

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VITA HREN
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VITA HREN

**Epitopsko mapiranje protiteles proti protrombinu pri bolniku z
vensko trombozo**

**Antiprothrombin antibodies epitope mapping in patient with
venous thrombosis**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder. Postopek izolacije protiteles sem izvedla v Laboratoriju imunologije revmatizma v Bolnici Petra Držaja, Klinični center Ljubljana, ki ga vodi doc. dr. Saša Čučnik, univ.dipl.biol., spec.med.biokem. Določitev nukleotidih zaporedij molekul DNA so izvedli v podjetju GATC Biotech AG (Konstanz, Nemčija). Delo je bilo odobreno s strani Komisije za medicinsko etiko z odločbo št. 99/04/15 (proučevanje vezavnih karakteristik antiprotrombinskih protiteles).

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem izr. prof. dr. Mojci Lunder, dr. Poloni Žigon in doc. dr. Saši Čučnik, da so mi omogočile opravljanje magistrske naloge. Iskrena hvala za vso posredovano znanje, strokovne nasvete in usmerjanje pri izvedbi eksperimentalnega dela in pisanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi moji družini in Janu za vso podporo in razumevanje tekom študija. Mojim farmacevtkam – Sari, Poloni in Rebeki – hvala, da so bila študijska leta tako prijetna.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm. in somentorstvom dr. Polone Žigon, univ. dipl. mikrobiolog.

Ljubljana, 2017

Vita Hren

MAGISTRSKA KOMISIJA

Predsednik: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Mentorica: izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

Somentorica: dr. Polona Žigon, univ. dipl. mikrobiolog

Član: doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK

KLJUČNE BESEDE

ABSTRACT

KEY WORDS

SEZNAM OKRAJŠAV

KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

1 UVOD	1
1.1 Antifosfolipidni sindrom	1
1.2 Protrombin	3
1.3 Protitelesa proti protrombinu	4
1.3.1 Zgodovinski okvir	4
1.3.2 Interakcija protitelesa z antigenom	5
1.3.3 Metode detekcije in diagnostičen pomen	5
1.3.4 Vloga protiteles pri patogenezi bolezni	7
1.4 Načini določanja epitopov	9
1.5 Metoda bakteriofagnega prikaza	10
2 NAMEN	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 Materiali	13
3.1.1 Kemikalije	13
3.1.2 Instrumenti	15
3.2 Pufri in raztopine	16
3.2.1 Pufri za izolacijo IgG z analiznim kompletom MAbTrap™ Protein G	16
3.2.3 Pufer za razsoljevanje s kolono PD-10 GE Healthcare	16
3.2.4 Pufri za pripravo kolone z vezanim protrombinom	17
3.2.5 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom	18
3.2.6 Pufri za ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT ELISA)	20
3.2.8 Pufri za selekcijo iz bakteriofagnih peptidnih knjižnic	21
3.2.9 Pufri za določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo s testom	
ELISA	24

3.2.10 Pufri za izolacijo fagne DNA	25
3.3 Metode	26
3.3.1 Izolacija IgG protiteles z analiznim kompletom MAbTrap™ Protein G	26
3.3.2 Razsoljevanje s kolono PD-10 (GE Healthcare)	26
3.3.3 Priprava kolone z vezanim protrombinom	27
3.3.4 Izolacija IgG protiteles proti protrombinu z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom	28
3.3.5 Koncentriranje izoliranih IgG proti protrombinu s koncentrirno epruveto Amnicon Ultra 4-30K	30
3.3.6 ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT ELISA)	31
3.3.7 Kaotropna ELISA za določanje avidnosti protiteles proti protrombinu	31
3.3.8 Selekcijska bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-12™, Ph.D.-7™, Ph.D.-C7C™	32
3.3.9 Pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov	36
3.3.10 Določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo s presejalnim testom ELISA	37
3.3.11 Določanje vezavnega mesta izbranih bakteriofagnih klonov s kompetitivnim testom ELISA	38
3.3.12 Izolacija fagne DNA za sekvenciranje	39
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1 Določitev aPS/PT v serumu bolnika in določitev avidnosti izbranih protiteles	40
4.2 Izolacija protiteles IgG iz seruma bolnika z afinitetno kromatografijo	40
4.3 Izolacija protiteles proti protrombinu	41
4.4 Selekcijska bakteriofagov	52
4.4.1 Selekcijska bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-12™	52
4.4.2 Selekcijska bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-7™	53
4.4.3 Selekcijska bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-C7C™	55
4.5 Določanje aminokislinskega zaporedja peptidov, izraženih na izbranih bakteriofagih	56
4.6 Določanje vezavnega mesta izbranih bakteriofagnih klonov s kompetitivnim testom ELISA	58
4.7 Analiza izoliranih peptidov	59
5 SKLEP	63

POVZETEK

Protitelesa proti protrombinu so podskupina protiteles značilnih za avtoimunsko obolenje imenovano antifosfolipidni sindrom. Bolniki s to boleznijo trpijo za arterijskimi ali venskimi trombozami ter zapleti v nosečnosti. Kljub pripisovanju vedno večje pomembnosti protitelesom proti protrombinu v diagnostiki in patogenezi bolezni, do danes še niso objavili študije, ki bi proučevala njihovo vezavno mesto. Zato smo se odločili poiskati mesto vezave med protitelesi proti protrombinu bolnika z venskimi trombozami in njihovim antigenom. V ta namen smo izbrali primernega bolnika z visoko avidnimi protitelesi. Iz seruma smo izolirali protitelesa IgG in z afinitetno kromatografijo očistili vzorec do protiteles proti protrombinu. Izolirana protitelesa smo uporabili kot tarčo pri selekciji peptidov z afiniteto do paratopov iz bakteriofagnih knjižnic. Selekcijo smo izvedli s tremi različnimi bakteriofagnimi knjižnicami, in sicer z naključnimi peptidi dolgimi dvanajst aminokislin, sedem aminokislin in ciklično povezanimi sedmimi aminokislinami. Izolirane bakteriofage smo ovrednotili s testom ELISA in najprimernejšim kandidatom določili peptidno zaporedje. Le-ta smo primerjali z linearno in tridimensionalno strukturo antiga protrombina. Iz dobljenih rezultatov predvidevamo, da protrombin vsebuje kriptični epitop, ki se razkrije po vezavi le-tega na antifosfolipidne membrane. Med izbranimi peptidi smo opazili ponavljanjoč motiv, sestavljen iz treh aminokislin: triptofan, histidin in arginin; na podlagi česar sklepamo, da pri interakciji paratop-epitop pomembno vlogo odigrajo ionske in vodikove vezi.

KLJUČNE BESEDE

antifosfolipidni sindrom, protitelesa proti protrombinu, venska tromboza, epitopsko mapiranje, bakteriofagne peptidne knjižice

ABSTRACT

Antiprothrombin antibodies are a subgroup of antibodies associated with an autoimmune disorder called antiphospholipid syndrome. Patients with this disease suffer from arterial or venous thrombosis and complications during pregnancy. Despite known importance of antibodies in the diagnosis and pathogenesis of the disease, a study which would determinate the binding site of antibody against prothrombin has not been published yet. Therefore, we decided to determine a binding site of antiprothrombin antibody and the antigen prothrombin of the patient with venous thromboses. For this purpose, we selected a suitable patient having high avidity antiprothrombin antibodies. IgG antibodies were first isolated from the serum and later antiprothrombin antibodies were purified with affinity chromatography. Isolated antibodies were used as targets in the selection of peptides with affinity to paratopes from bacteriophage libraries. Selection was performed with three different bacteriophage libraries, with random peptides of twelve and seven long amino acids and cyclic-linked seven amino acids. Isolated bacteriophages were evaluated using ELISA and peptides sequences were determined for the most suitable candidates. Alignment of peptide sequences with the linear and three-dimensional structure of the prothrombin antigen was performed. From the obtained results, it is anticipated that the prothrombin contains a cryptic epitope, which is revealed after binding to the antiphospholipid membranes. A repetitive motif consisting of three amino acids: tryptophan, histidine and arginine was observed among the selected peptides; on the basis of which we conclude that electrostatic and hydrogen bonds play an important role in the interaction of the paratope and epitope.

KEY WORDS

antiphospholipid syndrome, antiprothrombin antibodies, venous thrombosis, epitope mapping, phage display peptide library

SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
aPL	antifosfolipidna protitelesa
APS	antifosfolipidni sindrom
aPT	protitelesa proti protrombinu
aPS/PT	od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu
AUG	arbitrarne enote aPS/PT razreda IgG
BSA	goveji serumski albumin
DEA	dietanolaminski pufer
dH ₂ O	destilirana voda
ELISA	encimsko-imunski test na trdnem nosilcu
IgA	imunoglobulin razreda A
IgM	imunoglobulin razreda M
IgG	imunoglobulin razreda G
IS	interni standard
LA	lupusni antikoagulanti
LAF	komora z laminarnim pretokom zraka
OD ₆₀₀	optična gostota pri 600 nm
PBS	pufrana fiziološka raztopina (phosphate buffered saline)
pfu	plakotvorna enota
rpm	vrtljaji na minuto
TBS	s Tris-om pufrana fiziološka raztopina (tris buffered saline)

KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Aln	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
C	Cys	cistein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	glutaminska kislina
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
L	Leu	levcin
K	Lys	lizin
M	Met	metionin
F	Phe	fenilalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tirozin
V	Val	valin
X	katerakoli aminokislina	

1 UVOD

1.1 Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom (APS) ali Hughsov sindrom je sistemska avtoimunska bolezen, za katero je značilno nastajanje tromboz na ravni različnih segmentov obtočil in/ali zapleti med nosečnostjo. Sindrom se v približno polovici primerov pojavlja kot samostojna bolezen, v drugih primerih je sindromu pridružena še kakšna vezivnotkivna bolezen, največkrat sistemski lupus eritematozus. APS je prepoznan na osnovi mednarodno sprejetih klasifikacijskih kriterijev iz leta 2006 [1], ki klinične znake bolezni povezuje v sindrom ob povišanih serumskih nivojih antifosfolipidnih protiteles (aPL). Med slednje, t.i. serološke označevalce APS, uvrščamo avtoprotitelesa usmerjena proti kardiolipinu in β_2 -glikoproteinu I ter lupusne antikoagulante (LA). APS je pri bolniku potrjen, kadar določimo prisotnost vsaj enega kliničnega in vsaj enega laboratorijskega merila, pri čemer morajo biti vrednosti aPL trajno povišane v razmaku vsaj 12 tednov (Tabela 1).

Tabela 1: Klinična in laboratorijska klasifikacijska merila za APS. Bolezen je potrjena, če bolnik izpolnjuje vsaj enega od kliničnih in vsaj enega od laboratorijskih meril. Povzeto po [1].

Klinična merila	
Tromboze	Eno ali več evidentiranih tromboznih stanj arterij, ven ali malih žil ter katerega koli tkiva ali organa
Zapleti med nosečnostjo	Ena ali več nepojasnjenih smrti morfološko zdravega fetusa med 10. in 34. tednom nosečnosti Eno ali več eklampsij oz. preeklampsij pred 34. tednom nosečnosti Trije ali več nepojasnjenih spontanih splavov pred 10. tednom nosečnosti morfološko zdravega fetusa
Laboratorijska merila	
Lupusni antikoagulanti	Prisotni v plazmi vsaj dvakrat v razmiku 12 tednov
Antikardiolipinska protitelesa	Izotipa IgG ali/in IgM prisotna v plazmi ali serumu (v srednjem ali visokem titru) vsaj dvakrat v razmiku 12 tednov
Protitelesa proti β_2-glikoproteinu	Izotipa IgG ali/in IgM prisotna v plazmi ali serumu vsaj dvakrat v razmiku 12 tednov

Zraven klasičnih kliničnih in laboratorijskih znakov se pri APS pojavljajo tudi takšni, ki sicer niso vključeni v klasifikacijska merila, vendar jih vseeno povezujemo s to avtoimunsko boleznijo. Mednje spadajo: bolezen srčnih zaklopk, *livedo reticularis*, trombocitopenija, nevropatija, prisotnost protiteles proti kardiolipinu in β_2 -glikoproteinu izotipa IgA ter prisotnost protiteles proti protrombinu (aPT) in protiteles proti kompleksu protrombin/fosfatidilserin (aPS/PT).

Metode, ki se trenutno uporabljajo za določanje aPL, lahko ločimo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo encimsko-imunske metode oz. teste ELISA, ki se uporabljajo za določitev protiteles proti kardiolipinu in proti β_2 -glikoproteinu I, v drugo skupino pa uvrščamo teste koagulacije, s katerimi določamo lupusne antikoagulante [1].

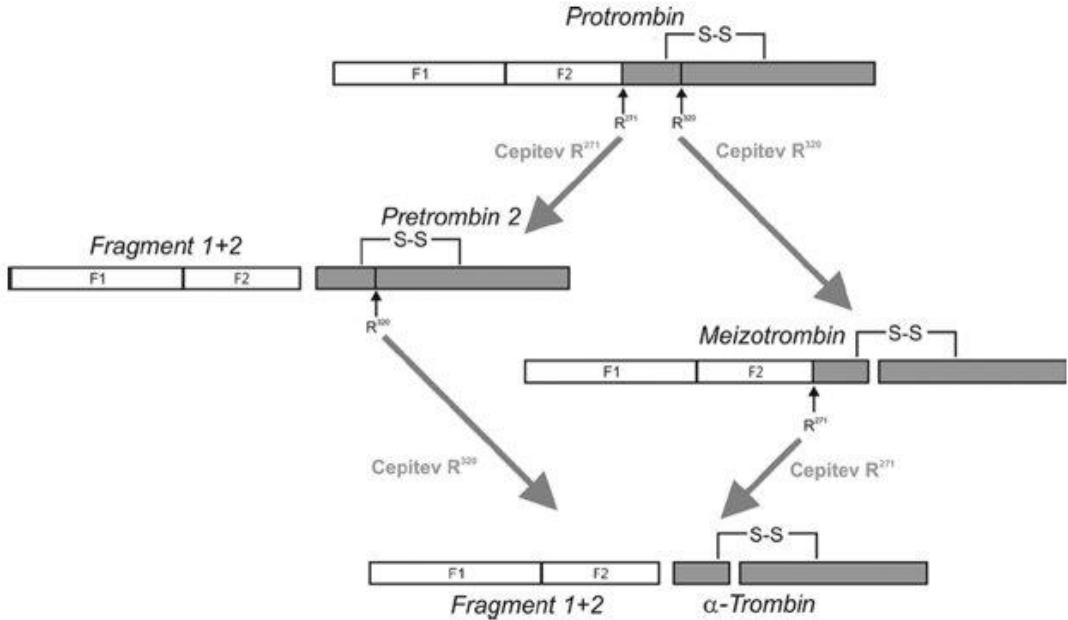
Po trenutnih smernicah zdravljenje APS temelji predvsem na preprečevanju nastanka krvnih strdkov s pomočjo antiagregacijskih (acetilsalicilna kislina) in antikoagulacijskih

zdravil (varfarin in nizko molekularni heparin). Pri bolnicah z zapleti v nosečnosti se do tretjega trimesečja najbolje obnese kombinacija acetilsalicilne kisline v nizkih odmerkih in nizko molekularnega heparina, kasneje se predpisuje le nizko molekularni heparin. Uporaba varfarina se v prvem trimesečju nosečnosti odsvetuje zaradi prehajanja placente in teratogenosti [2].

1.2 Protrombin

Protrombin ali faktor II je beljakovina, ki ima glavno vlogo v procesu strjevanja krvi. V krvi protrombin najdemo v obliki proencima, ki se v kaskadni reakciji koagulacije s pomočjo vitamina K proteolitično aktivira in pretvori v trombin. Ta ima funkcijo serinske proteaze, ki cepi številne molekule in jih s tem aktivira. Za zaustavitev krvavitve pa je ključna cepitev fibrinogena, faktorja I, v fibrin. Monomeri fibrina nato polimerizirajo in tvorijo fibrinski čep, ki je končni produkt strjevanja krvi [3].

Sinteza protrombina poteka v jetrih, znotraj hepatocitov, kjer se nato tudi sekundarno modificira in sprosti v krvni obtok kot enojno verižen glikoprotein dolg 579 aminokislin (AK) [4]. Sestavljen je iz treh delov: domene »kringel«, domene Gla (sestavljena iz 9 do 12 γ -karboksi glutaminskih ostankov), ki je locirana na fragmentu 1, in katalitične domene serinske proteaze na C-končnem delu proteina. Posttranslacijska modifikacija poteka na delu domene Gla, in sicer s pomočjo vitamina K poteče reakcija karboksilacije ostankov glutaminskih kislin v γ -karboksi glutamatne ostanke. Ti omogočijo vezavo protrombina na negativno nabite fosfolipide ob prisotnosti kalcijevih ionov. Za nadaljnjo aktivacijo protrombina v trombin je ta vezava nujno potrebna. Pri tem se sprosti tudi velik peptid, fragment 1+2 (Slika 1). Domena »kringel« je odgovorna za vezavo trombina na fibrinogen, le-tega nato katalitična domena odcepi od fibrinopeptida A in B, da ostane le netopni fibrin, ki je končni produkt strjevanja krvi [5].



Slika 1: Predstavitev poti aktivacije protrombina v trombin. Aktivacija zajema cepitev dveh peptidnih vezi profaktorja. Reakcijo katalizira faktor Xa. Poteče s cepitvijo na mestu Arg²⁴⁷ - Thr²⁷⁵, pri čemer se tvorita intermediata fragment 1+2 in pretrombina 2 in nato sledi cepitev Arg³²³ - Ile³²⁴. Reakcija, ki jo katalizira trombinaza, pa najprej poteče s cepitvijo Arg³²³ - Ile³²⁴ in pretvorbo v meizotrombin, čemur sledi cepitev na mestu Arg²⁴⁷ - Thr²⁷⁵. Povzeto po [5].

1.3 Protitelesa proti protrombinu

1.3.1 Zgodovinski okvir

Leta 1959 je Loelinger kot prvi predstavil primer bolnika s prisotnostjo aPT kot kofaktorja LA [6]. Dvajset let kasneje je Bajaj s sodelavci prvič potrdil prisotnost teh protiteles pri dveh bolnikih z LA in hudo hipoprothrombinemijo [7]. Predpostavljeni so, da je hipoprothrombinemija posledica hitrega izločanja kompleksa protiteles in protrombina iz krvnega obtoka. Kasneje so izvedli protitočno imunoeleketroforezo, s katero so potrdili obstoj takšnih kompleksov v plazmi bolnikov z LA, vendar brez hude hipoprothrombinemije [8]. Te rezultate je potrdil in še razširil Fleck s sodelavci, ki so dokazali, da imajo aPT aktivnost LA in so prisotna pri bolnikih, ki zbolevajo za to bolezni, vendar imajo normalne vrednosti protrombina v krvi [9]. Kasneje so Oosting in sodelavci pokazali, da protitelesa z aktivnostjo LA inhibirajo delovanje protrombinaznega

kompleksa na površini endotelijskih celic in da se frakcija IgG protiteles veže na kompleks fosfatidilserin/protrombin [10].

