori o njihovoj nezamenjivoj ulozi [29].

Trodimenzionalna struktura Bet v 1 je bila prva eksperimentalno utvrđena struktura klinički značajnog inhalatornog alergena [30]. Kristalna struktura Bet v 1 (slika 2 A) pokazala je da se ovaj protein sastoji od sedam anti-paralelnih  $\beta$  ploča koje okružuju C- terminalni  $\alpha$

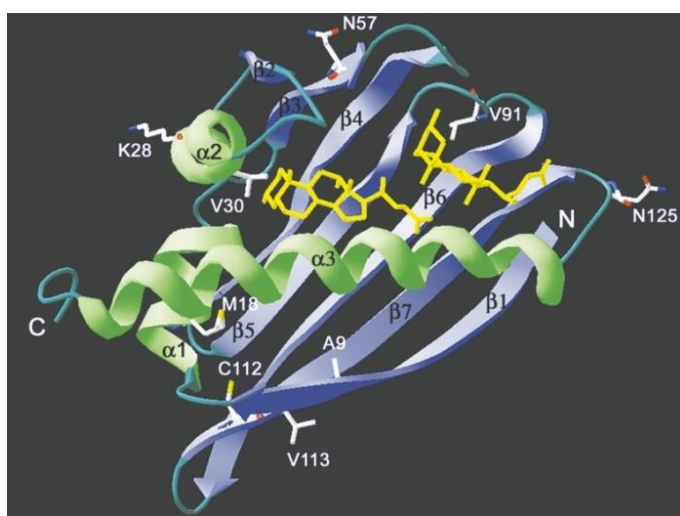
heliks dugačak 25 aminokiselina [30].  $\beta$  ploča i C-terminalni  $\alpha$  heliks su odvojeni sa dva uzastopna heliksa [30]. Hidrofobno jezgro Bet v 1 se formira između C- terminalnog heliksa, dva uzastopna heliksa i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka iz obližnjih  $\beta$  ploča [30]. Između tri heliksa i  $\beta$  ploča se nalazi račvasta šupljina (slika 2 B) koja se prostire kroz celu strukturu sa tri otvora ka površini proteina [30]. Ova šupljina predstavlja najneobičniju strukturnu karakteristiku ovog proteina. Pretežno je izgrađena od hidrofobnih aminokiselinskih ostataka uz svega nekoliko ostataka koji se mogu naelektrisati i formirati vodonične veze (Asp27, Asp69, Tyr81, Tyr83, Asn100, Gln132 i Ser136). Ove naelektrisane aminokiseline učestvuju u formiranju vodoničnih veza sa četiri molekula vode pronađena u unutrašnjosti proteina. Ostali molekuli vode u proteinskoj strukturi su povezani vodoničnim vezama sa hidrofilnim aminokiselinama na površini proteina [30]. Prvi otkriveni fiziološki ligand Bet v 1 je kvercetin-3-O-soforosid (Q3OS), glikozilovan flavonol [31]. Flavonoidi se u polenu nalaze u formi glikozilovanih prekursora koji se tokom rehidratacije polenovog zrna prevode u aktivnu formu pomoću polenske glikoziltransferaze [32]. Vezivanje za prirodni ligand dovodi do stabilizacije Bet v 1 strukture, čime se povećava njegova tačka topljenja i otpornost na endo-/lizosomalnu proteolizu [33]. Fitoprostan E1 (PPE1) je još jedan prirodni ligand Bet v 1 alergena [34]. PPE1 se visokim afinitetom vezuje za Bet v 1 povećavajući njegovu stabilnost i smanjujući njegovu lizosomalnu degradaciju katepsinom S [32]. Povećana stabilnost bi mogla da ometa optimalnu proteolitičku obradu alergena, što bi pogodovalo razvoju Th2 imunskog odgovora [32].



**Slika 2. A) 3D model dobijen iz kristalne strukture Bet v 1; B) prikaz hidrofobne račvaste šupljine Bet v 1. [30]**

U maju 1985. godine započet je rad na kloniranju cDNK Bet v 1 [32]. 1989. godine je prvi put klonirana cDNK Bet v 1 [35]. Ova cDNK kodira dominantnu izoformu u brezi, Bet v 1.0101 (Bet v 1a; Bv1a) [35]. Kasnije su otkrivene izoforme Bet v 1 koje se međusobno razlikuju samo u nekoliko aminokiselina, ali se značajno razlikuju u IgE reaktivnosti [35]. Genom breze sadrži najmanje 7 gena koji se eksprimiraju u polenu i kodiraju različite Bet v 1 izoforme koje se razlikuju po svojoj IgE reaktivnosti [36]. Nakon testiranja rekombinantno proizvedenih izoformi Bet v 1, one su prema svojoj IgE reaktivnosti klasifikovane kao slabo, srednje i jako alergene [36]. Dominantna izoforma Bet v 1. 0101 (Bet v 1a) je pokazala najjaču

IgE reaktivnost, dok su Bet v 1.0401 (Bet v 1d) i Bet v 1.1001 (Bet v 1l) pokazale veoma nisku IgE reaktivnost [36]. Ova zapažanja govore u prilog tome da su male razlike u strukturi ovih proteina dovoljne da odrede stepen alergnosti i imunogenosti ovih proteina [36]. Poređenje sekvenci Bet v 1 izoformi sa niskom i visokom sposobnošću vezivanja IgE pokazale su u *in vivo* i *in vitro* studijama da IgE vezivanje zavisi od najmanje šest aminokiselinskih ostataka na pozicijama 9, 30, 57, 112, 113 i 125 Bet v 1 molekula [37]. U poređenju sa Bet v 1a izoformom, hipoalergena Bet v 1l izoforma se razlikuje u 9 aminokiselinskih ostataka [37]. U ovih 9 aminokiselina se pored pomenutih šest nalaze i dodatne tri na pozicijama 18, 28 i 91 [37]. Šest aminokiselinskih ostataka (9, 57, 91, 112, 113, 125) se nalazi na suprotnim krajevima antiparalelnih  $\beta$  ploča, dok se ostatci na pozicijama 18, 28 i 30 nalaze na dva uzastopna  $\alpha$  heliksa [37] (slika 3). Samo četiri aminokiseline Lys28, Asn57, Val113 i Asn125 su izložene rastvaraču [37]. Izmena Asp125 u Asn125 je pronađena u svim hipoalergenim izoformama što ukazuje da može biti od posebnog značaja za smanjeno IgE vezivanje [37].



**Slika 3.** 3D model Bet v 1l dobijen iz kristalne strukture. Na slici su prikazani aminokiselinostaci koji se razlikuju između Bet v 1a i Bet v 1l izoformi [37].

## 2.2. Terapije alergije

Klasični, klinički pristup u lečenju alergije podrazumeva primenu farmakoterapije (antihistaminika, kortikosteroida i sl.). Ovakav vid terapije, iako efikasan za brzo razrešavanje simptoma alergije, ne rešava problem alergije, te se simptomi vraćaju vrlo brzo po prestanku dejstva primene farmakoterapije.

Razvoj imunoloških terapija za alergije ide u dva smera:

- 1) pasivna terapija
- 2) aktivna, alergen-specifičnu imunoterapija.

### 2.2.1. Pasivni oblici terapija alergije

Do razvoja pasivnih oblika terapije alergije je došlo sa novim saznanja o molekulskim mehanizmima razvoja same bolesti. Pasivna terapija podrazumeva intervencije na različitim tačkama alergijskog oboljenja kao što su administracija alergen-blokirajućih IgG antitela,

terapija monoklonskim antitelima koji ciljaju Th2 citokine, i primena monoklonskih antitela koji ciljaju IgE antitela [38].

Pasivna administracija IgG antitela je pristup koji se koristi u terapijama virusnih infekcija [38]. Iako dobro uspostavljen sistem, do skoro se nije razvijao za primenu u terapiji alergija [38]. Koncept pasivne administracije monoklonskih alergen-blokirajućih IgG antitela je prvi put ispitan na malom uzorku pacijenata alergičnih na mačju dlaku, a potom se proširio i na pacijente alergične na polen breze [39,40]. Razvijeni su terapijski kokteli jedan koji se sastoji od dva monoklonska antitela koja specifično prepoznaju dva epitopa na glavnom alergenu mačje dlake Fel d 1 i koktel tri monoklonska antitela koja prepoznaju različite epitope na površini Bet v 1. Antitela koja su se finalno našla u proizvodu su birana na osnovu niza prekliničkih testova koji su se zasnivali na merenju afiniteta i kapaciteta da blokiraju alergen-specifični IgE [38]. Osnova ovog pristupa je razumevanje i poznavanje strukture alergena i njegove interakcije sa antitelima [38]. Neophodno je blokirati veći broj epitopa kako bi se postigla snažna inhibicija aktivacije efektorskih ćelija [38]. Iako je pokazano da nije neophodna maksimalna pokrivenost epitopa na površini alergena kako bi se postiglo blokiranje IgE posredovanog alergijskog odgovora, imunodominantni alergeni sa definisanim epitopima su povoljniji jer bi ciljanje složenijih alergeni epitopa bilo znatno teže [38]. Pored ovoga, polialergija je dodatni izazov koji je potrebno prevazići jer su retki slučajevi osetljivosti samo na jedan alergen [38].

Drugi oblik pasivne terapije na čijem razvoju se radi su monoklonska antitela na Th2 citokine odgovorne za alergijsku reakciju (IL-4, IL-5 i IL-13), kao i citokine koje otpuštaju epitelne ćelije (IL-25, IL-33 i TSLP). Ova istraživanja su u povoju i tek su počela da otkrivaju molekulske mehanizme koji se aktiviraju nakon ovakvog vida terapije [38].

Omalizumab je prvi preparat baziran na monoklonskim anti-IgE antitelima koji je 2003. godine odobren za humanu upotrebu u lečenju alergija u SAD, a 2005. i u Evropi [41]. Kliničke terapije se razvijaju u smeru primene Omalizumaba paralelno sa alergen-specifičnom imunoterapijom gde se pokazalo da ima najveći efekat [41]. Pored omalizumaba, radi se na razvoju drugih anti-humanih monoklonskih antitela, kao što je ligelizumab (humanizovano IgG1 monoklonsko antitelo koje prepoznaje na površini IgE različite epitope od omalizumaba). Kao i prethodno pomenute strategije pasivne imunizacije i na ovom obliku je potrebno uraditi još kliničkih studija kako bi se razumeli mehanizmi i odredila tačna doza i vreme trajanja terapije.

### **2.2.2. Alergen-specifična imunoterapija**

Alergen-specifična imunoterapija (AIT) predstavlja jedinstveni oblik lečenja alergije koji ima dugoročan efekat i utiče na osnovni uzrok bolesti [6]. Alergolozi i imunolozi prepisuju AIT za učestala alergijska stanja, pre svega za alergijski rinitis/konjunktivitis, alergijsku astmu i preosetljivost na ubod insekata [42]. Indikacija za primenu AIT je prisustvo klinički značajnih količina alergen-specifičnih IgE antitela [42]. Prisustvo alergen-specifičnih IgE antitela se najčešće potvrđuje kožnim probama i određivanjem serumskog nivoa alergen-specifičnih IgE antitela.

Nakon uvođenja AIT 1911. godine [7], prva kontrolisana klinička studija je sprovedena 1954. godine i tokom nje je primećeno poboljšanje simptoma kod pacijenata koji su primali prirodni ekstrakt polena u poređenju sa kontrolnom grupom [43]. U narednim godinama su sprovedene brojne studije radi poboljšanja efikasnosti i bezbednosti AIT.



### 2.2.2.1. Mehanizam alergen-specifične imunoterapije

Uloga AIT je da koriguje patofiziološke mehanizme alergije [43]. Uvođenje T ćelijske tolerancije je esencijalni korak u AIT [44]. Mehanizam AIT uključuje povećanje broja T regulatornih (Treg) ćelija. Treg proizvode TGF $\beta$  i IL-10 koji su neophodni za imunomodulatornu aktivnost tokom terapije [43]. IL-10 inhibira oslobađanje histamina iz aktiviranih mastocita [45] i smanjuje oslobađanje proteina iz eozinofila [46]. Pored toga, IL-10 je odgovoran i za preključivanje klasa imunoglobulina u B ćelijama sa IgE na IgG klasu uključujući IgG1 i IgG4 klasu antitela [6]. Nasuprot njemu, TGF $\beta$  stimuliše preključivanje klasa imunoglobulina ka IgA antitelima [47]. Proizvedena alergen-specifična IgG i IgA antitela se kreću u cirkulaciji i takmiče se sa alergen-specifičnim IgE antitelima na senzitisanim bazofilima za vezivanje alergena, čime inhibiraju umrežavanje IgE antitela i okidanje signalne reakcije u senzitisanim mastocitima [6]. Treg nastaju u roku od nekoliko nedelja od početka AIT kao posledica interakcije sa regulatornim dendričkim ćelijama koje su stimulisane alergenom tokom AIT [6]. Postoje dva glavna podtipa Treg različitog fenotipa i mehanizma dejstva [44]. Prvi podtip podrazumeva prirodno prisutne timusne FOXP3+CD4+CD25+ Treg [44]. Drugi podtip se odnosi na inducibilne Treg koje nastaju na periferiji u tolerogenim uslovima [44]. Dva inducibilna tipa Treg koja igraju ključnu ulogu u uvođenju alergijske tolerancije su FOXP3+ i IL-10-pozitivne Treg [44]. Pokazano je da FOXP3 direktno interaguje sa traskripcionim faktorima sličnim Runt 1(RUNX1), koji smanjuju nivo ekspresije IL-2 i IFN- $\gamma$  i ispoljavaju supresivnu funkciju [48].

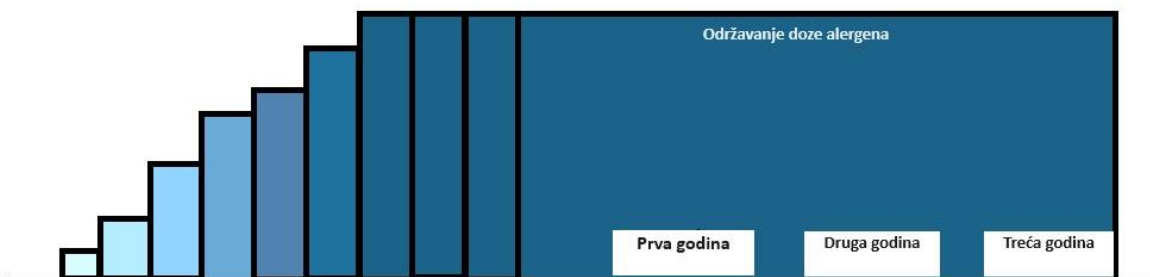
Alergen-specifični T ćelijski podtipovi (Th1, Th2 i inducibilne Treg) koji prepoznaju iste T ćelijske epitope alergena postoje kod zdravih i atopičnih osoba u različitom odnosu [44]. Osobe koje imaju više alergen-specifičnih Th2 ćelija su podložnije razvoju alergija, dok prisustvo alergen specifičnih inducibilnih Treg ima zaštitno dejstvo [44].

### 2.2.2.2. Načini dostave alergena u alergen-specifičnoj imunoterapiji

AIT se tipično sastoji iz dve faze. Prva faza predstavlja fazu desenzibilizacije (izgradnje imuniteta), dok je druga faza u terapiji faza održavanja [42]. Tokom faze desenzibilizacije pacijenti primaju terapiju koja počinje od niskih doza ekstrakta alergena uz postepeno povećanje tokom prvih tri do šest meseci [42]. Na dinamiku imunoterapije mogu uticati različiti faktori kao što su formulacija preparata, način administracije, kao i zdravstveno stanje pacijenta. Jedan od čestih načina administracije terapeutika podrazumeva da pacijenti primaju terapiju 1-3 puta nedeljno [42]. Nakon ovog perioda, pacijenti razviju dovoljnu toleranciju na alergen i prelazi se na fazu održavanja koja traje tri do pet godina [42]. Tokom faze održavanja, pacijenti primaju terapiju jednom u 4-6 nedelja [42]. Dva najčešća načina administracije alergena tokom AIT su subkutana i sublingvalna administracija.



Pre sezone		Tokom sezone
Izgradnja doze	Održavanje visoke doze	Faza kontrolisanja



**Slika 4. Shematski prikaz protokola AIT.**

Tradicionalni protokol subkutane AIT podrazumeva nedeljno primanje injekcija tokom faze izgradnje tolerancije [49]. Injekcije za subkutanu AIT daje obučeno osoblje u bolnicama ili domovima zdravlja gde su obezbeđeni neophodni uslovi za kontrolu neželjenih lokalnih i sistemskih reakcija kao što je anafilaksija [49]. Subkutana administracija predstavlja vrlo nepovoljno rešenje za pacijenta jer podrazumeva injektovanje terapeutika i dugoročno česte posete bolnici [49]. Ovo je dovelo do razvoja sublingvalne metode za primenu terapeutika tokom AIT. Sublingvalna metoda podrazumeva primenu alergenog terapeutika pod jezik. Prednosti sublingvalne administracije u odnosu na subkutanu su pogodnost po pacijenta, jer se na ovaj način izbegavaju brojne injekcije, takođe pacijenti terapiju uzimaju samostalno kod kuće, čime se smanjuje broj poseta bolnici, i najvažnija prednost sublingvalne AIT predstavlja njena bezbednost, odnosno izostanak jakih, sistemskih neželjenih reakcija [42]. Najčešće neželjene reakcije koje se dešavaju tokom sublingvalne AIT predstavljaju svrab, iritaciju grla i svrab oko ušiju [42]. Ovi simptomi uglavnom nestanu nakon prve nedelje primene terapije [42].

Tokom sublingvalne AIT alergen se elektrostatičkim interakcijama vezuje za epitelne ćelije, nakon čega ga preuzimaju APC - dendritske ćelije i makrofagi tokom 15-30 minuta od primene terapeutika [50]. APC u bukalnom tkivu su Langerhansove ćelije (LCs), CD11b+CD11c- ćelije slične makrofagima, konvencionalne CD11b+ CD11c+ dendritske ćelije kao i nezrele plazmacitoidne dendritske ćelije (CD40-CD80-CD86+) [50]. Ove APC su raspoređene u različitim delovima bukalnog tkiva. U mukoznom tkivu se nalaze LCs, u *lamina propria* su makrofagi i konvencionalne dendritske ćelije, dok su u submukoznom tkivu plazmocitoidne ćelije [50]. Ove ćelije igraju važnu ulogu u razvoju tolerancije na alergen sekretujući IL-10, TGFβ i IL-12 [50]. Bukalne APC stimulišu diferencijaciju naivnih CD4+ T ćelija u IFN-γ sekretujuće Th1 ćelije ili u IL-10 produkujuće inducibilne Treg koje imaju ulogu u spresiji alergijske reakcije [50]. Sublingvalni način administracije predstavlja jedini mukozni put do uspostavljanja specifične tolerancije na alergen kod pacijenata sa respiratornim alergijama [50].

### 2.3. Nove strategije u razvoju AIT

Iako se pokazala kao delotvorna, alergen-specifična imunoterapija je dugotrajna (period primene terapije je tri do pet godina), a pored toga neki pacijenti ne odreaguju na terapiju, dok

se kod nekih razviju neželjene reakcije [51]. Zbog svega navedenog, neophodan je rad na razvijanju AIT u pogledu povećanja njene efikasnosti (uvođenje novih adjuvanasa), ali i bezbednosti [51].

### 2.3.1. Molekularna alergologija

Većina identifikovanih alergena je do sada klonirana što je omogućilo preciznu dijagnostiku IgE-posredovane osetljivosti na glavne, ali i minorne alergene iz hrane i alergene prisutne u vazduhu [6]. Precizna dijagnostika je od izuzetnog značaja za uspostavljanje prave terapije. U kliničkim laboratorijama su dostupne različite metode za određivanje alergenspecifičnog IgE u serumu pacijenata. Većina ovih metoda se zasniva na dijagnostici razdvojenoj na komponente (*engl. Component resolved diagnostic- CRD*) [52]. Pored precizne dijagnostike, rekombinantno proizvedeni alergeni svoju primenu nalaze i u praćenju toka terapije kroz detekciju novonastalih alergenspecifičnih IgG antitela [6]. Osim ovoga alergeni dobijeni tehnologijom rekombinantne DNK se mogu koristiti u AIT. Na ovaj način se mogu dobiti velike količine čistog proteina koji je efikasan u imunoterapiji [53]. Kako bi se ovo ostvarilo neophodni su efikasni ekspresion sistemi koji će obezbediti visoke prinose rekombinantnih proteina, kao i efikasne moćne tehnike za prečišćavanje eksprimiranih alergena [54]. Krucijalni korak u proizvodnji rekombinantnih alergena je provera kvaliteta dobijenog proteina u smislu njegove čistoće, tercijarne strukture i biološke aktivnosti [54]. Kako bi se proverili svi navedeni parametri potrebno je primeniti različite fizičko-hemijske metode koje podrazumevaju masenu spektrometriju, CD spektrometriju i NMR analizu [54]. Paralelno, neophodno je proveriti i IgE reaktivnost dobijenih proteina [54].

Primena rekombinantnih alergena je bila prvi korak u razvoju AIT i podrazumevala je zamenu prirodnih ekstrakata alergena rekombinantnim homolozima. Za razliku od primene prirodnih ekstrakata, primenom čistog rekombinantnog alergena izbegava se uvođenje neželjene senzitivacije na ostale komponente prisutne u punom ekstraktu [53]. Nažalost, u poređenju sa prečišćenim prirodnim alergenom, rekombinantni alergeni su izazivali isti stepen neželjenih IgE reakcija [55]. Ovo je bio glavni razlog zašto se fokus primene molekularne alergologije prebacio sa istraživanja efekta rekombinantnih alergena u AIT ka proizvodnji i ispitivanju efekta hipoalergenih izoformi. Hipoalergene izoforme imaju smanjenu IgE reaktivnost, dok u isto vreme zadržavaju T-ćelijske epitope koji su značajni za uvođenje T-ćelijske tolerancije [36]. Iako bi ovakav vid AIT omogućio bezbednije i dobro definisane vakcine, dosadašnji rezultati su pokazali da primena čistih rekombinantnih proteina ili njihovih izoformi i derivata nije dovoljno efikasna. Radi povećanja njihove efikasnosti, neophodno je uvesti nove adjuvanse koji bi pojačali odgovor urođenih ćelija imunskog sistema i tako uticali na smanjivanje alergijskog Th2 imunskog odgovora.

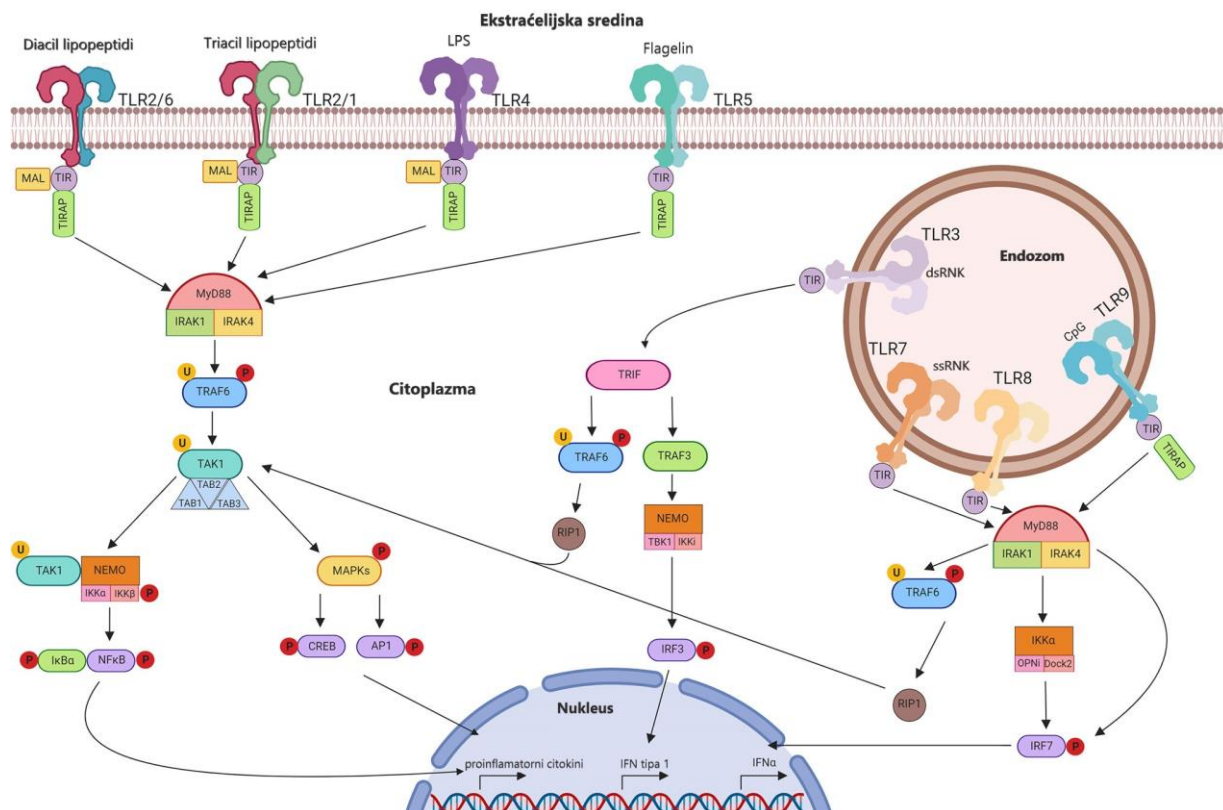
### 2.3.2. Imunomodulatorni agensi kao adjuvansi

Adjuvansi predstavljaju supstance ili jedinjenja koja se administriraju zajedno sa vakcinom kako bi pojačali imunogenost alergena i modulirali imunski odgovor [56]. Adjuvansi se dodaju kako bi izazvali brži, dugoročniji i potentniji odgovor tokom AIT [56]. Idealni adjuvans bi trebalo da bude biorazgradiv, stabilan, održiv, netoksičan i isplativ [56]. Iako su se brojna jedinjenja pokazala kao dobri adjuvansi, samo neki od njih su se proučavali radi primene u AIT (Tabela 2).

**Tabela 3. Adjuvansi u AIT [56].**

Sistemi isporuke	Aluminijum hidroksid
	Kalcijum fosfat
	Mikrokristalin tirozin
Imunomodulatorni agensi	Monofosforil lipid A (MPLA)
Adjuvansi koji se ispituju	Imunostimulatorne sekvence
	Nanopartikule
	Fosfatidil serin

Imunomodulatorni agensi predstavljaju heterogenu grupu koja obuhvata produkte koji deluju direktno na ćelije imunskog sistema i modulišu njihov odgovor na antigen [56]. Njihov mehanizam delovanja se zasniva na aktivaciji ćelija urođene imunosti kao što su makrofagi i dendriidske ćelije [57]. Ova vrsta adjuvanasa aktivira ćelije urođenog sistema preko PAMPova . PAMPovi nisu prisutni u ćeliji domaćinu i predstavljaju spoljašnji signal koji prepoznaju ćelije urođene imunosti preko receptora na svojoj površini- PRRovi [56]. Dve najveće grupe PRRovi predstavljaju TLRovi i receptori slični domenu koji vezuje nukleotide (NOD receptori). TLRovi prepoznaju odgovarajuće PAMPove i aktiviraju brojne unutarćelijske signalne puteve koji vode ka proizvodnji različitih citokina, hemokina, ćelijskih adhezionih molekula i imunoreceptora [56]. TLRovi su transmembranski proteini koji se mogu naći na površini ćelijske membrane gde prepoznaju patogene iz spoljašnje sredine ili unutar ćelije na površini membrane unutarćelijskih odeljaka kao što su endoplazmatični retikulum, endozom ili lizozom [11]. Kod sisara je otkriveno 13 TLR, dok kod ljudi postoji 10 [58]. Ligandi i signalni putevi TLR-ova 1-9 i 11 su poznati, dok za TLR 10, 12 i 13 i dalje nije potpuno jasna uloga [58]. TLRovi formiraju dimere kako bi obavljali svoju funkciju (TLR2 formira heterodimer sa TLR1 i TLR6, dok su ostali TLRovi u formi homodimera) [11]. Ligandi TLR i signalni putevi koje oni aktiviraju su prikazani na slici 4. TLRovi se eksprimiraju na antigen-prikazujućim ćelijama (makrofagima i dendritskim ćelijama), ali i na T- i B- limfocitima, kao i na epitelnim, endotelnim ćelijama i fibroblastima [11]. Nova generacija adjuvanasa podrazumeva upotrebu aktivatora TLRova koji osim što igraju ulogu sistema za isporuku vakcine imaju i imunomodulatornu funkciju.



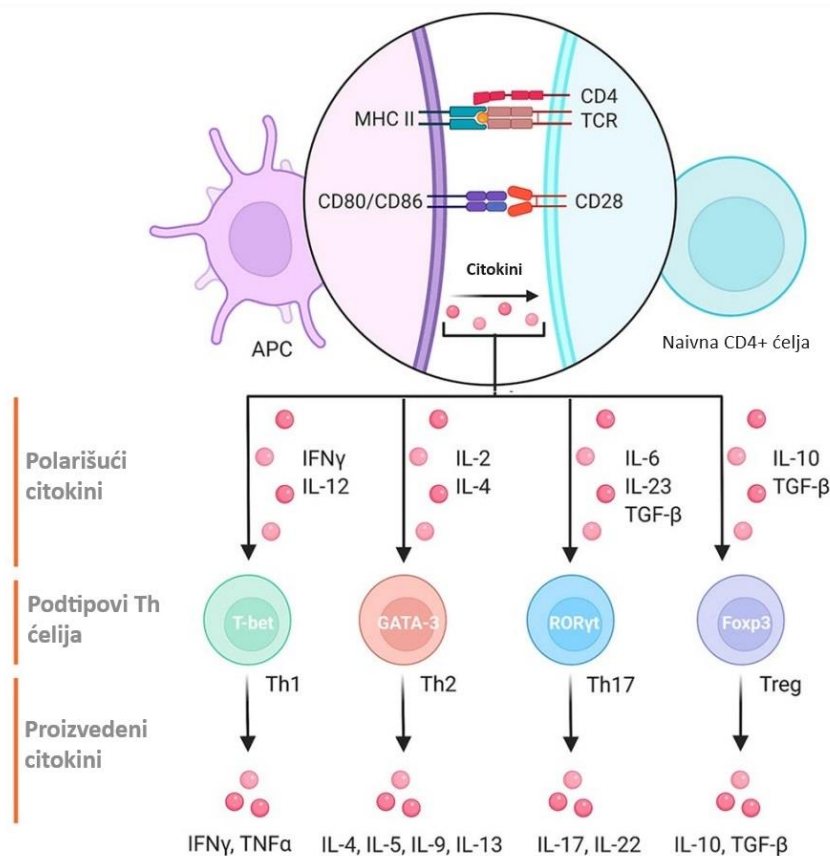
Slika 5. Ligandi i signalni putevi TLRova [11].

Razvijanje kombinovanih molekula alergena sa ligandima TLRova predstavlja primamljivo rešenje za poboljšavanje efikasnosti i imunološke tolerancije tokom AIT [6]. Do sada su proizvedeni rekombinantni konstrukti alergena povezanih sa površinskim slojem bakterijskih ćelija koji aktivira TLR2 receptor [59], kao i sa flagelinom koji aktivira TLR5 receptor [59]. Pored rekombinanto proizvedenih konstrukata alergena sa TLR ligandima, rađene su i hemijske modifikacije alergena sa detoksikovanim TLR4 ligandom MPLA [60] ili imunostimulativnim oligodeksinukleotidima (ISS-ODN) koji sadrže TLR9 aktivirajuće nemetilovane CpG motive [61].

## 2.4. Antigen-prikazujuće ćelije u alergenspecifičnoj imunoterapiji

APC su neophodne za inicijaciju, ali i kontrolu imunskog odgovora [62]. Profesionalne APC su podeljene u dva tipa: prvi tip podrazumeva dendrijske ćelije (DCs) u koje spadaju cirkulišuće i tkivne DCs, kao i epidermalne Langerhansove ćelije (LCs), a drugi tip su monociti i makrofazi [62]. Sve ove ćelije vode poreklo od pluripotentne CD34<sup>+</sup> hematopoetične progenitorske ćelije [62]. U zavisnosti od načina prikazivanja obrađenog antigena u APC, eksprimiranih ko-stimulativnih molekula i citokina u mikrosredini, CD4<sup>+</sup> naivne T ćelije se mogu diferencirati u Th1, Th2, Th9, Th17 ili Th22 tip [63]. Kako bi do ovoga došlo neopohna su dva signala. Nakon što APC preuzimu i obrade antigen, dolazi do prikazivanja peptide u kontekstu MHC molekula klase II nakon čega naivna T CD4<sup>+</sup> T ćelija svojim T ćelijskim receptorom (TCR) prepoznaje peptid u okviru MHC II [64], što predstavlja prvi signal. Po uspostavljanju prvog signala, dolazi do uspostavljanja drugog signala koji predstavlja vezivanje CD28 molekula na površini naivne CD<sup>+</sup> T ćelije za CD80/CD86 na površini APC

[64]. Sve ovo dovodi do lučenja različitih citokina, i u zavisnosti od toga koji citokini su izlučeni zavisice tip Th ćelija u koji će se diferencirati naivna CD4<sup>+</sup> T ćelija [64].



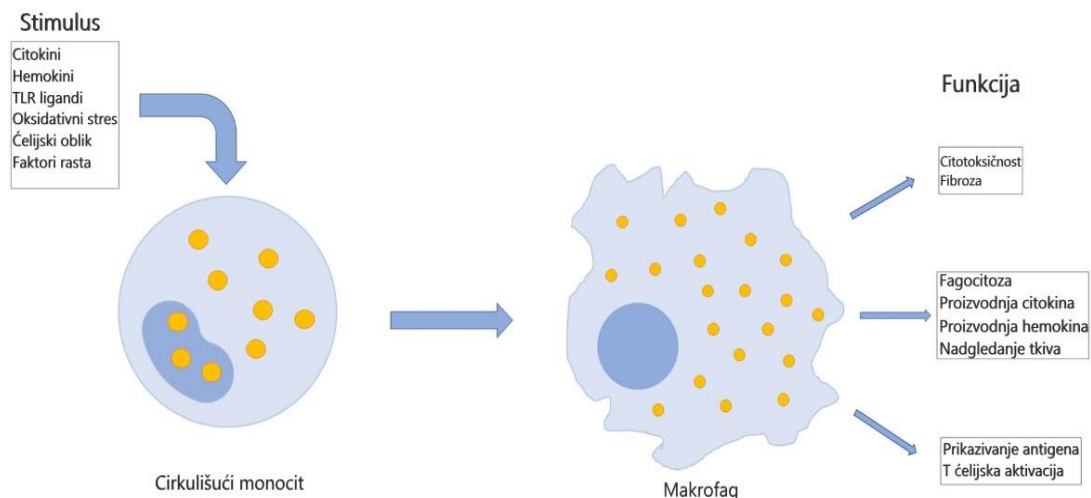
**Slika 6. Aktivacija i diferencijacija CD4<sup>+</sup> T ćelija [64].**

Efikasnost AIT zavisi od pobuđenog tolerogenog imunskog odgovora [65]. U poslednje vreme, raste interes za ciljanu dostavu alergena do APCs, kao što su DCs tokom AIT [65]. Ciljanje vakcina do APC dovodi do difrencijacije naivnih T ćelija u Th1 ćelije i Treg što dovodi do regulacije prejakog Th2 odgovora prisutnog kod alergija [65].

### 2.4.1. Makrofagi

Makrofagi su ćelije urođene imunosti. Kao i ostale ćelije krvi nastaju iz pluripotentne matične ćelije iz kostne srži, nakon njene diferencijacije u mijeloidne progenitorske ćelije [66]. Iz mijeloidne progenitorske ćelije nastaju eritrociti, krvne pločice, granulociti (bazofili, eozinofili i neutrofilni) i monociti. Kada monociti koji se kreću cirkulacijom pređu u tkivo diferenciraju se u makrofage (slika 7). U cirkulaciji monociti čine između 2-8% od ukupnog broja belih krvnih zrnaca, što odgovara broju od 200-800 monocita po mikrolitru krvi [66]. Monociti su okrugle ćelije sa nukleusom u obliku bubrega veličine 20-30 μm [66]. Nakon diferencijacije u makrofage menjaju svoj oblik i postaju većih dimenzija [66]. Monociti se mogu diferencirati u makrofage različitog fenotipa koji se međusobno razlikuju na osnovu markera koje ekspimiraju na svojoj površini [66]. Makrofagi su prisutni u svim tkivima u organizmu, i u zavisnosti od tkiva u kom se nalaze mogu imati različite fenotipove i morfologiju (tabela 3) [66]. Uloga makrofaga se ogleda u uklanjanju ostarelih, apoptotičnih ćelija, mrtvih ćelija u održavanju homeostaze, popravci tkiva i regeneraciji mišića [66]. Ono što je i dalje nejasno je da li rezidentni makrofagi predstavljaju funkcionalno različite

podtipove, ili imaju mogućnost promene u zavisnosti od mikrookoline i stanja u kom se ćelija nalazi [66].



