

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENKA STRUNA
MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALENKA STRUNA

**EPITOPSKO MAPIRANJE PROTITELES PROTI PROTROMBINU
PRI BOLNIKI Z ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM**

**ANTIPROTHROMBIN ANTIBODIES EPITOPE MAPPING IN
PATIENTS WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME**

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder mag. farm., v sodelovanju z Laboratorijem za imunologijo revmatizma Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, pod somentorstvom dr. Polone Žigon. Določitev nukleotidnih zaporedij so izvajali v podjetju GATC Biotech AG (Konstanz, Nemčija).

ZAHVALA

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Mojci Lunder, mag. farm. in dr. Poloni Žigon za pomoč pri izdelavi magistrske naloge ter za vse strokovne in življenjske napotke.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in vsem, ki so s spodbudami, nasveti ali podajanjem znanja pripomogli k osebni rasti in zaključku mojega študija.

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Mojce Lunder, mag. farm. in somentorice dr. Polone Žigon. Naloga je bila del programov ARRS, šifra P4-0127 (znanje in zdravje), katerega nosilec je prof. dr. Janko Kos in ARRS, šifra P3-0314 (Sistemske avtoimunske bolezni), katere nosilka je Snežan Sodin-Šemrl.

Ljubljana, 2018

Alenka Struna

Magistrska komisija:

Predsednik/-ca: izr. prof. dr. Janez Ilaš

Mentor/-ica: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Somentor/-ica: dr. Polona Žigon

Član/-ica: doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž

Kazalo

Kazalo	i
Seznam uporabljenih kratic in okrajšav	iv
Povzetek	vi
Abstract.....	vii
1. Uvod	1
1.1. Antifosfolipidni sindrom.....	1
1.2. Interakcije protiteles in antigenov.....	3
1.3. Protitelesa proti protrombinu in njihova detekcija.....	4
1.4. Protrombin	4
1.5. Teorija dveh sprožilcev in imunološke lastnosti aPL	6
1.6. Patogeneza protiteles proti protrombinu	7
1.7. Metode epitopskega mapiranja	8
1.7.1. Epitopsko mapiranje z bakteriofagnimi predstavitvenimi knjižnicami.....	9
1.8. Tridimenzionalna struktura protrombina	11
2. Namen dela	13
3. Materiali in instrumenti	14
3.1. Materiali.....	14
3.1.1. Biološki material	14
3.1.2. Reagenti	15
3.1.3. Gojišča	17
3.1.4. Pufri in raztopine	18
3.2. Instrumenti	20
3.2.1. Oprema	20
4. Metode.....	22
4.1. Priprava bakterijskih kultur <i>E. coli</i> ER 2738.....	22
4.1.1. Inokulacija bakterij na trdno gojišče	22
4.1.2. Inokulacija bakterij v tekoče gojišče	22
4.2. Mikrobiološka titracija.....	22
4.3. Selekcija bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-L7™ in Ph.D.-12™.....	24
4.4. Selekcija bakteriofagov iz predhodno obogatene knjižnice Ph.D.-12™	27
4.5. Izolacija in pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov.....	27
4.6. Spektrofotometrično določanje koncentracije bakteriofagov	27
4.7. Karakterizacija posameznih peptidov izraženih na bakteriofagih s testom ELISA28	
4.8. Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov	29
4.9. Določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombin	30
5. Rezultati in razprava.....	32

5.1.	Selekcija bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-L7 TM in Ph.D.-12 TM	32
5.1.1.	Vrednotenje poteka afinitetnih selekcij	32
5.2.	Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih	34
5.2.1.	Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih, po četrti stopnji selekcije iz predhodno obogatene knjižnice Ph.D.-12 TM	34
5.2.2.	Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih, iz knjižnic Ph.D.-L7 TM	37
5.2.3.	Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih iz knjižnic Ph.D.-12 TM	39
5.3.	Vrednotenje izbranih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih.....	43
5.3.1.	Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA	43
5.3.2.	Kompetitivni bakteriofagni test ELISA.....	45
5.4.	Primerjava izbranih peptidov z vezavo na tračna protitelesa.....	47
5.5.	Prileganje aminokislinskih zaporedij na izbrani kristalni strukturi protrombina in določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombinu	50
6.	Sklep	54
7.	Viri.....	56

Kazalo slik:

Slika 1:	Prileganje epitopa in paratopa	3
Slika 2:	Pretvorba protrombina v trombin v fizioloških pogojih	5
Slika 3:	Prikaz afinitetne selekcije iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic.	10
Slika 4:	Protrombin pri fizioloških pogojih.....	11
Slika 5:	Tridimenzionalna struktura protrombina z označenimi domenami.....	12
Slika 6:	Poliklonski bakteriofagni test ELISA.....	33
Slika 7:	Presejalni bakteriofagni test ELISA	35
Slika 8:	Presejalni bakteriofagni test ELISA	35
Slika 9:	Presejalni bakteriofagni test ELISA.	37
Slika 10:	Presejalni bakteriofagni test ELISA	38
Slika 11:	Presejalni bakteriofagni test ELISA	40
Slika 12:	Skupni motiv, ki ga tvorijo izbrani dodekapeptidi iz 1. skupine.	42
Slika 13:	Skupni motiv, ki ga tvorijo izbrani dodekapeptidi iz 2. skupine.....	42
Slika 14:	Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA.....	43
Slika 15:	Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA.....	45
Slika 17:	Kompetitivni bakteriofagni test ELISA.....	46
Slika 18:	Kompetitivni bakteriofagni test ELISA	46

Slika 19: Prileganje peptidov na površino zvite molekule protrombina (6C2W)..... 51

Slika 20: Prileganje peptidov na površino nezvite molekule protrombina (5EDM) 51

Kazalo preglednic:

Preglednica I: Klasifikacijska merila za diagnozo APS 1

Preglednica II: Število eluiranih bakteriofagov in delež eluiranih bakteriofagov..... 32

Preglednica III: Zbrana aminokislinska zaporedja peptidov, pridobljenih po 4. stopnji selekcije iz predhodno obogatene knjižnice dodekapeptidov..... 36

Preglednica IV: Zbrana aminokislinska zaporedja izraženih peptidov po 3. stopnji selekcije heptapeptidov..... 39

Preglednica V: Zbrana aminokislinska zaporedja dodekapeptidov peptidov, izbranih po 3. selekcijski stopnji s specifično elucijo 41

Preglednica VI: Zbrana aminokislinska zaporedja dodekapeptidov..... 47

Preglednica VII: Razširjeni skupni motivi dodekapeptidov 49

Seznam uporabljenih kratic in okrajšav

aPL	antifosfolipidna protitelesa
APS	antifosfolipidni sindrom (<i>antiphospholipid syndrom</i>)
aPS/PT	od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu
BSA	goveji serumski albumin
DNA	dezoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	encimsko imunski test na trdnem nosilcu (ang. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
IgG	imunoglobulini razreda G
IgM	imunoglobulini razreda M
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
K1	domena »kringle«-1
K2	domena »kringle«-2
LA	lupusni antikoagulant
LAF	laminarni pretok zraka
obr./min	obratov na minuto
PBS	pufrana fiziološka raztopina (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBST	PBS pufer z dodatkom Tweena
PDB	javna zbirka proteinskih struktur (angl. Protein Data bank)
pfu	plakotvorna enota (ang. <i>plaque-forming unit</i>)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

Okrajšave aminokislin

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

Povzetek

Antifosfolipidni sindrom je avtoimunska bolezen, katere klinični znaki so arterijske in venske tromboze ter zapleti v nosečnosti. Za potrditev te bolezni je potrebna hkratna povišana vrednost antifosfolipidnih protiteles, definiranih v mednarodnih klasifikacijskih merilih iz leta 2006. Z boleznijo so značilno povezana tudi protitelesa proti protrombinu, vendar v kriterije za potrditev bolezni še niso vključena zaradi njihove raznolikosti in težavne detekcije. V nekaterih primerih so protitelesa proti protrombinu edina povišana. V zadnjih letih je bilo objavljenih veliko člankov na temo patogeneze protiteles proti protrombinu, izboljšujejo se metode za njihovo detekcijo, predlagali so jih tudi za vključitev v klasifikacijska merila za določanje antifosfolipidnega sindroma.

Namen našega raziskovalnega dela je bil določiti in preučiti stične regije protrombina in protiteles proti protrombinu. Iskanje in vrednotenje interakcij omogoča vpogled v patogenezo bolezni, lahko pa pripomore tudi pri razvoju novih inhibitorjev patoloških protiteles. Za iskanje stičišč smo uporabljali skupek protiteles bolnikov, ki so preboleli vensko trombozo. Z metodo selekcije iz bakteriofagnih knjižnic naključnih dodekapeptidov in heptapeptidov smo izolirali bakteriofage z največjo vezavo na tarčna protitelesa. Izolirane bakteriofage smo ovrednotili s testom ELISA in jim določili aminokislinska zaporedja. Aminokislinska zaporedja dodekapeptidov smo prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina, s kompetitivnim testom ELISA pa želeli potrditi, da peptidi izraženi na bakteriofagih, predstavljajo mimetike epitopov protrombina. Določili smo štiri različne motive. Dva od njih sta se že pojavila v predhodnih študijah, dva pa sta prevladala v naši selekciji. S prileganjem po enega predstavnika iz vsake skupine peptidov, ki tvorijo motive, smo predvideli epitopska mesta na protrombinu. Ugotovili smo, da konformacija protrombina vpliva na katero domeno se bodo vezala protitelesa. Pri zviti konformaciji protrombina (6C2W) smo z algoritmom predvideli epitope na domeni serinske proteaze in domeni »kringle«-2, medtem ko je algoritem iste peptide na nezvito kristalno obliko protrombina (5EDM) prilegal na različne domene.

Ključne besede: antifosfolipidni sindrom, protitelesa proti protrombinu, protrombin, epitopsko mapiranje, bakteriofagne predstavitvene knjižnice

Abstract

Antiphospholipid syndrome is autoimmune disease, with complications of venous and arterial thrombosis and/or pregnancy morbidity. In order to establish a diagnosis there should be elevated concentrations of antiphospholipid antibodies as defined in 2006 in international classification criteria. A subgroup of antiphospholipid antibodies - anti-prothrombin antibodies - also shows high correlation to clinical manifestations of the syndrome. Sometimes they are the only elevated antibodies in patients but they are not included in classification criteria, due to their diversity and difficult detection. While pathogenesis of antiphospholipid syndrome is still unclear, a sensitive method for anti-prothrombin antibodies detection was just recently established. It is just a question of time before the methods for their detection will be acclaimed and anti-prothrombin antibodies will be added to classification criteria.

Our aim was to determine epitopes on prothrombin that are recognized by anti-prothrombin antibodies. Finding of epitopes and evaluating interactions antigen-antibody would give us insight into pathogenesis of the disease and could help to develop new inhibitors. To determine epitopes, we used phage display libraries containing different dodecapeptides and heptapeptides. With selection we isolated bacteriophages expressing peptides that interact with target - antiprothrombin antibodies - isolated from pooled sera of patients with syndrome and history of venous thrombosis. Using ELISA test, we determined avidity to antibodies for selected peptides. The next step was determination of amino acid sequences. With alignment on primary and tertiary structure of prothrombin we tried to localize epitopes. Further, by competitive ELISA we evaluated whether peptides expressed on bacteriophages, represent mimetics of prothrombin epitope, recognized by antibodies.

There were 4 different motives enriched. Two of them were already observed in last studies, when two dominate in our experiment. With alignments of one peptide from each group, that form motive, we predict epitopes on prothrombin. We found out that conformation of prothrombin have impact on alignment of antibodies. When we performed alignment on a closed conformation of prothrombin (6C2W), we revealed epitopes for antiphospholipid antibodies on kringle-2 and proteolytic domain, however when we performed alignment on more relaxed structure of prothrombin (5EDM) we found that epitopes could be on different domains.

Key words: antiphospholipid syndrome, anti-prothrombin antibodies, prothrombin, epitope mapping, phage display

1. Uvod

1.1. Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom (APS) je avtoimunska bolezen, prvič opisana leta 1983 (1). Bolezen potrdijo, ko določijo vsaj enega od kliničnih znakov in hkrati stalno povišane vrednosti vsaj enega od seroloških meril. Ta so opredeljena v mednarodno sprejetih klasifikacijskih merilih, ko so jih zadnjč posodobili leta 2006 v Sydneyju. Klinični znaki sindroma so ponavljajoče se arterijske in venske tromboze in/ali ponavljajoči se zapleti v nosečnosti, medtem ko serološka merila predstavljajo v razmiku vsaj 12 tednov povišane vrednosti antifosfolipidnih protiteles (aPL). Med slednje se štejejo lupusni antikoagulantni (LA), protitelesa proti kardiolipinom in/ali protitelesa proti β 2-glikoproteinom I (**preglednica I**). Protitelesa niso zgolj označevalci, pač pa igrajo tudi pomembno vlogo pri patogenezi bolezni skupaj z drugimi protitelesi, ki v diagnostična merila še niso vključena (1; 2).

Preglednica I: Klasifikacijska merila za diagnozo APS. IgG so imunoglobulini razreda G, IgM pa imunoglobulini razreda M.

KLINIČNA MERILA	
TROMBOZE	ZAPLETI V NOSEČNOSTI
-Ena ali več potrjenih tromboz v katerem koli tkivu (potrjene morajo biti z Dopplerjevo histopatologijo ali slikanjem, brez prisotnosti vnetja v steni žil).	-Ena ali več nepojasnjenih smrti morfološko normalnega ploda med 10. in 24. tednom nosečnosti. -Pre-/eklampsija pred 34. tednom nosečnosti -Trije nepojasnjeni spontani splavi pred 10. tednom nosečnosti.
Ob prisotnosti enega/več kliničnih znakov se pojavi sum na APS in preveri laboratorijska merila.	
LABORATORIJSKA MERILA	
Lupusni antikoagulantni	V razmiku 12 tednov vsaj dvakrat dokazana povišana vrednost v serumu.
Antikardiolipinska protitelesa	V razmiku 12 tednov vsaj dvakrat dokazan srednje ali visok titer protiteles izotipa IgG ali IgM v serumu ali plazmi.
Protitelesa proti β 2-glikoproteinu I	V razmiku 12 tednov vsaj dvakrat dokazan visok titer protiteles izotipa IgG ali IgM v serumu ali plazmi.

Poleg naštetih diagnostičnih meril so pri APS lahko prisotni tudi drugi klinični in laboratorijski znaki. Pogosto so povišana (včasih tudi edina) protitelesa proti protrombinu (aPT), ki sicer še niso vključena v klasifikacijska merila. Nekateri bolniki imajo jasno izražene klinične znake bolezni, vendar pri njih ni zaznati laboratorijskih označevalcev te bolezni. Tem bolnikom tako ni mogoče potrditi diagnoze, kar je ena od pomanjkljivosti trenutno veljavnih klasifikacijskih meril. Druga težava pa je, da metode za določanje aPL niso standardizirane, zato prihaja do med-laboratorijskih razlik. Interpretacija postane še bolj problematična ob dejstvu, da so aPL lahko nepatološko povišana tudi v času infekcij ali jemanju določenih zdravil (1).

Skupine znanstvenikov razvijajo nove metode določanja aPT (3; 4; 5), saj so močno povezana z APS, kar so potrdili že v Sydneyju, vendar so jih takrat označili za nespecifična za postavljanje diagnoze (2). Leta 2010 so se sprožile nove pobude za razširitev kriterijev (6). Predlagali so tudi matematični izračun ocene tveganja za pojav tromboze-GAPSS (angl. *global antiphospholipid score*), ki bi boljše ovrednotil bolnika v primerjavi z merili. Raziskovalci so predlagali kvantitativno oceno tveganja za tromboze, ki upošteva vrednosti LA, protiteles proti kardiolipinom, protiteles proti β 2 glikoproteinom I, aPT (izotipe imunoglobulinov razreda G (IgG) in imunoglobulinov razreda M (IgM)), splošno oceno tveganja za kardiovaskularne bolezni in avtoimunski profil. Izračun bi zdravnikom pomagal pri poteku in optimiziranju zdravljenja (1; 4).

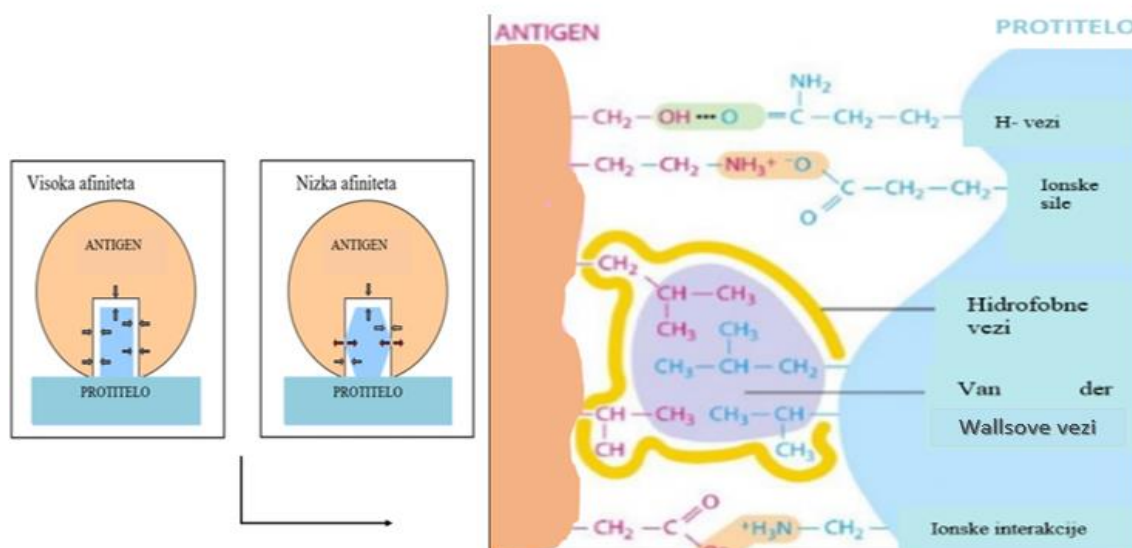
Protitelesa so lahko diagnostični in klasifikacijski označevalci bolezni, nekateri kažejo na aktivnost in napredovanje bolezni, lahko pa imajo tudi napovedno vrednost. Večina aPL sodeluje pri patogenezi sindroma (7; 8). Največkrat so usmerjena proti človeku lastnima proteinoma β -glikoproteinu I in protrombinu, ki sodelujeta pri procesu strjevanja krvi; oba antigena sta vezana na fosfolipidno površino (7; 8). Njune native kristalne strukture v kompleksu s fosfolipidom še nimamo, zato je napovedovanje mehanizma oteženo.

