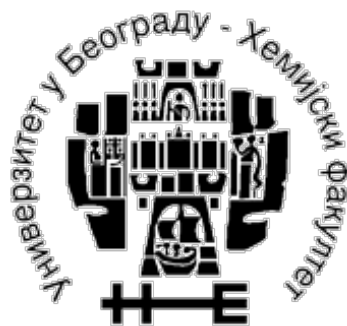


UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



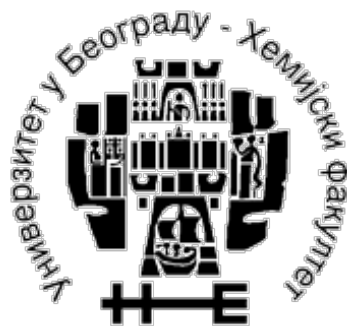
Zorana D. Lopandić

**Ispitivanje terapeutskog efekta H1sD2 himere i
njenih glikoformi na modulaciju imunskog
odgovora kod alergije na kućnu prašinu**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Zorana D. Lopandić

**The therapeutic effect of the H1sD2 chimera and
its glycoforms on the modulation of the immune
response in house dust mite allergy**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentor:

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

Članovi komisije:

Dr Radivoje Prodanović
Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Milica Popović
Vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Rajna Minić
Naučni savetnik
Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak"

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ispitivanje terapijskog efekta H1sD2 himere i njenih glikoformi na modulaciju imenskog odgovora kod alergije na kućnu prašinu

Sažetak

Alergijske bolesti predstavljaju jedan od najbrže rastućih javno zdravstvenih problema savremenog društva, sa učestalošću koja poprima gotovo pandemijske razmere. Među njima, alergija na grinje kućne prašine (*Dermatophagoides*) jedna je od najčešćih respiratornih alergija i značajno utiče na kvalitet života obolelih. Iako je alergen-specifična imunoterapija (AIT) jedina terapija koja deluje na sam uzrok bolesti i može trajno preusmeriti imunski odgovor iz patološkog u tolerogeni, njena primena je i dalje ograničena neželjenim efektima, dugim trajanjem terapije i nedovoljnom efikasnošću kod određenog broja pacijenata. Zbog toga postoji potreba za razvojem novih strategija koje će AIT učiniti kraćom, bezbednijom i efikasnijom. U ovoj disertaciji predstavljen je inovativni pristup koji koristi N-glikane kao nove adjuvanse kroz razvoj hibridne H1sD2 vakcine. Ova vakcina je himerni glikoprotein sastavljen od Der p 2 alergena i receptor-vezujućeg domena hemaglutinina virusa influence (H1s). U okviru H1s domena, ciljanom mutagenezom su uvedena različita N-glikozilaciona mesta kako bi se ispitao imunomodulatorni efekat N-glikana, posredovan njihovim vezivanjem za manozne receptore na ćelijama urođene imunosti. Pet različitih glikoformi H1sD2 proizvedeno je u ekspresionom sistemu *Pichia pastoris* i detaljno okarakterisano savremenim tehnikama, uključujući masenu spektrometriju, imunoblot, protočnu citometriju i konfokalnu mikroskopiju. Sve glikoforme su zadržale sposobnost vezivanja IgE antitela iz seruma alergičnih pacijenata i pokazale specifičnu interakciju sa DC-SIGN receptorima na THP-1 makrofagima. Funkcionalni imunološki testovi su pokazali da sve glikoforme, posebno M2 H1sD2, indukuju tolerogeni citokinski odgovor. Ova disertacija potvrđuje da ciljani glikoinženjering i uvođenje N-glikana može selektivno usmeravati imunski odgovor aktivirajući receptore urođenog imenskog sistema, čime se otvara nova perspektiva u razvoju AIT vakcina koje su bezbednije i efikasnije. Pored toga, ova strategija ima potencijalnu primenu i u širem polju imunoterapije, kao i dizajnu novih vakcina.

Ključne reči: alergije, HDM, alergen-specifična imunoterapija, adjuvansi, hemaglutinin

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

The therapeutic effect of the H1sD2 chimera and its glycoforms on the modulation of the immune response in house dust mite allergy

Abstract

Allergic diseases represent one of the fastest-growing public health challenges of modern society, with a prevalence approaching pandemic proportions. Among them, house dust mite allergy (caused by *Dermatophagoides* species) is one of the most common forms of respiratory allergy and significantly affects patients' quality of life. Although allergen-specific immunotherapy (AIT) is currently the only treatment that targets the root cause of the disease and can permanently redirect the immune response from a pathological to a tolerogenic state, its application remains limited by adverse effects, long treatment duration, and insufficient efficacy in a subset of patients. Therefore, there is a clear need for new strategies to make AIT shorter, safer, and more effective. This dissertation presents an innovative approach that employs N-glycans as novel adjuvants through the development of the hybrid H1sD2 vaccine. This vaccine is a chimeric glycoprotein composed of the Der p 2 allergen and the receptor-binding domain of influenza virus hemagglutinin (H1s). Within the H1s domain, multiple N-glycosylation sites were introduced via targeted mutagenesis to investigate the immunomodulatory potential of N-glycans mediated by their binding to mannose receptors on innate immune cells. Five different H1sD2 glycoforms were produced using the *Pichia pastoris* expression system and thoroughly characterized using state-of-the-art techniques, including mass spectrometry, immunoblotting, flow cytometry, and confocal microscopy. All glycoforms retained their ability to bind IgE antibodies from allergic patient sera and showed specific interaction with DC-SIGN receptors on THP-1 macrophages. Functional immunological assays revealed that all glycoforms, particularly the M2 H1sD2 variant, induced a tolerogenic cytokine response. This dissertation demonstrates that targeted glycoengineering and the introduction of N-glycans can selectively direct immune responses by activating innate immune receptors, thereby opening a new perspective for the development of safer and more effective AIT vaccines. Moreover, this strategy holds promise for broader applications in immunotherapy and vaccine design.

Keywords: allergy, HDM, allergen-specific immunotherapy, adjuvants, hemagglutinin

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćenica

AIT – Alergen-specifična imunoterapija
AJ – Adherentne veze (*eng. Adherens Junctions*)
ANOVA – Analiza varijanse (*eng. Analysis of Variance*)
APC – Antigen-prezentujuće ćelije
APS – Amonijum-persulfat
BCIP – 5-Bromo-4-hlor-3-indolil-fosfat (*eng. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*)
B_{reg} – Regulatorne B ćelije
BSA – Govedi serumski albumin (*eng. Bovine Serum Albumin*)
CCL2 – CC-hemokin ligand 2
CTLA-4 – Citotoksični T-limfocitni antigen 4 (*eng. Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)
CXCL8 – CXC-hemokin ligand 8 (IL-8)
DC – Dendritske ćelije
DC-SIGN – (*eng. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*)
ELISA – Imunosorbentni esej povezan sa enzimom (*eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
EMTU – Epitelno-mezenhimalna trojna jedinica (*eng. Epithelial–Mesenchymal Trophic Unit*)
FBS – Fetalni goveđi serum (*eng. Fetal Bovine Serum*)
FDA – Uprava za hranu i lekove SAD (*eng. Food and Drug Administration*)
FITC – Fluorescein-izotiocijanat
FSC – Prednje rasipanje svetlosti (*eng. Forward Scatter*)
GBP – Glikan-vezujući protein (*eng. Glycan binding protein*)
GM-CSF – Faktor koji stimulise formiranje kolonija granulocita i makrofaga (*eng. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
HA- Hemaglutinin
HCD – Disocijacija sudarima pri višim energijama (*eng. Higher-energy Collisional Dissociation*)
HDM – Grinje kućne prašine (*eng. House Dust Mites*)
HILIC – Tečna hromatografija zasnovana na hidrofilnim interakcijama (*eng. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)
HIV-1 – Virus humane imunodeficijencije
HSA – Humani serumski albumin (*eng. Human Serum Albumin*)
Ig – Imunoglobulin
IL – Interleukin
ILC2 – Urođene limfoidne ćelije tipa 2 (*eng. Innate Lymphoid Cells Type 2*)
IMAC – Imobilizovana metal-afinitetna hromatografija (*eng. Immobilized Metal Affinity Chromatography*)
JAK – Janus kinaza
LC – Tečna hromatografija (*Liquid Chromatography*)
LTB4 – Leukotrijen B4
M-CSF – Faktor koji stimulise formiranje kolonija makrofaga (*eng. Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
mAb – Monoklonsko antitelo
MBL – Manozna-vezujući lektin
MD-2 – Protein diferencijacije mijeloidnih ćelija 2 (*eng. Myeloid Differentiation protein-2*)

MGL – Makrofagni galaktozni tip lektina

MHC – Glavni kompleks tkivne podudarnosti (*eng. Major Histocompatibility Complex*)

MMR – Makrofagni manozni receptor

MS – Masena spektrometrija (*eng. Mass Spectrometry*)

NBT – Nitroplavo tetrazolijum (*eng. Nitro Blue Tetrazolium*)

NC – Nitroceluloza

NF- κ B – Nuklearni faktor kapa-B

PAMPs – Molekulski obrasci karakteristični za patogen (*eng. Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PBMC – Mononuklearne ćelije periferne krvi (*eng. Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS – Puferisan fiziološki rastvor (*eng. Phosphate-Buffered Saline*)

PCR – Lančana reakcija polimeraze (*eng. Polymerase Chain Reaction*)

PD-1 – Protein programirane ćelijske smrti 1 (*eng. Programmed Cell Death Protein 1*)

PRR – Receptori za prepoznavanje obrazaca (*eng. Pattern Recognition Receptors*)

SDS-PAGE – Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu sa natrijum dodecil-sulfatom (*eng. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SSC – Bočno rasipanje svetlosti (*eng. Size Scatter*)

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

TBS – Trisom puferisan fiziološki rastvor

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (*eng. N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine*)

TGF- β – Transformišući faktor rasta beta (*eng. Transforming Growth Factor Beta*)

Th1 – Pomoćničke T ćelije tipa 1

Th2 – Pomoćničke T ćelije tipa 2

TJs – Čvrste veze (*eng. Tight Junctions*)

TLR – Toll-like receptori

TNF- α – Faktor nekroze tumora alfa

tPBS – Puferisan fiziološki rastvor sa Tween 20

T_{reg} – Regulatorne T ćelije

TSLP – Limfopoetin strome timusa (*eng. Thymic Stromal Lymphopoietin*)

tTBS – Trisom puferisan fiziološki rastvor sa Tween-20

ZO – Zonula okcludens

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski deo	3
2.1. Alergije	3
2.2. Osobine alergijske inflamacije	3
2.2.1. Epitelna barijera	4
2.2.2. Alergijska senzitivizacija i inflamacija	5
2.2.3. Rana faza alergijske reakcije	6
2.2.4. Kasna faza alergijske reakcije	7
2.2.5. Hronična alergijska inflamacija	8
2.2.6. Alergijske respiratorne bolesti	9
2.2.7. Alergija na grinje kućne prašine (HDM)	10
2.2.8. Klinički značajni HDM alergeni	12
2.2.9. Der p 2	13
2.3. Tretman alergijskih bolesti	15
2.3.1. Edukacija pacijenata i kontrola izloženosti alergenima u terapijskom pristupu	15
2.3.2. Tradicionalna farmakoterapija	15
2.3.3. Primena biološke terapije u alergijskim bolestima	16
2.3.4. Alergen-specifična imunoterapija	18
2.3.5. Regulatorne ćelije imunskog sistema	20
2.3.6. Uloga antigen-prezentujućih ćelija u AIT	21
2.4. Nove strategije imunoterapije	22
2.4.1. Alergoidi	22
2.4.2. Rekombinantni alergeni	23
2.4.3. Ciljani pristupi u AIT	23
2.4.4. Adjuvansi	24
2.4.5. Novi adjuvansi za primenu u AIT	25
2.4.6. Uloga glikana u imunskom odgovoru	28
2.4.7. Glikoproteini virusa	29
2.5. Hemaglutinin kao adjuvans u AIT	29
2.6. Modeli u alergen-specifičnoj imunoterapiji	31
2.6.1. Životinjski modeli	31
2.6.2. <i>In vitro</i> modeli: THP-1 ćelijska linija	32
2.7. Kvasci kao domaćini za proizvodnju proteinskih terapeutika	33
2.7.1. <i>Pichia pastoris</i> kao ekspresioni sistem	34
3. Ciljevi	37
4. Naši radovi	39
4.1. In silico dizajn H1sD2 genskih konstrukata i provera plazmida	39
4.1.1. In silico dizajn genskih konstrukata	39
4.1.2. Provera plazmida	39
4.1.3. 3D modelovanje	40
4.2. Ekspresija i prečišćavanje proteina	43
4.2.1. Ekspresija proteina u <i>Pichia pastoris</i> ekspresionom sistemu	43
4.2.2. Prečišćavanje eksprimiranih proteina	43

4.3.	Analiza proteina masenom spektrometrijom	45
4.3.1.	Analiza aminokiselinske sekvence.....	45
4.3.2.	Analiza glikopeptida	47
4.3.3.	Analiza masa intaktnih H1sD2 glikoproteina	48
4.4.	IgE reaktivnost Der p 2 i H1sD2 proteina	50
4.5.	Ispitivanje vezivanja H1sD2 glikoproteina za receptore na THP-1 makrofaga	52
4.5.1.	Karakterizacija diferenciranih THP-1 makrofaga.....	52
4.5.2.	Vezivanje H1sD2 proteina za površinske receptore	54
4.5.3.	Analiza vezivanja H1sD2 proteina za DC-SIGN receptor na površini M2 makrofaga	56
4.6.	Ispitivanje imunomodulatornog efekta H1sD2 glikoproteina	57
4.6.1.	Analiza relativne genske ekspresije citokina nakon tretmana THP-1 makrofaga	57
4.6.2.	Tretman H1sD2 glikoproteinima indukuje proinflamatorni citokinski profil kod PBMCs osoba alergičnih na grinje kućne prašine	59
4.7.	Razvoj protokola imunizacije kod C57BL/6 i BALB/c miševa.....	62
4.7.1.	Analiza nivoa specifičnih antitela	63
4.7.2.	Procena prisustva leukocita u plućima.....	65
4.7.3.	Eozinofili i neutrofili u bronhoalveolarnom lavažu (BALF)	67
4.7.4.	Određivanje nivoa sekretovanih citokina.....	67
4.7.5.	Analiza citokina nakon tretmana mišjih splenocita Der p 2 alergenom i H1sD2 glikoproteinima	69
5.	Diskusija.....	76
6.	Zaključak.....	81
7.	Materijal i metode	83
7.1.	Dizajn Der p 2 i H1sD2 genskih konstrukata	83
7.2.	Bioinformatičke alatke za <i>in silico</i> analizu rekombinantnih proteina	83
7.3.	Metode rekombinantne DNK tehnologije za kloniranje, transformaciju i ekspresiju rekombinantnih proteina	83
7.3.1.	Medijumi za rast bakterija.....	84
7.3.2.	Priprema rastvora antibiotika	84
7.3.3.	Medijumi za rast kvasaca	85
7.3.4.	Kompetentne ćelije	86
7.3.5.	Umnožavanje plazmida u DH5 α ćelijama	88
7.3.6.	Transformacija kompetentnih KM71H ćelija	89
7.3.7.	Ekspresija rekombinantnih proteina u KM71H ćelijama.....	89
7.4.	Elektroforetske metode.....	90
7.4.1.	Agarozna elektroforeza	90
7.4.2.	Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE)	90
7.5.	Metode prečišćavanja proteina.....	92
7.5.1.	Prečišćavanje rekombinantnih Der p 2 i H1sD2 proteina.....	92
7.6.	Metode određivanja koncentracije proteina	93
7.6.1.	Primena Lambert-Beer-ovog zakona	93
7.7.	Određivanje koncentracije endotoksina	93
7.8.	Analiza proteina masenom spektrometrijom	94

7.8.1.	Deglikozilacija glikoproteina	94
7.8.2.	Priprema uzoraka za analizu masenom spektrometrijom	94
7.8.3.	Analiza peptida i obogaćenih glikopeptida	96
7.8.4.	Analiza intaktnih proteina	98
7.8.5.	Obrada i analiza podataka nakon MS analize	99
7.9.	Imunološke metode	99
7.9.1.	Dobijanje seruma pacijenata alergičnih na HDM	99
7.9.2.	Provera IgE reaktivnosti u imunoblotu	100
7.10.	Animalni modeli	102
7.10.1.	Laboratorijski miševi	102
7.10.2.	Imunizacija miševa	102
7.10.3.	Detekcija specifičnih IgG i IgE antitela ELISA testom	102
7.10.4.	Analiza imunskih ćelija iz pluća protočnom citometrijom	103
7.10.5.	Bronhoalveolarna lavaža i analiza ćelija	104
7.10.6.	Priprema i stimulacija splenocita	106
7.11.	Diferencijacija i tretman THP-1 makrofaga	106
7.11.1.	Gajenje THP-1 monocita	106
7.11.2.	Diferencijacija THP-1 monocita u M0 i M2 makrofage	106
7.11.3.	Karakterizacija THP-1 M0 i M2 makrofage	107
7.12.	Vezivanje H1sD2 glikoformi za površinske receptore na makrofagima	107
7.12.1.	Obeležavanje proteina fluorescein-izotiocijanatom (FITC)	107
7.12.2.	Ispitivanje vezivanja FITC-obeđenih proteina za diferencirane THP-1 makrofage pomoću protočne citometrije	108
7.12.3.	Ispitivanje vezivanja FITC-obeđenih proteina za diferencirane THP-1 makrofage pomoću konfokalne mikroskopije	108
7.13.	Genska ekspresija citokina RT-PCR metodom	109
7.13.1.	Izolovanje ukupne količine RNA	109
7.13.2.	RT-PCR	109
7.14.	Tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi	110
7.15.	Određivanje koncentracija sekretovanih citokina ELISA testom	111
7.16.	Statistička obrada podataka	112
8.	Literatura	114

1. Uvod

Okvirno 30% svetske populacije pati od alergija, koje predstavljaju hronične inflamatorne bolesti izazvane neadekvatnim imunskim odgovorom na bezopasne molekule u okolini, koji se nazivaju alergeni [1,2]. Alergijska reakcija podrazumeva aktivaciju bazofila i mastocita koja je posredovana imunoglobulinom E (IgE), a sami simptomi mogu da variraju od blagih do simptoma koji mogu biti opasni po život. Alergije su svrstane od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO) u jedan od tri najvažnija poremećaja koje treba sprečiti i kontrolisati u 21. veku [3].

Grinje kućne prašine (HDM) su jedan od glavnih izvora inhalatornih alergena koji izazivaju respiratorne simptome i predstavljaju značajan globalni zdravstveni problem. HDM alergija je povezana sa drugim respiratornim bolestima, kao što su alergijski rinitis, alergijska astma i atopijski dermatitis [4,5]. Po izveštajima SZO, 600 miliona ljudi pati od alergijskog rinitisa, a istovremeno 200 miliona ljudi ima astmu [6]. Jedan od klinički najznačajnijih alergena iz grinja kućne prašine je Der p 2, snažan izazivač alergijskih reakcija [4,7].

Alergen-specifična imunoterapija (AIT) trenutno je jedini efikasan tretman za alergije koji modifikuje imunski odgovor. Sama AIT podrazumeva davanje definisanih količina alergena alergičnoj osobi tokom određenog perioda u cilju razvijanja tolerancije na taj alergen. Ova terapija efikasno smanjuje zapaljenje, i moduliše i urođeni i stečeni imunski odgovor tako što postepeno desenzitizuje mastocite i bazofile na određene alergene, smanjujući preosetljivost tokom vremena [2,8,9]. Ovaj proces smanjuje aktivaciju alergenu-specifičnih Th ćelija, dok istovremeno podstiče razvoj regulatornih T i B ćelija i pojačava proizvodnju specifičnih blokirajućih antitela, poput IgG i IgA [10]. Iako AIT nudi dugotrajnu efikasnost, varijabilan odgovor različitih pacijenata ukazuje na potrebu za inovativnim pristupima u cilju poboljšanja njene delotvornosti, tako da se konstantno radi na razvoju novih strategija [11,12]. Jedna od obećavajućih strategija je primena novih adjuvanasa, što bi moglo da skрати vreme tretmana, kao i cenu terapije. Uloga novih adjuvanasa u AIT je da preusmere imunski odgovor sa Th2 ka proizvodnji blokirajućih IgG antitela tj. da preusmere imunski odgovor i dovede do ravnoteže imunskog odgovora. Kao adjuvansi, u AIT se mogu koristiti stimulatori urođene imunosti, TLR agonisti, C-tip lektina ili neke virusne čestice [4,13–16].

U cilju poboljšanja desenzitizacije na alergene, glikani su istraživani kao adjuvansi koji mogu povećati imunogenost i preusmeriti imunski odgovor sa Th2 na Th1 [15,17,18]. Glikani virusa, pored toga što su modulatori adaptivnog imunskog sistema, važni su i za interakciju sa ćelijama urođene imunosti, koja se ostvaruje preko receptora koji prepoznaju obrazac (PRR). Pokazano je da neki PRR prepoznaju šećerne strukture na glikoproteinima, a neki od tih receptora su MBL, MMR, MGL i DC-SIGN. Promenom tipa, mesta ili broja N-vezanih glikana u obrascu glikozilacije alergena može se značajno uticati na interakciju alergena sa ćelijama imunskog sistema, a time i na celokupni imunski odgovor [19–23].

C-tip lektinski receptori (CLR) imaju naročito važnu ulogu u AIT zbog svoje sposobnosti da prepoznaju strukture glikana na alergenima i oblikuju imunski odgovor u skladu s tim [24]. CLR receptori se mogu vezivati za specifične ugljenohidratne motive, što ih čini ključnim senzorima za glikozilovane alergene [25]. Ova glikan-receptor interakcija je od suštinskog značaja za usmeravanje antigen prezentujućih ćelija, naročito makrofaga i dendritskih ćelija, ka tolerogenom fenotipu.

Biološka aktivnost glikoproteina kao što je hemaglutinin (H), strukturni protein prisutan na površini mnogih virusa, uključujući influencu, zavisi od sastava njegovih N-glikana [26–28]. Hemaglutinin ima dvostruku ulogu u posredovanju ulaska virusa i pokretanju imunskog

prepoznavanja [29], što ga čini atraktivnim kandidatom za primenu u modulaciji imunskog odgovora u vidu adjuvansa. Posebno njegov receptor-vezujući domen (RBD) ima veliki potencijal kao novi adjuvans za AIT [30–32]. Njegova dokazana sposobnost da izazove snažan imunski odgovor, zajedno sa širokom primenom u razvoju vakcina, pozicionira ga kao obećavajuću platformu za dizajn gliko-inženjerisanih hibridnih adjuvans-alergen proteina.

2. Teorijski deo

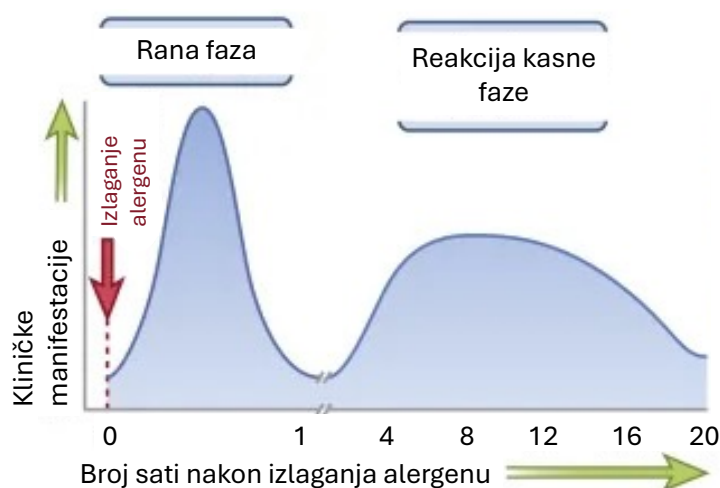
2.1. Alergije

Termin „alergija“ se koristi za opisivanje neodgovarajućeg imunskog odgovora stečenog imunskog sistema na neinfektivne supstance iz okoline. Stečeni imunski sistem obezbeđuje zaštitu od različitih patogena, međutim nekada dolazi do preteranog odgovora na bezopasne antigene što predstavlja reakciju preosetljivosti. Same alergije spadaju u reakcije preosetljivosti tipa I (rana preosetljivost) na osnovu klasifikacije iz 1963. po Coombs i Gell [33]. Ovaj tip preosetljivosti uključuje proizvodnju specifičnih IgE antitela na alergene. Termin „alergen“ prvi put je upotrebljen od strane von Pirqueta 1906. godine kako bi obuhvatio sve strane supstance koje mogu izazvati imunski odgovor, a najčešće su to proteini velike molekulske mase, uključujući glikoproteine, lipoproteine i nukleoproteine [34]. Sama patogeneza alergijskih bolesti je veoma složena i obuhvata mnoge faktore, kao što su genetika, epigenetika, ekološki faktori, mikroekologija i funkcija imunskog sistema [3].

2.2. Osobine alergijske inflamacije

Alergijska inflamacija predstavlja glavnu oznaku patologije Th2 imunskog odgovora, kao što su astma, atopični dermatitis, rinosinusitis i alergije na hranu. Alergije su veoma česte i predstavljaju sve veći globalni problem koji pogađa oko 30% populacije [2,35], a Svetska zdravstvena organizacija ih svrstava u jedan od tri najvažnija poremećaja koje treba sprečiti i kontrolisati u 21. veku [3].

Alergijska inflamacija se može podeliti u tri vremenske faze. Reakcije rane faze izazvane su u prvim sekundama ili minutima nakon izlaganja alergenima, dok se reakcije kasne faze javljaju u roku od nekoliko sati (2 do 24h) (Slika 1). Hronična alergijska inflamacija je kontinuirana upala koja se javlja usled produženog ili ponavljajućeg izlaganja specifičnom alergenima i okarakterisana je ne samo prisustvom velikog broja imunskih ćelija urođene i stečene imunosti, nego i promenama u vanćelijskom matriksu i promenama u broju, fenotipu i funkciji ćelija pogođenog tkiva [36].



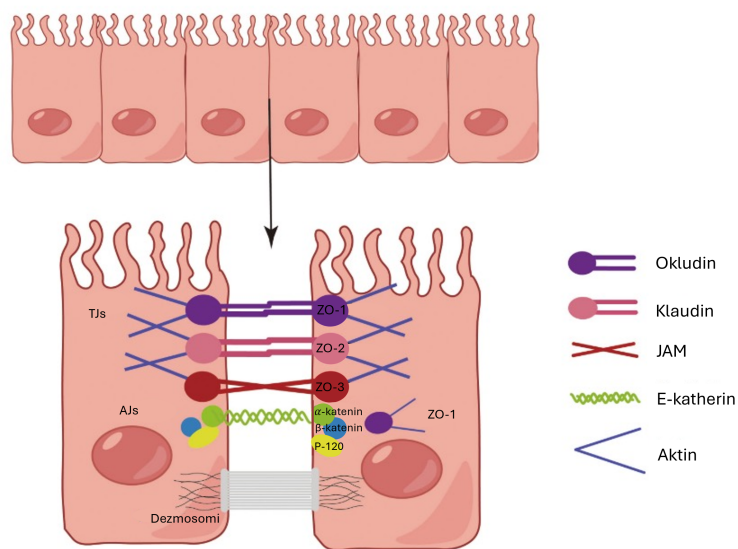
Slika 1: Kinetika imunskog odgovora na alergene. Preuzeto sa sajta <https://basicmedicalkey.com/hypersensitivity-disorders-caused-by-immune-responses/> i modifikovano

2.2.1. Epitelna barijera

Epitelne ćelije predstavljaju prvu barijeru između ljudskog organizma i vanjskog okruženja [3]. Između epitelne barijere kože, gastrointestinalnog i respiratornog trakta postoje sličnosti i razlike, kako u njihovoj strukturi, tako i u funkciji i biohemijским osobinama. Epitelno tkivo ima različite uloge, uključujući funkciju fizičke, hemijske i imunološke barijere [37]. Epitelne ćelije uspostavljaju barijeru kroz složene međusobne interakcije čvrstih veza (TJs), adherentnih veza (AJs) i dezmosoma. Kompleks čvrstih veza je sačinjen od kladina, okludina i adhezionih molekula sa glavnim citoplazmatskim proteinima, kao što su zonula okludens (ZO) proteini, ZO-1, ZO-2 i ZO-3. Adherentne veze, koje su postavljene ispod TJ obuhvataju E-katherin, aktin, vinculin, α -katenin i β -katenin. Dezmosomi koji su karakteristični po svojoj simetričnoj strukturi uključuju dve susedne membrane i imaju glavnu ulogu u uspostavljanju i održavanju stabilnih ćelijskih veza (Slika 2) [38].

Epitel koordinira odgovore na različite invazivne povrede tako što proizvodi razne imunomodulatorne i inflamatorne faktore kojima upravlja NF- κ B signalni put [3]. Disfunkcija epitelne barijere raznih tkiva je okarakterisana promenama u strukturi i funkcionalnim promenama epitelnih ćelija, narušenim čvrstim vezama i oslabljenim urođenim imunskim odgovorom [1]. Oštećenje epitelne barijere dovodi do progresije alergijske bolesti, jer se povećava propustljivost i favorizuje razvoj Th2 imunskog odgovora. Zbog svega navedenog, epitelne ćelije igraju ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji alergijskih bolesti.

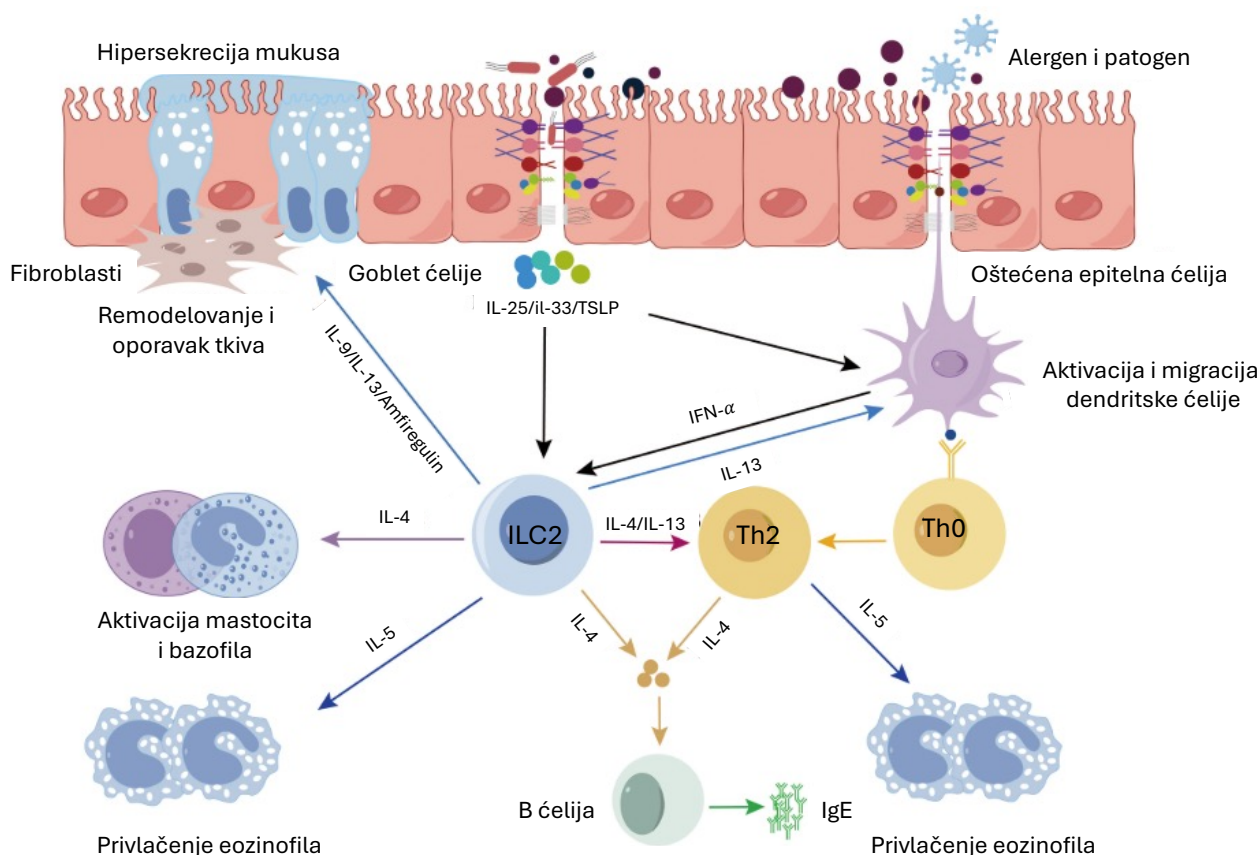
Većina alergena su proteini i neki od njih su proteaze, uključujući i Der p 1, jedan od glavnih alergena grinja kućne prašine (HDM). Još davne 1995. godine je prvi put pokazano da cistein proteaze iz HDM ekstrakta indukuju značajno povećanje permeabilnosti slojeva bronhijalne mukoze zbog povećane bioelektrične propustljivosti. Pokazano je da ove proteaze mogu direktno digestovati okludine i zonulu okludens-1 (ZO-1) u epitelu disajnih puteva, što povećava permeabilnost bronhijalnog epitela i olakšava prezentaciju alergena dendritskim ćelijama u subepitelijalnom tkivu [39].



Slika 2: Građa epitelne barijere. Preuzeto iz [37].

Pored fizičke barijere, epitelne ćelije predstavljaju i imunološku barijeru. One na svojoj površini imaju iskazane receptore kojima prepoznaju strukturne obrasce (PRRs) prisutne na brojnim patogenima, ali i na alergenima. Nakon strukturnog prepoznavanja, epitelne ćelije oslobađaju ključne citokine, kao što su IL-4, IL-5, IL-9, IL-33, TSLP i IL-3, koji aktiviraju ćelije urođene imunosti, kao

što su dendritske ćelije, bazofili, eozinofili, makrofagi i urođene limfoidne ćelije tipa 2 (ILC2). Ovakav proces promoviše oslobađanje citokina tipa 2, što dalje pokreće tip 2 imunskog odgovora (Slika 3) [37,40].

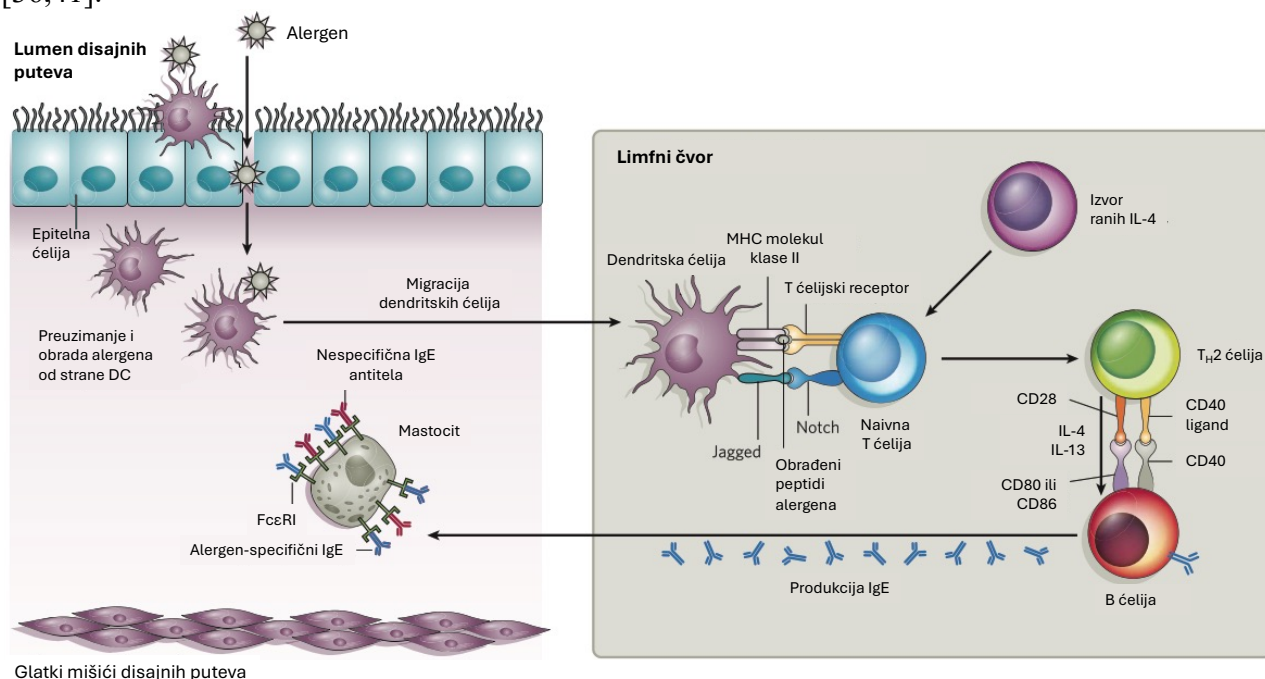


Slika 3: Epitelna barijera i tip 2 imunskog odgovora. Nakon izlaganja antigenu, alergenu ili patogenu, kompromitovana epitelna barijera podleže aktivaciji koja vodi ka oslobađanju različitih faktora od strane epitelnih ćelija, uključujući interleukine IL-25, IL-33 i TSLP. Takođe, do aktivacije može doći putem stimulacije dendritskih ćelija koje naknadno prezentuju antigen Th2 ćelijama ili ILC2 ćelijama. Preuzeto iz [37].

2.2.2. Alergijska senzitivizacija i inflamacija

Alergijska senzitivizacija predstavlja početak razvoja alergijske reakcije. Proizvodnja specifičnih antitela klase E (IgE) od strane B ćelija započinje u procesu senzitivizacije, kada organizam prvi put dođe u kontakt sa izvorom alergena. Alergeni tada bivaju obrađeni od strane antigen-prezentujućih ćelija (APĆ), kao što su dendritske ćelije i makrofagi, koje su ključne u imunskom odgovoru i predstavljaju most između urođene i stečene imunosti. Tako obrađeni fragmenti alergena, nakon migracije u najbliži limfni čvor, dalje bivaju prikazani u kontekstu MHC molekula klase II naivnim T ćelijama. Naivne CD4⁺ T ćelije se zatim diferenciraju u T pomoćničke ćelije tipa 2 (Th2 fenotip) i luče specifične citokine, IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, koji deluju na alergen-specifične B ćelijske klonove i stimulišu preuključivanje klasa imunoglobulina u smeru proizvodnje IgE klase antitela. Proizvedena alergen-specifična IgE antitela se vežu za visoko-afinitetne receptore (FcεRI) na efektorским ćelijama, poput bazofila ili mastocita. Proizvodnja i vezivanje specifičnih IgE antitela sa FcεRI se označava "senzitivizacijom" i predstavlja tihu fazu tokom koje ne dolazi do pojave simptoma (Slika 4).

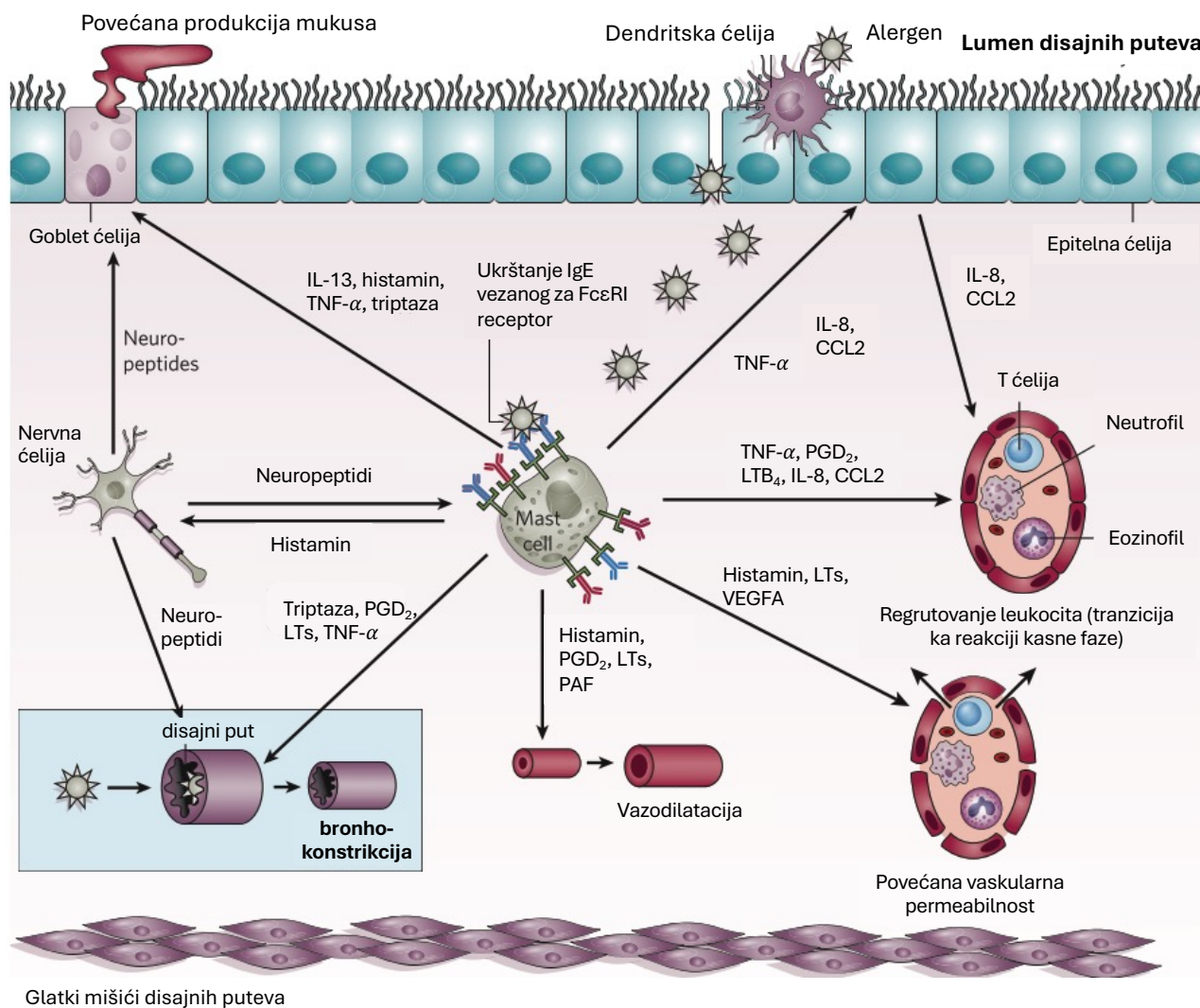
Ponovno izlaganje organizma istom specifičnom alergenu može izazvati aktivaciju mastocita i bazofila, gde dolazi do pojave simptoma alergije i time započinje efektorska faza alergijske reakcije [36,41].



Slika 4: Senzitivizacija disajnih puteva alergenom. Preuzeto iz [36].

2.2.3. Rana faza alergijske reakcije

Rana faza alergijske reakcije podrazumeva neposrednu reakciju preosetljivosti tipa I, koja se razvija u prvim minutama nakon izlaganja alergenu. Ovakva reakcija može biti lokalizovana ili sistemska kao što je slučaj kod anafilaktičkog šoka. Kod senzitivisanih osoba mastociti već imaju visokoafinitetne FcεRI receptore koji imaju vezana IgE antitela specifična za određeni alergen. Nakon ponovnog izlaganja alergenu, dolazi do umrežavanja IgE antitela sa bivalentnim ili multivalentnim alergenom, što uzrokuje agregaciju FcεRI receptora i pokretanje signalne kaskade unutar ćelije. Ovaj signalni proces vodi ka aktivaciji i degranulaciji mastocita i bazofila i do oslobađanja različitih bioaktivnih molekula (Slika 5). Neki od tih bioaktivnih molekula su histamin, serotonin i heparin, kao i proteinaze koje su specifične za mastocite (triptaze, himaze i matriks metalproteinaze). Pored navedenih medijatora, mastociti oslobađaju i medijatore lipidnog porekla koji utiču na metabolizam arahidonske kiseline i na taj način utiču i na oslobađanje prostaglandina (PGD₂) i leukotriena (LTB₄, LTC₄, LTD₄) [34]. Oslobađanje ovih medijatora dovodi do vazodilatacije, povećane vaskularne permeabilnosti i akutnih funkcionalnih promena u zahvaćenim organima, kao što su bronhokonstrikcija, sekrecija mukusa i urtikarija. Takođe, neki od oslobođenih medijatora promovišu lokalno regrutovanje i aktivaciju leukocita, doprinoseći razvoju kasne faze alergijske reakcije [36,41].

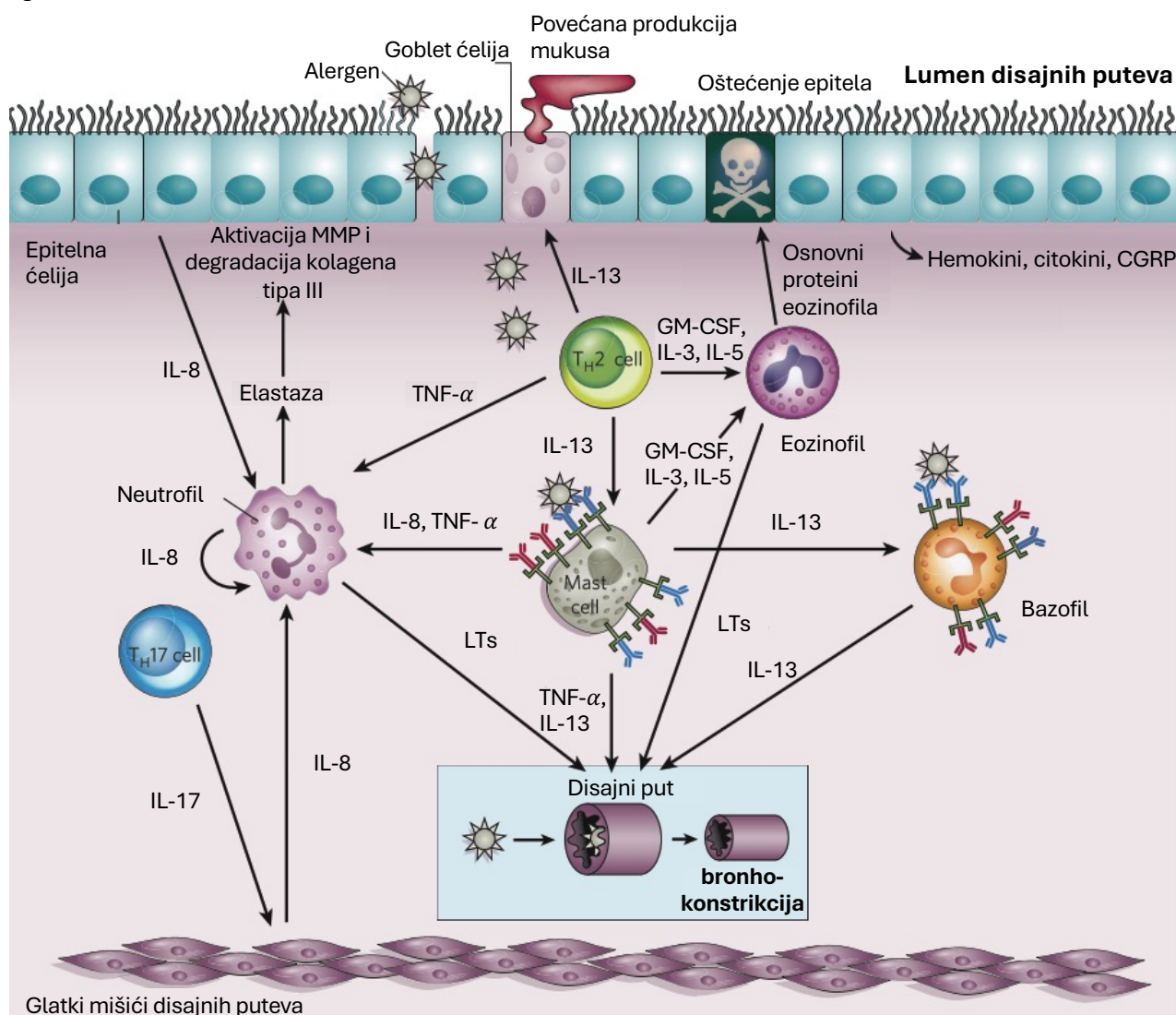


Slika 5: Rana faza alergijske inflamacije disajnih puteva. Preuzeto iz [36].

2.2.4. Kasna faza alergijske reakcije

Kasna faza alergijske reakcije se uglavnom razvija 2 do 6 sati nakon izlaganja alergenu, a svoj maksimalni pik dostiže između 6. i 9. sata. Za razliku od rane faze, koja uključuje momentalno oslobađanje prethodno formiranih medijatora, kasna faza se karakteriše sintezom i sekrecijom novih molekula koji dodatno pojačavaju i produžavaju zapaljensku reakciju. Nakon vezivanja alergena za IgE antitela na FcεRI receptorima, mastociti oslobađaju širok spektar novosintetisanih citokina, hemokina i faktora rasta, ali je njihovo oslobađanje znatno sporije nego oslobađanje prethodno formiranih medijatora. Među ključnim molekulima koji se oslobađaju nalaze se TNF, IL-8 (CXCL8), LTB4 (leukotrijen B4), CCL2 (CC-hemokin ligand 2) i drugi hemokini. Ovi medijatori imaju ulogu u regrutovanju dodatnih imunskih ćelija, kao i u aktivaciji komponenti urođene imunosti, uključujući neutrofile, eozinofile i monocite. Takođe utiču i na regulaciju aktivnosti dendritskih, T i B ćelija putem citokina kao što su IL-10, TNF-α, TGF-β, ali i histamin. Ipak, neki oslobođeni molekuli imaju i antiinflamatornu ili imunosupresorsku funkciju, kao što su IL-10 i TGF-β, čime doprinose modulaciji zapaljenske reakcije. Određeni proizvodi mastocita utiču i na strukturu ćelije, uključujući

vaskularne endotelijane ćelije, epitelne ćelije, fibroblasti, glatke mišiće i nervne ćelije, tako što povećavaju propustljivost epitelne barijere, razgrađuju vanćelijski matriks i narušavaju međucelijske veze, čime doprinose oštećenju i remodelovanju tkiva tokom alergijske reakcije (Slika 5) [36]. Pored mastocita, značajnu ulogu u ovoj fazi imaju i T limfociti specifični za peptide alergena, koji mogu biti već prisutni u tkivu ili naknadno regrutovani tokom rane faze. Njihova aktivacija dodatno doprinosi produženoj inflamaciji i potencijalnim tkivnim promjenama [36]. Smatra se da je kasna faza rezultat koordinisanog delovanja medijatora oslobođenih u ranoj fazi, kao i aktivacije T ćelija stimulisanih specifičnim antigenima, što dovodi do produženih simptoma i potencijalno hronične upale.



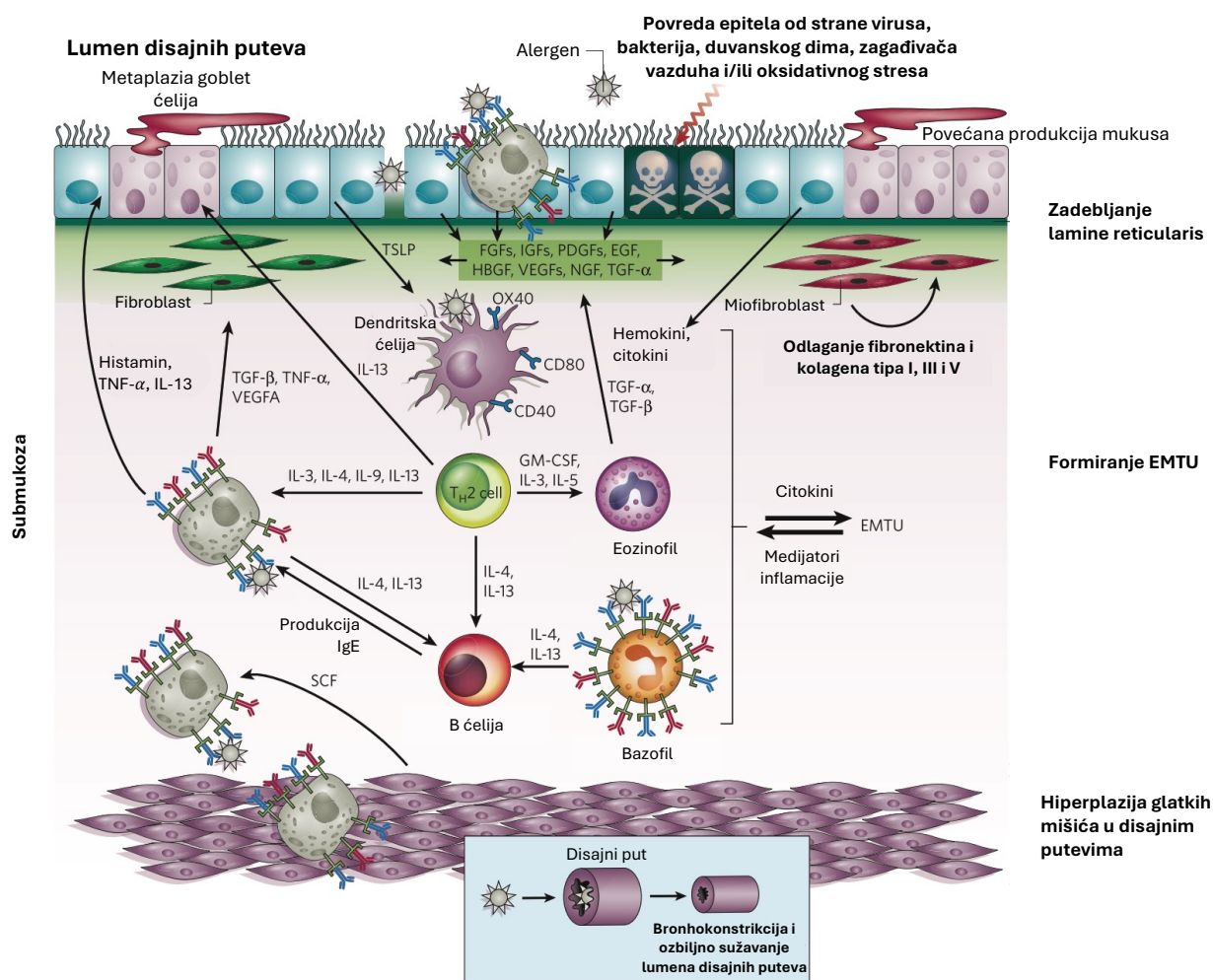
Slika 6: Kasna faza alergijske inflamacije disajnih. Preuzeto iz [36].

2.2.5. Hronična alergijska inflamacija

U slučajevima kada je izlaganje alergenu kontinuirano ili učestalo, dolazi do produžene inflamacije, pri čemu se brojne ćelije urođene i stečene imunosti regrutovane iz cirkulacije, akumuliraju u tkivu na mestu kontakta sa alergenom. Takva upalna sredina vodi ka dugotrajnoj

aktivaciji imunskih ćelija, što može rezultirati trajnim strukturnim i funkcionalnim promenama u pogođenim organima [36]. Iako alergijska reakcija u početku ima akutan karakter, ponovljena izlaganja vremenom vode ka razvoju hronične inflamacije, koja se karakteriše konstantnim inflamatornim odgovorom, tkivnom remodelacijom i perzistentnom aktivacijom ćelija. Ova faza uključuje progresivno oštećenje tkiva, zadebljanje bazalne membrane, fibrozu i promene u ćelijskoj populaciji, što može imati kliničke posledice koje dovode do smanjenja funkcionalnost organa i teže forme bolesti, kao što su astma ili hronični rinitis [36].

Zbog etičkih i tehničkih ograničenja, hronična alergijska inflamacija se ne može direktno proučavati kod ljudi, već se u tu svrhu koriste životinjski modeli, prvenstveno miševi. Ipak, mehanizmi koji dovode do prelaska iz akutne u hroničnu fazu inflamacije još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, te su predmet brojnih istraživanja [36].



Slika 7: Hronična faza alergijske inflamacije disajnih puteva. EMTU- Epitelno-mezenhimalna trojna jedinica. Preuzeto iz [36].