**Slika 7. Diferencijacija monocita iz cirkulacije u makrofage usled aktivacije različitim stimulusima [66].**

**Tabela 4. Različiti tipovi rezidentnih makrofaga su prisutni u tkivima [66].**

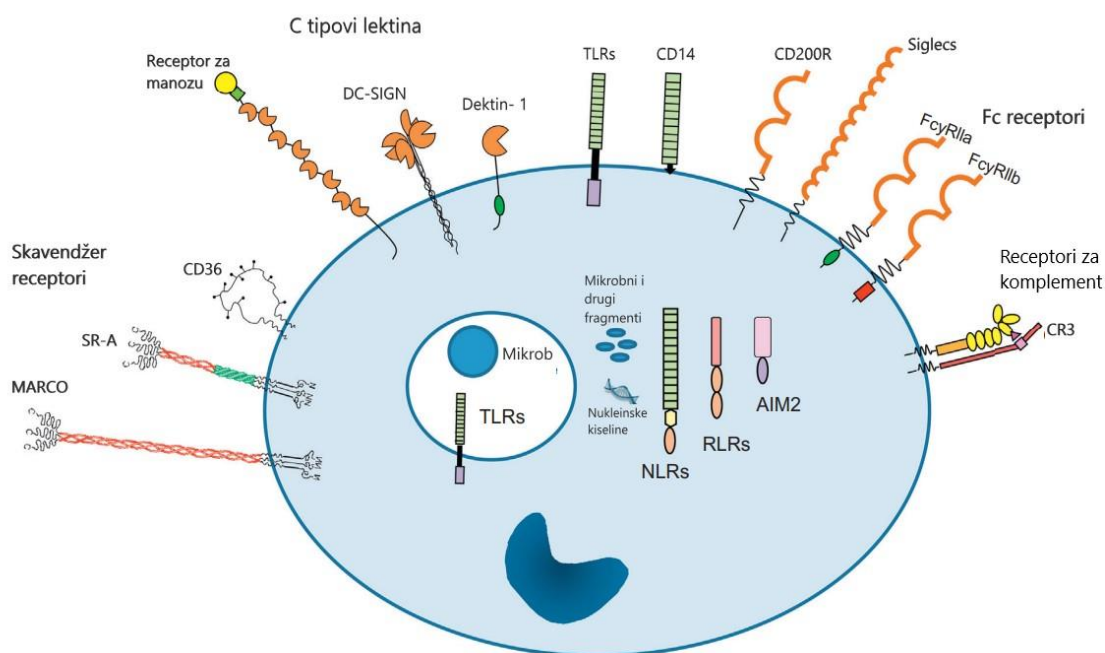
Tkivo	Rezidentni makrofagi
Jetra	Kupferove ćelije
Pluća	Alveolarni makrofagi
Koža	Langerhansove ćelije
Serozne šupljine	Serozni makrofagi
Vezivno tkivo	Histiociti
Zglobovi/hrskavice	Sinovijalni makrofagi (tip A)
Kosti	Osteoklasti
Bubrezi	Menzengijalni makrofagi
Mozak	Mikroglia

Makrofagi predstavljaju važnu prvu liniju odbrane organizma. Tokom infekcije ili povrede tkiva, makrofagi detektuju otpuštene hemotaktičke signale i dolaze na mesto zapaljenja gde fagocituju patogene i ćelijske ostatke, i digestuju ih u fagolizozomu koji se formira spajanjem fagozoma sa lizozomom [66]. Osim što uklanjaju patogen, oni prikazuju



dobijene peptide u kontekstu MHC molekula klase II ćelijama adaptivne imuosti, B- i T-limfocitima [66]. Takođe, enzimi povezani sa fagolizozomom proizvode velike količine reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koje dodatno ubijaju patogen [66].

Zahvaljujući brojnim receptorima na svojoj površini (slika 8) makrofagi se mogu polarizovati ka pro- ali i ka anti-inflamatornom odgovoru. Klasično aktivirani M1 makrofagi su povezani sa pojačanim fagocitnim aktivnostima, antigen prikazujućim sposobnostima, lučenjem pro-inflamatornih signala [66]. M1 makrofagi poseduju veliku citotoksičnu aktivnost, uklanjaju patogen tokom infekcije i posreduju u otpornosti na infekcije kroz lučenje pro-inflamatornih citokina, adhezionih molekula, hemokina, ciklooksigenaze 2, kao i proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) [66]. M2 tip makrofaga aktiviraju Th2 citokini (IL-4 i IL-13) [12]. Ovaj tip makrofaga pospešuje neovaskularizaciju, angiogenezu, stromalnu aktivaciju i remodelovanje, popravku oštećenog tkiva i generalno anti-inflamatorni odgovor [66]. M2 podtip makrofaga je dodatno podeljen na tri podtipa: M2a, M2b, M2c i M2d u zavisnosti od stimulusa zbog kojih ulazi u diferencijaciju i na osnovu rezultujućih molekula koje posledično sekretuje [12]. Regulatorne M2b makrofage aktiviraju različiti imuni kompleksi i agonisti TLRova [67]. Pored pro-inflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ ) ove ćelije luče i veliku količinu IL-10 i malu količinu IL-12 [67]. *In vitro* je pokazano da proizvodnja IgG4 nakon AIT utiče na diferencijaciju M2a podtipa makrofaga u M2b uz posledično lučenje IL-10 [12].



Slika 8. Shematski prikaz receptora prisutnih kod makrofaga [68].

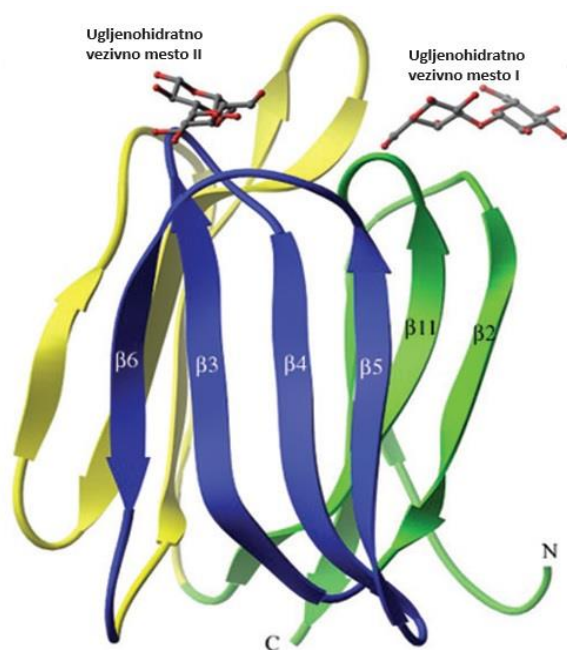
## 2.5. Lektin banane kao imunomodulatorni agens u alergenspecifičnoj imunoterapiji

Lektini su proteini koji specifično prepoznaju ugljene hidrate i vezuju se za njih [69]. Lektini su važna grupa proteina koja ima ulogu u različitim biološkim procesima s obzirom da sa visokom specifičnošću prepoznaju i vezuju ugljenohidratne komponente na površini ćelija [69]. Neke od dobro okarakterisanih uloga lektina su međućelijska komunikacija, u kancerskoj metastazi, embriogenezi, interakcijama između ćelija domaćina i patogena, kao i u

razvoju tkiva [70]. Lektini biljaka su podjeljeni u pet klasa na osnovu 3D structure njihovih subjedinica [71]. Ove klase su: lektini mahunarki, lektini uvijeni kao  $\beta$ - prizma (lektini slični žakalinu; *engl. Jacalin related lectins- JRL*), lektini monokotiledonskih biljaka koji vezuju manozu, lektini uvijeni u oblik deteline sa tri lista, lektini sa heveinskim domenom [71]. JRL se dele u dve grupe: JRL specifični za galaktozu (gJRL) i JRL specifični za manozu (mJRL) [71]. Osim po ugljenohidratnoj specifičnosti, ove dve grupe se razlikuju i po organizaciji svojih subjedinica. gJRL se sastoje iz dugačkog  $\alpha$  lanca i kratkog  $\beta$  lanca, dok su mJRL izgrađeni od jednog polipeptidnog lanca [71].

Banana je tropsko voće iz familije *Musaceae* [69]. BLwt je prvi put izolovan 1990. godine iz ploda *Musa paradisiac* [72]. BLwt specifično prepoznaje i vezuje manozu, ali osim  $\alpha$ - vezane gluko-/mano- piranozil grupe, BLwt može da veže i unutrašnje 3-O- $\alpha$ -D-glukopiranozil jedinice [73]. Ono što BLwt razlikuje od drugih lektina specifičnih za manozu je mogućnost vezivanja za redukujuće krajeve  $\beta$  1,3-vezanih glukozil oligosaharida [73]. Po svojoj strukturi, BLwt pripada grupi mJRL [74]. Iako se u početku mislilo da je BLwt homodimer u rastvoru [72], 2017. godine je pokazano da se BLwt u rastvoru nalazi u formi simetričnog homotetramera u kojoj svaki monomer ima dva ugljenohidratna vezivna mesta [75].

Monomer BLwt čini jedan polipeptidni lanac koji formira dvanaest  $\beta$  ploča organizovanih u  $\beta$  prizmu (slika 9) [74]. Ovakvo uvijanje podrazumeva tri četvrolančane antiparalelne  $\beta$  ploče organizovane u prizmu sa pseudo trostrukom simetrijom [74]. Prva strana prizme je u obliku pseudo grčkog ključa i izgrađena je od  $\beta$  ploča 1, 12, 11 i 2, dok su druga i treća strana prizme u obliku pravog grčkog ključa i izgrađuju ih  $\beta$  ploče 3 - 6 i 7 - 10, respektivno [74]. Lokacija prvog ugljenohidratnog vezivnog mesta je na vrhu prve stranice  $\beta$  prizme i uključuje region dve petlje (slika 9) [74]. Prva petlja je označena kao GG i nalazi se između  $\beta$  ploča 1 i 2 i sadrži Gly-Gly motiv [74]. Druga petlja, označena kao ligand vezujuća petlja, nalazi se između  $\beta$  ploča 11 i 12 i sadrži G-X3-D motiv [74]. Drugo ugljenohidratno vezivno mesto se nalazi na drugoj stranici  $\beta$  prizme i formirano je između  $\beta$  ploča 3 i 4 (ligand vezujuća petlja) i  $\beta$  ploča 5 i 6 (GG petlja) [74].





**Slika 9. Kristalna struktura monomera BLwt koja prikazuje dva vezivna mesta za ugljene hidrate. Prva stana  $\beta$  prizme je prikazana zelenom, druga plavom, a treća žutom bojom [74].**

Zahvaljujući svom visokom afinitetu ka manozni ( $IC_{50} = 249 \pm 2$  mM [13]), BLwt prepoznaje i vezuje manozne ostatke prisutne na površini HIV virusa i inhibira njegovo vezivanje za ćeliju domaćina, a samim tim i njegovu replikaciju [76].

Koshte sa saradnicima je pokazao da BLwt indukuje sekreciju anti-BLwt IgG4 antitela kod zdravih osoba koje su konzumirale banane [16]. Njihovo objašnjenje ovog fenomena je da se lektin najverovatnije vezuje za ugljenohidratne komponente kojima su ukrašene površine intestinalnih mukoznih ćelija tako da dolazi do umrežavanja ovih ćelija i promoviše se pokretanje imunskog signala [16].

Rekombinantni BLwt (rBLwt) je proizveden u *Escherichia coli* ekspresionom sistemu čime je omogućena proizvodnja ovog proteina u količinama i do 50 mg po litri ekspresionog medijuma [13]. Dobijeni rBLwt je po svojoj masi i ugljenohidratnoj specifičnosti uporediv sa BLwt [13]. Ovako dobijeni rBLwt je koristan kao reagens za glikoproteomiku i lektinske mikroeseje [13,77]. Osim svoje primene u različitim testovima, pokazano je da rBLwt ima potencijal modulacije imunskog odgovora. Zahvaljujući svojoj jedinstvenoj ugljenohidratnoj specifičnosti rBLwt ima sposobnost indukcije proliferacije CD3+, CD4+ i CD8+ T ćelijske populacije izolovane iz humanih mononuklearnih ćelija periferene krvi (PBMCs) [13]. Kako bi se smanjio njegov T mitogeni potencijal, dizajniran je mutant rBLwt, koji sadrži jednu mutaciju - umesto histidina na poziciji 84 nalazi se treonin (rBL<sub>H84T</sub>) [78]. Novodizajnirani rBL<sub>H84T</sub> ima smanjenu mitogenost, dok je zadržao antiviralne osobine [79]. rBLwt je termalno stabilan protein (temperatura tranzicionog maksimuma 60,8 °C), a *in vitro* testovi stimulisane gastrične digestije su pokazali da je rBLwt stabilan u drastičnim uslovima gastrointestinalnog trakta (nisko pH i prisustvo proteolitičkih enzima) i da zadržava ugljenohidratnu specifičnost [80]. U *in vivo* eksperimentima na mišijim modelima je pokazano da rBLwt deluje kao mukozni imunostimulator odnosno da ima ulogu adjuvansa [81]. Dodatno, potvrđeno je da rBLwt moduliše funkcionalne karakteristike peritonealnih mišijih makrofaga vezivanjem za ugljenohidratne komponente prisutne na površini TLR2 i CD-14 (ko-receptor TLR4) [15]. Kao izuzetno stabilan protein, specifičan za manozu, uz mogućnost indukcije lučenja IgG4 antitela i sa imunomodulatornim efektom, rBLwt i rBL<sub>H84T</sub> bi u kombinaciji sa alergenom ili hipoalergenom izoformom alergena bili vredni testiranja kao potencijalni adjuvansi za sublingvalnu AIT.

## 2.6. Model sistemi za testiranje imunomodulatornih efekata

Proces imunomodulacije menja funkcionalne karakteristike imunskog sistema jedinke a time i njen uobičajeni imunski odgovor [82]. Različite metodologije se koriste kako bi se ispitao / potvrdio imunomodulatorni efekat biomolekula [82]. Izbor odgovarajućeg modela za testiranje je komplikovan jer svaki model ima svoje prednosti, ali i nedostatke [82]. Izbor modela zavisi od početne hipoteze, ali i od cilja studije [82]. *In vitro* studije prate *in vivo* studije kako bi se razumeo precizan mehanizam imunomodulatornog efekta ispitivanog biomolekula [82].

### 2.6.1. Čelijske linije kao model sistemi

Preklinička testiranja su od izuzetnog značaja za razvoj različitih terapeutika. Istraživanja bazirana na čelijskim linijama predstavljaju osnovni protokol za uspostavljanje modela bolesti, istraživanje matičnih ćelija i raka, kao i uspostavljanje terapija [83]. *In vitro* modeli koji koriste jednu čelijsku liniju su vrlo efikasni i jeftini. Različite imortalizovane ili primarne čelijske linije su u upotrebi kako bi se evaluirali imunomodulatorni efekti biomakromolekula [82]. Ove ćelije se dobijaju biopsijom ili direktno iz telesnih tečnosti i sadrže heterogenu populaciju reprezentativnih ćelija za područje tkiva iz kog su izolovane [82]. Primarne ćelije blisko oponašaju fiziološko stanje ćelija *in vivo* i uspevaju da održe svoje *in vivo* funkcije u optimalnim uslovima u kratkom vremenskom periodu [82]. Iako se u poslednje vreme sve više razvija upotreba primarnih čelijskih linija, i dalje se favorizuje upotreba imortalizovanih čelijskih linija zbog njihove lake dostupnosti i održavanja [84]. Čelijske linije mišijih makrofaga kao što su RAW264.7 i J774A.1 su dobro okarakterisani i često primenjivani model sistemi u imunologiji i čelijskoj biologiji [85]. Česti modeli za evaluaciju imunomodulatornog dejstva su i makrofagi THP-1 i U937 monociti koji se pomoću forbol-12-miristat-13-acetata (PMA) vrlo lako mogu diferencirati u makrofage [85]. THP-1 ćelije podsećaju na primarne monocite i makrofage po morfološkim i funkcionalnim svojstvima, uključujući markere diferencijacije [86]. Prikaz najčešće korišćenih čelijskih linija za ispitivanje imunomodulatornih efekata je dat u tabeli 4. Najveća mana monoćelijskih *in vitro* sistema koji koriste jednu čelijsku liniju je odsustvo kompleksne mikrosredine prisutne u tkivima [87]. Noviji modeli nastoje da unaprede ovaj nedostatak monokultura tako što će uvesti dodatne tipove ćelija u sistem [87].

**Tabela 5. Najčešće korišćene čelijske linije za ispitivanje imunomodulatornih efekata [86].**

Čelijska linija	RAW 264.7	J744.A1	THP-1	U973
Izvor	BALB/c miš	BALB/c miš	Čovek	Čovek
Bolest	Abelson mišiji leukemijski tumori indukovani virusom	Retikulum sarcoma	Akutna monocitna leukemija	Histiocitični limfom
Generaciono vreme	~11 h	~17 h	~26 h	48–72 h
Način rasta	Semi-adherentne	Semi-adherentne	Suspenzija	Suspenzija
Morfološke karakteristike	Slabo adherentne, blago vretenaste	Okrugle ćelije sa velikim nukleusom.	Velika, okrugla, jednoćelijska morfologija.	Okruglog oblika sa kratkim mikroresicama i velikim

	ćelije. Ćelije se gomilaju i dobijaju okrugli oblik, kada je kultura gusta			nukleusom zrnastog oblika.
Druge karakteristike	Visoka ekspresija inducibilne azot-oksidasitaze (iNOS) u poređenju sa J774.A1	Profil eksprimiranih gena sličniji mišijim peritonealnim makrofagima u poređenju sa RAW 264.7.	Visoka fagocitna sposobnost i ekspresija površinskih markera kao što su TLR-2, CD36, CD-14, i (CD11b/CD18)	Nosi t (p13; q14) translokaciju, konstitutivno eksprimira visok nivo ćelijskih površinskih markera HLA klase I.

### 2.6.2. Životinjski model-sistemi

Primena životinjskih modela za potrebe bioloških istraživanja i razvoja lekova je vrlo stara praksa jer omogućava sticanje uvida u efekte koje određena bioaktivna supstanca ostvaruje u jednom kompleksnom sistemu kao što je živi organizam. Polazeći od pretpostavke sličnosti u fiziologiji i anatomiji između ljudi i životinja, posebno sisara, dobijeni rezultati se potom koriste za predviđanje efekata u humanoj populaciji [88]. Proces izbora životinjskog modela za biomedicinska istraživanja je veoma kompleksan [88], i mnogo faktora treba uzeti u obzir prilikom odabira idealnog životinjskog modela za biomedicinska ispitivanja [88]. Najvažniji kriterijum odnosi se na sličnosti između životinjskih vrsta i ljudi u smislu fizioloških i/ili patofizioloških aspekata [88]. Neophodna je detaljna procena tokom primene određenih lekova ili molekula i kapaciteta životinjskog modela da reprodukuje bolest ili patologiju koja se dešava kod ljudi [88]. Neophodno je razmotriti i dostupnost i veličinu životinjskih vrsta, kao i trajanje života ispitivane životinjske vrste [88]. Životinjski modeli se smatraju najvažnijim *in vivo* modelima u smislu određivanja osnovnih farmakokinetičkih karakteristika leka kao što su efikasnost, bezbednost i toksičnost, jer su ovi preklinički podaci neophodni pre ulasaka u kliničke studije koje se sprovode na ljudima [88]. *In vivo* modeli koji se najčešće koriste za ovu vrstu studija su miševi, pacovi i zečevi [88]. Uglavnom se za ova ispitivanja koriste glodari jer su laki za rukovanje i uzgoj u laboratorijskim uslovima, a imaju zadovoljavajući nivo fiziološke sličnosti sa ljudima [88]. Po novim regulativama Evropske Unije, obavezno je da se istovremeno sa studijom na glodarima izvedu i studije na neglodarima kao što su zečevi, psi, mačke ili primati [88]. Eksperimenti na životinjama pružaju uvid u mehanizam delovanja, ali ne mogu u potpunosti imitirati kompleksne humane sisteme organa [89]. Osim toga, eksperimenti na životinjama su vremenski zahtevni i skupi [89]. Dodatno, etička pitanja u radu na životinjama koja su počela 1959. godine sve više naglašavaju primenu i rad po 3R principu (eng. Reduction, refinement and replacement) [88].

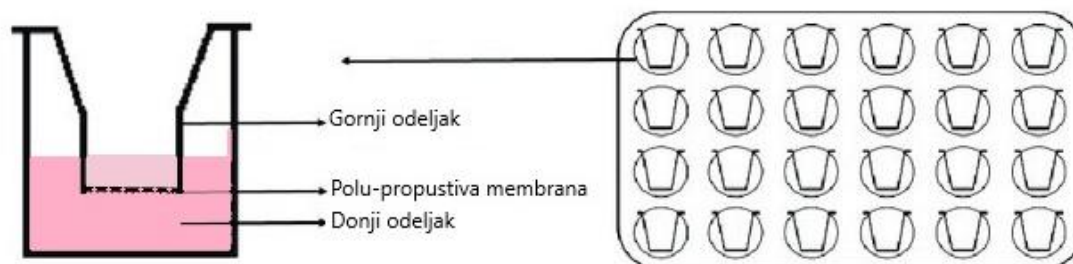
### 2.6.3. Ćelijske kokulture kao model-sistemi za testiranje potencijalnih terapeutika

Ćelijske kokulture predstavljaju pristup u kojme različiti tipovi ćelijskih populacija rastu uz određeni stepen međusobnog kontakta [90]. Ovakva postavka omogućava proučavanje

međucelijskih interakcija između ćelijskih populacija [90]. Primeri proučavanja prirodnih interakcija između populacija ćelija uključuju proučavanje infekcija i stvaranje eksperimentalnih modela i biomimetičkih okruženja prirodnih sistema, kao što su veštačka tkiva [90]. Kokulture ćelijskih linija humanog porekla su veoma bitne za istraživanje lekova jer su reprezentativniji model ljudskog tkiva u odnosu na životinjski model. Pored toga, one omogućavaju testiranje velikog broja uzoraka i dubinsko praćenje efekata leka na međucelijske interakcije [90].

Radi uspostavljanja kokulture za primenu u testiranju terapeutika neophodno je razviti eksperimentalne sisteme sposobne da imitiraju fiziološko ili odgovarajuće ispitivano stanje ćelija na koje će se terapeutik primenjivati [90]. Ćelijski fenotip predstavlja rezultat kombinacije genotipa i spoljašnje sredine [90]. U kontekstu kokulture ovo znači da spoljašnja sredina ne samo da utiče na razvoj fenotipa svake od ćelijskih populacija, nego samo na način interakcija između ćelijskih populacija prisutnih u kokulturi [90]. Kontrolisanje uslova spoljašnje sredine je dodatno komplikovano kada se govori o ćelijskoj kokulturi jer je najčešće neophodno uskladiti specifične zahteve pojedinačnih ćelijskih linija. [90].

Kokulture se mogu razlikovati u pogledu broja ćelijskih tipova, stepena sličnosti među populacijama, stepena razdvojenosti populacija, razlike između populacijskih lokalnih sredina, zapremine kokulture i vremenske skale sazrevanja [90]. Najvažnija stavka prilikom dizajna modela ćelijskih kokultura je razmatranje tipova ćelija i broja ćelijskih populacija koje je potrebno uključiti u sistem kako bi se verno ispitala željene interakcije [91]. Kompleksnost ćelijskih interakcija i analiza eksponencijalno rastu sa povećanjem broja tipova ćelija u kokulturi [91]. Najveći broj modela kokultura koristi dva ćelijska tipa. U zavisnosti od tipa interakcija koje se ispituju, ćelijske kokulture se mogu postaviti tako da se ispituju juktakrina i parakrina signalizacija između ćelija i takva ćelijska kokultura se naziva „direktna” [91]. Drugi način ispitivanja međucelijske signalizacije podrazumeva testiranje parakrinih interakcija i ovako postavljene kokulture se nazivaju „indirektna” [91]. Kod indirektnih sistema, dva tipa ćelijskih linija su međusobno razdvojena fizičkom barijerom, tako da je ćelijska komunikacija moguća samo preko sekretovanih faktora [91]. Primer indirektna ćelijske kokulture predstavljaju testovi u kojima su dva tipa ćelija razdvojena polupropustljivim migracionim umetkom [91]. Ovaj sitoliki umetak se ubacuje u posudu za gajenje ćelija i predstavlja polupropustljivu membranu kroz koju mogu prolaziti samo solubilni faktori koje ćelije oslobađaju u medijum (slika 10).



**Slika 10. Shematski prikaz postavke indirektna ćelijske kokulture [92].**

Izbor odgovarajućeg medijuma je još jedna stavka koja utiče na pravilno uspostavljanje ćelijske kokulture. Za većinu ćelijskih linija postoje dizajnirani medijumi koji omogućavaju njihovu propagaciju i održavanje [91]. Kako na prenos signala između ćelija utiču brojni faktori sredine, neophodno je odabrati odgovarajući medijum za rad sa ćelijskim kokulturama [91]. Za

većinu eksperimenta koristi se medijum za gajenje jedne ili druge ćelijske linije, a nekada se ćelije gaje u smeši odgovarajućih medijuma [91]. Medijum za gajenje sadrži komponente koje zadovoljavaju nutritivne zahteve ćelija (aminokiseline, glukozu, različite jone i vitamine), kao i faktore rasta koji utiču na ćelijsku diferencijaciju. Pored toga, često je jedna od komponenti medijuma i serum (najčešće fetalni goveđi serum (FBS)) koji sadrži faktore rasta i hormone neophodne za ćelijsko preživljavanje, rast i proliferaciju [93]. Formulisanje adekvatnog medijuma je ključno za funkcionalnost ćelijskih kokultura. Kada se zajedno gaje dve ili više ćelijskih linija izbor i priprema odgovarajućeg medijuma predstavljaju poseban izazov [93].

Iako se bukalni i imunski sistem tankog creva razlikuju, zajedničko im je da ispod sloja epitelnih ćelija sadrže podskupove različitih tolerogenih APC predisponiranih da indukuju diferencijaciju Treg i smanje uspostavljeni alergen-specifični Th2 odgovor [94]. Caco-2 epitelne ćelije su često korišćen model-sistem jer imaju karakteristike slične humanim epitelnim ćelijama tankog creva usled spontane diferencijacije iz fenotipa debelog creva do fenotipa sličnog tankom crevu [95]. Zahvaljujući ovoj osobini vrlo često se eksploatišu kao model-sistemi za praćenje efekta različitih komponenata, kao što su npr. lekovi na epitel creva [96]. THP-1 je monocitna ćelijska linija humane leukemije koja se zbog svoje sličnosti sa mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMCs) široko koristi za proučavanje funkcija monocita/makrofaga, signalnih puteva i transporta hranljivih materija i lekova [97]. Kombinacija Caco-2 i THP-1 ćelija u kokulturi omogućava oponašanje interakcija epitelnih ćelija i ćelija urođene imunosti u takom crevu. Dodatno, upotrebom humanih ćelijskih linija ovaj model favorizuje ekstrapolaciju dobijenih rezultata na humani sistem [96].

### 3. Ciljevi

Povećanje efikasnosti i bezbednosti AIT je od izuzetne važnosti kako bi se doprinelo unapređenju i usavršavanju terapije. Kombinovanjem rekombinantno proizvedenih alergena i hipoalergenih derivata sa imunomodulatornim adjuvansima koji aktiviraju urođeni imunski odgovor, a uz to i ciljano usmeravaju alergen na APC, poboljšala bi se efikasnost AIT.

Predmet rada ove doktorske disertacije je ispitivanje imunomodulatornog efekta rBLwt i njegovog mutanta rBL<sub>H84T</sub> kao stimulatora urođene imunosti za primenu u AIT na modelu rekombinantno proizvedenog glavnog alergena polena breze rBv1a. rBLwt je imunomodulatorni protein koji specifično prepoznaje oligosaharidne strukture na površini ćelija koje sadrže manozu. Imunomodulatorno dejstvo rBL ogleda se u modifikovanju imunološkog odgovora peritonealnih mišjih makrofaga usled vezivanja za oligosaharidne komponente TLR2 i CD14, kao i kroz stimulaciju proizvodnje IgG4 antitela. Ove osobine čine rBLwt potencijalnim adjuvansom za primenu u AIT. Kako bi se prevazišao problem T-ćelijske mitogenosti proizvedena je mutirana forma rBLwt, rBL<sub>H84T</sub>, gde je zamenjen histidin treoninom na poziciji 84. Ovom izmenom, smanjena je mitogenost, dok su druga svojstva ovog lektina zadržana.

U prvom delu ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- *In silico* dizajn i kloniranje rekombinantnih himera rBv1a-BLwt (Cwt) i njegovih mutanta koji se sastoje od hipoalergene izoforme alergena breze Bv11 i BL<sub>H84T</sub> (rBv11-BL<sub>H84T</sub>; C1 i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11; C2).
- Optimizacija ekspresije i prečišćavanje rekombinantnih himera
- Biohemijska i imunološka karakterizacija rekombinantnih alergena

Nakon proizvodnje i karakterizacije rekombinantnih himera, ispitaće se njihovi imunomodulatorni efekti na *in vitro* model sistemima. Radi ispitivanja imunomodulatornog efekta, u drugom delu ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- Analiza nivoa lučenja citokina nakon tretmana rezidentnih i tioglikolatom pobuđenih mišjih makrofaga
- Analiza nivoa lučenja citokina nakon tretmana diferencirane humane ćelijske linije THP-1 monocita u makrofage
- Razvoj stabilne ćelijske kokulture humanih epitelnih ćelija Caco-2 i makrofaga diferenciranih iz humane ćelijske linije THP-1 monocita (Caco-2/THP-1)
- Analiza nivoa ekspresije pro- i anti- inflamatornih citokina nakon tretmana razvijene stabilne ćelijske kokulture Caco-2/THP-1
- Analiza nivoa lučenja citokina nakon tretmana mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMCs) pacijenata alergičnih na polen breze

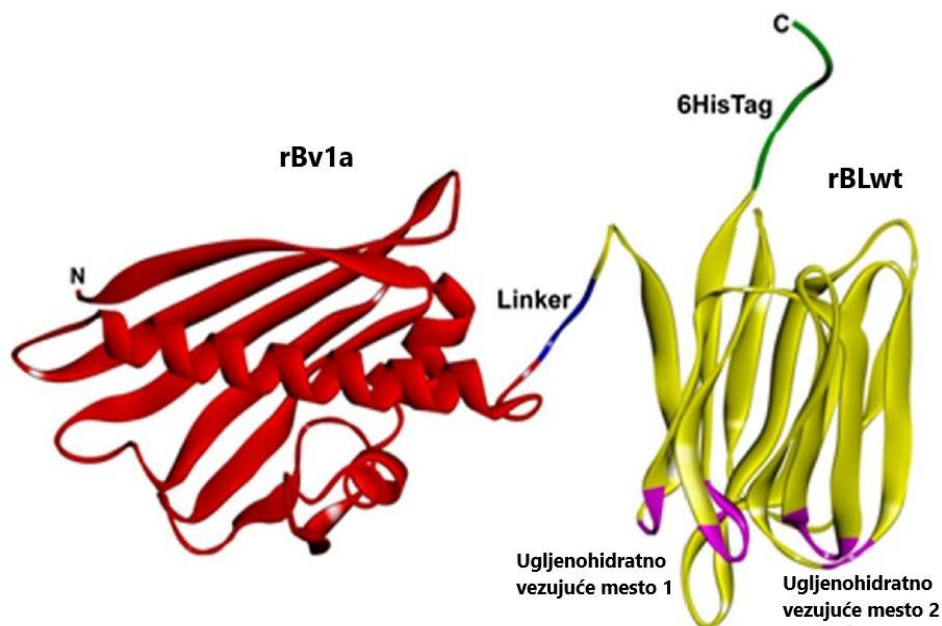
## 4. Naši radovi

### 4.1. *In silico* dizajn, kloniranje, ekspresija i prečišćavanje rBv1a-BLwt

#### 4.1.1. *In silico* dizajn rBv1a-BLwt

Molekulsko modelovanje rBv1a-BLwt (Cwt) je urađeno *in silico* a prikaz konačne strukture je napravljen u programu Discovery Studio 19.1.0 (slika 11). Optimizovana finalna struktura je bez naprezanja, potpuno minimizirana i opuštena bez ikakvih ograničenja torzionih uglova i Van der Valsovih (VdV) atomskih odbijanja. Finalna struktura Cwt se sastoji od 313 aminokiselinskih ostataka koje čine rBv1a, GPGP linker i rBLwt (slika 12).

Kratak GPGP linker efikasno povezuje rBv1a i rBLwt domene sprečavajući značajne distorzije sekundarnih i tercijarnih struktura usled jakih elektrostatičkih i VdV (hidrofilnih i hidrofobnih) interakcija. Dodatno, na slici 10 su označeni svi aminokiselinski ostaci koji učestvuju u građenju ugljenohidratnih vezivnih mesta. Između dva domena rekombinantne himere nisu uočene dodatne sterne smetnje. Teorijska molekulska masa i pI vrednost proteina su izračunate pomoću programa ExPasy ProtParm na osnovu aminokiselinske sekvence (slika 12).



Slika 11. Model struktura Cwt; crveno prikazan rBv1a, žuto rBLwt, GPGP linker prikazan plavo, dva ugljenohidratna domena prikazana ljubičasto, 6HisTag prikazan zeleno.

```

10      20      30      40      50      60
MGVFNYETET TSVIPAARLF KAFILDGDNL FPKVAPQALS SVENIEGNGG PGTIKKISFP
70      80      90      100     110     120
EGFPFKYVKD RVDEVDHTNF KYNYSVIEGG PIGDTLEKIS NEIKIVATPD GGSILKISNK
130     140     150     160     170     180
YHTKGNHEVK AEQVKASKEM GETLLRAVES YLLAHSDAYN GPGPMNGAIK VGAWGGNGGS
190     200     210     220     230     240
AFDMGPAYRI ISVKIFSGDV VDAVDVTPTY YGKTETRHFG GSGGTPHEIV LQEGEYLVGN
250     260     270     280     290     300
KGEFGNYEGV VVVGVKGFST NKKSYPGPGN TGGTTPSLPI AAGKISGPPG RGGDFIDAIG
310
VYLEPLEHHH HHH

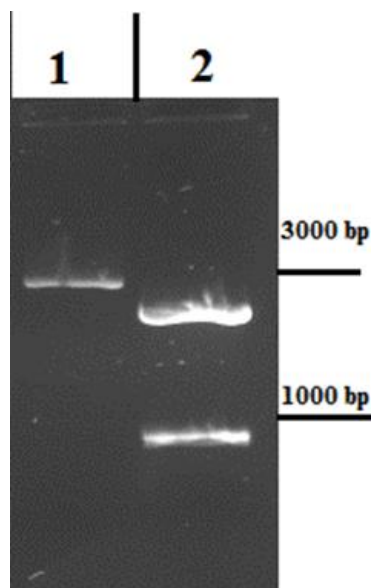
```

**Teorijska pI/MW: 6,11/ 33567,70**

Slika 12. Aminokiselinska sekvenca Cwt.

#### 4.1.2. Kloniranje rBv1a-BLwt iz pUC57 u pET23b vektor

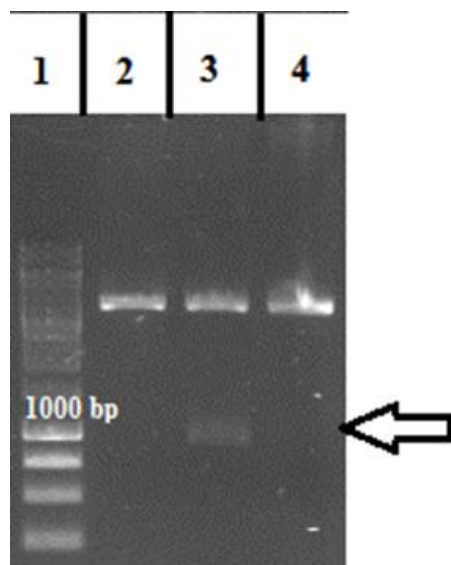
Korišćenjem proteinske baze podataka (PDB) i nukleotidne baze Nacionalnog centra za biotehnošku informaciju (NCBI) dizajnirana je kodirajuća sekvenca za Cwt upotrebom nukleotidnih sekvenci za rBv1a (Gene Bank ID AJ002110.1) i rBLwt (Gene Bank ID EU055641.1). Rezultujući konstrukt je poručen u pUC57 vektoru (pUC57-Cwt) od Synbio Technologies (New Jersey USA). pUC57-Cwt je umnožen i prečišćen iz *Escherichia coli* DH5a ćelija pomoću peqGold Plasmid Miniprep kompleta po uputstvu proizvođača. Osim pUC57-Cwt plazmida, na isti način je prečišćen i pET23b vektor. Oba vektora su isečena restrikcijom endonukleazama NdeI i XhoI nakon čega su proizvodi restrikcije analizirani u 1% agaroznom gelu (slika 13).



Slika 13. Analiza vektora 1) pET23b i 2) pUC57-Cwt nakon digestije restrikcijom endonukleazama NdeI i XhoI agaroznom elektroforezom.



Nakon digestije, iz agaroznog gela su prečišćeni pET23b vektor i Cwt gen i postavljena je reakcija ligacije. Po završetku ove reakcije, ligacionom smešom su transformisane *E. coli* DH5a ćelije koje su potom gajene na LA podlozi sa ampilicionom. Kolonije koje su porasle preko noći su zasejane u tečnu LB podlogu i gajene preko noći. Nakon ovoga, iz prekonoćne ćelijske kulture izolovani su plazmidi pomoću peqGold Plasmid Miniprep kompleta po uputstvu proizvođača. Izolovani plazmidi su digestovani restrikcionim enzimima NdeI i XhoI nakon čega su analizirani agaroznom elektroforezom (slika 14). Sa slike 14 se vidi da je iz jedne kolonije porasle nakon transformacije DH5a ćelija izolovan uspešno ukloniran gen za rekombinantnu himeru Cwt (traka 3 na gelu). Svi dalji eksperimenti su rađeni sa ovim plazmidom.



**Slika 14. Analiza kolonija poraslih nakon ligacije pET23b vektora i Cwt konstrukta agaroznom elektroforezom. 1) DNK markeri 250-10000 bp O'Gene Ruler™, (Fermentas), 2) klon 1, 3) klon 2 i 4) klon 3.**

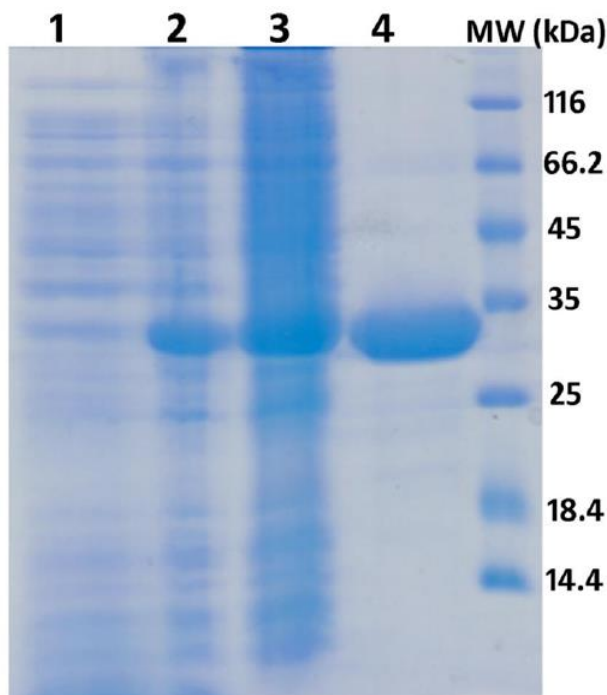
#### 4.1.3. Ekspresija i prečišćavanje rBv1a-BLwt

Proizvodnja Cwt himere rađena je u *E. coli* BL21 (DE3) Ripl ćelijama koje su gajene na selektivnom LB medijumu koji je sadržao ampicili, kanamici i hloramfenikol. Ekspresija je indukovana 1mM izopropil- $\beta$ -D-galaktopiranozidom (IPTG) i rađena je na temperaturi od 22 °C preko noći, uz mešanje na 250 rpm.