APS se pojavlja v dveh oblikah, in sicer ob ali pa brez pridruženih drugih sistemskih avtoimunskih bolezni. Zdravila za zdravljenje APS ni (9; 10). Lajša se z antikoagulantni in antiagregacijskimi učinkovinami, vendar kljub zdravljenju 16 % pacientov doživi tromboze, okoli 5 % pa jih umre v obdobju 5 let od diagnosticiranja bolezni. Največ smrti v prvih petih letih bolezni je posledica infekcij, srčnih infarktov, kapi in možganskih strdkov (11).

1.2. Interakcije protiteles in antigenov

Do interakcije med protitelesi in antigeni pride na biomolekulskih stičiščih, kjer nastajajo molekulske interakcije med aminokislinskimi preostanki antigena (epitop) z aminokislinskimi preostanki hipervariabilne regije protitelesa (paratop). Za specifičnost vezave epitopa in paratopa je pomembno tako aminokislinsko zaporedje, kakor ogrodni deli stične regije. Medtem ko so makromolekule antigena večinoma veliko večje od paratopa, epitop protitelesa meri le nekaj aminokislinskih ostankov. Protitelo se posledično ne more vezati na celoten antigen, lahko pa se zgodi, da se veže na več mestih. Glede na razporeditev aminokislinskih ostankov epitope razdelimo na linearne in konformacijske (12). Linearni epitopi so sestavljeni iz primarnega zaporedja aminokislin, konformacijske epitope pa tvorijo aminokisliline, ki se združijo šele, ko protein zavzame prostorsko strukturo (13).

Pri interakcijah epitop-paratop sodelujejo številne šibke vezi: Van der Waalsove, hidrofobne in vodikove vezi ter ionske interakcije. Medtem ko ionske interakcije in vodikove vezi vzpostavljajo interakcije antigen-protitelo na dolge razdalje, Van der Waalsove in hidrofobne interagirajo na kratkih razdaljah, predpogoj pa je komplementarnost površin (**slika 1**). Iskanje stičnih regij in vrednotenje interakcij nam omogoča vpogled v patogenezo bolezni, lahko pa nam tudi pomaga pri razvoju novih inhibitorjev patoloških protiteles (13).



Slika 1: Levo je prikaz pomembnosti prileganje epitopa in paratopa za afiniteto vezave posamičnega protitelesa z antigenom, desno pa vezi, ki sodelujejo pri interakcijah epitop-paratop. Prirejeno po (14; 15).

1.3. Protitelesa proti protrombinu in njihova detekcija

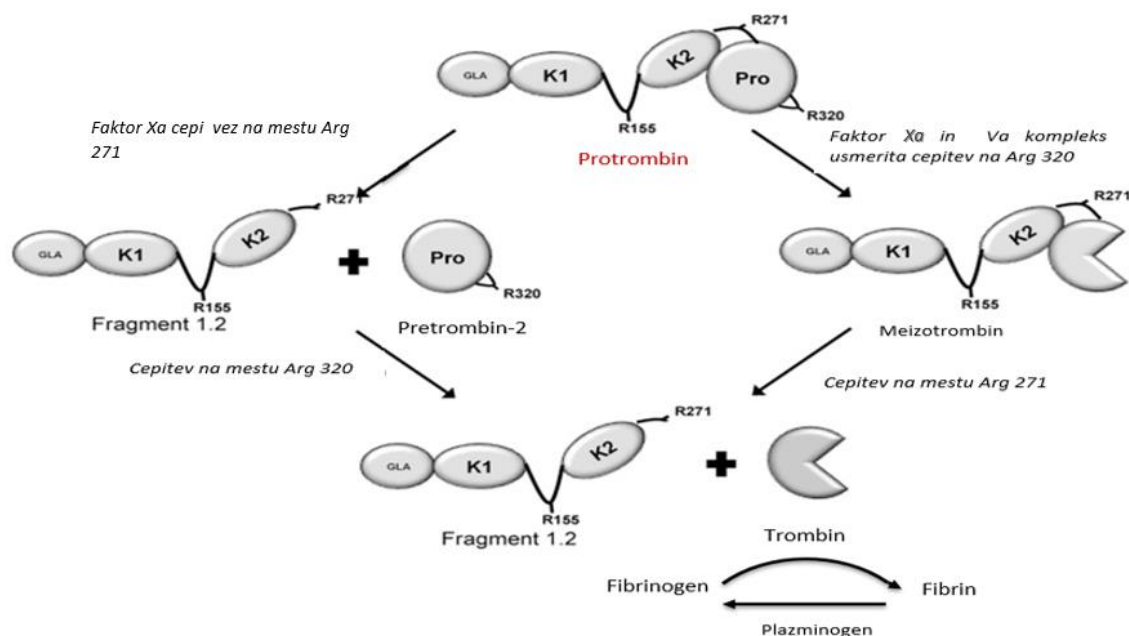
aPL so heterogena skupina imunoglobulinov, ki krožijo po krvi in serumu, njihove povišane vrednosti pa so povezane s kliničnimi znaki APS. Dokazali so, da aPT, podskupina aPL, aktivno prispevajo k razvoju bolezni, imajo veliko aktivnost LA, in so močno povezana s trombozami (1).

Med razvojem in optimizacijo metod za detekcijo aPT so ugotovili, da je ob izvedbi encimsko imunskega testa na trdnem nosilcu (ELISA) pomembna predstavitev antigena na trdni površini. Pomembno je, da je protrombin vezan na podlago, saj ga le na ta način aPT prepoznajo (16). Pri testih ELISA so najprej prepoznavno obliko protrombina zagotovili z uporabo γ - obsevanih ali polivinil kloridnih (PVC) plošč. Naslednji korak je bila imobilizacija protrombina na molekule fosfatidilserina. To omeji gibanje molekul protrombina v lateralni smeri, ga nakopiči in pravilno usmeri. Dodatek Ca^{2+} omogoči, da se na fosfatidilserin ujamejo tudi kompleksi protrombin-aPT. Raziskovalci so razvili dva testa ELISA za določanje aPT: test aPT ELISA, ki ima protrombin vezan na γ - obsevanih ali pa PVC ploščah in test ELISA, pri katerem je protrombin vezan na plošče preko fosfatidilserina. V slednjem testu se določajo od fosfatidilserina odvisna aPT (aPS/PT). Testa določata epitopsko vsaj deloma različna protitelesa. Oboja so odgovorna za aktivnost LA, aPS/PT nekoliko bolj (17; 18). Raziskovalci so ob uporabi različnih izvedb testov ELISA pridobivali raznolike rezultate. Akimoto in sodelavci so ugotovili, da prihaja do med-laboratorijskih razlik zaradi uporabe različnih nosilcev, količine in vrste dodanega detergenta ter pufra (19). Več raziskovalcev zgoraj omenjenih testov je potrdilo, da posamezne izvedbe ELISA ne zaznajo hkrati aPT in aPS/PT. Posledično pri nekaterih bolnikih, ki kažejo klinične znake APS, le-ta ni potrjen zaradi odsotnosti laboratorijskih označevalcev, saj je njihovo določanje pomanjkljivo (2). V laboratoriju za imunologijo revmatizma, UKC Ljubljana, so Žigon in sodelavci razvili modificiran test aPS/PT ELISA. Ta ima večjo analitsko občutljivostjo in omogoča zaznavo tudi nizko avidnih protiteles. Uporabnejši je za rutinsko testiranje. Med bolniki s kliničnimi znaki APS, ki so jih testirali z modificiranim testom aPS/PT ELISA in so imeli pozitiven rezultat, je bilo 4 % takih, ki so bili negativni na vsa ostala aPL (1; 5).

1.4. Protrombin

PT, tudi faktor II, je v krvni plazmi prisoten, od vitamina K odvisen, eno verižni glikoprotein. Sestavljen je iz treh delov: domene Gla (ostanki 1-46); dveh domen »kringle«

(domene »kringle«-1 (K1); (ostanki 65-143) in domene »kringle«-2 (K2); (ostanki 170-248)), ter katalitične domene serinske proteaze (ostanki 285-579). Domena Gla in K1 skupaj tvorita fragment-1, K2 z nekaj aminokislinskimi ostanki tvori fragment-1, domena serinske proteaze pa je sestavljena iz verige A in B. Sinteza protrombina poteka v jetrnih hepatocitih, kjer poteče tudi sekundarna modifikacija. Ob sprostitvi v krvni obtok je velik 579 aminokislin in 72 000 Da. Plazemska koncentracija je 100 mg/L razpolovna doba pa 2-4 dni. Sekundarna modifikacija poteka na domeni Gla, kjer vitamin K omogoči karboksilacijo glutaminskih kislin v γ -glutamatne ostanke. Hidrofilnost in naboj, ki ju molekula pridobi po modifikaciji, zagotovita okolje, ki je bistveno za vezavo fosfolipida na protrombin. Po vezavi se s posredovanjem protrombinaznega kompleksa (aktiviran faktor X, faktor V, kalcij in PL) le ta pretvori v biološko aktiven trombin. Pretvorba poteka s cepitvijo vezi na dveh mestih: Arg 271 in Arg 320. Poteka lahko preko dveh različnih intermediatov. Na površini trombocitov se aktivira pretvorba preko neaktivnega prekursorja pretrombina-2, na netrombocitni površini ali sintetičnih fosfolipidih pa preko aktivnega intermediata meizotrombina (1; 3; 20). Trombin kot encim aktivira številne biološke molekule. S cepitvijo fibrinogena (faktor I) v netopni fibrin (faktor Ia) omogoči nastanek fibrinskega čepa bistvenega za zaustavitev krvavitve (slika 2).



Slika 2: Pretvorba protrombina v trombin v fizioloških pogojih. Protrombin je sestavljen iz treh domen: domene Gla (ostanki 1-65); domene »kringle«, ki se deli na dva dela (»kringle«-1 (K1); ostanki 66-144 in »kringle«-2 (K2); ostanki 170-248) ter katalitične domene serinske proteaze (ostanki 272-579). Prirejeno po (21).

Epitopi protrombina, kamor se protitelesa vežejo, še niso popolnoma znani. Znanstveniki so raziskovali vezavo protiteles tako na protrombin kot na domene protrombina, da bi lažje določili epitop. Rao s sodelavci je dokazal, da se iz seruma bolnikov izolirana protitelesa IgG vežejo na protrombin, ter protrombin-1 in fragment-1, medtem ko se na imobiliziran trombin ne vežejo (18). Akimoto je potrdil rezultate (22). Največ protiteles je prepoznalo fragment-1 (62 %) in protrombin (38 %), medtem ko vezave na trombin ni bilo. Če povzamemo raziskave, je populacija protiteles izredno heterogena, vsa pa naj bi se vezala na protrombin v bližini vezavnega mesta za fosfolipid, ki se nahaja na eni od domen »kringle« (1; 18; 22). Protitelesa naj bi na ta način aktivirala tudi encim plazminogen, ki razgrajuje fibrin (23; 24). Kje se epitopi nahajajo, so raziskovali tudi z metodo epitopskega mapiranja (tudi kartiranja) z bakteriofagnimi predstavitvenimi knjižnicami. Predvideli so obstoj dveh različnih epitopov, oba pa se naj bi se nahajala na K2 protrombina (25).

Hwang in sodelavci v raziskavah poročajo, da najverjetneje obstaja več epitopov, ki so hkrati skupni protrombinu, trombinu in β -glikoproteinu I (26). Ugotovili so, da delež aPT pozitivnih serumskih vzorcev, vsebuje tudi protitelesa proti trombinu. Kot že omenjeno, trombin s svojim encimskim delovanjem omogoča pretvorbo fibrina v fibrinogen in omogoča povratno zvezo kaskadne reakcije z aktivacijo faktorjev V in VIII, ki povečujeta pretvorbo protrombina v trombin. Trombin v telesu regulira tudi antitrombin, ki zavira njegovo inaktivacijo. Pri nekaterih pacientih so opazili poleg povišane vrednosti aPT tudi povišane vrednosti antitrombina in predvideli, da se protitelesa vežejo na isti epitop kakor antitrombin in z vezavo zavirajo povratno zvezo regulacije trombina. Pri inhibiciji vezave protiteles na protrombin je bil dodatek raztopine trombina bolj učinkovit kakor dodatek raztopine protrombina (26).

1.5. Teorija dveh sprožilcev in imunološke lastnosti aPL

Protitelesa so pri pacientih z APS stalno povišana, medtem ko se tromboze in ostali zapleti pojavljajo le občasno. Iz tega se je razvila teorija dveh sprožilcev bolezni. Primarni sprožilec so aPL, vendar se brez sekundarnega dražljaja trombofilno stanje ne razvije (13). Žigon povzema znanstvena mnenja, da so protitelesa dveh vrst: funkcionalna, ki povzročajo aktivnost LA in nefunkcionalna, ki ne prispevajo k aktivnosti LA (1). Razlikovala naj bi se v epitopski specifičnosti. Funkcionalna protitelesa - primarni sprožilec, naj bi bila od fosfatidilserina odvisna aPT. Fosfatidilserin je anionski fosfolipid in je eden od 4 fosfolipidov celične membrane, ki se nahaja na notranji strani

citoplazemske stene, kjer ni dostopen antigenu niti protitelesom. Pri poškodbi, aktivaciji ali apoptozi celice pride do njegove aktivacije na zunanji steni celice. Aktivacijo bi lahko povzročil sekundarni dražljaj: vnetje ali nefunkcionalna protitelesa. Protrombin se nato veže na izpostavljen fosfatidilserin, ki deluje kot katalitična površina faktorjev strjevanja krvi in spremeni konformacijo tako, da pridejo na površje neoepitopi in omogočijo prej omenjeno vezavo od fosfatidilserina odvisnih aPT (27). Vezava protrombin-fosfatidilserin povzroči bodisi konformacijsko spremembo, bodisi kovalentno vezavo več molekul protrombina (1; 28; 29).

1.6. Patogeneza protiteles proti protrombinu

In vivo in *in vitro* živalske študije so pokazale, da razvoj APS poteka po različnih mehanizmi. Splošno so mehanizmi patogeneze primarnih sprožilcev deljeni na tri področja delovanja: celične komponente ožilja (monociti, trombociti in endotelijske celice), na vnetne faktorje in humoralne komponente reguliranja hemostaze (faktorji strjevanja krvi, naravni antikoagulanti in fibrinolitični sistem) (1).

- *Vpliv na endotelijske celice, trombocite in monocite:*

aPT, ki prepoznavajo kompleks antigena v plazmi ali na celični površini izpostavljeni plazmi, preko njega sprožijo prokoagulacijo. Endotelijske celice aktivirajo signalno pot, izločajo tkivni faktor, adhezijske molekule in intelevkine. Pri vezavi na trombocite naj bi aPT povzročili trombocitopenijo, vendar obstajajo tudi bolj specifična protitelesa proti glikoproteinom na trombocitih (1).

- *Aktiviranje imunskega odziva:*

Povezanost tromboz s sistemom komplementa so dokazali *in vivo*. Mišim so izbili gene za komponente komplementa C3 in C5 in jim dodajali aPT. Prihajalo je do manjših strdkov v primerjavi s pozitivno kontrolo. To je posledica tega, da aktivacija komplementa sproži ekspresijo tkivnega faktorja na nevtrofilcih, kar spremeni čas strjevanja krvi (1). Kasneje so odkrili, da je pri pacientih, ki imajo primarno obolenje APS, vloga komplementa bolj pomembna za razvoj APS, kakor pri bolnikih kjer APS spremljajo ostale bolezni.

- *Motnja hemostaze:*

V proces strjevanja krvi se aPT vpletajo na različnih nivojih. Povečevala naj bi afiniteto protrombina za negativno nabite fosfolipide in na tak način tekmovala s faktorji strjevanja krvi za vezavo na dostopno katalitično površino fosfolipida (1). Vezala naj bi se tudi na

faktorje, ki sodelujejo pri strjevanju krvi in tako preprečujejo njihovo inaktivacijo s strani naravnih antikoagulantov. Poleg naštetega inhibirajo antikoagulate, ki bi ob aktivnosti vzpostavljali hemostazo. Rezultat je povečana tvorba netopnega fibrina. Poleg povečanja fibrogeneze pa aPT vplivajo tudi na razgradnjo fibrina-fibrinolizo, saj se vežejo na tkivni aktivator encima plazminogena in plazmin (20; 24). Različne možne učinke in mehanizme so znanstveniki objasnili z obstojem dveh vrst protiteles. Epitopska specifičnost protiteles se razlikuje (1).

Kateri mehanizem prevladuje in v največji meri vpliva na razvoj bolezni ter klinične znake, ki se pojavljajo, je odvisno od antigenske specifičnosti patoloških protiteles in je med posamezniki različno (10). Izid APS, kjer so klinični znaki predvsem tromboze, so rezultat več različnih patogenih poti: formacije strdkov, inhibicije naravnih antikoagulativnih mehanizmov in poslabšanja fibrinolize (7).

1.7. Metode epitopskega mapiranja

Protitelesa in antigeni imajo na svoji površini strukturno definirane regije, ki so namenjene vezavi. Za ugotavljanje vezavnih mest in lastnosti epitopa uporabljamo različne metode epitopskega mapiranja (30).

- *Rentgenska kristalografija*

Za določanje epitopa z rentgensko kristalografijo je potrebna tvorba kokristala antigen-protitelo, ki ga nato obsevamo z rentgenskimi žarki. Žarki se skozi kristal uklanjajo in tvorijo difrakcijski vzorec. Z meritvijo intenzitete in položaja lis določamo dimenzije celice, nato pa preko programov računamo karto elektronske gostote. Iz rezultatov sklepamo, kje se nahajajo posamezni atomi. Metoda je zanesljiva, a zahtevna (31).

- *Jedrna magnetna resonančna spektroskopija (NMR)*

NMR je spektroskopska metoda, ki temelji na magnetni interakciji atomskega jedra z elektromagneti. Informacija, ki jo pridobimo z NMR, je bolj detajlna kakor pri večini metod. Metoda je hitrejša od rentgenske kristalografije, je pa za delo potreben kompleks v raztopini. Omejitev metode je velikost molekul in priprava kompleksa v raztopini, omogoča pa določevanje linearnih in konformacijskih epitopov (32).

