

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА**

**УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

**ПРЕДМЕТ:** Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Исидоре Протић-Росић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду одржаној 14.03.2024. године, одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Исидоре Протић-Росић, мастер биохемичара, асистента Хемијског факултета Универзитета у Београду, под насловом:

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

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној 30.03.2023. године на захтев Хемијског факултета (евиденциони број: 145/5 од 09.03.2023. године) дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (евиденциони број: 61206-1005/2-23).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно-научном већу подноси следећи

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација Исидоре Протић-Росић написана је на 118 страна, А4 формата, фонт 12, проред 1,5, и садржи 45 слика и 30 табела. Докторска дисертација је подељена на 8 поглавља: Увод (2 стране), Теоријски део (25 страна), Циљеви (2 стране), Наши радови (35 страна), Дискусија (8 страна), Закључак (2 стране), Материјал и методе (26 страна), Литература (14 страна, 134 цитата). Поред наведеног, дисертација садржи и насловне стране на српском и енглеском језику, једну страну са именима ментора и чланова комисије, Захвалницу (2 стране), Сажетак на српском и енглеском језику (по 3 стране), Листу скраћеница (3 стране), Садржај (3 стране), Биографију кандидата (2 стране), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности (1 страна) и Изјаву о коришћењу (2 стране).

**Увод** садржи опис предмета истраживања и осврт на актуелна истраживања која су од значаја за ову докторску дисертацију. Описан је проблем алергија, са посебним акцентом на алергију на полен брезе. Додатно, описан је значај алерген-специфичне имунотерапије, са нагласком на значај адјуванса и улогу макрофага као представника антиген-приказујућих ћелија. Такође, описан је значај лектина банане као потенцијалног адјуванса у алерген-специфичној имунотерапији.

**Теоријски део** је подељен на 6 целина. Целина **Алергије** даје преглед патологије алергијске болести, са освртом на фазе болести и најчешће алергене. Највећа пажња је посвећена инхалаторним алергенима, са посебним освртом на главни алерген полена брезе Bet v 1. Друга целина, **Терапије алергије**, објашњава пасивне облике лечења алергије и алерген-специфичну имунотерапију (АИТ) као једино дугорочно решење. Додатно су појашњени механизам АИТа и начини администрације алергена. У трећој целини, **Нове стратегије у развоју АИТ**, описан је значај молекуларне алергологије у стандардизацији терапеутика који се примењују у АИТ. Осим тога, детаљно су описани имуномодулаторни агенси као адјуванси који појачавају ефикасност терапеутика. Четврта целина, **Антиген-приказујуће ћелије у алерген-специфичној имунотерапији**, даје преглед антиген приказујућих ћелија, као и њихове улоге у обради антигена, активацији наивних CD4<sup>+</sup> Т ћелија и усмеравању њихове диференцијације ка различитим фенотиповима. Посебно су обрађени макрофаги, са детаљним описом рецептора које исказују на својој површини. У петој целини, **Лектин банане као имуномодулаторни агенс у алерген-специфичној имунотерапији**, описан је овај протеин, уз посебно истраживање његових имуномодулаторних карактеристика. Шеста целина, **Модел системе за тестирање имуномодулаторних ефеката**, описује различите модел системе који се користе како би се испитао имуномодулаторни ефекат терапеутика. У овој целини су детаљно описане предности и недостатци ћелијских и животињских модел система, као и ћелијских кокултура као модел система за тестирање потенцијалних терапеутика.

У поглављу **Циљеви** наведени су основни циљеве ове докторске дисертације. Такође, дат је и приказ конкретних задатака постављених како би се омогућило остваривање главних циљева.

