

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидаткиње **Исидоре В. Протић-Росић**, мастер биохемичара, пријављене под насловом „Испитивање имуноремодуlatorног ефекта химерног протеина **Bet v 1-BanLec** и његових мутаната на ћелијама урођене имуности“.

1. Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је испитивање имуномодуlatorног ефекта лектина банане (BanLec) и његовог мутанта BanLec_{H84T} као адјуванаса урођене имуности у алерген специфичној имунотерапији (АИТ) на моделу главног алергена брезе (*Betula verrucosa*) Bet v 1. За ова истраживања клонираће се, производити и пречишћавати химерни протеин Bet v 1-BanLec и његов мутант који се састоје од хипоалергене изоформе алергена брезе Bet v 1l и BanLec_{H84T} који поседује мутацију на позицији 84 где је хистидин замењен треонином што овај протеин чини немитогеним у односу на лектин банане [1].

Коришћењем протеинске базе података (PDB), нуклеотидне базе Националног центра за биотехнолошке информације (NCBI) и биоинформатичких алата биће дизајниране химерне структуре Bet v 1-BanLec, Bet v 1l-BanLec_{H84T} и BanLec_{H84T}-Bet v 1l. Након клонирања гена за лектин банане (Gene Bank ID EU055641.1), алерген Bet v 1 (Gene Bank ID AJ002110.1), мутант лектина банане (BanLec_{H84T}), хипоалергену изоформу алергена брезе Bet v 1l (Gene Bank ID AJ006906.1), химере Bet v 1-BanLec, Bet v 1l-BanLec_{H84T} и BanLec_{H84T}-Bet v 1l, ови протеини ће бити хетеролого произведени у прокариотском експресионом систему (*Escherichia coli*). Употребом хорматографских техника овако

добијени рекомбинантни протеини ће бити пречишћени до хомогености, а потом окарактерисани спектроскопским, електрофоретским и имунохемијским методама.

У другом делу истраживања пречишћени и окарактерисани антигени користиће се за праћење имуномодулаторног одговора *in vitro* на ћелијској култури перитонеалних мишијих макрофага, као и на ћелијама макрофага добијених диференцијацијом комерцијално доступних ТНР-1 моноцита (ћелијска линија хумане акутне моноцитне леукемије). Поред тога биће успостављен систем ко-културе сачињен од комерцијално доступних епителних ћелија које имитирају епителни монослој- Сасо-2 ћелије (ћелијска линија хуманог епителног колоректалног карцинома) и макрофага диференцираних из ТНР-1 моноцита. Имунолошки одговор након третмана ових ћелија одговарајућим антигенима ће бити праћен одређивањем нивоа експресије одређених про- и анти-инфламаторних цитокина.

3. Основне хипотезе

Стопа преосетљивости на алергене полена у свету је око 40%, док преко 400 милиона људи пати од симптома алергијског ринитиса узрокованог полинозом, што додатно може бити праћено астмом, упалом коже, али и развојем алергије на храну услед структурне хомологије између протеина хране и алергена из полена [2]. Међу биљкама које се опрашују ветром фамилија *Betulaceae* представља један од главних извора алергена полена, док је доминантан алерген полена беле брзе (*Betulla verrucosa*) Bet v 1 [2].

Једини третман са дугорочним ефектом на ток алергијског обољења јесте алерген-специфична имунотерапија (АИТ) која модификује имунски одговор на узрочнике болести - алергене. Ова терапија ефикасно смањује запаљење, мењањем ћелијског али и хуморалног имунског одговора приликом контакта са алергеном, а кључна особина за успешност ове терапије је производња алерген-специфичних IgG антитела. Сматра се да су алерген-специфична IgG4 антитела одговорна за дуготрајни ефекат АИТ [3]. Иако постоје различити начини администрације алергена приликом имунотерапије, сублингвална администрација представља ефикасан, безбедан и за пацијента комфоран начин лечења [4]. Орално мукозно ткиво у својим горњим слојевима садржи антиген-

презентујуће ћелије (Лангерхансове ћелије и макрофаге), које испољавају толерогени фенотип, па у присуству алергена изазвају толеранцију уместо инфламације поларизацијом алерген специфичних CD4⁺ Т ћелија од Th2 ка Th1 и Т регулаторним ћелијама [4]. Сублингвална имунотерапија је праћена и смањењем у нивоу IgE антитела специфичних за дати алерген, док се ниво алерген специфичних IgG1, IgG4 и IgA антитела повећава [4]. Прва генерација вакцина за АИТ садржала је екстракте природних алергена, али проблеми у квалитативним и квантитативним варијацијама у садржају појединачних алергена у алергеном екстракту су утицали на ефикасност терапије. Како би се производиле вакцине дефинисаног састава и тиме смањиле нежељене реакције прешло се на развој вакцина које садрже алергене добијене технологијом рекомбинантне ДНК. Ово је довело до развоја бројних стратегија у АИТ као што су употреба нативних алергена, употреба ДНК или РНК вакцина које кодирају примарну структуру алергена, као и дизајнирање хипоалергених молекула [5]. Употреба рекомбинантних хипоалергених деривата алергена је омогућила истовремено смањење нежељених алергених реакција и задржавање Т ћелијских епитопа [5]. Овако добијене вакцине су имале мању или исту ефикасност као и природни екстракти. Комбиновањем рекомбинантно произведених алергена са адјувансима или агенсима који модификују и активирају урођени имуни одговор, а уз то и циљано усмеравају алерген на антиген-презентујуће ћелије оралног ткива побољшала би се њихова ефикасност [4], а самим тим би се и економски оправдала производња рекомбинантних алергена. Као адјуванси у АИТ могу се користити стимулатори урођене имуности алуминијум хидроксид, липозоми, партикуле сличне вирусима, лиганди TLR (*eng. Toll-like receptors*), партикуле базиране на аминокиселинама, као и различити векторски системи [6]. Лектин банане је протеин који специфично препознаје и везује манозу. Овај протеин има ефекат на модулацију имуног система [7], као и на модификовање имунолошког одговора макрофага кроз везивање за олигосахаридне јединице на површини њихових рецептора, TLR2 и CD14 [8], а такође стимулише и производњу IgG4 антитела [9]. Наведена својства чине VanLec потенцијалним адјувансом у АИТ. Како би се превазишао проблем Т-ћелијске митогености произведен је мутант лектина банане коме је замењен хистидин тренином на позицији 84 чиме је редукована митогеност овог протеина, док су друге особине лектина задржане [1].