2.2.6. Alergijske respiratorne bolesti

Respiratorne alergije pogađaju disajne puteve i izazivaju različite simptome u vezi sa disanjem. Alergijske respiratorne bolesti, uključujući astmu, hronični rinosinusitis i alergijski rinitis, spadaju među najčešće alergije širom sveta i predstavljaju veliki zdravstveni i ekonomski problem i značajno

utiču na kvalitet života pogođenih individua [42]. Prema epidemiološkim studijama, učestalost respiratornih alergija procenjuje se na između 10 i 30%, pri čemu je populacija koja je pogođena obično brojnija u urbanim područjima nego u ruralnim. Globalno, 500 miliona ljudi pati od alergijskog rinitisa (AR) [43], a 300 miliona ljudi ima alergijsku astmu, što predstavlja najčešću kliničku manifestaciju alergije [44–46].

Alergijski rinitis je najčešće hronično oboljenje i karakterišu ga kihanje, zapušenost nosa, svrab u nosu i rinoreja, a uzrokovan je reakcijama na inhalatorne alergene. Ova imunska reakcija uključuje upalu sluzokože koju pokreću ćelije tipa 2 [44]. AR je često kombinovan sa astmom, koja predstavlja najčešće inflamatorno oboljenje pluća [46]. Sama astma je heterogena bolest koju karakteriše hronična inflamacija, pojačana bronhijalna reaktivnost i opstrukcija disajnih puteva, što dovodi do simptoma kao što su otežano disanje, stezanje u grudima, kašalj i iskašljavanje [46,47]. Alergijski rinitis i astma nastaju kao odgovor organizma na inhalatorne alergene, a najčešći izvori inhalatornih alergeni su polen, kućna prašina, plesan i životinjska dlaka [47].

2.2.7. Alergija na grinje kućne prašine (HDM)

Alergija na grinje kućne prašine je jedna od najčešćih respiratornih alergija i između 65 i 130 miliona ljudi širom sveta boluje od ove alergije [48]. Još 1967. godine kada su Voorhorst i Spieksma pokazali da su grinje glavni izvor alergena kućne prašine, oni su smatrali i da ovi alergeni igraju značajnu ulogu u razvoju astme [49]. Danas se zna da je HDM najčešći izvor alergena u zatvorenom prostoru i da je povezan sa alergijskim respiratornim bolestima, kao što su alergijski rinitis, alergijska astma i atopijski dermatitis [4,5]. Od alergijskog rinitisa pati 600 miliona ljudi, od kojih 200 miliona slučajeva ima i astmu. Kod odraslih astmatičnih pacijenata alergije su česte i sreću se u 50% slučajeva, od čega je 85% alergičnih na grinje [50].

Najčešće vrste grinja kućne prašine koje izazivaju alergije su *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) i *Dermatophagoides farinae* (Der f), kao i *Blomia tropicalis* u tropskim krajevima [51,52]. *D. pteronyssinus* je glavni izvor alergena kućne prašine u Centralnoj Evropi i pokazuje ukrštenu reaktivnost sa homolognim alergenima iz *D. farinae*, dok alergeni iz ova dva izvora pokazuju slabu ukrštenu reaktivnost sa alergenima iz *B. tropicalis* [4]. Do sada je identifikovano 40 grupa HDM alergena, od kojih 32 alergena iz *D. farinae* i 21 alergen iz *D. pteronyssinus* (Tabela 1).



Slika 8: Grinje kućne prašine (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Preuzeto iz [34].

Tabela 1: Alergeni grinja kućne prašine. Preuzeto iz [4].

Grupa alergena	<i>D. pteronyssinus</i>	<i>D. farinae</i>	Biološka aktivnost	Mw (kDa)	IgE reaktivnost
1	Der p 1	Der f 1	Cistein proteaze	25	80-100
2	Der p 2	Der f 2	ML domen LPS-a	14	80-100
3	Der p 3	Der f 3	Tripsin	Der p 3: 31 Der f 3: 29	7-97
4	Der p 4	Der f 4	α -amilaza	56	0-30
5	Der p 5	Der f 5	Nepoznato	14	30-40
6	Der p 6	Der f 6	Hemotripsin	25	41-65
7	Der p 7	Der f 7	Baktericidni protein koji povećava permeabilnost	Der p 7: 26, 30 i 31 Der f 7: 30–31	40
8	Der p 8	Der f 8	Glutation-S-transferaza	Der p 8: 27 Der f 8: 32	4-96
9	Der p 9	-	Serin preoteaza	29	92
10	Der p 10	Der f 10	Tropomiozin	Der p 10: 36 Der f 10: 37	2-81
11	Der p 11	Der f 11	Paramiozin	Der p 11: 103 Der f 11: 98	7-82
13	Der p 13	Der f 13	Protein koji se vezuje za masne kiseline	15	6
14	Der p 14	Der f 14	Apolipohorin	177	2-84
15	Der p 15	Der f 15	Protein sličan hitinazi	Der p 15: 58,8/61,4 Der f 15: 98/109	8-70
16	-	Der f 16	Gelsolin/vilin	53	47
17	-	Der f 17	Protein koji se vezuje za kalcijum	53	35
18	Der p 18	Der f 18	Protein koji se vezuje za hitin	Der p 18: 49,2 Der f 18: 60	38-63
20	Der p 20	Der f 20	Arginin kinaza	40	7-44
21	Der p 21	Der f 21	Nepoznato	14	30
22	-	Der f 22	Nepoznato	14,7	Nepoznato
23	Der p 23	Der f 23	Protein sličan peritrofinu	8	70-86
24	Der p 24	Der f 24	Protein koji se vezuje za ubihinol-citohrom c reduktazu	13	11

25	Der p 25	Der f 25	Triozafofat izomeraza	Der p 25: 27 Der f 25: 34	54
26	Der p 26	Der f 26	Laki lanac miozina	Der p 26: 14,1 Der f 26: 18	62
27	-	Der f 27	Serpin	48	42,1
28	Der p 28	Der f 28	HSP70	Der p 28: 45 Der f 28: 70	39
29	Der p 29	Der f 29	Ciklopilin	Der p 29: 27,7 Der f 29: 15	85
30	Der p 30	Der f 30	Feritin	Der p 30: 12,1 Der f 30: 15	63
31	Der p 31	Der f 31	Kofilin	Der p 31: 16,8 Der f 31: 15	32,5-34,6
32	Der p 32	Der f 32	Neorganska pirofosfataza	Der p 32: 45 Der f 32: 35	46
33	Der p 33	Der f 33	α -tubulin	Der p 33: 44,2 Der f 33: 52	65
34	-	Der f 34	Enamin/imin deaminaza	16	62,5
35	-	Der f 35	Nepoznato	14,4	51
36	Der p 36	Der f 36	Nepoznato	23	42
37	Der p 37	Der f 37	Protein koji sadrži domen peritrofina-A	Der p 37: 30 Der f 37: 29	28
38	Der p 38	Der f 38	Bakteriolitički enzim	15	26,7-45
39	Der p 39	Der f 39	Tropomiozin C	18	5,7-9,2
40	Der p 40	Der f 40	Protein sličan tioredoksinu	12	8-10

2.2.8. Klinički značajni HDM alergeni

Der p 1 i Der p 2 su se dugo smatrali glavnim HDM alergenima i poznato je da 80–85% senzitisanih osoba na *D. pteronyssinus* poseduje specifična IgE antitela na bar jedan od ovih alergena [53]. Tokom 2013. godine identifikovan je novi *D. pteronyssinus* alergen, Der p 23 [54], za koji je u više studija pokazana visoka IgE reaktivnost (70–86%), čime je potvrđeno da je ovaj protein, pored Der p 1 i Der p 2, treći klinički značajan HDM alergen [55,56]. Pored ova tri dominantna alergena, alergeni iz grupe 5, 7 i 21 su klasifikovani kao srednje važni alergeni, s obzirom na to da 30–40% pacijenata senzitisanih na grinje pokazuje IgE reaktivnost prema njima [57].

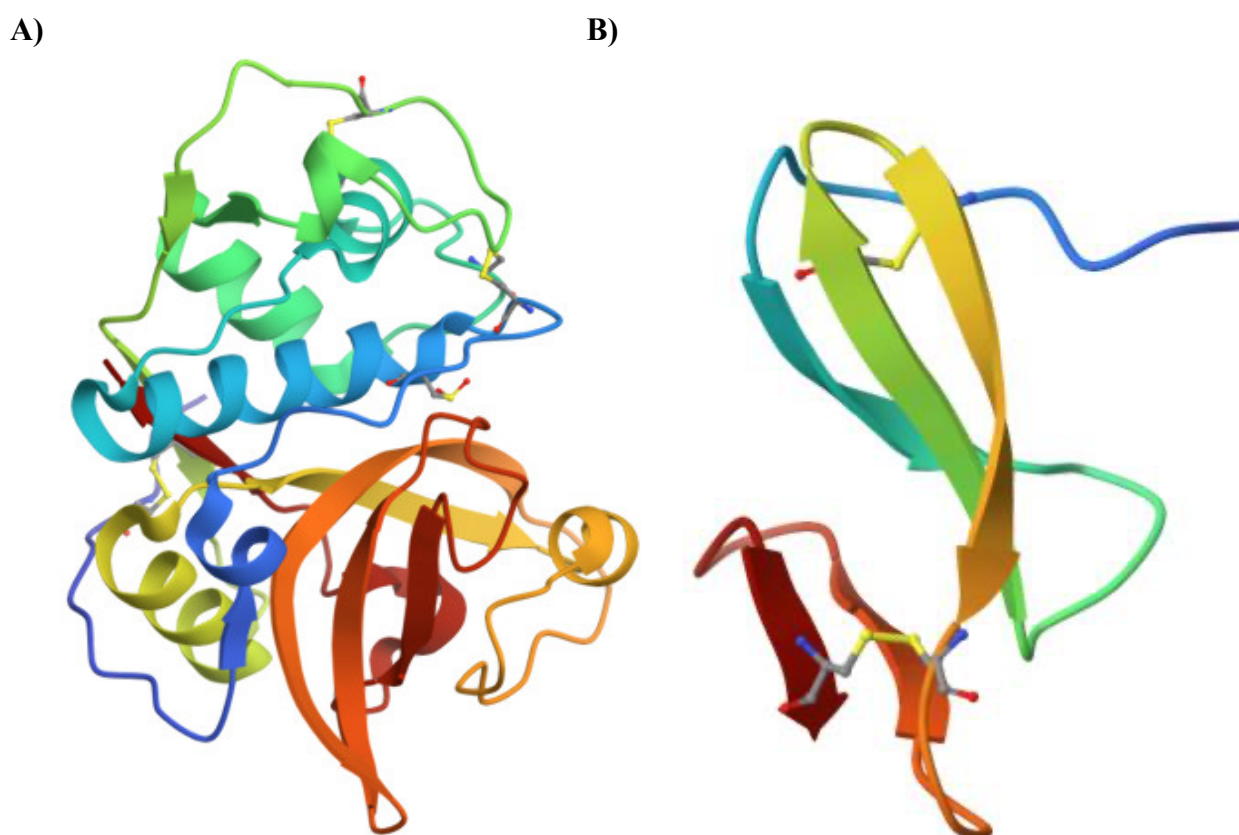
Klinički značaj ovih šest najrelevantnijih alergena ogleda se u njihovoj sposobnosti da obuhvate gotovo sve pacijente alergične na grinje, što ih čini vrednim komponentama u dijagnostičke svrhe, kao i potencijalno efikasnim kandidatima za imunoterapijske formulacije [4].

2.2.8.1. *Der p 1*

Der p 1 je cistein proteaza molekulske mase 24 kDa (Slika 9A). Sintetiše se kao neaktivna proforma, koja postaje biološki aktivna nakon posttranslacionog uklanjanja propeptida [7]. Zahvaljujući svojoj proteaznoj aktivnosti, Der p 1 narušava integritet bronhijalnog epitela tako što razgrađuje proteine čvrstih međusobnih veza, poput okludina i kladina. Time povećava propustljivost epitelne barijere i omogućava sopstvenu penetraciju kroz epitel [58].

2.2.8.2. *Der p 23*

Der p 23 je mali protein mase 8 kDa sličan peritrofinu (Slika 9B). Strukturne analize su pokazale da je Der p 23 mali, globularni protein stabilizovan sa dve disulfidne veze, koji u okviru svoje strukture na C-terminusu pokazuje homologiju sa hitin-vezujućim domenom tipa 2, ali još uvek nije pokazano da se ta interakcija zaista dešava [54,59].



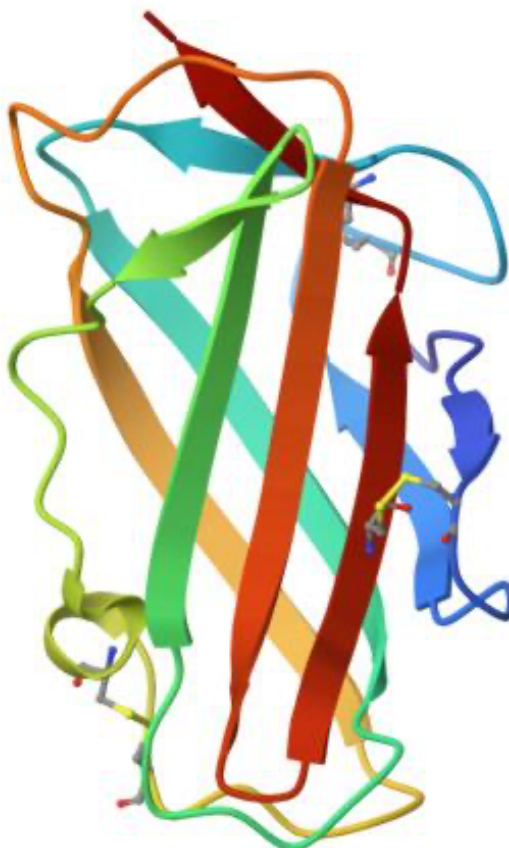
Slika 9: 3D struktura Der p 1 (PDB ID: 3F5V) i Der p 23 (PDB ID: 4ZCE). Preuzeto sa PDB baze (<https://www.rcsb.org/>).

2.2.9. Der p 2

Der p 2 je mali protein molekulske mase 14 kDa i jedan je od glavnih HDM alergena. Nalazi se u crevima grinja *D. pteronyssinus*, odakle se oslobađa u okolinu u obliku fekalnih kuglica, putem kojih dolazi u kontakt sa ljudima i dospeva u respiratorne puteve nakon udisanja [4].

Struktura Der p 2

Der p 2 pripada porodici ML (*eng. MD-2-related lipid-recognition*) domena. Struktura Der p 2 je oblikovana kao jedan β -sendvič, koji se sastoji od 8 antiparalelnih β -ploča, sa topologijom sličnom imunoglobulinskim domenima. Struktura Der p 2 je stabilizovanih sa 3 disulfidna mosta između cisteinskih ostataka na pozicijama Cys8–Cys119, Cys21–Cys27 i Cys73–Cys78 [60] (Slika 10). Na osnovu kristalne strukture Der p 2, gde je uočeno prisustvo hidrofobne šupljine, pretpostavljeno je da Der p 2 može da vezuje nepolarne lipidne molekule [60]. Reginald i Chew su to i dokazali u studiji sa sterolima, gde je pokazano da je Der p 2 lipid-vezujući protein i da specifično vezuje holesterol, preko bočnih ostataka V104, V106 i V110 [61].



Slika 10: 3D struktura Der p 2 (PDB ID: 1KTJ). Preuzeto sa PDB baze (<https://www.rcsb.org/>).

Biološka aktivnost

Der p 2 pokazuje značajnu biološku i strukturnu sličnost sa humanim MD-2 proteinom (*eng. MD-2 related lipid binding*), koji je sastavni deo TLR4 (*eng. Toll-like receptor 4*). Der p 2 može da vezuje lipopolisaharid (LPS) i time da doprinosi aktivaciji TLR4 [62]. Na ovaj način Der p 2 izaziva inflamaciju aktiviranjem NF- κ B (nuklearni faktor kapa-B) i MAPK signalnih puteva [63].

NF- κ B je transkripcioni faktor prisutan u skoro svim nuklearnim ćelijama, koji se aktivira u prisustvu inflamatornog stimulusa. Kada se NF- κ B aktivira u citoplazmi, ulazi u nukleus, gde reguliše ekspresiju različitih inflamatornih faktora, igrajući važnu ulogu u razvoju alergijskih bolesti [3]. Takođe, pokazano je da Der p 2 aktivira humane B ćelije direktno preko TLR4, indukujući ekspresiju proinflamatornih citokina, kao što su IL-1b, IL-8, CXCL10 i TNF [64]. Ova sposobnost da deluje kao imunomodulator, čini Der p 2 ključnim faktorom u patogenezi alergijske inflamacije.

2.3. Tretman alergijskih bolesti

Tretman alergijskih bolesti danas uglavnom podrazumeva pet aspekata: upravljanje i obrazovanje pacijenata u cilju izbegavanja alergena, tradicionalnu farmakoterapiju, imunoterapiju alergenima, primenu biološke i drugih terapija [3].

2.3.1. Edukacija pacijenata i kontrola izloženosti alergenima u terapijskom pristupu

Upravljanje i upoznavanje pacijenata sa alergijskim bolestima igraju ključnu ulogu u lečenju teških oblika alergija. Nepridržavanje uputstvima za sprovođenje imunoterapije često dovodi do neuspešnog lečenja. Zbog toga je neophodno propisno informisati pacijente i sreći njihovo poverenje u prepisane lekove kako bi se postigla kontrola bolesti [3].

Prvi korak tretiranja alergija je izbegavanje ili minimalno izlaganje alergenima, ali to često nije jednostavno i predstavlja izazov, posebno kod pacijenata koji su polisenzitizirani [44]. Zbog toga je podučavanje pacijenata kako da izbegnu kontakt sa alergenima veoma značajno za postizanje najboljeg efekta lečenja [3].

2.3.2. Tradicionalna farmakoterapija

Tradicionalna farmakoterapija predstavlja efikasnu i brzu metodu lečenja koja omogućava poboljšanje simptoma kod većine pacijenata i na taj način im poboljšava kvalitet života. Danas postoje različiti lekovi sa dobrim terapijskim efektom koji se koriste za tretiranje alergijskih bolesti i uključuju antihistaminike, kortikosteroide, leukotriene i JAK (*Janus kinase*) inhibitore [35,44]. U Tabeli 2 su navedeni neki od lekova i njihovi mehanizmi delovanja.

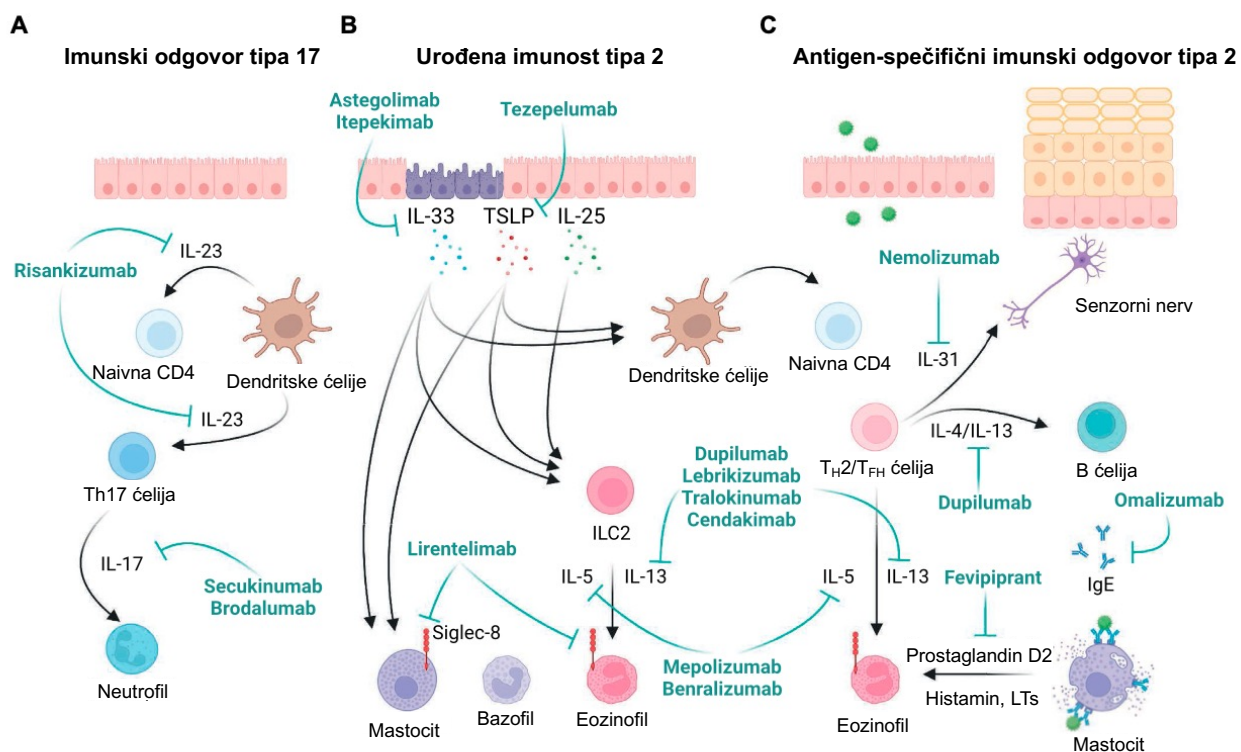
Tabela 2: Tradicionalni farmakoterapeutici za alergijske bolesti. Preuzeto iz [3].

Tradicionalna farmakoterapija		Mehanizam
H1-antihistaminici	Prva generacija	Služe kao neutralni receptorski antagonisti ili inverzni agonisti histaminskog H1 receptora; mogu blokirati delovanje histamina
	Druga generacija	
	Treća generacija	
Kortikosteroidi	Intranazalni kortikosteroidi (INCS)	Inhibiraju različite inflamatorne gene, uključujući citokine, inflamatorne enzime, molekule adhezije i receptore medijatora upale
	Topikalni kortikosteroidi (TCS)	
	Sistemijski kortikosteroidi (SCS)	

Leukotrieni (LTRA)		5-LO inhibitori sprečavaju sintezu leukotriena A ₄ tako što inhibiraju katalitičku aktivnost 5-LO, LTRA direktno blokiraju cistenil LT (cisLT) receptor tipa 1
Drugi lekovi	Stabilizatori mastocita	Inhibiraju degranulaciju alergijskih medijatora
	Hromoni	Preventivni antialergijski lekovi
	Inhibitori fosfodiesteraze 4	Promovišu apoptozu smanjenjem anti-apoptoznog proteina bcl-2, što može inhibirati neutrofile i eozinofile in vitro.
	Topikalni inhibitori kalcineurina (TCI)	Inhibicija proizvodnje proinflammatoryh citokina od strane T ćelija i mastocita otkriva antipruritične efekte, koji se pripisuju specifičnom delovanju na TRPV1 neurone u koži.
	Drugi imunosupresori	Inhibiraju proliferaciju i diferencijaciju imunoloških ćelija, kao i diferencijaciju T ćelija.
	Bronhodilatatori	Prevenција i ublažavanje bronhokonstrikcija.

2.3.3. Primena biološke terapije u alergijskim bolestima

Biološki lekovi predstavljaju posebnu klasu terapijskih agenasa koji se proizvode u živim organizmima ili njihovim ćelijskim sistemima. Za razliku od tradicionalnih lekova koji su najčešće mali hemijski sintetisani molekuli, biološki lekovi su obično veliki, složeni molekuli, uglavnom proteini, koji ciljano deluju na specifične molekulske komponente uključene u patofiziološke mehanizme bolesti. Najčešće vrste bioloških lekova uključuju monoklonska antitela (mAb), inhibitore citokina i rekombinantne proteine. Njihova prednost leži u sposobnosti da deluju precizno, tako što ciljano modulišu aktivnosti ćelija i molekula imunskog sistema koji učestvuju u razvoju bolesti. Zahvaljujući tome, biološki lekovi su postali nezamenjivi u terapiji brojnih inflamatornih, autoimunskih i alergijskih oboljenja. U poslednjih nekoliko godina, razvoj i klinička primena bioloških lekova postaje izuzetno popularna. Danas su dostupni brojni preparati koji ciljaju imunoglobulin E, različite signalne puteve i citokine, uključujući IL-5, IL-4/IL-13 i IL-31 (Tabela 3). Neki od najznačajnijih bioloških lekova prikazani su na Slici 11 [3,65,66].



Slika 11: Prikaz uticaja nekih bioloških lekova na imunski sistem. Preuzeto iz [66].

Tabela 3: Biološki lekovi za tretiranje alergija. Preuzeto iz (Atanasio et al. 2022).

Klasa terapije	Cilj	Terapija	Primarni mehanizam dejstva
Alergen-specifična monoklonska IgG antitela	Fel d 1 (glavni alergen mačke)	REGN1908-1909	Blokiranje interakcije alergena sa IgE vezanim za FcR1 ili CD23, što inhibira aktivaciju efektorskih ćelija i olakšava prezentaciju alergena.
	Bet v 1 (glavni alergen breze)	REGN5713-5714-5715	Isti kao kod REGN1908-1909.
Citokini tipa 2	IL4Ra	Dupilumab	Vezuje se za receptor IL4Ra i inhibira signalizaciju IL-4 i IL-13.
Citokini epitelnih ćelija	TSLP	Tezepelumab	Sprečava interakciju TSLP sa njegovim receptorom i signalizaciju.
	IL-33	Etokimab	Sprečava interakciju IL-33 sa receptorom i signalizaciju.
Anti-IgE terapije	IgE	Omalizumab	Vezuje se za Fc region IgE i sprečava/prekida povezivanje IgE sa FcR1 i CD23.
		Ligelizumab	

	Membranski IgE	<i>Quilizumab</i>	Vezuje se za membranski proksimalni domen IgE na B ćelijama, indukuje apoptozu i promoviše ADCC putem interakcije sa FcRa na NK ćelijama.
--	----------------	-------------------	---

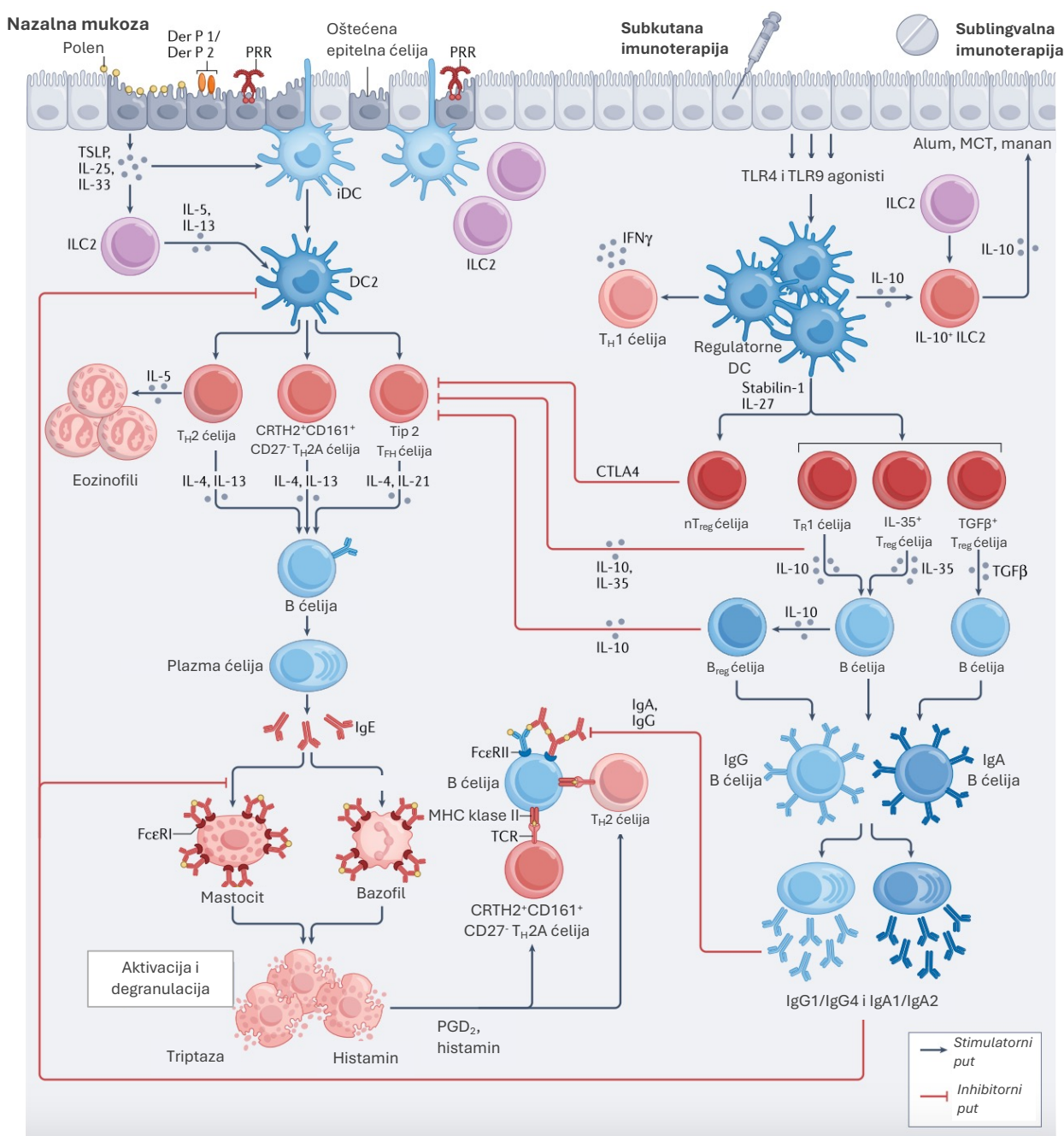
2.3.4. Alergen-specifična imunoterapija

Alergen-specifična imunoterapija (AIT) je prvi primer personalizovane medicine koja datira iz 1911. godine kada ju je primenio Leonard Noon [67]. Predstavlja jedini dugoročni vid terapije za alergijske bolesti [65], a podrazumeva administraciju tačno određenih doza ekstrakta alergena ili prečišćenog alergena u periodu od par meseci ili godina sa ciljem stvaranja tolerancije [2]. Ova terapija se prepisuje atopičnim osobama sa IgE posredovanim alergijskim rinitisom ili alergijskom astmom na inhalatorne alergene, kao što su poleni i HDM, a kod kojih farmakoterapija nije dovoljno efikasna [2]. Glavni cilj ove terapije je da smanji simptome nastale dejstvom alergena i da trajno spreči povratak bolesti. AIT podrazumeva različite strategije aktiviranja, inhibiranja ili modulacije urođene i stečene imunosti radi lečenja bolesti [2,8,9].

2.3.4.1. *Mehanizam alergen-specifične imunoterapije kod inhalatornih alergija*

Sam mehanizam imunoloških promena tokom AIT je kompleksan i još uvek nije potpuno razjašnjen [68]. Ipak, kod uspešne imunoterapije je primećeno stišavanje Th2 imunskog odgovora i uspostavljanje homeostaze Th1/Th2 odnosa [68], što je povezano i sa produkcijom T regulatornih ćelija (T_{reg}) koje proizvode antiinflamatorne citokine, kao što su IL-10, IFN- γ i TGF- β [2,68,69].

T_{reg} ćelije inhibiraju diferencijaciju Th2 ćelija preko regulatornih citokina i međućelijskim interakcijama [70]. IFN- γ inhibira sintezu citokina koji su karakteristični za Th2 imunski odgovor, kao što su IL-4, IL-5 i IL-13 [69]. Pokazano je da IL-10 podstiče preuključivanje klasa imunoglobulina u B ćelijama i da izaziva snižavanje nivoa IgE i povećavanje nivoa IgG (IgG1 i IgG4), dok TGF- β podstiče preuključivanje klasa imunoglobulina sa IgE ka IgA [2]. Alergen-specifična IgG i IgA antitela se u cirkulaciji nadmeću sa alergen-specifičnim IgE antitelima za vezivanje alergena i direktno utiču na blokiranje formiranja alergen-IgE kompleksa i početak signalne kaskade [2]. Ova „blokirajuća antitela“ imaju ulogu u sekundarnom imunskom odgovoru gde inhibiraju IgE zavisno aktiviranje mastocita, bazofila i T ćelija [71]. Takođe, pokazano je da AIT snižava regrutaciju mastocita, bazofila i eozinofila u mukozi kože, nosa, očiju i mukozi bronhija nakon izlaganja alergenima, kao i da snižava oslobađanje histamina [68,72].



Slika 12: Mehanizam alergen-specifične imunoterapije. Preuzeto iz [73].

2.3.4.2. Subkutana i sublingvalna imunoterapija alergenima

Dva najčešće primenjivana načina administracije alergena su subkutana (SCIT) i sublingvalna (SLIT) imunoterapija. Oba pristupa su dobro proučena i prema preporukama Evropske akademije za alergiju i kliničku imunologiju (EAACI) njihova efikasnost, bezbednost i dugoročna korist u lečenju alergijskog rinokonjunktivitisa potvrđene su relevantnim kliničkim dokazima [74].

Subkutana imunoterapija je termin koji se koristi za opisivanje procesa injektovanja ponovljenih doza alergena za lečenje IgE-posredovanih bolesti, kao što su alergije [75].

Konvencionalni raspored za SCIT koji koristi nemodifikovane ekstrakte alergena sastoji se od nedeljnih doza tokom faze izgradnje tolerancije putem subkutane injekcije, nakon čega slede doze održavanja na razmaku od 4 ili 8 nedelja. Upotrebom modifikovanih alergenskih ekstrakata, kao što su alergoidi i/ili adjuvansi, moguće je izgraditi toleranciju administracijom manjeg broja doza [76].

Sublingvalna imunoterapija je alternativni pristup alergijskoj imunoterapiji, pri čemu se alergeni unose oralno tj. sublingvalnim putem. U SLIT-u, alergen se daje u obliku rastvorljivih tableta ili vodenog/tečnog ekstrakta, a vremenski interval između svake doze održavanja varira od proizvoda do proizvoda [73].

Kada se uporede SLIT i SCIT, SLIT nudi veće pogodnosti, jer se može primenjivati kod kuće, što ga čini pogodnim i za malu decu. Takođe, SLIT smanjuje potrebu za korišćenjem zdravstvenih resursa i osoblja, a ne zahteva specifičnu stručnost ili posebne objekte [77].

I SCIT i SLIT mogu izazvati lokalne i sistemske reakcije. Česte lokalne nuspojave SCIT-a uključuju otok i crvenilo na mestu injekcije, dok SLIT može izazvati svrab i peckanje u ustima. Sistemske reakcije koje utiču na celo telo mogu varirati od anafilakse do astme ili urtikarije i generalno su retke [78–81].

Nedavna klinička ispitivanja su uporedila subkutanu imunoterapiju polenom trave i sublingvalnu imunoterapiju tabletama polena trave i pokazano je da su oba puta efikasna što se tiče kliničkog odgovora, ali da dve godine tretmana nisu bile dovoljne za održavanje tolerancije. Pokazano je da oba puta administracije inhibiraju alergen-specifični Th2 imunski odgovor, kao i ekspresiju citokina, IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, u nazalnoj mukozi, ali efekat nestaje nakon godinu dana od prestanka terapije [82]. Nasuprot tome, IgE-blokirajuća aktivnost u serumu bila je suzbijena i ovaj efekat je trajao tokom 3 godine. Blokirajuća antitela bila su prisutna i u serumu i u nosnoj tečnosti. Za subkutanu imunoterapiju, IgE- blokirajuća aktivnost bila je pretežno posredovana IgG4 antitelima, dok su za sublingvalnu imunoterapiju lokalna nosna i sistemska blokirajuća antitela uglavnom bila IgA1 i/ili IgA2. Iako ove pretpostavke zahtevaju dodatna ispitivanja, ovi rezultati sugerišu da je pored suzbijanja Th2 imunskog odgovora, koji je ključan za inicijalnu indukciju specifične tolerancije na alergen, za dugoročno održavanje tolerancije su neophodne i promena u B ćelijskom imunskom odgovoru [83].

2.3.5. Regulatorne ćelije imunskog sistema

Za očuvanje homeostaze i sprečavanje prekomernog ili štetnog imunskog odgovora, od suštinskog značaja je održavanje ravnoteže između tolerancije i aktivacije. U tom kontekstu, regulatorne T ćelije igraju ključnu ulogu u suzbijanju alergijske inflamacije putem različitih mehanizama delovanja [84].

Najvažnije podgrupe T_{reg} ćelija uključuju prirodno nastale, timusne, $CD4^+CD25^+$ T_{reg} ćelije, koje eksprimiraju transkripcioni faktor FoxP3, kao i periferno indukovane Tr1 ćelije, koje se razvijaju u prisustvu tolerogenih signala [84,85]. T_{reg} ćelije sa visokom ekspresijom CD25 i FoxP3 pokazale su najveći supresivni kapacitet. Njihova imunomodulatorna funkcija se primarno ostvaruje putem produkcije antiinflamatornih citokina kao što su IL-10, IL-35 i TGF- β [84,86]. Posebno je značajan IL-10, koji smanjuje sintezu IgE antitela putem interakcije sa B ćelijama, dok istovremeno podstiče produkciju alergen-specifičnih IgG4 antitela. Osim toga, T_{reg} ćelije eksprimiraju i supresorske molekule kao što su CTLA-4 i PD-1, koji dodatno učestvuju u indukciji i održavanju imunološke tolerancije [85–87].

Pored T_{reg} ćelija, važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora imaju i regulatorne B ćelije, B_{reg} , koje predstavljaju fenotipski heterogenu populaciju sa izraženim imunosupresivnim osobinama. Ove

ćelije ne deluju samo kroz proizvodnju antitela, nego i putem sekrecije regulatornih citokina, među kojima je najznačajniji IL-10, dok TGF- β i IL-35 dodatno podstiču njihovu imunosupresivnu funkciju. U B_{reg} populaciju spadaju različiti fenotipski podtipovi, uključujući: CD27⁺CD24^{high} B10 ćelije, CD24^{hi}CD38^{hi} nezrele tranzicione B ćelije, CD73-CD25⁺CD71⁺ Br1 ćelije, kao i određene plazma ćelije. Posebno se ističu humane Br1 ćelije, koje proizvode velike količine IL-10, inhibiraju proliferaciju antigen-specifičnih CD4⁺ T ćelija i značajno doprinose proizvodnji IgG4 antitela, što ih čini posebno značajnim tokom AIT [85,88].

2.3.6. Uloga antigen-prezentujućih ćelija u AIT

Antigen-prezentujuće ćelije (APĆ) imaju ključnu ulogu u AIT, jer su odgovorne za prepoznavanje i prezentaciju alergena T ćelijama, što predstavlja centralni mehanizam imunomodulacije. Efikasnost same AIT zavisi od aktiviranja tolerogenog imunskog odgovora, pa su zbog toga APĆ sve više u fokusu kao cilj za razvoj novih imunoterapijskih vakcina, usmerenih ka Th2 odgovoru [24]. Profesionalne APĆ podrazumevaju dendritske ćelije i makrofage [89]. U zavisnosti od prirode antigena, prisutnih kostimulatornih molekula i citokina koji se nalaze u okolini, naivne CD4⁺ T ćelije se mogu diferencirati u različite efektorske podtipove, kao što su Th1, Th2, Th9, Th17 ili Th22 [90].

2.3.6.1. Dendritske ćelije

Dendritske ćelije (DC) predstavljaju heterogenu grupu APĆ i one su najzastupljenije u mukoznim tkivima i koži, gde čine most između urođene i stečene imunosti. Njihova aktivnost u velikoj meri zavisi od signala koje primaju iz mikrookruženja, pa tako nezrele DC mogu imati tolerogeni ili inflamatorni profil, nezavisno od tipa antigena [84,85].

DC poseduju širok spektar receptora, uključujući PRR receptore, kao što su TLR i CLR, koji omogućavaju prepoznavanje alergena i drugih patogena [84,85]. Studije su pokazale da u zavisnosti od stimulatora i nezrele i zrele DC mogu da indukuju funkcionalne T_{reg} ćelije korišćenjem solubilnih (TGF- β i IL-10) i kostimulatornih molekula (PD-L1, CD80, CD86, MHC-II) [91]. Tokom AIT, dendritske ćelije stiču tolerogene karakteristike, smanjujući aktivaciju efektorskih Th2 ćelija i favorizujući diferencijaciju T_{reg} ćelija.

2.3.6.2. Makrofagi

Makrofagi predstavljaju ćelije urođene imunosti koje imaju ulogu u fagocitozi, prezentovanju antigena i proizvodnji citokina. Imaju bitnu ulogu u održavanju homeostaze imunskog sistema, jer se mogu ponašati kao proinflamatorne ili antiinflamatorne ćelije u zavisnosti od uticaja iz okoline [85]. Makrofagi su prisutni u svim tkivima u organizmu i njihova morfologija i fenotip zavise od samog tkiva u kom se nalaze [92].

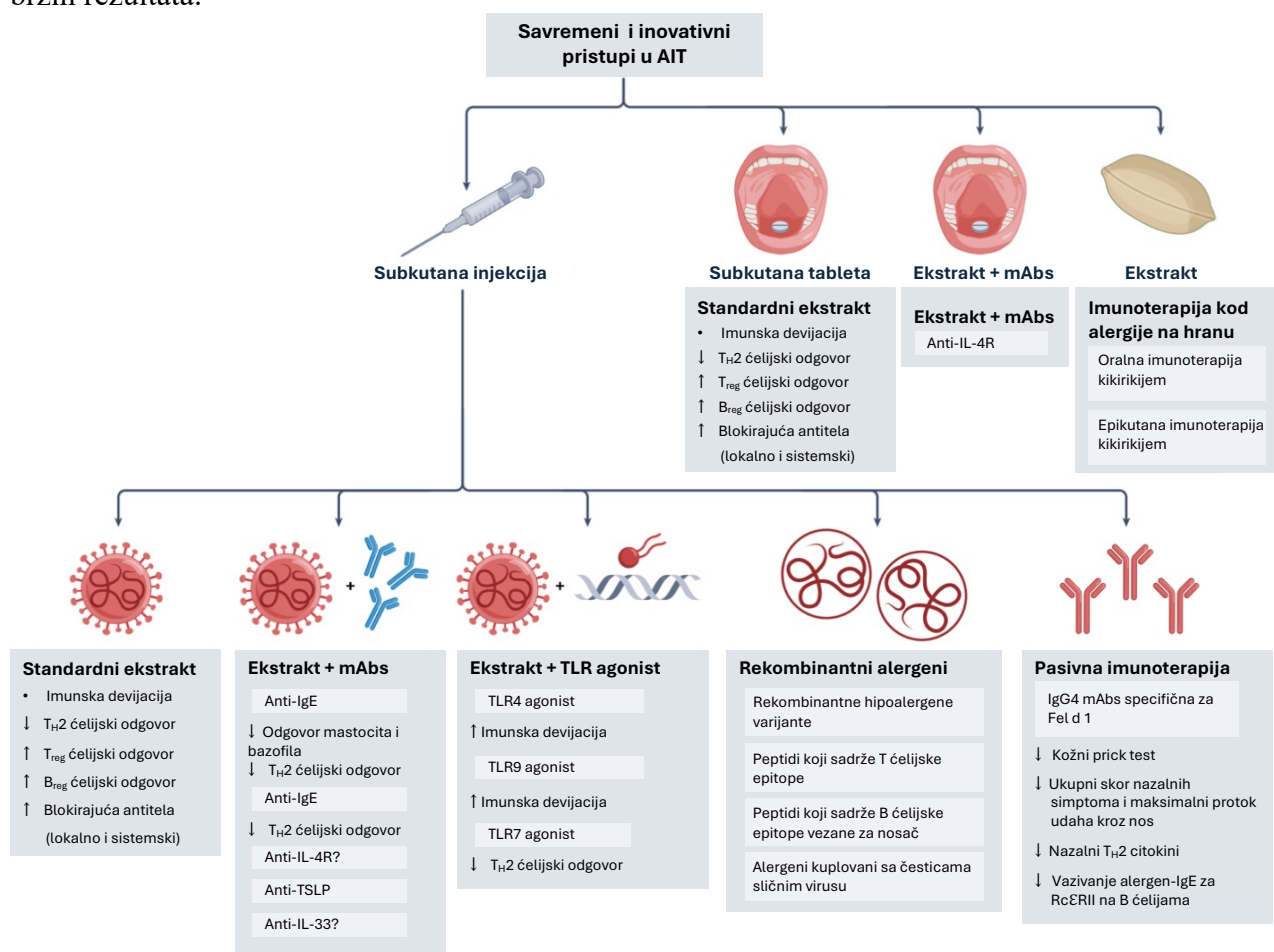
Makrofagi se mogu aktivirati klasičnim putem u M1 fenotip ili alternativnim putem u M2 fenotip. Citokini Th2 tipa indukuju alternativni put, što dovodi do razvoja M2 makrofaga. Ovaj podtip ima antiinflamatorna i reparativna svojstva, zbog proizvodnje regulatornih citokina, uključujući IL-10 i TGF- β . M2 makrofagi imaju više podtipova, M2a, M2b, M2c i M2d, koji se razlikuju prema fenotipu, induktorima i biološkoj aktivnosti i zbog toga iskazuju i alergijske i antialergijske osobine [93].

Posebno su značajni M2b makrofagi, koji pored proinflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF), takođe proizvode visok nivo IL-10 i nizak nivo IL-12, čime doprinose tolerogenosti na alergene [93].

Pokazano je da IgG4 antitela, proizvedena *in vitro* tokom AIT, mogu indukovati konverziju M2a u M2b podtip, koji zatim pojačava produkciju IL-10 [85]. Tokom AIT, makrofagi doprinose smanjenju inflamacije i preusmeravanju imunskog odgovora sa Th2 na Th1/T_{reg} profil.

2.4. Nove strategije imunoterapije

Iako je AIT efikasan tretman za brojne alergijske bolesti, ipak ima nekoliko nedostataka koji ograničavaju njenu primenu. Spora reakcija na terapiju, rizik od nuspojava, potreba za redovnim primenjivanjem, kao i izazovi u personalizaciji tretmana, ukazuju na potrebu za novim strategijama (Slika 13). Ove strategije istražuju upotrebu inovativnih adjuvanasa, modifikovanih alergena i naprednih sistema za dostavu sa ciljem poboljšanja efikasnosti, smanjenja nuspojava i postizanja brzih rezultata.



Slika 13: Savremeni i inovativni pristupi u AIT. Preuzeto iz [2].

2.4.1. Alergoidi

Pojam „alergoid“ je prvi put iskoristio 1970. godine Marsh, kako bi predstavio derivate alergena čija je alergena reaktivnost smanjena u odnosu na nativni alergen, dok su antigene osobine, kao što je imunogenost zadržane [94]. Alergoidi predstavljaju hemijski modifikovane alergene polimerizacijom sa glutaraldehydom ili formaldehydom [2,69]. Ove modifikacije dovode do promena

u tercijskoj strukturi alergena, gde dolazi do narušavanja konformacionih IgE epitopa, dok linearni T ćelijski epitopi ostaju nepromenjeni [69,95]. Samim tim, ove modifikacije smanjuju sposobnost alergena da izazove imunske reakcije putem IgE antitela, koja su odgovorna za alergijske reakcije, dok zadržavaju sposobnost stimulacije imunološkog sistema na način koji može pružiti zaštitu [96]. Smanjena alergičnost alergoida u poređenju sa samim alergenom je potvrđena kožnim „prick“ testom, a sposobnost da izazovu imunske odgovore je potvrđena u raznim kliničkim studijama, gde je pokazano da indukuju imunomodulatorna antitela klase IgG4 [97].

Alergoidi se najviše koriste u okviru AIT, naročito za inhalatorne alergene, kako bi se postigla tolerancija na alergene, smanjujući preosetljivost organizma [98]. Alergoidi se obično koriste u obliku injekcija ili sublingvalnih tableta i za sada je njihova efikasnost pokazana u tretmanu alergije na polen, grinje, životinjsku dlaku i druge alergene [96,97].

2.4.2. Rekombinantni alergeni

Zahvaljujući rekombinantnoj DNK tehnologiji i napretku u oblasti molekulske alergologije, do sada je većina alergena uspešno klonirana, što je omogućilo preciznu dijagnozu IgE osetljivosti na glavne alergene, kao i na manje značajne alergene. Takođe, ova tehnologija je doprinela identifikaciji ukršteno reaktivnih epitopa koji iako mogu izazvati pozitivne rezultate u testovima, često imaju manju kliničku relevantnost [2]. Precizna molekulska dijagnostika pomaže u selekciji alergenskih ekstrakata za imunoterapiju koji su prilagođeni pojedincu, što dovodi do poboljšanja rezultata i povećava efikasnost lečenja. Pored toga, molekulska biotehnologija omogućila je proizvodnju rekombinantnih alergena [99], rekombinantnih alergenskih mešavina [100] i hipoalergenih varijanti za primenu u imunoterapiju [101]. Međutim, iako su ove rekombinantne vakcine i rekombinantne hipoalergene varijante bile efikasne u fazi II kliničkih ispitivanja [99,100], do sada nisu pokazale dodatne koristi u pogledu efikasnosti ili sigurnosti u odnosu na konvencionalne, standardizovane ekstrakte alergena [99].

2.4.3. Ciljani pristupi u AIT

Jedno od važnijih pitanja u poboljšanju AIT jeste da li bi nove strategije trebalo da ciljaju T ćelijski odgovor sa minimalnim rizikom od anafilakse, ili B ćelijski odgovor koji favorizuje sintezu IgG i IgA antitela koja blokiraju alergen-specifična IgE antitela [2]. Pristupi koji ciljaju T ćelijski odgovor uključuju upotrebu kombinacija kratkolančanih T ćelijskih peptida koji su proizvedeni na osnovu mapiranja T ćelijskih epitopa alergena. Ovi peptidi su dizajnirani sa širokim spektrom HLA restrikcija, što omogućava njihovo prepoznavanje od strane većine ciljane populacije sa alergijskim bolestima. Cilj ovakvog pristupa je u izazivanju zaštitnog T ćelijskog odgovora bez izazivanja IgG antitela. Iako se ovim pristupom značajno smanjuje rizik od IgE-posredovane anafilakse, postoji mogućnost pojave kasnih astmatičnih reakcija posredovanih T ćelijama [2].

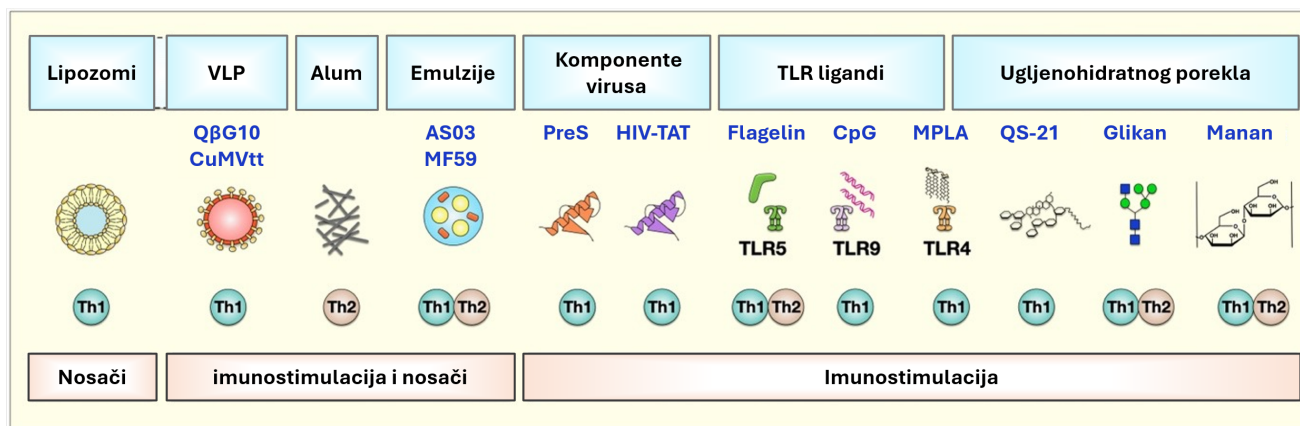
Pristupi u kojima se ciljaju B ćelije podržani su studijama koje su otkrile blokirajuća antitela tokom konvencionalne alergijske imunoterapije [102], kao i nedavnim istraživanjima koja pokazuju povećanje B_{reg} ćelija koje proizvode IL-10 tokom imunoterapije za alergiju na pčelinji otrov i alergiju na kućnu prašinu [103]. U ispitivanju koje je uključivalo pasivnu imunizaciju za alergiju na mačju dlaku, pojedincima je data subkutana injekcija rekombinantnih anti-Fel d 1 antitela, koja je pružila zaštitu od izazivanja simptoma uz izloženost mačjem alergenima u trajanju od gotovo 3 meseca [104], uz smanjenje Th2 citokina i povećanje IgE blokirajuće aktivnosti [2,105].

Dopunski pristup, koji podrazumeva selektivnu indukciju blokirajućih antitela specifičnih za alergen uz minimalnu aktivaciju T ćelijskog odgovora, zasniva se na aktivnoj imunizaciji

rekombinantnim peptidima alergena koji sadrže B ćelijske epitope [2]. Na primer, mešavina rekombinantnih linearnih peptida koji nisu reaktivni na IgE, a izvedeni su iz alergena polena trave, spojena je sa nosačem proteina, a zatim testirana u placebo-kontrolisanoj terenskoj studiji [106]. Rezultati ove studije su pokazali da dolazi do povećanja specifičnih IgG1 i IgG4 antitela, uz minimalne promene u IgE odgovorima. Iako su rezultati u vezi sa simptomima bili poboljšani, primarna analiza nije postigla statističku značajnost, a rezultati faze III kliničkih ispitivanja se očekuju [2,106].

2.4.4. Adjuvansi

Adjuvansi su supstance koje se koriste kako bi pojačale efikasnost slabo imunogenih alergena, alergoida ili modifikovanih rekombinantnih alergena koji se koriste u AIT i oni predstavljaju obećavajuću strategiju za poboljšanje efikasnosti imunoterapije. Njihova uloga je u pojačavanju imunskog odgovora i terapijskog efekta. Adjuvansi za primenu u AIT moraju biti bezbedni, stabilni i efikasni, a njihova glavna uloga je da pojačaju imunski odgovor na alergen, što omogućava upotrebu manjih doza antigena i izazivanje snažnijeg imunskog odgovora [107]. Na osnovu načina delovanja, adjuvansi se tradicionalno dele na adjuvanse prve generacije, kao što su aluminijum-hidroksid, kalcijum-fosfat i mikrokristalni tirozin, i adjuvanse druge generacije, agoniste TLR receptora, koji indukuju Th1 odgovor koji uključuje sekreciju IFN- γ , što potom ublažava Th2 alergijsku reakciju [69,108]. Primeri nekih adjuvanasa su prikazani na Slici 14.



Slika 14: Primeri adjuvanasa u AIT. Preuzeto iz [109].