У поглављу **Наши радови** приказани су резултати остварени током израде ове докторске дисертације. Ово поглавље је организовано у осам целина. Прве три целине се односе на анализу Bet v 1-BanLec (Cwt) рекомбинантне химере. Описана је њена производња у *E. coli* експресионом систему, пречишћавање и карактеризација. Такође приказани су и резултати функционалних тестова на мишијим перитонеалним макрофагима. Четврта целина описује производњу и пречишћавање мутанта Bet v 1l-BanLec<sub>H84T</sub> (C1) и BanLec<sub>H84T</sub>-Bet v 1l (C2). У петој целини описани су резултати одређивања капацитета везивања IgE антитела из серума алергичних пацијената на полен брезе за рекомбинантне химере Cwt, C1 и C2. Шеста целина описује успостављање стабилне кокултуре Caco-2 епителних ћелија и THP-1 макрофага. Осим тога, приказани су и резултати добијени након анализе генске експресије

про- и анти-инфламаторних цитокина у оба типа ћелија након третмана успостављене кокултуре. У шестој и седмој целини описани су резултати анализе излучених цитокина у медијум након третмана ТНР-1 макрофага и мононуклеарних ћелија периферне крви пацијената алергичних на полен брезе.

Поглавље **Дискусија** критички разматра резултате проистекле из ове дисертације и позиционира их у контексту доступних литературних података. Упоредном анализом доступних експерименталних и литературних података потврђене су или оповргнуте иницијалне хипотезе и претпостављена су објашњења описаних феномена.

**Закључак** даје кратак преглед резултата ове докторске студије и одговора на питања формулисана у оквиру циљева ове дисертације.

**Материјал и методе** садрже детаљан опис опреме, реагенаса, узорака као и експерименталних метода и процедура коришћених у овој докторској дисертацији.

## **Б. Кратак приказ резултата**

У овој докторској дисертацији испитан је имуномодулаторни ефекат три рекомбинантна протеина. Први Bet v 1-BanLec (Cwt) представља рекомбинантну химеру изграђену од главног алергена полена брезе Bet v 1 и лектина банане (BanLec). Друга два протеина су изграђена од хипоалергене изоформе Bet v 1, Bet v 1I, и слабо митогеног мутанта лектина банане, BanLec<sub>H84T</sub>, који су повезани на различите начине: Bet v 1I-BanLec<sub>H84T</sub> (C1) и BanLec<sub>H84T</sub>-Bet v 1I (C2). Cwt, C1 и C2 су коришћене како би се испитао имуномодулаторни ефекат BanLec и BanLec<sub>H84T</sub> као стимулатора урођене имуности за примену у алерген-специфичној имунотерапији на моделу главног алергена полена брезе Bet v 1. Структурни модели рекомбинантних химерних протеина су дизајнирани коришћењем софистицираних *in silico* метода. Такође, *in silico* дизајн је показао да BanLec поседује већи афинитет за манозу од мутиране форме протеина због успостављања додатних π-π интеракција између Tyr 83 и His 84, које изостају код BanLec<sub>H84T</sub>. Употребом технологије рекомбинантне ДНК произведена су сва три протеина у *E. coli* експресионом систему. Cwt се експримирао као солубилна цитосолна фракција, док су химере C1 и C2 добијене у форми инклузионих тела. Применом хроматографских техника, сва три рекомбинантна протеина су успешно пречишћена. Употребом гел-филтрације је показано да је Cwt димер у раствору, док је BanLec тетрамер. Такође, анализом CD спектра је показано да Cwt задржава карактеристичан спектар за протеине који већински садрже β плоче као секундарне структуре.

Употребом резидентних мишијих перитонеалних макрофага (осликавају стање хомеостазе) и мишијих макрофага побуђених тиогликолатом (осликавају макрофаге у инфламаторном стању) тестиран је имуномодулаторни ефекат Cwt химере. Добијени резултати указују да је овај протеин задржао својство BanLec да индукује лучење анти-инфламаторног IL-10 цитокина у оба типа макрофага. С друге стране, у поређењу са BanLec овај протеин није стимулисао лучење про-инфламаторних цитокина TNF-α и IL-6. Такође, потенцијал Cwt да

стимулише отпуштање азот (II) оксида и да активира мијелопероксидазу био је занемарљиво мали.

Коришћењем серума пацијената алергичних на полен брезе, ELISA инхибицијом је показан капацитет везивања специфичних IgE антитела за Cwt, C1 и C2, као и за Bet v 1 и Bet v 1l. Добијене IC50 вредности за Bet v 1 и Cwt су биле упоредиве (0,1 µg протеина), док су IC50 вредности за Bet v 1l, C1 и C2 биле више (1 µg, 10 µg и 50 µg протеина, респективно).