- *Alaninsko skeniranje*

Alaninsko skeniranje, tudi mestno-specifična mutageneza, je metoda, kjer z zamenjavo obstoječe aminokislina antigena z alifatsko aminokislino preverjamo pomembnost posamičnih aminokislin za vezavo peptida. Največkrat aminokislina zamenjamo za alanin, ker ima zgolj metilno funkcionalno skupino, je majhen, nima naboja, in zato ne vpliva na sekundarno strukturo proteina. Z nadaljnjim testiranjem preverimo, kako se mutiran antigen veže na protitelo. Če pride do spremembe afinitete, je aminokislina pomembna za vezavo (33; 34).

- *Knjižnice sinteznih peptidov*

Knjižnice sinteznih peptidov temeljijo na kemijsko sintetiziranih peptidih na trdnem nosilcu. Ti peptidi de med seboj prekrivajo in tako pokrivajo celotno zaporedje predvidenega epitopa antigena. Z dodatnimi metodami nato preverjamo vezavne lastnosti in določimo zaporedje vezavne regije. Tehnika je draga in časovno potratna, zato večkrat uporabimo biološke knjižnice (35).

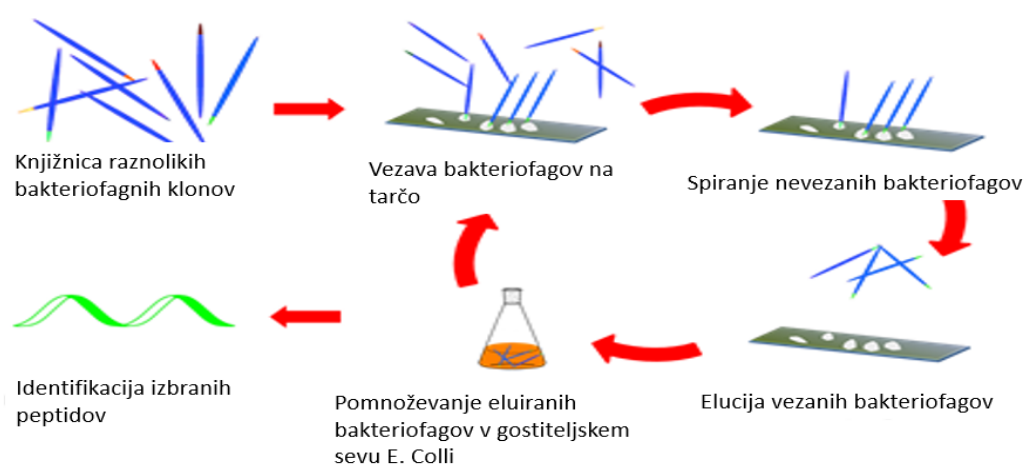
- *Biološke knjižnice peptidov (bakteriofagne predstavitvene knjižnice)*

Biološke peptidne knjižnice pogosto uporabimo za določanje epitopov, saj imajo pred prej naštetimi metodami določene prednosti. Ne zahtevajo predpriprave kompleksov ali standarda, so hitre in enostavne, ter cenovno dostopnejše kot knjižnice sinteznih peptidov. Afinitetna selekcija omogoča rešetanje peptidov in pridobitev majhne frakcije tistih, ki so specifični in prepoznavajo oziroma se vežejo na izbrano tarčo. Iz nabora vezanih peptidov lahko razberemo ponavljajoč se motiv, iz katerega sklepamo na značilnosti epitopa tarčnih protiteles.

1.7.1. Epitopsko mapiranje z bakteriofagnimi predstavitvenimi knjižnicami

Afinitetna selekcija z uporabo bakteriofagnih knjižnic poteka tako, da tarčna protitelesa posredno ali neposredno imobiliziramo na nosilec in dodamo knjižnico peptidov, izraženih na biološkem nosilcu – bakteriofagu. Po inkubaciji nevezane bakteriofage speremo, vezane pa eluiramo in pomnožimo v gostiteljskem sevu. Selekcija poteka v več selekcijskih stopnjah, med katerimi se obogatijo tisti bakteriofagni kloni, ki izražajo peptide z močno vezavo na tarčna protitelesa. Po zadnji stopnji s testom ELISA ali drugimi metodami ovrednotimo vezavo peptidov do tarče (**slika 3**). Vežalcem določimo zaporedje

aminokislin in jih nato primerjamo med sabo in prilegamo na primarno ali terciarno strukturo antigena (36; 37).



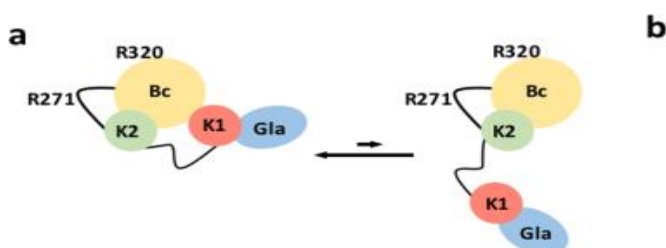
Slika 3: Prikaz afinitetne selekcije iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic. Knjižnico raznolikih bakteriofagnih klonov vežemo na tarčo, nevezane bakteriofage speremo, vezane pa eluiramo in pomnožimo v gostiteljskem sevu. Proces večkrat ponovimo (stopnje), nato pa identificiramo izbrane peptide. Prirejeno po (38).

Za pripravo knjižnic lahko uporabimo različne biološke ekspresijske sisteme: bakteriofage, bakterije, lahko tudi evkariontske celice. Bakteriofage uporabljamo najpogosteje. Posamezne vrste bakteriofagov se med seboj razlikujejo. Zgrajeni so iz nukleinskih kislin, ki so lahko eno ali dvo verižne, v linearni ali ciklični obliki, obdaja pa jih proteinski plašček. Knjižnici proizvajalca New England BioLabs, Ph.D.-L7TM in Ph.D.-12TM, sta proizvedeni tako, da so kratka oligonukleotidna zaporedja vstavljena v gen za plaščni protein pIII bakteriofaga M13 in se izrazijo na izpostavljenem N-končnem delu. Peptidi so na površino biološkega nosilca pritrjeni preko distančnika GGGS. Bakteriofagi M13 posledično na svoji površini izražajo do pet kopij istovrstnega peptida, za katerega nukleotidni zapis nosijo v genomu. Knjižnica Ph.D.-L7TM kodira približno $1,2 \times 10^9$ različnih heptapeptidov, Ph.D.-12TM pa $2,7 \times 10^9$ različnih dodekapeptidov (36).

Bakteriofagi za pomnoževanje uporabljajo replikacijske mehanizme bakterijskih celic. Bakteriofag M13 se pomnožuje v gostiteljskem sevu *E. coli* ER 2738. Z N-končnim delom kapsidnega proteina pIII se veže na F-pilus bakterije, kar omogoči vstop virusnega genskega materiala v celice. Bakteriofag M13 je lizogeni bakteriofag; pri sproščanju novih bakteriofagnih delcev iz gostiteljske celice ne povzroči propada celice (39; 40).

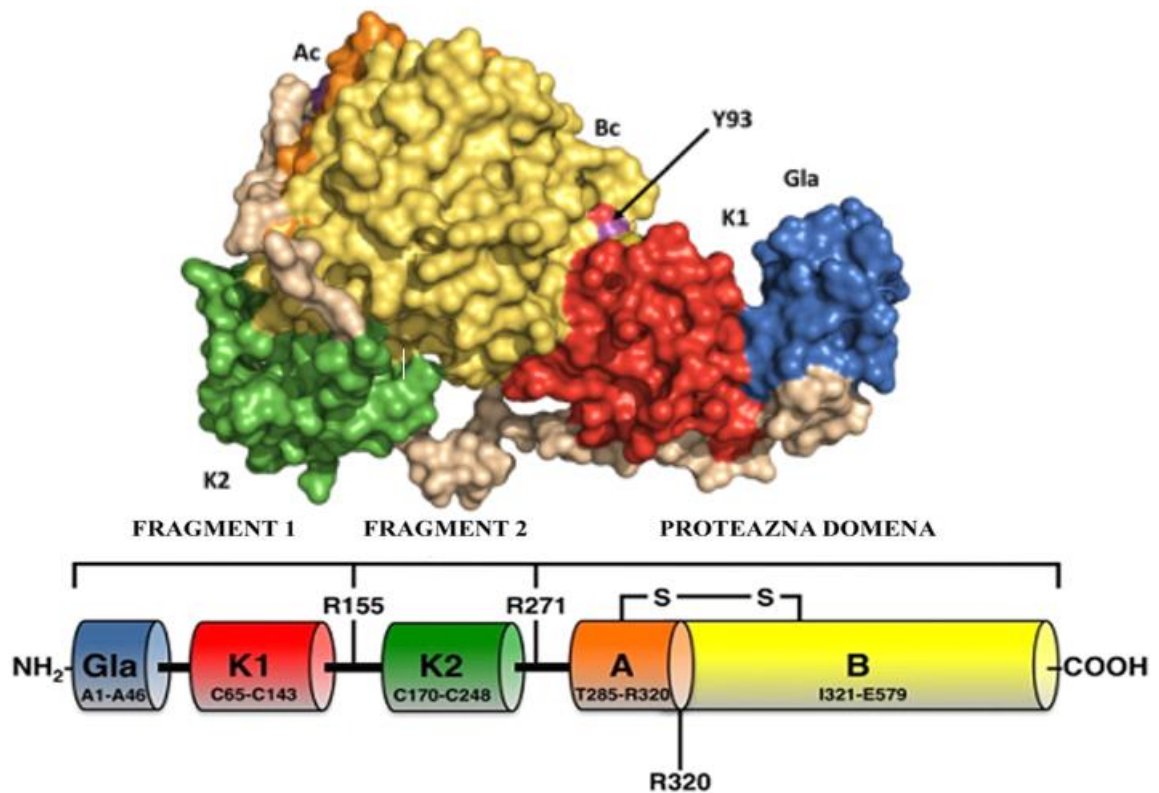
1.8. Tridimenzionalna struktura protrombina

V javni zbirki proteinskih struktur Protein Data bank (PDB) (41) je na voljo večje število eksperimentalno določenih molekulskih struktur protrombina. Struktura protrombina v kompleksu s fosfatidilserinom še ni določena. V telesu sta prisotni dve različni obliki protrombina - prosta in v kompleksu s fosfatidil serinom ali drugim protrombinom, ki je bolj zvita in izraža neoepitope, kamor naj bi se vezala aPT (**slika 4**). Kompleksnejša (zvita) oblika prevladuje (42).



Slika 4: Protrombin pri fizioloških pogojih. Modra predstavlja domeno Gla, rdeča domeno »kringle«-1 (K1) zelena domeno »kringle«-2 (K2), rumena pa predstavlja domeno serinske proteaze. Črna črta predstavlja aminokislinske ostanke med domenami. Molekula **a** ponazarja zvito konformacijo, ki jo tvori protrombin v kompleksu z fosfatidilserinom, **b** pa konformacijo prostega protrombina. V telesu prevladuje oblika **a**. Prirejeno po (42).

Zvita kristalna struktura protrombina (**6C2W**) opisuje konformacijo protrombina, ki so ga dobili s povezavo dveh molekul protrombina (**slika 5**). Kompleks so konstruirali z mutacijo S101C/A470C. (42; 43). Ocenjujejo, da je zvita oblika molekule najbolj podobna tisti, ki se pojavlja v fizioloških pogojih (42).



Slika 5: Tridimenzionalna struktura protrombina z označenimi domenami je prikazana na zgornjem delu slike. Domene so označene po ključu, prikazanem spodaj. Modra predstavlja domeno Gla, rdeča domeno »kringle«-1 (K1) (domena Gla in K1 tvorita fragment-1), zelena domeno »kringle«-2 (K2) (K2 z dodatnimi aminokislinskimi ostanki ustreza fragmentu-2), oranžna predstavlja odsek A domene serinske proteaze, rumena pa odsek B domene serinske proteaze. Bež predstavlja aminokislinske ostanke med domenami. Na spodnji sliki so označena tudi mesta cepitev, ki jih povzroči faktor Xa: Arg 155, Arg 271 in Arg 320. Prirejeno po (42).

2. Namen dela

aPT so značilna za avtoimunsko obolenje APS in so v nekaterih primerih edina aPL s povišano koncentracijo v pacientovi krvi. V nasprotju s protitelesi proti kardiolinom, protitelesi proti β 2-glikoproteinom I in LA, aPT ne predstavljajo merila za postavitev diagnoze, je pa njihovo pojavljanje pri zapletih APS tako pogosto, da bi morala imeti pomembnejšo vlogo pri diagnostiki te bolezni. Močno so vpletena tudi v mehanizem bolezni.

Namen magistrske naloge je identificirati aminokislino, ki tvorijo antigenske determinante, kamor se na protrombin vežejo aPT. Potrditi želimo rezultate predhodnega mapiranja epitopov in poiskati dodatne motive, preko katerih bi lahko sklepali o klinično pomembnih epitopih na protrombinu pri pacientih z APS in venskimi trombozami.

Cilji raziskovalnega dela:

1. Iz bakteriofagnih knjižnic Ph.D.-L7TM in Ph.D.-12TM bomo selekcionirali peptide, ki se vežejo na aPT, izolirana iz krvi bolnikov z APS in venskimi trombozami.
2. S testom ELISA bomo ovrednotili avidnost izbranih peptidov do tarčnih protiteles.
3. Izbrane peptide bomo prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina ter določili najverjetnejša epitopska mesta.

Hipoteze:

1. Peptidi, izraženi na bakteriofagih, se bodo specifično vezali na aPT.
2. Protitelesa, ki jih uporabljamo kot tarčo, so poliklonska in heterogeno avidna, zato predvidevamo, da bomo dobili peptide, ki jih bomo lahko razvrstili v več različnih skupin glede na medsebojno podobnost.
3. Predvidevamo, da bomo s pomočjo računalniških algoritmov določili najverjetnejši epitop/epitope na protrombinu, kamor se vežejo izbrana aPT.

3. Materiali in instrumenti

3.1. Materiali

3.1.1. Biološki material

Protitelesa proti protrombinu

Protitelesa so bila izolirana iz združenih serumov dvanajstih bolnikov z zgodovino venskih tromboz in morebitnimi pridruženimi zapleti z afinitetno kromatografijo. Po izolaciji na koloni z vezanim protrombinom so izolirali nabor aPT s koncentracijo 3,36 g/L (25). aPT so heterogeno avidna, kar je posledica združenih serumov različnih bolnikov.

Protrombin

Protrombin – humani, liofiliziran, najmanj 95 %; lot HP 4900L, Enzyme Research Laboratories, Swansea, ZDA. Liofilizat smo pred uporabo raztopili po navodilih proizvajalca in pridobili založno raztopino s koncentracijo 0,9 g/L.

Monoklonsko protitelo proti bakteriofagu, konjugirano s hrenovo peroksidazo

Monoklonsko protitelo proti bakteriofagu, konjugirano s hrenovo peroksidazo, lot. 9667794, GE Healthcare, Little Chalfont, ZDA

Bakteriofagne knjižnice

Ph.D.-12TM in Ph.D.-L7TM, New England BioLabs, Massachusetts, ZDA

Začetni oligonukleotid za pomnoževanje dezoksiribonukleinske kisline (DNA)

Začetni oligonukleotid – 96 gIII Sequencing Primer, 20-mer, 1 pmol/μL, lot. 231-05, New England Biolabs, Massachusetts, ZDA

Bakterije

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

Tetraciklin

Tetraciklin; najmanj 92,0 %, Sigma-Aldrich, Kitajska. Raztopino tetraciklina smo pripravili v koncentraciji 20 g/L v mešanici etanola in vode (1:1). Do uporabe smo ga shranjevali na -20 °C. Pred uporabo smo ga premešali na vibracijskem mešalu.

3.1.2. Reagenti

- 10 × koncentriran elucijski pufer: 0,1 M glicin-HCl, pH 2,7 iz analiznega kompleta MAb Trap™, GE Healthcare, Little Chalfont, ZDA
- 10 × koncentriran vezavni pufer: 20 mM natrijev fosfat v 20 % etanolu, pH 7,0 iz analiznega kompleta MAb Trap™, GE Healthcare, Little Chalfont, ZDA
- 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid (X-gal), Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
- dinatrijev hidrogen fosfat (Na₂HPO₄); 98,5 – 101,0 % analitske čistote, Sigma Aldrich, Missouri, ZDA
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat (Na₂HPO₄ × 2H₂O), Sigma Aldrich, Missouri, ZDA
- Dynabeads™ Protein A, Thermofisher Scientific, Norveška
- Dynabeads™ protein G, Novex, Life Technologies, Norveška
- EDTA (etilendiamintetraocetna kislina); najmanj 99 %, za molekularno biologijo, Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
- etanol absolutni; najmanj 99,8 % analitske čistote, Sigma Aldrich, Nemčija
- glicerol, Fluka Chemie, Švica
- goveji serumski albumin (BSA); Ph 7,0; lot. 101286, SERVA, Nemčija
- izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
- kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄); 98,0 – 100,5 %, Ph. Eur., Merck, Nemčija
- kalijev klorid (KCl); najmanj 99,0 %, za molekularno biologijo, Sigma-Aldrich, Izrael
- kalijev klorid (KCl); najmanj 99,5 % analitske čistote, Merck, Nemčija
- LB Agar, Lennox, Carl Roth, Nemčija
- LB Agar, Sigma Aldrich, Missouri, ZDA
- LB Broth. Sigma Aldrich, Missouri, ZDA
- magnezijev klorid (MgCl₂); 1,0 M standardna raztopina, Fluka Chemika, Švica
- natrijev hidroksid (NaOH), Kemika, Hrvaška
- natrijev klorid (NaCl); najmanj 99,5 %, Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
- polietilen glikol 8000 (PEG 8000), BioUltra, Sigma-Aldrich, Nemčija
- polioksietilen sorbitan monolavrat (Tween 20), Merck, Nemčija
- Reagent A in B iz kompleta za test ELISA EPO color (TMB(3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)), R&D Systems, Minnesota, ZDA

- TMB Pierce Coomassie Plus Assay Reagent 23236, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA
- tris(hidroksimetil)aminometan; najmanj 99,5 % analitske čistote, Kemika, Hrvatska
- žveplovna kislina (H_2SO_4); 95 – 97 % analitske čistote, Merck, Nemčija

3.1.3. Gojišča

Gojišča smo pripravljali v aseptičnem okolju. Sterilnost smo zagotovili bodisi s sterilizacijo z nasičeno vodno paro (avtoklaviranjem) pri pogojih 121 °C, 15 minut in 1 bar nadtlaka, bodisi s filtracijo skozi membranski filter z velikostjo por 0,22 µm.

LB gojišče

8 g LB Brotha smo raztopili v 400 mL dH₂O. Raztopino smo avtoklavirali in hranili na sobni temperaturi.

