

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Ana I. Đorđević–Vujičić

**SELEKCIJA SPECIFIČNIH ANTIGENA VIRUSA
HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE I VIRUSA
HEPATITISA C ZA PROGNOŠTIČKE I
DIJAGNOSTIČKE ELISA TESTOVE KORIŠĆENJEM
BIOINFORMATIČKIH METODA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Ana I. Đorđević – Vujičić

**SELECTION OF SPECIFIC ANTIGENS OF HUMAN
IMMUNODEFICIENCY VIRUS AND HEPATITIS C
VIRUS FOR PROGNOSTIC AND DIAGNOSTIC
ELISA BY USING BIOINFORMATICS METHODS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentori

dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu Farmaceutski fakultet

dr Nevena Veljković, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za nuklearne nauke „Vinča”

Član komisije

dr Zorica Stojić-Vukanić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Zahvalnost i poštovanje dugujem prof. dr Vesni Spasojević-Kalimanovskoj, svom mentoru, zbog pomoći, podrške i saveta u toku doktorskih studija i izrade teze.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Neveni Veljković, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, na ukazanom poverenju, razumevanju, kao i na nesebičnoj pomoći i podršci tokom izrade ove teze.

Zahvaljujem se prof. dr Zorici Stojić-Vukanić na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade disertacije.

Veliko hvala na podršci i doprinosu ovom radu Branislavi Gemović, dr Sanji Glišić, dr Veljku Veljkoviću, Vladimiru Peroviću i Nebojši Škrbiću, kolegama iz Centra za multidisciplinarna istraživanja, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”.

U toku eksperimentalnog rada pomogli su mi dr Ursula Dietrich i Sascha Antoni sa Instituta za biomedicinska istraživanja „Georg-Speyer-Haus” iz Frankfurta, dr Maria Sakarellos-Daitsiotis sa Hemijskog fakulteta u Janjini, kao i dr Nada Vasiljević, prof. dr Violeta Dopsaj i dr Jelena Martinović na čemu im srdačno zahvaljujem.

Mojoj kolegici, mr ph Mileni Veljković bez koje bi sve ovo bilo mnogo teže, zahvaljujem se na podršci i pomoći u toku izvođenja eksperimentalnih analiza.

Zahvaljujem se svojoj porodici na razumevanju i podršci da istrajem.

**SELEKCIJA SPECIFIČNIH ANTIGENA VIRUSA HUMANE
IMUNODEFICIJENCIJE I VIRUSA HEPATITISA C ZA PROGNOŠTIČKE I
DIJAGNOŠTIČKE ELISA TESTOVE KORIŠĆENJEM BIOINFORMATIČKIH
METODA**

Rezime

Uvod Postojanje specifičnih i osjetljivih, a samim tim, i pouzdanih imunohemijskih testova za detekciju brojnih virusa, između ostalog i virusa hepatitisa C (HCV) i virusa humane imunodeficijencije (HIV), je od velikog značaja u savremenoj dijagnostici. Sličnosti velikog broja proteina virusa i humanih proteina je ozbiljan izazov prilikom odabira specifičnog antigena za ELISA test, zbog potencijalnog unakrsnog imunskog prepoznavanja. Danas se sistemskim računarskim analizama proteinskih sekvenci mogu utvrditi karakteristične sličnosti i razlike na nivou celokupnih virusnih i humanih proteoma. Cilj ovog rada je bio da se iz naučne literature identifikuju sve sekvence humanih antigena koji su potencijalne mete urođenog humoralnog imunskog odgovora i da se na osnovu integrisanih bioinformatičkih analiza definišu specifični antigeni za: 1. anti-HCV ELISA skrining testove i 2. ELISA testove kojima bi se određivala antitela koja su karakteristična za neprogresivnu HIV-1 infekciju.

Metode Studija informacionih karakteristika proteinskih sekvenci virusnih i humanih antigena je izvršena bioinformatičkim programskim paketom zasnovanim na metodi informacionih spektara. Za upoređivanje sekvenci i ispitivanje homologije korišćeni su programi za lokalno i globalno poravnavanje sekvenci. Biološki klasteri u proteinskim skupovima identifikovani su programima kojima se analizira obogaćenje pojmovima iz baze podataka GENE ONTOLOGY. *In house* testovima ispitana je specifičnost ELISA antigena čija je sekvenca definisana na osnovu informacija dobijenih integrisanim bioinformatičkim analizama.

Rezultati Napravljena je kompilacija humanih antigena koji su reaktivni sa prirodnim autoantitelima i identifikovane su dominantne zajedničke informacione karakteristike do sada poznatih sopstvenih humanih antigena. Poklapanje ovih karakteristika sa virusnim antigenima je preduslov nespecifičnog imunskog prepoznavanja. Ispitali smo koji HCV proteini imaju značajne informacione sličnosti sa humanim autoantigenima i pokazali da

su na osnovu karakteristika proteinskih sekvenci HCV antigeni NS4 i NS5 nespecifični, što je u saglasnosti sa zaključcima iz kliničkih studija. Primenom metode informacionih spektara dizajniran je peptidni antigen za ELISA test za koji je eksperimentalno pokazano da vezuje antitela iz seruma HIV-1 pozitivnih pacijenata, a koja su markeri neprogresivne HIV-1 infekcije. Takođe, prisustvo ovih antitela pokazano je i u serumima novorođenih beba, što ukazuje na činjenicu da su ona deo urođenog humoralnog imunskog odgovora, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima.

Zaključak Sistemske analize virusnog i humanog proteoma i primene bioinformatičkih metoda su od izuzetnog značaja za selekciju i dizajniranje antigena u cilju poboljšanja karakteristika ili pravljenja novih imunohemijskih testova.

Ključne reči: ELISA, prirodna autoantitela, virus humane imunodeficijencije, virus hepatitisa C, bioinformatika

Naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.27 : 616-072 (043.3)

616.36-002 : 616.98 (043.3)

***SELECTION OF SPECIFIC ANTIGENS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY
VIRUS AND HEPATITIS C VIRUS FOR PROGNOSTIC AND DIAGNOSTIC
ELISA BY USING BIOINFORMATICS METHODS***

Abstract

Introduction An outbreak of specific and sensitive, and therefore reliable immunochemical tests for detecting numerous viruses, hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) included, is essential for modern diagnostics. Similarity of great number of virus proteins and human proteins is a serious challenge when selecting a specific antigen for ELISA test, due to potential cross-reactivity immune recognition. Nowadays, by using systematic computer-based analyses of protein sequences characteristic similarities and differences can be established on the level of overall virus and human proteomes. This paper is aimed at identifying all the sequences of human antigens from scientific literature which are potential targets of innate humoral immune response and at defining based on integrated bioinformatics analysis, specific antigens for: 1. anti-HCV ELISA screening tests and 2. ELISA tests to determine antibodies characteristic for non-progressive HIV-1 infection.

Methods The study of informational features of protein sequences of virus and human antigens was performed by bioinformatics program package based on information-spectrum method. Programs for local and global sequence aligning were used to compare sequences and examine homology. Biological clusters in protein sets were identified by programs of enrichment analysis of notions from GENE ONTOLOGY database. *In house* tests examined specificity of ELISA antigen whose sequence was defined based on information obtained by integrated bioinformatics analyses.

Results A compilation of human antigens reactive with natural auto antibodies was made and dominant common information characteristics of own human antigens were identified. Coincidence of these features with the virus antigens is a prerequisite for nonspecific immune recognition. We have examined which HCV proteins have significant informatics similarities with human autoantigens and showed that based on the features of protein sequences, HCV antigens NS4 and NS5 are nonspecific, which is in compliance with the clinical studies conclusions. By applying the information-

spectrum method, a peptide antigen was designed for ELISA test, experimentally proven to connect antibodies from the serum of HIV-1 positive patients, that are markers of non-progressive HIV-1 infection. Additionally, the presence of those antibodies was proven in the sera of the newborn, which indicates to the fact that they make part of the innate humoral immune response, in compliance with literature data.

Conclusion Systematic analyses of virus and human proteome and application of bioinformatics methods are crucial for antigens selection and design in order to improve characteristics or create new immunochemical tests .

Keywords: ELISA, Natural autoantibodies, Human immunodeficiency virus, Hepatitis C virus, Bioinformatics

Scientific field: Medical biochemistry

UDC number: 577.27 : 616-072 (043.3)

616.36-002 : 616.98 (043.3)

SKRAĆENICE

AIDS: sindrom stečene imunodeficijencije (*engl. acquired immunodeficiency syndrome, AIDS*)

APOBEC36: citidin dezaminaza koja spada u porodicu apolipoprotein B RNK-opravljajućih enzima (*engl. apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, family of cytidine deaminase enzymes, APOBEC36*)

bdNA: tehnologija razgranate dezoksiribonukleinske kiseline (*engl. branched DNA assay*)

BSA: goveđi serumski albumin (*engl. bovine serum albumin, BSA*)

CCR-5: C-C hemokinski receptor tip 5 (*engl. C-C chemokine receptor type 5, CCR5*)

CXCR6: receptor za hemokine 6 (C-X-C motiv) (*engl. chemokine (C-X-C motif) receptor 6, CXCR6*)

CCL3L1: hemokin ligand 3 (C-C motiv)-kao 1 (*engl. chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1*)

CD: klaster diferencijacije (*engl. cluster of differentiation, CD*)

CLIA: hemiluminiscentni imunotest (*engl. chemiluminescence immuno assay, CLIA*)

DC-SIGN: vrsta intracelularnog adhezionog molekula specifičnog za dendritične ćelije (*engl. dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN*)

DEA: dietanolamin (*engl. diethanolamine, DEA*)

DNK: dezoksiribonukleinska kiselina (*engl. deoxyribonucleic acid, DNA*)

EIA: enzimski imunotest (*engl. enzyme immuno assay*)

ELISA: enzimski imunosorbent test (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*)

ESI-MS: elektrosprej jonizacija-masena spektrometrija (*engl. electrospray ionization mass spectrometry*)

HCV: virus hepatitisa C (*engl. hepatitis C virus, HCV*)

HIV: virus humane imunodeficijencije (*engl. human immunodeficiency virus, HIV*)

HLA: humani leukocitni antigen (*engl. human leukocyte antigen, HLA*)

HPLC: tečna hromatografija pod visokim pritiskom (*engl. high pressure liquid chromatography, HPLC*)

iNOS: inducibilna azot-oksida sintaza (*engl. nitric oxide synthase, iNOS*)

ISM: metod informacionih spektara (*engl. informational spectrum method, ISM*)

LDL: holesterol male gustine (*engl. low density lipoprotein, LDL*)

LTNP: spori progresori (*engl. long term non-progressors, LTNP*)

KS: kros-spektralna funkcija (*engl. cross-spectral function, KS*)

MIP-1 α : makrofagni inflamatorni protein tip 1 α (*engl. macrophage inflammatory protein, MIP-1 α*)

NK ćelije: ćelije ubice (*engl. natural killer cell, NK*)

PEJI: potencijal elektron-jon interakcije (*engl. electron-ion interaction potential, EIIP*)

RANTES: regulisan aktivacijom, eksprimovan i sekretovan od strane normalnih T-ćelija, poznat i kao hemokin ligand 5 (CCL5) (*engl. regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES*)

RIA: radioimuno test (*engl. radioimmunoassay, RIA*)

RDS: respiratorni distres sindrom (*engl. respiratory distress syndrome, RDS*)

RIBA: rekombinantni imunoblot test (*engl. recombinant immunoblot assay, RIA*)

RNK: ribonukleinska kiselina (*engl. ribonucleic acid, RNA*)

RT PCR: reverzna transkripcija sa lančanom reakcijom polimeraze (*engl. reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR*)

SDF-1: faktor derivat stromalnih ćelija-1, pripada porodici hemokina (*engl. stromal cell-derived factor-1, SDF-1*)

SOC: skvencijelni oligopeptidni nosač (*engl. sequential oligopeptide carrier, SOC*)

TRIM 5: protein 5 koji sadrži trojni motiv (*engl. tripartite motif-containing protein 5, TRIM 5*)

VIP: vazoaktivni intestinalni peptid (*engl. vasoactive intestinal peptide, VIP*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Enzimski imunotestovi.....	1
1.2 Urođena humoralna imunost.....	3
1.3 Virus humane imunodeficijencije (HIV)	5
1.4 Virus hepatitisa C (HCV)	13
1.5 Specifične interakcije u biološkim sistemima: bioinformatički pristupi.....	18
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1 Ispitanici i uzorci.....	21
3.2 Sekvence.....	22
3.3 Bioinformatička analiza.....	23
3.3.1 Metod informacionih spektara (ISM).....	23
3.3.2 Poravnavanje sekvenci.....	29
3.4 Laboratorijske metode.....	30
3.4.1 Protokol <i>in house</i> ELISA testa za HIV-1 inficirane pacijente.....	30
3.4.2 Protokol <i>in house</i> ELISA testa za novorođenčad.....	31
3.4.3 Reagensi.....	32
3.4.4 Peptid za oblaganje ploče.....	34
3.5 Statistička analiza	36
4. REZULTATI	37
4.1 Analiza humanih sopstvenih antigena.....	37

4.1.1 Podaci o sekvencama humanih sopstvenih antigena.....	37
4.1.2 Bioinformatička analiza karakteristika humanih sopstvenih antigena....	48
4.2 Bioinformatička analiza HCV proteina.....	51
4.2.1 Informaciona analiza HCV peptida.....	52
4.2.2 Ispitivanje informacione sličnosti HCV NS5 antigena i sopstvenih antigena čoveka.....	57
4.2.3 Ispitivanje strukturne sličnosti HCV C (core), NS3 i NS4 sa humanim antigenima.....	58
4.3 Bioinformatička analiza HIV-1 NTM peptida.....	67
4.3.1 Informaciona analiza peptidnog antigena za ELISA test.....	67
4.3.2 Analiza sličnosti peptida NTMs i sopstvenih humanih antigena.....	72
4.4 Eksperimentalna analiza efikasnosti dizajniranog antigena u ELISA testu.....	74
4.4.1 Izbor optimalnog razblaženja antigena za oblaganje ploče u „in house” ELISA testu.....	74
4.4.2 Analiza seruma LTNP i odgovarajućih kontrola.....	76
4.5 Eksperimentalna analiza prisustva anti-NTMs antitela u serumu novorođenčadi.....	79
5. DISKUSIJA.....	83
6. ZAKLJUČCI.....	96
7. LITERATURA.....	98

1.UVOD

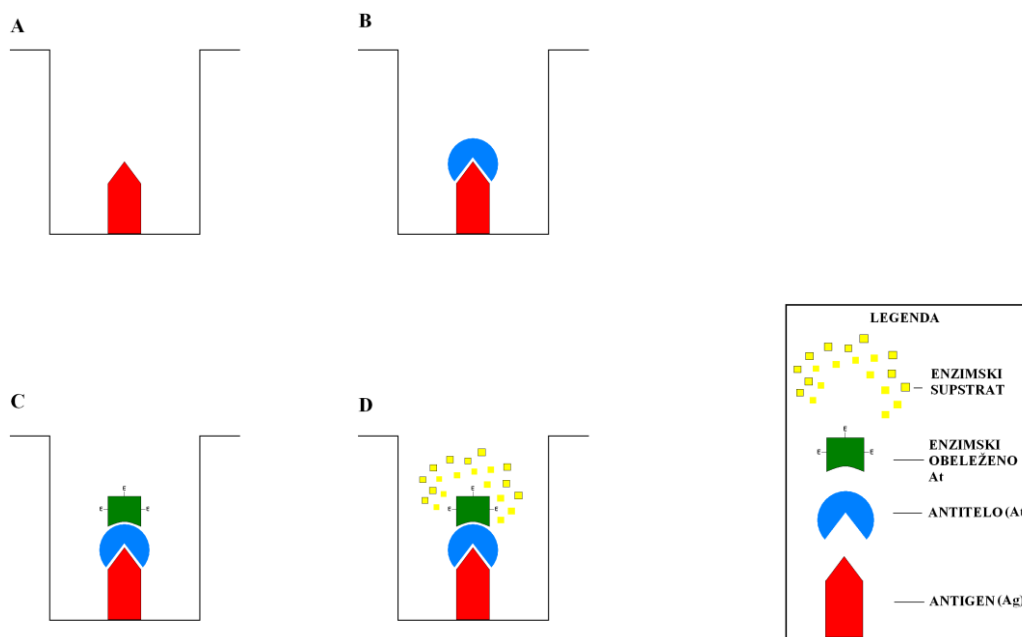
Tačno i brzo testiranje često ima ključnu ulogu za postavljanje dijagnoze i kliničku stratifikaciju pacijenata. Za kvalitativno i kvantitativno merenje veoma malih količina analita u kompleksnim biološkim sistemima koriste se imunohemijske metode zasnovane na specifičnoj reakciji između antigena i antitela (1). Pouzdanost imunohemijskih testova zavisi od njihove osetljivosti i specifičnosti. Osetljivost govori o mogućnosti da test otkrije stvarno bolesne, odnosno pacijente u određenim kategorijama (npr. progresija bolesti), dok specifičnost pokazuje mogućnost testa da precizno razdvoji pacijente različitih kategorija. Testovi sa niskom osetljivošću daju lažno negativne rezultate što ugrožava bezbednost pacijenata i zajednice kada su u pitanju infektivna oboljenja, dok nedovoljno specifični testovi daju lažno pozitivne rezultate i tako, između ostalog, povećaju troškove testiranja, zbog potrebe za naknadnim potvrđnim analizama (2).

1.1 Enzimski imunotestovi

Jedan od prvih imunohemijskih testova, rutinski korišćen u kliničkim laboratorijama, bio je RIA test (engl. Radioimmunoassay) razvijen 1960. godine za merenje peptidnih hormona kao što je insulin. Međutim, postojalo je nekoliko problema vezanih za upotrebu radioaktivnih obeleživača, kao što su bezbednost laboratorijskog osoblja, radioaktivni otpadni materijal, potreba za specijalnim laboratorijskim uslovima i skupa oprema za merenje (2, 3). Tokom šezdesetih godina su sprovedena istraživanja u cilju pronalaska načina za efikasno vezivanje velikog molekula enzima za antitelo ili antigen. Konačno, 1971. godine Engval i Perlman iz Švedske su objavili prvi rad o primeni ELISA testa (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) za određivanje IgG antitela u serumu zeca uz korišćenje alkalne fosfataze kao obeleživača. Iste godine van Vimen i Šurs iz Holandije su objavili rezultate istraživanja u kome su koristili EIA

(engl. Enzyme Immuno Assay) metodu za merenje humanog horionskog gonadotropina u urinu uz primenu peroksidaze rena kao obeleživača (3). Kasnije je došlo do razvoja različitih formata EIA/ELISA testova, koji su istisnuli iz upotrebe RIA metodu.

ELISA je oblik heterogenog enzimskog imunoodređivanja što znači da zahteva razdvajanje specifičnih kompleksa od slobodnih reaktanata. U ovoj metodi je jedna od reakcionih komponenti nespecifično adsorbovana ili kovalentno vezana za površinu čvrste faze kao što je bazen mikrotitarske ploče. Na taj način je ubrzano razdvajanje vezanih i slobodnih obeleženih reaktanata. Kada se ispituje imunski odgovor na antigen, što je najčešći slučaj u dijagnostici virusnih infekcija, upotrebljava se direktna forma ELISA testa (Slika1) (2,4).



Slika 1. ELISA test. A) U formi ELISA testa koji je korišćen u ovom radu antigen je imobilisan za čvrstu fazu. B) Nakon dodavanja seruma u bazen mikrotitarske ploče, eventualno prisutna specifična antitela se vezuju za antigen. C) Enzimi se koriste kao obeleživači za detekciju i kvantifikaciju imunološke reakcije. U toku testa prvo reaguju enzimski obeležena antitela ili antigen. D) Nakon toga se dodaje enzimski supstrat. U zavisnosti od vrste supstrata detekcija može da bude fotometrijska, fluorescentna ili hemiluminiscentna (1).

ELISA test se koristi za mnogobrojne rutinske analize u laboratoriji pri čemu nije potrebna komplikovana priprema uzorka niti skupa oprema. Odlikuje ga visok stepen osetljivosti, specifičnost, jednostavnost, praktičnost, lako dostupni i jeftini reagensi i mogućnost automatizacije. Osetljivost i specifičnost ELISA testa zavise od afiniteta i aviditeta antitela za antigen, kao i od formata testa (1,4,5). U ELISA testovima koji se koriste za skrining i dijagnostiku infektivnih bolesti najvažnije je postići visoku osetljivost, što kao posledicu ima smanjenje specifičnosti. Da bi se postigla visoka osetljivost testa, potrebno je uključiti veći broj antigenskih determinanti. Na taj način se istovremeno povećava verovatnoća imunološke ukrštene reaktivnosti sa drugim antigenima, koji mogu poticati od antigena domaćina ili koinfekcije drugim mikroorganizmima.

1.2 Urođena humoralna imunost

U organizmu zdravih ljudi postoje prirodna autoantitela, koja su deo urođene imunosti i funkcionalno su reaktivna sa sopstvenim antigenima. Smatra se da se autoreaktivni repertoar selektuje pre svega u toku fetalnog života. Za razliku od klasičnih imunoglobulina koji imaju ulogu u odbrani od infekcija, ova antitela intereaguju sa ograničenim brojem uglavnom evolutivno konzerviranih antigena što je genetski determinisano i dokazano u krvi iz pupčanika (6, 7, 8). Smatra se da je restriktivnost posledica ograničenog stepena rekombinacija na genetskom nivou (9). Prirodna autoantitela mogu da budu IgM, IgG ili IgA klase. Odlikuje ih nizak afinitet i polireaktivnost što znači da usled molekulske mimikrije mogu da prepoznaju nekoliko sopstvenih i stranih antigena (6, 10). Nema pojave sazrevanja afiniteta što bi moglo biti važno za razdvajanje normalne i patološke autoimunosti (7). Istraživanja na miševima su pokazala da prirodna autoantitela sekretuje posebna grupa B1 limfocita, dok za humanu populaciju još nema dovoljno podataka o toj oblasti (6).

Velika pažnja se poklanja istraživanju korelacije reaktivnosti prirodnih autoantitela kod novorođenčadi i njihovih majki. Organizam fetusa i novorođenčeta

stvara veoma male količine IgG antitela, ali postoji sopstvena produkcija IgM antitela. Za zaštitu novorođenčeta od različitih patogena do šestog meseca života, osim IgM antitela, ipak služe i IgG imunoglobulini, koji se nalaze u organizmu deteta zahvaljujući transplacentarnom prenosu iz organizma majke (11). Da bi se proučio razvoj i karakteristike urođene autoimunosti, ispitivana je reaktivnost antitela na sopstvene humane antigene u krvi iz pupčane vrpce deteta, kao i iz krvi njihovih majki. Fetalna i materinska IgG reaktivnost je bila gotovo identična, upravo zbog prenosa majčinih IgG antitela u organizam fetusa (12). Nasuprot tome, uočene su razlike kada je u pitanju IgM reaktivnost. Prvo je utvrđeno da su u organizmu različitih beba produkovana IgM antitela in utero, kada normalno nema stranih antigena, za veoma sličan set molekula za koje se zaključuje da su sopstveni antigeni (12). Drugo, poređenjem antigena sa kojima su IgM antitela reaktivna kod većeg broja novorođenčadi, utvrđeno je postojanje visokog stepena selektivnosti i uniformnosti (10, 12, 13). S druge strane, u krvi majki ispitivanih beba, nađena je veća međusobna raznovrsnost i drugačija organizacija IgM prirodnih autoantitela. Zahvaljujući primeni mikroerej tehnologije, utvrđene su blage promene u specifičnosti autoantitela u toku procesa odrastanja (14). Može da se govori o postojanju podgrupa (modula) prirodnih antitela sa posebno izraženom reaktivnošću prema grupama proteina sa određenim funkcijama. Takva organizacija tokom života u kontaktu sa stranim ili sopstvenim antigenima postaje sve složenija i specifična za određenu osobu (13,14).

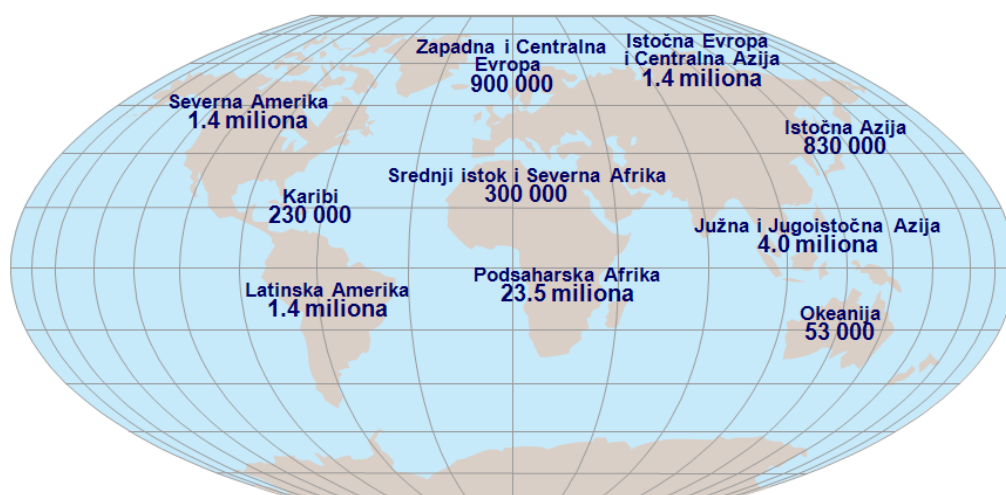
Smatra se da različita fiziološka (npr. rast, dojenje) i patološka stanja mogu da utiču na organizaciju urođene humoralne imunosti, pa bi njeno izučavanje i analiza uz primenu bioinformatičkih metoda mogli imati značaja za dijagnostiku i predviđanje budućih oboljenja (13, 15). Tako je pokazano da je organizacija IgG prirodnih autoantitela drugačija kod miševa, koji kasnije razviju ciklofosamidom ubrzani dijabetes, od onih koji su rezistentni na dejstvo ovog jedinjenja (16).

Smatra se da prirodna autoantitela imaju funkcije koje su važne za održavanje homeostaze u organizmu. Zbog postojanja mimikrije između humanih i molekula drugih organizama, ova antitela mogu da prepoznaju antigene na patogenim organizmima i učestvuju u inicijalnoj odbrani od njih (8,9). U humanim i mišijim uzorcima su nađeni značajni nivoi prirodnih antitela na oksidativno izmenjene oblike

LDL-a, kao i druge molekule na površini ćelija u apoptozi (6, 17, 18), te se smatra da ova antitela učestvuju u eliminaciji sopstvenih izmenjenih molekula i ćelija nastalih usled apoptoze, oksidativnog oštećenja, starenja ili maligne transformacije (6, 8,19). Na taj način prirodna autoantitela, između ostalog, preveniraju razvoj autoimunosti (20, 16). Postoje podaci da ova antitela mogu biti nosači drugih molekula ili pokazivati enzimsku aktivnost (7, 21). Zanimljiv je nalaz prisustva prirodnih IgA antitela sa katalitičkom aktivnošću kod zdravih ljudi, koja prepoznaju i razgrađuju površinski protein HIV-1 virusa gp120, kao i njihov značaj za usporavanje napredovanja infekcije (22).

1.3 Virus humane imunodeficijencije (HIV)

Virus humane imunodeficijencije (HIV) je retrovirus koji inficira humane imunске ćelije, uništava ih ili remeti njihovu funkciju što onemogućava normalnu odbranu od različitih infekcija. Može da se prenese seksualnim odnosom, putem krvi ili vertikalno, sa majke na potomstvo (23).

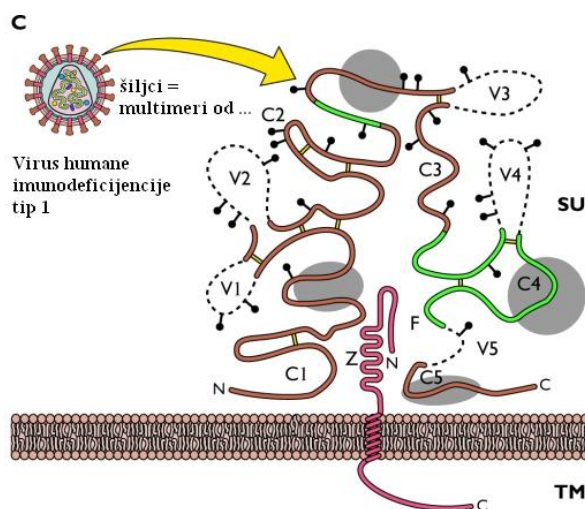


Slika 2. Procena o broju odraslih i dece koji su živeći sa HIV-om u 2011. godini. (Preuzeto sa sajta www.who.int/hiv/data/2012_epi_core_en.pps)

Infekcija HIV virusom je povezana sa progresivnim padom broja CD4+ T limfocita i povećanjem titra virusa u krvi. U periodu nakon primarne infekcije dolazi do ubrzane virusne replikacije, diseminacije virusa u različite delove organizma, pre svega limfne organe, i pojave virusa u perifernoj krvi. Jak imunski odgovor dovodi do smanjenja titra virusa u krvi i porasta broja CD4+ T limfocita, ali se virus ne eliminiše u potpunosti već perzistira u limfnim čvorovima i stvara se neka vrsta virusnog rezervoara. Ovaj period latencije može da traje godinama. Vremenom broj CD4+ T ćelija opada i javlje se klinički ispoljena bolest-AIDS (engl. acquired immunodeficiency syndrome) (1,24,25).

HIV virion se sastoji od nukleoproteinskog jezgra i dvoslojnog lipoproteinskog omotača. Unutar jezgra se nalaze dve identične kopije RNK i enzimi neophodni za replikaciju virusa obavijeni strukturnim proteinom p24. Između jezgra i omotača virusa se nalazi matriksni protein p17. Lipoproteinski omotač potiče delom od membrane ćelije u kojoj se virus razmnožavao. Drugi deo omotača predstavljaju glikoproteini kodirani virusnim genomom, koji u vidu šiljaka štrče na površini omotača (26). U pitanju su visoko glikozilirani proteini organizovani u heterotrimere-površinski glikoprotein gp120, koji se vezuje za receptor na ćeliji domaćina i transmembranski gp41, koji omogućava membransku fuziju (27, 28). Genom virusa HIV-1 i HIV-2 je sličan i sastoji se od strukturnih gena-*gag*, *pol* i *env*, regulatornih gena-*tat*, *rev* i pomoćnih gena *nef*, *vif*, *vpr* i *vpu* ili *vpx* u zavisnosti da li je u pitanju HIV-1 ili HIV-2 virus. (29).

Za kodiranje sinteze glavnih glikoproteina omotača zadužen je gen *env*. Prvo se na granuliranom endoplazmatičnom retikulumu sintetiše prekursorski protein gp160, a zatim proteolitičkom razgradnjom u Goldži kompleksu od gp 160 nastaju gp120 i gp41. Glikoprotein gp120 se sastoji od pet varijabilnih domena (V1, V2, V3, V4 i V5) između kojih se nalazi pet relativno konstantnih domena (C1, C2, C3 C4 i C5) (27,28,30).



Slika 3. Šematski prikaz strukture gp120 HIV-1 virusa (Preuzeto sa sajta: <http://wenliang.myweb.uga.edu>)

Skoro polovinu molekulske mase gp120 čine N- i O-vezani glikani, koji verovatno štite protein od imunološkog prepoznavanja, doprinose savijanju proteina i olakšavaju vezivanje virusa za površinu ćelija domaćina (28, 31). Pokazano je da su domeni koji pokazuju najveći stepen varijabilnosti V1 i V2. U okviru C1, C2 i C3 domena se nalazi najveći broj od 26 aminokiselina koje učestvuju u formiranju CD4 vezujućeg mesta. Ove aminokiseline su konzervirane i diskontinuirane, a odgovarajućom prostornom organizacijom dolaze u kontakt i obrazuju „spoljašnji” i „unutrašnji” domen koji su povezani „mostom” (engl. „bridging sheet”) (32).

HIV pokazuje tropizam za ćelije koje na svojoj površini imaju CD4 receptor kao što su T limfociti, makrofagi ili neke vrste nervnih ćelija. Proces ulaska virusa u ćeliju počinje vezivanjem gp120 za CD4 što pokreće konformacione promene molekula gp120 i povećava njegov afinitet za koreceptorske molekule na humanim ćelijama. Najznačajniji koreceptori su receptori za hemokine CCR5 i CXCR4 i na osnovu tropizma za odgovarajući koreceptor izvršena je jedna od podela HIV-1 virusa (28, 29). Dalje konformacione promene gp120 i gp41 omogućavaju fuziju sa ćelijskom membranom i ubacivanje jezgra virusa u citoplazmu (33). Uz pomoć virusnog enzima reverzne transkriptaze RNK virusa se prepisuje u DNK, koja se translokacijom kroz pore ubacuje u nukleus. Zahvaljujući delovanju virusnog enzima integraze, DNK virusa se ugrađuje u DNK domaćina. Genom HIV-a ugrađen u genom T limfocita ostaje u latentnom obliku do aktivacije limfocita, kada počinje razmnožavanje virusa i na taj

način razaranja ćelije (26). Sinteza virusnih proteina odigrava se u citoplazmi. Novosintetisani virusni proteini zajedno sa dve kopije virusne RNK stvaraju u plazma membrani novu generaciju virusa (29). Istovremeno sa oslobađanjem virusa iz inficirane ćelije virusni enzim, proteaza, razlaže poliproteine Gag i GagPol i omogućava stvaranje zrelog viriona (27, 28,29).

