

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA KAPŠ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA KAPŠ

**UPORABA PEPTIDNE KNJIŽNICE PRI DOLOČANJU  
VEZAVNIH ZNAČILNOSTI PROTITELES PROTI  
PROTROMBINU**

**DETERMINATION OF BINDING CHARACTERISTICS OF  
ANTIBODIES AGAINST PROTHROMBIN USING PEPTIDE  
LIBRARY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem. ter na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod somentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm.. Določitev nukleotidnega zaporedja DNA so opravili v laboratoriju GATC Biotech v Nemčiji.

### **Zahvale**

Zahvaljujem se vsem, ki so mi omogočili opravljanje magistrske naloge. Hvala za posredovano strokovno znanje, usmeritve ter malo manj strokovne pogovore, zaradi katerih je bilo delo prijetnejše. Posebna zahvala gre mentorici doc. dr. Saši Čučnik, somentorici izr. prof. dr. Mojci Lunder in dr. Poloni Žigon. Za vso pomoč ter prijetno vzdušje v laboratoriju se zahvaljujem zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma ter sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo.

Najlepša hvala izr. prof. dr. Petri Kocbek ter izr. prof. dr. Žigi Jakopinu za pregled naloge in dobronamerne pripombe.

Nenazadnje iskrena hvala mojim najbližjim za vso podporo. Hvala, ker verjamete vame.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem. in somentorice izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm.. Naloga je del projekta ARRS, šifra P3-0314 (sistemske avtoimunske bolezni), nosilka projekta je izr. prof. dr. Snežna Sodin Šemrl, UKC Ljubljana, KO za revmatologijo. Delo je bilo odobreno s strani Komisije za medicinsko etiko z odločbo št. 99/04/15 (proučevanje vezavnih karakteristik antiprotrombinskih protiteles).

Petra Kapš

### **Komisija za oceno in zagovor**

Mentorica: doc. dr. Saša Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem.

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

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

# Kazalo vsebine

Seznam uporabljenih kratic in simbolov .....	iii
Okrajšave aminokislin .....	iv
Povzetek .....	v
Abstract .....	vi
<b>1 Uvod .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antifosfolipidni sindrom .....	1
1.2 Protrombin .....	2
1.3 Protitelesa proti protrombinu .....	5
1.4 Določanje vezavnih mest protiteles na antigenu .....	6
<b>2 Namen dela .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Materiali in aparature .....</b>	<b>12</b>
3.1 Biološki material .....	12
3.1.1 Serumi bolnikov z APS .....	12
3.1.2 Protitelesa .....	12
3.1.3 Bakterije .....	12
3.1.4 Bakteriofagna knjižnica .....	12
3.2 Reagenti .....	13
3.3 Pufri, raztopine in gojišča .....	16
3.4 Aparature in pribor .....	21
<b>4 Metode .....</b>	<b>24</b>
4.1 Določanje protiteles proti protrombinu s testom aPS/PT ELISA .....	24
4.1.1 Kompetitivna aPS/PT ELISA .....	24
4.2 Izolacija IgG protiteles na koloni z vezanim proteinom G po principu afinitetne kromatografije .....	25
4.3 Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom po principu afinitetne kromatografije .....	26
4.4 SDS PAGE .....	27
4.5 Selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-12™ .....	28
4.6 Fagna ELISA .....	32

4.6.1	Presejalna fagna ELISA.....	32
4.6.2	Semikvantitativna fagna ELISA.....	32
4.6.3	Kompetitivna fagna ELISA.....	33
4.7	Izolacija in pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov .....	33
4.8	Spektrofotometrično določanje koncentracije bakteriofagov.....	33
4.9	Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov .....	34
4.10	Določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombinu.....	35
<b>5</b>	<b>Rezultati in razprava.....</b>	<b>36</b>
5.1	Izolacija IgG frakcije protiteles iz serumov bolnikov z APS .....	36
5.2	Izolacija protiteles proti protrombinu.....	36
5.3	Selekcija vezalcev protiteles proti protrombinu iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.- 12 <sup>TM</sup> .....	38
5.3.1	Določitev aminokislinskega zaporedja izbranih dodekapeptidov, izraženih na fagih .....	42
5.3.2	Primerjava vezave izbranih peptidov, izraženih na fagih.....	46
5.3.3	Potrditev specifičnosti vezave peptidov, izraženih na fagih, na tarčna protitelesa proti protrombinu s kompetitivno ELISA.....	47
5.3.4	Določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombinu.....	50
<b>6</b>	<b>Sklep.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>55</b>

## Seznam uporabljenih kratic in simbolov

APS	antifosfolipidni sindrom (ang. <i>antiphospholipid syndrome</i> ) <sup>1</sup>
aPS/PT ELISA	ELISA za določanje aPS/PT
aPS/PT	od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu
aPT	protitelesa proti samemu protrombinu
AUG	arbitrarne enote aPS/PT razreda IgG (ang. <i>arbitrary units for aPS/PT IgG</i> )
BSA	goveji serumski albumin (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
ELISA	encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu (ang. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
IgG	imunoglobulini razreda G
IgM	imunoglobulini razreda M
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
MM	molska masa
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
p.a.	analitska čistota (lat. <i>pro analysi</i> )
PBS	s fosfatom pufrana fiziološka raztopina (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	raztopina Tween 20 v PBS (ang. <i>phosphate buffered saline with Tween 20</i> )
pfu	plakotvorna enota (ang. <i>plaque-forming unit</i> )
Ph.D.-12™ knjižnica	bakteriofagna knjižnica dodekapeptidov (ang. <i>Phage Display Library</i> )
rpm	vrtljaji na minuto (ang. <i>revolutions per minute</i> )
SDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata
TBS	s Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol) pufrana fiziološka raztopina (ang. <i>tris buffered saline</i> )
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid

<sup>1</sup>Okrajšava dogovorjena na 4. Mednarodnem simpoziju o antifosfolipidnih protitelesih (Sirmione, Italija, april 1990)

## Okrajšave aminokislin

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

## **Povzetek**

Protitelesa proti protrombinu sodijo v skupino antifosfolipidnih protiteles, ki so značilno prisotna pri bolnikih z antifosfolipidnim sindromom. Najpogostejši zapleti omenjene avtoimunske bolezni so venske in arterijske tromboze ter zapleti v nosečnosti. Patogeneza bolezni še ni povsem pojasnjena, zato potekajo številne raziskave na tem področju. Izziv med drugim predstavlja določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombinu, kar je bil tudi cilj magistrskega dela. Iz združenih serumov bolnikov z antifosfolipidnim sindromom z zgodovino venskih tromboz smo izolirali IgG frakcijo protiteles proti protrombinu po principu afinitetne kromatografije. Z metodo bakteriofagnega prikaza smo iz knjižnice dodekapeptidov, izraženih na bakteriofagih, selekcionirali bakteriofage, ki so izkazovali vezavo na izolirana protitelesa proti protrombinu. Na podlagi vrednotenja z ELISA smo izolirali DNA izbranih bakteriofagnih klonov. Po sekvenciranju DNA smo iskali motiv, ki bi lahko predstavljal epitop na protrombinu. Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov smo prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina. S kompetitivnim testom ELISA smo potrdili, da izbrani dodekapeptidi, izraženi na bakteriofagih, predstavljajo mimetike protrombina. Rezultati kažejo, da motiv VGXK (X predstavlja katerokoli aminokislino) najverjetneje predstavlja del konformacijskega epitopa na protrombinu.

**Ključne besede:** protrombin, epitopsko mapiranje, bakteriofagna predstavljena knjižnica peptidov, antifosfolipidni sindrom, venske tromboze



## **Abstract**

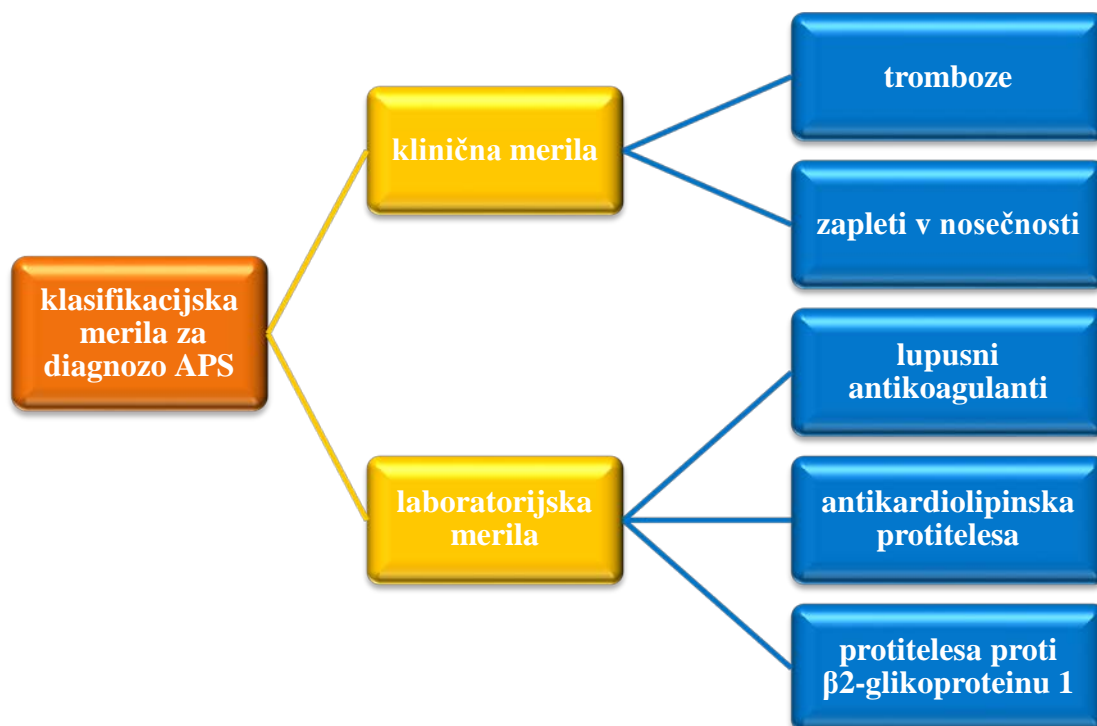
Antibodies against prothrombin (antiprothrombin antibodies) belong to a group of antibodies called antiphospholipid antibodies. Their elevated concentrations are characteristic for patients with antiphospholipid syndrome. The most common complications besides obstetric complications, are venous and arterial thrombosis. Due to the fact that pathogenesis of antiphospholipid syndrome is still unclear, several studies are trying to explain mechanisms of this disease. Determination of epitope of antiprothrombin antibodies remains a challenge. Our aim was to find epitopes recognized by antiprothrombin antibodies of different patients with antiphospholipid syndrome, who had experienced venous thrombosis. IgG fraction of antiprothrombin antibodies was purified by affinity chromatography from pool of sera of mentioned patients. Isolated antiprothrombin antibodies were later used as a target in selection from phage display library containing different dodecapeptides. Avidity of selected phages, displaying dodecapeptides, for our target was determined using ELISA. We isolated DNA of selected clones showing strongest binding to the target. Within obtained amino acid sequences we determined common motifs that could represent epitopes. To confirm that peptides are prothrombin mimetics, we used competitive ELISA. Alignments of peptides on primary and tertiary structure of prothrombin suggest that antiprothrombin antibodies recognise a conformational epitope. The most common motif VGXK (X representing any amino acid) is likely only a part of conformational epitope.

**Keywords:** prothrombin, epitope mapping, phage display peptide library, antiphospholipid syndrome, venous thrombosis

# 1 Uvod

## 1.1 Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom (APS) ali Hughesov sindrom je sistemska avtoimunska bolezen z nejasno patofiziologijo, katere pogostost ni znana. Vzrok leži v kompleksni postavitvi diagnoze. Klasifikacijska merila za opredelitev APS prikazuje slika 1 [1]. Diagnozo gotovega APS lahko postavimo, če bolnik izpolnjuje vsaj eno laboratorijsko in vsaj eno klinično merilo.



Slika 1: Klasifikacijska merila za določitev APS.

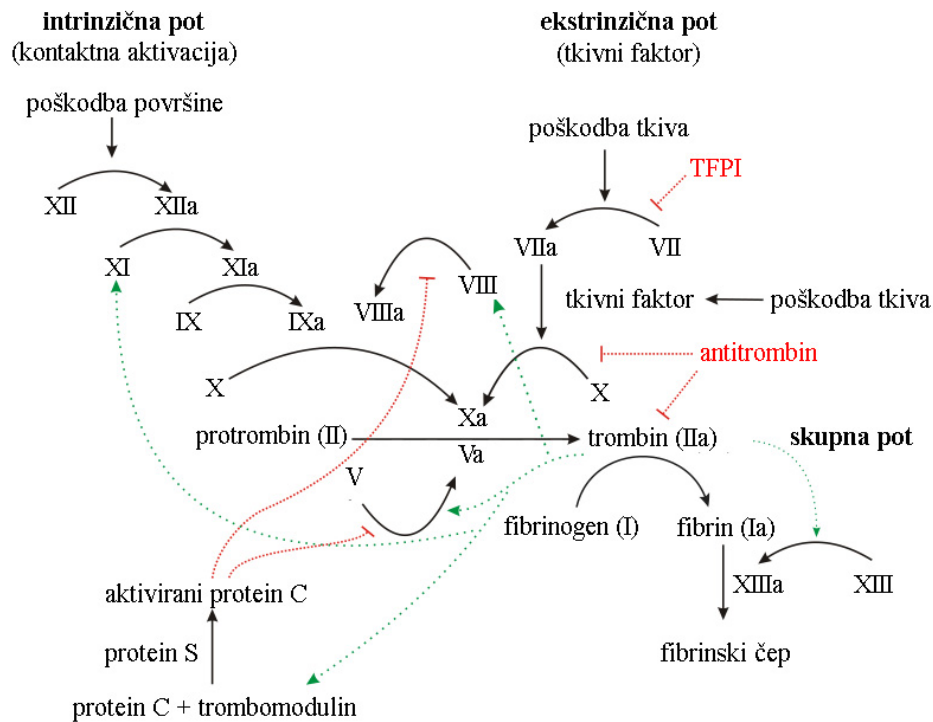
Za bolnike z APS je značilna prisotnost antifosfolipidnih protiteles (aPL), ki mora biti potrjena z dvema meritvama v razmaku vsaj 12 tednov. Tako se izognemo lažno pozitivnim rezultatom, saj so aPL lahko nepatološko povišana tudi v času infekcij. aPL so velika heterogena skupina imunoglobulinov, ki se kljub imenu ne vežejo na fosfolipide, temveč so usmerjena proti plazemskim proteinom z afiniteto za anionske (tudi fosfolipidne) površine. Med antigenske tarče aPL med drugim sodijo  $\beta$ 2-glikoprotein I, protrombin, visoko- in nizkomolekularni kininogeni, aneksin V, (aktivirani) protein C ter protein S [2]. Veliko antigenov aPL je vključenih v strjevanje krvi [3]. Posledica tega je večja pojavnost tromboz pri bolnikih z APS.

aPL merimo s specifičnimi in nespecifičnimi testi. Med prve štejemo funkcijski test koagulacije, s katerim določamo aktivnost lupusnih antikoagulantov, medtem ko s specifičnimi encimskoimunskimi metodami na trdnem nosilcu (ELISA) določamo protitelesa proti kardiolinu in protitelesa proti  $\beta$ 2-glikoproteinu I. Poleg aPL, ki so vključena v merila APS, so tudi protitelesa proti protrombinu dober potencialni biološki označevalec za APS, zato so predmet številnih raziskav [4, 5]. Navkljub temu protitelesa proti protrombinu zaenkrat še niso vključena med klasifikacijska merila za APS, vendar kažejo statistično značilno povezavo s to boleznijo in aktivnostjo lupusnih antikoagulantov [6].

## ***1.2 Protrombin***

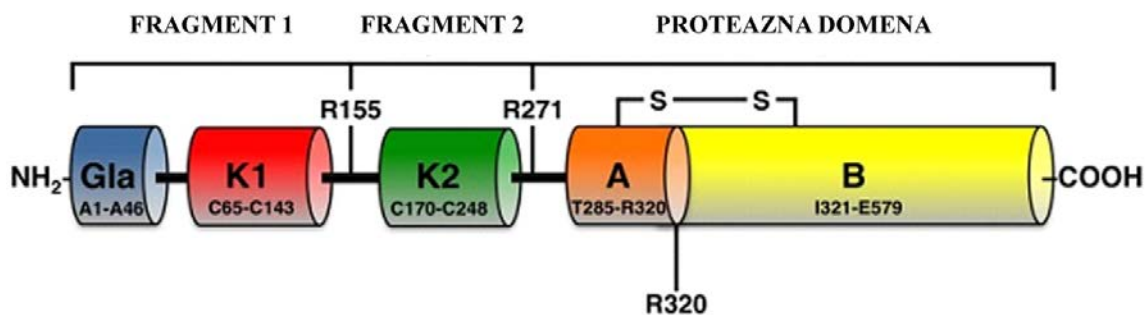
Protrombin ali faktor II je glikoprotein z molekularno maso 72 kDa. Sestavljen je iz 579 aminokislin, vsebuje pa 12 % ogljikovih hidratov [5, 7]. V plazmi je normalno prisoten v koncentraciji 100 mg/L [5]. Razpolovni čas protrombina znaša približno 60 ur [8].

Protrombin ima pomembno vlogo v procesu strjevanja krvi. Je proencim, ki nastaja v jetrih. Za njegov vstop v proces strjevanja krvi je nujno potrebna od vitamina K odvisna karboksilacija ostankov glutaminske kisline. Karboksilirani protrombin se ob prisotnosti pozitivno nabitih kalcijevih ionov poveže z negativno nabitimi fosfolipidnimi površinami in tako vstopa v reakcije z ostalimi faktorji in kofaktorji strjevanja krvi [9] (slika 2).



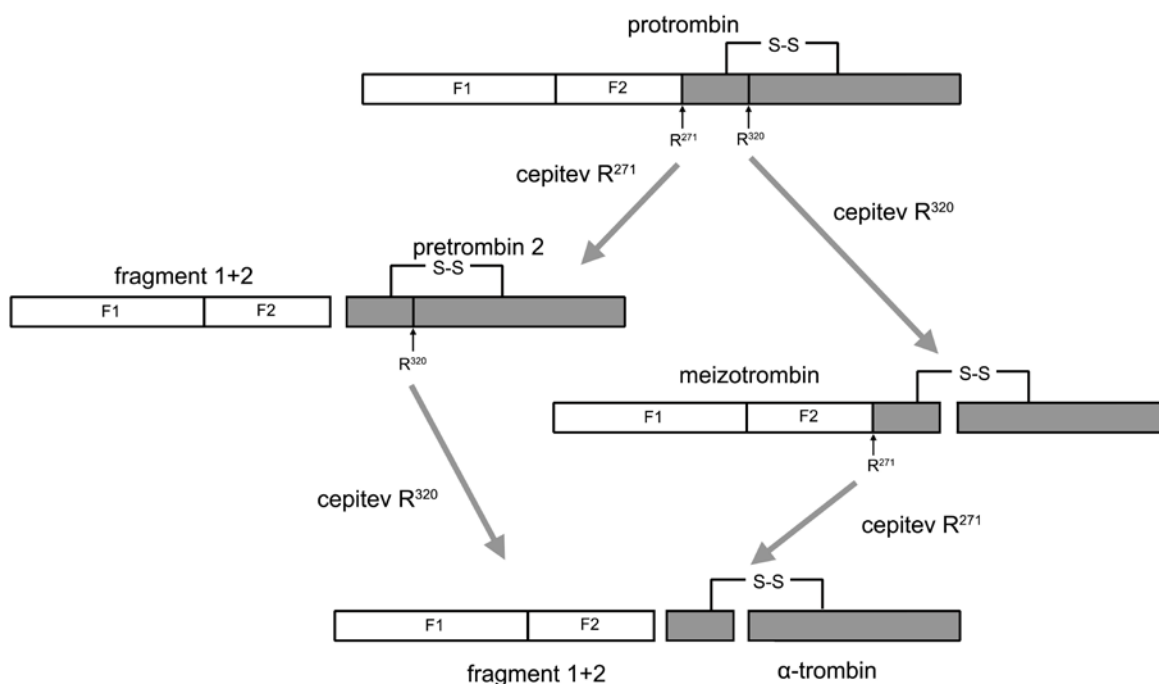
Slika 2: Potek strjevanja krvi. Strjevanje krvi poteka po ekstrinzični in intrinzični poti. Slednja predvsem pospeši proces strjevanja krvi, ki se začne z ekstrinzično potjo. Od stopnje, kjer se vključuje faktor Xa, poteka proces po skupni poti [9]. Faktorji strjevanja krvi so označeni s pripadajočimi rimskimi številkami; TFPI: inhibitor poti tkivnega faktorja. Prirejeno po [10].