LB agar

14 g LB agarja smo raztopili v 400 mL dH₂O. Avtoklaviran LB agar smo vlili v petrijevke. Do uporabe smo petrijevke s trdnim gojiščem shranjevali v hladilniku.

Gojišče za E.coli

Pred uporabo smo na ploščo s trdnim gojiščem razmazali tetraciklin v končni koncentraciji 20 mg/L.

Diferencialno agarno gojišče X-gal/LB/IPTG

2 % X-gal v dimetilformamidu in IPTG smo uporabili za vizualizacijo z bakteriofagi okuženih bakterijskih kolonij po titraciji.-Diferencialno agarno gojišče X-gal/LB/IPTG smo pripravili sveže. Na vsako ploščo smo nanесли mešanico X-gal/LB/IPTG s končno koncentracijo 4,5 g/L X-gal in 24 mM IPTG.

Agarozni top

Reagent in količina:

-1 M MgCl₂: 197 µL (4,9 mM)

-Agarozna: 0,28 g

-LB gojišče do 40 mL

V LB gojišče smo dodali agarozo in MgCl₂, raztopili v mikrovalovni pečici in avtoklavirali. Avtoklaviran agarozni top smo hranili v zaprtih vsebnikih in ga pred uporabo raztopili v mikrovalovni pečici ter v komori z laminarnim pretokom zraka (LAF) alikvotirali po 3 mL v 14 mL centrifugirke.

3.1.4. Pufri in raztopine

Pufrana fiziološka raztopina (PBS) - (pH 7,4)

Reagent in koncentracija:

- NaCl (58,44 g/mol): 136 mM
- KCl (74,56 g/mol): 2,7 mM
- Na₂HPO₄ × 2H₂O (177,99 g/mol): 10 mM
- KH₂PO₄ (136,09 g/mol): 1,8 mM
- dH₂O do 40 mL

NaCl, KCl, Na₂HPO₄ × 2H₂O in KH₂PO₄ smo raztopili v prečiščeni vodi. S HCl smo uravnali pH na 7,4. Pri raztapljanju in umerjanju pH smo si pomagali z magnetnim mešalom. Avtoklavirano raztopino smo hranili pri sobni temperaturi.

PBS z dodatkom Tweena (PBST)

Raztopine Tweena 20 v PBS v različnih koncentracijah smo pripravljali na dan uporabe. Za pripravo 0,1% PBST smo odpipetirali 40 µL, za pripravo 0,05 % PBST pa 20µL Tweena 20 v 40 mL PBS. PBST za namen uporabe pri selekcijah smo sterilizirali s filtracijo preko filtra z velikostjo por 0,22 µm v LAF komori.

1 % BSA v PBS

Pred uporabo smo v 35 mL PBS dodali 0,35 g BSA. Raztopino smo zaradi penjenja pripravljali v prebitku.

PEG/NaCl

Reagent in količina:

- 20 % m/v PEG-8000: 8 g
- 2,5 M NaCl: 5,85 g
- ddH₂O do 40 mL

PEG 8000 in NaCl smo dodali v prečiščeno vodo in avtoklavirali. Avtoklavirano raztopino smo hranili na sobni temperaturi.

Jodidni pufer (pH 8,0)

Reagent in količina:

-Tris: 48,5 mg

-NaI: 23,98 mg

-HCl (32 %): 39 μ L

-EDTA: 80 μ L

Natehtali smo TRIS in NaI ter ju raztopili v 40 mL bidestilirane vode. Dodali smo HCl in EDTA in uravnali pH s HCl. Avtoklaviranega smo hranili na sobni temperaturi, zaščitenega pred svetlobo.

3.2. Instrumenti

Laboratorijsko opremo, ki je bila v stiku z biološkim materialom in ni bila sterilna (steklovina, mikrocentrifugirke, nastavki za pipete), smo pred uporabo avtoklavirali pri pogojih 121 °C, 15 minut in 1 bar nadtaka.

3.2.1. Oprema

analitska tehtnica AB 104, Mettler Toledo, Švica

analitska tehtnica PM 2500, Mettler Toledo, Švica

avtoklav Kambič A-21, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija

avtomatska pipeta e1200, BioHit, Finska

centrifuga IKA® mini GIKA Works, IKA, Wilmington, ZDA

5804 R (F-34-6-38), Eppendorf, Nemčija

5415 R (F-45-24-11), Eppendorf, Nemčija

centrifugirke TPP®; 15 mL 50 mL, Trasadingen, Švica

čitalnik mikrotitrskih plošče Safire, Tecan, Švica

hladilnik Gorenje, Slovenija

inkubator WTC, Binder GmbH, Nemčija

Unihood 650, UniEquip, Nemčija

konično mešalo (vortex) Vibromix 104EV, Tehtnica, Slovenija

LAF komora LFVP 12, Iskra PIO, Slovenija

magnetno mešalo Rotamix 550 MMH, Tehtnica, Slovenija

magnetno stojalo New England BioLabs, Massachusetts, ZDA

magnetni mešalnik Rotamix 550 MMH, Tehtnica, Slovenija

membranski filtri Sartorius; 0,22 µm, Nemčija

mikrovalovna pečica LG, Južna Koreja

mikrocentrifugirke SARSTEDT AG & Co; 1,5 mL, 2 mL, Nemčija

mikrotitrške plošče Maxisorp F8, Nunc-immuno module, Thermo Scientific, Danska

multikanalna pipeta M100, BioHit, Finska

nastavki za pipete s filtri Biosphere® (Filter) Tips (10 µL, 200 µL, 1000 µL),
SARSTEDT AG & Co, Nemčija

pH meter 691 Metrohm, Švica (tip: 1.691.0010)

pipete, 0,5-10 mL; 10-100 µL; 100-1000 µL; 1000-5000 µL, Eppendorf, Nemčija

precizna tehtnica Exacta 610, Tehtnica, Slovenija

spektrofotometer nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Gibraltar, ZDA

spektrofotometer Lambda Bio+, L7110186, Perkin Elmer, ZDA

spektrofotometer Epoch Microplate, BioTek Instruments, Vermont, ZDA

stresalnik 314 EVT, Vibromix, Slovenija

IKA®MS3 digital, IKA Works, Wilmington, ZDA

termoblok-stresalnik Thermomixer Comfort 1,5 mL, Eppendorf, Nemčija

zamrzovalnik Vip Series -86 °C, Sanyo Electric Biomedical Co, Japonska

Gorenje, Slovenija

4. Metode

4.1. Priprava bakterijskih kultur *E. coli* ER 2738

4.1.1. Inokulacija bakterij na trdno gojišče

Na petrijevko s trdnim gojiščem LB smo ob plamenu s spatulo po Drigalskem razmazali 200 μ L raztopine tetraciklina v mediju LB, tako da je bila koncentracija antibiotika na trdnem gojišču 20 mL/L. Pustili smo, da se vpije, nato pa s sterilno zanko postrgali trajno kulturo seva *E. coli* ER 2738 (hranjen na -80 °C) in ga razmazali po petrijevki s trdnim gojiščem. Plošče smo zatesnili s parafilmom in inkubirali preko noči na 37 °C, da so zrastle kolonije, ki smo jih nato uporabljali do 14 dni. V vmesnem času smo jih hranili v hladilniku. Posamične kolonije smo uporabljali za inokulacijo prekonočne kulture, kulture za pomnoževanje bakteriofagov in kulture za mikrobiološko titracijo.

4.1.2. Inokulacija bakterij v tekoče gojišče

Prekonočna kultura: V sterilno erlenmajerico z utori smo dali 10 mL gojišča LB in 10 μ L tetraciklina (končna koncentracija 20 mg/L). S sterilno zanko smo prenesli eno kolonijo *E. coli* ER 2738. Ob stresanju na 250 obratov/minuto (obr./min) smo inkubirali na 37 °C preko noči. 100-krat redčeno prekonočno bakterijsko kulturo smo naslednji dan uporabili za pomnoževanje posamičnih klonov ali vzorcev.

Kultura za pomnoževanje: V sterilno erlenmajerico z utori smo dali 10 mL medija LB in s sterilno zanko prenesli eno kolonijo. Pomnoževali smo na 37 °C, pri 250 obr./min, dokler ni bila vrednost OD₆₀₀ (optična gostota pri 600 nm) približno 0,5. Kulturo smo uporabljali za pomnoževanje eluiranih bakteriofagov po vsaki stopnji afinitetne selekcije.

Kultura za mikrobiološko titracijo: V sterilno stekleno vialo s pokrovčkom smo dali 5 mL gojišča LB in s sterilno zanko prenesli eno kolonijo *E. coli* ER 2738. Pomnoževali smo na 37 °C, pri 250 obr./min, dokler ni bila vrednost OD₆₀₀ približno 0,1. Kulturo smo uporabljali za mikrobiološko titracijo eluiranih nepomnoženih in pomnoženih bakteriofagov po vsaki stopnji afinitetne selekcije.

4.2. Mikrobiološka titracija

Z mikrobiološko titracijo smo določili število plakotvornih enot (pfu) bakteriofagov v eluatu, ki smo ga pridobili po vsaki selekcijski stopnji in po pomnoževanju in čiščenju eluata za naslednjo stopnjo afinitetne selekcije. V mediju LB smo pripravili redčitveno

vrsto. Za nepomnoženi eluat smo pripravljali redčitve 10^2 , 10^3 , 10^4 , za pomnoženega pa 10^8 , 10^9 , 10^{10} in 10^{11} . Po 10 μL vsake redčitve smo združili z 200 μL **kulture za mikrobiološko titracijo**. Deset minut smo počakali, da so bakteriofagi inficirali bakterije, nato pa bakterijsko suspenzijo z bakteriofagi, ob gorilniku, dodali k 3 mL staljene agaroze s temperaturo 50 °C. To smo pred uporabo močno segreti in nato termostatirali na termobloku na 50 °C. Mešanico agaroze in bakteriofagov smo dobro premešali na vibracijskem stresalniku in ob gorilniku ulili na plošče z diferencialnim trdnim gojiščem z dodano mešanico X-gal/LB/IPTG.

Trdna gojišča smo inkubirali 12-18 h na temperaturi 37 °C, prešteli pfu in preračunali koncentracijo bakteriofagov oziroma titer (pfu/mL) (*enačba 1*), ki smo ga dobili po pomnoževanju in čiščenju in je predstavljal vhodni material za naslednjo stopnjo afinitetne selekcije. Izračunali smo delež bakteriofagov, ki smo jih uspeli eluirati s tarčnih protiteles glede na vhodno količino bakteriofagov po posamezni stopnji afinitetne selekcije (*enačba 2*) in celokupno število eluiranih bakteriofagov (*enačba 3*).

Enačba 1: Enačba za izračun koncentracije bakteriofagov.

$$\text{koncentracija bakteriofagov } \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{število modrih plakov} \times \text{faktor redčitve}}{\text{volumen redčitve}}$$

Enačba 2: Enačba za zračun deleža elucije.

$$\begin{aligned} &\text{Delež eluiranih bakteriofagov (\% elucije)} \\ &= \frac{\text{količina eluiranih bakteriofagov}}{\text{vhodna količina bakteriofagov}} \times 100 \end{aligned}$$

Enačba 3: Enačba za izračun števila eluiranih bakteriofagov. 200 μL je končni volumen eluiranih bakteriofagov.

$$\text{število eluiranih bakteriofagov} = \frac{\text{število modrih plakov} \times \text{faktor redčitev} \times 200 \mu\text{L}}{\text{volumen redčitve}}$$

4.3. Selekcija bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-L7TM in Ph.D.-12TM

Za tarčo pri selekcijah smo uporabljali nabor aPT, s koncentracijo 3,36 g/L. Selekcije smo izvajali z bakteriofagnima knjižnicama, kjer so na površini virusnih delcev predstavljeni naključni linearni hepta- in dodekapeptidi (Ph.D.-L7TM, Ph.D.-12TM). Pri vsaki selekciji smo izvedli tri stopnje. Delali smo v aseptični komori, pri tem pa uporabljali sterilni pribor in pipetne nastavke s filtri. Tako smo preprečili, da bi v vzorce zanesli nečistote iz zraka, predvsem bakteriofage divjega tipa, ki bi uspeli okužiti istega bakterijskega gostitelja. V prvi stopnji afinitetne selekcije smo na tarčo dodali alikvot, ki je vseboval 10¹¹ bakteriofagov iz osnovne Ph.D.-L7TM ali Ph.D.-12TM knjižnice. V drugi in tretji stopnji smo na tarčo dodali v predhodni stopnji obogateno in pomnoženo knjižnico z enako količino bakteriofagov. Potreben volumen bakteriofagne suspenzije smo preračunali in pripravili titracije pomnoženega in očiščenega eluata. V 2. in 3. stopnji afinitetne selekcije smo dodali še t. i **substraktivni korak**, s katerim smo odstranili bakteriofage, ki se vežejo na sestavine ozadja (površino mikrocentrifugirk, na protein G ali A ali pa na paramagnetne delce). V zadnji, tretji stopnji bakteriofagov, ki smo jih pridobili po eluciji, nismo pomnoževali, saj jih za nadaljnje stopnje selekcije nismo potrebovali.

Korak 1: Priprava knjižnice

- **1. stopnja:** Pripravili smo bakteriofagno knjižnico. Izhajali smo iz originalne bakteriofagne knjižnice, ki ima koncentracijo 10¹⁰ pfu/μL. 10 μL knjižnice smo odpipetirali v 250 μL 0,05 % PBST (10¹¹ pfu / 250 μL 0,05 % PBST).
- **2. in 3. stopnja:** Iz pomnožene in prečiščene knjižnice, ki smo jo v predhodni selekcijski stopnji obogatili smo pripravili suspenzijo bakteriofagov z 10¹¹ pfu/ 250 μL 0,05 % PBST.

SUBSTRAKTIVNI KORAK: V mikrocentrifugirko smo napipetirali 100 μL 0,05 % PBST in dodali 7,5 μL spranih paramagnetnih delcev z vezanim proteinom A ali G. Dvakrat smo sprali s 100 μL 0,05 % PBST, nato pa inkubirali paramagnetne delce skupaj s predpripravljeno knjižnico 1 h, na sobni T, pri 600 obr./min. Bakteriofagi z afiniteto do ozadja so se vezali, ostale pa smo odstranili s supernatantom in jih uporabili pri 2. in 3. stopnji afinitetne selekcije (korak 4).

Korak 2: Spiranje paramagnetnih delcev

Za selekcijo smo izmenično uporabljali paramagnetne delce z vezanim proteinom A ali G. Delce smo pred uporabo sprali. V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 100 μ L sterilnega 0,05 % PBST in dodali 15 μ L paramagnetnih delcev. Trikrat smo spirali s po 100 μ L sterilnega 0,05 % PBST. Medtem smo suspenzijo rahlo premešali na vibracijskem mešalu in kratko centrifugirali (15 s). Supernatant smo od paramagnetnih delcev ločili in odstranili s pomočjo magnetnega stojala. Zagotovili smo, da se delci niso popolnoma posušili. Ko smo supernatant odstranili, smo ga hitro nadomestili z novim pufrom.

Korak 3: Imobilizacija tarčnih protiteles

Po zadnjem izpiranju smo paramagnetnim delcem dodali 250 μ L suspenzije aPT v 0,05 % PBST s koncentracijo 0,027 g/L. Suspenzijo smo premešali in kratko centrifugirali. Med 30 min inkubacijo na 25 °C, pri 600 obr./min smo zagotovili, da aPT zasedejo vsa vezavna mesta paramagnetnih delcev. Vsakih 10 minut smo z zmešanjem preprečili posedanje delcev in zagotovili optimalne pogoje za vezavo. Po inkubaciji smo odstranili supernatant, v katerem je bil presežek nevezanih protiteles in 3-krat sprali s 500 μ L 0,05 % PBST. Med spiranji smo po 1 min inkubirali na termobloku pri 25 °C in stresali pri 600 obr./min.

Korak 4: Inkubacija s bakteriofagno knjižnico

Paramagnetnim delcem, na katere so se vezala aPT smo dodali 250 μ L predpripravljene bakteriofagne knjižnice (korak 1) in inkubirali 1 h, na 25 °C, pri 600 obr./min, da smo omogočili interakcijo med peptidi, izraženimi na bakteriofagih in tarčnimi aPT. Z mešanjem vsakih 20 min smo preprečili posedanje delcev. Nato smo nevezane bakteriofage 10-krat sprali s 475 μ L 0,1 % PBST. Med spiranji smo mikrocentrifugirko inkubirali na termobloku 1 min, na 25 °C, pri 600 obr./min.

Korak 5: Elucija

Pri selekciji iz knjižnice Ph.D.-L7TM in 4. stopnji selekcije iz knjižnice Ph.D.-12TM, kjer smo nadaljevali delo iz predhodne magistrske naloge (25), smo uporabljali specifično (z raztopino protrombina) in nespecifično (z nizkim pH) elucijo bakteriofagov, pri ponovitvi selekcije iz knjižnice Ph.D.-12TM pa zgolj specifično.

- **Specifična elucija** je potekala z dodatkom raztopine protrombina. Odstranili smo supernatant in dodali 200 μ L raztopine protrombina s končno koncentracijo 0,1 mg/mL. (22,2 μ L založne raztopine s koncentracijo 0,9 g/L smo dodali v

177,8 μL 0,05 % PBST). Inkubirali smo 45 min, na 25 °C, pri 600 obr./min. Po inkubaciji smo ločili eluirane bakteriofage v supernatantu od paramagnetnih delcev in jih prenesli v novo mikrocentrifugirko.

- **Nespecifična elucija** je potekala s spremembo pH. Po zadnjem spiranju nevezanih bakteriofagov smo paramagnetnim delcem z aPT in vezanimi bakteriofagi dodali 200 μL elucijskega pufra (Gly-HCl, pH 2,7), premešali in inkubirali pri sobni temperaturi na termobloku s 600 obr./min od 9 do 10 min. S pomočjo magnetnega stojala smo ločili supernatant z eluiranimi bakteriofagi od paramagnetnih delcev. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 10,5 μL pufra za nevtralizacijo ter dobro premešali.

Korak 6: Določanje koncentracije bakteriofagov v eluatu

Z mikrobiološko titracijo smo določili število bakteriofagov, ki smo jih v posamezni stopnji eluirali iz tarčnih protiteles. V mediju LB smo pripravili redčitveno vrsto. Na isti način smo določali število bakteriofagov po pomnoževanju in čiščenju, s tem da so bile redčitve večje.