U cilju dijagnostike HIV infekcije koriste se dve grupe testova:

1. indirektni testovi za dokazivanje prisustva antitela na HIV kao što su enzimska imunoodređivanja (EIA) i Western blot testovi
2. direktni testovi u koje spadaju, između ostalih, test za dokazivanje HIV antigena p24 i testovi za detekciju delova virusnog genoma.

U današnje vreme se za postavljanje dijagnoze HIV infekcije koristi četvrta generacija EIA testova, koja osim IgM i IgG antitela, omogućava istovremenu detekciju prisustva p24 antigena. Primenom ove generacije testova prisustvo infekcije može da se utvrdi posle dve nedelje. Ukoliko se dobiju pozitivni rezultati imunoenzimskog testa, potrebno je ponoviti isti test ili test drugog proizvođača, a potom iz istog ili novog uzorka uraditi potvrdni Western blot, koji je prvenstveno kvalitativni test, ali je intenzitet boje na pojedinim trakama proporcionalan koncentraciji antitela, te može da se tumači i semikvantitativno. Rezultati se izražavaju kao negativni, pozitivni ili neodređeni (engl.indeterminate). Western blot je zametan, skup i manje senzitivian test u odnosu na EIA testove, ali pokazuje veći stepen specifičnosti (34).

Kada se radi o direktnim testovima, pojedinačna detekcija p24 se koristi kao dopunski test za otkrivanje infekcije kada je nedostupno merenje RNK i za dijagnostiku infekcije kod novorođenčadi (35), dok se najranija dijagnoza može postaviti detekcijom virusne RNK, koja se obično meri primenom RT PCR (engl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) ili testovima zasnovanim na hibridizaciji nukleinskih kiselina (36).

Postoji manje od 5% HIV-1 inficiranih pacijenta koji uspevaju da održe stabilan broj CD4+ T limfocita u opsegu karakterističnom za zdrave (450-1650 ćelija/mL krvi, u zavisnosti od laboratorije) duži period vremena, bez simptoma bolesti i razvoja agresivnijih oblika HIV-a, iako nije primenjena antiretrovirusna terapija (37, 38, 39). Pacijenti koji imaju takve karakteristike se označavaju kao LTNP (engl. long term non-progressors). Među ovim pacijentima može da se izdvoji mala grupa (manje od 1% od

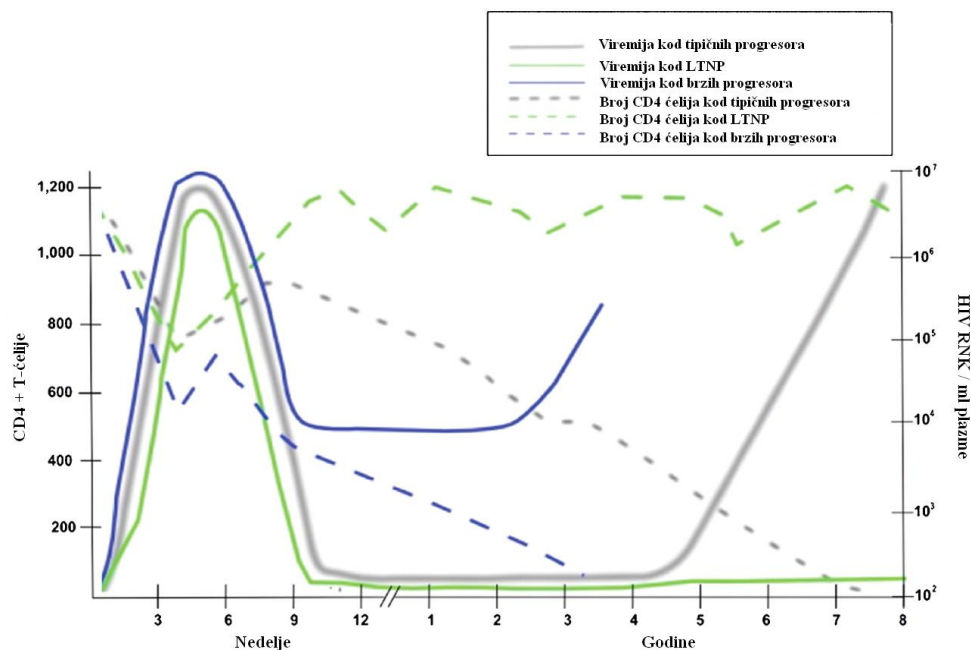
ukupnog broja) tkz. HIV kontrolora u čijem je organizmu replikacija virusa vrlo niska i nivo virusa ispod granice detekcije komercijalnih testova koja danas iznosi manje od 50 HIV-1 RNK kopija/mL plazme (37, 39).

Tabela 1. Definicija glavnih populacija kontrolora kod HIV infekcije

	HIV kontrolori	LTNP
Nivo CD4+ ćel/ μ L	≥ 500	≥ 500
HIV RNK kopija/mL	≤ 50	$\leq 10\ 000$
Antivirusna terapija	ne	ne
Godine bez AIDS-a	meseci-godine	$\geq 7-20$

(Modifikovano iz: Poropatic K, Sullivan DJ Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. J Gen Virol. 2011;92(Pt 2):247-68)

Kao mogući uzročnici spore progresije HIV infekcije izučavani su virusni faktori, kao i specifične genetske i imunološke osobine domaćina. Istraživanja su pokazala da mutacije različitih proteina virusa kao što su *nef*, *env*, *vpr* i *vif* mogu da omoguće bolju kontrolu virusa, kao i da neke osobine *gag* i *pol* virusnih proteina utiču na njegovu poremećenu replikaciju. Ipak, noviji podaci govore da je najveći broj neprogresora zaražen oblikom virusa koji se normalno razmnožava, odnosno da su karakteristike imunskog sistema i genetski faktori domaćina najznačajniji faktori neprogresivne infekcije (40, 41,42, 43).



Slika 4. Progresija bolesti kod HIV-1 inficiranih tipičnih progresora, LTNP pacijenata i brzih progresora prema broju CD4+ T ćelija i stepenu viremije (preuzeto iz: Poropatich K, Sullivan DJ Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. J Gen Virol. 2011;92(Pt 2):247-68)

Kada su u pitanju faktori domaćina, pokazano je da na tok infekcije može da utiče genetski polimorfizam receptora za hemokine: CCR-5 koreptora (alel CCR5D32), CXCR6, CCR2 i CX3CR1, kao i liganada za ove receptore MIP-1 α , MIP-1 β , CCL3L1, RANTES i SDF-1, ali su rezultati različitih studija često kontradiktorni (43). Kao mogući uzrok različite brzine napredovanja HIV infekcije proučavan je i polimorfizam molekula HLA I klase, pri čemu su zaštitnu ulogu pokazali neki B aleli, posebno B*27, B*57 i B*58, kao i neki aleli HLA II klase (37, 38, 44, 45). Održavanje određenog stepena HIV-specifičnog CD4+ T ćelijskog odgovora, koji obezbeđuje pomoć CD8+ T limfocitima, može da omogući dugotrajnu kontrolu replikacije HIV virusa (46). Studije koje su istraživale faktore koji utiču na broj CD4+ T limfocita, našle su značajan efekat pola, etničkog porekla, starosti i načina života pacijenta (37). Veća produkcija određenih podgrupa CD4+ T ćelija, kao što su Th17 i FOXP3+CD25+ Tregs, može da utiče na progresiju bolesti (47). Osim toga, utvrđeno je na osnovu

produkcije perforina i citokina da je funkcija CD8+ T ćelija veća kod pacijenata koji uspevaju da kontrolišu infekciju, ali nije dovoljno jasno da li je ovo uzrok ili možda posledica uspešne kontrole HIV-a (25,48).

Postoje podaci da neki od učesnika urođenog imuniteta, kao što su NK ćelije ili toll-like receptori, mogu da utiču na tok HIV infekcije. Međutim, prema dosadašnjim saznanjima ni jedan pojedinačni faktor nije u potpunosti protektivan (39, 44). Neke studije su ukazale da kombinacija više faktora, kao što su protektivni aleli HLA I klase i specifični NK ćelijski receptori mogu da omoguće dužu kontrolu infekcije (49).

U novijim radovima se kao faktor koji može da doprinese sporijem razvoju HIV infekcije pojavljuje polimorfizam endogenih antivirusnih agenasa. U ovu grupu spadaju APOBEC36-citidin dezaminaza koja blokira HIV-1 integraciju i čije je povećano stvaranje povezano sa sporijom progresijom, TRIM 5 α koji deluje na replikaciju HIV virusa, protein teterin koji može da remeti oslobađanje HIV partikula, kao i SAM-HD1 koji remeti replikaciju HIV-1 u makrofagama (43, 49).

Nijedan od proučavanih faktora nije mogao da kod svih pacijenata objasni razloge za veću ili manju brzinu napredovanja HIV infekcije. Većina istraživača se, ipak slaže, da teža primarna infekcija uslovljava i bržu progresiju bolesti.

Jedan od funkcionalno značajnih delova molekula gp120 HIV-1 je karboksilni kraj druge konzervirane regije (C2) za koji su istraživanja utvrdila da direktno učestvuje u vezivanju za CD4 receptor, kao i u događanjima koji slede, a omogućavaju ulazak virusa u ćeliju (32). Pokazano je da je ovaj deo molekula gp120 potreban za interakciju sa receptorima za hemokine, koja se dešava nakon interakcije sa CD4 molekulom i omogućava aktivaciju transmembranskog glikoproteina gp41 (50). Karboksilni kraj druge konzervirane regije bi mogao biti imunološki važan kada je u pitanju dugoročna zaštita HIV-1 zaraženih pacijenata. Naime, Neurath i sar. su utvrdili da su antitela koja prepoznaju karboksilni kraj C2 regije gp120 prevalentna kod asimptomatskih HIV pozitivnih pacijenata u odnosu na one kod kojih je već došlo do razvoja AIDS-a (51). Kasnija istraživanja su potvrdila postojanje korelacije između prisustva antitela reaktivnih sa peptidom NTM, koji obuhvata aminokiseline (280-306 RSNFTDNAKTIIVQLNQSVEIN) iz C2 regije gp120 HIV-1 i progresije bolesti kod HIV pozitivnih pacijenata (52).

S obzirom da ovaj HIV-1 gp120 domen nije imunogen kod čoveka, smatra se da su antitela koja se vezuju za njega deo urođenog imunskog odgovora (53). Pasivno primenjena, antitela reaktivna sa peptidom NTM, mogu efikasno da odlože napredovanje HIV infekcije (54). Može da se pretpostavi da bi HIV-1 gp120 C2 reaktivna antitela mogla da budu prognostički biomarker za kontrolu progresije HIV infekcije, koji bi se u obliku imunoheimijskog testa mogao jednostavno i efikasno pratiti i u kliničkim uslovima. Proteinski domen HIV-1 gp120 C2 koji je kao antigen korišćen u navedenim eksperimentima, peptid NTM, nalazi se u C-terminalnom delu, dugačak je 23 aminokiseline i nije pogodan za komercijalnu sintezu ni zbog svoje veličine ni zbog velikih hidrofobnih domena. Zato je veoma važno odrediti strukturu sopstvenog antigena, koji je obuhvaćen ovim domenom i odgovarajući oblik ovog antigena pogodan za primenu u ELISA testu.

Kada se radi o praćenju i prognozi HIV infekcije danas se mogu koristiti neke od metoda koje se koriste i za postavljanje dijagnoze. Jedna od mogućnosti je primena Western blot testa za detekciju prisustva pojedinačnih specifičnih antitela. Naime, u toku serokonverzije prvo se razvijaju antitela na antigene virusnog omotača i jezgra (env i gag), a poslednja se stvaraju antitela na virusne enzime (pol). Kada dođe do napredovanja HIV infekcije i razvoja imunosupresije opada koncentracija antitela za antigene virusnog jezgra, dok su kod razvijenog AIDS-a antitela nedetektibilna. Drugi mogući način za prognozu HIV infekcije je određivanje aviditeta specifičnih antitela na antigene virusnog jezgra (p17 i p24) i na transmembranski glikoprotein (gp41). Pošto su antitela visokog aviditeta značajna za kontrolu virusne replikacije, rana pojava nisko aviditetnih antitela za p17 i p24 ukazuje na brzo napredovanje infekcije, dok se u organizmu asimptomatskih pacijenta održavaju antitela visokog aviditeta iste specifičnosti. Merenje aviditeta antitela za gp41 može da se koristi za procenu starosti HIV infekcije (55).

Za praćenje progresije HIV infekcije koriste se u velikoj meri direktni testovi. Pokazano je da povećan titar virusa u plazmi ukazuje na kliničku progresiju, dok se njegovo opadanje javlja kod uspešno primenjene terapije. Visoki nivoi HIV RNK se javljaju u akutnoj fazi bolesti, kao i u kasnoj fazi kada se razvije AIDS (35).

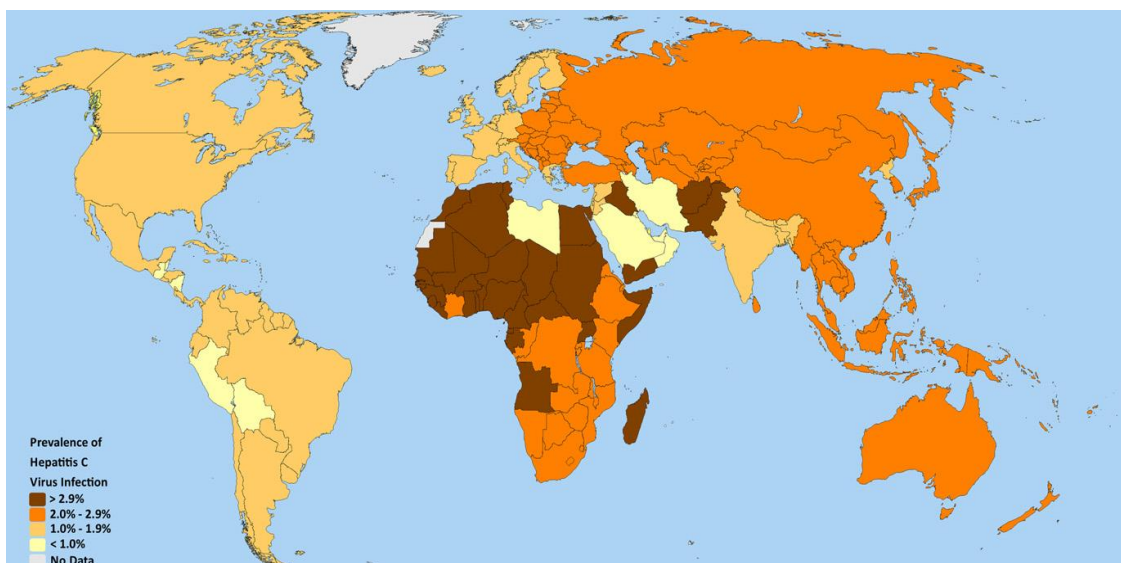
Kada se koristi u prognostičke svrhe HIV RNK se prati zajedno sa brojem CD4 limfocita. Visok početni nivo virusne RNK je u korelaciji sa brzim padom broja CD4 limfocita i brzom progresijom bolesti. Pokazano je da pacijenti koji održavaju nivo RNK <10 000 kopija/mL u ranoj fazi infekcije neće progredirati u AIDS u toku sledećih pet godina (55).

Ograničenja primene testova za analizu nukleinskih kiselina su: visoka cena, potreba za sofisticiranom laboratorijskom opremom i tehnička osposobljenost osoblja (35). Zbog nedostataka ove metode još uvek nisu dostupne u mnogim ekonomski nerazvijenim zemljama u kojima je procenat inficiranih visok.

1.4 Virus hepatitisa C (HCV)

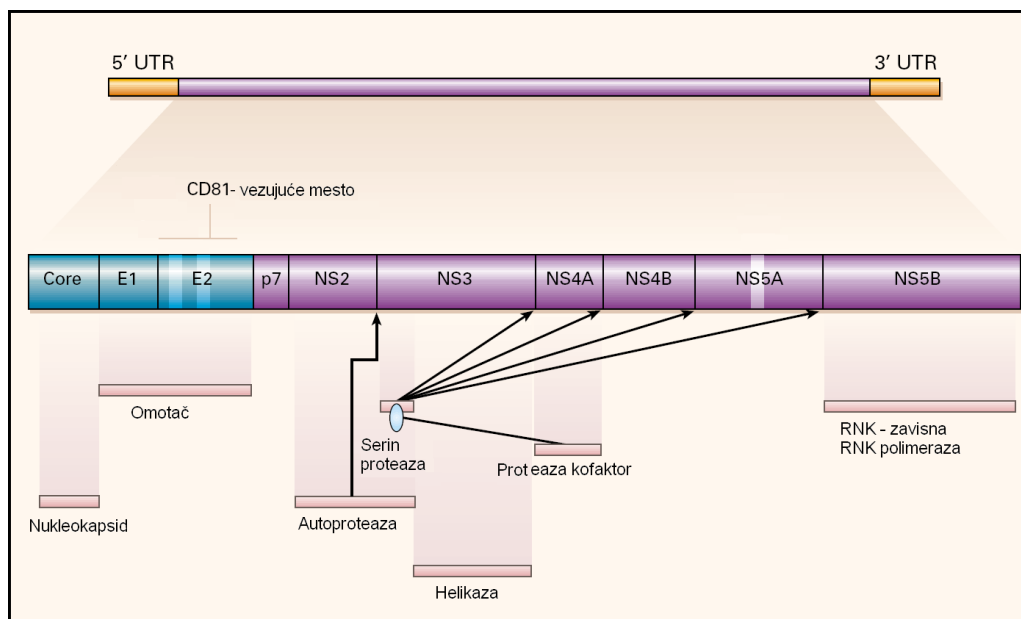
Virus hepatitisa C (HCV) je izazivač oboljenja jetre. Klinička slika HCV infekcije je u početnoj fazi vrlo često praćena blagim kliničkim simptomima, mada su zabeleženi slučajevi pacijenata sa žuticom, mučninom i slabošću. Akutna infekcija obično prelazi u hroničnu sa blagim kliničkim tokom, ali vodi ka razvoju hepatitisa i određenog stepena fibroze. U 15-20% slučajeva hepatitis dovodi do ciroze jetre, a moguć je razvoj hepatocelularnog karcinoma. Osim bolesti jetre, virus hepatitisa C može da izazove neke autoimunske bolesti i limfoproliferativna stanja (23, 56).

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije u 2011. godini virusom hepatitisa C je bilo hronično inficirano oko 150 miliona ljudi, a svake godine umre oko 350 000 ljudi kao posledica bolesti jetre izazvane ovim virusom (57).



Slika 5. Prevalenca infekcije virusom hepatitisisa C. (Preuzeto iz: Ip PP, Nijmanb HW, Wilschut J, Daemen T. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral Res.* 2012;96(1):36-50, Izvor: The US Centers for Disease Control and Prevention, Hepatitis C virus database project)

HCV virion se sastoji od linearnog molekula jednolančane, pozitivne RNK, koja se nalazi u okviru kapsida okruženog dvoslojnim lipidnim omotačem za koji su vezani glikoproteini (58). RNK virusa kodira sintezu poliproteina od oko 3000 aminokiselina, koji se uz pomoć enzima cepa na pojedinačne strukturne i nestrukturne proteine. U strukturne proteine spadaju protein C (engl. core) i glikoproteini omotača E1 i E2. Strukturni i nestrukturni proteini su razdvojeni kratkim membranskim peptidom p7 za koji se smatra da je viroporin. Nestrukturni proteini NS2, NS3 i NS4A imaju funkcije proteaza, NS3 helikaze, a NS5B RNK-zavisne RNK polimeraze. Funkcija proteina NS5A nije dovoljno poznata, ali se pretpostavlja da učestvuje u procesu replikacije virusa (56,59).



Slika 6. HCV poliprotein (preuzeto iz: Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. N Engl J Med. 2001;345(1):41-52)

Mogući receptori za HCV su CD81, „scavenger” receptor BI, adhezivni molekuli DC-SIGN i L-SIGN i receptor za LDL čestice na hepatocitima i limfoidnim ćelijama (mononukleari, B i T limfociti) (58). Oštećenje inficiranih hepatocita nastaje pre svega citotoksičnim delovanjem T-limfocita.

U cilju postavljanja dijagnoze infekcije HCV-om koriste se dve vrste dijagnostičkih testova:

1. serološki testovi kojima se detektuju antitela na hepatitis C virus (anti-HCV)
2. molekularni testovi kojima se može vršiti detekcija, merenje i karakterizacija HCV RNK genoma

Serološki testovi mogu da se podele na skrining testove za anti-HCV antitela kao što su EIA i CLIA (engl. Chemiluminescence Immuno Assay) i potvrđne testove kao što je najčešće korišćen RIBA (engl. Recombinant Immunoblot Assay) test. Od osamdesetih godina dvadesetog veka razvijene su tri generacije seroloških testova u cilju poboljšanja osetljivosti i specifičnosti. Trećom generacijom EIA testa, inače danas

u upotrebi, detektuju se antitela na rekonfigurisane proteine virusa hepatitisa C: C, NS3 i NS4 kao i NS5A antigen koji nije bio prisutan u prethodnoj generaciji testa (60).

RIBA testovi se koriste u cilju potvrde pozitivnih rezultata enzimskih imunotestova pri čemu mogu da se upotrebe isti uzorci seruma. Koriste se slični rekombinantni antigeni i sintetski peptidi kao i u EIA testovima, ali u imunoblot formatu, tako da se mogu identifikovati antitela na pojedinačne proteine. Rezultat testa može da bude pozitivan, ako se detektuju antitela na dva ili više antigena, neodređen ili granični ako se detektuju antitela na jedan antigen, ili negativan. Upotreba ovih testova se preporučuje pre svega za populaciju pacijenata sa niskim rizikom od HCV infekcije kao što su dobrovoljni davaoci krvi (56, 61). Dokaz postojanja anti-HCV antitela ne može da pokaže da li je u pitanju sadašnja ili ranija infekcija, ali ukazuje na potrebu za daljim ispitivanjem (61).

Serološki testovi mogu dati lažno negativne rezultate kod imunokompromitovanih osoba kao što su zaraženi HIV-om, pacijenati sa renalnom insuficijencijom, kao i kod pacijenata sa esencijalnom mešovitom krioglobulinemijom izazvanom HCV-om (56). Kvalitativni molekularni testovi se baziraju na RT-PCR tehnici. Imaju limit detekcije od oko 50 IU/mL. Ovi testovi služe za potvrdu postojanja viremije i praćenje odgovora na terapiju (62). Pozitivni rezultati testa ukazuju na aktivnu infekciju. Kvalitativne PCR testove bi trebalo koristiti i kod pacijenata sa suspektom akutnom infekcijom kod kojih se dobijaju negativni rezultati EIA testova, kod pacijenata koji imaju hepatitis nepoznatog uzroka, kao i kod onih sa poznatim uzrocima lažno negativnih rezultata testiranja antitela.

Kvantitativni molekularni testovi, PCR ili bDNA (engl. branched DNA assay), imaju značaja za praćenje anti-HCV terapije (56).

Važan nespecifični test za praćenje infekcije i efikasnosti terapije je merenje aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) (56).

Infekcija virusom hepatitisa C se pretežno prenosi parenteralno, upotrebom zagađenih igala i špriceva, transfuzijom krvi i krvnih produkata, kontaktom sa krvlju i sl. Pošto kod značajnog broja inficiranih ne može da se dokaže ni jedan od pomenutih načina prenošenja, ispituju se i drugi putevi, prvenstveno seksualni. Vertikalna

transmisija sa majke na plod, dokazana je u malom broju slučajeva i zavisi od trenutka infekcije majke, postojanja koinfekcija i drugo (23,56).

Do početka devedesetih godina 20. veka HCV se u značajnoj meri prenosio transfuzijom krvi. Uvođenjem skrininga na HCV tj. testiranjem krvi dobrovoljnih davalaca EIA testovima, pre svega u ekonomski razvijenim delovima sveta, značajno je smanjen rizik od posttransfuzijskog hepatitisa C. S druge strane, došlo je do povećanja incidence lažno pozitivnih rezultata testova. Naime, specifičnost EIA testova za HCV treće generacije iznosi preko 99% za populaciju sa visokom prevalencom infekcije, kao što su oni sa kliničkim pokazateljima oboljenja jetre (58). Međutim za populaciju sa prevalencom HCV infekcije manjom od 10% kao što su dobrovoljni davaoci krvi, zdravstveni radnici, vojna lica i drugi, nije obezbeđena adekvatna prediktivna vrednost za pozitivne rezultate. U ovoj populaciji nivo lažno pozitivnih rezultata dostiže i 35% (61). Razlog za ovakvu pojavu se nalazi i u činjenici da se u toku razvoja EIA testova za ovu populaciju, težilo se pre svega povećanju osetljivosti kako infekcija ne bi prošla nedetektovana, a postizanju prihvatljivog nivoa specifičnosti (62). Ovakva situacija zahteva da se u slučaju dobijanja pozitivnih rezultata EIA testovima izvode i dodatni potvrdni testovi što povećava volumen krvi potreban za testiranje, produžava vreme i troškove ispitivanja (63). Prema mnogim istraživanjima prisustvo NS5A antigena u EIA testovima treće generacije je osnovni uzrok lažno pozitivnih rezultata u populacijama sa niskom prevalencom HCV infekcije (64, 65, 66).

Pokazano je da 30% od 543 sintetska peptida poreklom iz različitih regiona virusa hepatitisa C različitih genotipova, pokazuje reaktivnost sa proteinima iz seruma zdravih davalaca krvi, što bi moglo da ukaže na nespecifičnu imunoreaktivnost antigenskih epitopa HCV-a (67). Istraživanje Kusalik i sar. je pokazalo visok stepen homologije između humanog i HCV proteoma (68). Takva saznanja su dovela do ispitivanja potencijalnog uticaja molekulske mimikrije na autoimunske poremećaje povezane sa infekcijom virusom hepatitisa C (69,70). Pokazano je takođe da je velika homologija između virusnih i humanih proteina prepreka za razvoj protektivne HCV vakcine (71).

Najveći broj inficiranih HIV-om ili HCV-om je iz nerazvijenih ili zemalja u razvoju zbog čega postoji velika potreba za jeftinim i jednostavnim dijagnostičkim

testovima kakav je ELISA test. Dijagnostika HIV i HCV infekcije često zahteva skupe i u mnogim zemljama nedostupne molekularne tehnike. Otežavajući faktor za razvoj specifičnih dijagnostičkih i/ili prognostičkih testova za ove viruse je postojanje velike sličnosti između virusnih i humanih proteina. Za ispitivanje stepena podudarnosti između proteina mogu da se koriste podaci iz javnih baza podataka, koje sadrže genske i proteinske sekvence čoveka, mikroorganizama i drugih organizama. Analiza se može vršiti različitim bioinformatičkim alatima za predviđanje funkcije i funkcionalno značajnih domena.

1.5 Specifične interakcije u biološkim sistemima: bioinformatički pristupi

Bioinformatika podrazumeva primenu informacionih tehnologija u obradi i analizi bioloških podataka. Najčešće se koristi za obradu velikog broja rezultata dobijenih primenom novih metoda za proučavanje genoma i proteoma (72). Projekat humanog genoma je bio najveći pokretač za razvoj mnogih bioinformatičkih metoda, ali osim genoma čoveka vrši se sekvencioniranje genoma drugih bioloških vrsta. Prvi sekvencirani genomi su bili virusni i bakterijski. Tako je genom virusa Haemophilus influenzae Rd bio prvi genom slobodnog živog organizma koji se našao u javnoj bazi podataka (73). Poznavanje genomske sekvence ne znači mnogo bez primene komparativne analize za koju je neophodno imati pristup javnim bazama podataka. Cilj svake bioinformatičke analize je dolaženje do odgovora na neko biološko ili biohemijsko pitanje. Može da bude u pitanju razumevanje veze genotipa i fenotipa kada su u pitanju različita oboljenja, strukture i funkcije proteina ili razumevanje složenih bioloških mreža.

Za dizajniranje specifičnih antigena za imunohemijska ispitivanja ključno je razumevanje procesa prepoznavanja između antigena i antitela. Uspešno prepoznavanje ovih molekula zavisi prvenstveno od njihove strukturne komplementarnosti. Iako se zna da su interakcije kratkog dometa ključne za prepoznavanje dva molekula, dugodosežne

interakcije su podjednako važne. Prema konceptu kvantne hemije o dalekosežnim interakcijama, pretpostavljeno je da se specifična interakcija molekula dešava usled koherentne ekscitacije nelinearnih spregnutih dipola, kao što su biomolekuli, koja propagira kroz polarni medijum dovodeći do pojave frekventno-selektivnih privlačnih sila. Prema Frulihu ovakva pojava omogućava komunikaciju proteina i dovodi do povećanog broja produktivnih sudara. Kratko i dugodosežne karakteristike proteina (antitela i antigena) determinisane su proteinskom sekvencom. U primarnoj strukturi proteina su kodirane informacije o funkciji, biološkoj aktivnosti i višim nivoima organizacije proteina. Bioinformatičke metode za analizu odnosa strukture i funkcije na osnovu sekvence zasnivaju se na upoređivanju, odnosno poravnavanju hemijskih struktura ili distribucije fizičko-hemijskih osobina bioloških polimera (74,75,76). Identifikacija najvažnijih karakteristika sekvenci virusnih antigena, koji se koriste za prognozu i dijagnozu je ključni korak u definisanju specifičnosti. Računarska pretraga baza humanih autoantigena i ko-infektanata omogućuje identifikaciju potencijalnih nespecifičnih interakcija i diskriminaciju neželjenih mimikrija.

2. Ciljevi istraživanja

1. kompjuterskim metodama za analizu odnosa strukture i funkcije proteina definisati peptidni antigen za ELISA test pogodan za detekciju antitela reaktivnih sa HIV-1 gp120 C2 NTM polipeptidom koja koreliraju sa neprogresivnom HIV-1 infekcijom;

2. eksperimentalno utvrditi da li je dizajnirani peptidni antigen sličan sa humanim antigenom, odnosno da li se u ELISA testu za njega vezuju IgM antitela iz seruma novorođenih beba;

3. eksperimentalno ispitati efikasnost dizajniranog antigena u ELISA testu sa serumima HIV-1 LTNP i odgovarajućih kontrola;

4. sakupiti podatke o sekvencama sopstvenih antigena čoveka potvrđenih u eksperimentima i objavljenim u naučnoj literaturi, kao i utvrditi specifičnosti i bitne zajedničke karakteristike do sada poznatih sopstvenih antigena;

5. ispitati informacione i strukturne sličnosti HCV NS5A antigena i sopstvenih antigena čoveka da bi se utvrdilo da li su one uzrok visokog nespecifičnog vezivanja za HCV NS5A u ELISA skrining testovima u transfuziologiji;

6. ispitati informacione i strukturne sličnosti HCV NS3, NS4 i core sa humanim antigenima da bi se utvrdilo eventualno postojanje izrazito sličnih domena koji mogu da uzrokuju lažno pozitivne i „neodređene” rezultate u anti-HCV ELISA skrining testovima u transfuziologiji.

3. Materijali i metode

3.1 Ispitanici i uzorci

Analizirani su serumi sedam LTNP pacijenata koji su inficirani virusom HIV-1 podtip B duže od 15 godina sa nivoom HIV RNK manjim od 10 000 kopija/mL i sa više od 500 CD4+ T limfocita/ μ L bez primene bilo kakve anti-retrovirusne terapije. Kontrolna grupa su bila četiri LTNP pacijenata stabilnog broja od preko 400 CD4+ limfocita/ μ L, ali sa nivoom HIV RNK većim od 10 000 kopija/mL i identifikovanim nekim od poznatih faktora virusa ili domaćina koji doprinose sporijoj progresiji bolesti, i pet pacijenata sa uobičajenom brzinom progresije infekcije, istog nivoa CD4+ ćelija i niskog titra virusa u plazmi. Svi LTNP pacijenti su imali uobičajen tip CC-hemokinskog receptora 5 (CCR5). Pre analize virus je toplotno inaktiviran. Kao negativnu kontrolu smo koristili tri uzorka HIV negativnih osoba. Uzorci HIV pozitivnih pacijenata i HIV negativnih kontrola su bili iz Instituta za biomedicinska istraživanja „Georg-Speyer-Haus” u Frankfurtu, Nemačka.

ELISA testom su testirani ostaci seruma posle urađenih rutinskih biohemijskih analiza, devetoro preterminske i devetoro terminske novorođenčadi starosti do sedam dana lečenih u Institutu za neonatologiju u Beogradu. Preterminska novorođenčad su rođena između 27 i 34 nedelje gestacije, telesne težine od 950-2200g. Terminska novorođenčad, rođena posle 37. gestacione nedelje, bila su telesne težine veće od 2500g i bez znakova RDS-a. Serumi su odvajani odmah nakon centrifugiranja i čuvani na -20°C do izvođenja analiza. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora Instituta za neonatologiju.

Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Deklaracijom iz Helsinkija, a na osnovu odobrenja Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta.

3.2 Sekvence

Sekvence HCV peptida su preuzete iz baze podataka Uni-ProtKB/Swiss-Prot i iz dokumentacije proizvođača za transfuziološke skrining testove ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System, Abbott Version 3.0. Sekvence humanih sopstvenih antigena su preuzete iz baze podataka Uni-ProtKB/Swiss-Prot (77).

