

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

REBEKA JEREB

EPITOPSKO MAPIRANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU PRI BOLNIKU  
Z ARTERIJSKO TROMBOZO  
ANTIPROTHROMBIN ANTIBODIES EPITOPE MAPPING IN PATIENT WITH  
ARTERIAL THROMBOSIS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm., in v Laboratoriju za imunologijo revmatizma v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, pod somentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem. Sekvenciranje DNA so opravili v podjetju GATC Biotech.

### Zahvala

Zahvalila bi se rada vsem, ki so mi omogočili prijetno opravljanje raziskovalnega dela in širjenje strokovnega znanja. Hvala zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma UKC Ljubljana, še posebej Saši Čučnik in Poloni Žigon. Hvala tudi vsem na Katedri za farmacevtsko biologijo, še posebej mentorici Mojci Lunder, ki je vedno našla odgovore na vprašanja. Hvala tudi sošolki Viti, s katero je bilo opravljanje raziskovalnega dela še prijetnejše. Zahvaljujem se še svoji družini in fantu, ki so mi stali ob strani vse od začetka do konca.

### Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm., in somentorice doc.dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem.

Študentov lastnoročni podpis

## Kazalo

---

Kazalo.....	i
Povzetek.....	iv
Abstract.....	v
Seznam okrajšav .....	vi
1. Uvod.....	1
1.1 Antifosfolipidni sindrom.....	1
1.2 Protitelesa proti protrombinu .....	1
1.3 Protrombin.....	3
1.4 Protitelesa.....	4
1.5 Bakteriofagi.....	5
2. Namen.....	7
3. Materiali in oprema.....	8
3.1 Biološki material .....	8
3.1.1 Humani serumi.....	8
3.1.2 Protitelesa.....	8
3.1.3 Bakterije.....	8
3.1.4 Bakteriofagni kloni .....	8
3.2 Reagenti.....	9
3.3 Pufri in raztopine.....	11
3.3.1 Izolacija protiteles proti protrombinu .....	11
3.3.2 Selekcija iz bakteriofagnih knjižnic.....	14
3.3.3 Pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov .....	15
3.3.4 ELISA posameznih bakteriofagnih klonov.....	15
3.3.5 Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov .....	15

3.4	Aparature in pribor .....	16
4.	Metode dela.....	18
4.1	Izolacija protiteles proti protrombinu.....	18
4.1.1	Afinitetna kromatografija na koloni z vezanim proteinom G.....	18
4.1.2	Razsoljevanje vzorcev po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim proteinom G.....	18
4.1.3	Priprava kolone z vezanim protrombinom.....	19
4.1.4	Afinitetna kromatografija na koloni z vezanim protrombinom.....	20
4.1.5	Koncentriranje in razsoljevanje vzorca po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim protrombinom .....	21
4.1.6	ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT ELISA).....	21
4.1.7	aPS/PT ELISA s kaotropnimi pogoji.....	22
4.2	Selekcija iz bakteriofagnih knjižnic .....	22
4.3	Izolacija in pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov .....	25
4.4	Optimizacija testa ELISA za določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo.....	26
4.4.1	Osnovni izvedba testa fagna ELISA .....	26
4.4.2	Zmanjšanje količine tarčnih protiteles in sprememba blokirnega sredstva.....	27
4.4.3	Nanašanje enotne koncentracije bakteriofagov na tarčo.....	27
4.4.4	Menjava pufra za vezavo tarčnih protiteles .....	27
4.4.5	Menjava pufra za vezavo in spiranje .....	27
4.4.6	Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles .....	28
4.4.7	Uporaba manjše količine kozjih anti-IgG protiteles za imobilizacijo in manjše količine tarčnih protiteles.....	28
4.4.8	Kompetitivna ELISA, izpodrivanje s fragmentom protiteles Fc .....	29
4.5	Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov .....	29

5.	Rezultati in razprava .....	31
5.1	Izolacija protiteles proti protrombinu in avidnost .....	31
5.1.1	Izolacija protiteles proti protrombinu .....	31
5.1.2	Avidnost .....	33
5.2	Selekcija iz bakteriofagnih knjižnic .....	34
	Optimizacija testa ELISA za določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo .....	36
5.2.1	Osnovni postopek testa fagna ELISA .....	36
5.2.2	Zmanjšanje količine tarčnih protiteles in sprememba blokirnega sredstva .....	38
5.2.3	Nanašanje enotne koncentracije bakteriofagov na tarčo .....	39
5.2.4	Menjava pufra za vezavo tarčnih protiteles .....	40
5.2.5	Menjava pufra za vezavo in spiranje .....	40
5.2.6	Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles .....	41
5.2.7	Uporaba manjše količine kozjih anti-IgG za imobilizacijo in manjše količine tarčnih protiteles .....	42
5.3	Vrednotenje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo .....	43
5.4	Kompetitivna ELISA, izpodrivanje s fragmentom protiteles Fc .....	47
5.5	Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov .....	49
5.6	Dodatno ovrednotenje vezave bakteriofagnih klonov .....	50
5.7	Pomembnost protiteles proti protrombinu .....	51
6.	Zaključek .....	53
7.	Literatura .....	55

## **Povzetek**

---

Protitelesa proti protrombinu najdemo pri bolnikih z antifosfolipidnim sindromom. To je avtoimunska bolezen, ki se kaže z venskimi in arterijskimi trombozami in zapleti v nosečnosti. V krvi teh bolnikov najdemo različna avtoprotitelesa. Med bolj pomembnimi so protitelesa proti protrombinu. V tej magistrski nalogi smo se osredotočili nanje in na določanje njihovega vezavnega mesta na protrombinu.

Iz seruma bolnika z antifosfolipidnim sindromom z arterijskim zapletom smo izolirali IgG frakcijo in jo nato afinitetno prečistili do protiteles proti protrombinu. Preverili smo njihovo avidnost ob kaotropnih pogojih. Za preiskovanje epitopov protrombina smo uporabili bakteriofagne predstavitvene knjižnice naključnih peptidov. Kot tarčo smo uporabili izolirana protitelesa proti protrombinu. V procesu selekcije smo iz bakteriofagnih knjižnic izolirali posamezne bakteriofagne klone in ovrednotili njihovo vezavo na tarčna protitelesa. Uporabili smo test ELISA. Ugotovili smo, da se sama izolirana protitelesa slabo vežejo na mikrotitrne plošče. Vezavo smo izboljšali tako, da smo tarčna protitelesa na ploščico pritrdili preko sekundarnih protiteles proti človeškim IgG. Izbranim bakteriofagnim klonom smo izolirali DNA in določili aminokislinsko zaporedje peptidov, predstavljenih na površini teh klonov. Značilnega zaporedja aminokislin, ki bi bilo pomembno za vezavo na protrombin, nismo našli. Potrdili smo, da so bakteriofagne selekcije potekle na protein G ali protein A in ne na tarčna protitelesa proti protrombinu.

Ključne besede: antifosfolipidni sindrom, protitelesa proti protrombinu, epitopsko mapiranje, bakteriofagni prikaz.

## **Abstract**

---

Antiprothrombin antibodies are found in the blood of patients with antiphospholipid syndrome. Antiphospholipid syndrome is an autoimmune disease with clinical manifestations such as venous and arterial thrombosis and pregnancy complications. Different autoantibodies are found in the blood of these patients. One of the most important are antiprothrombin antibodies. In this master's thesis we focused on antiprothrombin antibodies and the determination of their binding site on prothrombin.

We isolated IgG fraction from the serum of a patient with antiphospholipid syndrome with arterial thrombosis and we used affinity chromatography to obtain antiprothrombin antibodies. We checked the avidity of antibodies in caotropic conditions. To search epitopes of prothrombin we used bacteriophage display libraries of random peptides. We used isolated antiprothrombin antibodies as a target. In the process of selection we isolated individual bacteriophage clones and evaluated their binding to the target with ELISA. We found that the isolated antibodies itself bind poorly to the microtiter plates. We improved the binding by immobilizing the isolated antibodies to the plate through secondary antibodies against human IgG. We isolated DNA of the selected bacteriophage clones and determined the amino acid sequence of the peptides, displayed on their surface. We did not find any significant amino acid sequence important for the binding to the prothrombin. We confirmed that selections with bacteriophage libraries targeted protein G and protein A and not antiprothrombin antibodies.

Key words: antiphospholipid syndrome, antiprothrombin antibodies, epitope mapping, bacteriophage display.

## Seznam okrajšav

---

- anti- $\beta_2$ GPI – protitelesa proti  $\beta_2$  glikoproteinu I
- anti-M13 HRP – monoklonska protitelesa, usmerjena proti bakteriofagu M13, konjugirana s hrenovo peroksidazo
- aPT – protitelesa proti samemu protrombinu
- aPS/PT – od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu
- aPS/PT ELISA – ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu
- BSA – goveji serumski albumin
- DEA – dietanolaminski pufer
- dH<sub>2</sub>O – destilirana voda
- ELISA – encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu
- IgG – imunoglobulini razreda G
- IgM – imunoglobulini razreda M
- MM – molska masa
- OD<sub>600</sub> – optična gostota pri 600 nm
- PBS – s fosfatom pufrana fiziološka raztopina
- pfu – plakotvorna enota
- rpm – vrtljajev na minuto
- TBS – s Tris (3-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol) pufrana fiziološka raztopina



## 1. Uvod

---

### 1.1 Antifosfolipidni sindrom

---

Diagnozo antifosfolipidnega sindroma postavijo bolniku, ki zadosti vsaj enemu kliničnemu in vsaj enemu laboratorijskemu kriteriju. Klinični kriteriji so vsaj ena tromboza (venska, arterijska ali tromboza malih žil) in/ali težave v nosečnosti (smrt morfološko normalnega ploda po 10. tednu nosečnosti, prezgodnje rojstvo pred 34. tednom nosečnosti zaradi eklampsije ali preklampsije, trije zaporedni spontani splavi ali več njih pred 10. tednom nosečnosti). Laboratorijski kriteriji so prisotnost lupusnih antikoagulantov v plazmi, prisotnost protiteles proti kardiolinu (IgG in/ali IgM) v serumu ali plazmi in/ali prisotnost protiteles proti  $\beta_2$  glikoproteinu I (IgG in/ali IgM anti- $\beta_2$ GPI) v serumu ali plazmi. Za vse velja, da so prisotni trajno, torej so prisotnost potrdili v laboratoriju vsaj dvakrat v razmaku vsaj 12 tednov (1, 2).

Lupusni antikoagulant, protitelesa proti kardiolinu ter anti- $\beta_2$ GPI, spadajo v večjo skupino protiteles proti fosfolipidom. Mednje spadajo tudi protitelesa proti protrombinu. Na kakšen način protitelesa proti fosfolipidom povzročajo tromboze, še ni znano. Je pa že A. S. Roubey predvideval, da vplivajo na reakcije hemostaze na fosfolipidnih membranah *in vivo* (3). Če se osredotočimo na protitelesa proti protrombinu, obstaja več teorij: lahko povečajo afiniteto protrombina za anionske fosfolipide in tako tekmujejo s faktorji hemostaze za dostopno fosfolipidno površino; lahko preprečijo s trombinom posredovano sproščanje prostaciklina iz endotelijskih celic in tako vplivajo na aktivacijo proteina C; lahko pa prepoznajo kompleks protrombina-fosfolipidov na endotelijskih celicah, aktivirajo endotelijske celice in tako inducirajo sproščanje prokoagulantnih substanc (6, 10).

### 1.2 Protitelesa proti protrombinu

---

Protitelesa proti protrombinu za zdaj še niso vključena v laboratorijske kriterije za potrjevanje diagnoze antifosfolipidnega sindroma (1, 2). Vendar so pomembna skupina protiteles proti fosfatidilserinu, ker so pri bolnikih z antifosfolipidnim sindromom pogosto prisotna in včasih tudi edina povišana. Zato se kažejo kot potencialni diagnostični označevalec za antifosfolipidni sindrom (4, 5, 9).

Za zaznavanje protiteles proti protrombinu se danes najpogosteje uporablja encimsko-imunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA). Prvi test ELISA je določal protitelesa, usmerjena proti samemu protrombinu (danes imenovan test aPT ELISA), kjer je bil protrombin kot antigen direktno vezan na mikrotitrne plošče (7). Kasneje so Matsuda in sodelavci s testom aPS/PT ELISA določili od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu (aPS/PT)– na mikrotitrne plošče so vezali fosfatidilserin in nanj protrombin (8). Žigon in sodelavci so modificirali prvi opisan test aPS/PT ELISA, tako da so uvedli hkraten nanos protrombina in vzorca, in s tem povečali njegovo analitsko občutljivost (4).

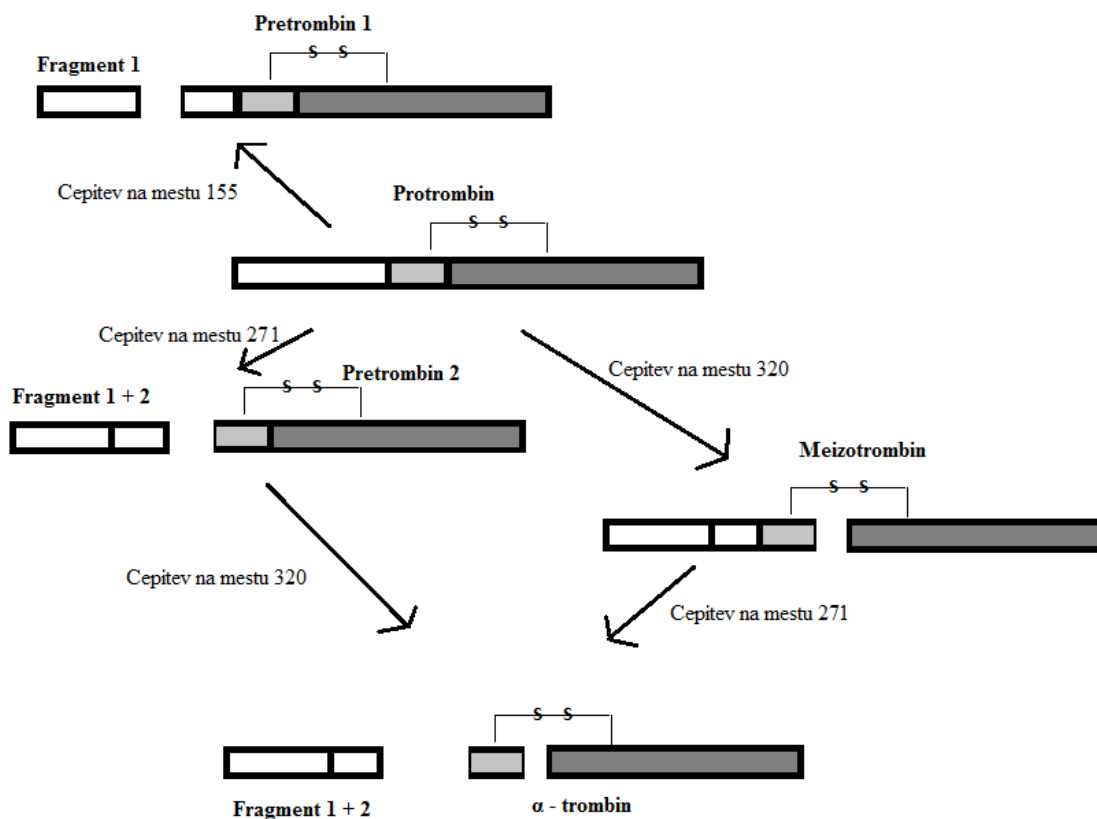
Razloge za razlike med aPT in aPS/PT je predvidel že A. S. Roubey (3). Trdil je, da so nekatera protitelesa proti protrombinu visoko avidna in ta naj bi se vezala na nativni protrombin. Ta bi danes poimenovali protitelesa proti samemu protrombinu (aPT). Nekatera pa so usmerjena proti kriptičnim ali neoantigenom protrombina, ki se pokažejo šele, ko se protrombin veže na anionske fosfolipide. Možno je tudi, da gre za nizko avidna protitelesa, ki se bivalentno vežejo na imobiliziran protrombin. Tu gre torej za protitelesa proti kompleksu fosfatidilserin-protrombin (aPS/PT). Kaže, da gre za dve ločeni skupini protiteles, vendar pa se deloma prekrivata, in z nekaterimi testi zaznamo oboje. Kar se tiče povezave z antifosfolipidnim sindromom, je občutljivost in specifičnost večja za aPS/PT kot za aPT (1, 2). Tudi Atsumi in sodelavci so pokazali, da so aPS/PT bolj povezana z aktivnostjo lupusnih antikoagulantov kot aPT (9). Dokazali so, da so aPS/PT povezana z antifosfolipidnim sindromom in lahko služijo kot potrditveni test za antifosfolipidni sindrom. Nekaj let kasneje so Oku in sodelavci (22) v študiji s 441 bolniki z različnimi avtoimunskimi boleznimi pokazali, da so aPS/PT bolj prevalentna pri pacientih z antifosfolipidnim sindromom v primerjavi s pacienti z drugimi boleznimi. Predlagali so, da bi bila aPS/PT glede na svojo visoko specifičnost tudi primerna za postavljanje diagnoze antifosfolipidnega sindroma kot eden od laboratorijskih kriterijev. Nedavno pa so Sciascia in sodelavci (23) s preglednim člankom povzeli več kot 7000 pacientov in kontrol v 48 študijah o aPT in aPS/PT in pokazali, da aPS/PT predstavljajo večji faktor tveganja za venske in arterijske tromboze kot aPT, in predlagajo nadaljnje raziskave v smeri vključitve aPS/PT v laboratorijske kriterije za antifosfolipidni sindrom.

### 1.3 Protrombin

Protrombin je glikoprotein, ki se sintetizira v jetrih, imenujemo ga tudi faktor II. Sestavljen je iz ene verige iz 579 aminokislin, med njimi so 3 verige ogljikovih hidratov in 10 ostankov  $\gamma$ -karboksiglutaminske kisline (6).

Protrombin je pomemben encim v verižni reakciji strjevanja krvi. Je proencim, ki ga protrombinazni kompleks pretvori v aktivno obliko  $\alpha$ -trombin (Slika 1). Ta nadaljuje reakcijo strjevanja krvi, tako da pretvori fibrinogen v fibrin in sproži nastajanje krvnega strdka. Ima tudi druge vloge, npr. zaščiti fibrinske strdke pred fibrinolizo, aktivira trombocite, aktivira nekatere druge faktorje hemostaze (12).

Epitop oz. epitopi na protrombinu, ki jih prepoznajo protitelesa proti protrombinu, še niso znani (6). Rao in sodelavci (10) so pokazali, da se protitelesa proti protrombinu ob odsotnosti fosfolipidov in kalcija vežejo tako na pretrombin 1 kot na fragment 1 in na celo molekulo protrombina. Raziskava s fragmenti protrombina pa je pokazala, da se pri 8 od 13 bolnikov protitelesa proti protrombinu vežejo pretežno direktno na fragment 1, pri 5 pa na pretrombin 1 (fragment 2 +  $\alpha$  trombin) (11).



Slika 1: Pretvorba protrombina v  $\alpha$ -trombin (6).

## 1.4 Protitelesa

---

Protitelesa oz. imunoglobulini so glikozilirani globularni proteini, ki jih izdelujejo aktivirani limfociti B po stiku z antigenom. Sestavljena so iz dveh enakih težkih in dveh enakih lahkih polipeptidnih verig. Polipeptidne verige nastajajo in se sestavijo v endoplazmatskem retikulumu, v Golgijevem aparatu pa prihaja do glikozilacije in drugih posttranslacijskih sprememb. Glede na vrsto težke verige protitelesa delimo v razrede G, M, A, D in E. Vsako težko in lahko verigo sestavljajo konstantna in variabilna področja. Slednja so odgovorna za specifičnost protitelesa za posamezen antigen (16, 18).

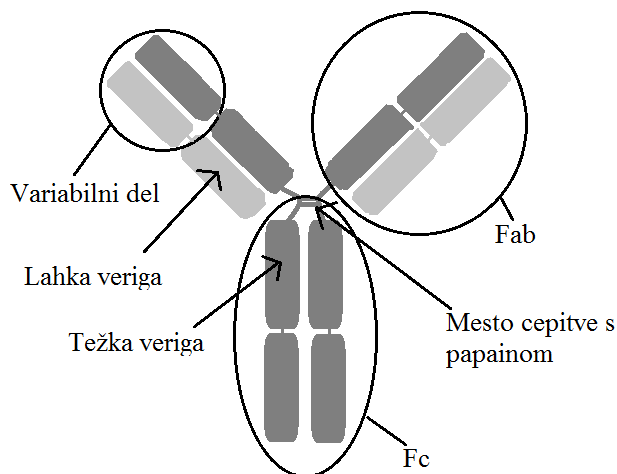
Protitelesa se med seboj razlikujejo ne le po specifičnosti, temveč tudi po afiniteti in avidnosti. Afiniteta opisuje moč vezave enega paratopa protitelesa z enim epitopom antigena. Vezavo zagotavljajo intermolekularne privlačne in odbojne sile. Večinoma so to nekovalentne interakcije kot npr. vodikova vez, elektrostatske sile, van der Waalsove sile ali hidrofobne interakcije (24).