Korak 7: Pomnoževanje in obarjanje pomnoženih bakteriofagov

Bakteriofage, ki smo jih eluirali, smo dodali v **kulturo za pomnoževanje**. Po 4,5 h pomnoževanja smo vsebino prelili v 50 mL centrifugirke in centrifugirali 10 min, na 4 °C in 10 000 obr./min. Supernatant smo prelili v nove centrifugirke in postopek ponovili. Na dnu so se posedle bakterije. V supernatantu so ostali bakteriofagi. Supernatant smo ponovno prelili v nove centrifugirke in oborili bakteriofage z dodatkom 1/6 volumna raztopine PEG/NaCl. Obarjanje je potekalo preko noči v hladilniku.

Naslednji dan smo vzorec centrifugirali 15 min pri 4 °C in 11 000 obr./min in dobro, tudi s pomočjo pipete odstranili supernatant. Bakteriofage, ki so se oborili, smo resuspendirali v 1 mL 0,1 % PBST, prenesli v mikrocentrifugirke in centrifugirali 5 min na 4 °C in 10 000 obr./min. Usedlino, netopne nečistote, smo ločili od supernatanta s pomnoženimi bakteriofagi. Vzorec smo ponovno obarjali s dodatkom 1/6 volumna raztopine PEG/NaCl, 1 h na ledu, nato pa centrifugirali 10 min na 4 °C, pri 14 000 obr./min. Odstranili smo supernatant in oborjeno usedlino resuspendirali v 200 μL PBS. Pet mikrolitrov smo uporabili za pripravo redčitvene vrste za določanje koncentracije bakteriofagov, preostanek pa shranili do naslednje stopnje selekcije.

4.4. Selekcija bakteriofagov iz predhodno obogatene knjižnice

Ph.D.-12™

Poleg treh afinitetnih selekcij, ki smo jih izvedli v celoti, smo nadaljevali tudi afinitetno selekcijo iz predhodnih raziskav (25), tako da smo dodatno naredili še 4. stopnjo selekcije iz predhodno obogatene knjižnice dodekapeptidov. Na tarčna aPT smo ločeno nanesti dodekapeptidni knjižnici Ph.D.-12™, obogateni v treh predhodnih stopnjah z nespecifično oziroma specifično elucijo (25). Obogateni knjižnici smo pomnožili in določili število bakteriofagov v njih. V četrti selekcijski stopnji smo na tarčo nanesti 10^{11} bakteriofagov. Izvajali smo specifično in nespecifično elucijo po zgoraj opisanih protokolih. Bakteriofage, ki smo jih eluirali iz tarče, smo po postopku mikrobiološke titracije ločili na trdnem gojišču.

4.5. Izolacija in pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov

Po titraciji eluata po 3. stopnji selekcije (oziroma 4. stopnji pri selekciji bakteriofagov iz predhodno obogatene knjižnice dodekapeptidov) smo s petrijevki, kjer je zraslo okoli 100 kolonij, pobirali naključno izbrane bakteriofagne klone. Pobirali smo jih s pomočjo sterilnih pipetnih nastavkov. Pobrli smo tiste, ki so bili dobro ločeni od ostalih. Pri posamičnih selekcijah smo pobrali od 20 do 88 bakteriofagnih klonov.

Prekonočno kulturo *E. coli* smo 100-krat redčili in alikvotirali po 2 mL v sterilne falkonke. V vsako faklonko smo prenesli po en moder plak, označili in pomnoževali 4,5 h pri 37 °C ob stresanju. Vsebino smo nato prelili v 2 mL centrifugirke in jih 10 min centrifugirali na temperaturi 4 °C, na 14 000 obr./min, da smo odstanili bakterije. Supernatant smo prelili v sveže mikrocentrifugirke, ponovili centrifugiranje, ponovno prenesli supernatant v nove mikrocentrifugirke in shranili v hladilniku.

4.6. Spektrofotometrično določanje koncentracije bakteriofagov

Iz medija LB smo bakteriofage oborili in prestavili v PBS. V 1400 µL vzorca v mediju LB smo dodali po 300 µL PEG/NaCl, premešali in obarjali preko noči. Po 10 min centrifugiranju na 4 °C, pri 14 000 obr./min smo dobro odstranili supernatant, oborjene bakteriofage pa resuspendirali v 200 µL PBS. Za določanje absorbance smo uporabili spektrofotometer NanoDrop™ 1000. Vrednost absorbanc smo merili pri dveh valovnih dolžinah, in sicer pri 268 nm, ki je absorpcijski maksimum bakteriofagov, in pri 320 nm, kjer absorbirajo nečistote. Koncentracijo bakteriofagov smo izračunali po **enačbi 4.** (44).

Enačba 4: Enačba za izračun koncentracije bakteriofagov. A označuje absorbanco. 7222 je število baz bakteriofaga M13 (44).

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

4.7. Karakterizacija posameznih peptidov izraženih na bakteriofagih s testom ELISA

S testom ELISA smo vrednotili vezavo posameznih dodekapeptidov, izraženih na bakteriofagih, na izolirana tarčna aPT. V polovico vdolbinic mikrotitrne plošče Maxisorp F8, smo vezali aPT direktno na mikrotitrsko ploščo. Nanesli smo po 200 µL suspenzije protiteles aPT v PBS s koncentracijo 25 µg/mL v vdolbinico in pokrito ploščo inkubirali preko noči v hladilniku (4 °C). Naslednje jutro smo dodali posamezne bakteriofagne klone. Nevezane bakteriofage smo odstranili s spiranjem, v vdolbinice pa nanesli sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo. Ob dodatku substrata TMB je prišlo do encimske reakcije in modrega obarvanja, ki smo ga ustavili z dodatkom H₂SO₄. Intenziteto obarvanja smo izmerili z UV spektrofotometrom in je premosorazmerna vezavnim lastnostim peptida. Na podlagi rezultatov smo izbrali dodekapeptide, izražene na bakteriofagih, za nadaljnje vrednotenje.

Korak 1: Vezava tarče

V polovico vdolbinic mikrotitrne plošče smo adsorbirali po 200 µL tarčnih aPT v koncentraciji 25 µg/mL v PBS. Inkubirali smo preko noči, pri 4 °C.

Korak 2: Blokiranje nezasedenih mest z BSA/PBS

Zjutraj smo s 150 µL 0,1 % PBST trikrat sprali nevezana aPT, medtem pa inkubirali po 3 min pri 45 obr./min. Površino, ki je aPT niso zasedla, smo blokirali z 1 % BSA v PBS pufri. Po 1,5 h smo BSA 3 × sprali z 250 µL 0,1 % PBST, medtem pa 3 min inkubirali pri 45 obr./min.

Korak 3: Nanos vzorcev

Poliklonski bakteriofagni test ELISA: nanašali smo po 200 µL obogatene knjižnice, suspenzije bakteriofagov, ki smo jo pomnožili in očistili po vsaki stopnji selekcije. Na vdolbinico smo nanesli 5 x 10⁹ pfu v 0,1 % PBST.

Presejalni bakteriofagni test ELISA: nanašali smo po 100 μL posamičnih, naključno izbranih in pomnoženih klonov v mediju LB.

Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA: na ploščo smo nanašali po 200 μL suspenzije vsakega bakteriofagnega klona s celokupnim številom 5×10^9 pfu/vdolbinico. Redčitve smo pripravljali v 0,1 % PBST. Slepa kontrola je bila 200 μL 0,1 % PBST; negativna kontrola pa je bila suspenzija bakteriofagov brez inserta s celokupnim številom 5×10^9 pfu v 0,1 % PBST.

Kompetitivni bakteriofagni test ELISA: na ploščo smo nanašali po 100 μL bakteriofagnih suspenzij s celokupnim številom 5×10^9 pfu/vdolbinico. Redčitve smo pripravljali v 0,1 % PBST. V ločene vdolbinice smo hkrati s suspenzijo bakteriofagov dodali tudi 100 μL protrombina v PBS v koncentraciji 51,4 mL/L oziroma 514 mL/L, kar je ustrezalo 1-kratnemu oziroma 10-kratnemu številu molov tarčnih protiteles, ki smo jih nanašali v vdolbinice. Slepa kontrola je bila 200 μL 0,1 % PBST; negativna kontrola pa so bili bakteriofagi brez inserta s celokupnim številom 5×10^9 pfu v 0,1 % PBST in dodatkom protrombina.

Korak 4: Spiranje nevezanih bakteriofagov

Po 1-urni inkubaciji vzorcev smo nevezane bakteriofage 5-krat sprali z 250 μL 0,1 % PBST; med spiranjem smo 5 min inkubirali pri 25 °C in na 45 obr./min.

Korak 5: Nanos sekundarnih protiteles

Dodali smo 100 μL proti bakteriofagom usmerjenih sekundarnih monoklonskih protiteles proti bakteriofagu, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (redčitev 1:5000 v 1 % BSA v PBS). Po 1-urni inkubaciji smo sekundarna protitelesa 5-krat sprali z 250 μL 0,1 % PBST; med spiranjem smo 5 min inkubirali pri sobni temperaturi, na 45 obr./min.

Korak 6: Dodatek substrata in merjenje absorbance

Po zadnjem izpiranju smo nanесли 100 μL substrata TMB. Potekla je encimska reakcija in prišlo je do modrega obarvanja. Reakcijo smo ustavili z dodatko H_2SO_4 . Intenziteto obarvanja smo izmerili z UV-VIS spektrofotometroma Lambda Bio+ ali Epoch BioTek, pri valovni dolžini 450 nm.

4.8. Izolacija DNA izbranih bakteriofagnih klonov

Posamičnim bakteriofagnim klonom, ki so imeli pri presejalnem bakteriofagnem testu ELISA najvišje odzive in najvišja razmerja med odzivom bakteriofagov vezanih na aPT in

ozadjem, smo izolirali DNA in določili aminokislinsko zaporedje peptida, ki je izražen na površini. Vzorce smo najprej ločili od medija LB, jih resuspendirali v jodidnem pufru, nato pa izvedli obarjanje s 96 % etanolom. Oborino smo sprali z 70% etanolom, osušili v LAF komori in suspendirali v avtoklavirani bidestilirani vodi.

Korak 1: Obarjanje s PEG/NaCl

V 1200 μL vzorca posameznega bakteriofagnega kлона v mediju LB smo dodali 480 μL PEG/NaCl. Raztopino smo dobro premešali ter inkubirali v hladilniku preko noči. Zjutraj smo centrifugirali 10 min pri 14 000 obr./min in 4 °C, ter, tudi s pomočjo dodatnega centrifugiranja in pipete, dobro odstranili supernatant.

Korak 2: Resuspendiranje in ponovna precipitacija

Oborjene bakteriofage smo resuspendirali s 150 μL 4 M jodidnega puфра in dodali 375 μL 96 % etanola. Med 30 min inkubacijo na sobni temperaturi je potekalo obarjanje DNA. S 10 min centrifugiranjem na 14 000 obr./min, pri 4 °C smo ločili in nato zavrgli supernatant. Ponovno smo kratko centrifugirali ter preostanek supernatanta odstranili s pipeto, oborino pa dodali 100 μL 70 % etanola. Centrifugirali smo 5 min, 14 000 obr./min, 4 °C, s pipeto odstranili ves etanol ter odprte mikrocentrifugirke pustili v LAF komori, da je etanol izhlapel.

Korak 3: Priprava DNA za sekvenciranje

Posušeno enoverižno DNA smo raztopili v 10 μL bidestilirane in avtoklavirane vode ter pomerili njeno koncentracijo na Nanodrop spektrofotometru. Izmerjene koncentracije so bile od 100 do 600 mg/L. Suspenzijo DNA smo ustrezno redčili z bidestilirano in avtoklavirano vodo, da smo dosegli koncentracijsko območje 80-100 mg/L. V nove 1,5 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 5 μL ustrezno redčene DNA in 5 μL 5 μM začetnika (-96 gIII Sequencing Primer, 20-mer), jih označili s črtno kodo ter poslali na sekvencioniranje v podjetje GATC Biotech.

4.9. Določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombin

Pridobljena nukleotidna zaporedja smo z orodjem na spletnem portalu za bioinformatiko ExPASy prevedli v aminokislinska zaporedja (45). Ta aminokislinska zaporedja so izražena na kapsidi bakteriofaga in se nanje vežejo aPT. Vsa aminokislinska zaporedja smo preverili s spletnim orodjem SAROTUP (Target-Unrelated Peptides Scanner) z algoritmom MimoSearch, ki služi za detekcijo netarčnih peptidov (46; 47). Za tiste, ki niso

bili netarčni peptidi, smo pregedali ali se zaporedja ujemajo s primarno strukturo protrombina. Nato smo z računalniškim programom mapirali pridobljene peptide z aminokislinskimi ostanki na površini tridimenzionalne molekule. Delali smo s programom dostopnem na strežniku Pepitope Server, uporabljali pa smo algoritem PepSurf (48; 49) Prostorski molekuli protrombina za prileganje smo izbrali v Protein Data bank (PDB). Našli smo več konformacijskih verzij človeškega protrombina. Izbrane peptide smo prilegali na kristalni strukturi zvitega protrombina (6C2W) (43) in nezvitega protrombina (5EDM) (50). S pomočjo programa ViewerLite (Accelrys) smo prikazali potencialno lokacijo epitopov.

5. Rezultati in razprava

5.1. Selekcija bakteriofagov iz knjižnic Ph.D.-L7TM in Ph.D.-12TM

5.1.1. Vrednotenje poteka afinitetnih selekcij

V treh stopnjah afinitetne selekcije smo obogatili peptide, ki prepoznajo tarčo in odstranili tiste, ki se na tarčo niso vezali. Po eluciji na tarčo vezanih bakteriofagov in po pomnoževanju in čiščenju eluiranih bakteriofagov smo določili njihovo število s postopkom mikrobiološke titracije. V ta namen smo preštevali modre kolonije na trdnem gojišču po titraciji in spremljali morebitni pojav prozornih plakov. Ti bi predstavljali okuženost vzorca z divjimi tipi bakteriofaga iz okolja. Število bakteriofagov in delež bakteriofagov, ki smo jih uspeli eluirati s tarčnih protiteles glede na vhodno količino bakteriofagov, smo izračunali po *enačbi 3* in *enačbi 2* in prikazali v **preglednici II**.

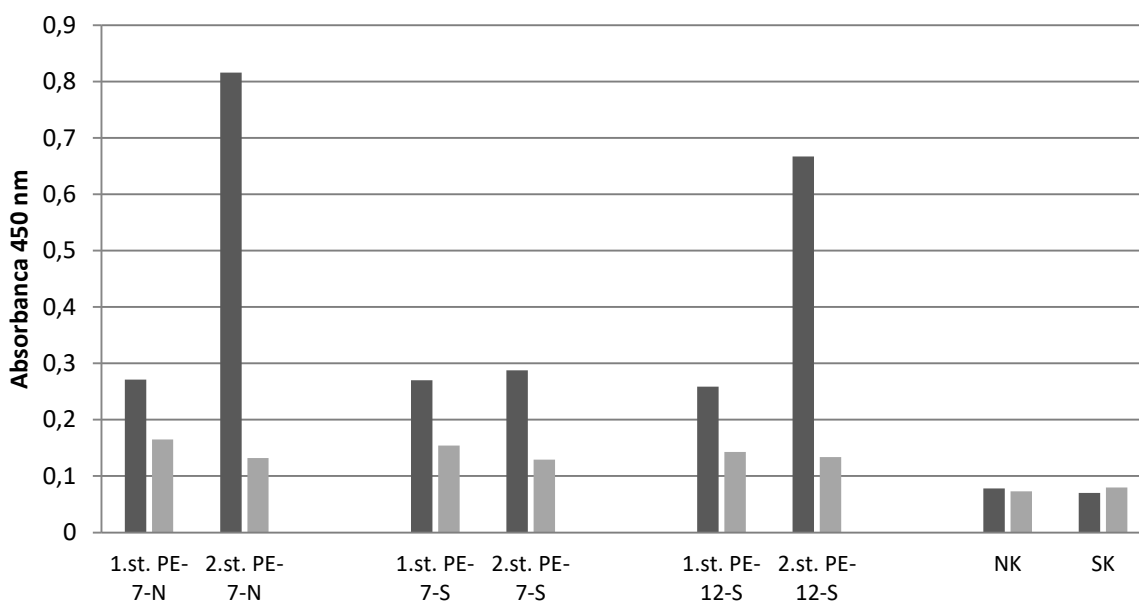
Preglednica II: Število eluiranih bakteriofagov in delež eluiranih bakteriofagov, ki smo jih uspeli eluirati s tarčnih protiteles glede na vhodno količino bakteriofagov pri selekcijah iz heptapeptidne (Ph.D.-L7TM) in dodekapeptidne (Ph.D.-12TM) knjižnice.

Stopnja		Ph.D.-L7 TM specifična elucija		Ph.D.-L7 TM nespecifična elucija		Ph.D.-12 TM specifična elucija	
		Število eluiranih bakteriofagov	število bakteriofagov po pomnoževanju	Število eluiranih bakteriofagov	število bakteriofagov po pomnoževanju	Število eluiranih bakteriofagov	število bakteriofagov po pomnoževanju
1	Pfu	202×10^2	185×10^9	158×10^2	313×10^9	74×10^2	94×10^9
	Delež eluiranih bakteriofagov	$2,02 \times 10^{-5}$		$1,58 \times 10^{-5}$		$7,4 \times 10^{-6}$	
2	Pfu	371×10^2	295×10^9	253×10^2	765×10^6	330×10^2	218×10^7
	Delež eluiranih bakteriofagov	$3,71 \times 10^{-4}$		$2,53 \times 10^{-5}$		$3,3 \times 10^{-4}$	
3	Pfu	450×10^5		529×10^6		404×10^5	
	Delež eluiranih bakteriofagov	$4,5 \times 10^{-2}$		$5,2 \times 10^{-1}$		$4,04 \times 10^{-2}$	

Delež bakteriofagov, ki smo jih eluirali s tarčnih protiteles glede na vhodno količino bakteriofagov, se je med stopnjami selekcij povečal za več velikostnih razredov. Zaključimo lahko, da so bile selekcije uspešno izvedene in je prišlo do obogatitve

bakteriofagov, ki interagirajo s tarčo. Za dodatno potrditev uspešnosti selekcije, je smiselno spremljati tudi spremembo vezave pomnoženega nabora bakteriofagov na tarčo.

S poliklonskim bakteriofagnim testom ELISA, smo preverjali vezavo peptidov, izraženih na bakteriofagih, na aPT in na ozadje (BSA). Predvidevali smo, da se bo v vsaki naslednji stopnji povečalo število bakteriofagov, specifičnih za tarčo in zmanjšalo število bakteriofagov, ki se vežejo na ozadje (**slika 6**).