Bakterijske ćelije su lizirane ultrazvučnom sondom, kako bi se oslobodio unutraćelijski sadržaj koji sadrži eksprimirani protein. Analizom pomoću SDS PAG elektroforeze je pokazano da se rekombinantna himera Cwt eksprimira kao rastvorni protein u citosolu bakterijskih ćelija (slika 15).

Rekombinantna himera Cwt je prečišćena afinitetnom hromatografijom na Sephadex G-75 matriksu. Sephadex G-75 matriks je umreženi dekstran (razgranati  $\alpha$ -1,6 i  $\alpha$ -1,3 polimer glukoze). Vezivanje himere za ovaj matriks je, osim za prečišćavanje, značajno i kao potvrda da je u okviru Cwt himere domen rBLwt zadržao svoju lektinsku aktivnost. Prečišćeni protein je analiziran SDS PAG elektroforezom nakon čega je uočena jedna traka mase oko 33 kDa (slika 15) što odgovara teorijski preračunatoj molekularnoj masi proteina na osnovu aminokiselinske sekvence. Prinos prečišćenog proteina iznosio je 0,5 g na 1L ekspresionog

medijuma. Nakon prečišćavanja, uklonjen je endotoksin iz uzorka. Koncentracija zaostalog endotoksina je bila ispod 0,5 ng/mL.

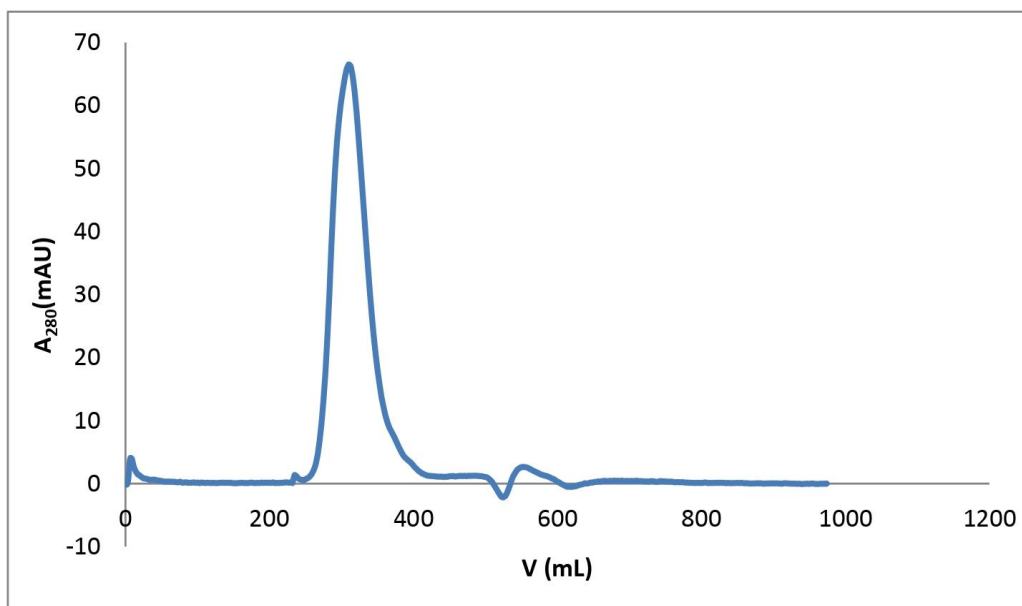


**Slika 15.** SDS PAG elektroforegram ekspresije i prečišćavanja rekombinantne himere Cwt. 1) ćelijska suspenzija pre indukovanja ekspresije, 2) ćelijska suspenzija nakon završetka ekspresije indukovane IPTGom, 3) supernatant nakon liziranja bakterijskih ćelija, 4) prečišćen protein nakon afinitente hromatografije na Sephadex G-75 matriksu, MW) nebojeni proteinski markeri masa (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

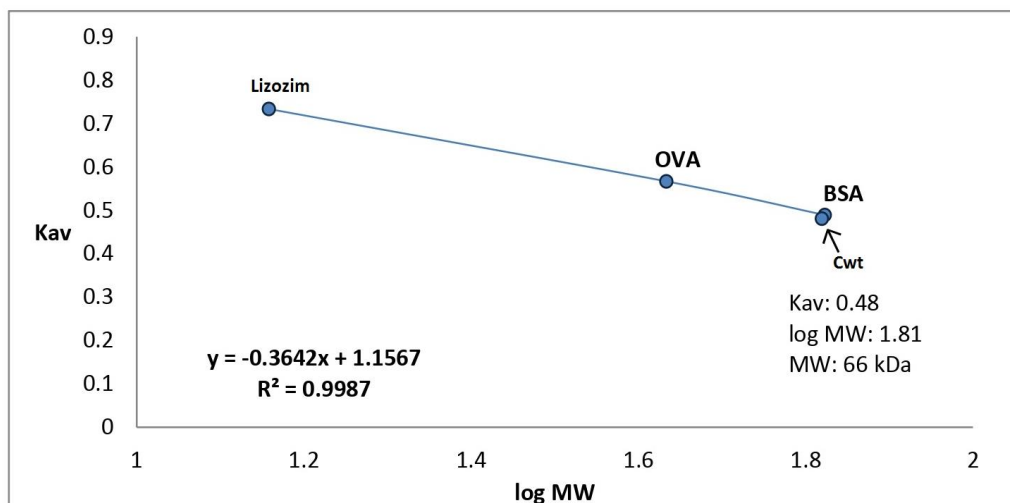
## 4.2. Karakterizacija rBv1a-BLwt

### 4.2.1. Određivanje molekulske mase rBv1a-BLwt u rastvoru

Kako je pokazano da se BLwt u rastvoru nalazi u formi homotetramera [75], gel filtracija je primenjena da bi se odredilo da li se Cwt himera u rastvoru nalazi u monomernom ili oligomernom obliku. Nakon gel filtracije izvedenoj na Superdex 75 (Pharmacia, PC 3.2/30.3.3) koloni dobijen je hromatogram koji pokazuje oštar pik (slika 16 A). Elucione zapremine standardnih proteina (goveđi serum albumin (BSA 66,5 kDa), ovalbumin (OVA 43 kDa) i lizozim (14.4 kDa)) su iskorišćene kako bi se konstruisala kalibraciona kriva (slika 16 B) za računanje molekulske mase Cwt. Preračunata masa rekombinantne himere Cwt na osnovu elucione zapremine na gel filtraciji iznosila je 67 kDa. S obzirom da je SDS PAG elektroforeza u redukujućim uslovima pokazala traku proteina na oko 33 kDa može se zaključiti da se Cwt nalazi u formi dimera u rastvoru.



A)

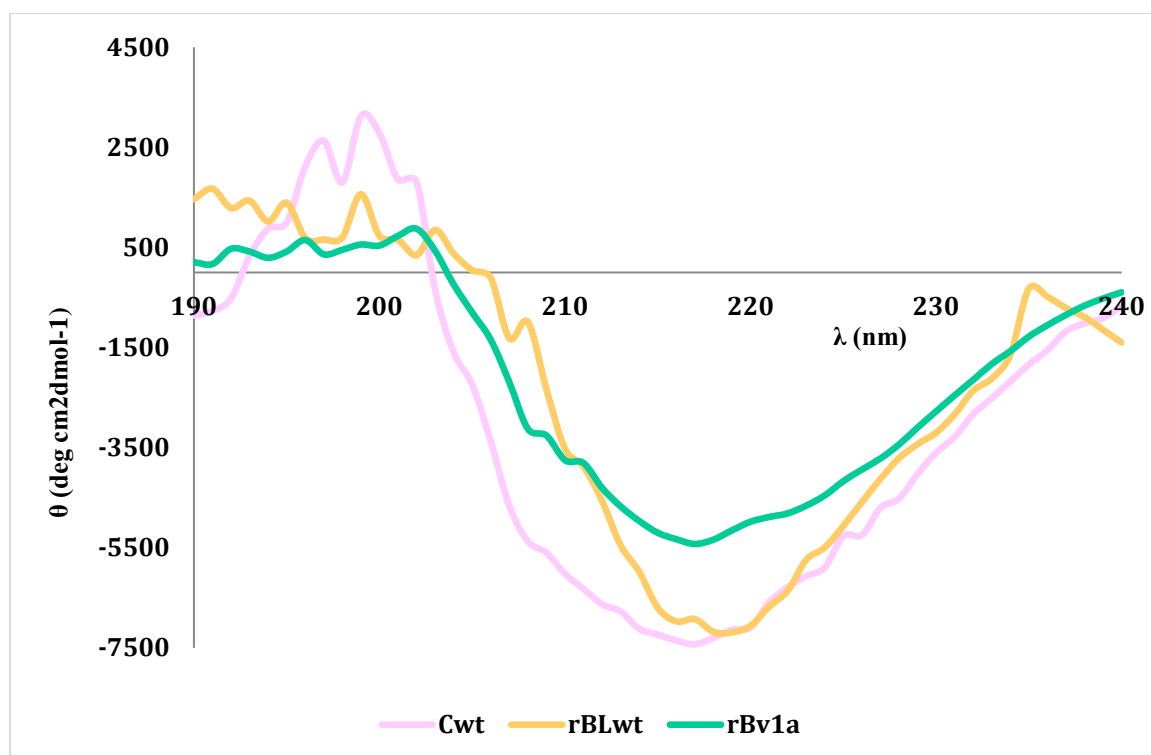


B)

**Slika 16. A) Hromatogram nakon razdvajanja Cwt gel filtracijom na Superdeks 75 PC 3.2/30.3.3 koloni; B) Standardna prava dobijena iz zavisnosti elucionih zapremina standardnih proteina (BSA, OVA i lizozim) od logaritma njihove molekulske mase.**

#### 4.2.2. CD spektroskopska analiza rBv1a-BLwt

CD spektroskopija je korišćena kako bi se odredilo prisustvo sekundarnih strukutra u prečišćenom protienu. Dobijen je spektar (slika 17), sniman u dalekoj UV oblasti, karakterističan za proteine u kojima su dominantne sekundarne strukture  $\beta$  ploče. CD spektar sadrži karakterističan minimum na 215 nm i maksimum na 197 nm. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa podacima dobijenim strukturnom analizom rBv1a i rBLwt gde je pokazano da u oba proteina dominiraju  $\beta$  ploče kao sekundarne strukture [30,74].



Slika 17. CD spektri Cwt (roze), rBLwt (žuto) i rBv1a (zeleno) snimljeni u dalekoj UV oblasti (180-260 nm).

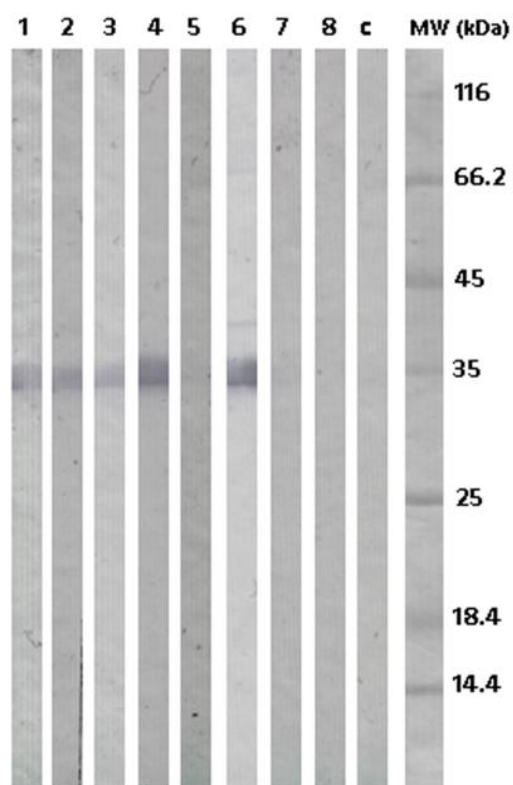
#### 4.2.3. IgE reaktivnost rBv1a-BLwt

IgE reaktivnost Cwt je testirana u imunoblotu sa serumima pacijenata alergičnih na polen breze, uzrasta 10-18 godina. Ova starosna grupa je izuzetno osetljiva na razvoj astme ukoliko se ne primeni adekvatna AIT. Karakteristike regrutovanih pacijenata su date u tabeli 5. Intezitet dobijenih traka traka koje su posledica interakcije Cwt i IgE (slika 18) u korelaciji je sa nivoom specifičnog IgE (sIgE) detektovanog u serumu kao i sa pozitivnom kontrolom rBv1a (slika 19). Iz toga se može zaključiti da pacijenti sa najvišim nivoom sIgE (pacijent 3 i 5 u tabeli 5) daju najjaču reakciju, dok pacijenti sa najnižim nivoom sIgE (pacijent 5 klasa II i pacijent 7 klasa III u tabeli 5) ne reaguju sa rekombinantnim proteinima rBv1a i Cwt.

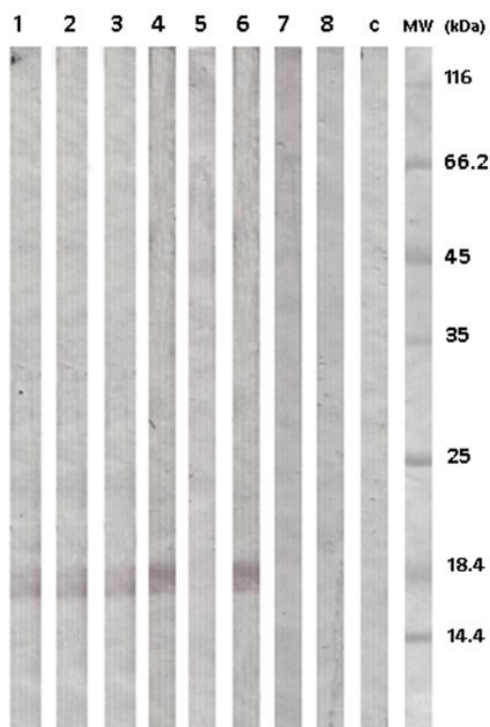
Tabela 6. Karakteristike pacijenata alergičnih na polen breze

#	Godine	Pol	Istorija alergije na polen breze	sIgE na polen breze (kU/L)	Test aplikacije ekstrakta na kožu (mm)	Simptomi
1.	18	Muški	5 godina	klasa IV (32,7)	8 × 20	Alergijski rinitis
2.	18	Ženski	6 godina	klasa IV (19,5)	5 × 28	Alergijski rinitis

3.	10	Ženski	2 godine	klasa VI (102,7)	15 × 30	Alergijski rinitis
4.	15	Ženski	5 godina	klasa IV (46,2)	10 × 20	Alergijski rinitis
5.	17	Muški	3 godine	klasa II (3,04)	3 × 15	Alergijski rinitis
6.	14	Muški	5 godina	klasa V (53,4)	10 × 25	Alergijski rinitis
7.	14	Ženski	5 godina	klasa III (13,4)	5 × 15	Alergijski rinitis
8.	27	Ženski	-	-	-	-



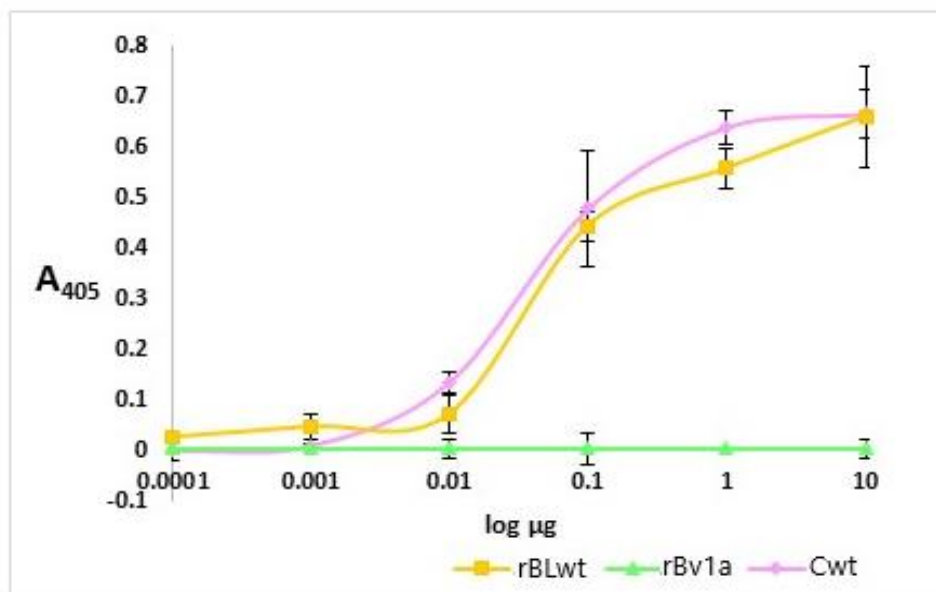
**Slika 18.** IgE reaktivnost prečišćenog Cwt; 1-7) uzorci nakon ikubacije nitrocelulozne membrane sa serumima pacijenata prikazanih u tabeli 4, 8) kontrola sa serumom nealergične osobe, MW) proteinski markeri masa (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).



**Slika 19.** IgE reaktivnost prečišćenog rBv1a; 1-7) uzorci nakon inkubacije nitrocelulozne membrane sa serumima pacijenata prikazanih u tabeli 4, 8) kontrola sa serumom nealergične osobe, MW) proteinski markeri masa (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

#### **4.2.4. Enzimski test povezan sa lektinom (ELLA)**

Kako bi se proverio ugljenohidratni afinitet Cwt urađen je ELLA test. Glikoprotein peroksidaza iz hrena (HRP) je adsorbovan za ELISA pločicu. Nakon dodavanja rastućih koncentracija Cwt, rBLwt i rBv1a, korišćena su zečija anti-BLwt antitela za detekciju vezivanja rBLwt, odnosno Cwt za HRP. Detekcija je urađena pomoću kozjih anti-zečijih antitela obeleženih alkalnom fosfatazom (ALP). Kod tretmana sa rBLwt i Cwt je uočen porast absorbance direktno proporcionalan povećanju koncentracije proteina (slika 20). Za rBv1a nisu uočene nikakve promene u absorbanciji u zavisnosti od koncentracije dodatog proteina.



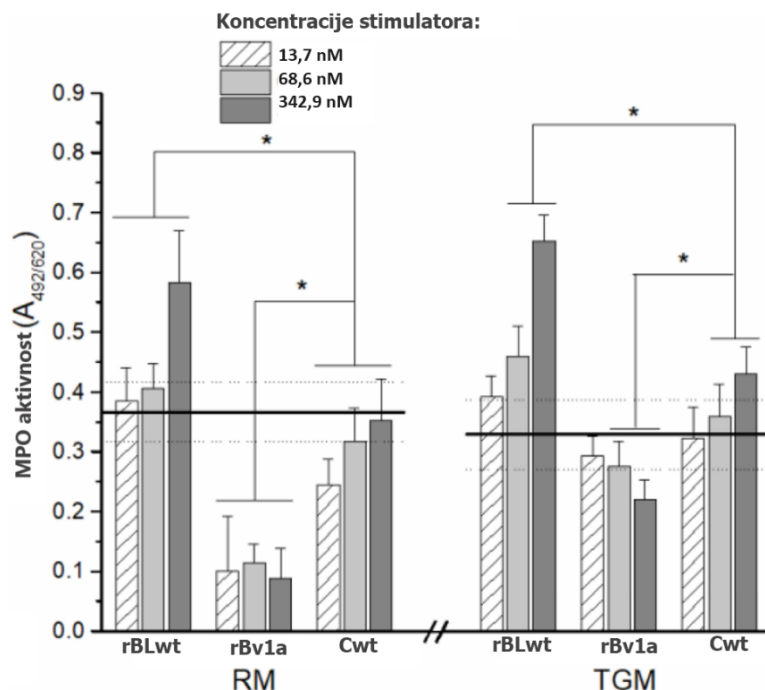
Slika 20. Vezivanje Cwt (roze), rBLwt (žuto) i rBv1a (zeleno) za HRP u ELLA testu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

### 4.3. Funkcionalni testovi: stimulacija mišijih peritonealnih makrofaga rBv1a-BLwt himerom

Funkcionalne karakteristike makrofaga mogu uticati na ishod prilikom određene stimulacije. Stimulatorni kapacitet Cwt himere je ispitan na rezidentnim (RMs) i tioglikolatom indukovanim (TGMs) peritonealnim mišijim makrofagima. RMs su korišćeni kao model makrofaga tokom homeostaze, dok su TGMs korišćeni kao model makrofaga u inflamatornom stanju. RMs i TGMs imaju različite fenotipske i funkcionalne karakteristike koje su posledica citokinskog miljea u kom se nalaze [98].

#### 4.3.1. Aktivnost mijeloperoksidaze

Analiza aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) u mišijim peritonealnim makrofagima nakon tretmana definisanim količinama Cwt pokazala je neke, ali ne statistički značajne razlike u odgovoru peritonealnih mišijih makrofaga na tretman Cwt (slika 21;  $P < 0,05$  za poređenje između RMs i TGMs stimulisanih Cwt u istoj koncentraciji). Za razliku od stimulacije sa Cwt, stimulacija sa rBLwt je pokazala potencijal da aktivira MPO u RMs na način zavisano od doze (slika 21; nestimulisani nasuprot 342,9 nM rBLwt  $P < 0,05$ ) (slika 21). Iako je zapažen porast u aktivnosti MPO nakon stimulacije TGMs Cwt himerom, bio je značajno niži u poređenju sa odgovarajućim (ista koncentracija) TGMs kulturama stimulisanim rBLwt (slika 21; Cwt nasuprot rBLwt  $P < 0,05$  za TGMs stimulisane sa 68.6 nM i 342,9 nM). Pored ovoga, Cwt je bio bolji aktivator MPO u poređenju sa rBv1a kako u RMs tako i u TGMs (slika 21). S druge strane, aktivnost MPO u svim TGMs stimulisanim kulturama Cwt himerom nije premašila aktivnost MPO u odgovarajućim (isti tip makrofaga) nestimulisanim kulturama (slika 21).

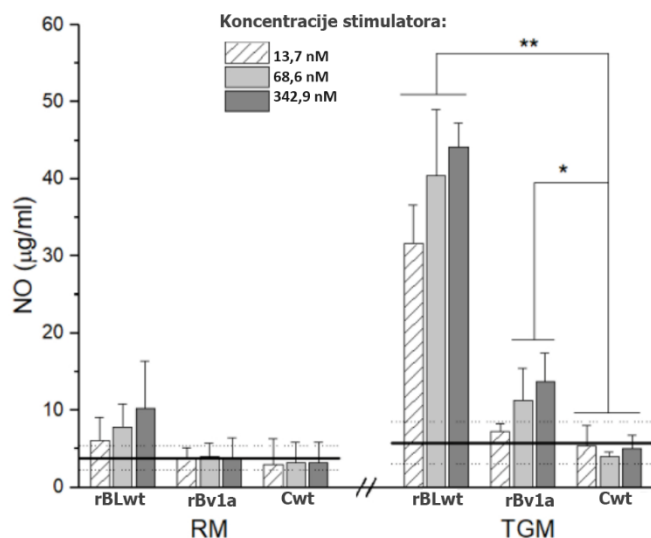


**Slika 21.** Aktivnost MPO u RMs i TGMs nakon stimulacije sa Cwt, rBLwt i rBv1a tokom 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n=5$ ). Nivo aktivnosti MPO u nestimuliranim RMs i TGMs je prikazan crnom horizontalnom linijom (srednja vrednost) i isprekidanim linijama ( $\pm$  standardna devijacija). Statistički značaj promena nakon stimulacije određen je one-way ANOVA metodom praćenom Bonferonijevim testom višestrukih poređenja (\*  $P<0,05$ , \*\* $P<0,005$ ). Na slici su prikazani rezultati poređenja odgovarajućih (isti tip makrofaga) rBLwt (referentni) i Cwt stimuliranih makrofaga.

#### 4.3.2. Proizvodnja NO

Proizvodnja NO je korišćena kao indikacija aktivnosti azot-oksid sitnaze (NOS). Nakon 48h stimulacije RMs i TGMs himerom Cwt u definisanim koncentracijama nije došlo do porasta u nivou NO (slika 22). Statistički značajne razlike nije bilo ni u poređenju između RMs i TGMs stimuliranih makrofaga istom koncentracijom Cwt himere (slika 22). S druge strane, TGMs stimulirani rBLwt i rBv1a su izazvali statistički značajno oslobađanje NO u poređenju sa Cwt stimuliranim TGMs u istoj koncentraciji (slika 22).



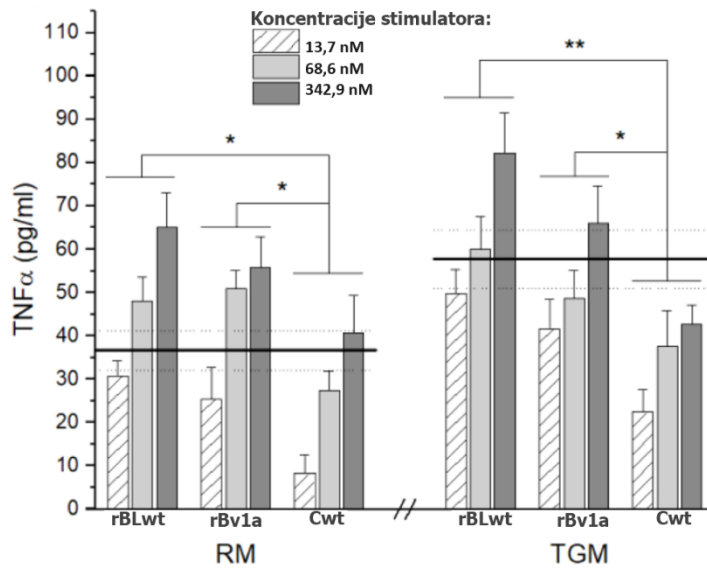


**Slika 22. Proizvodnja NO u RMs i TGMs nakon stimulacije sa Cwt, rBLwt i rBv1a tokom 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=5). Nivo aktivnosti MPO u nestimulisanim RMs i TGMs je prikazan crnom horizontalnom linijom (srednja vrednost) i isprekidanim linijama ( $\pm$  standardna devijacija). Statistički značaj promena nakon stimulacije određen je one-way ANOVA metodom praćenom Bonferonijevim testom višestrukih poređenja (\*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ ). Na slici su prikazani rezultati poređenja odgovarajućih (isti tip makrofaga) rBLwt (referentni) i Cwt stimuliranih makrofaga.**

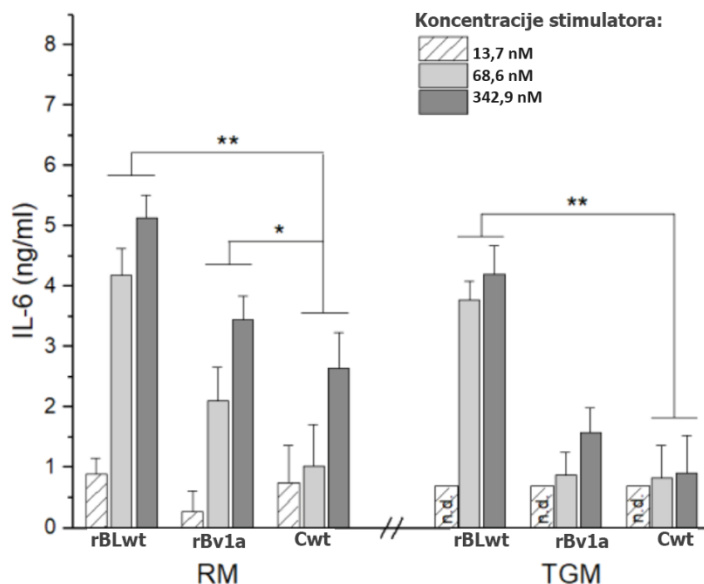
#### 4.3.3. Obrazac lučenja pro- i anti- inflamatornih citokina

Peritonealni mišji makrofagi su korišćeni kao model-sistem za evaluaciju uticaja Cwt na proizvodnju pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 i anti-inflamatornog citokina IL-10. Među testiranim antigenima rBLwt je bio najbolji stimulator sekrecije TNF- $\alpha$  i IL-6. Direktno proporcionalan porast u lučenju TNF- $\alpha$  i IL-6 u odnosu na koncentraciju dodatog rBLwt je zapažen nakon stimulacije RMs (slika 23; TNF- $\alpha$ : nestimulisani naspram 342,9 nM rBLwt stimulirani  $P < 0,005$ , IL-6: proizvodnja u nestimulisanim kulturama je bila ispod granice detekcije) i TGMs (TNF- $\alpha$ : nestimulisani naspram 342,9 nM rBLwt  $P < 0,05$ , IL-6: proizvodnja u nestimulisanim kulturama je bila ispod granice detekcije). Stimulacija sa 68,6 nM i 342,9 nM rBv1a je izazvala lučenje pro-inflamatornih citokina u RMs (slika 23; TNF- $\alpha$ : nestimulisani naspram 342,9 nM rBv1a  $P < 0,005$ ) i TGMs (slika 23; TNF- $\alpha$ : nestimulisani naspram 342,9 nM rBv1a  $P < 0,05$ ). U poređenju sa rBLwt i rBv1a, Cwt je bio značajno slabiji promotor lučenja pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 (slika 23 i 24) u oba tipa tretiranih makrofaga. Dodatno, poređenjem sa nestimulisanim kulturama uočeno je da Cwt ne izaziva statistički značajno lučenje ova dva pro-inflamatorna citokina.

Svi testirani stimulatori u definisanim količinama su izazvali lučenje anti-inflamatornog citokina IL-10 u oba tipa makrofaga (slika 25). Proizvodnja IL-10 nakon stimulacije Cwt je značajno premašila proizvodnju IL-10 u odgovarajućim kulturama (isti tip makrofaga) tretiranim sa rBv1a u istoj koncentraciji (slika 25; u svim slučajevima  $P < 0,05$ ). Koncentracija sekretovanog IL-10 nakon stimulacije oba tipa makrofaga Cwt himerom je bila uporediva sa oslobođenom koncentracijom IL-10 nakon stimulacije rBLwt (slika 25).

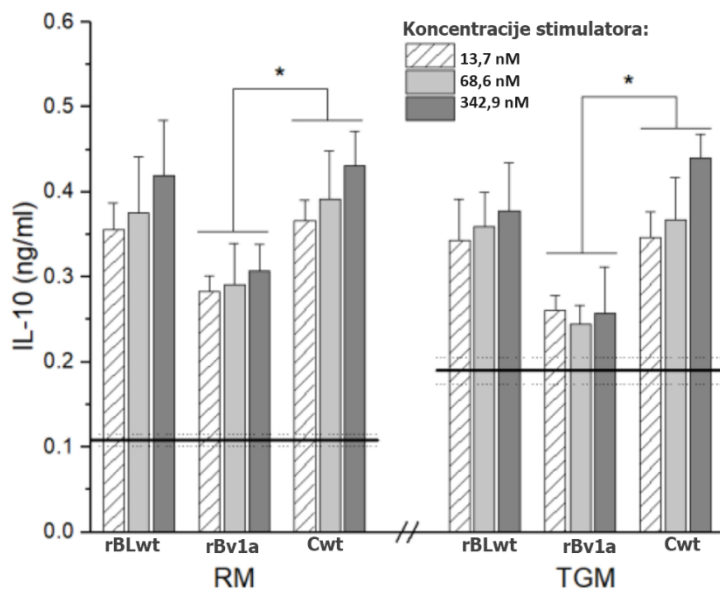


Slika 23. Sekrecija TNF $\alpha$  nakon tretmana RMs i TGMs sa rBLwt, rBv1a i Cwt tokom 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=5). Nivo sekretovanog TNF $\alpha$  u nestimulisanim RMs i TGMs je prikazan crnom horizontalnom linijom (srednja vrednost) i isprekidanim linijama ( $\pm$  standardna devijacija). Statistički značaj promena nakon stimulacije određen je one-way ANOVA metodom praćenom Bonferonijevim testom višestrukih poređenja (\* P<0,05, \*\*P<0,005). Na slici su prikazani rezultati poređenja odgovarajućih (isti tip makrofaga) rBLwt (referentni) i Cwt stimuliranih makrofaga.



Slika 24. Sekrecija IL-6 nakon tretmana RMs i TGMs sa rBLwt, rBv1a i Cwt tokom 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (n=5). Nivo sekretovanog IL-6 u nestimulisanim RMs i TGMs je prikazan crnom horizontalnom linijom (srednja vrednost) i isprekidanim linijama ( $\pm$  standardna devijacija). Statistički

značaj promena nakon stimulacije određen je one-way ANOVA metodom praćenom Bonferonijevim testom višestrukih poređenja (\*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ ). Na slici su prikazani rezultati poređenja odgovarajućih (isti tip makrofaga) rBLwt (referentni) i Cwt stimuliranih makrofaga.



Slika 25. Sekretija IL-10 nakon tretmana RMs i TGMs sa rBLwt, rBv1a i Cwt tokom 48h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija ( $n=5$ ). Nivo sekretovanog IL-10 u nestimuliranim RMs i TGMs je prikazan crnom horizontalnom linijom (srednja vrednost) i isprekidanim linijama ( $\pm$  standardna devijacija). Statistički značaj promena nakon stimulacije određen je one-way ANOVA metodom praćenom Bonferonijevim testom višestrukih poređenja (\*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ ). Na slici su prikazani rezultati poređenja odgovarajućih (isti tip makrofaga) rBLwt (referentni) i Cwt stimuliranih makrofaga.

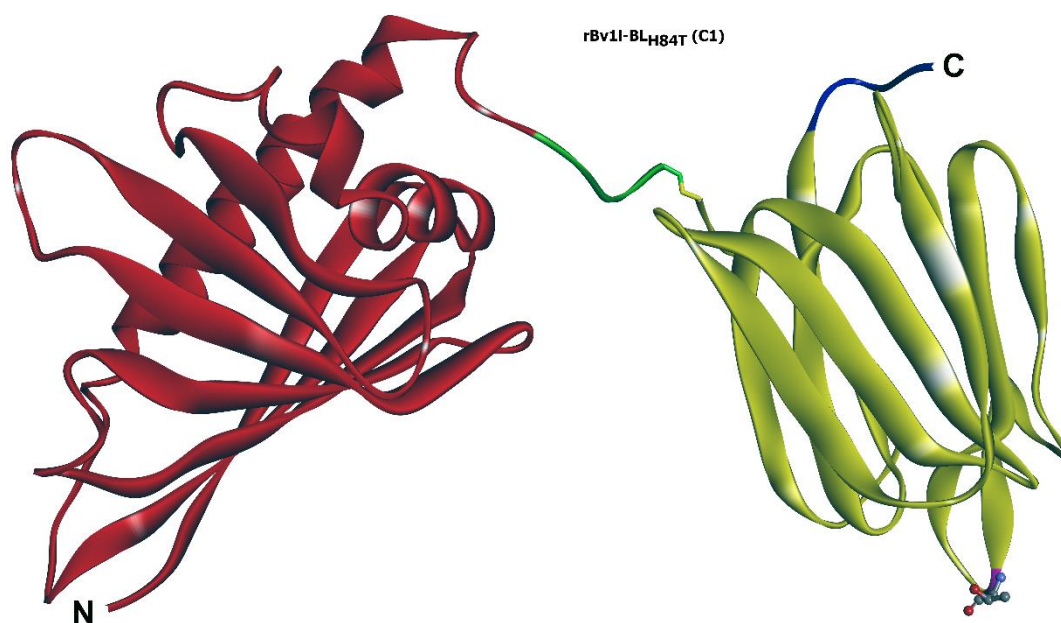
#### 4.4. *In silico* dizajn, kloniranje, ekspresija i prečišćavanje rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11

Prethodno dobijeni rezultati nakon stimulacije mišijih peritonealnih makrofaga su ukazali da je rekombinantna himera Cwt zadržala osobinu rBLwt da stimuliše lučenje anti-inflamatornog IL-10 citokina dok je lučenje pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 bilo značajno manje u poređenju sa makrofagima tretiranim rBLwt. Zbog obećavajućih rezultata odlučeno je da se nastavi sa ispitivanjem na humanim ćelijskim linijama kao i da se u istraživanje uvedu dve nove himere sačinjene od hipoalergene izoforme Bet v 1 (rBv11) i mutanta lektina banana (BL<sub>H84T</sub>). Ove himere su označene kao rBv11-BL<sub>H84T</sub> (C1) i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 (C2).

##### 4.4.1. *In silico* dizajn rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11

Rekombinantni konstrukti rBv11-BL<sub>H84T</sub> (C1) i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 (C2) su dizajnirani *in silico* kombinovanjem naprednih tehnika modelovanja i molekularne mehanike za generisanje atomskih koordinata i strukturnu optimizaciju dva himerna biomolekula. Ovo je postignuto korišćenjem kristalnih struktura rBL<sub>H84T</sub> i izoforme rBv11 i poboljšanjem dizajna himernog

modela korišćenjem naprednih alata za molekularno modelovanje i tehnika postepene minimizacije energije. Rezultujuće strukture C1 i C2 su prikazane na slikama 26 i 28, respektivno. Dobijene strukture su potpuno minimizovane i opuštene bez Van der Valsovih atomskih odbijanja. Moguće tenzije između veza, uglova i torzionih uglova su u potpunosti zanemarljive. Obe strukture se sastoje od 313 aminokiselinskih ostataka koje grade rBv11–(GP)<sub>3</sub>-linker–rBL<sub>H84T</sub>–6His tag u himeri C1 i rBL<sub>H84T</sub>–(GP)<sub>3</sub>-linker–rBv11 u himeri C2. Aminokiselinske sekvence su prikazane na slikama 27 i 29 respektivno. Na slici 28 prikazana su i ugljenohidratna vezivna mesta koja se nalaze u okviru rBL<sub>H84T</sub> domena himere C2. Ova dva vezivna mesta su lokalizovana u okviru petlji. Vezivna mesta su identična u himerama C1 i C2 kao i u rBL<sub>H84T</sub> proteinu što se vidi iz aminokiselinskih sekvenci proteina. Vezivno mesto 1 u rBL<sub>H84T</sub> proteinu se sastoji od GG petlje (14-15), GDFID petlje (129–133) uz dodatne S16, T84, A86, i V88 ostatke. Slično njemu, vezivno mesto 2 se sastoji od GG petlje (59–60) i GDVVD petlje (34–38) sa dodatnim T61, Y83 i F131 ostacima koji interaguju sa vezanim glikanima ili prave zid vezivnog džepa. U poređenju sa BLwt, ostaci T84 i Y83 su uključeni u vezivanje glikana u rBL<sub>H84T</sub>. Ovi ostaci formiraju  $\pi$ - $\pi$  *stacking* interakcije (slika 30) koje izostaju kod rBL<sub>H84T</sub> mutanta. Kao rezultat, petlja između ostatka na pozicijama 82-88 u okviru koje se nalaze Y83/T84 je destabilizovana kod rBL<sub>H84T</sub> mutanta što za rezultat ima smanjenu mitogenost, ali i konformacione promene koje utiču na strukturu zida vezivnog džepa za glikane, što dovodi do slabljenja interakcija između receptora i liganda. Koristeći online dostupan program ExPasy ProtParam na osnovu aminokiselinskih sekvenci proteina C1 (slika 27), odnosno C2 (slika 29) izračunate su teorijske pI vrednosti i molekulske mase.