Protrombin je sestavljen iz Gla domene, dveh »kringle« domen ter katalitične domene serinske proteaze. Gla domena je domena, na kateri poteka omenjena karboksilacija in preko katere se protrombin veže na fosfolipide – ta vezava omogoči pretvorbo v biološko aktiven  $\alpha$ -trombin. Preko »kringle« domen se trombin veže na fibrin [5]. Gla domena in »kringle« 1 (K1) skupaj tvorita fragment 1, domena »kringle« 2 (K2) predstavlja fragment 2, katalitično proteazno domeno pa sestavljata verigi A in B (slika 3).



Slika 3: Struktura protrombina. Protrombin sestavljajo fragment 1, ki ga tvorita Gla domena in »kringle« domena 1 (K1), fragment 2 s »kringle« domeno 2 (K2) ter proteazna domena, ki vsebuje verigo A in verigo B. Prirejeno po [11].

Protrombinazni kompleks pretvori protrombin v trombin s cepitvijo na mestih Arg-271 in Arg-320. Tako pride do nastanka neaktivnega prekursorja pretrombina-2 oziroma aktivnega intermedata meizotrombina. Od mesta poteka pretvorbe je odvisno, katera izmed dveh poti pretvorb prevladuje. Na površini trombocitov protrombinaza aktivira protrombin preko poti pretrombin-2, na netrombocitni površini ali sintetičnih fosfolipidih poteka aktivacija po poti meizotrombina [8] (slika 4).



Slika 4: Pretvorba protrombina v trombin. Cepitev protrombina poteka na dveh mestih, in sicer Arg-271 in Arg-320. Če najprej poteče cepitev na Arg-271, poteka pretvorba preko pretrombina 2, sicer poteka preko meizotrombina. Končni rezultat obeh cepitev je trombin. Prirejeno po [5]

Po proteolizi protrombina nastane trombin ali faktor IIa. Trombin je serinska proteaza, ki cepi in aktivira številne molekule, med njimi tudi topni fibrinogen (faktor I) v netopni fibrin (faktor Ia). Ta cepitev je ključna za zaustavitev krvavitve [9]. Poleg tvorbe fibrinskega čepa, ima trombin vlogo pri aktivaciji trombocitov, aktivaciji faktorjev V, VIII in XI (pozitivna povratna zanka), ščiti pred fibrinolizo ter se veže na trombomodulin – preko proteina C poteče inaktivacija kofaktorjev Va in VIIIa (negativna povratna zanka) [5].

### ***1.3 Protitelesa proti protrombinu***

Protitelesa proti protrombinu razreda IgM in/ali IgG so prisotna pri približno polovici bolnikov z aPL [3]. Za dokazovanje prisotnosti protiteles proti protrombinu se danes najpogosteje uporablja ELISA [5]. Glavna razlika med posameznimi različicami ELISA je v predstavitvi antigena. Pri testih, kjer se kot antigen uporablja protrombin, se merijo protitelesa proti samemu protrombinu (aPT), medtem ko se pri drugih testih kot antigen uporablja kompleks fosfatidilserin/protrombin in omogočijo določitev od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu (aPS/PT) [3]. Za omenjeni metodi se je izkazalo, da zajameta različne populacije protiteles proti protrombinu [4].

Raziskovalci so dokazali, da je določitev klinično pomembnih protiteles proti protrombinu boljša, če je protrombin vezan na fosfatidilserin ob prisotnosti kalcijevih ionov. Pri tem testu se doseže večja koncentracija in pravilna orientacija antigena, pride lahko tudi do zajetja še krožečih kompleksov protrombina s protitelesi proti protrombinu, poleg tega je možen pojav neoepitopov, ki se razkrijejo le, če je protrombin vezan na fosfatidilserin [3]. Protitelesa aPS/PT predstavljajo dokazano močnejši dejavnik tveganja za trombozo kot aPT [4], poleg tega so z modifikacijo metode aPS/PT ELISA Žigonova in sodelavci dosegli večjo diagnostično občutljivost [6]. S sočasno inkubacijo protrombina in seruma so omogočili določitev nizko avidnih protiteles, ki jih s predhodnimi testi ni bilo mogoče določiti. V izvedeni raziskavi je bilo med bolniki s pozitivnim rezultatom aPS/PT ELISA 4 % takih, ki so bili negativni na vsa ostala aPL, kljub prisotnosti kliničnih znakov, značilnih za APS [6]. Glede na trenutno priznana klasifikacijska merila teh bolnikov ne moremo razvrstiti med bolnike z APS.

Protitelesa proti protrombinu še niso uvrščena med laboratorijska klasifikacijska merila za opredelitev APS, vendar številne študije potrjujejo njihovo dobro korelacijo s klinično sliko APS [4, 12]. Dokazano je, da so protitelesa proti protrombinu statistično značilno

povezana tako z nastankom tromboz kot tudi z zapleti v nosečnosti. V eni izmed študij so protitelesa proti protrombinu izmed vseh aPL predstavljala celo največje tveganje za zaplete v nosečnosti in so bila tudi edina protitelesa, povezana z zapleti v zgodnji nosečnosti [12]. V primerjavi s protitelesi proti kardiolipinu in protitelesi proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I, ki sodijo med laboratorijska merila, imajo protitelesa proti protrombinu dokazano večjo diagnostično težo za pojav tromboze [6]. Z ozirom na vrsto tromboze, je povezava protiteles proti protrombinu večja z venskimi trombozami kot z arterijskimi trombozami [4]. Tako kot za ostale aPL, tudi za protitelesa proti protrombinu velja, da je diagnostični pomen za trombozo večji pri protitelesih razreda IgG v primerjavi z IgM [13]. Novejše raziskave so pokazale, da se bolnike z APS najbolje opredeli z določitvijo več različnih tipov aPL, saj je prisotnost večih različnih tipov aPL, med njimi tudi protiteles proti protrombinu, povezana z večjim tveganjem za tromboze [6].

#### ***1.4 Določanje vezavnih mest protiteles na antigenu***

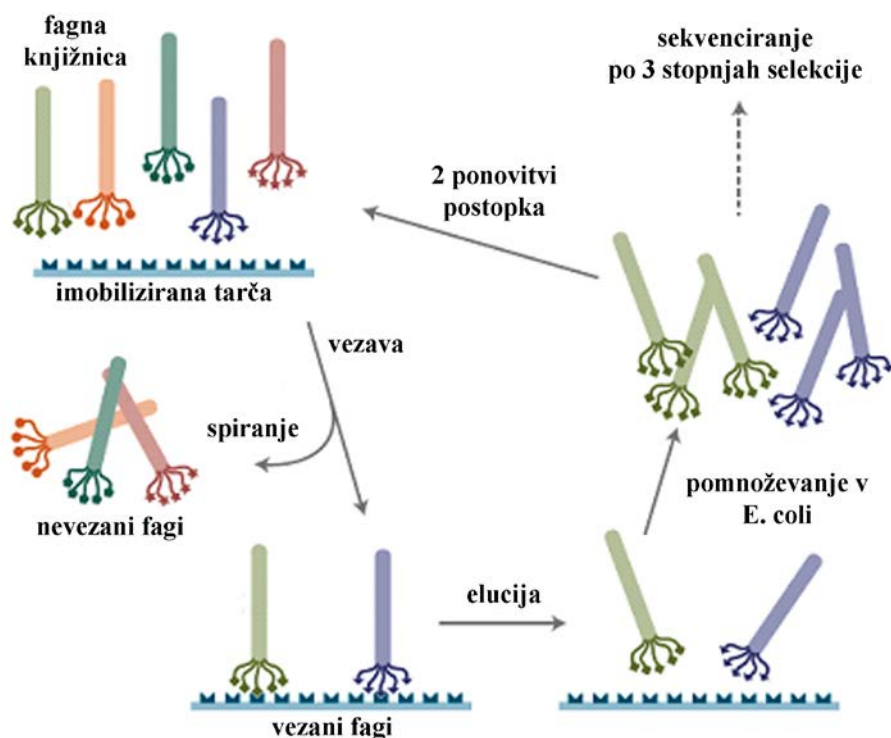
Poznavanje specifičnosti vezavnih mest med paratopom protitelesa in epitopom tarčnega antigena je izredno pomembno, saj omogoča razvoj novih zdravilnih učinkovin, cepiv, pripomore k izboljšanju diagnostike in razumevanju mehanizmov nastanka bolezni ter njenega poteka. V splošnem ločimo linearne in konformacijske epitope. Linearne sestavlja kontinuirano zaporedje aminokislin proteina, medtem ko so aminokisliline, ki tvorijo konformacijski epitop, v aminokislinskem zaporedju ločene in se združijo šele v prostorski strukturi proteina [14]. Za ugotavljanje lastnosti vezavnega mesta na antigenu (epitopa) uporabljamo epitopsko mapiranje. Razvili so že več metod za določanje epitopov:

- a) rentgenska kristalografija kompleksa antigen-protitelo
- b) jedrska magnetna resonanca – razlika v spektru prostega antigena in kompleksa antigen-protitelo
- c) s protitelesi inhibirana zamenjava vodika z devterijem v antigenu, ki ji sledi masna spektrometrija
- d) proučevanje manjših fragmentov antigena (ang. *peptide scanning*)
- e) mutageneza antigena ali protitelesa in testiranje vezave antigen-protitelo
- f) *in silico* napovedovanje epitopov – določanje s pomočjo računalniških orodij
- g) uporaba knjižnic – sintezne in biološke peptidne knjižnice [14].

Med obstoječimi metodami je zlati standard za določanje epitopov rentgenska kristalografija. Omogoča vizualizacijo, ločljivost na nivoju atoma in določitev tako

linearnih kot konformacijskih epitopov. Slabost omenjene metode je zahtevnost, potreba po velikih količinah prečiščenega proteina, priprava kristala kompleksa antigen-protitelo, predvsem pa gre za drago metodo [15]. V praksi se zato pogosteje poslužujemo ostalih metod. Za karakterizacijo epitopa se priporoča kombinacija različnih metod [14].

Pogosto se izvede določitev epitopa s pomočjo bioloških peptidnih knjižnic. Njihova glavna prednost je, da vsebujejo veliko število strukturno podobnih peptidov z različnimi naključnimi aminokislinskimi zaporedji, ki jih testiramo [16]. Za izražanje peptidne knjižnice se uporablja selekcijska tehnika, imenovana bakteriofagni prikaz (krajše fagni prikaz). Pri slednji je peptidna knjižnica izražena na površini fagnega viriona (zrel virusni delec, ki je zmožen okužiti celico in se v njej razmnoževati), medtem ko je genetski material, ki kodira vsako izmed različic peptida, v notranjosti. Tako dosežemo povezavo med aminokislinskim zaporedjem posameznega peptida in DNA, ki jo kodira. Omogočena je hitra selekcija peptidov z vezavno afiniteto za tarčno molekulo (npr. protitelo, encim, receptor na celični površini) [17]. Postopek selekcije specifičnih vezalcev izbrane tarče je prikazan na sliki 5.



Slika 5: Potek selekcije fagov z afiniteto do proučevane tarče. Prirejeno po [17]

Knjižnico naključnih peptidov, prikazanih na fagih, vežemo na izbrano tarčo (protitelesa, ki jih predhodno imobiliziramo, na primer na mikrosferah z vezanim proteinom G ali



proteinom A). Po spiranju nevezanih fagov eluiramo vezane fage. Elucijo lahko izvedemo bodisi nespecifično (npr. z nizkim pH) bodisi specifično s prebitkom znanega liganda izbrane tarče. Eluirane fage, ki se specifično vežejo na tarčo, pomnožimo v ustreznem bakterijskem gostitelju. Pomnožene fage izoliramo. Postopek ponovimo od 2 do 3-krat, s čimer obogatimo knjižnico [17].

Po zadnji selekcijski stopnji izoliramo posamezne fagne klonove, okarakteriziramo njihovo vezavo na tarčo s fagno ELISA ter izoliramo DNA izbranih klonov, ki izkazujejo specifično vezavo na tarčo [17]. Po določitvi aminokislinskega zaporedja peptida, izraženega na fagu, ki je mimetik epitopa na antigenu, iščemo motive, ki bi lahko bili pomembni pri tvorbi interakcij.

Poleg dejstva, da afinitetna selekcija pomeni tudi selekcijo kodirajočega gena, je dodatna prednost uporabe bioloških peptidnih knjižnic, prikazanih na fagih, ta, da lahko po izolaciji fagov, ki so specifični vezalci tarčnega antigena, le-te venomer pomnožimo v bakterijski kulturi (npr. *E. coli*). V primerjavi s sintezni knjižnicami je priprava biološke knjižnice cenejša. Večkratne zaporedne selekcije, ki jim sledi pomnoževanje, povečajo možnost določitve redkih ligandov, ki so v originalni knjižnici lahko prisotni zgolj enkrat [16]. Biološke knjižnice so sicer komercialno dostopne. Kljub številnim prednostim imajo tudi določene slabosti. Kloni se med seboj razlikujejo v sposobnosti infekcije gostitelja in v hitrosti rasti med pomnoževanjem, kar lahko privede do upada raznolikosti knjižnic [18] in celo do prevlade in selekcije peptidov, ki so s tarčo nepovezani, na račun učinkovitejše infekcije gostiteljskih celic in hitrejšega pomnoževanja.

Poznamo več različnih peptidnih knjižnic. V predhodnem raziskovalnem delu na področju določanja epitopov na protrombinu se je kot najboljša izbira izkazala peptidna knjižnica Ph.D.-12™ [19]. Peptidna knjižnica Ph.D.-12™ vsebuje  $10^9$  neodvisnih fagnih klonov, ki izražajo do pet kopij linearnih dodekamernih peptidov. Izraženi so na površini kapside bakteriofaga M13, ki je eden najpogosteje uporabljenih fagov. Omogoča pentavalentni prikaz peptidov kot N-terminalne fuzije z majhnim plaščnim proteinom pIII. Protein pIII modulira fagno infektivnost z vezavo na F-pilus bakterijske celice. Če je prikazani peptid dovolj kratek (pod 50 aminokislinskih ostankov), infektivna funkcija pIII ni ovirana, zato lahko tudi vseh 5 kopij proteina III izraža prikazani peptid [17].

M13 ni litični fag, zato se za vizualizacijo plakov priporoča uporaba X-gal/IPTG plošč. LacZ-alfa domena  $\beta$ -galaktozidaze omogoča uporabo modro/belega testa za ločitev bakterij, ki so sprejele fage (modri plaki) od tistih, ki jih niso [17, 20].

## 2 Namen dela

Bolniki z APS imajo slabšo kakovost življenja tako zaradi zapletov same bolezni kot tudi zaradi preventivnega zdravljenja z antikoagulanti in antiagregacijskimi učinkovinami. Za bolnike je značilna povišana prisotnost aPL, med katere sodijo tudi protitelesa proti protrombinu. Številne študije potrjujejo povezavo protiteles proti protrombinu s klinično sliko APS [4, 12, 13, 21-23], vendar je mesto njihove vezave na protrombin še neraziskano. K razumevanju patogeneze APS bi pomembno pripomoglo poznavanje še neznanih epitopov na protrombinu.

V predhodni magistrski nalogi Vite Hren [19] so prvi določili možne epitope na protrombinu na vzorcu enega bolnika z APS in zgodovino venskih tromboz. Nerazrešeno je ostalo vprašanje, ali se pri različnih bolnikih pojavljajo podobni epitopi ali se le-ti razlikujejo. V okviru magistrske naloge želimo na združenem vzorcu večjega števila bolnikov z zgodovino venskih tromboz odkriti morebiten prevladujoči epitop, ki se pojavlja pri večini bolnikov. Heterogenost paratopov predstavlja izziv pri nadaljnjem delu.

Cilji:

1. Iz združenih serumov 12 bolnikov z APS z zgodovino venskih tromboz bomo izolirali IgG frakcijo protiteles na koloni z vezanim proteinom G po principu afinitetne kromatografije.
2. Na koloni z vezanim protrombinom bomo izolirali IgG frakcijo protiteles proti protrombinu po principu afinitetne kromatografije.
3. Iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-12™ bomo selekcionirali peptide, ki se vežejo na protitelesa proti protrombinu.
4. Ovrednotili bomo vezavo izbranih peptidov, izraženih na fagih, na tarčna protitelesa z metodo ELISA.
5. Izolirali bomo DNA izbranih peptidov, izraženih na fagih, in določili njihovo aminokislinsko zaporedje.
6. Izbrane peptide bomo prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina ter določili možen epitop.

Hipoteze:

1. Pričakujemo, da bomo izolirali protitelesa proti protrombinu ustrezne čistosti in specifičnosti.

2. Predvidevamo, da bomo selekcionirali peptide, izražene na fagih, ki se specifično vežejo na protitelesa proti protrombinu. Domnevamo, da bodo peptidi mimetiki epitopa na protrombinu.
3. Predpostavljamo, da bomo določili epitop na protrombinu za tarčna protitelesa proti protrombinu.

## **3 Materiali in aparature**

### **3.1 Biološki material**

#### **3.1.1 Serumi bolnikov z APS**

Vzorec, ki smo ga preučevali, so bili združeni serumi 12 bolnikov z APS. Nujno vključitveno merilo uporabljenih serumov bolnikov je bila zgodovina venskih tromboz, medtem ko morebitni pridruženi zapleti niso bili izključitveno merilo. Bolniki so imeli bodisi primarni bodisi sekundarni APS. Protitelesa proti protrombinu, ki smo jih izolirali iz omenjenega vzorca, so bila heterogeno avidna, kar je posledica združenih serumov različnih bolnikov. Serume bolnikov z APS smo pridobili iz obstoječih bank vzorcev Laboratorija za imunologijo revmatizma UKC Ljubljana.