1.3.2 Interakcija protitelesa z antigenom

Interakcija med aPT in protrombinom se ne vzpostavi, če je le-ta v raztopini, vendar le če je antigen vezan na nosilec [11]. Za vezavo protrombina na negativno nabito fosfolipidno površino je nujna prisotnost kalcijevih ionov. Pod temi pogoji se Gla predel protrombina konformacijsko spremeni in izpostavijo se hidrofobni deli beljakovine, ki so ključni za vezavo. Zaradi te konformacijske spremembe so strokovnjaki mnenja, da so aPT usmerjena proti kriptičnim epitopom oziroma neoepitopom, ki se izrazijo šele z vezavo protrombina na fosfatidilserin [12].

Galli sodelavci je ugotovila, da protitelesa bolje prepozna protrombin, če je le-ta v ELISA testu vezan na fosfatidilserin [13]. Razlog za to je našla v nakopičenosti in boljši orientiranosti antiga. Predpostavila je, da so aPT nizko afinitetne narave in se na protrombin vežejo bivalentno. Kasnejša kinetična merjenja asociacije in disociacije so potrdila tezo o bivalentni vezavi, medtem ko so merjenja avidnosti protiteles pokazala obstoj tako visoko kot nizko avidnih protiteles [14, 15].

Rao sodelavci je pokazal, da se protitelesa IgG aPT, izolirana iz bolnikov z LA, vežejo na pretrombin 1 in fragment 1 ter cel protrombin, pri čemer pa nobeno od izoliranih protiteles ni reagiralo s trombinom [16]. Dominantni epitopi se zato verjetno nahajajo blizu vezavnega mesta za fosfolipide, vendar so lahko zelo heterogeno razporejeni. Druga raziskovalna skupina, ki se je iskanja epitopov lotila z uporabo rekombinantnih protrombinskih fragmentov, je ugotovila, da je 62 % protiteles usmerjenih proti fragmentu 1, preostalih 38 % pa proti pretrombinu 1 [17]. Možna je tudi vezava protiteles na domeno »kringel«, ki je skupna vsem od vitamina K odvisnim proencimom, kar bi pojasnilo navzkrižno reaktivnost s plazminogenom [18].

1.3.3 Metode detekcije in diagnostičen pomen

Dvojna imunodifuzija in protitočna imunoelktroforeza sta prvi metodi, ki sta bili uporabljeni za detekcijo aPT. Njuna glavna prednost je zaznava tvorb imunskega kompleksa med protitelesom in protrombinom, vendar je zato potreben visok titer in visoka afiniteta protiteles [7-9]. Kljub temu so ta *in vitro* dognanja nakazala, da so takšni imunski kompleksi najverjetneje prisotni tudi v plazmi bolnikov *in vivo*. Ker metodi ne

omogočata kvantitativne ocene protiteles, sta neprimerni za izvajanje rutinskih testiranj [19].

V iskanju primernejše metode je več raziskovanih skupin v zadnjih letih razvilo različne teste ELISA, s katerimi lahko hitro določimo koncentracijo in izotip protiteles aPT. Prvi takšen test je postavil Arvieux s sodelavci, pri katerem so kot antigen uporabili protrombin in ga nanesli na mikrotitrsko ploščo z visoko afiniteto vezave [20]. Na ta način so določali protitelesa usmerjena proti samemu protrombinu, zato ta test danes poimenujemo aPT ELISA. Pri tem je zanimivo, da način predstavitve protrombina močno vpliva na njegovo prepoznavo. Protitelesa aPT se vežejo na protrombin le, če je ta imobiliziran na anionski površini, kot so γ -obsevane ali visoko vezavne polivinilkloridne (PVC) mikrotitrsko ploščo [21]. Kasneje so Mastuuda in sodelavci pokazali, da je protrombin bolje prepoznan, kadar je kot antigen vezan na fosfatidilserin ob prisotnosti kalcijevih ionov. To metodo danes poimenujemo aPS/PT ELISA [22]. Klinične raziskave so pokazale, da test aPS/PT kaže večjo občutljivost in specifičnost kot aPT, kar lahko razložimo na več načinov:

1. Protrombin vezan na fosfatidilserin ni omejen v svojem lateralnem gibanju. To mu omogoča kopiranje in boljšo orientiranost, kar prispeva k optimizaciji pogojev za vezavo protiteles.
2. Ob prisotnosti kalcijevih ionov se na imobiliziran fosfatidilserin ujamejo tudi imunski kompleksi protiteles z antigenom.
3. Protitelesa aPT morda reagirajo z neoepitopi, ki se pojavi na protrombinu šele, ko se ta veže na fosfatidilserin s pomočjo kalcijevih ionov [21].

Naslednje pomembno odkritje je bilo, da je aPS/PT močneje povezana z aktivnostjo LA kot aPT. Atsumi s sodelavci ni potrdil korelacije med rezultati testa aPS/PT in aPT pri bolnikih z APS, zato so bili mnenja, da testa določata dve različni skupini protiteles usmerjenih proti trombinu glede na epitopsko prepoznavo [23]. Kasneje so v Laboratoriju za imunologijo revmatizma Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana modificirali metodo aPS/PT, ki je omogočila zaznavo obeh domnevno epitopsko različnih skupin protiteles in s tem obeh klinično pomembnih protiteles proti protrombinu [24].

Podatki iz presečnih študij povzetih v preglednem članku so pokazali, da se z zvišanimi vrednostmi tako aPT kot aPS/PT poveča tveganje za nastanek tromboz [25]. Pozitiven rezultat v aPS/PT ELISA predstavlja večjo nevarnost za nastanek trombotičnega stanja, tako venskega kot arterijskega. Zato so avtorji mnenja, da bi rutinsko merjenje aPS/PT

omogočilo boljšo oceno trombotičnega tveganja pri bolnikih z APS. Na slovenski populaciji je Žigon s sodelavci predstavila rezultate klinične študije njihove hišne aPS/PT metode, ki so pokazali da prisotnost aPS/PT protiteles poveča tveganje za venske tromboze in zaplete v nosečnosti [26]. Posledično so se v Laboratoriju za imunologijo revmatizma odločili, da aPS/PT ELISA uvrstijo med rutinske preiskave [27]. Zaradi vseh naštetih razlogov bi bil test aPS/PT primeren za diagnosticiranje APS, vendar zaradi premajhnega števila študij do leta 2006, ko so bila sprejeta zadnja klasifikacijska merila, protitelesa aPS/PT še niso bila uvrščena med laboratorijska merila za ta sindrom [1].

1.3.4 Vloga protiteles pri patogenezi bolezni

Protitelesa aPL niso le diagnostični pokazatelji APS, temveč predstavljajo tudi patogeno vlogo pri kliničnih znakih bolezni. Mehanizem njihovega delovanja še ni popolnoma poznan in je predmet raziskav, prav tako pa ni poznana funkcija vseh podskupin aPL pri razvoju patogeneze bolezni. Strokovnjaki so mnenja, da najpomembnejšo vlogo pri tem odigrajo protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I in protitelesa aPT, saj so najbolj povezana z aktivnostjo LA.

Razvoj aPL pri bolnikih z APS povezujemo z različnimi dejavniki: genske predispozicije, napake imunskega sistema, hormonski in okoljski vplivi (cepljenje, infekcije, stres, zdravila, rak). Ker trajno povišane vrednosti protiteles le občasno sprožijo nastanek trombov, se je izoblikovala t.i. "hipoteza dveh sprožilcev". Prvi sprožilec predstavljajo sama protitelesa aPL, ki vzpostavijo trombofilno stanje, vendar do tvorbe strdkov pride šele ob prisotnosti drugega sprožilca. To je lahko vnetje povezano z infekcijskim ali kakšnim drugim travmatološkim stanjem v telesu. Ta hipoteza obrazloži nastanek arterijskih in venskih tromboz, ne pojasni pa tudi vzrokov za zaplete pri nosečnosti pri ženskah z APS. Strokovnjaki so zato mnenja, da imata obe klinični oblici bolezni različen mehanizem nastanka [28, 29]. Tudi trombozna stanja so najverjetnejše rezultat različnih patogenih poti in morda vsa niso klinično pomembna pri razvoju bolezni pri vseh bolnikih.

Patogene poti, ki lahko vodijo v nastanek tromboze so:

1. Interakcija aPL s fosfolipidnimi membranami endotelnih celic sproži aktivacijo prokoagulacijskih in provnetnih faktorjev. Preko signalne poti p38 z mitogenom aktivirane kinaze (p38 MAPK) in jedrnim faktorjem kappa B (NF κ B) endotelijskih celic pride do povečane ekspresije tkivnega faktorja, kar privede do vnetnega mikrookolja. K temu pripomore tudi povečano izločanje adhezivnih molekul, ki

omogočijo lepljenje levkocitov, in inhibicija sinteze dušikovega oksida, ki služi kot vazodilatator [30].

2. Vezava aPL na monocite v krvi povzroči povečano ekspresijo tkivnega faktorja in nekaterih citokinov, kar prav tako prispeva k nastanku vnetnega mikrookolja [31].
3. Protitelesa aPL prepoznajo proteine izražene na trombocitih, se nanje vežejo in potencirajo že inducirano agregacijo trombocitov. Ta mehanizem naj bi pojasnil pogosto pridruženo trombocitopenijo APS [32].
4. Protitelesa neposredno vplivajo na komponente koagulacijske kaskade v plazmi, tako da inhibirajo antikoagulacijske poti. Protitelesa aPL se vežejo na koagulacijske faktorje (II (IIa), IX (IXa), X (Xa)) in s tem preprečijo njihovo inaktivacijo z naravnimi antikoagulantmi. Po drugi stani pa se vežejo na naravne antikoagulantne (antitrombin III in protein C/protein S) in preprečijo njihovo aktivacijo. Pri tem mehanizmu delovanja naj bi bila najpomembnejša prav protitelesa aPT [33].
5. Protitelesa se vpletajo tudi v mehanizem fibrinolize, katerega funkcija je razgradnja fibrina. Fibrinolizo nadzoruje plazmin, ki se iz svoje neaktivne oblike plazminogena pretvori v aktivno obliko plazmin s pomočjo tkivnega aktivatorja plazminogena (tPA). Iz plazme bolnikov z APS so bila izolirana protitelesa usmerjena proti plazminogenu in tPA, za katere so dokazali, da zmanjšajo aktivnost obeh molekul. Protitelesa aPT izkazujejo navzkrižno reaktivnost s plazminogenom, vendar obe skupini izražata različne funkcionalne lastnosti in zato najverjetneje nista med seboj povezani [34].

Prisotnost vnetja predstavlja ključni dejavnik za prehod iz trombofilnega stanja v trombozno stanje. Prispeva pa tudi k spremembam konformacij antigenov in imunske aktivnosti celic. Aktivacija sistema komplementa je po zadnjih raziskavah nujen dejavnik za tvorbo strdkov pri bolnikih z APS, saj so študije na miših z izbitim genom za komponenti komplementa C3 in C5 pokazale, da injiciranje aPL tem mišim sproži tvorbo manjših trombov v primerjavi z običajnimi [35].

Pri žilnih zapletih APS se prepleta več patogenih mehanizmov, med katerimi le redki igrajo vlogo tudi pri bolnicah z zapleti v nosečnosti značilnimi za APS. *In vitro* študije so pokazale, da aPL lahko povzročijo tromboze malega žilja na materini posteljici, vendar v večini primerov pri histoloških pregledih fetusov in placent bolnic z ASP niso zaznali prisotnosti tromboznega stanja [36]. Spontani splavi naj bi bili v največji meri posledica

vnetnih procesov, kot so aktivacija sistema komplementa, sinteza dejavnika tumorske nekroze alfa (TNF- α) in kemokinov [37].

1.4 Načini določanja epitopov

Protitelesa prepoznaajo posebne regije na antigenu, ki predstavljajo vezišča med protitelesom in antigenom, imenujemo jih epitopi. Paratop je epitopu prilegajoči se del hipervariabilne regije protitelesa. Epitope razvrščamo v dve skupini: linearni epitopi in konformacijski epitopi. Linearni se popolnoma skladajo z aminokislinskim zaporedjem določenega segmenta antiga, med tem ko se konformacijski prilegajo segmentu antiga na nivoju tridimenzionalne strukture proteina [38]. Poznavanje epitopov je pomembno iz vidika razumevanja delovanja terapevtskih protiteles, razvoja cepiv in iskanja novih diagnostičnih označevalcev. Zaradi želje po poznavanju vezišč so razvili več metod mapiranja epitopov.

1. Rentgenska kristalografija je metoda, ki je zlati standard določanja epitopov, saj omogoča vizualizacijo interakcije antigen-protitelo in določitev tako epitopa kot paratopa. Vendar takšna tehnika zahteva veliko visoko prečiščenega proteina in kokristalizacijo med protitelesom in antigenom, ki ni vedno mogoča, sploh kadar gre za membranske proteine. S to tehniko lahko določamo tako linearne kot konformacijske epitope.
2. Jедrska magnetna resonančna (NMR) spektroskopija omogoča pridobitev enako podrobnih podatkov o interakciji kot rentgenska kristalografija. Za izvedbo te metode ne potrebujemo kompleksa v kristalinični obliki, ampak v raztopini. Uporabnost metode je omejena z velikostjo molekul, saj je primerna le za majhne proteine. Določamo lahko tako linearne kot konformacijske epitope.
3. Zamenjava vodika z devterijem, ki ji sledi masna spektrometrija je metoda, ki se uporablja za določanje konformacijskih epitopov [39].
4. Metoda sintetičnih knjižnic peptidov temelji na kemijski sintezi. Knjižnice so lahko pripravljene na podlagi dveh metod: metode DCR (divide, couple, recombine) in metode aminokislinskih mešanic. Metoda DCR vključuje delitev nosilca v skupine za spajanje AK s posameznimi alikvoti, mešanje in razdelitev za naslednjo sklopitev z AK. Ta proces ustvarja sistem en nosilec ena spojina, ki vsebuje milijone naključnih peptidov. Pri tem vsak nosilec izraža le en peptid in vsak peptid ima enako porazdelitev v knjižnici, kar je prednost takšne knjižnice. Ena glavnih

pomanjkljivosti je, da je vsak peptid z nosilcem povezan preko vmesnika, ki lahko predstavlja sterično oviro pri vezavi med tarčo in peptidom. Pri metodi aminokislinskih mešanic je knjižnica sestavljena iz peptidov z randomiziranimi in definiranimi AK v zaporedju. Definirane zasedejo točno določen položaj v zaporedju, medtem ko so randomizirane AK v knjižnici enakromerno porazdeljene. Aminokislinsko zaporedje lahko določimo s postopno selekcijo, pri čemer določimo eno AK v vsakem koraku ali s hkratno analizo vseh variabilnih položajev, pri kateri se aminokislinsko zaporedje rekonstruira na koncu postopka [40, 41].

5. Biološke peptidne knjižnice pripravljamo s pomočjo raznih bioloških ekspresijskih sistemov, kot so bakteriofagi, bakterije, ribosomi, evkariontske celice... V te ekspresijske sisteme z vektorjem vnesemo gen za površinski protein in tako dobimo zbirko gostiteljskih mikroorganizmov, ki na svoji površini izražajo naključen peptid ali več kopij istega peptida. Najbolj uporabljana biološka knjižnica je bakteriofagna knjižnica, ki smo jo v okviru magistrske naloge tudi uporabili [41].

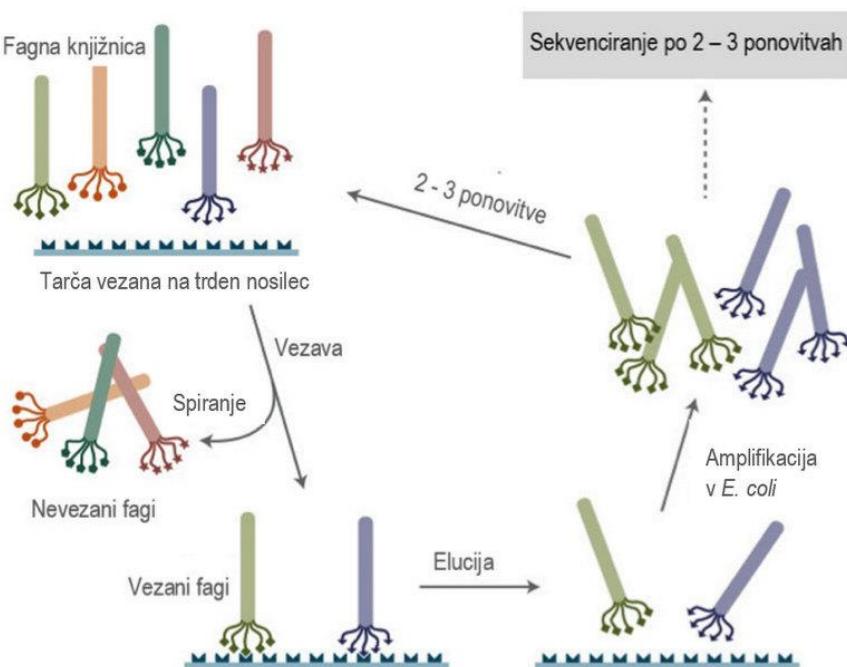
1.5 Metoda bakteriofagnega prikaza

Začetki metode bakteriofagnega prikaza segajo v leto 1985, ko je George P. Smith prvič uspešno izrazil peptidne fragmente na površju fagnega virona in pokazal, da je takšne bakteriofage mogoče uporabiti za afinitetno selekcijo peptidov, ki se vežejo na vezavna mesta protiteles [42]. Dandanes je ta metoda ena najbolj uporabljenih selekcijskih tehnik iskanja ligandov za najrazličnejše tarče. Metoda bakteriofagnega prikaza največkrat temelji na nitastem bakteriofagu M13, ki dovoljuje vstavljanje daljšega zapisa tuje DNA v genom preko dveh fagnih genov, pIII in pVIII. Bakteriofag M13 vsebuje ciklično enoverižno DNA, ki jo obdaja proteinska kapsida. Ta je sestavljena iz večjih in manjših površinskih proteinov, med katere spadata tudi pIII in pVIII. S specifično vezavo peptida pIII na F-pilus bakterije nitasti bakteriofagi M13 inficirajo bakterijo *E. coli* [43].

Naključne peptidne knjižnice ustvarijo z vstavljanjem kratkih oligonukleotidnih insertov s popolnoma randomizirano sekvenco. S tem pridobijo velike bakteriofagne knjižnice, ki vsebujejo $10^8 - 10^{10}$ fagov z unikatnim nukleotidnim zapisom. Posamezni bakteriofag izrazi svoj nov dedni zapis kot peptid, ki je zlit s površinskim proteinom [43]. Pri našem raziskovanju smo uporabili komercialno dostopne bakteriofagne knjižnice proizvajalca New England Biolabs, ki ponuja knjižnice naključnih linearnih heptapeptidov (Ph.D.-7TM), linearnih dodekapeptidov (Ph.D.-12TM) in cikličnih heptapeptidov (Ph.D.-C7CTM).

Knjižnice peptide izrazijo na N-končnem delu vsakega od petih plaščnih proteinov pIII bakteriofaga M13, kar pomeni, da so kopije peptidov na vsakem fagu pentavalentne. Peptide Ph.D.-C7C™ obdaja par cisteinskih ostankov, ki se po oksidaciji povežeta z disulfidno vezjo in tako ustvarita niz peptidov povezanih v zanko [44].