Slika 26. Model himere C1; rBv11 (crveno) (GP)<sub>3</sub>-linker (zeleno), rBL<sub>H84T</sub>–(žuto) i 6His tag (plavo).

```

10      20      30      40      50      60
MGVFNYETEA TSVIPAARMF KAFILDGDKL VPKVAPQAIS SVENIEGNGG PGTIKKINFP

70      80      90      100     110     120
EGFPFKYVKD RVDEVDHTNF KYNYSVIEGG PVGDTLEKIS NEIKIVATPD GGCVLKISNK

130     140     150     160     170     180
YHTKGNHEVK AEQVKASKEM GETLLRAVES YLLAHSDAYN GPGPGPMNGA IKVGAWGGNG

190     200     210     220     230     240
GSAFDMGPAY RIISVKIFSG DVVDAVDVTF TYYGKTETRH FGGSGGTPHE IVLQEGEYLV

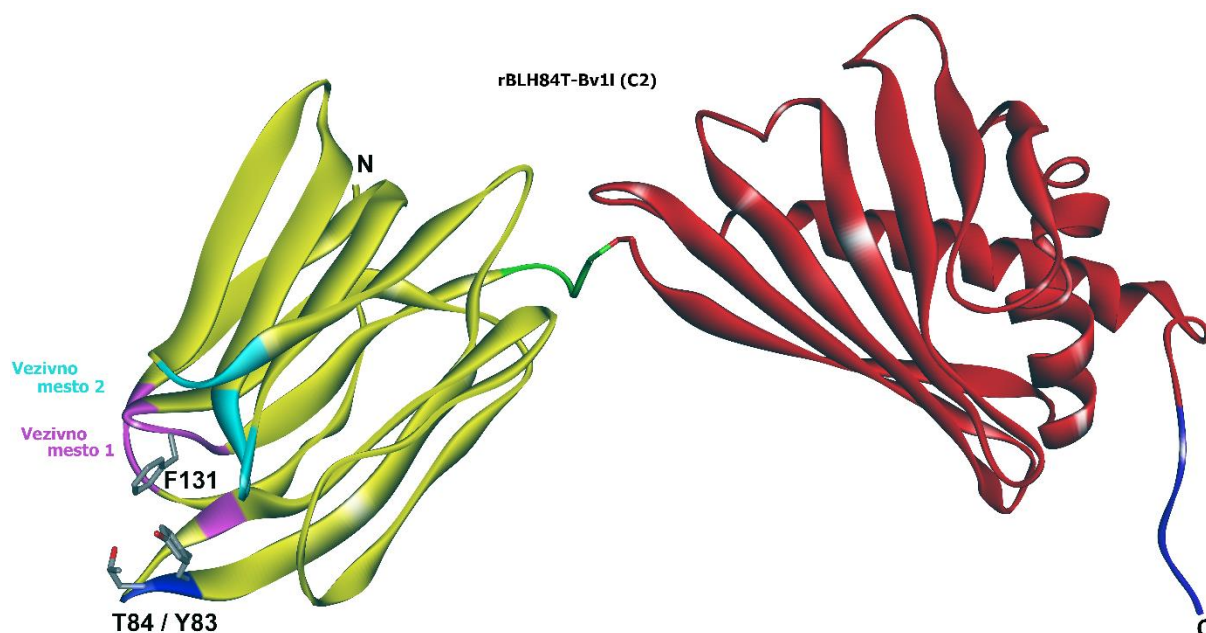
250     260     270     280     290     300
GNKGEFGNYT GVVVVGKVGF STNKKSYGPF GNTGGTTFSL PIAAGKISGF FGRGGDFIDA

310
IGVYLEPHHH HHH

```

### Teorijska pI/Mw: 6,31/33412,62

Slika 27. Aminokiselinska sekvenca dizajnirane himere C1. rBv11 (crveno) (GP)<sub>3</sub>-linker (zeleno), rBL<sub>H84T</sub>–(žuto) i 6His tag (plavo). Aminokiselinske sekvence koje učestvuju u građenju vezivnog mesta 1 roze, vezivnog mesta 2 tirkizno, Tyr83/Thr84 plavo. Na slici su prikazane i teorijske vrednosti molekulske mase i pI.



Slika 28 Model himere C2; rBv11 (crveno) (GP)<sub>3</sub>-linker (zeleno), rBL<sub>H84T</sub>–(žuto) i 6His tag (plavo). Na slici je u okviru domena rBL<sub>H84T</sub> prikazana ugljenohidratna vezivna mesta tirkizno i ljubičasto, kritična mutacija H84T plavo, a ostatak F131 štapićasto.



```

10      20      30      40      50      60
MNGAIKVGAW GNGGSAFDM GPAYRIISVK IFSGDVVDAV DVTFTYYGKT ETRHFGGSGG

70      80      90      100     110     120
TPHEIVLQEG EYLVGNKGEF GNYTGVVVG KVGSTNKKS YGPFNGTGGT TFSLPAAAGK

130     140     150     160     170     180
ISGFFGRGGD FIDAIGVYLE PGPGGPMGV FNYETEATSV IPAARMFKAF ILDGDKLVPK

190     200     210     220     230     240
VAPQAISSEV NIEGNGGPGT IKKINFPEGF PFKYVKDRVD EVDHTNFKYN YSVIEGGPVG

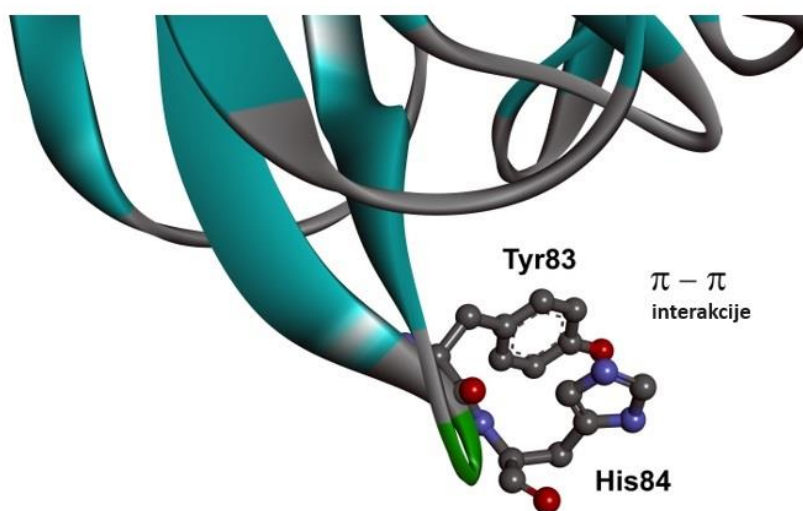
250     260     270     280     290     300
DTLEKISNEI KIVATPDGGC VLKISNKYHT KGNHEVKAEQ VKASKEMGET LLRAVESYLL

310
AHSDAYNHHH HHH

```

### Teorijska pI/Mw: 6,31/33412,62

Slika 29. Aminokiselinska sekvenca dizajnirane himere C1. rBv1l (crveno) (GP)<sub>3</sub>-linker (zeleno), rBL<sub>H84T</sub>–(žuto) i 6His tag (plavo). Aminokiselinske sekvence koje učestvuju u građenju vezivnog mesta 1 roze, vezivnog mesta 2 tirkizno, Tyr83/Thr84 plavo. Na slici su prikazane i teorijske vrednosti molekulske mase i pI.



Slika 30. Stabilizujuće  $\pi$ - $\pi$  interakcije Tyr 83...His84 u BLwt.

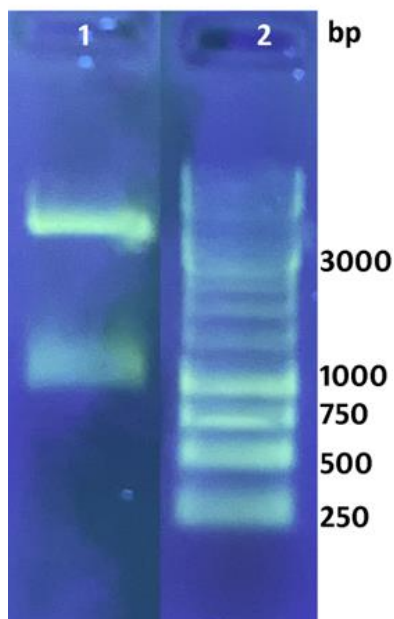
#### 4.4.2. Kloniranje rBv1l-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv1l rekombinantnih proteina

Korišćenjem nukleotidne baze Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) dizajnirane su kodirajuće sekvence za C1 i C2 upotrebom nukleotidnih sekvenci za rBv1l (Gene Bank ID AJ006906.1) i rBL<sub>H84T</sub>. Rezultujući konstrukti u pUC57 vektoru (pUC57-C1, odnosno pUC57-C2) su umnoženi i prečišćeni i analizirani po prethodno opisanom postupku u 4.1.2. Nakon analize duple digestije na preparativnoj agaroznoj elektroforezi, iz gela su isečene trake digestovanog pET23b plasmida, kao i gena za C1

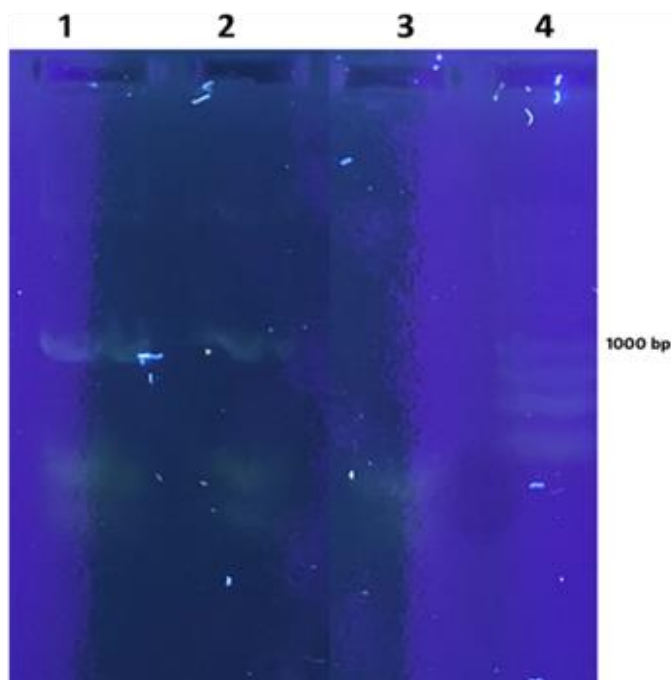
odnosno za C2. Kako bi se sprečila samoligacija praznog plazmida urađena je defosforilacija pomoću alkalne fosfataze. Po završetku defosforilacije, urađena je ligacija pET23b plazmida i gena za C1 odnosno za C2. Ligacionim smešama su transformisane *E. coli* DH5a ćelije koje su potom gajene na LA podlozi sa ampicilinom. Nakon transformacije ligacionom smešom za himeru C1 porasla je samo jedna kolonija na ampicilinskoj ploči, dok je na ampicilinskoj ploči na kojoj su zasejane transformisane ćelije ligacionom smešom C2 poraslo tri kolonije.

Kolonija koja je porasla nakon kloniranja C1 gena je zasejana u tečnu LB podlogu i gajena preko noći. Nakon ovoga iz prekonocne ćelijske kulture izolovan je plazmid pomoću kompleta za prečišćavanje plazmida Thermo Scientific MiniPrep Purification po uputstvu proizvođača. Izolovan plazmid nakon kloniranja gena za C1 himeru je analiziran duplom digestijom restrikcionim enzimima NdeI i XhoI nakon čega je urađena analiza elektroforezom na 1% agaroznom gelu (slika 31). Sa slike 31 se vidi da je iz jedine kolonije porasle nakon transformacije *E. coli* DH5a ćelija izolovan uspešno ukloniran gen za rekombinantnu himeru C1.

Porasle kolonije nakon ligacije vektora i C2 gena su analizirane lančanom reakcijom polimeraze (PCR) pomoću specifičnih prajmera za C2 gen. Dobijeni proizvodi su analizirani elektroforezom na 1% agaroznom gelu (slika 32). Sa slike 32 se vidi da je do uspešnog kloniranja došlo u dve od tri kolonije porasle nakon transformacije ligacionom smešom C2 (trake 1 i 2 na slici 32). Pozitivne kolonije su zasejane u tečnu LB podlogu preko noći i iz njih su izolovani plazmidi pomoću kompleta za prečišćavanje plazmida Thermo Scientific GeneJET PCR Purification po uputstvu proizvođača. Svi dalji eksperimenti su rađeni sa ovim plazmidima.



Slika 31. Analiza izolovanog plazmida na 2% agaroznom gelu nakon duple digestije sa NdeI i XhoI restrikcionim endonukleazama kloniranog gena za himeru C1; 1) analiza klona 1, 2) DNK markeri 250-10000 bp O'Gene Ruler™, (Fermentas).

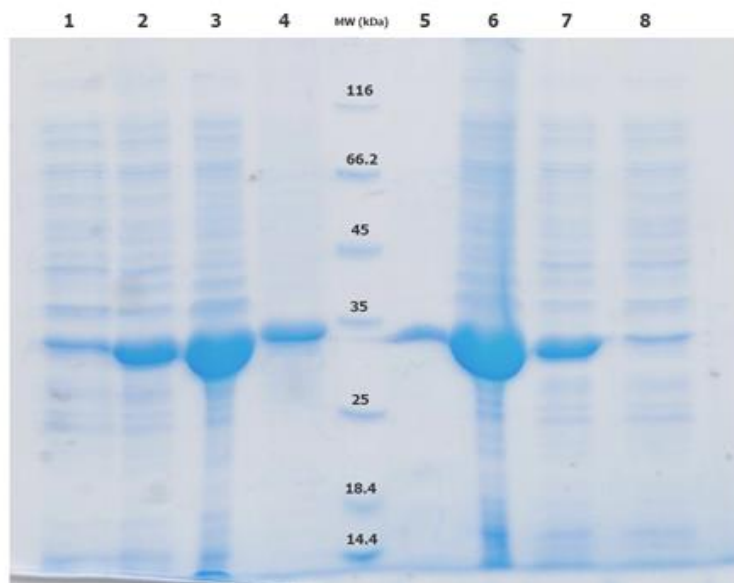


Slika 32. Analiza izolovanog plazmida na 2% agaroznom gelu nakon duple digestije sa NdeI i XhoI restrikcionim endonukleazama kloniranog gena za himeru C2; 1) klon 1, 2) klon 2, 3) klon 3, 4) DNK markeri 250-10000 bp O'Gene Ruler™, (Fermentas).

#### 4.4.3. Ekspresija i prečišćavanje *rBvII-BL<sub>H84T</sub>* i *rBL<sub>H84T</sub>-BvII*

Rekombinantni konstrukti su ekspimirani u *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3)-Ripl ćelijama nakon indukcije IPTG-om. Oba proteina su ekspimirana kao agregati u formi inkluzionih tela. Nakon ispiranja i rastvaranja inkluzionih tela u rastvoru 6M uree proteini su prečišćeni afinitetnom hromatografijom sa imobilisanim metalom (IMAC). Po završenom prečišćavanju, proteini su renaturisani u puferu koji je sadžao 20% glicerol. Jedna traka za svaki konstrukt je uočena na SDS-PAG elektroforezi, na masi oko 34 kDa (slika 33). Prinos prečišćenih proteina je bio 0,3 i 0,2 mg na 1L ekspresionog medijuma. Nakon prečišćavanja, uklonjen je endotoksin iz uzoraka. Koncentracija zaostalog endotoksina je bila ispod 0,5 ng/mL.





**Slika 33.** SDS-PAGE analiza rekombinantnih himera C1 i C2. 1,8) ćelijske suspenzije pre indukovanja ekspresije, 2,7) ćelijske suspenzije nakon završetka ekspresije indukovane IPTGom, 3,6) talozi nakon liziranja bakterijskih ćelija, 4,5) prečišćeni proteini C1 i C2, respektivno nakon IMAC i renaturacije naspram pufera sa glicerolom, MW) markeri proteinski masa (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

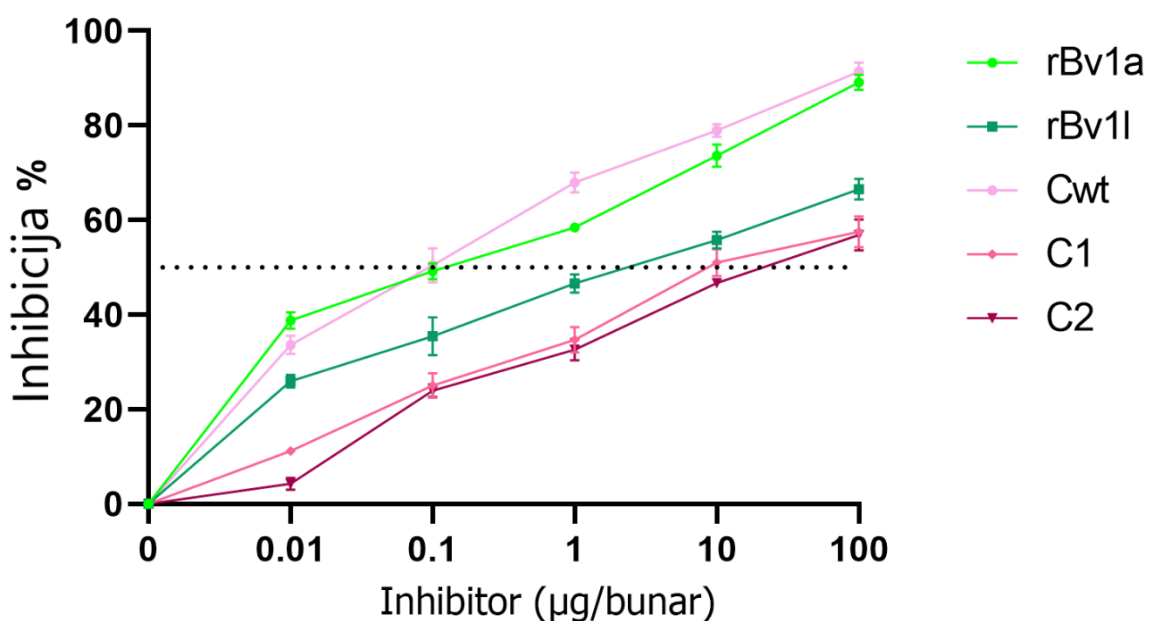
#### 4.5. Određivanje kapaciteta vezivanja IgE antitela za himere rBv1a-BLwt, rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11

ELISA inhibicija je korišćena kako bi se odredio kapacitet vezivanja IgE antitela za rBv1a, rBv11, Cwt, C1 i C2. Izvor IgE antitela su bili serumi pacijenata alergičnih na polen breze (karakteristike pacijenata su prikazane u tabeli 6). IgE vezivanje za rBv1a je inhibirano pomoću rBv1a i rBv11 u rastućim koncentracijama, dok je IgE vezivanje za Cwt inhibirano pomoću Cwt, C1 i C2 u rastućim koncentracijama (slika 34). IC<sub>50</sub> vrednosti za rBv1a i Cwt su bile uporedive (0,1 µg proteina), dok su IC<sub>50</sub> vrednosti za rBv11, C1 i C2 bile više (1 µg, 10 µg i 50 µg proteina, respektivno).

**Tabela 7.** Klinički fenotip ispitanika koji su učestvovali u istraživanju

#	Pol	sIgE (kU/mL) na polen breze	Simptomi
1.	Ženski	Klasa V (76,2)	Alergijski rinitis Dermatitis Laringitis
2.	Ženski	Klasa III (5,69)	Alergijski rinitis
3.	Ženski	Klasa III (15,3)	Alergijski rinitis Dermatitis Uvećan četvrti krajnik

4.	Muški	Klasa III (8,9)	Alergijski rinitis Voće-polen sindrom Pruritis
5.	Muški	Klasa V (80,4)	Alergijski rinitis
6.	Muški	Klasa IV (25,8)	Alergijski rinitis Konjuktivis Uvećan treći krajnik
7.	Ženski	Klasa IV (44,3)	Alergijski rinitis
8.	Muški	Klasa VI (105,2)	Alergijski rinitis Voće polen sindrom
9.	Muški	Klasa VI (101,0)	Alergijski rinitis Dermatitis Pruritus
10.	Ženski	Klasa III (10,9)	Alergijski rinitis
11.	Muški	Klasa IV (48,1)	Alergijski rinitis Pruritus
12.	Ženski	Klasa 0 (<0,1)	Nije bilo simptoma alergije



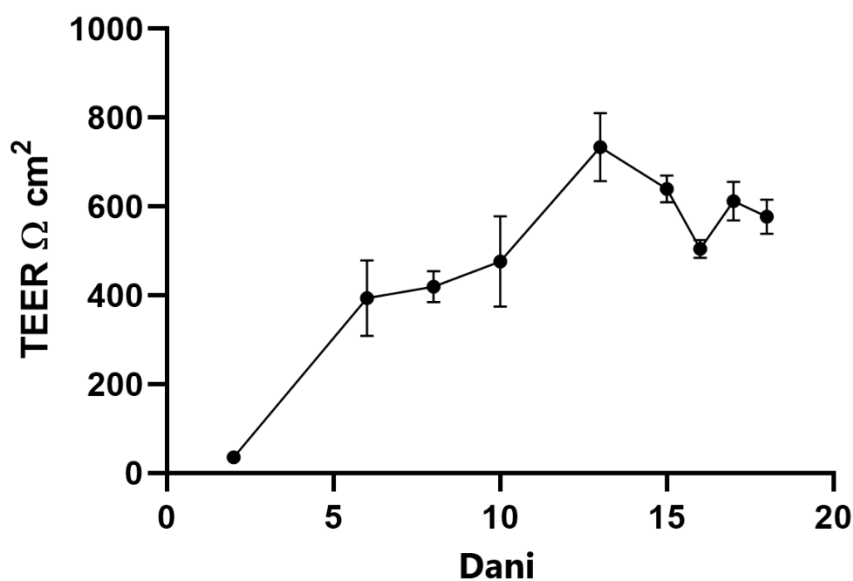
Slika 34. ELISA inhibicija sa pulom seruma (razblaženim 10 puta) alergičnih pacijenata na polen breze. Serum zdrave osobe (12 u tabeli 6) je korišćen kao negativna kontrola.

#### 4.6. Ispitivanje imunomodulatornog efekta rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 u kokulturi Caco-2/THP-1 makrofaga

Bukalno i intestinalno tkivo imaju sličnu organizaciju - sloj epitelnih ćelija ispod kojih se nalaze tolerogene dendritske ćelije i makrofagi [94]. Stoga je u ovoj doktorskoj disertaciji razvijena kokultura Caco-2 epitelnih ćelija i THP-1 diferenciranih makrofaga. Uspostavljena je stabilna ćelijska kokultura da bi se ispitaio međusobni uticaj ovih ćelijskih linija nakon tretmana antigenima.

##### 4.6.1. Razvoj kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi i tretman antigenima

Caco-2 ćelije su zasejne sa apikalne strane polupropustljivog (porozna membrana 0,4  $\mu\text{m}$ ) migracionog umetka za bunare. Trans-epitelna električna otpornost (TEER) je merena tokom 18 dana na svaka 2-3 dana kako bi se pratio rast Caco-2 ćelija (slika 35). Caco-2 ćelije su maksimum TEER-a dostigle između 12. i 15. dana (slika 35). Za razvoj kokulture korišćene su epitelne ćelije sa TEER > 400  $\Omega\text{cm}^2$ . Pad u TEER-u se uočava 16. dana (slika 35) je posledica promene medijuma sa bazolateralne strane na 70% RPMI (tabela 7).



Slika 35. Praćenje vrednosti TEER-a tokom gajenja Caco-2 ćelija na polupropustljivim migracionim umetcima za bunare.

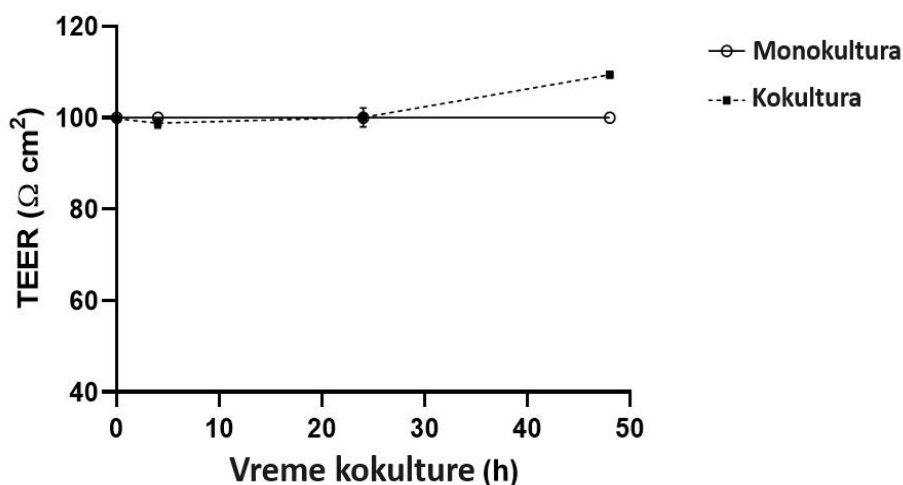
Tabela 8. Sastav medijuma sa bazolateralne strane tokom 18 dana Caco-2 kulture.

Dan gajenja kulture	Caco-2 medijum (%)	THP medijum (%)
2	100	0

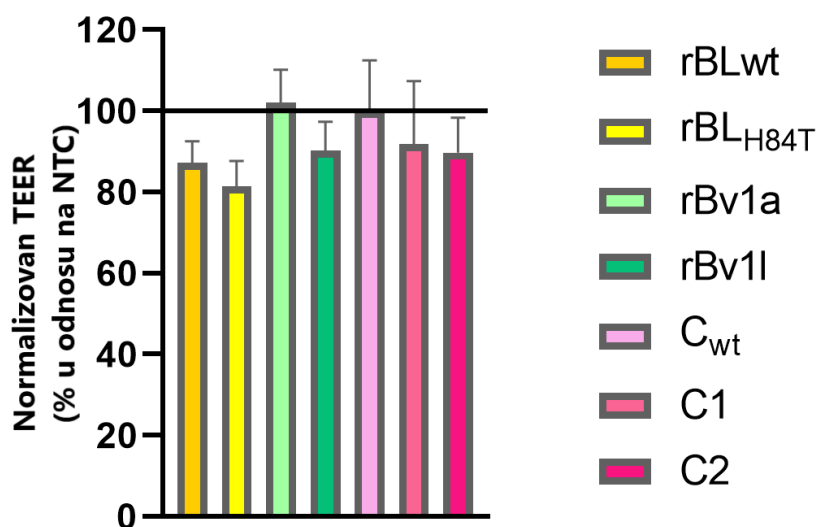
6	100	0
8	70	30
10	70	30
13	50	50
15	50	50
16	30	70
17	30	70
18	0	100

Kako bi se inicirala kokultura, 18 dana stare Caco-2 ćelije gajene na polupropustljivim migracionim umetcima za bunare, čiji je TEER  $> 400 \Omega\text{cm}^2$ , su prebačene na prethodno diferencirane THP-1 makrofage pomoću forbol-12-miristat12-acetat (PMA). TEER je meren nakon 4 h, 24 h i 48 h od uspostavljanja kokulture kako bi se pratio uticaj makrofaga na Caco-2 ćelije (slika 36). TEER je privremeno opao  $< 5\%$  u poređenju sa monokulturom (slika 36). Ovaj pad je najverovatnije posledica promene u spoljašnjem okruženju Caco-2 epitelnih ćelija. Nakon 24h došlo je do stabilizacije TEER-a (slika 36).

Nakon 48h od formiranja kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi, sa apikalne strane su primenjeni antigeni tokom 24h. TEER je izmeren po završetku tretmana i vrednosti su bile u opsegu između 84-100% u poređenju sa netretiranom kokulturom (slika 37).



Slika 36. Praćenje integriteta Caco-2 monosloja toko 48h od uspostavljanja kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi merenj m TEER vrednosti.

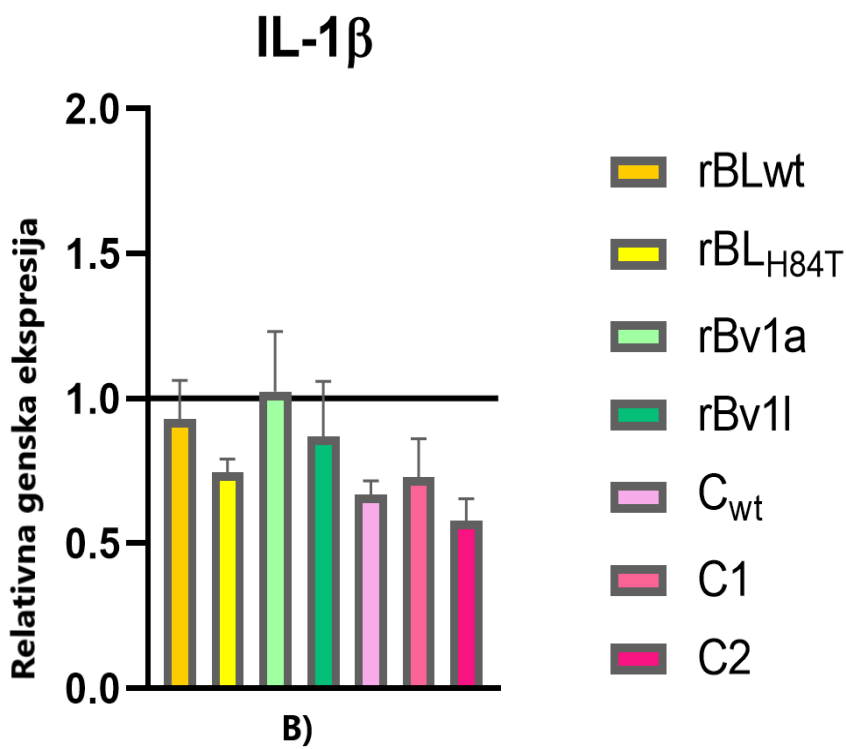
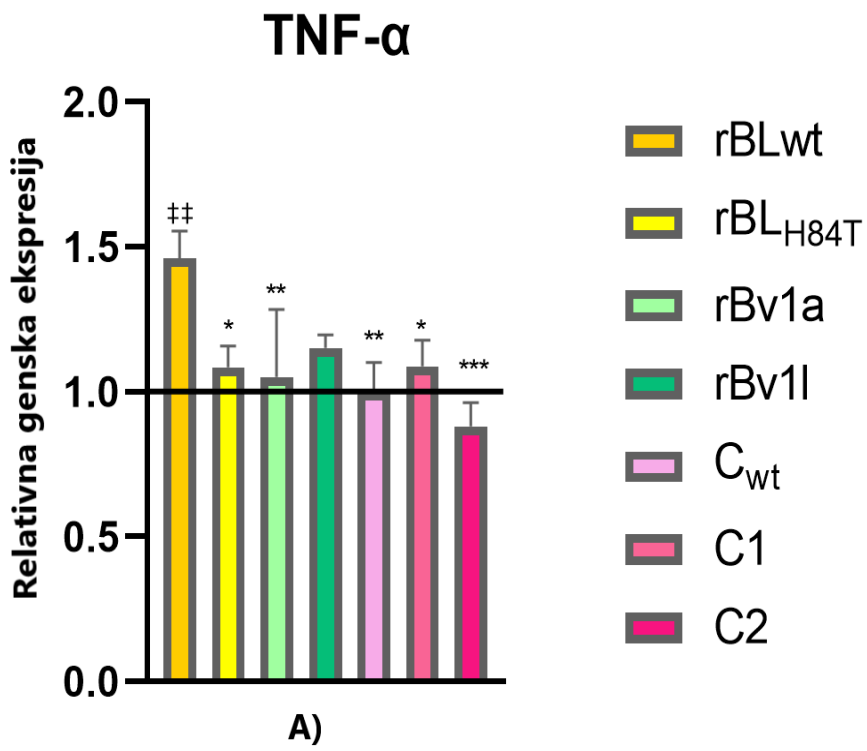


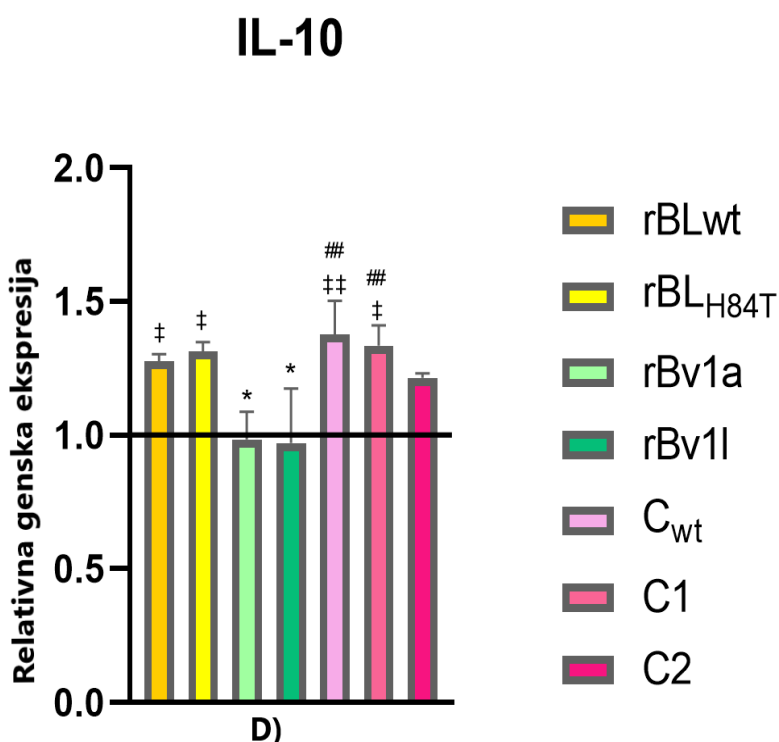
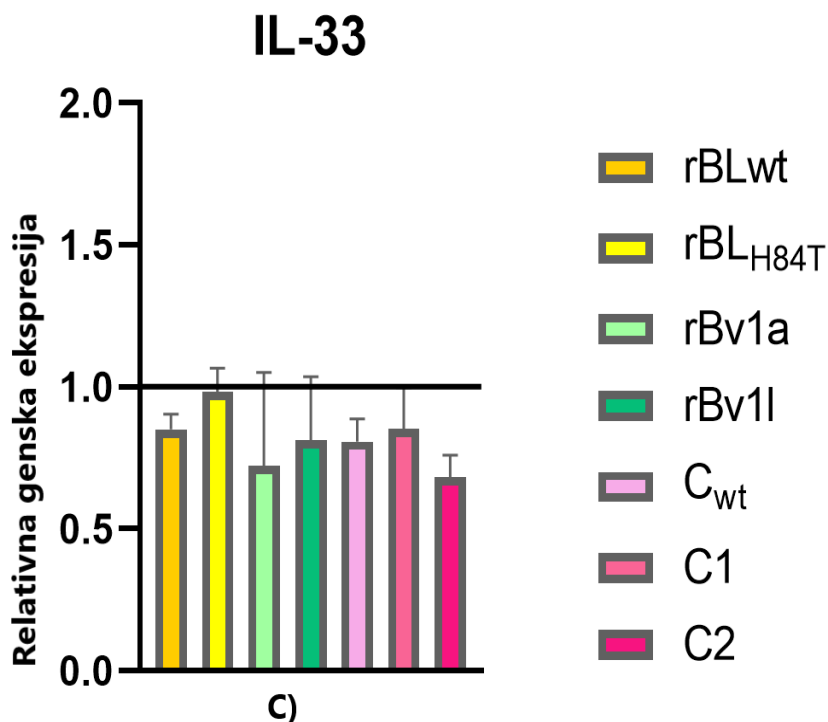
Slika 37. Vrednosti TEER-a nakon tretmana kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi tokom 24 h sa 342,9 nM antigenima.

#### 4.6.2. Određivanje relativne genske ekspresije u Caco-2 epitelnim ćelijama nakon tretiranja kokulture Caco-2/THP-1 makrofaga antigenima

Relativna genska ekspresija pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-33, kao i anti-inflamatornog citokina IL-10 u Caco-2 epitelnim ćelijama je određena nakon tretmana ćelijske kokulture antigenima (slika 38). Dobijeni rezultati ukazuju da je samo rBLwt uspešno stimulisao gensku ekspresiju TNF- $\alpha$  u poređenju sa nestimulisanoj kokulturom (NSC), (slika 38 A, NSC u poređenju sa rBLwt  $P < 0,05$ ). Do ekspresije druga dva merena pro-inflamatorna citokina (IL-1 $\beta$  i IL-33) nije došlo nakon tretmana antigenima (slike 38 B i 38 C).

Ekspresija anti-inflamatornog citokina IL-10 je indukovana nakon tretmana sa rBLwt (slika 38 D, NSC u poređenju sa rBLwt  $P < 0,05$ ), rBL<sub>H84T</sub> (slika 38 D, NSC u poređenju sa rBL<sub>H84T</sub>  $P < 0,01$ ), Cwt (slika 38 D, NSC u poređenju sa Cwt  $P < 0,01$ ), C1 (slika 38 D, NSC u poređenju sa C1  $P < 0,001$ ) i C2 (slika 38 D, NSC u poređenju sa C2  $P < 0,01$ ). Rekombinantni antigeni rBv1a i rBv1l nisu indukovali gensku ekspresiju IL-10 citokina (slika 38 D). U poređenju sa rBv1a sve tri rekombinantne himere su dovele do statistički značajne ekspresije citokina IL-10 (slika 38 D, rBv1a u poređenju sa Cwt  $P < 0,001$ , rBv1a u poređenju sa C1  $P < 0,0001$ , rBv1a u poređenju sa C2  $P < 0,01$ ).