#### **3.1.2 Protitelesa**

- konjugat IgG (kozja protitelesa usmerjena proti človeškim IgG, specifična za Fc<sub>γ</sub> fragment, konjugirana z alkalno fosfatazo) – koncentracija protiteles 0,6 mg/mL, lot J2155D, Accurate chemical & scientific corporation, New York, ZDA (aPS/PT ELISA)
- kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, specifična za Fc fragment, I2136, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA (fagna ELISA)
- monoklonska protitelesa usmerjena proti bakteriofagu M13, konjugirana s hrenovo peroksidazo, lot 9667794, GE Healthcare, Little Chalfont, Združeno kraljestvo (fagna ELISA)
- standard IgG, pozitivna kontrola IgG in negativna kontrola IgG za aPS/PT ELISA iz banke vzorcev Laboratorija za imunologijo revmatizma

#### **3.1.3 Bakterije**

- *E. coli* sev ER 2738, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA

#### **3.1.4 Bakteriofagna knjižnica**

- bakteriofagna knjižnica Ph.D.-12<sup>TM</sup>, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA

### 3.2 Reagenti

- 2-merkaptometanol ( $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) – 99 %, Merck, Darmstadt, Nemčija
- agaroz – za elektroforezo (nizka elektroendoosmoza), Merck, Darmstadt, Nemčija
- analizni komplet MAb Trap, GE Healthcare:
  - 10 x koncentriran vezavni pufer: 20 mM natrijev fosfat v 20 % etanolu, pH 7,0
  - 10 x koncentriran elucijski pufer: 0,1 M glicin-HCl, pH 2,7
  - nevtralizacijski pufer: 1 M Tris-HCl v 20 % etanolu, pH 9,0
- barvilo Coomassie brilliant blue R – Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- brezvodna očetna kislina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) – najmanj 99,8 %, p.a., 1,049 kg/L, Honeywell, Fluka, Seelze, Nemčija
- bromfenol modro (tetrabromofenol sulfoftalein) – indikator, pH 3,0 – 4,6, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
- demineralizirana in destilirana voda – pripravljene v Laboratoriju za imunologijo revmatizma in na Fakulteti za farmacijo
- dietanolamin ( $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ ) – najmanj 98,0 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- dinatrijev fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) – 98,5 – 101,0 %, p.a, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) – najmanj 99,5 %, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvaška
- Dynabeads™ protein A – ThermoFisher Scientific, Massachusetts, ZDA
- Dynabeads™ protein G – Novex by Life Technologies, 30 mg/mL, Life Technologies, Oslo, Norveška
- etanol 96 % ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) – Ph.Eur., Carlo Erba, Francija
- etanol 96 % ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) – Ph. Eur., Alkaloid Skopje, Makedonija
- etanol – absolutni ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) – najmanj 99,8 %, p.a., Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
- etilendiamintetraočetna kislina dinatrijeva sol dihidrat (EDTA) – najmanj 99 %, za molekularno biologijo, Sigma-Aldrich, ZDA
- fosfatidilserin – 2 g/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA

- glicerol ( $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ ) – analízne čistote, Lekarna UKC Ljubljana, serija: 420214032014
- glicin – 99,7 – 101 %, p.a, Sigma-Aldrich, Kitajska
- goveji serumski albumin (BSA) frakcija V – pH 7,0, liofiliziran, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemčija
- goveji serumski albumin (BSA) – liofiliziran prah, najmanj 96 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG,  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$ ) – Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- kalcijev klorid dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) – najmanj 99,5 %, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 98,0 – 100,5 %, Ph. Eur., Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalijev dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – za kromatografijo, najmanj 99 %, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- kalijev klorid (KCl) – najmanj 99,0 %, za molekularno biologijo, Sigma-Aldrich, Izrael
- kalijev klorid (KCl) – najmanj 99,5 %, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
- kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) – 99,0 – 99,4 %, p.a., Sigma-Aldrich, Francija
- klorovodikova kislina 37 % (HCl) – Ph. Eur., Merck, Darmstadt, Nemčija
- klorovodikova kislina 37 % (HCl) – Ph. Eur., Sigma-Aldrich, ZDA
- LB Agar – Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- LB Broth – Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- magnezijev klorid ( $\text{MgCl}_2$ ) – 1,0 M standardna raztopina, Fluka Chemika, Švica
- magnezijev klorid heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ) – p.a., 99,0 – 102,0 %, Merck, Darmstadt, Nemčija
- metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) – najmanj 99,5 %, p.a., Lex d.o.o., LexChem, Koper, Slovenija
- N, N – dimetilformamid (DMF) – najmanj 99 %, za molekularno biologijo, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- natrijev acetat, brezvodni ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) – najmanj 99 %, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija
- natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) – najmanj 99,0 %, visoke čistote, Merck, Darmstadt, Nemčija

- natrijev jodid (NaI) – Ph. Eur., 99 – 100,5 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- natrijev klorid (NaCl) – najmanj 99,5 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- natrijev klorid (NaCl) – najmanj 99,8 %, p.a., Sigma-Aldrich, Danska
- natrijev lavril sulfat (SDS) – elektroforezne čistote, Bio-Rad laboratories, Richmond, Kalifornija
- označevalec Chemiluminescent Blue Ranger plošča, liofiliziran, Pierce, Rockford, ZDA
- para-nitrofenil fosfat – 5 mg tablete, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- poli(etilen glikol) 8000 (PEG 8000) – BioUltra, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
- protrombin – humani, liofiliziran, najmanj 95 %, lot HP 4900L, Enzyme Research Laboratories, Swansea, Združeno kraljestvo
- substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) – raztopina TMB/E (ES001), EMD Millipore, Merck, ZDA
- tetraciklin – najmanj 92,0 %, Sigma-Aldrich, Kitajska
- tris(hidroksimetil)aminometan ( $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) – najmanj 99,5 %, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvaška
- tris(hidroksimetil)aminometan ( $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) – Ph.Eur., Merck, Darmstadt, Nemčija
- Tween 20 (polioksietilen (20) sorbitan monolavrat) BioXtra – Sigma-Aldrich, Francija
- Tween 20 (polioksietilen sorbitan monolavrat) – viskozna tekočina, 0,06 mM (20 – 25 °C), Sigma-Aldrich, Francija
- ultra čista voda – MiliQ®, Millipore, Massachusetts, ZDA
- X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid,  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrClNO}_6$ ) – OmniPur, Calbiochem, EMD Millipore, Italija
- X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid,  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrClNO}_6$ ) – Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
- začetni oligonukleotid – -96 gIII Sequencing Primer, 20-mer, 1 pmol/ $\mu\text{L}$ , lot 231-05, New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, ZDA
- žveplova kislina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) – 95 – 97 %, p.a., Merck, Darmstadt, Nemčija



### 3.3 Pufri, raztopine in gojišča

#### aPS/PT ELISA, kompetitivna aPS/PT ELISA

- kloroform/metanol (volumsko razmerje 1:3)
- s Tris pufrana fiziološka raztopina s kalcijem (TBS  $\text{CaCl}_2$ ), pH 7,4

sestavina	koncentracija
NaCl (MM = 58,44 g/mol)	136 mM
KCl (MM = 74,56 g/mol)	2,7 mM
Tris (MM = 121,14 g/mol)	25 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (MM = 147,01 g/mol)	5 mM
dH <sub>2</sub> O	

Umerili smo pH z 2 M HCl.

- pufer za blokado, pripravo vzorcev, kontrol in standarda: 1 % (m/V) BSA/TBS  $\text{CaCl}_2$
- spiralni pufer: TBS  $\text{CaCl}_2$  0,05 % (V/V) Tween 20
- dietanolaminski pufer pH 9,8

sestavina	koncentracija
dietanolamin (MM = 105,14 g/mol)	970 mM
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (MM = 203,30 g/mol)	0,49 mM
$\text{NaN}_3$ (MM = 65,01 g/mol)	3,1 mM
dH <sub>2</sub> O	

Umerili smo pH z 2 M HCl.

#### Izolacija IgG protiteles proti protrombinu

Vse pufre smo sterilno filtrirali skozi 0,22  $\mu\text{m}$  filter oziroma 0,45  $\mu\text{m}$  filter.

- pufri iz analiznega kompleta MAb Trap Kit (GE Healthcare):
  - 10-krat koncentriran vezavni pufer: 20 mM natrijev fosfat v 20 % etanolu, pH 7,0
  - 10-krat koncentriran elucijski pufer: 0,1 M glicin-HCl, pH 2,7
  - nevtralizacijski pufer: 1 M Tris-HCl v 20 % etanolu, pH 9,0
- raztopina za shranjevanje: 20 % (V/V) etanol
- pufra za regeneracijo kolone:
  - a) blokirni pufer: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0

Umerili smo pH z 2 M HCl.

b) acetatni pufer: 0,1 M acetatni pufer pH 4,0, 0,5 M NaCl  
 50 mL 0,5 M raztopine očetne kisline (priprava iz brezvodne očetne kisline z gostoto 1,05 kg/L) smo dodali 100 mL 0,1 M raztopine natrijevega acetata.  
 Umerili smo pH z dodajanjem raztopine očetne kisline. Dodali smo ustrezno količino NaCl.

### **SDS PAGE**

- *pufer za elektroforezo – spodnji*: 0,025 M Tris, 0,192 M glicin, pH 8,3
- *pufer za elektroforezo – zgornji*: spodnjemu pufru smo dodali SDS v koncentraciji 0,1 % (V/V)
- *4-krat koncentriran pufer za vzorce (reducirajoči SDS pufer)*

sestavina	količina
Tris-Cl, pH 6,8	250 mM
SDS	8 m/V %
glicerol	40 V/V %
2-merkaptioetanol	20 V/V % (0,8 µL/vzorec)
bromfenolmodro	0,02 m/V %
dH <sub>2</sub> O	

Proteinski vzorec smo pripravili tako, da smo pufer za vzorce 4-krat redčili.

- *barvilo*

sestavina	količina
Coomassie brilliant blue R	1,0 g
ledocetna kislina	100 mL
etanol 96 %	450 mL
dH <sub>2</sub> O	do 1000 mL

- *raztopina za razbarvanje*

sestavina	količina
ledocetna kislina	100 mL
etanol 96 %	250 mL
dH <sub>2</sub> O	do 1000 mL

### Selekcija specifičnih bakteriofagnih klonov iz peptidne knjižnice

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

- *LB gojišče*: 8 g LB Broth v 400 mL dH<sub>2</sub>O
- *LB agar*: 14 g LB agar v 400 mL dH<sub>2</sub>O
- *priprava gojišča z E. coli*

Delo je potekalo aseptično. Na agarno gojišče smo nanegli tetraciklin v končni koncentraciji 20 mg/L. Nato smo nanegli *E. coli*, sev ER 2738. Petrijevke smo zatesnili s parafilmom in inkubirali preko noči pri 37 °C.

- 2 % (V/V) *X-gal* v dimetilformamidu
- 1 M IPTG
- *diferencialno agarno gojišče X-gal/LB/IPTG*

Avtoklaviran LB agar smo vlili v petrijevke. Do uporabe smo petrijevke shranjevali v hladilniku. Diferencialno agarno gojišče X-gal/LB/IPTG smo pripravili sveže. Na vsako ploščo smo nanegli mešanico X-gal/LB/IPTG s končno koncentracijo 4,5 g/L X-gal in 24 mM IPTG.

- *agarozni top*

sestavina	količina
1 M MgCl <sub>2</sub>	197 µL (4,9 mM)
agarozna	0,28 g
LB gojišče	do 40 mL

- *PEG/NaCl*

sestavina	količina
PEG-8000	8 g (0,025 M)
NaCl (MM = 58,44 g/mol)	5,85 g (2,5 M)
dH <sub>2</sub> O	do 40 mL

- *s fosfatom pufrana fiziološka raztopina (PBS), pH 7,4*

sestavina	koncentracija
NaCl (MM = 58,44 g/mol)	136 mM
KCl (MM = 74,56 g/mol)	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O (MM = 177,99 g/mol)	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (MM = 136,09 g/mol)	1,8 mM
dH <sub>2</sub> O	

Umerili smo pH z 2 M HCl.

- *PBS 0,05 % (V/V) Tween 20*
- *PBS 0,1 % (V/V) Tween 20*
- *bakterijska kultura za pomnoževanje, bakterijska kultura za titracijo*

Uporabili smo vnaprej pripravljeno gojišče z *E. coli*. Za pomnoževanje smo v erlenmajerico z utori odmerili 20 mL LB gojišča, ki smo ga inokulirali z eno kolonijo *E. coli*. Za titracijo smo v stekleni viali pomnoževali kolonijo *E. coli* v 5 mL LB gojišča. Inkubirali smo pri 37 °C ob stresanju, da so bakterije zrasle do optične gostote OD<sub>600</sub> = 0,01 – 0,05 za pomnoževanje (rahlo motno) oziroma 0,5 za titracijo (zelo motno).

### **Pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov**

- *LB gojišče*
- *tetraciklin 20 mg/mL*
- *PEG/NaCl*
- *PBS, pH 7,4*

### **Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov**

- *jodidni pufer, pH 8,0*

sestavina	količina
Tris (MM = 121,14 g/mol)	48,5 mg (10 mM)
32 % HCl (MM = 36,46 g/mol)	39,3 µL (10 mM)
0,5 M EDTA (MM = 292,24 g/mol)	80 µL
NaI (MM = 149,89 g/mol)	23,98 g (4 M)
dH <sub>2</sub> O	do 40 mL

Umerili smo pH z 2 M HCl.

- *PEG/NaCl*

- 96 % (V/V) etanol
- 70 % (V/V) etanol

**Presejalna fagna ELISA, semikvantitativna fagna ELISA, kompetitivna fagna ELISA**

- PBS, pH 7,4
- PBS 0,1 % (V/V) Tween 20
- 1 % (m/V) BSA/PBS
- TBS, pH 7,4

sestavina	koncentracija
NaCl (MM = 58,44 g/mol)	136 mM
KCl (MM = 74,56 g/mol)	2,7 mM
Tris (MM = 121,14 g/mol)	25 mM
dH <sub>2</sub> O	

Umerili smo pH z 2 M HCl.

- pufer za substrat TMB

sestavina	količina
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (brezvodni) (MM = 141,96 g/mol)	50 mM
citronska kislina (brezvodna) (MM = 192,124 g/mol)	25 mM

Umerili smo pH do 5,0 z NaOH ali H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Dopolnili smo z dH<sub>2</sub>O do 500 mL.

Pufer smo filtrirali skozi 0,22 µm filter.

- 2 M žveplova kislina

### **3.4 Aparature in pribor**

- drobni laboratorijski pribor
- pipete Research (10 – 100  $\mu\text{L}$ , 20 – 200  $\mu\text{L}$ , 100 – 1000  $\mu\text{L}$ ) in multipipete Research (10 – 100  $\mu\text{L}$ , 30 – 300  $\mu\text{L}$ ), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- membranski filtri za enkratno uporabo 0,20  $\mu\text{m}$  in 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore Corporation, ZDA
- analitska tehtnica Mettler PM2500, Mettler Toledo, Švica
- stresalnik mikrotitrskih plošč MTS 2/4 digital, IKA, ZDA
- vibracijski mešalnik Vortex – Genie 2, Scientific Industries, G560E, ZDA

#### **aPS/PT ELISA, kompetitivna aPS/PT ELISA**

- čitalec mikrotitrskih plošč SunRise, Tecan, Švica
- polistirenske mikrotitrške plošče Costar medium binding, 96 well EIA/RIA plate, Corning Inc., New York, ZDA
- spiralec mikrotitrskih plošč EL $\times$ 405, BioTek, Winooski, Vermont, ZDA

#### **Izolacija IgG**

- HiTrap<sup>TM</sup> Protein G HP, 5 mL – MAb Trap Kit, GE Healthcare, Združeno kraljestvo
- pH lističi MColorpHast<sup>TM</sup>, Merck, Nemčija
- spektrofotometer Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, ZDA

#### **Razsoljevanje vzorca**

- Amicon Ultra-4 50K centrifugirke z ultrafiltracijsko membrano, Merck, Nemčija
- centrifuga 5430 R, Eppendorf, Nemčija
- centrifuga Hettich universal 32 R, DJB Labcare, Združeno kraljestvo

#### **Izolacija IgG frakcije protiteles proti protrombinu**

- kolona z vezanim protrombinom, pripravljena v Laboratoriju za imunologijo revmatizma
- črpalka Bio-Rad BioLogic LP, Bio-Rad laboratories, ZDA
- pH meter Mettler Toledo Seven Easy, Mettler Toledo, ZDA
- spektrofotometer Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, ZDA
- zbiralec frakcij Bio-Rad model 2110, Bio-Rad laboratories, ZDA

## **SDS PAGE**

- Bio-Rad Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra System, Bio-Rad laboratories, ZDA
- Bio-Rad PowerPac<sup>™</sup> Basic, Bio-Rad laboratories, Singapur
- brizga Hamilton model 1705N, kapaciteta 50  $\mu$ L, Sigma chemical co., St. Louis, ZDA
- celofanska membrana Bio-Rad, Model 583, Bio-Rad Laboratories, ZDA
- ciklični termostat Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler, serijska št. 27255101277, Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA
- geli Bio-Rad Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup>, 7,5 %, 10-well comb, 30  $\mu$ L, Bio-Rad Laboratories, ZDA
- sušilec gelov Bio-Rad Model 543, Bio-Rad Laboratories, ZDA

## **Selekcija specifičnih bakteriofagnih klonov iz peptidne knjižnice, pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov, izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov, presejalna fagna ELISA, semikvantitativna fagna ELISA, kompetitivna fagna ELISA**

- avtoklav A-21, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- centrifuga 5415R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- centrifuga 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- centrifugirke (15 mL in 50 mL), TPP, Švica
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire, Tecan, Švica
- grelno mešalo Thermomixer Comfort, Eppendorf, Nemčija
- hladilnik Gorenje, Velenje, Slovenija
- inkubator Unihood 650, Uniequip, Nemčija
- inkubator WTC binder, tip 1711509900312, Tuttlingen, Nemčija
- komora z laminarnim pretokom zraka, tip MC 12-2, Iskra-PIO, Šentjernej, Slovenija
- ledomat Scotsman, AF 80, Scotsman Industries, ZDA
- magnet za mikrotitrsko ploščo Luminex Corporation, Austin, Teksas, ZDA
- magnetno mešalo Rotamix 550 MMH, Tehtnica, Slovenija
- magnetno stojalo New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
- mešalnik Micro-centrifuge II GMC-060, Labtech International Ltd, Združeno kraljestvo

- mikrotitrne plošče Maxisorp F8, Nunc-immuno module, Thermo Scientific, Danska
- mikrovalovna pečica LG, Seul, Južna Koreja
- pH meter 691, Metrohm, Švica (tip 1.691.0010)
- spektrofotometer Lambda Bio+, L7110186, Perkin Elmer, Massachusetts, ZDA
- tehtnica Exacta 610 EB, Tehtnica, Slovenija
- vibracijski mešalnik Vibromix 10, Tehtnica, Slovenija
- zamrzovalnik Gorenje, Velenje, Slovenija



## 4 Metode

### 4.1 Določanje protiteles proti protrombinu s testom aPS/PT ELISA

aPS/PT smo določili s hišno metodo aPS/PT IgG ELISA, razvito v Laboratoriju za imunologijo revmatizma UKC Ljubljana [6].