2.4.4.1. Adjuvansi prve generacije

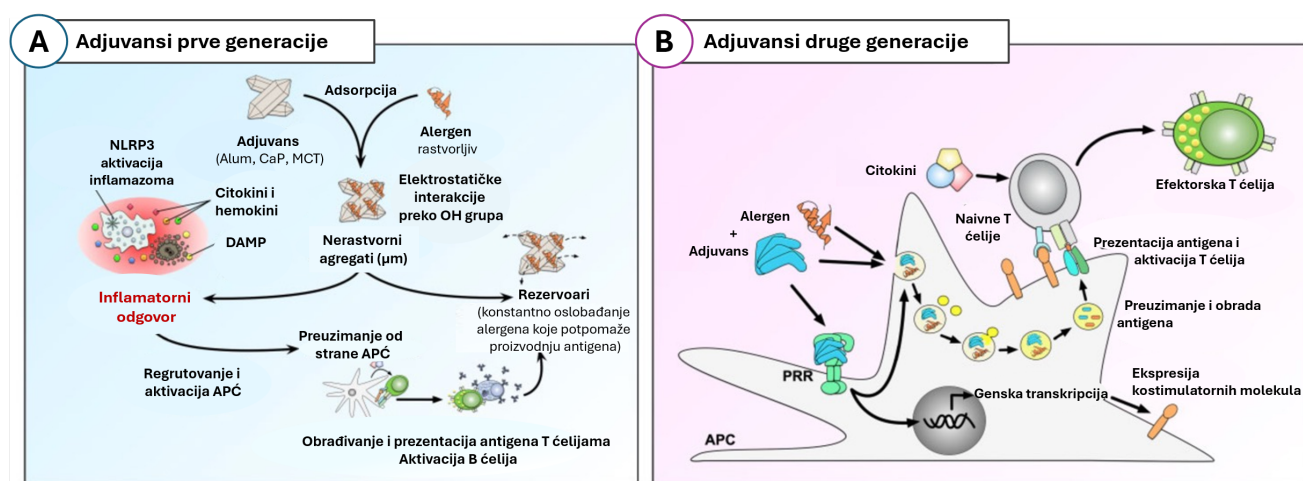
Adjuvansi prve generacije se ponašaju kao nosači koji adsorbuju antigene i formiraju nerastvorne adjuvans-alergen agregate. Ovi agregati aktiviraju imunske ćelije što vodi ka oslobađanju citokina i hemokina, kao i ka formiranju inflamazoma. Pored toga što ovi agregati bivaju prepoznati od strane APC, oni se ponašaju i kao rezervoari koji polako oslobađaju i izazivaju efikasnu prezentaciju alergena. Aluminijum-hidroksid je veoma dobro okarakterisan adjuvans prve generacije i poznato je da stimuliše ćelije urođene imunosti i dovodi do stvaranja rezervoara antigena na mestu injekcije [110].

Iako adjuvansi prve generacije uspešno pojačavaju imunski odgovor, posebno proizvodnju antitela, njihova primena ima mnoge mane. Na primer, adjuvansi na bazi aluminijum-hidroksida, u

zavisnosti od koapliciranog antigena, mogu izazvati Th2 imunski odgovor i proizvodnju IgE, što je veoma nepoželjno u kontekstu alergija. Osim toga, ovi adjuvansi nemaju sposobnost da indukuju CD8+ citotoksični T ćelijski odgovor [109].

2.4.4.2. Adjuvansi druge generacije

Kako bi se poboljšali adjuvansi prve generacije, iskorišćena su otkrića u vezi sa receptorima koji prepoznaju obrasce, PRR [111]. Ovi receptori su iskazani na površini APC, kao i drugih imunskih ćelija, kao što su B i T ćelije, neutrofili, mastociti, eozinofili, NK ćelije. PRR receptori imaju sposobnost da prepoznaju PAMP i da pokrenu urođeni imunski odgovor [111]. Na osnovu tih saznanja se došlo do zaključka da se različiti PAMP mogu koristiti kao adjuvansi druge generacije u kombinaciji sa antigenima. Aktiviranjem PRR receptora, oni izazivaju promene u ciljanim ćelijama, što dovodi do promena u njihovom fenotipu i funkciji, tako što ekspimiraju različite kostimulatorne molekule, citokine i hemokine. Uprkos ovim promenama, ćelije i dalje efikasno prezentuju antigene T ćelijama, čime modulišu aktivaciju T ćelija i smer imunskog odgovora [112]. Najbolje ispitani adjuvansi druge generacije u kontekstu AIT su monofosforilni lipid A (MPLA), koji aktivira TLR4, i CpG DNA motivi, koji aktiviraju TLR9 [9].



Slika 15: Uticaj adjuvanasa prve i druge generacije na imunski sistem. Preuzeto iz [109].

2.4.5. Novi adjuvansi za primenu u AIT

Trenutno je istraživanje adjuvanasa oblast od velikog interesa, ne samo za poboljšanje lečenja alergija, već i za razvoj vakcina protiv infektivnih bolesti i tumora. Fokus se sve više pomera od adjuvanasa koji nespecifično pojačavaju imunski odgovor ka ciljanoj imunoterapiji, tj. adjuvansima koji stimulišu Th1 i/ili T_{reg} odgovor. Ovakvi adjuvansi uključuju različite nosače i imunostimulatore, kao što su lipozomi, čestice slične virusu, neke komponente virusa, TLR agonisti, C-tip lektina i ugljenohidratni adjuvansi koji imitiraju glikane patogena ili alergena [107,109]. Ove komponente omogućavaju precizno usmeravanje imunskog odgovora uz smanjenje neželjenih efekata i imaju potencijal za racionalan dizajn vakcina i imunoterapije koje bi bile bezbedne, efikasne i prilagođene individualnim potrebama pacijenata.

2.4.5.1. TLR agonisti

Ćelije urođene imunosti sadrže visoko konzervirane PRR, kao što su TLR, receptori slični NOD-u (NLR) i RLR receptori, koji specifično prepoznaju jedinstvene strukture povezane isključivo sa stranim mikroorganizmima, PAMP-ove. Kada PAMP-ovi interaguju sa ovim receptorima, dolazi do aktivacije imunskih ćelija, koje zatim prezentuju peptide poreklom od patogena naivnim T ćelijama i pokreću i regulišu stečeni imunski odgovor [113]. Različiti ligandi za PRR pokreću različite aktivacione mehanizme u APC, što može dovesti do indukcije Th1, Th2 i/ili Th17 imunskog odgovora [113]. Zbog svoje sposobnosti da aktiviraju imunološki odgovor, PRR ligandi predstavljaju obećavajuće adjuvanse za razvoj budućih vakcina.

TLR postoje kao transmembranski receptori na površini ćelije i u intracelularnim membranama. Predstavljaju najproučavanije PRR i do sada je kod čoveka identifikovano 10 TLR receptora (TLR1 – TLR10) [114]. Značajni TLR ligandi koji su istraživani zbog svog potencijala u poboljšanju AIT su flagelin (TLR5 ligand) i CpG oligodeoksinukleotidi (TLR9 ligand) [109].

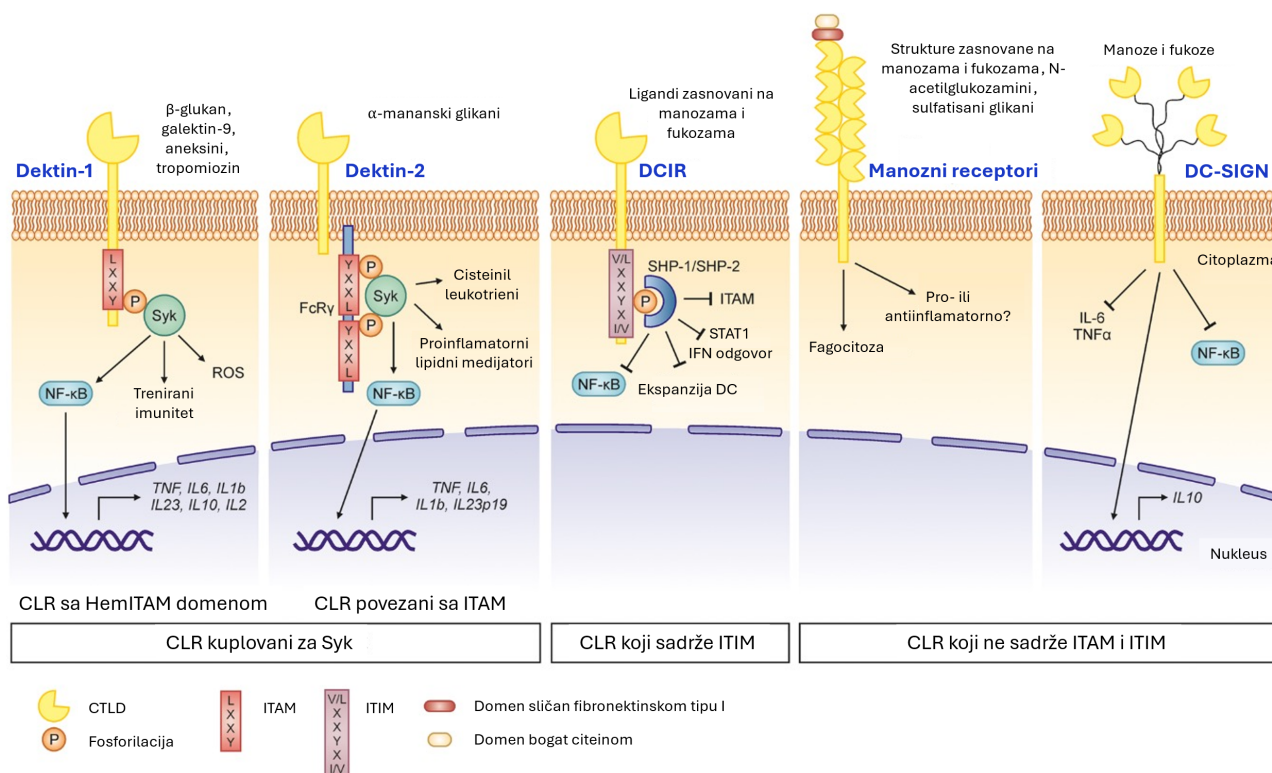
2.4.5.2. Čestice slične virusima (VLP) i komponente virusa

VLP predstavljaju multimerne komponente koje imaju morfologiju virusa, ali nemaju genomski materijal virusa i zbog toga ne mogu da se repliciraju *in vivo*. Veoma su efikasni sistemi za dostavu jer su jaki imunomodulatori zahvaljujući svojoj strukturi. VLP su do sada korišćene u različitim studijama u tretmanu alergija gde se pokazalo da imaju potencijal za redukovanje aktivnosti mastocita, supresiju Th2 i promociju Th1 imunskog odgovora i da dovode do povećane proizvodnje neutrališućih antitela [109].

Pored VLP, komponente virusa koje imaju sposobnost aktivacije imunskog odgovora se ispituju kao potencijalni adjuvansi za tretman alergija. Na primer, T ćelijski epitop hepatitis B virusa (HBV), PreS, je fuzionisan sa različitim alergenima i testiran u *in vivo* studijama, kao i u kliničkim studijama [115]. *In vivo* istraživanja su pokazala da korišćenjem PreS kao adjuvansa dolazi do povišene proizvodnje specifičnih IgG antitela, a detaljnije *in vitro* analize su pokazale da PreS fuzionisan sa Bet v 1 smanjuje aktivaciju T ćelija u PBMC alergičnih pacijenata, što je bilo praćeno proizvodnjom IL-10 i Th1 citokina IFN- γ [115].

2.4.5.3. C-tip lektinski receptori (CLR)

C-tip lektinski receptori (CLR), koje eksprimiraju dendritske ćelije (DC), prepoznaju strukture ugljenih hidrata i igraju ključnu ulogu u prepoznavanju antigena, njihovoj prezentaciji i polarizaciji odgovora T ćelija [25]. Neki od najznačajnijih CLR koji se nalaze na DC su: dectin-1, dectin-2, DCIR, DC-SIGN i MR (Slika 16). CLR imaju sposobnost da prepoznaju ugljene hidrate prisutne na alergenima i na taj način pokreću različite signalne puteve koji utiču na polarizaciju CD4⁺ T ćelija ka specifičnim Th2 ćelijama [25]. Određeni CLR receptori takođe mogu podstaći tolerogeni odgovor na alergene, što se može iskoristiti za razvoj novih terapijskih pristupa u okviru AIT. Na osnovu ovih saznanja, sintetisani su konjugati alergena i neoksidovanog manana (PM-alergoidi), koji predstavljaju vakcine nove generacije [25,116]. PM-alergoidi ciljano deluju na dendritske ćelije vezivanjem za CLR receptore putem mananskih komponenti, što omogućava njihovo efikasno preuzimanje i dalju obradu. Preklinički podaci pokazali su da PM-alergoidi indukuju tolerogene fenotipove dendritskih ćelija i makrofaga, koji dalje mogu da podstaknu regulatorne T ćelije *in vitro* [117] i *in vivo*, bilo putem subkutane [23,118] ili sublingvalne primene [118].



Slika 16: C-tip lektinskih receptora. Preuzeto iz [25].

2.4.5.4. Ugljeni hidrati kao adjuvansi

Jednostavni i složeni ugljeni hidrati (glikani) su najrasprostranjenija klasa biomolekula u prirodi i igraju ključnu strukturnu i metaboličku ulogu u biološkim sistemima, uključujući imunski odgovor [15,119–121]. Pokazano je da glikani imaju važnu ulogu u modulaciji kako urođene, tako i stečene imunosti [119]. Glikani, zbog svoje visoke biokompatibilnosti i niske toksičnosti, izdvajaju se kao zanimljivi kandidati za razvoj novih adjuvanasa. Danas su u upotrebi dva ugljenohidratna adjuvansa, QS-21 i MPLA, koja su pokazala dobru efikasnost [109].

U kontekstu AIT, glikani su istraživani kao adjuvansi alergenima, kako bi se povećala njihova imunogenost i imunomodulatorna svojstva [15,119–121]. Veoma su bezbedni i imaju razna korisna svojstva koja ih čine obećavajućim kandidatima za adjuvans [16,122]. Poznato je da ugljeni hidrati interaguju sa različitim lektinskim receptorima na površini ćelija urođene imunosti i tako utiču na celokupni imunski odgovor [25].

Modifikacije glikana na površini alergena mogu da promene način na koji ih imunski sistem prepoznaje i obrađuje, što vodi ka izmenjenom imunskom odgovoru [19,20,22,123]. Takođe, promene u glikozilacionim obrascima molekula povezanih sa patogenima, koji su ključni za interakciju domaćin-patogen, mogu izmeniti intenzitet imunskog odgovora [124]. Sveukupno, kompleksne interakcije između glikana i imunskog sistema otvaraju nove mogućnosti za razvoj inovativnih imunoterapijskih strategija, uključujući i njihovu primenu u personalizovanoj AIT [123].

2.4.6. Uloga glikana u imunskom odgovoru

Imunski sistem je složena mreža stimulatornih i inhibitornih puteva koji istovremeno štite organizam od stranih agenasa i endogenih oštećenja, dok sprečavaju prekomernu reakciju koja bi mogla dovesti do oštećenja sopstvenih tkiva. Narušavanje bilo kog od ovih puteva može dovesti do narušavanja homeostaze i zdravlja [120].

Poznato je da prosti i složeni glikani imaju glavne strukturne i metaboličke uloge u biološkim sistemima [120]. Nalaze se na površini svih ćelija i omogućavaju im različite interakcije i deluju kao molekuli koji određuju sudbinu i funkciju imunskog sistema [22]. Pokazali su se kao ključne komponente homeostaze, delujući kao fini regulatori imunskih odgovora sa sposobnošću da modulišu ravnotežu između tolerancije i aktivacije u različitim patološkim stanjima [22]. Različite strukture glikana na površini ćelija prepoznaju glikan-vezujući proteini (GBP), kao što su galektini i lektini C-tipa, koji na taj način kontrolišu različite aspekte imunskog odgovora, uključujući pro- i antiinflamatorne mehanizme. Poznato je i da ovaj tip interakcija utiče na različita patološka stanja, uključujući infekcije, fibrozu, autoimunost i malignitete [22,125].

Glikozilacija je najčešća posttranslaciona modifikacija proteina, koja značajno doprinosi funkcionalnoj raznovrsnosti proteina. Osim što utiče na strukturu, glikozilacija omogućava specifičnu komunikaciju između ćelija i njihove mikrookoline, posebno u kontekstu imunskog sistema. Imunske i stromalne (matične) ćelije izražavaju različite GBP, koji imaju sposobnost da prepoznaju promene u glikanskim obrascima, čak i one uzrokovane genetskim ili spoljašnjim faktorima, što može doprineti razvoju autoimunih bolesti, inflamatornih procesa i poremećaja u imunoregulatornim mehanizmima [22,125,126].

Mikroorganizmi takođe poseduju glikane na svojoj površini, poput lipopolisaharida (LPS), peptidoglikana, kapsularnih polisaharida ili gljivičnih mananskih struktura, koje imaju funkciju da budu prepoznati kao PAMP. Ova prepoznavanja od strane GBP čine osnovu prirodnog imunskog detektovanja, ali i dizajna novih vakcina [127]. Takav pristup je doveo do uspešnog razvoja vakcina protiv *Haemophilus influenzae* tipa b, *Streptococcus pneumoniae* i *Neisseria meningitidis*, dok se vaccine bazirane na ovom pristupu protiv virusa HIV-1, Denga i Hepatitis C i dalje istražuju [128].

U prirodi se nalaze glikani sa velikom različitosti u strukturi, što utiče na biološki diverzitet. Svaka ćelija u telu poseduje jedinstven glikanski potpis, koji funkcioniše kao "lična karta" ćelije, tkiva ili organizma u određenim fiziološkim i patološkim uslovima. Ovi obrasci glikozilacije uglavnom su konzervirani unutar iste vrste, ali i pored očuvanja gena povezanih sa glikozilacionim mehanizmima, postoje određene varijacije koje omogućavaju precizno imunološko razlikovanje sopstvenih od stranih struktura [125]. Zanimljivo je da mikroorganizmi mogu iskoristiti ovu biološku specifičnost kroz proces poznat kao mimikrija glikana [129], pri čemu oponašaju glikane domaćina i time izbegavaju da budu prepoznate od strane imunskog sistema. Ova strategija im omogućava da opstanu u organizmu domaćina i izazovu infekciju. Ipak, mimikrija glikana može zbuniti imunski sistem i potencijalno dovesti do autoimunih reakcija, jer organizam počinje da prepozna sopstvene strukture kao strane.

Zbog svega navedenog, glikani predstavljaju ključne molekulske komponente u imunoregulaciji. Razumevanje varijabilnosti glikanskih struktura i njihovog uticaja na imunski odgovor može doprineti razvoju novih terapijskih strategija, posebno u borbi protiv infekcija, maligniteta, autoimunskih bolesti i drugih poremećaja imunskog sistema.

2.4.7. Glikoproteini virusa

Virusi koji inficiraju ljudski organizam predstavljaju značajan globalni zdravstveni problem, a glikoproteini ovih virusa igraju centralnu ulogu u njihovoj patogenosti. Glikoproteini se nalaze na površini virusnih čestica i predstavljaju ključne faktore u životnom ciklusu virusa i njihovoj interakciji sa domaćinom (Tabela 4). Oni su odgovorni za prepoznavanje i vezivanje za specifične receptore na ćelijama domaćina, čime se omogućava ulazak virusa u ćeliju. Nakon internalizacije, glikoproteini mogu posredovati u procesu fuzije virusne i ćelijske membrane, olakšavajući isporuku genetskog materijala virusa u citoplazmu ćelije domaćina i započinjući replikaciju virusa.

Pored uloge u infekciji, viralni glikoproteini predstavljaju glavne mete imunskog sistema domaćina. Oni su često glavni antigeni virusne čestice, koje prepoznaju neutrališuća antitela i ćelije imunskog sistema, što ih čini važnim elementima u razvoju vakcina i antivirusnih terapija [130].

Tabela 4: Glikoproteini virusa i njihove uloge. Preuzeto iz [130].

Naziv virusa	Identifikovani glikoproteini	Specifična uloga
Virus influence	Hemaglutinin i neuraminidaza	Fuzija sa membranom ćelije domaćina, vezivanje za sijalinsku kiselinu
SARS-CoV	Spike (S) glikoprotein	Fuzija sa membranom
Virus hepatitisa C	E1 i E2	Vezivanje za receptor domaćina, konformacione promene potrebne za fuziju membrana
HIV-1	gp120, gp160, gp41	Unutarćelijski transport
Denga virus	E (dimer)	Fuzija i vezivanje za ćelije domaćina

Poznato je da su glikoproteini virusa podložni čestim mutacijama koje doprinose izbegavanju imunskog sistema, omogućavajući virusima da izbegnu imunski odgovor [130]. Do sada je pokazano da male mutacije na hemaglutininu virusa influence, poznate kao antigenski drift, dovode do pojave sezonske epidemije gripa. Izmena u glikozilaciji u smislu promene pozicije dovodi do toga da ključni antigeni ne mogu biti prepoznati od strane neutrališućih antitela. Takođe, virus HIV-a ima visoku stopu mutacija i rekombinacija, što omogućava brzo prilagođavanje ovog virusa, a promenu u okviru gp120 utiču na njegovu interakciju sa antitelima i koreceptorima (CCR5/CXCR4) [130].

Mutacije u okviru virusnih glikoproteina predstavljaju izazov za razvoj vakcina i terapija. One mogu brzo učiniti prethodno efektivne strategije manje efikasnim i zbog toga je stalno praćenje viralnih sekvenci veoma važno za razvoj terapija.

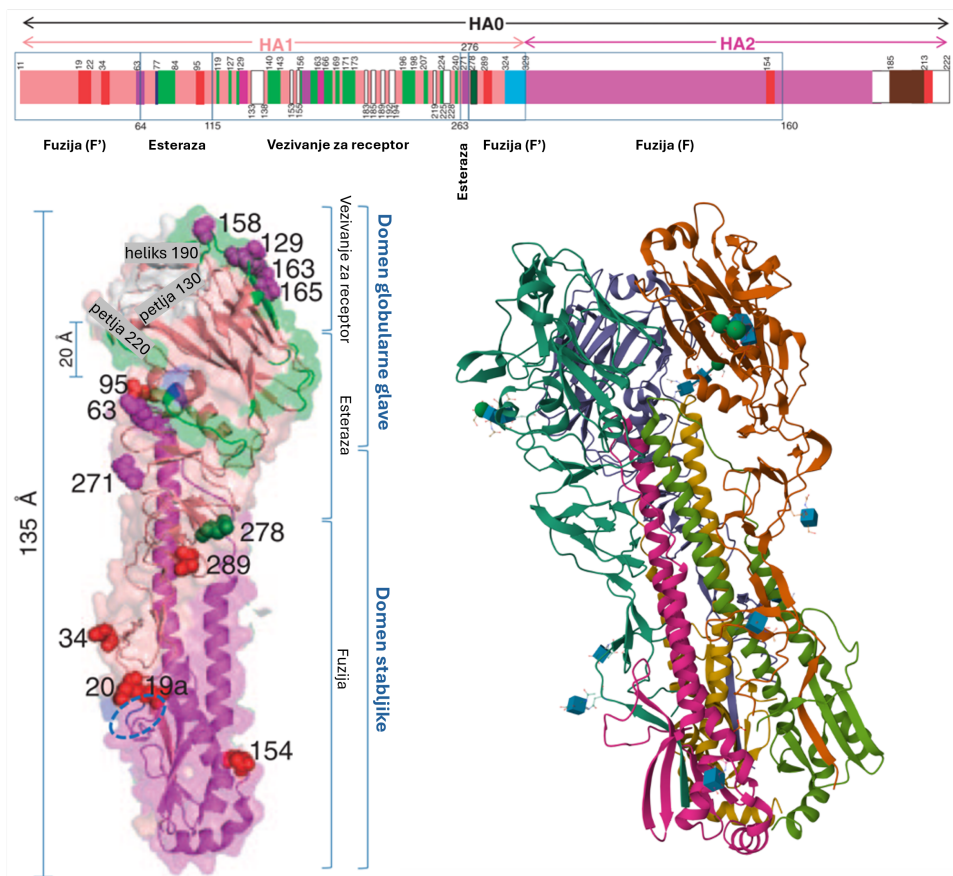
2.5. Hemaglutinin kao adjuvans u AIT

Hemaglutinin (HA) je jedan od dva glavna glikoproteina omotača, koji se eksprimiraju na površini kod različitih virusa, uključujući i virus gripa tipa A [26–28]. HA je glikoprotein omotača virusa gripa i odgovoran je za vezivanje virusa za receptore na ćeliji domaćina i ulazak viriona gripa u ćeliju pri virusnoj infekciji (Harshbarger et al. 2021). Uvijanje proteina, njegova stabilnost,

rastvorljivost, biosinteza, enzimska aktivnost i antigenost dinamički su regulisani njegovom N-glikozilacijom [131,132].

Hemaglutinin se sintetiše kao neaktivni prekursor poznat kao HA0. HA0 se sastoji od tri identična polipeptidna lanca, koji su međusobno povezani i formiraju cilindrični homotrimer. Svaki lanac HA0 se sastoji od dva ključna domena, globularne glave i stabljike (Slika 17) [133]. Domen globularne glave se nalazi na vrhu strukture i sadrži receptor-vezujući domen (RBD), koji je odgovoran za interakciju sa receptorima koji sadrže sijalinsku kiselinu na površini ćelija domaćina. Ovaj domen je bogat antiparalelnim β -pločama i ukrašen je N-glikanima koji igraju ulogu u izbegavanju imunskog odgovora. Domen stabljike se sastoji od trostrukih α -heliksa i povezuje globularnu glavu sa transmembranskim domenom. Stabljika je manje promenljiva od domena glave, što je čini atraktivnom za razvoj univerzalnih vakcina protiv virusa gripa [134].

HA0 prekursor postaje funkcionalno aktivan nakon proteolitičkog isecanja u respiratornom i gastrointestinalnom traktu domaćina, gde nastaju dve subjedinice, HA1 i HA2, koje ostaju povezane disulfidnim mostovima. HA1 ostaje deo domena globularne glave i uključuje RBD, a HA2 formira domen stabljike i sadrži fuzijski peptid koji je ključan za spajanje virusne membrane sa membranom ćelije domaćina. Glikozilacija HA0 je značajna za pravilno savijanje proteina, njegovu stabilnost i imunoevaziju, a sami N-glikani maskiraju regione epitopa, što otežava neutralizaciju virusnih čestica od strane antitela [134].



Slika 17: Kristalna struktura prekursora H1 hemaglutinina (HA0) iz pandemijskog soja iz 1918. godine (PDB:1RD8). Preuzeto iz [134] i modifikovano.

H1, zajedno sa svojim N-glikanima, predstavlja glavni antigen koji izaziva Th1 imunski odgovor domaćina protiv virusa gripa [131,135]. Neki od receptora urođene imunosti prepoznaju

ugljenohidratne strukture na glikoproteinima i pokazano je da se virus gripa vezuje za TLR2 [136]. Takođe, pokazano je da se na osnovu ugljenohidratnih struktura vezuje i za lektinske receptore, kao što su MBL (manoza-vezujući lektin), MMR (makrofagni manozni receptor), MGL (makrofagni galaktozni tip lektina) i DC-SIGN (*eng. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) [137].

Imajući u vidu ključnu ulogu hemaglutinina u procesu ulaska virusa u ćeliju domaćina, kao i njegov značaj u razvoju vakcina, ovaj glikoprotein je privukao veliku pažnju u oblasti imunologije i virusologije. Hemaglutinin se sve češće istražuje i kao potencijalni adjuvans u imunoterapiji alergija. Njegova sposobnost da aktivira ćelije urođene imunosti i da utiče na oblikovanje imunskog odgovora čini ga obećavajućim kandidatom za unapređenje efikasnosti alergen-specifične imunoterapije [30–32].

2.6. Modeli u alergen-specifičnoj imunoterapiji

Radi boljeg razumevanja mehanizama imunske tolerancije, optimizacije terapijskih protokola i razvoj novih pristupa u lečenju alergija, različiti životinjski i *in vitro* ćelijski modeli su veoma značajni.

2.6.1. Životinjski modeli

Životinjski modeli za alergijske bolesti disajnih puteva se koriste kako bi se ispitala patofiziologija povezana sa ponavljajućim izlaganjima alergenima kod astme [138]. S obzirom da miševi, kao i većina životinja, ne razvijaju upalnu bolest disajnih puteva koja podseća na astmu, mišji modeli zahtevaju protokol senzitivizacije alergenima i ponovno izlaganje istom kako bi došlo do razvijanja alergijskog odgovora [139].

Miševi se sve češće koriste za razvoj *in vivo* alergijskih modela. Njihova najveća prednost je što predstavljaju vrstu koja nije ugrožena i koja nudi veliku dostupnost dobro okarakterisanih genetskih sojeva. Ipak, modeli na miševima imaju određena ograničenja. Za razliku od ljudi, miševi ne razvijaju astmu spontano. Zbog toga, pored poteškoća u translaciji podataka dobijenih na mišjim modelima na ljude, mora se imati na umu da su miševi pogodniji za modelovanje osobina povezanih sa astmom nego za modelovanje kompletnog fenotipa astme [140].

Različiti sojevi miševa se razlikuju u jačini i prirodi imunog odgovora. Najčešće korišteni sojevi miševa za alergijsku astmu su BALB/c i C57BL/6. BALB/c miševi su poznati kao soj koji nakon protokola imunizacije ima veliku produkciju IgE antitela na većinu alergena, a C57BL/6 miševi su okarakterisani kao slabo produkujuće IgE životinje [141–143]. Generalno, C57BL/6 miševi razvijaju jači imunski odgovor tj. produkuju jaču eozinofiliju i imaju viši nivo Th2 citokina u odnosu na BALB/c miševe, ali BALB/c miševi pokazuju izraženiju bronhijalnu hiperreaktivnost [144,145]. Takođe, i sam patofiziološki mehanizam bolesti može biti drugačiji kod ova dva soja. Na primer, hiperreaktivnost disajnih puteva kod C57BL/6 miševa zavisi od eozinofila, ali kod BALB/c miševima ta zavisnost nije pokazana [144]. Pored svih pogodnosti korišćenja mišijih modela, njihov nedostatak je što ne oponašaju sva svojstva bolesti, ali su dovoljno dobri za predstavljanje brojnih inflamatornih, strukturnih i fizioloških osobina [138].

2.6.2. *In vitro* modeli: THP-1 ćelijska linija

Ćelijske linije miša ili čoveka, poreklom od kancerskih ćelija, važni su *in vitro* alati za proučavanje ćelijskih funkcija, mehanizama, kao i signalnih puteva i ispitivanja novih terapija i lekova. *In vitro* jednoćelijski modeli su vrlo jeftini i efikasni. Različite imortalizovane ili primarne ćelijske linije se koriste za ispitivanje imunomodulatornih mehanizama [146]. Upotreba *in vitro* ćelijskih linija je značajna, jer su veoma jednostavne za održavanje i imaju minimalne genetske varijacije. Takođe, kod ovih model sistema nema ograničenja u vidu etičkih pitanja, pristupačnosti i dostupnosti donora [147].

THP-1 ćelijska linija predstavlja humane monocite poreklom iz akutne monocitne leukemije i široko je korišćena kao model u istraživanjima funkcije, signalizacije i diferencijacije monocita i makrofaga. Zbog svoje stabilnosti i mogućnosti diferencijacije u makrofage pod dejstvom različitih stimulansa, THP-1 ćelije se smatraju pouzdanim *in vitro* sistemom za proučavanje ćelija urođene imunosti [147].

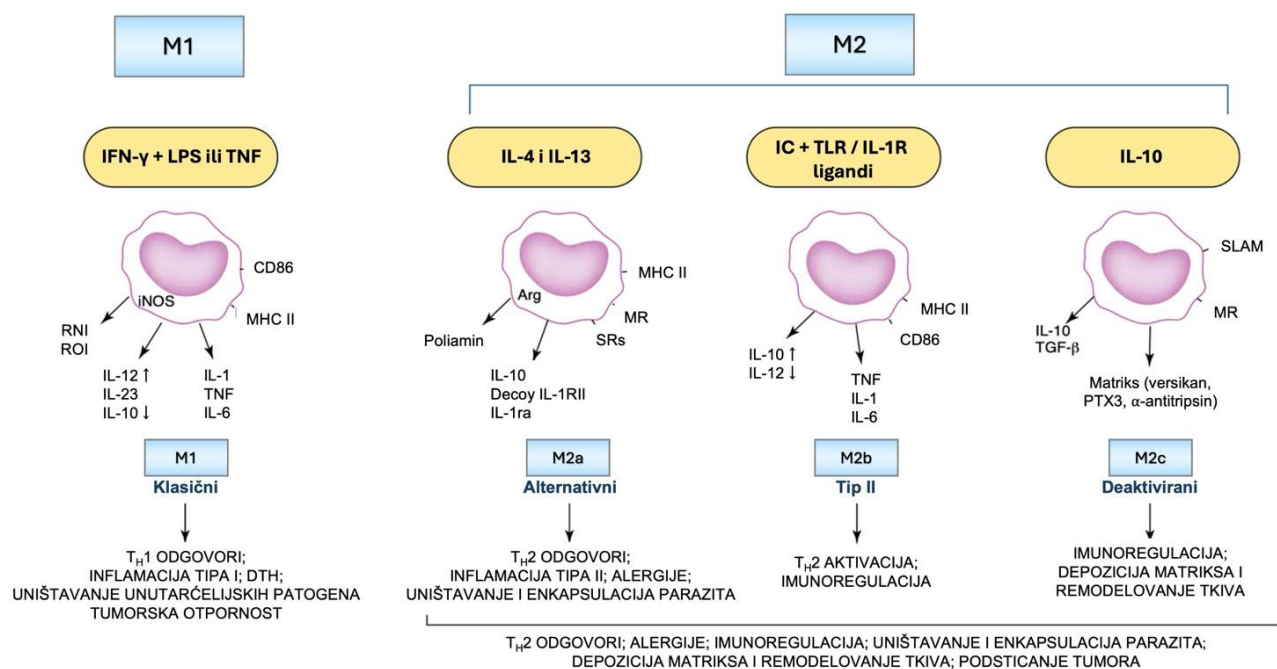
Monociti i makrofagi imaju ključnu ulogu u prvom odgovoru organizma na patogene i njihove funkcije obuhvataju: prepoznavanje mikroorganizama pomoću PRRs, proliferaciju i aktivaciju u cilju efikasnije eliminacije patogena, produkciju proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina i hemokina, kao i fagocitozu patogena i ćelijskih ostataka, što doprinosi klirensu infekcija i održavanju tkivne homeostaze. Zahvaljujući sličnostima sa primarnim monocitima, THP-1 ćelije omogućavaju standardizovano ispitivanje imunskih procesa i testiranje potencijalnih imunomodulatornih terapija u kontrolisanim laboratorijskim uslovima [147].

THP-1 monociti se jednostavno mogu diferencirati u makrofage primenom različitih stimulansa, među kojima su najčešći PMA (forbol 12-miristat 13-acetat), vitamin D3 (D3) i faktor koji stimuliše formiranje kolonija makrofaga (M-CSF). Nakon diferencijacije, makrofagi se mogu dodatno polarizovati u različite fenotipove, zavisno od stimulacije: IFN- γ i/ili LPS indukuju klasično aktivirane M1 makrofage, dok IL-4, IL-13 i IL-10 promovišu alternativnu aktivaciju u M2 makrofage [148–150] (Slika 18).

Stimulisanjem Th1 ćelijskog odgovora M1 makrofagi predstavljaju proinflammatory fenotip koji ima ključnu ulogu u zaštiti domaćina od patogena i razvoja tumora [151]. Njihova aktivacija je povezana sa produkcijom proinflammatoryh citokina: TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 i IL-12, pojačanom ekspresijom PRR receptora, uključujući TLR i NLR, kao i stimulacijom Th1 odgovora, koji je važan za eliminaciju intracelularnih patogena [151].

Nasuprot tome, M2 makrofagi su uključeni u imunoregulaciju, remodelovanje i reparaciju tkiva, odbranu od parazita, patofiziologiju alergijskih reakcija i progresiju tumora posredstvom Th2 odgovora [152]. M2 makrofagi se dodatno dele na tri funkcionalne podgrupe:

- (a) M2a makrofagi, indukovani pomoću IL-4 ili IL-13, uključeni u alergije i zaceljivanje rana;
- (b) M2b makrofagi, aktivirani imunokompleksima zajedno sa TLR ili IL-1R agonistima, koji kombinuju pro- i antiinflammatory funkcije;
- (c) M2c makrofagi, indukovani pomoću IL-10, povezani sa imunosupresijom i regulacijom inflamacije [153].



Slika 18: Stimulusi i izabrane funkcionalne osobine različito polarizovanih populacija makrofaga. DTH – preosetljivost odloženog tipa; IC – imunokompleksi; iNOS – inducibilna sintaza azot-monoksida; LPS – lipopolisaharid; MR – manoza receptor; PTX3 – pentraksin PTX3; RNI – reaktivni azotni intermedijeri; ROI – reaktivni kiseonični intermedijeri; SLAM – molekul za aktivaciju limfocita putem signalizacije; SRs – skavendžer receptori. Preuzeto iz [153].

2.7. Kvasci kao domaćini za proizvodnju proteinskih terapeutika

Upotreba proteinskih terapeutika je sve zastupljenija u modernoj medicini. Biološki lekovi i prirodni proizvodi sa medicinskom primenom imaju široku upotrebu u humanoj medicini, što zahteva njihovu obimnu proizvodnju kako bi se zadovoljile kliničke potrebe. Napredak u genetičkom inženjeringu i sekvenciranju genoma omogućio je razvoj heterologne proizvodnje kao alternativnog pristupa snabdevanju.

Ekspresioni sistemi predstavljaju ključnu tehnologiju za proizvodnju rekombinantnih proteinskih terapeutika. Ovi proteinski terapeutici uključuju proteinske hormone, vakcine, antitela, interferone i hormone rasta i zajedno se svi svrstavaju u kategoriju proteinskih biofarmaceutika [154]. Ovi sistemi omogućavaju efikasnu sintezu proteina u različitim domaćinima, pri čemu izbor optimalnog ekspresionog sistema zavisi od strukture, funkcije i posttranslacionih modifikacija ciljanog proteina. Jedan od prvih uspešnih primera rekombinantnog terapeutika je insulin proizveden u *Escherichia coli* ekspresionom sistemu, koji je 1982. godine odobrila FDA i plasirala na tržište, nakon čega je usledila i proizvodnja drugih rekombinantnih terapeutika [155,156].

Iako se najveći broj terapeutika proizvodi u sisarskim ćelijama, pretežno u ćelijama jajnika kineskog hrčka (CHO), korišćenje ovog ekspresionog sistema predstavlja dugotrajan, skup i složen proces. Sa druge strane, rekombinantni proteini proizvedeni u bakterijama suočavaju se s drugim ograničenjima, kao što je nedostatak adekvatnih posttranslacionih modifikacija (PTM), potencijalnom imunogenošću, slabom stabilnošću i kratkim poluživotom u serumu. Jedan od preferiranih heterolognih ekspresionih sistema su kvasci koji su generalno priznati kao bezbedni, poput *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* i *Hansenula polymorpha*. Ovi

organizmi su robustni, genetski lako podesivi, ekonomični, i za razliku od *E. coli*, poseduju sopstvenu PTM mašineriju i ne sadrže endotoksine [155,156].

Kao domaćini, kvasci su korišćeni za proizvodnju velikog broja različitih komponenti, kao što su steroli, alkoholi, derivati šećera, limunska i mlečna kiselina, organske i masne kiseline, peptidi i neki medicinski važni proteinski terapeutici [157]. Tabela 5 predstavlja primere nekih od najvažnijih proteinskih terapeutika koji su proizvedeni u kvascima.

Tabela 5: Proteinski terapeutici proizvedeni u kvascima. Preuzeto iz [156].

Kvasac	Proteinski terapeutik	Prinos
<i>S. cerevisiae</i>	IFN α 2b	15 mg/L
<i>S. cerevisiae</i>	Peptid sličan glukagonu 2	-
<i>P. pastoris</i>	Insulin	3 g/L (prekursor insulina)
<i>P. pastoris</i>	Antigen hepatitisa B	7 g/L
<i>P. pastoris</i>	HSA	92,29 mg/L
<i>P. pastoris</i>	Humani GM-CSF	285 mg/L
<i>K. lactic</i>	Humani interferon β	-
<i>H. polymorpha</i>	HBV površinski antigen	250 mg/L
<i>H. polymorpha</i>	GCSF	-
<i>H. polymorpha</i>	VP6 protein rotavirusa	3,35 g/L
<i>H. polymorpha</i>	HPV tip 16 L1-L2 hibridni protein	132,10 mg/L

2.7.1. *Pichia pastoris* kao ekspresioni sistem

Pichia pastoris je metalotrofni kvasac koji predstavlja dobro okarakterisan ekspresioni sistem za proizvodnju proteinskih terapeutika. U odnosu na sisarske ćelije, *P. pastoris* je jednostavnija za genetsku manipulaciju i uzgajanje i može da raste i pri velikoj gustini ćelija. Takođe je veoma važno i to što je *P. pastoris* eukariotski organizam i samim tim ima sposobnost za potencijalnu proizvodnju solubilnih, pravilno uvijenih rekombinantnih proteina koji imaju sve posttranslacione modifikacije neophodne za njihovu funkcionalnost. Prednost *P. pastoris* sistema je i što poseduje jake promotore koji vode ekspresiju stranih gena, što omogućava produkciju velikih količina željenog proteina sa relativnom lakoćom i sa manjom cenom u odnosu na većinu drugih eukariotskih sistema [158,159].

Proizvodnja rekombinantnih proteina u *P. pastoris* ima nekoliko prednosti u odnosu na proizvodnju u drugim eukariotskim i prokariotskim ekspresionim sistemima. Neke od tih prednosti su:

- 1) velika stopa rasta, povezana sa lakoćom fermentacije pri visokoj gustini ćelija,
- 2) visok nivo produkcije u medijumu,
- 3) eliminacija endotoksina i bakteriofagnih kontaminacija,
- 4) jednostavna genetska manipulacija dobro okarakterisanih ekspresionih vektora,
- 5) odsustvo humane patogenosti u spektru litičkih virusa koji se bore za *P. pastoris*,
- 6) razne posttranslacione modifikacije koje uključuju uvijanje proteina, glikozilaciju, metilaciju, proteolitičko prilagođavanje i ciljane ekspresije u subćelijske delove,
- 7) sposobnost inženjeringa sekretovanih proteina koji mogu biti prečišćeni iz medijuma u kome su rasli bez razaranja ćelija kvasca [159,160].

Iako *S. cerevisiae* i *P. pastoris* imaju brojne zajedničke osobine u pogledu genske manipulacije i molekularnog inženjeringa, *P. pastoris* se izdvaja zbog značajno većeg stepena ekspresije rekombinantnih proteina, koji može biti veći i do 100 puta [161]. Ova karakteristika čini *P. pastoris* idealnim sistemom za proizvodnju velikih količina proteina. Jedna od ključnih osobina *P. pastoris* je sposobnost da koristi metanol kao jedini izvor ugljenika. Alkohol oksidaza je prvi enzim u metaboličkom putu metanola, a *P. pastoris* sadrži dva gena koja kodiraju ovaj enzim: AOX1 i AOX2. Najveća proizvodnja alkohol oksidaze regulisana je AOX1 genom, koji ima ključnu ulogu u efikasnoj oksidaciji metanola. Ovaj enzim ima mali afinitet prema molekulskom kiseoniku, pa *P. pastoris* proizvodi velike količine alkohol oksidaze kako bi se metanol uspešno metabolisao. Ekspresija ovog enzima je direktno pod kontrolom promotora koji pokreće heterolognu ekspresiju proteina.

Postoje tri tipa *P. pastoris* domaćina koji se razlikuju u brzini rasta i njihovim sposobnostima korišćenja metanola. Većina sojeva raste na metanolu kao i standardni Mut⁺ soj (*eng. methanol utilization slow*) [162]. Dva ostala tipa sojeva, Mut^s i Mut⁻, imaju delecije u jednom ili oba AOX gena, što dovodi do smanjene proizvodnje alkohol oksidaze i usporenog rasta. Prednost ovih sojeva je ta što su pogodniji za proizvodnju stranih proteina u odnosu na standardni soj. Takođe, ovi sojevi zahtevaju manje metanola za indukovanje ekspresije, što je prednost kod fermentacija na velikoj skali gde se velika količina metanola smatra kao mogući uzročnik požara. Jedan od primera *P. pastoris* Mut^s soja je KM71H, dok X-33 soj spada u standardni Mut⁺ koji efikasno koristi metanol.

Za ekspresiju rekombinantnih proteina, zavisno od signalne sekvence, može doći do unutarćelijske ili vanćelijske proizvodnje. Signalna sekvenca α -faktor, koja je korišćena za vanćelijsku ekspresiju u *S. cerevisiae*, pokazala se kompatibilnom i u *P. pastoris* [158].

Jedna od najvećih prednosti *P. pastoris* kao ekspresionog domaćina je mogućnost da sekretuje velike količine pravilno uvijenog, posttranslaciono obrađenog i aktivnog rekombinantnog proteina u medijum. Najčešće korišćena signalna sekvenca u *P. pastoris* je α -faktor signalna sekvenca dobijena iz *S. cerevisiae* [158]. Takođe, jedna od glavnih prednosti *P. pastoris* u odnosu na druge sojeve kvasca je minimalna sekrecija njenih proteina, što znači da većina proteina koji se sekretuju iz ćelija predstavljaju željene rekombinantne proteine, što omogućava njihovo lakše prečišćavanje.

Kao i drugi eukariotski ekspresioni sistemi, *P. pastoris* može uvesti posttranslacione modifikacije. Za razliku od *S. cerevisiae* koja uvodi između 40 i 150 manoznih ostataka po glikozilacionom mestu, *P. pastoris* uvodi manji broj manoznih jedinica, a prosečna dužina je 8 – 14 manoznih ostataka. Kao i u sisarskim ćelijama, mesto glikozilacije u *P. pastoris* je Asn-X-Ser/Thr sekvenca [163,164]. Ipak, glikozilacija u kvascima razlikuje se od humane N- i O-glikozilacije, što predstavlja izazov u proizvodnji rekombinantnih proteina. Zbog toga se sve više radi na

glikoinženjeringu kvasaca kako bi se to prevazišlo. Takođe, sve više se radi i na unapređenju sekrecione mašinerije kvasaca, kao i degradaciji endogenih proteina, kako bi se poboljšalo uvijanje, sekrecija i stabilnost rekombinantnih proteina [164].

Veliki broj proteinskih terapeutika je proizveden u ovom ekspresionom sistemu. *P. pastoris* je takođe korištena za proizvodnju raznih vakcina, posebno onih protiv virusa. Ovakve vakcine uključuju rekombinantne proteine koji su zapravo antigeni različitih virusa, kao što su antigeni Epštajn-Bar virusa (EBV), denga virusa, virusa ptičjeg gripa (H5N1), površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg), glavni kapsidni protein L1 humanog papiloma virusa tipa 16, kapsidni protein VP1 humanog enterovirusa 71 [159].

3. Ciljevi

Alergen-specifična imunoterapija (AIT) je jedini trenutno dostupni tretman koji može da indukuje dugotrajnu imunsku toleranciju kod osoba sa alergijama. Ipak, njena efikasnost je i dalje ograničena, pa se zbog toga intenzivno istražuju novi adjuvansi koji bi mogli da poboljšaju njenu efikasnost. Glikani, zahvaljujući svojoj sposobnosti da modulišu imunski odgovor putem interakcija sa PRR, predstavljaju obećavajuće kandidate. Hemaglutinin, glikoprotein virusa gripa, pokazuje imunomodulatorna svojstva, što dodatno otvara mogućnost njegove primene u ovoj oblasti.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije jeste ispitivanje imunomodulatornog potencijala H1sD2 glikoproteina, koji su sastavljeni od receptor vezujućeg domena hemaglutinina (H1) i glavnog alergena grinja kućne prašine (Der p 2). Sam fokus istraživanja je analiza uticaja specifičnog sastava N-glikana na hemaglutininu na imunski odgovor kod različitih ćelijskih i životinjskih modela, sa ciljem da se proceni njihova primena kao novih adjuvanasa za unapređenje efikasnosti i bezbednosti AIT.

Naučni ciljevi ove doktorske disertacije definisani su kroz sledeće istraživačke faze:

- *In silico* dizajn i kloniranje rekombinantnih H1sD2 glikoproteina, koji se sastoje od alergena Der p 2 i receptor-vezujućeg domena H1 (RBD-H1), sa uvedenim različitim mestima glikozilacije u okviru H1 domena;
- Optimizacija proizvodnje rekombinantnih glikoproteina u ekspresionom sistemu *Pichia pastoris*;
- Prečišćavanje dobijenih H1sD2 glikoproteina;
- Detaljna biohemijska karakterizacija proteina korišćenjem masene spektrometrije, uključujući:
 - analizu primarne strukture,
 - identifikaciju glikopeptida,
 - određivanje statusa glikozilacije,
 - određivanje mase intaktnih proteina.
- Imunološka karakterizacija proizvedenih rekombinantnih glikoproteina.

Nakon uspešne proizvodnje i karakterizacije, H1sD2 glikoproteini će se koristiti za ispitivanje njihovog imunomodulatornog potencijala u različitim *in vitro* modelima. U cilju detaljnijeg istraživanja imunomodulatornog potencijala, definisani su sledeći ciljevi:

- Razvoj protokola imunizacije i mišjeg modela alergijske upale korišćenjem HDM ekstrakta i rekombinantnog Der p 2 alergena;
- Analiza citokinskog profila splenocita izdvojenih nakon izazivanja alergijskog odgovora i tretmana H1sD2 glikoproteinima;
- Diferencijacija humane ćelijske linije THP-1 monocita u M0 i M2 fenotipove makrofaga i njihova karakterizacija;
- Ispitivanje specifičnog vezivanja H1sD2 glikoproteina za receptore na površini diferenciranih THP-1 makrofaga korišćenjem protočne citometrije i konfokalne mikroskopije;
- Analiza relativne ekspresije gena za proinflamatorne i antiinflamatorne citokine nakon tretmana THP-1 makrofaga H1sD2 glikoproteinima;

- Analiza nivoa sekretovanih citokina nakon stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi pacijenata alergičnih na grinje kućne prašine H1sD2 glikoproteinima.

4. Naši radovi

4.1. *In silico* dizajn *H1sD2* genskih konstrukata i provera plazmida

4.1.1. *In silico* dizajn genskih konstrukata

Pet različitih rekombinantnih *H1sD2* konstrukata je dizajnirano *in silico* korišćenjem nukleotidne baze Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI). Za njihov dizajn su korišćene nukleotidne sekvence koje kodiraju receptor vezujući domen (RBD) hemaglutinina, H1₆₃₋₂₉₁ (GenBank ID: ACQ99608) i Der p 2 alergen (GenBank ID: JN222809). Takođe, kako bi se sprečila distorzija između tercijarnih i sekundarnih struktura ova dva domena i na taj način povećala stabilnost konstrukta, GPGP linker je umetnut između H1 i Der p 2 domena. Pored *H1sD2* genskog konstrukta, odabran je i gen koji kodira Der p 2 alergen korišćenjem nukleotidne sekvence, a koja je korišćena i prilikom dizajna *H1sD2* konstrukata (GenBank ID: JN222809).

H1sD2 genski konstrukti su dizajnirani tako da se očuva konzervirani deo sekvence koji kodira N-glikozilaciono mesto na poziciji N43 u svakom od pet *H1sD2* glikoformi i uvođenjem tri potencijalna N-glikozilaciona mesta (N81, N111, i N116). Razlika između ovih pet glikoproteina je u broju i poziciji N-glikana. WT *H1sD2* glikoforma dizajnirana je tako da poseduje samo N43 (N95 u H3 HA) N-glikozilaciono mesto koje je široko očuvano među H1N1 virusima, M1 glikoforma poseduje N43 i N111 (N158 u H3 HA), M2 glikoforma poseduje N43 i N116 (N163 u H3 HA), M3 glikoforma poseduje N43 i N81 (N129 u H3 HA), a M4 glikoforma poseduje sve od navedenih (N43, N81, N111 i N116). Finalne proteinske sekvence *H1sD2* proteina od 369 aminokiselina prikazane su na Slici 19.



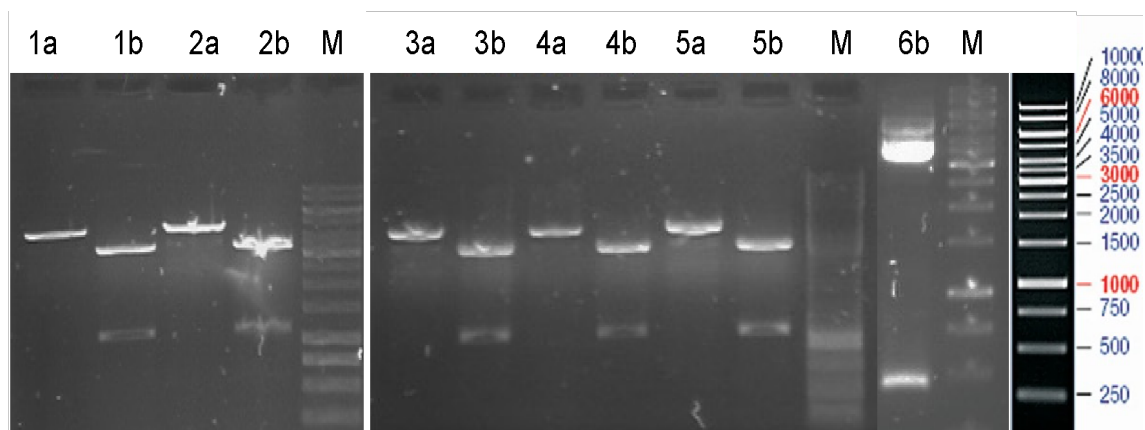
Slika 19: Poređenje aminokiselinskih sekvenci *H1sD2* glikoproteina. Legenda je prikazana u okviru same slike.

4.1.2. Provera plazmida

Sintetisani *D2* i *H1sD2* konstrukti su uklonirani u pPicZα-A vektor (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, SAD) između EcoRI i XbaI (Thermo Scientific, SAD) restrikcionih mesta. DNA sekvence koje kodiraju ove konstrukte sintetisane su od strane SynbioTechnologies (Monmouth Junction,

SAD), a kodoni su optimizovano za ekspresiju u *P. pastoris* ekspresionom sistemu. Za umnožavanje pPicZa-A-*H1sD2* plazmida je korišćen DH5α soj hemijski kompetentnih *E. coli* ćelija (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, SAD), koji su zatim prečišćeni po uputstvu proizvođača korišćenjem peqGold Plasmid Miniprep kita.

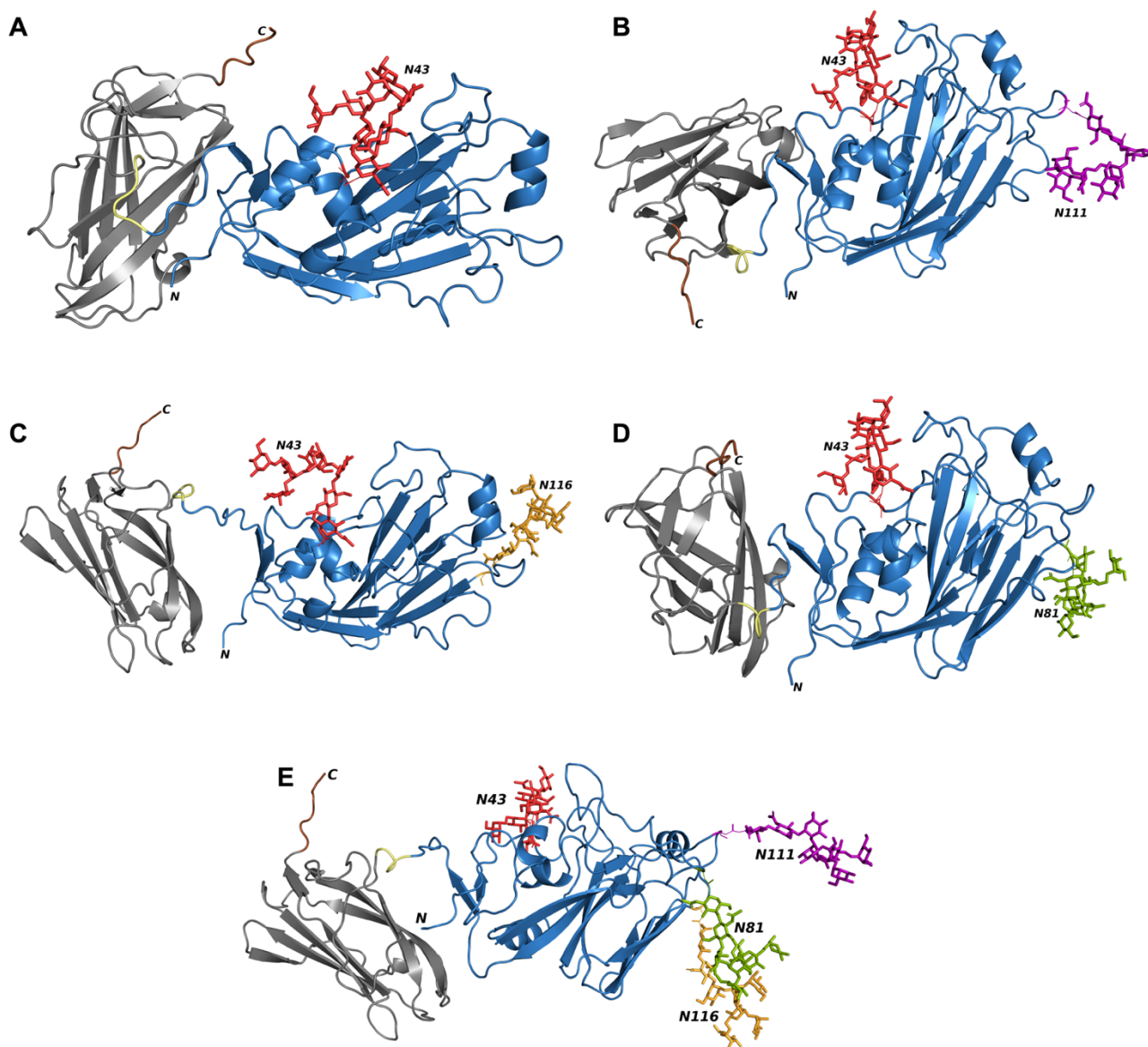
Kako bi se proverilo da li je izolovanje plazmida uspešno, kao i prisustvo gena u okviru plazmida, vektori su isečeni restrikcionim endonukleazama EcoRI (restrikcija) i EcoRI i SalI (dupla digestija), a proizvodi su analizirani agaroznom DNA elektroforezom u 1% agaroznom gelu (Slika 20). Na gelu se može videti da su plazmidi uspešno izolovani (4722 bp i 3989 bp), kao i da svaki od plazmida sadrži odgovarajući gen (1122 bp i 389 bp).