Slika 38. Relativna genska ekspresija citokina A) TNF- $\alpha$ , B) IL-1 $\beta$ , C) IL-33 i D) IL-10 u Caco-2 epitelnim ćelijama nakon tretmana kokulture Caco-2/THP-1 makrofaga sa antigenima (342,9 nM). Genska ekspresija je normalizovana u odnosu na NSC (crna horizontalna linija). Sve je urađeno u duplikatu sa dva biološka replikata. Razlike su analizirane two-way ANOVA softverom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$

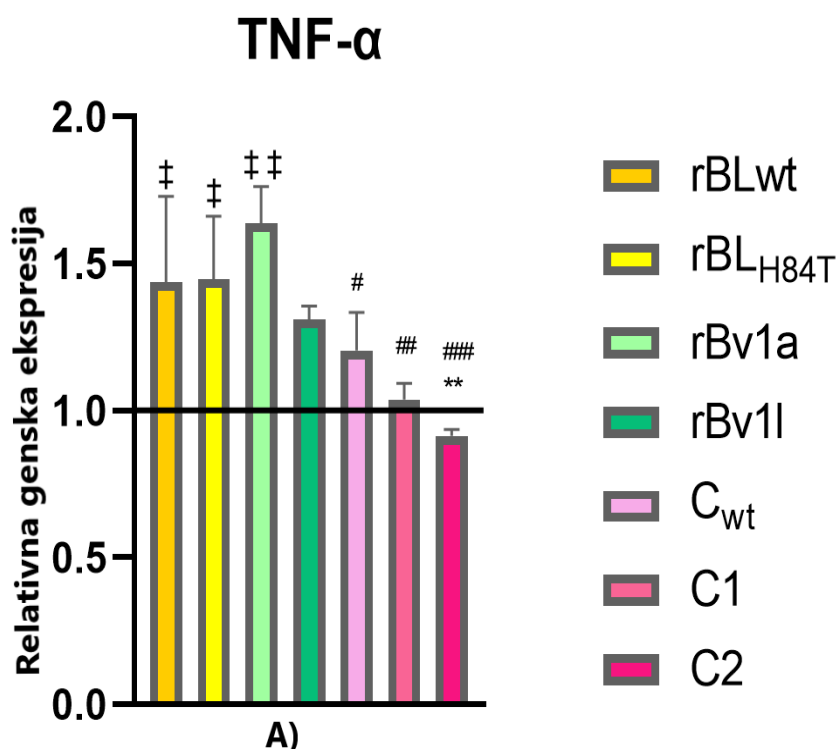
standardna devijacija ( $\ddagger P < 0,05$ ,  $\ddagger\ddagger P < 0,01$  u poređenju sa NSC \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  u poređenju sa rBLwt, ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , ####  $P < 0,0001$  u poređenju sa rBv1a).

#### 4.6.3. Određivanje relativne genske ekspresije citokina u THP-1 makrofagima nakon tretiranja kokulture Caco-2/THP-1 makrofaga antigenima

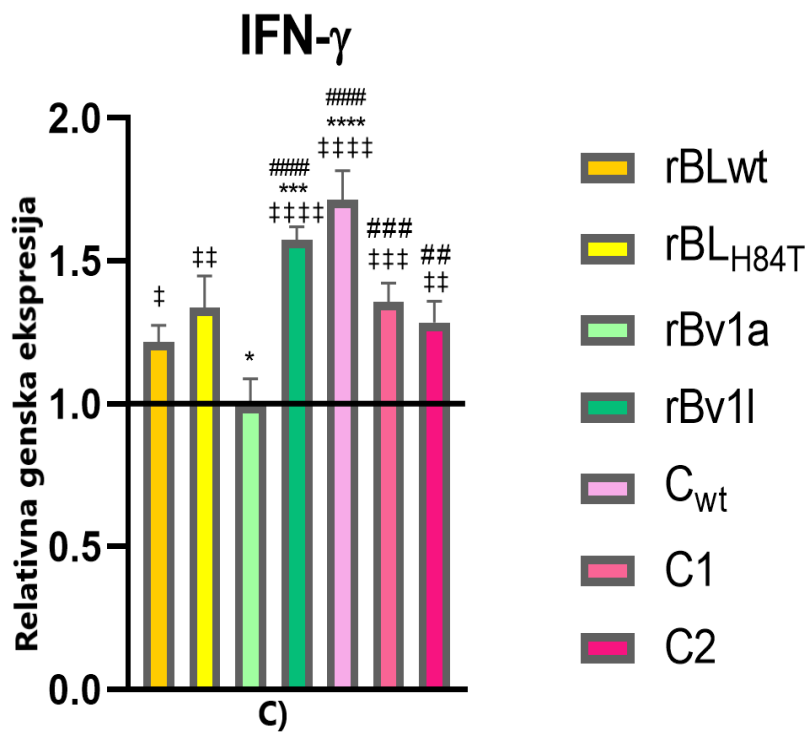
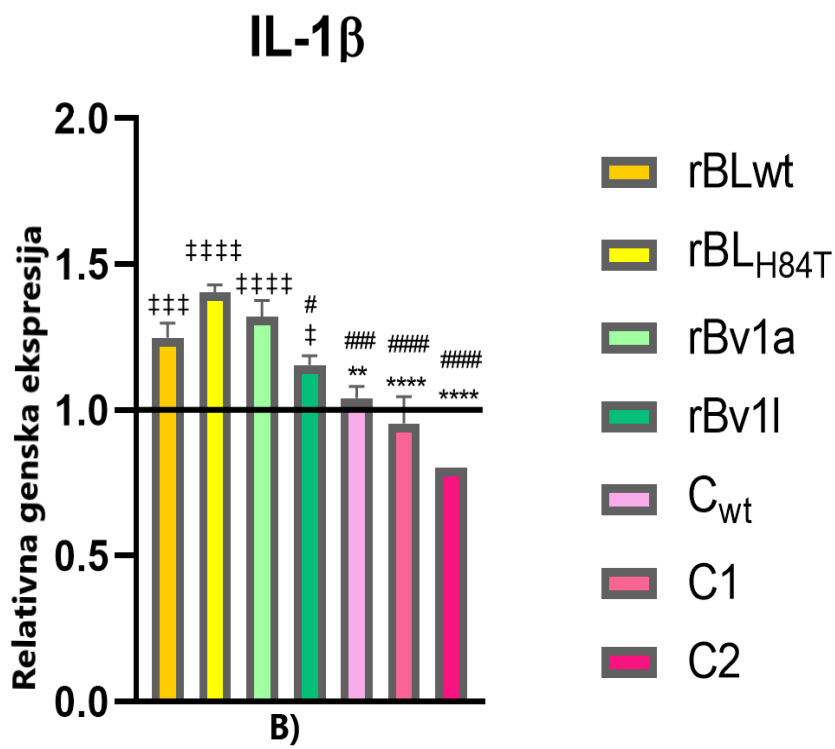
Relativna genska ekspresija pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$ , kao i anti-inflamatornog citokina IL-10 je određena u THP-1 makrofagima nakon tretmana kokulture antigenima (slika 39). Do indukovanja ekspresije pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  nije došlo nakon tretmana kokulture rekombinantnim himerama Cwt, C1 i C2 (slika 39 A i B). Nasuprot njima, tretman ostalim antigenima je doveo do značajnog porasta pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$  (slika 39 A, NSC u poređenju sa rBLwt  $P < 0,001$ , rBL<sub>H84T</sub>  $P < 0,001$ , rBv1a  $P < 0,001$ , rBv1l  $P < 0,05$ ) i IL-1 $\beta$  (slika 39 B, NSC u poređenju sa NSC rBLwt  $P < 0,01$ , rBL<sub>H84T</sub>  $P < 0,001$ , rBv1a  $P < 0,001$ ).

Osim rBv1a svi antigeni su pokazali sposobnost da indukuju gensku ekspresiju IFN- $\gamma$  (slika 39 C NSC u poređenju sa rBLwt  $P < 0,05$ , rBL<sub>H84T</sub>  $P < 0,001$ , rBv1l  $P < 0,0001$ , Cwt  $P < 0,0001$ , C1  $P < 0,001$ , C2  $P < 0,001$ ). Najjača ekspresija gena za IFN- $\gamma$  je uočena nakon tretmana kokulture rBv1l i Cwt antigenima.

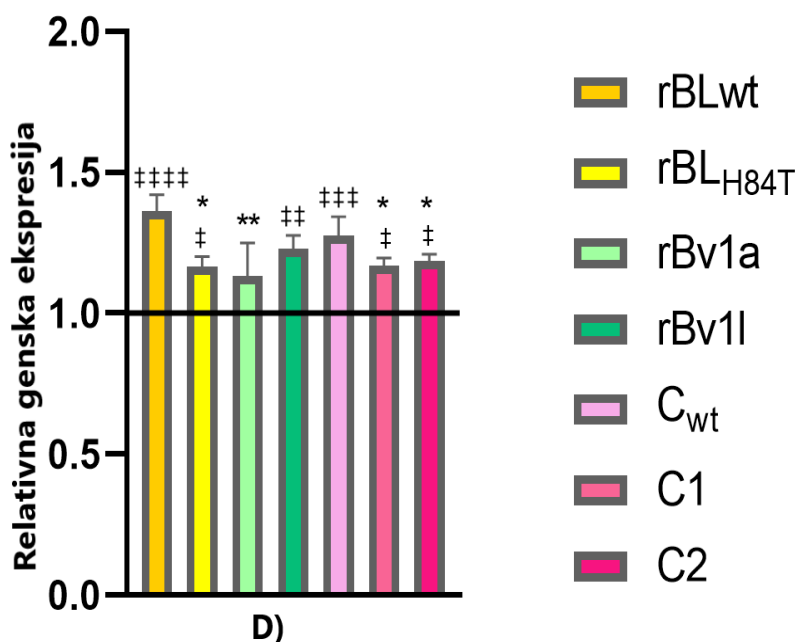
Ekspresija anti-inflamatornog citokina IL-10 u THP-1 makrofagima je indukovana tretmanom kokulture svim antigenima osim rBL<sub>H84T</sub> (slika 39 D, NSC u poređenju sa rBLwt  $P < 0,001$ , rBv1a  $P < 0,05$ , rBv1l  $P < 0,05$ , Cwt  $P < 0,01$ , C1  $P < 0,05$  i C2  $P < 0,05$ ). Iako su C1 i C2 bili slabiji induceri ekspresije IL-10 u odnosu na rBLwt, između Cwt i rBLwt nije bilo statistički značajne razlike u stimulaciji ekspresije IL-10 citokina (slika 39 D).







## IL-10

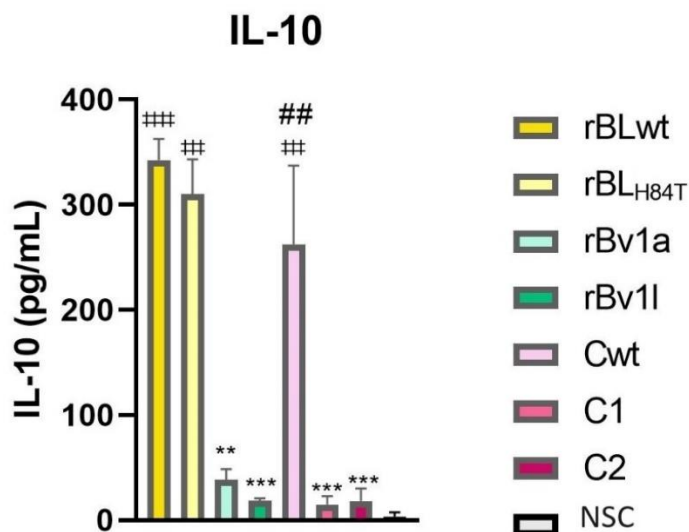


**Slika 39.** Relativna genska ekspresija citokina A) TNF- $\alpha$ , B) IL-1 $\beta$ , C) IFN $\gamma$  i D) IL-10 u THP-1 makrofagima nakon tretmana kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi sa antigenima (342,9 nM). Genska ekspresija je normalizovana u odnosu na NSC (crna horizontalna linija). Sve je urađeno u duplikatu sa dva biološka replikata. Razlike su analizirane two-way ANOVA softverom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (†P < 0,05, †† P < 0,01, ††† P < 0,001, †††† P < 0,0001 u poređenju sa NSC, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001 u poređenju sa rBLwt, ## P < 0,01, ### P < 0,001, #### P < 0,0001 u poređenju sa rBv1a).

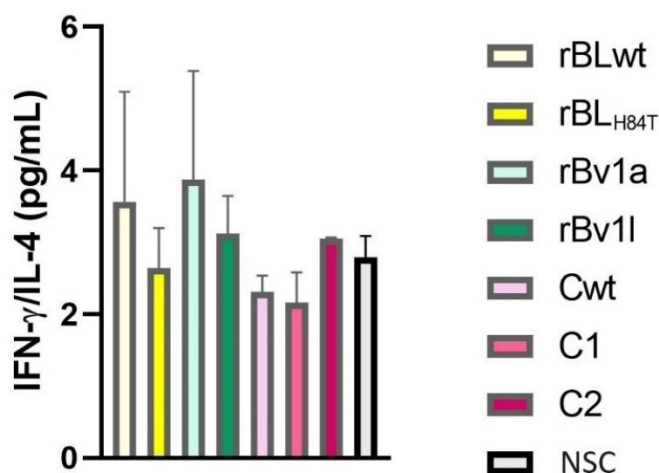
#### 4.7. Analiza izlučenih citokina nakon tretmana THP-1 diferenciranih makrofaga

THP-1 ćelijska linija (monociti izolovani iz periferne krvi pacijenta sa akutnom monocitnom leukemijom) predstavlja pouzdan model za proučavanje imunološkog odgovora monocita i makrofaga, zbog njihove sličnosti sa CD14<sup>+</sup> monocitima koji čine jednu od frakcija limfocita iz humanih perifernih mononuklearnih ćelija (PBMC) [97].

THP-1 monociti su diferencirani u makrofage po protokolu opisanom u 7.8.2. nakon čega su 24h tretirani antigenima u koncentraciji 342,9 nM. Ova koncentracija za tretman THP-1 makrofaga je korišćena na osnovu rezultata dobijenih u eksperimentima sa mišijim peritonealnim makrofaagima. Supernatanti su sakupljeni i analizirana je koncentracija izlučenih IL-4, IFN- $\gamma$  i IL-10 sendvič ELISA metodom. Na slici 40. su prikazani rezultati određivanja koncentracije izlučenog IL-10 nakon ćelijskog tretmana. Sa slike 40. se vidi da je statistički značajno povećanje sekrecije IL-10 uočeno nakon tretmana sa rBLwt, rBL<sub>H84T</sub> i Cwt u poređenju sa NTC kao i u poređenju sa rBv1a. Na slici 41. je prikazan grafik odnosa izlučenih IFN- $\gamma$  i IL-4, IFN- $\gamma$ /IL-4, statističke značajnosti nije bilo nakon tretmana bilo kojim antigenom.



Slika 40. Lučenje IL-10 nakon 24 h tretmana THP-1 makrofaga sa antigenima (342,9 nM). Sve je rađeno u duplikatu. Razlike su analizirane two-way ANOVA softverom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (####  $P < 0,0001$ , #####  $P < 0,0001$  u poređenju sa NTC, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$  u poređenju sa rBLwt, ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , #####  $P < 0,0001$  u poređenju sa rBv1a).

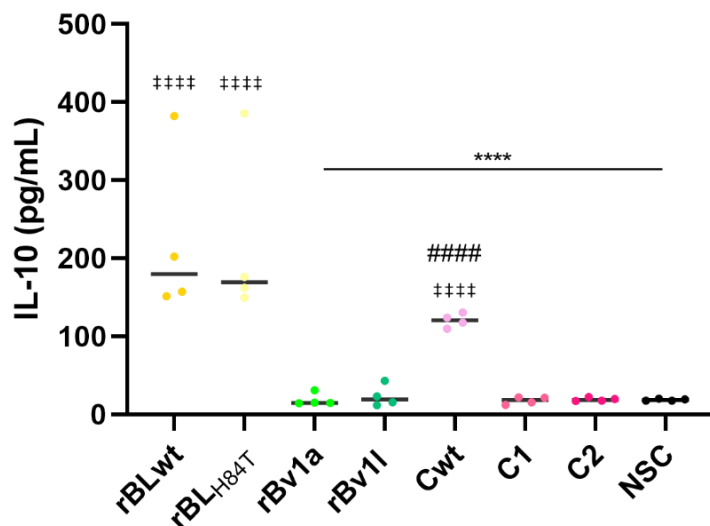


Slika 41. Odnos IFN- $\gamma$ /IL-4 nakon 24 h tretmana THP-1 makrofaga sa antigenima (342,9 nM). Sve je rađeno u duplikatu. Razlike su analizirane two-way ANOVA softverom. Statistička značajnost nije uočena.

#### 4.8. Analiza izlučenih citokina nakon stimulacije PBMCs alergičnih pacijenata na brezu antigenima

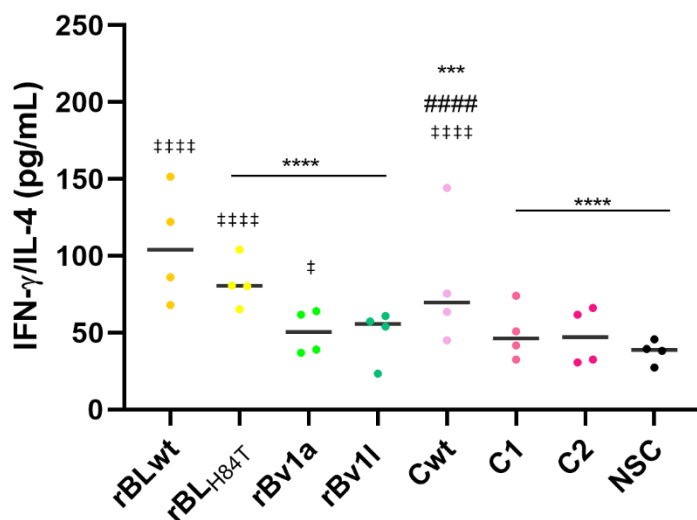
Kako bi se dodatno potvrdio imunomodulatorni efekat rBLwt u okviru rekombinantnih himera, PBMCs dobijene iz pune krvi pacijenata alergičnih na brezu tretirane su rekombinantnim himerama. Karakteristike pacijenata su prikazane u tabeli 6 (pacijenti pod rednim brojem 8-11). Sendvič ELISA je korišćena kako bi se izmerila koncentracija izlučenih

citokina IL-4, IFN- $\gamma$  i IL-10 nakon 24 h tretmana. Do statistički značajnog oslobađanja citokina IL-10 je došlo nakon tretmana rBLwt, rBL<sub>H84T</sub> i Cwt antigenima (slika 42, NSC u poređenju sa rBLwt  $P < 0,0001$ , rBL<sub>H84T</sub>  $P < 0,0001$ , Cwt  $P < 0,0001$ ). U poređenju sa NSC, ostali antigeni nisu doveli do statistički značajne razlike u oslobađanju citokina IL-10. rBLwt je bio statistički značajno bolji stimulator lučenja ovog citokina u poređenju sa Cwt (slika 42, rBLwt u poređenju sa Cwt  $P < 0,0001$ ). U poređenju sa rBv1a, Cwt je izazvao statistički značajno veće oslobađanje IL-10 (slika 42 rBv1a u poređenju sa Cwt  $P < 0,0001$ ).



**Slika 42. Lučenje IL-10 nakon 24 h tretmana PBMCs sa antigenima (342,9 nM). Sve je rađeno u duplikatu. Razlike su analizirane two-way ANOVA softverom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (\*\*\*\*  $P < 0,0001$  u poređenju sa NSC \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$  u poređenju sa rBLwt, ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , #####  $P < 0,0001$  u poređenju sa rBv1a).**

Za razliku od tretmana THP-1 diferenciranih makrofaga, uočen je trend povećanja odnosa koncentracije IFN- $\gamma$ /IL-4 nakon tretmana PBMCs sa rBLwt, rBL<sub>H84T</sub> i Cwt (slika 43, NSC u poređenju sa rBLwt  $P < 0,0001$ , rBL<sub>H84T</sub>  $P < 0,0001$ , Cwt  $P < 0,0001$ ). Ostali antigeni nisu uticali na trend lučenja IFN- $\gamma$ /IL-4 nakon stimulacije PBMCs u poređenju sa NSC. Nakon stimulacije PBMCs, rBLwt je bio statistički značajno bolji stimulator povećanja odnosa IFN- $\gamma$ /IL-4 u poređenju sa svim drugim antigenima (slika 43, rBLwt u poređenju sa rBL<sub>H84T</sub>  $P < 0,0001$ , rBv1a  $P < 0,0001$ , rBv11  $P < 0,0001$ , Cwt  $P < 0,001$ , C1  $P < 0,0001$ , C2  $P < 0,0001$ ). Cwt je nakon tretmana PBMCs pokazao trend da utiče na povećanje odnosa IFN- $\gamma$ /IL-4 u poređenju sa rBv1a (slika 43 rBv1a u poređenju sa Cwt  $P < 0,0001$ ).



Slika 43. Odnos IFN $\gamma$ /IL-4 nakon 24 h tretmana PBMCs sa antigenima (342,9 nM). Sve je radeno u duplikatu. Razlike su analizirane two-way ANOVA softverom. Rezultati su prikazani kao srednja vresnost  $\pm$  standardna devijacija († P < 0,05, \*\*\*\* P < 0,0001 u poređenju sa NSC, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001 u poređenju sa rBLwt, ## P < 0,01, ### P < 0,001, #### P < 0,0001 u poređenju sa rBv1a).

## 5. Diskusija

Poslednjih godina, zahvaljujući napretku rekombinantne DNK tehnologije, omogućena je identifikacija i kloniranje gotovo svih do danas identifikovanih alergena [6]. Ovo je omogućilo napredak AIT kroz proizvodnju rekombinantnih alergena [99] i hipoalegenih izoformi ili derivata koji sadrže T ćelijske epitope, ali ne i B ćelijske epitope [100]. Na ovaj način je omogućena proizvodnja definisanih smeša konzistentnog sastava nezavisnog od izvora alergena, čime se rešio problem neželjenih reakcija posredovanih B ćelijskim epitopima, ali problem nedovoljne efikasnosti preparata za AIT i dalje ostaje otvoren. Jedan od ključnih aspekata poboljšanja AIT je modulacija imunskog odgovora kroz stimulaciju APC koje prikazuju peptide u kontekstu MHC molekula naivnim T ćelijama i tako ih aktiviraju, a citokinima koje sekretuju usmeravaju u kom smeru će se aktivirane T ćelije diferencirati. Drugim rečima, APC predstavljaju ključnu kariku u adaptivnom imunskom odgovoru jer ga istovremeno pokreću i određuju njegove karakteristike. Jedno od potencijalnih rešenja za modulaciju odgovora APC je kombinovanje alergena sa TLR agonistima [6]. Sublingvalni način administracije terapeutika tokom AIT je bezbedan i pogodan za pacijenta jer omogućava samo-primenu u kućnim uslovima, a preporučuje ga i Svetska zdravstvena organizacija [101].

U okviru ove doktorske disertacije testiran je imunomodulatorni efekat lektina banane na modelu glavnog alergena iz breze Bet v 1. Očekivano imunomodulatorno dejstvo lektina banane bi bar delom moglo biti povezano sa njegovom sposobnošću da se veže za TLR2 i CD14 [15]. Rekombinantna himera Cwt je nakon *in silico* dizajniranja uspešno proizvedena u *E. coli* BL21 ekspresionom sistemu. Cwt se ekspimirao kao citosolni protein i uspešno je prečišćen afinitetnim vezivanjem lektinskog domena za Sephadex G-75 matriks. Prinos proteina nakon prečišćavanja je bio 0,5 g na 1L ekspresionog medijuma. Gel filtracijom je pokazano da je protein dimer u rastvoru, dok je CD spektroskopijom potvrđeno dominantno prisustvo  $\beta$  pločica što se slaže sa literaturnim podacima o pojedinačnim proteinima BLwt i Bv1a [30,74]. Pored uspešnog prečišćavanja na Sephadex G-75 matriksu, u ELLA testu sa HRP je potvrđeno da je rBLwt domen u okviru Cwt zadržao sposobnost vezivanja glikana što je neophodno za njegovu biološku aktivnost. Dodatno, u imunoblotu je potvrđeno da je Cwt zadržao IgE reaktivnost sa serumima pacijenata alergičnih na polen breze.

Kako bi se potvrdio imunomodulatorni efekat Cwt himere rađeni su *ex vivo* eksperimenti na peritonealnim mišijim makrofagima. Među ćelijama urođene imunosti makrofagi imaju važnu ulogu u oblikovanju imunskog odgovora tokom alergije. Aktivacijom makrofaga preko TLR može se stimulisati njihov antigen-prikazujući potencijal kao i otpuštanje reaktivnih kiseoničnih (ROS) ili reaktivnih azotnih vrsta (RNS) [102]. Kod alergičnih pacijenata, alternativno aktivirani makrofagi oslobađaju IL-13 što dodatno doprinosi diferencijaciji Th2 limfocita i infiltraciji eozinofila u pluća [103]. Pored ovoga, nakon aktivacije makrofagi mogu lučiti i druge citokine kao što su TNF- $\alpha$  i IL-6, ali i anti-inflamatorni citokin IL-10 koji doprinosi utišavanju inflamacije i diferencijaciji T ćelija u Tregs.

Funkcionalne karakteristike makrofaga mogu uticati na ishod prilikom određene stimulacije. Stimulatorni kapacitet Cwt himere je ispitan na rezidentnim (RMs) i tioglikolatom stimulisanim (TGMs) peritonealnim mišijim makrofagima. RMs su korišćeni kao model makrofaga tokom homeostaze, dok su TGMs korišćeni kao model makrofaga u inflamatornom stanju. RMs i TGMs imaju različite fenotipske i funkcionalne karakteristike koje su posledica citokinskog miljea u kom su se nalazile [98]. Osim toga, genetski faktori takođe utiču na profil aktivacije makrofaga i njihov odgovor na određeni stimulus [15]. Soj miševa korišćen za ovu

grupu eksperimenata je bio BALB/c, koji je karakterističan po dominantnom Th2 imunskom odgovoru, sličnom onom koji se odigrava kod alergičnih pacijenata [104]. Ovaj soj miševa je podložan senzitivaciji različitim alergenima, čak i bez dodatka adjuvanasa zbog čega se često koristi kao model sistem za ispitivanje poremećaja koji su u vezi sa alergijama [105,106]. Osim toga, na BALB/c miševima je pokazan imunomodulatorni efekat rBLwt [15,107].

Dobijeni rezultati nakon *ex vivo* stimulacije mišijih peritonealnih RMs i TGMs su pokazali da je Cwt zadržala sposobnost rBLwt da stimuliše sekreciju IL-10 citokina. Nasuprot tome, mogućnost Cwt da stimuliše proinflamatorni odgovor je bila smanjena u poređenju sa rBLwt. Ovo se ogleda u zanemarljivoj proizvodnji NO, kao i ograničenoj MPO aktivnosti i smanjenoj proizvodnji proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$  i IL-6). Razlika u obrascu lučenja citokina nakon stimulacije makrofaga Cwt himerom i rBLwt bi mogla biti posledica razlika u strukturi između ova dva proteina. Naime, za Cwt himeru je gel-filtracijom pokazano da je dimer u rastvoru, dok je rBLwt homotetramer [75]. Svaki od polipeptidnih lanaca rBLwt ima dva vezivna mesta za ugljene hidrate. Ovo znači da Cwt ima četiri ugljenohidratna vezivna mesta, dok rBLwt ima osam. Samim tim, rBLwt ostvaruje veći aviditet za vezivanje u poređenju sa Cwt. TLR2 receptor gradi heterodimere sa TLR1 i TLR6 glikoproteinima [108]. Makrofagi se mogu aktivirati na različite načine, stimulacijom preko spektra receptora koji se nalaze na njihovoj površini. rBLwt sa većim brojem ugljenohidratnih vezivnih mesta bi potencijalno mogao istovremeno stimulisati aktivaciju makrofaga potentnije od Cwt zbog većeg broja mogućih kombinacija, a samim tim i umrežavanjem većeg broja receptora na površini makrofaga. Ispitivanje signalnog puta kojim se makrofagi aktiviraju pomoću rBLwt i Cwt bi moglo razrešiti pitanje različitog citokinskog profila nakon aktivacije ovim antigenima.

U poređenju sa rBv1a, Cwt je efikasnija u stimulaciji oslobađanja IL-10, dok je slabiji stimulator sekrecije NO i proinflamatornih citokina. Smanjena proizvodnja proinflamatornih citokina, uz proizvodnju IL-10 ukazuje na potencijal Cwt u AIT kod pacijenata alergičnih na polen breze. Iako se alergije karakterišu dominacijom Th2 citokinskog profila, neki citokini koji ne spadaju u Th2 grupu takođe mogu učestvovati u oblikovanju alergijskog imunskog odgovora [109]. Doprinos IL-6 u razvoju alergijske patologije je pokazan [110]. Genetska inaktivacija IL-6 dovodi do smanjenja Th2 odgovora i inflamacije posredovane eozinofilima, kao i do smanjenja proizvodnje IgE antitela u mišijim modelima alergije na grinje kućne prašine [110]. U istom istraživanju makrofagi i dendrične ćelije su identifikovani kao primarni izvori IL-6 citokina [110]. Osim toga, IL-6 je predložen i kao meta za terapiju alergijske astme zbog njegove uloge prilikom preuzimanja antigena od strane dendričnih ćelija, kao i inicijacije Th2/Th17 posredovane inflamacije disajnih puteva [111]. TNF- $\alpha$ , je još jedna tačka koja se cilja tokom AIT. TNF $\alpha$  utiče na ekspresiju adhezivnih molekula čime omogućava influks eozinofila. Lokalno povećanje nivoa TNF- $\alpha$  i NO je ključno za prelazak eozinofila i neutrofila u tkivo u kom se odigrava alergijska reakcija [112]. Takođe, TNF $\alpha$  ima promovišuće dejstvo u slučaju proizvodnje sIgE antitela, Th2 citokina i hemokina [113]. **Error! Bookmark not defined.** Sposobnost Cwt da stimuliše sekreciju IL-10 u makrofagima (bez obzira da li su u fiziološkom ili inflamatornom stanju) sugerise da bi ova himeru mogla imati terapijski efekat u AIT. IL-10 deluje na monocite i makrofage dovodeći do smanjenja njihove proizvodnje i oslobađanja antiinflamatornih citokina i antigen prezentujućeg kapaciteta, a pojačava fagocitnu sposobnost [114]. Osim toga smanjuje i lučenje IL-2 i IFN- $\gamma$  u Th1 ćelijama i IL-4 i IL-5 od strane Th2 ćelija. IL-10 je odgovoran za diferencijaciju Tregs, koje dalje kroz IL-10 zavisano ili IL-10 nezavisano sprečavaju razvoj alergijske reakcije [115]. Takođe, makrofagi sekrecijom IL-10 molekula utiču na povećanje broja Tregs i Bregs ćelija čime se uspostavlja antiinflamatorno stanje u organizmu [114]. Povećanje broja Tregs je ključni događaj koji dovodi do stišavanja alergijskih simptoma tokom AIT [114].

Kako bi se uporedio efekat hipoalergene izoforme rBv11 u AIT, kao i da bi se testirao mutant rBL<sub>H84T</sub> *in silico* su dizajnirane C1 i C2 koje su uspešno eksprimirane u *E. coli* BL21 ćelijama u formi inkluzionih tela. *In silico* dizajn je pokazao da rBLwt ima veći afinitet za manozu od mutirane forme proteina zbog uspostavljanja dodatnih  $\pi$ - $\pi$  interakcija između Tyr 83 i His 84, koje izostaju kod rBL<sub>H84T</sub>. Razlike koje su uočene tokom ove studije nakon ćelijskih tretmana rBLwt i rBL<sub>H84T</sub> bi se mogle potencijalno objasniti ovim fenomenom. Proteini su, nakon ispiranja iz inkluzionih tela, prečišćeni u denaturišućim uslovima pomoću IMAC nakon čega su uspešno renaturisani u puferu koji je sadržao glicerol. Glicerol je bio neophodan za stabilizaciju proteina u procesu renaturacije. IgE reaktivnost novoprodukovanih himera je proverena inhibicijom u ELISA testu sa serumima pacijenata alergičnih na polen breze. IC50 vrednosti za rBv1a i Cwt su bile uporedive (0,1  $\mu$ g proteina), dok su IC50 vrednosti za rBv11, C1 i C2 bile više (1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g i 50  $\mu$ g proteina respektivno) što je u skladu sa literaturnim podacima za rBv11 [36]. U ovoj tezi je prvi put testirana IgE reaktivnost hipoalergene forme Bet v 11 na populaciji osoba alergičnih na brezu iz naše zemlje. Rezultati su pokazali smanjenu IgE reaktivnost ove hipoalergene forme i ukazuju da bi je trebalo koristiti u daljim testiranjima za primenu u AIT. Ovi rezultati ukazuju da rekombinantne himere C1 i C2 imaju manju verovatnoću da izazovu neželjene reakcije u AIT posredovane specifičnim IgE antitelima.

Evaluacija imunomodulatornog efekta rekombinantnih himera Cwt, C1 i C2 je urađena na THP-1 diferenciranim makrofagima kao i na kokulturi Caco-2/THP-1. Rad na humanim ćelijskim kokulturama je značajan jer oslikava komunikaciju između ćelija i interakcije koje postoje u ljudskom organizmu, dok se u isto vreme smanjuje broj eksperimenata na životinjskim modelima što je u skladu sa 3R principom [87].

Brojna istraživanja su se bavila poređenjem odgovora nakon stimulacije THP-1 diferenciranih makrofaga i makrofaga izolovanih iz PBMCs i u većini slučajeva je dobijen sličan obrazac [97]. THP-1 predstavlja ljudsku monocitnu ćelijsku liniju leukemije, koja je široko korišćena za proučavanje funkcija monocita/makrofaga, mehanizama, signalnih puteva, kao i transporta hranljivih materija i lekova [97]. Kod THP-1 diferenciranih makrofaga su detektovani brojni površinski marker, istražena je morfologija ovih ćelija, kao i njihove funkcionalne karakteristike nakon diferencijacije [97]. U zavisnosti od stimulusa koji se koristi za diferencijaciju, ove ćelije se mogu polarizovati ka različitim podtipovima M0, M1 ili M2 [97]. Diferencijacija pomoću PMA polarizuje makrofage ka M0 fenotipu, dok dodatak IFN- $\gamma$  i lipopolisaharida (LPS) uvodi THP-1 monocite u M1 fenotip makrofaga, nasuprot tome dodatak IL-4 vodi ka M2 fenotipu [97]. U ovoj doktorskoj disertaciji makrofagi su diferencirani po protokolu za M0 fenotip, odnosno medijum za diferencijaciju je bio obogaćen sa 100 nM PMA. Nakon diferencijacije ovako dobijeni makrofagi su tretirani antigenima tokom 24 h i analizirana je koncentracija izlučenih citokina IL-4, IL-10 i IFN- $\gamma$  u supernatantima. U analiziranim supernatantima je detektovana povišena koncentracija IL-10 nakon tretmana rBLwt, rBL<sub>H84T</sub> i Cwt što ukazuje da ova tri antigena utiču na lučenje ovog regulatornog citokina. Ostali antigeni nisu uticali na povećanje nivoa izlučivanja IL-10 citokina. Sa druge strane, ni jedan od antigena nije uticao na odnos izlučenih IFN- $\gamma$ /IL-4. Lučenje IL-10 je karakteristično za M2 podgrupu makrofaga koja ima značajnu ulogu u rešavanju infekcija parazitima, modeliranju tkiva, regulaciji imunskog odgovora, terapiji alergija i sprečavanju progresije tumora [97]. Uočeni trend lučenja IL-10, IFN- $\gamma$  i IL-4 ukazuje da Cwt himera, kao i rBLwt i rBL<sub>H84T</sub> imaju potencijal za usmeravanje diferencijacije makrofaga ka M2 fenotipu.

Dalji uticaj antigena je ispitan na složenijem model sistemu - kokulturi Caco-2 immortalizovanih epitelnih ćelija poreklom iz kolona i THP-1 diferenciranih makrofaga. Iako se



intestinalno i sublingvalno mukozno tkivo razlikuju po funkciji, oni ipak dele neke strukturne karakteristike. U oba tkiva, epitelne ćelije su povezane čvrstim, prijanjućim vezama, i desmozomima, što doprinosi strukturnom integritetu ovih tkiva [116]. Lamina propria ispod epitelijalnog sloja u oba tkiva sadrži različite ćelije imunskog sistema, poput limfocita, makrofaga i dendritskih ćelija. Konačno, i creva i sublingvalna mukoza su delovi limfoidnog sistema povezanog sa mukozom (MALT), u kojem se nalaze različite ćelije imunskog sistema poput T ćelija, B ćelija, makrofaga i dendritskih ćelija, koje su neophodne za imunski nadzor ovih tkiva kao i za pružanje odgovarajućeg imunskog odgovora na pretnju patogena [117]. Iako Caco-2 epitelne ćelije ne oslikavaju savršeno sublingvalni epitel, ovaj ćelijski model sistemi se široko koriste za proučavanje funkcije epitelne barijere i apsorpciju lekova zbog njihove sposobnosti da formiraju čvrste spojeve i spontano se diferenciraju u epitelni monosloj. Osim toga, Caco-2 *in vitro* evaluacija se preporučuje tokom prekliničkih ispitivanja novih terapija koje se oralno primenjuju u skladu sa smernicama propisanim od strane regulatornih agencija FDA i WHO [118,119]. Sličnost između crevno tkiva i sublingvalnog tkiva se može iskoristiti kako bismo dobili uvid u način na koji obezbeđuju toleranciju u organizmu. Imunski sistemi usne šupljine i sistema organa za varenje podržavaju imunološku toleranciju na alergene usled prisustva tolerogenih dendritskih ćelija i makrofaga koji podstiču diferencijaciju Treg. Nakon sublingvalne administracije, alergen se vezuje za epitelne ćelije vrlo brzo, tokom prvih par minuta, najverovatnije elektrostatičkim interakcijama. Nakon toga, se pomoću sublingvalnog dukalnog sistema sprovode do APC [120] nakon čega ga procesuju antigen-prikazujuće ćelije smeštene ispod sloja epitelnih ćelija i prikazuju naivnim CD4<sup>+</sup> T ćelijama [94].