Naravno prisotna protitelesa imajo navadno vsaj dve vezavni mesti za antigene, zato lahko hkrati vežejo več epitopov. Avidnost predstavlja skupno moč vezave med večvalentnim protitelesom in večvalentnim antigenom. Odvisna je tako od afinitet posameznih vezavnih mest kot tudi od njihovega števila, razdalj med njimi in polireaktivnosti protitelesa. Avidnosti ne moremo opisati s termodinamskimi oznakami in jo lahko predvidimo le s kinetičnimi meritvami (19, 20).

Afiniteta in avidnost sta pomembni, ker vplivata na aktivacijo celic B, odstranjevanje antigena in regulacijo imunskega odziva. Od obeh je odvisno, ali se bo protitelo sploh vezalo na antigen *in vivo* ter ali je ta vezava dovolj močna, da bo sprožila nek biološki odziv. Včasih se nizko avidna protitelesa ne vežejo dovolj močno in ne sprožijo biološkega odziva. Če pride do večvalentne vezave, se biološki odziv lahko sproži (19).

Fialova (17) je nedavno povzela več znanih metod za določanje afinitete in avidnosti protiteles. Običajne tehnike v kliničnih laboratorijih vključujejo imunske teste na trdnih nosilcih ob prisotnosti kaotropnih snovi. Avidnost se navadno določa s testom ELISA, kjer kaotropne snovi prekinjejo vezi med protitelesi in antigenom.

Molekulo protitelesa lahko z encimom papainom razgradimo na tri dele – dva enaka Fab dela, ki vsebujeta lahki verigi in prilegajoča dela težkih verig, in Fc regijo (Slika 2). Fc regija ne more vezati antigena, ima pa druge pomembne funkcije, npr. vezanje komplementa, vezanje na celice. Veže protein G ali protein A, kar izkoriščamo pri delu s protitelesi (npr. afinitetna kromatografija) (15, 16).



Slika 2: Zgradba protitelesa (16).

## 1.5 Bakteriofagi

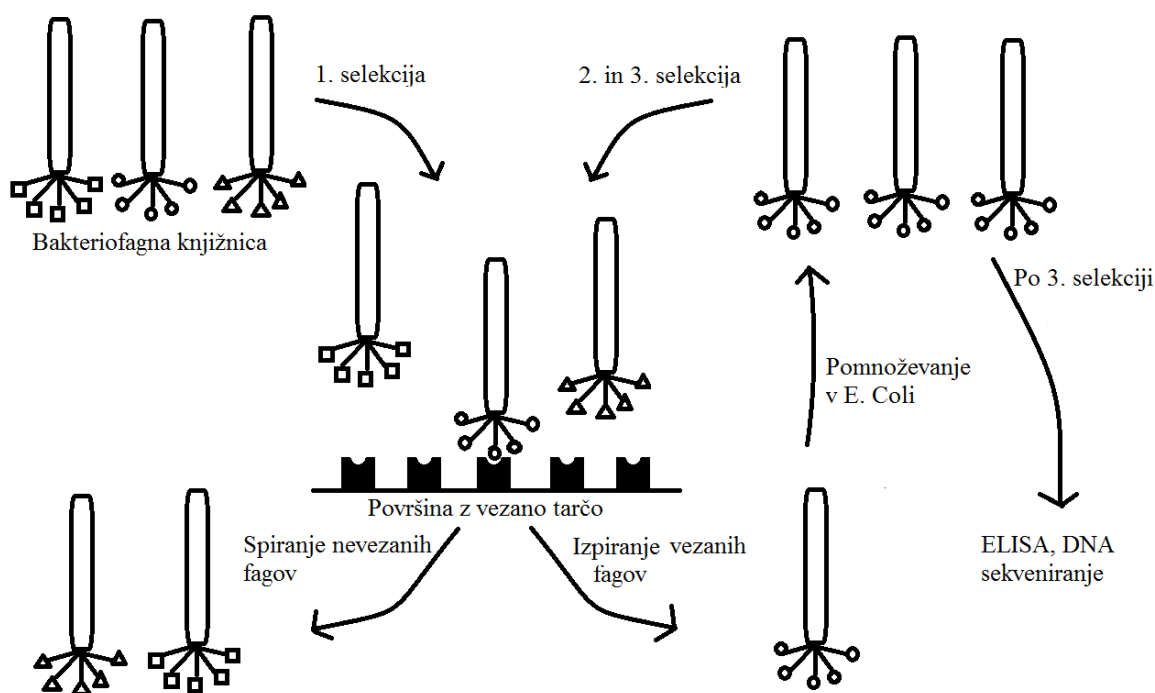
Nitasti bakteriofagi oz. fagi so skupina virusov, ki okužijo po Gramu negativne bakterije s F plazmidom, npr. *E. Coli*. Na splošno nitasti fagi niso litični, in okužene bakterije sprostijo nove viruse brez lize. Med nitaste bakteriofage spada tudi fag M13. Sestavljen je iz proteinske kapside in genoma, ki je enoverižna DNA. DNA kodira 11 genov, med drugim gen za plaščna proteina pIII in pVIII. Ta dva sta pomembna, saj se nahajata na zunanosti faga in nanju lahko vežemo naključne peptide, proteine, protitelesa. Temu rečemo bakteriofagni prikaz (14).

Bakteriofagni prikaz opisuje tehniko, pri kateri je na zunanji površini bakteriofaga izražen posamezen peptid ali protein, DNA te molekule pa se nahaja znotraj bakteriofaga ali v pomožnem bakteriofagu. Omogoča nam torej povezavo med genetskim zapisom in naključnim peptidom, ki ga lahko vežemo na izbrano tarčo (protitelesa, encime, celične receptorje...). Bakteriofagna knjižnica združuje veliko število bakteriofagov, ki na svoji površini predstavljajo različne peptide. V genom faga so vstavljena naključna cDNA zaporedja tako, da se peptid izrazi kot fuzijski protein s plaščnim proteinom. Ti peptidi so lahko dolgi od 6 do 20 aminokislin. Na mestu vsake aminokislina je lahko katerakoli izmed 20 obstoječih. Pri 7 aminokislin dolgih peptidih je v knjižnici teoretično prisotno  $20^7$  različnih peptidov. V realnosti ima bakteriofagna knjižnica stopnjo raznolikosti po navadi okrog  $10^9$  (13, 14).

Fag M13 vsebuje le 5 kopij plaščnega proteina pIII in okoli 2700 kopij proteina pVIII. Pri uporabi knjižnic, kjer so peptidi izraženi kot del pIII, običajno selekcioniramo tiste z višjo afiniteto, kot pri uporabi knjižnic, kjer so peptidi izraženi kot del pVIII. Peptidi so

izraženi na N – končnem delu pIII. Fag M13KE se od divjega tipa nitastega bakteriofaga razlikuje po tem, da ima vstavljen gen za lacZ  $\alpha$ -peptid, ki omogoča modro/beli test (13, 14).

V procesu selekcije peptidov iz bakteriofagnih knjižnic izbrano tarčo imobiliziramo na trdno površino. Nato bakteriofagno knjižnico inkubiramo s tarčo, da se posamezni kloni preko izraženih peptidov vežejo na tarčo. Nevezane klone speremo in zavržemo. Vezane klone pa odstranimo s tarče z izpiranjem s spremembo pH, spremembo koncentracije soli ali specifično z ligandom, ki peptid izpodrine s tarče. Izprane fage pomnožimo in z njimi ponovno izvedemo selekcijo, saj na ta način knjižnico obogatimo. Po treh ali štirih selekcijah vezavo posameznih klonov na tarčo ovrednotimo s testom ELISA. Z izolacijo in sekvenciranjem DNA določimo nukleotidno zaporedje in iz tega aminokislinsko zaporedje peptidov, ki tvorijo interakcijo (Slika 3) (13, 14).



Slika 3: Bakteriofagna selekcija (13).

## 2. Namen

---

Kljub številnim raziskavam epitopi, na katere se vežejo protitelesa proti protrombinu pri antifosfolipidnem sindromu, še niso poznani. Poznavanje teh vezavnih mest bi omogočilo boljše razumevanje pomena in funkcije teh protiteles.

Namen naše naloge je najti epitope protrombina, na katere se vežejo protitelesa proti protrombinu bolnika z antifosfolipidnim sindromom z arterijsko trombozo.

V magistrski nalogi nameravamo uresničiti zastavljene cilje:

1. Izdelava afinitetne kolone z vezanim protrombinom na CNBr aktivirani agaroz.
2. Določitev avidnosti protiteles proti protrombinu v serumu izbranega bolnika z antifosfolipidnim sindromom z arterijskim zapletom, ki ima z aPS/PT ELISA dokazano prisotna IgG aPS/PT protitelesa, s testom ELISA s kaotropnimi pogoji.
3. Izolacija protiteles proti protrombinu iz seruma bolnika z antifosfolipidnim sindromom z arterijskim zapletom z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim proteinom G in na koloni z vezanim protrombinom.
4. Izolirana protitelesa uporabiti kot tarčno molekulo za selekcijo peptidov s pomočjo treh različnih bakteriofagnih knjižnic.
5. Določitev najboljših pogojev za izvedbo testa ELISA za ovrednotenje vezave posameznih peptidov na tarčna protitelesa.
6. Ovrednotenje vezave posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih, na tarčna protitelesa s testom ELISA.
7. Izolacija in sekvenciranje DNA izbranih bakteriofagnih klonov in določitev aminokislinskega zaporedja peptidov, predstavljenih na teh klonih.

### Hipoteze

1. Pričakujemo, da bomo izolirali protitelesa proti protrombinu ustrezne čistosti in specifičnosti.
2. Predvidevamo, da bomo našli ustrezne pogoje za uspešno vrednotenje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčna protitelesa.
3. Predvidevamo, da bodo med pridobljenimi selekcioniranimi peptidi takšni, ki se bodo specifično vezali na protitelesa proti protrombinu. Njihovo aminokislinsko zaporedje bo oponašalo epitope na protrombinu.

### 3. Materiali in oprema

---

#### 3.1 Biološki material

---

##### 3.1.1 Humani serumi

---

Humane serume bolnikov z antifosfolipidnim sindromom z arterijskimi zapleti smo pridobili iz obstoječih bank Laboratorija za imunologijo revmatizma UKC Ljubljana. Delo je bilo odobreno s strani Komisije za medicinsko etiko z odločbo št. 99/04/15 (proučevanje vezavnih karakteristik anti protrombinskih protiteles).

Izbrali smo bolnika, katerega serum je vseboval od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu, kar smo potrdili s testom IgG aPS/PT ELISA. Iz izbranega seruma smo najprej izolirali IgG frakcijo in nato iz te protitelesa proti protrombinu.

##### 3.1.2 Protitelesa

---

- IgG standard, pozitivna in negativna kontrola aPS/PT (Laboratorij za imunologijo revmatizma UKC Ljubljana)
- Kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, Sigma Aldrich
- Sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG in IgM, konjugirana z alkalno fosfatazo
- Sekundarna protitelesa: monoklonska protitelesa, usmerjena proti bakteriofagu M13, konjugirana s hrenovo peroksidazo, GE Healthcare, Little Chalfont, UK
- Fc fragment IgG, Athens Research & Technology, ZDA
- Protitelesa proti protrombinu, izolirana iz serumskega vzorca bolnika z vensko trombozo (Vita Hren, magistrska naloga Epitopsko mapiranje protiteles proti protrombinu pri bolniku z vensko trombozo)

##### 3.1.3 Bakterije

---

- *E. Coli* K12 ER2738, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA

##### 3.1.4 Bakteriofagni kloni

---

Material za optimizacijo testa fagna ELISA so bili bakteriofagni kloni, ki so bili predhodno pridobljeni v selekcijah z bakteriofagnimi knjižnicami, kjer so bila kot tarčna protitelesa uporabljena protitelesa proti protrombinu, izolirana izseruma bolnika z vensko



trombozo (Vita Hren, magistrska naloga Epitopsko mapiranje protiteles proti protrombinu pri bolniku z vensko trombozo).

Uporabili smo 40 bakteriofagnih klonov, pridobljenih v selekcijah s knjižnico Ph.D<sup>TM</sup> 12. Kloni imajo na površini predstavljene različne peptide. Za nekatere bakteriofagne klone so znana aminokislinska zaporedja peptidov, predstavljenih na bakteriofagnih, ta so navedena v Tabela I. Za klone z oznakami MA12S5, MA12S8, MA12S9, MA12S11, MA12S14, MA12S17, MA12N3, MA12N4, MA12N8, MA12N9, MA12N10, MA12N14, MA12N16 in MA12N18 ne poznamo zaporedja aminokislin predstavljenega peptida.

**Tabela I: Bakteriofagni kloni, pridobljeni v selekcijah, kjer so bila kot tarčna protitelesa uporabljena protitelesa proti protrombinu bolnika z vensko trombozo.**

Oznaka bakteriofagnega klona	Zaporedje aminokislin peptida
MA12N5, MA12N6, MA12N7, MA12N15, MA12N17, MA12S19	H S E L W N E V H L R R
MA12S3, MA12S7, MA12S10, MA12S12, MA12S15	E L T W A Y Y H P P R N
MA12S1, MA12S2, MA12S20	R A D S W D D V H L P R
MA12N1, MA12N2, MA12N12	E R W E D T H V S R S R
MA12S4, MA12S13	L T C N G P F C L G Y W
MA12N19	G W V R M Q E S P M N S
MA12N11	H G V N T R S S S V G Q
MA12S6	F I P G G S V N Q R A T
MA12S16	F T P H K H S R L P G N
MA12N13, MA12N20	H L S S F Q N V H V Y R
MA12S18	Y Q P Y S Y R I S V M V

### 3.2 Reagenti

- Agaroza, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- Antibiotik tetraciklin, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- Agaroza, aktivirana s CNBr, Sigma Aldrich
- Bakteriofagne knjižnice
  - Ph.D<sup>TM</sup> 12 Phage Display Peptide Library, New England BioLabs

- Ph.D<sup>TM</sup> 7 Phage Display Peptide Library, New England BioLabs
- Ph.D<sup>TM</sup> C7 Phage Display Peptide Library, New England BioLabs
- Dietanolamin ( $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_2$ ), analitske čistoče
- Dimetilformamid (DMF), Merck, Nemčija
- Dynabeads Protein A, ThermoFisher Scientific
- Dynabeads Protein G, ThermoFisher Scientific
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ), analitske čistoče, Sigma Aldrich, ZDA
- Etanol absolutni, 96 %, analitske čistoče, Sigma Aldrich, ZDA
- Fosfatidilserin (2 g/L), Sigma Aldrich, ZDA
- Glicin ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ ), analitske čistoče, Sigma Aldrich, ZDA
- Goveji serumski albumin (BSA), Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- Humani protrombin, Encyme Research Swansea, UK
- Izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- Kalcijev diklorid dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), analitske čistoče
- Kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), analitske čistoče, Merck, Nemčija
- Kalijev klorid (KCl), analitske čistoče, Merck, Nemčija
- Klorovodikova kislina (HCl), analitske čistoče, Kemika, Hrvaška
- LB Agar, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- LB Broth, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- MAbTrap Kit, GE Healthcare
  - 10-krat koncentrirani vezavni pufer: 20 mM Na fosfat v 20 % etanolu, pH 7,0
  - 10-krat koncentrirani pufer za izpiranje: 0,1 M glicin-HCl, pH 2,7
  - Nevtralizacijski pufer: 1 M Tris-HCl v 20 % etanolu, pH 9,0
- Magnezijev diklorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ), analitske čistoče, Merck, Nemčija
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), analitske čistoče, Sigma Aldrich, ZDA
- Mleko v prahu
- Natrijev hidrogen karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), analitske čistoče, Kemika, Hrvaška
- Natrijev acetat brezvodni ( $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ), analitske čistoče, Merck, Nemčija

- Natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ), analitske čistoče, Merck, Nemčija
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), analitske čistoče
- Natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ ), analitske čistoče, Kemika, Hrvaška
- Natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ), analitske čistoče, Kemika, Hrvaška
- Natrijev jodid ( $\text{NaI}$ ), analitske čistoče, Sigma Aldrich, ZDA
- Ocetna kislina min 99,5 % ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), analitske čistoče, Kemika, Hrvaška
- Paranitrofenilfosfat, 5 mg tablete, Sigma Aldrich, ZDA
- Polietilenglikol 8000 (PEG-8000), Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- Polioksietilen sorbitan monolavrat (Tween 20), Bio-Rad, ZDA
- Vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- Začetnik za pomnoževanje DNA, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
  - -96 gIII Sequencing Primer (20-mer)
- Žveplova kislina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), Merck, Nemčija
- 3-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol (Tris), analitske čistoče, Bio-Rad, ZDA
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), analitske čistoče
- 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid (X-gal), Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA

### 3.3 Pufri in raztopine

---

#### 3.3.1 Izolacija protiteles proti protrombinu

---

##### 3.3.1.1 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim proteinom G

---

- Pufri, ki so del kompleta MAbTrap za izolacijo IgG (GE Healthcare):
  - a. Vezavni pufer: 20 mM Na fosfat v 20 % etanolu, pH 7,0
  - b. Pufer za izpiranje: 0,1 M glicin-HCl, pH 2,7
  - c. Nevtralizacijski pufer: 1 M Tris-HCl v 20 % etanolu, pH 9,0
- 20 % etanol

### 3.3.1.2 Pufri za razsoljevanje vzorca po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim proteinom G

---

- TBS, pH 7,4

Kemikalije	Koncentracija
NaCl (MM =58,44g/mol)	136 mmol
KCl (MM =74,56g/mol)	2,7 mmol
Tris (MM =121,14g/mol)	25 mmol
dH <sub>2</sub> O	
Umerimo pH z 2 M HCl	

- 20 % etanol

### 3.3.1.3 Pufri za pripravo kolone z vezanim protrombinom

---

- 1 mM HCl
- Vezavni pufer: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3
- Blokirni pufer: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
- 0,1 M acetatni pufer 0,5 M NaCl, pH 4,0
- Blokirni pufer z 0,5 M NaCl: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0

### 3.3.1.4 Pufri za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom

---

- TBS z dodatkom 0,1 % Tween 20, pH 7,4 (pufer za spiranje)

Natehtamo NaCl, KCl in Tris ter dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 800 mL. Umerimo pH z 1 M HCl na 7,4, nato dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1000 mL. Sterilno prefiltriramo in dodamo 1 mL Tween 20.

- TBS 0,5 M NaCl z dodatkom 0,1 % Tween 20, pH 7,4 (pufer za izpiranje za nizko avidna protitelesa)
- 4 M NaCl v 0,1 M glicinu z dodatkom 0,1 % Tween 20, pH 2,5 (pufer za izpiranje za visoko avidna protitelesa)

Najprej pripravimo 0,1 M glicin, pH 2,5. Končnemu volumnu raztopine dodamo 4 M NaCl. Sterilno prefiltriramo in dodamo 0,1 % Tween 20.

- 1 M Tris baza
- 0,1 M acetatni pufer 0,5 M NaCl, pH 4,0
- Blokirni pufer z 0,5 M NaCl: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0

### 3.3.1.5 Pufri zakoncentriranje in razsoljevanje vzorca po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim protrombinom

- 
- TBS, pH 7,4

### 3.3.1.6 Pufri za aPS/PT ELISA in aPS/PT ELISA s kaotropnimi pogoji

- 
- Kloroform/metanol (1:4)
  - Spiralni pufer: TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub> z dodatkom 0,05 % Tween 20, pH 7,4

Natehtamo NaCl, KCl, Tris in CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O ter dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 800 mL. Umerimo pH z 1 M HCl na 7,4, nato dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 1000 mL. Sterilno prefiltriramo in dodamo 0,5 mL Tween 20.

- Pufer za blokado, pripravo vzorcev in kontrol: 1 % goveji serumski albumin (BSA) v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub> z 250 mM NaCl, 500 mM NaCl, 1M NaCl, 2M NaCl
- Dietanolaminski pufer (DEA), pH 9,8

Kemikalije	Koncentracija
Dietanolamin (MM =105,14g/mol)	970 mM
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O (MM =203,30g/mol)	0,49 mM
NaN <sub>3</sub> (MM =65,01g/mol)	3,1 mM
dH <sub>2</sub> O	
Umerimo pH z 2 M HCl	

### 3.3.2 Selekcija iz bakteriofagnih knjižnic

Vsi pufri in raztopine za delo s fagi in bakterijami so bili avtoklavirani ali mikrobiološko filtrirani.