Како би се испитао међусобни утицај епителних ћелија и лимфоидног система повезаног са мукозом (МАЛТ) након стимулације рекомбинантним химерама, развијена је стабилна ћелијска кокултура епителних ћелија (Caco-2) и макрофага диференцираних из THP-1 моноцита. Диференцијација моноцита у макрофаге је постигнута употребом форбол-12-миристат-12 ацетата (PMA). Развој стабилне кокултуре је праћен мерењем трансепителног електричног отпора (TEEP). Caco-2 ћелије су расле током 21 дана на полупропустивом миграционом уметку. Након овог периода испод диференцираних Caco-2 ћелија засејани су макрофаги диференцирани из THP-1 моноцита. TEEP је по постављању кокултуре мерен након 4, 24 и 48 сати. Током овог периода није дошло до промене у TEEP, што је значило да је успостављена стабилна кокултура између два типа ћелија и да THP-1 макрофаги немају штетан утицај на епителне ћелије постављене са апикалне стране. Ћелије су са апикалне стране третиране рекомбинантним протеинима (BanLec, BanLec<sub>H84T</sub>, Bet v 1, Bet v 1l, Cwt, C1 и C2). Нетретиране ћелије су служиле као негативна контрола. Након завршеног третмана утврђено је да током третмана рекомбинантним протеинима није дошло до значајне промене у вредностима TEEP у односу на нетретиране контроле, што указује да рекомбинантни протеини немају негативан утицај на интегритет епителног монослоја. Урађена је анализа експримираних гена за про- и анти-инфламаторне цитокине у оба типа ћелија. Генску експресију TNF-α у Caco-2 ћелијама је стимулисао само BanLec. До експресије друга два анализирана про-инфламаторна цитокина IL-1β и IL-33, није дошло након третмана протеинима. С друге стране, статистички значајна експресија анти-инфламаторног цитокина IL-10 у Caco-2 ћелијама је детектована након третмана ћелијске кокултуре са BanLec, BanLec<sub>H84T</sub>, Cwt, C1 и C2. Анализа експримираних гена у THP-1 диференцираним макрофагима је показала да рекомбинантне химере нису утицале на пораст генске експресије про-инфламаторних цитокина TNF-α и IL-1β. С друге стране све три химере су довеле до пораста експресије IFN-γ. Такође све три рекомбинантне химере су индуковале статистички значајан пораст у нивоу експресије анти-инфламаторног цитокина IL-10. Испитан је и утицај рекомбинантних химера на профил секретованих цитокина након третмана THP-1 диференцираних макрофага. Ова анализа је показала да ни један од рекомбинантних протеина не утиче на излучивање IL-4 и IFN-γ, док је рекомбинантна химера Cwt утицала на пораст у концентрацији излученог анти-инфламаторног цитокина IL-10. Даље је анализиран утицај рекомбинантних химера на мононуклеарне ћелије периферне крви пацијената алергичних на полен брезе. Ова студија је показала да рекомбинантна химера Cwt утиче на излучивање IL-10, као и на однос концентрације IFN-γ

и IL-4. Наиме ова химера је довела до статистички значајног пораста у нивоу излученог IL-10, као и пораста IFN- $\gamma$ /IL-4 односа.

Добијени резултати су указали да међу тестираним рекомбинантним протеинима, Cwt има највећи потенцијал за даљи развој као терапеутик у АИТ.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе**