Slika 20: Analiza izolovanih plazmida na agaroznom gelu nakon isecanja restrikcionim endonukleazama. 1–WT H1sD2, 2– M1 H1sD21, 3– M2 H1sD2, 4– M3 H1sD2, 5– M4 H1sD2, 6– Der p 2, M– DNA markeri (250 – 10000 bp O'Gene Ruler™, Fermentas, Vilnius, Litvanija); a– restrikcija; b– dupla digestija.

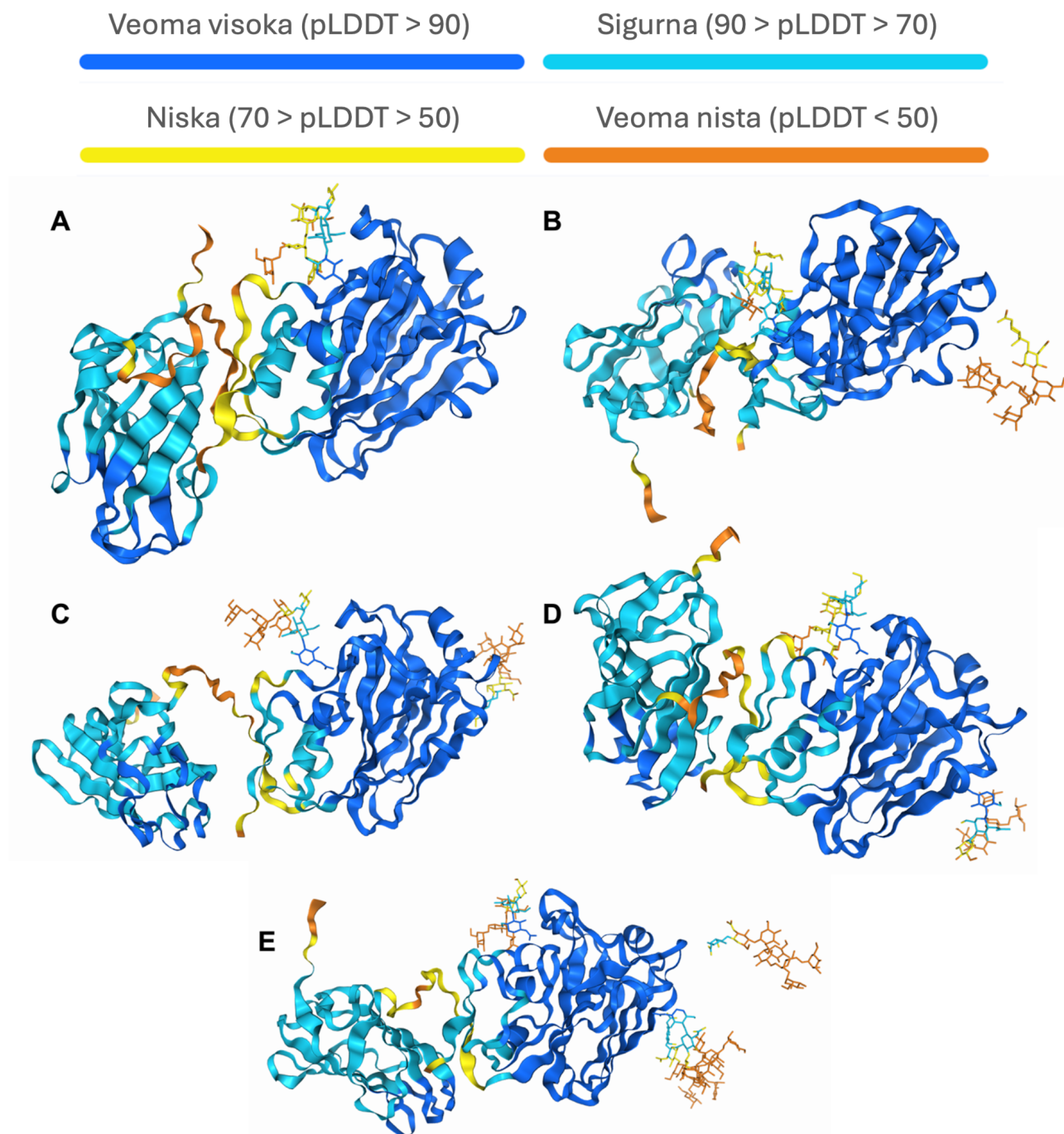
4.1.3. 3D modelovanje

Korišćenjem AlphaFold Servera (<https://alphafoldserver.com/>) koji koristi AlphaFold 3 verziju su dizajnirani 3D modeli H1sD2 glikoproteina. Na sva glikozilaciona mesta su dodati N-glikani kako bi se verodostojnije prikazale ugljenohidratne strukture. Zbog ograničenja samog servera, moguće je bilo dodati glikane od maksimalno 8 ugljenohidratnih jedinica. Na Slici 21 su prikazani dizajnirani 3D modeli.



Slika 21: 3D modeli H1sD2 glikoproteina. A) WT H1sD2, B) M1 H1sD2, C) M2 H1sD2, D) M3 H1sD2, E) M4 H1sD2. plavom bojom je naznačen H1s deo, dok je sivom bojom prikazan D2 deo strukture. Između njih je žutom bojom prikazan GPGP linker, a na C terminusu je označen His tag bordo bojom. N-glikani su prikazani crvenom (N43), zelenom (N81), ciklama (N111) i oker bojom (N116).

AlphaFold server koristi više parametara za karakterizaciju i procenu kvaliteta predviđenih 3D struktura proteina. Ključni parametri uključuju pLDDT, pTM i ipTM. pLDDT (*eng. predicted Local Distance Difference Test*) je parametar koji govori o kvalitetu predviđanja na nivou pojedinačnih aminokiselinskih ostataka. Skala ide od 0 do 100, gde viša vrednost ukazuje na veću pouzdanost predikcije. pLDDT vrednosti za 3D modele H1sD2 glikoproteina su prikazane na Slici 22.



Slika 22: H1sD2 modeli i pLDDT vrednosti. A) WT H1sD2, B) M1 H1sD2, C) M2 H1sD2, D) M3 H1sD2, E) M4 H1sD2. Legenda je prikazana u okviru same slike.

pTM (*eng. predicted TM-score*) i iPTM (*eng. interface predicted TM-score*) predstavljaju globalne mere pouzdanosti predviđenih 3D struktura proteina i njihovih međusobnih interakcija. pTM je mera pouzdanosti celokupne strukture proteina koja se izražava skalom od 0 do 1, gde veća vrednost znači veću pouzdanost. Vrednosti pTM veće od 0,7 ukazuju na stabilno i tačno predviđanje, dok pTM vrednosti manje od 0,5 ukazuju na strukturu koja je nesigurno predviđena i čiji domeni mogu biti netačno orjentisani. Vrednosti ovih parametara za H1sD2 modele su prikazane u Tabeli 6.

Tabela 6: pTM i ipTM parametri dizajniranih 3D modela

Naziv proteina	pTM	ipTM
WT H1sD2	0,66	0,85
M1 H1sD2	0,69	0,81
M2 H1sD2	0,67	0,77
M3 H1sD2	0,69	0,82
M4 H1sD2	0,72	0,71

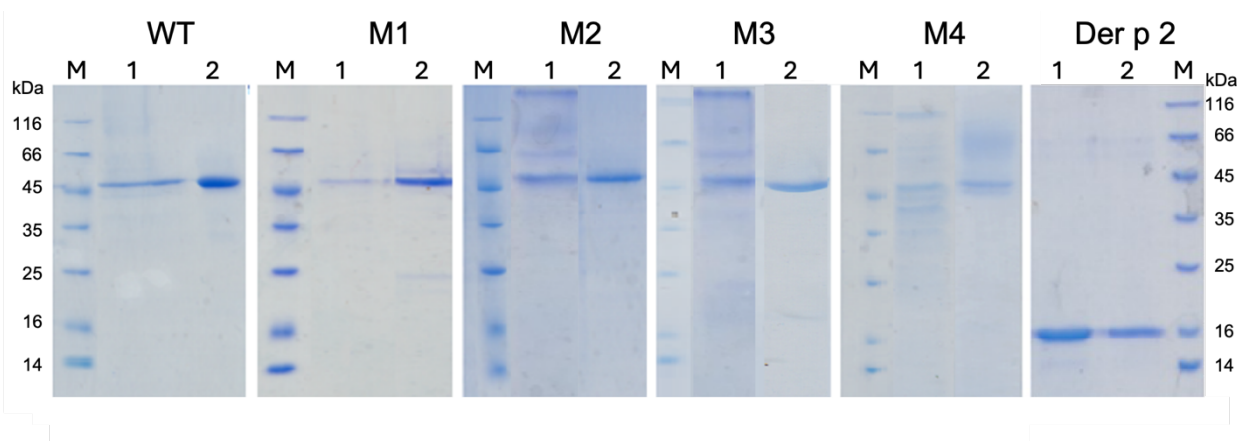
4.2. Ekspresija i prečišćavanje proteina

4.2.1. Ekspresija proteina u *Pichia pastoris* ekspresionom sistemu

Nakon uspešnog umnožavanja plazmida, isti su linearizovani MssI (PmeI) restrikcionim enzimom (Thermo Scientific, SAD) i korišćeni za transformaciju kompetentnih Mut^S KM71H *P. pastoris* ćelija. Pojedinačne transformisane kolonije su zatim korišćene za proizvodnju rekombinantnih Der p 2 i H1sD2 proteina. Ćelije su gajene u selektivnom BMGY medijumu sa zeocinom, a ekspresija je rađena u BMMY medijumu na 28 °C uz mešanje na 250 rpm i indukovana je 0,5 % metanolom na 24 sata tokom 3 ili 4 dana. Kako je ekspresija vanćelijska, ćelije kvasca su centrifugiranjem udaljene iz medijuma koji sadrži eksprimirane proteine. SDS-PAG elektroforezom je analizirana ekspresija proteina (Slika 23).

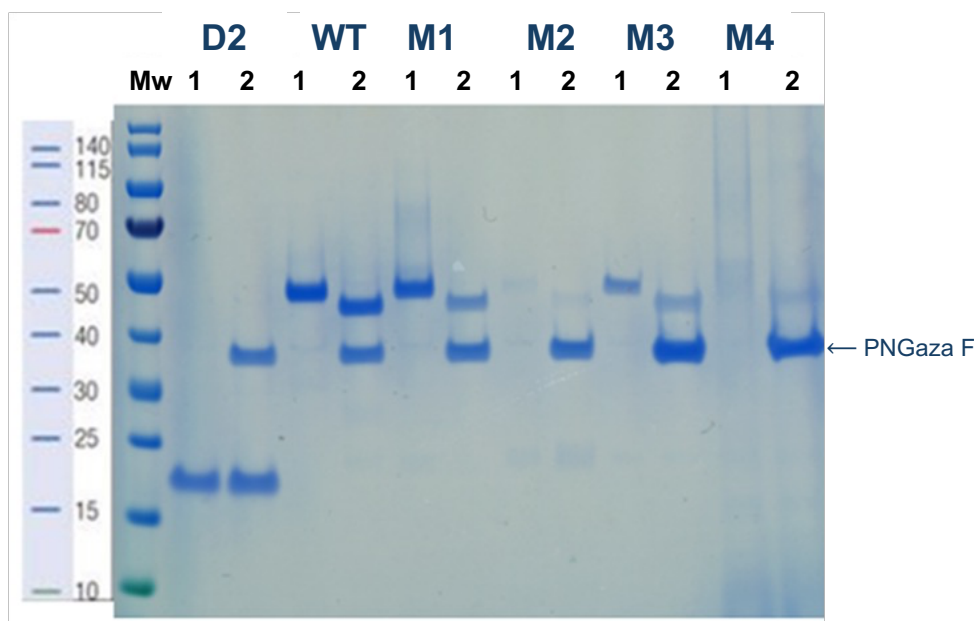
4.2.2. Prečišćavanje eksprimiranih proteina

Kako svi eksprimirani proteini imaju histidinski tag (6His) na C-terminusu, proteini su prečišćeni afinitetnom hromatografijom sa imobilisanim metalom (IMAC), a zatim i jonoizmenjivačkom hromatografijom na ANX koloni. Prečišćeni proteini su analizirani SDS-PAG elektroforezom (Slika 23). Teorijske molekulske mase na osnovu aminokiselinskih sekvenci izračunate su pomoću Compute pI/Mw alata (https://web.expasy.org/compute_pi/) i procenjene na oko 41 kDa za svih pet H1sD2 glikoproteina (bez glikana) i 15 kDa za Der p 2. Prisutnost tri disulfidne veze u Der p 2 uticala je na mobilnost proteina kroz gel pod neredukujućim uslovima. Kao rezultat toga, posmatrana molekularna masa Der p 2 na SDS-PA gelu je viša od teorijske molekularne mase Der p 2.



Slika 23: Ekspresija i prečišćavanje H1sD2 i Der p 2 rekombinantnih proteina. 1– ekspresija; 2– prečišćeni proteini; Mw – proteinski markeri od 14 – 116 kDa (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Iako položaj proteinskih traka na gelu ukazuju na višu molekulska masu glikoproteina u odnosu na njihovu teorijsku molekulska masu, kako bi se to i eksperimentalno utvrdilo, korišćena je PNGasa-F (New England Biolabs, SAD), enzim koji iseca glikane sa površine proteina i zatim su nativni i deglikozilovani proteini analizirani SDS-PAG elektroforezom čime je potvrđena razlika u masi tj. da su svi eksprimirani H1sD2 proteini glikozilovani (Slika 24).



Slika 24: Der p 2 i H1sD2 glikoproteini pre i nakon deglikozilacije korišćenjem enzima PNGaze F. Mw – proteinski marker; 1 – intaktni proteini; 2 – deglikozilovani proteini.

Iako je poznato da *P. pastoris* ekspresioni sistem proizvodi rekombinantne proteine bez endotoksina, svi proteini su testirani na kontaminaciju endotoksinima čime je potvrđeno da su nivoi endotoksina bili ispod 0,5 ng/mL (Tabela 7).

Tabela 7: Određivanje koncentracije endotoksina u uzorcima nakon prečišćavanja korišćenjem LAL eseja.

Endotoksin	
Protein	Koncentracija
Der p 2	0,13 ng/mL
WT H1sD2	0,31 ng/mL
M1 H1sD2	0,28 ng/mL
M2 H1sD2	0,29 ng/mL
M3 H1sD2	0,16 ng/mL
M4 H1sD2	0,22 ng/mL

4.3. Analiza proteina masenom spektrometrijom

4.3.1. Analiza aminokiselinske sekvence

Nakon što su proteini uspešno proizvedeni i prečišćeni, urađeno je mapiranje peptida i sekvenciranje primarne strukture masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Ove analize su obezbedile visoku pokrivenost aminokiselinske sekvence, što je potvrđeno pretragom baze podataka sekvenci pomoću Mascot Servera i Proteome Discoverer 3.0. Za pretragu je korišćena UniProt baza i na ovaj način su uspešno identifikovani Der p 2 i H1sD2 glikoproteini. Procenat potvrđenosti je prikazan u Tabeli 8, a identifikovani delovi sekvence na Slici 25.

Tabela 8: Pokrivenost aminokiselinskih sekvenci Der p 2 i H1sD2 proteina

Protein	Pokrivenost aminokiselinske sekvence	
	Mascot™	Proteome Discoverer 3.0
Der p 2	100%	100%
WT H1sD2	85%	85%
M1 H1sD2	75%	76%
M2 H1sD2	71%	73%
M3 H1sD2	84%	84%
M4 H1sD2	68%	69%

		10	20	30	40	50	60	70	80
Der p 2	1	EAEPMDQVDV	KDCANHEIKK	VLVPGCHGSE	PCIIHRGKPF	QLEAVFEANQ	NTKTAKIEIK	ASIDGLEVDV	PGIDPNACHY
	81	MKCPLVKGQQ	YDIKYTNVNP	KIAPKSENVV	VTVKVMGDDG	VLACAIATHA	KIRDHHHHHH		
WT H1sD2	1	EAEPMGVAPL	HLGKCNIAIW	ILGNPECESL	STASSWSYIV	ETSSSDNGTC	YPGDFIDYEE	LREQLSSVSS	FERFEIFPKT
	81	SSWPNHDSNK	GVTAACPHAG	AKSFYKNLIW	LVKKNGSYPK	LSKSYINDKG	KEVLVLWGIH	HPSTSADQQS	LYQNADAYVF
	161	VGSSRYSKKF	KPEIAIRPKV	RDQEGRMNYY	WTLVEPGDKI	TFEATGNLVV	PRYAFAMERN	AGSGIIISDT	PVHDGPGPDQ
	241	VDVKDCANHE	IKKVLVPGCH	GSEPCIIHRG	KPFQLEAVFE	ANQNTKTAKI	EIKASIDGLE	VDVPGIDPNA	CHYMKCPLVK
	321	GQQYDIKYTW	NVPKIAPKSE	NVVVTVKVMG	DDGVLACAIA	THAKIRDHHH	HHH		
M1 H1sD2	1	EAEPMGVAPL	HLGKCNIAIW	ILGNPECESL	STASSWSYIV	ETSSSDNGTC	YPGDFIDYEE	LREQLSSVSS	FERFEIFPKT
	81	SSWPNHDSNK	GVTAACPHAG	AKSFYKNLIW	LVKKNGSYPK	LSKSYINDKG	KEVLVLWGIH	HPSTSADQQS	LYQNADAYVF
	161	VGSSRYSKKF	KPEIAIRPKV	RDQEGRMNYY	WTLVEPGDKI	TFEATGNLVV	PRYAFAMERN	AGSGIIISDT	PVHDGPGPDQ
	241	VDVKDCANHE	IKKVLVPGCH	GSEPCIIHRG	KPFQLEAVFE	ANQNTKTAKI	EIKASIDGLE	VDVPGIDPNA	CHYMKCPLVK
	321	GQQYDIKYTW	NVPKIAPKSE	NVVVTVKVMG	DDGVLACAIA	THAKIRDHHH	HHH		
M2 H1sD2	1	EAEPMGVAPL	HLGKCNIAIW	ILGNPECESL	STASSWSYIV	ETSSSDNGTC	YPGDFIDYEE	LREQLSSVSS	FERFEIFPKT
	81	SSWPNHDSNK	GVTAACPHAG	AKSFYKNLIW	LVKKNGSYPN	LSKSYINDKG	KEVLVLWGIH	HPSTSADQQS	LYQNADAYVF
	161	VGSSRYSKKF	KPEIAIRPKV	RDQEGRMNYY	WTLVEPGDKI	TFEATGNLVV	PRYAFAMERN	AGSGIIISDT	PVHDGPGPDQ
	241	VDVKDCANHE	IKKVLVPGCH	GSEPCIIHRG	KPFQLEAVFE	ANQNTKTAKI	EIKASIDGLE	VDVPGIDPNA	CHYMKCPLVK
	321	GQQYDIKYTW	NVPKIAPKSE	NVVVTVKVMG	DDGVLACAIA	THAKIRDHHH	HHH		
M3 H1sD2	1	EAEPMGVAPL	HLGKCNIAIW	ILGNPECESL	STASSWSYIV	ETSSSDNGTC	YPGDFIDYEE	LREQLSSVSS	FERFEIFPKT
	81	SSWPNHSSNK	GVTAACPHAG	AKSFYKNLIW	LVKKNGSYPK	LSKSYINDKG	KEVLVLWGIH	HPSTSADQQS	LYQNADAYVF
	161	VGSSRYSKKF	KPEIAIRPKV	RDQEGRMNYY	WTLVEPGDKI	TFEATGNLVV	PRYAFAMERN	AGSGIIISDT	PVHDGPGPDQ
	241	VDVKDCANHE	IKKVLVPGCH	GSEPCIIHRG	KPFQLEAVFE	ANQNTKTAKI	EIKASIDGLE	VDVPGIDPNA	CHYMKCPLVK
	321	GQQYDIKYTW	NVPKIAPKSE	NVVVTVKVMG	DDGVLACAIA	THAKIRDHHH	HHH		
M4 H1sD2	1	EAEPMGVAPL	HLGKCNIAIW	ILGNPECESL	STASSWSYIV	ETSSSDNGTC	YPGDFIDYEE	LREQLSSVSS	FERFEIFPKT
	81	SSWPNHSSNK	GVTAACPHAG	AKSFYKNLIW	LVKKNGSYPN	LSKSYINDKG	KEVLVLWGIH	HPSTSADQQS	LYQNADAYVF
	161	VGSSRYSKKF	KPEIAIRPKV	RDQEGRMNYY	WTLVEPGDKI	TFEATGNLVV	PRYAFAMERN	AGSGIIISDT	PVHDGPGPDQ
	241	VDVKDCANHE	IKKVLVPGCH	GSEPCIIHRG	KPFQLEAVFE	ANQNTKTAKI	EIKASIDGLE	VDVPGIDPNA	CHYMKCPLVK
	321	GQQYDIKYTW	NVPKIAPKSE	NVVVTVKVMG	DDGVLACAIA	THAKIRDHHH	HHH		

Slika 25: Mape pokrivenosti aminokiselinskih sekvenci proteina Der p 2 i H1sD2. Plavom bojom su naznačeni aminokiselinski ostaci u okviru peptida koji su potvrđeni sa visokom pouzdanošću. Pretpostavlja se da aminokiselinski ostaci EAEF na N-terminusu potiču od pPicZa-A plazmida.

4.3.2. Analiza glikopeptida

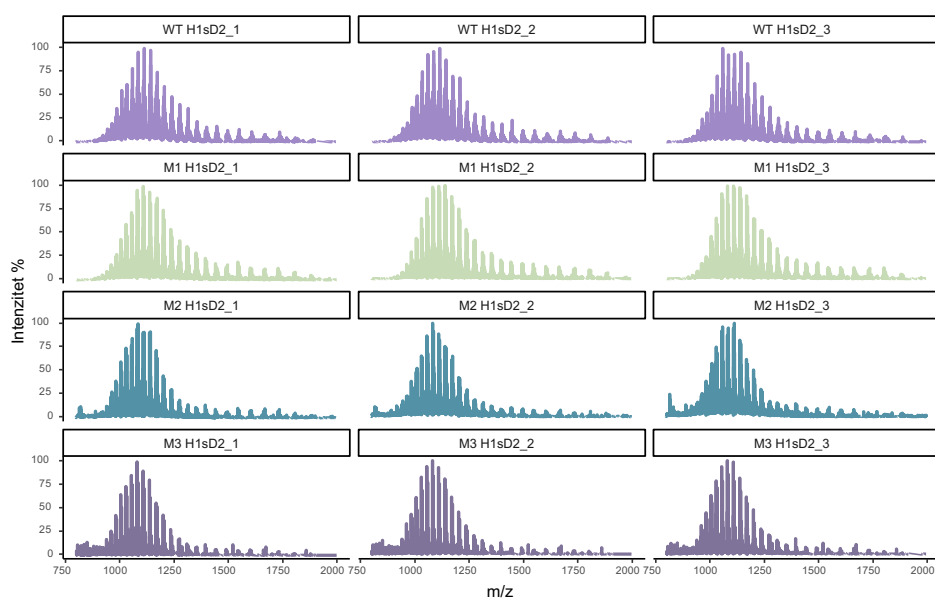
Nakon što su potvrđene sekvence proteina, urađena je analiza glikopeptida, kako bi se potvrdilo da li su sva uvedena N-glikozilaciona mesta uspešno glikozilovana. Analiza obogaćenih glikopeptida pokazala je da N-glikozilaciono mesto na poziciji 43 koje je prisutno u svim H1sD2 glikoproteinima uspešno glikozilovano. Takođe, uspešno je potvrđena glikozilacija i ostalih glikozilacionih mesta koja su uvedena u M1, M2 i M3 H1sD2 glikoformi. Što se tiče M4 glikoforme koja poseduje 4 uvedena N-glikozilaciona mesta, sa sigurnošću je potvrđena glikozilacija N43 i N81 mesta. Peptid koji sadrži preostala dva glikozilaciona mesta, N111 i N116, takođe je potvrđen kao glikozilovan, ali nije potvrđeno da dolazi do istovremene glikozilacije na oba mesta. Mogući razlog je taj, da zbog sternih smetnji nije bilo moguće za *P. pastoris* da uvede glikane na oba mesta. U Tabeli 9 su prikazani glikopeptidi, kao i broj manoznih jedinica koje su potvrđene u okviru identifikovanih glikana.

Tabela 9: Analiza glikopeptida H1sD2 glikoproteina; Cisteinski ostaci su alkilovali i prikazani su narandžastom bojom, dok su očekivana N-glikozilaciona mesta prikazana plavom bojom. Man – manaza; AsnX – pozicija Asn.

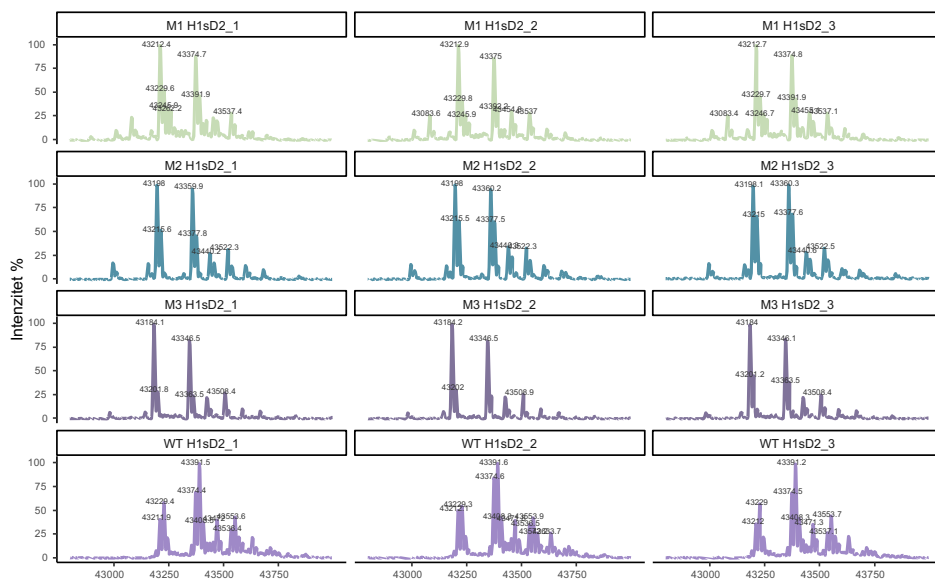
Protein	AsnX	Sekvenca peptida	Broj manoznih ostataka
WT H1sD2	Asn43	TSSSDNGT C YPGDFIDYEE	Man9-Man12 (Man10)
M1 H1sD2	Asn43	TSSSDNGT C YPGDFIDYEE	Man8-Man12 (Man9)
	Asn111	NGSY P KLSK	Man10-Man15 (Man11)
M2 H1sD2	Asn43	TSSSDNGT C YPGDFIDYEE	Man8-Man14 (Man10)
	Asn116	KGNSYP N LSK	Man10-Man14 (Man12)
M3 H1sD2	Asn43	TSSSDNGT C YPGDFIDYEE	Man8-Man13 (Man9)
	Asn81	TSSWP N HSSNK	Man9-Man13 (Man10)
M4 H1sD2	Asn43	TSSSDNGT C YPGDFIDYEE	Man9-Man12 (Man10)
	Asn111 ili	NGSY P N LSK	Man8-Man14 (Man11)
	Asn116	K N GSYP N LSK	Man10-Man15 (Man11)
	Asn81	TSSWP N HSSNK	Man9-Man11 (Man10)

4.3.3. Analiza masa intaktnih H1sD2 glikoproteina

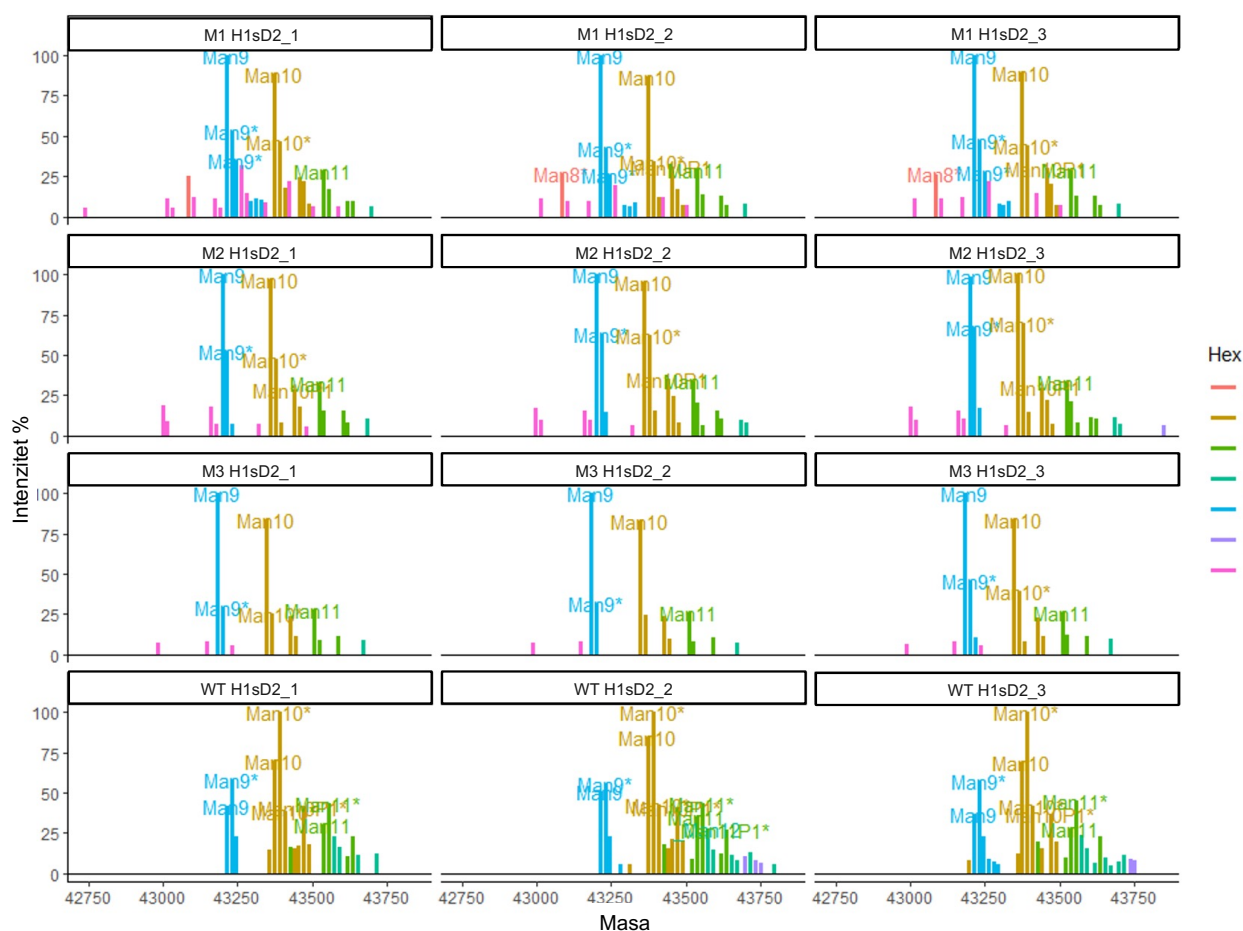
Rasoljeni uzorci rekombinantno proizvedenih i prečišćenih glikoproteina su analizirani masenom spektrometrijom radi utvrđivanja njihove intaktne mase. Analiza WT, M1, M2 i M3 intaktnih masa je bila uspešna. Pokazano je da je samo jedno glikozilaciono mesto zauzeto u detektovanim M1, M2 i M3 H1sD2 glikoproteinima. Analiza M4 H1sD2 rezultirala je vrlo heterogenim spektrom intaktnog proteina, koji nije mogao biti uspešno određen. Sirovi i dekonvoluirani maseni spektri za WT, M1, M2 i M3 su prikazani na Slikama 26 do 28.



Slika 26: Prosečni MS spektri intaktnih masa. Spektri su dalje obrađeni pomoću UniDec programa. Svaki protein je analiziran u triplicatu.

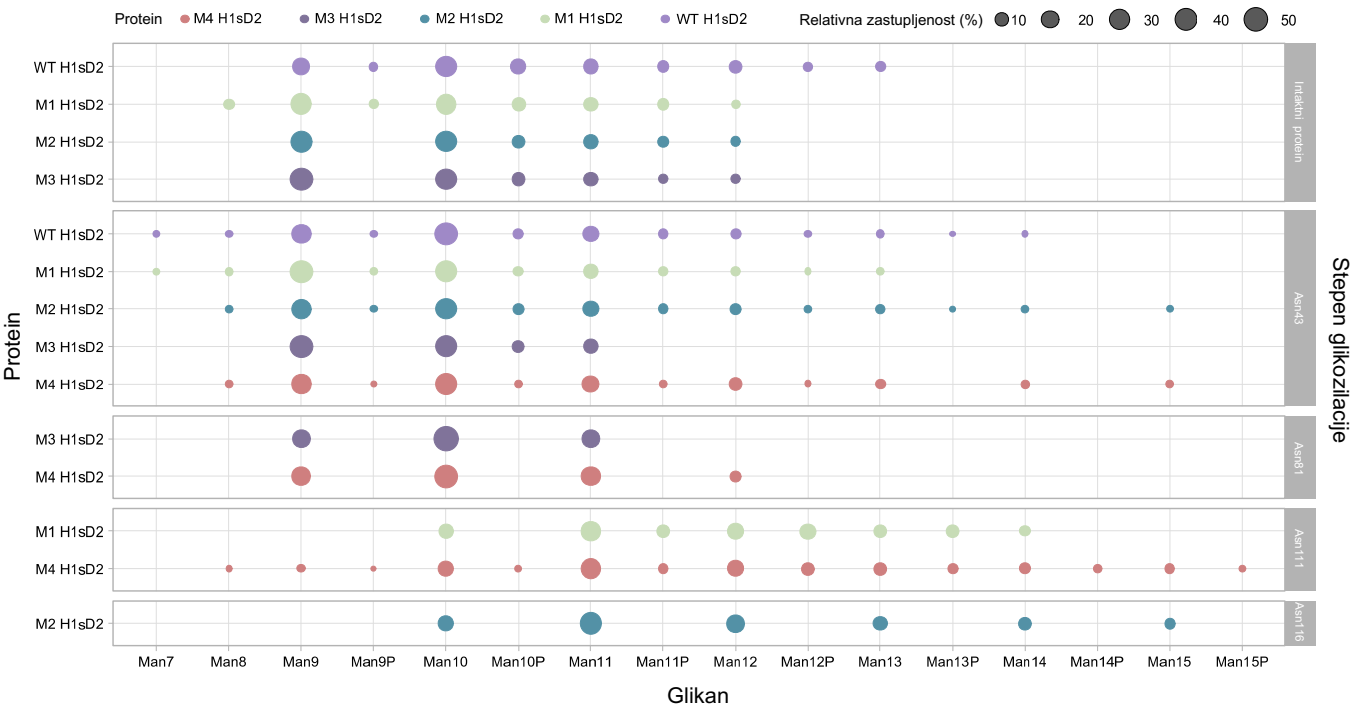


Slika 27: Dekonvoluisani MS spektri.



Slika 28: Anotacija dekonvoluisanih MS spektara. Prikazani su nazivi glikana prisutnih u najintenzivnijim pikovima. Boje pikova ukazuju na broj detektovanih ostataka manoze u anotiranim glikoformama. Pikovi obojeni roze bojom nisu anotirani. * označava adukt formiran u izvoru jonizacije ili oksidovani oblik molekula.

Svi dobijeni rezultati nakon masene analize su sumirani na Slici 29, koja daje pregled relativne zauzetosti glikana na različitim glikopeptidima, kao i na nivou intaktnih proteina za WT, M1, M2, M3 i M4 H1sD2 glikoproteine.



Slika 29: Relativna zauzetost N-glikanskih mesta u H1sD2 glikoproteinima. Dužina glikana prikazana je na x-osi, a pozicija N-glikana u svakom od H1sD2 glikoproteina na y-osi. Prvi panel sumira analizu masa intaktnog proteina, dok donji paneli prikazuju različita mesta glikozilacije (N43, N81, N111 i N116). Veličina kruga predstavlja relativnu zastupljenost glikana na specifičnom Asn ostatku ili intaktnom proteinu.

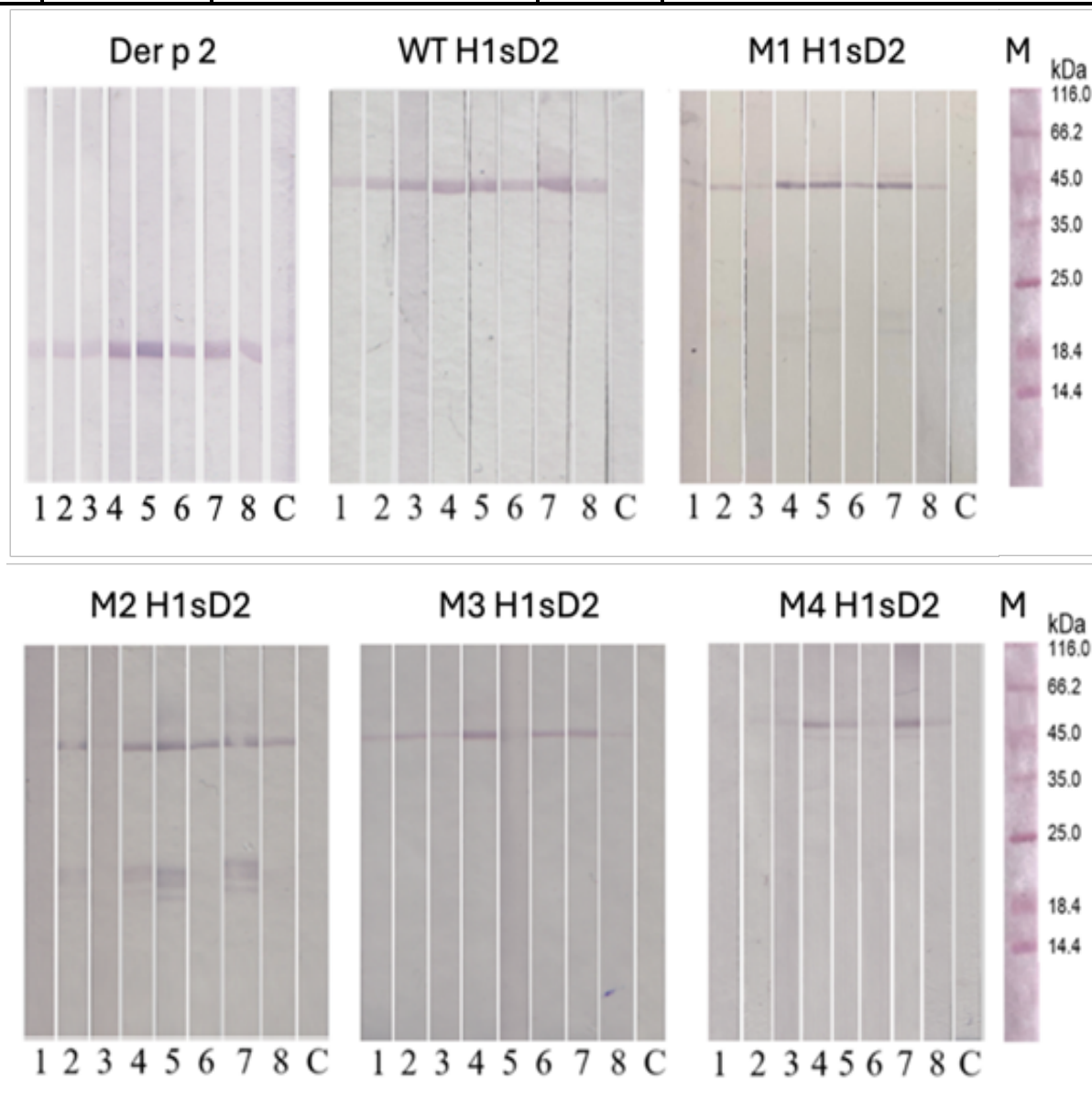
4.4. IgE reaktivnost Der p 2 i H1sD2 proteina

IgE reaktivnost Der p 2 i H1sD2 proteina je ispitana u imunoblotu korišćenjem seruma pacijenata koji su alergični na grinje kućne prašine (HDM). Karakteristike pacijenata koji su uključeni u ovu analizu su prikazane u Tabeli 10. Pozitivna reakcija između IgE antitela iz seruma i proteina ukazuje na to da je reaktivnost Der p 2 očuvana u svim H1sD2 uzorcima. Na osnovu intenziteta traka se može primetiti da pacijenti broj 4, 5 i 7 pokazuju najjaču IgE reaktivnost, dok je ta reaktivnost nešto slabija sa drugim uzorcima (Slika 30). Dobijeni rezultati su u korelaciji sa sIgE vrednostima dobijenim ImunoCAP merenjem.

Tabela 10: Kliničke karakteristike pacijenata koji su učestvovali u studiji

#	Pol	sIgE na HDM (kU/L)	Klasa	Simptomi
1.	Muški	d1: 0,43	<i>I</i>	Alergijski rinitis
2.	Muški	d1: 22,8	<i>IV</i>	Alergijski rinitis

3.	Ženski	d1: 11,1	<i>II</i>	Opstrukcija bronhijalnih puteva, astma
4.	Muški	d1: 0,56	<i>I</i>	Alergijski rinitis, astma
5.	Ženski	d1: 79,1	<i>V</i>	Alergijski rinitis, astma
6.	Ženski	d1: 54,7	<i>V</i>	Alergijski rinitis
7.	Muški	d1: 115,3	<i>VI</i>	Alergijski rinitis
8.	Muški	d1: 1,57	<i>II</i>	Alergijski rinitis

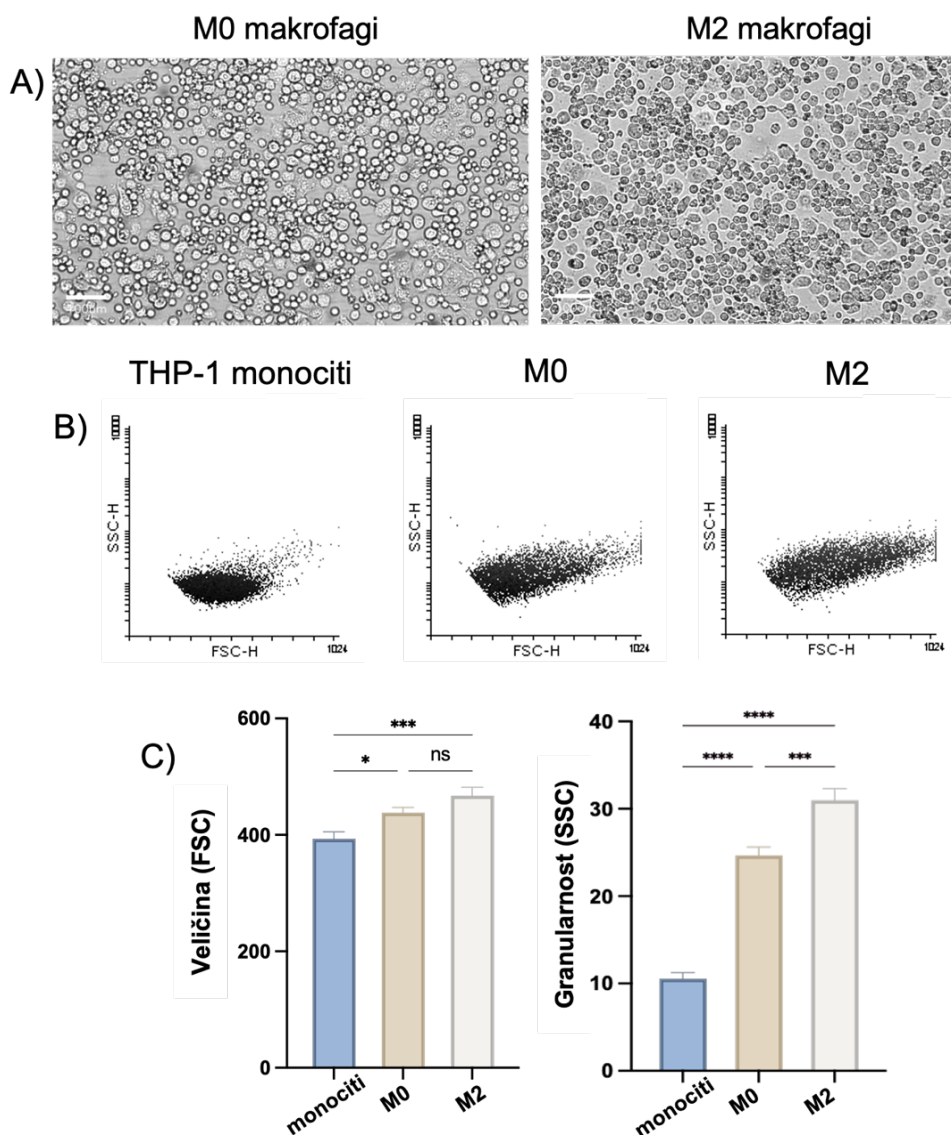


Slika 30: IgE reaktivnost Der p 2 i H1sD2 proteina određena sa serumima pacijenata alergičnih na grinje kućne prašine (1 do 8 – uzorci; C – kontrola sekundarnih antitela; M – proteinski markeri mase od 14,4 – 116 kDa (Thermo Fisher Scientific, SAD)).

4.5. Ispitivanje vezivanja H1sD2 glikoproteina za receptore na THP-1 makrofagima

4.5.1. Karakterizacija diferenciranih THP-1 makrofaga

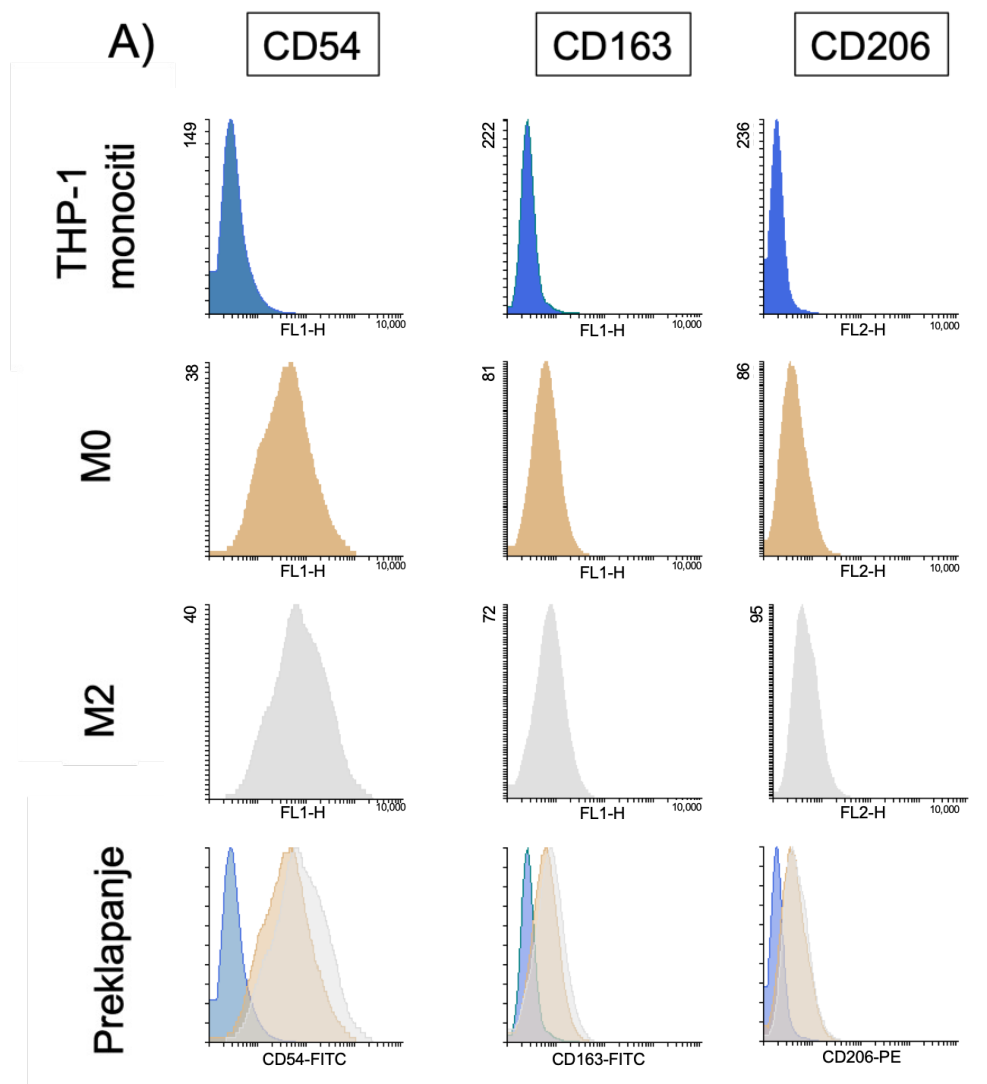
Ćelijska linija THP-1 predstavlja pogodan i pouzdan *in vitro* model za proučavanje odgovora monocita i makrofaga, pre svega zbog svoje sličnosti sa monocitima i makrofagima izvedenim iz perifernih mononuklearnih ćelija ljudske krvi (PBMC). Morfološke razlike između monocita i makrofaga diferenciranih iz THP-1 ćelija potvrđene su FACS analizom, poređenjem njihove veličine i granularnosti (Slika 31).

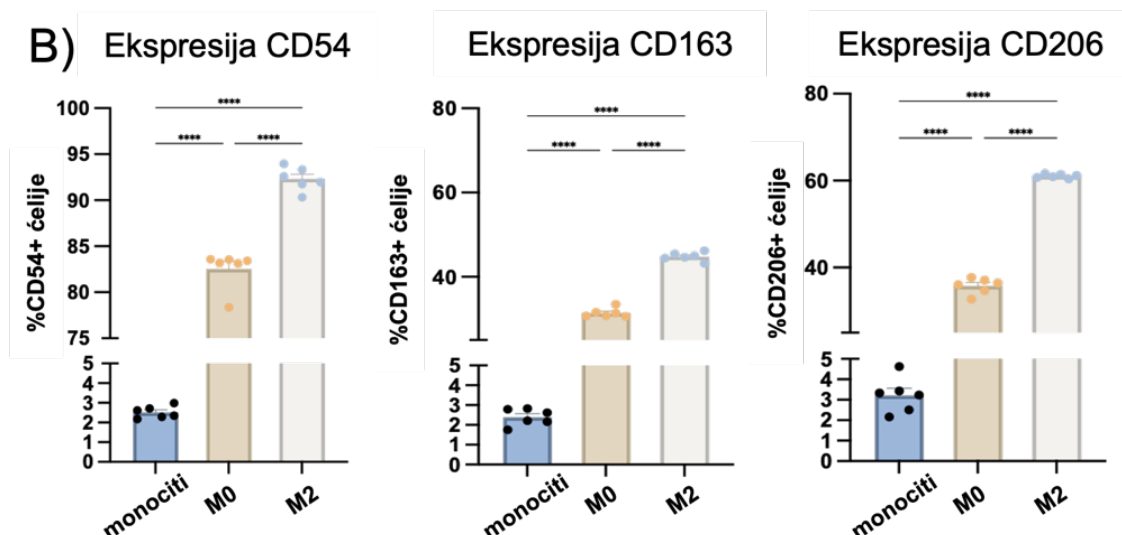


Slika 31: Analiza THP-1 monocita i diferenciranih M0 i M2 makrofaga protočnom citometrijom. A) Morfologija M0 i M2 makrofaga posmatrana pomoću MilliCell DCI (skala: 100 μ m); B) Dot plot grafici za THP-1 monocite, M0 i M2 makrofage; C) Razlike u veličini i granularnosti između monocita, M0 i M2 makrofaga. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta.

Statistička analiza izvedena je Bonferroni testom. Značajne razlike između grupa su označene sa: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Diferencijacija THP-1 monocita u M0 i M2 fenotip makrofaga, pored razlike u morfologiji, potvrđena je analizom ekspresije različitih površinskih markera CD206 (MR, manozni receptor), CD163 (receptor za preuzimanje visokog afiniteta) i CD54 (ICAM-1, međucelijski adhezioni molekul 1). Nivoi ekspresije ovih markera je praćen protočnom citometrijom, a na Slici 32 su prikazani histogrami i grafici sa dobijenim vrednostima pozitivnih ćelija.