U ovoj doktorskoj disertaciji je razvijena kokultura između epitelnih ćelija creva (Caco-2) sa apikalne strane porodne membrane i makrofaga (THP-1 diferencirani makrofagi) sa bazolateralne strane kako bi se imitirali uslovi u kojima se primenjuje sublingvalna administracija terapeutika. U ovako postavljenom sistemu THP-1 makrofagi nisu uticali na integritet Caco-2 monosloja nakon 48 h od uspostavljanja kokulture što je praćeno merenjem TEERa (slika 34).

Epitelni monosloj Caco-2 ćelija nije narušen ni nakon tretmana antigenima tokom 24 h (slika 36). Ovo ukazuje da rekombinantno proizvedeni proteini nisu imali negativan uticaj na integritet epitelnog monosloja, odnosno nisu doveli do raskidanja čvrstih veza. Ovo je vrlo značajno jer se na ovaj način eliminiše potencijalno izazivanje inflamacije na lokalnom nivou usled administracije alergena. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa izmerenom relativnom genskom ekspresijom pro-inflamatorinih citokina u Caco-2 ćelijama nakon stimulacije Caco-2/THP-1 kokulture. Naime, osim rBLwt, ni jedan od antigena nije doveo do stimulacije genske ekspresije pro-inflamatorinih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-33 u Caco-2 ćelijama. IL-1 $\beta$  i IL-33 pripadaju IL-1 podfamiliji citokina i sekretuju se kao odgovor ćelija na povredu [121]. IL-1 $\beta$  je ključni citokin za razvoj inflamacije i uočeno je da igra važnu ulogu u razvoju alergije, alergijske astme, kao i atopijskog dermatitisa [122]. Mesto delovanja ovog citokina do sada nije razjašnjeno, ali je uočeno da deluje na infiltraciju eozinofila, preuključivanje IgE antitela i utiče na diferencijaciju Th2 ćelija [122]. Još jedan iz podfamilije IL-1 citokina, IL-33 utiče ne samo na inflamaciju svojom ulogom alarmina, nego i kao signal za dodatnu stimulaciju kroz stimulaciju lučenja IL-4, IL-5 i IL-13 [123]. Terapeutici koji bi blokirali IL-33 mogli bi potencijalno predstavljati terapijski pristup alergijskih i inflamatornih bolesti [123]. Do stimulacije genske ekspresije IL-10 u Caco-2 ćelijama je došlo nakon tretmana kokulture rBLwt, rBL<sub>H84T</sub>, Cwt, C1 i C2, dok rBv1a i rBv1l nisu indukovali gensku ekspresiju IL-10 u ovim ćelijama. Kao što je prethodno pomenuto, IL-10 je izuzetno značajan za uspostavljanje tolerancije kroz stimulaciju diferencijacije Tregs. U crevima u neinflamatornom stanju epitelne ćelije su glavni izvor IL-10 citokina i smatra se da su odgovorne za održavanje homeostaze

ovog tkiva [124]. Pokazano je da epitelne ćelije oslobađaju IL-10 nakon aktivacije preko TLR2 i TLR4 na njihovoj površini [124]. Dodatno je pokazano da je ekspresija IL-10 posredovana međusobnim interakcijama epitelnih ćelija i makrofaga koji se nalaze u lamini propriji ispod njih [125]. U THP-1 makrofagima je došlo do povećanja nivoa relativne genske ekspresije TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  nakon stimulacije Caco-2/THP-1 kokulture rBLwt, rBL<sub>H84T</sub> i rBv1a. Do povećane ekspresije IFN- $\gamma$  je došlo nakon tretmana svim antigenima osim rBv1a. Nakon AIT, dolazi do kontrolisanog smanjenja u nivou Th2 citokina (IL-4, IL-5 i IL-13) i povećanja nivoa Th1 citokina (IFN- $\gamma$  i IL-2) [9,126]. Ovo ukazuje da se prilikom AIT dešava kontrolisano preusmeravanje od Th2 ka Th1 imunskom odgovoru. Naši rezultati ukazuju da rekombiantne himere, kao i rBv11 imaju potencijal da izazovu lučenje IFN- $\gamma$  u THP-1 makrofagima nakon stimulacije kokulture. Sve tri himere su povećale nivo relativne genske ekspresije IL-10 u THP-1 makrofagima nakon tretmana Caco-2/THP-1 kokulture. Među himerama, najpotentniji inducer genske ekspresije IL-10 citokina u THP-1 makrofagima bila je Cwt. Nivo ekspresije koji je indukovala ova himera je bio uporediv sa nivoom ekspresije koji je izazvala stimulacija sa rBLwt. Pokazano je da regulacioni mehanizam u dendritskim ćelijama koji može doprinosti utišavanju neželjenog imunološkog odgovora povezanog sa alergijama uključuje kooperaciju IL-10 i IFN- $\gamma$  [127]. Ovo zajedničko dejstvo IFN- $\gamma$  i IL-10 je potrebno takođe potvrditi i u makrofagima u budućem istraživanju.

Potencijal rekombinantnih himera da stimulišu relativnu gensku ekspresiju IL-10 u Caco-2 i THP-1, kao i potencijal stimulacije ekspresije IFN- $\gamma$  uz stimulaciju lučenja IL-10 nakon u u THP-1 makrofagima je dodatno ispitan sa PBMCs pacijenata alergičnih na polen breze. Upotrebom ovih primarnih ćelija kao model sistema, postiže se bolje oponašanje stanja ćelija u organizmu jer nakon izolovanja ćelije zadržavaju svoje fiziološke osobine i funkcije [82]. Ovi model sistemi su značajni jer pružaju relevantnije informacije o biološkim procesima u poređenju sa ćelijskim linijama koje se već duže vreme koriste i gaje u laboratorijskim uslovima [82]. Nakon tretmana PBMCs antigenima, uočava se da među rekombinantnim himerama samo Cwt stimuliše sekreciju IL-10.

Važno je istaći da IL-10 stvara odgovarajuću citokinsku sredinu koji dovodi do tolerancije [128]. Makrofagi luče IL-10 koji dovodi do aktivacije Treg koje imaju ključnu ulogu u AIT [128]. Ovako aktivirane Treg luče IL-10 koji inhibira T ćelijsku aktivaciju (dovodi do supresije CD28 i CD2), ali aktivira B ćelije i utiče na proizvodnju IgG4 [128]. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da stimulacija PBMCs sa rBLwt, rBL<sub>H84T</sub> i Cwt dovodi do sličnog efekta kao i stimulacija THP-1 makrofaga, povećavajući nivoe regulatornog citokina IL-10.

Dodatno, za razliku od THP-1 stimulisanih makrofaga, PBMCs nakon tretmana Cwt dovode i do povećanja nivoa izlučenih IFN- $\gamma$ /IL-4. Ova razlika u profilima može biti posledica heterogenog sastava PBMCs, za razliku od homogene THP-1 ćelijske kulture.

Ravnoteža između Th1 i Th2 imunskog odgovora igra ključnu ulogu u AIT [129]. Pokušaji imunoterapije sa IFN- $\gamma$  su izvedeni kako bi se postigla desenzitizacija na alergene [129]. Podaci ukazuju na to da je suplementacija IFN- $\gamma$  neophodna za postizanje ravnoteže između Th1 i Th2 imunске reakcije [129]. Takođe, regulatorne B ćelije su ključne u indukovanju diferencijacije naivnih T ćelija u Tregs [129]. Studije su pokazale da IFN- $\gamma$  može imati alergen-specifični tolerogeni efekat putem indukovanja diferencijacije alergen-specifičnih B regulatornih ćelija sposobnih za lučenje IL-10 [129]. Izlučeni IL-10 ima zaštitnu ulogu stimulišući proliferaciju B regulatornih ćelija [129].

Navedeni rezultati ukazuju da rekombinantne himere pokazuju imunomodulatorni efekat na testiranim model sistemima. Među himerama, najveći potencijal kao terapeutik u AIT je pokazala Cwt jer je jedina koja dovodi do pojačanja nivoa lučenja IL-10 u THP-1 makrofagima i PBMCs izolovanim iz krvi pacijenata alergičnih na polen breze. U kokulturi Caco-2/THP-1 sve tri himere su pokazale potencijal da stimulišu gensku ekspresiju IL-10, ali je i u ovom model sistemu Cwt bio najpotentniji stimulator što ukazuje da ova himera ima najveći potencijal za dalju primenu u terapijske svrhe. Ovi rezultati ukazuju na značaj rekombinantnih himera u potencijalnoj terapiji alergija, pružajući nove uvide u mehanizme imunoregulacije. Nastavak istraživanja u ovoj oblasti mogao bi doprineti razvoju efikasnih tretmana za alergijske bolesti poboljšavajući kvalitet života pacijenata.

## 6. Zaključak

Tokom ove doktorske disertacije tehnologijom rekombiante DNK proizvedene su himere rBv1a-BLwt, rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 nakon čega su okarakterisani biohemijskim i imunološkim metodama i ispitan je njihov imunomodulatorni uticaj u cilju potencijalne primene kao terapeutika u AIT.

Zaključci iz ove doktorske disertacije su sledeći:

1) Proizvodnja, prečišćavanje i karakterizacija rekombinantnih himera:

- Rekombinantne himere rBv1a-BLwt, rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 su proizvedne u *E. coli* BL21 ekspresionom sistemu.
- Himere rBv1a-BLwt, rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 su prečišćene do 95% čistoće.
- Molekulska masa proizvedenih himera je oko 33 kDa.
- Prinos rekombinantnih proteina je 0,5 mg rBv1a-BLwt, 0,3 mg rBv11-BL<sub>H84T</sub> i 0,2 mg rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 na 1 L ekspresionog medijuma.
- Nivo endotoksina nakon uklanjanja iz uzoraka prečišćenih rekombinantnih himera je bio ispod 0,5 ng/mL.
- rBv1a-BLwt himera je dimer u rastvoru.
- rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 himere pokazuju niži afinitet za vezivanje specifičnog IgE antitela u serumima alergičnih pacijenata na polen breze u odnosu na rBv1a-BLwt.

2) Evaluacija imunomodulatornog potencijala rekombinantnih himera:

- rBv1a-BLwt himera zadržala sposobnost rBLwt da stimuliše sekreciju anti-inflamatornog IL-10 citokina *ex vivo* u rezidentnim i tioglikolatom pobuđenim mišijim peritonealnim makrofagima.
- rBv1a-BLwt himera pokazala je smanjenu sposobnost za aktivaciju MPO, oslobađanje NO i indukciju sekrecije pro-inflamatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 u odnosu na rBLwt u *ex vivo* stimulisanim rezidentnim i tioglikolatom pobuđenim mišijim makrofagima.
- Stimulacija THP-1 diferenciranih makrofaga antigenima je pokazala povećanje u lučenju IL-10 anti-inflamatornog citokina nakon tretmana rBLwt, rBL<sub>H84T</sub> i rBv1a-BLwt u odnosu na netretirane ćelije, kao i u odnosu na ćelije tretirane rBv1a antigenom. S druge strane, ni jedan od antigena nije uticao na trend oslobađanja sekretovanih citokina IFN- $\gamma$ /IL-4.
- Sve tri rekombinantne himere stimulišu gensku ekspresiju IL-10 u Caco-2 ćelijama nakon tretmana kokulture Caco-2/THP-1.
- Sve tri himere stimulišu porast u trendu genske ekspresije anti-inflamatornog IL-10 citokina i gensku ekspresiju Th1 citokina IFN- $\gamma$  kod THP-1 makrofaga nakon stimulacije ćelijske kokulture Caco-2/THP-1.
- rBv1a-BLwt himera ostvaruje imunomodulatorni efekat na PBMCs izolovanim iz krvi pacijenata alergičnih na brezu. Ovaj efekat se ogleda u povećanju u trendu izlučivanja anti-inflamatornog citokina IL-10 i povećanju odnosa koncentracija izlučenih IFN- $\gamma$  i IL-4.

Nakon sveobuhvatne analize imunomodulatornog efekta rekombinantnih himera rBv1a-BLwt, rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 na različitim tipovima ćelija urođenog imunskog sistema (THP-1 makrofagima, Caco-2 epitelnim ćelijama i PBMCs izolovanim iz krvi

alergičnih pacijenata na polen breze), zaključujemo da himera rBv1a-BLwt pokazuje najveći terapijski potencijal u kontekstu AIT kod pacijenata alergičnih na polen breze. Osim što ova himera zadržava sposobnost indukcije anti-inflamatornog citokina IL-10, pokazuje i značajno smanjenje proinflamatornog odgovora u poređenju sa referentnim antigenom rBv1a.

Dodatno, u eksperimentima sa kokulturom Caco-2/THP-1 makrofaga, rBv1a-BLwt pokazuje sposobnost indukcije ekspresije IL-10 u epitelnim ćelijama Caco-2 i THP-1 makrofagima, kao i indukciju genske ekspresije IFN- $\gamma$  u THP-1 makrofagima, što ukazuje na njen potencijal u modulaciji imunskog odgovora na nivou MALT.

Naročito je značajno što je rBv1a-BLwt pokazala pozitivan imunomodulatorni efekat i na PBMCs izolovanih iz krvi pacijenata alergičnih na polen breze. Ovaj efekat se manifestuje stimulacijom proizvodnje IL-10 i pomeranju karakteristika citokinskog miljea ka Th1 imunskom odgovoru (porast u odnosu izlučenih IFN- $\gamma$ /IL-4).

Dobijeni rezultati sugerišu da bi himera rBv1a-BLwt mogla da bude ključni kandidat za dalji razvoj kao terapeutik u AIT. Ova himera pruža potencijalno efikasno rešenje za ublažavanje simptoma alergija na polen breze. Takođe, može poboljšati kvalitet života pacijenata. Očigledno je da ova himera nudi izuzetno značajne perspektive za razvoj personalizovane i efikasne terapije alergijskih bolesti, otvarajući put ka novim terapijskim strategijama i unapređenju medicinske prakse u oblasti alergologije.

## 7. Materijal i metode

### 7.1. Bioinformatički alati za *in silico* dizajn rekombinantnih himera rBv1a-BLwt, rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11

Za dizajniranje 3D modela rekombinantnih himera korišćene su kristalne structure deponovane u bazi podataka o proteinima (eng. *Protein data bank-PDB*). Korišćeni su PDB unosi za lektin banane 5EXG [75], mutant BanLeC<sub>H84T</sub> 4PIT [78], glavni alergen polena breze Bet v 1 a 4BK7 [130], kao i za hipoalergen izoformu Bet v 11 1FM4 [37]. Dizajn, vizuelizacija, i molekularno procesovanje je urađeno pomoću Discovery Studio 19.1.0 programa [131]. Kako bi se obezbedio strukturni integritet novodizajniranih himera kombinovano je molekularno modelovanje i molekularna mehanika u smislu zamene pojedinih ostataka, uklanjanja ili dodavanja neophodnih aminokiselina. Nedostajući N- i C- fragmenti su modelovani u konformaciji nasumičnih petlji. Kako bi se prevazišle sterne smetnje između domena u okviru himera uvedeni su linker. Kod rBv1a-BLwt himere konstruisan je glicin-prolin-glicin-prolin (GPGP) linker, dok je kod druge dve himere linker sadržao šest aminokiselinskih ostataka (GPGPGP) kako bi se obezbedile stabilne strukture. Takođe, histidinski tag (6 uzastopnih histidinskih ostataka) je dodat na C terminus kako bi se obezbedilo lakše prečišćavanje proteina pomoću afinitetne hromatografije sa metalom. *In silico* model je dizajniran sklapanjem četiri fragmenata i dodavanje atoma vodonika, nakon čega je usledila minimizacija pune strukturne u NAMD 2.9 [132]) sa CHARMM22 poljem sile [133] u implicitnom modelu vode.

Za *in silico* predviđanje molekulske mase proteina i njihove pI vrednosti korišćen je program dostupan na internetu ExPasy ProtParamTool. U ovaj program je upisana aminokiselinska sekvenca proteina, nakon čega su dobijeni preračuni molekulske mase i pI vrednosti.

### 7.2. Metode tehnologije rekombinante DNK za kloniranje i ekspresiju rekombinantnih proteina

Tokom rada sa mikroorganizmima poštovana su pravila rada u mikrobiološkoj laboratoriji. Sve podloge i rastvori su sterilisani autoklaviranjem tokom 20 min. na 121 °C, i pritisku 103,5 kPa. Rastvori koji su osetljivi na toplotu (štokovi antibiotika, rastvor IPTGa) su sterilisani ceđenjem kroz filter od 0,22 mikrona.

#### 7.2.1. Priprema medijuma za rast mikroorganizama

Luria-Bretani (LB) medijum je pripremljen rastvaranjem 10 g triptona (Institut za virusologiju, vaccine i serume Torlak), 5 g ekstrakta kvasca (Institut za virusologiju, vaccine i serume Torlak), 5 g NaCl (Sigma Aldrich) u 1 L dejonizovane vode. Nakon rastvaranja podešana je pH podloge na 7,4 pomoću 1M rastvora NaOH. Za potrebe pripreme čvrste podloge u LB medijum je pre autoklaviranja dodato 15 g agara (Institut za virusologiju, vaccine i serume Torlak) na 1L tečne podloge.

#### 7.2.2. Priprema rastvora antibiotika

Za pripremu štokova antibiotika korišćene su soli proizvođača Carl Roth GmbH. Štok ampicilina je pripremljen rastvaranjem 100 mg Na-ampicilina u 1 mL dejonizovane vode. Štok kanamicina je pripremljen rastvaranjem 25 mg kanamicina u 1 mL dejonizovane vode, dok je štok hloramfenikola pripremljen rastvaranjem 25 mg hloranfenikola u 1 mL 96% etanola.

Radni rastvori antibiotika su pripremljeni razblaživanjem štokova 1000 puta prohlađenim medijumom.

### 7.2.3. Priprema hemijski kompetentnih DH5 $\alpha$ i BL21 ćelija

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  i BL21 ćelije su zasejane na čvrstu podlogu bez antibiotika za sejanje DH5  $\alpha$  soja i sa ampicilinom (100  $\mu$ g/mL) za sejanje BL21 soja metodom iscrpljenja kako bi se dobila čista kultura mikroorganizama i ostavljene da rastu 16h na 37 °C. Potom je 5 mL LB medijuma bez antibiotika i sa ampicilinom (100  $\mu$ g/mL) inokulisano jednom kolonijom dobijenom metodom iscrpljenja. Prekonoćna kultura je ostavljena 16h na 37 °C, 250 rpm. Prekonoćna kultura je zasejana u 100 mL (u odnosu 200:1) LB medijuma sa odgovarajućim antibioticima i ostavljena na 37 °C, 250 rpm, dok OD 600 (optička gustina na 600 nm) nije dostigla vrednost 0,3 - 0,5. Kultura je zatim ostavljena na ledu 10 minuta kako bi ćelije prestale da rastu. Potom je kultura centrifugirana 10 min na 1600  $\times$  g, 4 °C da bi se sakupile ćelije. Supernatant je odbačen a talog ćelija je resuspendovan u 10 mL hladnog 100 mM CaCl<sub>2</sub> i inkubiran 30 minuta na ledu. Ćelijska suspenzija je ponovo centrifugirana na 1100  $\times$  g, 4 °C tokom 10 minuta. Supernatant je odliven a talog ćelija je resuspendovan u 2 mL hladnog 100 mM CaCl<sub>2</sub> u 10% glicerolu. Ćelije su alikvotirane (po 50  $\mu$ L) u sterilne ependorfe i zamrznute na -80°C.

### 7.2.4. Kloniranje gena *rBv1a-BLwt*, *rBv11-BL<sub>H84T</sub>* i *rBL<sub>H84T</sub>-Bv11* iz *pUC57* vektora u *pET23b* vektor

Kako bi se uspešno uklonili geni iz pUC57-rBv1a-BLwt, pUC57-rBv11-BL<sub>H84T</sub> i pUC-rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 (Synbio Technologies) u pET23b vektor (Synbio Technologies) tretirani su istim parom restrikcionih enzima NdeI i XhoI (Thermo Fisher Scientific). Sastav restrikcione smeše je dat u tabeli 8. Restrikcija je trajala 2h na 37 °C. Nakon završene reakcije isecanja proizvodi su analizirani agaroznom elektroforezom.

**Tabela 9. Sastav restrikcione smeše**

Komponenta	Zapremina
Pufer R	1 $\mu$ L
NdeI	2 $\mu$ L
XhoI	1 $\mu$ L
vektor	6 $\mu$ L

Iz agaroznog gela dobijenog nakon analiziranja digestovanih vektora prečišćeni su pET23b vektor i geni za himere pomoću kompleta za izolovanje DNK iz gela (Thermo Fisher Scientific). Ukratko, agarozni gel u delu gde se nalazi traga odgovarajućeg gena je isečen i rastvoren u adekvatnoj zapremini vezujućeg pufera na temperaturi od 55 °C. Ekstrakt je nanet na kolonu za prečišćavanje nakon čega je kolona isprana puferom za ispiranje kako bi se uklonile nevezane čestice, dok je digestovana DNK eluirana puferom za eluciju. Nakon prečišćavanja određena je koncentracija ekstrahovanog vektora pET23b i gena za rekombiantne proteine na NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) i postavljena je reakcija

ligacije. Ligaciona smeša je pripremljena po tabeli 9 tako da je odnos koncentracija gena prema plazmidu bio 5:1. Ligacija je rađena preko noći na 16 °C.

**Tabela 10. Sastav ligacione smeše**

Komponenta	Zapremina
10 x puffer za ligaciju	1 µL
Prečišćen gen	5 µL
pET23b digestovani vektor	2,5 µL
T4 DNK ligaza	0,5 µL
Dejonizovana voda	1 µL

Po završetku ove reakcije, ligacionom smešom su transformisane *E. coli* DH5a ćelije. Reakcija transformacije je podrazumevala dodatak 4 µL ligacione smeše u odmrznute kompetentne *E. coli* DH5a ćelije. Ćelije su potom ostavljene 30 min. na ledu, a potom je usledio toplotni šok 1 min. 42 °C. Posle toplotnog šoka, ćelije su ostavljene na ledu 5 min. a zatim su resuspendovane u 1 mL LB medijuma i ostavljene 1 h na 37 °C 250 rpm kako bi započela ekspresija gena koji obezbeđuju rezistenciju na antibiotike. Ćelijska suspenzija je potom zasejana na čvrstu podlogu sa ampicilinom i ostavljena je na 37 °C 18h. Kolonijama koje su porasle preko noći su inokulisani LB medijumi sa ampicilinom (5 mL) i gajene su preko noći na 37 °C 250 rpm. Nakon ovoga iz prekonoćne ćelijske kulture izolovani su plazmidi pomoću Plasmid Miniprep kompleta (Thermo Fisher Scientific) po uputstvu proizvođača. Prekonoćne ćelijske suspenzije su centrifugirane kako bi se oborio ćelijski talog. Nakon toga ćelije su resuspendovane dodatkom pufera za resuspendovanje (250 µL), a potom su vorteksovane. U ovakvu ćelijsku suspenziju dodat je razvor za liziranje (250 µL), a potom i rastvor za neutralizaciju (350 µL) uz lagano mešanje. Nakon neutralizacije ćelijska suspenzija je iscentrifugirana (15 min. 13400 rpm) kako bi se plazmidna DNK odvojila od ostalih ćelijskih komponenti (proteina, genomske DNK). Supernatant dobijen centrifugiranjem je dalje prečišćen na silikatnoj koloni ispiranjem puferom koji je sadržao 96% etanol. Nakon koraka taloženja, vezana plazmidna DNK je eluirana sa kolone dodatkom miliQ vode. Izolovani plazmidi su digestovani restrikcionim enzimima NdeI i XhoI nakon čega su analizirani agaroznom elektroforezom.

#### 7.2.5. Ekspresija rekombinantnih himera *rBv1a-BLwt*, *rBv1l-BL<sub>H84T</sub>* i *rBL<sub>H84T</sub>-Bv1l*

Ekspresija rekombinantnih himera je urađena u *E. coli* BL21 RIPL ćelijama. Ćelije su transformisane po prethodno opisanom protokolu. Nakon transformacije, zasejane su prekonoćne kulture jednom od kolonija poraslih na agarnoj ploči. Sutradan je po 100 µL prekonoćne kulture presejan u 300 mL LB medijuma. Ćelijska suspenzija je ostavljena na 37°C, 250 rpm dok OD<sub>600</sub> nije dostigla vrednost 0,6-0,8. Ekspresija je potom indukovana dodatkom 1 mM IPTGa (izo-propil-β-D -tiogalaktozid) i ostavljena 14h na 22 °C, 250 rpm. Alikvoti pre indukovanja ekspresije, kao i po završetku ekspresije su analizirani na SDS-PAGE.



### 7.3. Elektroforetske metode

#### 7.3.1. Metoda agarozne elektroforeze

Agarozna elektroforeza je izvođena na PeqLab PerfectBlue Mini L sistemu u TAE puferu na 1% agaroznom gelu. 50 puta koncentrovani TAE pufer je pripremljen rastvaranjem 242 g Tris-HCl (Sigma Aldrich), 57,1 mL glacijalne sirćetne kiseline (Betahem d.o.o.), 100 mL 0,5 M rastvora EDTA (pH 8,0) i dodatkom dejonizovane vode do 1L. Radni rastvor je pripreman neposredno pre upotrebe razblaživanjem 50 puta dejonizovanom vodom 1% agarozni gel pripremljen u TAE puferu rastvaranjem 1 g agaroze niske elektroendoosmoze (Cleaver Scientific) u 100 mL pufera uz zagrevanje. Agarozni gel je ohlađen na 55 °C nakon čega je u njega dodata boja za vizuelizaciju DNK (PEQ Green u finalnom razblaženju 20000 puta). Gel je izliven u kadicu za elektroforezu i ostavljen da polimerizuje. Uzorci su pripremani mešanjem sa 6 puta koncentrovanom bojom za nanošenje (Thermo Fisher Scientific) tako što je u 10 µL uzorka dodavano 2 µL boje za nanošenje uzorka. Nakon polimerizacije gela, u kadu za elektroforezu je naliven TAE pufer i naneti su uzorci. Elektroforeza je trajala 1h na 80 V. Po završetku elektroforeze vizuelizacija traka je rađena osvetljavanjem UV lampom.

**Tabela 11. Sastav 50 x TAE pufera**

Komponenta	Količina
TRIS	242 g
Sirćetna kiselina	57,1 mL
EDTA (0,5 M rastvor) pH 8,0	100 mL
Dejonizovana voda	842,9 mL

Ovako pripremljen pufer je pre rada razblaživan u odnosu 1:50.

#### 7.3.2. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je izvođena na Hoefer SE 600 Hroma vertikalnom sistemu u puferu za denaturišuću poliakrilamidnu elektroforezu (0,025 M Tris-HCl pH 8,3, 0,192 M glicin, 0,1% SDS). Pripreman je 12% razdvajajući poliakrilamidni gel, kao i 4% koncentrujući gel. Sastav gelova je dat u tabeli 10. Nakon pipetiranja odgovarajućih zapremina (tabela 10), između staklenih ploča razdvojenih distancerima debljine 1 mm prvo je naliven gel za razdvajanje, koji je potom nadslojen zasićenim rastvorom n-butanola. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje n-butanol je ispran dejonizovanom vodom, a naliven je gel za koncentrovanje u koji su uronjeni češljevi kako bi se formirali bunari za nanošenje uzoraka. Po završetku polimerizacije, gel je spakovan u sistem i naliven je pufer za denaturišuću poliakrilamidnu elektroforezu. Uzorci su pripremani mešanjem sa 5 x koncentrovanim puferom za uzorke (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 50% glicerol, 10% SDS, 0,1% brom fenol plavo, 25% β-merkaptotanol) i to 40 µL uzorka je pomešano sa 10 µL 5x koncentrovanog pufera za uzorke. Potom su uzorci kuvani u termobloku (bioSan) na 95 °C 5 min. Po nanošenju uzoraka u bunare gela puštena je elektroforeza. Koncentrovanje uzoraka je izvođeno pri konstantnom naponu od 80 V. Po prelasku uzoraka u gel za razdvajanje napon je pojačan na 120-200 V. Po završetku elektroforeze gel je bojen 5 minuta 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) bojom u 50% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini. Nakon bojenja, gel je ispiran dejonizovanom vodom, nakon čega je obezbojavan u rastvoru 7% sirćetne kiseline.

Tabela 12. Sastav gelova za SDS-PAGE

Komponenta	12% razdvajajući gel	4% koncentrujući gel
30 % rastvor akrilamida	4 mL	0,5 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,94 mL
Dejonizovana voda	3,33 mL	2,25 mL
10% SDS	0,1 mL	0,038 mL
TEMED	0,004 mL	0,002 mL
10 % APS	0,075 mL	0,028 mL

## 7.4. Metode za određivanje koncentracije proteina

### 7.4.1. Bradfordova metoda određivanja koncentracije proteina

Standardi za konstrukciju standardne prave su pripremljeni pomoću BSA. Napravljena je serija razblaženja od 0,1-1 mg/mL za konstruisanje makro standardne krive i 0,01-0,1 mg/mL za konstrukciju mikro standardne krive.

Bradfordov reagens: 0,125% (m/V) CBB G-250, 19% (V/V) etanol, 42,5% fosforna kiselina. Priprema Bradfordovog reagensa je podrazumevala rastvaranje boje i etanola uz postepeno dodavanje dejonizovane vode i fosforne kiseline. Nakon rastvaranja reagens je proceđen kroz filter papir dok se nije dobila braon boja reagensa. Za određivanje koncentracije proteina korišćene su makro metoda za koncentracije u opsegu 0,1-1 mg/mL i mikro metoda za opseg koncentracija 0,01-0,1 mg/mL. Za određivanje koncentracije makro metodom korišćeno je 5 µL uzorka koje je mešano sa 200 µL Bradfordovog reagensa, sa druge strane za određivanje koncentracije mikro metodom odmeravano je 20 µL uzorka i 200 µL reagensa u bunare mikrotitar pločice od 96 bunara. Nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku merena je apsorbancija na talasnoj dužini 620 nm korišćenjem čitača za mikrotitar pločice LKB Micro plate reader 5060-006 (GDV, Rim, Italija). Slepa proba je pripremana mešanjem 5, odnosno 20 µL dejonizovane vode sa 200 µL reagensa. Sva merenja su urađena u triplikatu.

### 7.4.2. Određivanje koncentracije proteina merenjem $A_{280}$

Za određivanje koncentracije proteina merenjem apsorbance na 280 nm korišćeni su samo uzorci koji su sadržali prečišćen protein. Uzorci su mereni na spektrofotometru (Lab Logistics Group GmbH, Mekenhajm, Nemačka) uz prethodno oduzimanje slepe probe (pufera u kom se uzorak nalazi). Nakon merenja  $A_{280}$  kako bi se odredila koncentracija proteina primenjen je Lambert-Beerov zakon:

$$A_{280} = a \times b \times c$$

Gde su:

a-ekstencioni koeficijent određen za svaki protein pojedinalno,

b-pređeni put svetlosti i za kivetu koja je korišćena iznosi 1 cm,

c-koncentracija mol/L.

Kako bi se koncentracija izrazila u mg/mL, dobijena molarna koncentracija je pomnožena sa molekulskom masom određenom za svaki protein.

$$[\text{mg/mL}] = c [\text{mol/L}] * M_w$$

## 7.5. Metode prečišćavanja rekombinantnih himera

### 7.5.1. Prečišćavanje rekombinantne himere rBv1a-BLwt

Sephadex G-75 matriks je umreženi dekstran (razgranati  $\alpha$ -1,6 i  $\alpha$ -1,3 polimer glukoze) i tradicionalno se koristi kao matriks za gel filtraciju. Kako lektin banane specifično prepoznaje glukozu afinitetno se vezuje za ovaj matriks. Rekombinantna himera rBv1a-BLwt je prečišćena afinitetno na ovom matriksu. Čelijska suspenzija nakon ekspresije je centrifugirana, a potom resuspendovana u puferu za liziranje (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% triton-X-100 pH 7,8, tabela 11). Nakon toga čelijski sadržaj je oslobođen sonikacijom ultrazvučnom sondom (10x 10 s na 30 W). Dobijena suspenzija je centrifugirana 10 min. 13400 rpm i analiziran je sadržaj rastvora i taloga na SDS-PAGE. Kako se protein nalazio u citosolu u rastvorenoj formi supernatant je korišćen za dalji rad. Sephadex G-75 matriks je ekvilibrisan puferom za ekvilibraciju (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,8 tabela 12) u baču (1 h na sobnoj temperature uz blago mešanje). Potom je uzorak proteina vezivan za matriks takođe u baču (1 h na sobnoj temperature uz blago mešanje). Elucija proteina je rađena na sobnoj koloni sa protokom 1 mL/min. Nevezani proteini su eluirani puferom za ekvilibraciju, dok su vezani proteini eluirani puferom za eluciju (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 M glukoza pH 7,8 tabela 13). Prečišćavanje proteina je praćeno spot testom.

**Tabela 13. Pufer za liziranje ćelija**

Komponenta	Količina
Tris	2,4 g
NaCl	8,7 g
Triton-X-100	0,1 mL
Dejonizovana voda	1 L

**Tabela 14. Pufer za ekvilibraciju Sephadex G-75 matriksa**

Komponenta	Količina
Tris	2,4 g
NaCl	8,7 g
Dejonizovana voda	1 L

**Tabela 15. Pufer za eluciju vezanih proteina na Sephadex G-75 matriksu**

Komponenta	Količina
Tris	2,4 g
NaCl	8,7 g
Glukoza	90 g
Dejonizovana voda	1 L

### 7.5.2. Prečišćavanje rekombinantnih himera rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11

Ćelijske suspenzije nakon ekspresije rekombinantnih proteina rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 su centrifugirane, nakon čega su resuspendovane u puferu za liziranje (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% triton-X-100 pH 7,8, tabela 11). Nakon toga usledilo je liziranje ćelija sonikacijom ultrazvučnom sondom (10 x 10 s na 30 W). Dobijene suspenzije su centrifugirane 10 min. 13400 rpm i analizirani su njihovi sadržaji u rastvoru i talogu na SDS-PAGE. Oba proteina su se eksprimirala u formi nerastvornih inkluzionih tela. Inkluzionna tela su ispirana 3x puferom za liziranje, potom puferom za lizu koji nije sadržao nejonski detergent Triton-X-100 i na kraju su rastvorena u puferu koji je sadržao 6M ureu (tabela 14). Kakos u oba proteina označena histidinskim tagom prečišćavana su hromatografijom sa metalom. Prečišćavanje je rađeno na komercijalnoj HiTrap IMAC HP koloni zapremine 1 mL na AKTA Purifier 10 sistemu (GE Healthcare, Upsala, Švedska). Ekvilibracija i elucija su rađene pri brzini protoka od 1 mL/min i pritisku od 0,5 MPa. Kako je hromatografija rađena u denaturišućim uslovima, svi puferi su sadržali 6M ureu. Kolona je ekspilibrisana sa 5 kolonskih zapremina pufera za ekvilibraciju (20 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl, 6 M urea, pH 7,8 tabela 14). Uzorak je nanet brzinom 1 mL/min pri pritisku od 0,5 MPa. Eluiranje nevezanih frakcija je urađeno sa puferom za ekvilibraciju dok je pufer za eluciju vezanih frakcija bio 20 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl, 6 M urea, 300 mM imidazol pH 7,8 (tabela 16).

**Tabela 16. Pufer za rastvaranje inkluzionih tela i pufer za ekvilibraciju**

Komponenta	Količina
Tris	2,4 g
NaCl	8,7 g
Urea	360,36 g
Dejonizovana voda	1 L

**Tabela 17. Pufer za eluciju vezanih proteina sa IMAC kolone**

Komponenta	Količina
Tris	2,4 g
NaCl	8,7 g
Urea	360,36 g

imidazol	20,42 g
Dejonizovana voda	1 L

## 7.6. Uklanjanje endotoksina iz uzoraka i određivanje njegove koncentracije

### 7.6.1. Uklanjanje endotoksina na matriksu sa vezanim $\epsilon$ -poli-L-lizinom

Za uklanjanje endotoksina iz uzoraka prečišćenih proteina korišćena su zrna visokog kapaciteta bazirana na celulozi kuplovanj sa  $\epsilon$ -poli-L-lizinom (Thermo Scientific™ Pierce™). Za postupak je korišćeno uputstvo proizvođača. Ukratko, zrna su regenerisana inkubacijom u 0,2 N NaOH u 95% etanolu tokom noći. Sutradan su zrna isprana sa kolonskih zapremina 2 M NaCl, potom sa 5 kolonskih zapremina sterilne dejonizovane vode. Nakon ispiranja, zrna su ekvilibrisana sa 5 zapremina sterilnog PBSa. Po završetku ekvibracije, nanet je uzorak, nakon čega je sakupljena protočna frakcija i matriks je ispran sa još 2 kolonske zapremine pufera. U sakupljenim uzorcima je određena koncentracija endotoksina.

### 7.6.2. Određivanje koncentracije endotoksina

Koncentracija endotoksina u uzorcima nakon njegovog uklanjanja je određena pomoću Hromogenog paketa za određivanje koncentracije endotoksina (Thermo Scientific™ Pierce™). Određivanje koncentracije je rađeno po uputstvu proizvođača. Mikrotitar ploča je preekvilibrirana zagrevanjem na 37 °C. Dodato je 50  $\mu$ L uzorka ili standardnog rastvora po bunaru mikrotitar pločice. Dok je pločica bila na 37 °C dodato je 50  $\mu$ L reagensa za liziranje i započeto je merenje vremena. Nakon naznačenog vremena za niže odnosno više standarde dodat je hromogeni supstrat prethodno zagrejan na 37 °C (100  $\mu$ L/bunar). Pločica je inkubirana 6 min. na 37 °C. Nakon isteka 6 min. dodato je 50  $\mu$ L reagensa za zaustavljanje reakcije i očitana je absorbanca na 405 nm. Na osnovu standardne prave određena je koncentracija endotoksina nakon uklanjanja.