Стопа преосетљивости на алергене полена међу особама које пате од алергија у свету је око 40%, док преко 400 милиона људи пати од симптома алергијског ринитиса узрокованог полинозом, што додатно може бити праћено астмом, алергијским дерматитом, али и развојем алергије на храну услед структурне хомологије између протеина хране и алергена из полена [1]. Међу биљкама које се опрашују ветром фамилија *Betulaceae* представља један од главних извора алергена полена, док је доминантан алерген полена беле брезе (*Betula verrucosa*) Bet v 1 [1]. Изоформе Bet v 1 се међусобно разликују само у неколико аминокиселина, али се значајно разликују у IgE реактивности [2]. Доминантна изоформа Bet v 1a показује најјачу IgE реактивност, док Bet v 1d и Bet v 1l изоформе показују веома ниску IgE реактивност [2]. Последњих година се интензивно ради на унапређењу алерген-специфичне имунотерапије (АИТ) кроз употребу рекомбинантно произведених алергена, хипоалергених изоформи, или деривата алергена који садрже Т-, али не и Б- ћелијске епитопе [3]. Основни принцип АИТ подразумева модулацију имунског одговора од преваленце про-алергених Th2 ћелија ка равнотежи између Th1 и Th2 (Th1/Th2) ћелија и активацији Т регулаторних ћелија [4]. Један од кључних приступа за побољшање АИТ је модулација имунског одговора кроз стимулацију антиген-приказујућих ћелија које приказују пептиде у контексту МНС молекула наивним Т ћелијама и тако их активирају. Такође, антиген-приказујуће ћелије излучују цитокине који стварају средину, цитокински миље, који усмерава диференцијацију Т ћелија. Једно од потенцијалних решења за модулацију одговора антиген-приказујућих ћелија је комбиновање алергена са TLR агонистима [5]. Постоје различити начини администрације АИТ, али данас се најчешће примењује сублингвална администрација јер у поређењу са другим приступима представља ефикаснију, безбеднију и за пацијента комфорнију начин лечења [6]. Комбиновањем рекомбинантно произведених алергена са адјувансима или агенсима који модулишу и активирају урођени имуни одговор, а уз то и циљано усмеравају алерген на антиген-презентујуће ћелије оралног ткива побољшала би се њихова ефикасност [6]. VanLec, протеин који специфично препознаје манозу поседује имуномодулаторно дејство које је показано *in vitro* [7]. Имуномодулаторно дејство би бар делом могло бити повезано са његовом способношћу да се веже за TLR2 и CD14 [7]. Како би се превазишао проблем Т-ћелијске митогености VanLec-а, произведена је мутирана форма VanLec<sub>H84T</sub> где је замењен хистидин треонином на позицији 84 [8]. Овом изменом је редукована митогеност овог протеина, док су друга својства лектина задржана. Како би се испитао имуномодулаторни ефекат VanLec и VanLec<sub>H84T</sub> као адјуванса у АИТ на модел систему Bet v 1, у овој докторској дисертацији су произведене и окарактерисане биохемијским и имунолошким методама