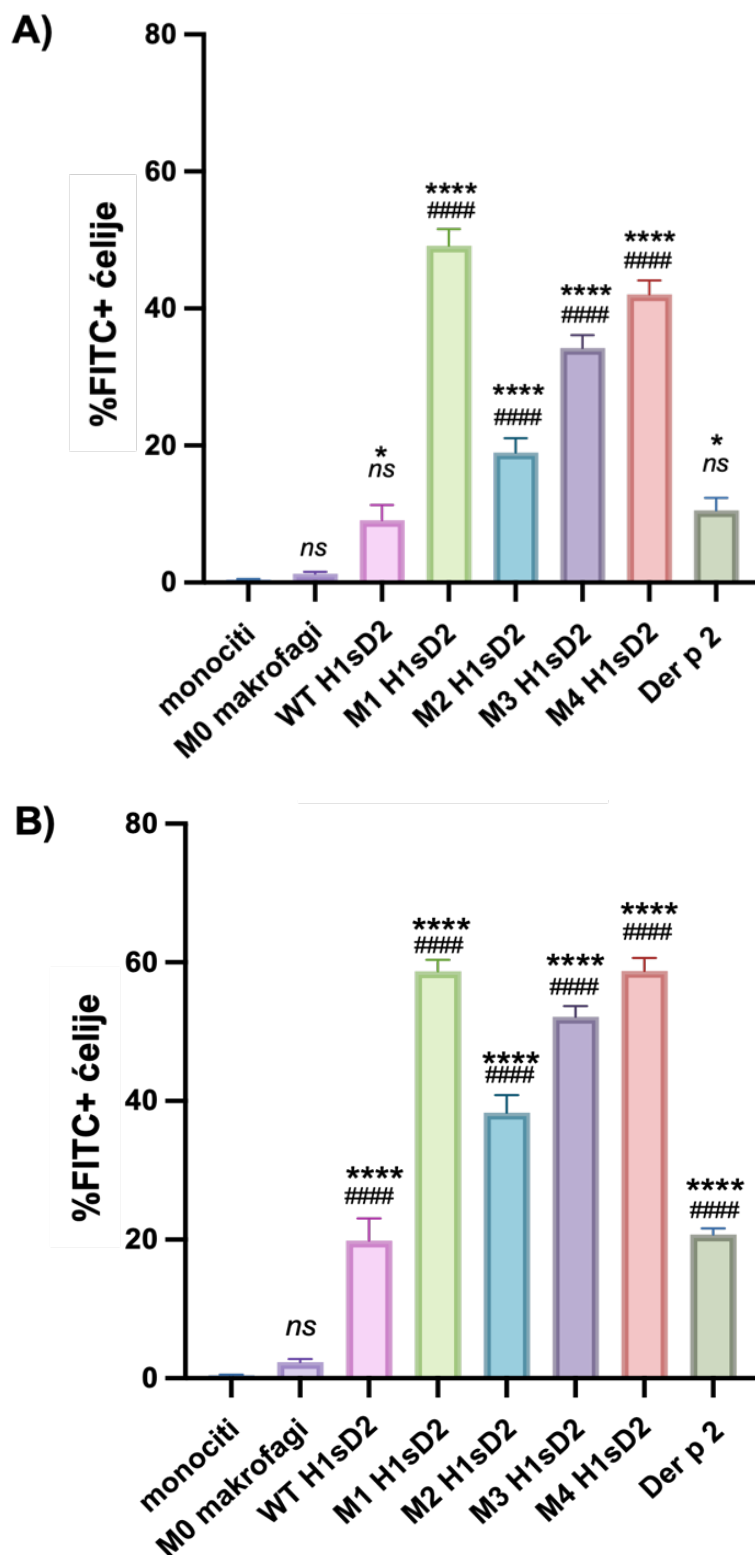




Slika 32: Analiza površinskih markera izraženih na THP-1 monocitima, M0 i M2 makrofagima. A) Histogrami za CD54, CD163 i CD206 površinske markere; B) Nivo ekspresije CD54, CD163 i CD206 površinskih markera. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatima ($n = 3$). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Statistička analiza odrađena je Bonferroni testom. Značajne razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.5.2. Vezivanje H1sD2 proteina za površinske receptore

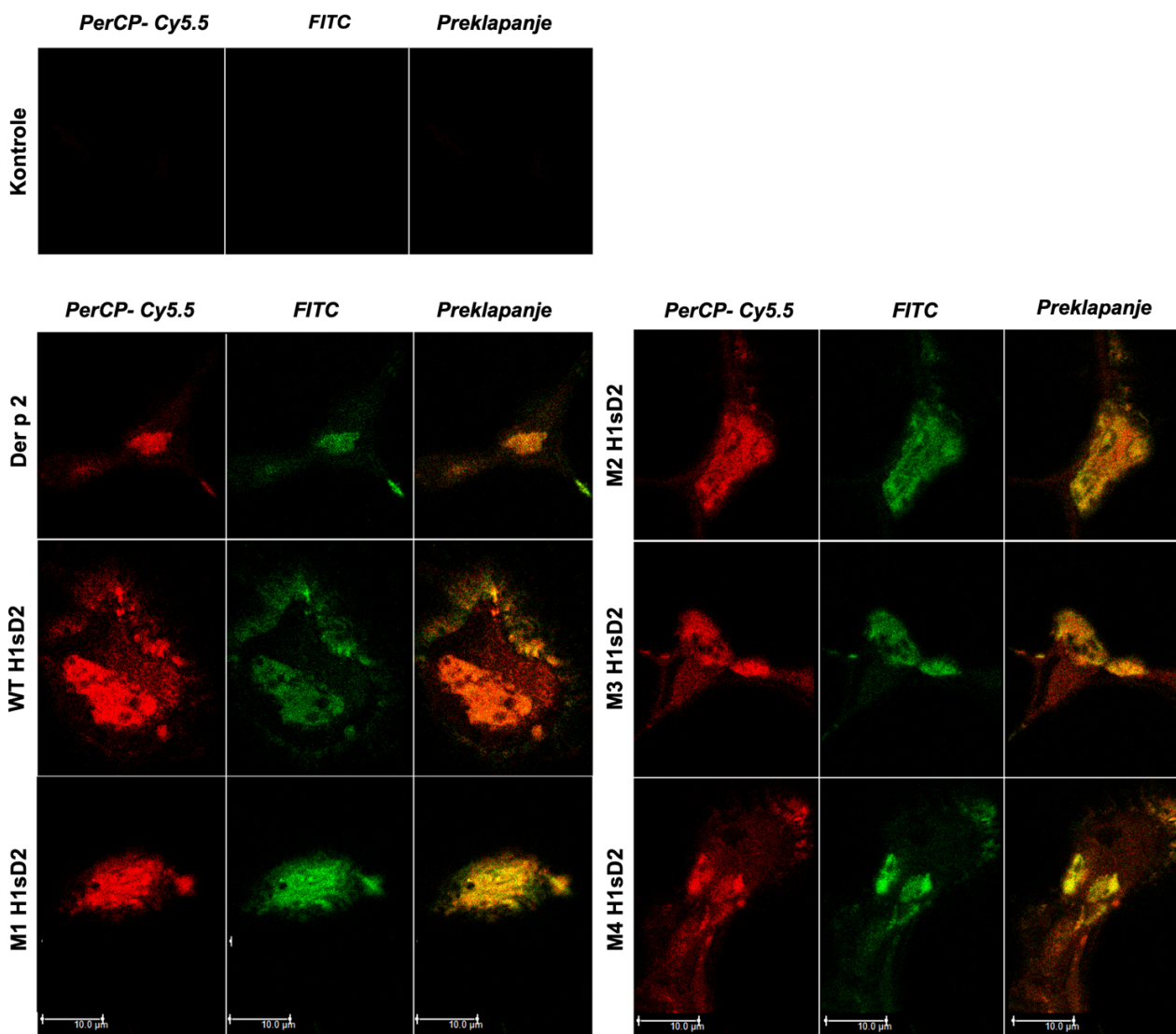
Suptilne razlike u vezivanju H1sD2 glikoproteina za površinu M0 i M2 diferenciranih makrofaga detektovane su protočnom citometrijom (Slika 33). Vezivanje glikoproteina bilo je slično za oba ćelijska fenotipa, a redosled povećanja procenta FITC-pozitivnih ćelija bio je sledeći: M2 H1sD2, M3 H1sD2, M4 H1sD2 i M1 H1sD2 (Slika 33). Vezivanje WT glikoproteina bilo je slično vezivanju alergena Der p 2. Veći procenat FITC-pozitivnih ćelija u M2 fenotipu u poređenju sa M0 može se objasniti povećanom površinskom ekspresijom različitih receptora koji vezuju manoze na M2 ćelijama.



Slika 33: Analiza protočnom citometrijom M0 (A) i M2 (B) makrofaga nakon tretmana sa H1sD2-FITC obeleženim proteinima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Statistička analiza urađena je primenom Bonferroni testa. Značajne statističke razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ u poređenju sa monocitima i # $p < 0,05$, ##### $p < 0,0001$ u poređenju sa M0/M2 makrofagima, ns - nije značajno.

4.5.3. Analiza vezivanja H1sD2 proteina za DC-SIGN receptor na površini M2 makrofaga

Kako bi se potvrdilo vezivanje H1sD2 glikoproteina za manozu-specifične PRRs, M2 makrofagi su inkubirani sa H1sD2-FITC glikoproteinima uz dodatak anti-DC-SIGN-PerCP-Cy5.5 antitela. Obojene ćelije su analizirane konfokalnom mikroskopijom. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se H1sD2 glikoproteini ukrašeni manoznim ostacima vezuju za M2 makrofage interakcijom sa manozu-specifičnim DC-SIGN receptorom (Slika 34).

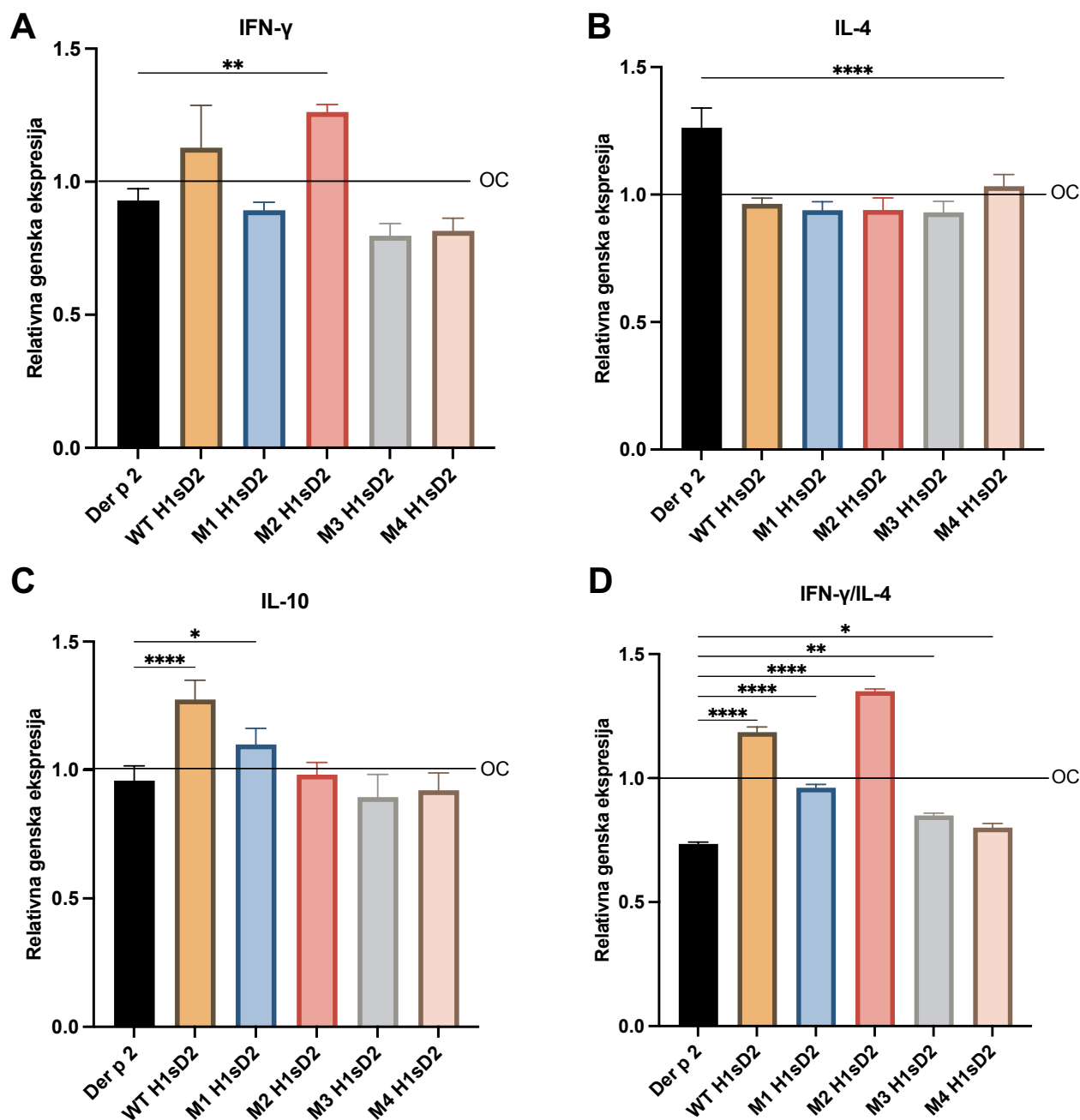


Slika 34: Analiza konfokalnom mikroskopijom dvostruko obeleženih M2 makrofaga sa H1sD2-FITC i anti-DC-SIGN antitelima. Crvenom bojom je prikazana lokalizacija DC-SIGN receptora korišćenjem anti-DC-SIGN-PerCP-Cy5.5 antitela, a zelenom bojom je prikazana lokalizacija H1sD2 glikoformi obeleženih FITC-om nakon vezivanja za površinske receptore na M2 makrofagima. Preklopljene slike ovih lokalizacija su prikazane u trećoj koloni. Sve slike su snimljene pri uvećanju objektiva od 64×, a skala prikazuje 10 μm.

4.6. Ispitivanje imunomodulatornog efekta H1sD2 glikoproteina

4.6.1. Analiza relativne genske ekspresije citokina nakon tretmana THP-1 makrofaga

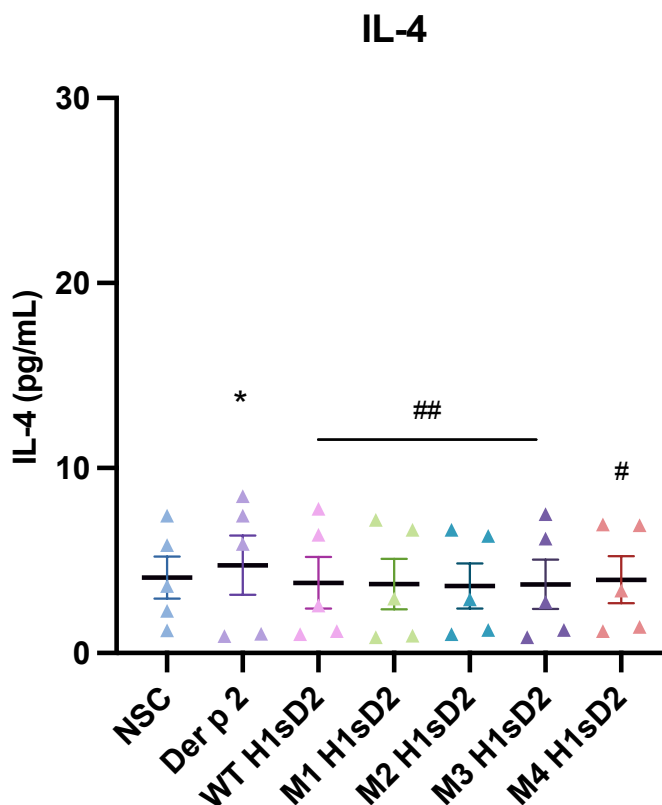
Relativna genska ekspresija proinflamatornih citokina IL-4 i IFN- γ , kao i antiinflamatornog citokina IL-10 je određena nakon 24-časovnog tretmana THP-1 makrofaga Der p 2 i H1sD2 antigenima u jednakim molarnim koncentracijama (200 nM). Nakon tretmana i analize genske ekspresije IL-4, jedini statistički značajan porast je primećen nakon tretmana sa Der p 2 antigenom (Slika 35). Najjača ekspresija gena za IFN- γ je uočena nakon tretmana antigenima M2 i WT. Ekspresija antiinflamatornog citokina IL-10 u THP-1 makrofagima je indukovana tretmanom ćelija antigenima WT i M1. Takođe, na slici je prikazan i odnos IFN- γ /IL-4, gde se može uočiti da se M2 H1sD2 glikoforma izdvaja kao najbolji kandidat za AIT. Ovi rezultati su dobijeni nakon jednom izvedenog eksperimenta.



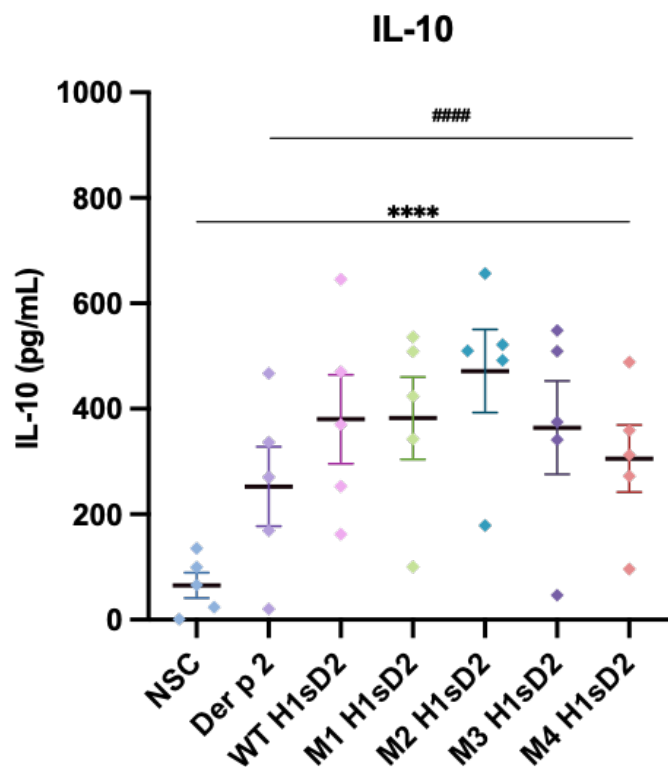
Slika 35: Relativna genska ekspresija citokina nakon tretmana THP-1 makrofaga Der p 2 i H1sD2 antigenima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost duplikata $\pm$ SEM nakon jednom izvedenog eksperimenta. Statistička analiza urađena je primenom Bonferroni testa. Značajne statističke razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ i **** $p < 0,0001$ u poređenju sa ćelijama tretiranim sa Der p 2.

4.6.2. Tretman H1sD2 glikoproteinima indukuje proinflamatorni citokinski profil kod PBMCs osoba alergičnih na grinje kućne prašine

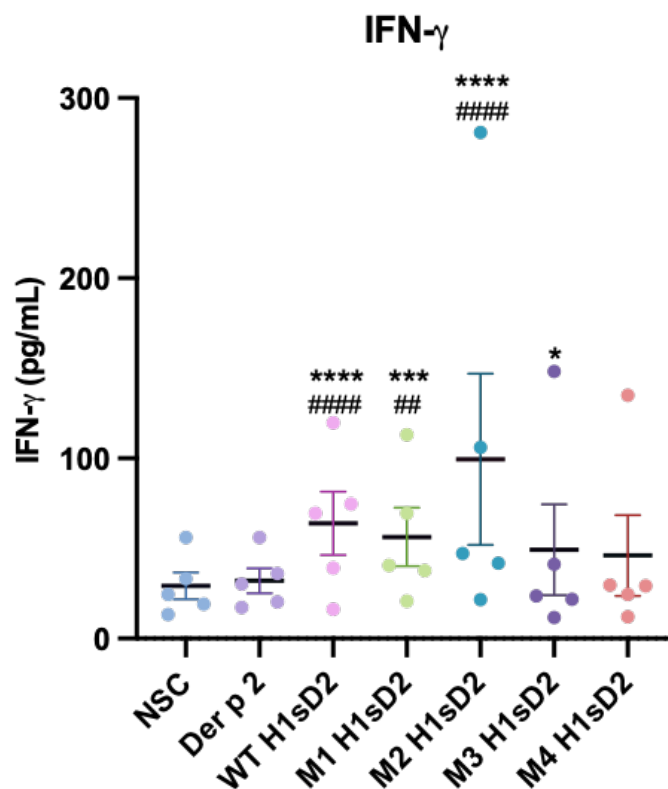
Kako bi se dodatno ispitao imunomodulatorni potencijal H1sD2 glikoproteina, korišćeni su PBMC donirani od strane pet osoba alergičnih na HDM (Tabela 10, uzorci 1, 3, 4, 5 i 8). PBMC su izolovani iz pune krvi donora i nakon tretmana koji je trajao 48 sati sa H1sD2 proteinima izmerena je koncentracija sekretovanih IL-4, IL-10 i IFN- γ citokina u sendvič ELISA. Nivo sekretovanog IL-4 nakon tretmana je bio nizak kod svih uzoraka. Statistički značajan rezultat u odnosu na nestimulisane ćelije (NSC) je dobijen nakon tretmana sa Der p 2 (Slika 36). Za razliku od nivoa IL-4 sekrecije, nivo IL-10 sekretovanih citokina je statistički značajan kod svih glikoproteina u poređenju sa NSC i ćelijama tretiranim sa Der p 2 (Slika 37). Ovaj rezultat ukazuje na imunomodulatorni potencijal ovih proteina. Takođe, nivo sekrecije IFN- γ i odnos IFN- γ /IL-4 bili su statistički značajni za WT, M1 i M2 H1sD2 glikoproteine u poređenju sa NSC i Der p 2 (Slike 38 i 39). Povećanje sekrecije IFN- γ , zajedno sa višim odnosom IFN- γ /IL-4, ukazuje na preusmeravanje imunskog odgovora sa Th2 ka Th1 tipu, što dodatno potvrđuje imunomodulatorni potencijal ovih glikoproteina.



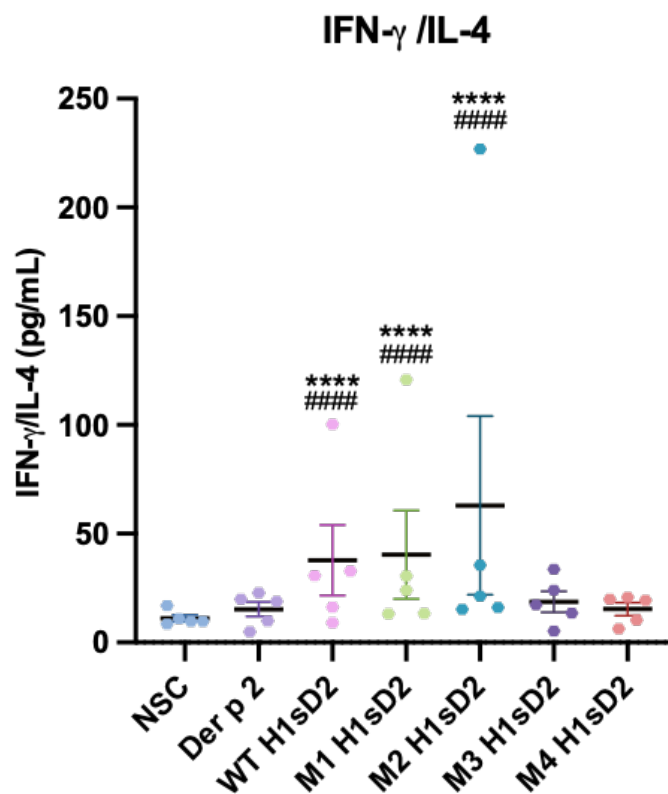
Slika 36: Sekrecija IL-4 nakon stimulacije PBMC sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. PBMC su izolovane iz krvi alergičnih volontera i tretirani 48 sati sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. Dva biološka replikata svakog uzorka analizirana su u duplikatu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Razlike su analizirane dvostepenim ANOVA testom korišćenjem Bonferroni testa. Značajne statističke razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$ u poređenju sa NSC i # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ u poređenju sa Der p 2.



Slika 37: Sekrecija IL-10 nakon stimulacije PBMC sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. PBMC su izolovane iz krvi alergičnih volontera i tretirani 48 sati sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. Dva biološka replikata svakog uzorka analizirana su u duplikatu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Razlike su analizirane dvostepenim ANOVA testom korišćenjem Bonferroni testa. Značajne statističke razlike između grupa označene su sa: **** $p < 0,0001$ u poređenju sa NSC i ##### $p < 0,0001$ u poređenju sa Der p 2.



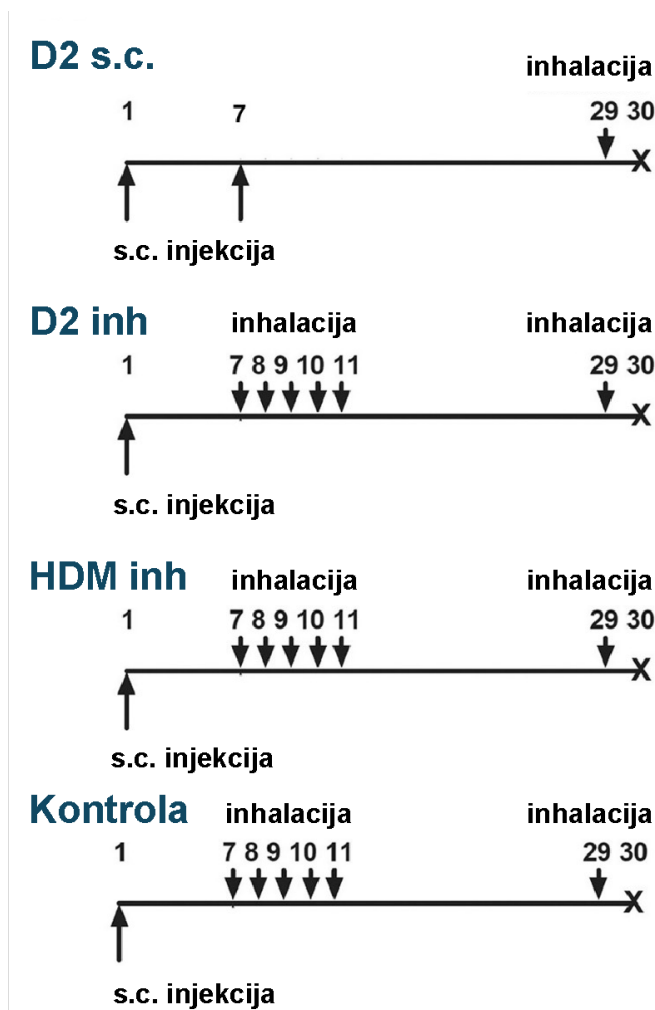
Slika 38: Sekrecija IFN- γ nakon stimulacije PBMC sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. PBMC su izolovani iz krvi alergičnih volontera i tretirani 48 sati sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. Dva biološka replikata svakog uzorka analizirana su u duplikatu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Razlike su analizirane dvostepenim ANOVA testom korišćenjem Bonferroni testa. Značajne statističke razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ u poređenju sa NSC i ## $p < 0,01$, ##### $p < 0,0001$ u poređenju sa Der p 2.



Slika 39: Odnos IFN- γ /IL-4 nakon stimulacije PBMC-ova sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. PBMC su izolovani iz krvi alergičnih volontera i tretirani 48 sati sa Der p 2 i H1sD2 glikoproteinima. Dva biološka replikata svakog uzorka analizirana su u duplikatu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Razlike su analizirane dvostepenim ANOVA testom korišćenjem Bonferroni testa. Značajne statističke razlike između grupa označene su sa **** $p < 0,0001$ u poređenju sa NSC i #### $p < 0,0001$ u poređenju sa Der p 2.

4.7. Razvoj protokola imunizacije kod C57BL/6 i BALB/c miševa

In vivo životinjski modeli mogu pružiti dragocene informacije o mehanizmu patogenezi alergijske astme, a genetska predispozicija i fenotip miševa mogu uticati na imunski odgovor. Kako bi analizirali imunski odgovor na Der p 2 i ekstrakt HDM alergena korišćeni su BALB/c i C57BL/6 miševi kao model sistemi koji su ispitivani nakon injekcije i inhalacije ovih antigena. U ovom istraživanju upoređivan je efekat tri različita protokola imunizacije, kako bi se ispitaio uticaj genotipa BALB/c i C57BL/6 soja miševa na rane faze indukcije astme izazvane Der p 2 alergenom (Slika 40).

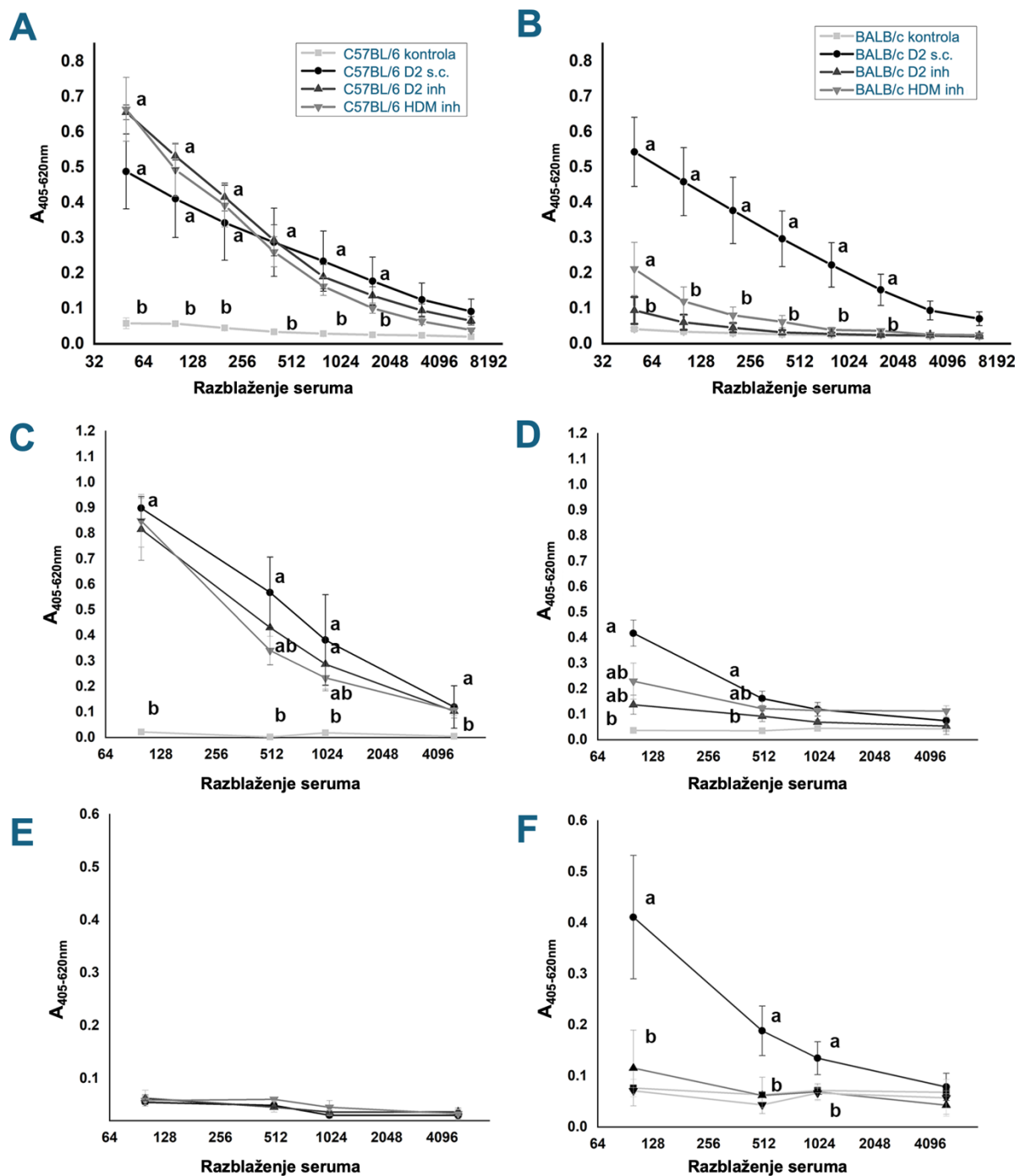


Slika 40: Šema imunizacije C57BL/6 i BALB/c miševa.

4.7.1. Analiza nivoa specifičnih antitela

Nivo specifičnih antitela na Der p 2 antigen izmeren je direktnim ELISA testom. Kao što je prikazano na Slikama 41A i 41C, C57BL/6 miševi su imali povećane nivoe IgG i IgG1 antitela u D2 s.c. grupi, kao i u D2 inh i HDM inh grupama, dok specifični IgG2a nije bio detektovan (Slika 41E). Ovi rezultati ukazuju na indukciju dominantnog Th2 imunskog odgovora, što je u skladu sa prirodnom tendencijom alergena iz kućne prašine da stimuliraju humoralni imunitet.

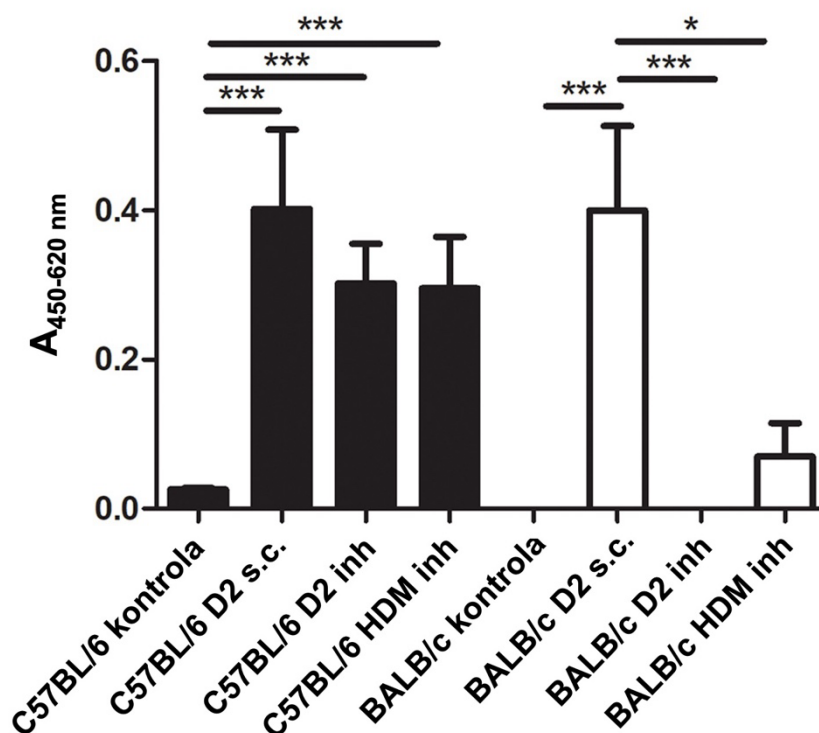
S druge strane, BALB/c miševi su pokazali povećan nivo specifičnog IgG prvenstveno u D2 s.c. grupi (Slika 41B). Iako je nivo specifičnog IgG1 bio najviši u D2 s.c. grupi, porast je zabeležen i u HDM inh grupi (Slika 41D). Takođe, D2 s.c. grupa je imala povećane nivoe IgG2a (Slika 41F).



Slika 41: Nivoi serumskih IgG antitela specifičnih za Der p 2 u različito tretiranim grupama miševa. Titracija vezivanja (A) IgG, (C) IgG1 i (E) IgG2a za Der p 2 kod C57BL/6 miševa, kao i (B) IgG, (D) IgG1 i (F) IgG2a kod BALB/c miševa. Signal u eksperimentalnim grupama poreden je sa kontrolnom grupom, pri čemu su značajno različite vrednosti ($p < 0,05$) označene različitim slovima. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$) i *** ($p < 0,0005$). Eksperimentalne grupe su se sastojale od po 10 miševa, a prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SD. Kontrola – netretirani miševi; D2 s.c. – dva

puta subkutano injektovani Der p 2; D2 inh – subkutano injektovani Der p 2 i inhalirani Der p 2; HDM inh – subkutano injektovani Der p 2 i inhalirani HDM ekstrakt.

Pored analize IgG antitela, ispitivan je i nivo specifičnog IgE u serumu imunizovanih miševa. Rezultati prikazani na Slici 42 pokazuju da su C57BL/6 miševi imali detektabilne nivoe IgE antitela u sve tri eksperimentalne grupe, što ukazuje na izraženu tendenciju ovog soja ka razvoju Th2-orijentisanog imunskog odgovora bez obzira na protokol imunizacije. Nasuprot tome, kod BALB/c miševa specifični IgE je bio prisutan isključivo u grupi imunizovanoj Der p 2 antigenom putem subkutane aplikacije (D2 s.c.), dok u ostalim grupama IgE nije bio detektovan. Ovakvi rezultati sugerišu da kod BALB/c miševa aktivacija Th2 tipa imunskog odgovora i produkcija IgE zahteva specifične uslove stimulacije, dok je kod C57BL/6 miševa IgE odgovor lakše indukovati. Ove razlike između sojeva dodatno potvrđuju njihovu inherentnu predispoziciju za razvoj različitih oblika imunskog odgovora nakon izlaganja alergenima.



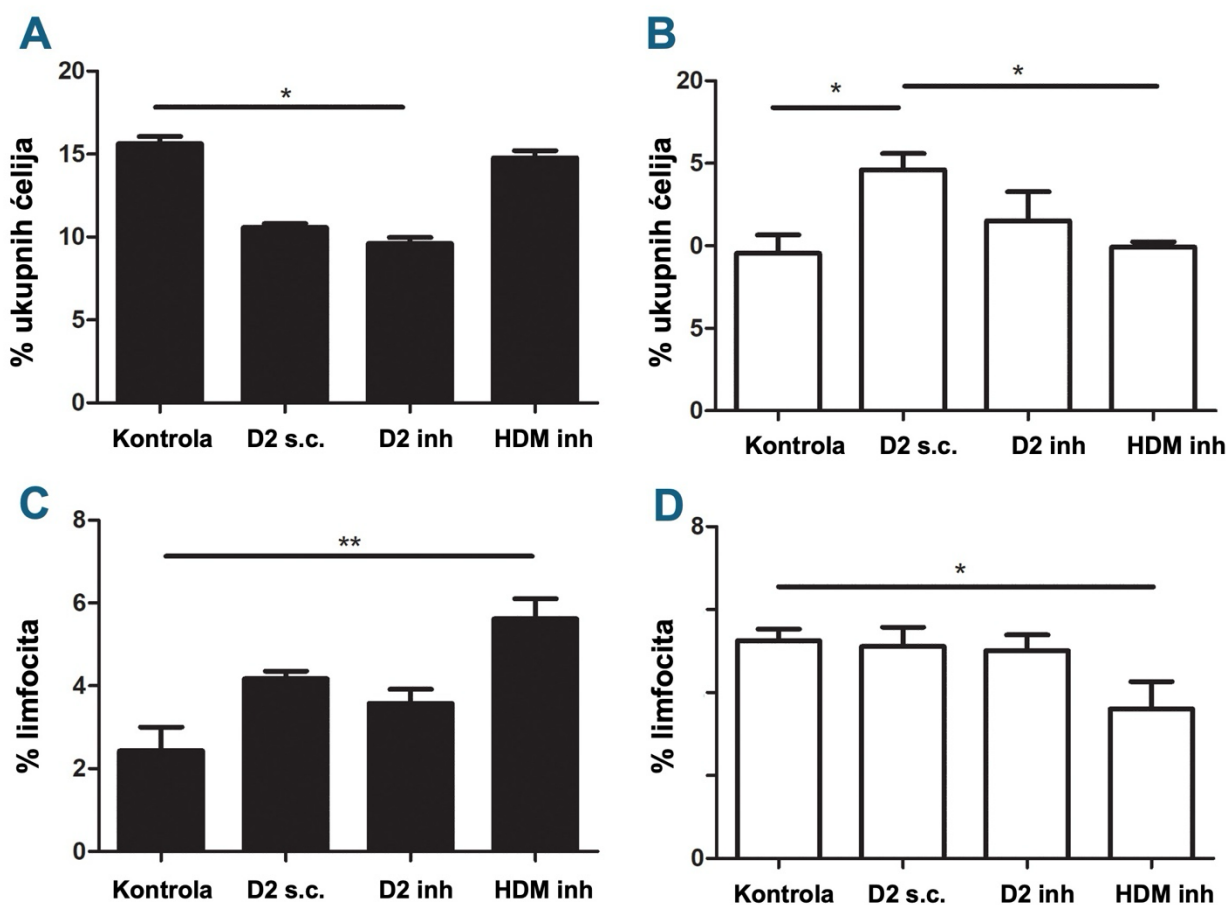
Slika 42: Poređenje reaktivnosti IgE pri petostrukom razblaženju seruma u različitim sojevima i grupama laboratorijskih miševa. Crne kolone predstavljaju C57BL/6 miševe, a bele kolone BALB/c miševe. Statistički značajne razlike označene su sa * ($p < 0,05$) i *** ($p < 0,0005$). Eksperimentalne grupe su se sastojale od po 10 miševa, a prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SD. Kontrola – netretirani miševi; D2 s.c. – dva puta subkutano injektovani Der p 2; D2 inh – subkutano injektovani Der p 2 i inhalirani Der p 2; HDM inh – subkutano injektovani Der p 2 i inhalirani HDM ekstrakt.

4.7.2. Procena prisustva leukocita u plućima

Analiza leukocita u plućima pokazala je razlike između BALB/c i C57BL/6 sojeva. CD11b⁺ marker označava mijeloidne leukocite, kao što su monociti, makrofagi, neutrofili i dendritske ćelije. U plućima, ove ćelije imaju ključnu ulogu u odgovoru na infekciju i upalu. Kod C57BL/6 miševa

(Slika 43A) u kontrolnoj grupi je u homogenatu pluća bilo oko 15% CD11b⁺ ćelija, što je zabeleženo i u HDM inh grupi. Nasuprot tome, u D2 s.c. i D2 inh grupama izmereni su niži nivoi CD11b⁺ ćelija, pri čemu je samo u D2 inh grupi ovo smanjenje bilo statistički značajno. Sa druge strane, BALB/c miševi su imali niže početne nivoe CD11b⁺ ćelija u odnosu na C57BL/6, od oko 10%, pri čemu je značajan porast na približno 15% uočen samo u D2 s.c. grupi (Slika 43B).

Analizom prisustva CD3⁺CD8⁺ limfocita u plućima ponovo su dobijeni različiti rezultati za dva soja miševa. Kod C57BL/6 miševa, kontrolna grupa imala je relativno nizak nivo CD3⁺CD8⁺ limfocita, dok je u HDM inh grupi zabeležen značajan porast (Slika 43C). Nasuprot tome, kod BALB/c miševa kontrolna grupa je imala viši početni nivo CD3⁺CD8⁺ ćelija, dok je njihov broj bio smanjen samo u HDM inh grupi (Slika 43D). Udeo ukupnih CD3⁺ ćelija pratio je isti trend u različitim eksperimentalnim grupama kao i udeo CD3⁺CD8⁺ ćelija kod oba soja miševa.



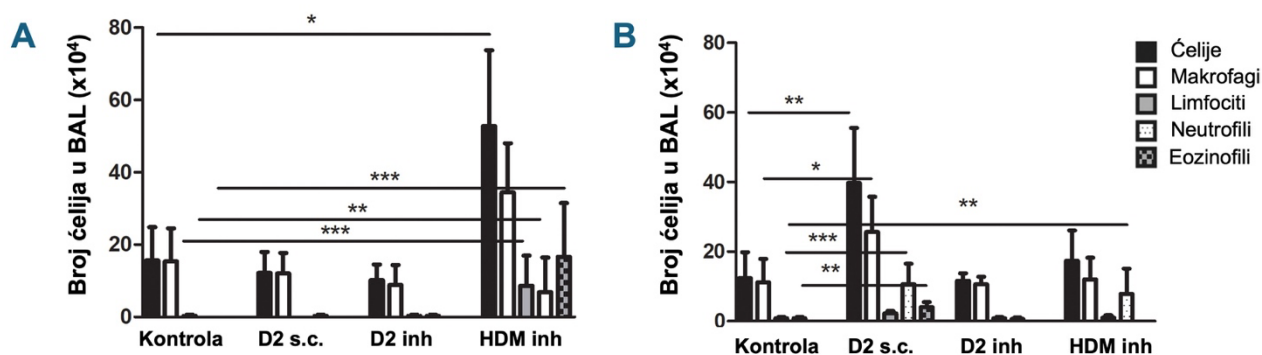
Slika 43: Analiza ćelija plućnog tkiva protočnom citometrijom. Procenat CD11b⁺ ćelija u ukupnim ćelijama pluća: (A) C57BL/6 miševi i (B) BALB/c miševi. Procenat CD3⁺CD8⁺ limfocita u plućima (limfocitna populacija): (C) C57BL/6 miševi; (D) BALB/c miševi. Eksperimentalne grupe su se sastojale od po 4 miša, a prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SD. Kontrola – netretirani miševi; D2 s.c. – miševi dva puta subkutano injektovani Der p 2; D2 inh – subkutano injektovani Der p 2 i inhalirani Der p 2; HDM inh – subkutano injektovani Der p 2 i inhalirani HDM ekstrakt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

4.7.3. Eozinofili i neutrofil i u bronhoalveolarnom lavažu (BALF)

Analiza prisustva eozinofila i neutrofila u BALF omogućava procenu upalne reakcije u plućima nakon različitih tretmana. Rezultati ukazuju na razlike između eksperimentalnih grupa i sojeva miševa i reflektuju različit imunski odgovor u zavisnosti od alergena i protokola imunizacije.

Izlaganje BALB/c i C57BL/6 miševa alergenu dovelo je do promena u ćelijskim populacijama bronhoalveolarnog lavaža u određenim eksperimentalnim grupama. Kao što je prikazano na Slici 44A, kod C57BL/6 miševa značajno veći broj ćelija detektovan je u HDM inh grupi u poređenju sa kontrolnom grupom. Značajne razlike su primećene kod svih analiziranih tipova ćelija, osim makrofaga. Ova grupa je takođe bila jedina sa izraženom eozinofilijom.

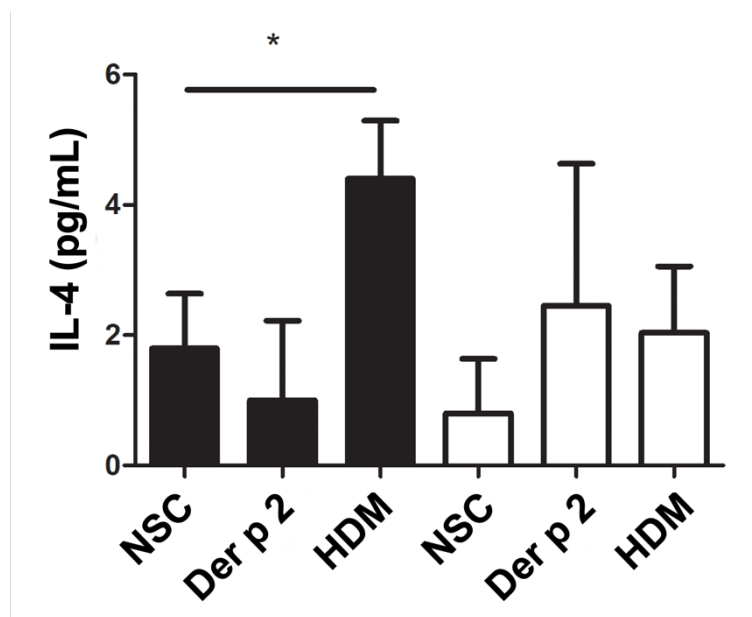
Kod BALB/c miševa (Slika 44B), značajno povećanje broja ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom uočeno je samo u D2 s.c. grupi, pri čemu je zabeležen i porast broja makrofaga, neutrofila i, u manjoj meri, eozinofila. Takođe, povećanje broja neutrofila detektovano je i u HDM inh grupi BALB/c miševa (Slika 44B).



Slika 44: Mikroskopsko brojanje i analiza ćelija bronhoalveolarnog lavaža A) C57BL/6 i B) BALB/c miševa. Ćelije bronhoalveolarnog lavaža (BALF) obojene su May-Grünwald Giemsa metodom i analizirane mikroskopskim brojanjem. Prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SD ($n = 5$). Uporedna analiza između kontrolnih i tretiranih grupa, a značajni rezultati su označeni na sledeći način: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; * $p < 0,0005$.**

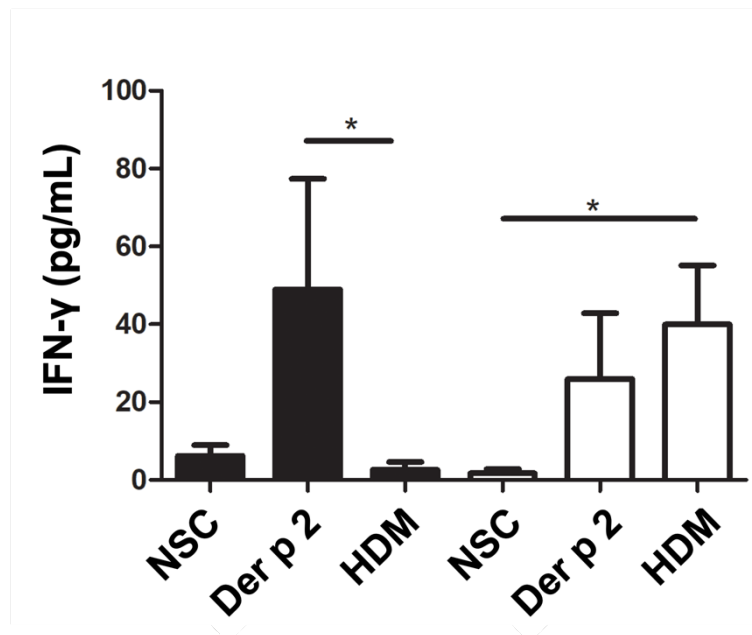
4.7.4. Određivanje nivoa sekretovanih citokina

Stimulacija splenocita sa Der p 2 i HDM ekstraktom takođe je pokazala razlike između dva soja miševa. Oba soja miševa su proizvela povećane nivoe IL-4 nakon stimulacije sa HDM ekstraktom (Slika 45), ali je ova razlika bila statistički značajna samo u C57BL/6 soju.



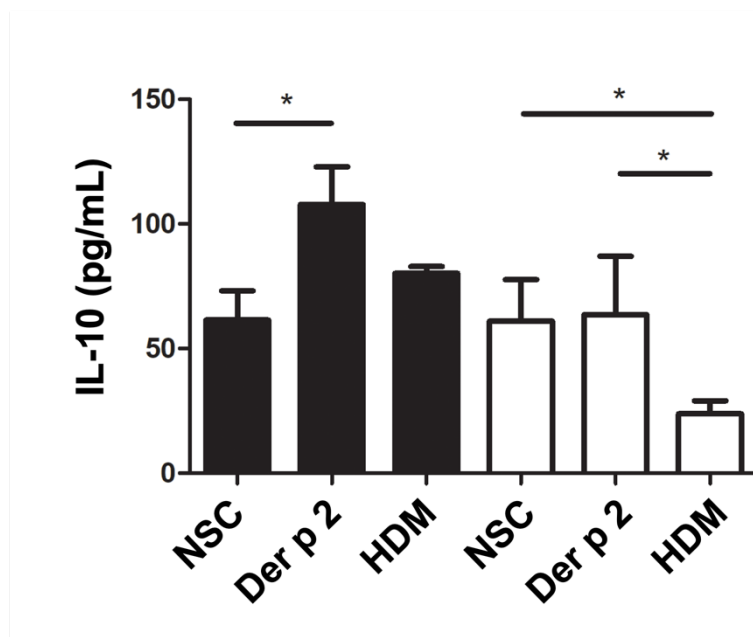
Slika 45: Analiza proizvodnje IL-4 iz splenocita C57BL/6 i BALB/c miševa nakon stimulacije. Splenociti su izolovani i inkubirani tokom 24 časa bez stimulacije (NSC) ili nakon stimulacije sa Der p 2 ili HDM ekstraktom. Čelijski supernatant je prikupljen, a citokini su mereni u ELISA. Prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SD, $n = 5$. Crni stubovi predstavljaju C57BL/6 miševe, a beli BALB/c miševe.

Sekrecija IFN- γ detektovana je samo kod C57BL/6 miševa nakon stimulacije sa Der p 2 alergenom, dok stimulacija sa HDM ekstraktom nije izazvala proizvodnju ovog citokina. BALB/c miševi su proizvodili IFN- γ nakon stimulacije i sa Der p 2 i sa HDM ekstraktom (Slika 46).



Slika 46: Analiza proizvodnje IFN- γ iz splenocita C57BL/6 i BALB/c miševa nakon stimulacije. Splenociti su izolovani i inkubirani tokom 24 časa bez stimulacije (NS) ili nakon stimulacije sa Der p 2 ili HDM ekstraktom. Supernatant bez ćelija je prikupljen, a citokini su mereni u ELISA. Prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SD, $n = 5$. Crni stubovi predstavljaju C57BL/6 miševe, a beli BALB/c miševe.

Stimulacija splenocita BALB/c miševa sa Der p 2 nije imala uticaja na produkciju IL-10, dok je stimulacija HDM ekstraktom dovela do smanjenja IL-10 (Slika 47). S druge strane, C57BL/6 miševi su pokazali povećanu sekreciju IL-10 nakon stimulacije sa Der p 2, dok stimulacija HDM ekstraktom nije dovela do značajne promenu u proizvodnji ovog citokina.

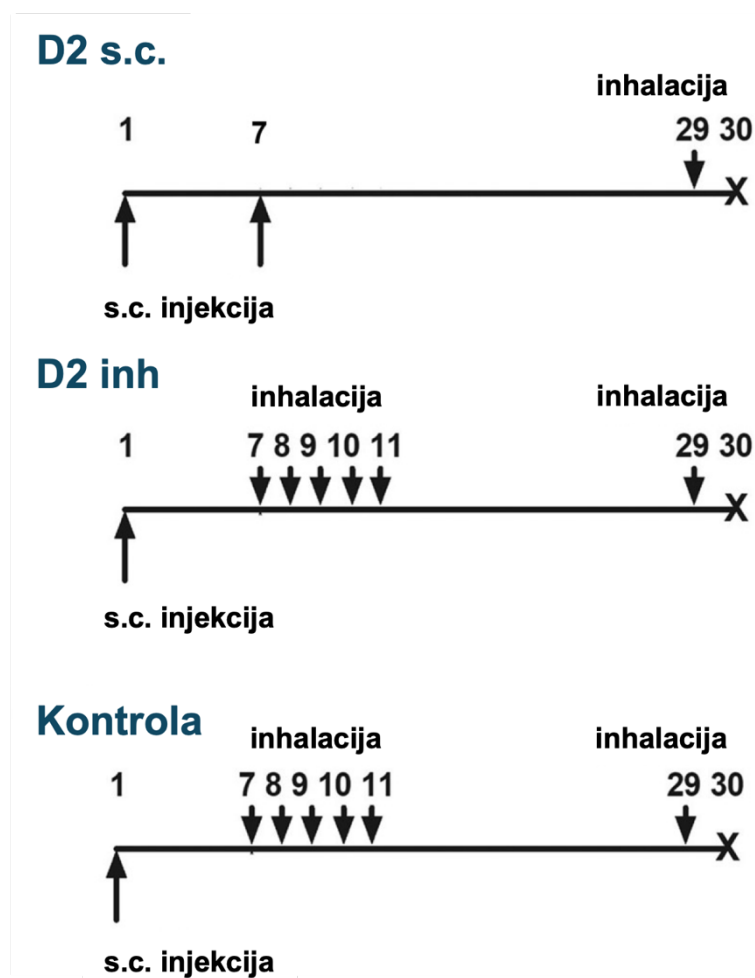


Slika 47: Analiza proizvodnje IL-10 iz splenocita C57BL/6 i BALB/c miševa nakon stimulacije. Splenociti su izolovani i inkubirani tokom 24 časa bez stimulacije (NS) ili nakon stimulacije sa Der p 2 ili HDM ekstraktom. Čelijski supernatant je prikupljen, a citokini su mereni u ELISA. Prikazane su srednje vrednosti $\pm$ SD, n = 5. Crni stubovi predstavljaju C57BL/6 miševe, a beli BALB/c miševe.

4.7.5. Analiza citokina nakon tretmana mišjih splenocita Der p 2 alergenom i H1sD2 glikoproteinima

Kako bi se ispitao imunomodulatorni uticaj H1sD2 glikoproteina na proizvodnju različitih citokina korišćeni su mišji splenociti izolovani nakon imunizacije miševa sa Der p 2 alergenom. Slezina je važan organ u imunološkom sistemu, jer sadrži različite vrste ćelija, kod laboratorijskih miševa prvenstveno T i B limfocite, ali i makrofage i dendritske ćelije, koje učestvuju u imunskom odgovoru. Analizom splenocita može se bolje razumeti kako imunski sistem reaguje na alergene, kao i na koji način određeni terapeutici mogu da utiču na imunski sistem.

Za ove analize C57BL/6 i BALB/c sojevi miševa su imunizovani subkutano (s.c.) ili inhalatornim putem (inh), a kontrolna grupa su bili miševi imunizovani samo PBS-om. Šema imunizacije je prikazana na Slici 48.