Za uspešno afinitetno selekcijo tarčne molekule, v našem primeru so to bila protitelesa, tarčo immobiliziramo na trdno podlago. Uporabimo lahko mikrotitrsko ploščico ali paramagnetne kroglice. Nato inkubiramo z izbrano knjižnico peptidov. Najprej s pufrom speremo fage, ki se niso vezali na tarčo. Vezane fage lahko eluiramo specifično s kompetitivnim ligandom oziroma antigenom, ali nespecifično s spremembou pH ali ionske moči elucijskega pufra. Eluirane fage pomnožimo v ustreznom bakterijskem sevu in po izolaciji pomnoženih bakteriofagov dobimo obogateno sekundarno knjižnico, ki jo nato uporabimo pri naslednjih stopnjah selekcije. Po dveh do treh ponovitvah selekcije obogatene bakteriofagne klone naključno izberemo, ovrednotimo njihovo vezavo na tarčo in jim določimo nukleotidno zaporedje (Slika 2) [44, 45].



Slika 2: Potek afinitetne selekcije z metodo bakteriofagnega prikaza. Povzeto po [44].

2 NAMEN

Bolniku po diagnozi APS upade kakovost življenja, ne le zaradi nevarnosti ponovitve tromboz na različnih segmentih obtočil ali nosečniških zapletov, temveč tudi zaradi profilaktičnega zdravljenja z antiagregacijskimi in antikoagulacijskimi sredstvi. Protitelesa aPT spadajo v heterogeno skupino protiteles, ki so značilna za to avtoimunske obolenje. Kljub temu, da jih po trenutno veljavnih klasifikacijskih merilih ne uvrščamo med serološke označevalce bolezni, jim raziskovalci v zadnjem času pripisujejo vedno večjo vlogo tako pri diagnosticiranju kot tudi pri patogenezi bolezni.

V okviru magistrske naloge želimo doseči naslednje cilje:

1. Izdelati afinitetno kolono z vezanim protrombinom na agarozi aktivirani s cianobromidom (CNBr).
2. Izolirati aPT iz serumata bolnika z APS in prebolelo vensko trombozo z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom.
3. S pomočjo treh različnih bakteriofagnih knjižnic poiskati mimetike epitopov protrombina za izolirana protitelesa, ki bodo pri tej metodi služila kot tarča.
4. Ovrednotiti izbrane peptide in najboljšim s sekvenciranjem določiti aminokislinska zaporedja ter ta prilegati na primarno in terciarno strukturo protrombina.

Hipoteze:

1. Izolirali bomo protitelesa aPT ustrezne čistosti in imunske specifičnosti.
2. Iz bakteriofagnih knjižnic bomo izolirali specifične peptide, ki se bodo vezali na tarčna protitelesa.
3. Lokalizirali bomo mesto vezave med antigenom in protitelesom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

- Agaroza, aktivirana s CNBr, Sigma, Taufkirchen, Nemčija
- Bakteriofagne knjižnice: Ph.D.-12TM, Ph.D.-7TM, Ph.D.-C7CTM, New England Biolabs, Massachusetts, ZDA
- Dinatrijev 4-nitrofenil fosfat heksahidrat (5mg tablete), C₆H₄NNa₂O₆P, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Dinatrijev hidrogen fosfat, Na₂HPO₄
- Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, Na₂HPO₄ x 2H₂O
- *E. coli* K12 ER2738, New England BioLabs, Massachusetts, ZDA
- Etanol absolutni, 96 %
- Fosfatidilserin (2g/L), Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Glicerol, C₃H₈O₃
- Glicin, C₂H₂NO₂
- Gojišče LB (Lennox L Both Base), Invitrogen, Carlsbad, ZDA
- Gojišče LB-agar, Invitrogen, Carlsbad, ZDA
- Goveji serumski albumin brez maščobnih kislin, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Humani protrombin, Enzyme Research Laboratories, Združeno Kraljestvo
- IgG interni standard za aPS/PT ELISA, Laboratorij za imunologijo revmatizma, UKC Ljubljana, Slovenija
- IgG negativna kontrola za aPS/PT ELISA, Laboratorij za imunologijo revmatizma, UKC Ljubljana, Slovenija
- IgG pozitivna kontrola za aPS/PT ELISA, Laboratorij za imunologijo revmatizma, UKC Ljubljana, Slovenija
- IPTG, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranoid, Promega, Madison, ZDA
- Kalcijev diklorid, CaCl₂
- Kalijev dihidrogen fosfat, KH₂PO₄, E. Merck, Nemčija
- Kalijev klorid, KCl, E. Merck, Nemčija
- Kloroform, analitske čistote, Kemika, Zagreb, Hrvatska

- Klorovodikova kislina, koncentrirana, HCl, Kemika, Hrvatska
- Kozja protitelesa usmerjena proti človeškim Fc fragmentom (5 µg/mL), Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Metanol, CH₃OH, Sigma-Aldrich, ZDA
- Natrijev acetat, CH₃COONa, E. Merck, Nemčija
- Natrijev azid, NaN₃, ekstra čist, E. Merck, Nemčija
- Natrijev hidrogen karbonat, NaHCO₃
- Natrijev hidroksid, NaOH, Kemika, Hrvatska
- Natrijev jodid, NaI
- Natrijev klorid, NaCl, Kemika, Hrvatska
- Ocetna kislina 99,5 %, CH₃COOH, Kemika, Hrvatska
- Paramagnetni delci Dynabeads Protein A, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, ZDA
- Paramagnetni delci Dynabeads Protein G, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, ZDA
- PEG-8000, polietilenglikol 8000, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Perklorna kislina, HClO₄
- Sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG konjugirana z alkalno fosfatazo, Accurate Chemical & Scientific Corporation (ACSC), Westbury, ZDA
- Sekundarna protitelesa: Anti-M13-mAb-HRP, monoklonsko protitelo proti bakteriofagu M13 konjugirano s hrenovo peroksidazo, GE healthcare, Little Chalfont, Združeno kraljestvo
- Tetraciklin (liofilizat), Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Tris, 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol, C₄H₁₁NO₃, Bio-Rad, ZDA
- Tween 20, polioksietilen sorbitan monolavrat, C₅₈H₁₁₄O₂₆, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- X-gal, 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β-D-galaktozil, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje -96 gll Sequencing Primer (20-mer), New England BioLabs, Massachusetts, ZDA
- Žveplova kislina, H₂SO₄

3.1.2 Instrumenti

- Analitska tehnica Mettler Toledo, PM2500, Mettler Toledo AG Greinfesce, Švica
- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka, LFVP 12, Iskra PIO, Slovenija
- Avtoklav Kambič, Kambič Laboratorijska oprema, Slovenija
- Avtomatski spiralnik mikrotitrskih plošč ELx405, BioTek, Vermont, ZDA
- Centrifuga 5415 R, Eppendorf, Nemčija
- Centrifuga 5804, Eppendorf, Nemčija
- Centrifuga Mini Spin plus, Eppendorf, Nemčija
- Centrifugirke (15 in 50 mL), TPP, Švica
- Črpalka za raztopine, Bio-Rad, Kalifornija, ZDA
- Droben laboratorijski pribor (steklovina, injekcijske brizge, igle, epruvete, stojala za epruvete, mikrocentrifugirke (1,5 in 2,0 mL), stojala za mikrocentrifugirke,...)
- Grelnik Končar, Končar, Hrvaška
- Indikatorski pH lističi, Merck, Nemčija
- Kolona za afinitetno kromatografijo: 1,5 cm x 15 cm, Bio-Rad, Kalifornija, ZDA
- MAbTrapTM Protein G analizni komplet, 1 mL kolona, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Švedska
- Magnetna mešala, Tehnica, Slovenija
- Magnetni mešalnik, Rotamix 550 MMH, Tehnica, Slovenija
- Membranski filtri za enkratno uporabo 0,20 µm in 0,45 µm, Millipore Corporation, Massachusetts, ZDA
- Mikrotitrskie plošče F8 Maxisorp, Nunc-immuno module Thermo specific, Danska
- pH meter Mettler Toledo Sevedn Easy, Mettler Toledo, Ohio, ZDA
- pH meter, Metrohm, Švica
- Pipete, Eppendorf, Nemčija
- Pipetni nastavki (z in brez filtrov), Eppendorf, Nemčija
- Polistirenske mikrotitrskie plošče Costar Medium Biding, 96 well EIA/RIA plate, Corning inc., New York, ZDA
- Razsoljevalna kolona, PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska
- Stresalnik, MS3 digital, IKA Works, North Carolina, ZDA
- Tehnica Exacta 610 EB, Tehnica, Slovenija

- Ultrafiltracijska celica s polietersulfonsko membrano: Amnicon Ultra 4-30K, Millipore Corporation, Massachusetts, ZDA
- UV-spektrofotometer, Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Massachusetts, ZDA
- UV-spektrofotometerični čitalec za mikrotitrsko ploščo Tecan Safire, Tecan, Švica
- UV-spektrofotometerični čitalec za mikrotitrsko ploščo Tecan Sunrise, Tecan, Švica
- Vibracijski mešalnik, Assistant, Nemčija
- Vibracijski stresalnik, Vibromix 104 EV, Tehnica, Slovenija
- Zbiralec, Pharmacia RediFrac, Pharmacia LKB, Švedska

3.2 Pufri in raztopine

3.2.1 Pufri za izolacijo IgG z analiznim kompletom MAbTrapTM Protein G

- Vezavni pufer: 10× koncentrirani 0,2 M natrijev fosfat, pH 7,0
- Elucijski pufer: 10× koncentrirani 1 M glicin-HCl, pH 2,7
- Nevtralizacijski pufer: 1 M Tris-HCl, pH 9
- Raztopina za shranjevanje: 20 % etanol

Vezavni in elucijski pufer smo pred nanosom na kolono 10× redčili z destilirano vodo.

3.2.2 Pufer za razsoljevanje s kolono PD-10 GE Healthcare

- Pufrana fiziološka raztopina: TBS, pH 7,4

	c (mM)	m (g)
NaCl	136	7,948
KCl	2,7	0,201
Tris	25	3,028
destilirana voda		do 1 L

Po potrebi smo pH pufra uravnavali z 2 M HCl ali 2 M NaOH.

3.2.3 Pufri za pripravo kolone z vezanim protrombinom

- Pufer za nabrekanje agaroze: 1 mM HCl

	c (mM)	V
36,6 % HCl	1,0	85 µL
destilirana voda		do 1 L

V merilni valj smo odmerili 800 mL destilirane vode, v digestoriju dodali 85 µL koncentrirane HCl ter dopolnili z destilirano vodo do 1 L. Nato smo sterilno filtrirali.

- Vezavni pufer: 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3

	c (mM)	m (g)
NaHCO₃	100	16,802
NaCl	500	58,440
destilirana voda		do 2 L

Pufru smo uravnali pH z 2 M HCl ali 2 M NaOH. Nato smo sterilno filtrirali.

- Blokirni pufer: 0,1 M Tris-HCl, 0,5M NaCl, pH 8,0

	c (mM)	m (g)
Tris	100	6,057
NaCl	500	2,922
destilirana voda		do 100 mL

Pufru smo umerili pH z 2 M HCl. Nato smo sterilno filtrirali.

- Acetatni pufer: 0,1 M acetat, 0,5 M HCl, pH 4
 - * Raztopina A: 0,36 M ocetna kislina

	c (mM)	V
CH₃COOH	360	5,108 mL
destilirana voda		do 250 mL

* Raztopina B: 0,1 M brezvodni natrijev acetat

	c (mM)	m (g)
CH₃COONa	100	4,102
destilirana voda		do 500 mL

K 200 mL raztopine A smo dodali 300 mL raztopine B in umerili pH na 4,0. Končen volumen acetatnega pufra smo umerili z merilnim valjem in nato dodali 500 mM NaCl (29,22 g NaCl/L).

- Pufer za shranjevanje kolone: 0,02 % NaN₃

3.2.4 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom

- Spiralni pufer: pufrana fiziološka raztopina (TBS), pH 7,4 z dodatkom 0,1 % Tween 20

	c (mM)	m (g)
NaCl	136	7,948
KCl	2,7	0,201
Tris	25	3,028
destilirana voda		do 1 L
Tween 20	0,1 %	1 g = 1 mL

Natehtali smo NaCl, KCl in Tris ter dopolnili z destilirano vodo do 800 mL. Umerili smo pH na 7,4 in dopolnili z destilirano vodo do 1000 mL. Nato smo sterilno filtrirali in dodali Tween 20.

- Elucijski pufer za nizko avidna aPT: TBS 0,5 M NaCl, pH 7,4 z dodatkom Tween 20

	c (mM)	m (g)
NaCl	500	29,220
KCl	2,7	0,201
Tris	25	3,028
destilirana voda		do 1 L
Tween 20	0,1 %	1 g = 1 mL

Natehtamo NaCl, KCl in Tris ter dopolnimo z destilirano vodo do 800 mL. Umerimo pH na 7,4 in dopolnili z destilirano vodo do 1000 mL. Nato smo sterilno filtrirali in dodali Tween 20.

- Elucijski pufer za visoko avidna aPT: 0,1 M glicin, 4 M NaCl, pH 2,5 z dodatkom 0,1 % Tween 20

	c (mM)	m (g)
glicin	100	7,5
destilirana voda		do 1 L
NaCl	4000	233,76
Tween 20	0,1 %	1 g = 1 mL

Natehtali smo glicin in dopolnili z destilirano vodo do 1 L. Umerili smo pH na 2,5. Končnemu volumnu smo dodali NaCl, nato smo sterilno filtrirali in na koncu dodali reagent.

- 1 M Tris baza

	c (mM)	m (g)
Tris	1000	12,114
destilirana voda		do 100 mL

3.2.5 Pufri za ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT ELISA)

- Metanol/kloroform (4:1)
- Pufer za blokado, pripravo vzorcev in kontrol: 1 % goveji serumski albumin (BSA) v TBS-CaCl₂, pH 7,4

	c (mM)	m (g)
NaCl	136	7,95
KCl	2,7	0,201
Tris	25	3,028
CaCl₂	5	0,555
destilirana voda		do 1 L
BSA	1 %	10

Natehtali smo NaCl, KCl, Tris in CaCl₂ ter dopolnili z destilirano vodo do 1 L. Umerili smo pH na 7,4. Tako pripravljeni raztopini smo dodali 1 % BSA in dobro premešali, da se je BSA raztopil.

- Spiralni pufer: TBS-CaCl₂ z dodatkom 0,05 % Tween 20, pH 7,4

	c (mM)	m (g)
NaCl	136	7,95
KCl	2,7	0,201
Tris	25	3,028
CaCl₂	5	0,555
destilirana voda		do 1 L
Tween 20	0,05 %	0,5 mL

Natehtali smo NaCl, KCl, Tris in CaCl₂ ter dopolnili z destilirano vodo do 1 L. Umerili smo pH na 7,4 ter tako pripravljeni raztopini dodali Tween 20.

3.2.6 Pufri za selekcijo iz bakteriofagnih peptidnih knjižnic

- Pufrana fiziološka raztopina – PBS, pH 7,4

	c (mM)	m (g)
NaCl	136	3,18
KCl	2,7	0,08
Na₂HPO₄ x 2H₂O	10,0	0,722
KH₂PO₄	1,8	0,096
destilirana voda		do 400 mL

Natehtali smo NaCl, KCl, Na₂HPO₄ x 2H₂O in KH₂PO₄ ter dopolnili z destilirano vodo do 400 mL. Umerili smo pH na 7,4 in avtoklavirali. Shranjevali smo pri sobni temperaturi.

- Spiralni pufer 1: PBS pH 7,4 z dodatkom 0,05 % Tween 20

	c (mM)	V (µL)
Tween 20	0,05 %	20
PBS	do 40 mL	

PBS pufru smo v centrifugirki dodali Tween 20. Nato smo raztopino prefiltrirali preko mikrobiološkega filtra (0,22 µm) v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF).

- Spiralni pufer 2: PBS pH 7,4 z dodatkom 0,1 % Tween 20

	c (mM)	V (µL)
Tween 20	0,1 %	40
PBS	do 40 mL	

PBS pufru smo v centrifugirki dodali Tween 20. Nato smo raztopino prefiltrirali preko mikrobiološkega filtra (0,22 µm) v komori LAF.

- Elucijski pufer 1: 4 M NaCl, 0,1 M glicin, pH 2,5

	c (mM)	m (g)
glicin	100	0,75
NaCl	4000	23,376
destilirana voda	do 100 mL	

Natehtali smo glicin in NaCl ter dopolnili z destilirano vodo do 100 mL. Umerili smo pH na 2,5 in avtoklavirali. Shranjevali smo pri sobni temperaturi.

- Pufer za nevtralizacijo elucijskega pufra: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8

	c (mM)	m (g)
Tris	100	1,211
NaCl	500	2,922
destilirana voda	do 100 mL	

Natehtali smo Tris in NaCl ter dopolnili z destilirano vodo do 100 mL. Umerili smo pH na 8,0 in avtoklavirali. Shranjevali smo pri sobni temperaturi.

- Tekoče gojišče LB:

	m (g)
LB both	8
destilirana voda	do 400 mL

Natehtali smo suho osnovo za gojišče LB in dopolnili z destilirano vodo do 400 mL. Nato smo avtoklavirali in shranjevali pri sobni temperaturi.

- Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal:

	m (g)
LB - agar	14
destilirana voda	do 400 mL

Natehtali smo osnovo za gojišče LB in dopolnili z destilirano vodo do 400 mL. Nato smo avtoklavirali in LB gojišče čim prej vlili v petrijevke v komori LAF ter počakali, da se je strdilo. Tako pripravljeno trdno LB gojišče smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C. Pred uporabo smo gojišče v inkubatorju segreli na 37 °C in ga nato premazali z raztopino IPTG/X-gal/LB medija s končno koncentracijo 2,4 mM IPTG in 4,5 mg/mL X-Gal.

- Agarozni top:

	c (mM)	m (mg)
agarozna		280
MgCl₂	1000	19
LB medij	do 40 mL	

Natehtali smo agarozo in MgCl₂ ter dopolnili z LB medijem do 40 mL. Nato smo avtoklavirali in shranjevali pri sobni temperaturi.

- PEG/NaCl:

	c (mM)	m (g)
PEG-8000	20 %	8
NaCl	2500	5,85
destilirana voda	do 40 mL	

Natehtali smo PEG-8000 in NaCl ter dopolnili s 40 mL destilirane vode. Nato smo avtoklavirali in shranjevali pri sobni temperaturi.

- Založna raztopina tetraciklina s koncentracijo 20 mg/mL v etanolno vodni raztopini (razmerje 1:1)

3.2.7 Pufri za določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo s testom ELISA

- PBS
- 5 % mleko v PBS:

	m (g)
mleko v prahu	10
PBS	do 200 mL

Stehtali smo mleko v prahu in ga raztopili v 200 mL pufra PBS.

- PBS z dodatkom 0,1 % Tween 20

- 1 % BSA v PBS

3.2.8 Pufri za izolacijo fagne DNA

- PEG/NaCl
- jodidni pufer:

	c (mM)	m (g)
Tris	10	48,5
32 % HCl	10	39,3 µL
EDTA (pH 8,0)	50	80 µL
NaI	4000	23,98
destilirana voda		do 40 mL

pH smo umerili na 8,0 in sterilno filtrirali.