V vsako vdolbinico na polistirenski mikrotitrski plošči (Costar medium binding plošče) smo nanesti 40  $\mu$ L fosfatidilserina v raztopini kloroform/metanol (1:3) s koncentracijo 50 mg/L. Odkrite plošče smo inkubirali preko noči (od 16 do 18 ur) pri 4 °C, da je raztopina kloroform/metanol izhlapela. Naslednji dan smo plošče blokirali z 1% BSA/TBS CaCl<sub>2</sub> (150  $\mu$ L/vdolbinico) in pokrite inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Pripravili smo redčitve vzorcev, negativne kontrole, pozitivne kontrole, protrombina in standarda IgG z 1 % BSA/TBS CaCl<sub>2</sub>. Vzorce, negativno kontrolo in pozitivno kontrolo smo redčili v volumskem razmerju 1:50, protrombin pa smo redčili v razmerju 1:45. Standard IgG smo najprej redčili v razmerju 1:50 ter nato izvedli zaporedne redčitve 1:1 z 1 % BSA/TBS CaCl<sub>2</sub>. Mikrotitrsko plošče smo spirali s TBS CaCl<sub>2</sub> 0,05 % Tween 20. Nato smo nanesti najprej 25  $\mu$ L protrombina (20 mg/mL) in potem 25  $\mu$ L vzorca v vsako vdolbinico. Končna koncentracija protrombina je znašala 10 mg/mL, končna redčitev vzorca pa 1:100. Inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi ob stresanju. Pripravili smo raztopino sekundarnih protiteles (kozja protitelesa usmerjena proti človeškim IgG, specifična za Fc<sub>γ</sub> fragment, konjugirana z alkalno fosfatazo) z redčenjem 1:2 000 z 1 % BSA/TBS CaCl<sub>2</sub>. Po spiranju s TBS CaCl<sub>2</sub> 0,05 % Tween 20 smo nanesti po 50  $\mu$ L sekundarnih protiteles v vsako vdolbinico in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi (22 – 26 °C) na stresalniku. Substrat para-nitrofenil fosfat v dietanolaminskem pufri (pH 9,8) koncentracije 1 mg/mL smo pripravili 15 minut pred nanosom. Plošče smo spirali s TBS CaCl<sub>2</sub> 0,05 % Tween 20 ter nanesti 100  $\mu$ L substrata/vdolbinico.

S čitalcem SunRise Tecan smo merili absorbanco pri 405 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorbanc internega standarda IgG. Neredčenemu internemu standardu IgG smo pripisali vrednost AUG (arbitrarne enote IgG) 100. Na podlagi polinoma AUG v odvisnosti od absorbance internega standarda IgG smo iz izmerjenih absorbanc določili AUG vzorcev.

#### 4.1.1 Kompetitivna aPS/PT ELISA

Kompetitivno aPS/PT ELISA smo izvedli kot običajno aPS/PT ELISA, le da smo nanesti izolirana protitelesa proti protrombinu v redčitvi 1:800 ter hkrati dodali posamezne bakteriofagne klone v količini 10<sup>9</sup> pfu/vdolbinico.

## ***4.2 Izolacija IgG protiteles na koloni z vezanim proteinom G po principu afinitetne kromatografije***

IgG protitelesa smo izolirali na 5 mL koloni HiTrap<sup>TM</sup> Protein G HP (MAb Trap Kit, GE Healthcare). Postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca [24].

Vezavni pufer in elucijski pufer smo 10-krat redčili, nevtralizacijski pufer je bil že pripravljen za uporabo. Vzorec smo redčili 1:1 z vezavnim pufrom. Kolono smo najprej sprali s 25 mL destilirane vode ob pretoku 1 kapljica/s (5 mL/min) (ta korak smo izpustili, če smo na koloni že imeli vezavni pufer). V času izolacije smo pazili, da v kolono nismo vnesli zraka. Kolono smo nato sprali z vsaj 25 mL vezavnega pufera ob pretoku 1 kapljica/s (5 mL/min) ter izmerili absorbanco vezavnega pufera. Tako smo preverili, če je bila kolona čista ali je bil že prej na koloni vzorec. Filter smo omočili z vezavnim pufrom in preko filtra z brizgo v kolono nanесли vzorec ter takoj zbirali frakcije. Kolono smo spirali z od 10 do 25 mL vezavnega pufera oziroma dokler nismo odstranili nevezanih proteinov. Absorbanco zbranih frakcij smo izmerili pri 280 nm (slepa – nevtralizacijski pufer:elucijski pufer = 1:10). Ko je absorbanca frakcij dosegla vrednost absorbance slepe raztopine, so bili nevezani proteini odstranjeni.

Vezane proteine (IgG) smo eluirali z 10 mL elucijskega pufera in zbirali v epruvete najprej štiri dvomililitrske frakcije, nato po enomililitrske frakcije. V eprugetah smo merili pH z indikatorskimi lističi in nevtralizirali pH z nevtralizacijskim pufrom (do pH 7). Koncentracijo IgG smo spektrofotometrično določili na aparatu Nanodrop. Kolono smo sprali s 25 mL vezavnega pufera (če je sledila takojšnja izolacija iz novega vzorca) in/ali z 10 mL 20 % etanola za dolgotrajnejše shranjevanje. MabTrap kolono smo shranjevali pri 4 – 8 °C.

Po izolaciji IgG na koloni smo vzorec razsolili z uporabo Amicon Ultra-4 50K centrifugirke. Pri vseh korakih razsoljevanja smo centrifugirali pri pogojih  $7197 \times g$  do doseženega volumna 0,5 mL. Centrifugirko smo omočili z vezavnim pufrom in centrifugirali pri omenjenih pogojih. Nanesli smo 4 mL IgG frakcije in centrifugirali do 0,5 mL. Izvedli smo potrebno število ponovitev dopolnjevanja do 4 mL z IgG frakcijo in centrifugiranja do 0,5 mL, da smo razsolili celoten vzorec. Na koncu smo dodali vezavni pufer do 4 mL in centrifugirali. Dobljenega 0,5 mL vzorca smo prenesli v epruveto. Amicon centrifugirko smo večkrat sprali z 2 mL vezavnega pufera (potencialni zaostanki protiteles) in celotni volumen dodali v epruveto z vzorcem.

### ***4.3 Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom po principu afinitetne kromatografije***

Kolono z vezanim protrombinom, ki smo jo uporabili, so pripravili v Laboratoriju za imunologijo revmatizma v skladu z navodili proizvajalca. Protrombin so vezali na agarozo, aktivirano s CNBr (medij za vezavo ligandov, ki vsebujejo primarne amine). Nezasedena vezavna mesta so blokirali z 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Kolono je potrebno shranjevati v hladni sobi.

Pri izolaciji protiteles proti protrombinu smo uporabili črpalko Bio-Rad za črpanje raztopin s cevkami premera 1,6 mm. Pretok na črpalki smo nastavili na 2 mL/min. Kolono z vezanim protrombinom smo spirali s 100 mL vezavnega pufra 50 minut. Nato smo s kolono povezali razsoljen vzorec frakcije IgG, ki smo ga predhodno mikrobiološko filtrirali skozi 0,45 µm filter, in ga pustili krožiti skozi kolono preko noči pri temperaturi 4 °C in pretoku 0,8 mL/min.

Kolono smo naslednji dan sprali s 65 mL vezavnega pufra (pretok 2 mL/min, t = 50 minut). Shranjevali smo štirimililitrske frakcije v epruvete in spektrofotometrično določili koncentracijo proteinov na aparatu Nanodrop. Frakcije z najvišjo vsebnostjo nevezanih proteinov smo združili v »ostanek po kroženju na koloni z vezanim protrombinom«. Pripravili smo kolektor z oštevilčenimi epruvetami in ga povezali z računalnikom ter črpalko. Na črpalki smo nastavili program APT. Vezane proteine smo eluirali z elucijskim pufrom ( $V_{\text{pufra}} = 40 \text{ mL}$ , pretok 1,0 mL/min, velikost frakcij 2 mL). Spremljali smo spremembo prevodnosti in prepuščene UV svetlobe na računalniku. V kolikor so se protitelesa še eluirala, smo podaljšali čas eluiranja. Zbranim frakcijam smo sproti preverjali pH in ga uravnali na pH 7 z nevtralizacijskim pufrom. Koncentracijo IgG smo določili na aparatu Nanodrop pri 280 nm.

Po eluciji smo kolono regenerirali z blokirnim pufrom z 0,5 M NaCl pH 8,0 ter z acetatnim pufrom pH 4,0 s programom REGEN APT. Skozi kolono smo spustili po 30 mL posameznega pufra ob pretoku 1,0 mL/min v naslednjem zaporedju: blokirni pufer, acetatni pufer, blokirni pufer, acetatni pufer, blokirni pufer, acetatni pufer. Spremljali smo spremembo prevodnosti in prepuščene UV svetlobe na računalniku. Vse cevke smo sprali s programom Spiranje z dH<sub>2</sub>O (15 minut). Kolono smo sprali s 100 mL vezavnega pufra (pretok 2 mL/min, t = 50 minut) oziroma konzervirali z 20 % etanolom, če kolone nismo uporabili naslednji dan.

Ustrezne frakcije izoliranih protiteles proti protrombinu smo združili in jih koncentrirali ter razsolili s pomočjo Amicon Ultra-4 50K centrifugirki. Centrifugirki z ultrafiltracijsko membrano smo omočili bodisi z vezavnim pufrom bodisi z ostalimi frakcijami – nezdružene. Nato smo nanesti 3,5 mL frakcije protiteles proti protrombinu ter centrifugirali pri pogojih  $7197 \times g$ , 6 minut do 0,5 mL. Ponovno smo nanesti frakcijo protiteles proti protrombinu in centrifugirali pod enakimi pogoji – korak smo ponavljali, dokler nismo skoncentrirali celotne frakcije. Zatem smo centrifugirki dopolnili z vezavnim pufrom do 3,5 mL in centrifugirali pod omenjenimi pogoji do 0,5 mL. Koncentracije protiteles proti protrombinu razreda IgG smo spektrofotometrično določili na aparatu Nanodrop.

#### **4.4 SDS PAGE**

Čistost izoliranih protiteles proti protrombinu smo preverjali z metodo SDS PAGE.

Vzorci smo ustrezno redčili, da smo dobili 7,5 µg vzorca v 40 µL (10 µL 4-krat koncentriranega pufru za vzorce smo dodali ustrezen volumen vzorca ter dH<sub>2</sub>O). Pred nanosom na gel smo vzorce na kratko centrifugirali (približno 10 sekund) in jih »skuhali« v napravi za PCR (5 minut, 98 °C). Sledila je priprava označevalca – liofoliziranemu označevalcu Chemiluminiscent Blue Ranger, Pierce, smo dodali 10 µL dH<sub>2</sub>O. Pripravili smo elektroforezno celico, vanjo nalili spodnji pufer (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, pH 8,3) in vstavili sendvič z že pripravljenimi geli z nalitim zgornjim pufrom (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS, pH 8,3). Glavnik smo previdno izvlekli in vsak žepki sprali z zgornjim pufrom s pomočjo Hamiltonove brizge. Na gel smo nanesti označevalec (7,5 µL) in vzorce (po 30 µL v žepki) ter nalili zgornji pufer do vrha. Elektroforezo smo izvedli pri pogojih: napetost 125 V, konstanten tok 25 mA. Ko je bila fronta 1 centimeter pred koncem gela, smo izključili elektriko in takoj začeli z nadaljnjo obdelavo.

Gel smo s pomočjo distančnikov previdno prenesli v plastično kadičko s Coomassie brilijantnim modrilom in ga ob rahlem stresanju barvali približno 30 minut. Po barvanju smo barvilo odlili v posebno odpadno posodo ter na gel nalili raztopino za razbarvanje in postavili na stresalnik za približno 1 uro. Tekočino za razbarvanje smo vmes vsaj enkrat zamenjali. Učinkovitost razbarvanja smo sproti preverjali.

Gel smo posušili s pomočjo sušilca, priključenega na vakumsko črpalko. Gel smo sušili pri 50 °C 30 minut.

#### **4.5 Selekcija bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-12™**

Selekcijo bakteriofagov smo izvedli z vezavo bakteriofagov na protitelesa proti protrombinu, ki smo jih predhodno vezali bodisi na mikrosfere s proteinom A bodisi na mikrosfere s proteinom G – izmenjajoče med posameznimi stopnjami selekcije. Izvedli smo štiri selekcije, ki so se razlikovale predvsem v načinu elucije fagov:

- 1. selekcija – nespecifična elucija z elucijskim pufrom (glicin-HCl, pH 2,7),
- 2. selekcija in 3. selekcija – specifična elucija s protrombinom,
- 4. selekcija – specifična elucija s kompleksom fosfatidilserin/protrombin.

Vsako selekcijo smo izvedli v treh stopnjah. Pufre za selekcijo smo sterilizirali z avtoklaviranjem ali prefiltrirali skozi 0,22 µm filter. Delo je potekalo aseptično v komori z laminarnim pretokom zraka oziroma ob gorilniku. Pri uporabi mikrosfer smo ločbo supernatanta izvedli s pomočjo magnetnega stojala. V nadaljevanju je opisan postopek izvedbe posamezne stopnje selekcije. 1. in 2. stopnja sta potekali vsaka 3 dni, 3. stopnja 2 dni.

##### **1. SUBTRAKTIVNI KORAK**

Pri 1. stopnji selekcije smo izhajali iz 10 µL knjižnice Ph.D.-12™ v 240 µL PBS 0,05 % Tween 20 (0,05 % PBST). Pri 2. in 3. stopnji smo pripravili raztopino ustrezne količine pomnoženega eluata prejšnje stopnje v 0,05 % PBST, da smo vedno dobili knjižnico z  $10^{11}$  plakotvornih enot (pfu)/250 µL.

V 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL 0,05 % PBST ter 7,5 µL mikrosfer (z vezanim proteinom G ali proteinom A). Mikrosfere smo 2-krat sprali s 100 µL 0,05 % PBST in odstranili supernatant. Dodali smo fagno knjižnico. Med enourno inkubacijo pri sobni temperaturi in 600 rpm je potekla vezava fagov na ozadje. Med inkubacijo smo vsakih 10 minut vsebino premešali na vibracijskem mešalniku, da se mikrosfere niso posedle. Supernatant (knjižnico) smo s pomočjo magnetnega stojala prenesli v novo mikrocentrifugirko, mikrosfere smo zavrgli.

##### **2. VEZAVA PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA MIKROSFERE**

V 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL 0,05 % PBST in 15 µL mikrosfer (z vezanim proteinom G ali proteinom A) ter premešali na vibracijskem mešalniku. Mikrosfere smo 2-krat sprali s 100 µL 0,05 % PBST. Dodali smo 250 µL raztopine protiteles proti protrombinu v 0,05 % PBST s koncentracijo 0,027 g/L (protitelesa proti protrombinu v prebitku). Med 30-minutno inkubacijo pri sobni temperaturi in stresanju 600 rpm je potekla vezava protiteles proti protrombinu na

mikrosfere. Med inkubacijo smo vsakih 10 minut disperzijo premešali na vibracijskem mešalniku, da se mikrosfere ne bi posedle.

### 3. SPIRANJE NEVEZANIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU

Nevezana protitelesa proti protrombinu smo spirali 3-krat s 500  $\mu\text{L}$  0,05 % PBST, premešali na vibracijskem mešalniku ter med posameznimi spiranji stresali 1 minuto na termobloku pri 25 °C in 600 rpm.

### 4. VEZAVA FAGOV NA PROTITELESA PROTI PROTROMBINU

Po zadnji odstranitvi supernatanta smo vezali fage – dodali smo 250  $\mu\text{L}$  fagne knjižnice, predinkubirane z mikrosferami s proteinom G ali A (subtraktivni korak). Vezava bakteriofagov na protitelesa proti protrombinu je potekla med enurno inkubacijo na termobloku pri sobni temperaturi (25 °C) ob stresanju 600 rpm. Med inkubacijo smo vsakih 20 minut ročno rahlo premešali vsebino, da se mikrosfere niso posedle.

### 5. SPIRANJE NEVEZANIH FAGOV

Nevezane fage smo spirali 10-krat s 475  $\mu\text{L}$  0,1 % PBST. Med spiranji smo vzorce inkubirali na termobloku 1 minuto pri 25 °C in 600 rpm.

### 6. ELUCIJA FAGOV

Elucijo fagov smo izvedli na različne načine.

#### *a) Nespecifična elucija pri 1. selekciji*

Po odstranitvi supernatanta po zadnjem spiranju smo fage eluirali z 200  $\mu\text{L}$  1-krat koncentriranega elucijskega pufra. Elucija je potekla med 10-minutno inkubacijo na sobni temperaturi pri 600 rpm. Supernatant s fagi smo prenesli v novo mikrocentrifugirko ter nevtralizirali pH z 10,5  $\mu\text{L}$  nevtralizacijskega pufra.

#### *b) Specifična elucija s protrombinom pri 2. in 3. selekciji*

Po zadnjem spiranju smo odstranili supernatant in dodali 200  $\mu\text{L}$  raztopine protrombina s koncentracijo 0,1 mg/mL (pri 2. selekciji smo pripravili raztopino protrombina v 0,05 % PBST, pri 3. selekciji v TBS  $\text{Ca}^{2+}$ ). Po 45-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi in 600 rpm smo ločili supernatant s fagi od mikrosfer in ga prenesli v novo mikrocentrifugirko.

#### *c) Specifična elucija s kompleksom fosfatidilserin/protrombin pri 4. selekciji*

Po 10. spiranju smo odstranili supernatant ter mu v mikrocentrifugirki dodali 100  $\mu\text{L}$  TBS  $\text{Ca}^{2+}$ . Na mikrotitrsko ploščo z nanešenim fosfatidilserinom smo v 4 vdolbinice posebej nanesti po 100  $\mu\text{L}$  raztopine protrombina v TBS  $\text{Ca}^{2+}$  s koncentracijo 0,1 mg/mL. Vsebinsko mikrocentrifugirke s fagi smo v enakih delih prenesli v 4 vdolbinice. Inkubirali

smo 45 minut na sobni temperaturi pri 600 rpm. Po eluciji smo s pomočjo magneta mikrosfere posedli na dno mikrotitrne plošče in nato supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko (po 50  $\mu$ L vrhnje plasti supernatanta iz vsake vdolbinice).

Za titracijo smo vedno uporabili 5  $\mu$ L nepomnoženega eluata. Preostanek eluata smo takoj pomnoževali v bakterijski kulturi *E. coli* z  $OD_{600} = 0,01-0,05$ .

#### 7. POMNOŽEVANJE FAGOV

V 1. in 2. stopnji selekcije smo pomnoževali fage 4,5 h pri 37 °C ob stresanju (250 rpm). V 3. stopnji selekcije pomnoževanja nismo izvedli.

#### 8. TITRACIJA NEPOMNOŽENIH FAGOV

V komori z laminarnim pretokom zraka smo pripravili redčitveno vrsto nepomnoženega eluata v LB gojišču: v 1. stopnji smo uporabili redčitve  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ , v 2. in 3. stopnji pa smo pripravili redčitve  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ . V 3. stopnji smo naredili 2 ponovitvi vsake redčitve. Bakterije smo okužili s fagi: 10  $\mu$ L vsake redčitve (uporabili smo zadnje tri redčitve) smo prenesli v novo mikrocentrifugirko z 200  $\mu$ L pomnoženih bakterij *E. coli* z  $OD_{600} = 0,5$ . Celotno vsebino posamezne mikrocentrifugirke smo prenesli v 3 mL top agaroze, termostatirane na 50 °C. Vsebino smo premešali na vibracijskem mešalniku ter takoj vlili na segrete petrijevke z diferencialnim agarnim gojiščem X-gal/LB/IPTG. Petrijevke smo inkubirali na 37 °C preko noči (18 ur). Zatesnili smo jih s parafilmom, da se ne bi izsušile.

#### 9. OBARJANJE POMNOŽENIH FAGOV

Bakterijsko gojišče s pomnoženimi fagi smo prelili v 50-mililitrske centrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 4 °C, 10 000 rpm (oborino, ki so jo tvorile bakterije, smo zavrgli). Supernatant smo prelili v nove 50-mililitrske centrifugirke in ponovno centrifugirali pod enakimi pogoji. Supernatant smo nato prenesli v nove 50-mililitrske centrifugirke z ustrežno količino PEG/NaCl (1/6 celotnega volumna), dobro premešali in pustili obarjati fage preko noči v hladilniku. Naslednji dan smo prešteli pfu, ki so bile prisotne v nepomnoženem eluatu predhodne stopnje.