три рекомбинантне химере Bet v 1-BanLec (Cwt), Bet v 1l- BanLec<sub>H84T</sub> (C1) и BanLec<sub>H84T</sub>- Bet v 1l (C2). IgE реактивност химера произведених у овој докторској дисертацији је проверена инхибицијом у ELISA тесту са серумима пацијената алергичних на полен брезе из Републике Србије. IC50 вредности за Bet v 1 а и Cwt су биле упоредиве (0,1 µg протеина), док су вредности IC50 за Bet v 1l, C1 и C2 биле више (1 µg, 10 µg и 50 µg протеина респективно) што је у складу са литерарним подацима за Bet v 1l [2]. Активацијом макрофага преко TLR рецептора долази до ослобађања про-инфламаторних цитокина као што су TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-4 и IL-6, али и анти-инфламаторних цитокина попут IL-10 [9]. Резултати добијени након *ex vivo* стимулације резидентних и тиогликолатом побуђених мишијих перитонеалних макрофага указују да је Cwt задржала способност BanLec да подстакне секрецију IL-10 цитокина. Међутим, могућност Cwt да изазове про-инфламаторни одговор била је мања у поређењу са BanLec. Ово се огледа у занемарљивој производњи NO, као и ограниченој MPO активности и смањеној производњи про-инфламаторних цитокина. У прилог значају смањене продукције проинфламаторних цитокина иде чињеница да је једна од предложених мета за терапију алергијске астме проинфламаторни цитокин IL-6 због његове улоге приликом преузимања антигена од стране дендридских ћелија, као и иницијације Th2/Th17 посредоване инфламације дисајних путева [10]. TNF-α је још једна тачка која се циља током АИТ. TNF-α утиче на експресију адхезивних молекула чиме омогућава инфлукс еозинофила. Локално повећање нивоа TNF-α и NO је кључно за прелазак еозинофила и неутрофила у ткиво у ком се одиграва алергијска реакција [11]. Макрофаги секрецијом IL-10 цитокина утичу на повећање броја Т регуларних и Б регулаторних ћелија чиме се успоставља анти-инфламаторно стање у организму [12]. Анализа излучених цитокина након третмана TLR-1 макрофага је показала да Cwt има способност да стимулише лучење IL-10, док химере C1 и C2 не утичу на ниво секреције овог цитокина. Такође, ни један од тестираних протеина није утицао на повећање односа концентрација излучених IFN-γ/IL-4. Лучење IL-10 је карактеристично за M2 подгрупу макрофага која има значајну улогу у решавању инфекција паразитима, моделирању ткива, регулацији имунолошког одговора и терапији алергија [9]. Иако се интестинално и сублингвално мукозно ткиво разликују по функцији, они представљају делове МАЛТ-а и деле неке структурне и функционалне карактеристике. У оба ткива, епителне ћелије су повезане чврстим, пријањујућим везама, и десмосомима, што доприноси структурном интегритету ових ткива [13]. Иако Caco-2 епителне ћелије не осликавају савршено сублингвални епител, овај ћелијски модел систем се широко користи за проучавање функција епителне баријере и апсорпцију лекова због њихове способности да формирају чврсте спојеве и спонтано се диференцирају у епителни монослој. Осим тога, у складу са смерницама прописаним од стране регулаторних агенција FDA (*eng. Food and Drug administration*) и WHO (*eng. World health organisation*) [14,15], Caco-2 *in vitro* евалуација се препоручује током преклиничких испитивања нових терапија које се орално примењују. У овој докторској дисертацији успешно је успостављен модел ћелијске кокултуре Caco-2 епителних ћелија и TLR-1 диференцираних макрофага. Рекомбинантни протеини нису имали негативан утицај на монослој епителних ћелија. Анализа генске експресије након третмана кокултуре је показала да у Caco-2 ћелијама ни једна од химера

није индуковала експресију про-инфламаторних цитокина TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-33, док је дошло до индуковања експресије анти-инфламаторног цитокина IL-10. Ово је изузетно значајно зато што су у цревима у неинфламаторном стању епителне ћелије главни извор IL-10 и сматра се да су одговорне за одржавање хомеостазе овог ткива [16]. Показано је да епителне ћелије ослобађају IL-10 након активације преко TLR2 и TLR4 на њиховој површини [16]. Анализа генске експресије у THP-1 макрофагима након стимулације ћелијске кокултуре је показала да су све три рекомбинантне химере стимулисале експресију IFN- $\gamma$ , али и IL-10. Показано је да регулациони механизам у дендритским ћелијама који може да допринесе утишавању нежељеног имунског одговора повезаног са алергијама укључује коекспресију IL-10 и IFN- $\gamma$  [17]. Имуномодулаторни потенцијал рекомбинантних химера је финално испитан на мононуклеарним ћелијама периферне крви пацијената алергичних на полен брезе. Ове примарне ћелије као модел системи пружају бољи увид у потенцијалне ефекте у организму човека јер и након изоловања задржавају своје физиолошке особине и функције [18]. Међу анализираним протеинима, Cwt химера је показала способност стимулације лучења анти-инфламаторног цитокина IL-10, а додатно је утицала и на повећање односа концентрација IFN- $\gamma$ /IL-4 излучених од стране мононуклеарних ћелија периферне крви.