Tabela 2. Sekvence HCV peptida genotipa 1a (izolata 1)

Peptid	UniProtKB/Swiss-Prot oznaka	Sekvenca
HCV C (core)	P26664, Genome polyprotein, Hepatitis C virus genotype 1a (isolate 1)	AA # 2-191
NS3	P26664, Genome polyprotein, Hepatitis C virus genotype 1a (isolate 1)	AA # 1027-1657
NS4A	P26664, Genome polyprotein, Hepatitis C virus genotype 1a (isolate 1)	AA # 1658-1711
NS4B	P26664, Genome polyprotein, Hepatitis C virus genotype 1a (isolate 1)	AA # 1712-1972
NS5A	P26664, Genome polyprotein, Hepatitis C virus genotype 1a (isolate 1)	AA # 1973-2420

3.3 Bioinformatička analiza

3.3.1 Metoda informacionih spektara (ISM)

Biološka funkcija i struktura proteina je određena redosledom aminokiselina, odnosno proteinskom sekvencom. Metode za analizu odnosa strukture i funkcije na osnovu sekvence zasnivaju se na upoređivanju, odnosno poravnavanju:

1. simboličke reprezentacije sekvenci, odnosno niza simbola koji predstavljaju njihovu primarnu strukturu i
2. parametarskih reprezentacija.

Za predstavljanje aminokiselina koriste se fizički, hemijski, statistički i drugi parametri (78). Metod informacionih spektara (engl. Informational spectrum method, (ISM)) (79) spada u drugu grupu metoda za analizu sekvenci.

Postoji široko zastupljeno mišljenje da je međusobno prepoznavanje biomolekula zasnovano na površinskoj komplementarnosti između njih. Ovo shvatanje je zasnovano na dve fundamentalne hipoteze. Prema modelu interakcije „ključ-i-brava”, koju je predložio Emil Fišer, mesta vezivanja proteina strukturno su međusobno komplementarna i slažu se kao ključ sa bravom ili ruka sa rukavicom. Daniel Košland je predložio fleksibilniji model „indukovanog slaganja” za biološku interakciju, koji se zasniva na činjenici da je moguća slobodna rotacija oko pojedinačne kovalentne veze (80). Prema ovom modelu aktivno mesto enzima ima sve potrebne elemente za pozicioniranje supstrata, ali nije potpuno formirano. Interakcijom supstrata sa enzimom indukuje se konformaciona promena u enzimu, koja dovodi do repositioniranja aminokiselina i formiranja aktivnog mesta. Promena enzima može naknadno da dovede do promene u supstratu, odnosno do „naprezanja” ili „istezanja” supstrata, što uslovljava još bolje slaganje između supstrata i mesta za vezivanje na enzimu (81).

Smatra se da se hemijska reakcija odigrava kada se čestice reaktanata (atomi, molekuli, joni) slučajno sudare usled termičkog kretanja (Braunovo kretanje). Tada dolazi do interakcija koje raskidaju postojeće i/ili uspostavljanja nove veze između čestica (82). Da bi došlo do ispoljavanja slabih nekovalentnih sila privlačenja, kao što su van der Valsove sile, vodonične veze ili jonske interakcije, potrebnih za prepoznavanje i vezivanje, reagujući biomolekuli treba da se nađu na bliskom rastojanju od približno 2\AA i odgovarajući atomi treba da budu korektno orijentisani. Međutim, ovakvo shvatanje hemijskih reakcija ne može u potpunosti da objasni niz brzih i veoma tačnih procesa koji se odvijaju u ćeliji kao što su: replikacija, transkripcija, selektivna interakcija enzim-supstrat itd. Zato se pojavilo nekoliko modela koji teže da objasne realne biohemijske procese (76).

Model fizičko-hemijskih procesa u biološkim sistemima, koji je predložio Frulih (83) i na osnovu koga bi se prevazišao raskorak između izračunatih i realnih brzina hemijskih reakcija, zasniva se na sledećim zaključcima:

(1) biopolimeri, proteini, DNK i RNK, bi trebalo da imaju metastabilno ekscitirano stanje sa vrlo velikim dipolnim momentom

(2) proteini, DNK i RNK vibriraju na frekvencijama bliskim 10^{11} Hz.

Pod ovim uslovima ekscitacija polarnog stanja makromolekula dovodi do razbijanja električne simetrije i kroz porast internog električnog polja omogućava njegovu dalekosežnu specifičnu privlačnu interakciju sa drugim molekulom. Korišćenjem Ramanovog efekta i koherentnih milimetarskih talasa došlo se do eksperimentalnih dokaza o postojanju periodičnih vibracija proteina u oblasti 10^{11} - 10^{12} Hz. Međusobna interakcija polarnih bioloških makromolekula, koja je zasnovana na takvim vibracijama, dovodi do pojave frekventno-selektivnih dalekosežnih sila. Ovakve sile su efikasne na rastojanjima većim od linearne dimenzije molekula koji stupaju u interakciju. Slaganje frekvenci između bioloških makromolekula dozvoljava njihovu selektivnu komunikaciju na velikim distancama, što omogućava ubrzavanje biohemijskih procesa i porast produktivnih sudara u poređenju sa slučajnim susretima molekula. Na osnovu ovih razmatranja može da se zaključi da je za efikasnu interakciju

bioloških makromolekula neophodna kompatibilnost frekvenci dalekosežnih sila kao i strukturna komplementarnost (74,75,76).

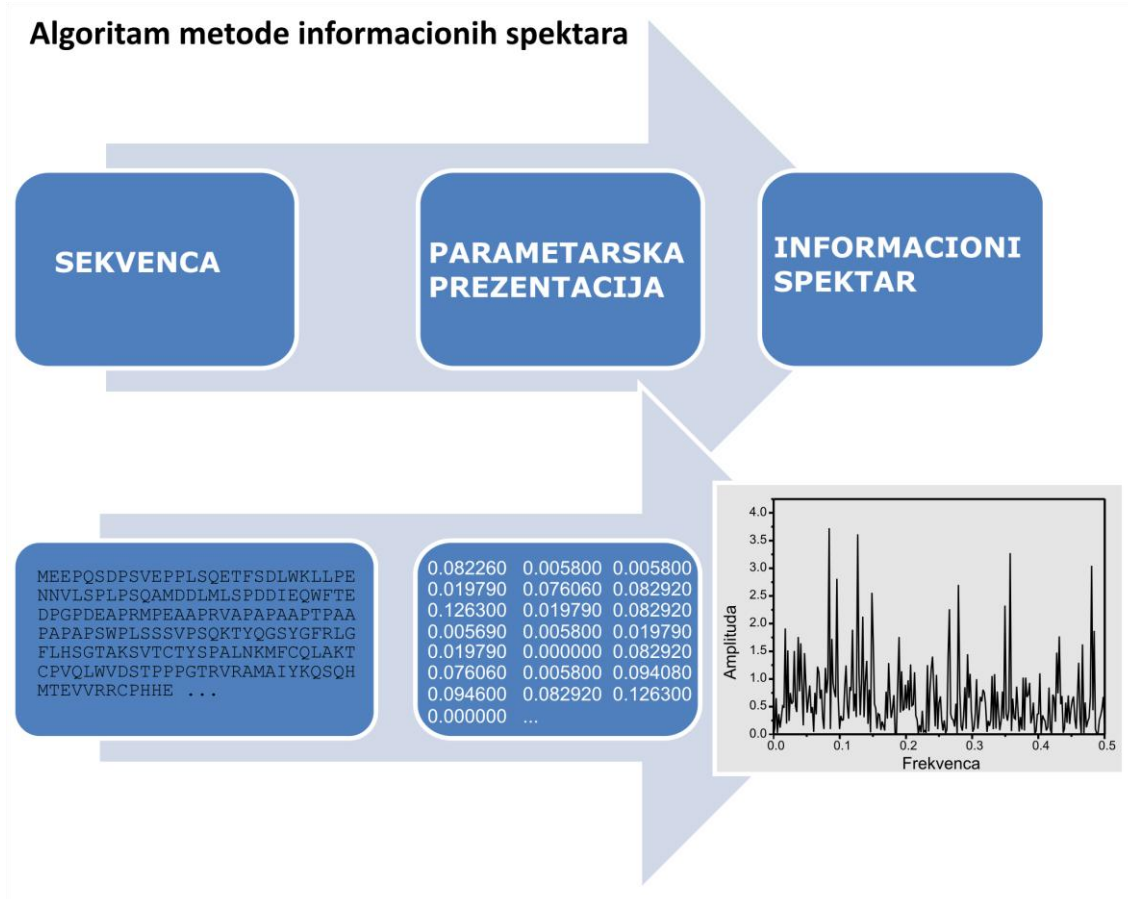
Kada su u pitanju proteini, pretpostavlja se da je izvor električnih oscilacija vremenski zavisna polarizacija proteinskih bočnih grupa indukovana kretanjem valentnih elektrona u konstantnom delu makromolekula (84). Ovo stanovište nas upućuje na to da su karakteristike oscilovanja proteina određene primarnom strukturom proteina tj. rasporedom i osobinama aminokiselina koje grade molekul proteina.

S obzirom da su dalekosežne sile između biomolekula važne za odigravanje biohemijskih procesa, trebalo bi ih analizirati prilikom ispitivanja interakcija protein-protein i protein-DNK. Fizički parametar, koji opisuje dalekosežna svojstva aminokiselina je potencijal elektron-jon interakcije (PEJI). PEJI vrednost se za organske molekule izračunava na osnovu jednačine dobijene iz opšteg modela za pseudopotencijal (85) i date su u Tabeli 3. Jedinica za izražavanje vrednosti PEJI je Rydbergs (Ry).

Tabela 3. Vrednosti potencijala elektron-jon interakcije za aminokiseline (74)

Aminokiseline	Simbol	PEJI (Ry)	Aminokiseline	Simbol	PEJI (Ry)
Leucin	Leu, L	0,0000	Tirozin	Tyr, Y	0,0516
Izoleucin	Ile, I	0,0000	Triptofan	Trp, W	0,0548
Asparagin	Asn, N	0,0036	Glutamin	Gln, Q	0,0761
Glicin	Gly, G	0,0050	Metionin	Met, M	0,0823
Glutaminska kis.	Glu, E	0,0058	Serin	Ser, S	0,0829
Valin	Val, V	0,0057	Cistein	Cis, C	0,0829
Prolin	Pro, P	0,0198	Treonin	Thr, T	0,0941
Histidin	His, H	0,0242	Fenilalanin	Phe, F	0,0946
Lizin	Lys, K	0,0371	Arginin	Arg, R	0,0959
Alanin	Ala, A	0,0373	Asparaginska kis.	Asp, D	0,1263

Za analizu proteinskih sekvenci ISM-om korišćeni su računarski programi razvijeni u Centru za multidisciplinarne studije i inženjering, Instituta za nuklearne nauke, Vinča. Algoritam metode informacionih spektara dat je na Slici 7.



Slika 7. Procedura ISM. Prva faza podrazumeva transformaciju sekvence aminokiselina, simbolično predstavljene u obliku alfabetskog niza, u numeričku sekvencu. Taj postupak podrazumeva predstavljanje svake rezidue u sekvenci vrednošću hemijskog deskriptora, potencijala elektron-jon interakcije (PEJI), koji odgovara prosečnom energetsom stanju svih valentnih elektrona u određenoj aminokiselini. U drugoj fazi se numerička sekvencu transformiše u virtuelni domen frekvenci da bi se kreirao ISM spektar korišćenjem diskretne Fourier-ove transformacije.

Istraživanja su pokazala da parovi proteina, koji stupaju u interakcije, kao što su receptor i ligand ili antigen i antitelo imaju zajedničku istu karakterističnu frekvencu (74,86). Da bi se identifikovale frekvence u informacionom spektru molekula važne za biološku funkciju ili interakciju sa drugim molekulima, za više funkcionalno sličnih proteina određuje se kros-spektralna funkcija (KS). Vrhovi u kros-spektralnoj funkciji definišu značajne zajedničke karakteristike analiziranih nizova. Za procenu sličnosti

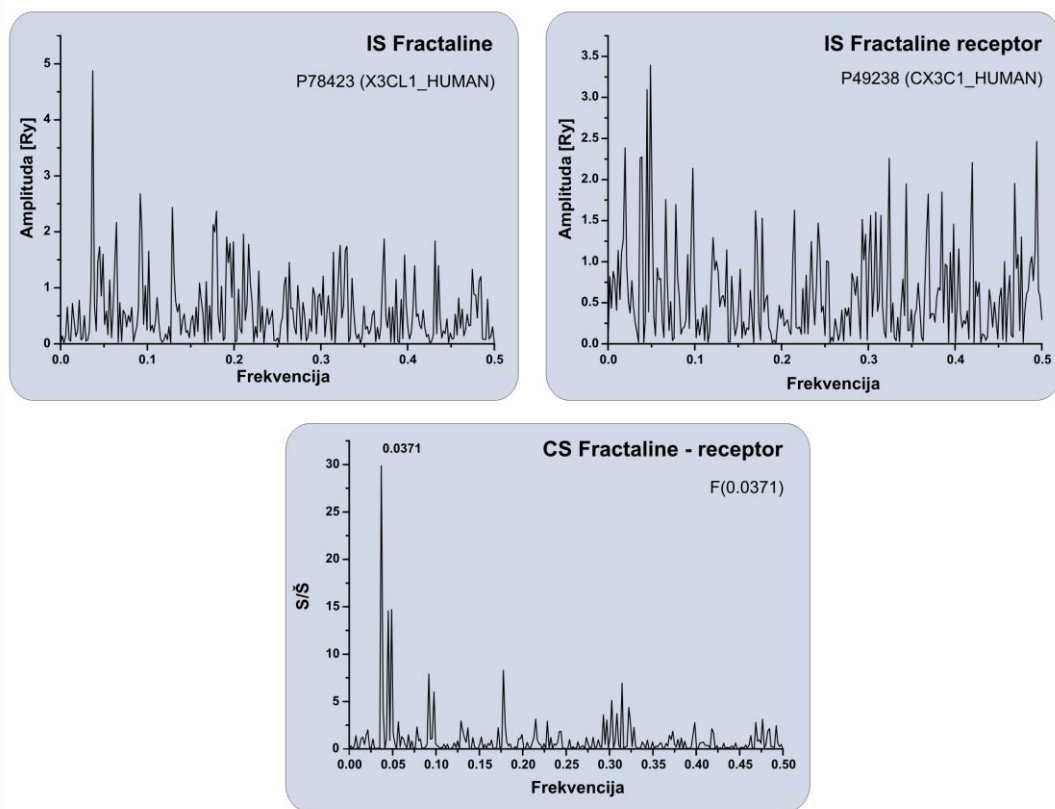
vrhova u kros-spektralnoj funkciji, koristi se vrednost odnosa signal/šum-S/Š (engl. signal/noise-S/N), koji predstavlja odnos intenziteta posmatranog signala i aritmetičke srednje vrednosti intenziteta signala preostalog dela spektra. Ako se za grupu proteina različite primarne strukture, izračunavanjem kros-spektralne funkcije nađe značajan vrh, znači da analizirane sekvence imaju zajedničku karakterističnu frekvencu. Tada se može zaključiti da njihove primarne strukture kodiraju istu informaciju (75). Osim toga, pokazano je da:

[1] grupa sekvenci sa istom biološkom funkcijom ima samo jednu karakterističnu frekvencu;

[2] karakteristične sekvence su različite za različite biološke funkcije;

[3] ne postoji značajan vrh u konsenzus informacionom spektru za sekvence koje nisu u nekoj biološkoj vezi.

Kada se metodom informacionih spektara utvrdi koja je karakteristična frekvencija povezana sa određenom biološkom funkcijom, korišćenjem inverznog pristupa u odnosu na opisani, moguće je predvideti sekvence aminokiselina koje u najvećoj meri određuju datu frekvencu i verovatno su važne za datu funkciju. U ove svrhe dužina numeričke sekvence se definiše rezolucijom, kojom se postiže da različiti vrhovi budu dovoljno razdvojeni i željenom dužinom peptida (87). Na taj način ISM može da se koristi i za dizajniranje peptidomimetika.



Slika 8. Kros-spektralna analiza proteina fraktalina i njegovog specifičnog receptora. Nakon dobijanja IS dva analizirana proteina određuje se kros-spektralna funkcija ovih proteina. Dominantni pik na F(0,0371) označava zajedničku frekvencu za obe sekvence. Za oba spektra na apcisi su predstavljene frekvence dobijene Fourier-ovom transformacijom sekvence vrednosti PEJI što odgovara sekvenci aminokiselina. Na ordinati su predstavljene vrednosti odnosa signal/šum-S/Š (engl. signal/noise-S/N) koje odgovaraju svakoj frekventnoj komponenti u spektru. (Preuzeto iz: Stojković L, Djurić T, Stanković A, Dinčić E, Stančić O, Veljković N, Alavantić D, Zivković M. The association of V249I and T280M fractalkine receptor haplotypes with disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2012 Apr;245(1-2):87-92)

3.3.2 Poravnavanje sekvenci

Lokalno poravnavanje sekvenci izvršeno je programom BLAST (88), kao i primenom bioinformatičkog alata EMBOSS Water (89). Globalno poravnavanje

sekvenci izvršeno je programom CLUSTALW (90). Klasterizacija GO sopstvenih humanih autoantigena je izvršena pomoću programa DAVID (91).

3.4 Laboratorijske metode

3.4.1 Protokol *in house* ELISA testa za HIV-1 inficirane pacijente

Oblaganje

Peptid (NTMs)₄-SOC₄ je rastvoren u puferu za oblaganje da bi se dobila koncentracija 0,005 g/L. Polistirenske mikrotitarske ploče (Grenier Bio One 96 polja, sa ravnim dnom) su inkubirane preko noći na 4°C sa 100 µL rastvora peptida. Nakon toga su isprane šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Blokiranje

Blokiranje nezasićenih mesta na ploči je vršeno sa 200 µL 5% BSA u fosfatnom puferu u toku dva sata na sobnoj temperaturi. Ploča je isprana šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Dodavanje seruma

Uzorci su razblaženi u odnosu 1:100 u 5% BSA u fosfatnom puferu. Dodato je 100 µL razblaženog seruma po bazenčiću. Inkubiranje je trajalo 4 sata na sobnoj temperaturi, a zatim je urađeno ispiranje šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Reakcija detekcionih antitela

Peroksidazom konjugovana kozja anti-humana IgG antitela specifična za Fc fragment (Sigma A0170), razblažena u odnosu 1:2500 u 5% BSA u fosfatnom puferu, dodata su u zapremini od 100 µL po otvoru. Inkubiranje je trajalo 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je urađeno ispiranje šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Razvijanje boje

Za enzim peroksidazu kojom su bila obeležena detekciona antitela kao supstrat je korišćen OPD (o-fenilendiamin dihidrohlorid, tablete, Sigma) u fosfatno-citratnom puferu. Neposredno pre upotrebe je rastvarana jedna tableta OPD-a u 35 mL pufera (1mg/mL). Nakon toga je dodavano 50 μ L rastvora 30% vodonik-peroksida.

Reakcija je zaustavljena nakon 15 minuta korišćenjem 100 μ L 0,5 M sumporne kiseline. Apsorbanca je merena na ELISA čitaču na 492/620 nm.

3.4.2 Protokol *in house* ELISA testa za novorođenčad

Oblaganje

Peptid (NTMs)₄-SOC₄ je rastvoren u puferu za oblaganje da bi se dobila koncentracija 0,0125 g/L. Polistirenske mikrotitarske ploče (SARSTEDT 96 polja, sa ravnim dnom) su inkubirane preko noći na 4°C sa 100 μ L rastvora peptida. Nakon toga su isprane šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Blokiranje

Blokiranje nezasićenih mesta na ploči je vršeno sa 200 μ L 5% BSA u fosfatnom puferu u toku dva sata na sobnoj temperaturi. Ploča je isprana šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Dodavanje seruma

Uzorci su razblaženi u odnosu 1:200 u 5% BSA u fosfatnom puferu. Dodato je 100 μ L razblaženog seruma po otvoru. Inkubiranje je trajalo 4 sata na sobnoj temperaturi, a zatim je urađeno ispiranje šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Reakcija detekcionih antitela

Alkalnom fosfatazom konjugovana kozja anti-humana IgM antitela specifična za Fc fragment (Sigma A9794), razblažena u odnosu 1:50 u 5% BSA u fosfatnom puferu, dodata su u zapremini od 100 μ L po otvoru. Inkubiranje je trajalo 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je urađeno ispiranje šest puta sa 0,05% Tween-om u fosfatnom puferu.

Razvijanje boje

Kao supstrat za enzim alkalnu fosfatazu kojom su bila obeležena sekundarna antitela korišćen je p-nitrofenil fosfat (50 mmol/L, EliTech) u DEA (smeša dietanolamin pufera 1,25 mol/L, pH 10,2 i magnezijum hlorida 0,625 mmol/L, EliTech). Neposredno pre korišćenja je rastvaran p-nitrofenil fosfat u odnosu 1:10 u DEA puferu. Za jednu ploču je rastvaran 1 mL p-nitrofenil fosfat-a u 9 mL DEA.

Reakcija je zaustavljena posle 15 minuta dodavanjem po 100 μ L 3 M natrijum-hidroksida u svaki otvor. Apsorbanca je merena na ELISA čitaču na 405/620 nm.

Kao kontrolu smo koristili antigen iz testa Serion ELISA classic Cytomegalovirus (Institute Virion/Serion GmbH).

3.4.3 Reagensi

Bikarbonatni pufer (pufer za oblaganje)-pH 9,6

natrijum karbonat, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$	28,6 g
natrijum hidrogenkarbonat, NaHCO_3	8,4 g
destilovana voda H_2O	do 1000 mL

Fosfatni pufer-pH 7,4

primarni kalijum hidrogenfosfat, KH_2PO_4	0,2 g
sekundarni natrijum hidrogenfosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
natrijum hlorid, NaCl	8,0 g
kalijum hlorid, KCl	0,2 g
destilovana voda H_2O	do 1000 mL

Puferi su sterilisani na 110°C i do upotrebe čuvani na $+4^\circ\text{C}$.

Fosfatno-citratni pufer

Fosfatno-citratni pufer je dobijan rastvaranjem jedne tablete pufera (Sigma) u 100 mL destilovane vode.

Rastvor govedeg serumskog albumina (engl. Bovine Serum Albumin-BSA) u fosfatnom puferu

Pravljen je 5% BSA (Bovine Serum Albumin fraction V- SERVA 11930 pH 7,0) u fosfatnom puferu. Rastvor je čuvan na 4°C do upotrebe.

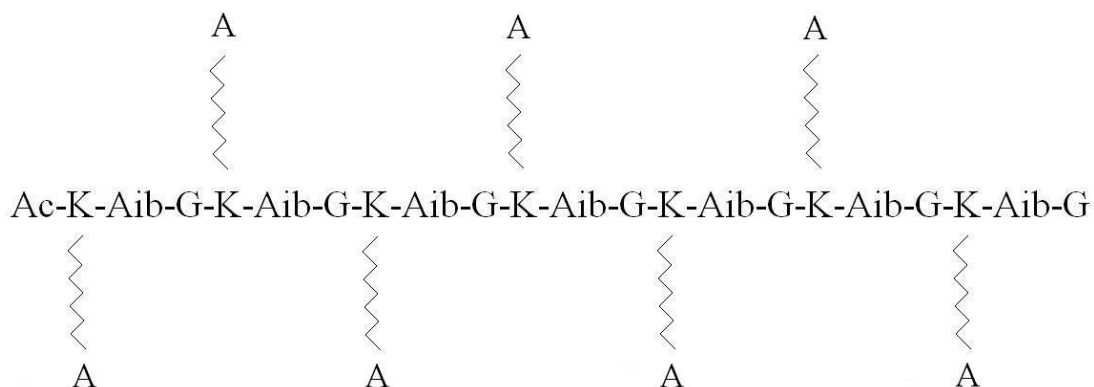
Deterdžentski rastvor 0.05% Tween u fosfatnom puferu

0,5 mL Tween-a 20 je rastvarano u 1 L fosfatnog pufera.

3.4.4 Peptid za oblaganje ploče

Prilikom oblaganja ploče, mnogi peptidi će se direktno vezati za mikrotitarsku ploču bez modifikacija. S druge strane, mali molekuli koji sadrže manje od 20 aminokiselina, zahtevaju konjugaciju za irelevantni noseći protein da bi se bolje vezali za čvrstu fazu. Kao noseći proteini mogu da se koriste goveđi, mišji ili zečiji serumski albumin, ovalbumin i dr. Nedostaci ovih nosača su između ostalog i to što mogu da dovedu do promene bioloških osobina peptidnog epitopa i izazovu promenu aktivne konformacije. Zato se sve češće koriste sintetski nosači. Ovi nosači su često građeni od većeg broja rezidua lizina tako da za njih može da se veže više kopija peptidnog antigena. Konjugacija peptida za ovakve nosače treba da spreči konformacione restrikcije i sterne smetnje i tako omogući optimalno prepoznavanje epitopa od strane antitela. Antigeni zadržavaju svoju prirodnu „aktivnu” konformaciju bez interakcije sa drugim molekulima antigena ili nosača (92, 93, 94)

U našim eksperimentima je kao peptidni nosač korišćen sekvencijelni oligopeptidni nosač-SOC_n (engl. Sequential Oligopeptide Carrier) koji je građen od ponavljajućeg segmenta lizin- α -aminoizobuterna kiselina-glicin.



Slika 9. Ilustracija sekvencijelnog oligopeptidnog nosača (engl. SOC_n) i za njega vezanog antigena (preuzeto iz: Sakarellos-Daitsiotis et al. Methods, 1999)

Za potrebe izvođenja naših eksperimenata manuelno je vršena sinteza konjugata (NTMs)₄-SOC₄ (sintetisan na Hemijskom fakultetu, Univerzitet u Janjini, Grčka). Rađen je postupak višestepene sinteze peptida na čvrstoj fazi uz korišćenje BOC-Gly-OCH₂-Pam smole (1g, kapacitet 0,25 mmol/g). Oligopeptidi nosač (SOC₄) sačinjen od ponavljajućeg niza Lys-Aib-Gly, korišćen je da prikaže analizirani peptid. Procedura sinteze započinje tako što se korak po korak kupuju zaštićene rezidue (Boc/Bzl) na SOC₄ nosač na smoli. Lizin se uvodi u obliku Boc-Lys(Fmoc)-OH. Posle uklanjanja Fmoc protektivne grupe sa ε-amino grupe lizina uz pomoć 20% piperidina u dimetilformamidu, sinteza epitopa FTDNAKTI je vršena simultanim vezivanjem svake rezidue u četiri kopije. Treonin je uveden kao Boc-Thr(Bzl)-OH, lizin kao Boc-Lys(2,6-Di-CI-Bzl)-OH i asparaginska kiselina kao Boc-Asp(Obzl)-OH. Peptid je odvojen od smole korišćenjem tečnog HF u prisustvu fenola i anizola u toku 30 minuta na -8°C i 1,5 h na 0°C i ekstrahovan sa 2 M sirćetnom kiselinom. Tako dobijen peptid je prečišćen korišćenjem reverzno fazne HPLC (engl. high pressure liquid chromatography) tehnike na Supelco Discovery C₁₈ semipreparativnoj koloni (25 cm x 10 mm, 5 μm). Eluent A je bila 0,1% trifluorosirćetna kiselina u vodi, eluent B je bila 0,1% trifluorosirćetna kiselina u acetonitrilu i linearni gradijent je bio 20% do 40% acetonitrila u 0,1% trifluorosirćetnoj kiselini pri protoku brzine od 4,7 mL/min u toku 30 minuta i detekcija je rađena na λ=214 nm. Prečišćeni peptid je potvrđen pomoću analitičke reverzno fazne HPLC metode (t_R=13,2 min) i ESI-MS (M+H⁺ izračunat/nađen 4705,35/4705,65). Karakterizacija strukture je izvršena pomoću nuklearne magnetne rezonance i molekuskog modelovanja.

Peptidi su čuvani na -20°C, bez obzira da li su u čvrstom stanju ili u rastvoru. Rastvori koncentracije 1 mg peptida/mL H₂O su pravljani u malim porcijama i izbegavano je često odmrzavanje i zamrzavanje. Na ovaj način se izbegava neželjena oksidacija peptida.

3.5 Statistička analiza

Značajnost razlike vrednosti apsorbance dobijenih u eksperimentalnom radu u ELISA testovima izračunati su korišćenjem Studentovog t-testa, pošto su veličine uzoraka bile relativno male. Upotrebljen je heteroskedastički t-test s obzirom da se radilo o grupama sa raspodelom podataka sa nejednakim varijansama.

4. Rezultati

4.1 Analiza humanih sopstvenih antigena

Visok stepen specifičnosti ELISA testa počiva na izboru antigena koji vezuje samo antitela od interesa. Pored koinfekcije sa drugim patogenima, nespecifične reakcije mogu poticati od interakcije antigena u ELISA testu sa prirodnim autoantitelima, koja su deo imunskog sistema svake osobe i funkcionalno su reaktivna sa sopstvenim antigenima. Da bi se napravio optimalan izbor specifičnog antigena, potrebno je poznavati sopstvene antigene domaćina, odnosno generalno antigene sa kojim su autoantitela ukršteno reaktivna. Prirodna autoantitela su deo imunskog repertoara svih kičmenjaka. Ona se vezuju za evolutivno konzervirane antigene koji mogu postojati i na patogenim organizmima i zato su važna za inicijalnu odbranu od štetnih mikroorganizama. Sopstveni antigenski repertoar čoveka je genetski određen.

4.1.1 Podaci o sekvencama humanih sopstvenih antigena

U okviru ove studije smo na osnovu podataka objavljenih u naučnoj literaturi napravili kompilaciju podataka, koja sadrži sekvence sopstvenih antigena čoveka. Iz ove kompilacije sekvenci (Tabela 4) se bioinformatičkim alatima mogu ekstrahovati informacije o specifičnim i nespecifičnim antigenima za kliničku dijagnostiku.