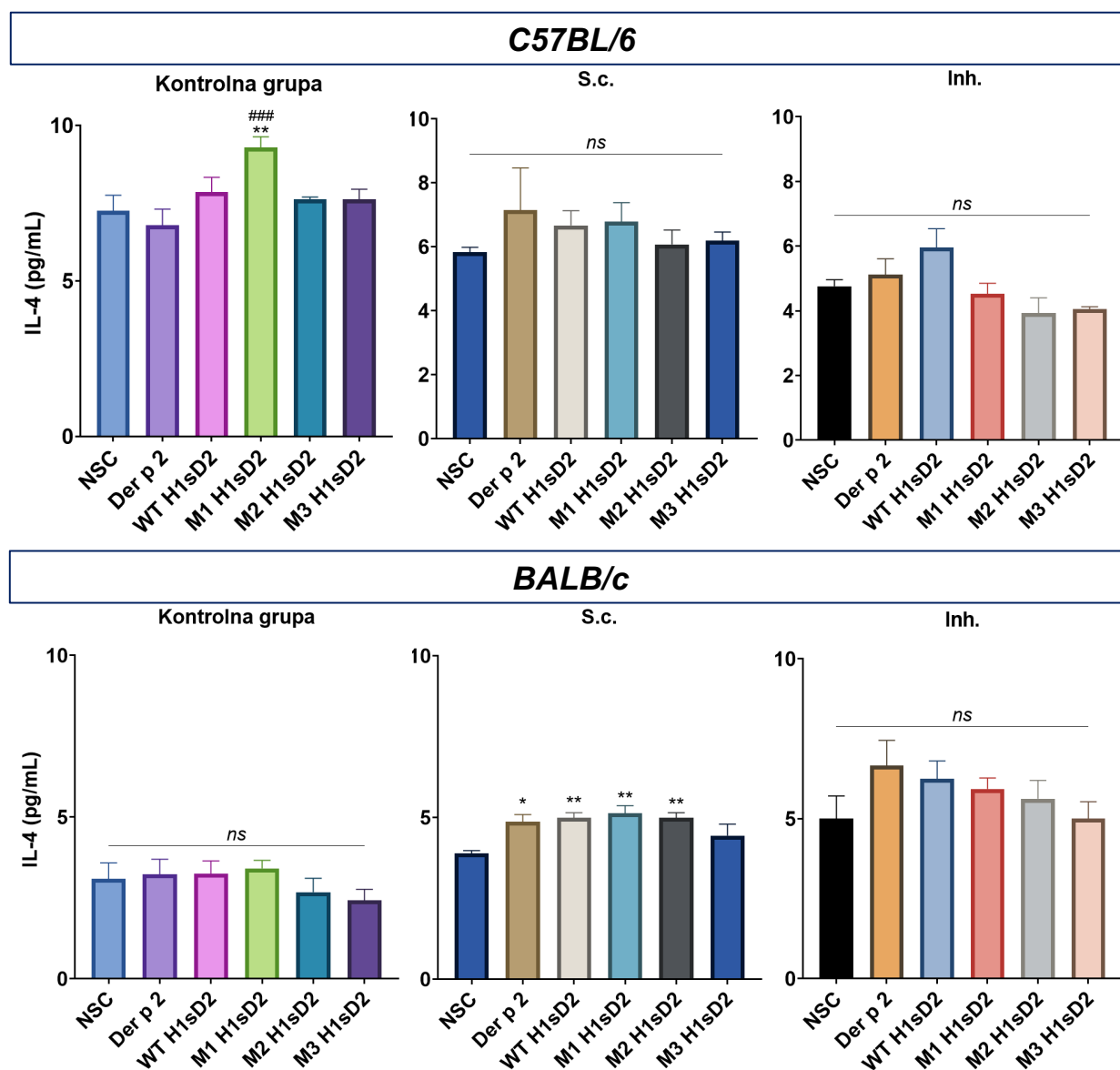
Slika 48: Šema imunizacije C57BL/6 i BALB/c miševa Der p 2 alergenom koji je proizveden u *P. pastoris*.

Nakon imunizacije miševa, izolovani su splenociti i tretirani Der p 2 alergenom i H1sD2 glikoproteinima u istim molskim koncentracijama. Nakon 48 sati tretmana, supernatanti su sakupljeni i korišćeni za analiziranje nivoa ekspresije IL-4, IL-10 i IFN- γ u sendvič ELISA.

4.7.5.1. Analiza nivoa sekretovanog IL-4

Kod C57BL/6 miševa u kontrolnoj grupi jedino je M1 glikoforma izazvala značajno povećanje nivoa IL-4 u poređenju sa netretiranom grupom i grupom koja je tretirana Der p 2 alergenom, dok ostali proteini nisu pokazali statistički značajne razlike, kako u kontrolnoj grupi, tako i grupama koje su imunizovane subkutano i inhalatorno (Slika 49).

Kod BALB/c miševa u kontrolnoj grupi, kao i u grupi koja je imunizovana inhalatorno, nakon tretmana nije došlo do značajnih razlika u ekspresiji IL-4, dok su u s.c. grupi D2, WT, M1 i M2 pokazali statistički značajno povećanje nivoa IL-4 u poređenju sa NSC (Slika 49).

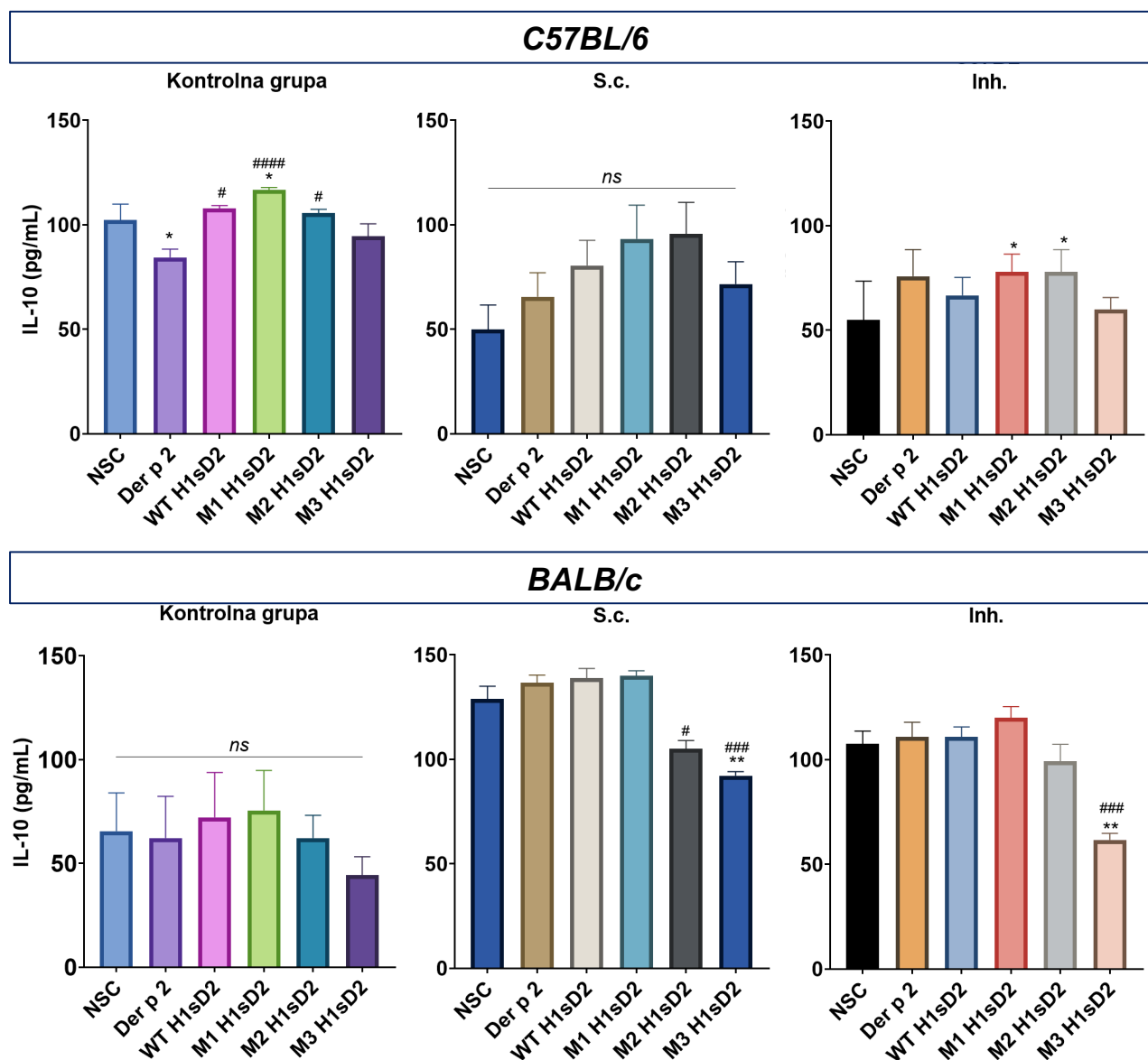


Slika 49: Analiza nivoa ekspresije IL-4 u različitim eksperimentalnim grupama kod C57BL/6 i BALB/c miševa, pod različitim tretmanima (kontrolna grupa, subkutana (S.c.) aplikacija i inhalaciona (Inh.) aplikacija). Razlike su analizirane ANOVA testom (Kruskal-Wallis test). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Značajne razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u poređenju sa NSC i ### $p < 0,001$ u poređenju sa Der p 2; ns- nije značajno.

4.7.5.2. Analiza nivoa sekretovanog IL-10

Analiza produkcije IL-10 citokina kod C57BL/6 miševa nakon stimulacije kontrolne grupe, pokazuje razlike u odgovoru ćelija tretiranih sa WT, M1 i M2 kroz značajno povećane nivoe IL-10 ($p < 0,05$, $p < 0,0001$) u poređenju sa Der p 2, pri čemu M1 grupa ima najizraženiji porast. U S.c. grupi nakon tretmana nivo IL-10 je svuda sličan, dok u Inh grupi M1 i M2 pokazuju značajno povećanje IL-10 ($p < 0,05$) u poređenju sa NSC, što ukazuje na potencijalni imunomodulatorni efekat inhalacione aplikacije u ovim grupama (Slika 50).

Kod BALB/c miševa nije došlo do značajne razlike u kontrolnoj grupi. Nakon subkutane i inhalatorne imunizacije, svi stimulatori izazivaju povišene nivoe IL-10, s tim da su nivoi kod M2 i M3 grupa nešto niži (Slika 50). Na osnovu rezultata, može se zaključiti da je C57BL/6 soj osetljiviji na imunomodulaciju u poređenju sa BALB/c sojem, posebno u kontekstu inhalacione aplikacije.



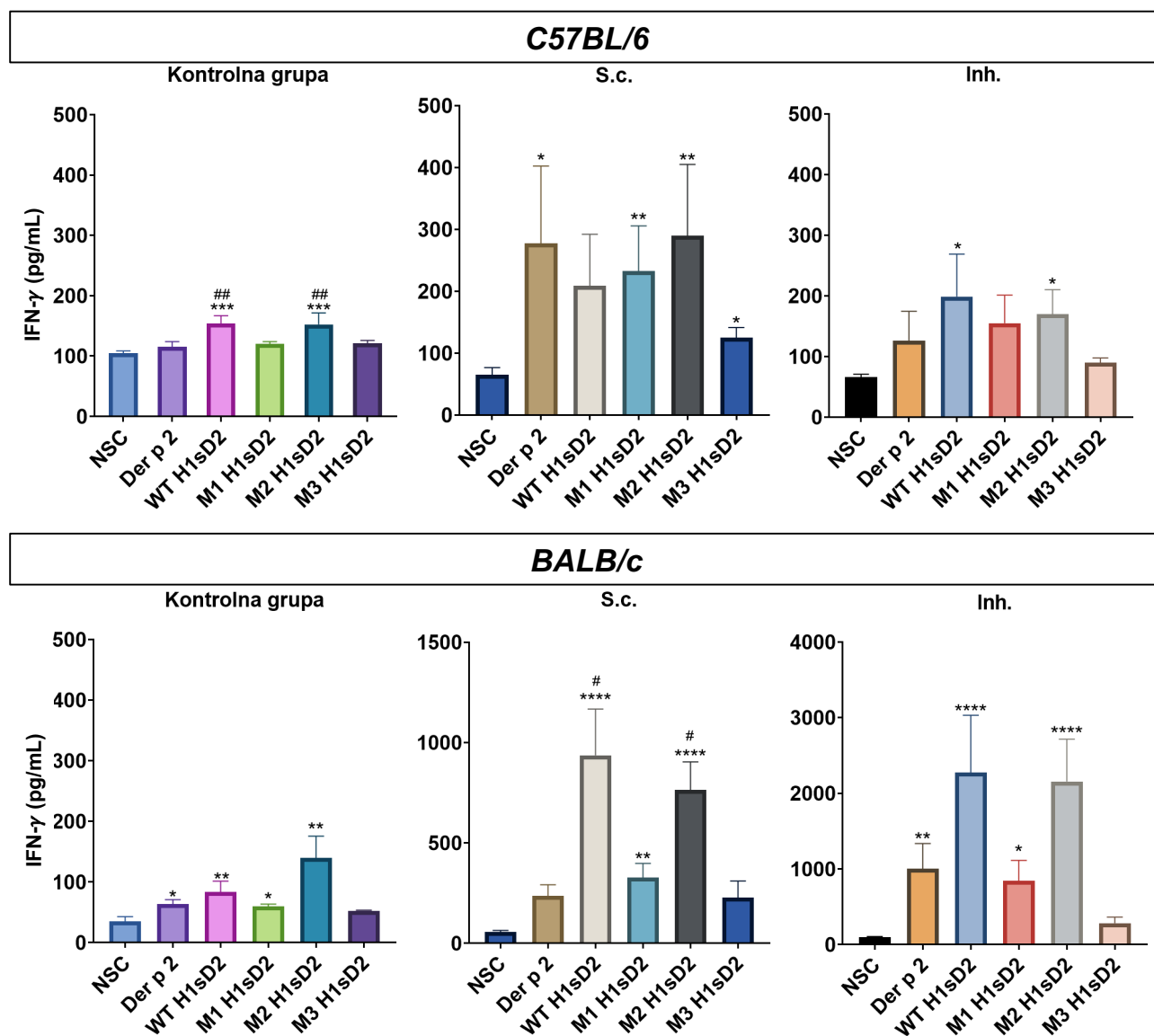
Slika 50: Analiza nivoa ekspresije IL-10 u različitim eksperimentalnim grupama kod C57BL/6 i BALB/c miševa, pod različitim tretmanima (kontrolna grupa, subkutana (S.c.) aplikacija i inhalaciona (Inh.) aplikacija). Razlike su analizirane ANOVA testom (Kruskal-Wallis test). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Značajne razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u poređenju sa NSC i # $p < 0,05$, #### $p < 0,0001$ u poređenju sa Der p 2; ns- nije značajno.

4.7.5.3. *Analiza nivoa sekretovanog IFN- γ*

Analizom IFN- γ , kod C57BL/6 miševa se može primetiti da u kontrolnoj grupi nakon tretmana s WT i M2 dolazi do statistički značajnog porasta nivoa IFN- γ u poređenju sa NSC (** $p < 0,001$) i D2 (## $p < 0,01$). Subkutana aplikacija povećava proizvodnju IFN- γ nakon stimulacije sa D2, M1 i M2, dok u Inh. grupi nakon tretmana nije došlo do statistički značajnih promena u nivoima IFN- γ .

Kod BALB/c miševa, u kontrolnoj grupi, dolazi do blagog povišenja IFN- γ nakon tretmana sa WT i M2 proteinima (** $p < 0,01$). Kod subkutane i inhalatorne imunizacije BALB/c miševa, nakon tretmana WT i M2 proteinima, dolazi do snažnog porasta IFN- γ , posebno u Inh grupi (**** $p < 0,0001$).

Iz ovih rezultata se može zaključiti da BALB/c miševi imaju znatno jači odgovor, posebno nakon inhalatorne imunizacije, gde IFN- γ dostiže vrednosti i preko 3000 pg/mL. Subkutana imunizacija izaziva visok porast nivoa IFN- γ u BALB/c miševima, posebno nakon tretmana WT i M2 H1sD2 proteinima. Ovi podaci sugerišu da je BALB/c soj skloniji jakom Th1 odgovoru, dok je C57BL/6 manje reaktivan na stimulanse u kontekstu IFN- γ produkcije.



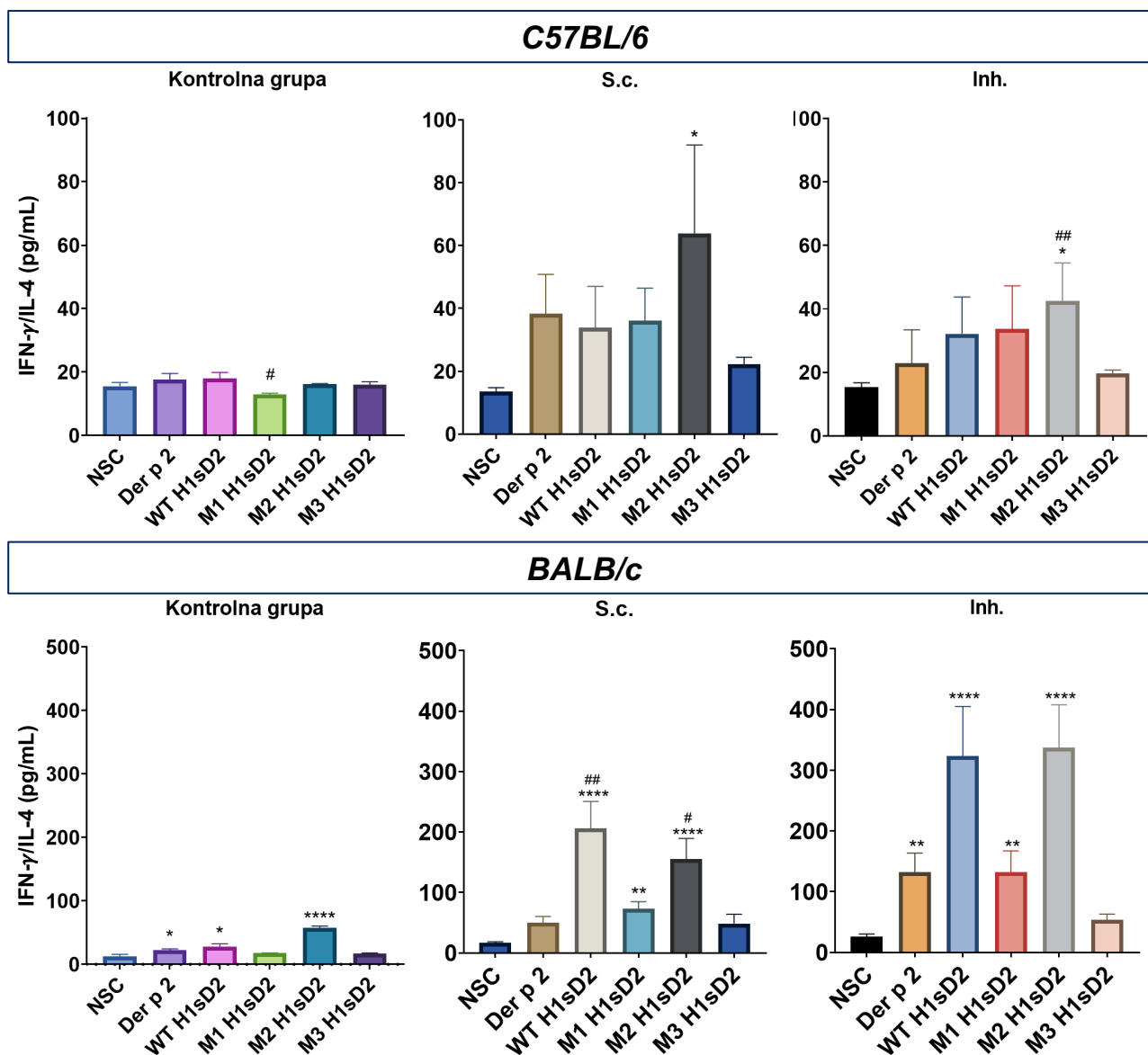
Slika 51: Analiza nivoa ekspresije IFN- γ u različitim eksperimentalnim grupama kod C57BL/6 i BALB/c miševa, pod različitim uslovima imunizacije (kontrolna grupa, subkutana (S.c.) aplikacija i inhalaciona (Inh.) aplikacija). Razlike su analizirane ANOVA testom (Kruskal-Wallis test). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Značajne razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ u poređenju sa NSC i # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ u poređenju sa Der p 2; ns- nije značajno.

4.7.5.4. Odnos nivoa sekretovanih IFN- γ /IL-4

Kako bismo procenili odnos Th1 i Th2 odgovora kod C57BL/6 i BALB/c miševa nakon različitih uslova imunizacije i tretmana, određivan je odnos IFN- γ i IL-4. Kao što se vidi na Slici 52, nivoi IFN- γ sekretovani nakon specifične stimulacije su generalno veći od nivoa IL-4, što pretpostavlja dominaciju Th1 odgovora. U kontrolnoj grupi kod C57BL/6 miševa, IFN- γ ostaje nizak, ali je ipak viši od IL-4, što potvrđuje prirodnu Th1 orijentaciju C57BL/6 miševa. Kod S.c. grupe nakon stimulacije, primećuje se porast odnosa IFN- γ /IL-4 nakon tretmana sa D2, WT, M1, a naročito M2, ukazujući na pojačan Th1 odgovor, statistički značajno nakon tretmana sa M2 glikoformom. U

grupi nakon Inh. imunizacije nivo IFN- γ ostaje nizak, bez značajnih razlika između grupa, osim nakon tretmana sa M2 glikoformom koja pokazuje značajnu razliku u poređenju sa NSC i D2.

Kod BALB/c miševa se primećuje još viši odnos IFN- γ /IL-4, posebno nakon imunizacije inhalacijom. U odnosu na kontrolnu grupu, vidi se nagli skok, posebno nakon stimulacije WT i M2 glikoformama. U S.c. grupi, IFN- γ /IL-4 odnos je blago povećan, što ukazuje na balansiraniji Th1/Th2 odgovor, dok sa druge strane, u Inh. grupi, Odnos IFN- γ /IL-4 se drastično povećava, a najizraženiji je nakon tretmana WT i M2 glikoformama (**** $p < 0,0001$).



Slika 52: Odnos IFN- γ /IL-4 u različitim eksperimentalnim grupama kod C57BL/6 i BALB/c miševa, pod različitim imunizacijama (kontrolna grupa, subkutana (S.c.) aplikacija i inhalaciona (Inh.) aplikacija). Razlike su analizirane ANOVA testom, a statistička analiza je izvršena Kruskal-Wallis testom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Značajne razlike između grupa označene su sa: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ u poređenju sa NSC i # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ u poređenju sa Der p 2; ns- nije značajno.

5. Diskusija

Alergije predstavljaju ozbiljan globalni zdravstveni problem koji utiče na kvalitet života stotina miliona ljudi širom sveta [2,35]. Alergijska astma koja nije pod lekarskim nadzorom može da izazove respiratorne probleme i ozbiljne alergijske reakcije, kao što je anafilaksa, koja može da bude opasna po život. Iako alergen-specifična imunoterapija (AIT) nosi određene izazove u pogledu bezbednosti, efikasnosti i dužine trajanja, ona i dalje predstavlja obećavajuću strategiju u lečenju alergijskih bolesti. AIT ima potencijal da modifikuje osnovni Th2 imunski odgovor na alergene i da na taj način dugoročno ublaži simptome, modifikuje samu bolest i spreči njeno dalje napredovanje [35,68,165].

Nakon više od 100 godina rada na unapređenju AIT, tokom poslednjih 30 godina, alergen-specifična imunoterapija se razvijala zahvaljujući inovacijama kao što su alergoidi (hemijski modifikovani alergeni), rekombinantni alergeni [99], rekombinantne mešavine [100] i hipoalergene varijante [101,106], koje su prilagođene individualnoj senzitivnosti pacijenata i nude nova rešenja za lečenje alergija [2,69].

Jedna od glavnih prepreka za postizanje efikasne alergen-specifične imunoterapije jeste to što većina čistih alergena pokazuje nizak stepen imunogenosti [166]. U tom kontekstu, dodavanje adjuvansa alergenima sa niskom imunogenošću predstavlja obećavajuću strategiju za pojačavanje ili modifikaciju ukupnog imunskog odgovora koji ti alergeni indukuju [109]. Adjuvansi igraju ključnu ulogu u jačanju adaptivnog imunskog odgovora, prvenstveno ciljanjem ćelija urođenog imuniteta i prepoznavanjem putem receptora koji prepoznaju strukturne obrasce. Na primer, bakterijska DNK koja sadrži CpG motive biva prepoznata od strane TLR9 na ćelijama imunskog sistema, kao što su monociti, makrofagi, dendritske i B ćelije [167]. Drugi adjuvansi, koji oponašaju prirodne patogene, poboljšavaju preuzimanje antigena i njegovu prezentaciju od strane antigen-prezentujućih ćelija [18]. Pored toga, adjuvansi podstiču ekspresiju molekula za prezentaciju antigena i kostimulatornih signala (npr. CD40, CD80/CD86) na antigen-prezentujućim ćelijama, što je od suštinskog značaja za aktivaciju T ćelija i formiranje imunološke memorije [18,168].

Među novim adjuvansima, glikani su u fokusu zbog svog potencijala da pojačaju imunski odgovor [4,13–16,169]. Glikani, koji su od presudnog značaja za stabilnost virusa, patogenost, imunogenost i izbegavanje imunskog odgovora, dekorisu površinu virusnih proteinima. Njihova struktura se menja pod pritiskom od strane imunskog odgovora domaćina, što pruža važne uvide za njihovu stratešku upotrebu u dizajnu imunogena [170–172].

U okviru ove disertacije, *in silico* je dizajnirano, a zatim i proizvedeno pet hibridnih H1sD2 glikoformi. U okviru ovih pet glikoformi su uvedena različita glikozilaciona mesta – N43, N81, N111 i N116 sa ciljem ispitivanja uticaja N-glikana na modulaciju imunskog odgovora. Rekombinantni Der p 2 alergen i H1sD2 glikoforme su proizvedene korišćenjem ekspresionog sistema *Pichia pastoris*, metilotrofnog kvasca poznatog po visokoj gustini ćelijskog rasta i efikasnoj genetskoj manipulaciji [158]. Ovaj sistem je naročito pogodan za proizvodnju eukariotskih proteina sa odgovarajućim posttranslacionim modifikacijama, uključujući i N-glikozilaciju. Za proizvodnju je korišćen *P. pastoris* soj KM71H (aox1: ARG4, arg4), poznata po sposobnosti da eksprimira glikozilovane, biološki aktivne rekombinantne proteine [161,173]. Efikasnost ovog sistema potvrđena je kroz njegovu upotrebu u proizvodnji vakcina poput rekombinantnog hepatitis B površinskog antigena (rHBsAg) [174] i HPV vakcine [175].

Nakon uspešne proizvodnje, svi rekombinantni proteini su prečišćeni metal-afinitetnom hromatografijom ili kombinacijom metal-afinitetne i jonoizmenjivačke hromatografije. Na osnovu samog SDS-PA gela se već moglo primetiti da su proteini uspešno glikozilovani jer su postojale

razlike u njihovim molekulskim masama. Dodatno, masena spektrometrija je potvrdila molekulsku masu intaktnih proteina gde je potvrđena razlika u njihovoj glikozilaciji. Uvedena glikozilaciona mesta (N43, N81, N111 i N116) su bila u potpunosti zauzeta Man7–Man15 glikanima, što je u skladu sa podacima pronađenim u literaturi [176]. Masenom spektrometrijom su potvrđeni i glikopeptidi nakon tripsinske digestije, kao i aminokiselinski sastav Der p 2 i H1sD2 glikoproteina. Pored potvrđene strukture proteina, IgE reaktivnost Der p 2 i svih pet H1sD2 glikoformi pokazana je u imunoblotu korišćenjem seruma pacijenata alergičnih na grinje kućne prašine, što ukazuje na to da su B ćelijski epitopi očuvani.

Ćelijska linija THP-1 predstavlja pogodan i pouzdan *in vitro* model za proučavanje imunoloških mehanizama povezanih sa alergijama koji uključuju i ispitivanje vezivanja alergena za receptore iskazane na monocitima i makrofagima [147]. THP-1 ćelije predstavljaju humanu leukemijsku monocitnu liniju koja se koristi kao model za ispitivanje raznih funkcija monocita i makrofaga, kao što su mehanizmi ćelijske aktivacije i signalni putevi, kao i transport nutrijenata i lekova. Predstavljaju jedan od standardnih eksperimentalnih sistema u imunologiji, posebno u analizi interakcije ćelija sa različitim stimulatorima, uključujući alergene [147]. THP-1 monociti se mogu diferencirati u različite fenotipove makrofaga korišćenjem različitih stimulatora. Stimulacija pomoću PMA podstiče prelazak monocita u neaktivirani M0 fenotip. Dalja aktivacija sa IFN- γ u kombinaciji sa lipopolisaharidom (LPS) promoviše polarizaciju ka proinflamatornom M1 fenotipu makrofaga, dok tretiranje ćelija sa IL-4 vodi ka alternativno aktiviranom, antiinflamatornom M2 fenotipu [147,177]. U ovoj disertaciji THP-1 monociti su diferencirani u M0 i M2 fenotip makrofaga korišćenjem 100 nM PMA (M0) i 100 nM PMA + 20 ng/mL IL-4 (M2). Pored razlike u morfologiji, diferencirani makrofagi su detaljno analizirani protočnom citometrijom, gde je na osnovu razlika u granularnosti i veličini, kao i na osnovu nivoa eksprimiranih površinskih markera (CD54, CD163 i CD206) potvrđena uspešna polarizacija. Kako bi se ispitale interakcije N-glikana prisutnih na različitim H1sD2 sa površinskim receptorima na diferenciranim M0 i M2 makrofagima, isti su tretirani glikoformama prethodno obeleženim FITC-om. Na osnovu dobijenih rezultata se moglo primetiti da je profil vezivanja H1sD2 glikoformi za oba fenotipa sličan, ali je procenat FITC-pozitivnih ćelija u M2 fenotipu viši u poređenju sa M0 fenotipom, što se može objasniti povećanom ekspresijom različitih receptora koji vezuju manose na površini M2 makrofaga. Takođe, vezivanje H1sD2 glikoformi za M2 fenotip makrofaga vizualizovano je konfokalnom mikroskopijom. Kao model receptor specifičan za manose je korišćen DC-SIGN. Ovaj receptor se inače iskazuje na mijeloidnim dendritskim ćelijama i makrofagima [178,179], poznat je po interakciji sa specifičnim ugljenohidratnim strukturama [180–182]. THP-1 monociti su diferencirani u M2 makrofage i tretirani H1sD2 obeleženim FITC-om i anti-DC-SIGN-PerCP-Cy5.5 antitelima. Rezultati konfokalne analize ukazuju na to da se svi H1sD2 glikoproteini vezuju za M2 makrofage preko ovog receptora.

THP-1 monociti su korišteni i kako bi se ispitao uticaj H1sD2 proteina na relativnu gensku ekspresiju proinflamatornih i antiinflamatornih citokina. Nakon diferencijacije u M0 makrofage, isti su tretirani sa rekombinantnim Der p 2 i H1sD2 antigenima u trajanju od 24 sata. Korišćenjem TRI reagensa je izolovana ukupna RNA, koja je korišćena za analizu relativne genske ekspresije IL-4, IL-10 i IFN- γ korišćenjem RT-PCR metode. Ova stimulacija je pokazala da WT i M1 H1sD2 izazivaju povećanu gensku ekspresiju antiinflamatornog IL-10, dok WT i M2 H1sD2 glikoforme dovode do povećanja genske ekspresije IFN- γ koji je karakterističan za Th1 odgovor [183]. Takođe, na osnovu odnosa IFN- γ /IL-4, gde je najviši nivo dobijen za M2 H1sD2, može se zaključiti da se ova glikoforma izdvaja kao najbolji kandidat za AIT.

Relativna genska ekspresija proinflamatornih citokina IL-4 i IFN- γ , kao i antiinflamatornog citokina IL-10 je određena nakon 24-časovnog tretmana THP-1 makrofaga Der p 2 i H1sD2 antigenima u jednakim molarnim koncentracijama (200 nM). Nakon tretmana i analize genske

ekspresije IL-4, jedini statistički značajan porast je primećen nakon tretmana sa Der p 2. Najjača ekspresija gena za IFN- γ je uočena nakon tretmana antigenima M2 i WT H1sD2. Ekspresija antiinflamatornog citokina IL-10 u THP-1 makrofagima je indukovana tretmanom ćelija antigenima WT i M1. Takođe, prikazan je i odnos IFN- γ /IL-4, gde se može uočiti da se M2 H1sD2 glikoforma izdvaja kao najbolji kandidat za AIT. Nedostatak ovih rezultata je što su dobijeni nakon jednom izvedenog eksperimenta tj. odsustvo bioloških replikata.

Kako bi se dodatno ispitao imunomodulatorni efekat ovih glikoformi, korišćene su mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC) izolovane iz pune krvi osoba alergičnih na grinje. Nakon izolovanja, ćelije su stimulisane antigenima u trajanju od 48 sati, a zatim su ELISA testom praćeni nivoi oslobođenih citokina u supernatantu. Zabeleženo je značajno povećanje nivoa IL-10 i IFN- γ , što ukazuje da H1sD2 antigeni izazivaju pomak ka Th1 imunskom odgovoru. Poznato je da IL-10 i IFN- γ igraju komplementarne uloge u AIT tako što doprinose indukciji imunološke tolerancije: IL-10 podstiče prelazak sa Th2 na Th1 odgovor [69,184], promoviše produkciju alergenspecifičnog IgG [2,84,185] i reguliše produkciju proinflamatornih citokina [103,185]. IFN- γ dodatno podstiče ovaj prelaz sa Th2 na Th1 odgovor inhibicijom Th2 citokina, čime se postiže balansiraniiji imunski odgovor [183]. Ova modulacija citokina je ključna za reprogramiranje imunskog odgovora ka stanju tolerancije, što je krajnji cilj AIT [186,187].

U okviru ove disertacije je razvijen protokol imunizacije na dva najčešće korišćena mišja modela za izazivanje astme, BALB/c i C57BL/6. C57BL/6 miševi imaju dominantniji Th1 odgovor, što ih čini pogodnim za analizu modulacije imunskog odgovora tokom AIT, dok su BALB/c miševi prirodno Th2 polarizovani, zbog čega se često koriste kao model za indukovanje alergijske astme [188]. U istraživanju je analiziran rani imunski odgovor na glavnu komponentu grinja kućne prašine, Der p 2, primljenu samostalno ili u kombinaciji sa HDM ekstraktom, gde je potvrđeno da imunski odgovor zavisi kako od prirode alergena, tako i od genetike eksperimentalnog modela koja uslovljava određeni fenotip. Najizraženija razlika između analiziranih sojeva je u produkciji imunoglobulina. BALB/c miševi su pokazali izuzetno nizak nivo IgE i IgG, posebno nakon subkutane injekcije i inhalacije Der p 2. Ovaj rezultat ukazuje na njihovu smanjenu sposobnost povezivanja lokalnog i sistemskog imunskog odgovora u poređenju sa C57BL/6 miševima. Slična zapažanja su dobijena praćenjem uticaja Der f 2 alergena na različite sojeve [189]. Primećeno je i da C57BL/6 miševi proizvode gotovo isključivo IgG1 antitela na Der p 2, dok BALB/c miševi dominantno sekretuju IgG2a. Ovo ukazuje na razlike u polarizaciji T ćelijskog odgovora, pri čemu je produkcija IgG1 podstaknuta IL-4 citokinom (Th2), dok prisustvo IgG2a ukazuje na prisustvo IFN- γ (Th1) [188,190].

Ispitivanjem uticaja Der p 2 na ova dva soja je uočeno da kod C57BL/6 miševa dolazi do izražene eozinofilne infiltracije u bronhoalveolarnom lavažu nakon inhalacije HDM ekstrakta, dok su BALB/c miševi reagovali dominantno neutrofilnom infiltracijom, posebno pri subkutanom davanju alergena. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, gde je za imunizaciju korišćen ovalbumin [191,192].

U modelima astme, analiza ćelijskog sastava plućnog tkiva omogućava direktno praćenje lokalne inflamacije i tipa imunskog odgovora, što je ključno za razumevanje patogeneze bolesti. Ova analiza takođe pruža pouzdaniju procenu efekta terapije, jer promene u plućima često nisu vidljive u perifernoj krvi [193]. U ovoj disertaciji je analizirana ćelijska populacija u maceratu plućnog tkiva koja je pokazala povećanje procentualne zastupljenosti CD11b⁺ ćelija u C57BL/6 miševa nakon inhalacije HDM, dok su BALB/c miševi pokazali sličan porast nakon subkutane aplikacije Der p 2. CD11b⁺ predstavlja marker koji obeležava mijeloidne ćelije koje imaju ključnu ulogu u inicijaciji i regulaciji inflamacije kod infekcija ili hroničnih upala, kao što je astma [194]. Pored ovog markera, analizirane su i CD3⁺ CD8⁺ ćelije što je omogućilo procenu aktivacije citotoksičnih ćelija u lokalnom imunskom odgovoru na alergije. Njihova uloga u alergijskoj upali je složena, jer mogu doprineti

smanjenju eozinofilne infiltracije ili učestvovati u tkivnom oštećenju u težim oblicima bolesti [195]. U okviru ove disertacije rezultati analize CD3+CD8+ ćelija su pokazali da su u grupi C57BL/6 miševa tretiranih HDM ekstraktom ove ćelije značajno zastupljene, što je ukazalo na aktivaciju adaptivnog imunskog odgovora, i potencijalno učestvovanje u regulaciji eozinofilne infiltracije.

Analizirana je i koncentracija serumskog TGF- β 1, koji predstavlja ključni molekul u regulaciji inflamacije i remodelovanja disajnih puteva [196]. Dobijeni rezultati su pokazali viši bazalni nivo ovog citokina u C57BL/6 miševima u poređenju sa BALB/c linijom, iako se nivoi TGF- β 1 nisu značajno razlikovali između eksperimentalnih grupa.

In vitro stimulacija splenocita pokazala je jasnu razliku između ovih sojeva. Kod C57BL/6 miševa Der p 2 alergen indukuje produkciju IL-10 i IFN- γ , ali ne i IL-4, što ukazuje na aktivaciju Th1 i regulatornog imunskog odgovora, dok HDM indukuje snažan Th2 imunski odgovor kroz povišen nivo IL-4 i IL-10, bez produkcije IFN- γ . Sa druge strane, pri obe stimulacije splenociti BALB/c miševa luče IL-4 i IFN- γ , dok HDM dodatno smanjuje IL-10, što korelira sa izraženijom neutrofilijom u BAL tečnosti u ovoj grupi. Dobijeni rezultati naglašavaju kompleksnost Th1/Th2 balansa i ukazuju da se imunski odgovor ne može u potpunosti predvideti na osnovu opšte klasifikacije linija. Iako se C57BL/6 miševi tradicionalno svrstavaju u Th1 dominantni soj [197], oni ovde razvijaju eozinofilni odgovor i IgG1 produkciju. S druge strane, BALB/c miševi, uprkos statusu Th2 dominantne linije, pokazuju sekreciju IFN- γ , IgG2a antitela i neutrofilnu infiltraciju, što potvrđuje prethodna opažanja u literaturi [189,191]. Razvoj protokola imunizacije i dobijeni rezultati ukazuju na to da C57BL/6 i BALB/c miševi predstavljaju korisne modele za ispitivanje različitih tipova imunskog odgovora na Der p 2 alergen.

Nakon razvoja protokola, radi daljeg ispitivanja imunomodulatornog efekta H1sD2 antigena, splenociti prethodno imunizovanih C57BL/6 i BALB/c miševa su izolovani i tretirani Der p 2 alergenom i H1sD2 antigenima. Tretman je trajao 48h, a zatim su supernatanti korišćeni kako bi se analizirao nivo sekretovanih citokina ELISA testom. Sekrecija IL-4, kao glavnog citokina Th2 imunskog odgovora [198,199], pokazala je različite obrasce kod dva soja miševa. C57BL/6 miševi ispoljili su povećane nivoe IL-4 isključivo nakon tretmana M1 glikoformom u kontrolnoj grupi, dok ostali tretmani nisu izazvali statistički značajne promene, što ukazuje na ograničenu Th2 reaktivnost ovog soja. Nasuprot tome, kod BALB/c miševa zabeleženo je statistički značajno povećanje IL-4 nakon subkutane imunizacije sa D2, WT, M1 i M2 proteinima, što potvrđuje sklonost ovog soja ka Th2 odgovoru [188], ali i zavisnost od tipa aplikacije antigena. IL-10 je ključni regulatorni citokin koji doprinosi razvoju tolerancije i ublažavanju alergijske inflamacije [185,198]. Kod oba soja miševa, tretmani sa H1sD2 antigenima doveli su do izraženog porasta IL-10, s tim da su nivoi kod BALB/c miševa bili niži, posebno nakon tretmana sa M2 i M3 antigenima pri čemu je M1 izazvao najviši nivo sekrecije, što ukazuje na značajan imunomodulatorni potencijal. Subkutana imunizacija kod C57BL-6 soja jedina nije dovela do većih promena. Produkcija IFN- γ , kao markera Th1 imunskog odgovora [183,198], bila je izraženija kod BALB/c miševa, posebno nakon inhalacione imunizacije sa WT i M2 antigenima, gde su nivoi dostizali i preko 3000 pg/mL. Ovaj soj je takođe pokazao visoku reaktivnost i nakon subkutane aplikacije, što ukazuje na njegov potencijal za snažnu Th1 polarizaciju u zavisnosti od stimulatora. Kod C57BL/6 miševa, IFN- γ je porastao u kontrolnoj i s.c. grupi nakon tretmana sa WT, M1 i M2, dok inhalaciona imunizacija nije dovela do značajnih promena, što sugerše slabiju Th1 aktivaciju ovim putem.

Analiza odnosa IFN- γ /IL-4 jasnije je prikazala balansa između Th1 i Th2 odgovora. Kod C57BL/6 miševa ovaj odnos je u većini slučajeva bio u korist IFN- γ , naročito nakon tretmana M2 antigenom, što ukazuje na potencijalnu Th1 dominaciju. Kod BALB/c miševa, ovaj odnos je bio značajno viši, naročito u inhalacionoj grupi, gde je ovaj odnos posebno bio visok nakon tretmana WT i M2 antigenima. Ovi rezultati potvrđuju da je BALB/c soj sposoban da razvije snažan Th1

odgovor kada je adekvatno stimulisan, dok C57BL/6 pokazuje veću osetljivost na indukciju regulatornih mehanizama [188].

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da razlika u profilu glikozilacija H1sD2 proteina značajno utiče na njihovu imunološku aktivnost. Među njima, posebno se izdvaja M2 H1sD2 glikoforma koja je dosledno pokazivala izražen imunomodulatorni potencijal kako nakon tretmana THP-1 ćelija i PBMC, tako i nakon tretmana mišjih splenocita. Indukcija regulatornih i Th1 citokina (IL-10 i IFN- γ), kao i povoljan odnos IFN- γ /IL-4, ukazuju na mogućnost reprogramiranja imunskog odgovora ka toleranciji. Ovi rezultati su od posebne važnosti za alergen-specifičnu imunoterapiju, jer ukazuju na to da precizno dizajnirani glikoproteini mogu usmeriti imunski odgovor u pravcu koji podržava toleranciju, a ne inflamaciju. Time se otvara prostor za razvoj bezbednijih i efikasnijih AIT kandidata sa potencijalno smanjenim rizikom od neželjenih reakcija.

6. Zaključak

Tokom izrade ove doktorske disertacije, Der p 2 i pet hibridnih H1sD2 glikoformi je proizvedeno u *Pichia pastoris* ekspresionom sistemu. Sve glikoforme su okarakterisane biohemijskim metodama gde je pokazano da je očuvan strukturni integritet i različitost u profilu glikozilacije. Takođe, ispitivan je i imunomodulatorni uticaj ovih glikoformi i uticaj različitih glikozilacionih profila na imunski sistem radi dalje potencijalne primene u alergen-specifičnoj terapiji (AIT).

Glavni zaključci do kojih se došlo tokom izrade ove doktorske disertacije su sledeći:

- Proizvodnja i biohemijska karakterizacija rekombinantnih glikoformi:
 - *In silico* dizajnom su konstruisani geni za Der p 2 i H1sD2, gde su uvedene mutacije u okviru HA glikozilacionih mesta
 - Rekombinantni Der p 2 i H1sD2 proteini su proizvedeni u *P. pastoris* KM71H ekspresionom sistemu.
 - Prečišćeni su hromatografskim metodama do >95% čistoće, a prinos je bio između 20 i 50 mg/mL.
 - Molekulska masa H1sD2 glikoformi na osnovu poliakrilamidnog gela odgovara teorijskoj masi koja iznosi oko 41 kDa.
 - Potvrđena je aminokiselinska sekvenca, kao i strukturni integritet i zauzetost N-glikozilacionih mesta u okviru H1sD2 glikoformi.
 - Nivo endotoksina u svim prečišćenim frakcijama proteina je ispod 0,5 ng/mL.
 - Rekombinantni Der p 2 i H1sD2 proteini vezuju IgE iz seruma pacijenata alergičnih na grinje, što potvrđuje očuvanost B ćelijskih epitopa.
- Ispitivanje imunomodulatornog efekta proizvedenih H1sD2 glikoformi:
 - Sve H1sD2 glikoforme se vezuju za receptore na površini M0 i M2 diferenciranih THP-1 makrofaga, a posebno za DC-SIGN receptor na M2 makrofagima.
 - Stimulacija THP-1 diferenciranih makrofaga rekombinantnim H1sD2 glikoproteinima je pokazala da WT i M1 H1sD2 izazivaju povećanu gensku ekspresiju antiinflamatornog citokina IL-10, dok WT i M2 H1sD2 glikoforme dovode do povećanja genske ekspresije citokina IFN- γ koji je karakterističan za Th1 odgovor. Takođe, na osnovu odnosa IFN- γ /IL-4 se može zaključiti da se M2 glikoforma izdvaja kao najbolji kandidat za AIT.
 - Sve H1sD2 glikoforme, nakon tretmana PBMC izolovanih iz krvi pacijenata alergičnih na HDM, izazivaju povišen nivo ekspresije antiinflamatornog IL-10, čime je potvrđen njihov imunomodulatorni potencijal.
 - Praćenjem nivoa sekretovanih IFN- γ i IL-4 nakon tretmana PBMC izolovanih iz krvi pacijenata alergičnih na HDM, na osnovu njihovog odnosa su se izdvojili WT, M1 i M2 glikoforme čime je potvrđen njihov imunomodulatorni potencijal, sa posebno izraženim efektom kod M2 glikoforme.
- Razvoj protokola imunizacije i analiza citokinskog profila splenocita nakon izazivanja alergijskog odgovora:
 - Razvoj protokola imunizacije na dva mišja modela, BALB/c i C57BL/6, potvrđuje da sam imunski odgovor na Der p 2 i HDM ekstrakt zavisi od genetskog porekla eksperimentalnog modela.
 - Analiza nivoa specifičnih antitela ukazuje na to da C57BL/6 miševi pokazuju snažan Th2 imunski odgovor sa povišenim nivoima IgG, IgG1 i IgE antitela u svim tretiranim

grupama, dok su BALB/c miševi imali izražen odgovor uglavnom u D2 s.c. grupi, uključujući i produkciju IgG2a i IgE, što ukazuje na potrebu za jačom stimulacijom za pokretanje Th2 odgovora kod ovog soja.

- Analiza leukocita u plućima pokazala je specifične razlike za ispitivani soj: C57BL/6 miševi imali su viši bazalni nivo CD11b⁺ ćelija i pojačan CD8⁺ T ćelijski odgovor na HDM inhalaciju, dok su BALB/c miševi pokazali niže početne nivoe CD11b⁺ ćelija s porastom nakon D2 s.c. tretmana i smanjenje CD8⁺ T ćelija u HDM inh grupi.
- Analiza ćelija u BAL ispirku pokazala je izraženiju upalnu reakciju kod C57BL/6 miševa, posebno u HDM inh grupi, sa dominantnom eozinofilijom, dok su BALB/c miševi imali povećanje broja ćelija uglavnom u D2 s.c. grupi, uključujući makrofage, neutrofile i blagu eozinofiliju.
- Stimulacija splenocita i analiza citokinskog profila pokazale su različite mehanizme regulacije imunskog odgovora kod dva soja miševa. C57BL/6 soj je razvio snažniji Th2 odgovor na HDM putem povećane sekrecije IL-4, dok je na Der p 2 reagovao povećanom produkcijom IFN- γ i IL-10. Sa druge strane, splenociti BALB/c miševa su reagovali proizvodnjom IFN- γ na oba alergena i smanjenom proizvodnjom IL-10 nakon stimulacije HDM ekstraktom.
- Stimulacija splenocita izolovanih iz BALB/c i C57BL/6 miševa nakon izazivanja alergijskog odgovora H1sD2 antigenima pokazala je različite citokinske profile u zavisnosti od načina imunizacije i prirode antigena. Rezultati ukazuju na to da WT i M2 H1sD2 proteini pokazuju najjači imunomodulatorni potencijal. M2 antigen posebno ističe snažnu Th1 orijentaciju kod BALB/c miševa i izražen IL-10 odgovor kod C57BL/6, dok M1 prvenstveno indukuje IL-4 i IL-10 kod C57BL/6. Varijanta M3 izazivala je najslabiji odgovor.

Nakon svih dobijenih rezultata i detaljnog ispitivanja imunomodulatornog potencijala H1sD2 glikoformi, može se jasno zaključiti da varijacije u glikozilacionom profilu značajno utiču na oblik imunskog odgovora. Među testiranim himernim varijantama, M2 glikoforma se ističe kao najefikasnija zbog sposobnosti da istovremeno indukuje snažan Th1 odgovor kroz povećanu proizvodnju IFN- γ , kao i antiinflamatorni efekat kroz povećanu ekspresiju IL-10, čime uspešno moduliše imunski odgovor. Ove karakteristike ukazuju na značajan potencijal M2 glikoforme za primenu u alergen-specifičnoj imunoterapiji kao siguran i efikasan kandidat.

7. Materijal i metode

7.1. Dizajn *Der p 2* i *H1sD2* genskih konstrukata

Za dizajniranje pet različitih H1sD2 himernih glikoproteina korišćene su sekvence preuzeta iz NCBI baze podataka. Korišteni su nukleotidni unosi za receptor-vezujući domen hemaglutinina, H1₆₃₋₂₉₁ identifikacionog broja GenBank: ACQ99608 i glavni alergen grinja kućne prašine, *Der p 2*, identifikacionog broja GenBank: JN222809. DNA sekvence koje kodiraju *Der p 2* i *H1sD2* konstrukt su sintetisane od strane Synbio Technologies, a kodoni su optimizovani za ekspresiju u *P. pastoris* ekspresionom sistemu. Kako bi se izbegle sterne smetnje između H1 i D2 domena u okviru himera uveden je glicin-prolin-glicin-prolin (GPGP) linker u svim konstruktima. Takođe, radi jednostavnijeg prečišćavanja korišćenjem metal afinitetne hromatografije, na C-terminus svih proteina je dodat histidinski tag sačinjen od 6 histidinskih ostataka (6His-tag). Sintetisani *Der p 2* i *H1sD2* DNA fragmenti su uklonirani u pPicZα-A vektor (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) između pozicija restrikcionih enzima EcoRI i XbaI (Thermo Scientific, SAD). Za umnožavanje željenih genskih konstrukata, kao i za njihovo održavanje i čuvanje, korišćen je *Escherichia coli* soj DH5α, dok je vanćelijska ekspresija rekombinantnih *Der p 2* i H1sD2 proteina urađena u *Pichia pastoris* Mut^S KM71H soju.

7.2. Bioinformatičke alatke za *in silico* analizu rekombinantnih proteina

Za *in silico* analizu proteina su korištene različite bioinformatičke alatke dostupne online u okviru Expasy portala (<https://www.expasy.org/>). Za prevođenje nukleotidne sekvence u aminokiselinsku je korišćena online bioinformatička alatka Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>), gde je na osnovu unete nukleotidne sekvence proteina dobijena odgovarajuća aminokiselinska sekvenca. Za teorijsko predviđanje molekulske mase i pI vrednosti proteina je korišćena alatka ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Unošenjem aminokiselinske sekvence proteina u ovaj program dobijeni su podaci o teorijskoj vrednosti molekulske mase, kao i pI vrednosti. Ovi programi za svoje proračune koriste samo sekvence koje se unose. ClustalOmega online program (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>), koji pripada EMBL-EBI bazi podataka, korišćen je za poređenje aminokiselinskih sekvenci rekombinantnih H1sD2 glikoproteina.

7.3. Metode rekombinantne DNK tehnologije za kloniranje, transformaciju i ekspresiju rekombinantnih proteina

Prilikom rada sa mikroorganizmima i mikrobiološkim metodama poštovana su sva propisana pravila o radu u mikrobiološkoj laboratoriji. Pripremanje svih rastvora i podloga je urađeno sa supstancama odgovarajuće čistoće i odmeravanjem definisane količine supstance koja je zatim rastvorena u demineralizovanoj vodi. Svi pripremljeni rastvori i medijumi su pre korišćenja sterilisani autoklaviranjem u trajanju od 20 minuta na 121 °C pri pritisku od 103,5 kPa. Pojedine komponente koje se koriste za pripremu podloga, a koje su osetljive na toplotu, kao što su rastvori antibiotika, IPTG-a, biotina, su sterilisane hladnom sterilizacijom tj. ceđenjem kroz filter od 0,22 mikrona.

7.3.1. Medijumi za rast bakterija

7.3.1.1. *Luria-Bretani tečni medijum (LB)*

Komponenta	Količina
Trypton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Dejonizovana voda do	1 L

Nakon rastvaranja supstanci pH vrednost podloge je podešena na 7,4 korišćenjem 1M rastvora NaOH.

7.3.1.2. *Luria-Bretani čvrsti medijum (LA)*

Komponenta	Količina
Trypton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Dejonizovana voda do	1 L

Nakon rastvaranja supstanci pH vrednost podloge je podešena na 7,4 korišćenjem 1M rastvora NaOH.

7.3.2. Priprema rastvora antibiotika

Mikroorganizmi, kao i sami plazmidi koji se koriste za transformaciju, poseduju određene selektivne markere, a to su najčešće geni za rezistenciju na antibiotike. Samim tim, dodavanje odgovarajućih antibiotika u podloge omogućava selektivni rast željenih mikroorganizama.

Rastvor ampicilina:

Komponenta	Količina
Ampicilin - natrijumova so	100 mg
Dejonizovana voda	1 mL

Rastvor kanamicina:

Komponenta	Količina
Kanamicin	25 mg
Dejonizovana voda	1 mL

Rastvor hloramfenikola:

Komponenta	Količina
Hloramfenikol	25 mg
96 % etanol	1 mL

Rastvor Zeocina:

Komponenta	Količina
Zeocin	100 mg
Dejonizovana voda	1 mL

Radni rastvori antibiotika su pripremljeni direktnim dodavanjem antibiotika u prohlađene medijume, tako da finalna koncentracija u medijumu bude 1000 puta razblažena u odnosu na štok (25 µg/L ili 100 µg/L).

7.3.3. Medijumi za rast kvasaca***7.3.3.1. YPD tečni medijum***

Komponenta	Količina
Pepton	20 g
Ekstrakt kvasca	10 g
Dejonizovana voda do	900 mL

Nakon sterilizacije, u prohlađen medijum je dodato 100 mL prethodno sterilisanog rastvora 20% glukoze, kao i hloramfenikol u finalnoj koncentraciji 12,5 µg/L.

7.3.3.2. YPDS čvrsti medijum

Komponenta	Količina
Pepton	20 g
Ekstrakt kvasca	10 g
Sorbitol	182,2 g
Agar	20 g
Dejonizovana voda do	900 mL

Nakon sterilizacije, u prohlađen medijum je dodato 100 mL prethodno sterilisanog rastvora 20% glukoze, tako da finalni medijum sadrži 2% glukozu, kao i zeocin u finalnoj koncentraciji 100 µg/L.