- 95 % etanol
- 70 % etanol

3.4 Metode

3.4.1 Izolacija IgG protiteles z analiznim kompletom MAbTrapTM Protein G

Izolacijo IgG protiteles smo izvajali po postopku proizvajalca z uporabo 1 mL kolone z vezanim proteinom G [46]. Vezavni in elucijski pufer iz analiznega kompleta smo desetkrat redčili in ju filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. V mikrocentrifugirke, v katere smo zbirali frakcije, smo predhodno odpipetirali potreben volumen nevtralizacijskega pufra, da smo preprečili modifikacijo protiteles IgG v kislem pH. Serum smo redčili v razmerju 1:1 z vezavnim pufrom. Postopek izolacije protiteles IgG se je izvajal po naslednjih korakih:

1. Kolono smo vpeli v stojalo, povezali z brizgo in jo sprali z 10 mL destilirane vode ob pretoku 1 kapljica/s.
2. Kolono smo sprali z 10 mL vezavnega pufra, neposredno prefiltriranega preko filtra z velikostjo por 0,45 µm. Zadnjemu mL smo izmerili absorbanco, da smo se prepričali ali smo kolono dobro sprali.
3. Z brizgo smo preko filtra na kolono nanesli 2 mL našega vzorca in takoj začeli zbirati frakcije. Vsem zbranim frakcijam smo izmerili absorbanco z aparatom NanoDrop pri 280 nm.
4. Kolono smo sprali z 10-15 mL vezavnega pufra in s tem odstranili nevezane proteine. To smo dosegli takrat, ko je absorbanca frakcij dosegla vrednost absorbance vezavnega pufra.
5. Vezana IgG protitelesa smo spirali s 5 mL elucijskega pufra in takoj začeli zbirati frakcije po 1 mL v naprej pripravljene mikrocentrifugirke z nevtralizacijskim pufrom. S pH lističi smo preverili pH frakcij. Če je izmerjen pH preveč odstopal od pH 7, smo po potrebi dodali nevtralizacijski ali elucijski pufer. Nato smo izmerili absorbanco zbranih frakcij z aparatom NanoDrop pri 280 nm.
6. Kolono smo sprali z 10 mL vezavnega pufra, če je sledila takojšnja izolacija IgG iz novega vzorca. Kadar smo kolono shranjevali dlje časa, smo sprali še z 20 % etanolom. Kolono MAbTrapTM in pufre smo hranili v hladilniku (4-8 °C).

3.4.2 Razsoljevanje s kolono PD-10 (GE Healthcare)

Za razsolitev in menjavo pufra smo uporabili razsoljevalno kolono PD-10 (GE Healthcare), napolnjeno s Sephadex G-25. Pripravili smo pufer TBS, v katerem smo

shranjevali pridobljen vzorec in ustrezeno število razsoljevalnih kolon. Postopek razsoljevanja se je izvajal po naslednjih korakih:

1. Kolono smo spirali s 25 mL TBS, ki smo ga predhodno sterilno prefiltrirali.
2. Nanesli smo vzorec, maksimalno 2,5 mL na kolono in takoj lovili frakcije po 1 mL.
3. Kolono smo sprali s 15 mL TBS.
4. Vsem frakcijam smo izmerili koncentracijo IgG na aparatu NanoDrop s pomočjo absorbance pri 280 nm.
5. Kolono smo regenerirali z 20 mL destilirane vode. Če smo jo uporabili naslednji dan, smo spirali z 20 mL TBS.
6. Za konzervacijo kolone smo spirali z 20 mL 20 % etanola. Do naslednje uporabe smo kolono hranili v hladilniku (4-8 °C).

3.4.3 Priprava kolone z vezanim protrombinom

Protrombin smo na aktivirano agarozo vezali po postopku proizvajalca [47]. Pripravili smo raztopino protrombina, in sicer tako da smo uporabili 3 stekleničke po 9,0 mg liofiliziranega proteina in vse skupaj raztopili v 3,0 mL vezavnega pufra. Priprava kolone je trajala dva dni.

Prvi dan:

1. 5 g agaroze aktivirane s CNBr (za 17,5 mL gela) smo dodali 62,5 mL 1 mM HCl in 30 min ob rahlem mešanju nabrekali pri sobni temperaturi.
2. Nastali gel smo prenesli v avtoklavirano Bio-Radovo kolono (1,5 cm x 15 cm) vpeto v stojalo.
3. Spodnji del kolone smo priklopili na črpalko in najprej sprali s 500 mL 1 mM HCl (pretok 200 mL/h), nato pa še s 25 mL vezavnega pufra.
4. Raztopino protrombina smo prelili na kolono, kolono zaprli, rahlo pretresli in jo čez noč diagonalno vrteli na vrtilniku pri 4 °C.

Drugi dan:

1. Kolono smo vpeli v stojalo in s pomočjo prostega pada odstranili raztopino nad gelom, nato smo kolono sprali s 70 mL vezavnega pufra.
2. Za blokado preostalih aktivnih mest smo na kolono dodali 20 mL 0,1 M Tris-HCl, pH 8, jo pretresli ter gel z vezanim proteinom prenesli v 50 mL epruveto. Navpično smo jo vrteli 2 uri na vrtilniku pri sobni temperaturi.

3. Raztopino gela smo prelili v kolono. Epruveto smo sprali z 0,1 M Tris-HCl, pH 8, in spodaj odsesavali s prostim padom.
4. Kolono vpeto v stojalo smo prenesli v hladno sobo (4 °C) in jo vpeli v rotacijsko črpalko. S hitrostjo 150 mL/h smo odsesavali raztopino 0,1 M Tris-HCl, pH 8 iz kolone.
5. Kolono smo izmenično spirali z vezavnim, acetatnim in blokirnim pufrom, kot kaže Tabela 2. Spirali smo z dvakratnim volumnom kolone (30 mL), s hitrostjo odsesavanja 80 mL/h.
6. Kolono smo sprali s 30 mL 0,02 % NaN₃ in jo zaprto ter vpeto v stojalo shranili v hladni sobi (4 °C).

Tabela 2: Spiranje kolone z vezanim protrombinom

	volumen (mL)	hitrost (mL/h)
Vezavni pufer, pH 8,3	30	80
Acetatni pufer, pH 4	30	80
Vezavni pufer, pH 8,3	30	80
Acetatni pufer, pH 4	30	80
Blokirni pufer, pH 8	30	80
Acetatni pufer, pH 4	30	80

3.4.4 Izolacija IgG protiteles proti protrombinu z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom

Izolacijo IgG aPT smo izvajali po postopku navedenem v [48] v hladni sobi (4 °C). Vse pufre in vzorce smo pred nanosom na kolono filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. Postopek je trajal dva dni.

Prvi dan:

1. Za črpanje raztopin smo pripravili črpalko, na kateri smo nastavili pretok 120 mL/h. Uporabili smo cevke s premerom 3,1 mm in jih najprej sprali s 5 mL spiralnega pufra (TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20, pH 7,4).

2. Nato smo črpalko povezali s kolono in jo sprali s 100 mL spiralnega pufra.
3. Na kolono smo nanesli filtriran vzorec IgG frakcije in ga pustili krožiti čez noč skozi kolono s pretokom 60 mL/h.

Drugi dan:

4. Takoj zjutraj smo ostanku po kroženju izmerili absorbanco na aparaturi NanoDrop pri 280 nm.
5. Kolono smo sprali s 120 mL spiralnega pufra, pretok 120 mL/h. Vmes smo merili absorbanco frakcijam spiranja pri 280 nm.
6. Črpalko smo povezali z zbiralcem frakcij, kolektorjem z oštevilčenimi epruvetami. Nastavili smo čas zbiranja tako, da je bila velikost frakcije 1,3 mL. Pretok smo znižali na 50 mL/h.
7. Nizko avidna protitelesa smo izpirali s 30 mL elucijskega pufra za nizko avidna protitelesa aPT (TBS 0,5 M NaCl, pH 7,4 z dodatkom Tween 20) in zbirali frakcije, ter jim izmerili absorbanco pri 280 nm.
8. Za tem smo visoko avidna protitelesa izpirali s 50 mL elucijskega pufra za visoko avidna protitelesa aPT (0,1 M glicin, 0,4 M NaCl, pH 2,5 z dodatkom 0,1 % Tween 20). Zbranim frakcijam smo izmerili pH z indikatorskimi lističi in pH po potrebi uravnali na vrednosti 6-8 z 1 M Tris bazo, nato smo jim izmerili absorbanco pri 280 nm.
9. Kolono smo nato regenerirali z izmenjevanjem acetatnega in blokirnega pufra kot kaže Tabela 3. Pretok smo povečali na 120 mL/h. Zbirali smo frakcije po 2 mL in jim izmerili absorbanco pri 280 nm.

Tabela 3: Regeneracija kolone z vezanim protrombinom

	volumen (mL)	hitrost (mL/h)
Blokirni pufer, pH 8	30	80
Acetatni pufer, pH 4	30	80
Blokirni pufer, pH 8	30	80
Acetatni pufer, pH 4	30	80
Blokirni pufer, pH 8	30	80
Acetatni pufer, pH 4	30	80

10. Kolono smo sprali s 100 mL spiralnega pufra.

11. Na koncu smo kolono sprali s 30 mL 0,02 % NaN_3 . Zaprli smo vse ventile, odklopili črpalko in jo shranili v hladni sobi (4°C).

3.4.5 Koncentriranje izoliranih IgG proti protrombinu s koncentrirno epruveto Amnicon Ultra 4-30K

Izolirana protitelesa IgG aPT smo koncentrirali in razsolili s pomočjo koncentrirne epruvete Amnicon Ultra 4-30K, ki ima membrano z velikostjo por 30 kDa in premerom 43 mm. To smo izbrali zato, ker imajo protitelesa navidezno molsko maso 150 kDa, in se nam tako zagotovo niso filtrirala skozi membrano, temveč so ostala v koncentrirani raztopini.

1. Pripravili smo dve Amnicon Ultra 4-30K koncentrirni epruveti in ju napolnili s 3,5 mL izolirane frakcije IgG aPT.
2. Centrifugirali smo s centrifugo Eppendorf (rotor: F-35-6-30) pri pogojih: 7197 rpm, 5 min. Koncentrirali smo do 500 μL .
3. 1. in 2. točko smo ponavljali tako dolgo, dokler nismo skoncentrirali celotne frakcije izoliranih aPT protiteles.
4. Nato smo koncentrirno epruveto dopolnili še s 3,5 mL pufra TBS.
5. Centrifugirali smo s centrifugo Eppendorf (rotor: F-35-6-30) pri pogojih: 7197 rpm, 5 min. Koncentrirali smo do volumna 500 μL .

6. Skoncentrirani in razsoljeni frakciji IgG aPT smo izmerili absorbanco pri 280 nm in jo zamrznili na -36 °C.

3.4.6 ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT ELISA)

Izolirana protitelesa IgG aPT smo merili s spektrofotometrom Tecan Sunrise po prilagojenem rutinskem postopku aPS/PT ELISA, ki ga uporabljajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma [24, 48].

1. Na polistirenske mikrotitrskne plošče (Cosatar medium binding EIA/RIA) smo nanesli 40 µL fosfatidilserina s koncentracijo 50 mg/L v raztopini kloroform:metanol (1:4). Nepokrite plošče smo inkubirali čez noč v hladilniku (4 °C), da je topilo izhlapelo.
2. Naslednji dan smo nanesli 150 µL 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4, v vsako vdolbinico. Inkubirali smo eno uro in plošče sprali s spiralnim pufrom (TBS-CaCl₂ z dodatkom 0,05 % Tween 20, pH 7,4) s pomočjo avtomatskega spiralnika ELx405.
3. Na mikrotitrsko ploščo smo nanesli 25 µL protrombina (20 mg/L v 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4). Tako nato smo v vzorčne vdolbinice, ne pa tudi v slepe, dodali še 25 µL IS in vzorcev redčenih 1:50 z 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4. Končna koncentracija protrombina na plošči je tako bila 10 mg/L, medtem ko so bili vzorci redčeni 1:100. Inkubirali smo eno uro. Plošče smo sprali s spiralnim pufrom s pomočjo avtomatskega spiralnika ELx405.
4. Nato smo nanesli 50 µL sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti IgG konjugirana z alkalno fosfatazo), redčenih 1:3000 z 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4. Inkubirali smo pol ure. Plošče smo sprali s spiralnim pufrom s pomočjo avtomatskega spiralnika ELx405.
5. Nanesli smo 100 µL substrata *para*-nitrofenil fosfata v DEA pufru s koncentracijo 1 g/L. Inkubirali smo 5 min.
6. Merili smo absorbcojo s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Sunrise pri 405 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorbencijam IS.

3.4.7 Kaotropna ELISA za določanje avidnosti protiteles proti protrombinu

Avidnost protiteles IgG aPT smo določili po kaotropni metodi, ki jo je opisal Božič s sodelavci [49] za določanje avidnosti protiteles usmerjenih proti β₂-glikoproteinu I in jo je

kasneje Žigon s sodelavci prilagodila za določanje avidnosti protiteles aPT [24]. Protrombin in izolirana protitelesa IgG aPT smo po tej metodi inkubirali ločeno.

1. Na polistirenske mikrotitrskie plošče (Cosatar high binding EIA/RIA) smo neposredno nanesli 50 µL protrombina (50 mg/L) raztopljenega v 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4 in inkubirali čez noč v hladilniku (4 °C).
2. Naslednji dan smo plošče sprali s spiralnim pufrom (TBS-CaCl₂ z dodatkom 0,05 % Tween 20, pH 7,4) s pomočjo avtomatskega spiralnika ELx405. Nato smo nanesli 150 µL 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4 na vsako vdolbinico. Inkubirali smo eno uro in plošče sprali s spiralnim pufrom s pomočjo avtomatskega spiralnika ELx405.
3. Nato smo nanesli po 100 µL IS in vzorcev redčenih 1:100 v 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4 z naraščajočo koncentracijo NaCl 136 mM, 250 mM, 500 mM, 2000 mM in 4000 mM. Inkubirali smo eno uro na sobni temperaturi in plošče sprali s spiralnim pufrom s pomočjo avtomatskega spiralnika ELx405.
4. Nato smo nanesli 50 µL sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti IgG konjugirana z alkalno fosfatazo), redčenih 1:3000 z 1 % BSA v TBS-CaCl₂, pH 7,4. Inkubirali smo pol ure. Plošče smo sprali s spiralnim pufrom s pomočjo avtomatskega spiralnika ELx405.
5. Nanesli smo 100 µL substrata *para*-nitrofenil fosfata v DEA pufru s koncentracijo 1 g/L. Inkubirali smo 5 min.
6. Izmerili smo absorpcijo s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Sunrise pri 405 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorpcijam IS.

3.4.8 Selekcija bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-12TM, Ph.D.-7TM, Ph.D.-C7CTM

Za selekcijo smo uporabili izolirana protitelesa IgG aPT bolnika z APS s prebolelo vensko trombozo in postopali po protokolu, zapisanem v [44]. Najprej smo izvedli selekcijo z bakteriofagno knjižnico naključnih peptidov dolgih 12 AK. Nato smo se po istem postopku lotili še selekcije s fagnima knjižnicama naključnih peptidov dolgih 7 AK in naključnih cikličnih peptidov dolgih 7 AK. Ves droben laboratorijski material smo predhodno sterilizirali z avtoklavom. Dela smo se lotili čim bolj aseptično, občasno smo si pomagali tudi s komoro LAF. Z vsako knjižnico smo izvedli tri stopnje selekcije. Izvedba ene stopnje selekcije je potekala tri dni.

Prvi dan:

1. 100 µL PBS 0,05 % Tween 20 smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in nato vanjo prenesli 15 µL paramagnetnih delcev. Izmenično smo uporabili delce z imobiliziranim proteinom G in proteinom A, s tem smo se izognili vezavi bakteriofagov na ozadje. Vsebino mikrocentrifugirke smo premešali na rotacijskem mešalu in s pomočjo magnetnega stojala odstranili supernatant. Še enkrat smo sprali paramagnetne delce s 100 µL PBS z 0,05 % Tween 20 in odpipetirali supernatant. Paramagnetne delce smo od supernatana ločili s pomočjo magnetnega stojala.
2. Paramagnetnim delcem smo dodali 8,5 µL izoliranih protiteles v 240 µL PBS z 0,05 % Tween 20. Rahlo smo premešali na rotacijskem mešalu in inkubirali 30 min na stresalniku s stresanjem 600 rpm na sobni temperaturi. Med inkubacijo smo dodatno premešali vsakih 10 min, da smo preprečili posedanje paramagnetnih delcev. Po inkubaciji smo nevezana protitelesa odpipetirali in shranili v hladilnik.
3. Nevezana protitelesa smo trikrat sprali s 500 µL PBS z 0,05 % Tween 20. Med spiranjem smo mikrocentrifugirko stresali 1 min na stresalniku s frekvenco 600 rpm pri sobni temperaturi. Med vsakim spiranjem smo odstranili supernatant.
4. Pred dodajanjem fagne knjižnice smo paramagnetne delce z vezanimi protitelesi razdelili na polovico v dve mikrocentrifugirki – za specifično in nespecifično elucijo. Pripravili smo knjižnico. V 490 µL PBS z 0,05 % Tween 20 smo dodali 10 µL knjižnice Ph. D. s količino 2×10^{11} pfu, in razdelili na dva enaka dela, torej 250 µL s 1×10^{11} pfu v vsako mikrocentrifugirko. Obe pripravljeni mikrocentrifugirki smo rahlo prevorteksirali in inkubirali 60 min na stresalniku s frekvenco 600 rpm pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo tudi ročno premešali vsakih 20 min, da se paramagnetni delci niso posedli.
5. Na protitelesa nevezane fage smo $10 \times$ sprali z 950 µL PBS z 0,1 % Tween 20. Med spiranjem smo mikrocentrifugirki stresali 1 min na stresalniku s frekvenco 600 rpm pri sobni temperaturi. Med vsakim spiranjem smo odstranili supernatant. Ob zadnjem spiranju smo supernatant prestavili v novo mikrocentrifugirko, da smo zagotovili popolno odsotnost nevezanih fagov.
6. Specifična elucija: Iz mikrocentrifugirke smo odstranili supernatant in dodali 22 µL protrombina (0,9 g/L) v 178 µL PBS z 0,05 % Tween 20. Inkubirali smo 45 min na stresalniku s frekvenco 600 rpm pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo si

pomagali z magnetnim stojalom in iz mikrocentrifugirke odpipetirali supernatant, v katerem so bili fagi, ki jih je prisotnost protrombina odstranila iz tarčnih protiteles. Eluat iz prve stopne selekcije smo označili 1 S NE (prvi nepomnoženi eluat specifične elucije). Eluatu smo odvzeli 5 µL za titracijo, preostanek smo dali takoj pomnoževat v erlenmajerico s pomnoženimi bakterijami z ustrezno optično gostoto (0,01-0,05). Glej točko 9.