- PBS, pH 7,4

Kemikalije	Koncentracija
NaCl (MM =58,44g/mol)	0,136 M
KCl (MM =74,56g/mol)	0,0027 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (MM =141,96g/mol)	0,010 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MM =136,09 g/mol)	0,0018 M
dH <sub>2</sub> O	
Umerimo pH z 2 M HCl	

- PBS 0,05 % Tween 20

Pripravimo PBS, ga mikrobiološko filtriramo in dodamo 0,05 % Tween 20.

- PBS 0,1 % Tween 20

Pripravimo PBS, ga mikrobiološko filtriramo in dodamo 0,1 % Tween 20.

- LB Agar

Zatehtamo 14 g LB Agar in dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 400 mL.

- LB medij

Zatehtamo 8 g LB Broth in dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 400 mL.

- PEG/NaCl

Zatehtamo 8 g PEG-8000 in 5,85 g NaCl in dopolnimo z dH<sub>2</sub>O do 40 mL.

- Agarozni top

Odmerimo 40 mL LB medija, dodamo 19 mg MgCl<sub>2</sub> (197 µL 1 M MgCl<sub>2</sub>) in 0,28 g agaroze.

- 0,1 M Tris-HCl 0,5 M NaCl, pH 8,0 – pufer za izpiranje 1
- 4 M NaCl v 0,1 M glicinu z dodatkom 0,1 % Tween 20, pH 2,5 – pufer za izpiranje 2
- 2 % X-gal v DMF
- 0,1 M IPTG

### 3.3.3 Pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov

---

- PBS, pH 7,4
- LB medij
- PEG/NaCl

### 3.3.4 ELISA posameznih bakteriofagnih klonov

---

- PBS, pH 7,4
- PBS 0,05 % Tween 20, pH 7,4
- 5 % mleko vPBS
- 1 % BSA v PBS
- 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Coating Buffer, 10-kratna založna raztopina, pH 9,6, Candor Bioscience GmbH, Wangen, Nemčija

Pred uporabo redčimo 1:10.

- TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub> 0,1 % Tween 20, pH 7,4
- 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>

### 3.3.5 Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov

---

- Jodidni pufer, pH 8,0

Natehtamo 48,5 mg Tris in 23,98 g NaI, raztopimo v 40 mL dH<sub>2</sub>O. Dodamo 39,3 µL 32 % HCl in 80 µL 0,5 M EDTA ter umerimo pH z 2 M HCl.

- 95 % etanol
- 70 % etanol

### 3.4 Aparature in pribor

---

- Amicon Ultra-4 filter epruvete
- Amicon Ultra-15 filter epruvete
- Analitska tehtnica
- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka
- Avtoklav Kambič
- Avtomatska pipeta
- Avtomatski spiralec mikrotitrskih plošč ELx405 BioTek, program aPS/PT
- Črpalka za črpanje raztopin, Bio-Rad
- Droben laboratorijski material: nastavki za pipete (s filtri in brez njih), epruvete, stojalo za epruvete, mikrocentrifugirke, stojalo za kolone, staničevina, filter za filtriranje vode in TBS
- Falcon epruvete (50 ml, 15 ml)
- Hladilnik
- Indikatorski pH lističi
- Inkubator
- Kolona za afinitetno kromatografijo: 1,5 x 15 cm, Bio-Rad
- MAbTrap kolona z vezanim G proteinom 1 ml, GE Healthcare
- Magnetno mešalo
- Magnetno stojalo
- Membranski filtri za enkratno uporabo 45  $\mu\text{m}$  in 20  $\mu\text{m}$ , Sartorius
- Multipipete, 8 kanalne (30-300  $\mu\text{l}$ , 120-1200  $\mu\text{l}$ )
- Namizna centrifuga, Eppendorf
- Namizna centrifuga, Hettich
- Naprava za vrtenje
- Petrijevke, TPP
- pH meter, Mettler Toledo
- Pipete (1-10  $\mu\text{l}$ , 2-20  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$ ), Eppendorf
- Polistirenske mikrotitrne plošče
  - Costar medium binding
  - MaxiSorb
- Razsoljevalne kolone PD-10 Desalting column, GE Healthcare



- Gugalnik
- Rotacijska črpalka
- Sistem za pripravo ultra čiste vode, Millipore
- Spektrofotometerski čitalec mikrotiterskih plošč SunRise Tecan
- Sterilne centrifugirke s pokrovčkom 10 ml
- Stresalnik
- Termoblok
- UV – spektrofotometer NanoDrop
- Vodna črpalka
- Zamrzovalnik

## 4. Metode dela

---

### 4.1 Izolacija protiteles proti protrombinu

---

#### 4.1.1 Afinitetna kromatografija na koloni z vezanim proteinom G

---

Izolacija IgG je potekala na koloni z vezanim proteinom G, ki je sestavni del analiznega kompleta MAbTrap za izolacijo IgG. Pufre smo pripravili po navodilih proizvajalca. Nevtralizacijski pufer smo uporabljali neredčen, vezavni pufer in pufer za izpiranje pa smo redčili 1:10 z destilirano vodo in ju filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$ . Filtrirali smo tudi 20 % etanol, s katerim smo po uporabi konzervirali kolono. Eno kolono smo uporabili za večkratno izolacijo IgG iz seruma enega bolnika.

Kolono, pufre in serumski vzorec smo pred uporabo segreli na sobno temperaturo. Razredčili in filtrirali smo pufre ter redčili vzorec 1:1 z vezavnim puffrom. Novo kolono smo sprali z 10 mL destilirane vode s pomočjo brizge in posebnega adapterja. Pazili smo, da v kolono ni zašel zračni mehurček. Pretok skozi kolono je bil ves čas dela s kolono 1 kapljica/sekundo. Kolono smo sprali z 10 mL vezavnega pufra. Nato smo nanjo nanesti redčen vzorec (500  $\mu\text{L}$  seruma + 500  $\mu\text{L}$  vezavnega pufra) preko filtra z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$ , ki smo ga prej omočili z vezavnim puffrom. Kolono smo spirali z 10 mL vezavnega pufra in zbirali frakcije po 1 mL ter merili absorbanco s spektrofotometrom Nanodrop, dokler nismo sprali vseh nevezanih proteinov (absorbanca spirka je bila enaka absorbanca vezavnega pufra). Nato smo vezane IgG izprali s 5 mL izpiralnega pufra. Zbirali smo frakcije po 0,5 mL v vnaprej pripravljene mikrocentrifugirke z nevezavnim puffrom. pH vrednosti smo preverjali z indikatorskimi lističi in jih po potrebi uravnavali na 8,0 z nevtralizacijskim puffrom. Koncentracijo IgG smo merili s spektrofotometrom Nanodrop. Izbrane izpirke z največjo koncentracijo IgG smo združili. Na koncu smo kolono sprali z 10 mL vezavnega pufra in jo konzervirali z 10 mL 20 % etanola ter shranili v hladilnik pri temperaturi 4°C. Ob ponovni uporabi smo kolono sprali le z 10 mL vezavnega pufra, nato pa nanesti vzorec.

#### 4.1.2 Razsoljevanje vzorcev po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim proteinom G

---

Za razsoljevanje izoliranih IgG smo uporabili razsoljevalno kolono PD-10 (GE Healthcare). Združenim izpirkom z največ IgG iz afinitetne kromatografije na koloni z

vezanim proteinom G smo tako zamenjali izpiralni pufur, nevtraliziran z nevtralizacijskim pufrom, s fiziološkim pogojem bolj podobnim TBS.

Največji volumen vzorca, ki smo ga lahko nanegli na razsoljevalno kolono, je bil 2 mL, zato smo uporabili dve koloni hkrati.

Z nove kolone smo naprej odlili konzervirno raztopino in vpeli kolono v stojalo pri sobni temperaturi. Kolono smo sprali s 25 mL TBS in pustili, da je raztopina s prostim padom popolnoma vstopila v kolono. Nato smo nanegli vzorec (približno 2 mL združenih izpirkov z visoko koncentracijo IgG) in začeli takoj loviti frakcije po 1,5 mL. Kolono smo sprali s 15 mL TBS. Frakcijam smo merili koncentracijo IgG s spektrofotometrom Nanodrop ter združili izbrane frakcije z največjo koncentracijo IgG. Združenim frakcijam smo pomerili koncentracijo s spektrofotometrom Nanodrop in jih shranili v zamrzovalnik. Kolono smo natosprali z 20 mL dH<sub>2</sub>O in konzervirali z 20 mL 20 % etanola. Če smo kolono uporabili naslednji dan, smo jo le sprali z 20 mL TBS. Kolone smo shranili v hladilniku pri temperaturi 4°C.

#### 4.1.3 Priprava kolone z vezanim protrombinom

---

Najprej smo 4 g agaroze, aktivirane s CNBr, 30 min nabrekli s 50 ml 1 mM HCl na sobni temperaturi. Nastal je gel, ki smo ga prenesli v Bio-Rad kolono (1,5 cm × 15 cm), vpeto v stojalo. Kolono smo sprali s 500 mL 1 mM HCl in spodaj odsesavali z vodno črpalko (pretok 200 mL/h). Nato smo sprali še s 25 mL 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M NaCl, pH 8,3. 27 mg liofiliziranega protrombina smo raztopili v 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M NaCl, pH 8,3 in ga nanegli na kolono, jo zaprli in pretresli. Kolono smo preko noči diagonalno vrteli na napravi za vrtenje pri 4°C. Zjutraj smo jo vpeli na stojalo in s prostim padom odsesali raztopino nevezanega protrombina v avtoklavirano stekleničko, ki smo jo označili in shranili na -80°C. Kolono smo sprali s 70 mL vezavnega pufra. Nezasedena mesta na nosilcu smo blokirali z 20 mL 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, tako da smo raztopino iz kolone prenesli v plastično 50 mL centrifugirko in jo vertikalno vrteli na napravi za vrtenje dve uri pri sobni temperaturi. Nato smo raztopino gela prelili nazaj v vpeto kolono. Centrifugirko smo sprali z 0,1 M Tris-HCl in vse nanegli na kolono, ki smo jo odsesavali s prostim padom. Kolono smo postavili v hladno sobo na 4°C in priklopili rotacijsko črpalko. S hitrostjo pretoka 150 mL/h smo odsesali preostalo raztopino Tris-HCl iz kolone. Kolono smo nato spirali z dvakratnim volumnom kolone (30 mL) z vezavnim pufrom, z acetatnim pufrom, z vezavnim pufrom, z acetatnim pufrom, z blokirnimi pufromi z 0,5 M NaCl in spet

z acetatnim pufrom. Kolono smo konzervirali z 20 % etanolom, jo zaprli in vpeto v stojalo shranili na 4°C.

#### 4.1.4 Afinitetna kromatografija na koloni z vezanim protrombinom

---

Izolacijo protiteles proti protrombinu smo izvedli pri temperaturi 4°C. Uporabili smo afinitetno kolono z vezanim protrombinom, ki smo jo pripravili sami. Kolono smo imeli priključeno na Bio-Rad črpalko za črpanje raztopin. Pazili smo, da do stacionarne faze kolone ni prišel zrak.

Kolono smo vpeli na stojalo in jo s cevkami (premer 3,1 mm) povezali s črpalko. Pretok na črpalki smo nastavili na 2 mL/min. Najprej smo kolono spirali s 100 mL 136 mM TBS z 0,1 % Tween 20, pH 7,4. Nato smo kolono povezali s Falcon epruveto, v kateri je bil mikrobiološko filtriran vzorec IgG frakcije (združene vse izprane in razsoljene IgG frakcije enega bolnika, to je približno 30 mL s koncentracijo 1 g/L). Vzorec smo pustili krožiti skozi kolono preko noči s pretokom 0,8 mL/min. Naslednji dan smo spirali kolono s 100 mL 136 mM TBS z 0,1 % Tween 20, pH 7,4, s pretokom 2,0 mL/min. Zbirali smo frakcije po 15 mL in jim s spektrofotometrom Nanodrop določili koncentracijo IgG. Tako smo ocenili, koliko IgG se je vezalo na kolono. Ko je bila absorbanca zadnjega spirka enaka absorbanci spiralnega pufra, smo vedeli, da smo sprali vse nevezane IgG. Pripravili smo kolektor z oštevilčenimi epruvetami, v katere smo zbirali po 2 mL izpirka. Nizko avidna protitelesa smo izprali s 40 mL 0,5 M NaCl TBS z 0,1 % Tween 20, pH 7,4. Pretok je bil 1,0 mL/min, zbrali smo približno 20 frakcij. Visoko avidna protitelesa smo izpirali s 40 mL 4 M NaCl v 0,1 M glicinu z 0,1 % Tween 20, pH 2,5. Pretok je bil 1,0 mL/min, zbrali smo približno 20 frakcij. Vseskozi smo spremljali spremembo prevodnosti in UV-svetlobe na računalniku ter tako sledili spremembam pufra in izpiranju protiteles. Zbranim frakcijam smo preverjali pH vrednosti z indikatorskimi lističi in jih po potrebi uravnali z 1 M Tris bazo na pH 7,0. Sledila je regeneracija kolone – trikrat izmenično spiranje z blokirnim pufrom z 0,5 M NaCl in acetatnim pufrom, V = 30 mL, pretok je bil 1,5 mL/min. Tudi med regeneracijo smo izpirke zbirali in jim uravnali pH vrednosti ter pomerili koncentracijo IgG zaradi morebitnega izpiranja visoko avidnih protiteles proti protrombinu. Po regeneraciji smo kolono sprali s 100 mL 136 mM TBS z 0,1 % Tween 20, pH 7,4. Kolono smo odklopili z rotacijske črpalke in jo konzervirali s prostim padom z 20 mL 20 % etanola, zaprli ter shranili pri temperaturi 4°C. Vse cevke na črpalki smo sprali z destilirano vodo. Ustrezne frakcije izoliranih protiteles smo združili in označili.

#### 4.1.5 Koncentriranje in razsoljevanje vzorca po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim protrombinom

---

Frakcije vzorcev po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim protrombinom je bilo potrebno skoncentrirati in razsoliti. Izbrane frakcije z visokimi vsebnostmi IgG smo ločeno združili – pretežno nizko avidna oziroma pretežno visoko avidna protitelesa proti protrombinu, to je protitelesa, izprana z blokirnimi ali acetatnim pufrom.

Pripravili smo dve Amicon Ultra-4 filter epruveti in v vsako nanesli prvih 3,5 mL združene frakcije. Centrifugirali smo z Eppendorf centrifugo ob uporabi rotorja F-35-6-30, 7197 g, 5 min do 500  $\mu$ L preostanka. Nato smo v epruveti dodali drugih 3,5 mL vzorca in ponovili postopek, dokler nismo skoncentrirali celotne združene frakcije. Nazadnje smo v epruveti dali 3,5 mL TBS in centrifugirali pod enakimi pogoji. Tako smo zamenjali pufer in dobili 500  $\mu$ L protiteles v TBS. Koncentracijo IgG protiteles proti protrombinu smo pomerili s spektrofotometrom Nanodrop, vzorce ustrezno označili in shranili v zamrzovalnik.

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

---

Uporabili smo modificiran test aPS/PT ELISA, ki so ga opisali Žigon in sodelavci (4).

V vdolbinice polistirenske mikrotitrne plošče (Costar medium binding) smo nanesli 40  $\mu$ L fosfatidilserina s koncentracijo 50 mg/L v raztopini metanol:kloroform (4:1) in nepokrite plošče inkubirali preko noči na 4°C, da je raztopina metanol:kloroform izhlapela. Naslednji dan smo nevezana mesta na plošči 1 uro blokirali na sobni temperaturi z 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Nato smo plošče sprali na spiralniku plošč s spiralnim pufrom TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub> z 0,05 % Tween 20, pH 7,4. Sledil je nanos protrombina in vzorcev s protitelesi neposredno drugega za drugim. Najprej smo nanesli 25  $\mu$ L protrombina (20 mg/L v 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) v vzorčne vdolbinice in 25  $\mu$ L 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 v slepe vdolbinice. Nato smo v vse vdolbinice dodali še 25  $\mu$ L internega standarda ter vzorcev, redčenih 1:50 v 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Končna koncentracija v vsaki vdolbinici je bila tako 10 g/L, redčitev vzorca pa 1:100. Inkubirali smo eno uro in nato sprali s TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub> z 0,05 % Tween 20, pH 7,4. Sledil je nanos sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti človeškim IgG, označena z alkalno fosfatazo), redčenih 1:3000 v 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Inkubirali smo eno uro in plošče sprali s TBS

5 mM CaCl<sub>2</sub> z 0,05 % Tween 20, pH 7,4. Nanesli smo 100 µL substrata para-nitrofenil fosfata v DEA pufu s koncentracijo 1 g/L. Inkubirali smo 5 min in merili absorpcijo s čitalcem mikrotitrskih plošč pri 405 nm.

Za določitev umeritvene krivulje smo uporabili interni standard. To je IgG frakcija izbranega bolnika s pozitivnimi vrednostmi aPS/PT. Pri vsaki izvedbi aPS/PT ELISA smo imeli tudi pozitivno in negativno kontrolo (izbrana seruma bolnikov). Za ozadje smo merili absorbanco reagentov (brez seruma), ki smo ga odšteli od vseh meritev vzorcev, standardov in kontrol.

#### 4.1.7 aPS/PT ELISA s kaotropnimi pogoji

---

S kaotropnim testoma PS/PT ELISA smo določali avidnost protiteles proti protrombinu. Uporabili smo enako metodo kot pri testu aPS/PT ELISA, spremenili smo le pogoje vezave protiteles. Vzorce smo redčili v 1 % BSA v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 z različnimi koncentracijami NaCl – 250 mM, 500 mM, 1M in 2M.

#### 4.2 Selekcija iz bakteriofagnih knjižnic

---

Z izbranimi tarčnimi protitelesi (izolirana in prečiščena protitelesa proti protrombinu bolnika z arterijsko trombozo) smo izvedli tri bakteriofagne selekcije s tremi različnimi bakteriofagnimi knjižnicami. Začeli smo s Ph. D<sup>TM</sup> 12 bakteriofagno knjižnico. V treh zaporednih selekcijah z eno bakteriofagno knjižnico smo tarčna protitelesa izmenično imobilizirali na magnetne mikrosfere Dynabeads s proteinom A in Dynabeads s proteinom G.

Najprej smo v 1,5 mL mikrocentrifugirko dali 100 µL PBS z 0,05% Tween 20. Vanjo smo prenesli 15 µL mikrosfer (0,45 mg Dynabeads protein A ali G) in rahlo premešali na vibracijskem stresalniku ter s pomočjo magnetnega stojala odstranili supernatant. Mikrosfere smo še enkrat sprali s 100 µl PBS z 0,05 % Tween 20 in odstranili supernatant. Mikrosferam smo dodali 250 µl PBS z 0,05 % Tween 20, v katerem smo razredčili 4,0 µg koncentriranih protiteles proti protrombinu (11,2 µL s koncentracijo 0,367 g/L). Rahlo smo premešali na vibracijskem stresalniku in inkubirali 30 min na sobni temperaturi s stresanjem 600 rpm na termobloku, med inkubacijo smo premešali na vibracijskem stresalniku vsakih 10 min. V komori z laminarnim pretokom zraka smo pripravili bakteriofagno knjižnico: 10 µL knjižnice Ph. D<sup>TM</sup> 12 smo dodali v 490 µl PBS z

0,05 % Tween 20. Po končani inkubaciji smo nevezana protitelesa pobrali in shranili v hladilnik.

Mikrosfere smo sprali trikrat s 500  $\mu$ L PBS z 0,05 % Tween 20 in odstranili supernatant z magnetom. Med vsakim spiranjem smo mikrocentrifugirko stresali 1 minuto pri 600 rpm. Sprane mikrosfere smo razdelili v dve mikrocentrifugirki. V eni smo bakteriofage, vezane na tarčo, odstranjevali specifično, v drugi nespecifično. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 250  $\mu$ L pripravljene knjižnice v PBS z 0,05 % Tween 20 ( $2 \times 10^{11}$  pfu v 1. stopnji). Rahlo smo premešali na vibracijskem stresalniku in inkubirali na termobloku 1 h pri sobni temperaturi in 600 rpm. Vsakih 20 min smo rahlo premešali na vibracijskem stresalniku, da se mikrosfere niso posedle. Bakteriofagne klonove, ki se niso vezali na tarčo, imobilizirano na magnetne mikrosfere, smo sprali desetkrat z 950  $\mu$ L PBS z 0,1 % Tween 20, vmes smo inkubirali 1 min na termobloku pri sobni temperaturi in 600 rpm. Pred izpiranjem vezanih bakteriofagnih klonov smo mikrosfere prenesli v sveže mikrocentrifugirke.