Slika 6: Poliklonski bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanašali nabor bakteriofagnih klonov (5×10^9 pfu/ vdolbinico), pomnoženih po 1. stopnji (1.st.) in 2. stopnji (2.st.) z nespecifično elucijo z nizkim pH (N) in specifično elucijo s protrombinom (S) iz heptapeptidne Ph.D.-L7™ (7) in dodekapeptidne Ph.D.-12™ (12) knjižnice. Temno sivi stolpci predstavljajo vezavo na tarčna protitelesa, svetlo sivi pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanegli bakteriofag brez inserta, slepo kontrolo (SK) pa predstavlja vezava sekundarnih protiteles na prazne vdolbinice, prekrite s PBS.

Pri selekciji heptapeptidov z nespecifično elucijo in pri selekciji dodekapeptidov s specifično elucijo je pri drugi selekcijski stopnji do povečanja vezave bakteriofagov na tarčna aPT, kar pomeni, da se je nabor bakteriofagov obogatil z vezalci. Ozadja, ki kažejo na prisotnost nespecifičnih vezalcev na komponente ozadja, so nizka. Pri selekciji heptapeptidov s specifično elucijo se vezava bakteriofagnih klonov ne povečuje. Tudi v nadaljevanju je pri presejalnem bakteriofagnem testu ELISA malo klonov z izrazitim odzivom. Zato nismo bili prepričani, da je prišlo do obogatitve specifičnih vezalcev na tarčo.

5.2. Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih

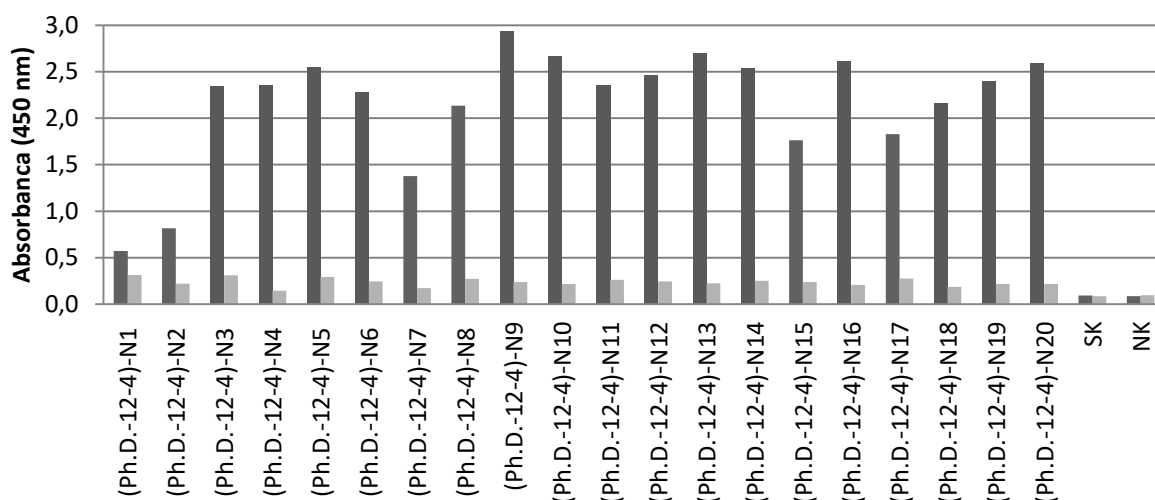
S poliklonskim bakteriofagnim testom ELISA smo preverjali uspešnost selekcije, nato pa smo želeli preveriti relativno vezavo posameznih bakteriofagnih klonov na tarčo in izbrati najboljše vezalce, za katere smo kasneje določili aminokislinsko zaporedje peptida, izraženega na površini. Njihovo avidnost do tarče smo določali s presejalnim bakteriofagnim testom ELISA.

5.2.1. Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih, po četrti stopnji selekcije iz predhodno obogatene knjižnice Ph.D.-12™

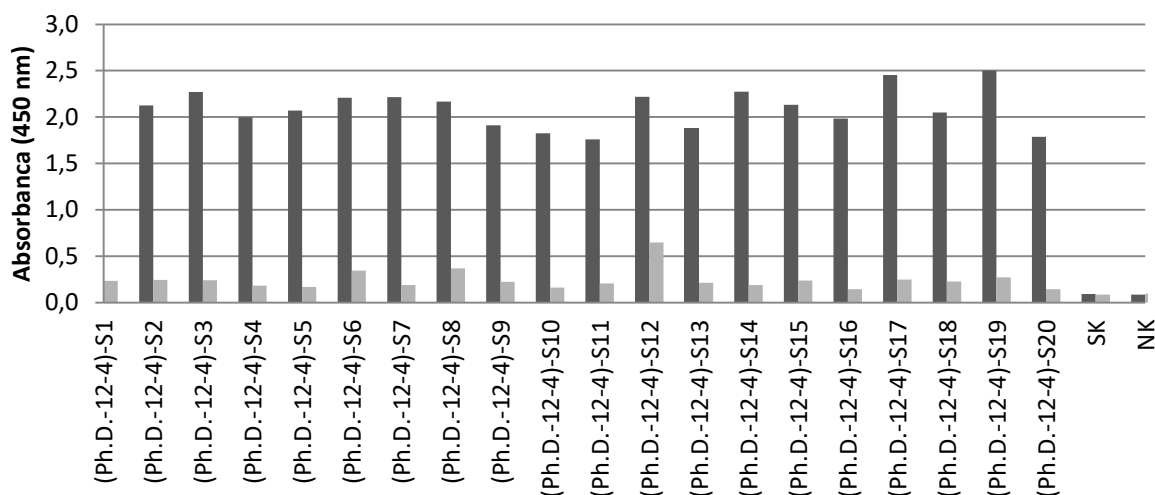
V predhodnih raziskavah so pridobili peptide, izražene na bakteriofagih, ki so tvorili dva motiva. Nekateri raziskovalci navajajo, da so dosegli boljšo obogatitev specifičnih vezalcev šele po več kot treh stopnjah selekcije. Najboljše rezultate naj bi dosegli po 4. selekcijski stopnji (51). Navajajo, da več kot je selekcijskih stopenj, bolj se zmanjša nabor peptidov, ki se vežejo na ozadje (52). V protokolu, ki smo mu sledili je priporočena selekcija v treh stopnjah (36). Kljub temu smo se odločili preveriti, ali bo dodatna 4. stopnja selekcije pripomogla k obogatitvi peptidov, ki vsebujejo značilna motiva (25).

5.2.1.1 .Presejalni bakteriofagni test ELISA

Po mikrobiološki titraciji eluata, pridobljenega po 4. stopnji selekcije, se je na gojišču pojavilo večje število prozornih plakov, ki kažejo na prisotnost divjega tipa bakteriofagov, zato smo morali biti pri delu previdni in izbrati dobro ločene modre plake. Zbrali smo 20 bakteriofagnih klonov iz selekcije z nespecifično elucijo, in 20 iz selekcije s specifično elucijo, jih pomnožili in napravili presejalni bakteriofagni test ELISA (**slika 7, slika 8**).



Slika 7: Presejalni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanesli posamezne bakteriofagne klonove v mediju LB, pridobljene po 4. selekcijski stopnji z neposredno elucijo iz predhodno obogatene knjižnice dodekapeptidov, Ph.D.-12TM. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo bakteriofagnih klonov na protitelesa, svetlo sivi stolpci pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanesli bakteriofag brez inserta, slepo kontrolo pa predstavlja vezava sekundarnih protiteles na prazne vdolbinice, prekrte z medijem LB (SK).



Slika 8: Presejalni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanesli posamezne bakteriofagne klonove v mediju LB, pridobljene po 4. selekcijski stopnji s specifično elucijo iz predhodno obogatene knjižnice dodekapeptidov, Ph.D.-12TM. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo bakteriofagnih klonov na protitelesa, svetlo sivi stolpci pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanesli bakteriofag brez inserta, slepo kontrolo pa predstavlja vezava sekundarnih protiteles na prazne vdolbinice, prekrte z medijem LB (SK).

Za izolacijo DNA in nadaljnje vrednotenje smo izbrali vzorce, pri katerih je absorbanca ob vezavi na aPT dosegla vrednost nad 2,0 in so imeli hkrati čim nižjo vezavo na ozadje

(BSA). To so bili vzorci (**Ph.D.-12-4**) -N5, -N6, -N9, -N10, -N11, -N12, -N13, -N14, -N16, -N18, -N19 in -N20, ter (**Ph.D.-12-4**) -S2, -S3, -S5, -S6, -S7, -S14, -S15, -S17, -S18 in -S19.

5.2.1.2. Aminokislinska zaporedja izbranih bakteriofagnih klonov

Dodekapeptidi, ki jih izražajo izbrani bakteriofagi po 4. stopnji nespecifične in specifične selekcije iz predhodno obogatene knjižnice, so zbrani v **preglednici III**.

Preglednica III: Zbrana aminokislinska zaporedja peptidov, pridobljenih po 4. stopnji selekcije iz predhodno obogatene knjižnice dodekapeptidov. V levem stolpcu so navedeni bakteriofagni kloni, ki so označeni po ključu: Ph.D.-12 je bakteriofagna knjižnica dodekapeptidov; 4 pomeni stopnjo selekcije; S in N označujeta sepecifično oz. nespecifično elucijo; v desnem so pripadajoča aminokislinska zaporedja. Sivo obarvana zaporedja so netarčni peptidi.

(Ph.D.-12-4)-N10,-N13,-N4	RVHPLESQMI FQ
(Ph.D.-12-4)-N19	VVESPKRAGEAY
(Ph.D.-12-4)-N20,-S3	GNNPLHVHDKR
(Ph.D.-12-4)-N3	GYWERLSVYGVH
(Ph.D.-12-4)-N16	TNVTPPERQTRM
(Ph.D.-12-4)-N14	DSFSHNNSNMRI
(Ph.D.-12-4)-S17,-N18,-N6,-N5,-S6	WGPSRSLVDVFR
(Ph.D.-12-4)-S19	TSISMMSLWAQT
(Ph.D.-12-4)-N11	SPDSAGLKFNSV
(Ph.D.-12-4)-N12	AVNHKLYKVDGN
(Ph.D.-12-4)-N9,-S5	GMGSMYEDAVQL
(Ph.D.-12-4)-S14	ALSVGAKTATPR
(Ph.D.-12-4)-S7,-S18	RDYHPRDHTATW
(Ph.D.-12-4)-S15,-S2	QVNGLGERSQQM

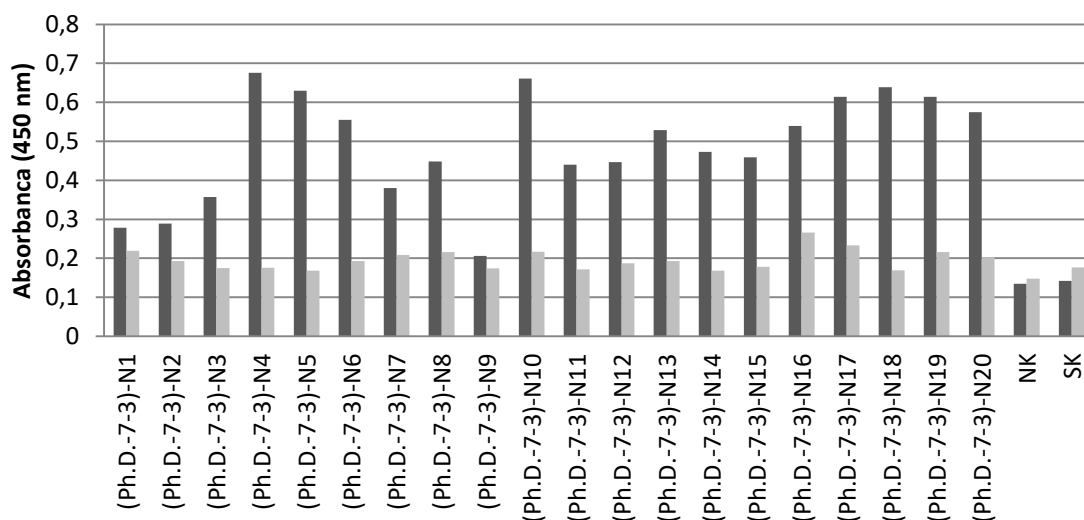
Pridobljena zaporedja so izredno različna in med njimi nismo razbrali in določili ponavljajočega se motiva. Še več, po preverjanju algoritmom MimoSearch na strežniku SAROTUP (47) smo ugotovili, da smo izolirali tudi štiri klone, ki na svoji površini izražajo dva različna **netarčna peptida** (sivo v **preglednici I**). Njihova pojavnost pri selekcijah je pogosta, saj se ali vežejo na komponente ozadja, ali pa imajo boljše propagacijske lastnosti in se zato prednostno pomnožujejo in izražajo na bakteriofagih (53). Iz rezultatov sklepamo, da 4. stopnja selekcije ni več optimalna. Do pričakovane

obogatitve dveh prevladujočih motivov, ki so jih predhodno zbrali po 3. selekciji teh dveh knjižnic (25), v našem primeru ni prišlo.

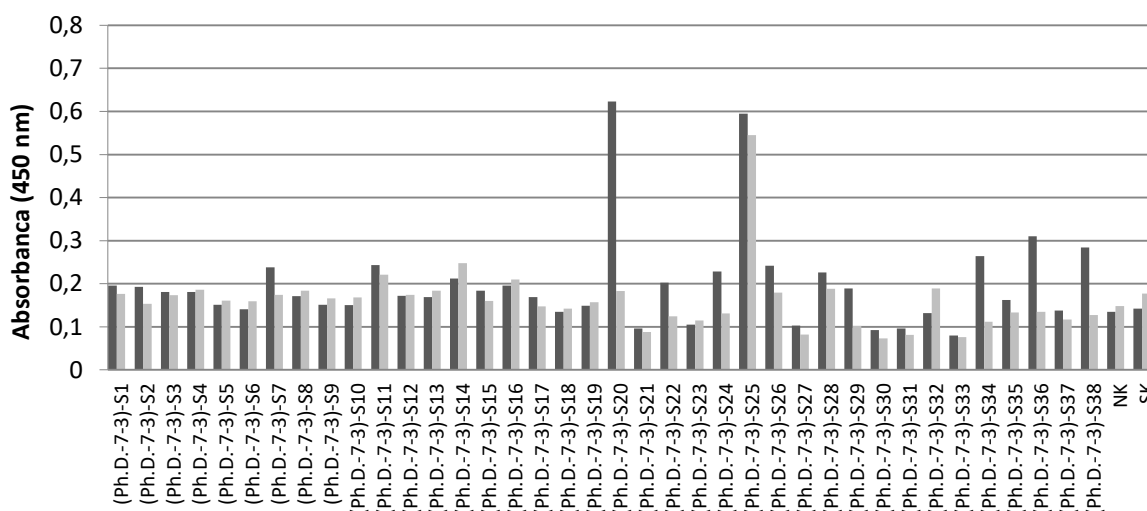
5.2.2. Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih, iz knjižnic Ph.D.-L7TM

5.2.2.1. Presejalni bakteriofagni test ELISA

Bakteriofage, ki smo jih eluirali iz tarče po tretji stopnji vsake selekcije, smo po postopku mikrobiološke titracije ločili na trdnem gojišču. Iz trdnih gojišč, kjer je zraslo okoli 100 kolonij, smo izolirali 20 klonov, pridobljenih v selekciji z nespecifično elucijo (**slika 9**) in 38 klonov, pridobljenih v selekciji s specifično elucijo (**slika 10**).



Slika 9: Presejalni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanegli posamezne bakteriofagne klone v mediju LB, pridobljene po 3. selekcijski stopnji z nespecifično elucijo iz izhodiščne knjižnice heptapeptidov, Ph.D.-L7TM. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo bakteriofagnih klonov na protitelesa, svetlo sivi stolpci pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanegli bakteriofag brez inserta, slepo kontrolo pa predstavlja vezava sekundarnih protiteles na prazne vdolbinice, prekrte z medijem LB (SK).



Slika 10: Presejalni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanegli posamezne bakteriofagne klone v mediju LB, pridobljene po 3. selekcijski stopnji s specifično elucijo iz predhodno obogatene knjižnice heptapeptidov, Ph.D.-7TM. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo bakteriofagnih klonov na protitelesa, svetlo sivi stolpci pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanegli bakteriofag brez inserta, slepo kontrolo pa predstavlja vezava sekundarnih protiteles na prazne vdolbinice, prekrite z medijem LB (SK).

Pri selekciji z nespecifično elucijo smo za izolacijo DNA in nadaljnje vrednotenje izbrali bakteriofage, ki so pri presejalnem bakteriofagnem testu ELISA dosegli vrednost absorbance nad 0,5 in hkrati imeli čim nižjo vezavo na ozadje (BSA). To so bakteriofagi **(Ph.D.-7-3) -N4, -N5, -N6, N10, -N13, -N16, -N17, -N18, -N19, -N20**. Pri selekciji s specifično elucijo smo za mejni kriterij izbrali vrednost absorbance 0,2 (pri tej vrednosti nastajajo razlike v absorbancah vzorcev in ozadij) in razmerje absorbanca med vezavo na aPT in ozadje 2. Izbrali smo bakteriofagne klone **(Ph.D.-7-3) -S20, -S24, -S34, -S36, -S38**.

5.2.2.2. Aminokislinska zaporedja izbranih bakteriofagnih klonov

Heptapeptidi, ki jih izražajo bakteriofagi po 3. stopnji nespecifične in specifične selekcije iz izhodiščne knjižnice so zbrani v **preglednici IV**.

Preglednica IV: Zbrana aminokislinska zaporedja izraženih peptidov po 3. stopnji selekcije heptapeptidov. V levem stolpcu so navedeni bakteriofagni kloni, ki so označeni po ključu: Ph.D.-7 je bakteriofagna knjižnica heptapeptidov; 3 pomeni stopnjo selekcije; S in N označujeta sepecifično oz. nespecifično elucijo; v desnem stolpcu so pripadajoča aminokislinska zaporedja.