#### 10. IZOLACIJA FAGOV PO OBARJANJU

V 1. in 2. stopnji selekcije smo izolirali in titrirali pomnožene fage. Oborjene fage smo centrifugirali 15 minut pri 4 °C, 11 000 rpm. Supernatant smo previdno odlili, preostanek supernatanta pa odstranili s pipeto. Oborjene fage smo resuspendirali v 1 mL PBS. Na kratko smo centrifugirali vsebino (približno 10 sekund) ter dispergirane fage s pipeto prenesli v 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke. Da smo se znebili nečistot (ostanki gojišča),

smo centrifugirali 5 minut pri 4 °C, 14 000 rpm. Supernatant smo s pipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko (1 mL, ostalo smo zavrgli), dodali 200 µL PEG/NaCl, ročno premešali vsebino s pipeto in pustili obarjati fage 1 uro na ledu. Po ponovnem obarjanju fagov smo izvedli centrifugiranje pod naslednjimi pogoji: 10 minut, 4 °C, 14 000 rpm in supernatant zavrgli. Kratko smo centrifugirali (približno 10 sekund) in preostanek supernatanta odstranili s pipeto. Oborino fagov smo resuspendirali v 200 µL PBS in centrifugirali 1 minuto pri 14 000 rpm, da smo odstranili morebitni preostanek nečistot. Eluat smo prenesli v novo mikrocentrifugirko – pomnoženi eluat. Pred nadaljnjo titracijo ali pred naslednjo stopnjo selekcije smo ga hranili v hladilniku. Za titracijo smo uporabili 5 µL pomnoženega eluata.

#### 11. TITRACIJA POMNOŽENIH FAGOV

Titracijo pomnoženega eluata smo izvedli na enak način kot titracijo nepomnoženega eluata. Razlika je bila le v uporabljenih redčitvah. Pri titraciji pomnoženega eluata smo pripravili redčitveno vrsto  $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  in  $10^{11}$  v LB gojišču. Za titracijo smo uporabili zadnje tri redčitve, torej  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ .

Pred naslednjo stopnjo selekcije smo prešteli pfu, ki so bile prisotne v pomnoženem eluatu predhodne stopnje. Pomnoženi eluati so obstojni do 3 tedne pri shranjevanju pri 4 °C. Ob dodatku sterilnega glicerola do 50 % so pri –20 °C obstojni 5 let ali več.

#### Odstopanja od zgoraj opisanega postopka pri posameznih selekcijah.

Pri 1. selekciji z nespecifično elucijo fagov ter pri 2. selekciji z elucijo s protrombinom v 1. stopnji nismo izvedli subtraktivnega koraka. Izhajali smo iz polovične količine knjižnice Ph.D.-12™, torej 5 µL knjižnice v 245 µL 0,05 % PBST.

Pri 3. in 4. selekciji smo za 9. in 10. spiranje nevezanih fagov uporabili TBS  $Ca^{2+}$ .

Pri 4. selekciji smo dan pred začetkom vsake stopnje selekcije na mikrotitrsko ploščo vezali fosfatidilserin. V 4 vdolbinice smo nanесли po 40 µL raztopine fosfatidilserina v kloroform/metanolu (1:3) s koncentracijo 2 g/L. Odkrite plošče smo inkubirali preko noči (16 – 18 ur) pri 4 °C, da je topilo izhlapelo. Po končani uporabi smo v stekleničko s fosfatidilserinom vpihali  $CO_2$  ali  $N_2$  zaradi občutljivosti fosfatidilserina na oksidacijo.



## **4.6 Fagna ELISA**

### **4.6.1 Presejalna fagna ELISA**

S presejalno fagno ELISA smo vrednotili vezavo posameznih dodekapeptidov, izraženih na fagih, na izolirana protitelesa proti protrombinu. Na podlagi rezultatov smo določili dodekapeptide, izražene na fagih, za nadaljnje vrednotenje. V polovici vdolbinic mikrotitrne plošče smo vezali tarčna protitelesa direktno na ploščo. Nanesli smo 200  $\mu\text{L}$  raztopine protiteles proti protrombinu v PBS s koncentracijo 25  $\mu\text{g/mL}$  v vdolbinico in pokrito ploščo inkubirali preko noči v hladilniku (4 °C).

Naslednji dan smo nevezana protitelesa proti protrombinu odstranili s trikratnim spiranjem z 250  $\mu\text{L}$  0,1 % PBST. Med vsakim nanosom pufru za spiranje smo ploščo stresali 2 – 3 minute pri 100 rpm. Nezasedeno površino smo na celotni plošči (vdolbinice za vezavo na tarčna protitelesa in vezavo na ozadje) blokirali z 200  $\mu\text{L}$  1 % BSA v PBS. Pokrito ploščo smo inkubirali 1,5 ure na sobni temperaturi pri 45 rpm. Nevezane proteine smo sprali trikrat z 250  $\mu\text{L}$  0,1 % PBST. Med vsakim nanosom pufru za spiranje smo ploščo stresali 3 minute pri 100 rpm. V vsako vdolbinico smo nanesli 100  $\mu\text{L}$  posameznega vzorca v LB gojišču. Pokrito ploščo smo inkubirali 1 uro na sobni temperaturi pri 45 rpm. Nevezane fage smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  0,1 % PBST. Med vsakim nanosom pufru za spiranje smo ploščo stresali 5 minut pri 100 rpm. Pripravili smo raztopino proti fagom usmerjenih sekundarnih protiteles (redčitev 1:5 000) v 1 % BSA/PBS in nanesli 100  $\mu\text{L}$ /vdolbinico. Pokrito ploščo smo inkubirali 1 uro na sobni temperaturi pri 45 rpm. Nevezana sekundarna protitelesa smo petkrat sprali z 250  $\mu\text{L}$  0,1 % PBST. Med vsakim nanosom pufru za spiranje smo ploščo stresali 5 minut pri 100 rpm. Nanesli smo 200  $\mu\text{L}$ /vdolbinico mešanice substrata TMB in pufru za substrat TMB v razmerju 1:1. Pokrito ploščo smo inkubirali ob stresanju pri 45 rpm na sobni temperaturi do pojava ustreznega močnega modrega obarvanja. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 50  $\mu\text{L}$ /vdolbinico 2 M žveplove kisline, pri čemer je prišlo do spremembe obarvanja iz modrega v rumeno. Absorbanco smo izmerili pri 450 nm.

### **4.6.2 Semikvantitativna fagna ELISA**

Semikvantitativno fagno ELISA smo izvedli kot presejalno fagno ELISA, razlika je bila le v mediju, v katerem so se nahajali bakteriofagni kloni ter v naneseni količini. Bakteriofagne klone, ki so bili v TBS, smo ustrezno redčili z 0,1 % PBST, da smo pri vseh nanesli  $5 \times 10^9$  pfu/vdolbinico v 100  $\mu\text{L}$  posameznega vzorca.

### **4.6.3 Kompetitivna fagna ELISA**

Kompetitivno fagno ELISA smo izvedli kot semikvantitativno fagno ELISA, pri čemer smo hkrati dodali bakteriofagni klon v količini  $5 \times 10^9$  pfu/vdolbinico in protrombin v dveh različnih količinah. Protrombin smo dodali v množinskem razmerju protitelesa proti protrombinu:protrombin 1:1 oziroma 1:10.

### **4.7 Izolacija in pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov**

Po zadnji selekcijski stopnji posamezne selekcije smo naključno izbrali klone, ki smo jih izolirali in pomnožili. Pripravili smo prekonočno kulturo *E. coli* v LB gojišču z 20 µg/mL tetraciklina. V erlenmajerici z utori smo bakterije pomnoževali preko noči pri 37 °C med stresanjem. Naslednji dan smo prekonočno kulturo 100-krat redčili z LB gojiščem ter alikvotirali po 2 mL v sterilne epruvete. S petrijevk z nepomnoženim eluatom 3. stopnje, na katerih je zraslo manj kot 100 plakov, smo naključno izbrali po 20 modrih plakov iz vsake selekcije. Pomembno je bilo, da so bili izbrani plaki dobro ločeni od ostalih plakov (vsaj 0,5 cm) in da v bližini ni bilo neobarvanih plakov (divji tip). Izbrane plake smo označili ter v komori z laminarnim pretokom zraka s sterilnim pipetnim nastavkom aseptično prenesli v epruvete, v katere smo predhodno odpipetirali 2 mL v LB gojišču 100-krat razredčene prekonočne kulture.

Bakteriofagne klone smo inkubirali 4,5 h pri 37 °C ob stresanju (600 rpm). Po koncu pomnoževanja smo vsebino posamezne epruvete prelili v mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 4 °C, 14 000 rpm. Supernatant smo hitro, da se oborina ne bi redispergirala, prelili v nove mikrocentrifugirke in še enkrat centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatant smo prelili v nove mikrocentrifugirke in pomnožene bakteriofagne klone v LB gojišču shranili pri 4 °C.

Na podlagi rezultatov presejalne fagne ELISA smo izbrali bakteriofagne klone za nadaljnje vrednotenje. Izbrane bakteriofagne klone smo iz LB gojišča oborili s pomočjo PEG/NaCl in jih prenesli v PBS ali TBS.

### **4.8 Spektrofotometrično določanje koncentracije bakteriofagov**

Koncentracijo smo določili fagom, raztopljenim v PBS ali TBS. Koncentracijo smo izračunali na podlagi absorbanc pri dveh valovnih dolžinah, določenih z UV-VIS spektroskopijo na aparatu Nanodrop po enačbi 1. Valovna dolžina 269 nm predstavlja

absorpcijski maksimum faga, medtem ko pri 320 nm izmerimo prisotne nečistote in majhno absorpcijo kromoforov faga [25].

Enačba 1: Izračun koncentracije fagov v 1 mL vzorca [25], pri čemer je 7222 število baz viriona M13.

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

#### ***4.9 Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov***

Klonom, ki so na fagni ELISA izkazovali močno vezavo na protitelesa proti protrombinu v primerjavi z ozadjem, smo izolirali DNA. V dvomililitrske mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 1200 µL posameznega klona in dodali 480 µL PEG/NaCl (ali ustrezen volumen, če smo imeli klona manj). Raztopino smo dobro premešali ter pustili obarjati fage na ledu 1 uro. Potem smo centrifugirali vzorce 10 minut pri 14 000 rpm, 4 °C in supernatant zavrgli. Kratko smo centrifugirali (približno 10 sekund) in odstranili preostanek supernatanta s pipeto. Oborjene fage smo resuspendirali s 150 µL 4 M jodidnega puфра in močno premešali. Fage smo ponovno obarjali s 375 µL 96 % etanola – inkubirali smo 30 minut na sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 10 minut pri 14 000 rpm, 4 °C; supernatant smo zavrgli. Ponovno smo kratko centrifugirali (približno 10 sekund) ter preostanek supernatanta odstranili s pipeto. Oborino smo sprali s 100 µL 70 % etanola. Centrifugirali smo 5 minut pri 14 000 rpm, 4°C. Etanol smo odstranili s pipeto ter odprte mikrocentrifugirke pustili v komori z laminarnim pretokom zraka, da je etanol popolnoma izhlapel. Posušeno DNA smo raztopili v 10 µL bidestilirane vode (MiliQ, avtoklavirana) ter določili njeno koncentracijo na Nanodrop spektrofotometru (enoverižna DNA). Koncentracija DNA je morala biti v območju 80 – 100 ng/µL. Če je bila koncentracija prevelika, smo raztopino DNA ustrezno redčili; če je bila koncentracija premajhna, je bilo potrebno ponovno pomnožiti posamezni klon in ponoviti postopek izolacije DNA.

V 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke smo odpipetirali 5 µL ustrezno redčene DNA in 5 µL 5 µM začetnika (-96 gIII Sequencing Primer, 20-mer). Mikrocentrifugirke smo označili s kodo ter poslali na določitev nukleotidnega zaporedja v podjetje GATC Biotech.

#### ***4.10 Določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombinu***

Nukleotidna zaporedja dodekapeptidov, izraženih na fagih, smo prevedli v aminokislinska zaporedja s pomočjo prevajalnega orodja s spletnega portala ExPASy (translate tool). Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov smo prilegali na primarno strukturo protrombina s spletnim orodjem Clustal Omega [26] ter na terciarno strukturo protrombina z oznako 5EDM v PDB bazi z algoritmom, dostopnem na strežniku Pepitope Server [27]. Uporabili smo algoritem PepSurf.

## 5 Rezultati in razprava

### 5.1 Izolacija IgG frakcije protiteles iz serumov bolnikov z APS

Izhajali smo iz serumov bolnikov z APS in zgodovino venskih tromboz. Na aPS/PT IgG ELISA so imeli potrjeno prisotnost aPS/PT IgG z visoko pozitivnim rezultatom – pri večini bolnikov  $AUG > 100$ , najnižja vrednost pri bolniku je bila 67 (pozitiven rezultat predstavlja že  $AUG > 5$ ). Serume izbranih bolnikov smo združili in dobili skupno 14 mL vzorca.

Izvedli smo aPS/PT ELISA s postopno redčenim vzorcem. Rezultati so potrdili pričakovano premosorazmerno korelacijo med koncentracijo vzorca (absorbanco) in AUG. Dobljena korelacija velja le za dotični vzorec, ni pa splošno veljavna, saj gre za heterogeno avidna protitelesa proti protrombinu. Pri vzorcu, redčenem 1:200, je AUG znašal 79, iz česar sklepamo, da bi bil rezultat pri redčitvi 1:100, ki se uporablja pri rutinski metodi, AUG približno 160. Rezultat potrjuje visoko vsebnost protiteles proti protrombinu v vzorcu.

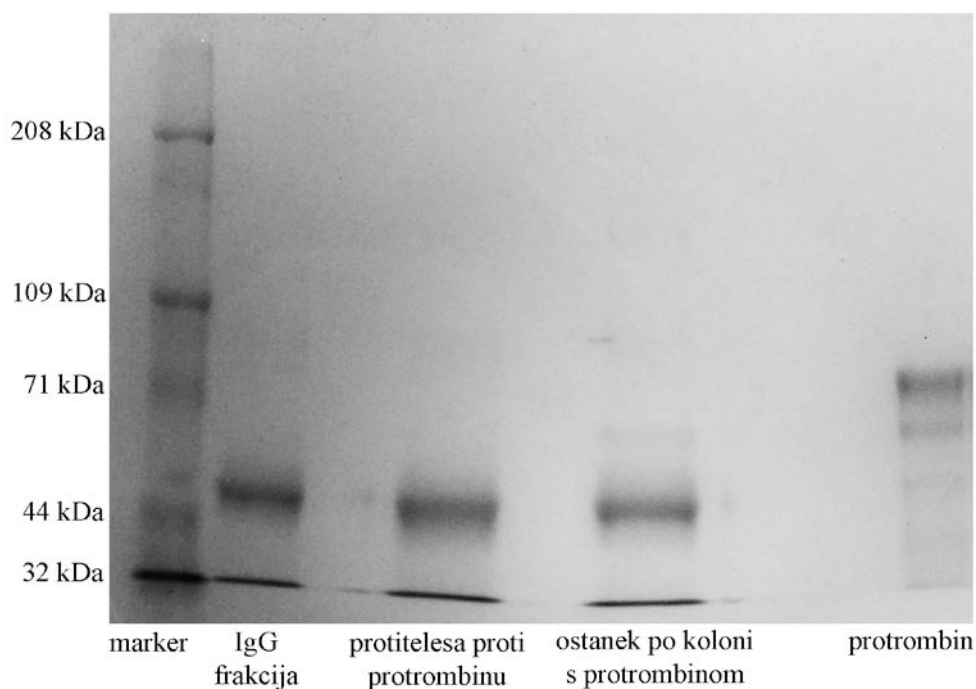
Na koloni z vezanim proteinom G smo iz združenih serumov bolnikov izolirali IgG frakcijo protiteles z afinitetno kromatografijo. Iz skupno 14 mL združenih serumov smo v šestih korakih uspeli izolirati celokupno **99,25 mg IgG** (2,578 mg/mL, 38,5 mL). Frakcije nevezanih proteinov z najvišjimi koncentracijami smo združili v *ostanek po IgG koloni*, ki je vseboval še 274,7 mg IgG (7,424 mg/mL, 37 mL). Ostanek po IgG koloni se je nahajal v negativnem območju na aPS/PT ELISA, s čimer smo potrdili, da v njem ni prisotnih protiteles proti protrombinu, ali pa so prisotna le v minimalni količini.

### 5.2 Izolacija protiteles proti protrombinu

Izolirana IgG smo nanegli na kolono z vezanim protrombinom, da smo izolirali IgG frakcijo protiteles proti protrombinu. Del izoliranih IgG smo shranili. Tako smo na kolono nanegli **90,84 mg IgG** (2,271 mg/mL, 40 mL). Frakcije IgG smo pustili krožiti skozi kolono z vezanim protrombinom preko noči. Naslednji dan smo sprali nevezane proteine z vezavnim pufrom. Sprane frakcije, ki so vsebovale največ protiteles, smo združili v *ostanek po koloni s protrombinom*. Tekom prve izolacije smo izolirali 21,13 mg protiteles proti protrombinu, kar predstavlja približno 23 % nanese IgG frakcije. V ostanku po koloni s protrombinom smo še vedno zaznali visoke količine protiteles (0,686 mg/mL, 40 mL, kar znaša 27 mg IgG). Kapaciteta kolone je bila pri prvi izolaciji presežena, zato

smo ponovno izvedli izolacijo ter izolirali dodatnih 5,49 mg protiteles proti protrombinu. *Ostanek po koloni z vezanim protrombinom druge izolacije* smo skoncentrirali ter mu določili vsebnost IgG 10,33 mg (3,038 mg/mL, 3,4 mL). Celokupno smo izolirali **26,62 mg protiteles proti protrombinu** (3,697 mg/mL, 7,2 mL) iz nanesenih 90,84 mg IgG, torej so protitelesa proti protrombinu predstavljala **29,31 % vseh IgG**. Izolirana protitelesa proti protrombinu obeh izolacij smo združili in določili koncentracijo **3,365 mg/mL** (7,2 mL, 24,23 mg). 200-mikrolitrške in 500-mikrolitrške alikvote smo shranili v zamrzovalniku. Uporabili smo jih pri nadaljnjem delu.

Čistost izoliranih proteinov smo potrdili z metodo SDS PAGE (slika 6). Pričakovano smo za vzorce, ki vsebujejo protitelesa, torej IgG frakcijo, izolirana protitelesa proti protrombinu ter ostanek po kroženju na koloni s protrombinom, na gelu dobili lisi za lahko verigo pri 25 kDa ter težko verigo pri 50 kDa, medtem ko je bila lisa za protrombin pri približno 72 kDa.



Slika 6: Z metodo SDS PAGE smo preverili čistost proteinov. Pri vzorcih, ki so vsebovali protitelesa, sta vidni lisi za lahko in težko verigo. Lisa za protrombin ustreza njegovi velikosti 72 kDa.