#### *4.2.1.1 Specifično izpiranje vezanih fagov*

---

Odstranili smo supernatant iz mikrocentrifugirke za specifično izpiranje in dodali protrombin (200  $\mu$ L protrombina s koncentracijo 0,1 g/L v PBS z 0,05 % Tween 20). Inkubirali smo 45 min na termobloku pri sobni temperaturi in 600 rpm. Po inkubaciji smo na magnetnem stojalu ločili mikrosfere od supernatanta in ga prenesli v novo mikrocentrifugirko. Supernatant je vseboval prvi izpirek, v katerem so bili fagi. Od tega smo odvzeli 5  $\mu$ L za določanje števila izpranih bakteriofagov, preostanek pa smo pomnožili za drugo stopnjo selekcije.

#### *4.2.1.2 Nespecifično izpiranje vezanih fagov*

---

Nespecifično izpiranje vezanih fagov smo naredili v dveh korakih. Odstranili smo supernatant ter v mikrocentrifugirko dodali 200  $\mu$ L pufra za izpiranje 1 (4 M NaCl 0,1 M glicin 0,1 % Tween 20, pH 2,5). Premešali smo na vibracijskem stresalniku in inkubirali 9 minut na termobloku pri sobni temperaturi in 600 rpm. Po inkubaciji smo pobrali supernatant, ki je vseboval bakteriofage, ter v mikrocentrifugirko dodali 200  $\mu$ L pufra za izpiranje 2 (0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl, pH 8). Nato smo v mikrocentrifugirko z mikrosferami dodali 200  $\mu$ L pufra za izpiranje 2 (0,5 M NaCl 0,1 M Tris-HCl, pH 8). Premešali smo na vibracijskem stresalniku in inkubirali 9 minut na termobloku pri sobni

temperaturi in 600 rpm. Po inkubaciji smo pobrali supernatant, v katerem so bili fagi, ter ga dodali v mikrocentrifugirko, ki je vsebovala izpirek iz prvega koraka. Od tega smo odvzeli 5  $\mu\text{L}$  za določanje števila izpranih fagov, preostanek pa smo pomnožili za drugo stopnjo selekcije.

#### 4.2.1.3 Pomnoževanje izpranih bakteriofagov

---

Za pomnoževanje fagov smo v dve 250 mL erlenmajerici dali 20 mL LB medija, 20  $\mu\text{L}$  10 mg/mL tetraciklina in eno kolonijo bakterije *E. coli* K12 ER2738, ki smo jo predhodno pripravili na trdnem LB agar gojišču s tetraciklinom 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Erlenmajerici smo inkubirali pri 37°C na stresalniku pri 250 rpm, dokler ni bila dosežena optimalna gostota bakterij ( $\text{OD}_{600} \approx 0,01\text{--}0,05$ ). Izpirek, pridobljen s specifičnim izpiranjem, in izpirek, pridobljen z nespecifičnim izpiranjem, smo ločeno pomnoževali. V eno suspenzijo bakterij smo dodali 195  $\mu\text{L}$  izpirka, pridobljenega s specifičnim izpiranjem, v drugo pa 595  $\mu\text{L}$  izpirka, pridobljenega z nespecifičnim izpiranjem. Pomnoževali smo 4,5 h na 37 °C pri 250 rpm.

#### 4.2.1.4 Določanje števila bakteriofagov (bakteriofagna titracija)

---

Za določanje števila fagov, ki smo jih izprali v posamezni selekcijski stopnji, smo izvedli bakteriofagno titracijo. Izpirek smo redčili 10, 10<sup>2</sup> in 10<sup>3</sup>-krat. 10  $\mu\text{L}$  vsake redčitve smo dodali k 200  $\mu\text{L}$  svežih pomnoženih bakterij v LB mediju ( $\text{OD}_{600} \approx 0,5$ ). Mikrocentrifugirke smo 5 minut inkubirali na sobni temperaturi, da so fagi inficirali bakterije, nato pa vsebino prenesli v 3 mL staljene agaroze, termostahirane na 50 °C. Bakterije v agarozni smo premešali ter takoj vlili na segrete petrijevke s trdnim LB gojiščem (37°C) z dodanim X-gal in IPTG. Petrijevke smo inkubirali na 37°C preko noči. Naslednji dan smo prešteli modre plake na posamezni plošči in preračunali količino fagov v posameznem izpirku.

Bakteriofagno titracijo po pomnoževanju smo izvedli enako kot je opisano zgoraj, le da smo suspenzijo prečiščenih bakteriofagov redčili 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> in 10<sup>10</sup>-krat.

#### 4.2.1.5 Izolacija bakteriofagov po pomnoževanju

---

Bakterijsko kulturo, v kateri smo pomnoževali bakteriofage, smo iz 250 mL erlenmajeric prelili v 50 mL centrifugirko in centrifugirali 10 min pri 4°C in 11000 rpm. Supernatant smo prelili v novo centrifugirko in še enkrat centrifugirali pod enakimi pogoji. Supernatant smo prelili v novo centrifugirko in dodali 4 mL raztopine PEG/NaCl. Dobro



smo premešali in obarjali fage preko noči pri 4°C. Naslednji dan smo centrifugirali oborjene fage 15 min pri 4°C in 11000 rpm. Supernatant smo zavrgli, kratko centrifugirali in preostanek supernatanta odstranili s pipeto. Oborino bakteriofagov smo resuspendirali v 1 mL PBS in jih prenesli s pipeto v 1,5 mL mikrocentrifugirke. Te smo centrifugirali 5 min pri 4°C in 14000 rpm ter s tem odstranili netopne nečistote. Supernatant smo prenesli v 200 µL PEG/NaCl in ponovno obarjali bakteriofage na ledu 1 h. Oborjene fage smo centrifugirali 10 min pri 4°C in 14000 rpm. Supernatant smo zavrgli, kratko centrifugirali in odstranili supernatant s pipeto. Oborino bakteriofagov smo resuspendirali v 200 µL PBS. Centrifugirali smo 1 min pri 14000 rpm, da smo odstranili netopne nečistote, in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Supernatant je vseboval pomnožene in prečiščene bakteriofage, ki smo jih uporabili v naslednji selekcijski stopnji. Od teh smo vzeli po 5 µL za določanje števila pomnoženih bakteriofagov, preostanek pa shranili v hladilniku pri 4°C za naslednjo stopnjo selekcije.

Drugo in tretjo stopnjo selekcije smo delali enako kot prvo. V vsako naslednjo stopnjo smo dodali znano količino ( $2 \times 10^{11}$  pfu ali maksimalno število, ki smo ga uspeli pridobiti) pomnoženih bakteriofagov iz prejšnje stopnje.

Selekciji s knjižnicama Ph. D<sup>TM</sup> 7 in Ph. D<sup>TM</sup> C7 sta potekali na enak način.

#### 4.3 Izolacija in pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov

---

Po zadnji selekcijski stopnji z vsako od uporabljenih knjižnic smo iz petrijevk, na katerih je zraslo manj kot 100 plakov, naključno izbrali 20 modrih plakov iz specifičnega in 20 modrih plakov iz nespecifičnega izpiranja. Pazili smo na to, da smo izbrali plake, ki so bili dobro ločeni od ostalih, tako modrih kot potencialno prisotnih prosojnih plakov (divji tip).

Prekonočno kulturo *E. coli* v LB gojiščus tetraciklinom 10 mg/L, smo redčili 1:100 z LB gojiščem s tetraciklinom 10 mg/L. Redčeno gojišče smo aseptično alikvotirali po 2 mL v sterilne centrifugirke s pokrovčkom. S sterilnim pipetnim nastavkom smo prenesli en naključno izbran modri plak v gojišče v centrifugirki. Plake, ki so vsebovali posamezne klone bakteriofagov, smo pomnoževali 4,5 h na 37°C in močno stresali (600 rpm). Po pomnoževanju smo vsebino iz posamezne centrifugirke prelili v 2 mL mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 min pri 14000 rpm in 4°C. Nato smo supernatant prelili v sveže mikrocentrifugirke in še enkrat centrifugirali pod enakimi pogoji. Supernatant smo prelili v

nove mikrocentrifugirke in shranili pri 4°C. Tako smo dobili pomnožene in ločene bakteriofagne klone v LB mediju.

Za določanje koncentracije fagov smo del fagov oborili iz LB medija in ga resuspendirali v PBS. V nove mikrocentrifugirke smo dali 750 µL pomnoženih fagov v LB mediju in dodali 150 µL PEG/NaCl, dobro premešali ter pustili obarjati preko noči na 4 °C. Naslednji dan smo mikrocentrifugirke centrifugirali 10 min pri 14000 rpm in 4 °C. Supernatant smo zavrgli, mikrocentrifugirke kratko centrifugirali in preostanek supernatanta odstranili s pipeto. Oborino fagov smo resuspendirali v 200 µL PBS. Z Nanodrop smo pomerili absorbanco pri 269 nm in 320 nm. Po ustrezni enačbi (Enačba 1) smo preračunali koncentracijo fagov v posamezni mikrocentrifugirki (30).

**Enačba 1: Koncentracija fagov.**

$$c = \frac{(A_{269} - A_{320}) * 6 * 10^{16}}{7222}$$

#### 4.4 Optimizacija testa ELISA za določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo

---

##### 4.4.1 Osnovni izvedba testa fagna ELISA

---

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo napipetirali 100 µl 25 µg/mL tarčnih protiteles, to je izoliranih protiteles proti protrombinu, v PBS. Mikrotitrsko ploščo smo prekrili s folijo in inkubirali preko noči na 4°C in 50 rpm.

Naslednji dan smo s tarčo nezasedeno površino v vdolbinicah blokirali z 200 µL 1 % BSA v PBS. Sočasno smo za testiranje vezave na ozadje za vsak klon blokirali vdolbinico brez tarče. Blokirali smo 1,5 h na sobni temperaturi in 50 rpm. Nevezane proteine smo odstranili s petkratnim spiranjem z 250 µL PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim nanosom spiralnega pufra smo ploščo stresali 5 min na 50 rpm. V vdolbinice smo nanесли po 100 µL posameznih pomnoženih bakteriofagnih klonov ( $0,7-1,1 \times 10^{11}$  pfu/mL) v LB mediju. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 rpm. Nevezane fage smo petkrat sprali z 250 µL PBS z 0,1 % Tween 20. Nato smo v vsako vdolbinico napipetirali po 100 µL sekundarnih protiteles proti fagom (anti-M13 HRP), ki smo jih redčili 1:5000 v 1 % BSA v PBS. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 rpm. Nevezana sekundarna protitelesa smo petkrat sprali z 250 µL PBS z 0,1 % Tween 20. V vse vdolbinice smo dodali 200 µL substrata TMB z dodanim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mL TMB) in inkubirali od

10 min do 1 h. Ko je barva postala temno modra, smo ustavili reakcijo s 50  $\mu\text{L}$  2 M žveplove kisline. Absorbanco smo izmerili na čitalcu Tecan Safire pri valovni dolžini 450 nm.

#### 4.4.2 Zmanjšanje količine tarčnih protiteles in sprememba blokirnega sredstva

---

Postopek smo izvedli podobno kot pri osnovnem testu fagna ELISA. Spremenili smo količino protiteles, ki smo jih vezali na ploščo. Nanesli smo 100  $\mu\text{L}$  s koncentracijo 1  $\mu\text{g/mL}$ . Spremenili smo tudi sredstvo za blokiranje. Blokiralimo z 200  $\mu\text{L}$  5 % mleka v PBS.

#### 4.4.3 Nanašanje enotne koncentracije bakteriofagov na tarčo

---

Postopek smo izvedli podobno kot test fagna ELISA, z manjšo količino tarčnih protiteles in blokado z mlekom. Tokrat smo nanesli na tarčo  $1 \times 10^{10}$  pfu bakteriofagov v 100  $\mu\text{L}$  PBS za vsak posamezni klon.

#### 4.4.4 Menjava pufru za vezavo tarčnih protiteles

---

Postopek smo izvedli podobno kot v testu fagna ELISA z nanosom enotne koncentracije bakteriofagov. Pri vezavi tarčnih protiteles v vdolbinice smo protitelesa razredčili do koncentracije 1  $\mu\text{g/mL}$  v Coating Buffer in ne v PBS.

#### 4.4.5 Menjava pufru za vezavo in spiranje

---

Postopek smo izvedli podobno kot v osnovnem testu fagna ELISA, le da smo namesto pufru PBS uporabili pufer TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . V vsako vdolbinico mikrotitrne ploščice smo napipetirali po 100  $\mu\text{L}$  2  $\mu\text{g/mL}$  tarčnega protitelesa v TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Nevezana tarčna protitelesa smo odstranili s petkratnim spiranjem z 250  $\mu\text{L}$  TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$  z 0,1 % Tween 20. S tarčo nezasedeno površino v vdolbinicah smo blokiralimo z 200  $\mu\text{L}$  1 % BSA v TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . V vdolbinice smo nanesli  $1 \times 10^{10}$  vsakega bakteriofagnega klona v 100  $\mu\text{L}$  TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Nevezane fage smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$  z 0,1 % Tween 20. V vsako vdolbinico smo nato napipetirali po 100  $\mu\text{L}$  sekundarnih protiteles proti fagom (anti-M13 HRP), ki smo jih redčili 1:5000 v 1 % BSA v TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Nevezana sekundarna protitelesa smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  TBS 5 mM  $\text{CaCl}_2$  z 0,1 % Tween 20.

#### 4.4.6 Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles

---

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo dodali po 200  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kozjih anti-IgG protiteles v PBS in s folijo prekrile inkubirali preko noči na 4°C in 50 rpm.

Nevezana protitelesa smo odstranili s trikratnim spiranjem z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim nanosom spiralnega pufra smo ploščo stresali 5 min pri 50 rpm. Nato smo dodali 200  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tarčnih protiteles v 1 % BSA v PBS. Mikrotitrsko ploščico smo prekrili s folijo in inkubirali 2 h na sobni temperaturi in 50 rpm. Za določanje vezave bakteriofagov neposredno na protitelesa za imobilizacijo smo kozja anti-IgG protitelesa namesto s tarčnimi protitelesi inkubirali s PBS. Ploščo smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. Nezasedeno površino smo blokirali z 200  $\mu\text{L}$  1 % BSA v PBS. Za določanje vezave bakteriofagov na blokirno sredstvo smo pripravili vdolbinice brez tarče in protiteles za imobilizacijo, le z blokirnim sredstvom. Ploščo smo inkubirali 1,5 h na sobni temperaturi in 50 rpm. Nevezane proteine smo sprali s petkratnim spiranjem z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. V vse vdolbinice smo dodali 100  $\mu\text{L}$  posameznih bakteriofagnih klonov v LB ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{11}$  pfu/mL), vsak klon trikrat. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 rpm. Nevezane fage smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. V vsako vdolbinico smo nato dodali po 100  $\mu\text{L}$  proti fagom usmerjenih sekundarnih protiteles (anti-M13 HRP), ki smo jih redčili 1:5000 v 1 % BSA v PBS. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 rpm. Nevezana sekundarna protitelesa smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. V vse vdolbinice smo dodali 200  $\mu\text{L}$  substrata TMB z dodanim  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,2  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mL}$  TMB) in spremljali spremembo barve. Po petih minutah je barva postala temno modra in reakcijo smo ustavili s 50  $\mu\text{L}$  2 M žveplove kisline. Absorbanco smo izmerili na čitalcu Tecan Safire pri valovni dolžini 450 nm.

#### 4.4.7 Uporaba manjše količine kozjih anti-IgG protiteles za imobilizacijo in manjše količine tarčnih protiteles

---

Postopek smo izvedli enako kot v prejšnjem poskusu, zmanjšali smo le količino kozjih anti-IgG protiteles. Nanesli smo le 100  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kozjih anti-IgG protiteles v PBS. Zmanjšali smo tudi količino tarčnih protiteles. Uporabili smo 100  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tarčnih protiteles v 1 % BSA v PBS.

#### 4.4.8 Kompetitivna ELISA, izpodrivanje s fragmentom protiteles Fc

---

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo nanegli po 100  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kozjih anti-IgG protiteles v PBS in s folijo prekrita mikrotitrna ploščica inkubirali preko noči na 4°C in 50 rpm.

Naslednji dan smo nevezana protitelesa odstranili s trikratnim spiranjem z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. Med vsakim nanosom spiralnega pufra smo ploščo stresali 5 min pri 50 rpm. Nato smo s tarčo nezasedeno površino v vdolbinicah blokirali z 200  $\mu\text{L}$  1 % BSA v PBS. Ploščo smo stresali 1,5 h na sobni temperaturi in 50 rpm. Nevezane proteine smo odstranili s petkratnim spiranjem z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. V eno polovico vdolbinic smo nanegli po 100  $\mu\text{L}$  posameznih bakteriofagnih klonov v LB mediju ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{11}$  pfu/mL) in 50  $\mu\text{L}$  PBS, v drugo polovico vdolbinic pa po 100  $\mu\text{L}$  posameznih bakteriofagnih klonov v LB mediju ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{11}$  pfu/mL) in 50  $\mu\text{L}$  Fc (5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Oboje smo nanašali v dvojniku, v vdolbinice s kozjimi anti-IgG protitelesi in brez njih. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 rpm. Ploščo smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  PBS z 0,1 % Tween 20. Nadaljevali smo kot pri testu ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles.

#### 4.5 Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov

---

V 2 mL mikrocentrifugirko smo dali 1200  $\mu\text{L}$  posameznega izbranega bakteriofagnega klona v LB mediju in 480  $\mu\text{L}$  PEG/NaCl. Dobro smo premešali in inkubirali na ledu 1 uro. Nato smo centrifugirali 10 min pri 14000 rpm in 4°C. Zavrgli smo supernatant, kratko centrifugirali in s pipeto odstranili preostanek supernatanta. Oborino fagov smo resuspendirali v 150  $\mu\text{L}$  jodidnega pufra, močno premešali na vibracijskem stresalniku in dodali 375  $\mu\text{L}$  95 % etanola. Inkubirali smo 30 min na sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali 10 min pri 14000 rpm in 4°C in zavrgli supernatant. Še enkrat smo kratko centrifugirali, odstranili preostanek supernatanta s pipeto ter oborino sprali s 100  $\mu\text{L}$  70 % etanola. Centrifugirali smo 5 min pri 14000 rpm in 4°C ter odstranili etanol s pipeto. Odprte mikrocentrifugirke smo pustili v komori z laminarnim pretokom zraka, da je etanol izhlapel. Nato smo posušeno DNA raztopili v 10  $\mu\text{L}$  bidestilirane vode in pomerili koncentracijo enoverižne DNA s spektrofotometrom Nanodrop. Če je bila koncentracija DNA prevelika, smo redčili z bidestilirano vodo do koncentracije 80–100 ng/ $\mu\text{L}$ . V nove 1,5 mL mikrocentrifugirke smo dali 5  $\mu\text{L}$  ustrezno redčene DNA in 5  $\mu\text{L}$  5  $\mu\text{M}$  začetnika

(-96 gIII Sequencing Primer, 20-mer). Mikrocentrifugirke smo ustrezno označili s kodo in poslali na sekvenciranje v podjetje GATC Biotech.

## 5. Rezultati in razprava

---

### 5.1 Izolacija protiteles proti protrombinu in avidnost

---

#### 5.1.1 Izolacija protiteles proti protrombinu

---

Za izolacijo protiteles proti protrombinu smo izbrali serum bolnika z antifosfolipidnim sindromom z arterijskim zapletom, ki je imel v preteklosti določena aPS/PT. V serumu izbranega bolnika smo s testom aPS/PT ELISA (modificirana metoda (4)) izmerili aPS/PT vrednosti več kot 100 AU (glede na umeritveno krivuljo), kar je visoko pozitiven odziv in potrjuje prisotnost aPS/PT v serumu tega bolnika. Izvedli smo devet afinitetnih kromatografij na koloni z vezanim proteinom G in na ta način pridobili 30 mL vzorca s koncentracijo IgG 1,077 g/L, torej 32,31 mg IgG.

Teh 32,31 mg IgG smo nanegli na kolono z vezanim protrombinom. Po kroženju vzorca skozi kolono preko noči smo zjutraj sprali kolono in v spirkih skupaj zbrali 27,95 mg IgG. Na kolono vezana protitelesa proti protrombinu smo nato izpirali najprej z 0,5 M NaCl TBS z dodanim Tween 20, nato pa še z 4 M NaCl TBS z dodanim Tween 20. Pri izpiranju nizko avidnih protiteles smo s kolone pridobili 0,46 mg IgG. Pri izpiranju visoko avidnih protiteles smo s kolone pridobili 0,19 mg IgG. Ob regeneraciji kolone pa se je s kolone izpralo še 0,66 mg visoko avidnih IgG. Skupaj smo s kolone pridobili 1,32 mg specifičnih protiteles proti protrombinu. Predpostavili smo, da je to kapaciteta kolone. Predvidevali smo, da je bila kolona zasičena in se proti protrombinu niso vezala vsa protitelesa. Zato smo nekatere spirke iz prve izolacije na tej koloni združili. Tako smo dobili vzorec s 23,70 mg IgG in ga ponovno nanegli na kolono. Drugič smo pridobili le 0,15 mg nizko avidnih protiteles, s pufrom za izpiranje visoko avidnih protiteles pa nismo pridobili nič visoko avidnih protiteles. Šele ob regeneraciji kolone smo izprali 0,35 mg visoko avidnih protiteles. Tako smo drugič skupaj pridobili 0,50 mg specifičnih protiteles proti protrombinu. To je manj kot prvič, torej kapaciteta kolone ni bila presežena, zato vzorca nismo ponovno nanašali na kolono. Spirke po drugi izolaciji smo testirali na testu aPS/PT ELISA in dali so nizek odziv, torej smo očitno izolirali večino specifičnih protiteles proti protrombinu.