7.3.3.3. BMGY medijum za fermentaciju

Komponenta	Količina
Pepton	20 g
Ekstrakt kvasca	10 g
Dejonizovana voda do	697 mL

Nakon sterilizacije u prohladen medijum su dodati prethodno sterilisani sledeći rastvori:

Komponenta	Količina
1M KH ₂ PO ₄ , pH 6.0	100 mL
13,4 % YNB (10x)	100 mL
0,02 % Biotin (500x)	2 mL
10 % Glicerol (10x)	100 mL
Zeocin	1 mL

7.3.3.4. BMMY medijum za ekspresiju

Komponenta	Količina
Pepton	20 g
Ekstrakt kvasca	10 g
Dejonizovana voda do	787 mL

Nakon sterilizacije u prohladen medijum su dodati prethodno sterilisani rastvori:

Komponenta	Količina
1M KH ₂ PO ₄ , pH 6,0	100 mL
13,4 % YNB (10x)	100 mL
0,02 % Biotin (500x)	2 mL
50 % Metanol (10x)	10 mL
Zeocin*	1 mL

* Zeocin se dodaje u medijum kom je pH podešena na 7,4

7.3.4. Kompetentne ćelije**7.3.4.1. Hemijski kompetentne Escherichia coli DH5a ćelije**

Potrebni rastvori:

Rastvor 100 mM CaCl₂

Komponenta	Količina
CaCl ₂	11,1 g

Dejonizovana voda do	1 L
----------------------	-----

Rastvor 100 mM CaCl₂ u 10% glicerolu

Komponenta	Količina
CaCl ₂	11,1 g
100% glicerol	100 mL
Dejonizovana voda do	1 L

Iz glicerolskog štoka su ćelije DH5α soja zasejane na čvrstu LA podlogu bez antibiotika metodom iscrpljenja i ostavljene su da rastu na 37 °C tokom noći. Nakon što su ćelije porasle, jedna pojedinačna kolonija je inokulisana u 5 mL tečnog LB medijuma i gajena je tokom noći na 37 °C uz mešanje pri brzini od 250 rpm. Prekonoćna kultura je zasejana u 100 mL LB medijuma u odnosu 200:1 i ostavljena je na 37 °C uz mešanje na 250 rpm. Kada je ćelijska kultura dostigla optička gustina na 600 nm (OD₆₀₀) u vrednost između 0,3 i 0,5, ćelije su ostavljene na ledu 10 minuta kako bi se stopirao njihov rast. Nakon toga, ćelije su centrifugirane 10 minuta na 1600 × g na 4 °C, a dobijeni talog je resuspendovan u 10 mL hladnog rastvora 100 mM CaCl₂ i inkubirane pola sata na ledu. Ćelije su zatim centrifugirane 10 minuta na 4 °C pri brzini od 1100 × g, supernatant je odbačen, a talog ćelija je resuspendovan u 2 mL ledeno hladnog rastvora 100 mM CaCl₂ u 10% glicerolu. Dobijene hemijski kompetentne ćelije su razlivene u alikvotima po 50 µL u sterilne ependorfe i skladištene na -80 °C.

7.3.4.2. Priprema kompetentnih *Pichia pastoris* KM71H ćelija**Potrebni rastvori:****1M Sorbitol**

Komponenta	Količina
Sorbitol	182,2 g
Dejonizovana voda do	1 L

Rastvor DTT/LiAc

Komponenta	Količina
100 mM Litijum-acetat	6,6 g
10 mM DTT*	0,154 g
10 mM TRIS	1,21 g
Dejonizovana voda do	1 L

*DTT se dodaje nakon sterilizacije

Iz glicerolskog štoka su ćelije *Pichia pastoris* KM71H soja zasejane na YPD čvrsti medijum metodom iscrpljenja i ostavljene da rastu na 30 °C. Nakon što su ćelije porasle, jedna kolonija je zasejana u 3 mL YPD tečnog medijuma u koji je dodato 12,5 µg/mL hloramfenikola i gajene su na 30 °C u termostatu uz mešanje pri brzini od 200 rpm. Nakon 14 h, 100 µL kulture je presejano u 50 mL svežeg YPD tečnog medijuma i gajeno uz mešanje na 30 °C, dok ćelijska kultura nije dostigla OD₆₀₀ između 1 i 1,5. Nakon toga su ćelije centrifugirane 10 minuta na 3000 rpm. Dobijeni talog je resuspendovan u 10 mL rastvora DTT/LiAc i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Ćelije su zatim centrifugirane 5 minuta na 3000 rpm i talog je resuspendovan u 1 mL hladnog rastvora 1M sorbitola i prebačene u ependorf od 1,5 mL. Ponovo su centrifugirane, a zatim je talog 3 puta ispran hladnim rastvorom 1M sorbitola. Finalno, ćelije su resuspendovane u 0,5 mL hladnog 1M sorbitola sa 60 µL sterilnog 100% glicerola i razlivene su po 100 µL u sterilne ependorfe, koji su zatim skladišteni na -80 °C. Prilikom pripreme kompetentnih ćelija, sve je rađeno u sterilnim uslovima.

7.3.5. Umnožavanje plazmida u DH5α ćelijama

Transformacija hemijski kompetentnih *E. coli* DH5α ćelija je urađena sa komercijalno poručenim plazmidima pPICZ-α A koji u sebi nose gen za željene proteine. Dodato je po 1 µL plazmidne DNK u 50 µL kompetentnih DH5α ćelija i transformaciona smeša je inkubirana na ledu 30 minuta. Ćelije su zatim izložene 1 minut toplotnom šoku na 42 °C i nakon toga vraćene na led 10 minuta. Po 1 mL prethodno temperiranog LB tečnog medijuma na 37 °C je dodato u transformisane ćelije koje su onda ostavljene 1 sat na 37 °C uz mešanje pri brzini od 250 rpm kako bi započela ekspresija gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike. Posle inkubacije, 100 µL ćelijske suspenzije je zasejano na LA ploče sa ampicilinom koje su ostavljene u inkubator na 37 °C preko noći. Pojedinačne kolonije koje su porasle na selektivnom medijumu se inokulisane u po 5 mL LB medijuma sa ampicilinom i gajene su preko noći na 37 °C uz mešanje na 250 rpm.

Prekonoćne ćelijske kulture su korišćene za izolovanje plazmida korišćenje komercijalnog Plasmid Miniprep kompleta (Thermo Fisher Scientific, SAD) praćenjem uputstva proizvođača. Nakon centrifugiranja, ćelijski talog je resuspendovan u 250 µL pufera za resuspendovanje i talog je homogenizovan na vorteksu. Ćelije su zatim lizirane dodatkom 250 µL rastvora za liziranje, a zatim je usledila neutralizacija dodatkom 350 µL pufera za neutralizaciju. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana 15 minuta na 13400 rpm kako bi se plazmidna DNK odvojila od proteina i genomske DNK. Plazmidna DNK je dodatno prečišćena na silikatnoj koloni sa koje je eluirana dodatkom ultra čiste miliQ vode. Izolovani plazmidi su provereni agaroznom elektroforezom nakon restrikcije i duple digestije sa EcoRI i EcoRI + SalI restrikcionim enzimima, a sastav reakcionih smeša je prikazan u Tabeli 11.

Tabela 11: Sastav smeše za restrikciju i duplu digestiju

Komponenta	Restrikcija	Dupla digestija
MiliQ voda	3 µL	2 µL
10x pufer O	1 µL	1 µL

Plazmidna DNK	5 μ L	5 μ L
EcoRI	1 μ L	1 μ L
SalI	/	1 μ L

7.3.6. Transformacija kompetentnih KM71H ćelija

Kako bi kompetentne KM71H ćelije bile transformisane, plazmidna DNK je linearizovana PmeI restrikcionim enzimom. Smeša za linearizaciju je prikazana u Tabeli 12, a linearizacija je izvođena u trajanju od 16h na 37 °C, a sama reakcija je zatim prekinuta inkubiranjem na 65 °C 20 minuta.

Tabela 12: Sastav smeše za linearizaciju plazmida

Komponenta	Količina
MiliQ voda	7 μ L
10x pufer B	2 μ L
Plazmidna DNK	10 μ L
PmeI (5 U/ μ L)	1 μ L

Po završetku ove reakcije, 10 μ L je korišćeno za transformaciju kompetentnih KM71H ćelija. U alikvot prethodno pripremljenih ćelija je dodat linearizovan plazmid a transformaciona smeša je zatim prebačena u prethodno ohlađene kivete za elektroporaciju (BioRad, SAD) i inkubirana 5 minuta na ledu. Kiveta je zatim prebačena u elektroporator gde su ćelije izložene elektro-šoku na 2500 V. Odmah nakon elektroporacije, ćelijama je dodat 1 mL ledeno hladnog rastvora 1M sorbitola i inkubirane su 1 sat na 30 °C bez mešanja. Nakon toga, ćelijama je dodato po 0,5 mL YPD tečnog medijuma i inkubirane su 3 sata na 30 °C uz mešanje na 250 rpm. Nakon završene transformacije, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 3000 rpm, talog je resuspendovan u 200 μ L svežeg YPD medijuma i zasejane na YPDS čvrsti medijum sa 100 μ L/mL zeocina. Ploče su inkubirane na 30 °C dok ćelije nisu porasle (3-5 dana).

7.3.7. Ekspresija rekombinantnih proteina u KM71H ćelijama

Pojedinačne kolonije koje su porasle na YPDS pločama nakon transformacije KM71H ćelija su inokulisane u po 2 mL BMGY medijuma u koji je prethodno dodato 12,5 μ g/mL hloramfenikola i 100 μ g/mL zeocina i inkubirane na 30 °C uz mešanje na 250 rpm tokom noći. Ćelije su potom prebačene u 300 mL svežeg BMGY medijuma i gajene na 30 °C uz mešanje na 250 rpm, dok optička gustina nije dostigla vrednost između 5 – 6. Ćelije su zatim centrifugirane 10 minuta na 2500 $\times$ g, a dobijeni ćelijski talog je resuspendovan u 30 mL BMMY medijuma i inkubiran na 30 °C uz mešanje na 250 rpm u narednih 5 dana. Ekspresija proteina je indukovana na svakih 24 sata dodatkom 50% metanola, tako da finalna koncentracija bude 0,5%.

7.4. Elektroforetske metode

7.4.1. Agarozna elektroforeza

Za analizu izolovanih plazmida korišćena je agarozna elektroforeza koja je izvođena na PeqLab PerfectBlue Mini L sistemu u 1% agaroznom gelu i 1x TAE puferu. Elektroforeza je izvođena u 1x TAE puferu, koji je pripreman neposredno pre puštanja elektroforeze razblaživanjem koncentrovanog TAE pufera 50 puta, čiji sastav je prikazan u Tabeli 13. Radni rastvor pufera je pripreman neposredno pre upotrebe, a sam 1% agarozni gel se sprema rastvaranjem 1 g agaroze niske elektroendoosmoze (Cleaver Scientific, Velika Britanija) u 100 mL TAE pufera uz zagrevanje kom je nakon hlađenja na 55 °C dodata PEQ Green boja (VWR Peqlab, Nemačka) za vizuelizaciju DNK. U kadicu za elektroforezu, gde su postavljeni bunarići se izliva gel i ostavlja da polimerizuje. Uzorci su pre nanošenja mešani sa bojom za DNK elektroforezu (6 x Orange Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, SAD), tako što je korišćeno 10 µL uzorka i 2 µL boje. Nakon polimerizacije, gel se postavlja u kadicu i naliva se 1x TAE pufer, a zatim se nanose uzorci i DNK molekulski markeri (1 kb DNK markeri, Fermentas, Vilnius, Litvanija)). Elektroforeza je izvođena pod naponom od 80 V i potom su DNK trake vizuelizovane pod UV lampom.

Tabela 13: Sastav 50x TAE pufera

Komponenta	Količina
TRIS	242,2 g
Sirćetna kiselina	57,74 mL
EDTA	14,61 g
Dejonizovana voda do	1 L

7.4.2. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE)

Provera ekspresije i nivoa prečišćenosti proteina je rađena pomoću denaturišuće poliakrilamidne gel elektroforeze koja je izvođena na Hoefer SE 600 Hroma ili BioRad vertikalnom sistemu. Za koncentrovanje uzoraka je pripreman 4% gel, a za razdvajanje 12% gel. Način pripreme je prikazan u Tabeli 14.

Tabela 14: Sastav gelova za SDS-PAGE

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

10 % APS	0,028 mL	0,075 mL
TEMED	0,002 mL	0,004 mL

Nakon sklapanja sistema za elektroforezu, pipetiranjem su pomešane odgovarajuće zapremine rastvora za gel za razdvajanje i rastvor je naliven između staklenih ploča koje su razdvojene distancerima debljine 1 mm. Ovaj gel se potom nadslojava zasićenim n-butanolom i ostavlja da polimerizuje. Nakon polimerizacije, n-butanol se potpuno ispira dejonizovanom vodom, a zatim se naliva gel za koncentrovanje u koji se uranjaju češljevi koji formiraju bunare za nanošenje uzoraka. Nakon polimerizacije, finalni gel se ispira dejonizovanom vodom, ubacuje u sistem i naliva puferom za elektroforezu (1 x PZE), čiji sastav je prikazan u Tabeli 15. Radni rastvor PZE pufera se priprema neposrednim razblaživanjem 10 puta pre korišćenja.

Tabela 15: Sastav 10 x PZE pufera

Komponenta	Količina
0,025 M TRIS-HCl, pH 8,3	30 g
0,192 M Glicin	144 g
0,1 % SDS	10 g
Dejonizovana voda do	1 L

Uzorci za nanošenje na gel se pripremaju mešanjem sa 5 puta koncentrovanim redukujućim puferom za uzorke (PUZ), tako što se meša 10 μ L uzorka sa 40 μ L PUZ, a zatim se inkubiraju 5 minuta na 95 °C. Sastav PUZ je prikazan u Tabeli 16.

Tabela 16: Sastav 5 x PUZ

Komponenta	Količina
0,5 M Tris, pH 6,8	1,2 mL
100% Glicerol	5 mL
10% SDS	2 mL
β -merkaptoetanol	0,5 mL
1% bromfenol-plavo (BPB)	1 mL
Dejonizovana voda do	10 mL

Nakon nanošenja uzoraka na gel, elektroforeza se pušta pri naponu od 100 V dok se uzorci ne koncentruju i uđu u gel za razdvajanje, a zatim se napon pojačava na 150-200 V. Po završetku elektroforeze, gel se boji rastvorom CBB G-250 boje (Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigma-Aldrich, SAD), a zatim se obezbojava rastvorom 7% sirćetne kiseline do pojave proteinskih traka. Način pripreme CBB G-250 boje je prikazan u Tabeli 17.

Tabela 17: Sastav boje za SDS-PAGE

Komponenta	Količina
CBB G-250	0,5 g
Metanol	250 mL
Sirćetna kiselina	50 mL
Dejonizovana voda do	500 mL

7.5. Metode prečišćavanja proteina

7.5.1. Prečišćavanje rekombinantnih Der p 2 i H1sD2 proteina

7.5.1.1. IMAC

Nakon vanćelijske ekspresije Der p 2 i H1sD2 proteina u ćelijama *Pichia pastoris*, ekspresioni medijumi su centrifugirani 10 minuta na $3000 \times g$, a dobijeni supernatant je korišćen za prečišćavanje proteina nakon što je dijalizovan naspram 20 mM TRIS pufera, 150 mM NaCl, pH 8,0 preko noći. S obzirom da su svi proteini na svom C-terminusu His-tagovani, za njihovo prečišćavanje je korišćena metal afinitetna hromatografija (IMAC). Prečišćavanje je rađeno na IMAC HiTrap koloni (1 mL, GE Healthcare, Upsala, Švedska) korišćenjem Akta Purifier sistema. Kolona je ekvilibrisana puferom za ekvibraciju (Tabela 18), a zatim je nanet uzorak nakon dijalize. Eluiranje sa kolone je urađeno linearnim gradijentom koncentracije imidazola (0 – 100%) u 15 zapremina kolone, što je postignuto postepenim mešanjem ekvibracionog i elucionog pufera sa imidazolom (Tabela 18). Ekvibracija i eluiranje proteina je urađeno pri protoku od 1 mL/min, pri maksimalnom pritisku na koloni 0,3 MPa. Sakupljane su frakcije od po 1 mL koje su praćenje snimanjem apsorbance na 280 nm (A_{280}), a zatim proverene SDS-PAG elektroforezom.

Tabela 18: Sastav pufera korišćenih za prečišćavanje na IMAC koloni

Komponenta	Ekvibracioni pufer	Elucioni pufer
20 mM TRIS-HCl, pH 8,0	2,4 g	2,4 g
150 mM NaCl	8,7 g	8,7g
300 mM imidazol	-	20,4 g
Dejonizovana voda do	1 L	1 L

7.5.1.2. Jonoizmenjivačka hromatografija (IEX)

Radi dobijanja čistijih H1sD2 proteina, koji nakon razdvajanja na IMAC koloni nisu bili potpuno prečišćeni, dodatno su prečišćeni jonoizmenjivačkom hromatografijom (IEX). Ova hromatografija je takođe rađena korišćenjem Akta Purifier sistema na ANX HiTrap koloni (1 mL, GE Healthcare, Upsala, Švedska). Frakcije nakon prečišćavanja na IMAC koloni su spojene i dijalizovane naspram 20 mM TRIS-a, pH 7,8 preko noći. ANX kolona je ekvilibrisana puferom za ekvibraciju (Tabela 19), a zatim je nanet uzorak nakon dijalize. Eluiranje vezanih proteina sa kolone

je rađeno linearnim gradijentom koncentracije NaCl (0-100%) u 20 zapremina kolone, što je postignuto postepenim mešanjem ekvibracionog i elucionog pufera sa NaCl (Tabela 19). Ekvilibracija kolone i eluiranje proteina je urađeno pri protoku od 1 mL/min, pri maksimalnom pritisku na koloni 0,3 MPa. Sakupljane su frakcije od po 1 mL koje su praćene snimanjem apsorbance na 280 nm (A_{280}), a zatim proverene SDS-PAG elektroforezom.

Tabela 19: Sastav pufera korišćenih za prečišćavanje na ANX koloni

Komponenta	Ekvibracioni pufer	Elucioni pufer
20 mM TRIS-HCl, pH 8.0	2,4 g	2,4 g
500 mM NaCl	-	29,2 g
Dejonizovana voda do	1 L	1 L

7.6. Metode određivanja koncentracije proteina

7.6.1. Primena Lambert-Beer-ovog zakona

Za kvantifikaciju koncentracije prečišćenog proteina korišćeno je merenje apsorbance pri talasnoj dužini od 280 nm (A_{280}), koje je izvedeno na UV/VIS spektrofotometru (Lab Logistics Group GmbH, Mekenhajm, Nemačka). Pre svakog merenja, od apsorbance svakog uzorka oduzeta je vrednost slepe probe (pufer u kojem se uzorak nalazi), kako bi se eliminisao doprinos rastvarača. Nakon merenja apsorbance na 280 nm koncentracija proteina određena je primenom Lambert-Beerovog zakona:

$$A_{280} = \epsilon \times l \times c$$

Gde ϵ predstavlja molarni ekstinkcioni koeficijent ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) specifičan za svaki protein, l dužinu puta svetlosti (1 cm za korišćenu kivetu) i c koncentraciju izraženu u mol/L (M).

Za svaki protein posebno je korišćen odgovarajući ekstinkcioni koeficijent, dobijen na osnovu poznate aminokiselinske sekvence i broja aromatičnih ostataka. Nakon dobijanja molarne koncentracije (c), ista je izražena u jedinicama mg/mL (masena koncentracija, γ) množenjem sa molekulskom masom odgovarajućeg proteina:

$$\gamma [mg/mL] = c [mol/L] \times Mw [g/mol]$$

7.7. Određivanje koncentracije endotoksina

Iako ekspresioni sistem *Pichia pastoris* uobičajeno proizvodi rekombinantne proteine bez prisustva endotoksina, ipak su svi proteini testirani na kontaminaciju endotoksinima pre njihovog korišćenja u imunoesejima, kako bi se obezbedili bezbednost i kvalitet. Za određivanje koncentracije korišćen je komercijalni hromogeni kit (Thermo Fisher Scientific, SAD). Određivanje je rađeno po

uputstvu proizvođača. Mikrotitar ploča je preekvilibrisana inkubiranjem 10 minuta na 37 °C, a zatim je u bunare pipetirano po 50 µL standardnih rastvora i uzoraka. Standardni rastvori su pripremljeni u četiri koncentracije: 1, 0,5, 0,25 i 0,1 EU/mL. U bunare je zatim dodato po 50 µL LAL reagensa i započeto je merenje vremena. Nakon 10 minuta, u bunare je dodato po 100 µL hromogenog supstrata koji je prethodno temperiran na 37 °C i pločica je inkubirana 6 minuta na 37 °C. Finalno, reakcija je zaustavljena dodatkom 100 µL stop reagensom (25% sirćetna kiselina), a zatim su očitane apsorbance na 405 nm (A_{405}). Koristeći apsorbance standardnih uzoraka konstruisana je standardna prava na osnovu koje su zatim određene koncentracije endotoksina u uzorcima.

7.8. Analiza proteina masenom spektrometrijom

7.8.1. Deglikozilacija glikoproteina

Kako bi se sa glikoproteina udaljili vezani N-glikani, a pri tome se očuvala njihova nativna struktura, svi proteini su tretirani enzimom PNGase F (New England Biolabs, SAD). Tretman je rađen po nativnom protokolu koji je obezbedio proizvođač. Svi uzorci proteina korišćenih u reakciji su imali istu koncentraciju (0,5 mg/mL) i korišteni su za pripremu reakcione smeše koja je navedena u Tabeli 20.

Tabela 20: Reakciona smeša za deglikozilaciju proteina

Komponenta	Količina
Protein	16 µL
GB (10x)	2 µL
PNGaza F	2 µL

*eng. GlycoBuffer2

Sam enzim je dodat u reakciju kao poslednji, smeša je lagano promešana i reakcija je inkubirana na 37 °C preko noći. Nakon inkubacije, uzorci su pomešani sa odgovarajućim SDS-PAGE puferom za nanošenje uzoraka i zagrevani na 85 °C u trajanju od 2 minuta. Uzorci su analizirani elektroforetski korišćenjem komercijalnih NuPAGE™ Bis-Tris Bolt™ 4–12% gelova (Thermo Fisher Scientific, SAD), pri čemu je na gel naneto po 2 µg netretiranog i deglikozilovanog uzorka. Vizualizacija proteinskih traka izvršena je pomoću InstantBlue® Coomassie boje za proteine (Abcam, Velika Britanija).

7.8.2. Priprema uzoraka za analizu masenom spektrometrijom

7.8.2.1. Digestija uzoraka u gelu

Za analizu aminokiselinskih sekvenci, uzorci su digestovani u gelu praćenjem protokola Shevchenko et. Al [200]. Proteinske trake netretiranih i deglikozilovanih proteina su pažljivo isečene iz poliakrilamidnog gela i digestovane tripsinom, a dobijeni peptidi su analizirani masenom spektrometrijom.

Potrebni rastvori:**Tabela 21: Rastvor za obezbojavanje (50% acetonitril i 50 mM amonijum bikarbonat)**

Komponenta	Količina
Acetonitril	10 mL
100 mM amonijum bikarbonat	10 mL

Tabela 22: Rastvor za redukciju (10 mM DTT u 100 mM amonijum bikarbonatu)

Komponenta	Količina
1M DTT (Merck, SAD)	10 µL
100 mM amonijum bikarbonat do	1 mL

Tabela 23: Rastvor za alkilovanje (55 mM jodacetamid u 100 mM amonijum bikarbonatu)

Komponenta	Količina
Jodacetamid (Merck, SAD)	10,17 mg
100 mM amonijum bikarbonat do	1 mL

*rastvor se priprema svež i čuva se u mraku

Detaljan postupak:

1. Proteinske trake su isečene iz gela čistim skalpelom.
2. Trake sa proteinima su dodatno isečene na kockice (~ 1 x 1 mm) i stavljene u tube od 1,5 mL.
3. Dodato je 100 µL rastvora za obezbojavanje i inkubirane su 30 minuta.
4. Tube su spinovane i udaljena je tečnost.
5. Ispiranje (500 µL acetonitrila, 10 minuta).
6. Tube su spinovane i udaljena je tečnost.
7. Dodato je 50 µL rastvora za redukciju kako bi se delovi gela potpuno prekrili.
8. Inkubirano je 30 minuta na 56 °C.
9. Tube su prohlađene na sobnoj temperaturi.
10. Ispiranje (500 µL acetonitrila, 10 minuta), a zatim je udaljena tečnost.
11. Dodato je 50 µL rastvora za alkilovanje i inkubirano 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku.
12. Ispiranje (500 µL acetonitrila, 10 minuta), a zatim je udaljena tečnost.
13. Dodat je rastvor tripsina tako da se gel pokrije u 3x većoj zapremini.
14. Inkubiranje 30 minuta na 4 °C.
15. Udaljen je supernatant.
16. U nabubrene deliće gela koji su upili rastvor tripsina je dodat 10 mM amonijum bikarbonat.
17. Inkubiranje 16 sati na sobnoj temperaturi.
18. Supernatant je prebačen u čiste tube sa smanjenim vezivanjem (eng. *low binding tubes*).

7.8.2.2. *Digestija uzoraka u rastvoru*

Kao i digestija u gelu, Na sličan način je odrađena digestija proteina u rastvoru. Svi uzorci su bili u koncentraciji od 1 µg/µL. Redukovani su dodatkom 10 mM DTT-a (30 minuta na 57 °C), a nakon toga alkilovani dodatnom sveže pripremljenog 20 mM jodacetamida (30 minuta, u mraku na sobnoj temperaturi). Uzorci su digestovani ili samo tripsinom (1:50=w:w; preko noći na 37 °C) ili kombinacijom tripsina i endoproteinaze Glu-C (1:20=w:w; 4h na 37 °C). Digestija je stopirana dodatkom 2% mravlje kiseline.

7.8.2.3. *Prečišćavanje peptida nakon digestije*

Pre LC-MS/MS analize, peptidi nakon digestije su prečišćeni pomoću nastavaka koji su punjeni Poros R3 materijalom (C18; Thermo Fisher, SAD). Matriks je ispran i aktiviran 100% acetonitrilom, a zatim ekvilibrisan 0,1% mravljom kiselinom. U uzorke je dodata 0,1% mravlja kiselina i naneti. Sakupljen je supernatant u tubu, a zatim je rađeno ispiranje sa 50 µL 0,1 % mravlje kiseline (nevezane frakcije), a potom eluiranje sa 20 µL rastvora 80% acetonitril / 0,1% mravlja kiselina. Nakon prečišćavanja, uzorci su osušeni i rehidratirani u 0,1% mravljoj kiselini tako da koncentracija bude 1 pmol/µL radi dalje analize.

7.8.2.4. *Obogaćivanje glikopeptida (HILIC)*

Pre LC-MS analize, rađena je *Cotton HILIC* (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) metoda obogaćivanja glikopeptida, koja se zasniva na korišćenju vlaknastog materijala, pamuka, kao nosača i hidrofilne smole (PHA, polihidroksietil A) koja funkcioniše na HILIC principu.

Postupak:

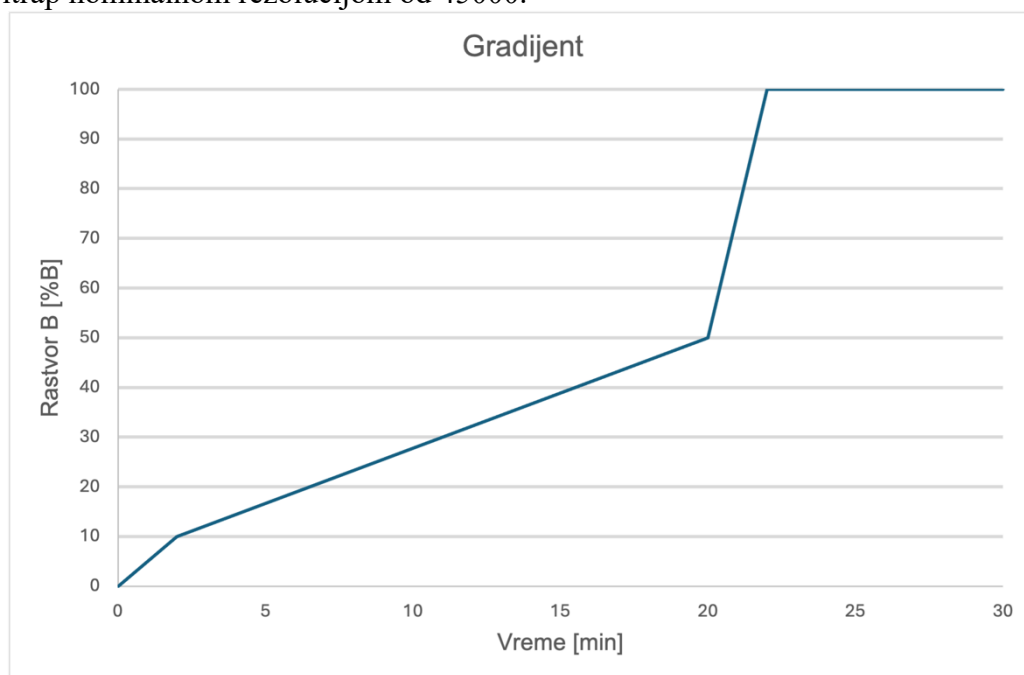
1. U nastavak se ubaci mala količina medicinskog pamuka.
2. Dodaje se PHA matriks (~3 mm).
3. Matriks se aktivira dodatkom 100% acetonitrila.
4. Ispiranje matriksa sa 5% mravljom kiselinom (50 µL).
5. Ekvilibracija rastvorom 80% acetonitril/2% mravlja kiselina (2 x 50 µL).
6. Nanošenje i vezivanje uzoraka.
7. Eluiranje nevezanih frakcija rastvorom 80% acetonitril/2% mravlja kiselina (50 µL).
8. Eluiranje vezanih frakcija 5% mravljom kiselinom (2 x 50 µL).

7.8.3. Analiza peptida i obogaćenih glikopeptida

Nakon digestije i prečišćavanja uzoraka, rađena je optimizacija eksperimentalnih uslova. Nakon što je metoda optimizovana, MS analiza glikopeptida je odrađena na *Orbitrap Exploris 480* (Thermo Fisher Scientific, SAD), a svi uzorci su snimljeni u triplikatu. Za snima nje je korišćeno 2 pmol po uzorku. Analitička kolona (dužina: 23 cm, prečnik: 75µm) je upakovana Reprosil-Pur 120 C18-AQ 3µm materijalom za pakovanje kolona (Dr. Maisch GmbH, Nemačka). Spojena je sa Easy-nLC sistemom koji je povezan za to *Orbitrap Exploris* instrument (Thermo Fisher Scientific, SAD). Rastvori korišćeni su prikazani u Tabeli 24, a parametri koji su korišćeni pri samoj analizi su navedeni u Tabeli 25.

Za uzorke obogaćene glikopeptidima prečišćavanje je rađeno tokom 30-minutrnog gradijenta (Slika 50) pri protoku od 250 ng/min. Izabrano je 10 prekursora najvišeg intenziteta sa naelektrisanjem od +2 do +9. Fragmentacija je rađena HCD metodom (*eng. Higher-energy Collisional Dissociation*) uz kolizionu energiju od 35%. MS2 spektri su snimani pri Orbitrap rezoluciji od 60000.

Što se tiče neobogaćenih uzoraka digestovanih u gelu, sam gradijent je bio malo kraći, 23 minuta i odabrani su prekursori sa naelektrisanjem od +2 do +6 sa najvišim intenzitetom signala. Fragmentisani su HCD metodom pri kolizionoj energiji od 30%. MS2 spektri ovih uzoraka zabeleženi su sa Orbitrap nominalnom rezolucijom od 45000.



Slika 50: Gradijent korišćen za analizu

Tabela 24: Rastvori korišćeni za analizu peptida

Rastvor A	Rastvor B
0,1 % mravlja kiselina	95% acetonitril
	0,1 % mravlja kiselina

Tabela 25: Parametri analize na Orbitrap Exploris 480 instrumentu

Parametar	Vrednost
Napon izvora	2,1 kV
Temperatura transferne cevi	275 °C
Rezolucija za MS1	120000
Rezolucija za MS2	60000/45000

7.8.4. Analiza intaktnih proteina

7.8.4.1. Rasoljavanje uzoraka

Glikoproteini i odgovarajući deglikozilovani uzorci su rasoljeni pomoću *Zeba™ Spin Desalting* kolone (Thermo Fisher Scientific, SAD). Ove kolone su jednokratne i nakon upotrebe se bacaju.

Postupak:

1. Sa kolone se uklanja donji čep i otpustiti poklopac bez uklanjanja.
2. Kolonu postaviti u tubu od 1,5 mL i centrifugirati $1500 \times g$ tokom 1 minuta, kako bi se uklonio rastvor koji se nalazi u koloni.
3. Osušiti donji deo kolone upijanjem viška tečnosti papirom.
4. Matriks u koloni je sa jedne strane nagnut naviše, obeležiti tu stranu i voditi računa prilikom centrifugiranja da kolona uvek bude postavljena tako da viši deo matriksa bude ka spolja, jer se tako povećava efikasnost rasoljavanja.
5. Kolonu prebaciti u novu tubu, ukloniti poklopac i naneti uzorak direktno u centar matriksa (30 - 130 μ L).
6. Centrifugirati $1500 \times g$ tokom 2 minuta kako bi se sakupio rasoljeni uzorak.
7. Rasoljene uzorke razblažiti u 0,1% mravljoj kiselini do koncentracije od 1 pmol/ μ L.

7.8.4.2. Snimanje intaktnih masa

Analiza intaktnih masa proteina sprovedena je korišćenjem tečne hromatografije visoke rezolucije u nano formatu u kombinaciji sa visokorezolucionom masenom spektrometrijom. Kolona unutrašnjeg prečnika od 75 μ m i dužine 23 cm je upakovana koristeći PLRP-S materijal za pakovanje (1000 Å, 5 μ m; Agilent, SAD) i povezana sa EasyLC nano-LC sistemom (Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao mobilne faze korišćeni su rastvori prikazani u Tabeli 26. Razdvajanje je rađeno tokom 30-minutnog gradijenta, a sama analiza je odrađena korišćenjem *Orbitrap Fusion Eclipse* instrumentu (Thermo Fisher Scientific, SAD) u režimu za analizu intaktnih proteina sa parametrima prikazanim u Tabeli 27.

Dobijeni spektri su obrađeni u softveru FreeStyle (Thermo Fisher Scientific), gde je izvršeno uprosečavanje signala proteina, a prosečan spektar je zatim dekonvoluisan korišćenjem softvera UniDec. Za anotaciju identifikovanih glikoformi korišćen je R skript, zasnovan na poznatim sastavima glikana (dobijenim MS analizom glikopeptida) i varijacijama u sekvenci proteina.

Tabela 26: Rastvori korišćeni za analizu intaktnih masa proteina

Rastvor A	Rastvor B
1% acetonitril	95% acetonitril
0,1 % mravlja kiselina	0,1 % mravlja kiselina

Tabela 27: Parametri analize na Orbitrap Fusion Eclipse instrumentu

Parametar	Vrednost
-----------	----------

Napon za nanoelktrosprej	2,3 kV
Rezolucija	15000
Broj mikroskenova po spektru	5

7.8.5. Obrada i analiza podataka nakon MS analize

MS podaci su pretraživani korišćenjem baze podataka za *Pichia pastoris* (preuzeta sa www.uniprot.org, dana 25.07.2022.godine), kojoj su pridodate sekvence H1sD2 proteina, kao i cRAP baza podataka (baza najčešćih kontaminanata, *The Global Proteome Machine Organization*). Za identifikaciju peptida korišćeni su MS Amanda i Sequest HT algoritmi implementirani u softveru *Proteome Discoverer v3.0* (PD, Thermo Fisher Scientific, SAD). Parametri pretrage u PD softveru su uključivali: MS1 tolerancija: 10 ppm, MS2 tolerancija: 0,02 Da i dozvoljena stopa lažno pozitivnih identifikacija (FDR): 1%.

Za obradu podataka obogaćenih glikopeptida, sirovi podaci su prvo konvertovani u .mzML format korišćenjem *MSConvert* alata (*ProteoWizard 3.0*). Pretraga glikopeptida je izvršena pomoću *GlycReSoft* softvera. Pretraga glikanske mase uključivala je glikane sa 3 do 15 manoznih jedinica i 0–1 fosfatnih grupa. Tolerancija za glikopeptidnu pretragu bila je postavljena na 5 ppm na MS i MS/MS nivou. Takođe, radi potvrde anotacija, spektri glikopeptida su i ručno pregledani. Za ekstrakciju površina signala glikopeptida u svrhu relativne kvantifikacije, korišćen je softver *Skyline* (verzija 23.1.0.455). Pored MS/MS potvrđenih glikopeptida, u analizu su uključeni i oni glikopeptidi sa visokomanoznim glikanima koji su imali samo MS1 identifikaciju sa tačnošću manjom od 5 ppm i vremenskim odstupanjem <0,5 minuta u odnosu na MS/MS potvrđene glikopeptide sa istom peptidnom sekvencom. Za statističku analizu i vizualizaciju podataka korišćen je R softver, verzija 4.2.2.

7.9. Imunološke metode

Korišćenje biološkog materijala humanog porekla odobreno je od strane Etičke komisije Univerzitetske dečje klinike Tiršova, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Broj etičke dozvole: 017-16/23, datum odobrenja: 09.06.2022. godine).

7.9.1. Dobijanje seruma pacijenata alergičnih na HDM

Serumi alergičnih pacijenata koji su korišćeni za imunološku karakterizaciju rekombinantnih proteina su dobijeni u saradnji sa prof. dr Marinom Atanasković-Marković sa Univerzitetske dečje klinike Tiršova, Medicinski fakultet Univerzitet u Beogradu. Svi serumi su dobijeni iz pune krvi pacijenata alergičnih na HDM nakon njihovog pristanka za učešće u ovoj naučnoj studiji. Nakon vađenja krvi u vakutaner koji ne sadrži antikoagulanse, ona je ostavljena 30 minuta na 4 °C, a zatim centrifugirana 20 minuta na 3000 rpm. Dobijeni serum koji se izdvojio kao supernatant, inkubiran je 10 minuta na 56 °C radi inaktivacije komplementa, a zatim je alikvotiran u manje zapremine i skladišten na – 20 °C.

7.9.2. Provera IgE reaktivnosti u imunoblotu

7.9.2.1. *Transfer proteina na membranu*

Za proveru IgE reaktivnosti H1sD2 proteina korišćenjem seruma pacijenata, proteini su transferovani na nitroceluloznu (NC) membranu polu-suvom metodom. Proteini su naneti u preparativni bunar i nakon elektroforetskog razdvajanja, SDS-PAGE gel je korišćen za sklapanje sendviča za transfer. Redosled pri sklapanju sendviča je sledeći: Watman-ov papir, NC membrana, gel, Watman-ov papir, a sendvič je sklapan u Towbin-ovom puferu (Tabela 28). Sendvič se zatim prebacuje u bloter tako da NC membrana bude orjentisana ka anodi i rolerom se istisne vazduh iz sendviča. Transfer je trajao 45 minuta pri konstantnoj struji jačine $2\text{mA}/\text{cm}^2$ gela. Nakon transfera, membrana je obojena Ponceau S bojom kako bi se proverila uspešnost transfera (Tabela 29).

Tabela 28: Sastav Towbin-ovog pufera

Komponenta	Količina
TRIS	2,9 g
Glicin	1,45 g
SDS	0,185 g
Metanol	100 mL
Dejonizovana voda do	500 mL

Tabela 29: Sastav Ponceau S boje za bojenje NC membrane

Komponenta	Količina
Ponceau S	1 g
Sirćetna kiselina	7 mL
Dejonizovana voda do	100 mL

Nakon uspešnog transfera, membrana je isečena da trake širine ~ 2 mm koje su dalje korišćene za razvijanje u imunoblotu sa pojedinačnim serumima alergičnih pacijenata koji su razblaženi desetostruko pre korišćenja.

7.9.2.2. *Razvijanje imunoblota*

Potrebni rastvori:

Tabela 30: 20 mM TBS (Tris-om puferisan fiziološki rastvora, pH 7,4)

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

Tabela 31: 20 mM tTBS (TBS sa 0,2% Tween 20, pH 7,4)

Komponenta	Količina
0,2 % Tween 20	2 mL
TBS do	1 L

Tabela 32: Rastvor za blokiranje (1% BSA)

Komponenta	Količina
BSA	1 g
tTBS	100 mL

Tabela 33: Pufer za alkalnu fosfatazu (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5)

Komponenta	Količina
TRIS	2,42 g
NaCl	1,17 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,2 g
Dejonizovana voda do	200 mL

Tabela 34: Supstrati za ALP

Komponenta	Količina
BCIP (50 mg/mL u vodi)	33 µL
NBT (50 mg/mL u 70 % DMF)	66 µL
Pufer za ALP	10 mL

Postupak:

Nakon sečenja, membrane su blokirane u 1% rastvoru BSA tokom 1,5 sata na 37 °C, uz blago mešanje pri 80 rpm. Blokirane membrane su zatim tri puta ispirane tTBS puferom (po 10 minuta) na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Nakon ispiranja, svaka membrana je inkubirana sa pojedinačnim serumom pacijenata u trajanju od 1,5 sata na sobnoj temperaturi, takođe uz blago mešanje. Po završetku inkubacije, membrane su ponovo ispirane prema prethodnom protokolu, a zatim inkubirane sa monoklonskim anti-IgE antitelima konjugovanim sa alkalnom fosfatazom (klon GE1, Sigma-Aldrich, SAD) tokom 1 sata na sobnoj temperaturi. Nakon završne inkubacije, membrane su tri puta ispirane tTBS puferom, a zatim i puferom za alkalnu fosfatazu (po 10 minuta). Detekcija je izvršena dodatkom precipitirajućeg supstrata za ALP na 37 °C, sve do pojave ljubičastog taloga, čime je potvrđeno prisustvo ciljanih antitela. Reakcija je zaustavljena ispiranjem membrana dejonizovanom vodom.

7.10. Animalni modeli

7.10.1. Laboratorijski miševi

Rad sa laboratorijskim miševima odobren je od strane Etičkog komiteta za dobrobit eksperimentalnih životinja pri Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i dozvola za rad je dobijena od Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (broj odobrenja: 323-07-12284/2021-05). Ženke miševa C57BL/6 i BALB/c sojeva, starosti 6–8 nedelja, nabavljene su sa Vojnomedicinske akademije (VMA, Beograd, Srbija). Svi eksperimenti na životinjama sprovedeni su u skladu sa zakonom Republike Srbije i u saglasnosti sa odredbama Evropske konvencije ETS 123.

7.10.2. Imunizacija miševa

Za eksperimente su korišćene 4 različite grupe životinja, svaka sačinjena od po 10 jedinki. Grupe su formirane nasumičnim odabirom jedinki, tako da nije bilo razlike u starosti, kao ni u telesnoj masi između grupa. Svaka grupa je imunizovana na različit način (Slika 37 i Slika 45).

Prvog dana, sve grupe osim kontrolne su subkutano (s.c.) injektovane sa 10 µg Der p 2 alergena u 100 µL suspenzije PBS:aluminijum-hidroksid (v:v=1:1). Za razvijanje protokola je korišćen Der p 2 proizveden u *E. coli*, a za imunizaciju miševa radi daljeg tretiranja H1sD2 glikoformama je korišćen Der p 2 proizveden u *P. pastoris*. Na dan 7, D2 s.c. grupa je ponovo imunizovana subkutanom injekcijom. Dana 7, 8, 9, 10 i 11, miševi iz grupa HDM inh i D2 inh bili su izloženi aerosolu HDM ekstrakta (100 µg/mL) ili rekombinantnog Der p 2 alergena (10 µg/mL). Kontrolna grupa je injektovana i inhalirana rastvorom PBS-a (Tabela 35). Inhaliranje je izvođeno u zatvorenoj komori u trajanju od 3 minuta po izlaganju. Dana 29, D2 s.c. i D2 inh grupe su provocirane aerosolom Der p 2 alergena, dok je HDM inh grupa provocirana HDM ekstraktom. Nakon 24 sata, anestezirani miševi su eutanizirani dislokacijom vratnog pršljena i uzeta je krv iz srca. Urađena je bronhoalveolarna lavaža, a slezina i pluća su sakupljeni za dalje analize. Serumi su odvojeni po standardnom protokolu i čuvani na –20 °C.

Tabela 35: PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4)

Komponenta	Količina
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,245 g
Dejonizovana voda do	1 L

7.10.3. Detekcija specifičnih IgG i IgE antitela ELISA testom

Korišćena su različita razblaženja za IgG i IgE, a razblaženja su pripremljena u PBS rastvoru koji sadrži 1% BSA. Za određivanje specifičnih klasa antitela korišćena su biotinirovana anti-mišja

IgG (IgG, IgG1 i IgG2a, razblaženje 1:1000 u 1% BSA/PBS; Biolegend, SAD) i anti-mišja IgE antitela (razblaženje 1:250 u 1% BSA/PBS; Biolegend, SAD). Za detekciju je korišćen streptavidin-alkalna fosfataza (razblaženje 1:1000 u 1% BSA/PBS; Sigma–Aldrich, SAD), a kao supstrat 4-nitrofenil fosfat. Očitavanje apsorbance je rađeno na ELISA čitaču (Ascent 6–384 [Suomi], MTX Lab Systems Inc., Beč, VA 22182, SAD).

Potrebni rastvori:

Tabela 36: tPBS (PBS sa 0,05% Tween, pH 7,4)

Komponenta	Količina
Tween 20	0,5 mL
PBS do	1 L

Tabela 37: Rastvor za blokiranje (1% BSA/PBS)

Komponenta	Količina
BSA	1 g
PBS do	100 mL

Postupak:

- Der p 2 (5 µg/mL u PBS-u) je nanet u zapremini od 50 µL na ELISA pločice; inkubacija je rađena preko noći na 4 °C.
- Blokiranje sa 1% BSA u PBS-u, 1 sat na sobnoj temperaturi.
- Dodato je po 50 µL razblaženih seruma miševa (IgG – serijska razblaženja, IgE – 1:5), inkubacija 1 sat.
- Ispiranje pločice 3 puta sa tPBS-om i 1 put sa PBS-om.
- Dodato biotinilovano anti-mišje IgG ili IgE antitelo, inkubacija 1 sat.
- Ispiranje pločice 3 puta sa tPBS-om i 1 put sa PBS-om.
- Dodat streptavidin-alkalna fosfataza, inkubacija 30 minuta.
- Ispiranje pločice 4 puta PBS-om.
- Dodat 4-nitrofenil fosfat (pNPP), u puferu za alkalnu fosfatazu i inkubacija 30 minuta u mraku.
- Očitavanje apsorbance na 405 nm.

7.10.4. Analiza imunskih ćelija iz pluća protočnom citometrijom

Nakon izolacije, pluća su mehanički usitnjena na sterilnoj čeličnoj mrežici (70 µm) kroz koju je na taj način prošla ćelijska suspenzija. Dobijena suspenzija je zatim centrifugirana pri 400 × g tokom 10 minuta na 4 °C, čime je formiran ćelijski talog. Kako bi se uklonili eritrociti, ćelije su resuspendovane u 1 mL rastvora za liziranje crvenih krvnih zrnaca (RBC pufer za liziranje, Tabela 38) i inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija je centrifugirana pri 400 × g tokom 10 minuta, a supernatant je odbačen. Ćelije su zatim resuspendovane u PBS-u sa 1% BSA i 0,1% natrijum-azida (Tabela 39) i razblažene do finalne koncentracije od 1 × 10⁶ ćelija/mL. Kako bi se

blokirali Fc receptori, u svaku suspenziju ćelija je dodato po 10 μ L netretiranog mišjeg seruma i inkubirani je 10 minuta na 4 °C. Za imunofenotipsku analizu, ćelije su inkubirane sa monoklonskim antitelima na CD3 ϵ , CD8 i CD11b (Tabela 40, Immunotools, Nemačka). Nakon inkubacije sa antitelima 20 minuta na 4 °C u mraku, ćelije su dva puta isprane sa 4 mL rastvora 2% BSA/0,1% natrijum-azida i centrifugirane 10 minuta pri 400 $\times$ g. Isprane ćelije su resuspendovane u 0,5 mL rastvora 0,4% formaldehida u PBS-u.

Fluorescentni signal je analiziran korišćenjem protočnog citometra FACSVerse (Becton Dickinson, SAD). Dobijeni podaci su dalje obrađeni korišćenjem BD FACSuite™ softvera za analizu protočne citometrije. Za svaki uzorak je analizirano 10000 događaja po uzorku, a određivanje ćelijske populacije (*gating*) je rađeno za ukupne leukocite ili limfocite. Prilikom analize je podešena kompenzacija signala X-%Y = FITC: 0,64% PE, 0,00% APC; PE: 25,96% FITC, 0,00% APC; APC: nije bilo potrebe za kompenzacijom.

Tabela 38: RBC pufer (0,8% NH₄Cl, 0,1 mM EDTA u vodi, KHCO₃, pH 7,4)

Komponenta	Količina
NH ₄ Cl	0,8 g
0,1 M EDTA	10 μ L
KHCO ₃	0,084 g
Dejonizovana voda do	100 mL

Tabela 39: Rastvor za FACS (2% BSA u PBS-u sa 0,1% natrijum-azidom, pH 7,4)

Komponenta	Količina
BSA	20 g
NaN ₃	1 g
PBS do	1 L

Tabela 40: Korišćenih antitela za analizu imunskih ćelija pluća

Antitelo	Klon	Poreklo i klasa
Anti-CD3 ϵ (FITC)	145-2C11	Hrčak, IgG
Anti-CD11b (FITC)	M1/70.15	Pacov, IgG2b
Anti-CD8 (PE)	YTS 169.4	Pacov, IgG2b

7.10.5. Bronhoalveolarna lavaža i analiza ćelija

Bronhoalveolarna lavaža je sprovedena prema prethodno opisanoj metodi [191,201], uz određene modifikacije. Postupak je obuhvatao uvođenje igle u dušnik, koja je zatim fiksirana *pean-*klještima, nakon čega je dva puta ubrizgano po 1 mL PBS rastvora sa 1% BSA, uz sakupljanje tečnosti

između dva ispiranja. Čelije iz prikupljene tečnosti su isprane centrifugiranjem pri $400 \times g$ tokom 10 minuta, a zatim resuspendovane u istom rastvoru.

Brojanje ćelija je obavljeno pomoću hemocitometra, nakon bojenja ćelija Türk-ovim rastvorom (Tabela 41). Za pravljenje razmaza, ćelije su fiksirane na mikroskopske pločice pomoću citocentrifuge (Cytospin, Shandon Elliott, Cheshire, UK), pri $400 \times g$ tokom 10 minuta. Za bojenje ćelija korišćena je May-Grünwald Giemsa (MGG) metoda.

Postupak MGG metode:

1. Na osušen razmaz ćelija naneti May-Grünwald rastvor (Tabela 42, nerazblažen), 5 min.
2. Dodati jednaku količinu fosfatnog pufera (Tabela 43) i inkubirati još 5 min.
3. Isprati pločicu puferom.
4. Naneti Giemsa rastvor (Tabela 44) razblažen 1:10 u fosfatnom puferu i inkubirati 20 min.
5. Isprati destilovanom vodom i ostaviti da se osuši na vazduhu.
6. Posmatrati pod mikroskopom.

Tabela 41: Türk-ov rastvor

Komponenta	Količina
Kristal violet boja	10 mg
Sirćetna kiselina (glacijalna)	3 mL
Dejonizovana voda do	100 mL

Tabela 42: May-Grünwald-ov rastvora

Komponenta	Količina
Eozin Y	0,25 g
Metilen plavo	0,25 g
Metanol	100 mL

Tabela 43: Fosfatni pufer (10mM NaH_2PO_4 i 10 mM Na_2HPO_4 , pH 6,8)

Komponenta	Količina
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,36 g
Na_2HPO_4	1,42 g
Dejonizovana voda do	1 L

Tabela 44: Giemsa boja

Komponenta	Količina
Giemsa boja	1 g
Metanol	100 mL

7.10.6. Priprema i stimulacija splenocita

Slezine su aseptično odstranjene iz imunizovanih miševa i odmah stavljene u 5 mL sterilnog kompletnog RPMI 1640 medijuma (Sigma-Aldrich, SAD) sa 10% FBS (kataloški broj: F2442, Sigma-Aldrich). Nakon toga, izolovane slezine su presečene na polovine, a splenociti su oslobođeni iz kapsule mehaničkim drobljenjem. Čelijska suspenzija je sakupljena nakon filtriranja i zatim je centrifugirana pri $400 \times g$ tokom 10 minuta kako bi se ćelije odvojile. Eritrociti su udaljeni tretmanom sa RBC puferom 10 min i ponovnim centrifugiranjem ($400 \times g$, 10 minuta). Broj ćelija i njihova vitalnost je procenjena pomoću Trypan blue bojenja i iznosila je preko 95%. Ćelije su zatim resuspendovane u kompletnom RPMI medijumu sa 10% FBS i 50 μM β -merkaptetanola do koncentracije od 1×10^6 ćelija/mL i stimulisane su sa 1 $\mu\text{g/mL}$ Der p 2 ili 2,5 $\mu\text{g/mL}$ HDM ekstrakta (37°C , 5% CO_2 , 24 h) u zapremini od 1 mL u ploči sa 24 bunara (Greiner Bio, Austrija). Kod tretmana splenocita korišćeni su Der p 2 i H1sD2 proteini u jednakim molskim koncentracijama (300 nM) i sam tretman je trajao 48 sati (37°C , 5% CO_2). Nakon završenog tretmana, sakupljeni su supernatanti od kojih su udaljene ćelije centrifugiranjem i skladišteni su na -80°C . Za određivanje koncentracije sekretovanih IL-4, IL-10 i IFN- γ korišćeni su standardi i parovi antitela (BioLegend, SAD). Protokol je opisan u sekciji 5.15.

7.11. Diferencijacija i tretman THP-1 makrofaga

7.11.1. Gajenje THP-1 monocita

THP-1 monociti su gajeni u suspenziji u bocama za gajenje ćelijske kulture površine 75 cm^2 (T-75), u RPMI-1640 hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 1% penicilin/streptomycin mešavinom (Gibco, SAD) i 1% L-glutaminom (Gibco, SAD). Radi održavanja optimalnih uslova za rast ćelija medijum je menjan na svaka dva do tri dana. Ćelije su pasažirane kada je gustina dostigla 8×10^5 ćelija/mL. Proces pasažiranja obuhvatao je centrifugiranje suspenzije pri brzini od $300 \times g$ tokom 5 minuta, nakon čega je dobijeni ćelijski pelet resuspendovan u 1 mL svežeg medijuma. Koncentracija ćelija određivana je pomoću hemocitometra, nakon prethodnog razblaženja uzorka u PBS-u i bojenja ćelija Trypan blue bojom. Nakon brojanja, ćelije su ponovo zasejavane u T-75 bocu u koncentraciji od $0,2 \times 10^5$ ćelija/mL, u 10 mL hranljivog medijuma, pri čemu je 70% bio svež, a 30% prethodno korišćen medijum. Prisustvo starog medijuma omogućava prisustvo faktora rasta i hormona koje ćelije prirodno izlučuju, što doprinosi boljem oporavku i nastavku proliferacije nakon pasažiranja.

7.11.2. Diferencijacija THP-1 monocita u M0 i M2 makrofage

THP-1 monociti su nakon uzgajanja prebaćeni u pločice od 48 bunara ($0,3 \times 10^5$ ćelija po bunaru u 200 μL) koje su diferencirane sa 100 ng/mL PMA (forbol-12-miristat-13-acetat, Sigma-Aldrich, SAD) i inkubirane tokom 48 sati, na 37°C , 5% CO_2 . Nakon toga, ćelije su isprane PBS-om 2 puta i zatim inkubirane 72 sata u kompletnom RPMI-1640 medijumu kako bi se dovršila njihova diferencijacija („*resting*“ period). Na ovaj način su monociti diferencirani u M0 fenotip. Kako bi se

diferencijacija nastavila ka M2 fenotipu, ćelije su ponovo isprane PBS-om, a zatim tretirane 48 sati sa 20 ng/mL IL-4 u RPMI medijumu sa 2% FBS.