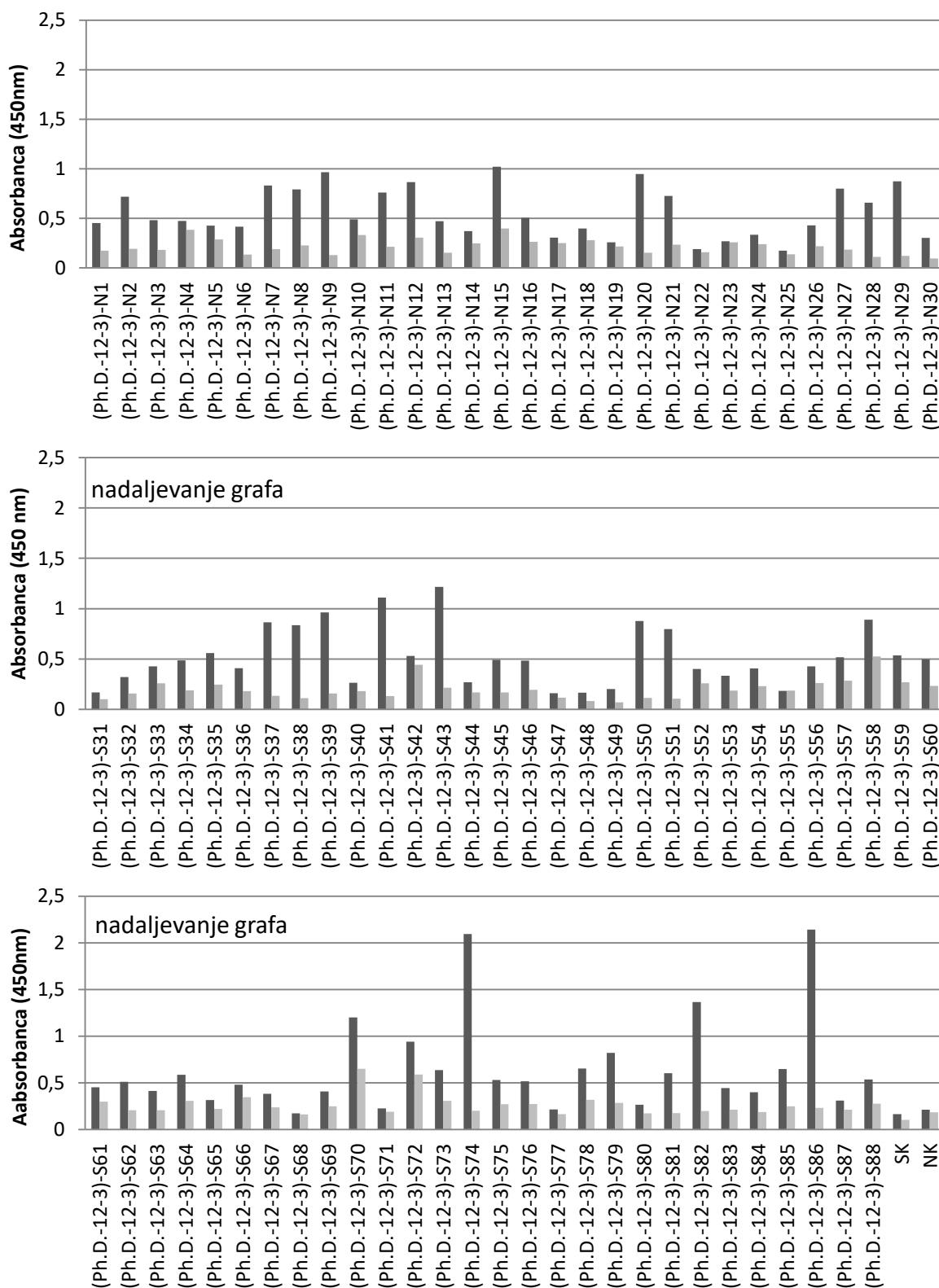
(Ph.D.-7-3)-N16	HALYPQK
(Ph.D.-7-3)-S34,-S36,-S24	SPRLPNN
(Ph.D.-7-3)-N20	LGVSDIG
(Ph.D.-7-3)-S20	FNRTWSN
(Ph.D.-7-3)-N18	GPKLSIK
(Ph.D.-7-3)-N6,-N19,-N13	YNVASPT
(Ph.D.-7-3)-N4,-N5	SLLMSHW
(Ph.D.-7-3)-N10,-N17	HIYKFPM
(Ph.D.-7-3)-S38	SVFHERG

Heptapeptidi med sabo nimajo izrazitih podobnosti. Ujemanja s primarno strukturo protrombina nismo našli. Sklepamo, da gre za večji konformacijski epitop, kar pa ne izključuje, da se sicer kratki segmenti teh aminokislinskih zaporedij vežejo z aPT.

5.2.3. Izbor in identifikacija posameznih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih iz knjižnic Ph.D.-12TM

5.2.3.1. Presejalni bakteriofagni test ELISA

Selekcijo iz izhodiščne knjižnice dodekapeptidov smo izvajali v treh stopnjah. Napravili smo selekcijo s specifično elucijo, saj se je ta v predhodnih poskusih izkazala za selekcijo, ki doprinese največ zadetkov. Iz petrijevk smo po mikrobiološki titraciji eluata pridobljenega po 3. stopnji selekcije izolirali in pomnožili 88 klonov. Veliko število klonov smo zbrali z namenom, da bi dobili čim več različnih zaporedij. Napravili smo presejalni bakteriofagni test ELISA (**slika 11**).



Slika 11: Presejalni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanesli posamezne bakteriofagne klonove v mediju LB, pridobljene po 3. selekcijski stopnji s specifično elucijo iz izhodiščne knjižnice dodekapeptidov, Ph.D.-12TM. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo bakteriofagnih klonov na protitelesa, svetlo sivi stolpci pa na ozadje

(BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanesti bakteriofag brez inserta, slepo kontrolo pa predstavlja vezava sekundarnih protiteles na prazne vdolbinice, prekrite z medijem LB (SK).

Vrednosti absorbance so se med seboj zelo razlikovale, zato smo za kriterij upoštevali razmerje med protitelesi in ozadjem. Za izolacijo DNA in nadaljnje vrednotenje smo izbrali bakteriofagne kloni, ki so imeli razliko med absorbanco ob vezavi na aPT v primerjavi z vezavo na ozadje (BSA) večjo od 2,5. Izbrali smo 34 vzorcev:

(Ph.D.-12-3) -S1, -S2, -S3, -S6, -S7, -S8, -S9, -S11, -S12, -S13, -S15, -S20, -S21, -S27, -S28, -S29, -S30, -S34, -S37, -S38, -S39, -S41, -S43, -S45, -S50, -S51, -S62, -S73, -S74, -S79, -S81, -S82, -S85 in -S86.

5.2.3.2. Aminokislinska zaporedja izbranih bakteriofagnih klonov

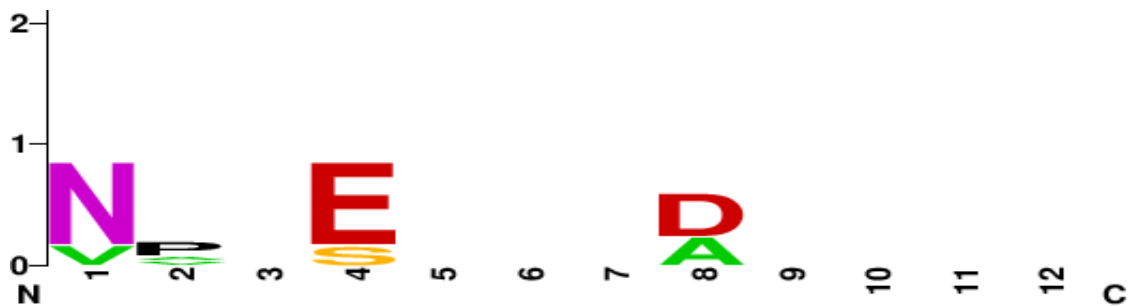
Dodekapeptidi, ki jih izražajo bakteriofagi, izbrani po 3. selekcijski stopnji s specifično elucijo iz izhodiščne knjižnice so zbrani v **preglednici V**. V preglednico nismo vključili treh peptidov, pri katerih je bodisi prišlo do izgube inserta tekom pomnoževanja, ali pa nismo uspeli razbrati sekvence.

Preglednica V: Zbrana aminokislinska zaporedja dodekapeptidov peptidov, izbranih po 3. selekcijski stopnji s specifično elucijo. Prvi stolpec ozačuje zaporedno številko skupine podobnih peptidov (ločene z dvojno črto). V drugem stolpcu so navedeni bakteriofagni kloni, ki so označeni po ključu: Ph.D.-12 je bakteriofagna knjižnica dodekapeptidov; 3 pomeni stopnjo selekcije; S in N pa označujeta sepecifično oz. nespecifično elucijo. Tretji stolpec vsebuje aminokislinska zaporedja, kjer temno siva barva označuje iste aminokisliline, svetlo siva pa po lastnostih podobne aminokisliline.

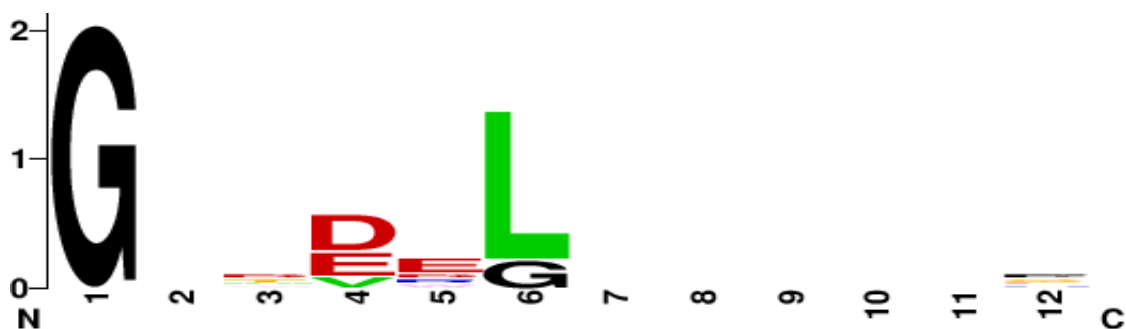
1.	(Ph.D.-12-3)-S38,-S43,-S37,-S9,-S51	NPLERMLDRPEQ
	(Ph.D.-12-3)-S2,-S28	NAERLLDLQKS
	(Ph.D.-12-3)-S39,-S50,-S12,-S7,-S8,-S15,-S86	NPMEAFVDSNPL
	(Ph.D.-12-3)-S41,-S20	NPIENQIAGAQL
	(Ph.D.-12-3)-S34,-S62	VVESPKRAGEAY
2.	(Ph.D.-12-3)-S30	GFMDLHLQVLHS
	(Ph.D.-12-3)-S3	GDDVWGSILIRE
	(Ph.D.-12-3)-S27	GFDELNLSYLP
	(Ph.D.-12-3)-S11	GLTDELTIQQVP
	(Ph.D.-12-3)-S82	GMTEELEWTGDS
	(Ph.D.-12-3)-S79,-73	GYWERLSVYGVH

3.	(Ph.D.-12-3)-S13	ALSVGSKIDTRL
	(Ph.D.-12-3)-S1,-S6,-S81	AIGVGSKPLRPD
4.	(Ph.D.-12-3)-S21	ILTPITLTWYESG
	(Ph.D.-12-3)-S85	NIPSQTLGGSEG

Dodekapeptide smo na podlagi podobnih aminokislin razdelili v 4 skupine (ločene z dvojno črto v **preglednici V**). Poleg obogatitve peptidov, ki sodijo v dva predhodno ugotovljena motiva (25), sta se pokazala še dva motiva. Kar 17 bakteriofagnih klonov je izražalo 5 različnih aminokislinskih zaporedij, ki tvorijo motiv, prikazan na **sliki 12**. Drugi izrazit motiv je sooblikovalo 7 klonov s 6 različnimi dodekapeptidi. Prikazan je na **sliki 13**. Opazili smo še dva motiva: A × × V G S K (v skupini 3) in I × × × T L (v skupini 4).



Slika 12: Skupni motiv, ki ga tvorijo izbrani dodekapeptidi iz 1. skupine. Barve aminokislin označujejo njihove lastnosti. Rdeče označeni sta negativno nabiti aminokislini (D, E), modra označuje pozitivno nabite aminokislino (K, H, R), rožnata aminokislino z amidno skupino (N,Q), oranžna aminokislino s hidroksilno skupino (S, T) zelena alifatske aminokislino (A, V I, L, M), siva aromatske aminokislino (F, Y, W) črna pa aminokislino G in P. Sliko smo naredili s programom WebLogo (54).



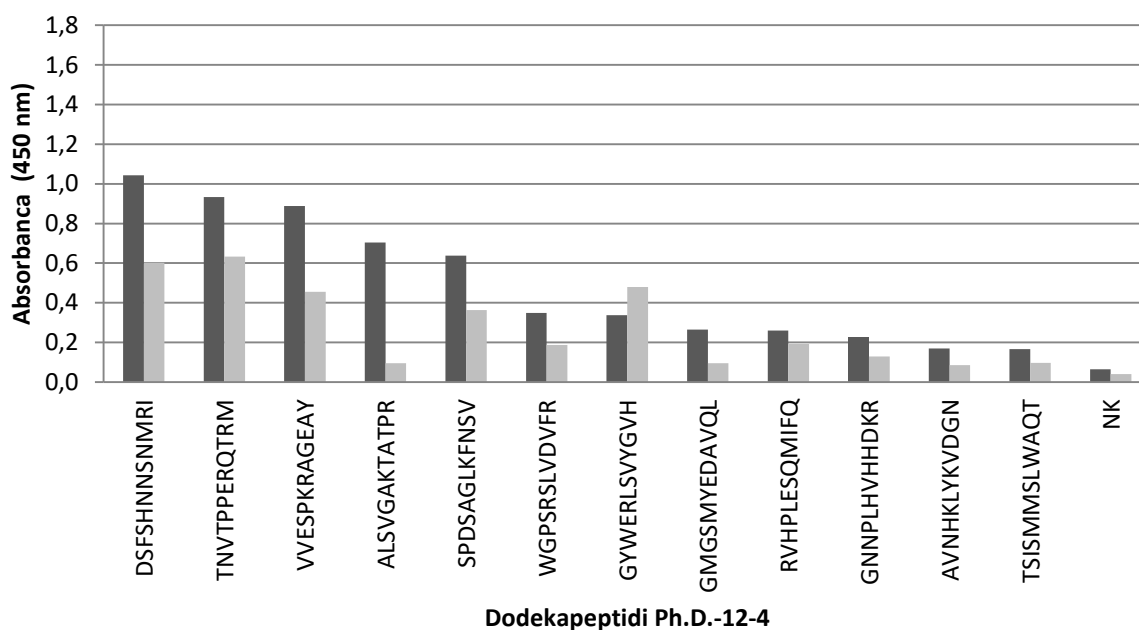
Slika 13: Skupni motiv, ki ga tvorijo izbrani dodekapeptidi iz 2. skupine. Barve aminokislin označujejo njihove lastnosti. Rdeče označeni sta negativno nabiti aminokislini (D, E), modra označuje pozitivno nabite aminokislino (K, H, R), rožnata aminokislino z amidno skupino (N,Q), oranžna aminokislino s hidroksilno skupino (S, T) zelena alifatske aminokislino (A, V I, L, M), siva aromatske aminokislino (F, Y, W) črna pa aminokislino G in P. Sliko smo naredili s programom WebLogo (54).

amidno skupini (N,Q), oranžna aminokislina s hidroksilno skupino (S, T) zelena alifatske aminokislina (A, V I, L, M), siva aromatske aminokislina (F, Y, W) črna pa aminokislina G in P. Slike smo naredili s programom WebLogo (54).

5.3. Vrednotenje izbranih peptidov, izraženih na bakteriofagnih klonih

5.3.1. Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA

Izbrane peptide, izražene na bakteriofagih, smo dodatno vrednotili in kvantitativno primerjali njihovo vezavo na aPT. **Slika 14** prikazuje rezultate semikvantitativnega bakteriofagnega testa ELISA za izbrane dodekapeptide, pridobljene po 4. stopnji selekcije iz predhodno obogatenih knjižnic, **slika 15** za izbrane heptapeptide po 3. stopnji selekcije iz izhodiščne knjižnice Ph.D.-L7TM, **slika 16** pa za dodekapeptide, pridobljene po 3. stopnji selekcije iz izhodiščne knjižnice Ph.D.-12TM.

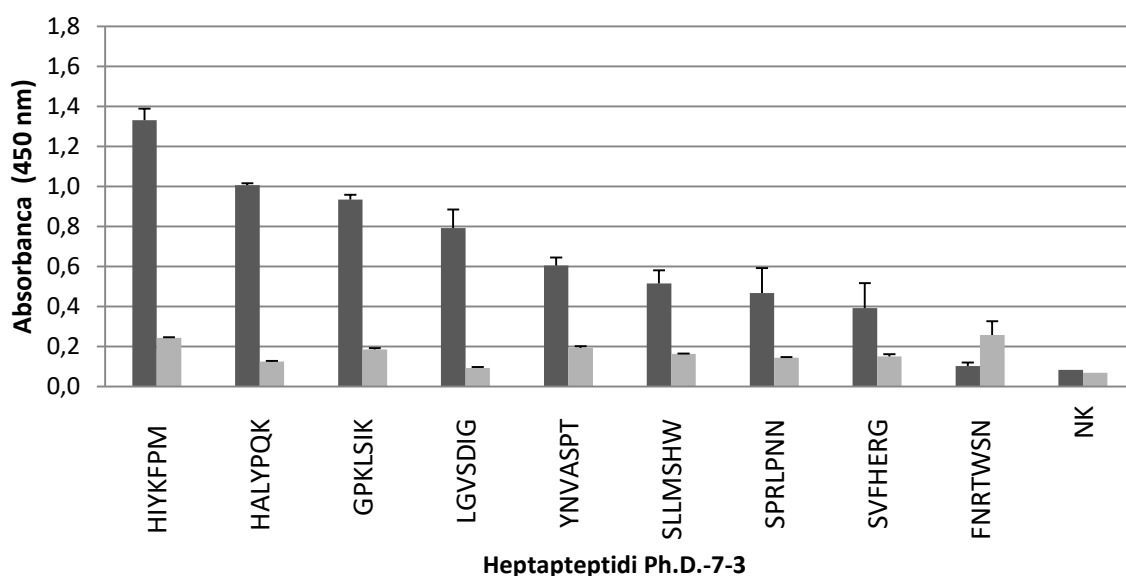


Slika 14: Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanegli 5×10^9 pfu/vdolbinico bakteriofagnih klonov v 0,1 % PBST, ki so izražali izbrane peptide. Bakteriofagne klone smo izbrali glede na rezultate presejalnega bakteriofagnega testa ELISA, po 4. selekcijski stopnji z nespecifično in specifično elucijo iz predhodno obogatene knjižnice dodekapeptidov, Ph.D.-12TM. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo na protitelesa proti protrombinu, svetlo sivi pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanegli bakteriofag brez inserta.