### 5.3 *Selekcija vezalcev protiteles proti protrombinu iz bakteriofagne*

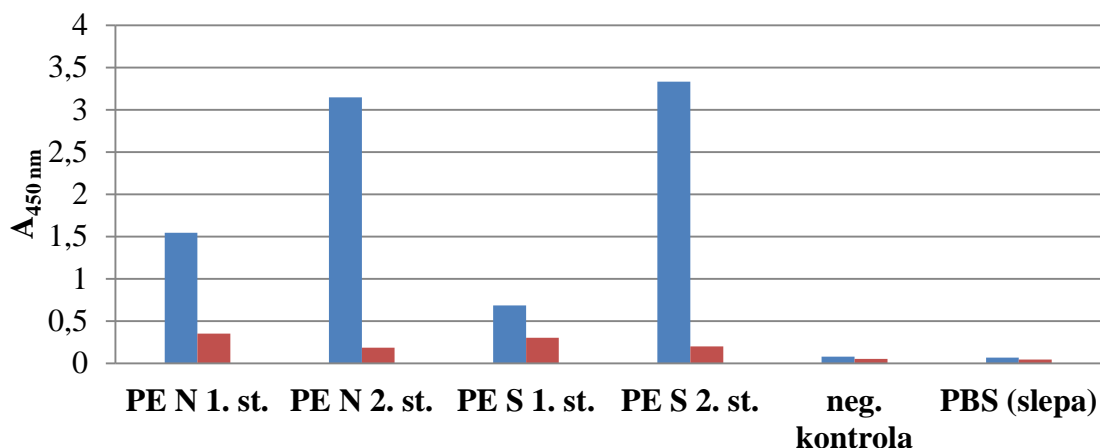
#### *knjižnice Ph.D.-12<sup>TM</sup>*

Izolirana protitelesa proti protrombinu smo uporabili kot tarčna protitelesa pri selekciji iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-12<sup>TM</sup>. Na mikrosfere z vezanim proteinom G ali proteinom A smo vezali izolirana protitelesa proti protrombinu ter dodali bakteriofagno knjižnico. Vezane dodekapeptide, izražene na fagih, smo eluirali na različne načine, in sicer nespecifično z nizkim pH (elucijski pufer glicin-HCl, pH 2,7), specifično s protrombinom ter specifično s kompleksom fosfatidilserin/protrombin. Zaradi večje preglednosti smo izbrane fagne klone označili po naslednjem ključu: N za nespecifično elucijo (1. selekcija), S za specifično elucijo s protrombinom (2. selekcija, subtraktivni korak smo izvedli v 2. in 3. stopnji), P za specifično elucijo s protrombinom (3. selekcija, subtraktivni korak smo izvedli v vseh treh stopnjah) in PS za specifično elucijo s kompleksom fosfatidilserin/protrombin (4. selekcija). Oznaki za vrsto elucije je sledila zaporedna številka posameznega klona. Za vsako stopnjo selekcije smo izračunali delež eluiranih bakteriofagov glede na vhodno količino in pridobljeno količino fagov v eluatu (preglednica I).

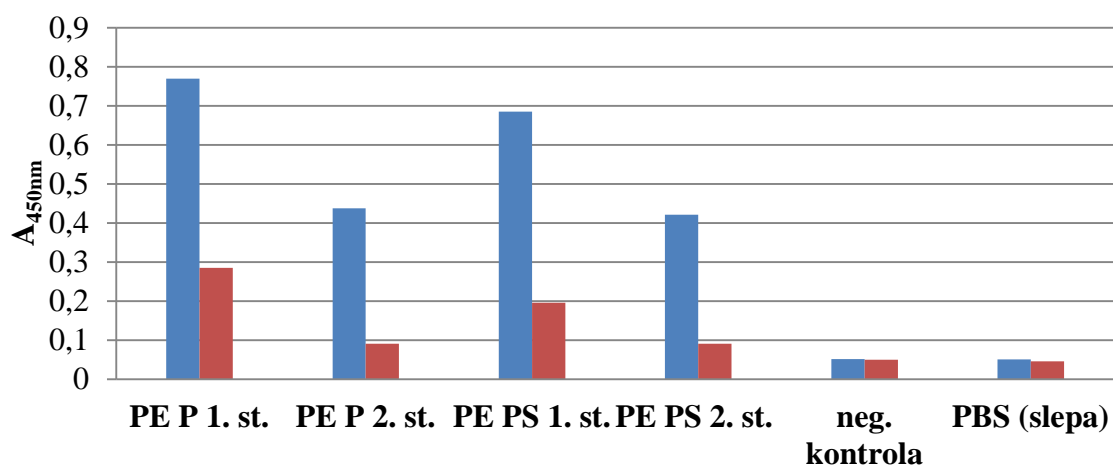
Preglednica I: Deleži elucije pri posameznih stopnjah vsake selekcije

vrsta selekcije (oznaka)	% elucije		
	1. stopnja	2. stopnja	3. stopnja
1. selekcija – nizek pH (N)	0,00126	0,00498	0,00260
2. selekcija – protrombin (S)	0,00030	0,00025	0,00020
3. selekcija – protrombin (P)	0,00035	0,00108	0,00142
4. selekcija – fosfatidilserin/protrombin (PS)	0,00015	0,00088	0,00113

Delež elucije se tekom stopenj v posamezni selekciji ni bistveno povečeval. Ocenili smo, da so selekcije kljub temu potekale uspešno, saj povečevanje deleža elucije ni vedno merilo za uspešnost selekcije. Pomembno je spremljati tudi avidnost vezave pomnoženih bakteriofagnih eluatov na tarčo v ELISA tekom stopenj. Slednja se je pri primerljivo nizkem odzivu ozadja tekom stopenj povečevala pri 1. in 2. selekciji (slika 7). Pri 3. in 4. selekciji do tega sicer ni prišlo, vendar se je zmanjšala vezava na ozadje (BSA) (slika 8).



Slika 7: Fagna ELISA pomnoženih eluatov (PE) 1. in 2. stopnje prvih dveh selekcij (N – nespecifična elucija z nizkim pH, S – specifična elucija s protrombinom). Modri stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa, rdeči stolpci vezavo na ozadje (BSA). Bakteriofagni eluati so bili v PBS. Za negativno kontrolo smo uporabili fag brez inserta za dodekapeptid (divjji tip). Nanesena količina fagov pri vseh vzorcih je bila  $10^{10}$  pfu/vdolbinico.

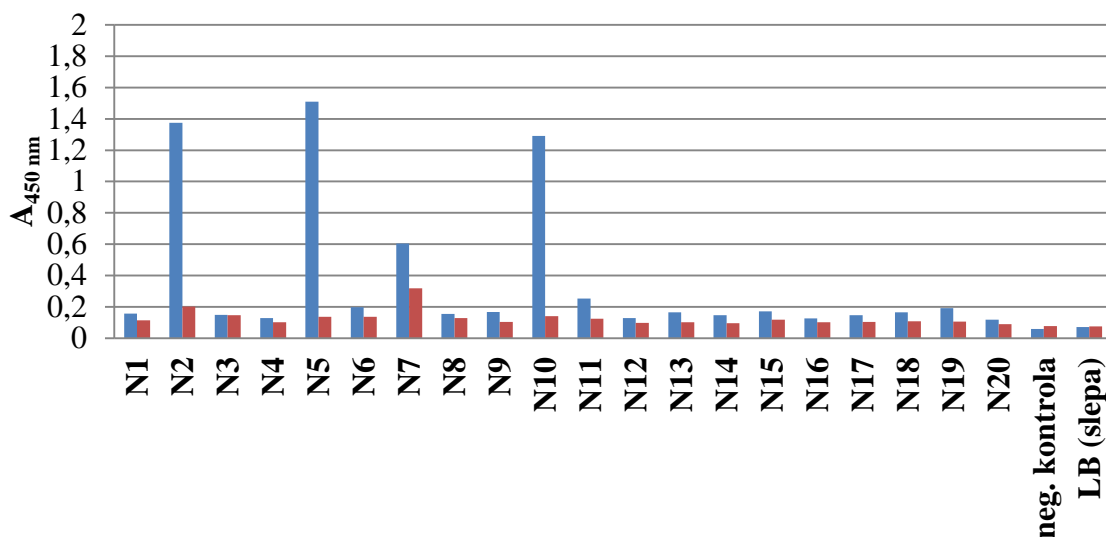


Slika 8: Fagna ELISA pomnoženih eluatov (PE) 1. in 2. stopnje 3. in 4. selekcije (P – specifična elucija s protrombinom, PS – specifična elucija s kompleksom fosfatidilserin/protrombin). Modri stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa, rdeči stolpci vezavo na ozadje (BSA). Bakteriofagni eluati so bili v PBS. Za negativno kontrolo smo uporabili fag brez inserta za dodekapeptid (divjji tip). Nanesena količina fagov pri vseh vzorcih je bila  $10^{10}$  pfu/vdolbinico.

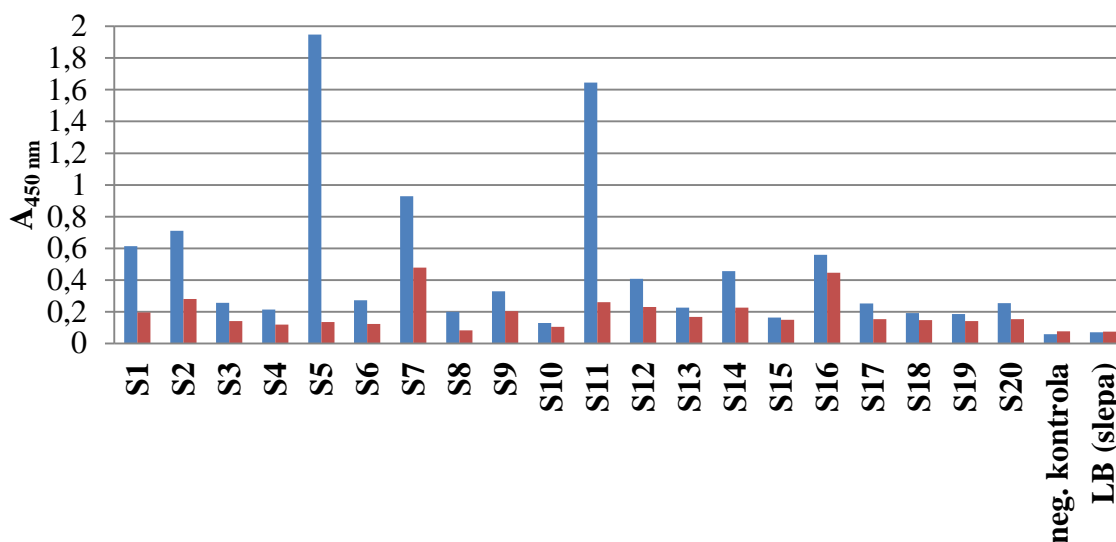
V nadaljevanju smo s presejalno fagno ELISA vrednotili vezavo posameznih dodekapeptidov, izraženih na fagih, na tarčna protitelesa proti protrombinu. Najprej smo jo izvajali po postopku, ki se je izkazal kot najbolj optimalen v predhodni raziskavi [28], saj



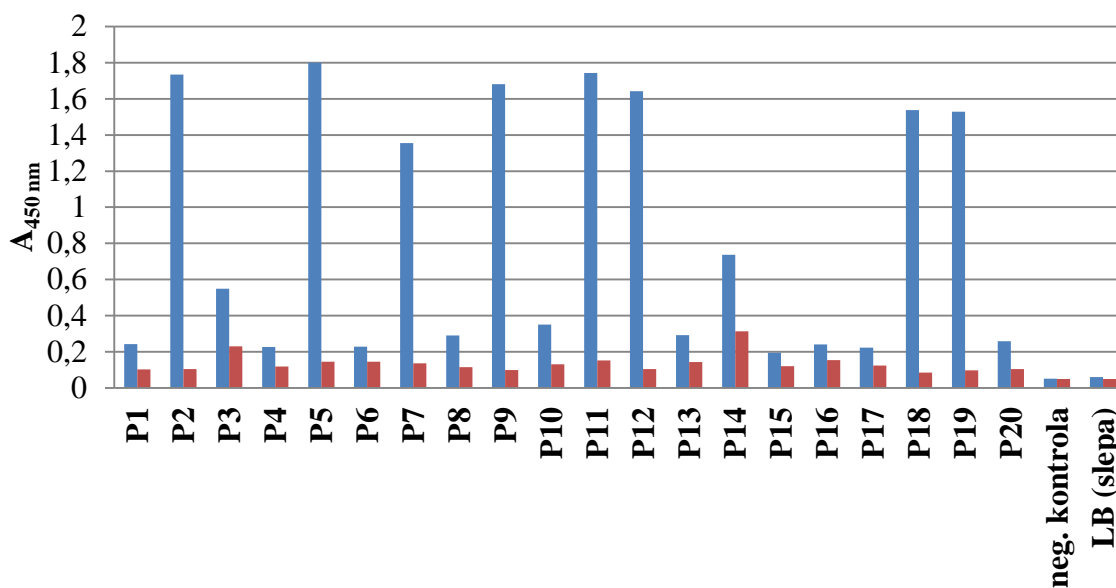
smo porabili manjšo količino tarčnih protiteles. Ovrednotiti smo morali večje število klonov, zato je bilo varčevanje s tarčnimi protitelesi smiselno. Izolirana IgG protitelesa proti protrombinu v koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$  smo imobilizirali preko kozjih protiteles, usmerjenih proti človeškemu IgG, specifičnih za Fc, v koncentraciji 5  $\mu\text{g/mL}$  ter nadaljevali po postopku, opisanem v poglavju Metode. Z izvedbo fagne ELISA z imobilizacijo tarčnih protiteles nismo dobili nedvoumnih rezultatov (ni prikazano), zato smo postopek optimizirali. Tarčna protitelesa proti protrombinu smo vezali direktno na mikrotitrsko ploščo tako, da smo jih dodali v koncentraciji 25  $\mu\text{g/mL}$ . V postopku izolacije in čiščenja smo namreč pridobili večjo količino protiteles proti protrombinu kot v predhodni raziskavi [28], zato smo lahko izvedli fagno ELISA po klasičnem postopku z večjo količino tarčnih protiteles. Slednje se je kasneje izkazalo kot uspešno. Uspeli smo razlikovati klone, ki so se specifično vezali na tarčna protitelesa, od tistih, ki se niso. Rezultati za posamezne bakteriofagne klone, pridobljene v štirih selekcijah, so prikazani v nadaljevanju (slike 9 – 12). Posamezni bakteriofagni kloni so bili v LB gojišču. Kot negativna kontrola je služil bakteriofagni klon brez inserta za dodekapeptid. Na mikrotitrsko ploščo smo vezali tarčna protitelesa proti protrombinu, nezasedeno površino blokirali z 1 % BSA/PBS ter dodali bakteriofagne klone.



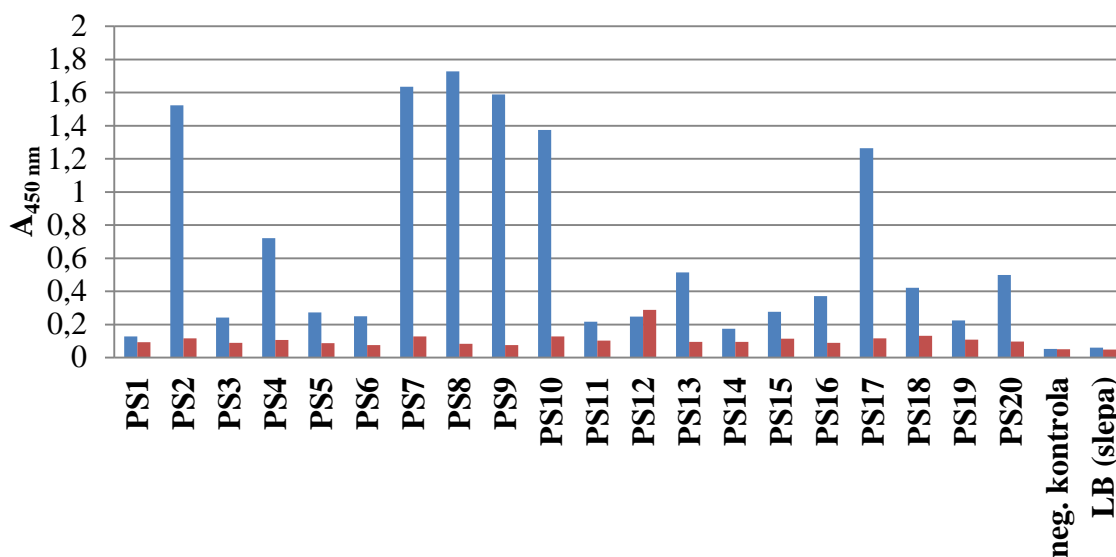
Slika 9: Presejalna fagna ELISA izoliranih bakteriofagov 1. selekcije – nespecifična elucija z nizkim pH. Modri stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa, rdeči stolpci vezavo na ozadje (BSA). Največjo vezavo na tarčo, v primerjavi z ozadjem, so izkazovali kloni N2, N5 in N10.



Slika 10: Presejalna fagna ELISA izoliranih bakteriofagov 2. selekcije – specifična elucija s protrombinom. Modri stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa, rdeči stolpci vezavo na ozadje (BSA). Največjo vezavo na tarčo, v primerjavi z ozadjem, so izkazovali kloni S1, S5 in S11.



Slika 11: Presejalna fagna ELISA izoliranih bakteriofagov 3. selekcije – specifična elucija s protrombinom. Modri stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa, rdeči stolpci vezavo na ozadje (BSA). Največjo vezavo na tarčo, v primerjavi z ozadjem, so izkazovali kloni P2, P5, P7, P9, P11, P12, P18 in P19.



Slika 12: Presejalna fagna ELISA izoliranih bakteriofagov 4. selekcije – specifična elucija s kompleksom fosfatidilserin/protrombin. Modri stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa, rdeči stolpci vezavo na ozadje (BSA). Največjo vezavo na tarčo, v primerjavi z ozadjem, so izkazovali kloni PS2, PS7, PS8, PS9, PS10 in PS17.

S presejalno ELISA smo ugotovili, kateri izmed 20 izbranih bakteriofagov iz vsake selekcije se najbolj vežejo na tarčo v primerjavi z ozadjem. V 1. selekciji z nespecifično elucijo so bili to bakteriofagni kloni N2, N5 in N10 (slika 9), v 2. selekciji s specifično elucijo s protrombinom bakteriofagni kloni S1, S5 in S11 (slika 10), v 3. selekciji s specifično elucijo s protrombinom bakteriofagni kloni P2, P5, P7, P9, P11, P12, P18 in P19 (slika 11) ter v 4. selekciji s specifično elucijo s kompleksom fosfatidilserin/protrombin bakteriofagni kloni PS2, PS7, PS8, PS9, PS10 in PS17 (slika 12).

### 5.3.1 Določitev aminokislinskega zaporedja izbranih dodekapeptidov, izraženih na fagih

Posamezne bakteriofagne klone, ki so izkazovali največjo vezavo na tarčna protitelesa na podlagi rezultatov presejalne fagne ELISA, smo nadalje vrednotili. Izbrane klone smo pomnožili, običajno smo dobili koncentracijo okrog  $10^9$  pfu/ $\mu$ L, ter izolirali njihovo DNA. Koncentracije izolirane DNA so se nahajale v območju od 80 do 235 ng/ $\mu$ L. DNA smo ustrezno redčili, da smo prišli v območje od 80 do 100 ng/ $\mu$ L ter vzorce poslali v podjetje GATC Biotech, kjer so določili nukleotidno zaporedje, ki kodira aminokislinsko zaporedje peptida pri posameznem bakteriofagnem klonu. S pomočjo prevajalnega orodja s spletnega portala ExpASy (translate tool) smo nukleotidno zaporedje prevedli v aminokislinsko

zaporedje. Zaporedja aminokislin dodekapeptidov, izraženih na površini faga, so zbrana v preglednicah II – V. Nekatera zaporedja so bila izražena na večjem številu bakteriofagnih klonov. Vsa zaporedja smo preverili s spletnim orodjem SAROTUP za detekcijo netarčnih peptidov [29]. Netarčni peptidi so lahko posledica propagacijskih prednosti nekaterih peptidov ali vezave peptidov na ostale komponente sistema in ne na tarčo [30]. Z optimizacijami metode selekcije smo se želeli v največji možni meri izogniti netarčnim peptidom. To smo skušali doseči z imobilizacijo tarče, s specifično elucijo z znanim ligandom tarče, z izvedbo subtraktivnega koraka – tako imenovano negativno selekcijo, z menjavo mikrosfer z vezanim proteinom G z mikrosferami z vezanim proteinom A med posameznimi stopnjami selekcije ter z ustreznim časom inkubacije peptida in tarče, saj daljši čas poveča delež nespecifične vezave. Pri negativni selekciji smo skušali odstraniti fage, ki so se nespecifično vezali na mikrosfere s proteinom G ali proteinom A namesto na tarčna protitelesa proti protrombinu. Med pridobljenimi dodekapeptidi nismo identificirali netarčnih peptidov.