7. Nespecifična elucija: Iz mikrocentrifugirke smo odstranili supernatant, dodali 200 µL elucijskega pufra 1 (pH 2,5) in premešali. Inkubirali smo 9 min na stresalniku s frekvenco 600 rpm pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo si pomagali z magnetnim stojalom in iz mikrocentrifugirke odpipetirali supernatant, v katerem so bili fagi, ter ga prenesli v novo mikrocentrifugirko z 200 µL nevtralizacijskega pufra. V mikrocentrifugirko za nespecifično elucijo smo nato dodali 200 µL nevtralizacijskega pufra (pH 8) in premešali. Inkubirali smo 9 min na stresalniku s frekvenco 600 rpm pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo si pomagali z magnetnim stojalom in iz mikrocentrifugirke odpipetirali supernatant, v katerem so fagi, ter ga prenesli v mikrocentrifugirko, v kateri je že bil supernatant iz prejšnjega koraka nespecifične elucije. Pridobljeni eluat iz prve stopnje smo poimenovali 1 N NE (prvi nepomnoženi eluat nespecifične elucije). Supernatantu smo odvzeli 5 µL za titracijo, preostanek smo takoj začeli pomnoževati v erlenmajerici s pomnoženimi bakterijami z ustrezno optično gostoto OD₆₀₀ (0,01-0,05). Glej točko 9.
8. Število bakteriofagov v pridobljenih eluatih smo določili s pomočjo mikrobiološke titracije. Za titracijo nepomnoženih eluatov smo pripravili redčitveno vrsto 10¹, 10², 10³ in 10⁴. V 45 µL medija LB smo dodali odvzetih 5 µL eluata, premešali in 10 µL prenesli v novo mikrocentrifugirko z 90 µL medija LB itd., da smo dobili redčitveno vrsto. 10 µL iz vsake od redčitev 10², 10³ in 10⁴ smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, kamor smo predhodno napipetirali 200 µL pomnoženih bakterij z ustreznim OD₆₀₀ (0,5). Celotno vsebino posamezne mikrocentrifugirke smo prenesli v 3 mL staljene top agaroze, termostatirane na 50 °C, vsebino smo premešali in takoj prelili na petrijevke z diferencialnim agarnim gojiščem LB/IPTG/X-gal. Petrijevke smo inkubirali čez noč (18 h) pri 37 °C.
9. Za pomnoževanje specifičnega in nespecifičnega eluata smo v dve 250 mL mikrocentrifugirki odmerili 20 mL medija LB, 20 µL tetraciklina s koncentracijo

20 mg/mL in eno kolonijo *E. coli*, iz vnaprej pripravljenega trdnega gojišča teh bakterij. Inkubirali smo v inkubatorju na 37 °C in s stresanjem 250 rpm do zamotnitve medija (približno 3 h) oziroma do ustreznega OD₆₀₀ (0,01-0,05). Nato smo v eno erlenmajerico dodali 1 S NE, v drugo 1 N NE. Nato smo pri istih pogojih inkubirali 4,5 h oziroma do ustreznega OD₆₀₀ (0,01-0,05).

10. Suspenzijo pomnoženih inficiranih bakterij z bakteriofagi smo prenesli v 50 mL centrifugirko in centrifugirali 10 min pri 4 °C in 10000 rpm. Supernatant smo prelili v nove centrifugirke in ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Nato smo supernatant ponovno prelili v nove centrifugirke s 4 mL PEG/NaCl, dobro premešali na rotacijskem mešalu in preko noči pustili v hladilniku pri 4 °C.

Drugi dan:

11. Naslednji dan smo suspenzijo centrifugirali 15 min pri 4 °C in 10000 rpm. Supernatant smo odlili, oborino resuspendirali v 1 mL PBS in prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Centrifugirali smo 5 min pri 4 °C in 13200 rpm. S pipeto smo prenesli supernatant v novo mikrocentrifugirko z 200 µL PEG/NaCl in inkubirali 60 min na ledu. Po inkubaciji smo suspenzijo centrifugirali 10 min pri 4 °C in 13200 rpm. Supernatant smo zavrgli, pelet fagov resuspendirali z 200 µL PBS in centrifugirali 1 min ter prenesli v novo mikrocentrifugirko. Tako dobljeni suspenziji pomnoženih bakteriofagov smo poimenovali 1 S PE (prvi pomnoženi eluat specifične elucije) in 1 N PE (prvi nepomnoženi eluat nespecifične elucije). Eluatoma smo odvzeli 5 µL za titracijo, preostanek pa smo shranili v hladilniku na 4 °C in obogateno knjižnico uporabili v naslednji stopnji selekcije.

12. Število bakteriofagov, pridobljenih po pomnoževanju, smo določili s pomočjo mikrobiološke titracije. Za titracijo pomnoženega izpirka smo pripravili redčitveno vrsto 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ in 10¹⁰. V 45 µL LB medija smo dodali odvzetih 5 µL 1 S PE ali 1 N PE, prevoteksirali in 10 µL prenesli v novo mikrocentrifugirko z 90 µL LB medija itd., da dobimo redčitveno vrsto. 10 µL iz vsake od redčitev 10⁸, 10⁹ in 10¹⁰ smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, kamor smo predhodno napipetirali 200 µL pomnoženih bakterij z ustreznim OD₆₀₀ (0,5). Celotno vsebino posamezne mikrocentrifugirke smo prenesli v 3 mL staljene top agaroze, termostatirane na 50 °C, vsebino premešali in takoj prelili na petrijevke z

diferencialnim agarnim gojiščem LB/IPTG/X-gal. Petrijevke smo inkubirali čez noč (18 h) pri 37 °C.

Tretji dan:

1. Na petrijevkah, ki smo jih inkubirali, smo prešteli število modro obarvanih plakov in izračunali koncentracijo inficiranih bakterij z bakteriofagi. Iz koncentracij vseh treh redčitev smo izračunali srednjo vrednost.

Drugo in tretjo stopnjo selekcije smo izvedli enako kot prvo, razlika je bila le v tem, da nismo dodajali izvorne fagne knjižnice, ampak obogateno knjižnico, ki smo jo pridobili in pomnožili v predhodni stopnji selekcije. Količino dodane suspenzije smo ocenili na osnovi titra pomnoženega eluata tako, da je bila zagotovljena količina velikostnega razreda 10^{11} pfu. Tretjo stopnjo selekcije smo ustavili pri eluciji bakteriofagov in njihovi titraciji, tako knjižnice bakteriofagov nismo več pomoževali s pomočjo bakterij *E. coli*.

3.4.9 Pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov

Klone za pomnoževanje smo pobrali iz petrijevk z nepomnoženim specifičnim ali nespecifičnim eluatom tretje stopnje selekcije (3 S NE in 3 N NE), na kateri je bilo manj kot 100 plakov. Izbrali smo jih naključno. Pazili pa smo, da smo pobrali modre plake, ki so bili evidentno ločeni od ostalih.

1. Dan pred pomnoževanjem smo pripravili prekonočno kulturo *E. coli*. V erlenmajerico smo dodali 20 mL medija LB, 20 µL tetraciklina s koncentracijo 20 mg/mL in eno kolonijo *E. coli*. Inkubirali smo čez noč v inkubatorju na 37 °C in 250 rpm.
2. Prekonočno kulturo *E. coli* smo $100\times$ redčili z medijem LB, ki smo mu prej dodali tetraciklin v razmerju 1:1000. Tako pripravljen medij smo v komori LAF alikvotirali po 2 mL v sterilne centrifugirke. Nato smo prav tako v komori LAF s sterilnimi pipetnimi nastavki prenesli po eno naključno izbrano modro kolonijo v vsako centrifugirko. Tako pripravljene klone smo pomnoževali v inkubatorju 4,5 h pri 37 °C in 600 rpm.
3. Po inkubaciji smo vsebino centrifugirk prelili v 2 mL mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 min pri 4 °C in 13200 rpm. Supernatant smo prelili v nove mikrocentrifugirke in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Na koncu smo

supernatant še enkrat prelili v nove mikrocentrifugirke in jih shranili v hladilniku pri 4 °C.

4. Bakteriofage smo iz medija LB oborili in raztopili v PBS. V 1 mL supernatanta smo dodali 200 µL PEG/NaCl, močno premešali na rotacijskem mešalu in pustili v hladilniku čez noč na 4 °C.
5. Naslednje jutro smo suspenzijo centrifugirali 10 min pri 4 °C in 13200 rpm. Supernatant smo zavrgli, pelet fagov resuspendirali z 200 µL PBS in centrifugirali 1 min ter prenesli v nove mikrocentrifugirke. Te smo do nadaljnega shranjevali v hladilniku.

3.4.10 Določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo s presejalnim testom ELISA

Vezavo posameznih bakteriofagov na aPT smo določili s testom ELISA, pri katerem smo najprej na podlago mikrotitrsko ploščice vezali kozja protitelesa usmerjena proti Fc regiji človeških IgG (anti-Fc). S tem smo ustvarili t.i. nosilec za tarčna aPT.

1. V 2/3 vdolbinic mikrotitrsko plošče MaxisorpTM smo odpipetirali 200 µL kozjih protiteles anti-Fc s koncentracijo 5 g/L. Pred nanosom smo jih redčili v PBS do koncentracije 5 µg/mL. Mikrotitrsko ploščo smo nato prekrili z lepilnim trakom in inkubirali čez noč na stresalniku (50 rpm) v hladilniku pri 4 °C.
2. Naslednje jutro smo nevezana protitelesa anti-Fc sprali 3× z 250 µL PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim spiranjem smo 5 min stresali na stresalniku.
3. V 1/3 vdolbinic mikrotitrsko plošče smo nato napipetirali po 200 µL tarčnega protitelesa (IgG aPT), redčenega v 1 % BSA v PBS do koncentracije 10 µg/mL. V ostali 2/3, ki sta predstavljeni ozadje (ena z anti-Fc in BSA in ena samo BSA) pa 200 µL PBS. Inkubirali smo 2 h pri sobni temperaturi in stresanju 50 rpm.
4. Po inkubaciji smo nevezana protitelesa sprali 5× z 250 µL PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim spiranjem smo 5 min stresali na stresalniku.
5. Nato smo v vse vdolbinice dodali blokirni pufer in blokirali nezasedena mesta z 1 % BSA v PBS. Inkubirali smo 1,5 h na sobni temperaturi in stresanju 50 rpm.
6. Po blokadi smo nevezane proteine sprali 3× z 250 µL PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim spiranjem smo 5 min stresali na stresalniku.

7. V vdolbinice mikrotitrsko ploščice smo nato nanesli $100 \mu\text{L}$ posameznih bakteriofagnih klonov, shranjenih v mediju LB (njihove koncentracije nismo določili). Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in stresanju 50 rpm.
8. Po inkubaciji smo sprali nevezane bakteriofage tako, da smo spirali $5 \times 250 \mu\text{L}$ PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim spiranjem smo 5 min stresali na stresalniku.
9. Nato smo v vsako vdolbinico dodali $100 \mu\text{L}$ sekundarnih protiteles usmerjenih proti fagom (anti M13-HRP), ki smo jih predhodno redčili 1:5000 v 1 % BSA v PBS. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in stresanju 50 rpm.
10. Po inkubaciji smo sprali nevezana sekundarna protitelesa tako, da smo spirali $5 \times 250 \mu\text{L}$ PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim spiranjem smo 5 min stresali na stresalniku.
11. Nanesli smo $200 \mu\text{L}$ TMB z dodanim H_2O_2 ($0,2 \mu\text{L} \text{H}_2\text{O}_2/\text{mL TMB}$) in spremljali spremembo barve, ko je ta postala temno modra, smo reakcijo ustavili s $50 \mu\text{L} 2 \text{ M žvepljive kisline}$.
12. Izmerili smo absorbanco s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire pri 450 nm.

3.4.11 Določanje vezavnega mesta izbranih bakteriofagnih klonov s kompetitivnim testom ELISA

S tem testom ELISA smo želeli dokazati, da se protrombin in izbrani kloni fagov vežejo na isto vezavno mesto tarčnih protiteles in tako med seboj povzročijo kompeticijo. To smo lahko opazili z znižanjem izmerjene absorbance pri 450 nm, ki jo je povzročil v reakcijski mešanici prisoten protrombin, ki je zmanjšal vezavo fagov. Ta test smo izvedli enako v vseh točkah, kot je opisano v prejšnjem poglavju. Razlikoval se je le v naslednjih potezah: pri vezavi bakteriofagov smo postopali tako, da smo na ploščo v prvi stolpec nanesli $100 \mu\text{L}$ izbranih bakteriofagnih klonov v PBS s količino 10^{10} pfu, v drugi stolpec pa smo k $100 \mu\text{L}$ izbranih bakteriofagnih klonov v PBS s količino 10^{10} pfu dodali še protrombin, da je njegova koncentracija znašala $0,1 \mu\text{g/mL}$. Količino izbranih bakteriofagov smo izračunali iz določenih absorbanc na NanoDrop s pomočjo naslednje enačbe:

$$\frac{(A_{269} - A_{320}) \times 6 \times 10^{16}}{\text{št. baz (ssDNA) bakteriofaga}} = \text{št. bakteriofagov/mL}$$

Enačba je povzeta po [50]. Pri tem je število baz bakteriofaga enako 7222. V enačbi oznaka A269 predstavlja absorbanco pri valovni dolžini 269 nm, ki je absorpcijski maksimum za

bakteriofag. Oznaka A320 pomeni absorbanco pri valovni dolžini 320 nm, ki izmeri prisotnost nečistot, zato jo odštejemo od skupne absorbance pri 269 nm.

3.4.12 Izolacija fagne DNA za sekvenciranje

Glede na rezultate presejalnega testa ELISA smo se odločili, katerim bakteriofagnim klonom določiti aminokislinsko zaporedje peptida, ki ga izražajo.

1. K 1000 µL pomnožene suspenzije bakteriofagov v mediju LB smo dodali 400 µL PEG/NaCl in dobro premešali na rotacijskem mešalu ter inkubirali na ledu 60 min.
2. Po inkubaciji smo centrifugirali 10 min pri 4 °C in 13200 rpm. Supernatant smo zavrgli, pelet pa resuspendirali v 150 µL jodidnega pufra in ponovno močno premešali na rotacijskem mešalu, da smo dosegli sprostitev nukleinskih kislin. Nato smo dodali 375 µL 95 % etanola in inkubirali 30 min pri sobni temperaturi, s čimer smo oborili sproščene nukleinske kisline.
3. Po 30 min smo centrifugirali 10 min pri 4 °C in 13200 rpm. Supernatant smo zavrgli in pelet sprali z 100 µL 70 % etanolom, to smo centrifugirali 5 min pri 4 °C in 13200 rpm. Nato smo etanol odstranili s pipeto in pustili mikrocentrifugirko odprto v komori LAF, da se je popolnoma osušila.
4. Posušeno DNA smo nato raztopili v 20 µL bidestilirane vode. Koncentracijo DNA smo pomerili na NanoDropu. Če je imel vzorec koncentracijo med 80 in 100 ng/µL, ga nismo redčili, če je imel višjo koncentracijo smo ga primerno redčili, če je imel pa bistveno nižjo koncentracijo smo ponovno pomnožili fagni klon in izolirali njegov DNA.
5. Skupni volumen vzorca, ki smo ga poslali na sekvenciranje v 1,5 mL mikrocentrifugirkah je bil 10 µL, saj smo 5 µL izolirane DNA dodali 5 µL 5 µM oligonukleotidnega začetnika.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Določitev aPS/PT v serumu bolnika in določitev avidnosti izbranih protiteles

V Laboratoriju za imunologijo revmatizma vsakodnevno izvajajo rutinski test aPS/PT ELISA. Iz zbranih rezultatov tega testa pri predhodno testiranih bolnikih z venskimi trombozami smo določili najprimernejšega kandidata (rezultat aPS/PT: <100 AUG) in njegov vzorec seruma uporabili pri raziskovanju.

Protitelesom aPT, določenih v serumu izbranega bolnika, smo določili avidnost s kaotropno metodo aPS/PT ELISA [49]. Mejo med visoko in nizko avidnimi IgG protitelesi smo določili arbitrarno po [48]. Primerjali smo vezavo protiteles pri vzorcih s 168,7 mM NaCl in vezavo protiteles pri 500 mM NaCl. Pretežno visoko avidna protitelesa so bila prisotna, če je pri 500 mM NaCl ostalo vezanih več kot 70 % protiteles glede na začetno vezavo pri 168,7 M NaCl. Če pa se je vezava protiteles zmanjšala na 25 % ali manj začetne vezave, so bila prisotna pretežno nizko avidna protitelesa. Če je bil vzorec z vezavo protiteles med 25 in 70 % začetne vezave, je vseboval heterogena protitelesa [48]. Rezultati kaotropne ELISA za naš izbrani vzorec so zbrani v Tabeli 4.

Tabela 4: Izmerjene vrednosti kaotropne ELISA za določitev avidnosti

vzorec	168,7 mM NaCl	250 mM NaCl	500 mM NaCl	1 M NaCl	2 M NaCl	500 mM/ 168,7 mM NaCl	avidnost
VT	3719	3670	3521	1348	834	95 %	visoka

Izbrani vzorec je vseboval zelo visoko avidna protitelesa (Tabela 4), kar smo upoštevali kasneje pri izolaciji protiteles iz kolone z vezanim protrobinom.

4.2 Izolacija protiteles IgG iz serumu bolnika z afinitetno kromatografijo

Iz serumu izbranega bolnika smo v prvem koraku izolirali IgG protitelesa s pomočjo afinitetne kolone z vezanim proteinom G (analizni komplet MAbTrapTM). Po končani izolaciji smo frakcije IgG razsolili in jim zamenjali pufer z uporabo razsoljevalne kolone. Tako smo dobili 11 frakcij s skupnim volumenom 25 mL in skupno količino IgG protiteles 24,43 mg.

4.3 Izolacija protiteles proti protrombinu

Protitelesa aPT smo iz frakcije IgG izolirali s pomočjo afinitetne kolone z vezanim protrombinom na stacionarno fazo. Na kolono smo nanesli vseh 25 mL izoliranih IgG s koncentracijo 0,977 g/L, torej **24,43 mg IgG**. Vzorec (Vzorec 1) smo pustili krožiti čez noč in takoj zjutraj smo pomerili koncentracijo IgG v krožečem vzorcu in še v 6 frakcijah s približno 15 mL, zbranih po spiranju protrombinske kolone s 100 mL TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20 (Tabela 5).

Tabela 5: Izmerjene koncentracije IgG po kroženju Vzorca 1 na koloni čez noč

Po PT koloni 1	V (mL)	konz IgG (mg/mL)	m (mg)
<i>NanoDrop</i>			
Vzorec 1	23	0,472	10,856
VT-Po koloni PT 1-1	15	0,434	6,510
VT-Po koloni PT 1-2	15	0,250	3,750
VT-Po koloni PT 1-3	15	0,074	1,110
VT-Po koloni PT 1-4	15	0,023	0,345
VT-Po koloni PT 1-5	40	0,019	0,760
VT-Po koloni PT 1-6	20	0,003	0,060
			23,39

S spiranjem z vezavnim pufrom smo iz kolone sprali 23,39 mg nevezanih proteinov od vseh 24,43 mg nanešenih. Kar pomeni, da se je na kolono specifično vezalo približno 1,03 mg aPT, kar predstavlja 4,2 % izhodiščne IgG frakcije.

Nato smo pričeli z elucijo, najprej smo kolono z vezanim protrombinom spirali s pufrom za nizko avidna protitelesa (TBS 0,5 M NaCl, pH 7,4 z dodatkom Tween 20), nato s pufrom za visoko avidna protitelesa (0,1 M glicin, 0,4 M NaCl, pH 2,5 z dodatkom 0,1 % Tween 20) in zbirali frakcije velike 1,3 mL pri pretoku 1 mL/min. Menjavo pufra in eluiranje visoko in nizko avidnih protiteles smo spremljali z elektronskim senzorjem povezanim z računalnikom, ki je meril spremembo prevodnosti in absorpcije UV svetlobe pri posamezni frakciji. Zbranim frakcijam smo sproti preverjali pH in ga umerjali na pH 7

z 1 M Tris bazo ter izmerili absorpcijo pri 280 nm s spektrofotometrom NanoDrop. Po eluciji smo kolono regenerirali z izmenjavanjem blokirnega in acetatnega pufra. Ob tem smo povečali pretok na 1,5 mL/min in še vedno zbirali frakcije, vendar z volumnom 2 mL. Tudi slednjim smo izmerili absorpcijo pri 280 nm s spektrofotometrom NanoDrop, da bi preverili ali se iz kolone še eluirajo proteini. Nato smo kolono sprali še s 100 mL TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20. Izmerjene koncentracije protiteles aPT po eluciji Vzorca 1 so zbrane v Tabeli 6.