Tabela 4. Podaci o sekvencama humanih sopstvenih antigena

Opis proteina	Broj (SwissProt)	Reference
Alfa-2-makroglobulin prekursor	P01023	12
Acetilholinesteraza prekursor	P22303	12
Serumski albumin prekursor	P02768	12
Fruktoza-bifosfat aldolaza A	P04075	12
Fruktoza-bifosfat aldolaza B	P05062	12
Fruktoza- bifosfat aldolaza C	P09972	12
Amiloid beta A4 protein	P05067	12
Anjon izmenjivački protein 3	P48751	95
Atrijalni natriuretični faktor prekursor	P01160	12
Natriuretični peptid B prekursor (Sadrži: Gama-moždani natriuretični peptid; Moždani natriuretični peptid 32)	P16860	12
Aneksin A10	Q9UJ72	12
Aneksin A11	P50995	12
Aneksin A13	P27216	12
Aneksin A1	P04083	12
Aneksin A2	P07355	12
Aneksin A3	P11229	12
Aneksin A4	P09525	12
Aneksin A5	P08758	12
Aneksin A6	P08133	12
Aneksin A7	P20073	12
Aneksin A8	P13928	12

Aneksin A9	O76027	12
ATP sintaza subjedinica alfa, mitohondrijalna	P25705	96
ATP sintaza subjedinica beta, mitohondrijalna	P06576	96
Beta-2-glikoprotein 1 prekursor	P02749	12
Beta-2-mikroglobulin prekursor (Sadrži: Beta-2-mikroglobulin formu pI 5,3)	P61769	12
Komplement C1q subkomponenta subjedinica A prekursor	P02745	12
Komplement C1q subkomponenta subjedinica B prekursor	P02746	12
Komplement C1q subkomponenta subjedinica C prekursor	P02747	12
Kalcitonin prekursor (Sadrži: Kalcitonin; Katakalcin)	P01258	12
Kaspaza-3 prekursor	P42574	12
Kaspaza-8 prekursor	Q14790	12
Katalaza	P04040	12
C-C hemokin receptor tip 5	P51681	97,98
C-X-C hemokin receptor tip 4	P61073	97
Citrat sintaza, mitohondrijalna	O75390	30
T-ćelijski površinski glikoprotein CD4	P01730	97, 99, 100
Ciklin-A1	P78396	12
Ciklin-A2	P20128	12
Horiogonadotropin sujedinica beta prekursor	P01233	12
60 kDa stres protein, mitohondrijalni prekursor	P10809	12
Koagulacioni faktor VIII	P00451	101, 102
Kolagen alfa-1(I) lanac prekursor	P01252	12
Kolagen alfa-2(I) lanac prekursor	P08123	12

Komplement componenta C9 prekursor (Sadrži: Komplement komponentu C9a; Komplement komponenta C9b)	P02748	12
Kolagen alfa-1(X) lanac prekursor	Q03692	12
Kortikotropin-lipotropin prekursor	P01189	12
Kortikoliberin prekursor	P06850	12
C-reaktivni protein prekursor (Sadrži: C-reaktivni protein (1-205))	P02741	12
Citotoksični T-limfocit protein 4 prekursor	P16410	12
Glutamat dekarboksilaza 1	Q99259	12
Glutamat dekarboksilaza 2	Q05329	12
Granulocitni makrofagni faktor stimulacije kolonija	P04141	103
DnaJ homolog subfamilija B član 1	P25685	12
Endoplazmin/gp96 homolog	P14625	96
Endotelin-1 prekursor	P05305	12
Endotelin-2 prekursor	P20800	12
Alfa-enolaza	P06733	96
Pro-epidermalni faktor rasta prekursor	P01133	12
Leukocitna elastaza prekursor	P08126	12
Koagulacioni faktor X prekursor	P00742	12
Koagulacioni faktor VII prekursor	P08709	12
Alfa-2-HS-glikoprotein prekursor	P02765	12
Fetuin-B prekursor	Q9UGM5	12
Fibrinogen alfa lanac prekursor (Sadrži: Fibrinopeptid A)	P02671	12
Fibrinogen beta lanac prekursor (Sadrži: Fibrinopeptid B)	P02675	12
Fibrinogen gama lanac prekursor	P02679	12

Fibronektin prekursor	P02751	12
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	P04406	12, 96
Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, testis-specifična	O14556	12
Gastrin prekursor (Sadrži: Gastrin-71)	P01350	12
Gelzolin prekursor	P06396	12
Glikoprotein hormon, alfa lanac, prekursor	P01215	12
Glukagon prekursor (Sadrži: Glicentin; Glicentin-povezani polipeptid)	P01275	12
Progonadoliberin-1 prekursor	P01148	12
Protein toplotnog stresa-70, mitohondrijalni prekursor	P38646	12
Glutation S-transferaza A1	P08263	12
Glutatione S-transferaza A2	P09210	12
Glutathion S-transferase A3	Q16772	12
Glutation S-transferaza A4	O15217	12
Glutation S-transferaza A5	Q7RTV2	12
Glutation S-transferaza kapa 1	Q9Y2Q3	12
Glutation S-transferaza Mu 1	P09488	12
Glutation S-transferaza Mu 2	P28161	12
Glutation S-transferaza Mu 3	P21266	12
Glutation S-transferaza Mu 4	Q03013	12
Glutation S-transferaza Mu 5	P46439	12
Glutation transferaza omega-1	P78417	12
Glutation transferaza omega-2	Q9H4Y5	12
Glutation S-transferaza P	P09211	12

Glutation S-transferaza teta-1	P30711	12
Glutation S-transferaza teta-2	P30712	12
Visoko afinitetni imunoglobulin epsilon receptor, subjedinica alfa	P12319	104
Histon H2A tip 2-C	Q16777	12
Hemoglobin subjedinica alfa	P69905	12
Hemoglobin subjedinica teta-1	P09105	12
Hemoglobin subjedinica zeta	P02008	12
Hemoglobin subjedinica beta	P68871	12
Hemoglobin subjedinica delta	P02042	12
Hemoglobin subjedinica epsilon	P02100	12
Hemoglobin subjedinica gama 1	P69891	12
Hemoglobin subjedinica gama 2	P69892	12
Hemoglobin subjedinica mi	Q6B0K9	12
Spermalni protamin-P1	P04553	12
Protein toplotnog stresa 70 kDa protein 1	P08107	12
Protein toplotnog stresa 70 kDa protein 4	P34932	12, 96
Protein toplotnog stresa 70 kDa protein 6	P17066	12
Putativni protein toplotnog stresa 70 kDa protein 7	P48741	12
Protein toplotnog stresa (cognate) 71 kDa protein	P11142	12, 96
Protein toplotnog stresa 70 kDa protein 14	Q0VDF9	12
Protein toplotnog stresa HSP 90-beta	P08238	96
Protein toplotnog stresa beta-1	P04792	12
Amiloid polipeptid prekursor	P10997	12

Interferon gama	P01579	103
Interleukin-1 alfa	P01583	103
Interleukin-10 prekursor	P22301	12
Interleukin-12 subjedinica alfa prekursor	P29459	12
Interleukin-12 subjedinica beta prekursor	P29460	12
Interleukin-15 prekursor	P40933	12
Interleukin-2 prekursor	P60568	12
Interleukin-21 prekursor	Q9HBE4	12
Interleukin-2 receptor alfa lanac prekursor	P01589	12
Interleukin-2 receptor subjedinica beta prekursor	P14784	12
Interleukin-4 prekursor	P05112	12
Interleukin-5 prekursor	P05113	12
Interleukin-6 prekursor	P05231	12, 105
Interleukin-8 prekursor	P10145	12
Insulin prekursor (Sadrži: Insulin B lanac; Insulin A lanac)	P01308	12
Keratin, tip I citoskeletni 18	P05783	12
Keratin, tip II citoskeletni 8	P05787	12
Laminin subjedinica alfa-1 prekursor	P25391	12
Laminin subjedinica alfa-2 prekursor	P12043	12
Laminin subjedinica alfa-3 prekursor	Q16787	12
Laminin subjedinica alfa-4 prekursor	Q16363	12
Laminin subjedinica alfa-5 prekursor	O15230	12
Laminin subjedinica beta-1 prekursor	P07942	12

Laminin subjedinica beta-2 prekursor	P55268	12
Laminin subjedinica beta-3 prekursor	Q13751	12
Laminin subjedinica gama-1 prekursor	P11047	12
Laminin subjedinica gama-2 prekursor	Q13753	12
Laminin subjedinica gama-3 prekursor	Q9Y6N6	12
Receptor lipoproteina male gustine prekursor	P01130	12
Lupus La protein	P05455	106
Galektin-1	P09382	12
Galektin-3	P17931	12
Malat dehidrogenaza, mitohondrijalna	P40926	107
Melanoma-povezani antigen E1	Q9HCI5	12
Melanoma antigen prepoznat od T-ćelija 1	Q16655	12
Pro-MCH-sličan protein 1	Q16048	12
Pro-MCH-sličan protein 2	Q9BQD1	12
Makrofagni migracioni inhibitorni faktor	P14174	12
Intersticijalni kolagenaza prekursor	P03956	12
72 kDa tip IV kolagenaza prekursor	P08253	12
Stromelizin-1 prekursor	P08254	12
Matriks metaloproteinaza-9 prekursor	P14780	12
Mijelin-povezani oligodendrocitni osnovni protein	Q13875	12
Mijelin-oligodendrociti glikoprotein prekursor	Q16653	12
Mucin-1 prekursor	P15941	12
Mik proto-onkogen protein	P01106	12

Mioglobin	P02144	12, 108
Mijelin proteolipid protein	P60201	12
Oksitocin-neurofizin 1 prekursor	P01178	12
Neurotenzin/neuromedin N prekursor (Sadrži: Veliki neuromedin N)	P30990	12
Neuropeptid Y prekursor (Sadrži: Neuropeptid Y)	P01303	12
Mijeloperoksidaza prekursor	P05164	12, 109
Fosfatidilinositol-glikan-specifična fosfolipaza D prekursor	P80108	12
Fosfoglicerat mutaza 1	P18669	96
Plazminogen prekursor	P00747	12
Protein disulfid-izomeraza/Prolil 4-hidroksilaza sujedinicica beta	P07237	96
Protein disulfid-izomeraza A5	Q14554	96
Protein disulfid-izomeraza A3	P30101	96
Proteolipid protein 2	Q04941	12
Prostatična kiselina fosfataza prekursor	P15309	12
Protamin-2	P04554	12, 110
Protamin-3	Q9NNZ6	12
Paratiroidni hormon-povezani protein prekursor	P12272	12
Paratiroidni hormon/paratiroidni hormon-povezani peptid receptor prekursor	Q03431	12
Paratiroidni hormon prekursor	P01270	12
Serpin H1 prekursor	P50454	12
Serum amiloid A protein	P02735	111
Sijalinska kiselina-vezujući Ig-sličan lektin 8/Siglec 8	Q9NYZ4	112
Sijalinska kiselina-vezujući Ig-sličan lektin 9/Siglec 9	Q9Y336	113

Mali nuklearni ribonukleoprotein Sm D1	P62314	106
Mali nuklearni ribonukleoprotein Sm D2	P62316	106
Mali nuklearni ribonukleoprotein Sm D3	P62318	106
Somatoliberin prekursor	P01286	12
Somatostatin prekursor	P61278	12
60 kDa SS-A/Ro ribonukleoprotein	P10155	106
Superoksid dizmutaza Cu-Zn	P00441	12
Ekstracelularna superoksid dizmutaza Cu-Zn prekursor	P08294	12
Superoksid dismutaza Mn, mitohondrijalni prekursor	P04179	12
Spektrin alfa lanac, eritrocitni	P02549	12
Spektrin beta lanac 1, moždani	Q01082	12
Alfa-sinuklein	P37840	12,17
Transformišući faktor rasta beta-1 prekursor	P01137	12
Transformišući faktor rasta beta -2 prekursor	P61812	12
Transformišući faktor rasta beta-3 prekursor	P10600	12
Protein-glutamin gama-glutamyltransferaza K	P22735	12
Protein-glutamin gama-glutamyltransferaza 2	P21980	12
Protein-glutamin gama-glutamyltransferaza E prekursor	Q08188	12
Protein-glutamin gama-glutamyltransferaza 6	O95932	12
Protein-glutamin gama-glutamyltransferaza 4	P49221	12
Protein-glutamin gama-glutamyltransferaza 5	O43548	12
Protein-glutamin gama-glutamyltransferaza Z	Q96PF1	12
Protrombin prekursor	P00734	12

Talin-1	Q9Y490	114
Talin-2	Q9Y4G6	114
Thy-1 membranski glikoprotein	P04216	115
Tireoglobulin prekursor	P01266	12
Protahikinin 1 prekursor	P20366	12
Tubulin beta-4B lanac/Tubulin beta-2 lanac	P68371	96
Tumor nekroza faktor prekursor	P01375	12
Tumor nekroza faktor receptor superfamilja član 6/Apo-1 antigen/FASLG receptor	P25445	116
Trafiking kinezin-vezujući protein 1	Q9UPV9	96
Tropomiozin alfa-1 lanac	P09493	12
Tropomiozin beta lanac	P07951	12
Tropomiozin alfa-3 lanac	P06753	12
Tropomiozin alfa-4 lanac	P67936	12
Serotransferin prekursor	P02787	12, 108
Laktotransferin prekursor	P02788	12
Ubikvitin	P62988	12
Vimentin	P08670	27
Vinkulin	P18206	114
VIP peptid prekursor (Sadrži: Intestinalni peptid PHV-42; Intestinalni peptid PHM-27)	P01282	12
Vitronektin prekursor	P04004	12

U ovom radu je sakupljeno 225 sekvenci sopstvenih antigena čoveka objavljenih u naučnoj literaturi. Proteini koji su dati u Tabeli 4 su raznoliki u pogledu strukture, funkcije i lokalizacije. Najveći broj podataka potiče iz rada Merbl Y i sar. (12) u kome su u cilju ispitivanja karakteristika prirodne autoimunosti na rođenju, analizirana autoantitela na sopstvene antigene u serumima iz krvi pupčanika zdravih beba i iz krvi njihovih majki. Detekciju velikog broja autoantigena omogućila je primena mikroerej metode uz korišćenje čipova obloženih sa 305 fragmenata različitih molekula, dok je analiza podataka rađena primenom bioinformatičkih metoda. Značajan deo autoantigena nađenih u ovom istraživanju pripada u pogledu funkcionalnog obeležja tkivnim proteinima, imunomodulatorima i proteinima toplotnog stresa (117).

Deo podataka potiče iz istraživanja Servettaz A i sar. (96) u kome je cilj bio da se prouče ciljni antigeni za antiendotelna antitela u serumu zdravih odraslih dobrovoljaca. Analiza je rađena primenom dvodimenzionalne elektroforeze, imunoblotinga i masene spektrometrije. Kod svih ispitanika su nađena antitela na citoskeletne proteine (α -tubulin, vimentin) i glikolitičke enzime (gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza i α -enolaza).

Manji broj sopstvenih autoantigena izučavan je pojedinačno u više različitih studija, koje su najčešće istraživala patogenezu patološke autoimunosti, pri čemu su u organizmu zdravih ljudi detektovana prirodna autoantitela.

4.1.2 Bioinformatička analiza karakteristika humanih sopstvenih antigena

Da bismo utvrdili kojim biološkim grupama i funkcionalnim klasterima pripadaju autoantigeni prikazani u Tabeli 4, primenili smo analizu ontologije gena ovih proteina. Ontologija gena (engl. Gene Ontology-GO) je bioinformatička inicijativa koja ujedinjuje reprezentacije gena i karakteristike produkata tih gena kod različitih bioloških vrsta (118). U ovoj bazi podataka svaki gen je opisan ćelijskom komponentom sa kojom je povezan, biološkim procesom i molekulskom funkcijom. Klasterizacija GO sopstvenih humanih autoantigena je izvršena pomoću programa DAVID (91). U ovoj

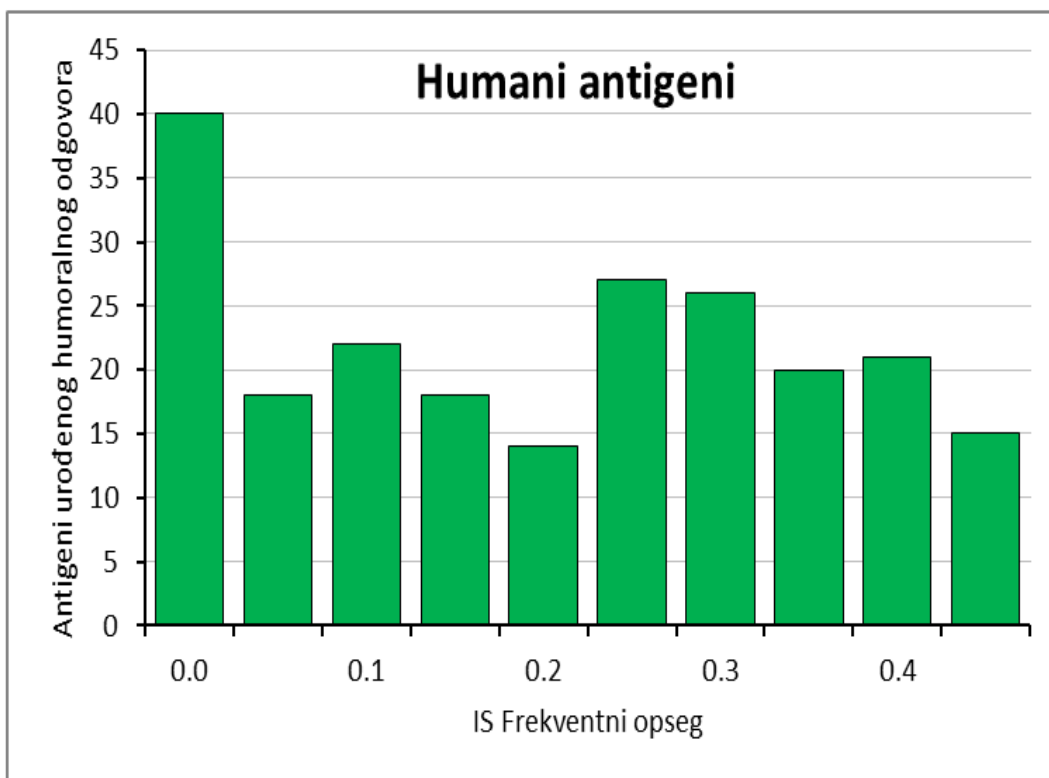
vrsti analize vrednosti faktora obogaćenja veće od 3,5 smatraju se značajnim (91), a na osnovu laboratorijskog iskustva vrednosti veće od 7,5 imaju biološkog značaja (Jude Fitzgibbone, Queen Mary, University of London, lična komunikacija).

Tabela 5. Klasteri kojima pripadaju humani sopstveni autoantigeni

KLASTER	FAKTOR OBOGAĆENJA
Ekstraćelijski prostor	25,96
Kalcijum-zavisno vezivanje za fosfolipide	15,30
Glutationin-transferazna aktivnost	13,40
Hormonska aktivnost	13,19
Regulacija apoptoze	12,66
Odgovor na povredu tkiva	12,29
Regulacija nivoa tečnosti u organizmu	11,69
Pozitivna regulacija imunskog sistema	10,89
Homeostatski procesi	10,72

Analiza je pokazala da pojedinačno po klasterima najveći broj proteina predstavlja tkivne antigene koji su deo ekstraćelijskog prostora. Ako se sagleda više klastera koji dominiraju, uočava se da se radi o proteinima koji obavljaju enzimske i regulatorne uloge u različitim metaboličkim procesima.

Da bismo utvrdili koje informacione frekvence dominiraju u skupu autoantigena urođenog humoralnog imunskog odgovora, izračunali smo informacione spektre sekvenci u Tabeli 4 i za svaki od njih odredili dominantnu frekvencu. Na Slici 10 je prikazana distribucija dominantnih frekvenci za svaki pojedinačni protein.



Slika 10. Raspodela autoantigena urođenog humoralnog odgovora navedenih u Tabeli 4 prema dominantnim frekvencama njihovih informacionih spektara

Ova analiza pokazuje da je najveće prisustvo dominantnih frekvenci u domenu niskih frekvenci u informacionom opsegu Fop1 (0,0-0,05) i u srednjem Fop2 (0,25-0,35). S obzirom da su to karakteristike kojima je determinisano prepoznavanje sa autoantitelima, možemo pretpostaviti da će prisustvo ovih dominantnih frekvenci u ELISA antigenima dovesti do nespecifičnog vezivanja, pa bi ih trebalo izbegavati prilikom dizajniranja testova.

Tabela 6. Klasteri kojima pripadaju humani sopstveni autoantigeni sa dominantnim informacionim frekvencama u F_{op1} i F_{op2}

IS frekventni opseg	KLASTER
F_{op1} (0,0-0.05)	Hemoglobinski kompleks, odgovor na povredu tkiva
F_{op2} (0.25-0.35)	Kalcijum-zavisno vezivanje za fosfolipide

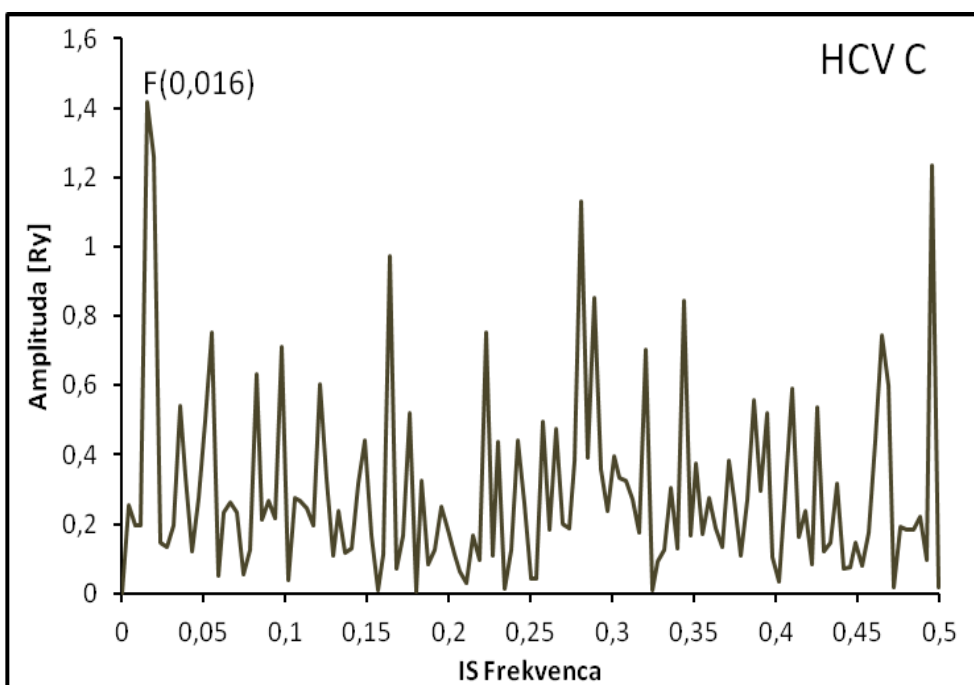
Analiza faktora obogaćenja je pokazala da je najviše antigena iz F_{op1} povezano sa koagulacijom krvi dok su antigeni iz skupa F_{op2} uključeni u kalcijum zavisno vezivanje za fosfolipide.

4.2 Bioinformatička analiza HCV proteina

Prevenција širenja HCV infekcije obuhvata rutinsko testiranje krvi dobrovoljnih davalaca na prisustvo anti-HCV antitela u serumu. ELISA skrining testovi, koji se koriste za tu svrhu, uključuju sledeće HCV antigene: C (engl. core), NS3, NS4 i NS5. Ključni zahtev koji ovi testovi moraju da zadovolje je visoka osetljivost. Osetljivost u generaciji testova koji se sada koriste iznosi 97,2% (119). S druge strane, značajna karakteristika anti-HCV skrining ELISA testova je relativno niska specifičnost, odnosno veliki broj uzoraka koji se klasifikuju kao „neodređeni” ili se nakon potvrđenih, molekularnih testova pokažu lažno pozitivni. Ovo je posledica inverznog odnosa između osetljivosti i specifičnosti, kao i velike sličnosti između virusnih i proteina domaćina. Važan korak u definisanju specifičnih antigena za skrining testove je identifikovanje HCV antigena ili delova antigena, koji zbog sličnosti sa sopstvenim antigenima čoveka potencijalno uzrokuju lažno pozitivne rezultate. Zbog toga smo u ovom radu metodom informacionih spektara odredili ciljne determinante virusnih proteina i utvrdili domene i stepen sličnosti virusnih proteina i proteina domaćina za koje je pokazano da sadrže nepatogene autoantigene.

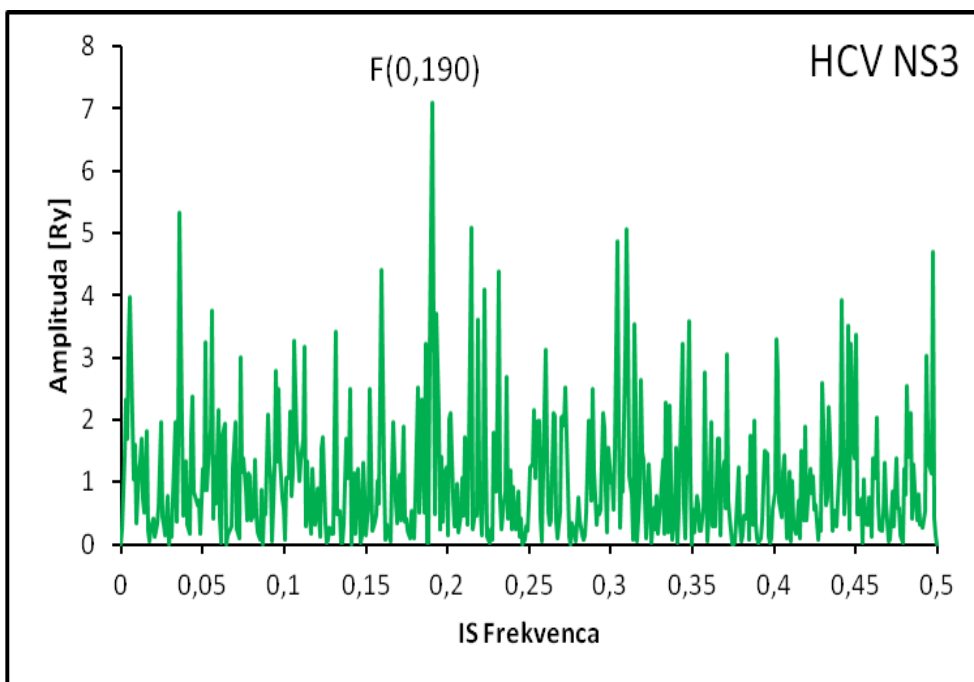
4.2.1 Informaciona analiza HCV peptida

Informaciona analiza pojedinačnih HCV peptida trebalo je da pokaže koje su njihove osnovne i dominantne ciljne determinante. Na osnovu toga možemo da damo procenu o stepenu njihove sličnosti sa humanim autoantigenima. Na Slikama od 11 do 15 su prikazani informacioni spektri HCV proteina koji su uključeni u ELISA skrining testove.



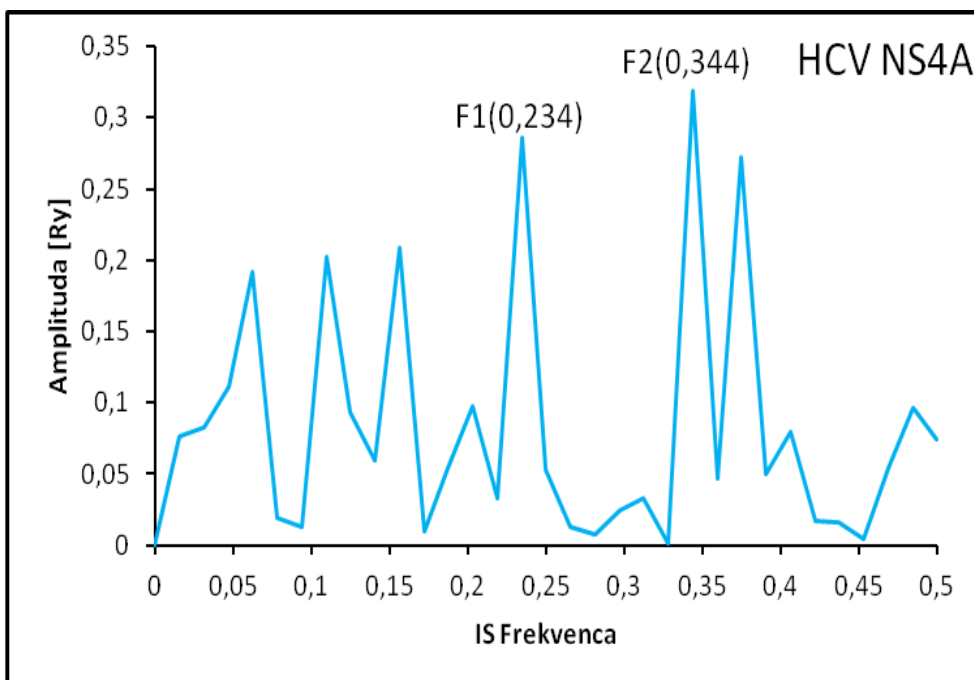
Slika 11. Informacioni spektar HCV C proteina

Informacionom analizom HCV C proteina utvrđeno je da ovaj protein ima dominantnu frekvencu u domenu niskih IS frekvenci koja iznosi $F_{\text{HCV core}}(0,016)$.



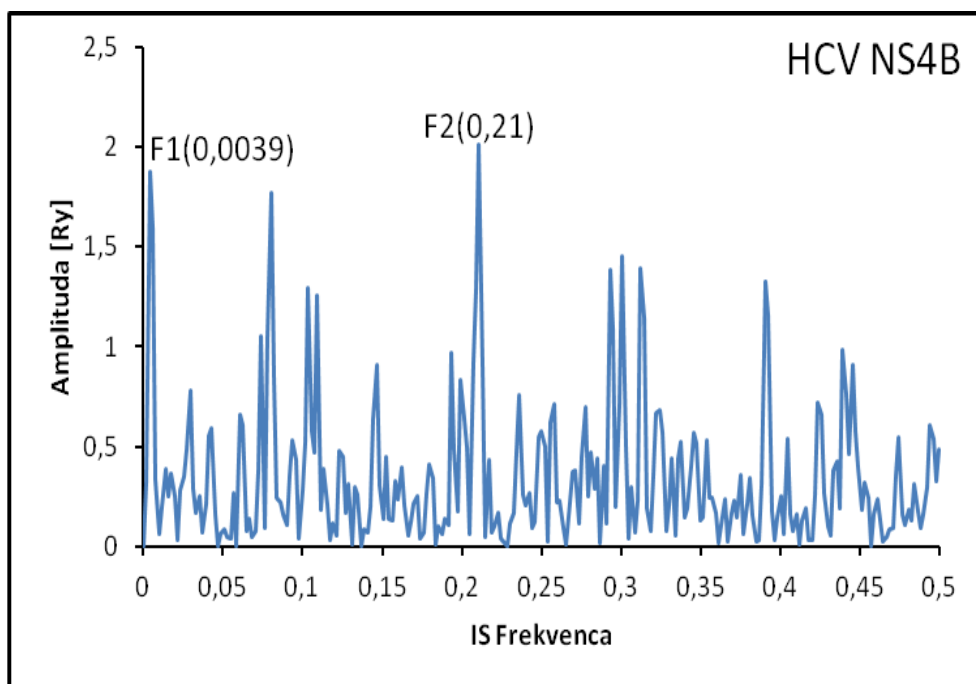
Slika 12. Informacioni spektar HCV NS3 proteina

Informacionom analizom HCV NS3 proteina utvrđeno je da ima dominantnu frekvencu u domenu srednjih IS frekvenci $F_{\text{HCV NS3}}(0,190)$.



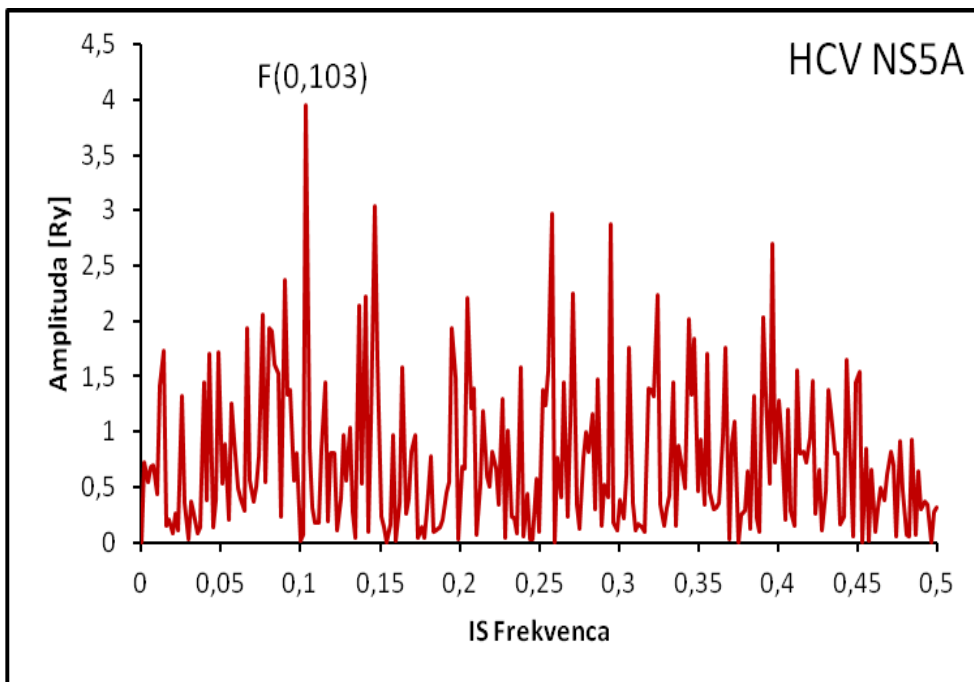
Slika 13. Informacioni spektar HCV NS4A proteina

Informacionom analizom proteina HCV NS4A utvrdili smo da ima više dominantnih frekvenci koje se nalaze u domenu srednjih i visokih IS frekvenci $F_{\text{HCV NS4A } 1}(0,234)$ i $F_{\text{HCV NS4A } 2}(0,344)$.



Slika 14. Informacioni spektar HCV NS4B proteina.

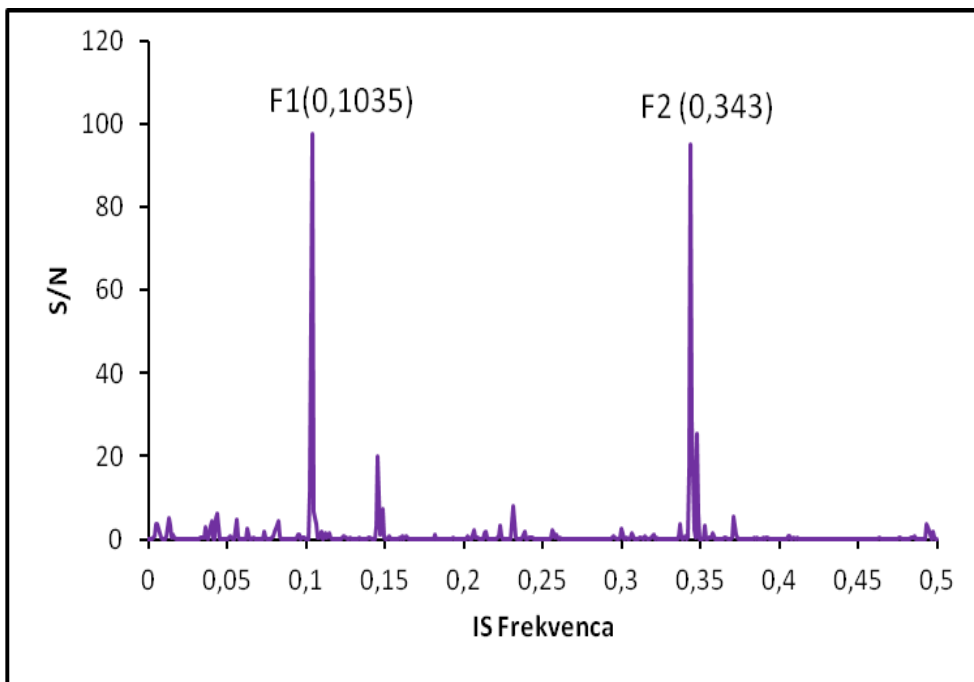
Na osnovu informacione analize proteina HCV NS4B ustanovili smo da se njegove dominantne frekvence nalaze u domenu niskih i srednjih IS frekvenci $F_{\text{HCV NS4B } 1}(0,0039)$ i $F_{\text{HCV NS4B } 2}(0,21)$.



Slika 15. Informacioni spektar HCV NS5A proteina. Dominantna frekvencija je u domenu niskih IS frekvencija

Primenom metode informacionih spektara smo utvrdili da se u informacionom spektru peptida HCV NS5A izdvaja jedna dominantna informaciona frekvencija $F_{\text{HCV NS5A}}(0,103)$.

Pokazano je da informacija koja je kodirana u primarnoj strukturi proteina i pojavljuje se u obliku određene dominantne frekvencije u njegovom informacionom spektru, značajno utiče na efikasnost njegove interakcije sa antitelima. Saznanja o dominantnim frekvencijama proteina virusa hepatitisa C predstavlja važan korak u kreiranju antigena koji bi bili reaktivni sa antitelima čije prisustvo treba detektovati u imunohemijskim testovima.



Slika 16. Kros-spektar HCV proteina C, NS3, NS4A, NS4B i NS5A

Kako bismo utvrdili zajedničke karakteristike HCV proteina C, NS3, NS4A, NS4B i NS5A, primenili smo metodu informacionih spektara. Dobijen je kros-spektar koji pokazuje postojanje dve zajedničke dominantne frekvence F1(0,1035) i F2 (0,343) za sekvence ovih pet proteina (Slika 16). Na apcisi su predstavljene frekvence dobijene Fourier-ovom transformacijom sekvence vrednosti PEJI što odgovara sekvenci aminokiselina. Na ordinati su predstavljene vrednosti odnosa signal/šum koje odgovaraju svakoj frekventnoj komponenti u spektru.