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Научни циљеви су дефинисани кроз следеће фазе:

- Дизајн и клонирање рекомбинантних антигена BanLec, Bet v 1, BanLec_{H84T}, Bet v 11, Bet v 1-BanLec, Bet v 11-BanLec_{H84T} и BanLec_{H84T}-Bet v 11
- Оптимизација експресије и пречишћавање рекомбинантних антигена
- Биохемијска и имунолошка карактеризација рекомбинантних антигена
- Развој стабилне ћелијске кокултуре од епителног монослоја и макрофага
- Анализа нивоа експресије одређених про- и анти-инфламаторних цитокина након третмана макрофага у монослоју и развијене стабилне ћелијске кокултуре

Очекивани резултати су успешна производња и карактеризација рекомбинантних антигена у *Escherichia coli* експресионом систему, као и испитан њихов утицај на регулацију имунолошког одговора на *in vitro* ћелијским моделима.

5. Методе истраживања

Ради дизајна химерних протеина од главног алергена полена брезе Bet v 1 и лектина банане (BanLec), као и мутаната Bet v 11-BanLec_{H84T} и BanLec_{H84T}-Bet v 11 користиће се протеинска база података (PDB) и нуклеотина база података (NCBI).

За умножавање гена користиће се стандардне методе рекомбинантне ДНК технологије (трансформација хемијски компетентних ћелија *E. coli* DH5 α , colony-PCR). За производњу рекомбинантних антигена хемијски компетентне бактеријске ћелије *E. coli* BL21 ће бити трансформисане одговарајућим плазмидима.

Након оптимизације процеса експресије у бактеријским ћелијама оптимизоваће се пречишћавање рекомбинантних протеина коришћењем хроматографских метода раздвајања (афинитетна хроматографија и афинитетна хроматографија са имобилизованим металом). Након пречишћавања добиће се протеини од интереса у милиграмским количинама.

За карактеризацију протеина користиће се електрофоретске технике (SDS-PAGE), имунохемијске методе (имуноблот и ензимски имуносорбентни есеј- ELISA), као и савремене биохемијске методе (спектрометрија циркуларног дихроизма). За одређивање концентрације протеина користиће се спектрофотометријске методе.

За развој стабилне ћелијске кокултуре користиће се Сасо-2 епителне ћелије и макрофаги диференцирани из ТНР-1 моноцита. Док ће се за третман макрофага у монослоју користити макрофаги диференцирани из ТНР-1 моноцита и перитонеални мишији макрофаги.

За анализу нивоа генеске експресије одговарајућих про- и анти-инфламаторних цитокина користиће се PCR техника.

6. Литература

- [1] M. G. Lloyd, D. Liu, M. Legendre, D. M. Markovitz, and J. F. Moffat, "H84T BanLec has broad spectrum antiviral activity against human herpesviruses in cells, skin, and mice," *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-05580-6.
- [2] L. Pointner *et al.*, "Initiating pollen sensitization - Complex source, complex mechanisms," *Clin. Transl. Allergy*, vol. 10, no. 1, pp. 1–18, 2020, doi: 10.1186/s13601-020-00341-y.
- [3] J. Eckl-Dorna *et al.*, "Allergen-specific antibodies regulate secondary allergen-specific immune responses," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. JAN, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2018.03131.
- [4] P. Moingeon, V. Lombardi, V. Baron-Bodo, and L. Mascarell, "Enhancing Allergen-Presentation Platforms for Sublingual Immunotherapy," *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, vol. 5, no. 1, pp. 23–31, 2017, doi: 10.1016/j.jaip.2016.07.020.
- [5] M. Curin *et al.*, "Next-Generation of Allergen-Specific Immunotherapies : Molecular Approaches," *Curr. Allergy Asthma Rep.*, vol. 18, no. 39, pp. 1–13, 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0790-x>.

- [6] Z. Feng, X. Yi, and J. Hajavi, “New and old adjuvants in allergen-specific immunotherapy: With a focus on nanoparticles,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 236, no. 2, pp. 863–876, 2021, doi: 10.1002/jcp.29941.
- [7] L. J. de Camargo, T. Picoli, G. Fischer, A. C. O. de Freitas, R. B. de Almeida, and L. da Silva Pinto, “Antiviral activity of native banana lectin against bovine viral diarrhea virus and bovine alphaherpesvirus type 1,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 157, pp. 569–576, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.125.
- [8] E. Marinkovic *et al.*, “Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin,” *PLoS One*, vol. 12, no. 2, pp. 1–21, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0172469.
- [9] I. Koneczny *et al.*, “IgG4 Autoantibodies in Organ-Specific Autoimmunopathies: Reviewing Class Switching, Antibody-Producing Cells, and Specific Immunotherapies,” *Front. Immunol.*, vol. 13, no. March, pp. 1–20, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.834342.