Tabela 6: Koncentracije eluiranih aPT v posameznih frakcijah, izmerjene s spektrofotometrom NanoDrop pri 280 nm. Z oranžno barvo so označene frakcije zbrane po eluciji s pufrom za nizko avidna protitelesa, z zeleno barvo po eluciji s pufrom za visoko avidna protitelesa, z modro frakcije po spiranju z blokirnim pufrom in z vijolično po spiranju z acetatnim pufrom.

št.	konz. IgG (mg/mL)								
1	0,009	17	0,008	33	0,002	49	0,007	65	0,008
2	-0,001	18	0,015	34	0,005	50	-0,002	66	0,032
3	-0,001	19	0,018	35	-0,001	51	-0,001	67	0,042
4	0,009	20	0,010	36	-0,008	52	-0,004	68	0,010
5	0,003	21	0,011	37	-0,005	53	-0,001	69	0,006
6	0,007	22	0,017	38	0,008	54	-0,008	70	-0,006
7	0,004	23	0,011	39	0,006	55	-0,003	71	-0,012
8	-0,002	24	0,008	40	-0,002	56	-0,0011	72	0,003
9	0,007	25	0,015	41	0,000	57	-0,005	73	-0,011
10	0,006	26	0,015	42	-0,004	58	-0,012	74	/
11	0,007	27	0,012	43	0,004	59	-0,007	75	-0,002
12	0,004	28	0,008	44	0,004	60	-0,010	76	-0,002
13	0,017	29	0,008	45	0,013	61	-0,004	77	-0,004
14	0,019	30	0,004	46	0,004	62	-0,003	78	0,002
15	0,014	31	0,010	47	-0,003	63	-0,011	79	0,005
16	0,013	32	0,013	48	0,005	64	0,004	80	0,005

Glede na izmerjene koncentracije smo se odločili, da združimo frakcije nizko avidnih protiteles: 11-34 in visoko avidnih protiteles: 43-49 in 64-69. Frakcije smo ločeno koncentrirali po protokolu proizvajalca s koncentrirno epruveto Amnicon Ultra 4-30K.

Izmerili smo koncentracijo vsakega skoncentriranega vzorca pri 280 nm z NanoDrop in izvedli test aPS/PT ELISA, da smo potrdili imunsko specifičnost izoliranih protiteles (Tabela 7).

Tabela 7: Rezultati aPS/PT ELISA za tri združene frakcije aPT

vzorec	V (mL)	konz. IgG (mg/mL) <i>NanoDrop</i>	m (mg)	avidnost	aPS/PT ELISA (AUG) - vzorec redčen 1:2
A: 11-34	0,8	0,257	0,206	nizko avidna	44
B: 43-49	0,3	0,315	0,095	visoko avidna	66
C: 64-69	1,1	0,496	0,546	visoko avidna	30
0,86					

Iz kolone smo izolirali 0,86 mg IgG aPT ob nanosu 24,43 mg IgG protiteles. S tem podatkom lahko predpostavimo, da je bil delež specifičnih protiteles glede na vsa IgG protitelesa pri izbranem bolniku 3,5 %. Glede na to, da se je na kolono specifično vezalo približno 1,03 mg protiteles, po eluciji pa smo jih uspeli zbrati 0,85 mg, je bil izkoristek elucije torej 81,8 %. Nekaj manj kot 20 % izgubo proteinov lahko pripisemo postopkom koncentriranja in združevanja frakcij. V naslednjem koraku smo združili še ostanek Vzorca 1 po kroženju na protrombinski koloni in prve tri eluate zbrane po 15 min spiranja s TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20. Glede na meritve koncentracij je njihova skupna masa aPT znašala 22,23 mg (Tabela 7). Združeni vzorec smo koncentrirali in dobili 18 mL s koncentracijo 0,682 mg/mL, kar pomeni 12,28 mg IgG protiteles. Pri tem lahko opazimo, da smo po koncentriranju pridobili za polovico manj protiteles glede na začetno količino. Razlog za to deloma najdemo v tem, da smo del vzorca v procesu koncentriranja polili in deloma izgubili na filtrirni celici koncentrirne epruvete Amnicon Ultra 4-30K.

Združeni vzorec (Vzorec 2) smo prefiltrirali čez 0,20 µm membranski filter, nato pa pustili krožiti čez noč na protrombinski koloni. Takoj zjutraj smo pomerili koncentracijo v preostanku vzorca in po vsakih 15 mL, ki so prišli iz kolone po spiranju z 100 mL TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20 (Tabela 8).

Tabela 8: Izmerjene koncentracije IgG in rezultat testa aPS/PT ELISA po kroženju Vzorca 2 na koloni čez noč

Po PT koloni 2	V (mL)	konc IgG (mg/mL) <i>NanoDrop</i>	m (mg)	aPS/PT ELISA (AUG)
Vzorec 2	15	0,281	4,215	18
VT-Po koloni PT 2-1	15	0,257	3,855	17
VT-Po koloni PT 2-2	15	0,118	1,770	7
VT-Po koloni PT 2-3	15	0,023	0,345	3
VT-Po koloni PT 2-4	15	0,017	0,255	
VT-Po koloni PT 2-5	40	0	0	
10,44				

Na kolono smo nanesli 12,28 mg IgG protiteles, iz kolone pa smo sprali 10,44 mg, kar pomeni da je na kolono ostalo vezanih 1,84 mg IgG protiteles. Preračunana masa vezanih IgG protiteles po drugem nanosu na kolono s protrombinom predstavlja 7,5 % izhodiščne IgG frakcije.

Nato smo pričeli z elucijo, najprej smo kolono z vezanim protrombinom spirali s pufrom za nizko avidna protitelesa (TBS 0,5 M NaCl, pH 7,4 z dodatkom Tween 20), nato s pufrom za visoko avidna protitelesa (0,1 M glicin, 0,4 M NaCl, pH 2,5 z dodatkom 0,1 % Tween 20) in zbirali frakcije velike 1,3 mL pri pretoku 1 mL/min. Menjavo pufra in eluiranje visoko in nizko avidnih protiteles smo spremljali z elektronskim senzorjem povezanim z računalnikom, ki je meril spremembo prevodnosti in absorpcije UV svetlobe pri posamezni frakciji. Zbranim frakcijam smo sproti preverjali pH in ga umerjali na pH 7 z 1 M Tris bazo ter izmerili absorpcijo pri 280 nm s spektrofotometrom NanoDrop. Po eluciji smo kolono regenerirali z izmenjanjem blokirnega in acetatnega pufta, ob tem smo povečali pretok na 1,5 mL/min in še vedno zbirali frakcije, vendar z volumnom 2 mL. Tudi slednjim smo izmerili absorpcijo pri 280 nm s spektrofotometrom NanoDrop, da bi preverili ali se iz kolone še eluirajo proteini. Nato smo kolono sprali še s 100 mL TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20. Izmerjene koncentracije protiteles aPT po eluciji Vzorca 2 so zbrane v Tabeli 9.

Tabela 9: Koncentracije eluiranih aPT v posameznih frakcijah izmerjene s spektrofotometrom NanoDrop pri 280 nm. Z oranžno barvo so označene frakcije zbrane po eluciji s pufrom za nizko avidna protitelesa, z zeleno barvo po eluciji s pufrom za visoko avidna protitelesa in z modro frakcije po spiranju z blokirnim pufrom. Meritve koncentracij vzorcev od 38 do 48 nismo opravili, saj smo bili, na podlagi rezultatov prve izolacije aPT, prepričani, da v tem delu izpiranja kolone ni želenih protiteles.

št.	konz. IgG (mg/mL)								
1	0,007	15	0,000	29	-0,007	43	/	57	-0,005
2	0,001	16	0,007	30	-0,009	44	/	58	-0,012
3	0,002	17	0,003	31	-0,010	45	/	59	-0,007
4	0,002	18	0,007	32	-0,012	46	/	60	-0,010
5	0,007	19	-0,001	33	-0,012	47	/	61	-0,004
6	0,003	20	-0,003	34	-0,014	48	/	62	-0,003
7	0,013	21	0,000	35	-0,011	49	0,007	63	-0,011
8	0,007	22	0,006	36	-0,007	50	-0,002	64	0,004
9	0,009	23	0,008	37	0,000	51	-0,001	65	0,008
10	0,009	24	-0,002	38	/	52	-0,004	66	0,032
11	0,005	25	0,011	39	/	53	-0,001	67	0,042
12	0,000	26	0,001	40	/	54	-0,008	68	0,010
13	0,004	27	0,006	41	/	55	-0,003	69	0,006
14	-0,006	28	-0,002	42	/	56	-0,011	70	-0,006

Na podlagi rezultatov smo združili frakcije 7-27 z nizko avidnimi protitelesi in 43-49 z visoko avidnimi. Frakcije smo ločeno koncentrirali po protokolu proizvajalca s koncentrirno epruveto Amnicon Ultra 4-30K. Izmerili smo koncentracijo vsakega skoncentriranega vzorca pri 280 nm z NanoDrop in izvedli test aPS/PT ELISA, da smo potrdili imunsko specifičnost izoliranih protiteles (Tabela 10).

Tabela 10: Izmerjene koncentracije IgG in rezultat testa aPS/PT ELISA za dve združeni frakciji aPT

vzorec	V (mL)	konz. IgG (mg/mL) <i>NanoDrop</i>	m (mg)	avidnost	aPS/PT ELISA (AUG) - vzorec redčen 1:2
D: 7-27	0,4	0,045	0,018	nizko avidna	1
E: 43-49	0,7	0,554	0,388	visoko avidna	39
0,41					

Iz kolone smo izolirali 0,41 mg IgG aPT ob nanosu 12,28 mg IgG protiteles in preračunani vezavi protiteles aPT na koloni 1,84 mg. Delež specifičnih protiteles glede na vsa IgG protitelesa je bil pri drugi eluciji 3,3 %, delež elucije glede na preračunano vezavo na kolono pa 22,1 %. Izoliranih 0,41 mg aPT ne presega ocenjene kapacitete kolone iz prejšnje izolacije 0,85 mg. Ker smo na testu aPS/PT ELISA kljub temu zaznali specifična aPT, smo se odločili za ponovno elucijo.

Na kolono smo nanesli Vzorec 3, ki je vseboval združene in skoncentrirane frakcije ostalega Vzorca 2 po koloni in prve tri eluate zbrane po 15 min spiranja s TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20. Glede na meritve koncentracij znaša skupna masa protiteles aPT 10,19 mg (Tabela 10). Po koncentraciji sPT smo imeli 12,5 mL s koncentracijo 0,398 mg/mL, kar pomeni 4,98 mg IgG protiteles. Pri tem lahko opazimo, da smo več kot polovico protiteles, glede na preračunano količino protiteles po spiranju ponovno izgubili, tokrat je bil najverjetneje glavni razlog koncentriranje vzorca. Pred nanosom na kolono smo novi vzorec še prefiltrirali skozi 0,20 µm membranski filter, nato pa vzorec pustili krožiti preko noči. Tako jutri smo pomerili koncentracijo v preostanku vzorca in po vsakih 15 mL, ki so prišli iz kolone po spiranju z 100 mL TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20 (Tabela 11).

Tabela 11: Izmerjene koncentracije IgG in rezultat testa aPS/PT ELISA po kroženju Vzorca 3 na koloni čez noč. Združili smo vzorec 3, VT-Po koloni PT 3-1 in VT-Po koloni PT 3-2, kar je tabeli označeno s sivino.

Po PT koloni 3	V (mL)	konc IgG (mg/mL) <i>NanoDrop</i>	m (mg)	aPS/PT ELISA (AUG)
Vzorec 3	11	0,123	1,353	
VT-Po koloni PT 3-1	15	0,109	1,635	40
VT-Po koloni PT 3-2	15	0,074	1,110	
VT-Po koloni PT 3-3	15	0,026	0,390	
VT-Po koloni PT 3-4	15	0,011	0,165	
VT-Po koloni PT 3-5	40	0,006	0,240	
				4,89

Test aPS/PT ELISA je dal pozitiven rezultat za združene vzorce, kar je pomenilo, da so še vedno prisotna IgG aPT in je zato ponovna izolacija protiteles smiselna. Na kolono smo za tretjo elucijo nanesli 4,98 mg, iz kolone pa smo sprali 4,89 mg, kar pomeni da je na kolono ostalo vezanih 0,09 mg specifičnih IgG protiteles. Masa vezanih specifičnih protiteles aPT je tokrat glede na začetno količino znašala le 0,3 %, delež elucije teh protiteles pa 8,3 %.

Pričeli smo s tretjo elucijo, najprej smo kolono z vezanim protrombinom spirali s pufrom za nizko avidna protitelesa (TBS 0,5 M NaCl, pH 7,4 z dodatkom Tween 20), nato s pufrom za visoko avidna protitelesa (0,1 M glicin, 0,4 M NaCl, pH 2,5 z dodatkom 0,1 % Tween 20) in zbirali frakcije velike 1,3 mL pri pretoku 1 mL/min. Menjavo pufra in eluiranje visoko in nizko avidnih protiteles smo spremljali z elektronskim senzorjem povezanim z računalnikom, ki je meril spremembo prevodnosti in absorpcije UV svetlobe pri posamezni frakciji. Zbranim frakcijam smo sproti preverjali pH in ga umerjali na pH 7 z 1 M Tris bazo ter izmerili absorpcijo pri 280 nm s spektrofotometrom NanoDrop. Po eluciji smo kolono regenerirali z izmenjavanjem blokirnega in acetatnega pufa s tem, da smo povečali pretok na 1,5 mL/min in še vedno zbirali frakcije, vendar z volumnom 2 mL. Tudi slednjim smo izmerili absorpcijo pri 280 nm s spektrofotometrom NanoDrop, da bi preverili ali se iz kolone še izpirajo proteini. Nato smo kolono sprali še s 100 mL TBS z

dodatkom 0,1 % Tween 20. Izmerjene koncentracije protiteles aPT po eluciji Vzorca 3 so zbrane v Tabeli 12.

Tabela 12: Koncentracije eluiranih aPT v posameznih frakcijah izmerjene s spektrofotometrom NanoDrop pri 280 nm. Z oranžno barvo so označene frakcije, zbrane po eluciji s pufrom za nizko avidna protitelesa, z zeleno barvo po eluciji s pufrom za visoko avidna protitelesa, z modro frakcije po spiranju z blokirnim pufrom in z vijolično po spiranju z acetatnim pufrom.

št.	konz. IgG (mg/mL)								
1	0,030	13	0,005	25	-0,007	37	-0,001	49	0,020
2	0,024	14	-0,005	26	0,002	38	0,000	50	0,010
3	0,005	15	0,000	27	0,001	39	0,010	51	0,013
4	0,009	16	-0,006	28	0,004	40	-0,005	52	0,014
5	0,007	17	-0,008	29	0,008	41	-0,005	53	0,027
6	-0,001	18	-0,005	30	0,003	42	-0,005	54	0,018
7	0,006	19	-0,017	31	0,006	43	0,005	55	0,033
8	0,012	20	-0,006	32	0,017	44	0,027	56	0,013
9	0,0012	21	-0,002	33	0,012	45	0,028	57	0,022
10	0,005	22	-0,001	34	-0,001	46	0,027	58	0,023
11	-0,005	23	-0,005	35	-0,003	47	0,044	59	0,021
12	0,011	24	-0,009	36	0,000	48	0,024	60	-0,019

Glede na izmerjene koncentracije smo se odločili, da združimo in skoncentriramo frakcije visoko avidnih protiteles: 47-53. Frakcije smo ločeno koncentrirali po protokolu proizvajalca s koncentrirno epruveto Amnicon Ultra 4-30K. Izmerili smo koncentracijo vsakega skoncentriranega vzorca pri 280 nm z NanoDrop in izvedli test aPS/PT ELISA, da smo potrdili imunsko specifičnost izoliranih protiteles (Tabela 13).

Tabela 13: Rezultati aPS/PT ELISA za združeno frakcijo aPT

vzorec	V (mL)	konz. IgG (mg/mL) <i>NanoDrop</i>	m (mg)	avidnost	aPS/PT ELISA (AUG) - vzorec redčen 1:2
F: 47-53	0,4	0,017	0,007	visoko avidna	7
0,01					

Po tretjem poskusu smo iz kolone izolirali 0,01 mg IgG aPT ob nanosu 4,98 mg IgG protiteles in preračunani vezavi specifičnih protiteles 0,08 mg. Tako lahko izračunamo, da je bil v vzorcu 0,1 % delež specifičnih protiteles in da smo iz kolone uspeli eluirati 8,5 % protiteles, ki so se vezala na protrombin v koloni. Kljub majhnim vrednostim po izolaciji smo z aPS/PT ELISA pred nanosom vzorca še zaznali prisotnost specifičnih protiteles, kar si lahko razlagamo, da s kolono, kjer je protrombin vezan na CNBr agarozo, ne moremo izolirati vseh specifičnih protiteles, ki jih lahko zaznamo na aPS/PT ELISA testu, kjer je protrombin vezan na fosfatidilserin. V prid tej razlagi je tudi dejstvno, da smo v ostanku frakcije IgG po treh kroženjih na koloni z vezanim protrombinom še vedno izmerili 40 AUG specifičnih aPS/PT (Tabela 11). Ponovni nanos teh frakcij na kolono z vezanim protrombinom ne bi omogočil izolacije protiteles, saj se le-ta očitno vežejo samo na protrombin imobiliziran na fosfatidilserin, ne pa tudi na protrombin imobiliziran na agarozo.

Rezultate vseh treh elucij smo združeno prikazali še v dveh tabelah zaradi večje preglednosti (Tabela 14 in 15).

Tabela 14: Delež izoliranih aPT s kolono z vezanim protrombinom glede na izhodiščno frakcijo IgG

zaporedje izolacije	masa izoliranih aPT (mg)	masa izoliranih aPT/začetna masa IgG ob nanosu	masa izoliranih aPT/ masa IgG vezanih na kolono
1.	0,86	3,5 %	81,8 %
2.	0,41	3,3 %	22,1 %
3.	0,01	0,1 %	8,3 %
skupaj	1,26		

Tabela 15: Združene količine in rezultati aPS/PT ELISA testov vseh izoliranih specifičnih protiteles aPT v posameznih izolacijah. Z nežno roza so označeni vzorci iz prve elucije, s temnejšo barvo vzorci druge elucije in z rdečo barvo vzorec iz zadnje tretje elucije.

vzorec	V (mL)	konz. IgG (mg/mL) <i>NanoDrop</i>	m (mg)	avidnost	aPS/PT ELISA (AUG) - vzorec redčen 1:2
A: 11-34	0,8	0,257	0,206	nizko avidna	44
B: 43-49	0,3	0,315	0,095	visoko avidna	66
C: 64-69	1,1	0,496	0,546	visoko avidna	30
D: 7-27	0,4	0,045	0,018	nizko avidna	1
E: 43-49	0,7	0,554	0,388	visoko avidna	39
F: 47-53	0,4	0,017	0,007	visoko avidna	7
1,26					

Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da za nadaljnje raziskovanje izberemo **visoko avidna protitelesa eluirana z blokirnim pufom**. Tako smo združili frakcije **C, E in F**. Dobili smo **1,8 mL** protiteles IgG aPT s koncentracijo **0,467 mg/mL**, kar pomeni da smo izolirali **0,84 mg** specifičnih protiteles, ki so visoko avidna. Iz znanih podatkov lahko izračunamo, da IgG aPT predstavljajo 5,2 % vseh IgG protiteles tega bolnika in da je delež visoko avidnih aPT glede na celoto specifičnih protiteles 66,7 %. Pridobljen vzorec smo v nadaljevanju uporabili pri selekciji bakteriofagov.