Na osnovu informacione analize HCV poliproteina i dominantnih opsega frekvenci humanih autoantigena, zaključujemo sledeće:

1. HCV NS3 i NS5A antigeni su pogodniji od ostalih HCV antigena za specifičan ELISA skrining s obzirom da imaju samo po jednu dominantnu frekvencu u informacionom spektru;

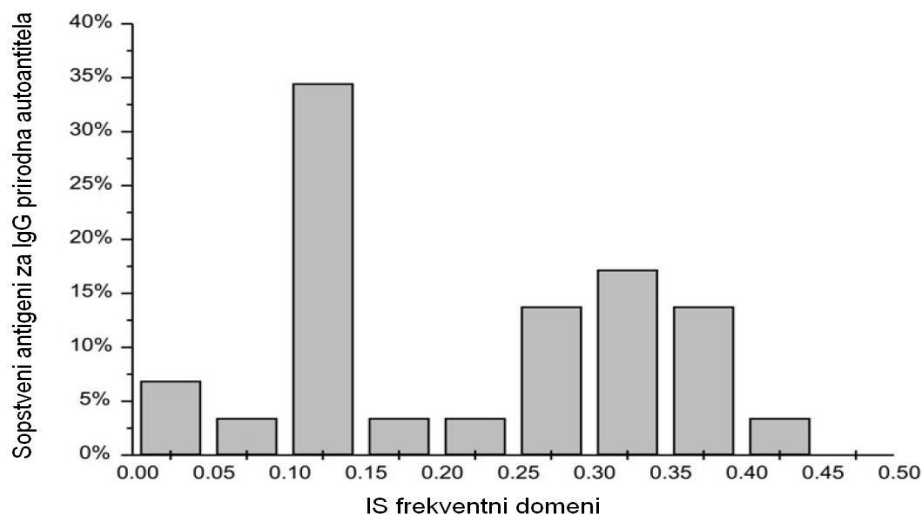
2. od analiziranih HCV antigena iz genotipa 1a najveću informacionu sličnost sa repertoarom humanih autoantigena ima HCV NS4A, jer su obe karakteristične

frekvence ovog proteina u frekventnim opsezima dominantnih autoantigenskih frekvenci;

3. proteini virusa hepatitisa C, koje smo analizirali, imaju potencijal da se iz njih napravi specifičan set ELISA skrining antigena ukoliko bi se izdvojili segmenti koji doprinose dominantnoj spektralnoj karakteristici F1 (0,1035) u kros-spektru. Sa druge strane segmente koji doprinose F2(0,343) bi trebalo isključiti iz baterije antigena, jer su oni informaciono slični humanim autoantigenima.

4.2.2 Ispitivanje informacione sličnosti HCV NS5 antigena i sopstvenih antigena čoveka

Da bismo utvrdili moguće postojanje informacione sličnosti između proteina HCV NS5A i humanih proteina, uradili smo kros spektralnu analizu primenom metode informacionih spektara. Vršeno je poređenje peptida HCV NS5A sa humanim proteinima, koji su bili reaktivni sa IgM, IgG i IgA autoantitelima, na osnovu rezultata antigen mikroerej studije u kojoj su analizirana prirodna antitela prisutna u serumu zdravih majki i njihove novorođenčadi (12). Utvrđena je distribucija karakterističnih dominantnih frekvenci, koja pokazuje da su zajedničke frekvence za HCV NS5 i antigene čoveka grupisane u određen broj subdomena. Najveći broj zajedničkih frekvenci, 41%, se nalazi u domenu F1 (0,25-0,40), a zatim u domenu F2 (0,10-0,15). Na osnovu koncepta metode informacionih spektara delovi HCV NS5 koji najviše doprinose frekvencama u ovim domenima će verovatno biti prepoznati od strane prirodnih antitela.



Slika 17. Distribucija karakterističnih Fourier-ovih frekvenci za sopstvene molekule čoveka i HCV NS5A koji vezuju IgG prirodna autoantitela. Na x-osi su prikazani domeni Fourier-ovih frekvenci (0-0,5) informacionog spektra (IS), a na y-osi ukupan udeo sopstvenih molekula koji imaju karakterističnu IS frekvencu u određenom domenu frekvenci.

4.2.3 Ispitivanje strukturne sličnosti HCV C (core), NS3 i NS4 sa humanim antigenima

Proteinske virusne sekvence koje su značajno slične sa proteinima domaćina koji su reaktivni sa autoantitelima mogu da uzrokuju lažno pozitivne i „neodređene” rezultate u anti-HCV ELISA skrining testovima. Uradili smo komparativno istraživanje proteina HCV C, NS3 i NS4 sa humanim antigenima iz naše baze sopstvenih antigena primenom programa CLUSTAL W (89). Na taj način smo došli do podataka o sličnosti u sekvenci između ove dve grupe proteina. U tabelama je prikazano po pet najvećih slaganja između humanih i proteina virusa hepatitisa C.

NS3	196	SFQVAHLHAP--TGS GKSTKV-PAAYAAQGYKVLV-----NPSVAATLG	237
MAGE1_HUMAN	156	ASEVPSTSLPPTPGEGTSTVPPPTAYEGPSTSVVPTPDEGPSTSVLPPTG	205
NS3	238	FGAYMSKAHGIDPNIRTGVRTITTTGSPIT-----YSTY GKFLADGG	278
MAGE1_HUMAN	206	EGPGT SVPLAATEGLSTSVQATPDEGPSTSVPPPTATEGLSTPVPPTRDEG	255
NS3	279	CSGGAYDIIICDECHSTDATSILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGS	328
MAGE1_HUMAN	256	PS-----TSVPATPGE GPSTSVLPAASDGQSI SLVPTRGKSS	293
NS3	329	VTVPHPNIEEVALS---TTGEIPFYGKAI PLEVIKGRRHLIFCHSKKKCD	375
MAGE1_HUMAN	294	TSVPPPTATEGLSTSVQPTAGE---GSSTSVPPPTPGG-----	326
NS3	376	ELAAKLVALGINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDALMTGY-----TG	420
MAGE1_HUMAN	327	-----GLSTSVPP-----ATEELSTSVPPPTGEG	351
NS3	421	DFDSVI-----DCNTCVTQTV---DFSLDPTFTIETITL PQDAVSR TQR	461
MAGE1_HUMAN	352	PSTSVLPPIPGEGLSTSVPPPTASDGSDTSVPPPTGEGASTLVQP-----	394
NS3	462	RGRTRGRGKPGIYRFVAPGERPSGMFDSSVLC ECYDAGCAWYELTPAETTV	511
MAGE1_HUMAN	395	---TAPDGP GSSVLPNPGEGPSTL FSSSASVDRNPSKCSL--VLPSPRVT	439
NS3	512	RLRAYMNT PGLPVCQDHLEF	531
MAGE1_HUMAN	440	KASVDS DSEGPKGAE GPIEF	459

**Protein: Fibronektin
prekursor (FINC) - Homo
sapiens**

SwissProt broj: P02751

Skor: 98,5

NS3	1	APITAYAQQT--RGLLGCIIITSLTGRDKNQ--VEG---EVQ-IVSTAAQT	42
FINC_HUMAN	1567	SPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQTEMTIEGLQPTVEYVVS VYAQN	1616
NS3	43	FLATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGPVIQMYTNVDQD--LVGW P APQG	90
FINC_HUMAN	1617	-----PSGESQPLVQTAVT-NIDRPKG---LAFTD VD VDSIKIAWESPQG	1657
NS3	91	SRS-----LTPCTCGSSD-----LYLVTRHA	111
FINC_HUMAN	1658	QVSRYRVTYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAE LQGLRPGSEYTVSVVALHD	1707
NS3	112	DV-----IPVRRRGRDSRGSLLSPRPIS-----Y LKG---	137
FINC_HUMAN	1708	DMESQPLIGTQSTAIPAPT--DLKFTQVTP T SLSAQWTPPNVQLTGYRVR	1755
NS3	138	----SSGGPL----LCPAGHAVGIFRAAVCTR---GVAKAVDFI---PVE	173
FINC_HUMAN	1756	VTPKEKTGPMKEINLAPDSSVVVSGLMVATKYEVSVYALKD T L T SRPAQ	1805
NS3	174	NLETTMRS PVFTDNSSPPVVPQSFQVAHLHAPTGS GKSTKVPAAYAAQGY	223
FINC_HUMAN	1806	GVVTTL-----ENVSP-----RRARVTDATETTITISWR TK--	1837
NS3	212	KVLVLNPSVAATLGF GAYMSKAHG-----IDPNIRTGVRTITTTGSPIT	266
FINC_HUMAN	1838	-----TETITGFQVDVAPANGQTPIQRTIKPDVRS--YTITGLQP GT	1877
NS3	267	-YSTY GKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATSILGI-----GTVLDQA	310
FINC_HUMAN	1878	DYKIYLYTLNDNARSSP---VVIDASTAIDAPS NLRFLATTPNSLLVSW	1923
NS3	311	ETAGARLV-VLATATPPGS-----VTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAI	354
FINC_HUMAN	1912	QPPRARITGYIIKYEKPGSPPREVVPRPRPGVTEATI--TGLEPGTEYTI	1971

NS3	355	PLEVIKGRHLIFCHSKKKCELAAKLVAL	384
		
FINC_HUMAN	1972	YVIALKNNQKSEPLIGRKKTDEL-PQLVTL	2000
Protein: Gelzolin prekursor (GELS) - Homo sapiens		SwissProt broj: P06396	Skor: 95,5
NS3	155	RAAVCTRGVAKAVDFIPVENLETTMRSPVFTDNSSPPVVPQSFQVAHLHA	204
		: : : 	
GELS_HUMAN	356	KAALKT-----ASDFITKMDYPKQTVQSVLPEGGETPLFKQFF-----	393
NS3	205	PTGSGKSTKVPAAAYAAQGYKVL---VLN----PSVAATLFGFAYMSKAHG	127
		:..	
GELS_HUMAN	394	-----KNWRDPDQTDGLGLSYLSSHIANVERVFPDAATLHTSTAMAAQHG	438
NS3	128	IDPNIRTGVRTI--TTGS---PITYSTYGFADGGCSCGGAYDIIICDEC	292
		: :..	
GELS_HUMAN	439	MDDD-GTGKQKIWRIEGSKNKPVDPATYGGFY-----GGDSYIILYNYR	481
NS3	293	HSTDATSIL--GIGTVLDQAETAGARLVVLTATATPPGSVTVPHNIEEVA	340
	 :..	
GELS_HUMAN	482	HGGRQGQIITYNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPVQSRVQ---	528
NS3	341	LSTTGEIP-----FYGKAI PLEVIKGRHLIFCHSKKKCELA---AKL	381
		:.. 	
GELS_HUMAN	529	----GKEPAHLMSLFPGGK--PMIYKGG-----TSREGGQTAPASTRL	565
NS3	382	VALGINAVAYRGLDVSVIPTSG-----DVVVATDALMTGYTGDFDSVI	426
	 :.....	
GELS_HUMAN	566	FQVRANSAGATRA--VEVLPKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLWVG-----	607
NS3	427	DCNTCVTQTVDVDFSLDPTFTIETITLPODAVSRTRRRG-----RTGRGKPG	471
		
GELS_HUMAN	608	-----TGASEAEKTGAQELLRLVLAQP-	629
NS3	472	IYRFVAPGERPSGMFSSVLCCECYDAGCAWYELTPAETTIVRLRAYMNTPG	521
		
GELS_HUMAN	630	--VQVAEGSEPDGFWEAL-----GGKAAARTSPRLKDKKMDAH--PPR	668
NS3	522	LPVCQDH-----LEFWEGVFT-----	537
		.. :.. 	
GELS_HUMAN	669	LFACSNKIGRFVIEEVPGLMQEDLATDDVMLLDTWQVFWVWGKDSQEE	718
NS3	538	----GLTHIDAHFLSQTKQSGENLPYLVAQATVCARAQAPPPS-----	577
		
GELS_HUMAN	719	EKTEALTSAKRYIETDPANRDRRTPITVVKQG-----FEPPSFVGVFL	761
NS3	578	-WD 579	
GELS_HUMAN	762	GWD 764	
Protein: Stres-70 protein, mitohondrijalni prekursor (GRP75) - Homo sapiens		SwissProt broj: P38646	Skor: 92,0
NS3	52	CWTVYHGAGTRTIASPKG----PVIQMYTNVDQDLVGPAPQGSRLTPC	97
		
GRP75_HUMAN	66	CVAVMEGKQAKVLENAEGARTTPSVVAFATADGERLVGMPAKRQA-----V	110
NS3	98	TCGSSDLY----LVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRPISYLKGSNG---	140
		
GRP75_HUMAN	111	TNPNTFYATKRLIGRRYDDPEVQKD-----IKNVPFKIVRASNGDAW	153
NS3	141	----GPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENLETTMRSPVFTD	186
		... :..	
GRP75_HUMAN	154	VEAHGKLYSPS--QIGAF---VLMKMKETAENY-----LGHTAKNAVIT-	192
NS3	187	NSSPPVVPQSFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAAYAAQGYKVL-VLNPSVAAT	235
		
GRP75_HUMAN	193	-----VPAYFNDSQRQATKDAQ-----ISGLNVLRVINEPTAAA	227

NS3	236	LGFGAYMSKAHGIDPNIRTVRTITTGSPITYSTYKFLADGGCSGGAYD	285
GRP75_HUMAN	228	L-----AYGLD-----KSEDKVIAVYDLGGGTFD	251
NS3	286	IIICD-----ECHSTDATSILGIGTVLDQA-----ET-----	312
GRP75_HUMAN	252	ISILEIQKGVFEVKSTNGDTFLG-GEDFDQALLRHIVKEFKRETGVDLTK	300
NS3	313	-----AGARLVVLATATPPGSVTVP-----HPNIE-----	337
GRP75_HUMAN	301	DNMALQRVREAAEKAKCELSSSVQTDINLPYLTMDSGPKHLNMKLTRAQ	350
NS3	338	-----EVALSTGEIPFYGKAI PLEVIKGRH	364
GRP75_HUMAN	351	FEIVTDLIRRTIAPCQKAMQDAEVSQSDIGEVILVGGMTRMPKV-----	395
NS3	365	LIFCHSKKKCELAAKLVALGIN---AVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVAT	411
GRP75_HUMAN	396	-----QQTVDLFRAPSKAVNPDEAVAIGAAIQGGVL--AGDV---T	433
NS3	412	DALMTGYT-----GDFDSVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETITL	451
GRP75_HUMAN	434	DVLLLDVTPLSLGIETLGGVFTKLINRNTTI-----PTKKSQVFST	474
NS3	452	PQDAVSRTQRRGRTGRGKPGIYRFVAPGER	481
GRP75_HUMAN	475	AADGQTQVEIK-----VCQGER	491
Protein: Laminin subjedinic			
gama-1 prekursor (LAMC1) -		SwissProt broj: P11047	
Homo sapiens		Skor: 89,0	
NS3	45	ATCINGVCWTVYHGAGTRTIASPKGPVIQMYTNVDQDLVGPAPQ--GSR	92
LAMC1_HUMAN	502	SVCTNAVGVSVYSISST-----FQIDED--GWRAEQRDGSE	535
NS3	93	SLTPCTCGSSDLYLVT----RHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRPISYLKG	137
LAMC1_HUMAN	536	ASLEWSSERQDIAVISDSYFPRYF-IAPAK-----FLGKQVLSYGQN	576
NS3	138	SSGGPLLCPAGHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENLETTMRSPVFTDN	187
LAMC1_HUMAN	577	LS-----FSFRVDRRDRLSAEDLVLEGAGLRVSVPLIAQG	612
NS3	188	SSPPVVPQSFQVAHLHAPTSGSKTKVPAAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLG	237
LAMC1_HUMAN	613	NSYPSETTVKYVFRHLH-----EATDYPWRPALTPFEFQKLLNNTSIKI	656
NS3	238	FGAYMSKAHGIDPNIRTVRTITTGSPITYST-----YKFLADGGCS	280
LAMC1_HUMAN	657	RGTYSERAGYLDVTLASARPGVGPATWVESCTCPVGYGGQFCMCLS	706
NS3	281	G-----GAYDIIICDEC--HSTDATSILGIGTVLDQA-----	310
LAMC1_HUMAN	707	GYRRETPNLGPYSPCVLCAACNGHSETCDPETGVCNCRDNTAGPHCEKCS	756
NS3	311	-----ETAGARLVVLATATPPGSVTVPHNIEEVALS-----TTG-----	345
LAMC1_HUMAN	757	GYDSTAGTSSDCQPCPCPGSSCAVVPKTKEVCTNCPTGTTGKRCEL	806
NS3	346	-EIPFYGKAI----PLEVIKGRHLIFC-----HSKKKCELAAKLVAL	384
LAMC1_HUMAN	807	CDDGYFGDPLGRNGPVRLCR---LCQCSDNIDPNAVGNCRNLTGECLKC	852
NS3	385	GINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDALMTGYTG-----DFDSVI	426
LAMC1_HUMAN	853	IYNTAGFY-----CDRCKDGGFFGNPLAPNPADKCKAC	884
NS3	427	DCNTCVTQTVDFSLDPTFTIETITL---QDAVSRTQRRGRTGRGKPGI	472
LAMC1_HUMAN	885	NCNPYGTMKQSSCNPV-TGQCECLPHVTGQDC-----GACDPGF	923

NS3	473	YRFVAPGERPSGMFDSSVLCCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYMNTPGL	522
LAMC1_HUMAN	912	YNL-----QSG--QGCEKCDHALGS-----TNGQCDIRGTGQCECQPGI	960
NS3	523	-----PVCQ-DHLEFW-EGVFTGLTHIDAHFLSQTQKQSG--ENLPYLVA	563
LAMC1_HUMAN	961	TGQHCERCEVNHFGFGPEGCKPCDCHPEGSLSLQCKDDGRCECREGFGVGN	1010
NS3	564	QATVCARAQAPPPSWDQMWKCLIRLKPRTLHGPTPLLYRLGAVQNEITLTH	613
LAMC1_HUMAN	1011	RCDQCEENYFYNRSWPGQCQC-----PACYRL--VKDKVA-DH	1045
NS3	614	PVTKYIMTCMSADL----EVRT	631
LAMC1_HUMAN	1046	RVKLELESLIANLGTGDEMVT	1067

Tabela 9. Humani autoantigeni koji imaju najveći stepen sličnosti sa HCV NS4A proteinom

Protein: Fruktaza-difosfat aldolaza B (ALDOB) - Homo sapiens	SwissProt broj: P05062	Skor: 50,5	
NS4A	10	LAALAAYCLSTGCVVIVGRVVLGKPAIIPDREVLRYREFDEMEEC	54
ALDOB_HUMAN	171	LARYASICQNGIVPIV-----EPEVLPDGD-----HDLEHC	202
Protein: Fruktaza-difosfat aldolaza A (ALDOA) - Homo sapiens	SwissProt broj: P04075	Skor: 49,5	
NS4A	9	VLAALAAYCLSTGCVVIVGRVVLGKPAIIPDREVLRYREFDEMEEC	54
ALDOA_HUMAN	170	VLARYASICQNGIVPIV-----EPEILPDGD-----HDLKRC	202
Protein: Fruktaza-difosfat aldolaza C (ALDOC) - Homo sapiens	SwissProt broj: P09972	Skor: 49,5	
NS4A	9	VLAALAAYCLSTGCVVIVGRVVLGKPAIIPDREVLRYREFDEMEEC	54
ALDOC_HUMAN	170	VLARYASICQNGIVPIV-----EPEILPDGD-----HDLKRC	202
Protein: Laminin subjedinicna alfa-4 prekursor (LAMA4) - Homo sapiens	SwissProt broj: Q16363	Skor: 45,0	
NS4A	4	VLVGGVLAALAAYCLS-----TGCV---VIVGRVVLGKPAII	38
LAMA4_HUMAN	1769	VFVGGVPESLLTPRLAPSKPFTGCIHFVIDGHPVSFSKAALV	1811

K1C18 HUMAN	45	RISVSRSTSFRRGGMGSG-----GLATGIAGGLAGMGGIQNEKETMQS	86
NS4B	168	LVNLLPAIL	176
K1C18_HUMAN	87	LNDRLASYL	95
Protein: Laminin subjedinic alfa-5 prekursor (LAMA5) - Homo sapiens		SwissProt broj: O15230	Skor: 61,5
NS4B	6	YIEQGMMLAEQFKQKALGL-LQTASRQAEVIAPAVQTNWQKLETFWAKH-	53
LAMA5 HUMAN	3395	FLSNGHFVAQ---MEGLGTRLRAQSRQRS--RPG---RWHKVSVRWEKNR	3436
NS4B	54	-----MWN-----FISGIQYLAGLSTLP----	71
LAMA5_HUMAN	3437	ILLVTDGARAWSQEGPHRQHQAIEHPQPHTLFVGGLPASSHSSKLPVTVG	3486
NS4B	72	-----GNP--AIASLMAFTAAVTSPLTTSQTLLFNILGGVAAQ	108
LAMA5_HUMAN	3487	FSGCVKRLRLHGRPLGAPTRMAGVTPCILGPLEAG--LFFPGSGGVITLD	3534
NS4B	109	LAAPGAATAFVGAGLAGAAIGSVGL	133
LAMA5_HUMAN	3535	L--PGATLPDVGLELEVRPLAVTGL	3557
Protein: 60 kDa protein toplotnog stresa, mitohondrijalni prekursor (CH60) - Homo sapiens		SwissProt broj: P10809	Skor: 58,0
NS4B	146	AGVAGALVAFKIM--SGEV---PSTEDLVNLL-PAILSPGALV-----	182
CH60 HUMAN	483	AGVEGSLIVEKIMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEKGIIDPTKVVRTALLDA	532
NS4B	183	-----VGVVCAAILRRHVGPGEAVQWM	205
CH60_HUMAN	533	AGVASLLTTAEVVVTEIPKEEKDPGMGAMGGM	564
Protein: 70 kDa protein toplotnog stresa 6 (HSP 76) - Homo sapiens		SwissProt broj: P17066	Skor: 56,5
NS4B	139	DILAGYGAGVAGALVAFKIMSGEVPSTEDLVNLLPAILSPGALVGVVCA	188
HSP76_HUMAN	368	DEAVAYGAAVQAAV----LMGDKCEKVQDLLLDVAPLSLGLTAGGVMT	413
NS4B	189	AILRRH-----VGPGEAVQWMNRLIA-FAS	213
HSP76 HUMAN	414	TLIQRNATIPTKQTQTFFTYSDNQPGVFIQVYEGERAMTKDNNLLGRFEL	463
NS4B	214	RGNHVSPTHYVPESD-----AAARVTAILSSLTVTQLLRRLL	129
HSP76_HUMAN	464	SGIPPAP-RGVPQIEVTFDIDANGILSVTATDRSTGKANKITITNDKGRLL	512

U Tabelama od 7 do 10 je prikazan rezultat dobijen poravnavanjem sekvenci između proteina HCV C, NS3, NS4A i NS4B, koji se koriste u imunohemijskim testovima za detekciju HCV infekcije, i humanih sopstvenih antigena iz naše baze podataka. Najveći stepen sličnosti postoji između proteina sa najvećim skorom. Između

identičnih aminokiselina prikazane su crtice, dve tačke ukazuju na konzervirane promene, tj. aminokiseline koje imaju slične biohemijske osobine bočnih lanaca, a jedna tačka semikonzervirane promene.

Ovom analizom su identifikovane sekvence aminokiselina virusa i čoveka koje bi mogle predstavljati epitope visokog stepena sličnosti. Delovi virusnih proteina koji su slični delovima humanih proteina ne bi trebalo koristiti kao antigene u imunohemijskim testovima za merenje anti-HCV antitela da ne bi došlo do njihove interakcije sa prirodnim autoantitelima i posledično dobijanja lažno pozitivnih rezultata.

Analizom funkcionalnih karakteristika humanih proteina, koji pokazuju najveću sličnost sa proteinima virusa hepatitisa C, možemo zaključiti da spadaju u grupu ekstracelularnih proteina, proteina koji učestvuju u odgovoru na stres i povredu tkiva, kao i enzima.

U prethodnim istraživanjima u kojima je poređen proteom čoveka i HCV-a, utvrđena je sličnost u sekvenci od blizu 60 %. Prema nekim istraživanjima tireoglobulin i protein toplotnog stresa od 60 kDa predstavljaju humane ciljne antigene u hroničnoj infekciji HCV-om (68). U našem istraživanju se ova dva proteina nalaze među pet koji pokazuju najveću sličnost sa proteinom HCV NS4B.

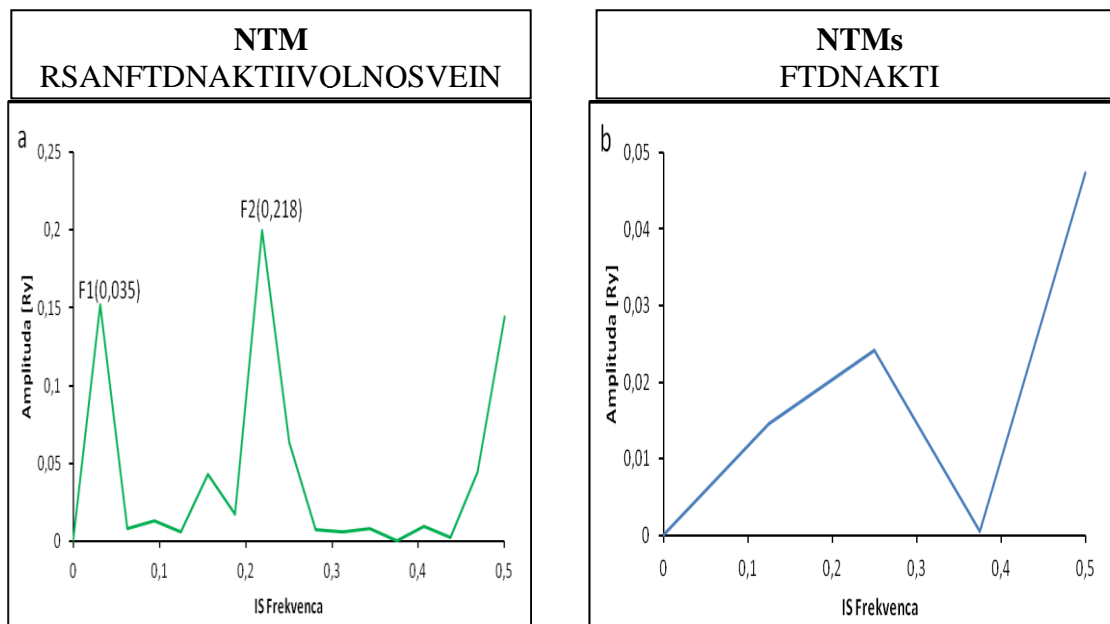
4.3. Bioinformatička analiza HIV-1 NTM peptida

4.3.1 Informaciona analiza peptidnog antigena za ELISA test

Primenom metode informacionih spektara deset godina pre otkrića kristalne strukture molekula gp120 HIV-1, identifikovan je peptid NAKTIVQL (nazvan peptid V) koji se nalazi na karboksilnom kraju C2 regije gp120 HIV-1 u okviru peptida NTM, kao važan za interakciju molekula gp120 HIV-1 i CD4 molekula (120). Kada su Kwong i sar. otkrili kristalnu strukturu molekula gp120 HIV-1, utvrdili su da peptid

SVNFTDNAKTI (petlja D) iz C2 regiona učestvuje u interakciji sa CD4 receptorom pri čemu su četiri aminokiseline iz ovog domena Asp279, Asn280, Ala281 i Thr283 u direktnom kontaktu (32). Jasno je da su od ove četiri aminokiseline tri zajedničke za peptid V i D petlju. Takođe, par godina ranije Stamatatos i sar. su pokazali da jedna mutacija u regionu FTDNAK dovodi do gubitka infektivnosti virusa (121). Kasnijim istraživanjima je utvrđeno postojanje korelacije nivoa anti-NTM antitela i progresije bolesti kod HIV pozitivnih pacijenata, pa se može pretpostaviti da bi merenje antitela reaktivnih sa peptidom NTM, moglo da se koristi za prognozu i procenu napredovanja HIV infekcije.

U cilju definisanja peptidnog antigena za ELISA test pogodnog za detekciju antitela reaktivnih sa HIV-1 gp120 C2 NTM polipeptidom, koja koreliraju sa neprogresivnom HIV infekcijom, primenili smo metodu informacionih spektara. Trebalo je peptid NTM, dugačak 23 aminokiseline, koji nije pogodan za komercijalnu sintezu, ni zbog svoje veličine ni zbog velikih hidrofobnih domena, zameniti peptidom veličine od sedam do deset aminokiselina pogodnijim za test na čvrstoj fazi. U informacionom spektru peptida NTM izdvajaju se dve dominantne informacione frekvence F1(0,0351) i F2 (0,2187) (Slika 18a). Da bi se sačuvala dugodosežne karakteristike ovog peptida, koje su važne za prepoznavanje sa antitelima, trebalo je održati ta informaciona svojstva i u novom peptidu, NTMs (engl. NTM short). Peptid NTMs smo dizajnirali kao linearni fragment NTM peptida da bismo u njemu zadržali aminokiseline preko kojih HIV-1 gp120 stupa u interakciju sa CD4 receptorom, tj. D petlju. Sa Slike 18b je očigledno da novi peptid NTMs, iako ima predefinsane informacione karakteristike, nema specifične pikove na IS frekvencama F1 i F2.

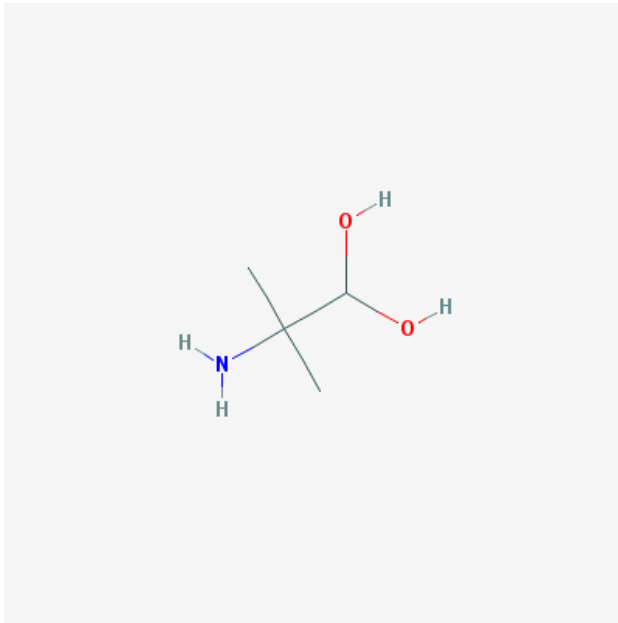


Slika 18. Informacioni spektri (a) NTM (b) NTMs

Efikasni i potentni peptidni antigeni za ELISA test predstavljaju sintetičke peptide vezane za peptidne nosače. U laboratorijskim uslovima to su najčešće BSA i KLH (engl. Keyhole Limpet Hemocyanin). Mi smo se u ovoj studiji odlučili za značajno manji peptidni nosač da bismo izbegli neke od uobičajnih neželjnih pojava u ELISA testovima:

1. nespecifično vezivanje antitela za nosač;
2. neprecizno definisan sastav i strukturu;
3. peptid NTMs, s obzirom na njegovu malu specifičnu veličinu u odnosu na nosač, vezuje relativno malu količinu specifičnih antitela.

Sekvencijelni oligopeptidni nosač-SOC_n je građen od ponavljajućeg segmenta lizin- α -aminoizobuterna kiselina-glicin. Lizin ima funkciju da vezuje antigen, α -aminoizobuterna kiselina omogućava stvaranje helikoidne strukture peptidne kičme, a glicin je tu zbog malog stereohemijskog volumena. SOC_n ima odgovarajuću sekundarnu strukturu koja omogućava da antigenski peptidi koji se vežu za njega zadrže svoju prirodnu konformaciju (94).



Molekulska formula: $C_4H_{11}NO_2$

Molekulska težina: 105,136 g/mol

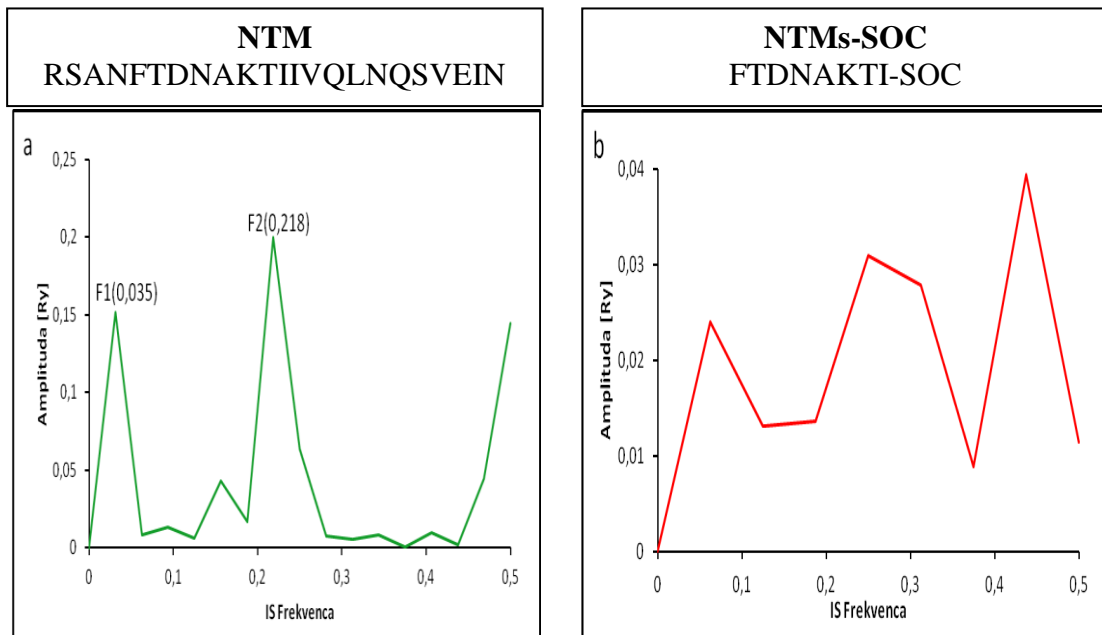
PEJI: 0,0964 Ry

Slika 19. Hemijska struktura α -aminoizobuterne kiseline

S obzirom da α -aminoizobuterna kiselina ne spada u standardne aminokiseline, da bismo mogli da izračunamo informacione spektre peptida vezanih za SOC nosač, bilo je potrebno prvo odrediti njenu vrednost PEJI. Primenom jednačina iz rada Veljkovic i sar, (85) i pomoću in-house računarskih programa iz Instituta „Vinča“ određena je PEJI vrednost (122) za α -aminoizobuternu kiselinu i prikazana na Slici 19.