Posamezne frakcije izolatov po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim protrombinom smo testirali s testom aPS/PT ELISA (Tabela II).

**Tabela II: Rezultati testa aPS/PT ELISA.**

IZOLATI	Koncentracija IgG (mg/mL)	Volumen (mL)	Količina IgG (mg)	Rezultat aPS/PT ELISA – redčenje vzorca 1:2	Rezultat aPS/PT ELISA – redčenje vzorca 1:3
ID1 n.a. <sup>1</sup>	0,58	0,8	0,46	18	5
ID2 v.a. <sup>2</sup>	0,24	0,8	0,19	4	3
ID3 v.a.-B <sup>3</sup>	0,39	1,7	0,66	16	10
ID4 n.a. <sup>1</sup>	0,15	1,0	0,15	1	1
ID5 v.a-B <sup>3</sup>	0,39	0,9	0,35	/ <sup>4</sup>	9

<sup>1</sup>n.a. – izolat, pridobljen po izpiranju s pufrom za nizko avidna protitelesa proti protrombinu

<sup>2</sup>v.a. – izolat, pridobljen po izpiranju s pufrom za visoko avidna protitelesa proti protrombinu

<sup>3</sup>v.a.-B – izolat, pridobljen ob regeneraciji kolone z blokirnimi pufrom, gre za visoko avidna protitelesa proti protrombinu

<sup>4</sup>Nismo testirali, ker smo varčevali s protitelesi.

Testirali smo tudi količino protiteles v vzorcu, ki je ostal po afinitetni kromatografiji na koloni z vezanim protrombinom. Dobili smo odzive 7, 2 in 0, kar kaže na to, da smo uspeli izolirati večino aPS/PT.

Pri izolaciji protiteles proti protrombinu smo uporabili afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom. Pri tem smo izolirali protitelesa proti samemu protrombinu. Populacija protiteles proti čistemu protrombinu se prekriva s populacijo od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (4). Žigon in sodelavci so pokazali, da lahko z modificirano metodo aPS/PT ELISA določimo obe populaciji protiteles. Tako smo lahko tudi v našem primeru s testom aPS/PT ELISA v izolatih po koloni z vezanim protrombinom (Tabela II) ugotovili prisotnost aPS/PT.

Z našim postopkom izolacije protiteles proti protrombinu smo uspeli ločiti različne populacije protiteles – nizko avidna in visoko avidna, izprana s pufrom za izpiranje in z blokirnimi pufrom (Tabela II). Tu smo jih arbitrarno poimenovali nizko in visoko avidna glede na to, s katerim pufrom smo jih izprali s kolone. Tista, ki so se izprala šele ob bolj ostrih pogojih (povečanje koncentracije soli, sprememba pH), smo poimenovali visoko avidna. Vse izolate smo testirali s testom aPS/PT ELISA in ugotovili, da visoko avidna protitelesa, izolirana z blokirnimi pufrom, dajejo zadovoljive rezultate (neredčen vzorec bi dal odziv približno 30 AU glede na umeritveno krivuljo), pa tudi izolirali smo jih največ (približno 1 mg). Zato smo se odločili, da bomo združili ti dve frakciji, izprani z blokirnimi pufrom ob regeneraciji kolone z vezanim protrombinom. Tako smo dobili 2,5 mL vzorca z 0,367 mg/mL specifičnih protiteles proti protrombinu v TBS.

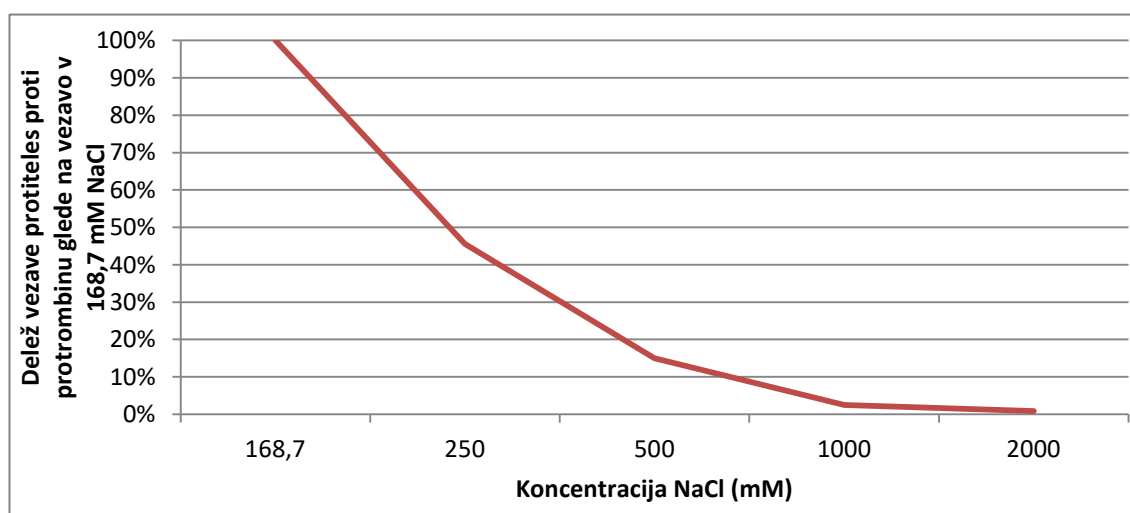


### 5.1.2 Avidnost

Za selekcijo z bakteriofagnimi knjižnicami je dobro uporabiti visoko očiščeno tarčo, ki ima dobro izražene paratope in močno veže antigen, saj tako pridemo do peptidov, ki specifično vežejo tarčo. Zato je najbolje uporabiti visoko avidna protitelesa.

Prvo določanje avidnosti protiteles v povezavi z antifosfolipidnim sindromom so izvedli Čučnik in sodelavci (21). Za določanje avidnosti anti- $\beta_2$ GPI so uporabili test ELISA s kaotropnimi pogoji. Podobno kot za anti- $\beta_2$ GPI, so nekaj let kasneje Žigon in sodelavci (4) določili avidnost protiteles proti protrombinu. Uporabili so enak postopek, torej kaotropne pogoje pri vezavi protiteles. Vzorce so razredčili v 1 % BSA v TBS s Ca z naraščajočimi koncentracijami NaCl. Mejo za visoko avidna protitelesa proti protrombinu so postavili, ko je bila vezava pri 0,5 M NaCl več kot 70 % vezave pri 0,136 M NaCl. Nizko avidna so bila protitelesa, ki so imela vezavo pri 0,5 M NaCl pod 30 % začetne vezave. Ostali vzorci so obveljali za heterogeno avidna protitelesa.

Naš vzorec smo testirali na podoben način kot Žigon in sodelavci (4), torej s testom aPS/PT ELISA s kaotropnimi pogoji. Avidnost smo določili po formuli odziv testa aPS/PT ELISA pri 500 mM NaCl glede na odziv testa aPS/PT ELISA pri 168,7 mM NaCl. Vezava, izmerjena pri kaotropnih pogojih, je predstavljala 15 % vezave, izmerjene pri fizioloških pogojih v serumu izbranega bolnika (Slika 4). To pomeni, da so protitelesa proti protrombinu v serumu tega bolnika večinoma nizko avidna.



Slika 4: Rezultati kaotropnega testa ELISA, delež vezave protiteles proti protrombinu na protrombin pri različnih koncentracijah NaCl glede na vezavo v 168,7 mM NaCl.

Predvidevali smo, da smo z našim postopkom izolacije z afinitetno kromatografijo uspeli ločiti manjši delež visoko avidnih protiteles proti protrombinu. Protrombin se lahko pri imobilizaciji v koloni drugače orientira in protitelesa se lahko močneje vežejo na izpostavljene epitope, medtem ko je vezava na protrombin v testu aPS/PT ELISA nizka, zato lahko dobimo nižje odzive. Tako smo za nadaljnje delo uporabili protitelesa, izprana iz kolone z blokirnimi pufrom, za katera smo predvidevali, da so visoko avidna.

## 5.2 Selekcija iz bakteriofagnih knjižnic

---

Izolirana protitelesa smo uporabili kot tarčo v bakteriofagni selekciji. Pri delu smo uporabili tri različne bakteriofagne knjižnice. Ph. D<sup>TM</sup> 12 vsebuje bakteriofage, ki imajo na svoji površini predstavljen 12 aminokislin dolg peptid. Ph. D<sup>TM</sup> 7 vsebuje bakteriofage, ki imajo na svoji površini predstavljen 7 aminokislin dolg peptid. Ph. D<sup>TM</sup> C7 vsebuje bakteriofage, ki imajo na svoji površini predstavljen ciklični 7 aminokislin dolg peptid (13). Razlike med bakteriofagnimi knjižnicami predstavlja dolžina in oblika predstavljenega peptida. Böttger in Böttger priporočata izvedbo selekcij z različnimi knjižnicami (26). Če z daljšimi peptidi že pridobiš nakazano zaporedje aminokislin, pomembno za vezavo, lahko s knjižnico s krajšimi peptidi še bolj točno definiraš, katero vezavno mesto je kritično za vezavo. Po drugi strani pa se prekratki peptidi včasih ne uspejo vezati na pomembna vezavna mesta. Ph. D<sup>TM</sup> C7 se uporablja za odkrivanje prostorskih vezavnih mest (13).

Uspešnost selekcije z eno bakteriofagno knjižnico smo določali z deležem bakteriofagov, ki smo jih izprali s tarčnih protiteles v treh selekcijskih stopnjah vsake selekcije glede na celokupno število bakteriofagov, ki smo jih nanegli na tarčo. Med dvema ali tremi stopnjami selekcije naj bi delež naraščal, kar naj bi pomenilo, da se je knjižnica obogatila s fagi, specifičnimi za vezavo na tarčo.

Selekcijo smo najprej izvedli s Ph. D<sup>TM</sup> 12. Selekcija je potekala ugodno, fagi so se tekom treh stopenj obogatili, naraščal je odstotek vezanih fagov glede na nanos (Tabela III). V vseh stopnjah selekcije nismo imeli težav z divjim tipom bakteriofagov. Tako smo predvidevali, da smo uspeli pridobiti bakteriofagne klonke, ki se specifično vežejo na protitelesa proti protrombinu.

**Tabela III: Uspešnost selekcije s Ph. D<sup>TM</sup> 12**

	Specifično izpiranje	Nespecifično izpiranje
1. stopnja	0,00016 %	0,00030 %
2. stopnja	*	*
3. stopnja	0,00736 %	0,00537 %

\* v drugi stopnji selekcije števila vnešenih bakteriofagov nismo mogli izračunati zaradi neuspešne titracije.

Ko smo delali knjižnicama s Ph. D<sup>TM</sup> 7 in Ph. D<sup>TM</sup> C7, smo imeli več težav, tudi z divjimi tipi bakteriofagov. Že v prvi stopnji smo dobili zelo malo fagov, še posebej pri nespecifičnem izpiranju pri delu s Ph. D<sup>TM</sup> C7 (Tabela IV in Tabela V). Zato smo izvedli le še drugo stopnjo in kar iz te izbrali in pomnožili nekaj bakteriofagnih klonov, za katere smo upali, da se specifično vežejo na protitelesa proti protrombinu.

**Tabela IV: Uspešnost selekcije s Ph. D<sup>TM</sup> 7**

	Specifično izpiranje	Nespecifično izpiranje
1. stopnja	0,000024 %	0,000126 %
2. stopnja	0,00227 %	0,00372 %

Opomba: izvedli smo samo dve stopnji, saj so se bakteriofagni kloni slabo pomnožili in jih je bilo premalo za izvedbo 3. stopnje.

**Tabela V: Uspešnost selekcije s Ph. D<sup>TM</sup> C7**

	Specifično izpiranje	Nespecifično izpiranje
1. stopnja	0,000006 %	0 %
2. stopnja	0,000105 %	0 %

Opomba: izvedli smo samo dve stopnji, saj so se bakteriofagni kloni slabo pomnožili in jih je bilo premalo za izvedbo 3. stopnje.

Ko smo ponovili selekcijo s Ph. D<sup>TM</sup> 12 (Tabela VI), smo pri specifičnem izpiranju dobili podoben rezultat kot prvič, pri nespecifičnem izpiranju pa je selekcija potekla slabo (knjižnica se ni skoraj nič obogatila, dobili smo zelo malo bakteriofagnih klonov).

**Tabela VI: Uspešnost selekcije s Ph. D<sup>TM</sup> 12 – ponovljena selekcija**

	Specifično izpiranje	Nespecifično izpiranje
1. stopnja	0,000045 %	0,000003 %
2. stopnja	0,000213 %	0,000009 %
3. stopnja	0,001340 %	0,000014 %

Zakaj selekcije z eno knjižnico uspejo in z drugo ne, ne moremo zagotovo trditi. Včasih se zgodi, da tudi dve ponovljeni selekciji ob enakih pogojih na koncu privedeta do drugačnih rezultatov (26). To se je zgodilo tudi nam pri ponovljeni selekciji s Ph. D<sup>TM</sup> 12.

Na potek selekcij lahko vpliva tudi vezava tarčnih protiteles na mikrosfere. Mikrosfere Dynabeads s proteinom G in proteinom A imajo vezavno kapaciteto približno 8 µg človeških IgG na mg mikrosfer. Količina vezanih protiteles je odvisna od koncentracije protiteles in mikrosfer v začetnem vzorcu (25). Po priporočilih naj bi na 50 µL mikrosfer (1,5 mg) vezali 1–10 µg protiteles. Mi smo na 15 µL mikrosfer (0,45 mg) vezali 4,0 µg protiteles, kar naj bi bila že presežena vezavna kapaciteta. V ponovljeni selekciji s Ph. D<sup>TM</sup> 12 (Tabela VI) smo vezali 7,1 µg protiteles na enako količino mikrosfer, kar je skoraj še enkrat več in naj bi protitelesa zasedla vsa prosta vezavna mesta na mikrosferah. Po koncu vseh selekcij smo preverili koncentracijo protiteles v spirkih, ki smo jih dobili po vezanju protiteles na mikrosfere. Ugotovili smo, da ne vsebujejo nič protiteles. Torej so se vsa protitelesa vezala na mikrosfere. Obstaja torej možnost, da so bila na mikrosferah še vedno prosta mesta za vezavo protiteles, na katera pa bi se lahko vezali tudi bakteriofagi v postopku selekcij. Kljub temu smo upali, da so selekcije potekle specifično na tarčna protitelesa.

Optimizacija testa ELISA za določanje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo

---

### 5.2.1 Osnovni postopek testa fagna ELISA

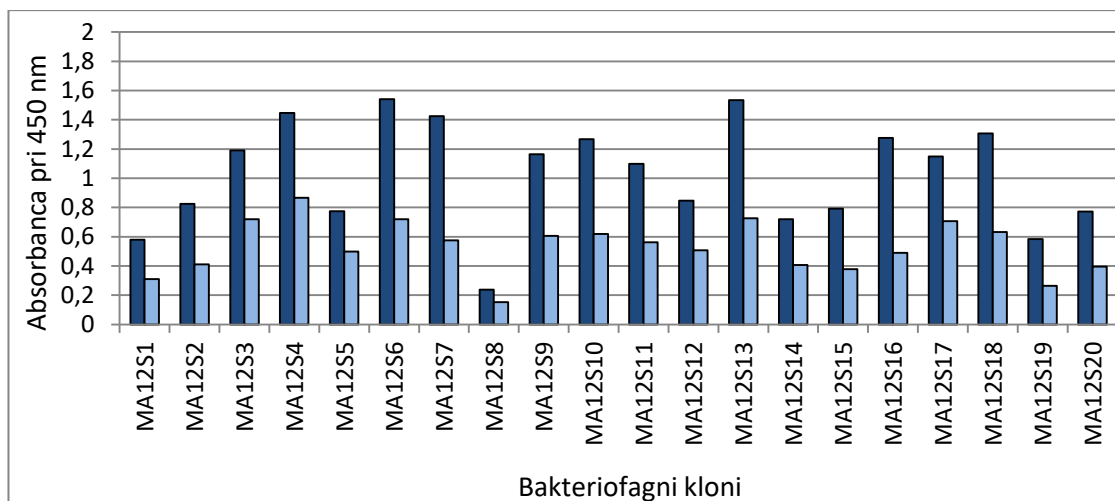
---

Za vrednotenje vezave peptidov, predstavljenih na posameznih pomnoženih bakteriofagnih klonih, ki smo jih pridobili s selekcijami iz bakteriofagnih knjižnic, na tarčna protitelesa, smo morali najti najboljšo metodo. Kot primerno metodo smo izbrali test ELISA, kot je v priporočilih za delo z bakteriofagnimi knjižnicami (13). Pred testiranjem vseh pridobljenih bakteriofagnih klonov smo izvedli optimizacijo testa fagna ELISA. To smo storili z bakteriofagnimi kloni, pridobljenimi po enakem postopku kot pri našem delu, le da so bila pri selekcijah z bakteriofagnimi knjižnicami kot tarčna protitelesa uporabljena protitelesa proti protrombinu bolnika z vensko trombozo. To so bakteriofagni kloni, navedeni med materiali (Tabela I).

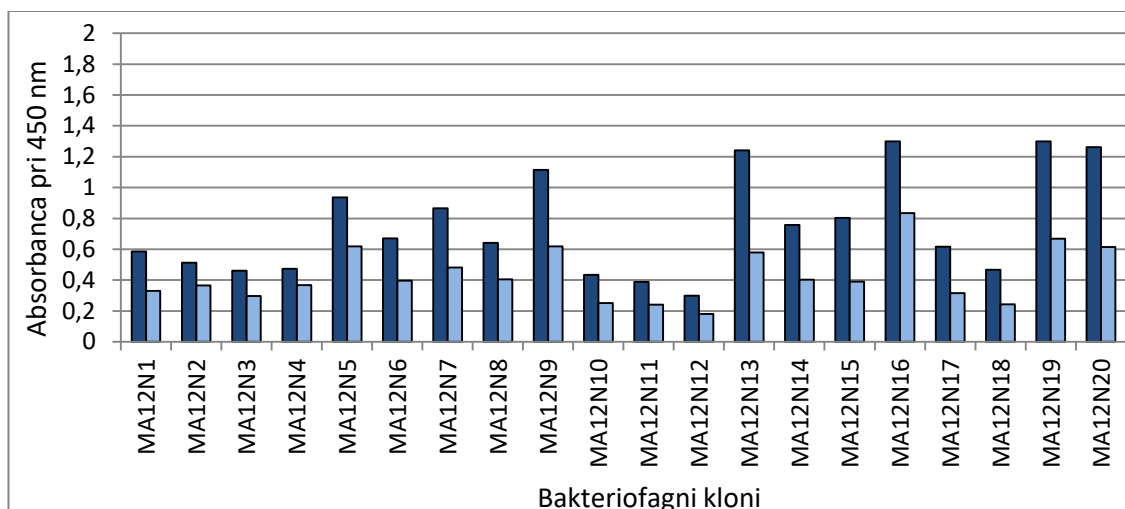
Oznaka vsakega posameznega bakteriofagnega klona je sestavljena iz štirih delov. Prvi del predstavlja tarčno protitelo, s pomočjo katerega je bil bakteriofagni klon pridobljen v selekcijah iz bakteriofagnih knjižnic. Tarčna protitelesa bolnika z vensko trombozo so

označena z MA. Klone s to oznako smo uporabili za optimizacijo testa fagna ELISA. Tarčna protitelesa bolnika z arterijsko trombozo so označena z ID. Klone s to oznako smo pridobili z bakteriofagnimi selekcijami v tem magistrskem delu in želeli smo ovrednotiti njihovo vezavo na tarčo. Drugi del oznake označuje bakteriofagno knjižnico, ki je bila uporabljena za selekcijo, v kateri je bil pridobljen posamezni klon. Oznaka 12 pomeni uporabo Ph. D<sup>TM</sup> 12, oznaka 7 pomeni uporabo Ph. D<sup>TM</sup> 7 in oznaka C7 pomeni uporabo Ph. D<sup>TM</sup> C7. Tretji del oznake označuje način izpiranja vezanih bakteriofagnih klonov na mikrosfere v bakteriofagni selekciji. Oznaka S pomeni specifično izpiranje, oznaka N pa nespecifično izpiranje. Zadnji del oznake so številke 1 do 20, ki predstavljajo posamezne bakteriofagne klone.