4.4 Selekcija bakteriofagov

4.4.1 Selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-12TM

Po izolaciji tarčnih protiteles smo se lotili selekcije z bakteriofagnimi knjižnicami. Najprej smo jo izvedli s knjižnico Ph.D.-12TM. Po vsaki izvedeni stopnji selekcije bakteriofagov smo določili število bakteriofagov v eluatih pred pomnoževanjem in po pomnoževanju. Ocenili pa smo tudi izgled petrijevke kot take, saj nismo želeli prisotnosti prosojnih plakov. Ti bi na podlagi belo/modrega testa pomenili okuženost vzorca z divjimi tipi bakteriofaga M13, ki nimajo vstavljenega gena za lacZ α-peptid. Glede na število bakteriofagov po eluciji in količino dodanih bakteriofagov v vsako selekcijsko stopnjo smo izračunali odstotek elucije in poskusili oceniti uspešnost selekcije (Tabela 16):

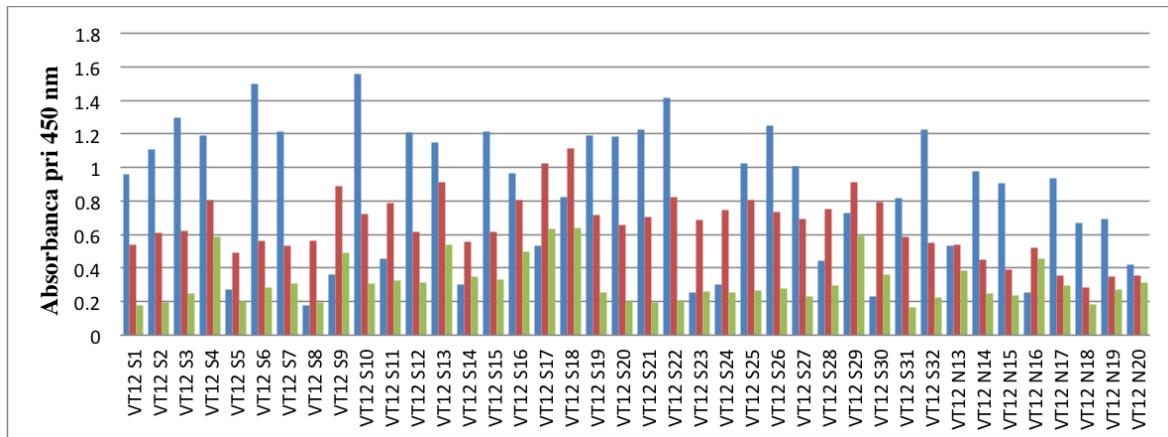
Tabela 16: Ocena uspešnosti selekcije z bakteriofagno knjižnico Ph.D.-12TM

Uspešnost selekcije	Specifična	Nespecifična
1. stopnja	0,00028 %	0,00012 %
2. stopnja	0,00094 %	0,00150 %
3. stopnja	0,0116 %	0,0139 %

Iz Tabele 16 je razvidno, da se je odstotek elucije skozi stopnje selekcije povečeval. Iz tega lahko sklepamo, da je selekcija uspešno potekala, saj se je bogatilo število bakteriofagov, ki so se vezali na tarčo.

Po 3. stopnji selekcije smo iz petrijevk po titraciji nepomnoženega eluata pobrali 20 plakov iz specifične elucije in 20 plakov iz nespecifične elucije. Pri tem smo izbrali petrijevke, ki so bile manj poraščene s plaki (<100), na njih pa takšne plake, ki so bili izolirani od ostalih. Izbrane plake smo pomnožili, kot je opisano v metodah in določili njihovo vezavo

na tarčna protitelesa s presejalnim testom ELISA (Slika 3). Izolirane bakteriofagne klone smo poimenovali po naslednjem ključu: VT kot oznaka zapleta venske tromboze, 12 kot število AK bakteriofagne knjižnice, S ali N kot oznaka za specifično ali nespecifično elucijo in nato zaporedna številka klena.



Slika 3: Vezava posameznih bakteriofagnih klonov iz knjižnice Ph.D.-12TM na tarčna aPT. Grafični prikaz absorbance, izmerjene pri 450 nm pri presejalnem testu ELISA. Modri stolpci prikazujejo vezavo fagov na tarčna protitelesa, rdeči stolci in zeleni stolci prikazujejo vezavo na ozadje. Vezava na anti-Fc protitelesa za imobilizacijo in BSA je prikazana z rdečimi stolpci, vezava na BSA pa z zelenimi stolpci.

Iz Slike 3 je razvidno, da so se nekateri bakteriofagni kloni vezali močneje na tarčna protitelesa kot na ozadje, saj smo s presejalnim testom ELISA izmerili višje absorbance. Bakteriofage, pri katerih se je vezava na tarčna protitelesa le malo razlikovala od ozadja, smo izključili iz nadaljnega raziskovanja. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da določimo aminokislinsko zaporedje prikazanih peptidov naslednjih klonov: pridobljeni s specifično elucijo VT12_S1, VT12_S2, VT12_S3, VT12_S4, VT12_S6, VT12_S7, VT12_S10, VT12_S12, VT12_S13, VT12_S15, VT12_S16, VT12_S19, VT12_S20 in pridobljeni z nespecifično elucijo VT12_N1, VT12_N2, VT12_N5, VT12_N6, VT12_N7, VT12_N11, VT12_N12, VT12_N14, VT12_N15, VT12_N17, VT12_N19.

4.4.2 Selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-7TM

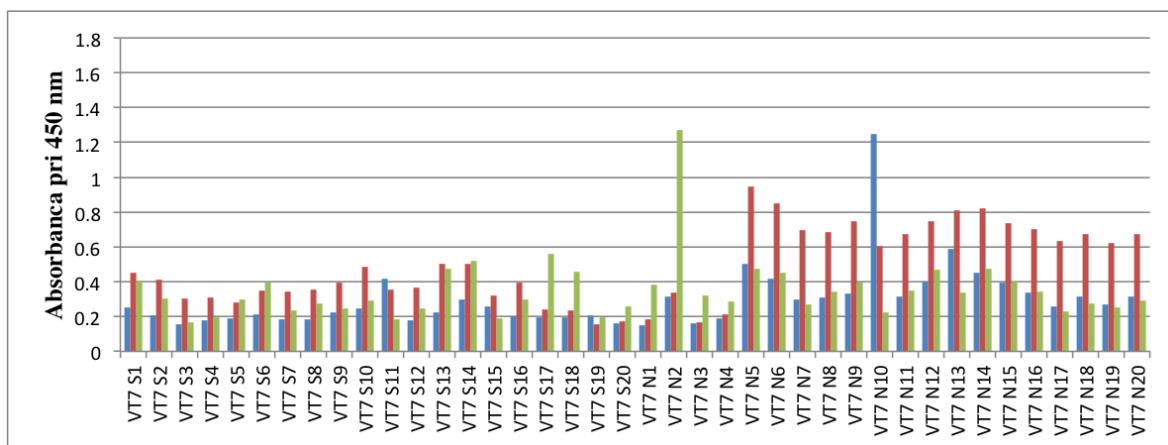
Popolnoma enako kot pri selekciji bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-12TM, smo ravnali tudi pri selekciji iz knjižnice Ph.D.-7TM. Uspešnost selekcije je podana v Tabeli 17:

Tabela 17: Ocena uspešnosti selekcije z bakteriofagno knjižnico Ph.D.-7TM

Uspešnost selekcije	Specifična	Nespecifična
1. stopnja	/	0,00013 %
2. stopnja	0,00063 %	0,00123 %
3. stopnja	0,00044 %	0,00533 %

Iz Tabele 17 je razvidno, da se je odstotek nespecifične elucije povečeval, iz česar lahko sklepamo, da je selekcija uspešno potekala, saj se je bogatilo število bakteriofagov, ki so se vezali na tarčo. Pri 1. stopnji specifične elucije smo titrirane bakterije dodali v preveč segreto agarozo in jih tako uničili. Iz tega razloga na gojišču niso zrastli plaki. Tudi odstotka uspešnosti 2. in 3. stopnje specifične elucije ne kažeta bogatenja selekcije bakteriofagov, saj sta oba enakega velikostnega razreda.

Po izvedeni 3. stopnji selekcije smo iz petrijevk po titraciji nepomnoženega eluata pobrali 20 plakov iz specifične elucije in 20 plakov iz nespecifične elucije. Izbrane plake smo pomnožili kot je opisano v metodah in določili njihovo vezavo na tarčna protitelesa s presejalnim testom ELISA (Slika 4). Ključ poimenovanja klonov je bil enak kot pri prejšnji selekciji.



Slika 4: Vezava posameznih bakteriofagnih klonov iz knjižnice Ph.D.-7TM na tarčna aPT. Grafični prikaz absorbance, izmerjene pri 450 nm pri presejalnem testu ELISA. Modri stolpci prikazujejo vezavo fagov na tarčna protitelesa, rdeči stolpci in zeleni stolpci prikazujejo vezavo na ozadje. Vezava na anti-Fc protitelesa za immobilizacijo in BSA je prikazana z rdečimi stolpcii, vezava na BSA pa z zelenimi stolpcii.

Na Sliki 4 lahko opazimo, da velika večina izoliranih klonov ne daje nič višjega odziva kot ozadje. Vrednosti slepih kontrol se od vzorca VT7 N5 nekoliko povišajo, saj so bili ti vzorci nekoliko dlje časa podvrženi vplivu substrata TMB. Opazimo lahko tudi, da se pri bakteriofagih, pridobljenih z nespecifično elucijo bistveno poviša odziv pri protitelesih za imobilizacijo, glede na bakteriofage, pridobljene s specifično elucijo. Sklepamo lahko, da smo z nespecifično bakteriofagno selekcijo obogatili klone, ki se vežejo na anti-Fc protitelesa in ne na protrombin. Odločili smo se, da določimo aminokislinsko zaporedje prikazanih peptidov klona VT7 S11, pridobljenega s specifično elucijo, in klona VT7 N10, pridobljenega z nespecifično elucijo, ki sta edina pokazala večjo afiniteto za vezavo na tarčna protitelesa v primerjavi s tistimi za imobilizacijo.

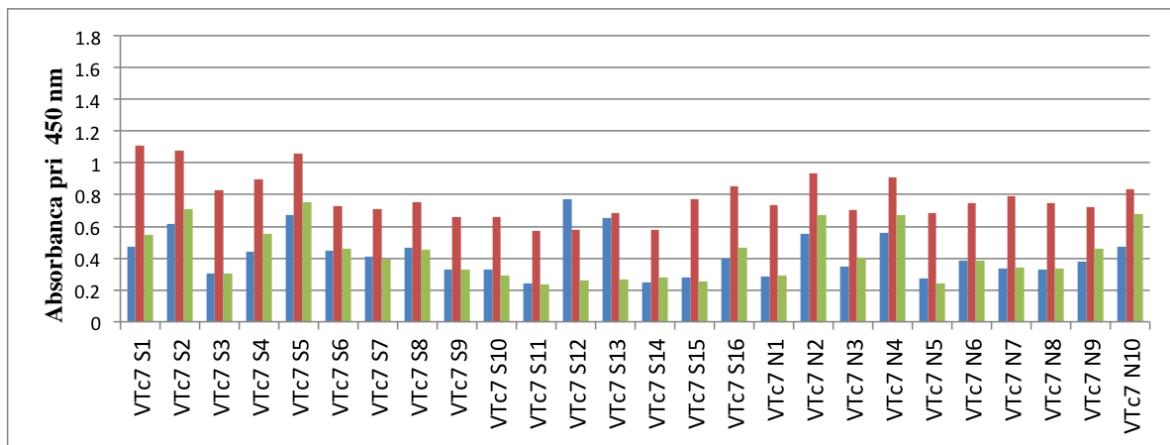
4.4.3 Selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-C7CTM

Selekcijo smo opravili še s knjižnico Ph.D.-C7CTM. Uspešnost selekcije je podana v Tabeli 18:

Tabela 18: Ocena uspešnosti selekcije z bakteriofagno knjižnico Ph.D.-C7CTM

Uspešnost selekcije	Specifična	Nespecifična
1. stopnja	0,000028 %	0,000015 %
2. stopnja	0,000039 %	0,000066 %
3. stopnja	0,000088 %	/

Iz Tabele 18 je razvidno, da se je odstotek elucije med selekcijo sicer povečeval, vendar je skozi vse stopnje ostal v enakem velikostnem razredu. Sklepamo lahko, da se skozi selekcijo ni opazno obogatilo število bakteriofagov, ki so se vezali na tarčo. Ker smo pri 2. stopnji selekcije opazili dokaj nizke izkoristke, smo se odločili, da na tej stopnji iz petrijevk po titraciji nepomnoženega eluata pobremo 10 specifičnih in 10 nespecifičnih klonov bakteriofagov. Kljub temu smo izvedli 3. stopnjo selekcije in iz petrijevk, po titraciji nepomnoženega eluata, pobrali še 6 specifičnih klonov. Izbrane plake smo pomnožili kot je opisano v metodah in določili njihovo vezavo na tarčna protitelesa s presejalnim testom ELISA (Slika 5). Ključ poimenovanja klonov je bil enak kot pri prejšnji selekciji.



Slika 5: Vezava posameznih bakteriofagnih klonov iz knjižnice Ph.D.-C7CTM na tarčna aPT. Grafični prikaz absorbance, izmerjene pri 450 nm pri presejalnem testu ELISA. Modri stolpci prikazujejo vezavo fagov na tarčna protitelesa, rdeči stolci in zeleni stolci prikazujejo vezavo na ozadje. Vezava na anti-Fc protitelesa za imobilizacijo in BSA je prikazana z rdečimi stolpcii, vezava na BSA pa z zelenimi stolpcii.

Iz Slike 5 je razvidno, da tudi v tem primeru ni izrazitega odziva klonov na tarčno protitelo. Podobno kot pri nespecifičnih bakteriofagih iz selekcije s knjižnico Ph.D.-7TM (Slika 4), so tudi pri tem presejalnem testu opazni visoki odzivi na imobilizirana protitelesa. Sklep je enak, s selekcijo smo najverjetneje obogatili klone, ki se vežejo na anti-Fc protitelesa in ne na protrombin. Odločili smo se, da določimo aminokislinsko zaporedje prikazanega peptidnega klena VTC7 S12, pridobljenega s specifično elucijo, ki je edini pokazal višjo afiniteto do vezave na tarčno protitelo kot na imobilizacijsko anti-Fc protitelo.

4.5 Določanje aminokislinskega zaporedja peptidov, izraženih na izbranih bakteriofagih

Izbrane klone, ki smo jim izolirali DNA, smo poslali na sekvenciranje v podjetje GATC BioTech. Zaporedje nukleotidov smo prevedli v aminokislinsko zaporedje s pomočjo prevajalnega orodja s spletno strani ExPasy – translate tool, ki omogoča translacijo zaporedja nukleotidov DNA v proteinsko sekvenco. Rezultati so zbrani v Tabeli 19. Peptide smo zaradi večje preglednosti preimenovali v peptidX, pri čemer ima X vrednost od 1 do 9.

Tabela 19: Peptidi izraženi na površini izbranih bakteriofagnih klonov.

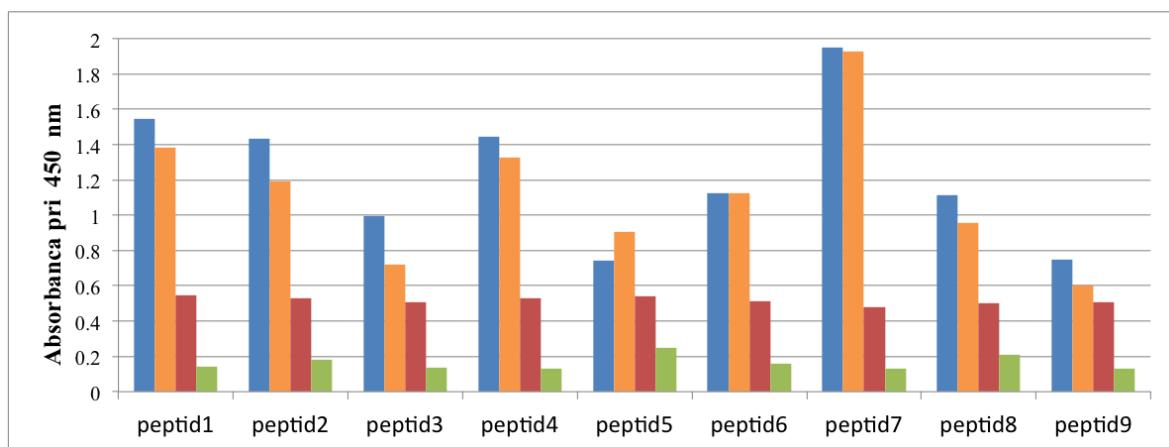
Izbran peptid	AK zaporedje	Izbran peptid	AK zaporedje
VT12 N5		VT12 S3	
VT12 N6		VT12 S7	
VT12 N7		VT12 S10	
VT12 N15	H S E L W N E V H L R R	VT12 S12	E L T W A Y Y H P P R N
VT12 N17		VT12 S15	
VT12 S19		= peptid2	
= peptid1			
VT12 S1		VT12 N1	
VT12 S2	R A D S W D D V H L P R	VT12 N2	E R W E D T H V S R S R
VT12 S20		VT12 N12	
= peptid3		= peptid4	
VT12 N19	G W V R M Q E S P M N S	VT12 S4	L T C N G P F C L G Y W
= peptid6		VT12 S13	
VT12 S6	F I P G G S V N Q R A T	= peptid5	
= peptid7			
VT12 S16	F T P H K H S R L P G N	VT7 S11	G P V R F A S
= peptid8		= peptid9	

Za bakteriofagni klon VT12 N11 smo ugotovili, da zaporedje vsebuje STOP kodon, medtem ko klon VTc7 S12 ni vseboval vstavljenega aminokislinskega zaporedja. Nobeno izmed izoliranih peptidnih zaporedij ni spadalo med poznane netarčne peptide s potrjeno vezavo na ozadje [51], kar smo preverili z internetnim orodjem za detekcijo lažnih peptidov SAROTUP [52]. Netarčni peptidi je izraz za aminokislinska zaporedja, ki se pogosto pojavljajo kot rezultat bakteriofagnih selekcij in se vežejo na ozadje ali pa imajo propagacijske prednosti pred drugimi kloni. Zato smo vsa izolirana zaporedja preverili s

prej omenjenim programom in glede na rezultate vsa izbrana zaporedja vključili v naslednje stopnje raziskav.