## 7.7. Instrumentalne metode za karakterizaciju proteina

### 7.7.1. Gel-filtracija za određivanje molekulske mase

Gel-filtracija je rađena kako bi se utvrdila molekulska masa i broj subjedinica nativnog proteina. Hromatografija je urađena na Superdex 75 PC 3.2/30 koloni ( $V=2,4$  mL, GE Healthcare) na AKTA Purifier 10 sistemu (GE Healthcare). Ekvibracija i elucija proteina sa kolone su rađene u istom puferu (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,3 M glukoza pH 7,8 tabela 16). Kolona je ekvilibrisana propuštanjem dve kolonske zapremine pufera brzinom 0,02 mL/min i pritisku od 2,4 MPa. Nakon ekvibracije naneto je 10  $\mu$ L uzorka proteina u istom puferu koncentracije 0,5 mg/mL. Standardna prava je dizajnirana propuštanjem standardnih rastvora proteina pri istim uslovima. Standardni rastvori proteina su pripremani rastvaranjem komercijalnih proteina u puferu u koncentraciji 0,5 mg/mL. Korišćeni su sledeći standardi proteina: BSA (66,5 kDa) (Serva Electrophoresis GmbH), ovalbumin (OVA 43 kDa) (Merck KGaA) and lysozyme (14.4 kDa) (Merck KGaA).

**Tabela 18. Pufer za gel-filtraciju**

Komponenta	Količin
------------	---------

	a
Tris	2,4 g
NaCl	8,7 g
Glukoza	54 g
Dejonizovana voda	1 L

### 7.7.2. CD spektroskopska analiza sekundarnih struktura proteina

Cirkularni dihroizam (CD) je sniman kako bi se odredile sekundarne structure prisutne u uzorku proteina. CD spektar je sniman na 25 °C na Jasco J-815 A spektrofotometru (Jasco). Uzorak (1 mg/mL) je pripremljen dijalizom naspram dejonizovane vode. Snimanje je urađeno u dalekoj UV oblasti (180-260 nm) u kiveti širine 0,5 mm. Podaci su snimani brzinom 50 nm/min. Finalni spektar je dobijen kao prosečna vrednost akumulacije tri snimljena spektra nakon oduzimanja vrednosti same dejonizovane vode kao slepe probe.

## 7.8. Imunološke metode za karakterizaciju rekombinantnih himera

Odobrenje za korišćenje biološkog materijala humanog porekla je dobijeno od Etičkih komisija Univerzitetske dečije klinike Tiršova Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i Instituta za virusologiju, serume i vakcine Torlak.

### 7.8.1. Izolovanje seruma alergičnih pacijenata

Serumi alergičnih pacijenata neophodnih za imunološku karakterizaciju rekombinantnih proteina su dobijeni u saradnji sa dr. Marinom Atanasković-Marković (Univerzitetska dečja klinika Tiršova- Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija) i dr. Gordana Blagojevića (Institut za imunologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd, Srbija). Svi serumi su dobijeni iz pune krvi dobrovoljnih davaoca koji imaju kliničku istoriju alergije na polen breze. Serumi su dobijeni iz venske krvi koja je izvađena u vakutaner koji ne sadrži antikoagulanse, ali sadrži gel za razdvajanje krvnih ćelija od serum ai krvnog ugruška. Nakon vađenja krvi u ovaj tip vakutanera ona je ostavljena 30 min. na 4 °C nakon čega je centrifugirana na 3000 rpm. 20 min. Bistra žuta tečnost dobijena nakon centrifugiranja predstavlja serum. Ovako dobijen serum je inkubiran 10 min. na 56 °C kako bi se inaktivirao komplement, nakon čega je alikvotiran u manje zapremine u čuvan na -20 °C do dalje upotrebe.

### 7.8.2. Immunoblot za proveru IgE reaktivnosti

Kako bi se ispitala IgE reaktivnost rekombinantne himere rBv1a-BLwt ovaj protein je transferovan na nitroceluloznu membranu (NC) elektrotransferom polu-suvom metodom. Rastvor proteina je razdvojen SDS-PAGE elektroforezom. Po završetku elektroforeze sklopljen je sendvič (redosled od anode ka katodi: Watmann papir-nitrocelulozna membrana- SDS-PAGE gel- Watmann papir) u Towbinovom puferu (tabela 17). Transfer je trajao 45 min. uz jačinu struje 2 mA/cm<sup>2</sup> gela. Uspešnost transfera je proverena bojenjem NC membrane bojom Ponceau S (1% rastvor Ponceau S u 7% sirćetnoj kiselini).

#### **Tabela 19. Towbinov pufer za transfer proteina na NC membranu**

Komponenta	Količina
Tris	2,9 g
Glicin	1,45 g
SDS	0,185 g
Methanol	100 mL
Dejonizovana voda	500 mL

Po završetku transfera i detekcije proteina na membrane membrana je isečena na diskretne trake širine 3 mm. Za immunoblot korišćeni su sledeći rastvori: TBS (trisom puferisan fiziološki rastvor, tabela 18), tTBS (0,02% Tween u TBSu), 1% BSA u tTBS, pufer za alkalnu fosfatazu (100 mM TRIS, pH 9,6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, tabela 19), supstrati za alkalnu fosfatazu BCIP (5-bromo-4-hloro-3-indolil-fosfat, 50 mg/mL u dejonizovanoj vodi tabela 20) i NBT (nitro-blue-tertrazolijum 50 mg/mL u dimetilformamidu tabela 20).

**Tabela 20. Trisom puferisan fiziološki rastvor**

Komponenta	Količina
Tris	3,63 g
NaCl	9 g
Dejonizovana voda	1L

**Tabela 21. Pufer za alkalnu fosfatazu**

Komponenta	Količina
Tris	1,21 g
MgCl <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Dejonizovana voda	100 mL

**Tabela 22. Supstrati za alkalnu fosfatazu BCIP i NBT**

BCIP		NBT	
Komponenta	Količina	Komponenta	Količina
BCIP	50 mg	NBT	50 mg
Dejonizovana voda	1 mL	Dimetil formamid	1 mL

Smeša radnog rastvora je pripremljena neposredno pre upotrebe mešanjem 66  $\mu$ L NBT i 33  $\mu$ L BCIP u 10 mL pufera za alkalnu fosfatazu.

Sve trake sa transferovanim proteinom su tretirane po postupku opisanom ispod:

1. Blokiranje 1% BSA u tTBSu, 1 h, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
2. Ispiranje tTBS, 3 x 10 min, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
3. Inkubacija sa pojedinačnim serumima alergičnih pacijenata (svi uzorci razblaženi TBSom tako da je finalna koncentracija specifičnog IgE 6 kU/L), preko noći, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
4. Ispiranje tTBS, 3 x 10 min, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
5. Inkubacija sa monoklonskim anti-IgE antitelom obeleženim alkalnom fosfatazom (Sigma Aldrich) razblaženim po uputstvu proizvođača, 1h, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
6. Ispiranje tTBS, 3 x 10 min, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
7. Ispiranje TBS 1 x 10 min, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
8. Detekcija je rađena dodatkom precipitirajućeg supstrata za alkalnu fosfatazu do pojave ljubičastog taloga na 37°C, nakon čega je reakcija stopirana ispiranjem membrane dejonizovanom vodom.

### 7.8.3. ELISA inhibicija

ELISA inhibicija je korišćena kako bi se uporedila IgE reaktivnost hipoalergenog Bet v 11 i rekombinantnih himera koje sadrže hipoalergeni Bet v 11 (rBv11-BL<sub>H84T</sub> i rBL<sub>H84T</sub>-Bv11) sa proalergenim Bet v 1a i himerom koja sadrži proalergeni Bet v 1 a (rBv1a-BLwt). Proteini su kuplovani za mikrotitar pločicu rastvaranjem u puferu za kuplovanje (50 mM karbonatno-bikarbonatni pufer pH 9,6, tabela 22). Korišćeni su isti rastvori kao za immunoblot osim rastvora supstrata za alkalnu fosfatazu. Za detekciju u ELISA korišćen je p-nitrofenilfosfat (pNPP) kao supstrat (1 mg/mL) u puferu za alkalnu fosfatazu (tabela 23).

**Tabela 23. Pufer za kuplovanje**

Komponenta	Količina
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,159 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,293 g
Dejonizovana voda	100 mL

**Tabela 24. Supstrat za alkalnu fosfatazu pNPP**

Komponenta	Količina
pNPP	1 mg
Pufer za alkalnu fosfatazu	1 mL

ELISA inhibicija je urađena po postupku opisanom ispod:



1. Za ELISA pločicu je kuplovano 1  $\mu\text{g}$  proteina po bunaru (rBv1a ili rBv1a-BLwt) u puferu za kuplovanje preko noći na 4 °C.
2. Ispiranje tTBS, 3 x 10 min, sobna temperatura.
3. Blokiranje 1% BSA u tTBSu, 1 h, sobna temperatura, mešanje 100 rpm.
  - a. Paralelno sa blokiranjem postavljeno je inkubiranje pula seruma alergičnih pacijenata na polen breze sa odgovarajućim količinama rBv11, rBv11-BL<sub>H84T</sub> ili rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 (10 ng - 100 ng po bunaru), 1h na sobnoj temperaturi uz mešanje 100 rpm.
4. Ispiranje tTBS, 3 x 10 min, sobna temperatura.
5. Inkubacija sa pulom alergičnih pacijenata i inhibitora (u bunare kuplovane rBv1a dodata je smeša sa rBv11 kao inhibitorom, dok je u bunare kuplovane sa rBv11-BLwt dodata smeša sa rBv11-BL<sub>H84T</sub> ili rBL<sub>H84T</sub>-Bv11 kao inhibitorima.
6. Inkubacija sa monoklonskim anti-IgE antitelom obeleženim alkalnom fosfatizom (Sigma Aldrich) razblaženim po uputstvu proizvođača, 1h, sobna temperatura. rpm.
7. Ispiranje tTBS, 3 x 10 min, sobna temperatura.
8. Ispiranje TBS, 3 x 10 min, sobna temperatura.
9. Detekcija je rađena dodatkom rastvorljivog supstrata za alkalnu fosfatazu 30 min. na 37°C, nakon čega je izmerena apsorbanca na 405 nm (A<sub>405</sub>).

## 7.9. *Ex vivo* tretman mišijih peritonealnih makrofaga

Funkcionalni testovi rekombinantne himere rBv1a-BLwt su izvedeni na peritonealnim mišijim makrofagima izolovanim iz BALB/c soja miševa. Svi eksperimenti su urađeni u skladu sa zakonom Republike Srbije i evropske regulative za dobrobit životinja. Dozvola za rad na životinjama je dobijena od Etičke komisije Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

### 7.9.1. *Izolovanje mišijih peritonealnih makrofaga*

Makrofagi su prikupljeni iz peritonealne šupljine miševa. Rezidentni makrofagi (RM) su dobijeni ispiranjem peritonealne šupljine sa po 5 mL sterilnog, hladnog PBSa, nakon čega su isprani 2 puta RPMI 1640 medijumom (Sigma Aldrich) uz dodatak 5% FBSa. Makrofagi pobuđeni tioglikolatom (TGM) su dobijeni na isti način kao i RM iz miševa kojima je 4 dana ranije ubrizgan 1 mL 3% tioglikolatomnog medijuma. Vijabilnost dobijenih ćelija je procenjena bojenjem tripan plavim.

### 7.9.2. *Stimulacija mišijih peritonealnih makrofaga*

Izolovani RM i TGM su zasejani u mikrotitar ploču od 24 bunara u koncentraciji 1 x 10<sup>6</sup> ćelija /mL, 1 mL po bunaru. Ćelije su ostavljene tokom 24 h na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> kako bi se zalepile za dno bunara mikrotitar ploče. Sutradan su ćelije koje se nisu zalepile isprane RPMI 1640 (prethodno zagrejanim na 37 °C). Svež RPMI 1640 koji je sadržao stimulator (rBLwt, rBv1a, rBv1a-BLwt) u odgovarajućoj količini je dodat u bunare (1 mL po bunaru). Svi stimulatori su testirani u tri koncentracije: 13,7 nM (ekvivalentno 0,20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBLwt, 0,26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a i 0,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a-BLwt), 68,6 nM (ekvivalentno 1,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBLwt, 1,28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a i 2,29  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a-BLwt), i 342,9 nM (ekvivalentno 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBL, 6,40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a i 11,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a-BLwt). Po pet uzoraka RM i TGM (n=5) je stimulirano svakim stimulatorom u definisanoj količini. Po pet uzoraka RM i TGM je tretirano samo RPMI 1640 medijumom kao kontrolom. Uzorci su inkubirani 48 h na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

## 7.10. Diferencijacija i tretman THP-1 makrofaga

### 7.10.1. Održavanje THP-1 monocita u ćelijskoj kulturi

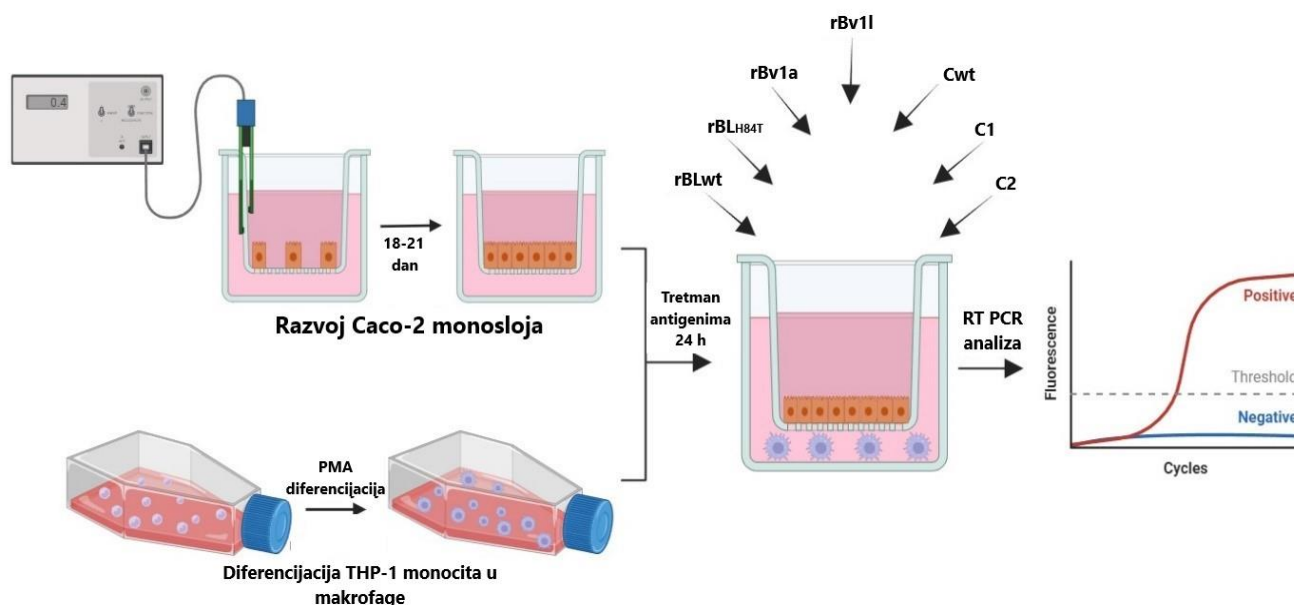
THP-1 monociti su gajeni u suspenziji u boci za ćelijsku kulturu (površine 75 cm<sup>2</sup>, T-75) u hranljivoj podlozi RPMI-1640 sa dodatkom 10% FBSa, 1% penicilinom/streptomycinom (Gibco) i 1% L-glutaminom (Gibco). Hranljivi medijum je menjan svaka 2-3 dana. Nakon što je broj ćelija u flasku dostigao  $8 \times 10^5$  ćelija/mL ćelije su pasažirane. Pasažiranje THP-1 monocita je podrazumevalo centrifugiranje ćelijske suspenzije 5 min. na 300 x g, nakon čega je ćelijski talog resuspendovan u 1 mL medijuma. Ćelijska koncentracija je određena brojanjem ćelija u hemocitometru, nakon razblaživanja 50 x u PBSu. Nakon brojanja ćelije zasejane u flask u koncentraciji  $0,2 \times 10^5$  ćelija/mL u 10 mL medijuma koji se sastojao od 30% starog i 70% svežeg medijuma. Dodatak izvesnog procenta starog medijuma je neophodan jer se u njemu nalaze hormoni i faktori rasta koje su ove ćelije izlučile i koje potpomažu njihov rast nakon pasažiranja.

### 7.10.2. Diferencijacija THP-1 monocita u makrofage

THP-1 monociti ( $0,12 \times 10^6$  ćelija/bunar) su diferencirani sa 100 ng PMA (forbol-12-miristat-13-acetat) u mikrotitar ploči od 48 bunara i inkubirani tokom 24 h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Nakon toga PMA je ispran PBSom 2 x i ćelije su tokom 24 h gajene u kompletnom RPMI-1640 medijumu kako bi se dovršila njihova diferencijacija. Nakon diferencijacije, dobijeni makrofagi su tretirani antigenima u koncentraciji 342,9 nM tokom 24 h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Po isteku ovog vremena supernatanti su sakupljeni pažljivo kako se ne bi pokupile zalepljene ćelije i analizirani sendvič ELISA metodom kako bi se odredila koncentracija izlučenih IL-4, IL-10 i IFN- $\gamma$  u medijumu.

## 7.11. Razvoj i tretman kokulture Caco-2/THP-1 makrofaga

Za potrebe uspostavljanje ćelijske kokulture korišćene su dve besmrtno ćelijske linije Caco-2 ćelije (ćelijska linija humanog epitelnog kolorektalnog adenocarcinoma) i THP-1 monociti (ćelije humane akutne leukemije). Oba tipa ćelija su kupljena od ATCC (zbirka američke tipične culture- *eng. American Type Cell Culture*). Hranljive podloge korišćene za rad, kao is vi neophodni rastvori su čuvani u frižider, a pre rada su zagrevane u vodenom kupatilu na 37 °C. Ćelije su gajene na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Sav rad sa ćelijskim kulturama je obavljan u sterilnoj komori, sa sterilnim posuđem i plastikom.



Slika 44. Shematski prikaz uspostavljanja ćelijske kokulture

### 7.11.1. Održavanje ćelijskih kultura Caco-2 i THP-1

Caco-2 ćelije su gajene kao zalepljeni ćelijski monosloj u boci za kulturu ćelija (površine 75 cm<sup>2</sup>, T-75) u hranljivoj podlozi EMEM (Erlov minimalni esencijalni medijum-*eng. Eagle's minimal essential medium*) sa dodatkom 20 % FBSa, 1 % penicilina/streptomicina (Gibco) i 1 % L-glutaminom (Gibco). Hranljivi medijum je menjan svaka 2-3 dana dok ćelije nisu porasle tako da zauzimaju 80-90% površine boce za kulturu ćelija (uspostavljanja konfluencije). Ćelije su potom pasažirane po sledećem protokolu:

1. Odbačen je medijum iz boce za gajenje ćelija.
2. Ćelije su isprane PBSom tako da se potpuno prekrije ćelijski monosloj rastvorom.
3. Ćelije su inkubirane u rastvoru tripsin-EDTA 5 - 15 min. na 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Ćelije su sakupljene u tubu od 15 mL koja je dopunjena kompletnim medijumom kako bi se inhibirala aktivnost tripsina.
5. Ćelijska suspenzija je centrifugirana 5 min. na 300 x g.
6. Ćelijski talog je resuspendovan u 1 mL svežeg hranljivog medijuma.
7. Ćelije su izborjane korišćenjem hemocitometra.
8. U novi flask je zasejano 0,2 x 10<sup>6</sup> ćelija, koje su potom gajene na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> do ponovnog uspostavljanja konfluencije.

Ćelije u pasažama 25-35 su korišćene za eksperimente.

THP-1 monociti su gajeni u suspenziji po protokolu opisanom u 7.8.1.

### 7.11.2. Uspostavljanje ćelijske kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi

Za uspostavljanje ćelijske kokulture Caco-2 ćelije su zasejane sa apikalne strane polupropustljivog (porozna membrana 0,4 μm) migracionog umetka za bunare (0,1 x 10<sup>5</sup> ćelija po bunaru) za mirkotitar pločicu od 24 bunara (Thermo Fisher Scientific). Ćelije su gajene 18-21 dan kako bi se uspostavio konfluentan monosloj. Sa apikalne strane je dodavan kompletni EMEM medijum, dok je sa bazolateralne strane postepeno uvođen kompletan RPMI-1640 medijum (tabela 7). Tokom tog perioda praćen je transepitelni električni otpor (TEER)

upotrebom Milicell-ERS Volt-Ohm-metar (Millipore). Polupropustljivi migracioni umetci sa ćelijskim monoslojem čiji je TEER bio veći od  $400 \Omega\text{cm}^2$  su korišćene za uspostavljanje kokulture.

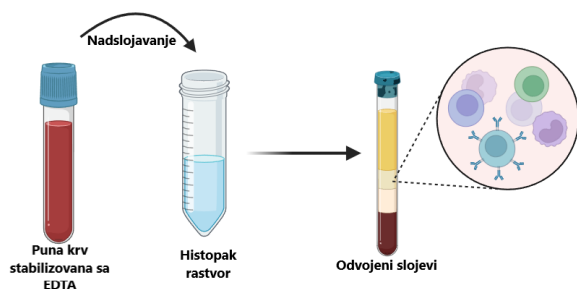
THP-1 monociti su diferencirani po protokolu opisanom u 7.8.2. Nakon diferencijacije, makrofagi su nadslojeni Caco-2 ćelijama na polupropustljivim migracionim umetcima. TEER je meren nakon 4 h, 24 h i 48 h od uspostavljanja kokulture kako bi se proverio uticaj THP-1 makrofaga na integritet epitelnog monosloja. Kokultura u kojoj izmereni TEER nije opao više od 90% tokom prvih 48 h i kojoj se TEER vratio na više od 95 % je smatrana stabilno uspostavljenom kokulturom i korišćena je za dalji rad.

### **7.11.3. Stimulacija kokulture Caco-2/THP-1 makrofagi antigenima**

Nakon uspostavljanja stabilne kokulture, medijum sa bazolateralne strane je zamenjen svežim kompletnim RPMI-1640 medijumom. Sa apikalne strane na Caco-2 ćelije je dodat EMEM medijum sa antigenima u koncentraciji 342,9 nM (što odgovara sledećim koncentracijama: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBLwt i rBL<sub>H84T</sub>, 6,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a i rBv1l, i 11,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cwt, C1, C2). Ćelijski tretman je trajao 24 h na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. TEER je izmeren pre ćelijskog tretmana i nakon završetka 24 h. Po završetku tretmana supernatanti su odbačeni a Caco-2 epitelne ćelije i THP-1 makrofagi su korišćeni za analizu genske ekspresije.

## **7.12. Izolovanje i tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi**

Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMCs) su izolovane iz pune krvi četiri pacijenta alergična na polen breze (pacijenti 8-11, tabela 4). Regrutovanje volontera za ovu studiju obezbedio je dr Gordan Blagojević (Instituta za virusologiju, vaccine i serume Torlak u Beograd, Srbija). Puna krv je dobijena venskom punkcijom i sakupljanjem u vakutaner sa EDTA kao antikoagulacionim sredstvom. Nakon sakupljanja krvi, vakutaner je promešan izvrtnjem nekoliko puta kako bi se sprečila koagulacija. Postupak za izolovanje PBMCs (slika 45.) je podrazumevao upotrebu Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich) rastvora za obezbeđivanje koncentracionog gradijenta. Puna krv je razblažena 2 puta fiziološkim rastvorom (0,9 % NaCl u dejonizovanoj vodi) nakon čega je nadslojena Histopaque®-1077 reagensom (puna krv 2 x razblažena: Histopaque®-1077=2:1). Uzorci su centrifugirani na 400 x g 30 min. na sobnoj temperaturi uz ugašenu kočnicu centrifuge. Pažljivo je uklonjena krvna plazma, pa međusloj u kome se nalaze PBMCs. PBMCs su isprane 2x PBS-om 300 x g 4°C. Nakon ispiranja ćelije su izbrojane i razbažene na  $1 \times 10^6$  ćelija/mL u kompletnom RPMI-1640 medijumu bez FBS-a. Ćelije su zasejane u mikrotitar pločicu od 96 bunara (200  $\mu\text{L}$ ) i dodati su antigeni u RPMI-1640 medijumu u koncentraciji 342,9 nM što odgovara sledećim koncentracijama: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBLwt i rBL<sub>H84T</sub>, 6,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rBv1a i rBv1l, i 11,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Cwt, C1, C2 i ostavljene na 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Nakon 48 h stimulacije skupljeni su supernatanti. Kako bi se uklonile ćelije uzorci su centrifugirani 10 min. x 13400 rpm. Ćelijski talog je odbačen nakon centrifugiranja, a supernatanti su sačuvani na -80 °C za dalju analizu ELISA sendvič esejom.



Slika 45. Shematski prikaz izolovanja PBMCs iz pune krvi pomoću Histopak rastvora.

### 7.13. Određivanje aktivnosti mijeloperoksidaze nakon tretmana mišijih makrofaga

Aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) je određena u mikrotitar ploči od 96 bunara. Svi prethodno opisani rastvori (ćelijsk suspenzija, RPMI 1640 medijum sa ili bez antigena) su dodati u zapremini 100  $\mu\text{L}$  po bunaru. Nakon završetka 48 h inkubacije na 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , supernatanti su odbačeni a ćelijski talog je ispran dva puta sa po 200  $\mu\text{L}$  na 37  $^{\circ}\text{C}$  zagrejanog PBSa, nakon čega je sledilo centrifugiranje 5 min. 250 g. Ćelije su potom lizirane dodatkom 50  $\mu\text{L}$  0,1% Triton-X-100 u PBSu koji je sadržao inhibitore proteazne aktivnost, nakon čega su mešane 30 min. na sobnoj temperature. Enzimska aktivnost je merena u ćelijskom lizatu. Reakcija je zasnovana na oksidaciji *o*-fenilendiamina (OPD, Merck KGaA). OPD rastvor (1 mg/mL OPD, 0.01 % vodonik peroksid, 50 mM limunska kiselina, pH 5, tabela 24) je dodat u bunare. Reakcija je trajala 30 min. na sobnoj temperaturi, a potom je zaustavljena dodatkom 1 M sumporne kiseline. Izmerena je absorbanca na talasnim dužinama 492/620 nm ( $A_{492/620}$ ) na ELISA čitaču (Multiskan Ascent, Labsystems).

Tabela 25. OPD rastvor

Komponenta	Količina
OPD	100 mg
30 % vodonik peroksid	0,033 mL
Limunska kiselina	0,96 g
Dejonizovana voda	100 mL

### 7.14. Određivanje proizvodnje azot (II) oksida nakon tretmana mišijih makrofaga

Proizvodnja NO je određena kao indirektni pokazatelj aktivnosti azot oksid sintaze. NO je određen upotrebom Grisovog reagensa (0,2 % rastvor naftiletildiamin-dihlorid i 2 % sulfanilamid u 5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pomešani u jednakim zapreminama) po prethodno opisanom protokolu [134]. Reakcija se zasniva na detekciji oslobođenih nitrita  $\text{NO}_2^-$  koji u reakciji sa Grisovim reagenskom daje roze obojeno jedinjenje čija se absorbancija meri na 545 nm. Supernatanti nakon tretmana mišijih makrofaga su prebačeni u mikrotitar pločicu od 96 bunara (50  $\mu\text{L}$  po bunaru) nakon čega je dodat Grisov reagens (50  $\mu\text{L}$  po bunaru). Nakon 10 min.

očitanja je A<sub>545</sub>. Koncentracija nitritnih jona u uzorcima je određena na osnovu standardne prave konstruisane pomoću NaNO<sub>2</sub> poznate koncentracije.

## 7.15. Određivanje genske ekspresije citokina PCRom u realnom vremenu

### 7.14.1. Izolovanje ukupne RNK iz ćelija

Za izolovanje RNKA iz ćelija korišćena je plastika označena kao čista od DNAza i RNAza (*eng. DNase/RNase free*) kako ne bi došlo do gubitka željenog molekula. Za određivanje genske ekspresije pro- i anti-inflamatornih citokina izolovana je ukupna RNK iz ćelija koje su gradile ćelijsku kokulturu. Izolovanja su posebno urađena iz Caco-2 ćelija, a posebno iz THP-1 makrofaga. Za izolovanje ukupne RNK korišćen je TRI® reagens (Sigma Aldrich). Na 10 cm<sup>2</sup> suda u kom se nalaze ćelije je dodato 1 mL reagensa. Ćelije su lizirane resuspendovanjem u reagensu pomoću automatske pipete. Nakon toga, ćelijski lizat je pomešan sa 0,2 mL hloroforma po mL dodatog TRI® reagensa. Ćelije su promešane nakon čega su ostavljene 2-15 min. na sobnoj temperaturi. Smeša je potom centrifugirana 15 min. na 12000 x g na 4 °C. Nakon centrifugiranja razdvojile su se tri faze: donja, crvena hloroformska faza koja sadrži denaturisane ćelijske proteine, međufaza koja sadrži genomsku DNK ćelija i gornja vodena faza u kojoj se nalazi ukupna RNK od interesa. Vodeni sloj je prebačen u novu sterilnu ependorf tubu i pomešan sa 2-propanolom (0,5 mL na 1 mL TRI® reagensa) nakon čega je promešan izvrtanjem ependorf tuba. Smeša je ostavljena 10 min. na sobnoj temperaturi nakon čega je centrifugirana na 12000 x g na 4 °C. Odliven je supernatant i ependorfi su ostavljeni 45 min. da se osuše na vazduhu. Talog RNK je rastvoren u 20 µL miliQ vode. Koncentracija i čistoća izolovane RNK su određene merenjem na NanoDrop-u<sup>TM</sup> (Thermo Scientific). Čistom, prečišćenom RNK su smatrani uzorci za koje je odnos absorbanci na 260 i 280 (A<sub>260/280</sub>) iznosio približno 2. Dobijena RNK je čuvana na -80 °C.

### 7.15.2. Lančana reakcija polimeraze kojoj prethodi reverzna transkripcija (RT-PCR)

Izolovana RNK je korišćena za analizu genske ekspresije pro- i anti-inflamatornih citokina. Kako bi uzorci bili uporedivi, za sve reakcije je korišćeno 100 ng RNK po reakcionoj smeši. Uzorci RNK su pripremani pravljenjem odgovarajućih razblaženja iz štokova prečišćenih RNKa sa miliQ vodom. RNK je prevedena u cDNK u reakciji reverzne transkripcije nakon čega je usledila reakcija PCRa. RT-PCR je urađen upotrebom paketa KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2X) (Merck KGaA). Pripremljena je reakciona smeša koja je sadržala 100 ng izolovane RNK razblažene u KAPA SYBER® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2x), direktni (*for-eng: forward*) i obrnuti (*rev-eng: reverse*) prajmer (10 µM) i reverznu transkriptazu. Faze RT-PCR reakcije su date u tabeli 25. Sekvence direktnih i obrnutih prajmera su preuzete iz baze podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) i naručene od firme Invitrogen. Sekvence korišćenih prajmera su date u tabeli 26. Analiza ekspresije gena je urađena pomoću delta/delata Ct metode (2<sup>ΔΔCt</sup>) nakon čega su sve vrednosti normalizovane u odnosu na konstitutivno eksprimiran gen GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze).

**Tabela 26. Faze PCR reakcije**

Korak	Temperatura	Trajanje
cDNA sinteza reverznom transkripcijom	42 °C	5 min.

Inaktivacija reverzne transkriptaze	95 °C	5 min.	40 ciklusa
Denaturacija	95 °C	10 sek.	
Hibridizacija	Tm*	30 sek.	
Elongacija	72 °C	30 sek.	
Krajnja elongacija	72 °C	7 min.	

\* Tm temperatura topljenja zavisi od svakog para prajmera i data je u tabeli 25.

**Tabela 27. Sekvence prajmera korišćenih za RT-PCR**

Gen	Sekvenca	Tm (°C)
GAPDH	For: AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC Rev: CCGGAGGGGCCATCCACAGTCT	61
TNF $\alpha$	For: AACGGCATGGATCTCAAAGA Rev: TTTCTCCTGGTATGAGATAGCAAATC	49
IFN- $\gamma$	For: ATTCGGTAACTGACTTGAATGTCC Rev: CTCTTCGACCTCGAAACAGC	49
IL-1 $\beta$	For: ATCCAAGCAATACCCAAAGAA Rev: GCTGATGTACCAGTTGGGGAA	49
IL-10	For: TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA Rev: TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA	51
IL-33	For: GGTGTGGATGGGAAGAAGCTG Rev: GAGGACTTTTTGTGAAGGACG	51

### 7.16. Određivanje koncentracije izlučenih citokina nakon tretmana ćelijskih linija

Koncentracija citokina TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 i IL-10 u supernatantima nakon tretmana mišijih makrofaga, THP-1 makrofaga ili PBMCs je određena ELISA testom. Kompleti za određivanje koncentracije citokina su kupljeni od firme BioLegend i ELISA je urađena po uputstvu proizvođača. Pripremljeni su potrebni rastvori: pufer za kuplovanje antitela (Bikarbonatno-karbonatni pufer, tabela 26), PBS (tabela 27), tPBS (0,05% Tween u PBSu), 1% BSA u tPBSu, supstrat za peroksidazu- tetrametilbenzidin (TMB, BioLegend) i stop reagens (2 N sumporna kiselina, tabela 28). Svi rastvori su pre upotrebe filtrirani kroz filter pora 0,22  $\mu$ m. Za konstruisanje standarne krive korišćeni su standardi dobijeni u kompletu. Standardi su razblaženi po uputstvu proizvođača u 1% BSA u tPBSu, a zatim su napravljena serijska razblaženja. Opseg koncentracija standardnih rastvora je bio sledeći:

500-7,8 pg/mL za TNF- $\alpha$ , IL-6 i IFN- $\gamma$ ,

250-3,9 pg/mL za IL-4 i IL-10 citokine.

Tabela 28. Pufer za kuplovanje antitela

Komponenta	Količina
NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3,56 g
Dejonizovana voda	1 L

Tabela 29. Puferisan fiziološki rastvor

Komponenta	Količina
NaCl	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,16 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
KCl	0,2 g
Dejonizovana voda	1 L

Tabela 30. Stop reagens

Komponenta	Količina
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	54 mL
Dejonizovana voda	1 L

ELISA je rađena po sledećem postupku:

1. Kuplovanje antitela za mikrotitar pločicu od 96 bunara je pripremljeno u puferu za kuplovanje (antitelo za kuplovanje svakog citokina je razblaženo po uputstvu proizvođača), preko noći na 4 °C.
2. Ispiranje neizreagovanih antitela za kuplovanje 4 puta tPBSom.
3. Blokiranje 1% BSA u tPBSu 1 h na sobnoj temperaturi, 300 rpm.
4. Ispiranje 4 puta tPBSom.
5. Inkubiranje sa standardnim rastvorima citokina ili supernatantima nakon ćelijskog tretmana, 2 h na sobnoj temperaturi, 300 rpm.
6. Ispiranje 4 puta tPBSom.
7. Inkubiranje sa antitelom za detekciju 1 h na sobnoj temperaturi, 300 rpm.
8. Ispiranje 4 puta tPBSom.
9. Inkubiranje razblaženim rastvorom avidin-HRP 30 min. na sobnoj temperaturi, 300 rpm.
10. Ispiranje 5 puta tPBSom.
11. Detekcija dodatkom TMB supstrata 30 min. u mraku.



12. Prekidanje reakcije dodatkom stop reagensa.
13. Čitanje apsorbance na 450 nm.
14. Određivanje koncentracije oslobođenih citokina na osnovu konstruisane kalibracione krive.

### 7.17. Statistička obrada rezultata

Svi eksperimenti su urađeni u najmanje tri nezavisna biološka ponavljanja u duplikatu. Srednje vrednosti duplikata dobijenih iz svakog eksperimenta su izračunate pomoću programa Microsoft Office Excel 2016. Odgovarajući grafici su dobijeni upotrebom programa GraphPad Prism verzija 9, pomoću kog su dobijene standardne devijacije. Poređenje srednjih vrednosti je urađeno pomoću analize varijanse (ANOVA) u GraphPad Prism v. 9. Ukoliko je utvrđeno postojanje standardne devijacije primenjena je Bonferonijeva metoda kako bi se omogućilo određivanje preciznih vrednosti za višestruka ponavljanja. Razlika u rezultatima je smatrana statistički značajnom ukoliko je  $p < 0,05$ . Statistička značajnost je prikazana na graficima upotrebom odgovarajućih simbola. Ispod svakog grafika je naznačeno šta simboli na slici predstavljaju.