Za optimizacijo testa fagna ELISA smo uporabili bakteriofagne klone, pridobljene v selekcijah z bakteriofagnimi knjižnicami, kjer so bila kot tarčna protitelesa uporabljena protitelesa proti protrombinu bolnika z vensko trombozo (klone, katerih del oznake je MA). Tudi v testih ELISA smo kot tarčna protitelesa uporabili protitelesa proti protrombinu bolnika z vensko trombozo (MA). V prvem poizkusu smo na miktrotitrski plošče z visoko afiniteto vezave vezali tarčna protitelesa neposredno na MaxiSorp® plošče, 25 µg/mL, po 100 µL na vdolbinico. Za ozadje smo vdolbinice blokirali z BSA. Pri vseh 40 klonih je bil signal vzorca višji od signala ozadja, zato smo predvidevali, da je prišlo do vezave fagov na tarčo (Slika 5 in Slika 6). Pri vseh je bilo ozadje precej visoko in spremenljivo, kar je verjetno posledica tega, da tudi fagov v posamezne vdolbinice nismo nanесли v enaki koncentraciji. Koncentracije so bile med  $0,7 \times 10^{11}$  pfu/mL in  $1,1 \times 10^{11}$  pfu/mL.



Slika 5: Osnovni postopek testa fagna ELISA, bakteriofagni kloni MA12S1–MA12S20, pridobljeni s specifičnim izpiranjem ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{10}$  pfu). Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo fagov na BSA (ozadje).

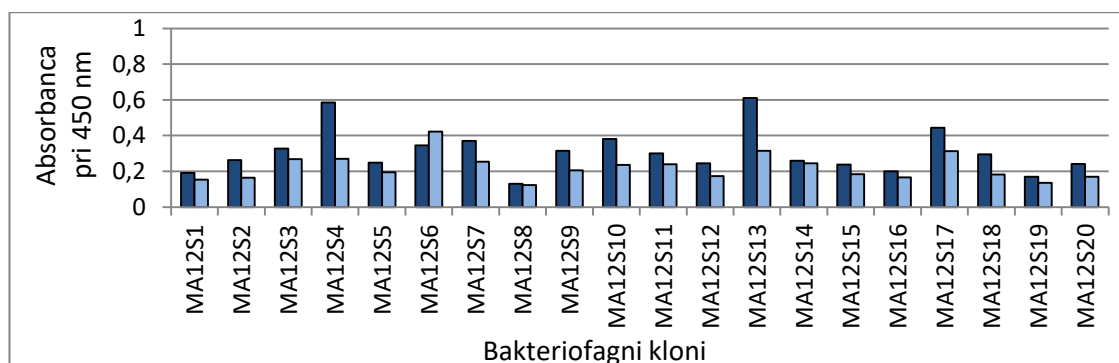


Slika 6: Osnovni postopek testa fagna ELISA, bakteriofagni kloni MA12N1–MA12N20, pridobljeni z nespecifičnim izpiranjem ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{10}$  pfu). Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo fagov na BSA (ozadje).

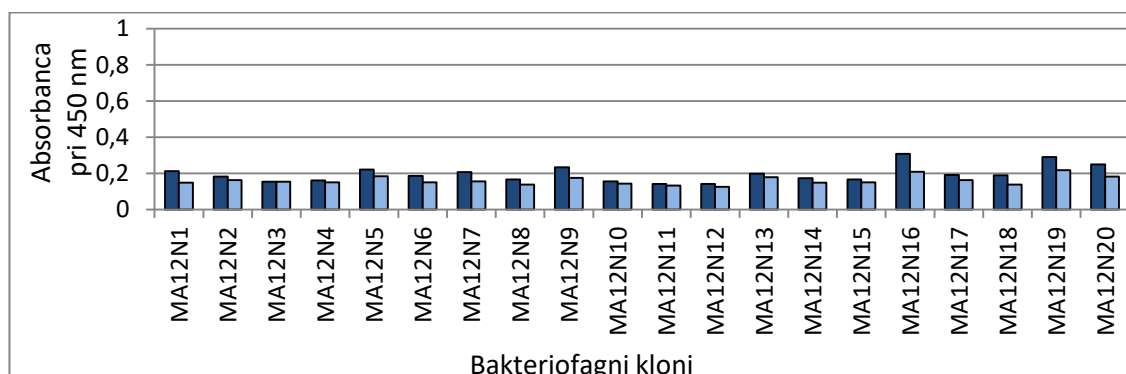
## 5.2.2 Zmanjšanje količine tarčnih protiteles in sprememba blokirnega sredstva

Kot prvi korak pri optimizaciji testa ELISA smo želeli zmanjšati količino nanesenih protiteles na mikrotitrsko ploščico. Tako smo še enkrat testirali istih 40 klonov, le da smo tokrat vezali na ploščo 25-krat manjšo količino protiteles proti protrombinu. Da bi znižali odzive ozadja, smo spremenili tudi blokado (namesto 1 % BSA smo uporabili 5 % mleko v PBS). Tako odzivi vzorcev kot odzivi ozadja so se znižali (Slika 7 in Slika 8). Kloni, pridobljeni s specifičnim izpiranjem (Slika 7), so dali malo višje signale od klonov, pridobljenih z nespecifičnim izpiranjem (Slika 8). Z rezultati nismo bili zadovoljni, saj so

bile razlike med odzivom vzorcev in ozadja premajhne, pa tudi odzivi ozadja so nihali med vzorci.



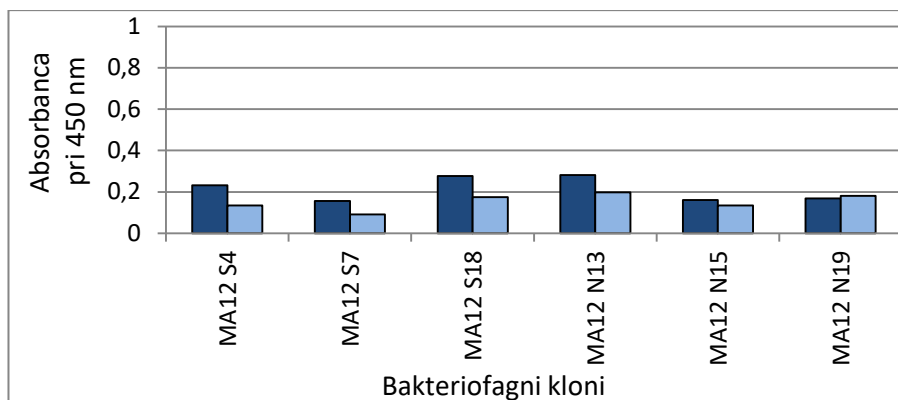
Slika 7: Fagna ELISA z manjšo količino tarčnih protiteles in spremembo blokirnega sredstva, bakteriofagni kloni MA12S1–MA12S20, pridobljeni s specifičnim izpiranjem ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{10}$  pfu). Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo fagov na proteine posnetega mleka (ozadje).



Slika 8: Fagna ELISA z manjšo količino tarčnih protiteles in spremembo blokirnega sredstva, bakteriofagni kloni MA12N1–MA12N20, pridobljeni z nespecifičnim izpiranjem ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{10}$  pfu). Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo fagov na proteine posnetega mleka (ozadje).

### 5.2.3 Nanašanje enotne koncentracije bakteriofagov na tarčo

Odločili smo se, da poskusimo z nanosom enotne koncentracije bakteriofagov ( $1 \times 10^{10}$  pfu/vdolbinico) na plošče, kar naj bi zmanjšalo nihanja ozadja. Zamenjali smo LB medij, v katerem so bili fagi pri nanosu na ploščo, za PBS. Upali smo, da bo to znižalo odzive ozadja. Ker smo varčevali s protitelesi, smo testirali le nekaj klonov (Slika 9).



Slika 9: Fagna ELISA z nanosom enotne koncentracije bakteriofagov ( $1 \times 10^{10}$  pfu) na tarčo, izbrani bakteriofagni kloni. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo fagov na proteine posnetega mleka (ozadje).

Kot vidimo, so odzivi ozadja vsi pod 0,2, vendar pa so tudi odzivi vzorcev zelo nizki.

#### 5.2.4 Menjava pufra za vezavo tarčnih protiteles

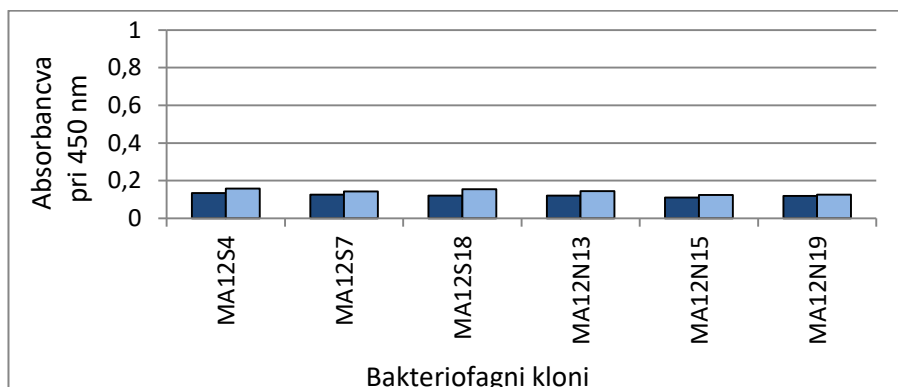
Predvidevali smo, da je težava v vezavi tarčnih protiteles na mikrotitrne ploščice. Kljub temu, da smo uporabili mikrotitrne plošče z visoko afiniteto vezave, ki so namenjene vezanju protiteles direktno na ploščo, je mogoče, da so se protitelesa slabo vezala. To smo poskusili izboljšati tako, da smo za vezavo protiteles na ploščico uporabili pufrano raztopino, pH 9,6 (Coating Buffer, Candor Bioscience GmbH), ki je namenjena vezanju protiteles na mikrotitrne ploščice. Tudi v tem primeru smo dobili zelo nizke odzive tako vzorcev kot ozadja (rezultati niso prikazani).

#### 5.2.5 Menjava pufra za vezavo in spiranje

V testu aPS/PT ELISA smo uporabili za vezavo protiteles na protrombin TBS pufer z dodanim kalcijem, ki naj bi pomagal pri vezavi protiteles na protrombin. Kalcij je sicer potreben za vezavo protrombina na fosfolipidne membrane ali na fosfatidilserin na mikrotitrski plošči (4, 9). Šele po vezavi ob prisotnosti kalcija se protrombin lahko spremeni v biološko aktiven  $\alpha$ -trombin. V študiji iz leta 1996 (10) so sicer pokazali, da se lupusni antikoagulant lahko vežejo tako na protrombin kot na pretrombin 1 in fragment 1 tudi ob odsotnosti fosfolipidov in kalcijevih ionov. Vendar to ne velja za vsa protitelesa proti protrombinu. Pri nekaterih bolnikih so v serumu prisotna protitelesa, ki jih določimo le z aPS/PT ELISA, ne pa tudi z aPT ELISA. Zato novejša študija (pregled v 23) priporoča določanje protiteles proti protrombinu z metodo aPS/PT ELISA, ki izmeri klinično bolj pomembna protitelesa v primerjavi z metodo aPT ELISA. Vendar kljub temu odsotnost kalcija v fazi vezave tarčnih protiteles najverjetneje ne bi smela bistveno vplivati



na rezultate. Želeli smo preveriti, ali bo vezava protiteles na mikrotitrne plošče boljša ob prisotnosti kalcija ali če kalcij kako drugače ugodno vpliva na vezavo fagov na protitelesa. Posledično smo pri eni izvedbi testa fagna ELISA vse pufore zamenjali s TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Test smo izvedli z manjšim številom izbranih bakteriofagnih klonov. Slika 10 prikazuje rezultate testiranja izbranih bakteriofagnih klonov v testu fagna ELISA s TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Odzivi ozadja in vzorcev sonizki in lahko sklepamo, da Ca ni pripomogel k vezavi pri izbranih pogojih testa ELISA.

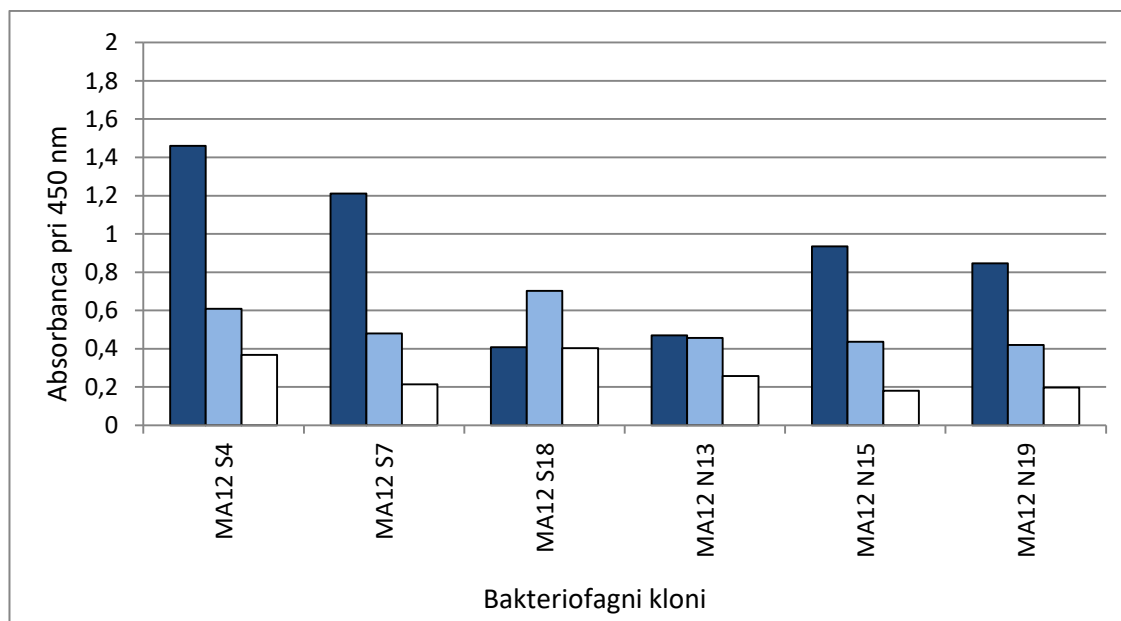


Slika 10: Fagna ELISA z menjavo pufru za vezavo in spiranje, izbrani bakteriofagni kloni ( $1 \times 10^{10}$  pfu). Temno modri stolpec predstavlja vezavo na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo na ozadje (BSA).

### 5.2.6 Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles

Predvidevali smo, da je glavna težava v tem, da se protitelesa slabo vežejo na mikrotitrne plošče in da se pri vezavi narobe obrnejo. Zato smo se odločili izvesti sendvič test ELISA. Na mikrotitrsko ploščo smo vezali kozja protitelesa proti človeškim IgG. Na ta smo potem vezali tarčna protitelesa, plošče smo blokirali z BSA. Pri testiranju z izbranimi bakteriofagnimi kloni smo dobili visoke odzive vzorcev v vdolbinicah s tarčnimi protitelesi in kozjimi anti-IgG protitelesi, nižji odzivi so bili v vdolbinicah s kozjimi anti-IgG protitelesi in še nekoliko nižji odzivi v vdolbinicah, ki so bile blokirane z BSA (Slika 11). Izjema je klon MA12S18, ki je dal višji odziv vzorca v vdolbinici s kozjimi anti-IgG protitelesi kot v vdolbinici s tarčnimi protitelesi. Z optimiziranim testom ELISA sedaj lahko ločimo med peptidi, ki se vežejo na tarčna protitelesa, od tistih, ki imajo afiniteto do drugih komponent, ki so bile prisotne med selekcijo. Lahko torej ločimo med pravimi vezalci, ki ciljajo paratope tarčnih protiteles in oponašajo epitope protrombina, od tako imenovanih »netarčnih« vezalcev. Ovrednotimo in primerjamo lahko tudi jakost vezave

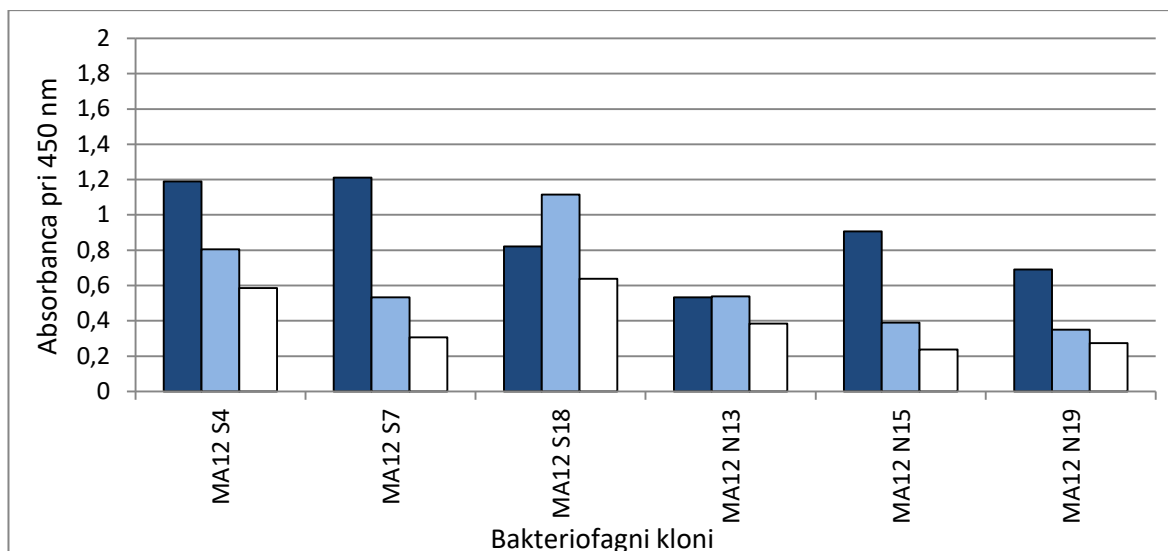
posameznih peptidov na tarčna protitelesa in na ta način sklepamo, kateri so boljši ali slabši mimetiki epitopov.



Slika 11: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, izbrani bakteriofagni kloni ( $0,7-1,1 \times 10^{10}$  pfu). Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.

### 5.2.7 Uporaba manjše količine kozjih anti-IgG za imobilizacijo in manjše količine tarčnih protiteles

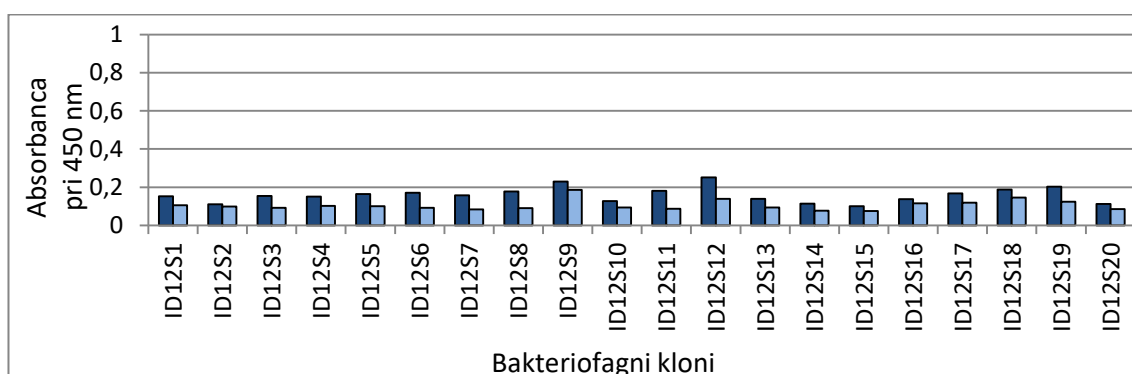
Zaradi omejenih količin tarčnih protiteles smo se odločili izvesti test fagna ELISA z manjšimi količinami kozjih anti-IgG protiteles in tarčnih protiteles (Slika 12). Rezultati so bili primerljivi s predhodno izvedenim testom ELISA (Slika 11), zato smo se odločili, da je test ELISA dovolj optimiziran. V vseh nadaljnjih poskusih smo z optimiziranim postopkom ovrednotili vse bakteriofagne klone, pridobljene v selekcijah z bakteriofagnimi knjižnicami na protitelesih bolnika z arterijsko trombozo.