V nadaljevanju smo izmed klonov, ki so imeli izražen isti dodekapeptid, vrednotili le po enega. Posamezne aminokisliline smo označili z različnimi barvami glede na njihove lastnosti. Z modro so označene pozitivno nabite aminokisliline (K, H, R), z rdečo negativno nabiti aminokislilini (D, E), z oranžno aminokislilini s hidroksilno skupino (S, T), z vijolično aminokislilini z amidno skupino (N, Q), aromatske aminokisliline s sivo (F, Y, W) ter alifatske aminokisliline z zeleno barvo (A, V, I, L, M).

Preglednica II: Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov, izraženih na posameznih bakteriofagnih klonih, pridobljena pri 1. selekciji z nespecifično elucijo.

oznaka bakteriofagnega klona	aminokislinsko zaporedje dodekapeptida
N2	D V T D A Y R R P F F Q
N5	N A V E D R I A A H S G
N10	K I D V G H K Q M A A A

Preglednica III: Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov, izraženih na posameznih bakteriofagnih klonih, pridobljena pri 2. selekciji s specifično elucijo s protrombinom.

oznaka bakteriofagnega klona	aminokislinsko zaporedje dodekapeptida
S1	I T T P D W E L I A R N
S5	N P L E R M L D R P E Q
S11	N L V E N F I D F G P A

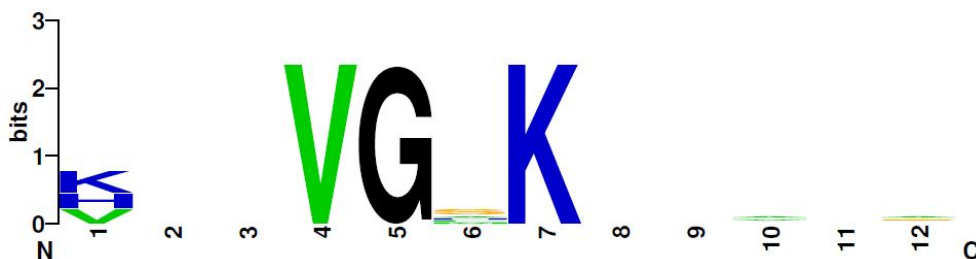
Preglednica IV: Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov, izraženih na posameznih bakteriofagnih klonih, pridobljena pri 3. selekciji s specifično elucijo s protrombinom.

oznaka bakteriofagnega klona	aminokislinsko zaporedje dodekapeptida
P2, P9, P12	KMLVGSKEMVPN
P5	VTNVGLKSTAGL
P7	HLAVGMKERSIA
P11, P18	VQSVGSKIKDTP
P19	KAEVGSKFVYS

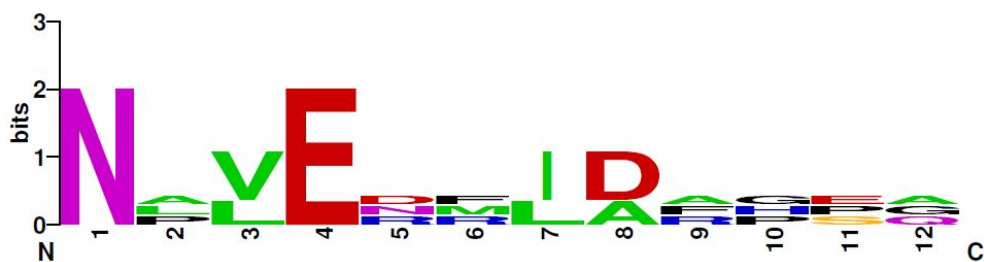
Preglednica V: Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov, izraženih na posameznih bakteriofagnih klonih, pridobljena pri 4. selekciji s specifično elucijo s kompleksom fosfatidilserin/protrombin.

oznaka bakteriofagnega klona	aminokislinsko zaporedje dodekapeptida
PS2, PS10, PS17	HLGVGAKPLTNS
PS7	QVNGLGER SQM
PS8	GIDDLGPLHPR

Pri enem izmed bakteriofagnih klonov (PS9) v aminokislinskem zaporedju nismo našli inserta, najverjetneje je prišlo do izgube inserta med pomnoževanjem. Nekatera izmed dobljenih aminokislinskih zaporedij dodekapeptidov so bila podobna. Dodekapeptide smo na podlagi zaporedij lahko razvrstili v dve skupini. V prvo skupino smo uvrstili peptide, ki vsebujejo motiv VGXX, pri čemer X predstavlja katerokoli aminokislino (peptidi P2, P5, P7, P9, P12, P11, P18, P19, PS2, PS10, PS17, N10) (slika 13). Drugačen motiv so izkazovali peptidi S5, S11 ter N5, ki smo jih razvrstili v drugo skupino (slika 14). Ostalih peptidov nismo uspeli uvrstiti v prvo ali drugo skupino. V preglednici VI so pri posameznih peptidih označene aminokisliline, ki sodijo v prvi ali drugi skupni motiv.



Slika 13: Dodekapeptidi s prvim motivom – P2, P5, P7, P9, P12, P11, P18, P19, PS2, PS10, PS17, N10. Aminokisliline so označene z različnimi barvami glede na njihove lastnosti. Sliko smo naredili s programom WebLogo [31].



Slika 14: Dodekapeptidi z drugim motivom – S5, S11, N5. Aminokisliline so označene z različnimi barvami glede na njihove lastnosti. Sliko smo naredili s programom WebLogo [31].

Preglednica VI: Zbrana aminokislinska zaporedja dodekapeptidov, pridobljena v vseh selekcijah. Identificirana motiva smo označili z rumeno (1. skupina) oziroma zeleno barvo (2. skupina).

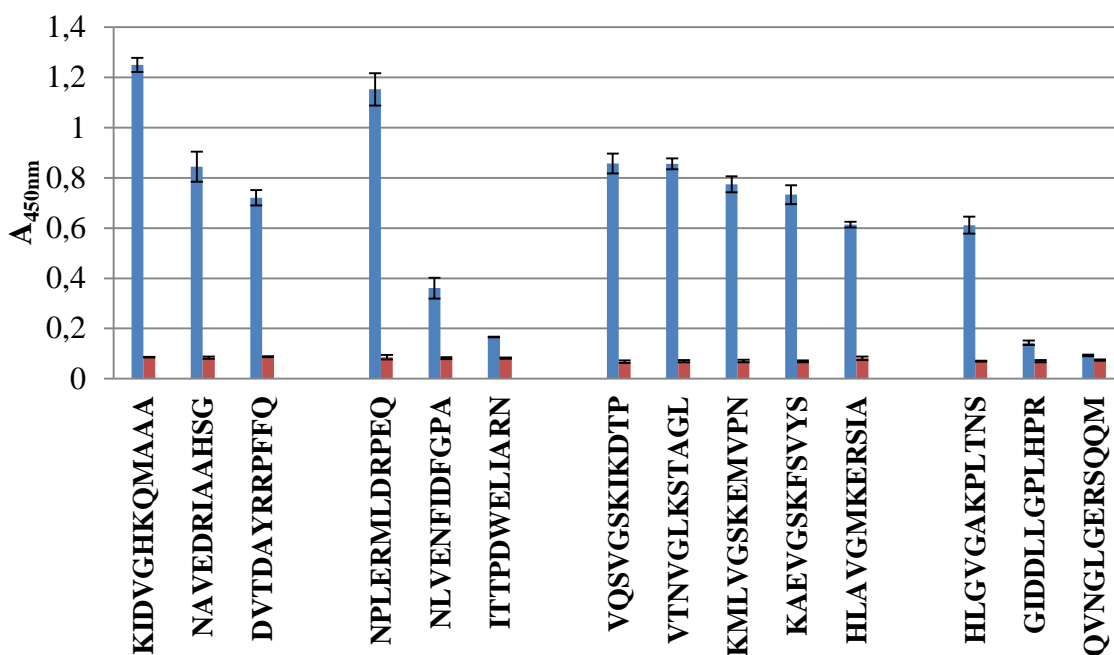
oznaka bakteriofagnega klona	aminokislinsko zaporedje dodekapeptida
P2, P9, P12	KML <b>VGSK</b> EMVPN
P19	KAE <b>VGSK</b> FSVYS
P7	HLA <b>VGMK</b> ERSIA
PS2, PS10, PS17	HLG <b>VGAK</b> PLTNS
P5	VTN <b>VGLK</b> STAGL
P11, P18	VQS <b>VGSK</b> IKDTP
N10	KID <b>VGHK</b> QMAAA
S5	<b>NPL</b> ERMLDRPEQ
S11	<b>NLVE</b> NFIDFGPA
N5	<b>NAVE</b> DRIAASG
PS7	QVNGLGERSQQM
PS8	GIDLLGPLHPR
S1	ITTPDWELIARN
N2	DVTDAYRRPFFQ

Subtraktivno selekcijo smo izvedli v vseh stopnjah 3. in 4. selekcije, medtem ko to ne velja za 1. in 2. selekcijo. Dodana subtraktivna selekcija je lahko vzrok, da smo pri 3. in 4. selekciji dobili večji delež vezalcev na tarčo. V primerjavi z 2. selekcijo (S), kjer smo izmed testiranih 20 bakteriofagnih klonov pridobili tri, ki so izkazovali močnejšo vezavo na tarčna protitelesa v primerjavi z ozadjem, smo v 3. selekciji (P) dobili večje število vezalcev na tarčo, in sicer 8.

Namen subtraktivne selekcije je bil tudi pridobiti čim bolj izrazit motiv. Med pridobljenimi dodekapeptidi se je po uvedbi subtraktivnega koraka v vseh stopnjah selekcije najpogosteje pojavljal motiv VGXK, pri čemer X predstavlja katerokoli aminokislino.

### 5.3.2 Primerjava vezave izbranih peptidov, izraženih na fagih

Avidnost vezave posameznega dodekapeptida, izraženega na bakteriofagu, smo ovrednotili s semikvantitativno fagno ELISA (slika 15).



Slika 15: Primerjava vezave izbranih peptidov, izraženih na fagih, s semikvantitativnim testom ELISA. Prikazana so zaporedja dodekapeptidov, izražena na fagih. Modri stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa, rdeči stolpci vezavo na ozadje (BSA). Za vsak klon smo izvedli tri ponovitve vezave na tarčna protitelesa ter tri ponovitve ozadja (BSA). Prikazane so povprečne vrednosti absorbanc in standardni odkloni. Količina nanesenih fagov je znašala  $5 \times 10^9$  pfu/vdolbinico, fagni kloni so bili v TBS.

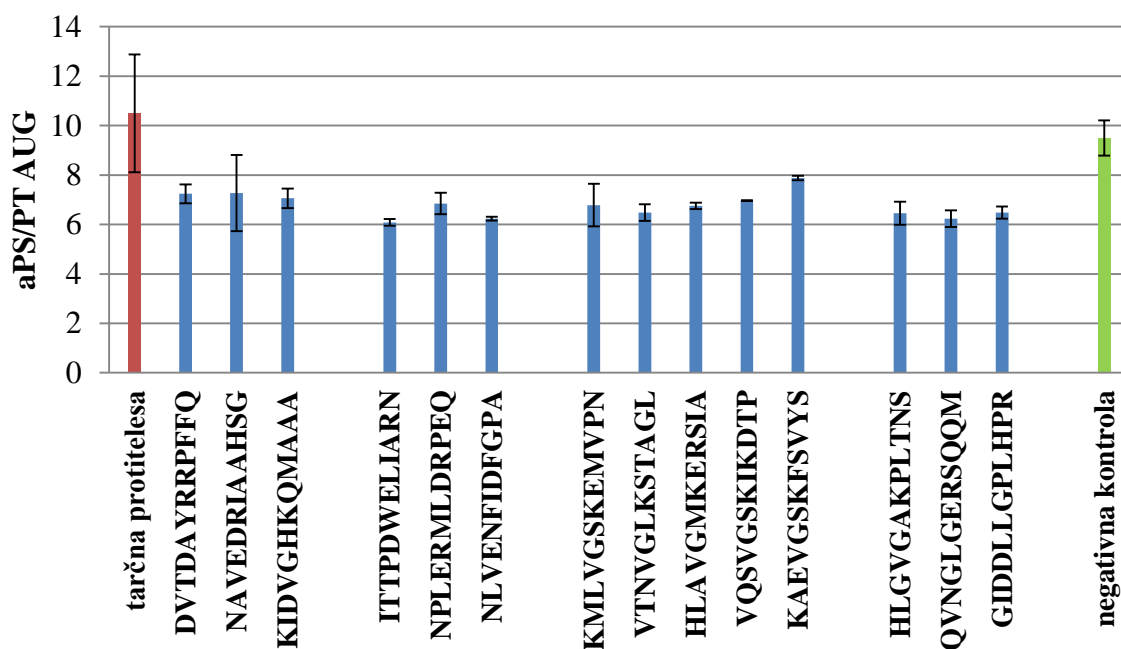
Pri nekaterih peptidih, izraženih na fagih, se je pokazalo, da niso bili tako močni vezalci tarčnih protiteles. To so bili peptidi z zaporedji ITTPDWELIARN, QVNLGERSQQM in GIDDLLGPLHPR, ki tudi niso pripadali nobenemu izmed opaženih motivov. Za razliko od omenjenih peptidov, je peptid z zaporedjem DVTDAYRRPFFQ izkazoval močno vezavo na tarčo, čeprav ga nismo uspeli uvrstiti v ustrezen motiv. Kljub temu smo na podlagi ugotovljenega domnevali, da je najbolj relevanten motiv VGXK, ki ga vsebuje večina dodekapeptidov z močno vezavo na tarčo.

### **5.3.3 Potrditev specifičnosti vezave peptidov, izraženih na fagih, na tarčna protitelesa proti protrombinu s kompetitivno ELISA**

S kompetitivno ELISA smo ugotavljali, če dodekapeptidi, izraženi na fagih, resnično predstavljajo mimetike protrombina, torej če tekmujejo za vezavo na paratop tarčnih protiteles s protrombinom. Omenjeno vezavo smo vrednotili s kompeticijo s protrombinom pod različnimi pogoji, in sicer v prisotnosti fosfatidilserina z aPS/PT ELISA ter odsotnosti fosfatidilserina s kompetitivno fagno ELISA.

Pri kompetitivni aPS/PT ELISA smo nanesti izolirana protitelesa proti protrombinu v redčitvi 1:800 ter izvedli kompeticijo z dodatkom posameznih bakteriofagnih klonov v količini  $10^9$  pfu/vdolbinico. Za vezavo na protitelesa proti protrombinu so tekmovali peptidi na bakteriofagnih klonih in protrombin. S sekundarnimi protitelesi smo detektirali in primerjali količino vezanih protiteles proti protrombinu. S kompetitivno aPS/PT ELISA smo potrdili, da so dodekapeptidi specifično vezali določen delež protiteles proti protrombinu, ki smo jih tekom ELISA sprali (slika 16). Manjši delež protiteles proti protrombinu, ki se je vezal na protrombin, se odraža v znižanju absorbance vzorca, posledično nižjem AUG. Pri koncentraciji 4,21  $\mu\text{g/mL}$  protiteles proti protrombinu smo s fagi dosegli od 26,8 % inhibicije pri klonu z izraženim peptidom KAEVGSKFSVYS do največ 44,0 % inhibicije pri klonu z izraženim peptidom ITTPDWELIARN. Pri vseh klonih je bila prisotna kompeticija vezave s protrombinom. Vprašljiva je bila le za klon z izraženim peptidom NAVEDRIAAHSG zaradi večjih standardnih odklonov meritev (slika 16). Za dodatno potrditev bi morali izvedbo testa ponoviti, vendar se za to nismo odločili, saj smo vezavo peptida na protitelesa proti protrombinu potrdili tudi pri kompetitivni fagni ELISA. Absorbance izmerjene v vdolbinicah s fagi brez dodanih protiteles proti protrombinu so bile v nivoju absorbance slepega vzorca, s čimer smo potrdili, da vezave sekundarnih protiteles na same fage ni bilo (ni prikazano). Prav tako nismo zaznali značilne kompeticije pri negativni kontroli, to je bakteriofagu brez inserta, torej so za kompeticijo resnično odgovorni dodekapeptidi, izraženi na fagih. Za dosego večjega deleža inhibicije vezave protiteles proti protrombinu na protrombin bi morali bodisi dodati večje količine bakteriofagnih klonov, ki jih nismo imeli na voljo, bodisi zmanjšati količino protiteles proti protrombinu. Slednjega analitska občutljivost metode ne dopušča. V prihodnje bi bilo smiselno kompeticijo preizkusiti z izbranimi sintezniimi peptidi.