## 8. Literatura

1. Curin, M.; Khaitov, M.; Karaulov, A.; Namazova-Baranova, L.; Campana, R.; Garib, V.; Valenta, R. Next-Generation of Allergen-Specific Immunotherapies: Molecular Approaches. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2018**, *18*, 1–13, doi:https://doi.org/10.1007/s11882-018-0790-x.
2. Roitt, I.M.; Brostoff, J.; Male, D.K. *Immunology*; Immunology; Mosby, 2001; ISBN 9780397445738.
3. Aldakheel, F.M. Allergic Diseases: A Comprehensive Review on Risk Factors, Immunological Mechanisms, Link with COVID-19, Potential Treatments, and Role of Allergen Bioinformatics. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, doi:10.3390/ijerph182212105.
4. Brozek, G.; Lawson, J.; Szumilas, D.; Zejda, J. Increasing Prevalence of Asthma, Respiratory Symptoms, and Allergic Diseases: Four Repeated Surveys from 1993-2014. *Respir. Med.* **2015**, *109*, 982–990, doi:10.1016/j.rmed.2015.05.010.
5. Raith, M.; Swoboda, I. Birch Pollen—The Unpleasant Herald of Spring. *Front. Allergy* **2023**, *4*, 1–13, doi:10.3389/falgy.2023.1181675.
6. Durham, S.R.; Shamji, M.H. Allergen Immunotherapy: Past, Present and Future. *Nat. Rev. Immunol.* **2023**, *23*, 317–328, doi:10.1038/s41577-022-00786-1.
7. L. Noon Prophylactic Inoculation against Hay Fever. *Lancet* **1911**, *177*, 1572–1573, doi:10.1016/S0140-6736(00)78276-6.
8. Komlósi, Z.I.; Kovács, N.; Sokolowska, M.; van de Veen, W.; Akdis, M.; Akdis, C.A. Mechanisms of Subcutaneous and Sublingual Aeroallergen Immunotherapy: What Is New? *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **2020**, *40*, 1–14, doi:10.1016/j.iac.2019.09.009.
9. Feng, Z.; Yi, X.; Hajavi, J. New and Old Adjuvants in Allergen-Specific Immunotherapy: With a Focus on Nanoparticles. *J. Cell. Physiol.* **2021**, *236*, 863–876.
10. Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C.B.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T. PAMPs and DAMPs: Signal Os That Spur Autophagy and Immunity. *Immunol. Rev.* **2012**, *249*, 158–175, doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
11. Kirtland, M.E.; Tsitoura, D.C.; Durham, S.R.; Shamji, M.H. Toll-Like Receptor Agonists as Adjuvants for Allergen Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–16, doi:10.3389/fimmu.2020.599083.
12. Kucuksezer, U.C.; Ozdemir, C.; Cevhertas, L.; Ogulur, I.; Akdis, M.; Akdis, C.A. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy and Allergen Tolerance. *Allergol. Int.* **2020**, *69*, 549–560, doi:10.1016/j.alit.2020.08.002.
13. Gavrovic-Jankulovic, M.; Poulsen, K.; Brckalo, T.; Bobic, S.; Lindner, B.; Petersen, A. A Novel Recombinantly Produced Banana Lectin Isoform Is a Valuable Tool for Glycoproteomics and a Potent Modulator of the Proliferation Response in CD3+, CD4+, and CD8+ Populations of Human PBMCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 929–941, doi:10.1016/j.biocel.2007.10.033.
14. Sansone, A.C.M.B.; Sansone, M.; dos Santos Dias, C.T.; Oliveira do Nascimento, J.R. Oral Administration of Banana Lectin Modulates Cytokine Profile and Abundance of T-Cell Populations in Mice. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *89*, 19–24,

- doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.049.
15. Marinkovic, E.; Djokic, R.; Lukic, I.; Filipovic, A.; Inic-Kanada, A.; Kosanovic, D.; Gavrovic-Jankulovic, M.; Stojanovic, M. Modulation of Functional Characteristics of Resident and Thioglycollate-Elicited Peritoneal Murine Macrophages by a Recombinant Banana Lectin. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–21, doi:10.1371/journal.pone.0172469.
  16. Koshte, V.L.; Aalbers, M.; Calkhoven, P.G.; Aalberse, R.C. The Potent IgG4-Inducing Antigen in Banana Is a Mannose-Binding Lectin, BanLec-I. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1992**.
  17. Wang, J.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Hu, L.; Liu, J.; Wang, L.; Wang, T.; Zhang, H.; Cong, L.; Wang, Q. Pathogenesis of Allergic Diseases and Implications for Therapeutic Interventions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, doi:10.1038/s41392-023-01344-4.
  18. Galli, S.J.; Tsai, M.; Piliponsky, A.M. The Development of Allergic Inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 445–454, doi:10.1038/nature07204.
  19. Schoos, A.M.M.; Bullens, D.; Chawes, B.L.; Costa, J.; De Vlieger, L.; DunnGalvin, A.; Epstein, M.M.; Garssen, J.; Hilger, C.; Knipping, K.; et al. Immunological Outcomes of Allergen-Specific Immunotherapy in Food Allergy. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1–20, doi:10.3389/fimmu.2020.568598.
  20. Jeong, S.K.; Kim, H.J.; Youm, J.K.; Ahn, S.K.; Choi, E.H.; Sohn, M.H.; Kim, K.E.; Hong, J.H.; Shin, D.M.; Lee, S.H. Mite and Cockroach Allergens Activate Protease-Activated Receptor 2 and Delay Epidermal Permeability Barrier Recovery. *J. Invest. Dermatol.* **2008**, *128*, 1930–1939, doi:10.1038/jid.2008.13.
  21. Grozdanovic, M.; Cavic, M.; Andjelkovic, U.; Petersen, A.; Smit, J.; Gavrovic-Jankulovic, M. Kiwifruit Protease Act d 1 Compromises the Intestinal Barrier by Disrupting Tight Junctions. *Clin. Transl. Allergy* **2014**, *4*, 2014, doi:10.1186/2045-7022-4-s2-o10.
  22. Mahram, M. The Frequency of Common Allergens in Allergic Rhinitis among the Patients Referred to the Allergy Clinic of Qods Hospital in Qazvin during 2007-2010. *J. Allergy Ther.* **2013**, *04*, 1–5, doi:10.4172/2155-6121.1000130.
  23. Strzelczyk, Z.; Roszkowski, M.; Feleszko, W.; Krauze, A. Avoidance of Allergens as an Environmental Method in the Prevention of Inhaled Allergy Symptoms. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. **2020**, *48*, 745–752, doi:10.1016/j.aller.2019.06.011.
  24. Gauvreau, G.M.; El-Gammal, A.I.; O’Byrne, P.M. Allergen-Induced Airway Responses. *Eur. Respir. J.* **2015**, *46*, 819–831, doi:10.1183/13993003.00536-2015.
  25. D’Amato, G.; Murrieta-Aguttes, M.; D’Amato, M.; Ansotegui, I.J. Pollen Respiratory Allergy: Is It Really Seasonal? *World Allergy Organ. J.* **2023**, *16*, 100799, doi:10.1016/j.waojou.2023.100799.
  26. Tegart, L.J.; Johnston, F.H.; Borchers Arriagada, N.; Workman, A.; Dickinson, J.L.; Green, B.J.; Jones, P.J. ‘Pollen Potency’: The Relationship between Atmospheric Pollen Counts and Allergen Exposure. *Aerobiologia (Bologna)*. **2021**, *37*, 825–841, doi:10.1007/s10453-021-09726-3.
  27. Asam, C.; Hofer, H.; Wolf, M.; Aglas, L.; Wallner, M. Tree Pollen Allergens - An Update from a Molecular Perspective. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *70*,

- 1201–1211, doi:10.1111/all.12696.
28. Yamada, Y.; Kidoguchi, M.; Yata, A.; Nakamura, T.; Yoshida, H.; Kato, Y.; Masuko, H.; Hizawa, N.; Fujieda, S.; Noguchi, E.; et al. High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in *Nicotiana Benthamiana*. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1–10, doi:10.3389/fpls.2020.00344.
  29. Fernandes, H.; Michalska, K.; Sikorski, M.; Jaskolski, M. Structural and Functional Aspects of PR-10 Proteins. *FEBS J.* **2013**, *280*, 1169–1199, doi:10.1111/febs.12114.
  30. Gajhede, M.; Osmark, P.; Poulsen, F.M.; Ipsen, H.; Larsen, J.N.; Van Neerven, R.J.J.; Schou, C.; Lowenstein, H.; Spangfort, M.D. X-Ray and NMR Structure of Bet v 1, the Origin of Birch Pollen Allergy. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 1040–1045, doi:10.1038/nsb1296-1040.
  31. Von Loetzen, C.S.; Hoffmann, T.; Hartl, M.J.; Schweimer, K.; Schwab, W.; Rösch, P.; Hartl-Spiegelhauer, O. Secret of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1: Identification of the Physiological Ligand. *Biochem. J.* **2014**, *457*, 379–390, doi:10.1042/BJ20130413.
  32. Breiteneder, H.; Kraft, D. The History and Science of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1. *Biomolecules* **2023**, *13*, doi:10.3390/biom13071151.
  33. Asam, C.; Batista, A.L.; Moraes, A.H.; de Paula, V.S.; Almeida, F.C.L.; Aglas, L.; Kitzmüller, C.; Bohle, B.; Ebner, C.; Ferreira, F.; et al. Bet v 1 - a Trojan Horse for Small Ligands Boosting Allergic Sensitization? *Clin. Exp. Allergy* **2014**, *44*, 1083–1093, doi:10.1111/cea.12361.
  34. Soh, W.T.; Aglas, L.; Mueller, G.A.; Gilles, S.; Weiss, R.; Scheiblhofer, S.; Huber, S.; Scheidt, T.; Thompson, P.M.; Briza, P.; et al. Multiple Roles of Bet v 1 Ligands in Allergen Stabilization and Modulation of Endosomal Protease Activity. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *74*, 2382–2393, doi:10.1111/all.13948.
  35. Breiteneder, H.; Pettenburger, K.; Bito, A.; Valenta, R.; Kraft, D.; Rumpold, H.; Scheiner, O.; Breitenbach, M. The Gene Coding for the Major Birch Pollen Allergen BetvI, Is Highly Homologous to a Pea Disease Resistance Response Gene. *EMBO J.* **1989**, *8*, 1935–1938, doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb03597.x.
  36. Wagner, S.; Radauer, C.; Bublin, M.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Kopp, T.; Greisenegger, E.K.; Vogel, L.; Vieths, S.; Scheiner, O.; Breiteneder, H. Naturally Occurring Hypoallergenic Bet v 1 Isoforms Fail to Induce IgE Responses in Individuals with Birch Pollen Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121*, 246–252, doi:10.1016/j.jaci.2007.08.006.
  37. Marković-Housley, Z.; Degano, M.; Lamba, D.; Von Roepenack-Lahaye, E.; Clemens, S.; Susani, M.; Ferreira, F.; Scheiner, O.; Breiteneder, H. Crystal Structure of a Hypoallergenic Isoform of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 and Its Likely Biological Function as a Plant Steroid Carrier. *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 123–133, doi:10.1016/S0022-2836(02)01197-X.
  38. Atanasio, A.; Orengo, J.M.; Sleeman, M.A.; Stahl, N. Biologics as Novel Therapeutics for the Treatment of Allergy: Challenges and Opportunities. *Front. Allergy* **2022**, *3*, 1–10, doi:10.3389/falgy.2022.1019255.
  39. Orengo, J.M.; Radin, A.R.; Kamat, V.; Badithe, A.; Ben, L.H.; Bennett, B.L.; Zhong, S.; Birchard, D.; Limnander, A.; Rafique, A.; et al. Treating Cat Allergy with

- Monoclonal IgG Antibodies That Bind Allergen and Prevent IgE Engagement. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *149*, 189–199, doi:10.1038/s41467-018-03636-8.
40. Gevaert, P.; De Craemer, J.; De Ruyck, N.; Rottey, S.; de Hoon, J.; Hellings, P.W.; Volckaert, B.; Lesneuck, K.; Orenge, J.M.; Atanasio, A.; et al. Novel Antibody Cocktail Targeting Bet v 1 Rapidly and Sustainably Treats Birch Allergy Symptoms in a Phase 1 Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2022**, *149*, 189–199, doi:10.1016/j.jaci.2021.05.039.
  41. Menzella, F.; Just, J.; Sauerbeck, I.S.; Mailaender, C.; Saccheri, F.; Thonnelier, C.; Jaumont, X.; Mala, L. Omalizumab for the Treatment of Patients with Severe Allergic Asthma with Immunoglobulin E Levels above >1500 IU/ML. *World Allergy Organ. J.* **2023**, *16*, 100787, doi:10.1016/j.waojou.2023.100787.
  42. Moote, W.; Kim, H.; Ellis, A.K. Allergen-Specific Immunotherapy. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **2018**, *14*, 1–10, doi:10.1186/s13223-018-0282-5.
  43. Pavón-Romero, G.F.; Parra-Vargas, M.I.; Ramírez-Jiménez, F.; Melgoza-Ruiz, E.; Serrano-Pérez, N.H.; Teran, L.M. Allergen Immunotherapy: Current and Future Trends. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11020212.
  44. Fujita, H.; Soyka, M.B.; Akdis, M.; Akdis, C.A. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy. *Clin. Transl. Allergy* **2012**, *2*, 1–8, doi:10.1186/2045-7022-2-2.
  45. Royer, B.; Varadaradjalou, S.; Saas, P.; Guillosson, J.J.; Kantelip, J.P.; Arock, M. Inhibition of IgE-Induced Activation of Human Mast Cells by IL-10. *Clin. Exp. Allergy* **2001**, *31*, 694–704, doi:10.1046/j.1365-2222.2001.01069.x.
  46. Rak, S.; Löwhagen, O.; Venge, P. The Effect of Immunotherapy on Bronchial Hyperresponsiveness and Eosinophil Cationic Protein in Pollen-Allergic Patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1988**, *82*, 470–480, doi:10.1016/0091-6749(88)90021-8.
  47. Pilette, C.; Kayhan, †; Nouri-Aria, T.; Jacobson, M.R.; Wilcock, L.K.; Detry, B.; Walker, S.M.; Francis, J.N.; Durham, S.R. Grass Pollen Immunotherapy Induces an Allergen-Specific IgA2 Antibody Response Associated with Mucosal TGF-Expression 1. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 4658–4666.
  48. Ono, M.; Yaguchi, H.; Ohkura, N.; Kitabayashi, I.; Nagamura, Y.; Nomura, T.; Miyachi, Y.; Tsukada, T.; Sakaguchi, S. Foxp3 Controls Regulatory T-Cell Function by Interacting with AML1/Runx1. *Nature* **2007**, *446*, 685–689, doi:10.1038/nature05673.
  49. Mueller, R.S. Update on Allergen Immunotherapy. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* **2019**, *49*, 1–7, doi:10.1016/j.cvsm.2018.08.001.
  50. Moingeon, P.; Mascarell, L. Differences and Similarities between Sublingual Immunotherapy of Allergy and Oral Tolerance. *Semin. Immunol.* **2017**, *30*, 52–60, doi:10.1016/j.smim.2017.07.003.
  51. Sokolowska, M.; Boonpiyathad, T.; Escribese, M.M.; Barber, D. Allergen-Specific Immunotherapy: Power of Adjuvants and Novel Predictive Biomarkers. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *74*, 2061–2063.
  52. Barber, D.; Diaz-Perales, A.; Escribese, M.M.; Kleine-Tebbe, J.; Matricardi, P.M.; Ollert, M.; Santos, A.F.; Sastre, J. *Molecular Allergology and Its Impact in Specific Allergy Diagnosis and Therapy*; 2021; Vol. 76; ISBN 0000000254885.
  53. Pauli, G.; Larsen, T.H.; Rak, S.; Horak, F.; Pastorello, E.; Valenta, R.; Purohit, A.;

- Arvidsson, M.; Kavina, A.; Schroeder, J.W.; et al. Efficacy of Recombinant Birch Pollen Vaccine for the Treatment of Birch-Allergic Rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *122*, 951–960, doi:10.1016/j.jaci.2008.09.017.
54. Podzhilkova, A.; Nagl, C.; Hoffmann-Sommergruber, K. Molecular Allergology and Its Application in Prevention, Diagnosis and Therapy. *Front. Allergy* **2023**, *4*, 1–6, doi:10.3389/falgy.2023.1260902.
55. Zhernov, Y.; Curin, M.; Khaitov, M.; Karaulov, A.; Valenta, R. Recombinant Allergens for Immunotherapy: State of the Art. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *19*, 402–414, doi:10.1097/ACI.0000000000000536.
56. Zubeldia, J.M.; Ferrer, M.; Dávila, I.; Justicia, J.L. Adjuvants in Allergen-Specific Immunotherapy: Modulating and Enhancing the Immune Response. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2019**, *29*, 103–111, doi:10.18176/jiaci.0349.
57. O’Hagan, D.T.; De Gregorio, E. The Path to a Successful Vaccine Adjuvant - “The Long and Winding Road.” *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 541–551, doi:10.1016/j.drudis.2009.02.009.
58. Sameer, A.S.; Nissar, S. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *Biomed Res. Int.* **2021**, *2021*, doi:10.1155/2021/1157023.
59. Gerstmayr, M.; Ilk, N.; Schabussova, I.; Jahn-Schmid, B.; Egelseer, E.M.; Sleytr, U.B.; Ebner, C.; Bohle, B. A Novel Approach to Specific Allergy Treatment: The Recombinant Allergen-S-Layer Fusion Protein RSbsC-Bet v 1 Matures Dendritic Cells That Prime Th0/Th1 and IL-10-Producing Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 7270–7275, doi:10.4049/jimmunol.179.11.7270.
60. Schülke, S.; Vogel, L.; Junker, A.C.; Hanschmann, K.M.; Flaczyk, A.; Vieths, S.; Scheurer, S. A Fusion Protein Consisting of the Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A and the Allergen Ovalbumin Boosts Allergen-Specific Th1, Th2, and Th17 Responses in Vitro. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/4156456.
61. Tighe, H.; Takabayashi, K.; Schwartz, D.; Van Nest, G.; Tuck, S.; Eiden, J.J.; Kagey-Sobotka, A.; Creticos, P.S.; Lichtenstein, L.M.; Spiegelberg, H.L.; et al. Conjugation of Immunostimulatory DNA to the Short Ragweed Allergen Amb a 1 Enhances Its Immunogenicity and Reduces Its Allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *106*, 124–134, doi:10.1067/mai.2000.107927.
62. Utsugi, M. Antigen Presenting Cells in Allergy. *Nippon rinsho. Japanese J. Clin. Med.* **2009**, *67*, 2076–2081, doi:10.1067/mai.2001.117457.
63. Akdis, C.A.; Akdis, M. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy and Immune Tolerance to Allergens. *World Allergy Organ. J.* **2015**, *8*, 1–12, doi:10.1186/s40413-015-0063-2.
64. Tian, H. fei; Xing, J.; Tang, X. qian; Chi, H.; Sheng, X. zhen; Zhan, W. bin Cluster of Differentiation Antigens: Essential Roles in the Identification of Teleost Fish T Lymphocytes. *Mar. Life Sci. Technol.* **2022**, doi:10.1007/s42995-022-00136-z.
65. Wen, H.; Qu, L.; Zhang, Y.; Xu, B.; Ling, S.; Liu, X.; Luo, Y.; Huo, D.; Li, W.; Yao, X. A Dendritic Cells-Targeting Nano-Vaccine by Coupling Polylactic-Co-Glycolic Acid-Encapsulated Allergen with Mannan Induces Regulatory T Cells. *Int. Arch.*

- Allergy Immunol.* **2021**, *182*, 777–787, doi:10.1159/000512872.
66. Lendeckel, U.; Venz, S.; Wolke, C. Macrophages: Shapes and Functions. *ChemTexts* **2022**, *8*, 1–12, doi:10.1007/s40828-022-00163-4.
67. Wang, L. xun; Zhang, S. xi; Wu, H. juan; Rong, X. lu; Guo, J. M2b Macrophage Polarization and Its Roles in Diseases. *J. Leukoc. Biol.* **2019**, *106*, 345–358, doi:10.1002/JLB.3RU1018-378RR.
68. Gordon, S.; Plüddemann, A. Role of Macrophages in Autoimmunity. *Autoimmune Dis. Fifth Ed.* **2013**, 161–174, doi:10.1016/B978-0-12-384929-8.00011-3.
69. Singh, S.S.; Devi, S.K.; Ng, T.B. Banana Lectin: A Brief Review. *Molecules* **2014**, *19*, 18817–18827, doi:10.3390/molecules191118817.
70. Gern, J.E. The Antibacterial Lectin RegIII-Gamma Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Pediatrics* **2012**, *130*.
71. Raval, S.; Gowda, S.B.; Singh, D.D.; Chandra, N.R. A Database Analysis of Jacalin-like Lectins: Sequence-Structure-Function Relationships. *Glycobiology* **2004**, *14*, 1247–1263, doi:10.1093/glycob/cwh140.
72. Koshte, V.L.; Van Dijk, W.; Van der Stelt, M.E.; Allbers, R.C. Isolation and Characterization of BanLec-I, a Mannoside-Binding Lectin from Musa Paradisiac (Banana). *Biochem. J.* **1990**, *272*, 721–726, doi:10.1042/bj2720721.
73. Mo, H.; Winter, H.C.; Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Misaki, A.; Goldstein, I.J. Carbohydrate Binding Properties of Banana ( Musa Acuminata ) Lectin . *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2609–2615, doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02148.x.
74. Meagher, J.L.; Winter, H.C.; Ezell, P.; Goldstein, I.J.; Stuckey, J.A. Crystal Structure of Banana Lectin Reveals a Novel Second Sugar Binding Site. *Glycobiology* **2005**, *15*, 1033–1042, doi:10.1093/glycob/cwi088.
75. Hopper, J.T.S.; Ambrose, S.; Grant, O.C.; Krumm, S.A.; Allison, T.M.; Degiacomi, M.T.; Tully, M.D.; Pritchard, L.K.; Ozorowski, G.; Ward, A.B.; et al. The Tetrameric Plant Lectin BanLec Neutralizes HIV through Bidentate Binding to Specific Viral Glycans. *Structure* **2017**, *25*, 773-782.e5, doi:10.1016/j.str.2017.03.015.
76. Swanson, M.D.; Winter, H.C.; Goldstein, I.J.; Markovitz, D.M. A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 8646–8655, doi:10.1074/jbc.M109.034926.
77. Lopandić, Z.; Dragačević, L.; Popović, D.; Andjelković, U.; Minić, R.; Gavrović-Jankulović, M. Banlec-EGFP Chimera as a Tool for Evaluation of Lectin Binding to High-Mannose Glycans on Microorganisms. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1–13, doi:10.3390/biom11020180.
78. Swanson, M.D.; Boudreaux, D.M.; Salmon, L.; Chugh, J.; Winter, H.C.; Meagher, J.L.; André, S.; Murphy, P. V.; Oscarson, S.; Roy, R.; et al. Engineering a Therapeutic Lectin by Uncoupling Mitogenicity from Antiviral Activity. *Cell* **2015**, *163*, 746–758, doi:10.1016/j.cell.2015.09.056.
79. Lloyd, M.G.; Liu, D.; Legendre, M.; Markovitz, D.M.; Moffat, J.F. H84T BanLec Has Broad Spectrum Antiviral Activity against Human Herpesviruses in Cells, Skin, and Mice. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–15, doi:10.1038/s41598-022-05580-6.

80. Dimitrijevic, R.; Jadranin, M.; Burazer, L.; Ostojic, S.; Gavrovic-Jankulovic, M. Evaluation of the Thermal Stability and Digestibility of Heterologously Produced Banana Lectin. *Food Chem.* **2010**, *120*, 1113–1118, doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.062.
81. Dimitrijevic, R.; Stojanovic, M.; Micic, M.; Dimitrijevic, L.; Gavrovic-Jankulovic, M. Recombinant Banana Lectin as Mucosal Immunostimulator. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 636–641, doi:10.1016/j.jff.2012.04.003.
82. Ganeshpurkar, A.; Saluja, A.K. Experimental Animal Models Used for Evaluation of Potential Immunomodulators: A Mini Review. *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* **2017**, *55*, 211–216, doi:10.1016/j.bfopcu.2017.08.002.
83. Richter, M.; Piwocka, O.; Musielak, M.; Piotrowski, I.; Suchorska, W.M.; Trzeciak, T. From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 1–11, doi:10.3389/fcell.2021.711381.
84. Kämpfer, A.A.M.; Urbán, P.; Gioria, S.; Kanase, N.; Stone, V.; Kinsner-Ovaskainen, A. Development of an in Vitro Co-Culture Model to Mimic the Human Intestine in Healthy and Diseased State. *Toxicol. Vitro.* **2017**, *45*, 31–43, doi:10.1016/j.tiv.2017.08.011.
85. Khatua, S.; Simal-Gandara, J.; Acharya, K. Understanding Immune-Modulatory Efficacy in Vitro. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, *352*, 109776, doi:10.1016/j.cbi.2021.109776.
86. Chanput, W.; Mes, J.J.; Wichers, H.J. THP-1 Cell Line: An in Vitro Cell Model for Immune Modulation Approach. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23*, 37–45, doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002.
87. Darling, N.J.; Mobbs, C.L.; González-Hau, A.L.; Freer, M.; Przyborski, S. Bioengineering Novel in Vitro Co-Culture Models That Represent the Human Intestinal Mucosa With Improved Caco-2 Structure and Barrier Function. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 992, doi:10.3389/fbioe.2020.00992.
88. Mukherjee, P.; Roy, S.; Ghosh, D.; Nandi, S.K. Role of Animal Models in Biomedical Research: A Review. *Lab. Anim. Res.* **2022**, *38*, 1–17, doi:10.1186/s42826-022-00128-1.
89. Liu, M.; Samant, S.; Vasa, C.H.; Pedrigi, R.M.; Oguz, U.M.; Ryu, S.; Wei, T.; Anderson, D.R.; Agrawal, D.K.; Chatzizisis, Y.S. Co-Culture Models of Endothelial Cells, Macrophages, and Vascular Smooth Muscle Cells for the Study of the Natural History of Atherosclerosis. *PLoS One* **2023**, *18*, 1–22, doi:10.1371/journal.pone.0280385.
90. Goers, L.; Freemont, P.; Polizzi, K.M. Co-Culture Systems and Technologies: Taking Synthetic Biology to the next Level. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, doi:10.1098/rsif.2014.0065.
91. Mason, J.; Öhlund, D. Key Aspects for Conception and Construction of Co-Culture Models of Tumor-Stroma Interactions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1–23, doi:10.3389/fbioe.2023.1150764.
92. Gallo-Francisco, P.H.; Giorgio, S. A Cell-Culturing System for the Study of Interaction between Macrophages Infected with *Leishmania Amazonensis*. *J. Trop. Pathol.* **2019**, *48*, 99–108, doi:10.5216/rpt.v48i2.58004.
93. Vis, M.A.M.; Ito, K.; Hofmann, S. Impact of Culture Medium on Cellular Interactions



- in in Vitro Co-Culture Systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–8, doi:10.3389/fbioe.2020.00911.
94. Moingeon, P.; Mascarell, L. Differences and Similarities between Sublingual Immunotherapy of Allergy and Oral Tolerance. *Semin. Immunol.* **2017**, *30*, 52–60, doi:10.1016/j.smim.2017.07.003.
95. Lennernäs, H.; Palm, K.; Fagerholm, U.; Artursson, P. Comparison between Active and Passive Drug Transport in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells in Vitro and Human Jejunum in Vivo. *Int. J. Pharm.* **1996**, *127*, 103–107, doi:10.1016/0378-5173(95)04204-0.
96. Kämpfer, A.A.M.; Urbán, P.; Gioria, S.; Kanase, N.; Stone, V.; Kinsner-Ovaskainen, A. Development of an in Vitro Co-Culture Model to Mimic the Human Intestine in Healthy and Diseased State. *Toxicol. Vitro.* **2017**, *45*, 31–43, doi:10.1016/j.tiv.2017.08.011.
97. Chanput, W.; Mes, J.J.; Wichers, H.J. THP-1 Cell Line: An in Vitro Cell Model for Immune Modulation Approach. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23*, 37–45, doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002.
98. Cassado, A.A.; D’Império Lima, M.R.; Bortoluci, K.R. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 1–9, doi:10.3389/fimmu.2015.00225.
99. Jutel, M.; Jaeger, L.; Suck, R.; Meyer, H.; Fiebig, H.; Cromwell, O. Allergen-Specific Immunotherapy with Recombinant Grass Pollen Allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *116*, 608–613, doi:10.1016/j.jaci.2005.06.004.
100. Niederberger, V.; Neubauer, A.; Gevaert, P.; Zidarn, M.; Worm, M.; Aberer, W.; Malling, H.J.; Pfaar, O.; Klimek, L.; Pfützner, W.; et al. Safety and Efficacy of Immunotherapy with the Recombinant B-Cell Epitope-Based Grass Pollen Vaccine BM32. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *142*, 497–509.e9, doi:10.1016/j.jaci.2017.09.052.
101. Baba, S.M.; Rasool, R.; Gull, A.; Qureshi, T.A.; Beigh, A.H.; Qadri, Q.; Shah, Z.A. Effectiveness of Sublingual Immunotherapy in the Treatment of HDM-Induced Nasobronchial Allergies: A 3-Year Randomized Case-Control Study From Kashmir. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1–7, doi:10.3389/fimmu.2021.723814.
102. Herb, M.; Schramm, M. Functions of Ros in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1–39, doi:10.3390/antiox10020313.
103. Nazimek, K.; Ptak, W.; Marcinkiewicz, J.; Bryniarski, K. Macrophage Function in Allergic and Autoimmune Responses. *J. Phys. Ther. Heal. Promot.* **2013**, *1*, 36–45, doi:10.18005/PTHP0101005.
104. Cooley, L.F.; Martin, R.K.; Zellner, H.B.; Irani, A.M.; Uram-Tuculescu, C.; El Shikh, M.E.; Conrad, D.H. Increased B Cell ADAM10 in Allergic Patients and Th2 Prone Mice. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0124331.
105. Chen, C.; Lianhua, L.; Nana, S.; Yongning, L.; Xudong, J. Development of a BALB/c Mouse Model for Food Allergy: Comparison of Allergy-Related Responses to Peanut Agglutinin,  $\beta$ -Lactoglobulin and Potato Acid Phosphatase. *Toxicol. Res. (Camb)*. **2017**, *6*, 251–261, doi:10.1039/c6tx00371k.
106. Zhou, C.; Ludmila, T.; Sun, N.; Wang, C.; Pu, Q.; Huang, K.; Che, H. BALB/c Mice

- Can Be Used to Evaluate Allergenicity of Different Food Protein Extracts. *Food Agric. Immunol.* **2016**, *27*, 589–603, doi:10.1080/09540105.2015.1129600.
107. Stojanović, M.M.; Živković, I.P.; Petrušić, V.Ž.; Kosec, D.J.; Dimitrijević, R.D.; Jankov, R.M.; Dimitrijević, L.A.; Gavrović-Jankulović, M.D. In Vitro Stimulation of Balb/c and C57 BL/6 Splenocytes by a Recombinantly Produced Banana Lectin Isoform Results in Both a Proliferation of T Cells and an Increased Secretion of Interferon-Gamma. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 120–129, doi:10.1016/j.intimp.2009.10.007.
  108. Mariano, V.S.; Zorzetto-Fernandes, A.L.; Da Silva, T.A.; Ruas, L.P.; Nohara, L.L.; De Almeida, I.C.; Roque-Barreira, M.C. Recognition of TLR2 N-Glycans: Critical Role in ArtinM Immunomodulatory Activity. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–9, doi:10.1371/journal.pone.0098512.
  109. Deo, S.S.; Mistry, K.J.; Kakade, A.M.; Niphadkar, P. V. Role Played by Th2 Type Cytokines in IgE Mediated Allergy and Asthma. *Lung India* **2010**, *27*, 66–71, doi:10.4103/0970-2113.63609.
  110. Gubernatorova, E.O.; Gorshkova, E.A.; Namakanova, O.A.; Zvartsev, R. V.; Hidalgo, J.; Drutskaya, M.S.; Tumanov, A. V.; Nedospasov, S.A. Non-Redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1–14, doi:10.3389/fimmu.2018.02718.
  111. Lin, Y.L.; Chen, S.H.; Wang, J.Y. Critical Role of IL-6 in Dendritic Cell-Induced Allergic Inflammation of Asthma. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 51–59, doi:10.1007/s00109-015-1325-8.
  112. Ahmad, S.; Azid, N.A.; Boer, J.C.; Lim, J.; Chen, X.; Plebanski, M.; Mohamud, R. The Key Role of TNF-TNFR2 Interactions in the Modulation of Allergic Inflammation: A Review. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.02572.
  113. Iwasaki, M.; Saito, K.; Takemura, M.; Sekikawa, K.; Fujii, H.; Yamada, Y.; Wada, H.; Mizuta, K.; Seishima, M.; Ito, Y. TNF- $\alpha$  Contributes to the Development of Allergic Rhinitis in Mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 134–140, doi:10.1067/mai.2003.1554.
  114. Boonpiyathad, T.; Satitsuksanoa, P.; Akdis, M.; Akdis, C.A. IL-10 Producing T and B Cells in Allergy. *Semin. Immunol.* **2019**, *44*, 101326, doi:10.1016/j.smim.2019.101326.
  115. Akdis, C.A.; Akdis, M. Mechanisms of Immune Tolerance to Allergens: Role of IL-10 and Tregs. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 4678–4680, doi:10.1172/JCI78891.
  116. Suárez, L.J.; Arboleda, S.; Angelov, N.; Arce, R.M. Oral Versus Gastrointestinal Mucosal Immune Niches in Homeostasis and Allostasis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1–21, doi:10.3389/fimmu.2021.705206.
  117. Cesta, M.F. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicol. Pathol.* **2006**, *34*, 599–608, doi:10.1080/01926230600865531.
  118. Food and Drug Administration (FDA) M9 Biopharmaceutics Classification SystemBased Biowaivers: Guidance for Industry. *Publ. by ICH* **2021**, 20.
  119. Agency, E.M. Who Guideline on Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers. *WHO Drug Inf.* **2023**, *37*, 670–693.

120. Nagai, Y.; Shiraishi, D.; Tanaka, Y.; Nagasawa, Y.; Ohwada, S.; Shimauchi, H.; Aso, H.; Endo, Y.; Sugawara, S. Transportation of Sublingual Antigens across Sublingual Ductal Epithelial Cells to the Ductal Antigen-Presenting Cells in Mice. *Clin. Exp. Allergy* **2015**, *45*, 677–686, doi:10.1111/cea.12329.
121. Kaminsky, L.W.; Al-Sadi, R.; Ma, T.Y. IL-1 $\beta$  and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 6–9, doi:10.3389/fimmu.2021.767456.
122. Wang, H.R.; Wei, S.Z.; Song, X.Y.; Wang, Y.; Zhang, W. Bin; Ren, C.; Mou, Y.K.; Song, X.C. IL-1  $\beta$  and Allergy: Focusing on Its Role in Allergic Rhinitis. *Mediators Inflamm.* **2023**, *2023*.
123. Chan, B.C.L.; Lam, C.W.K.; Tam, L.S.; Wong, C.K. IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–11, doi:10.3389/fimmu.2019.00364.
124. Latorre, E.; Layunta, E.; Grasa, L.; Pardo, J.; García, S.; Alcalde, A.I.; Mesonero, J.E. Toll-like Receptors 2 and 4 Modulate Intestinal IL-10 Differently in Ileum and Colon. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2018**, *6*, 446–453, doi:10.1177/2050640617727180.
125. Hyun, J.; Romero, L.; Riveron, R.; Flores, C.; Kanagavelu, S.; Chung, K.D.; Alonso, A.; Sotolongo, J.; Ruiz, J.; Manukyan, A.; et al. Human Intestinal Epithelial Cells Express Interleukin-10 through Toll-like Receptor 4-Mediated Epithelial-Macrophage Crosstalk. *J. Innate Immun.* **2015**, *7*, 87–101, doi:10.1159/000365417.
126. Akdis, M.; Akdis, C.A. Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy: Multiple Suppressor Factors at Work in Immune Tolerance to Allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *133*, 621–631, doi:10.1016/j.jaci.2013.12.1088.
127. Yanagawa, Y.; Iwabuchi, K.; Onoé, K. Co-Operative Action of Interleukin-10 and Interferon- $\gamma$  to Regulate Dendritic Cell Functions. *Immunology* **2009**, *127*, 345–353, doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02986.x.
128. Akdis, M.; Burgler, S.; Cramer, R.; Eiwegger, T.; Fujita, H.; Gomez, E.; Klunker, S.; Meyer, N.; O'Mahony, L.; Palomares, O.; et al. Interleukins, from 1 to 37, and Interferon- $\gamma$ : Receptors, Functions, and Roles in Diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *127*, 701-721.e70, doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050.
129. Noh, J.; Noh, G.; Lee, S.J.; Lee, J.H.; Kim, A.; Kim, H.S.; Choi, W.S. Tolerogenic Effects of Interferon-Gamma with Induction of Allergen-Specific Interleukin-10-Producing Regulatory B Cell (Br1) Changes in Non-IgE-Mediated Food Allergy. *Cell. Immunol.* **2012**, *273*, 140–149, doi:10.1016/j.cellimm.2011.12.006.
130. Kofler, S.; Ackaert, C.; Samonig, M.; Asam, C.; Briza, P.; Horejs-Hoeck, J.; Cabrele, C.; Ferreira, F.; Duschl, A.; Huber, C.; et al. Stabilization of the Dimeric Birch Pollen Allergen Bet v 1 Impacts Its Immunological Properties. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 540–551, doi:10.1074/jbc.M113.518795.
131. Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4 2015.
132. Phillips, J.C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R.D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802, doi:10.1002/jcc.20289.
133. MacKerell, A.D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R.L.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; et al. All-Atom Empirical Potential for

- Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586–3616, doi:10.1021/jp973084f.
134. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [<sup>15</sup>N]Nitrate in Biological Fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138, doi:10.1016/0003-2697(82)90118-X.

## Biografija

Isidora I. Protić-Rosić je rođena 28.01.1994. godine u Beogradu, Srbija gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije upisala je školske 2013/2014. godine na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, smer Biohemija. 2017. god. koje je završila sa prosečnom ocenom 9,41. Završni rad pod naslovom „Ekspresija, prečišćavanje i karakterizacija rekombinantnog konstrukta BanLec-Bet v 1“ je odbranila sa ocenom 10. 2017/2018 je upisala master akademske studije na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, na studijskom programu Biohemija koje je završila 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,60, završni master rad pod naslovom „Optimizacija ekspresije, prečišćavanja i strukturna karakterizacija rekombinantnog konstrukta BanLec -Bet v 1“ odbranila je sa ocenom 10. Bila je nosilac stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije od 2015-2017. god. Doktorske akademske studije je upisala 2018. godine na Univerzitetu u Beogradu- Hemijskom fakultetu, na studijskom programu Biohemija. Kao istraživač pripravnik bila je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“ (172049). Aktivno učestvuje u okviru HORIZON-MSCA-DN-2021 ALLPreT projekta „Allergenicity Prediction Toolbok for Novel Foods“ u obuci studenata doktorskih studija. Od letnjeg semestra školske 2020/2021. godine do danas zaposlena je kao asistent pri Katedri za Biohemiju na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Dobitnik je stipendije Federacije evropskih biohemijskih društava za tromesečni boravak na Medicinskom Univerzitetu u Beču 2021. godine. Evropska federacija društva imunologa je nagradila Isidoru I. Protić-Rosić stipendijom za tromesečni boravak na Institutu za Imunologiju, Medicinskog Univerziteta u Beču u 2024. godini. Od 2018. godine Isidora I. Protić-Rosić je član Biohemijskog društva Srbije, čiji je sekretar od 2021. godine. Od 2023. godine je član Društva Imunologa Srbije.

Прилог 1.

образац изјаве о ауторству

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Исидора Протић-Росић

Број индекса ДБ 02/2018

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање имуноремодулаторног ефекта химерног протеина Vet v 1-BanLec и његових мутаната на ћелијама урођеног имунског система“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Прилог 2.

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Исидроа Протић- Росић

Број индекса ДБ 02/2018

Студијски програм Биохемија

Наслов рада „Испитивање имуноремодулаторног ефекта химерног протеина Vet v 1-VanLec и његових мутаната на ћелијама урођеног имунског система“

Ментор др Марија Гавровић-Јанкуловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду

Потписани \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Прилог 3.

образац изјаве о коришћењу

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Испитивање имуноремодулаторног ефекта химерног протеина Vet v 1-BanLec и његових мутаната на ћелијама урођеног имунског система“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.