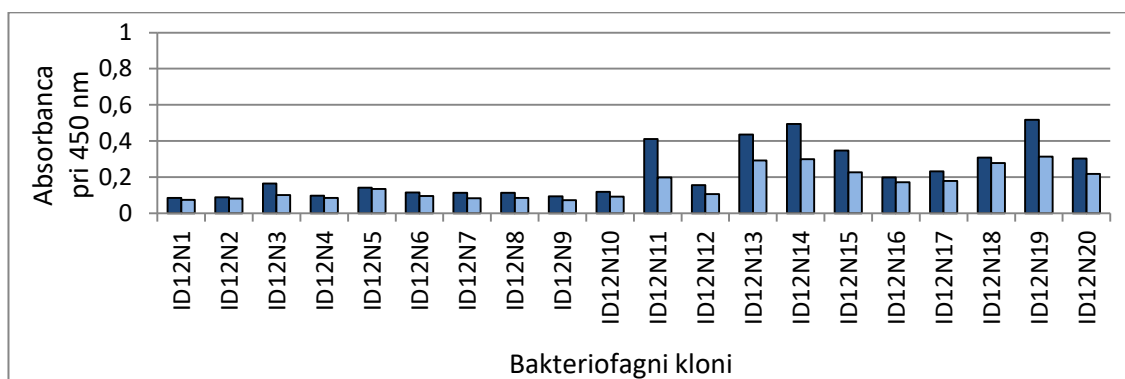
Slika 12: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, izbrani bakteriofagni kloni ( $0,7\text{--}1,1 \times 10^{10}$  pfu), uporaba manjše količine kozjih anti-IgG in tarčnih protiteles. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.

### 5.3 Vrednotenje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo

Bakteriofagne klone, ki smo jih pridobili s prvo selekcijo iz Ph. D<sup>TM</sup> 12 na tarčnih protitelesih proti protrombinu bolnika z arterijsko trombozo (ID), smo najprej ovrednotili z neoptimiziranim testom ELISA. Uporabili smo osnovni test fagna ELISA, pri čemer smo bakteriofagne klone nanašali na mikrotitrsko ploščico v enotni koncentraciji  $1 \times 10^{11}$  pfu/mL v PBS (Slika 13 in Slika 14). Kot tarčno protitelo na mikrotitrskih ploščicah smo uporabili protitelesa proti protrombinu bolnika z arterijsko trombozo (ID). Ugotovili smo, da dajejo vsi kloni zelo šibek odziv oziroma visoko ozadje. Naključno smo izbrali 10 klonov, jim izolirali DNA in jo poslali na sekvenciranje.

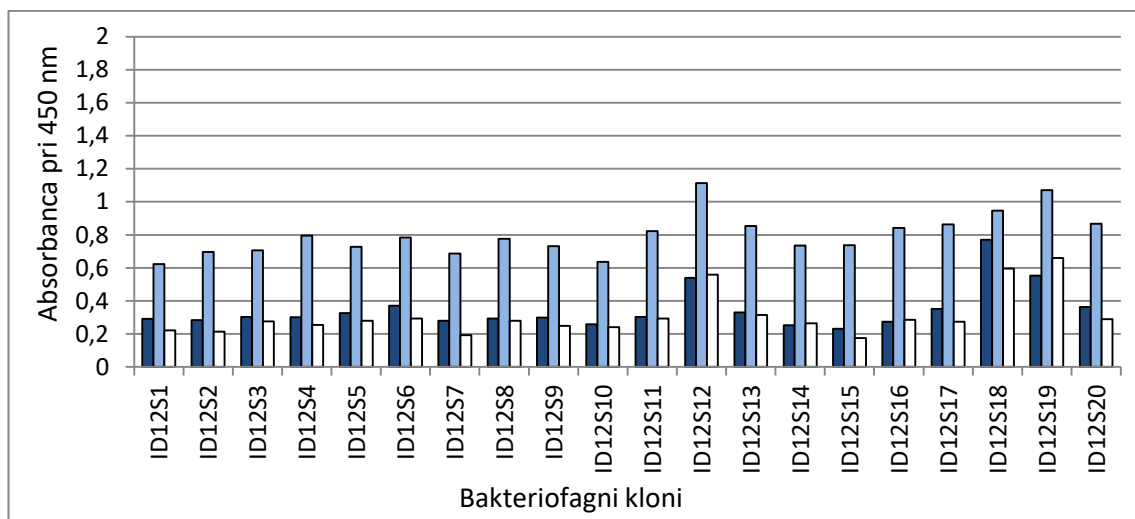


Slika 13: Fagna ELISA z nanosom enotne koncentracije bakteriofagov ( $1 \times 10^{10}$  pfu) na tarčo, bakteriofagni kloni ID12S1–ID12S20, pridobljeni s specifičnim izpiranjems selekcijami iz Ph. D<sup>TM</sup> 12. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo fagov na proteine posnetega mleka (ozadje).

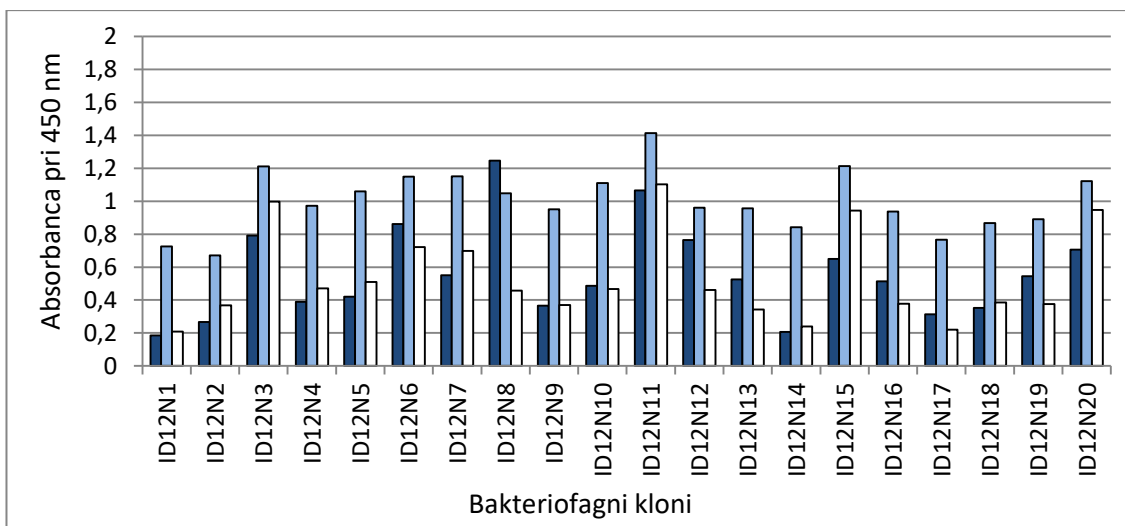


Slika 14: Fagna ELISA z nanosom enotne koncentracije bakteriofagov ( $1 \times 10^{10}$  pfu) na tarčo, bakteriofagni kloni ID12N1–ID12N20, pridobljeni z nespecifičnim izpiranjem selekcijami iz Ph. D<sup>TM</sup> 12. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri pa vezavo fagov na proteine posnetega mleka (ozadje).

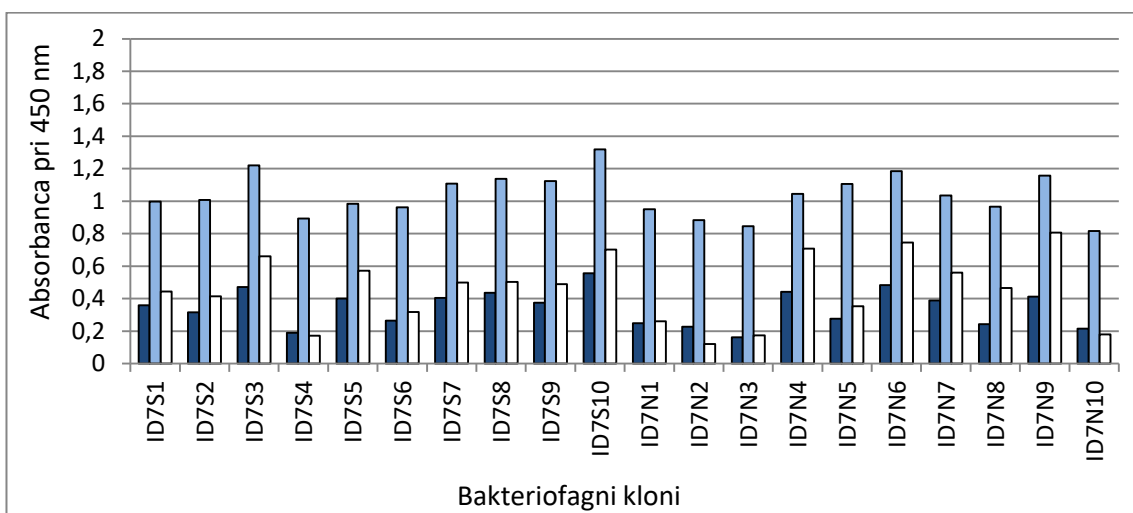
Ko smo optimizirali test fagna ELISA, smo ponovno testirali teh 40 bakteriofagnih klonov (Slika 15, Slika 16) in še vse ostale, pridobljene v selekcijah s knjižnicami Ph. D<sup>TM</sup> 7 (Slika 17) in Ph. D<sup>TM</sup> C7 (Slika 18) ter ponovljeni selekciji s Ph. D<sup>TM</sup> 12 (Slika 19, Slika 20).



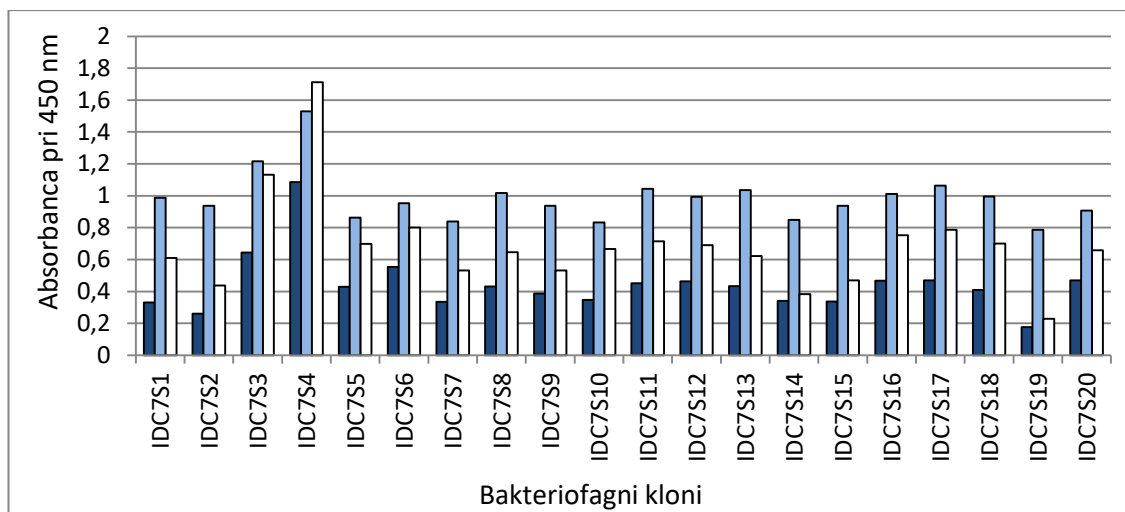
Slika 15: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, kloni ID12S1–ID12S20, pridobljeni s specifičnim izpiranjem s selekcijami iz Ph. D<sup>TM</sup> 12. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.



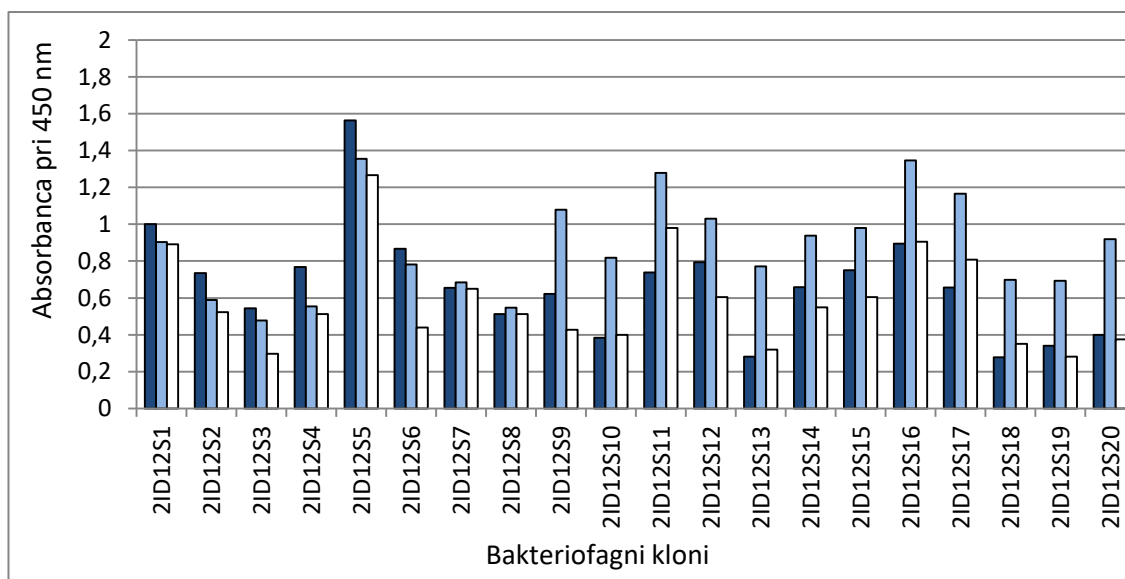
Slika 16: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, kloni ID12N1–ID12N20, pridobljeni z nespecifičnim izpiranjem s selekcijami iz Ph. D<sup>TM</sup> 12. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.



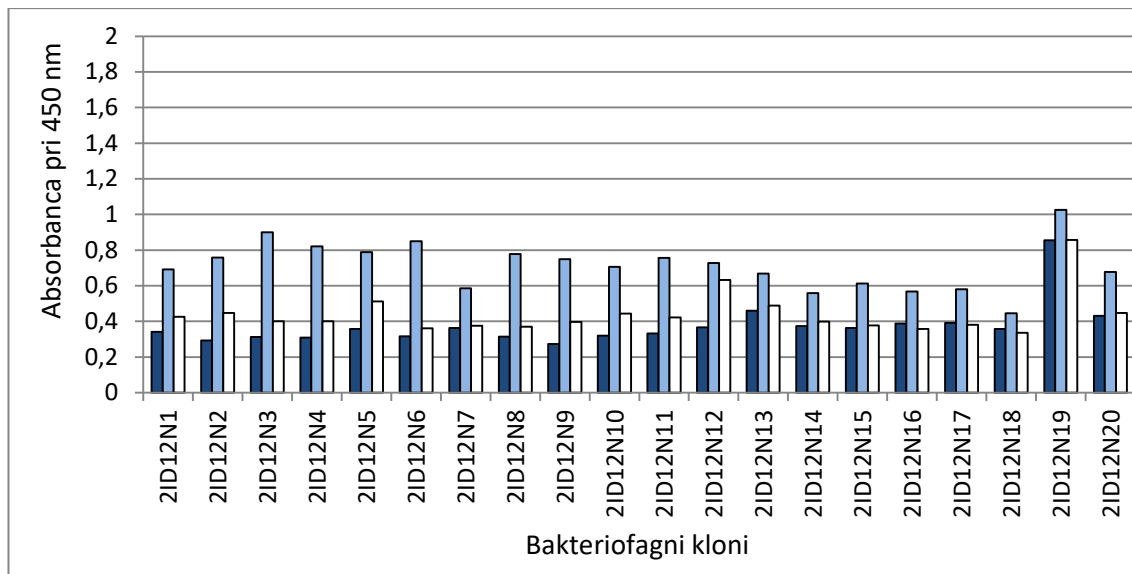
Slika 17: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, kloni ID7S1–ID7S10, ID7N1–ID7N10, pridobljeni s selekcijami iz Ph. D<sup>TM</sup> 7. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.



Slika 18: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, kloni IDC7S1–IDC7S10, IDC7N1–IDC7N10, pridobljeni s selekcijami iz Ph. D<sup>TM</sup> C7. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.



Slika 19: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, kloni 2ID12S1–2ID12S20, pridobljeni s specifičnim izpiranjem v ponovljeni selekciji s Ph. D<sup>TM</sup> 12. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.



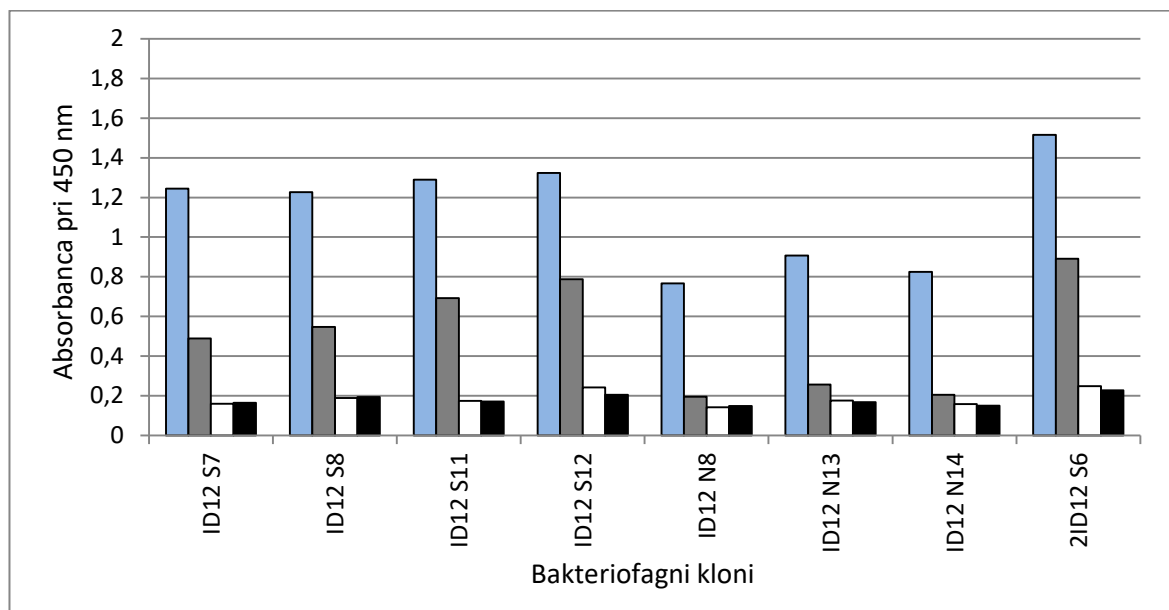
Slika 20: Test fagna ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles preko kozjih anti-IgG protiteles, kloni 2ID12N1–2ID12N20, pridobljeni z nespecifičnim izpiranjem v ponovljeni selekciji s Ph. D<sup>TM</sup> 12. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.

Iz rezultatov je razvidno, da je pri vseh klonih zelo velik odziv v vdolbinicah s kozjimi anti-IgG protitelesi, kjer ni tarčnih protiteles, kar lahko kaže na to, da je prišlo do nespecifične vezave na kozja anti-IgG protitelesa. Klon ID12N8 (Slika 16) in kloni 2ID12S1-2ID12S8 (Slika 19) dajo približno enak odziv s kozjimi anti-IgG protitelesi ob prisotnosti tarčnih protiteles ali brez njih.

#### 5.4 Kompetitivna ELISA, izpodrivanje s fragmentom protiteles Fc

Glede na rezultate vseh testov ELISA, kjer smo zaznali močan odziv v vdolbinicah, kjer so bila prisotna le kozja anti-IgG protitelesa in ne tarčna protitelesa, smo pomislili, da selekcije niso potekle na tarčna protitelesa, ampak na protein G ali protein A. Torej, da se naši peptidi, predstavljeni na bakteriofagnih klonih, ne vežejo specifično na tarčna protitelesa proti protrombinu, temveč je tekom selekcij prišlo do nespecifične vezave na proteine ozadja. Če je res prišlo do vezave na protein G ali protein A, potem smo v selekcijah pridobili peptide, ki posnemajo Fc regijo protiteles, saj se protitelesa vežejo na protein G in protein A z Fc regijo. Kozja anti-IgG protitelesa pa vežejo Fc dele protiteles. Da bi potrdili, da smo pri selekciji nenamerno selekcionirali klone, ki se vežejo na paratope kozjih anti-IgG protiteles, smo izvedli test izpodrivanja vezave na kozja anti-IgG protitelesa s fragmentom protiteles Fc. Vzorec smo nanjali hkrati s fragmenti Fc, ki se prav tako vežejo na kozja anti-IgG protitelesa (Slika 21).

Izbrali smo 8 bakteriofagnih klonov, pridobljenih v selekcijah s knjižnicami Ph. D<sup>TM</sup> 12 (za 7 od teh smo že poznali zaporedje aminokislin peptidov, predstavljenih na klonih).



Slika 21: Kompetitivna fagna ELISA, izpodrivanje s fragmentom protiteles Fc. Svetlo modri stolpec predstavlja vezavo fagov direktno na kozja anti-IgG protitelesa, sivi stolpec predstavlja izpodrivanje s fragmentom Fc, beli stolpec predstavlja vezavo na ozadje BSA, črni pa izpodrivanje vezave na BSA.