#### Литература:

1. Pointner, L.; Bethanis, A.; Thaler, M.; Traidl-Hoffmann, C.; Gilles, S.; Ferreira, F.; Aglas, L. Initiating Pollen Sensitization - Complex Source, Complex Mechanisms. *Clin. Transl. Allergy* **2020**, *10*, 1–18, doi:10.1186/s13601-020-00341-y.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Moingeon, P.; Lombardi, V.; Baron-Bodo, V.; Mascarell, L. Enhancing Allergen-Presentation Platforms for Sublingual Immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2017**, *5*, 23–31, doi:10.1016/j.jaip.2016.07.020.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. Food and Drug Administration (FDA) M9 Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers: Guidance for Industry. *Publ. by ICH* **2021**, *20*.
  15. Agency, E.M. Who Guideline on Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers. *WHO Drug Inf.* **2023**, *37*, 670–693.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.

## Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су два научна рада од којих је један публикован у врхунском међународном часопису (категирија М21), а други у истакнутом међународном часопису (категирија М22). Такође, резултати су презентовани и на научним скуповима - четири саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (категирија М34) и једно саопштење са скупа од националног значаја штампано у изводу (категирија М64).

### 1) Радови

#### **Врхунски међународни часописи (М21):**

Protić-Rosić I., Lopandić Z, Popović D., Blagojević G., Gavrović-Jankulović M., rBet v 1a-BanLecwt induce upregulation of IL-10 and IFN- $\gamma$  gene expression in Caco-2/THP-1 co-culture and secretion of IL-10 and IFN- $\gamma$ /IL-4 levels in PBMCs of birch pollen allergic donors, *International Immunopharmacology*, 2024,129



<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111607>. (IF 5,6 (2022), Immunology (56/161), Pharmacology and Pharmacy (44/278) ISSN 1567-5769)

***Истакнути часописи међународног значаја (M22):***

Protić-Rosić I.; Nešić A.; Lukić I.; Miljković R.; Popović D.; Atanasković-Marković M.; Stojanović M.; Gavrović-Jankulović M. Recombinant Bet v 1-BanLec chimera modulates functional characteristics of peritoneal murine macrophages by promoting IL-10 secretion. *Molecular Immunology* 2021,138. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.06.015>. (IF 4,174 Biochemistry and Molecular Biology (152/297), Immunology (93/163) ISSN 0161-5890).

**2) Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)**

1. Protić-Rosić I.; Lopandić Z.; Popović D.; Blagojević D.; Gavrović-Jankulović M.; Evaluation of the immunomodulatory potential of chimera Bv1a-BLwt and its mutants on the co-culture model system, Book of Abstracts 12<sup>th</sup> SBS Conference “Biochemistry in Biotechnology”, p. 71-72, 21-23. September 2023, Belgrade, Serbia
2. Protić-Rosić I.; Lopandić Z.; Gavrović-Jankulović M.; Bv1l-BL<sub>H84T</sub> and BL<sub>H84T</sub>-Bv1l chimeras modulate immune response of THP1 derived macrophages, Book of Abstracts 47th FEBS Congress: “Together in bioscience for a better future”, p. 08.253, 8-12. July 2023, Tours, France.
3. Protić-Rosić I.; Lopandić Z.; Zlatanova M.; Nešić A.; Miljković R.; Lukić I.; Atanasković-Marković M.; Stojanović M.; Gavrović-Jankulović M.; Immunomodulatory potential of banana lectin in allergen-specific immunotherapy, Book of Abstracts of the 1st European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (1-EuSPMF), p. 17, 7-9. September 2022, Belgrade, Serbia.
4. Protić-Rosić I.; Gavrović-Jankulović M.; Modulation of THP-1 derived macrophages by Bet v 1l-BL<sub>H84T</sub> and BL<sub>H84T</sub>-Bet v 1l chimeras, Book of Abstracts 8<sup>th</sup> SBS Conference: “Amazing Biochemistry”, p. 124, 22-23. September 2022, Novi Sad, Serbia.

**3) Саопштења са скупа од националног значаја штампано у изводу(M64)**

1. Protić-Rosić I., Miljković R., Nešić A., Marinković E., Stojanović M., Gavrović-Jankulović M., Modulation of peritoneal murine macrophages functional characteristics by Bet v 1-BanLec chimera, 9th SBS Conference “Diversity in Biochemistry”, p. 157, 14-16. November 2019, Belgrade, Serbia.