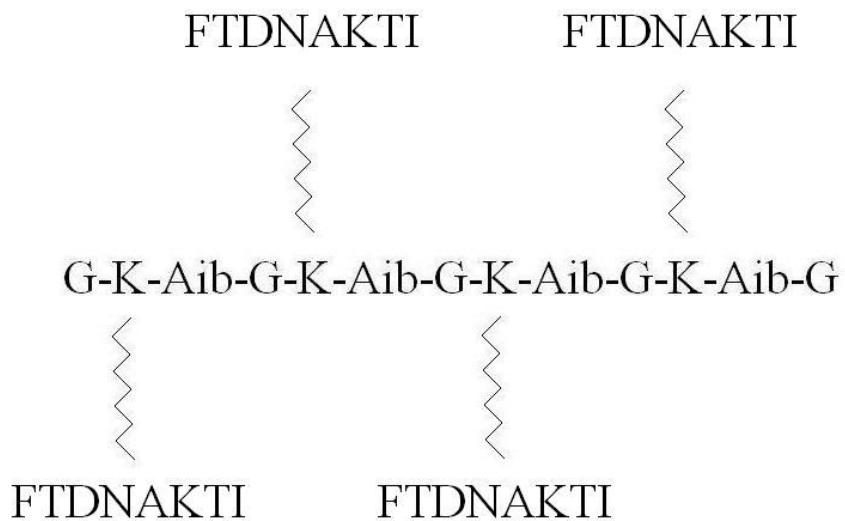
Nakon toga smo odredili informacioni spektar konjugata FTDNAKTI-SOC, koji bismo koristili kao antigen u ELISA testu. Utvrdili smo da ima dominantne pikove na željenim informacionim frekvencama F1 i F2, kao i da se u informacionom spektru konjugata izdvajaju specifični pikovi, koji su preciznije definisani nego pikovi u samom peptidu FTDNAKTI (Slika 20b).

Na osnovu teorije molekuskog prepoznavanja možemo da zaključimo da FTDNAKTI-SOC predstavlja odgovarajući antigenski supstrat za NTM vezujuća antitela.



Slika 20. Informacioni spektri (a) NTM (b) FTDNAKTI-SOC

Peptid NTMs je u replikatima po četiri vezan za SOC₄ (Slika 21) i kao takav primenjen u ELISA testu.



Slika 21. Šematski prikaz antigena za prognostički ELISA test

4.3.2 Analiza sličnosti peptida NTMs i sopstvenih humanih antigena

S obzirom na pretpostavku da su antitela koja prepoznaju peptid NTMs prirodna autoantitela, analizirali smo sličnost sekvenci peptida NTMs i sopstvenih antigena iz Tabele 4. Stepem sličnosti sekvenci je prikazan kao rezultat koji izračunava program EMBOSS Water (89). Vrednosti skora za analizirane peptide su se kretale od 7 do 23. U Tabeli 11 smo prikazali poravnavanje sekvence FTDNAKTI sa deset proteina (oko 2% od ukupnog broja), koji su pokazali najveću sličnost sa peptidom. Oni predstavljaju moguće kandidate za sopstvene antigene koje prepoznaju antitela reaktivna sa NTMs.

Osim vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP), za koji su ranije studije pokazale da je potencijalni antigen za NTM reaktivna antitela, ovom analizom smo utvrdili da identičnu sekvencu sadrži i ribonukleoprotein Ro60 (123). Ovo je RNK-vezujući protein, koji vezuje nekoliko malih citoplazmatskih RNK molekula, poznatih kao Y RNK. On je identifikovan kao autoantigen u okviru studije čiji je cilj bio da potvrdi postojanje i stepen membranske ekspresije Ro60 tokom oštećenja tkiva na ćelijama u apoptozi kod neonatalnog lupus sindroma. Analiza je rađena primenom multiparametarske protočne citofluorimetrije (124).

Tabela 11. Mogući kandidati za sopstvene antigene koje prepoznaju anti-NTMs prirodna autoantitela

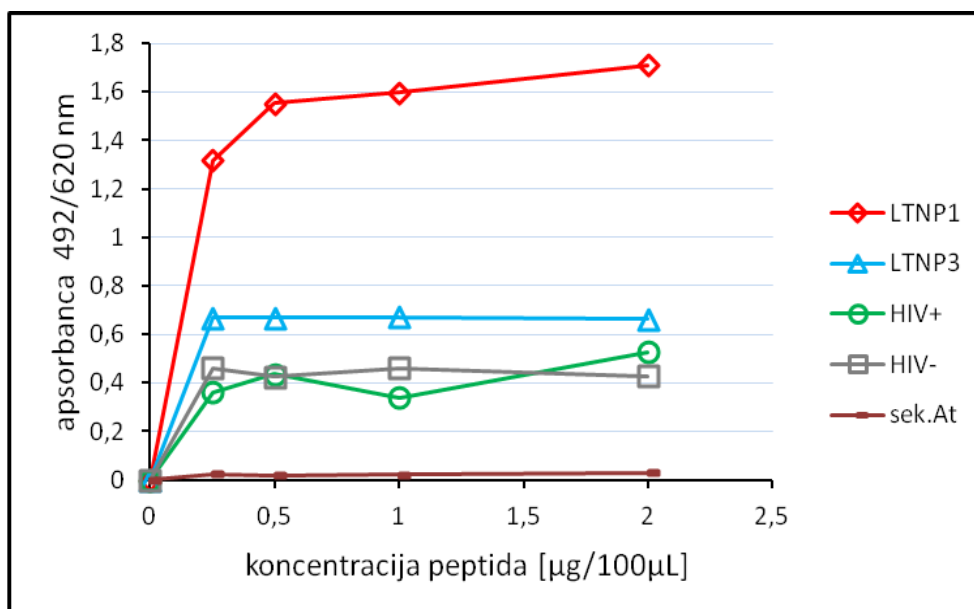
Ime proteina	SwissProt No	Skor	Poravnanje sekvenci			
VIP	P01282	23	NTMs	1	FTDN	4
			VIP_HUMAN	130	FTDN	133
RO60 ribonukleoprotein	P10155	23	NTMs	1	FTDN	4
			RO60-HUMAN	467	FTDN	470
ATP sintaza subjedinica alfa	P25705	22	NTMs	1	FTDNAK	6
			ATPA_HUMAN	300	FRDNGK	305
Histon H2A 2C	Q16777	21	NTMs	3	DNAKT	7
			H2A2C_HUMAN	73	DNKKT	77
Serumski albumin	P02768	21	NTMs	1	FTDNAKT	7
			ALBU_HUMAN	151	FHDNEET	157
Hsp70	P08107	21	NTMs	1	FTDNAKTI	8
			HSP71_HUMAN	44	FTDTERLI	51
Hsp71	P11142	21	NTMs	1	FTDNAKTI	8
			HSP7C_HUMAN	44	FTDTERLI	51
Mijeloperoksidaza	P05164	21	NTMs	1	FTDNAKTI	8
			PERM_HUMAN	369	FQDNGRAL	376
Fibronektin	P02751	21	NTMs	1	FTDNAKT	7
			FINC_HUMAN	364	FTYNGRT	370
Tireoglobulin	P01266	21	NTMs	1	FTDNAKTI	8
			THYG_HUMAN	460	FTTNPKRL	467

4.4 Eksperimentalna analiza efikasnosti dizajniranog antigena u ELISA testu

4.4.1 Izbor optimalnog razblaženja antigena za oblaganje ploče u „in house” ELISA testu

S obzirom da kapacitet proteina za apsorpciju zavisi od njegove prirode, jedan od najvažnijih koraka u izradi „in house” ELISA testa je izbor optimalne koncentracije antigena za oblaganje ploče, koji se vrši jednom vrstom titracije. Ovim ispitivanjem se u početku izrade testa proverava da li se antigen vezuje za ploču i da li će se obeleženo antitelo vezati za antigen.

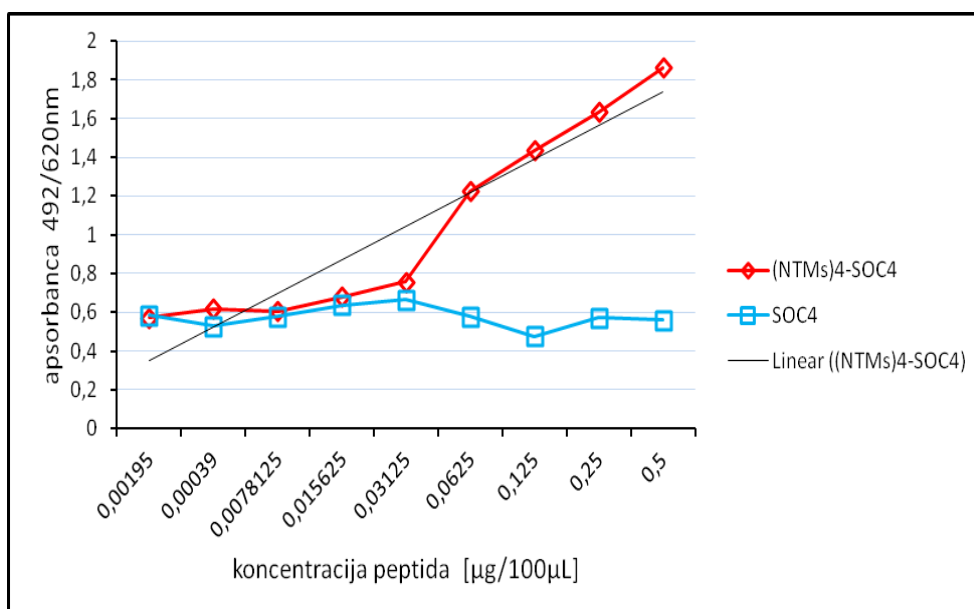
ELISA titraciona kriva je dobijena korišćenjem seruma LTNP pacijenata, kao i HIV pozitivnih progresora i HIV negativnih kontrolnih uzoraka.



Slika 22. Vrednosti apsorbanca u odnosu na količinu peptida (NTMs)₄-SOC₄ za oblaganje ploče

Utvrđeno je da se saturacija postiže pri koncentraciji peptida (NTMs)₄-SOC₄ od 0,5 μg/100 μL. Na osnovu ovih rezultata izabrana je količina peptida za oblaganje pri daljem ELISA testiranju.

Kako bismo proverili moguće postojanje imunološke ukrštene reaktivnosti između molekula NTMs i SOC, urađeno je paralelno testiranje reaktivnosti antitela iz uzorka LTNP pacijenta sa različitim koncentracijama ovih antigena.



Slika 23. Vrednosti apsorbance u odnosu na količinu peptida NTMs i SOC₄ za oblaganje ploče

Sa Slike 23 se vidi da oblaganje bazena mikrotitarske ploče sa 0,5μg/100μL peptida ne dovodi do ispoljavanja imunološke sličnosti između molekula NTMs i SOC i da je sa tog aspekta SOC pogodan nosač za diskriminaciju antitela koja koreliraju sa neprogresivnom HIV-1 infekcijom.

4.4.2 Analiza seruma LTNP i odgovarajućih kontrola

U sledećoj fazi istraživanja je urađena studija kojom je trebalo da se ispita efikasnost dizajniranog antigena u ELISA testu i mogućnost korišćenja anti-NTMs antitela kao prognostičkog markera HIV infekcije. Peptid NTMs vezan za SOC je korišćen kao antigen kojim je oblagana ploča. Svaki uzorak je postavljen u duplikatu. Da bi se eliminisao uticaj eventualnog vezivanja antitela za SOC, svaki uzorak je imao svoju kontrolu, što znači da je za svaki uzorak oblagano po dva bazena sa (NTMs)₄-SOC₄ i dva sa SOC₄. Od absorbance izmerene za polja (NTMs)₄-SOC₄ je oduzimana apsorbance dobijena za polja oblagana samo nosačem.

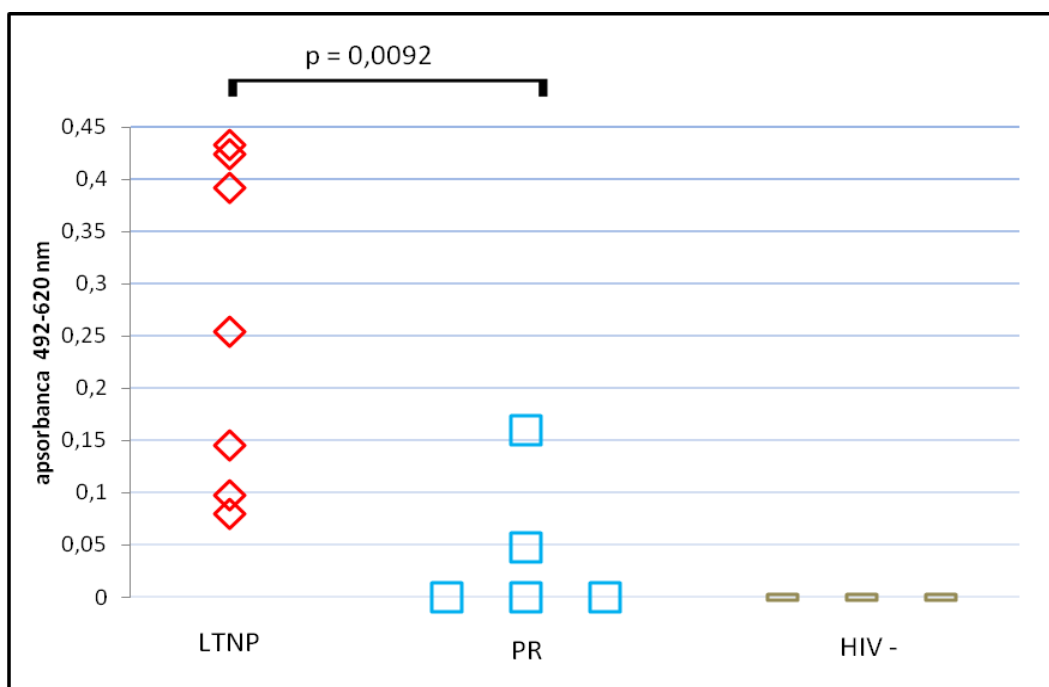
U studiji je analizirano sedam seruma LTNP pacijenata koji su inficirani virusom HIV-1 podtip B, a bili su u stabilnom stanju duže od 15 godina bez bilo kakve antiretrovirusne terapije. U prethodnim istraživanjima na ovim pacijentima isključeno je nekoliko poznatih virusnih i ćelijskih faktora kao mogućih uzročnika LTNP statusa. Naime, ni kod jednog pacijenta nije nađena delecija virusnih regulatornih gena (nef, tat, rev i vpr) niti gena za CC-hemokinski receptor 5 (125). Osim toga, pokazano je da je ćelijska imunost kod ovih LTNP pacijenata komparabilna sa imunošću kod HIV-1 progresora (126).

U našem eksperimentu je testirano i pet HIV-1 pozitivnih pacijenata (progresori) kod kojih je broj CD4 limfocita i titar virusne RNK bio sličan onom kod LTNP pacijenata. Pošto su uzorci za kontrolnu grupu uzeti od pacijenata koji nisu nikada primali antiretrovirusnu terapiju, mogli smo da merimo nivo anti-NTMs antitela kod prirodne progresije HIV infekcije.

Posebnu kontrolnu grupu su činili LTNP pacijenti sa stabilnim brojem CD4 limfocita, ali povećanim titrom virusne RNK (LTNP GF). Smatra se da kod ovih pacijenata neki virusni ili genetski faktor domaćina doprinosi sporijoj progresiji bolesti.

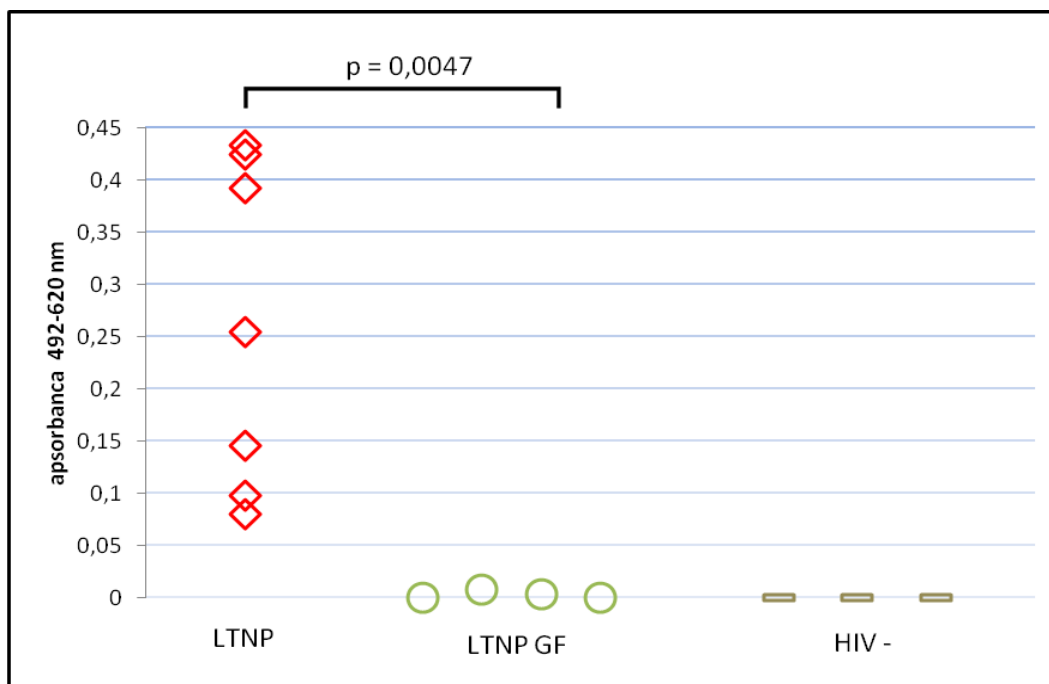
Tabela 12. Karakteristike pacijenata i srednje vrednosti apsorbance na peptid NTMs u ELISA testu

	LTNP n=7	PR n=5	LTNP GF n=4	HIV- n=3
Inficirani u periodu od (godina)	1985-1990.	1997-2003.	1988-1990.	/
Virusna RNK (broj kopija/mL)	<10000	769-688000	>10000	/
Srednje vrednosti apsorbance	0,261±0,156	0,104±0,069	0,006±0,004	0



Slika 24. Poređenje reaktivnosti seruma LTNP pacijenata, tipičnih progresora i HIV negativnih kontrola dobijenih u ELISA testu

Kao što se vidi iz grafičkog prikaza (Slika 24) antitela koja prepoznaju peptid NTMs su u značajnoj meri više prisutna u serumima LTNP pacijenata u poređenju sa HIV-1 progresorima pri čemu je $p=0,0092$.



Slika 25. Poređenje reaktivnosti seruma LTNP pacijenata, LTNP kod kojih je poznati faktor uzročnik spore progresije (LTNP GF) i HIV negativnih kontrola dobijenih u ELISA testu

Antitela koja prepoznaju peptid NTMs su više prisutna u serumima LTNP pacijenata u poređenju sa onim LTNP pacijentima kod kojih neki virusni ili genetski faktor domaćina doprinosi neprogresivnoj infekciji pri čemu je $p=0,0047$ (Slika 25).

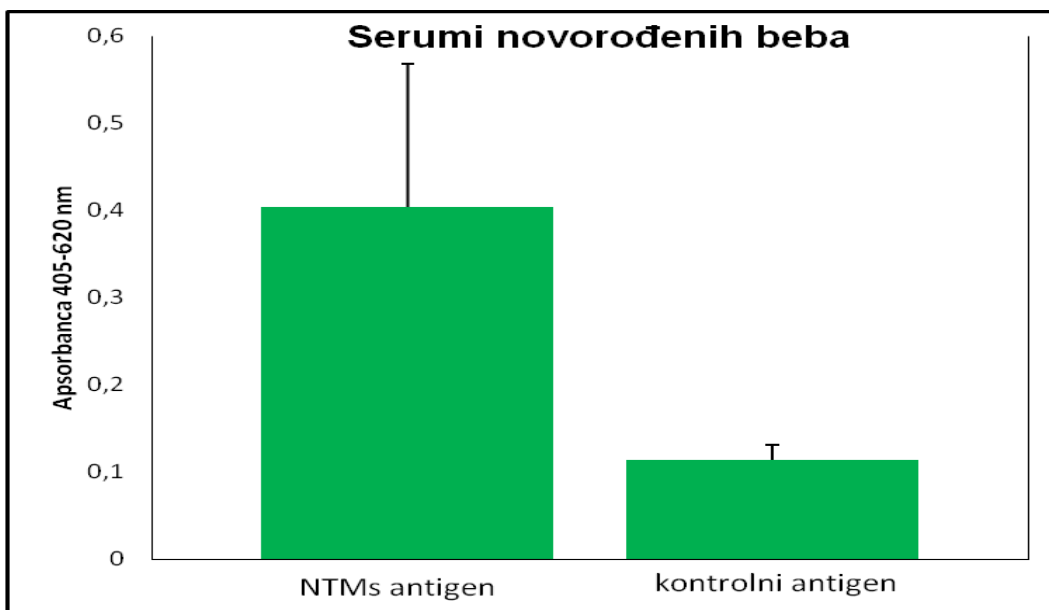
Grupa LTNP GF pacijenata je bila relativno mala, ali je odabrana zato što su LTNP i LTNP GF pacijenti bili u ovom slučaju deo iste grupe, koja je praćena u periodu od devet godina. Prethodno istraživanje je pokazalo da između grupa nije bilo razlike u nivou citotoksičnih T limfocita. Ni jedan drugi faktor kao što su starost, pol, virusni hepatitis ili neki drugi infektivni agens nisu mogli biti povezani sa LTNP statusom.

4.5 Eksperimentalna analiza prisustva anti-NTMs antitela u serumu novorođenčadi

U sledećem koraku našeg istraživanja, eksperimentalno smo ispitivali da li je dizajnirani peptidni antigen sličan nekom humanom antigenu, analiziranjem reaktivnosti seruma 18 HIV negativnih novorođenčadi sa peptidom NTMs korišćenjem ELISA testa. S obzirom da se radilo o novorođenim bebama starosti do sedam dana kod kojih IgG antitela uglavnom potiču iz organizma majke, analizirali smo reaktivnost IgM antitela specifičnih za novorođenče. Polovina ispitivane novorođenčadi su bila rođena pre 37. nedelje gestacije sa težinom manjom od 2500g, dok su drugu grupu činile zdrave bebe rođene u terminu težine veće od 2500g.

Tabela 13. Karakteristike novorođenčadi i srednje vrednosti apsorbance na peptid NTMs u ELISA testu

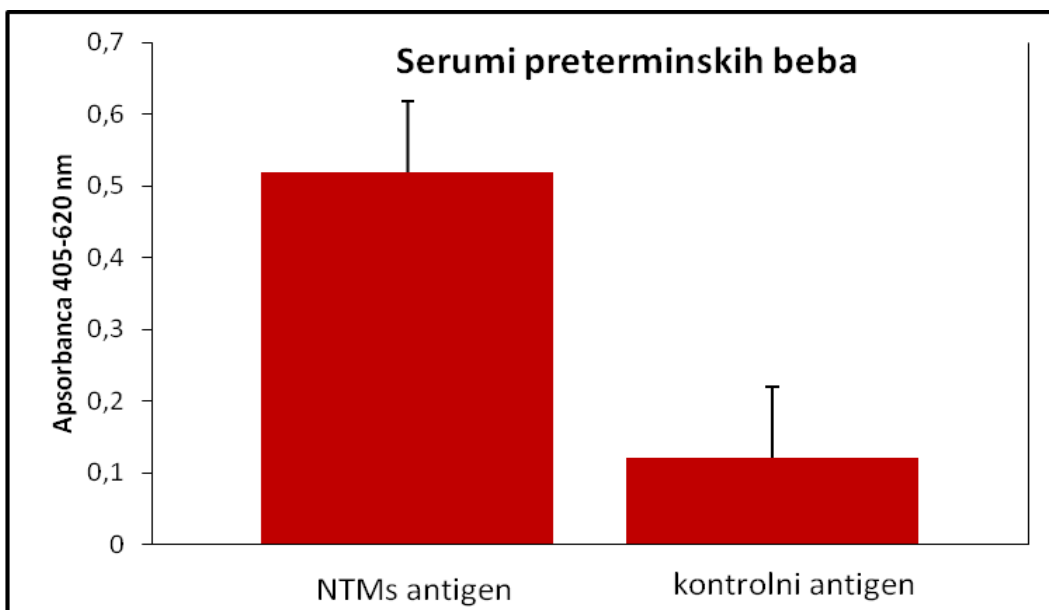
	Pretermnska deca n=9	Termnska deca n=9
Gestaciona starost na rođenju (nedelje)	<34	>37
Težina na rođenju (grami)	<2500	>2500
Starost deteta u vreme uzimanja uzorka (dani)	<7	<7
Srednje vrednosti apsorbance za NTM antigen	0.517±0.107	0.287±0.128
Srednje vrednosti apsorbance za kontrolni antigen	0,120±0,022	0,106±0,009



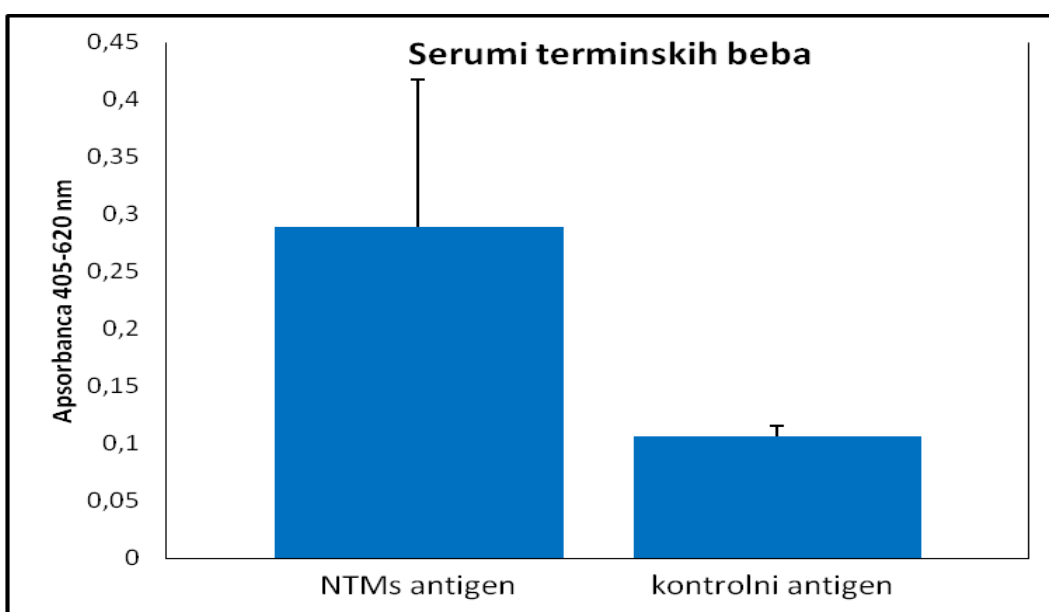
Slika 26. Poređenje reaktivnosti seruma novorođenčadi sa peptidom NTMs i kontrolnim antigenom u ELISA testu

Analizom seruma novorođenčadi dobili smo srednju vrednost apsorbanca za NTMs antigen od 0,404 (SD= 0,164), dok je srednja vrednost apsorbanca za kontrolni antigen iznosila 0,113 (SD= 0,018). Na ovaj način smo primenom ELISA testa pokazali postojanje specifične reaktivnosti IgM antitela iz seruma novorođenčadi sa peptidom NTMs na osnovu čega možemo da zaključimo da je dizajnirani antigen sličan sa nekim humanim proteinom.

Sledećom analizom smo utvrdili da postoji specifična reaktivnost sa peptidom NTMs u odnosu na kontrolni antigen u populaciji prevremeno rođenih beba (Slika 27).

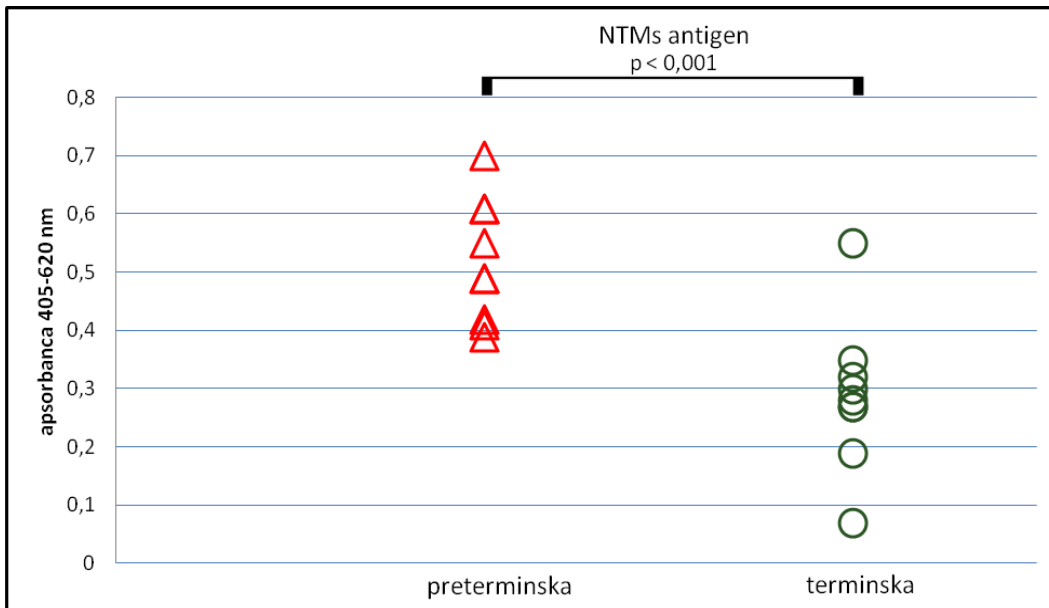


Slika 27. Poređenje reaktivnosti seruma pretermijske novorođenčadi sa peptidom NTMs i kontrolnim antigenom u ELISA testu



Slika 28. Poređenje reaktivnosti seruma termijske novorođenčadi sa peptidom NTMs i kontrolnim antigenom u ELISA testu

Našli smo da postoji specifična reaktivnost sa peptidom NTMs u odnosu na kontrolni antigen u populaciji zdrave termijske novorođenčadi (Slika 28).



Slika 29. Poređenje reaktivnosti seruma preterminske i terminske novorođenčadi dobijene u ELISA testu

Nivo antitela koja prepoznaju peptid NTMs je bio značajno veći kod preterminske u poređenju sa terminskom novorođenčadi ($p < 0,001$).

5. Diskusija

Sistemske biološki pristup izučavanju imunskog sistema je komplementaran tradicionalnim eksperimentalnim tehnikama kojima se analizira specifičnost. Sistemska biologija omogućava širok uvid uz korišćenje tzv. high-throughput eksperimentalnih metoda kojima se iz pojedinačnog uzorka ili analize može dobiti veliki broj informacija. Analiza informacije dobijene ovim eksperimentalnim tehnikama vrši se kompjuterskim alatima koji se zasnivaju na matematičkoj obradi fizičkih i hemijskih podataka. Krajnji cilj svih ovih analiza je tačno i precizno predviđanje bioloških interakcija. Jedna od centralnih tema za izučavanje u sistenskoj biologiji i bioinformatici predstavlja poznavanje fizičko-hemijskih osnova protein-protein interakcija, što je važan preduslov za predviđanje interakcija između antigena i antitela. U ovom radu su integrisane dve vrste bioinformatičkih metoda pomoću kojih smo želeli da dođemo do informacija vezanih za prepoznavanje, targeting i neposredno vezivanje antitela i antigena.

Zbog svoje veoma kompleksne prirode imunsko prepoznavanje i interakcije su jedan od najvećih izazova za biologe i biohemičare. Često se ispituju u *in vivo* ili *in vitro* životinjskim modelima ili kompjuterskim (*in silico*) modelima. Napredak u oblasti bioinformatike je omogućio nastanak brojnih tehnika za obradu i integraciju velikog broja podataka nastalih u genomičkim eksperimentima. Osim toga, ovaj iskorak je unapredio naše mogućnosti da predvidimo molekularnu specifičnost imunskog sistema. U ovom radu smo imali za cilj da predvidimo interakciju između virusnih antigena i prirodnih autoantitela domaćina. Prirodna autoantitela su humoralni deo urođene imunosti i otkrivena su kod svih kičmenjaka (127). Rezultat su prirodne selekcije, ispoljavaju genetski određen i stabilan repertoar koji je u opštem smislu nezavisan od spoljašnjeg antigenskog stimulusa (7,8). Ova antitela imaju regulisane i stabilne nivoe kod zdravih osoba. U zdravim, neinficiranim miševima, većina plazmatskih IgM antitela su prirodna autoantitela koja potiču od B-1 ćelija (6).