7.11.3. Karakterizacija THP-1 M0 i M2 makrofage

Radi dalje karakterizacije protočnom citometrijom (FACS) THP-1 ćelije su zasejavane u ploče sa 24 bunara u koncentraciji od 5×10^5 ćelija po bunaru i diferencirane u M0 i M2 makrofage. Nakon ispiranja, ćelije su inkubirane sa akutazom (PAN-Biotech, Aidenbach, Nemačka) tokom 20 minuta, a zatim pažljivo prikupljene u FACS epruvete (Falcon®, Thermo Fisher Scientific). Ćelije su najpre okarakterisane na osnovu njihove veličine (FSC – *forward scatter*) i granularnosti (SSC – *side scatter*), čime je potvrđen njihov fenotipski profil karakterističan za diferencirane makrofage. Nakon ispiranja, površinski markeri su obeleženi fluorescentno konjugovanim antitelima u skladu sa uputstvima proizvođača (Tabela 45).

Tabela 45: Korišćena antitela za karakterizaciju makrofaga

Antitelo	Klon	Proizvođač
FITC-konjugovano anti-CD53	QA19A07	BioLegend
FITC-konjugovano anti-CD163	GHI/61	BioLegend
PE-konjugovano anti-CD206	19.2	Invitrogen Thermo Fisher Scientific

Nakon bojenja površinskih markera, ćelije su resuspendovane u 500 μ L PBS-a sa dodatkom 0,2% BSA i natrijum-azida (NaN_3) kako bi se obezbedili stabilni uslovi za analizu. Analiza je urađena na BD FACSCalibur™ uređaju (BD Biosciences, SAD), pri čemu je za svaki uzorak ukupno analizirano 10 000 ćelija. Pre same analize, ćelije su prvo selektovane na osnovu fizičkih osobina, veličine i granularnosti, kako bi se isključili ćelijski ostaci i mrtve ćelije. Fluorescentno obeležene ćelije analizirane su u skladu sa protokolima proizvođača, a podaci su obrađeni korišćenjem softvera BD CellQuest™ Pro, verzija 5.1. Na osnovu dobijenih histogram i dot-plotova, izračunat je procenat ćelija koje izražavaju specifične markere na površini, čime je kvantifikovana razlika u izraženosti fenotipskih karakteristika između M0 i M2 makrofaga.

7.12. Vezivanje H1sD2 glikoformi za površinske receptore na makrofagima

7.12.1. Obeležavanje proteina fluorescein-izotiocijanatom (FITC)

Radi ispitivanja interakcija sa receptorima na površini ćelija, H1sD2 glikoforme i Der p 2 protein su obeleženi fluorescein-izotiocijanatom (FITC; Sigma-Aldrich, SAD) u skladu sa uputstvom proizvođača. Uzorci proteina su pripremljeni u sveže pripremljenom 0,1 M natrijum-karbonatnom puferu, pH 9,0. FITC u koncentraciji 1 mg/mL je pripremljen u DMSO i polako je dodat u uzorak u alikvotima od po 5 μ L uz konstantno, blago mešanje. Na 1 mL uzorka proteina je dodato 50 μ L rastvora FITC-a. Nakon dodavanja FITC-a, smeša je inkubirana u mraku, tokom 8 sati na 4 °C. Potom

je dodat 50 mM amonijum-hlorid (NH_4Cl) i inkubacija je nastavljena još 2 sata na 4°C . Obeleženi proteini su zatim odvojeni od nevezanog FITC-a gel-filtracijom na Bio-Gel P-30 matriksu (Bio-Rad Laboratories, SAD) koristeći PBS, pH 7,4. Koncentracija proteina i stepen obeležavanja su određeni spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije pri 280 nm i 495 nm. Obeleženi proteini su čuvani na -20°C u PBS puferu, zaštićeni od svetlosti, do daljeg korišćenja.

7.12.2. Ispitivanje vezivanja FITC-obeležanih proteina za diferencirane THP-1 makrofage pomoću protočne citometrije

Kako bi se ispitalo vezivanje Der p 2 i H1sD2 glikoformi za površinske receptore, THP-1 monociti su zasejani u pločice od 24 bunara u gustini od 5×10^5 ćelija/bunar i diferencirani u M0 i M2 fenotipove makrofaga na prethodno opisan način. Nakon diferencijacije, M0 i M2 makrofagi su inkubirani sa Der p 2 i H1sD2 proteinima obeleženim FITC-om u koncentraciji od 500 nM tokom dva sata na 37°C i 5% CO_2 . Po završetku inkubacije, ćelije su isprane 3 puta PBS-om kako bi se uklonili nevezani proteini, a zatim, kako bi se odvojile od pločice, ćelije su tretirane akutatazom (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Nemačka). Nakon pola sata, ćelije su sakupljene sa pločice, prebačene su u FACS tube i isprane od akutaze. Resuspendovane su u 500 μL PBS-a koji sadrži 0,2% BSA i NaN_3 . Uzorci su analizirani pomoću protočnog citometra BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, SAD), a ukupno 10000 ćelija po uzorku je analizirano. Dobijeni sirovi podaci su obrađeni korišćenjem softvera BD CellQuest™ Pro verzije 5.1, a rezultati su prikazani kao procenat ćelija koje su pokazale pozitivnu fluorescenciju, odnosno specifično vezivanje FITC-obeležanih proteina. Sve je rađeno u duplikatu, a dobijeni rezultati su analizirani pomoću GraphPad Prism 9.0 programa.

7.12.3. Ispitivanje vezivanja FITC-obeležanih proteina za diferencirane THP-1 makrofage pomoću konfokalne mikroskopije

U pločicu od 24 bunara su dodata staklena stakalca i na njih su zasejane THP-1 ćelije (175×10^3 ćelija/bunaru), koje su potom diferencirane pomoću PMA i IL-4 u M2 makrofage u skladu sa prethodno opisanim protokolom. Nakon ispiranja 3 puta PBS-om, ćelije su inkubirane sa 500 nM Der p 2 i H1sD2 proteinima obeleženim FITC-om tokom 2 sata na 37°C i 5% CO_2 . Nakon toga, ćelije su 3 puta isprane PBS-om, a nespecifična vezivanja su blokirana pomoću 1% humanog serum albumina (HSA, Serva) u PBS-u tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su potom ponovo isprane i inkubirane sa anti-DC-SIGN antitelima konjugovanim sa PerCP-Cy5.5 (15 μL na 1 milion ćelija u 0,1% HSA/PBS) u trajanju od 20 minuta na 4°C . Nakon ponovnog ispiranja, ćelije su fiksirane na staklene pločice pomoću 4% paraformaldehida u 1% PBS-u, u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Stakalca sa fiksiranim ćelijama su prebačena na mikroskopska stakla i ostavljena da se suše na 4°C u mraku. Ćelije su analizirane pomoću konfokalnog mikroskopa (Leica TCS SP5 II, Leica Microsystems, Nemačka). Sve je rađeno u duplikatu, kao i negativna kontrola što su bile same ćelije i kontrola anti-DC-SIGN antitela, a snimci su napravljeni korišćenjem objektivsa sa $64\times$ uvećanjem i uz dodatno dvostruko uvećanje kako bi se snimile pojedinačne ćelije. Talasne dužine ekscitacije i emisije korišćene pri snimanju su prikazane u Tabeli 46.

Tabela 46: Talasne dužine ekscitacije i emisije

Fluorescentna boja	Ekscitacija	Emisioni maksimum
FITC (proteini)	488 nm	695 nm
Per CP- Cyanine 5.5	488 nm	516 nm

7.13. Genska ekspresija citokina RT-PCR metodom

U pločicu od 48 bunarića je zasejano po $0,3 \times 10^5$ THP-1 ćelija (200 μ L) koje su zatim tretirane 24 sata sa 100 ng/mL PMA na 37 °C i 5% CO₂. Nakon diferencijacije, ćelije su isprane tri puta PBS-om i inkubirane 24 sata u kompletnom RPMI medijumu na 37 °C i 5% CO₂ ("resting" period). Nakon diferencijacije, ćelije su tretirane 24 sata Der p 2 i H1sD2 antigenima u istim molskim koncentracijama (200 nM) na 37 °C i 5% CO₂. Nakon završenog tretmana, izolovana je ukupna RNA iz tretiranih ćelija radi daljeg analiziranja.

7.13.1. Izolovanje ukupne količine RNA

Za izolovanje ukupne RNA su korišćeni tretirani THP-1 makrofagi. Izolovanje je rađeno korišćenjem TRI[®] reagensa (Sigma Aldrich, SAD), tako što je na 10 cm² suda dodato po 1 mL reagensa. Ćelije su resuspendovane u reagensu pomoću automatske pipete i na taj način su lizirane, a zatim je u lizat dodat hloroform (0,2 mL na 1 mL TRI[®] reagensa) i inkubirano je 15 minuta na sobnoj temperaturi. Smeša je zatim centrifugirana 15 minuta na $12000 \times g$ na 4 °C, gde je došlo do izdvajanja tri faze: hloroformska, međufaza i gornja vodena faza. U hloroformskoj fazi su se ekstrahovali denaturisani proteini, u međufazi genomska DNK ćelija, a u vodenoj fazi ukupna RNA od interesa, tako da je taj sloj prebačen u novi sterilni ependorf. Pomešan je sa 2-propanolom (0,5 mL na 1 mL TRI[®] reagensa) i dobro promešan izvrtnjem ependorfa par puta. Smeša je ostavljena 10 minuta da se inkubira na sobnoj temperaturi, a zatim su ependorfi centrifugirani na $12000 \times g$ na 4 °C. Supernatant je odliven, a talog RNA je nakon sat vremena sušenja na sobnoj temperaturi rastvoren u 20 μ L ultračiste miliQ vode. Na NanoDropTM-u (Thermo Scientific, SAD) je određena koncentracija i čistoća izolovane RNA, a sami uzorci su čuvani na -80 °C.

7.13.2. RT-PCR

Izolovana RNA je korišćena za analizu genske ekspresije citokina IL-4, IL-10 i IFN- γ . kako bi mogao da se odredi relativni nivo genske ekspresije i kako bi uzorci bili uporedivi, korišćene su iste količine RNK po reakcionoj smeši. Za analizu je korišćen KAPA[®] SYBR FAST Kit (Merck KGaA, SAD) i 100 ng izolovane RNA po reakciji. Uzorci su pripremani razblaživanjem izolovane RNA sa miliQ vodom koja je zatim prevođena u cDNA u reakciji reverzne transkripcije, a dobijena cDNA je dalje išla u PCR reakciju. Reakciona smješa je pripremljena po uputstvu proizvođača tako da je sadržala 100 ng izolovane RNA, MasterMix (2x), prajmere (*eng. forward* i *reverse*) u koncentraciji 10 μ M i reverznu transkriptazu (RT). Koraci za izvođenje RT-PCR analize koji su korišćeni su prikazani u Tabeli 47.

Tabela 47: Koraci u izvođenju RT-PCR reakcije

Koraci	Temperatura	Vreme	Broj ciklusa
Sinteza cDNA	42 °C	5 min	1
Inaktivacija reverzne transkriptaze	95 °C	5 min	1
Denaturacija	95 °C	10 s	40
Hibridizacija	T _m *	30 s	
Ekstenzija	72 °C	30 s	
Finalna ekstenzija	72 °C	7 min	1
Kraj	4 °C	/	1

*T_m zavisi od samih prajmera i za korišćene prajmere je data u Tabeli 48

Prajmeri su dizajnirani na osnovu sekvenci koje su preuzete iz NCBI baze podataka i prikazane su u Tabeli 48, a poručene su od Invitrogen kompanije (Thermo Fisher Scientific, SAD). Analiza relativne ekspresije gena je dobijena poređenjem i normalizacijom u odnosu na vrednosti koje su dobijene za konstitutivno eksprimirani gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH).

Tabela 48: Sekvence i T_m vrednosti korišćenih prajmera

Gen	Sekvenca	T _m
GAPDH	For: AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC Rev: CCGGAGGGGCCATCCACAGTCT	61 °C
IL-4	For: GCACCGAGTTGACCGTAACA Rev: AGGAATTCAAGCCCGCCAG	48 °C
IL-10	For: TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA Rev: TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA	50 °C
IFN-γ	For: ATTCGGTAACTGACTTGAATGTCC Rev: CTCTTCGACCTCGAAACAGC	49 °C

7.14. Tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi

Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMCs) su izolovane iz pune krvi pacijenta koji su alergični na HDM (Tabela 10, uzorci 1, 2, 4, 5 i 8). Svi uzorci su sakupljeni uz saglasnost pacijenata, a same uzorke je obezbedila prof. dr Marina Atanasković-Marković iz Dečje klinike "Tiršova", Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu. Puna krv je dobijena venskom punkcijom i sakupljanjem u vakutaner sa EDTA kao antikoagulansom. Za izolovanje PBMCs je korišćen rastvor Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich, SAD) kako bi se obezbedio koncentracioni gradijent.

Postupak izolovanja:

1. Krv je razblažena sterilnim PBS-om (v:v=1:1).
2. Histopaque®-1077 reagens je temperiran na sobnoj temperaturi.
3. Histopaque®-1077 reagens je polako nadslojen razblaženom krvlju (v:v=1:2).
4. Centrifugiranje sa isključenom kočnicom: 30 min, 450 × g, sobna temperatura.

5. Plazma pažljivo uklonjena, a međusloj u kome se nalaze PBMC pažljivo prebačen u sterilnu vaju (da se na zahvati reagens).
6. Izolovane PBMCs isprane 2x PBS-om.
7. Centrifugiranje sa isključenom kočnicom: 15 min, $300 \times g$, $4^\circ C$.
8. Izolovane PBMCs su izbrojane i razblažene do 1×10^6 ćelija/mL (kompletni RPMI-1640 medijum bez FBS).
9. Razblažene PBMCs zasejane u mikrotitar pločicu od 96 bunara ($250 \mu L$ /bunar).
10. Tretman PBMCs sa Der p 2 i H1sD2 proteinima koncentracije 500 nM u RPMI-1640 medijum bez FBS-a.
11. Nakon 48h supernatanti su sakupljeni i centrifugirani 10 minuta na $13400 \times g$ kako bise udaljile ćelije.
12. Ćelijski talozi su udaljeni, a supernatanti su ostavljeni na $-80^\circ C$ radi daljeg analiziranja sendvič ELISA testom.

7.15. Određivanje koncentracija sekretovanih citokina ELISA testom

Citokini čije koncentracije su određivane u supernatantu nakon stimulacije mišjih splenocita i PBMCs su IL-4, IL-10 i IFN- γ . Za određivanje koncentracija su korišćeni komercijalni ELISA MAXTM kitovi (BioLegend) i sve je rađeno po uputstvu proizvođača. Za izvođenje ELISA eseja su pripremljeni sledeći rastvori:

Tabela 49: Bikarbonatni pufer za kuplovanje

Komponenta	Količina
NaHCO ₃	0,84 g
Na ₂ CO ₃	0,36 g
Dejonizovana voda do	100 mL

Tabela 50: Puferisan fiziološki rastvora, PBS

Komponenta	Količina
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1,16 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,2 g
Dejonizovana voda do	1 L

Tabela 51: tPBS (0,05% Tween 20 u PBS)

Komponenta	Količina
Tween 20	0,5 mL
PBS	1 L

Tabela 52: 1% BSA rastvora za blokiranje

Komponenta	Količina
BSA	1 g
tPBS	100 mL

Tabela 53: Stopirajući reagens (2N sumporna kiselina)

Komponenta	Količina
H ₂ SO ₄	5,4 mL
Dejonizovana voda do	100 mL

Svi rastvori su pre korišćenja filtrirani kroz filter (0,22 µm). Standardni rastvori su pripremljeni od štokova dobijenih u kitovima i njihovim serijskim razblaženjem po uputstvu proizvođača (opseg koncentracija za IFN-γ: 500 do 7,8 pg/mL, a za IL-4 i IL-10: 250 do 3,9 pg/mL).

ELISA eseji su rađeni u duplikatu ili triplikatu u mikrotitar pločicama od 96 bunara prateći sledeće korake:

1. Kuplovanje antitela: Antitela za kuplovanje za sve citokine su pripremljena po uputstvu proizvođača u puferu za kuplovanje, izlivena u pločicu i pločica je ostavljena preko noći na 4 °C.
2. Ispiranje bunara: 4 puta tPBS-om kako bi se uklonila antitela koja se nisu kuplovala za pločicu.
3. Blokiranje bunara sat vremena 1% rastvorom BSA u tPBS na sobnoj temperature uz mešanje na 300 rpm.
4. Ispiranje bunara: 4 puta tPBS-om.
5. Inkubiranje sa standardnim rastvorima ili uzorcima nakon tretmana 2 sata na sobnoj temperature uz mešanje na 300 rpm.
6. Ispiranje bunara: 4 puta tPBS-om.
7. Inkubiranje sat vremena sa antitelima za detekciju na sobnoj temperature uz mešanje na 300 rpm.
8. Ispiranje bunara: 4 puta tPBS-om.
9. Inkubiranje pola sata sa rastvorom avidin-HRP koji je razblažen po uputstvu proizvođača na sobnoj temperature uz mešanje na 300 rpm.
10. Ispiranje bunara: 5 puta tPBS-om.
11. Detekcija dodatkom komercijalnog TMB rastvora (BioLegend, SAD) pola sata u mraku.
12. Zaustavljanje reakcije dodatkom stopirajućeg reagensa.
13. Očitavanje apsorbance na 450 nm i 570 nm.
14. Određivanje koncentracije sekretovanih citokina na osnovu standardne prave.

7.16. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti su urađeni u najmanje tri nezavisna biološka ponavljanja u duplikatu ili triplikatu. Srednje vrednosti za svaki eksperimenta su izračunate pomoću programa Microsoft Office Excel, a grafici su dizajnirani korišćenjem GraphPad Prism 9.0 programa, gde su dobijene SD

(standardna devijacija) i SEM (standardna greška sredine). Poređenje dobijenih vrednosti je urađeno pomoću analize varijanse (ANOVA), a statistička analiza je izvršena Bonferonijevim ili Kruskal-Wallis testom kako bi se odredile vrednosti za višestruka ponavljanja. Razlika u rezultatima je smatrana statistički značajnom ukoliko je $p < 0,05$. Statistička značajnost je prikazana na graphicima upotrebom odgovarajućih simbola (* ili #). Ispod svakog grafika je naznačeno šta simboli na slici predstavljaju.

8. Literatura

- [1] Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat Rev Immunol* 2021;21:739–51. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00538-7>.
- [2] Durham SR, Shamji MH. Allergen immunotherapy: past, present and future. *Nat Rev Immunol* 2023;23:317–28. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00786-1>.
- [3] Wang J, Zhou Y, Zhang H, Hu L, Liu J, Wang L, et al. Pathogenesis of allergic diseases and implications for therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8:138. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01344-4>.
- [4] Huang HJ, Sarzsinszky E, Vrtala S. House dust mite allergy: The importance of house dust mite allergens for diagnosis and immunotherapy. *Mol Immunol* 2023;158:54–67. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.04.008>.
- [5] Platts-Mills TAE, Erwin EA, Heymann PW, Woodfolk JA. Pro: The evidence for a causal role of dust mites in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:109–13. <https://doi.org/10.1164/rccm.200811-1756PR>.
- [6] Öçal R, Bayar Muluk N, Mullol J. Epidemiology of Allergic Rhinitis. *All Around the Nose*, Cham: Springer International Publishing; 2020, p. 297–301. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21217-9_33.
- [7] Vrtala S. Allergens from house dust and storage mites. *Allergo J Int* 2022;31:267–71. <https://doi.org/10.1007/s40629-022-00226-5>.
- [8] Jensen-Jarolim E, Roth-Walter F, Jordakieva G, Pali-Schöll I. Allergens and Adjuvants in Allergen Immunotherapy for Immune Activation, Tolerance, and Resilience. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2021;9:1780–9. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.12.008>.
- [9] Zubeldia JM, Ferrer M, Dávila I, Justicia JL. Adjuvants in allergen-specific immunotherapy: Modulating and enhancing the immune response. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2019;29:103–11. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0349>.
- [10] Gurgel RK, Baroody FM, Damask CC, Mims J “Whit,” Ishman SL, Baker DP, et al. Clinical Practice Guideline: Immunotherapy for Inhalant Allergy. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)* 2024;170:S1–42. <https://doi.org/10.1002/ohn.648>.
- [11] Mosbech H, Deckelmann R, De Blay F, Pastorello EA, Trebas-Pietras E, Andres LP, et al. Standardized quality (SQ) house dust mite sublingual immunotherapy tablet (ALK) reduces inhaled corticosteroid use while maintaining asthma control: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014;134. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.03.019>.
- [12] Virchow JC, Backer V, Kuna P, Prieto L, Nolte H, Villesen HH, et al. Efficacy of a house dust mite sublingual allergen immunotherapy tablet in adults with allergic asthma: A randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 2016;315:1715–25. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.3964>.
- [13] Agache I, Zemelka-Wiącek M, Shamji MH, Jutel M. Immunotherapy: State-of-the-art review of therapies and theratypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2022;150:1279–88. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.10.007>.
- [14] Novakova P, Tiotiu A, Baiardini I, Krusheva B, Chong-Neto H, Novakova S. Allergen immunotherapy in asthma: current evidence. *Journal of Asthma* 2021;58:223–30. <https://doi.org/10.1080/02770903.2019.1684517>.

- [15] Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2011;10:523–37. <https://doi.org/10.1586/erv.11.30>.
- [16] Pifferi C, Fuentes R, Fernández-Tejada A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nat Rev Chem* 2021;5:197–216. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-00244-3>.
- [17] Tarp MA, Clausen H. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2008;1780:546–63. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2007.09.010>.
- [18] Zhao T, Cai Y, Jiang Y, He X, Wei Y, Yu Y, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8:283. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01557-7>.
- [19] He M, Zhou X, Wang X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9:194. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01886-1>.
- [20] Wolfert MA, Boons GJ. Adaptive immune activation: Glycosylation does matter. *Nat Chem Biol* 2013;9:776–84. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1403>.
- [21] Baum LG, Cobb BA. The direct and indirect effects of glycans on immune function. *Glycobiology* 2017;27:619–24. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx036>.
- [22] Pinho SS, Alves I, Gaifem J, Rabinovich GA. Immune regulatory networks coordinated by glycans and glycan-binding proteins in autoimmunity and infection. *Cell Mol Immunol* 2023;20:1101–13. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01074-1>.
- [23] Sirvent S, Soria I, Cirauqui C, Cases B, Manzano AI, Diez-Rivero CM, et al. Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;138:558-567.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.029>.
- [24] Wen H, Qu L, Zhang Y, Xu B, Ling S, Liu X, et al. 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;182:777–87. <https://doi.org/10.1159/000512872>.
- [25] Angelina A, Martín-Cruz L, de la Rocha-Muñoz A, Lavín-Plaza B, Palomares O. C-Type Lectin Receptor Mediated Modulation of T2 Immune Responses to Allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 2023;23:141–51. <https://doi.org/10.1007/s11882-023-01067-0>.
- [26] Henrickson KJ. Parainfluenza Viruses. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:242–64. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>.
- [27] Forgione RE, Di Carluccio C, Kubota M, Manabe Y, Fukase K, Molinaro A, et al. Structural basis for Glycan-receptor binding by mumps virus hemagglutinin-neuraminidase. *Sci Rep* 2020;10:1589. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58559-6>.
- [28] Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, et al. The Receptor-Binding Site of the Measles Virus Hemagglutinin Protein Itself Constitutes a Conserved Neutralizing Epitope. *J Virol* 2013;87:3583–6. <https://doi.org/10.1128/jvi.03029-12>.
- [29] Harshbarger WD, Deming D, Lockbaum GJ, Attatippaholkun N, Kamkaew M, Hou S, et al. Unique structural solution from a VH 3-30 antibody targeting the hemagglutinin stem of influenza A viruses. *Nat Commun* 2021;12:559. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20879-6>.
- [30] Kanekiyo M, Graham BS. Next-generation influenza vaccines. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2021;11:1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038448>.

- [31] DuBois RM, Aguilar-Yañez JM, Mendoza-Ochoa GI, Oropeza-Almazán Y, Schultz-Cherry S, Alvarez MM, et al. The Receptor-Binding Domain of Influenza Virus Hemagglutinin Produced in *Escherichia coli* Folds into Its Native, Immunogenic Structure. *J Virol* 2011;85:865–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.01412-10>.
- [32] Nachbagauer R, Palese P. Development of next generation hemagglutinin-based broadly protective influenza virus vaccines. *Curr Opin Immunol* 2018;53:51–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.001>.
- [33] Rajan TV. The Gell–Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol* 2003;24:376–9. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00142-X).
- [34] Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Roitt's Essential Immunology, 13th Edition. 13th ed. London: John Wiley & Sons; 2017.
- [35] Akdis CA, Akdis M, Boyd SD, Sampath V, Galli SJ, Nadeau KC. Allergy: Mechanistic insights into new methods of prevention and therapy. *Sci Transl Med* 2023;15. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.add2563>.
- [36] Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454:445–54. <https://doi.org/10.1038/nature07204>.
- [37] Lu HF, Zhou YC, Yang LT, Zhou Q, Wang XJ, Qiu SQ, et al. Involvement and repair of epithelial barrier dysfunction in allergic diseases. *Front Immunol* 2024;15:1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1348272>.
- [38] Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:564–80. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>.
- [39] Jacquet A. Characterization of Innate Immune Responses to House Dust Mite Allergens: Pitfalls and Limitations. *Frontiers in Allergy* 2021;2:1–8. <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.662378>.
- [40] Hirose K, Iwata A, Tamachi T, Nakajima H. Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunol Rev* 2017;278:145–61. <https://doi.org/10.1111/imr.12540>.
- [41] Rahman RS, Wesemann DR. Immunology of allergen immunotherapy. *Immunotherapy Advances* 2022;2. <https://doi.org/10.1093/immadv/ltac022>.
- [42] Cheng B-H, Xiao X, Jin Y, Li J. Editorial: Mechanisms and advances in respiratory allergic diseases. *Front Immunol* 2023;14:660–660. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1186301>.
- [43] Wang Y, Zhang L, Shi B, Luo J. Trends and research foci in immunoregulatory mechanisms of allergic rhinitis: a bibliometric analysis (2014-2024). *Front Immunol* 2024;15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1443954>.
- [44] Bousquet J, Anto JM, Bachert C, Baiardini I, Bosnic-Anticevich S, Walter Canonica G, et al. Allergic rhinitis. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6:95. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00227-0>.
- [45] Grosse-Kathoefer S, Aglas L, Ferreira F, Pointner L. What inhalant allergens can do and not do?-The cooperation of allergens and their source in Th2 polarization and allergic sensitization. *Allergo J Int* 2023;32:258–68. <https://doi.org/10.1007/s40629-023-00262-9>.
- [46] Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15025. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.25>.

- [47] Ahrens W, Pigeot I. Handbook of epidemiology: Second edition. Springer New York; 2014. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-09834-0>.
- [48] Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, Hernandez Fernandez De Rojas D, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: What do we really know? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2015;136:38–48. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.012>.
- [49] Voorhorst R, Spieksma-Boezeman MI, Spieksma FT. IS A MITE (DERMATOPHAGOIDES SP.) THE PRODUCER OF THE HOUSE-DUST ALLERGEN? *Allerg Asthma (Leipz)* 1964;10:329–34.
- [50] Öçal R, Bayar Muluk N, Mullol J. Epidemiology of Allergic Rhinitis. In: Cingi C, Bayar Muluk N, editors. *All Around the Nose: Basic Science, Diseases and Surgical Management*, Cham: Springer International Publishing; 2020, p. 297–301. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21217-9_33.
- [51] Arlian LG, Morgan MS, Neal JS. Dust mite allergens: Ecology and distribution. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2:401–11. <https://doi.org/10.1007/s11882-002-0074-2>.
- [52] d'Alessandro M, Bergantini L, Perrone A, Cameli P, Beltrami V, Alderighi L, et al. House Dust Mite Allergy and the Der p1 Conundrum: A Literature Review and Case Series. *Allergies* 2021;1:108–14. <https://doi.org/10.3390/allergies1020008>.
- [53] Muddaluru V, Valenta R, Vrtala S, Schleiderer T, Hindley J, Hickey P, et al. Comparison of house dust mite sensitization profiles in allergic adults from Canada, Europe, South Africa and USA. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021;76:2177–88. <https://doi.org/10.1111/all.14749>.
- [54] Weghofer M, Grote M, Resch Y, Casset A, Kneidinger M, Kopec J, et al. Identification of Der p 23, a Peritrophin-like Protein, as a New Major Dermatophagoides pteronyssinus Allergen Associated with the Peritrophic Matrix of Mite Fecal Pellets . *The Journal of Immunology* 2013;190:3059–67. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202288>.
- [55] Jiménez-Feijoo R, Pascal M, Moya R, Riggioni C, Domínguez O, Lózano J, et al. Molecular diagnosis in house dust mite–Allergic patients suggests that der p 23 is clinically relevant in asthmatic children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2020;30:127–32. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0431>.
- [56] Romero-Sánchez L, Otero A, González-Rivas M, Lojo S, González-Quintela A, Vidal C. Der p 23 sensitization in patients with house dust mite respiratory allergy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2024;56:79–85. <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.264>.
- [57] Thomas WR. IgE and T-cell responses to house dust mite allergen components. *Mol Immunol* 2018;100:120–5. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.016>.
- [58] Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *Journal of Clinical Investigation* 1999;104:123–33. <https://doi.org/10.1172/JCI5844>.
- [59] Soh WT, Le Mignon M, Suratannon N, Satitsuksanoa P, Chatchatee P, Wongpiyaboron J, et al. The House Dust Mite Major Allergen der p 23 Displays O-Glycan-Independent IgE Reactivities but No Chitin-Binding Activity. *Int Arch Allergy Immunol* 2016;168:150–60. <https://doi.org/10.1159/000442176>.
- [60] Derewenda U, Li J, Derewenda Z, Dauter Z, Mueller GA, Rule GS, et al. The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications. *J Mol Biol* 2002;318:189–97. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00027-X).

- [61] Reginald K, Chew FT. The major allergen Der p 2 is a cholesterol binding protein. *Sci Rep* 2019;9:1556. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38313-9>.
- [62] Trompette A, Divanovic S, Visintin A, Blanchard C, Hegde RS, Madan R, et al. Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 2009;457:585–8. <https://doi.org/10.1038/nature07548>.
- [63] Österlund C, Grönlund H, Polovic N, Sundström S, Gafvelin G, Bucht A. The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF- κ B and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clinical & Experimental Allergy* 2009;39:1199–208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03284.x>.
- [64] Tsai JJ, Liu SH, Yin SC, Yang CN, Hsu HS, Chen WB, et al. Mite allergen Der-p2 triggers human B lymphocyte activation and Toll-like receptor-4 induction. *PLoS One* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023249>.
- [65] Atanasio A, Orengo JM, Sleeman MA, Stahl N. Biologics as novel therapeutics for the treatment of allergy: Challenges and opportunities. *Frontiers in Allergy* 2022;3. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.1019255>.
- [66] Morita H, Matsumoto K, Saito H. Biologics for allergic and immunologic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2022;150:766–77. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.08.009>.
- [67] Noon L. PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. *The Lancet* 1911;177:1572–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)78276-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)78276-6).
- [68] Moote W, Kim H, Ellis AK. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 2018;14:1–10. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0282-5>.
- [69] Pavón-Romero GF, Parra-Vargas MI, Ramírez-Jiménez F, Melgoza-Ruiz E, Serrano-Pérez NH, Teran LM. Allergen Immunotherapy: Current and Future Trends. *Cells* 2022;11:212. <https://doi.org/10.3390/cells11020212>.
- [70] Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *The Lancet* 2004;363:608–15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15592-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15592-X).
- [71] Shamji MH, Bellido V, Scadding GW, Layhadi JA, Cheung DKM, Calderon MA, et al. Effector cell signature in peripheral blood following nasal allergen challenge in grass pollen allergic individuals. *Allergy* 2015;70:171–9. <https://doi.org/10.1111/all.12543>.
- [72] Frew AJ. Allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;125:S306–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.064>.
- [73] Tsaouri S, Mavroudi A, Feketea G, Guibas G V. Subcutaneous and sublingual immunotherapy in allergic asthma in children. *Front Pediatr* 2017;5. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00082>.
- [74] Roberts G, Pfaar O, Akdis CA, Ansotegui IJ, Durham SR, Gerth van Wijk R, et al. EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy* 2018;73:765–98. <https://doi.org/10.1111/all.13317>.
- [75] Bousquet J, Lockey R, Malling H. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1998;102:558–62. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(98\)70271-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(98)70271-4).
- [76] Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, et al. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;137:358–68. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1300>.

- [77] Arshad SH. An update on allergen immunotherapy. *Clinical Medicine* 2016;16:584–7. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-584>.
- [78] Bae JM, Choi YY, Park CO, Chung KY, Lee KH. Efficacy of allergen-specific immunotherapy for atopic dermatitis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013;132:110–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.044>.
- [79] Cox L, Nelson H, Lockey R, Calabria C, Chacko T, Finegold I, et al. Allergen immunotherapy: A practice parameter third update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011;127:S1–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.09.034>.
- [80] Guo B-C, Wu K-H, Chen C-Y, Lin W-Y, Chang Y-J, Lin M-J, et al. Advancements in Allergen Immunotherapy for the Treatment of Atopic Dermatitis. *Int J Mol Sci* 2024;25:1316. <https://doi.org/10.3390/ijms25021316>.
- [81] James C, Bernstein DI. Allergen immunotherapy: an updated review of safety. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2017;17:55–9. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000335>.
- [82] Renand A, Shamji MH, Harris KM, Qin T, Wambre E, Scadding GW, et al. Synchronous immune alterations mirror clinical response during allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018;141:1750-1760.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.041>.
- [83] Shamji MH, Larson D, Eifan A, Scadding GW, Qin T, Lawson K, et al. Differential induction of allergen-specific IgA responses following timothy grass subcutaneous and sublingual immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2021;148:1061-1071.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.030>.
- [84] Palomares O, Akdis M, Martín-Fontecha M, Akdis CA. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. *Immunol Rev* 2017;278:219–36. <https://doi.org/10.1111/imr.12555>.
- [85] Kucuksezer UC, Ozdemir C, Cevhertas L, Ogulur I, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and allergen tolerance. *Allergology International* 2020;69:549–60. <https://doi.org/10.1016/J.ALIT.2020.08.002>.
- [86] Noval Rivas M, Chatila TA. Regulatory T cells in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;138:639–52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.003>.
- [87] Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes & Immunity* 2014 15:8 2014;15:511–20. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.45>.
- [88] van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013;131:1204–12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.014>.
- [89] von Bubnoff D, Geiger E, Bieber T. Antigen-presenting cells in allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001;108:329–39. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.117457>.
- [90] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organization Journal* 2015;8. <https://doi.org/10.1186/s40413-015-0063-2>.
- [91] Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016;137:984–97. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.004>.

- [92] Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts* 2022;8:12. <https://doi.org/10.1007/s40828-022-00163-4>.
- [93] Wang L, Zhang S, Wu H, Rong X, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* 2019;106:345–58. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>.
- [94] Marsh DG, Lichtenstein LM, Campbell DH. Studies on “Allergoids” Prepared from Naturally Occurring Allergens I. ASSAY OF ALLERGENICITY AND ANTIGENICITY OF FORMALINIZED RYE GROUP I COMPONENT*. vol. 18. 1970.
- [95] Pfaar O, Bachert C, Bufe A, Buhl R, Ebner C, Eng P, et al. Guideline on allergen-specific immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases. *Allergo Journal* 2014;23:28–67. <https://doi.org/10.1007/s40629-014-0032-2>.
- [96] Compalati E, Incorvaia C, Cavaliere C, Masieri S, Gargiulo A, Frati F. The role of allergoids in allergen immunotherapy: from injective to sublingual route. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2020;52:195. <https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.142>.
- [97] Gaur S. Allergoid preparations for allergen immunotherapy: A brief overview. *Indian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 2018;32:1. https://doi.org/10.4103/ijaai.ijaai_37_17.
- [98] Hüser C, Dieterich P, Singh J, Shah-Hosseini K, Allekotte S, Lehmacher W, et al. A 12-week DBPC dose-finding study with sublingual monomeric allergoid tablets in house dust mite-allergic patients. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017;72:77–84. <https://doi.org/10.1111/all.12913>.
- [99] Pauli G, Larsen TH, Rak S, Horak F, Pastorello E, Valenta R, et al. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008;122:951–60. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.09.017>.
- [100] Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005;116:608–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.06.004>.
- [101] Niederberger V, Horak F, Vrtala S, Spitzauer S, Krauth M-T, Valent P, et al. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:14677–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404735101>.
- [102] Shamji MH, Kappen J, Abubakar-Waziri H, Zhang J, Steveling E, Watchman S, et al. Nasal allergen-neutralizing IgG 4 antibodies block IgE-mediated responses: Novel biomarker of subcutaneous grass pollen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2019;143:1067–76. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.039>.
- [103] Boonpiyathad T, Satitsuksanoa P, Akdis M, Akdis CA. IL-10 producing T and B cells in allergy. *Semin Immunol* 2019;44:101326. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2019.101326>.
- [104] Orenge JM, Radin AR, Kamat V, Badithe A, Ben LH, Bennett BL, et al. Treating cat allergy with monoclonal IgG antibodies that bind allergen and prevent IgE engagement. *Nat Commun* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03636-8>.
- [105] Shamji MH, Singh I, Layhadi JA, Ito C, Karamani A, Kouster L, et al. Passive prophylactic administration with a single dose of Anti-Fel d 1 monoclonal antibodies REGN1908–1909 in cat allergen-induced allergic rhinitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;204:23–33. <https://doi.org/10.1164/rccm.202011-4107OC>.

- [106] Niederberger V, Neubauer A, Gevaert P, Zidarn M, Worm M, Aberer W, et al. Safety and efficacy of immunotherapy with the recombinant B-cell epitope-based grass pollen vaccine BM32. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018;142:497-509.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.052>.
- [107] Gamazo C, D'Amelio C, Gastaminza G, Ferrer M, Irache JM. Adjuvants for allergy immunotherapeutics. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13:2416–27. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1348447>.
- [108] Kim IS. New approaches to immunotherapy in house dust mite allergy. *Clin Exp Pediatr* 2023;66:161–8. <https://doi.org/10.3345/cep.2022.00479>.
- [109] Lin Y-J, Zimmermann J, Schülke S. Novel adjuvants in allergen-specific immunotherapy: where do we stand? 2024. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1348305>.
- [110] Satitsuksanoa P, Angelina A, Palomares O, Akdis M. Mechanismen bei AIT: Erkenntnisse 2021. *Allergologie* 2022;45:848–56. <https://doi.org/10.5414/ALX02300E>.
- [111] Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010;140:805–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- [112] Verma SK, Mahajan P, Singh NK, Gupta A, Aggarwal R, Rappuoli R, et al. New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective. *Front Immunol* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1043109>.
- [113] Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>.
- [114] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2004;17:1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>.
- [115] Marth K, Breyer I, Focke-Tejkl M, Blatt K, Shamji MH, Layhadi J, et al. A Nonallergenic Birch Pollen Allergy Vaccine Consisting of Hepatitis PreS–Fused Bet v 1 Peptides Focuses Blocking IgG toward IgE Epitopes and Shifts Immune Responses to a Tolerogenic and Th1 Phenotype. *The Journal of Immunology* 2013;190:3068–78. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202441>.
- [116] Nieto A, Mazón Á, Nieto M, Ibáñez E, Jang DT, Calaforra S, et al. First-in-human phase 2 trial with mite allergoids coupled to mannan in subcutaneous and sublingual immunotherapy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2022;77:3096–107. <https://doi.org/10.1111/all.15374>.
- [117] Benito-Villalvilla C, Pérez-Diego M, Angelina A, Kisand K, Rebane A, Subiza JL, et al. Allergoid-mannan conjugates reprogram monocytes into tolerogenic dendritic cells via epigenetic and metabolic rewiring. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2022;149:212-222.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.06.012>.
- [118] Soria I, López-Relaño J, Viñuela M, Tudela J -I., Angelina A, Benito-Villalvilla C, et al. Oral myeloid cells uptake allergoids coupled to mannan driving Th1/Treg responses upon sublingual delivery in mice. *Allergy* 2018;73:875–84. <https://doi.org/10.1111/all.13396>.
- [119] Van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses 2008. <https://doi.org/10.1038/ni.f.203>.
- [120] Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017;27:3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>.
- [121] Vicente MM, Alves I, Fernandes Â, Dias AM, Santos-Pereira B, Pérez-Anton E, et al. Mannosylated glycans impair normal T-cell development by reprogramming commitment and repertoire diversity. *Cell Mol Immunol* 2023;20:955–68. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01052-7>.

- [122] Astronomo RD, Burton DR. Carbohydrate vaccines: Developing sweet solutions to sticky situations? *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:308–24. <https://doi.org/10.1038/nrd3012>.
- [123] Baum LG, Cobb BA. The direct and indirect effects of glycans on immune function. *Glycobiology* 2017;27:619–24. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx036>.
- [124] Amon R, Reuven EM, Leviatan Ben-Arye S, Padler-Karavani V. Glycans in immune recognition and response. *Carbohydr Res* 2014;389:115–22. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.02.004>.
- [125] Alves I, Fernandes Â, Santos-Pereira B, Azevedo CM, Pinho SS. Glycans as a key factor in self and nonself discrimination: impact on the breach of immune tolerance. *FEBS Lett* 2022;596:1485–502. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14347>.
- [126] Rabinovich GA, Toscano MA. Turning “sweet” on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009;9:338–52. <https://doi.org/10.1038/nri2536>.
- [127] Crispin M, Ward AB, Wilson IA. Structure and Immune Recognition of the HIV Glycan Shield. *Annu Rev Biophys* 2018;23. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys>.
- [128] Krumm SA, Doores KJ. Targeting Glycans on Human Pathogens for Vaccine Design, 2018, p. 129–63. https://doi.org/10.1007/82_2018_103.
- [129] Damian RT. Molecular mimicry: Antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am Nat* 1964;98:129–49.
- [130] Banerjee N, Mukhopadhyay S. Viral glycoproteins: biological role and application in diagnosis. *Virusdisease* 2016;27:1–11. <https://doi.org/10.1007/s13337-015-0293-5>.
- [131] Kosik I, Yewdell JW. Influenza hemagglutinin and neuraminidase: Yin–yang proteins coevolving to thwart immunity. *Viruses* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/v11040346>.
- [132] She Y-M, Farnsworth A, Li X, Cyr TD. Topological N-glycosylation and site-specific N-glycan sulfation of influenza proteins in the highly expressed H1N1 candidate vaccines. *Sci Rep* 2017;7:10232. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10714-2>.
- [133] Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P, Wilson IA. Structure of the Uncleaved Human H1 Hemagglutinin from the Extinct 1918 Influenza Virus. *Science* (1979) 2004;303:1866–70. <https://doi.org/10.1126/science.1093373>.
- [134] Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2012;88:226–49. <https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>.
- [135] Tate MD, Job ER, Deng YM, Gunalan V, Maurer-Stroh S, Reading PC. Playing hide and seek: How glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses* 2014;6:1294–316. <https://doi.org/10.3390/v6031294>.
- [136] Liu Y, Chen H, Sun Y, Chen F. Antiviral role of toll-like receptors and cytokines against the new 2009 H1N1 virus infection. *Mol Biol Rep* 2012;39:1163–72. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0846-7>.
- [137] York IA, Stevens J, Alymova I V. Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. *Biosci Rep* 2019;39:1–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20171505>.
- [138] Kianmehr M, Ghorani V, Boskabady MH. Animal model of asthma, various methods and measured parameters, a methodological review. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2016;15:445–65.
- [139] Chapman DG, Tully JE, Nolin JD, Janssen-Heininger YM, Irvin CG. Animal models of allergic airways disease: Where are we and where to next? *J Cell Biochem* 2014;115:2055–64. <https://doi.org/10.1002/jcb.24881>.

- [140] Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma. *European Respiratory Journal* 2003;22:374–82. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00026403>.
- [141] Herz U, Renz H, Wiedermann U. Animal models of type I allergy using recombinant allergens. *Methods* 2004;32:271–80. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.08.013>.
- [142] Mcmillan SJ, Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clinical & Experimental Allergy* 2004;34:497–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01895.x>.
- [143] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma From Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720–45. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.5.9903102>.
- [144] Gorska MM. Mouse models of asthma. *Methods in Molecular Biology* 2018;1809:351–62. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8570-8_23.
- [145] Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, et al. Mouse models of asthma: A comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflammation Research* 2009;58:845–54. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0054-2>.
- [146] Ganeshpurkar A, Saluja AK. Experimental animal models used for evaluation of potential immunomodulators: A mini review. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 2017;55:211–6. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.08.002>.
- [147] Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014;23:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>.
- [148] Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>.
- [149] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549–55. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02302-5).
- [150] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958–69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- [151] Cheng X, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4+ T cells. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:36896–904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409516>.
- [152] Takeuchi O, Akira S. Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur J Immunol* 2011;41:2490–3. <https://doi.org/10.1002/eji.201141792>.
- [153] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677–86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
- [154] Nielsen J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 2013;4:207–11. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>.
- [155] Kulagina N, Besseau S, Godon C, Goldman GH, Papon N, Courdavault V. Yeasts as Biopharmaceutical Production Platforms. *Frontiers in Fungal Biology* 2021;2. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.733492>.
- [156] Madhavan A, Arun KB, Sindhu R, Krishnamoorthy J, Reshmy R, Sirohi R, et al. Customized yeast cell factories for biopharmaceuticals: from cell engineering to process scale up. *Microb Cell Fact* 2021;20. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-z>.

- [157] Kavšček M, Stražar M, Curk T, Natter K, Petrovič U. Yeast as a cell factory: Current state and perspectives. *Microb Cell Fact* 2015;14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0281-x>.
- [158] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 2005;18:119–38. <https://doi.org/10.1002/jmr.687>.
- [159] Safder I, Khan S, Islam I, Kazim Ali M, Bibi Z, Wagas M. *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Journal Biomedical Letters* 2018;4:1–14.
- [160] Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 2007. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>.
- [161] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:5301–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.
- [162] Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol* 2015. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.12.3376>.
- [163] Trimble RB, Atkinson PH, Tschopp JF, Townsend RR, Maley F. Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biological Chemistry* 1991.
- [164] Laukens B, De Visscher C, Callewaert N. Engineering yeast for producing human glycoproteins: Where are we now? *Future Microbiol* 2015;10:21–34. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.104>.
- [165] Lao-Araya M. Novel Approaches to Allergen Immunotherapy for Respiratory Allergies. *Pharmaceuticals* 2024;17. <https://doi.org/10.3390/ph17111510>.
- [166] Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004;82:488–96. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>.
- [167] Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a Ragweed–Toll-Like Receptor 9 Agonist Vaccine for Allergic Rhinitis. *New England Journal of Medicine* 2006;355:1445–55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052916>.
- [168] Capitani N, Baldari CT. The Immunological Synapse: An Emerging Target for Immune Evasion by Bacterial Pathogens. *Front Immunol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.943344>.
- [169] Berreiros-Hortala H, Vilchez-Pinto G, Diaz-Perales A, Garrido-Arandia M, Tome-Amat J. Virus-like Particles as Vaccines for Allergen-Specific Therapy: An Overview of Current Developments. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol 25, Page 7429 2024;25:7429. <https://doi.org/10.3390/IJMS25137429>.
- [170] Lavie M, Hanouille X, Dubuisson J. Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00910>.
- [171] Salpini R, Piermatteo L, Battisti A, Colagrossi L, Aragri M, Rosa KY La, et al. A hyperglycosylation of HBV surface antigen correlates with HBsAg-Negativity at immunosuppression-driven HBV reactivation in vivo and hinders HBsAg recognition in vitro. *Viruses* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/v12020251>.
- [172] Bajic G, Maron MJ, Adachi Y, Onodera T, McCarthy KR, McGee CE, et al. Influenza Antigen Engineering Focuses Immune Responses to a Subdominant but Broadly Protective Viral Epitope. *Cell Host Microbe* 2019;25:827–835.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.003>.

- [173] Juturu V, Wu JC. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem* 2018;19:7–21. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700460>.
- [174] Hardy E, Martínez E, Diago D, Díaz R, González D, Herrera L. Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 2000;77:157–67. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00201-1).
- [175] Li J, Shi LW, Yu BW, Huang LR, Zhou LY, Shi L, et al. Safety and immunogenicity of a *pichia pastoris*-expressed bivalent human papillomavirus (types 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in healthy Chinese women aged 9–45 years: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 clinical trial. *Vaccine* 2023;41:3141–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.04.009>.
- [176] Bejenaru C, Radu A, Mogoșanu GD, Bejenaru LE, Biță A, Segneanu A-E. *Fungi. Natural Products and Medicinal Properties of Carpathian (Romanian) Plants*. 4th ed., New York: CRC Press; 2024, p. 197–226. <https://doi.org/10.1201/9781003270515-18>.
- [177] Baxter EW, Graham AE, Re NA, Carr IM, Robinson JI, Mackie SL, et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods* 2020;478:112721. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>.
- [178] Rahimi N. C-Type Lectin CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN: Cell Adhesion Molecules Turned to Pathogen Recognition Receptors 2020:1–17. <https://doi.org/10.20944/preprints202011.0245.v2>.
- [179] Londrigan SL, Tate MD, Brooks AG, Reading PC. Cell-surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus. *J Leukoc Biol* 2012;92:97–106. <https://doi.org/10.1189/jlb.1011492>.
- [180] Hillaire MLB, Nieuwkoop NJ, Boon ACM, de Mutsert G, Vogelzang-van Trierum SE, Fouchier RAM, et al. Binding of DC-SIGN to the Hemagglutinin of Influenza A Viruses Supports Virus Replication in DC-SIGN Expressing Cells. *PLoS One* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056164>.
- [181] Yang ZS, Huang SW, Wang WH, Lin CY, Wang CF, Urbina AN, et al. Identification of important n-linked glycosylation sites in the hemagglutinin protein and their functional impact on DC-SIGN mediated avian influenza H5N1 infection. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms22020743>.
- [182] Londrigan SL, Turville SG, Tate MD, Deng Y-M, Brooks AG, Reading PC. N-Linked Glycosylation Facilitates Sialic Acid-Independent Attachment and Entry of Influenza A Viruses into Cells Expressing DC-SIGN or L-SIGN. *J Virol* 2011;85:2990–3000. <https://doi.org/10.1128/jvi.01705-10>.
- [183] Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon- γ on immune and allergic responses. vol. 100. 2005.
- [184] Coomes SM, Kannan Y, Pelly VS, Entwistle LJ, Guidi R, Perez-Lloret J, et al. CD4 + Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation. *Mucosal Immunol* 2017;10:150–61. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.47>.
- [185] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. *J Clin Invest* 2014;124:4678–80. <https://doi.org/10.1172/JCI78891>.
- [186] Lee SP, Shin YS, Kang SY, Kim TB, Lee SM. Recent Advances in Allergen-Specific Immunotherapy in Humans: A Systematic Review. *Immune Netw* 2022;22:1–13. <https://doi.org/10.4110/in.2022.22.e12>.

- [187] Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014;133:621–31. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1088>.
- [188] Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. INNATE IMMUNE RESPONSE IN TH1- AND TH2-DOMINANT MOUSE STRAINS. *Shock* 2004;22:460–6. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>.
- [189] Chang Y-S, Kim Y-K, Jeon SG, Kim S-H, Kim S-S, Park H-W, et al. Influence of the Adjuvants and Genetic Background on the Asthma Model Using Recombinant Der f 2 in Mice. *Immune Netw* 2013;13. <https://doi.org/10.4110/in.2013.13.6.295>.
- [190] Collins AM. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunol Cell Biol* 2016;94:949–54. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.65>.
- [191] Hove CL Van, Maes T, Cataldo DD, Guéders MM, Palmans E, Joos GF, et al. Comparison of acute inflammatory and chronic structural asthma-like responses between C57BL/6 and BALB/c Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149. <https://doi.org/10.1159/000199715>.
- [192] Zhang Q, Zhu W, Zou Z, Yu W, Gao P, Wang Y, et al. A Preliminary Study in Immune Response of BALB/c and C57BL/6 Mice with a Locally Allergic Rhinitis Model. *Am J Rhinol Allergy* 2023;37:410–8. <https://doi.org/10.1177/19458924231157619>.
- [193] Kung TT, Jones H, Adams IGK, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, et al. Characterization of a Murine Model of Allergic Pulmonary Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;105:83–90. <https://doi.org/10.1159/000236807>.
- [194] Medoff BD, Seung E, Hong S, Thomas SY, Sandall BP, Duffield JS, et al. CD11b+ Myeloid Cells Are the Key Mediators of Th2 Cell Homing into the Airway in Allergic Inflammation. *The Journal of Immunology* 2009;182:623–35. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.623>.
- [195] Tang Y, Guan SP, Chua BYL, Zhou Q, Ho AWS, Wong KHS, et al. Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012;129:1611–1620.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.976>.
- [196] Schmidt-Weber CB, Blaser K. Regulation and role of transforming growth factor- β in immune tolerance induction and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2004;16:709–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.09.008>.
- [197] Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004;22:460–6. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>.
- [198] Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011;127:701–721.e70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>.
- [199] Gour N, Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine* 2015;75:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.014>.
- [200] Olsen J V, Mann M, Shevchenko A, Tomas H, Havlis J. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2007;1:2856–60. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>.
- [201] Tournoy KG, Kips JC, Schou C, Pauwels RA. Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Clinical and Experimental Allergy* 2000;30:79–85. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00772.x>.

Biografija

Zorana Lopandić rođena je 19.12.1993. u Bijeljini, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije biohemije upisala je 2012. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a diplomirala 2017. sa prosekom 8,38. Završni rad pod naslovom “Kloniranje BanLec u pET-23b-GFP vektor, ekspresija, prečišćavanje i karakterizacija dobijenog proteina” odbranila je sa ocenom 10. Master studije završila je 2018. sa prosekom 9,80, odbranivši rad pod naslovom “Optimizacija procesa prečišćavanja i karakterizacija rekombinantnog BanLec-GFP proteina” sa ocenom 10. Doktorske studije biohemije upisala je 2018. godine. Radila je kao istraživač pripravnik i saradnik na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gde je bila angažovana i u nastavi na više predmeta pri Katedri za biohemiju (2018 - 2023). Učestvovala je na projektima Ministarstva nauke Republike Srbije: „Alergeni, antitela, enzimi i mali fiziološki značajni molekuli: dizajn, struktura, funkcija i značaj“ (172049) i „Hipersenzitivne reakcije na lekove kod dece“ (451-03-137/2025-03/200110) i Fonda za inovacionu delatnost „Novi pristupi lečenju intoksikacije toksinom tetanusa“ (PoC-5132). Takođe, učestvovala je u realizaciji HORIZON-MSCA-DN-2021 ALLPreT projekta „Allergenicity Prediction Toolbok for Novel Foods“. Od septembra 2023. zaposlena je kao asistent na Institutu za hemiju u medicini, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dobitnica je FEBS stipendije, tokom koje je 2022. boravila na Univerzitetu Južne Danske u grupi prof. Ole N. Jensena. Dobitnica je brojnih stipendija za učešće na međunarodnim inostranim kongresima, gde je aktivno učestvovala. Osvojila je prvu nagradu za najbolji poster na Konferenciji Biohemijskog društva Srbije 2022. i prvu nagradu na StartUp takmičenju u okviru programa “Inovacioni inkubatori”. Istraživačke rezultate prezentovala je na virtuelnoj COST Akciji CA18132 „GLYCONanoPROBES“ (2021), na Danima imunologije (2024) i FEBS3+ konferenciji (2025). Član je Biohemijskog društva Srbije od 2018, a od 2023. i Društva imunologa Srbije i Srpskog udruženja za proteomiku.

Прилог 1

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Зорана Лопандић

Број индекса ДБ01/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**”Испитивање терапеутског ефекта H1sD2 химера и њених гликоформи на
модулацију имунског одговора код алергије на кућну прашину”**

- 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: Зорана Лопандић

Број индекса: ДБ01/2018

Студијски програм: Биохемија

Наслов рада: ”Испитивање терапеутског ефекта H1sD2 химера и њених гликоформи
на модулацију имунског одговора код алергије на кућну прашину”

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

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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 терапеутског ефекта H1sD2 химера и њених гликоформи на модулацију имунског одговора код алергије на кућну прашину”

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.** Дозвољавање 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.** Дозвољавање 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.** Дозвољавање 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.** Дозвољавање 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.** Дозвољавање 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.** Дозвољавање 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.