**Д. Провера оригиналности докторске дисертације**

Оригиналност докторске дисертације Исидоре Протић-Росић је проверена употребом програма iThenticate на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Утврђено је да је степен подударности од 10% настао као последица цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом ове дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је прихватљиво у складу са чланом 9. овог Правилника. Стога сматрамо да је докторска дисертација Исидоре И. Протић-Росић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

## **Ђ. Закључак**

На основу приказаних података и резултата, Комисија је закључила да је у поднетој дисертацији под насловом „Испитивање имуноремодулаторног ефекта химерног протеина Bet v 1-BanLec и његових мутаната на ћелијама урођеног имунског система“ кандидат Исидора И. Протић-Росић успешно одговорила на задате циљеве у оквиру којих је применом рекомбинантне технологије ДНК произвела химерни протеин Bet v 1-BanLec, као и два мутанта Bet v 1l-BanLec<sub>H84T</sub> и BanLec<sub>H84T</sub>-Bet v 1l. Протеине је окарактерисала инструменталним и биохемијским методама. Додатно, у овој докторској дисертацији је први пут тестирана IgE рекативност хипоалергене изоформе главног алергена полена брезе Bet v 1l на популацији особа алергичних на брезу у нашој земљи. Потврђен је нижи афинитет специфичних IgE антитела за Bet v 1l у поређењу са проалергеном изоформом Bet v 1, као и нижи афинитет ка химерама које садрже Bet v 1l у односу на химеру Bet v 1-BanLec. Такође, кандидат је испитао имуномодулаторни ефекат рекомбинантне химере Bet v 1-BanLec *ex vivo* на мишијим перитонеалним макрофагима. Додатно је испитан утицај рекомбинантних химера на макрофагима диференцираним из ТНР-1 моноцитне ћелијске линије. Поред тога, у овој докторској дисертацији је успешно успостављена кокултура епителних ћелија хуманог аденокарцинома Сасо-2 и макрофага диференцираних из ТНР-1 моноцита. Комбинација Сасо-2 и ТНР-1 ћелија у кокултури омогућава опонашање интеракције епителних ћелија и ћелија урођене имуности у МАЛТ-у. Финално испитивање имуномодулаторног ефекта химера је урађено на мононуклеарним ћелијама периферне крви пацијената алергичних на полен брезе. Након свеобухватне анализе имуномодулаторног ефекта рекомбинантних химера Bet v 1-BanLec, Bet v 1l-BanLec<sub>H84T</sub> и BanLec<sub>H84T</sub>-Bet v 1l у различитим модел системима (кокултура ТНР-1 макрофагима и Сасо-2 епителним ћелијама, и мононуклеарне ћелије периферне крви пацијената алергичних на брезу), закључено је да химера Bet v 1-BanLec показује највећи терапијски потенцијал у контексту алерген-специфичне имунотерапије код пацијената алергичних на полен брезе. Осим што има способност индукције секреције анти-инфламаторног цитокина IL-10, Bet v

1-BanLec и значајно смањењује проинфламаторни одговор у поређењу са референтним антигеном Bet v 1.

Резултати научно – истраживачког рада кандидата постигнути у оквиру ове докторске дисертације су објављени у два научна рада категорија M21 и M22. Поред тога, резултати ове докторске дисертације су саопштени на 5 скупова, од којих је 4 од међународног значаја. На основу изложеног Комисија предлаже Наставно – научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Исидоре И. Протић-Росић под насловом „Испитивање имуноремодуlatorног ефекта химерног протеина Bet v 1-BanLec и његових мутаната на ћелијама урођеног имунског система“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду, 05.04.2024.

**Комисија:**

---

Др Тања Ћирковић-Величковић  
Редовни професор  
Хемијски факултет, Универзитет у Београду  
Дописни члан САНУ

---

Др Милица Поповић  
Ванредни професор  
Хемијски факултет Универзитет у Београду

---

Др Маријана Стојановић  
Научни саветник  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“  
Институт од националног значаја за Републику Србију  
Универзитет у Београду