4.6 Določanje vezavnega mesta izbranih bakteriofagnih klonov s kompetitivnim testom ELISA

Da bi ugotovili, ali dobljena aminokislinska zaporedja posnemajo epitope protrombina in ali tekmujejo s protrombinom za vezavno mesto na protitelesih, smo naredili kompetitivni test ELISA (Slika 6). Od klonov, ki so si delili popolnoma enako zaporedje, smo za ta test izbrali le enega predstavnika vsake skupine. Poimenovali smo jih tako, kot je zapisano v Tabeli 19.



Slika 6: Vrednotenje vezave izbranih bakteriofagnih klonov na tarčna aPT ob kompeticiji s tarčo - protrombinom. Grafični prikaz absorbance, izmerjene pri 450 nm pri kompetitivnem testu ELISA. Modri stolpci prikazujejo vezavo fagov na tarčna protitelesa, oranžni stolpci prikazujejo vezavo fagov na tarčna protitelesa ob prisotnosti protrombina, rdeči stolci in zeleni stolci prikazujejo vezavo na ozadje. Vezava na anti-Fc protitelesa za imobilizacijo in BSA je prikazana z rdečimi stolpcji, vezava na BSA pa z zelenimi stolpcji.

Iz Slike 6 je razvidno, da se vezava na tarčna protitelesa ob prisotnosti protrombina pri nekaterih bakteriofagnih klonih zmanjša. Iz tega lahko sklepamo, da aminokislinska zaporedja teh klonov posnemajo vezavno mesto oziroma epitop na protrombinu, saj antigen izpodrini peptid iz paratopa. Pri tem testu smo tudi normirali količino dodanih bakteriofagov (10^{10} pfu/na vdolbinico) na tarčna protitelesa, zato lahko kvantitativno primerjamo peptide glede na moč vezave na tarčno protitelo. Tako lahko opazimo, da

najmočnejši odziv daje peptid7, vendar gre v primeru tega klena ob kompeticiji zgolj za 1,2 % znižanje absorbance pri 450 nm. Največje znižanje absorbance smo zaznali pri bakteriofagnem klonu z aminokislinskim zaporedjem peptid3, pri katerem ta znaša 27,7 %, vendar osnovni odziv na ELISA testu ni med najvišjimi. Pri bakteriofagnih klonih peptid1, peptid2, peptid4, peptid8 in peptid9 je bilo znižanje absorbance zaradi prisotnosti protrombina 10,6 %, 16,7 %, 8,5 %, 14,4 % in 19,3 %. Prisotnost antiga na testu ELISA ni vplivala na odziva bakteriofagnih klonov s peptid5 in peptid6, saj sta ostala nespremenjena oziroma se je v primeru peptid5 absorbanca ob dodatku protrombina celo povišala. Slabši odziv na kompetitivnem testu ELISA lahko povezujemo bodisi z vezavo peptida na neko drugo mesto protitelesa in ne na paratop, bodisi z močnejšo interakcijo peptida s paratopom protiteles aPT, ki je izbrana koncentracija protrobina ni izpodrinila. Možna razloga je tudi, da protrombin v raztopini ni v celoti odkril epitopov in je zato manj učinkovito tekmoval s peptidi.

4.7 Analiza izoliranih peptidov

V nadaljevanju smo primerjali zaporedja izbranih peptidov med seboj in jim poiskali skupen motiv (Tabela 20).

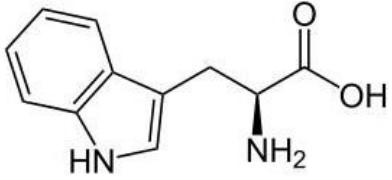
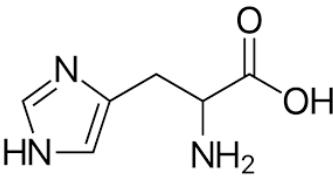
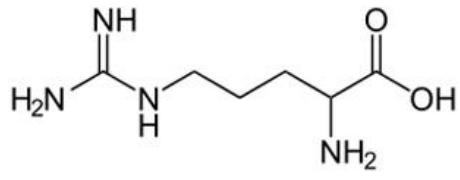
Tabela 20: Zaporedja izbranih peptidov. V oklepaju je navedeno število izoliranih peptidov s takšnim zaporedjem.

Izbran peptid (št.)	AK zaporedje
peptid1 (6)	H S E L W N E V H L R R
peptid2 (5)	E L T W A Y Y H P P R N
peptid3 (3)	R A D S W D D V H L P R
peptid4 (3)	E R W E D T H V S R S R
peptid5 (2)	L T C N G P F C L G Y W
peptid6 (1)	G W V R M Q E S P M N S
peptid7 (1)	F I P G G S V N Q R A T
peptid8 (1)	F T P H K H S R L P G N
peptid9 (1)	G P V R F A S

Med prvimi štirimi peptidi smo lahko določili ponavljajoči se motiv: W-XXX-H-XX-R. Pri preostalih peptidih (od 5 do 9) nismo zaznali podobnosti ne med seboj, kakor tudi ne z motivom prvih štirih peptidov. Z zeleno so označene tiste AK, ki določajo motiv, so popolnoma enake in jih najdemo na enakih mestih. Prvi med njimi je triptofan (W), hidrofobna AK z veliko stransko aromatsko skupino, ki lahko tvori kation $- \pi$, $\pi - \pi$ interakcije, kot tudi vodikove vezi zaradi prisotnosti N-H skupine. Z razmikom treh AK sledi histidin (H), ki je AK z imidazolno funkcionalno skupino, ta ji daje šibke bazične lastnosti, zato lahko vzpostavi ionske vezi. Možne so tudi vodikove vezi preko imidazolnega vodika in kation $- \pi$, $\pi - \pi$ interakcije zaradi aromatskega obroča. Zadnja AK v ponavljajočem se motivu je arginin (R), ki ima na zadnji alifatski ogljikov atom vezano gvanidinsko skupino z visokim pKa (12,48), zato ima AK bazične lastnosti in se lahko povezuje z ionskimi vezimi. Lahko se vzpostavijo tudi vodikove vezi preko N-H skupine (Tabela 21). Z rumeno barvo so označene tiste AK, ki so na enakih mestih, vendar ne gre za enake temveč sorodne AK, ki imajo podobne kemijske lastnosti. H in R sta bazična in tvorita ionske interakcije, E in D imata kisle lastnosti in se prav tako povezujeta z ionskimi interakcijami. T in S sta hidrofilni AK s hidroksilno skupino na koncu stranske

verige, ki hitro odda vodik za tvorbo vodikovih vezi. L, P in V so AK, ki imajo relativno velike hidrofobne alifatske stranske verige, s katerimi lahko tvorijo hidrofobne interakcije.

Tabela 21: Molekulske strukture in kemijske lastnosti treh aminokislin, ki tvorijo motiv.

	
tryptofan (W) <ul style="list-style-type: none"> • Hidrofobna aromatska AK • Možna tautomerija na aromatski skupini • Vodikove vezi • Kation – π, $\pi - \pi$ interakcije 	histidin (H) <ul style="list-style-type: none"> • Polarna nabita AK • Bazične lastnosti ($pK_a=6,04$) • Vodikove vezi • Ionske vezi • Kation – π, $\pi - \pi$ interakcije
	
arginin (R) <ul style="list-style-type: none"> • Polarna nabita AK • Bazične lastnosti ($pK_a=12,48$) • Vodikove vezi • Ionske vezi 	

Nato smo se lotili prileganja linearnega zaporedja izoliranih peptidov protrombinskemu s pomočjo spletne platforme UniPort. V PBD bazi so širje vnosi za protrombin: 5EDM, 5EDK, 4NZQ, 4O03. 4O03 je kristalna struktura protrombina ob prisotnosti kalcijevih ionov, medtem ko so ostale tri brez dodanih ionov. Vse strukture imajo določene strukturne mutacije. Vsa štiri primarna zaporedja protrombina smo prilegali in rezultati vseh so zelo primerljivi. V primarnem zaporedju protrombina nismo našli identičnega ali

podobnega motiva W-XXX-H-XX-R. Glede na rezultate linearnega prileganja, smo mnenja, da izbrani peptidi ne posnemajo linearnega epitopa.

Konformacijsko prileganje smo preverili s preko spletja dostopnim serverjem Pepitope za vse 4 PDB kristalne strukture protrombina. Algoritem PepSurf je peptide 1 do 4, ki kažejo podobnost, razvrstil na različna mesta na tridimenzionalni površini protrombina (rezultati niso prikazani). Iz dobljenih rezultatov bi lahko sklepali, da motiv W-XXX-H-XX-R pri prileganju ne odigra pomembne vloge, vendar smo mnenja, da prileganje ni bilo uspešno, saj pri dostopnih tridimenzionalnih strukturah v PDB bazi, epitop, ki ga posnemajo peptidi, ni bil razkrit. Zato predpostavljamo, da se aPT vežejo na neoepitope, ki se izpostavijo šele po vezavi protrombina na negativno nabite fosfolipide, kot sta predvidela že Wu in Lentz [13]. Za uspešno določitev vezavnih mest izbranih protiteles bi potrebovali tridimenzionalno strukturo konformacije protrombina, ki jo zavzame ob vezavi na fosfatidilserin ali druge negativno nabite fosfolipide, vendar le-ta zaenkrat še ni določena.

Na podlagi zbranih rezultatov lahko zaključimo, da se protitelesa aPT, izolirana iz bolnika z vensko trombozo, najverjetneje vežejo na kriptični epitop, ki ga posnema motiv W-XXX-H-XX-R. Za interakcijo paratop-epitop so najverjetneje pomembne tako ionske kot vodikove vezi. Tudi pomembnost kation – π in $\pi - \pi$ interakcij ni zanemarljiva. To smo predpostavili na podlagi ponavlajočega motiva. Tega sestavljajo tri AK: triptofan (W), histidin (H) in arginin (R), ki jih ločujeta dva distančnika, dolga tri in dve AK. Triptofan kot multifunkcionalna aromatska AK s N-H skupino omogoča tvorbo vodikovih vezi, kation – π in $\pi - \pi$ interakcij, medtem ko sta histidin in arginin bazični AK, ki sta sposobni tvorbe tako ionskih vezi kot vodikovih vezi. Histidin se lahko zaradi svojega aromatskega obroča povezuje tudi s kation – π in $\pi - \pi$ vezmi.

5 SKLEP

Z opravljenim raziskovalnim delom smo uspeli uresničiti zastavljene cilje:

1. Izdelali smo afinitetno kolono z vezanim protrombinom na agarozi aktivirani s CNBr.
2. Izolirali smo protitelesa aPT iz seruma bolnika z APS in prebolelo vensko trombozo z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom.
3. S pomočjo treh različnih bakteriofagnih knjižnic smo poiskali mimetike epitopov protrombina za izolirana protitelesa, ki so pri tej metodi služila kot tarča.
4. Ovrednotili smo izbrane peptide in najboljšim s sekvenciranjem določili aminokislinska zaporedja ter ta prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina.

Potrdili smo sledeče hipoteze:

1. Izolirali smo protitelesa aPT ustrezne čistosti in imunske specifičnosti.
2. Iz bakteriofagnih knjižnic smo izolirali peptide, ki so se specifično vezali na tarčna protitelesa.

Vezavnega mesta med antigenom in tarčnim protitelesom nismo uspeli določiti. Iz pridoboljenih dokazov lahko sklepamo, da se aPT, izolirana iz bolnika z vensko trombozo, vežejo na neoepitop, ki se izpostavi šele po vezavi protrombina na fosfatidilserin. Kriptični epitop pri tem verjetno posnema motiv W-XXX-H-XX-R. Zaradi prisotnosti AK triptofana, histidina in arginina sklepamo, da so za vezavo paratop-epitop pomembne predvsem ionske in vodikove vezi.

V prihodnosti bi lahko takšen model raziskovanja uporabili na večih združenih vzorcih bolnikov z APS in venskimi trombozami, in s tem pokazali, ali lahko dobljene rezultate razširimo na celotno populacijo bolnikov. Poleg tega bi bilo smiselno selekcijo optimizirati tako, da bi elucijo specifičnih bakteriofagov izvedli ob prisotnosti kalcijevih ionov in protrombina vezanega na fosfatidilserin, saj vemo, da oboje pomembno vpliva na interakcijo med aPT in antigenom – protrombinom.

LITERATURA

- [1] Miyakis S, Lonckshin MD, Atusami T, Branch DW, Bray RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.
- [2] Cohen D, Berger SP, Steup-Beeker MA, et al. Diagnosis and management of antiphospholipid syndrome. *BMJ* 2010; 340: 1125–32.
- [3] Ribarič S. Temelji patološke fiziologije. Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta. Ljubljana, 2011.
- [4] Margusson S, Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, Petersen TE. Proceedings: Complete primary structure of prothrombin. Partial primary structures of plasminogen and hirudin. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34(2): 562-3.
- [5] Mann KG, Neshein ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* 1990; 76 (1): 1-16.
- [6] Loalinger A. Prothrombin as a co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus? *Thromb Diath Haemorrh* 1959; 3: 237-56
- [7] Bajaj SP, Rapaport SI, Fierer D, Herbst KD, Schwartz DB. A mechanism for the hypoprothrombinemia of the acquired hypoprothrombinemia-lupus anticoagulant syndrome. *Blood* 1983; 61: 684-92.
- [8] Edson JR, Vogt JM, Hasegawa DK. Abnormal prothrombin crossed-immunoelectrophoresis in patients with lupus inhibitors. *Blood* 1984; 64: 807-816.
- [9] Fleck RA, Rapaport SI, Rao LVM. Anti-prothrombin antibodies and the lupus anticoagulant. *Blood* 1988; 72: 512-9.
- [10] Oosting JD, Derkx RHWM, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 1993; 81: 2618-25.
- [11] Field S, Chesterman C, Dai Y, Hogg P. Lupus Antibody Bivalency Is Required to Enhance Prothrombin Binding to Phospholipid. *J Immunol* 2001; 166(10): 6118-6125

- [12] Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb Diath Haemorrh* 1994; 71(4): 569-604.
- [13] Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prithrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Diath Haemorrh* 1997; 77(3): 486-91.
- [14] Field SL, Chesterman CN, Dai YP, Hogg PJ. Lupus antipody bivalence is required to enhace prothrombin binding to phospholipid. *J Immunol* 2001; 166(10): 6118-25.
- [15] Žigon P, Čučník S, Ambrožič A, Sodin Šemrl S, Kveder T, Božič B. Antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex as an additional diagnostic marker of APS? *Lupus* 2012; 21(7): 790-2.
- [16] Rao LV, Hoang AD, Papaport SI. Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood* 1996; 88(11): 4173-82.
- [17] Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T. Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin autobodies in patiens with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1999; 8(9); 761-6.
- [18] Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patiens with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thromb Haemost* 1996; 75(5): 721-4.
- [19] Bajaj SP, Rapaport SI, Baracley S, Herbst KD. Aquaired hypoprothrombinemia due to non-neutralizing antibodies to prothrombin: mechanism and managment. *Blood* 1985; 65(6): 1538-43.
- [20] Ariveux J, Daringe L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autobodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost*. 1995; 74(4): 1120-25.
- [21] Galli M, Barbui T. Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 1999; 93(7): 2149-57.
- [22] Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, Kasawagi K, Gohchi K, Tsukamoto M. Phosphatidyl serine-dependent antiprothrombine antibody is exclusive to patients with lupus anticoagulant. *Br J Rheumatol* 1996; 36(6): 589-91.

- [23] Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserin-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9): 1982-93.
- [24] Žigon P, Ambrožič A, Čučnik S, Kveder T, Rozman B, Božič B. Modified phosphatidylserine-dependent antiprothrombin ELISA enables identification of patients negative for another antiphospholipid antibodies and also detects low avidity antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(9): 1573.
- [25] Scianscia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashte MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrommin (aPS/PT) antibodies and risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systemativ review. *Thromb Haemost* 2013; 111(2).
- [26] Žigon P, Čučnik S, Ambrožič A, Kveder T, Sodin Šemrl, Rozman B, et al. Detection of Antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies and their potencial diagnostic value. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013-8.
- [27] Žigon P, Ambrožič A, Božoč B, Čučnik S. Protitelesa proti protrombinu. *Zdrav Vest* 2015; 84: 209-21.
- [28] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tadesco F. Patogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(6): 330-9.
- [29] Willis R, Gonzalez EB, Brasier AR. The Journey of antiphospholipid antibodies from cellular activation to antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2015; 17(16): 1-11.
- [30] Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R *et al.* Involvement of p38 MARK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum* 2005; 52(5): 1545-54.
- [31] Reverter JC, Tassies D, Font J *et al.* Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on pelet funcion and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum* 1998; 41(8): 1420-7.
- [32] Jy W, Tiede M, Bidot CJ *et al.* Platelet activation rather than endothenial injury indentifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2007; 121(3): 319-25.

- [33] Hwang KK, Yang CD, Yan W *et al.* A thrombin-cross-reactive anticardiolipin antibody binds to and inhibits the anticoagulant function of activated protein C. *Arthritis Rheum* 2003; 48(6): 1622-30.
- [34] Krone KA, Allen KL, McCrae KR. Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12(1): 53-7.
- [35] Pierangeli SS, Girardi G, Vega-Ostertag M *et al.* Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* 2005; 52(7): 2120-4.
- [36] Nayar R, Lage JM. Placental changes in a first trimester missed abortion in maternal systemic lupus erythematosus with antiphospholipid syndrome: a case report and review of literature. *Hum Pathol* 1996; 27: 201-6.
- [37] Meroni PL, Tedesco F, Locati M, Vecchi A, Di Simone N, Acaia B, Pierangeli SS, Borghi MO. Anti-phospholipid antibody mediated fetal loss: still an open question from a pathogenic point of view. *Lupus* 2010; 19: 453-6.
- [38] Vozelj M. Temelji imunologije. DZS, 2000.
- [39] B. Hjelm. Epitope mapping of antibodies towards human protein targets. Royal Institute of Technology, Stockholm 2011.
- [40] Houghten RA, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo JH. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* 1991; 354; 84-6.
- [41] Falciani C, Lozzi L, Pini A, Bracci L. Biactive peptides from libraries. *Chemistry & Biology* 2005; 12: 417-26.
- [42] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the viron surface. *Science* 1985; 228: 1315-7.
- [43] Boettger V, Boettger A. Epitope mapping using phage display peptide libraries. *Methods Mol Biol* 2009; 524: 181-201.
- [44] Ph.D.TM Phage display libiraries: Instruction manual 2.1, 07/16.
- [45] Jian H, Bifang H, Peng Z. Mimotope-based prediction of B-cell epitopes. *Methods Mol Biol* 2014; 1184: 237-43.

- [46] MAbTrapTM Kit, Instruction 71-5003-43 AK, GE Healthcare.
- [47] CNBr-activated SepharoseTM – 4B, Instruction 71-7086-00 AF, GE Healthcare.
- [48] Žigon P. Značilnosti vezave antiprotrombinskih protiteles in vitro ter in vivo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008.
- [49] Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B. Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. Autoimmun Rev 2005; 4 (5); 303-8.
- [50] AbsorptionSpectrum.doc, Absorption Spectroscopy and Quantitation of Filamentous Phage: www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/AbsorptionSpectrum.doc; dostop 04.09.2017
- [51] Vodnik M, Žager U, Štrukelj B, Lunder M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. Molecules 2011; 16, 790-817.
- [52] Huang J, Ru B, Li S, Lin H, Guo FB. SAROTUP: scanner and reporter of target-unrelated peptides. J Biomed Biotechnol 2010; 2010: 101932