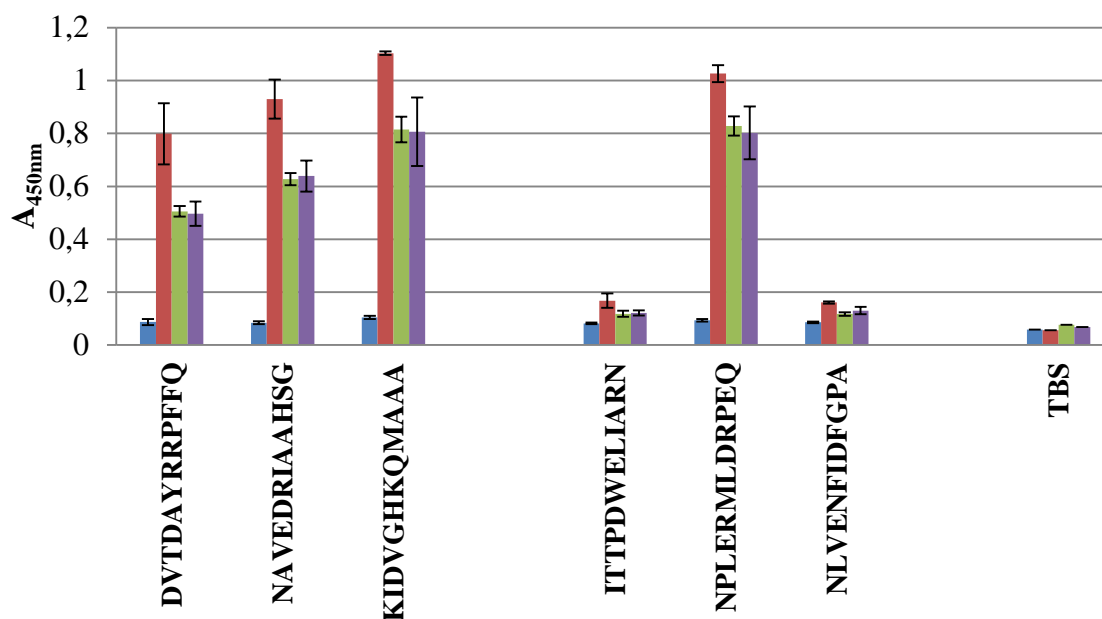




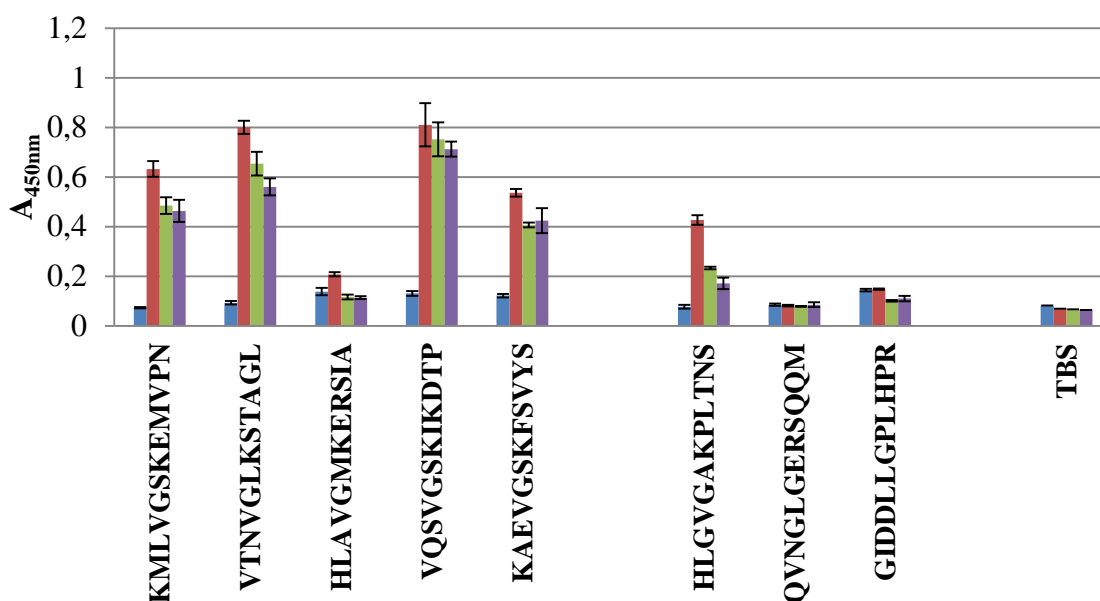
Slika 16: Kompetitivna aPS/PT ELISA. Kompeticijo smo izvedli z dodatkom posameznih bakteriofagnih klonov v količini  $10^9$  pfu/vdolbinico. Izolirana tarčna protitelesa proti protrombinu smo redčili v razmerju 1:800. Fagni kloni so bili v TBS. Za negativno kontrolo smo uporabili fag brez inserta za dodekapeptid. Prikazane so povprečne vrednosti AUG dveh ponovitev ter standardni odkloni.

Kompetitivno fagno ELISA smo izvedli kot običajno fagno ELISA, pri čemer smo hkrati dodali bakteriofagni klon v količini  $5 \times 10^9$  pfu/vdolbinico in protrombin v dveh različnih količinah. Protrombin smo dodali v množinskem razmerju protitelesa proti protrombinu:protrombin 1:1 oziroma 1:10. Pri večji količini dodanega antigena smo pričakovali večjo kompeticijo za vezavo. Dodatek protrombina je znižal odziv, torej smo tudi v odsotnosti fosfatidilserina potrdili, da se dodekapeptidi specifično vežejo na protitelesa proti protrombinu (sliki 17 in 18). Bistvenih razlik v kompeticiji za vezavo med različnima količinama dodanega protrombina ni bilo. Možnih razlag za tovrstne rezultate je več. Možno je, da smo že z manjšo količino protrombina dosegli mejno inhibicijo vezave z ozirom na avidnost protrombina in bakteriofagnih klonov do protiteles proti protrombinu. Možno je tudi, da je med izoliranimi protitelesi le določen delež protiteles s paratopi, za katera tekmujejo peptidi na fagih. Opažanja v predhodnih študijah potrjujejo, da protrombin v raztopini nima velike afinitete za protitelesa proti protrombinu [5].

Posledično se le majhen delež molekul protrombina uspe vezati na protitelesa proti protrombinu ter izpodriniti peptide.



Slika 17: Vezava izbranih peptidov, izraženih na fagih (1. in 2. selekcije), ob prisotnosti protrombina, določena s kompetitivno fagno ELISA. Modri stolpci prikazujejo vezavo na ozadje (BSA), rdeči stolpci vezavo na tarčna protitelesa v odsotnosti protrombina, zeleni stolpci vezavo na tarčna protitelesa v prisotnosti protrombina v množinskem razmerju tarčna protitelesa:protrombin 1:1 ter vijolični stolpci vezavo na tarčna protitelesa v prisotnosti protrombina v množinskem razmerju tarčna protitelesa:protrombin 1:10. V vsako vdolbinico smo nanegli fage v količini  $5 \times 10^9$  pfu, fagi so bili v TBS. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev in standardni odkloni.



Slika 18: Vezava izbranih peptidov, izraženih na fagih (3. in 4. selekcije), ob prisotnosti protrombina, določena s kompetitivno fagno ELISA. Modri stolpci prikazujejo vezavo na ozadje (BSA), rdeči stolpci vezavo na tarčna protitelesa v odsotnosti protrombina, zeleni stolpci vezavo na tarčna protitelesa v prisotnosti protrombina v množinskem razmerju tarčna protitelesa:protrombin 1:1 ter vijolični stolpci vezavo na tarčna protitelesa v prisotnosti protrombina v množinskem razmerju tarčna protitelesa:protrombin 1:10. V vsako vdolbinico smo nanegli fage v količini  $5 \times 10^9$  pfu, fagi so bili v TBS. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev in standardni odkloni.

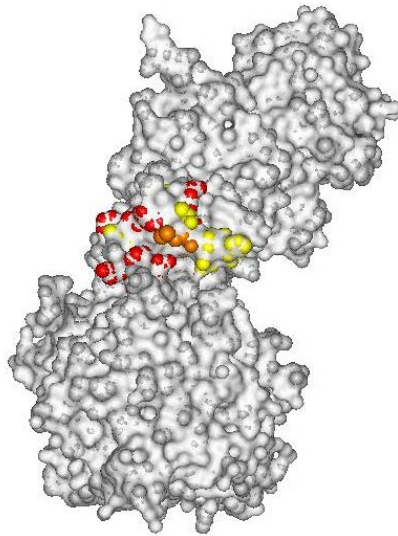
Pri semikvantitativni in kompetitivni fagni ELISA se je za nekatere bakteriofagne klone pokazalo, da imajo nižjo avidnost do tarče v primerjavi z drugimi in najverjetneje motiv slabše posnema epitop na protrombinu. Ostali bakteriofagni kloni, še posebej tisti z izraženim peptidom, ki pripada enemu od motivov (prvi ali drugi skupini), so tudi v kompetitivnih preizkušanjih kazali močno vezavo na tarčo, prišlo je tudi do izpodrivanja peptidov s protrombinom. Z obema izvedbama kompetitivnih ELISA smo potrdili, da gre za specifične vezalce izoliranih protiteles proti protrombinu in ne netarčne peptide.

### 5.3.4 Določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombinu

Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov, izraženih na fagih, ki so se specifično vezali na protitelesa proti protrombinu (preglednica VI), smo prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina z oznako 5EDM v bazi PDB. Želeli smo lokalizirati domnevni epitop. Prileganje peptidov na primarno strukturo protrombina smo izvedli s spletnim

orodjem Clustal Omega [26]. V primarni strukturi nismo našli zaporedja, ki bi bilo identično ali bi dobro posnemalo zaporedje izbranih peptidnih mimetikov epitopov. Sklepamo, da je epitop, ki ga tarčna protitelesa proti protrombinu prepoznajo, najverjetneje konformacijski. Epitopsko mapiranje afinitetno selekcioniranih peptidov na terciarno strukturo protrombina smo izvedli s pomočjo algoritma PepSurf, ki je dostopen na strežniku Pepitope Server [27]. Le-ta prilega peptide na površino izbrane kristalne strukture. Algoritem je prilegal posamezni peptid na več mest v izbrani strukturi ter številčno ovrednotil in rangiral prileganja na izbrana mesta. Peptide z identičnim motivom je algoritem prilegal na različna mesta, zato smo izbrali dva peptida. Vsak je pripadal enemu od obeh motivov in je v semikvantitativni ELISA izkazoval najvišjo vezavo na tarčo. Predstavniki motiva prve skupine je peptid KIDVGHKQMAAA in predstavnik motiva druge skupine peptid NPLERMLDRPEQ. Odločili smo se, da se bomo pri vrednotenju osredotočili na prileganja, podana z najvišjo vrednostjo, in sicer taka, ki se ne nahajajo na proteazni domeni. Slednja namreč najverjetneje ne vsebuje epitopa, kar so pokazale študije fragmentov protrombina [5, 21, 32]. Ugotovili so, da se IgG frakcija bolnikov z aktivnostjo lupusnih antikoagulantov veže na cel protrombin, na pretrombin 1 (protrombin brez fragmenta 1) ter na fragment 1, medtem ko do vezave na imobiliziran trombin ni prišlo [32]. Poskusi na miškah, imuniziranih s protrombinom oziroma pretrombinom 1 so pokazali, da je vezava protiteles mišk, imuniziranih s protrombinom, na kompleks fosfatidilserin/protrombin večja, prav tako ta protitelesa delno inhibirajo vezavo prečiščene IgG frakcije bolnikov z APS na kompleks fosfatidilserin/protrombin, medtem ko do inhibicije vezave pri uporabi imunogena pretrombina 1 ni prišlo [21]. To nakazuje na pomen fragmenta 1 za vezavo protiteles na protrombin.

Slika 19 prikazuje prileganje obeh izbranih peptidov. Aminokislina na protrombinu, ki ustrežajo peptidu KIDVGHKQMAAA, so označene rdeče in tiste, ki ustrežajo peptidu NPLERMLDRPEQ, rumeno. Aminokislina, ki ustrežajo obema peptidoma so označene oranžno. Oba peptida je algoritem prilegal znotraj domene »kringle« 2 (K2). Domene »kringle« so homologne z drugimi od vitamina K odvisnimi proteini, zato bi epitop znotraj teh domen razložil navzkrižno reaktivnost protiteles proti protrombinu z ostalimi proteini [5].



Slika 19: Prileganje peptidov KIDVGHKQMAAA in NPLERMLDRPEQ na površino protrombina. Na strukturi protrombina so aminokisliline, na katere je Pepitope server prilegal peptid NPLERMLDRPEQ, označene z rdečo barvo, aminokisliline prileganja peptida KIDVGHKQMAAA z rumeno barvo. Z oranžno barvo so označene aminokisliline, na katere se prilegata oba peptida. Sliko smo oblikovali s programom Viewer Lite.

Predpostavljamo, da najbolj izrazit motiv VGXK predstavlja le del konformacijskega epitopa na protrombinu. Da bi potrdili lokacijo in določili aminokisliline, ki sestavljajo epitop, bo potrebno narediti še več testov. Domnevamo, da je v vezavo protiteles na antigen udeleženih več domen, ki pridejo v bližino po zvitju proteina. Smiselno bi bilo prilegati dobljene peptide na tridimenzionalne strukture posameznih fragmentov protrombina, vendar njihove kristalne strukture še niso znane. Smiselno bi bilo tudi ovrednotiti vezavo izoliranih protiteles (izolirana iz združenih serumov) na posamezne fragmente. Poleg vezave na fragmente protrombina bi lahko ovrednotili vezavo protiteles proti protrombinu na sintezne peptide z zaporedji, ki so se izkazala kot najperspektivnejša tekom našega dela. Nenazadnje bi bilo smiselno ovrednotiti tudi vezavo protiteles iz serumov posameznih bolnikov na pridobljene peptidne mimetike epitopov in s tem določiti ali so protitelesa različnih bolnikov usmerjena na iste epitope.

## 6 Sklep

V okviru magistrske naloge smo uspeli doseči zadane cilje:

1. Izolirali smo IgG frakcijo protiteles proti protrombinu po principu afinitetne kromatografije iz združenih serumov 12 bolnikov z APS z zgodovino venskih tromboz.
2. Iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-12™ smo selekcionirali fage, ki so imeli na površini izražene dodekapeptide, specifične za izolirana protitelesa proti protrombinu.
3. Izbranim dodekapeptidom smo določili aminokislinsko zaporedje ter jih prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina.
4. Našli smo motiv, za katerega predvidevamo, da predstavlja del konformacijskega epitopa na protrombinu.

Potrdili smo naslednje hipoteze:

1. Izolirali smo protitelesa proti protrombinu ustrezne čistosti in specifičnosti.
2. Selekcijirali smo dodekapeptide, izražene na fagih, ki so se specifično vezali na paratop protiteles proti protrombinu.

Epitopa na protrombinu nismo uspeli z gotovostjo določiti. Domnevamo, da motiv VGXX predstavlja del konformacijskega epitopa za protitelesa proti protrombinu. Potrebne so še dodatne študije za podkrepitev naših ugotovitev ter lokalizacijo epitopa. Za določitev epitopa na protrombinu bi morali pridobiti večje število peptidov s specifično vezavo na tarčo (protitelesa proti protrombinu), ki bi podkrepili pridobljene peptidne motive. Številne raziskave potrjujejo večjo relevantnost aPS/PT napram aPT [4], zato bi bilo za optimalno določitev vezavnega mesta smiselno prileganje na terciarno strukturo protrombina v prisotnosti fosfatidilserina, vendar le-ta zaenkrat še ni znana. Tako bi lahko prepoznali domnevne neoepitope, ki se razkrijejo šele ob vezavi protrombina na fosfatidilserin [5]. Poleg protiteles proti protrombinu bolnikov z APS z zgodovino venskih tromboz bi bilo smiselno testirati še protitelesa proti protrombinu bolnikov z ostalimi zapleti APS na različne peptide, pridobljene s selekcijo. Tako bi ugotovili morebiten prevladujoč motiv glede na zaplet bolezni. Izziv pri tem predstavlja pridobivanje vzorcev bolnikov s prisotnostjo zgolj enega zapleta. Običajno imajo prisotnih več različnih zapletov APS, več različnih antifosfolipidnih protiteles ali pridružene bolezni (sekundarni APS), kar za epitopsko mapiranje ni optimalno. Določitev vezavnega mesta bi pripomogla k

razumevanju mehanizma delovanja protiteles proti protrombinu oziroma procesov, ki privedejo do zapletov, značilnih za APS.

## 7 Literatura

1. Miyakis S, Lockshin M D, Atsumi T, Branch D W, Brey R L, Cervera R, Derksen R H, PG D E G, Koike T, Meroni P L, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos P G, and Krilis S A: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
2. Galli M, Luciani D, Bertolini G, and Barbui T: Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2003; 102: 2717-23.
3. Galli M, and Barbui T: Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. *Blood* 1999; 93: 2149-57.
4. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta M A, and Bertolaccini M L: Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost* 2014; 111: 354-64.
5. Žigon P, Ambrožič A, Božič B, and Čučnik S: Protitelesa proti protrombinu. *Zdrav vestn* 2015; 84: 209-21.
6. Zigon P, Ambrozic A, Cucnik S, Kveder T, Rozman B, and Bozic B: Modified phosphatidylserine-dependent antiprothrombin [corrected] ELISA enables identification of patients negative for other antiphospholipid antibodies and also detects low avidity antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 1011-8.
7. Putnam F W: *The Plasma Proteins*, Second Edition, 1984.
8. Pozzi N, and Di Cera E: Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert Rev Proteomics* 2014; 11: 653-5.
9. Ribarič S: *Temelji patološke fiziologije*, 2. izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2011: 147-150.
10. *Coagulation*. <https://www.britannica.com/science/coagulation-of-blood> (dostop: 15.1.2018).
11. Pozzi N, Chen Z, Gohara D W, Niu W, Heyduk T, and Di Cera E: Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *J Biol Chem* 2013; 288: 22734-44.
12. Žigon P, Božič-Mijovski M, Bertoncej M F, Ambrožič A, Tomšič M, Hočevar A, Božič B, Šemrl S S, Kveder T, and Čučnik S, "Laboratory Methodology Important in the Diagnosis and Prognosis of Antiphospholipid Syndrome," *Thrombosis, Atherosclerosis and Atherothrombosis - New Insights and Experimental Protocols*, M. Bozic-Mijovski, ed., p. Ch. 06, Rijeka: InTech, 2015.
13. Zigon P, Cucnik S, Ambrozic A, Kveder T, Semrl S S, Rozman B, and Bozic B: Detection of antiphosphatidylserine/prothrombin antibodies and their potential diagnostic value. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 724592.
14. Hjelm B: *Epitope mapping of antibodies towards human protein targets*, Royal Institute of Technology, Stockholm, 2011.
15. Gershoni J M, Roitburd-Berman A, Siman-Tov D D, Tarnovitski Freund N, and Weiss Y: Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs* 2007; 21: 145-56.
16. Westwood O. M. R. H F C: *Epitope Mapping: A Practical Approach*, Oxford University Press, 2001.
17. New England BioLabs: *Ph.D.<sup>TM</sup> Phage Display Libraries, Instruction Manual*



18. Gray B P, and Brown K C: Combinatorial peptide libraries: mining for cell-binding peptides. *Chem Rev* 2014; 114: 1020-81.
19. Hren V: Epitopsko mapiranje protiteles proti protrombinu pri bolniku z vensko trombozo = Antiprothrombin antibodies epitope mapping in patient with venous thrombosis : enoviti magistrski študij farmacije / Vita Hren, Ljubljana, 2017.
20. Bottger V, and Bottger A: Epitope mapping using phage display peptide libraries. *Methods Mol Biol* 2009; 524: 181-201.
21. Oku K, Amengual O, Zigon P, Horita T, Yasuda S, and Atsumi T: Essential role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52: 1775-84.
22. Willis R, Gonzalez E B, and Brasier A R: The journey of antiphospholipid antibodies from cellular activation to antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2015; 17: 16.
23. Zigon P, and Perdan Pirkmajer K: Anti-Phosphatidylserine/Prothrombin Antibodies Are Associated with Adverse Pregnancy Outcomes. 2015; 2015: 975704.
24. GE Healthcare: MAbTrap™ Kit, Instruction 71-5003-43 AK.
25. *Absorption spectrum and quantitation of filamentous phage.* <http://www.biosci.missouri.edu/smithGp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html> (dostop: 16.1.2018).
26. *Clustal Omega.* <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (dostop: 14.11.2017).
27. *Pepitope Server.* <http://pepitope.tau.ac.il/> (dostop: 20.12.2017, 1.1.2018, 8.1.2018, 10.1.2018, 9.2.2018).
28. Jereb R: Epitopsko mapiranje protiteles proti protrombinu pri bolniku z arterijsko trombozo = Antiprothrombin antibodies epitope mapping in patient with arterial thrombosis : enoviti magistrski študij farmacija / Rebeka Jereb, 2017.
29. *SAROTUP.* <http://immunet.cn/sarotup/index.html> (dostop: 6.2.2018).
30. Vodnik M, Zager U, Strukelj B, and Lunder M: Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules* 2011; 16: 790-817.
31. *WebLogo.* <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> (dostop: 5.3.2018).
32. Rao L V, Hoang A D, and Rapaport S I: Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood* 1996; 88: 4173-82.