Prirodna autoantitela imaju ulogu da obezbede inicijalnu zaštitu od infekcija, a s druge strane, da spreče nastanak inflamacije olakšavajući uklanjanje oksidovanih lipida i proteina, kao i ćelija u apoptozi. Njihova uloga u autoimunskim oboljenjima nije

precizno objašnjena. Postoje dokazi da neka od ovih autoantitela učestvuju u patogenezi autoimunskih oboljenja, ali je to uslovljeno promenama u njihovoj količini i afinitetu za antigen (7). Dugo je postojalo gledište da je autoreaktivnost povezana samo sa patologijom, pa su autoantitela bila marker autoimunskih poremećaja i bolesti. Prema Burnetovoj teoriji klonalne selekcije, autoreaktivni klonovi limfocita se kod zdravih ljudi uklanjaju još tokom razvoja u limfnim organima, te je njihovo prisustvo kod zdravih dugo predstavljalo paradoks (128). Međutim, od kada detekcija serumskih autoantitela postaje dostupna u kliničkim uslovima, razvijaju se preduslovi za sistematičnu analizu urođenog imunskog odgovora, koji će u budućnosti postati moćan dijagnostički alat u različitim oblastima medicine.

Nova tehnologija, antigen mikroerej, u kojoj je za čipove kovalentno vezan veliki broj antigena, omogućila je simultano merenje reaktivnosti na stotine antitela (72). Potrebna je kap seruma (ili neke druge telesne tečnosti) da bi se testirala reaktivnost antitela, koja se vezuju za svako antigensko mesto, pri čemu se obično za merenje koriste fluorescentni obeleživači. Primenom antigenskih čipova, ali i klasičnih imunohemijskih analiza, značajno je uvećan broj poznatih autoantigena.

Dok su u prošlosti mreže antitela i njihove reaktivnosti izučavane na osnovu veze između idiotipova i anti-idiotipova, koji se vezuju jedni za druge, danas se veća pažnja poklanja drugoj mreži antitela, antitelima koja su između sebe povezana reaktivnošću sa skupom humanih autoantigena (129). Razvijene su bioinformatičke platforme koje omogućavaju integrisanu analizu različitih faktora urođene imunosti: mreža, puteva i gena (130), ali u dostupnoj literaturi nema kompletnih podataka o humanim autoantigenima koji su potencijalna meta urođenog humoralnog imunskog odgovora, a koja je rezultat ove disertacije.

Analizirajući literaturu napravili smo kompilaciju humanih antigena urođenog imunskog odgovora, odnosno sopstvenih molekula čoveka za koja se vezuju nepatogena autoantitela i prikazali ih u Tabeli 4. U njoj se nalaze podaci o 225 antigena, koji osim opisa proteina, sadrže i pristupni broj u bazi UniProt/Swiss-Prot (www.uniprot.org/help/uniprotkb) pomoću koga se može doći do podataka o sekvenci proteina i informacija o funkciji, strukturi i biološkom značaju određenog gena (77). U ovom radu smo koristili bioinformatički alat DAVID da bismo identifikovali biološke

termine i pojmove (odnosno biološke uloge) koje preovlađuju u skupu humanih autoantigena (Tabela 5). DAVID je web bioinformatički alat kojim se analizira statistička značajnost prisustva predefinisanih bioloških pojmova u datom skupu gena. Standardizovani biološki pojmovi koji se odnose na ćelijsku lokalizaciju, molekulsku funkciju i biološku aktivnost određenih gena nalaze se u bazi podataka GO (118). U našoj analizi su vrednosti faktora obogaćenja, koji je kvantitativna mera statističke značajnosti klasterizacije, za sve navedene funkcionalne klastere značajno iznad granične vrednosti. Očekivano, najveći deo humanih autoantigena je ekstraćelijski. Osim toga, u pogledu funkcije dominiraju agensi sa enzimskom i hormonskom aktivnošću uključeni u apoptotske i inflamatorne procese. Možda je nelogično da je regulacija imunskog odgovora na dnu liste statistički značajnih pojmova. Ovaj rezultat može biti posledica slabog poznavanja učesnika u procesu imunske regulacije, te zbog toga određeni geni i pojmovi nisu adekvatno opisani u GO. Možda ipak, naše shvatanje da je primarna uloga humoralne urođene imunosti nespecifična zaštita od infektivnih agenasa, nije u potpunosti u skladu sa realnom funkcijom ove poluge imunskog sistema u organizmu.

Antigen mikroerej tehnologija ne omogućava strogo definisanje specifičnosti ili afiniteta bilo kog pojedinačnog antitela ili grupe antitela. U stvari, pozitivni signali na antigenskom čipu verovatno odražavaju vezivanje poliklonalne smeše za različite strukturne epitope svakog imobilisanog antigena. Paralelno merenje reaktivnosti na stotine različitih antigena predstavlja težak računarski zadatak: kako ekstrahovati relevantnu informaciju iz velike količine podataka. Potrebno je definisati odgovarajući sistemski pristup kojim bi se analizirala funkcionalna osnova interakcije između antitela i antigena (72). U ovom radu smo za predviđanje specifične interakcije antigen-antitelo koristili pristup u kome smo integrisali poravnavanje sekvenci i poravnavanje fizičko-hemijskih profila proteina.

Poravnavanje proteinskih sekvenci je jedna od osnovnih metoda u bioinformatici. Poravnavanja se koriste za detekciju homologije, da bi se izučavali evoluciono povezani događaji i da bi se analizirali funkcionalni domeni koji su zajednički elementi za proteinske familije. Kao generalni koncept, sličnost između bioloških sekvenci je predstavljena kao identičnost sekvenci: broj poravnatih pozicije na

kojima su odgovarajuća slova (odnosno aminokiseline u proteinima) identični. Kada je u pitanju izučavanje imunskog sistema i identifikacija epitopa, analiza sličnosti između bioloških sekvenci znači pronalaženje kratkih sekvenci (odnosno peptida od 5 do 7 aminokiselina) koji se minimalno razlikuju (131).

Ranije je više puta pokazano da je poravnavanje parametarskih profila tehnika koja je komplementarna analizi sekvenci. Najkorisnija informacija do koje se može doći poravnavanjem sekvenci je, pre svega, o apsolutno konzerviranim aminokiselinama, koje su važne za održavanje trodimenzionalne strukture proteina ili su od suštinskog funkcionalnog značaja. Obrazac ili profil konzerviranih aminokiselina može se koristiti za identifikaciju proteina iz iste grupe koji mogu imati sličnu strukturu. Osim toga, varijacije na specifičnim pozicijama u sekvenci mogu da uslove i/ili ukažu na funkcionalne izmene, ali veoma često nemaju nikakvog ili imaju veoma malo funkcionalnog značaja. Bioinformatičke metode kojima se analiziraju globalni profili fizičko-hemijskih osobina mogu efikasno da razdvoje varijacije koje su inertne od onih koje utiču na proteinsku funkciju i imunogenost (132). Kao što smo ranije naglasili, metode zasnovane na identifikaciji konsenzus parametarskih profila imaju brojne primene: u klasifikaciji sekvenci (133), poređenju epitopa (134), definisanju multivalentnih sekvenci kao dijagnostičkih antigena i antigena za vakcine (135) i u određivanju ciljnih molekula i njihovih domena za dizajniranje lekova (136, 137).

Imunološki unakrsno reaktivni proteini su pored značajnog stepena sličnosti sekvenci imali i veoma sličnu distribuciju fizičko-hemijskih parametara duž molekula (138). Ove na prvi pogled neprimetne sličnosti, vizuelizuju se metodom ISM koja se zasniva na konceptima pozajmljenim iz digitalne analize signala u kome se numerički niz transformiše u virtualnu frekventnu karakteristiku. Primenom ISM metode proteinska sekvenca se prikazuje u formi virtuelnog, informacionog spektra. U ovakvom prikazu proteinske sekvence, izdvajaju se frekvence na kojima su signali koji dominiraju proteinskim informacionim spektrom. Ove dominantne frekvence potiču od funkcionalno najvažnijih strukturnih motiva i često su evolutivno konzervirane. U ovoj vrsti bioinformatičkih analiza od ključnog značaja je izbor molekulskog parametra kojim se predstavlja aminokiselinska sekvenca. U metodi informacionih spektara se koristi parameter PEJI kojim se opisuju dugodosežne karakteristike aminokiselina (85).

Ove karakteristike i njihova raspodela duž sekvence su determinante intermolekulske interakcije, koje su odgovorne za specifično prepoznavanje i povezivanje bioloških makromolekula (proteina, DNK i RNK) (74, 86). Na osnovu Frulihovog koncepta (83) koherentni motivi omogućavaju proteinsku komunikaciju koja rezultira frekventno-specifičnim privlačnim silama i povećanim brojem produktivnih sudara.

Virusni proteini ili njihovi domeni sa dominantnim frekvencama koje su jednake sa humanim autoantigenima, imaju potencijal da budu prepoznati od strane prirodnih autoantitela kao humani autoantigeni i predstavljaju potencijalne mete humoralnog imunskog odgovora. Korišćenjem ISM programskog paketa u ovom radu su izračunati informacioni spektri svih 225 sekvenci proteina reaktivnih sa urođenim autoantitelima i određene su njihove dominantne informacione frekvence. Nađeno je da dominantne frekvence preovlađuju u informacionom opsegu Fop1 (0,0-0,05) i Fop2 (0,25-0,35). Pošto su to karakteristike kojima je određeno prepoznavanje sa autoantitelima, smatramo da će prisustvo ovih dominantnih frekvenci u antigenima za imunohemijske testove dovesti do nespecifičnog vezivanja. Iz tog razloga bi preporuka za izbor specifičnih antigena bila da budu u Fop3 (0,20-0,25), Fop4 (0,05-0,10) i Fop5 (0,45-0,50), dok bi trebalo izbegavati antigene sa dominantnim IS frekvencama u Fop1 i Fop2. Primenom analize ontologije gena proteina koji imaju dominantne frekvence u F_{op}1 i F_{op}2 utvrđeno je da se u prvom opsegu u najvećoj meri nalaze proteini povezani sa kogulacijom krvi, a u drugoj proteini uključeni u kalcijum zavisno vezivanje za fosfolipide.

Metoda informacionih spektara je uspešno primenjena u identifikaciji funkcije G-receptora, fiziološki značajnih interaktora epigenetskog regulatora TET2 (139) i receptora na ćeliji domaćinu za toksin antraksa (140). U ovom radu smo je koristili da bismo odredili determinante virusnih i humanih antigena koje prepoznaju antitela.

Posttransfuzijski hepatitis, izazvan virusom hepatitisa C je ozbiljan problem pri primeni krvi za lečenje. Ova pojava je uslovlila razvoj automatskih i pristupačnih seroloških testova za testiranje krvi kojom bi mogao da se prenese ovaj infektivni agens. Primarni skrining test za detekciju anti-HCV antitela je enzimski imunoesej. Prvom generacijom EIA testa je ispitivano prisustvo antitela na jedan rekombinantni antigen c100-3, derivat proteina NS4 virusa hepatitisa C. Ova generacija testa je kod pacijenata

sa kliničkim i molekularnim pokazateljima HCV infekcije davala pozitivne rezultate kod 80% osoba (141, 142). Stopa lažno pozitivnih rezultata bila je 5-25% (143, 144, 145). Da bi se, pre svega, smanjio broj lažno pozitivnih rezultata, razvijeni su dodatni potvrdni testovi kao što je RIBA test. Nakon toga se pojavila druga generacija EIA testa, koji je osim antigena derivata proteina NS4 dela genoma, sadržao i antigene iz proteina C (engl. core) i NS3. Ovaj test je pokazivao veću specifičnost i osetljivost u odnosu na prethodnu generaciju. Postignuto je smanjivanje tkz. „prozora” za HCV serokonverziju sa 16 na 10 nedelja, a osetljivost je iznosila oko 95%. Treća generacija EIA testa sadrži rekonfigurisane proteine C, NS3, NS4 kao i NS5 antigen koji nije bio prisutan u prethodnoj generaciji testa (60). Primenom ovog testa „prozor” je skraćen na 7-8 nedelja.

Testovi treće generacije su pokazali značajno povećanje osetljivosti kod davalaca krvi, imunokompromitovanih osoba i obolelih od bolesti jetre, ali ne i dovoljno povećanje specifičnosti (146, 147, 64, 148). Naime, opravdanost uvođenja NS5 antigena u skrining testove je i dalje kontroverzna, s obzirom da se ovaj antigen smatra osnovnim uzrokom lažno pozitivnih rezultata u populacijama sa niskom prevalencijom, kao što su npr. davaoci krvi. (64, 65, 66). ELISA testovi treće generacije uključuju skoro ceo NS5 protein, međutim različite analize ovih testova pokazale su da NS5 antigen nije imunoreaktivan koliko i drugi antigeni, kao i da pokazuje nižu specifičnost od bilo kog drugog antigena sadržanog u testu. Utvrđeno je da su davaoci krvi, inače bez prethodnog rizika od infekcije, bili pozitivni samo na anti-NS5 antitela, a sa negativnim rezultatom molekularnog testiranja, odnosno uočeno je da izolovana NS5 reaktivnost obično nije povezana sa infekcijom virusom hepatitisa C (146, 149).

Tako, i nakon treće generacije ELISA testova, lažno pozitivni rezultati ostaju problem u populacijama sa niskom prevalencijom HCV infekcije. S obzirom na troškove koje uzrokuje postavljanje lažno pozitivnih rezultata, kao i na rastuću potrebu za testiranjem krvi u nerazvijenim i osiromašenim područjima, postoji izražena potreba za razvojem specifičnog enzimskog imunotesta za identifikaciju anti-HCV antitela. U ovom radu smo pokazali da je jedna od mogućnosti za povećanje specifičnosti HCV skrininga u niskorizičnoj populaciji isključivanje antigenskih domena ili/i peptida koji su izrazito slični sa humanim autoantigenima.

Informacionom analizom HCV antigena HCV C, NS3, NS4A, NS4B i NS5A identifikovane su njihove karakteristične frekvence sa ciljem da se utvrdi stepen sličnosti sa humanim antigenima i potencijal da budu ciljne mete urođenog humoralnog imunskog odgovora. HCV proteini C, NS3A i NS5A imaju po jednu dominantnu informacionu frekvencu, od kojih je $F_{HCV\ C}$ u opsegu Fop1, dok su $F_{HCV\ NS3}$ i $F_{HCV\ NS5A}$ izvan opsega dominantnih autoantigena, dakle specifični su za virus. Proteini HCV NS4A i NS4B imaju po dve dominantne informacione frekvence. Ukrštanje ove informacije sa podacima o humanim antigenima, pokazalo je da je po jedna njihova dominantna frekvencija u okviru humanih autoantigenih informacionih opsega. Informacione karakteristike zajedničke za sve HCV antigene za ELISA test, određene su pomoću kros-spektralne funkcije u programskom paketu ISM sa ciljem da se identifikuju globalne specifične karakteristike HCV antigena. Određen je kros-spektar proteina HCV C, NS3, NS4A, NS4B i NS5A u kome postoje dve dominantne frekvence F_{HCV1} i F_{HCV2} . Zaključeno je da bi proteinske domene, koji doprinose jačini virtuelnog signala na F_{HCV2} trebalo isključiti iz baterije antigena, jer su oni informaciono slični humanim autoantigenima koji imaju dominantne frekvence u Fop2, dok su oni koji doprinose F_{HCV1} specifični za virus HCV. Rezultati informacione analize su pokazali da HCV NS5A antigen, koji je najmanje specifičan iz palete HCV antigena u skrining testovima, ima dominantne informacione frekvence koje su karakteristične za većinu humanih autoantigena (Slika 17). Kao posledica toga proizilazi unakrsna reaktivnost sa prirodnim autoantitelima što je potvrđeno u studiji Vasiljević i sar. (150).

U daljoj analizi smo primenom programa BLAST, koji je deo programskog paketa za analizu proteinskih i genskih sekvenci, pokazali da postoje brojni humani proteini čije su primarne strukture veoma slične sa svim HCV proteinima. Primenom programa CLUSTALW identifikovali smo delove proteina HCV C, NS3 i NS4 koji pokazuju visok stepen sličnosti sa humanim antigenima iz naše baze sopstvenih antigena. Interesantno je da se među humanim proteinima sa kojima HCV protein NS4B pokazuje najveći stepen homologije nalaze tireoglobulin i protein toplotnog stresa od 60 kDa, koji su prema nekim ranijim istraživanjima humani ciljni antigeni u hroničnoj infekciji HCV-om (68). Rezultati o sličnosti humanih i proteina virusa hepatitisa C su u saglasnosti sa podacima iz literature o sličnosti između HCV proteina i humanih sekvenci koje dovode do unakrsne imunološke reaktivnosti. Kusalik i sar. su ispitujući

sličnost pentapeptida iz HCV poliproteina utvrdili sličnost sa čak 19605 humanih proteina, što čini 57,6% humanog proteoma (68). Smatra se da je upravo ova pojava uzrok različitih autoimunskih bolesti koje se sreću kod pacijenata sa hroničnom HCV infekcijom. Tako je utvrđeno da imunološka ukrštena reaktivnost između HCV C proteina i humanog GOR proteina doprinosi razvoju autoimunskog hroničnog hepatitisa i nekih drugih oboljenja jetre izazvanih hroničnom HCV infekcijom (151, 152, 153, 154). Još jedan primer uloge molekularne mimikrije u patogenezi HCV infekcije je homologija između HCV C proteina i humanog citohroma P450 čime se objašnjava razvoj autoimunskog hepatitisa tipa 2 (155, 156). U jednom od istraživanja je pronađena povezanost između antitela na nuklearne proteine i autoantitela na proteine ćelija glatkih mišića (157). Naime, bioinformatičkim pretraživanjem proteinskih baza podataka identifikovana su tri proteina u glatkim mišićima - smudelin, miozin i vimentin, kao i tri nuklearna proteina - matrin, histon H2A i replikacioni protein A, sa velikim stepenom lokalne homologije u odnosu na HCV poliprotein. Velika sličnost virusnog i humanog proteoma ne predstavlja samo prepreku za razvoj specifične dijagnostike, već i za razvoj protektivne vakcine za HCV (71, 158).

Potvrdu opravdanosti naših analiza pokazuju i rezultati dobijeni u istraživanju Vasiljević i sar (150). Kombinovanom primenom metode informacionih spektara i pretraživanjem baze sekvenci humanih proteina UniProt, u ovoj studiji je utvrđeno da postoji veliki stepen strukturne i informacione homologije između dela proteina HCV NS5A i peptida koji se nalazi na N-terminalnom kraju humanog enzima inducibilna azot-oksida sintaza (engl. iNOS). Peptidi sa najvećom sličnošću koji su bili delovi molekula HCV NS5A i iNOS su sintetisani i iskorišćeni za oblaganje mikrotitarske ploče u ELISA testu. Urađeno je ispitivanje reaktivnosti seruma HCV-negativnih i HCV-pozitivnih davalaca krvi na ove peptide. Pokazana je veoma slična reaktivnost ($p < 0,001$) kod obe grupe ispitanika, pri čemu je najveća reaktivnost utvrđena za HCV-negativne serume koji su davali lažno pozitivne rezultate u komercijalnom imunoenzimskom testiranju. Na taj način je potvrđena ideja da je NS5A antigen mogući uzročnik smanjene specifičnosti treće generacije ELISA testova za merenje antitela na virus hepatitisa C.

Dakle, na osnovu navedenih činjenica i rezultata bioinformatičkih analiza prikazanih u ovom radu, zaključili smo da anti-HCV ELISA test treba prvenstveno da se zasniva na aminokiselinskim motivima koji su specifični za virus i u pogledu sekvence i na osnovu informacionih karakteristika. Na taj način bi se izbegli nespecifični rezultati koji potiču od imunološkog prepoznavanja sopstvenih antigena.

Drugi aspekt specifičnosti, koji je bio tema u ovom radu, odnosio se na modifikaciju prirodnog polipeptida koja bi ga učinila pogodnim za antigen u komercijalnom ELISA testu. Ovde smo takođe, odredili informacione i hemijske karakteristike neophodne za prepoznavanje i vezivanje između antigena i antitela. Dobijene rezultate, odnosno svojstva smo zatim preneli na sintetički peptid. Predmet studije je bio polipeptid NTM iz C-terminalnog kraja gp120 HIV-1. U ranijim istraživanjima je pokazano da HIV-1 inficirane osobe kod kojih je utvrđen povišen titar antitela reaktivnih sa ovim peptidom imaju neprogresivnu infekciju, kao i da relativno smanjenje titra ovih antitela korelira sa progresijom bolesti (52). Polipeptid HIV-1 gp120 NTM ima 23 amino kiseline, te nije pogodan za potencijalnu primenu u kliničkoj analitici. Sa druge strane, NTM-reaktivna antitela imaju potencijal da budu klinički relevantan biomarker neprogresivne HIV-1 infekcije. Interes za pouzdane biomarkere neprestano raste usled njihovog značaja za kvalitetnu dijagnostiku i terapiju infektivnih i hroničnih bolesti. U ovom radu su analizirane informacione karakteristike skraćene forme NTM polipeptida i odgovarajućeg peptidnog nosača koji je neophodna komponenta ELISA testa u kome se peptidom oblaže ploča. Dve dominantne frekvence u informacionom spektru HIV-1 gp120 NTM, F_{NTM1} i F_{NTM2} predstavljale su karakteristiku koju je bilo potrebno definisati u novom peptidu. Osim toga, u peptid NTMs je bilo potrebno uključiti fragment NTM polipeptida koji učestvuje u direktnom hemijskom vezivanju između HIV-1 gp120, petlja D, i humanog receptora CD4. Za NTMs antigen predložen je oktapeptid koji ima sledeću sekvencu: Fenilalanin(F)-Treonin(T)-Aspartat(D)-Asparagin(N)-Alanin(A)-Lizin(K)-Treonin(T)-Izoleucin(I), koja obuhvata aminokiseline 2-4 (DNA) i 7(T) koje učestvuju u direktnom vezivanju za CD4. Ovaj peptid ima širok i nespecifičan informacioni signal, koji se poklapa sa dominantnim frekvencama polipeptida HIV-1 NTM, pa je modifikacija i poboljšanje karakteristika informacionog spektra izvedeno dodavanjem odgovarajućeg peptidnog nosača. Naime, dodatak SOC tripeptida, lizin (K)- α -aminoizobuterna kiselina (Aib)-

glicin(G) doveo je do definisanja specifičnih predefinisanih informacionih karakteristika u spektru NTMs. Pokazali smo da oktapeptid NTMs, FTDNAKTI derivat HIV-1 gp120 NTM kovalentno vezan za peptidni nosač SOC ima dominantne frekventne karakteristike koje ima i peptid NTM, F1 (0,035) i F2 (0,218) (122). Osim toga u oktapeptidu NTMs sadržan je epitop za koga se smatra da je ključan za vezivanje antitela koja koreliraju sa neprogresivnom HIV-1 infekcijom. Uzimajući u obzir ove činjenice zaključili smo da bi ovaj peptid bio pogodan ELISA antigen za merenje antitela koja koreliraju sa neprogresivnom HIV-1 infekcijom.

S tim u vezi smo testirali malu grupu ispitanika, koji zahvaljujući svojim prirodnim imunološkim karakteristikama, godinama uspešno kontrolišu HIV infekciju. LTNP predstavljaju mali heterogeni podskup (oko 5%) HIV pozitivnih osoba kod kojih specifični ćelijski i humoralni imunski odgovor održava replikaciju virusa na niskom nivou i kod kojih se možda nikada neće desiti progresija infekcije, bez obzira što ne primaju nikakvu antiretrovirusnu terapiju (37,38).

Pre nego što smo odredili reaktivnost seruma HIV pozitivnih pacijenata sa NTMs, proverili smo da li se naš peptid vezuje za površinu polistirenske mikrotitarske ploče i koja bi bila optimalna koncentracija ovog antigena za detekiju anti-NTMs antitela kod različitih grupa pacijenata zaraženih HIV-om. Primenom rastvora različite koncentracije NTMs za oblaganje, odnosno nekom vrstom titracije, pokazali smo već u inicijalnim eksperimentima da postoji reaktivnost koja je veća kod LTNP pacijenata u odnosu na HIV + progresore i HIV- kontrolu, kao i da koncentracija antigena pri kojoj se postiže zasićenje ploče iznosi 0,5 µg/100 µL (Slika 22). Dodatnom analizom smo utvrdili specifičnost vezivanja antitela za peptid NTMs s obzirom da je bio vezan za nosač, koji omogućava bolju adsorbciju za čvrstu fazu bez konformacionih promena (Slika 23).

U našim eksperimentima svi LTNP serumi su bili reaktivni sa peptidom NTMs. Reaktivnost u kontrolnoj grupi HIV-1 progresora, odnosno inficiranih kod kojih se infekcija razvija uobičajenim tokom bila je statistički značajno niža ($p = 0,0092$). Analize ukupnog imunološkog statusa LTNP pacijenata pokazale su da oni proizvode i održavaju energičniji imunski odgovor na HIV-1 infekciju od brzo-progresivirajućih

pacijenata. Osim toga, podaci Jollz i Weissa pokazuju da kada se jednom ustanovi nivo i aktivnost antitela, on se verovatno neće značajno menjati kod LTNP pacijenata (159).

Da bismo odredili da li u ELISA testu, kod koga je za čvrstu fazu vezan NTMs antigen, detektujemo specifičnu frakciju antitela koja koreliraju sa odlaganjem bolesti, testirali smo nekoliko osoba koji uspešno kontrolišu infekciju zahvaljujući nekom od protektivnih genetskih faktora domaćina ili virusa i imaju potpuno očuvan imunski sistem uprkos dugotrajnoj HIV infekciji. Ova grupa pacijenata koju smo nazvali LTNP GF je imala stabilan broj CD4 ćelija i nije imala kliničke simptome bolesti, ali je imala povišen titar virusne RNK. Naši rezultati su pokazali da je titar antitela koja se vezuju za NTMs kod ovih seruma statistički značajno ($p=0,0047$) niži nego kod LTNP pacijenata, kod kojih je humoralni imunski odgovor odgovoran za stabilan status. Ovi rezultati su potvrdili da je modifikovani antigen za ELISA test pogodan za praćenje nivoa imunološkog biomarkera i kontrole HIV-1 infekcije.

Poreklo NTM reaktivnih antitela je još uvek nejasno, jer je domen koji obuhvata FTDNAKTI sekvencu HIV-1 gp120 neimunogen (160). Može da se pretpostavi da su ova antitela nastala kao odgovor na neki retko prisutni HIV-specifični stimulans (npr. konformacioni epitop) ili da su posledica antigenske stimulacije koja nije specifična za HIV-1, odnosno da je u pitanju autoantigen. Dakle, postavljena je hipoteza da su NTM-reaktivna antitela, zapravo autoantitela. Ranija istraživanja su pokazala da HIV-1 gp120 NTM pokazuje homologiju sa humanim VIP peptidom (engl. vasoactive intestinal peptide), kao i da su antitela iz seruma HIV negativnih osoba prečišćena afinitetnom hromatografijom na VIP reaktivna sa peptidom NTM u ELISA testu (123). Utvrđeno je da je VIP autoantigen za prirodna autoantitela (12). Međutim, s obzirom da su prirodna autoantitela reaktivna sa epitopima koji su zajednički za nekoliko antigena i kroz tu polispecifičnost ostvaruju svoju multifunkcionalnost, ispitali smo da li u našoj bazi (Tabela 4) postoji još antigena koji su slični sa peptidom NTMs i kolika je mera te sličnosti. Ne iznenađuje podatak da smo pored VIP-a našli još jednu sekvencu sa identičnim stepenom i obimom sličnosti, kao i da postoji još nekoliko humanih proteina koji imaju potencijal da vežu antitela reaktivna sa NTMs, koja su marker stabilne i neprogresivne HIV-1 infekcije (Tabela 11). Utvrdili smo da identičnu sekvencu kao NTMs sadrži i ribonukleoprotein Ro60, koji inače pripada grupi RNK-vezujućih

proteina. Prethodno je identifikovan kao autoantigen u istraživanju ekspresije Ro60 tokom oštećenja tkiva na ćelijama u apoptozi kod neonatalnog lupus sindroma (124).

Inače, peptidi koji oponašaju funkcionalno važne regione HIV proteina su izvrstan alat za istraživanje strukture i funkcije virusa HIV-1 (161). Takvi peptidi mogu poslužiti kao polazna tačke za nove terapijske i preventivne anti-HIV strategije, koje mogu da uključuju i razvoj inhibitora ulaska virusa u ćeliju, kao i indukciju neutralizirajućih antitela. Danas se najviše istražuju široko neutralizirajuća antitela, koja imaju potencijal da neutralizuju različite sojeve virusa HIV-1 i odgovarajući antigeni koji bi trebalo da budu mete za vakcine (162, 163, 164, 165).

I na kraju, pokazali smo da je NTMs zapravo antigen urođenog humoralnog imunskog odgovora, jer u serumu novorođenih beba starosti do sedam dana, možemo da detektujemo IgM antitela koja su reaktivna sa ovim antigenom. Serumi 18 novorođenčadi su testirani ELISA testom sa NTMs antigenom imobilisanim na ploči. Grupa je sadržala 9 terminskih i 9 preterminskih beba. Kod svih uzoraka je zabeležena reaktivnost statistički značajno viša od reaktivnosti sa kontrolnim antigenom, koji nije komponenta urođenog imunskog antigenskog repertoara. Osim toga, zapaženo je da u grupi preterminskih beba postoji statistički značajno viši titar NTMs reaktivnih antitela nego u grupi terminskih beba. Ova razlika je u saglasnosti sa već zabeleženim razlikama imunskog sistema između ove dve kategorije novorođenčadi, koje mogu poticati od specifičnih imunskih odbrambenih puteva, koji su aktivni u zaštiti preterminskih beba od infekcije ili od neregulisanog urođenog imunskog odgovora, koji igra glavnu ulogu u etiologiji određenih komplikacija koje nastaju u kasnijem životnom dobu dece rođene pre termina (166). Razlika u titru anti-NTM antitela između dve grupe novorođenčadi mogla bi se povezati i sa saznanjem da je nivo VIP-a veći kod preterminske u odnosu na terminsku novorođenčad, a da su naše i ranija istraživanja pokazala postojanje homologije između HIV-1 gp120 NTM i VIP-a (123, 167).

Danas je manje uobičajeno nego što je to ranije bio slučaj da se u okviru pojedinačnih studija analizira mala količina bioloških podataka. Sistemski podaci se često generišu u velikim, dobro opremljenim laboratorijama i institutima. Čitavi genomi se procesuju u okviru jednog projekta (168, 169, 170). Podaci o sekvencama, analitički podaci, kao i prateće, obično automatizovane interpretacije su centralizovane i lako

dostupne (171,172,173). Mnoge hipoteze se mogu jednostavno testirati analizom podataka koji se nalaze u bazama prebogatim informacijama. Ipak, postoji još dosta prostora i potrebe za unapređenjima. Potrebni su bolji algoritmi za predviđanje B-ćelijskih epitopa i afiniteta antigen/antitelo interakcije. Postojeće arhitekture treba unaprediti da bi se mogle lako razvijati i modulisati kako bi se poboljšale tačnost i preciznost predviđanja. Funkcionalna anotacija koja je korišćena i u ovom radu će se takođe unapređivati, pre svega kroz povećanje preciznosti. Takve promene će doprineti sagledavanju imunskog sistema u finijoj rezoluciji i mapiranju virusnih antigena u vremenskoj i prostornoj dinamici. Ovo će olakšati i ubrzati razvoj testova veće specifičnosti što će omogućiti kvalitetnije lečenje infektivnih oboljenja i racionalizaciju troškova zdravstvene zaštite.

6. Zaključci

1. Na osnovu saznanja o prirodnoj humoralnoj imunosti i eksperimentalno potvrđenih podataka objavljenih u naučnoj literaturi, napravili smo kompilaciju sekvenci sopstvenih antigena čoveka, koja nam je poslužila za testiranje strukturne i informacione sličnosti humanih i virusnih proteina, a u cilju definisanja specifičnih antigena za imunohemijske testove. Analizom zajedničkih karakteristika utvrđeno je da najveći broj ovih proteina u funkcionalnom pogledu spada u ekstracelularne proteine, enzime i regulatorne proteine. Informacionom analizom smo utvrdili koja informaciona svojstva karakterišu specifične sintetičke antigene koji nisu unakrsno reaktivni sa sopstvenim autoantigenima.

2. Primenom informacione i strukturne analize smo utvrdili da HCV NS5 antigen, koji je najmanje specifičan iz palete HCV antigena u skrining testovima, ima dominantne informacione frekvence koje su karakteristične za većinu humanih antigena što je mogući uzrok nespecifičnosti treće generacije ELISA skrining testova.

3. Komparativnom analizom proteina virusa hepatitisa C, C (engl.core), NS3, NS4A, NS4B pokazali smo da postoje brojni humani proteini slične primarne strukture. Osim toga, utvrđeno je da je HCV NS3 antigen zbog svojih informacionih karakteristika pogodniji za dizajniranje specifičnog ELISA testa, za razliku od NS4A koji pokazuje sličnost sa humanim autoantigenima.