Kot vidimo, prisotni fragmenti Fc zmanjšajo odzive bakteriofagnih klonov. Predvidevamo, da izpodrinejo klone iz vezavnega mesta na kozjih anti-IgG protitelesih. Fragmenti Fc ne vplivajo na vezavo na BSA. Bakteriofagni kloni, pridobljeni v selekcijah, se torej vežejo na isto vezavno mesto kot fragmenti Fc in so mimetiki fragmenta Fc. To kaže na to, da je selekcija potekla na protein G in protein A, kamor se vežejo protitelesa s Fc delom. Očitno menjavanje mikrosfer s proteinom G in mikrosfer s proteinom A ni preprečilo, da bi selekcija potekla v to smer. Razlog je morda tudi, da mikrosfere niso bile povsem zasedene s tarčnimi protitelesi in je ostalo prostih dovolj mest, na katera je lahko potekla selekcija. Zanimivo je, da je pri specifičnem izpiranju s protrombinom prišlo do izpiranja teh bakteriofagnih klonov z mikrosfer, kot da bi protrombin izpodrinil peptide iz vezavnih mest na proteinu A ali proteinu G. Morda naša tarčna protitelesa niso dovolj visoko avidna, da bi nanje potekla selekcija. Glede na to, da smo s kaotropnim testom ELISA (Slika 4) dokazali, da imamo večinoma nizko avidna protitelesa, je to precej verjetno.

Da bi preprečili nespecifično vezavo na ozadje, bi lahko v postopek vključili negativno selekcijo, kot predlagata Böttger in Böttger (26). To pomeni, da bi pri drugi stopnji



selekcije s posamezno bakteriofagno knjižnico spremenili postopek tako, da na mikrosfere ne bi imeli vezanih tarčnih protiteles. Kot tarčo bi lahko uporabili kakšna druga protitelesa ali pa le ozadje, torej mikrosfere s proteinom G ali s proteinom A. Po nanosu knjižnice na mikrosfere bi pustili, da se bakteriofagi vežejo, nato pa bi za nadaljevanje uporabili supernatant. V njem bi bili le fagi, ki se ne bi vezali na ozadje, torej na protein A, protein G ali mikrosfere. Tako bi lahko odpravili našo težavo, da je selekcija potekla na protein A ali protein G oziroma kakšne druge proteine ozadja. Izboljšali bi vezavno kinetiko in zmanjšali nespecifično vezavo (13).

## 5.5 Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov

Noben klon iz prve selekcije s Ph. D<sup>TM</sup> 12 (Slika 13 in Slika 14) ni dal ustreznega odziva, vendar smo kljub temu naključno izbrali 10 bakteriofagnih klonov. Izolirali smo jim DNA in jo poslali na sekvenciranje. Iz pridobljenih sekvenc smo s pomočjo Expassy Translate tool ugotovili aminokislinsko zaporedje posameznih peptidov, predstavljenih na bakteriofagnih klonih (Tabela VII).

Dobili smo 8 različnih zaporedij aminokislin (po dva klona imata enak predstavljen peptid) (Tabela VII).

**Tabela VII: Aminokislinsko zaporedje peptidov, predstavljenih na izbranih bakteriofagnih klonih. Aminokisliline, ki tvorijo možen motiv, pomemben za vezavo na protein G ali A, so označene zeleno in rumeno.**

Oznaka bakteriofagnega klona	Zaporedje aminokislin peptida
ID12N15	K L W S I P T N F L L P*
ID12S12	W G P S <b>R</b> S <b>L</b> V <b>D</b> V <b>F</b> R
ID12S8, ID12S11	V V E S P <b>K</b> R <b>A</b> G <b>E</b> A <b>Y</b>
ID12N8	<b>S L S</b> F M D R <b>L</b> T <b>Q S T</b>
ID12N13, ID12N19	<b>H L S</b> R <b>P N</b> M S <b>N T S</b> A
ID12N11	H <b>H L</b> R I <b>P</b> Y A L D <b>Q T</b>
ID12N14	<b>H N T</b> W W <b>Q</b> A D Y <b>Q P T</b>
ID12S7	R V <b>H</b> P L E S <b>Q</b> M I F <b>Q</b>

\*netarčni peptid s potrjeno vezavo na ozadje

Iz pridobljenih zaporedij aminokislin lahko razpoznamo dva motiva, ki bi lahko bila pomembna za vezavo Fc regij protiteles na protein G ali protein A.

Tudi s prileganjem teh zaporedij na zaporedje aminokislin protrombina s pomočjo programskega orodja UniProt Align (dostop online 26. 1. 2017: <http://www.uniprot.org/align/>) ne pride do ujemanja zaporedij aminokislin peptidov, prestavljenih na bakteriofagih, in protrombina. To je dodaten dokaz, da nismo uspeli pridobiti bakteriofagnih klonov z zaporedji aminokislin, ki bi se ujemale s protrombinom. Razlogi za to so navedeni že prej, saj smo s testom ELISA (Slika 21) ugotovili, da naše selekcije niso potekle v pravo smer in da se izolirani bakteriofagni kloni ne vežejo specifično na protitelesa proti protrombinu.

Zaporedja smo prilegali tudi na zaporedje aminokislin Fc dela protiteles s pomočjo istega programskega orodja UniProt Align (dostop online 27. 5. 2017: <http://www.uniprot.org/align/>). Tudi tu nismo opazili izrazitega ujemanja v primarnem zaporedju. Verjetno so peptidi konformacijski mimetiki vezavnega mesta, s katerim se Fc fragment veže na protein G ali A.

Mimetiki Fc regije protiteles so zanimivi, saj predstavljajo označevalce, s pomočjo katerih lahko v procesu proizvodnje načrtujemo afinitetno čiščenje rekombinantnih proteinov.

Ob pregledu zaporedja aminokislin peptidov s spletnim orodjem SAROTUP (dostop online 3. 3. 2017: <http://immunet.cn/sarotup/cgi-bin/TUPScan.pl>) smo ugotovili, da klon ID12N15 izraža na površini »netarčni« peptid. Motiv K(L/V)WX(I/L/V)P domnevno veže lipid A, ki je del lipopolisaharida *E. Coli*. Le ta je pogost kontaminant v očiščenih fagnih vzorcih po pomnoževanju, po obarjanju fagov s PEG/NaCl (29).

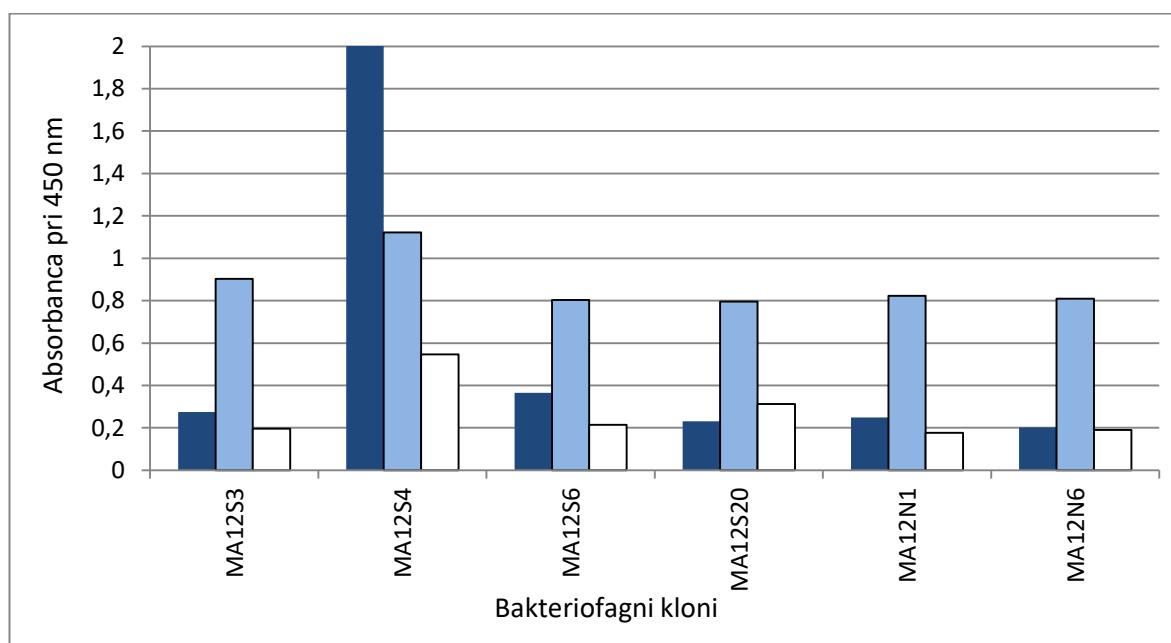
Pri delu z bakteriofagnimi knjižnicami se sicer ne zgodi redko, da selekcioniramo peptide, ki se ne vežejo na izbrano tarčo. Peptidi, predstavljeni na površini bakteriofagov, se lahko namesto na tarčo vežejo na plastiko, mikrosfere, proteine za imobilizacijo (npr. streptavidin, protein G ali A), blokirno sredstvo, nečistote v vzorcu... Še pogosteje pa se to zgodi, ko imamo nizko avidna tarčna protitelesa (29). Ravno zato je zelo pomembno, da imamo učinkovito in optimizirano metodo, s katero ločimo prave vezalce od netarčnih.

## 5.6 Dodatno ovrednotenje vezave bakteriofagnih klonov

---

Na protitelesa proti protrombinu bolnika z arterijsko trombozo (ID) smo poskusili vezati tudi posamezne bakteriofagne klone, pridobljene v selekcijah, kjer so bila kot tarčna protitelesa uporabljena protitelesa proti protrombinu bolnika z vensko trombozo (MA). Uporabili smo tiste klone, ki so se v magistrskem delu Vite Hren izkazali kot najmočnejši

vezalci na protitelesa proti protrombinu (MA12S3, MA12S4, MA12S6, MA12S20, MA12N1 in MA12N6), pridobljena iz bolnika z vensko trombozo. To smo storili, da bi preverili, ali se morda kloni, pridobljeni z bakteriofagnimi selekcijami na visoko avidnih tarčnih protitelesih proti protrombinu bolnika z vensko trombozo, vežejo tudi na nizko avidna protitelesa proti protrombinu bolnika z arterijsko trombozo. Torej imajo podobne paratope. Le klon MA12S4 je dal relativno močan odziv v vdolbinici s tarčnimi protitelesi (Slika 22). Peptid L T C N G P F C L G Y W se je vezal na protitelesa bolnika z arterijsko trombozo in vensko trombozo. Možno je, da je del protiteles iz obeh pacientov usmerjen proti istemu epitopu in je peptid L T C N G P F C L G Y W mimetik tega epitopa. Ostali peptidi pa ne oponašajo skupnih epitopov.



Slika 22: Fagna ELISA, vezava bakteriofagnih klonov, pridobljenih s selekcijami na protitelesih proti protrombinu bolnika z vensko trombozo, na protitelesa proti protrombinu bolnika z arterijsko trombozo, imobilizirana preko kozjih anti-IgG protiteles. Temno modri stolpec predstavlja vezavo fagov na tarčna protitelesa proti protrombinu bolnika z arterijsko trombozo, svetlo modri stolpec predstavlja vezavo na kozja anti-IgG protitelesa, beli stolpec pa vezavo na BSA.

## 5.7 Pomembnost protiteles proti protrombinu

Z našimi poskusi nismo uspeli najti epitopov protiteles proti protrombinu. Optimizirali smo test fagna ELISA in predlagali nekaj sprememb, s katerimi bi lahko v prihodnje optimizirali postopek selekcije, kar bi nas privedlo do zelenih končnih rezultatov. Predvidevamo, da se bodo raziskave v zvezi s protitelesi proti protrombinu nadaljevale,

sploh glede na to, da sta nedavno dve skupini predlagali dve lestvici za ocenjevanje tveganja trombotičnih dogodkov. Otomo in sodelavci so predlagali antifosfolipidno lestvico na podlagi hkratnega testiranja različnih antifosfolipidnih protiteles, med drugim tudi aPS/PT. Samo z merjenjem vseh predlaganih testov ima lestvica največjo napovedno moč za postavljanje diagnoze antifosfolipidnega sindroma in napovedovanje trombotičnih dogodkov. Na podlagi te lestvice bi se lahko zdravniki odločali za primerno zdravljenje (27). Sciascia in sodelavci pa so razvili GAPSS – the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score – lestvico za ocenjevanje tveganja trombotičnih dogodkov in prekinitve nosečnosti pri bolnikih s sistemskim lupusom eritematosusom. V lestvico so vključili šest spremenljivk, to so arterijska hipertenzija, hiperlipidemija, antikardiolipinska protitelesa, lupusni antikoagulant, anti- $\beta_2$ GPI in aPS/PT. Vse so se izkazale za neodvisne faktorje tveganja za trombozo ali prekinitve nosečnosti (28).

Več raziskovalnih skupin je v zadnjih letih potrdilo klinično uporabnost določanja protiteles proti protrombinu, kar je v sistematičnem pregledu povzel Sciascia s sodelavci (23). Kljub vedno večjemu zanimanju za protitelesa proti protrombinu pa v literaturi do danes še ni objavljene študije, ki bi preučevala vezavno mesto protiteles na protrombinu. V magistrski nalogi smo se sistematično lotili te problematike in poskusili določiti njihovo vezavno mesto na protrombinu. Ugotovitve bi lahko posledično omogočile natančnejšo razlago patogene vloge in delovanja teh protiteles v telesu bolnikov z antifosfolipidnim sindromom. Z izoliranimi protitelesi iz seruma bolnika z arterijsko trombozo specifičnih epitopov na protrombinu nismo uspeli določiti, kljub temu pa smo razrešili veliko neznank v postopku in tako postavili temelje za nadaljnje raziskave.

## 6. Zaključek

---

Protitelesa proti protrombinu so ena pomembnejših skupin antifosfolipidnih protiteles, ko govorimo o njihovi povezavi z antifosfolipidnim sindromom. Njihova vloga in delovanje v človeku še ni povsem jasna. Zagotovo prispevajo k povečanju tveganja za tromboze in zaplete v nosečnosti. Z bolj natančnim poznavanjem njihove strukture in vezave na protrombin bi lahko razjasnili nekaj njihovih značilnosti.

V tej magistrski nalogi smo iz seruma bolnika z antifosfolipidnim sindromom z arterijskim zapletom izolirali protitelesa proti protrombinu. To smo izvedli z metodo afinitetne kromatografije na protein G in na protrombin. S testiranjem seruma s kaotropnim testom ELISA smo ugotovili, da so protitelesa tega bolnika večinoma nizko avidna. S postopkom izolacije smo uspeli izolirati populacijo visoko avidnih protiteles. Tako smo potrdili prvo hipotezo, saj smo izolirali protitelesa proti protrombinu ustrezne čistosti in specifičnosti. Uporabili smo jih kot tarčna protitelesa za selekcije s tremi različnimi bakteriofagnimi knjižnicami. Pridobili smo veliko bakteriofagnih klonov, ki smo jih želeli ovrednotiti s testom fagna ELISA, ki pa ga je bilo potrebno najprej optimizirati. V ta namen smo prvič zmanjšali količino uporabljenih tarčnih protiteles v posameznem testu ELISA, drugič spremenili blokirni in vezavni pufer, tretjič nanašali bakteriofagne klone na mikrotitrsko ploščico v PBS, četrtič nanašali klone na mikrotitrsko ploščico v TBS 5 mM CaCl<sub>2</sub>, petič uporabili kozja anti-IgG protitelesa za imobilizacijo tarčnih protiteles. Kot najboljša metoda se je izkazal test, kjer smo protitelesa proti protrombinu imobilizirali na mikrotitrsko ploščico preko kozjih anti-IgG protiteles. Z omenjeno metodo smo nato ovrednotili vezavo posameznih bakteriofagnih klonov na tarčna protitelesa. Tako smo potrdili tudi drugo hipotezo, saj smo našli ustrezne pogoje za uspešno vrednotenje vezave posameznih bakteriofagnih klonov na tarčna protitelesa.

Ugotovili smo, da se bakteriofagni kloni vežejo na kozja protitelesa proti človeškim IgG in ne na protitelesa proti protrombinu. Predvidevali smo, da je bakteriofagna selekcija potekla na protein G ali protein A in da je zato zaporedje aminokislin peptidov na fagih oponaša mesto na fragmentu protiteles Fc. Izvedli smo test ELISA z izpodrivanjem s fragmenti Fc, ki je potrdil naše domneve, torej da je selekcija potekla na protein G in protein A.

Pridobili smo nekaj zaporedij aminokislin peptidov, ki nakazujejo na dva motiva, ki pa se ne ujemata s primarnim zaporedjem aminokislin Fc dela protiteles. Specifičnih peptidov, ki bi oponašali epitope na protrombinu, nismo uspeli pridobiti. Tako tretje

hipoteze ne moremo potrditi. Namena naloge nismo dosegli, saj nismo našli epitopov protrombina, kamor se vežejo protitelesa proti protrombinu. Vendar smo optimizirali test fagna ELISA, kar bo olajšalo vse nadaljnje raziskave na tem področju.

## 7. Literatura

---

1. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42: 1309–11.
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295–306.
3. Roubey RA: Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* 1994; 84:2854–2867.
4. Žigon P., Ambrožič A., Čučnik S., et al. Modified phosphatidylserine-dependent antiprothrombin ELISA enables identification of patients negative for other antiphospholipid antibodies and also detects low avidity antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:1011–1018.
5. Žigon P., Čučnik S., Ambrožič A., et al. Antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex as an additional diagnostic marker of APS? *Lupus* 2012; 21: 790.
6. Amengual O., Atsumi T., Koike T. Specificities, Properties, and Clinical Significance of Antiprothrombin Antibodies. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48 (4): 886–895.
7. Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost.* 1995; 74(4): 1120–5.
8. Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, Kawasugi K, Gohchi K, Tsukamoto M. Phosphatidyl serine-dependent antiprothrombin antibody is exclusive to patients with lupus anticoagulant. *Br J Rheumatol.* 1996; 35(6): 589–91.
9. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9): 1982–93.

10. Rao L, Hoang A, Rapaport S. Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood* 1996;88:4173–82.
11. Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T. Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1999;8:761–6.
12. Žigon P., Ambrožič A., Božič B., et al. Protitelesa proti protrombinu. *Zdravniški vestnik* 2015; 84: 209–21.
13. New England Biolabs, Inc.. Ph.D.<sup>TM</sup> Phage Display Libraries, Instruction Manual NEB E8100S, E8101S, E8102L, E8110S, E8111L, E8120S, E8121L
14. Hamzeh-Mivehroud M, Alizadeh AA, Morris MB, et al. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug Discovery Today* 2013; 18 (24/25): 1144–57.
15. GE Healthcare. Affinity Chromatography, Principles and Methods. Handbook 18–1022–29.
16. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007; 532–33.
17. Fialova L. Avidity of antiphospholipid antibodies– our current knowledge. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2014; 63 (3): 221–5.
18. Vozelj M. Temelji imunologije. DZS, Ljubljana, 2000; 47–56, 111–12.
19. Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B. Affinity and avidity of autoantibodies. In: Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni P, editors. *Autoantibodies*. 3<sup>rd</sup> ed., Elsevier, 2014: 43–49.
20. Gharavi A, Reiber H. Affinity and avidity of autoantibodies. In: Peter J, Shoenfeld Y, editors. *Autoantibodies*. 1st ed., Amsterdam: Elsevier, 1996:13–23.
21. Čučnik S, Kveder T, Križaj I, Rozman B, Božič B. High avidity anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1478–82.
22. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koika T. Antiprothrombin Antibody Testing: Detection and Clinical Utility. *Semin Thromb Hemost*, 2008; 34(4): 335–9.
23. Sciascia S, Sanna G, Murru V, et al. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*, 2014; 111(2): 354–64.



24. Wild D. *The Immunoassay Handbook*. Elsevier Ltd., 3<sup>rd</sup> Ed., UK, 2005; 5–7, 751–752.
25. Dynabeads Protein G in Dynabeads Protein A. Life Technologies Corporation, 2011. Catalog num. 10003D, 10004D, 10009D.
26. Böttger V in Böttger A. *Epitope Mapping Using Phage Display Peptide Libraries*. *Epitope Mapping Protocols*, 2009; Volume 524 of the series *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>; 181–201.
27. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, et al. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis and Rheumatism*, 2012;64(2):504–12.
28. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. GAPSS: the Global Anti-phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology (Oxford)*, 2013;52(8):1397–403.
29. Vodnik M., Žager U., Štrukelj B., Lunder M. Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. *Molecules* 2011; 16: 790–817.
30. Smith P. G. Absorption spectrum and quantitation of filamentous phage. Dostop online 29. 07. 2017:<http://www.biosci.missouri.edu/smithGp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>.