4. Primenom metode informacionih spektara dizajnirali smo peptidni antigen NTMs za koji smo eksperimentalno pokazali, kod pacijenata sa različitim tokom HIV infekcije, da je pogodan za pravljenje komercijalnog ELISA testa. Ovaj imunohemijski test bi mogao da se koristi za merenje anti-NTM antitela kao biomarkera neprogresivne HIV infekcije.

5. Eksperimentalno smo utvrdili da postoji specifična reaktivnost IgM antitela iz seruma novorođenčadi sa peptidom NTMs što ukazuje da je ovaj peptid sličan sa nekim humanim peptidom i da su NTMs reaktivna antitela deo urođenog humoralnog imunskog odgovora. Bioinformatička analiza je pokazala najveću sličnost sekvence

NTMs sa humanim VIP peptidom i proteinom Ro60 koji spada u RNK-vezujuće proteine.

7. Literatura

1. Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *LabMedicine*. 2006;37(8):490-497
2. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier Saunders 2006
3. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005;51(12):2415-8
4. KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc; [cited 2012 Oct 10]. Available from: <http://www.kpl.com/technical/techdocsearch.cfm?tcat=3>
5. Kobayashi N, Oyama H. Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules. *Analyst*. 2011;136(4):642-51
6. Chou MY, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Hansen LF, Woelkers D, Shaw PX, Choi J, Perkmann T, Bäckhed F, Miller YI, Hörkkö S, Corr M, Witztum JL, Binder CJ. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1335-49
7. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Current Opinion in Immunology*. 1995;7(6):812-818
8. Rodman TC, To SE, Sullivan JJ, Winston R. Innate natural antibodies. Primary roles indicated by specific epitopes. *Hum Immunol*. 1997;55(2):87-95
9. Meffre E, Salmon JE. Autoantibody selection and production in early human life. *J Clin Invest*. 2007;117(3):598-601
10. Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, Kazatchkine MD. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods*. 1998;216(1-2):117-37
11. Ygberg S, Nilsson A. The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta Paediatr*. 2012;101(2):120-7
12. Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Cohen IR. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest*. 2007;117(3):712-8
13. Madi A, Hecht I, Bransburg-Zabary S, Merbl Y, Pick A, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Tauber AI, Cohen IR, Ben-Jacob E. Organization of the autoantibody repertoire in healthy newborns and adults revealed by system level informatics of antigen microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(34):14484-9

14. Madi A, Kenett DY, Bransburg-Zabary S, Merbl Y, Quintana FJ, Tauber AI, Cohen IR, Ben-Jacob E. Network theory analysis of antibody-antigen reactivity data: the immune trees at birth and adulthood. *PLoS One*. 2011;6(3):e17445
15. Poletaev AB. The immunological homunculus (immunculus) in normal state and pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;67(5):600-8
16. Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101 Suppl 2:14615-21.
17. Lutz HU, Binder CJ, Kaveri S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends Immunol*. 2009;30(1):43-51
18. Kearney JF. Innate-like B cells. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26(4):377-83
19. Lutz HU, Miescher S. Natural antibodies in health and disease: an overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease. *Autoimmun Rev*. 2008;7(6):405-9
20. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 1999;286(5447):2156-9.
21. Paul S, Nishiyama Y, Planque S, Karle S, Taguchi H, Hanson C, Weksler ME. Antibodies as defensive enzymes. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26(4):485-503
22. Planque S, Nishiyama Y, Taguchi H, Salas M, Hanson C, Paul S. Catalytic antibodies to HIV: physiological role and potential clinical utility. *Autoimmun Rev*. 2008;7(6):473-9
23. Krstić Lj. *Medicinska virusologija*. Beograd: Grafopan; 2005. 247 str.
24. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. *Medicinska mikrobiologija*. Beograd: Savremena administracija; 1998. 531-544 str.
25. Imami N, Westrop SJ, Grageda N, Herasimtschuk AA. Long-Term Non-Progression and Broad HIV-1-Specific Proliferative T-Cell Responses. *Front Immunol*. 2013;4:58
26. Jevtović Đ. Početni pristup i dalji tretman pacijenata sa infekcijom virusom humane imunodeficijencije. *Acta Clinica*. 2001;1 (1):17-28
27. Caffrey M. HIV envelope: challenges and opportunities for development of entry inhibitors. *Trends Microbiol*. 2011;19(4):191-7
28. Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol*. 2011;410(4):582-608

29. Wang WK, Chen MY, Chuang CY, Jeang KT, Huang LM. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect.* 2000;33(3):131-140
30. Araújo LAL, Almeida SEM. HIV-1 Diversity in the Envelope Glycoproteins: Implications for Viral Entry Inhibition. *Viruses* 2013, 5, 595-604
31. Yang X, Tomov V, Kurteva S, Wang L, Ren X, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Sodroski J. Characterization of the outer domain of the gp120 glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2004;78(23):12975-86
32. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 1998;393(6686):648-59
33. Stolp B, Fackler OT. How HIV takes advantage of the cytoskeleton in entry and replication. *Viruses.* 2011;3(4):293-311
34. Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal Mdel C, García F. Improving Clinical Laboratory Efficiency: Introduction of Systems for the Diagnosis and Monitoring of HIV Infection. *Open Virol J.* 2012;6:135-43
35. Buttò S, Suligoi B, Fanales-Belasio E, Raimondo M. Laboratory diagnostics for HIV infection. *Ann Ist Super Sanita.* 2010;46(1):24-33
36. Iweala OI. HIV diagnostic tests: an overview. *Contraception.* 2004;70(2):141-7
37. Mandalia S, Westrop SJ, Beck EJ, Nelson M, Gazzard BG, Imami N. Are long-term non-progressors very slow progressors? Insights from the Chelsea and Westminster HIV cohort, 1988-2010. *PLoS One.* 2012;7(2):e29844
38. Lopalco L. Humoral immunity in HIV-1 exposure: cause or effect of HIV resistance? *Curr HIV Res.* 2004;2(2):127-39
39. Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Thirty Years with HIV Infection-Nonprogression Is Still Puzzling: Lessons to Be Learned from Controllers and Long-Term Nonprogressors. *AIDS Res Treat.* 2012;2012:161584
40. Rhodes DI, Ashton L, Solomon A, Carr A, Cooper D, Kaldor J, Deacon N. Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group. *J Virol.* 2000; 74(22): 10581–10588
41. Calugi G, Montella F, Favalli C, Benedetto A. Entire genome of a strain of human immunodeficiency virus type 1 with a deletion of nef that was recovered 20 years after primary infection: large pool of proviruses with deletions of env. *J Virol.* 2006;80(23):11892-6
42. Miura T, Brumme ZL, Brockman MA, Rosato P, Sela J, Brumme CJ, Pereyra F, Kaufmann DE, Trocha A, Block BL, Daar ES, Connick E, Jessen H, Kelleher AD, Rosenberg E, Markowitz M, Schafer K, Vaida F, Iwamoto A, Little S,

Walker BD. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J Virol.* 2010;84(15):7581-91

43. Poropatich K, Sullivan DJ Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 2):247-68

44. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity.* 2007;27(3):406-16

45. Tang J, Shelton B, Makhatadze NJ, Zhang Y, Schaen M, Louie LG, Goedert JJ, Seaberg EC, Margolick JB, Mellors J, Kaslow RA. Distribution of chemokine receptor CCR2 and CCR5 genotypes and their relative contribution to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seroconversion, early HIV-1 RNA concentration in plasma, and later disease progression. *J Virol.* 2002;76(2):662-72

46. Pernas M, Casado C, Arcones C, Llano A, Sánchez-Merino V, Mothe B, Vicario JL, Grau E, Ruiz L, Sánchez J, Telenti A, Yuste E, Brander C, Galíndez CL. Low-replicating viruses and strong anti-viral immune response associated with prolonged disease control in a superinfected HIV-1 LTNP elite controller. *PLoS One.* 2012;7(2):e31928

47. Hartigan-O'Connor DJ, Hirao LA, McCune JM, Dandekar S. Th17 cells and regulatory T cells in elite control over HIV and SIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011;6(3):221-7

48. Ogg GS, Kostense S, Klein MR, Jurriaans S, Hamann D, McMichael AJ, Miedema F. Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J Virol.* 1999;73(11):9153-60

49. Thèze J, Chakrabarti LA, Vingert B, Porichis F, Kaufmann DE. HIV controllers: a multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. *Clin Immunol.* 2011;141(1):15-30

50. Schols D, Esté JA, Cabrera C, De Clercq E. T-cell-line-tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1alpha contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in coreceptor use. *J Virol* 1998;72(5):4032-7

51. Neurath AR, Strick N, Taylor P, Rubinstein P, Stevens CE. Search for epitope-specific antibody responses to the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoproteins signifying resistance to disease development. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1990;6(10):1183-92

52. Veljkovic N, Branch DR, Metlas R, Prljic J, Manfredi R, Stringer WW, Veljkovic V. Antibodies reactive with C-terminus of the second conserved region of HIV-1gp120 as possible prognostic marker and therapeutic agent for HIV disease. *J Clin Virol.* 2004;31 Suppl 1:S39-44

53. Veljkovic N, Branch DR, Metlas R, Prljic J, Vlahovicek K, Pongor S, Veljkovic V. Design of peptide mimetics of HIV-1 gp120 for prevention and therapy of HIV disease. *J Pept Res.* 2003;62(4):158-66
54. Veljkovic V, Metlas R, Jevtovic D, Stringer WW. The role of passive immunization in hiv-positive patients : a case report. *Chest.* 2001;120(2):662-6
55. Žerjav S. Dijagnostika infekcije virusom humane imunodeficijencije. *Acta Clinica.* 2001;1 (1):17-28
56. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001; 345(1):41-52
57. World Health Organization; [cited 2012 Oct 1]. Available from: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/Virus hepatitis C](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/Virus%20hepatitisa%20C)
58. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2007;13(17):2461-6
59. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology.* 2004;39(1):5-19
60. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology.* 1997;26(3 Suppl 1):43S-47S
61. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L; Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep.* 2003;52(RR-3):1-13
62. Narciso-Schiavon JL, Schiavon LL, Carvalho-Filho RJ, Cardoso JR, Freire FC, Sampaio JP, Bordin JO, Soares MA, Silva AE, Ferraz ML. Anti-HCV reactive blood donors: clinical and epidemiological factors associated with false-reactive results. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20(11):1071-6
63. Fonseca BP, Marques CF, Nascimento LD, Mello MB, Silva LB, Rubim NM, Foti L, Silva ED, Ferreira AG, Krieger MA. Development of a multiplex bead-based assay for detection of hepatitis C virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(5):802-6
64. Vernelen K, Claeys H, Verhaert H, Volckaerts A, Vermeylen C. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet.* 1994;343(8901):853
65. Dow BC, Buchanan I, Munro H, Follett EA, Davidson F, Prescott LE, Yap PL, Simmonds P. Relevance of RIBA-3 supplementary test to HCV PCR positivity and genotypes for HCV confirmation of blood donors. *J Med Virol.* 1996;49(2):132-6
66. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, Lee SR. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang.* 1995;68(1):15-8
67. Rodríguez-López M, Riezu-Boj JI, Ruiz M, Berasain C, Civeira MP, Prieto J, Borrás-Cuesta F. Immunogenicity of variable regions of hepatitis C virus proteins: selection and modification of peptide epitopes to assess hepatitis C virus genotypes by ELISA. *J Gen Virol.* 1999;80 (Pt 3):727-38

68. Kusalik A, Bickis M, Lewis C, Li Y, Lucchese G, Marincola FM, Kanduc D. Widespread and ample peptide overlapping between HCV and Homo sapiens proteomes. *Peptides*. 2007;28(6):1260-7
69. Bogdanos DP, Rigopoulou EI. Viral/self-mimicry and immunological cross-reactivity as a trigger of hepatic C virus associated autoimmune diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(1):155-6
70. Bianchi FB, Muratori P, Granito A, Pappas G, Ferri S, Muratori L. Hepatitis C and autoreactivity. *Dig Liver Dis*. 2007;39 Suppl 1:S22-4.
71. Kanduc D, Tessitore L, Lucchese G, Kusalik A, Farber E, Marincola FM. Sequence uniqueness and sequence variability as modulating factors of human anti-HCV humoral immune response. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(8):1215-23
72. Plymoth A, Hainaut P. Proteomics beyond proteomics: toward clinical applications. *Curr Opin Oncol*. 2011; 23(1):77-82
73. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 1995;269(5223):496-512
74. Veljkovic V, Veljkovic N, Esté JA, Hüther A, Dietrich U. Application of the EIIP/ISM bioinformatics concept in development of new drugs. *Curr Med Chem*. 2007;14(4):441-53
75. Veljkovic N, Glisic S, Prljic J, Perovic V, Botta M, Veljkovic V. Discovery of new therapeutic targets by the informational spectrum method. *Curr Protein Pept Sci*. 2008;9(5):493-506
76. Veljkovic N, Glisic S, Perovic V, Veljkovic V. The role of long-range intermolecular interactions in discovery of new drugs. *Expert Opin Drug Discov*. 2011;6(12):1263-1270
77. UniProt Consortium. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D43-7
78. Lazović J. Informaciona analiza proteina. Beograd: Zadužbina Andrejević; 1998. 150 str.
79. Veljkovic V, Cosic I, Dimitrijevic B, Lalovic D.: Is it possible to analyze DNA and protein sequences by the methods of digital signal processing? *IEEE Biomed Eng*. 1985; 32: 337-41
80. Koshland D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1958;44 (2): 98–104
81. Devlin T M. Textbook of biochemistry: with clinical correlations, 6th ed. USA: John Wiley & Sons; 2006, 1536p.
82. Dragojević M, Popović M, Stević S, Šćepanović V. Opšta hemija. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet; 1994. 403 str.

83. Fröhlich H. Long Range Coherence and the Action of Enzymes. *Nature*. 1970;228(5276):1093
84. Little WA. Possibility of Synthesizing an Organic Superconductor. *Phys. Rev.* 1964;134: A1416–A1412
85. Veljkovic V, Slavic I.: General model of pseudopotential. *Phys Rev Lett.* 1972; 29: 105-8
86. Tintori C, Veljkovic N, Veljkovic V, Botta M. Computational studies of the interaction between the HIV-1 integrase tetramer and the cofactor LEDGF/p75: insights from molecular dynamics simulations and the informational spectrum method. *Proteins*. 2010;78(16):3396-408
87. Veljkovi N. Informaciona analiza i dizajniranje u biotehnologiji. Beograd: Zadužbina Andrejević; 2002. 97 str.
88. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215 (3): 403–410
89. Smith TF, Waterman MS. Identification of Common Molecular Subsequences. *JMolBiol*. 1981;147:195-197 (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/)
90. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23 (21): 2947–2948
91. Huang W, Sherman, BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009;4: 44-57
92. Walker JM. *The protein protocols handbook*. New Jersey: Humana Press Inc; 1996. 809p
93. Sakarellos-Daitsiotis M, Tsikaris V, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM, Sakarellos C. Peptide carriers: A helicoid-type sequential oligopeptide carrier (SOCn) for multiple anchoring of antigenic/immunogenic peptides. *Methods*. 1999; 19(1):383-411
94. Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Panou-Pomonis E, Sakarellos C. Artificial carriers: Strategy for Constructing Antigenic/Immunogenic Conjugates. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2006; 6(16): 1715-1735
95. Lutz HU. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004; 50(2):107-16
96. Servettaz A, Guilpain P, Camoin L, Mayeux P, Broussard C, Tamby MC, Tamas N, Kaveri SV, Guillevin L, Mouthon L. Identification of target antigens of antiendothelial cell antibodies in healthy individuals: A proteomic approach. *Proteomics*. 2008;8(5):1000-8
97. Lobo PI, Schlegel KH, Spencer CE, Okusa MD, Chisholm C, McHedlishvili N, Park A, Christ C, Burtner C. Naturally Occurring IgM Anti-Leukocyte

Autoantibodies (IgM-ALA) Inhibit T Cell Activation and Chemotaxis. *J Immunol.*2008;180(3):1780-91

98. Bouhlal H, Hocini H, Quillent-Grégoire C, Donkova V, Rose S, Amara A, Longhi R, Haeffner-Cavaillon N, Beretta A, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Antibodies to C-C chemokine receptor 5 in normal human IgG block infection of macrophages and lymphocytes with primary R5-tropic strains of HIV-1. *J Immunol.* 2001;166(12):7606-11

99. von Gunten S, Simon HU. Natural anti-Siglec autoantibodies mediate potential immunoregulatory mechanisms: Implications for the clinical use of intravenous immunoglobulins (IVIg). *Autoimmun Rev.* 2008;7(6):453-6

100. Hurez V. Anti-CD4 activity of normal human immunoglobulin G for therapeutic use. (Intravenous immunoglobulin, IVIg). *Ther Immunol.* 1994;1(5):269-77

101. Algiman M, et al. Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(9):3795-9

102. Dietrich G, Algiman M, Sultan Y, Nydegger UE, Kazatchkine MD. Origin of anti-idiotypic activity against anti-factor VIII autoantibodies in pools of normal human immunoglobulin G (IVIg). *Blood.*1992;79(11):2946-51

103. Lutz HU. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J Autoimmun.* 2007;29(4):287-94

104. Horn MP. Conditional autoimmunity mediated by human natural anti-Fc γ R1a autoantibodies? *FASEB J.* 2001;15(12):2268-74

105. Hansen MB, Svenson M, Abell K, Yasukawa K, Diamant M, Bendtzen K. Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur J Immunol.* 1995;25(2):348-54

106. Yadin O, Sarov B, Naggan L, Slor H, Shoenfeld Y. Natural autoantibodies in the serum of healthy women--a five-year follow-up. *Clin Exp Immunol.* 1989;75(3):402-6

107. Czömpöly T, Olasz K, Nyárády Z, Simon D, Bovári J, Németh P. Detailed analyses of antibodies recognizing mitochondrial antigens suggest similar or identical mechanism for production of natural antibodies and natural autoantibodies. *Autoimmun Rev.* 2008;7(6):463-7

108. Mirilas P, Fesel C, Guilbert B, Beratis NG, Avrameas S. Natural antibodies in childhood: development, individual stability, and injury effect indicate a contribution to immune memory. *J Clin Immunol.* 1999;19(2):109-15

109. Guilpain P, Servettaz A, Batteux F, Guillevin L, Mouthon L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. *Autoimmun Rev.* 2008;7(6):421-5

110. Rodman TC, To SE, Sullivan JJ, Winston R. Innate natural antibodies. Primary roles indicated by specific epitopes. *Hum Immunol.* 1997;55(2):87-95.

111. Lakota K, Thallinger GG, Cucnik S, Bozic B, Mrak-Poljsak K, Ambrozic A, Rozman B, Blinc A, Tomsic M, Sodin-Semrl S. Could antibodies against serum amyloid A function as physiological regulators in humans? *Autoimmunity*. 2011;44(2):149-58
112. von Gunten S, Vogel M, Schaub A, Stadler BM, Miescher S, Crocker PR, Simon HU. Intravenous immunoglobulin preparations contain anti-Siglec-8 autoantibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(4):1005-11
113. von Gunten S, Simon HU. Natural anti-Siglec autoantibodies mediate potential immunoregulatory mechanisms: implications for the clinical use of intravenous immunoglobulins (IVIg). *Autoimmun Rev*. 2008;7(6):453-6
114. Pfueller SL, Logan D, Tran TT, Bilston RA. Naturally occurring human IgG antibodies to intracellular and cytoskeletal components of human platelets. *Clin Exp Immunol*. 1990;79(3):367-73
115. Avrameas S, Ternynck T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Res Immunol*. 1995;146(4-5):235-48
116. Prasad NK, Papoff G, Zeuner A, Bonnin E, Kazatchkine MD, Ruberti G, Kaveri SV. Therapeutic preparations of normal polyspecific IgG (IVIg) induce apoptosis in human lymphocytes and monocytes: a novel mechanism of action of IVIg involving the Fas apoptotic pathway. *J Immunol*. 1998;161(7):3781-90
117. Cohen IR. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun*. 2007;29(4):126-9
118. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D440-4
119. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C; HEPATITIS Group. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat*. 2001;8(2):87-95
120. Veljković V, Metlas R. Identification of nanopeptide from HTLV-III, ARV-2 and LAVBRU envelope gp120 determining binding to T4 cell surface protein. *Cancer Biochem Biophys*. 1988;10(2):91-106
121. Stamatatos L, Cheng-Mayer C. Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range, and syncytium-forming ability. *J Virol*. 1993;67(9):5635-9
122. Djordjevic A, Veljkovic M, Antoni S, Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Zevgiti S, Dietrich U, Veljkovic N, Branch DR. The presence of antibodies recognizing a peptide derived from the second conserved region of HIV-1 gp120 correlates with non-progressive HIV infection. *Curr HIV Res*. 2007;5(5):443-8
123. Veljkovic V, Metlas R, Raspopovic J, Pongor S. Spectral and sequence similarity between vasoactive intestinal peptide and the second conserved region of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein (gp120): possible

consequences on prevention and therapy of AIDS. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189(2):705-10

124. Reed JH, Neufing PJ, Jackson MW, Clancy RM, Macardle PJ, Buyon JP, Gordon TP. Different temporal expression of immunodominant Ro60/60 kDa-SSA and La/SSB epitopes. *Clin Exp Immunol.* 2007;148(1):153-60

125. Humbert M, Antoni S, Brill B, Landersz M, Rodes B, Soriano V, Wintergerst U, Knechten H, Staszewski S, von Laer D, Dittmar MT, Dietrich U. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur J Immunol.* 2007;37(2):501-15.

126. Rodés B, Toro C, Paxinos E, Poveda E, Martinez-Padial M, Benito JM, Jimenez V, Wrin T, Bassani S, Soriano V. Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS.* 2004;18(8):1109-16

127. Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today.* 1991;12(5):154-9

128. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* 1976;26(2):119-21

129. Madi A, Bransburg-Zabary S, Kenett DY, Ben-Jacob E, Cohen IR. The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview. *Adv Exp Med Biol.* 2012;750:198-212

130. Breuer K, Foroushani AK, Laird MR, Chen C, Sribnaia A, et al. InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D1228-33

131. David Mount. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis.* Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001 New York

132. Schein CH, Bowen DM, Lewis JA, Choi K, Paul A, van der Heden van Noort GJ, Lu W, Filippov DV. Physicochemical property consensus sequences for functional analysis, design of multivalent antigens and targeted antivirals. *BMC Bioinformatics.* 2012;13 Suppl 13:S9

133. Zhang S, Bovshik EI, Maillard R, Gromowski GD, Volk DE, Schein CH, Huang CY, Gorenstein DG, Lee JC, Barrett AD, Beasley DW. Role of BC loop residues in structure, function and antigenicity of the West Nile virus envelope protein receptor-binding domain III. *Virology.* 2010 Jul 20;403(1):85-91

134. Krsmanovic V, Biquard JM, Sikorska-Walker M, Cosic I, Desgranges C, Trabaud MA, Whitfield JF, Durkin JP, Achour A, Hearn MT. Investigations into the cross-reactivity of rabbit antibodies raised against nonhomologous pairs of synthetic peptides derived from HIV-1 gp120 proteins. *J Pept Res.* 1998;52(5):410-20

135. Vergara-Alert J, Argilaguet JM, Busquets N, Ballester M, Martín-Valls GE, Rivas R, López-Soria S, Solanes D, Majó N, Segalés J, Veljkovic V, Rodríguez F, Darji

A. Conserved synthetic peptides from the hemagglutinin of influenza viruses induce broad humoral and T-cell responses in a pig model. *PLoS One*. 2012;7(7):e40512

136. Nikolic K, Veljkovic N, Gemovic B, Srdic-Rajic T, Agbaba D. Imidazoline-1 Receptor Ligands as apoptotic agents: Pharmacophore Modeling and Virtual Docking study. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2013. [Epub ahead of print]

137. Schein CH, Oezguen N, van der Heden van Noort GJ, Filippov DV, Paul A, Kumar E, Braun W. NMR solution structure of poliovirus uridylyated peptide linked to the genome (VPgpU). *Peptides*. 2010;31(8):1441-8

138. Veljkovic N, Branch DR, Metlas R, Prljic J, Vlahovicek K, Pongor S, Veljkovic V. Design of peptide mimetics of HIV-1 gp120 for prevention and therapy of HIV disease. *J Pept Res*. 2003;62(4):158-66

139. Mancini M, Veljkovic N, Leo E, Aluigi M, Borsi E, Galloni C, Iacobucci I, Barbieri E, Santucci MA. Cytoplasmic compartmentalization by Bcr-Abl promotes TET2 loss-of-function in chronic myeloid leukemia. *Cell Biochem*. 2012;113(8):2765-74

140. Doliana R, Veljkovic V, Prljic J, Veljkovic N, De Lorenzo E, Mongiat M, Ligresti G, Marastoni S, Colombatti A. EMILINs interact with anthrax protective antigen and inhibit toxin action in vitro. *Matrix Biol*. 2008;27(2):96-106

141. van der Poel CL. Hepatitis C virus infection from blood and blood products. *FEMS Microbiol Rev*. 1994;14(3):241-6

142. van der Poel CL, Reesink HW, Lelie PN, Leentvaar-Kuypers A, Choo QL, Kuo G, Houghton M. Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in The Netherlands. *Lancet*. 1989;2(8658):297-8

143. Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, Di Nello R, Van Boven JJ, Winkel I, Mulder-Folkerts D, Exel-Oehlers PJ, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet*. 1991;337(8737):317-9

144. Contreras M, Mollison PL. ABC of transfusion. Testing before transfusion, and blood ordering policies. *BMJ*. 1989;299(6713):1446-9

145. Janot C, Couroucé AM, Maniez M. Antibodies to hepatitis C virus in French blood donors. *Lancet*. 1989;2(8666):796-7

146. Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang*. 1994;66(2):122-9

147. Couroucé AM, Le Marrec N, Girault A, Ducamp S, Simon N. Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second- and third-generation anti-HCV assays. *Transfusion*. 1994;34(9):790-5

148. Vrieling H, Reesink HW, van den Burg PJ, Zaaijer HL, Cuypers HT, Lelie PN, van der Poel CL. Performance of three generations of anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assays in donors and patients. *Transfusion*. 1997;37(8):845-9.
149. Lee HF, Lu HY, Hsiao HL, Horng CB. Sequencing analysis of hepatitis C virus mixed genotype in a hemodialysis patients. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. 1995;28(4):280-90
150. Vasiljevic N, Veljkovic N, Kosec T, Ma XZ, Glisic S, Prljic J, Vujcic AD, Markovic L, Branch DR. A bioinformatics approach to identify natural autoantibodies from healthy blood donors' sera reactive with the HCV NS5A-derived peptide by imm+unoassay. *Viral Immunol*. 2011;24(2):69-76
151. Michel G, Ritter A, Gerken G, Meyer zum Büschenfelde KH, Decker R, Manns MP. Anti-GOR and hepatitis C virus in autoimmune liver diseases. *Lancet*. 1992;339(8788):267-9
152. Vandelli L, Medici G, Savazzi AM, De Palma M, Lusvardi E. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) antibodies in haemodialysis patients. *Arch Virol Suppl*. 1992;4:339-42
153. Tran A, Benzaken S, Braun HB, Fredenrich A, Dreyfus G, Durant J, Hiéronimus S, Quaranta JF, Ouzan D, Michel G. Anti-GOR and anti-thyroid autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;77(2):127-30
154. Nelson DR, David GL, Lau JY, Johnson RJ, Gretch D, Wilson R, Mizokami M. Anti-GOR in chronic HCV patients with membranoproliferative glomerulonephritis. *J Hepatol*. 1996;24(2):248
155. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, Cerny A. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *J Exp Med*. 1999;190(2):169-76
156. Bogdanos DP, Dalekos GN. Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s. *Curr Med Chem*. 2008;15(22):2285-92
157. Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, Pensati P, Iorio R, Grant P, Garson J, Bogdanos DP, Vegnente A, Mieli-Vergani G, Vergani D. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(3):404-13
158. Stufano A, Capone G, Pesetti B, Polimeno L, Kanduc D. Clustering of rare peptide segments in the HCV immunome. *Self Nonself*. 2010;1(2):154-162
159. Jolly PE, Weiss HL. Neutralization and enhancement of HIV-1 infection by sera from HIV-1 infected individuals who progress to disease at different rates. *Virology*. 2000;273 (1):52-9

160. Mathiesen T, Broliden PA, Rosen J, Wahren B. Mapping of IgG subclass and T-cell epitopes on HIV proteins by synthetic peptides. *Immunology*. 1989;67(4):453-9
161. Kalle Moebius, Jutta Eichler, HIV-derived peptide mimics, *Drug Discovery Today: Technologies*. 2009;6(1-4):19-25
162. van Gils MJ, Sanders RW. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: templates for a vaccine. *Virology*. 2013;435(1):46-56
163. Zhu J, Ofek G, Yang Y, Zhang B, Louder MK, et al. Mining the antibodyome for HIV-1-neutralizing antibodies with next-generation sequencing and phylogenetic pairing of heavy/light chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 27. [Epub ahead of print]
164. McGuire AT, Hoot S, Dreyer AM, Lippy A, Stuart A, et al. Engineering HIV envelope protein to activate germline B cell receptors of broadly neutralizing anti-CD4 binding site antibodies. *J Exp Med*. 2013 Mar 27. [Epub ahead of print]
165. Pancera M, Yang Y, Louder MK, Gorman J, Lu G, et al. N332-Directed broadly neutralizing antibodies use diverse modes of HIV-1 recognition: inferences from heavy-light chain complementation of function. *PLoS One*. 2013;8(2):e55701
166. Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol*. 2012;145(1):61-8
167. Lucas A, Bloom SR, Aynsley-Green A. Vasoactive intestinal peptide (VIP) in preterm and term neonates. *Acta Paediatr Scand*. 1982;71(1):71-4
168. Cáceres O, Montenegro J, Padilla C, Tarazona D, Bailón H, García P, Céspedes M, Valencia P, Guio H. Whole-Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Yersinia pestis*, the Causative Agent of a Plague Outbreak in Northern Peru. *Genome Announc*. 2013;1(1). pii: e00129-12
169. Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420(6915):520-62
170. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65
171. Laulederkind SJ, Hayman GT, Wang SJ, Smith JR, Lowry TF, Nigam R, Petri V, de Pons J, Dwinell MR, Shimoyama M. The Rat Genome Database 2013--data, tools and users. *Brief Bioinform*. 2013 [Epub ahead of print]
172. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D36-42
173. Helmborg W. Bioinformatic databases and resources in the public domain to aid HLA research. *Tissue Antigens*. 2012;80(4):295-304

Biografija

Ana Đorđević-Vujičić je rođena 26.04.1979. godine u Beogradu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar, upisala je školske 1998/99. godine. U okviru razmene studenata 2003.godine boravila je mesec dana u Nemačkoj. Diplomirala je 25.05.2004. godine sa prosečnom ocenom 9,47. Tema diplomskog rada koji je ocenjen najvišom ocenom bila je "Uloga citokina u aterosklerozi". Dobitnik je diplome Naučnog fonda "Profesor Ivan Berkeš" kao student generacije. Od školske 2002/2003. bila je stipendista Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Školske 2004/2005. godine upisala je postdiplomske magistarske studije na predmetu Medicinska biohemija na Farmaceutskom fakultetu. Školske 2006/2007. godine upisuje doktorske akademske studije iz Medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu. U novembru 2007.godine upisala je specijalističke studije iz Medicinske biohemije. Specijalistički ispit je položila 16.12. 2010.godine i stekla naziv specijaliste iz medicinske biohemije. Od 2005. godine postaje istraživač-stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije i radi u Institutu za nuklearne nauke „Vinča”, Centar za multidisciplinarna istraživanja i inženjering na projektu "Proteomiks u istraživanju apoptoze: primene u dijagnostici i terapiji hroničnih bolesti". 2005. godine stupa u stalni radni odnos u Institutu za neonatologiju u Beogradu. Đorđević-Vujičić i nakon toga nastavlja saradnju sa Centrom za multidisciplinarna istraživanja i inženjering u okviru koje izvodi istraživanja vezana za svoju doktorsku tezu. U okviru te saradnje u martu 2006.godine boravi u Institutu za biomedicinska istraživanja "Georg-Speyer-Haus" u Frankfurtu, Nemačka, gde ispituje prognostičke markere za predviđanje brzine razvoja HIV infekcije. Osim toga njen istraživački rad obuhvata in silico i in vitro analizu antigenskih determinanti urođenog imunskog odgovora i njihovu potencijalnu primenu kao biohemijskih markera. Ana Đorđević-Vujičić odlukom Naučnog veća Instituta „Vinča” 08.06.2011. godine stiče zvanje istraživač saradnik. Od novembra 2012. godine se nalazi na mestu načelnika biohemijsko-hematološke laboratorije Instituta za neonatologiju. Do sada je publikovala tri naučna rada i ima šest saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ana Đorđević-Vujičić

број индекса 67/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Selekcija specifičnih antigena virusa humane imunodeficijencije i virusa hepatitisa C za prognostičke i dijagnostičke ELISA testove korišćenjem bioinformatičkih metoda

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

Потпис докторанда

У Београду, 12.05.2013.

Ana Đorđević-Vujičić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ana Đorđević-Vujičić

Број индекса 67/06

Студијски програм doktorske akademske studije iz medicinske biohemije

Наслов рада Selekcija specifičnih antigena virusa humane imunodeficiјенције i virusa hepatitisа C za prognostičke i dijagnostičke ELISA testove korišćenjem bioinformatičkih metoda

Ментор dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr Nevena Veljković, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča”

Потписани/а Ana Đorđević-Vujičić

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 12.05.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Selekcija specifičnih antigena virusa humane imunodeficijencije i virusa hepatitisa C za prognostičke i dijagnostičke ELISA testove korišćenjem bioinformatičkih metoda

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 12.05.2013.

Ана Јорђевић-Ђурковић

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 прераде.** 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 прераде.** 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.