Za večino peptidov, ki smo jih izbrali glede na rezultate presejalnega bakteriofagnega testa ELISA, po 4. selekcijski stopnji z nespecifično elucijo iz predhodno obogatene knjižnice

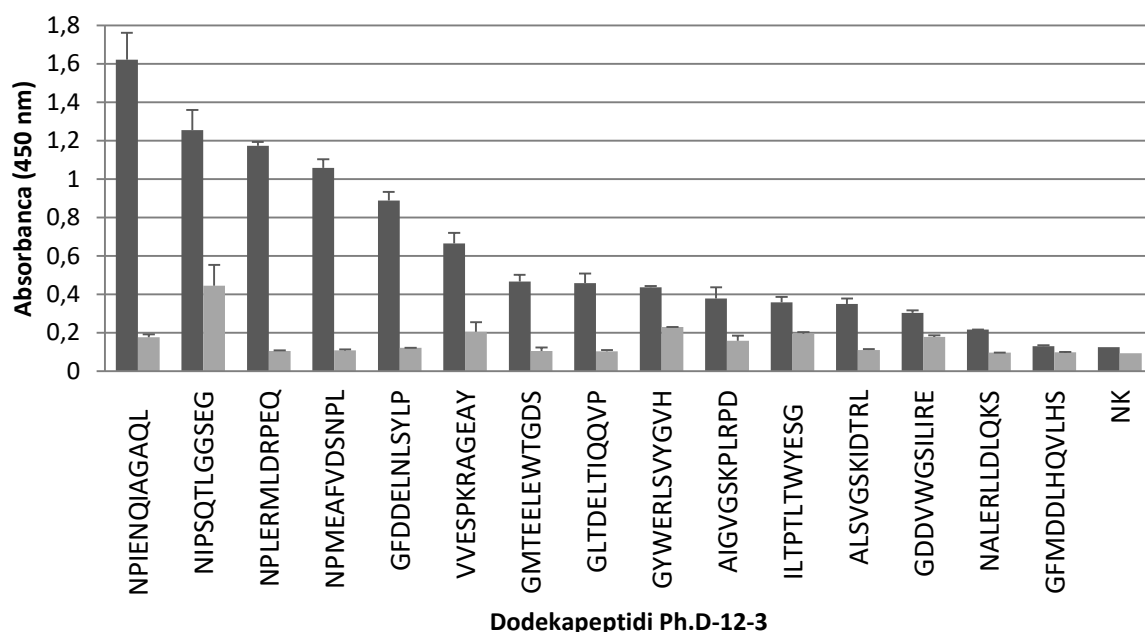
dodekapeptidov, se je izkazalo, da niso specifični vezalci za aPT (imeli so visoko vezavo na ozadje). Najbolj je izstopal klon, ki na svoji kapsidi izraža peptid **ALSVGAKTATPR**. Ta ima tudi največjo podobnost z enim izmed skupnih motivov, ki so ga določili v predhodnih selekcijah (25). Motiv se je pojavil tudi med našimi dodekamernimi zaporedji, ki smo jih pridobili po 3. stopnji selekcije iz izhodiščne knjižnice (**preglednica V**). Ostali bakteriofagni kloni niso kazali podobnosti s skupnimi motivi. Glede na visok signal, pri vezavi posameznih peptidov na ozadje (BSA), lahko sklepamo, da ne gre za specifične vezalce na tarčna aPT.

Dodatna stopnja selekcije se v našem primeru ni obnesla, saj nismo uspeli obogatiti peptidov, ki sestavljajo predhodno določena motiva. Na gojišču so se pojavljale tudi prozorne kolonije, ki so kazale na okužbo in prevlado bakteriofagov divjega tipa. Med izbranimi kloni so se pojavili tudi takšni, ki so izražali poznane ne-tarčne peptide.



Slika 15: Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanegli 5×10^9 pfu/vdolbinico bakteriofagnih klonov v 0,1 % PBST, ki so izražali izbrane peptide. Bakteriofagne klone smo izbrali glede na rezultate presejalnega bakteriofagnega testa ELISA, po 3. selekcijski stopnji s specifično in nespecifično elucijo iz knjižnice heptapeptidov, Ph.D.-L7TM. Vsak test smo izvedli v dveh ponovitvah. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa proti protrombinu, svetlo sivi pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanegli bakteriofag brez inserta.

Pri izoliranih heptapeptidih smo dobili bakteriofagne klone, za katere lahko glede na rezultate semikvantitativnega bakteriofagnega testa ELISA zaključimo, da so večinoma dobri in specifični vezalci na aPT.

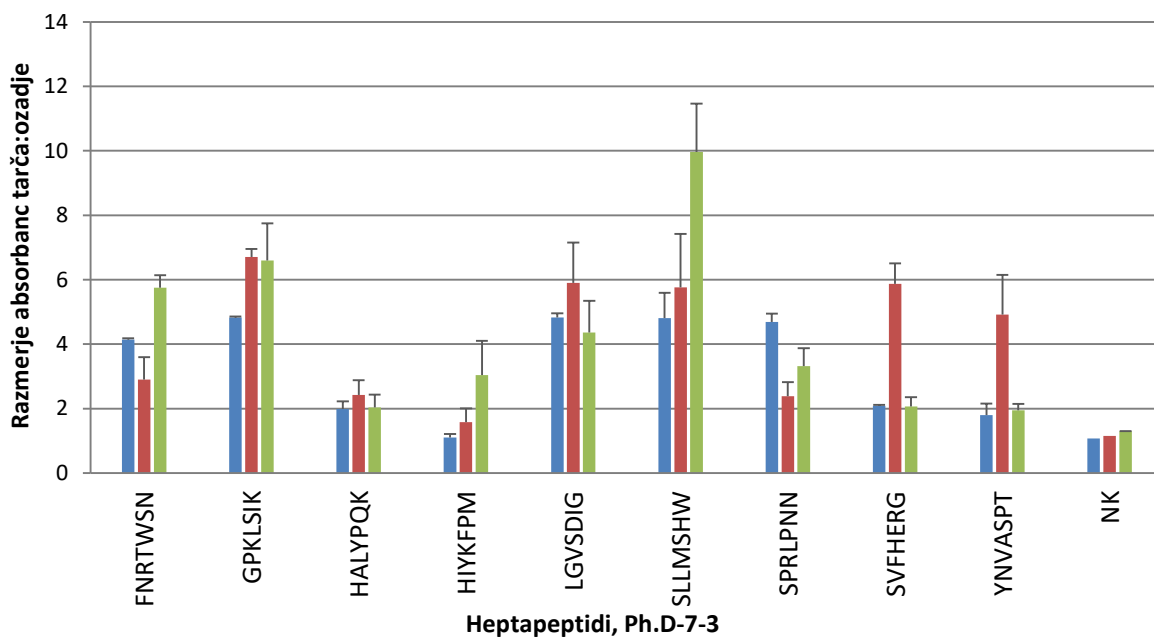


Slika 16: Semikvantitativni bakteriofagni test ELISA. Na imobilizirano tarčo smo nanegli 5×10^9 pfu/vdolbinico bakteriofagnih klonov v 0,1 % PBST, ki so izražali izbrane peptide. Bakteriofagne klone smo izbrali glede na rezultate presejalnega bakteriofagnega testa ELISA, po 3. selekcijski stopnji s specifično elucijo iz knjižnice dodekapeptidov, Ph.D.-12TM. Vsak test smo izvedli v dveh ponovitvah. Temno sivi stolpci prikazujejo vezavo na tarčna protitelesa proti protrombinu, svetlo sivi pa na ozadje (BSA). Za negativno kontrolo (NK) smo na imobilizirano tarčo nanegli bakteriofag brez inserta.

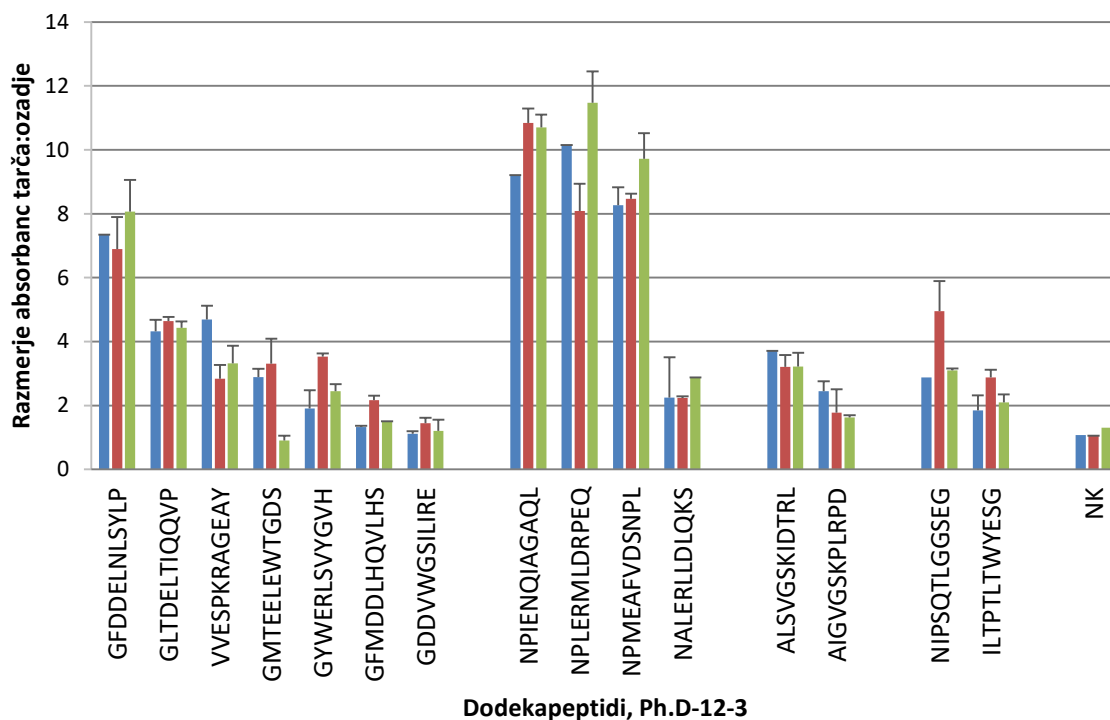
Izolirane dodekapeptide z določenimi zaporedji smo razporedili po avidnosti vezave do aPT. Najvišje signale so dosegli peptidi z zaporedjem, ki vsebuje motiv $N P \times E \times \times \times D$: NPIENQIAGAQL, NIPSQTLGGSEG, NPLERMLDRPEQ, NPMEAFVDSNP. Interakcije ostalih peptidov s protitelesi so manjše.

5.3.2 Kompetitivni bakteriofagni test ELISA

S kompetitivnim bakteriofagnim testom ELISA smo želeli preveriti, ali peptidi tekmujejo s protrombinom za isto vezavno mesto. K izbranim bakteriofagnim klonom (5×10^9 pfu/vdolbinico) smo dodajali po 100 μ L raztopine protrombina s koncentracijo 51,4 mL/L oziroma 514 mL/L v PBS. Protrombin naj bi v primeru, da gre za isto vezavno mesto, tekmoval s površinsko predstavljenimi peptidi za vezavno mesto na aPT. Kompetitivni bakteriofagni test ELISA smo izvedli za heptapeptide (**slika 17**) in dodekapeptide (**slika 18**), izolirane iz izhodiščnih bakteriofagnih knjižnic.



Slika 17: Kompetitivni bakteriofagni test ELISA. Modri stolpci prikazujejo razmerje absorbanc, izmerjenih pri vezavi peptidov na tarčna protitelesa in na ozadje (BSA), rdeči razmerje absorbanc, izmerjenih pri vezavi peptidov na tarčna protitelesa in na ozadje (BSA) ob dodatku 51,4 mL/L protrombina, zeleni pa razmerje absorbanc, izmerjenih pri vezavi peptidov na tarčna protitelesa in na ozadje (BSA) ob dodatku 514 mL/L protrombina v PBS. Vsak test smo izvedli v dveh ponovitvah. Negativna kontrola (NK) so bakteriofagi brez inserta.



Slika 18: Kompetitivni bakteriofagni test ELISA. Modri stolpci prikazujejo razmerje absorbanc, izmerjenih pri vezavi peptidov na tarčna protitelesa in na ozadje (BSA), rdeči razmerje absorbanc, izmerjenih pri vezavi peptidov na tarčna protitelesa in na ozadje (BSA) ob dodatku 51,4 mL/L protrombina, zeleni pa razmerje absorbanc, izmerjenih pri vezavi peptidov na tarčna protitelesa in na ozadje (BSA) ob dodatku 514 mL/L protrombina v PBS. Vsak test smo izvedli v dveh ponovitvah. Negativna kontrola (NK) so bakteriofagi brez inserta.

(BSA) ob dodatku 51,4 mL/L protrombina, zeleni pa razmerje absorbanc, izmerjenih pri vezavi peptidov na tarčna protitelesa in na ozadje (BSA) ob dodatku 514 mL/L protrombina v PBS. Vsak test smo izvedli v dveh ponovitvah. Negativna kontrola (NK) so bakteriofagi brez inserta.

Ob dodatku protrombina smo pričakovali, da bo prišlo do izpodrivanja in zato do zmanjšanja signalov. Pri uporabi višje koncentracije protrombina v primerjavi z vzorci, kjer protrombin dodajamo v nižji koncentraciji, oziroma ga ne dodajamo, ni prišlo do bistvenih razlik. Bistvene razlike v odzivih so opazne le pri heptapeptidih SLLMSHW, SVFHERG in YNVASPT.

Z kompetitivnim bakteriofagnim testom ELISA, ki smo ga uporabili z namenom inhibicije vezave peptidov na tarče ob prisotnosti molekule protrombina, nismo dosegli pričakovanih rezultatov. Ena od možnih razlag, zakaj ni prišlo do izpodrivanja peptidov z vezavnega mesta na tarčnih aPT je, da so tarčna aPT imobilizirana na mikrotitrski plošči tako, da je manjšim dodekapeptidom dostop do paratopov na aPT lažji kakor molekulam protrombina. Druga razlaga je, da protrombin v raztopini zavzame konformacijo, ki ni enaka kakor prevladujoča v fizioloških pogojih in se zato slabše veže na aPT. To so ugotovili tudi pri vzpostavitvi modificiranega testa aPS/PT ELISA, kjer so pokazali, da se aPT ne vežejo na protrombin v raztopini. Ravno zaradi tega so razvili modificiran test aPS/PT ELISA, kjer hkrati inkubirajo protitelesa in protrombin. Do vezave aPT pride šele, ko se protrombin veže na fosfatidilserin (5). V prihodnje bi bilo smotrno izvesti kompetitivni test aPS/PT ELISA, kjer bi ločeno testirali aPT in protrombin s protitelesi, ob prisotnosti sintetiziranih peptidov. Pri tem testu pričakujemo, da bi v prvem primeru protrombin zavzel konformacijo, ki bi omogočila vezavo protiteles, v drugem primeru pa bi peptidi s svojo vezavo na aPT inhibirali njihovo vezavo na molekulo protrombina.

5.4. Primerjava izbranih peptidov z vezavo na tarčna protitelesa

Dodekapeptide, ki smo jih pridobili v selekcijah smo primerjali med sabo in jih primerjali tudi z dodekapeptidi, ki so jih pridobili v predhodnih selekcijah na istih tarčnih protitelesih (25). Vsa zaporedja so zbrana v **preglednici VI**. Na podlagi podobnosti smo aminokislinska zaporedja razvrstili v 4 skupine, pri katerih se kaže skupni motiv.

Preglednica VI: Zbrana aminokislinska zaporedja dodekapeptidov. Prvi stolpec ozačuje zaporedno številko skupine, kateri pripadajo peptidi (ločene so z dvojno črto). V drugem stolpcu so navedeni bakteriofagni kloni, ki so označeni po ključu Ph.D.-12 je bakteriofagna knjižnica dodekapeptidov; 3 in 4 pomenita stopnjo selekcije; S in N označujeta sepecifično

oz. nespecifično elucijo. Tretji stolpec vsebuje aminokislinska zaporedja, kjer temno siva barva označuje iste aminokislinske, svetlo siva pa po lastnostih podobne aminokislinske. Rjavo obarvani so kloni zbrani v predhodnih poizkusih (25).

1	(Ph.D.-12-3)-S38,-S43,-S37,-S9,-S51	NPLERMLDRPEQ
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-S5	NPLERMLDRPEQ
	(Ph.D.-12-3)-S2,-S28	NALERLLDLQKS
	(Ph.D.-12-3)-S39,-S50,-S12,-S7,-S8,-S15,-S86	NPMEAFVDSNPL
	(Ph.D.-12-4)-N20,-S3	GNNPLHVHDKR
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-S11	NLVENFIDFGPA
	(Ph.D.-12-3)-S41,-S20	NPIENQIAGAQL
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-N5	NAVEDRIAAHSG
	(Ph.D.-12-4)-N10,-N13,- N4	RVHPLESQMIFQ
	(Ph.D.-12-3)-S34,-S62 (Ph.D.12-4)-N19	VVESPKRAGEAY
(Ph.D.-12-KAPŠ)-PS7	QVNGLGERSQQM	
2	(Ph.D.-12-KAPŠ)-PS8	GIDDLGPLHPR
	(Ph.D.-12-3)-S30	GFMDLHQVLHS
	(Ph.D.-12-3)-S3	GDDVWGSILIRE
	(Ph.D.-12-3)-S27	GFDELNLSYLP
	(Ph.D.-12-3)-S11	GLTDELTIQQVP
	(Ph.D.-12-3)-S82	GMTEELEWTGDS
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-N2	DVTDAYRRPFFQ
	(Ph.D.-12-3) -S79,-S73, (Ph.D.-12-4)-N3	GYWERLSVYGVH
3	(Ph.D.-12-3)-S13	ALSVGSKIDTRL
	(Ph.D.-12-3)-S1,-S6,-S81	AIGVGSKPLRPD
	(Ph.D.-12-4)-S14	ALSVGAKTATPR
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-P5	VTNVGLKSTAGL
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-P11,-P18	VQSVGSKIKDTP
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-P2,-P9,-P12	KMLVGSKEMVPN
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-P19	KAEVGSKFSVYS
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-P7	HLAVGMKERSIA
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-PS2,-PS10,-PS17	HLGVGAKPLTNS
	(Ph.D.-12-KAPŠ)-N10	KIDVGHKQMAAA

	(Ph.D.-12-4)-N11	SPDSAGLKFNSV
4	(Ph.D.-12- <small>KAPŠ</small>)-S1	ITTPDWELIARN
	(Ph.D.-12-3)-S21	ILTPTLTWYESG
	(Ph.D.-12-3)-S85	NIPSQTLGGSEG

S primerjavo vseh peptidov smo prej izoblikovanima skupinama peptidov iz Ph.D.-12TM z motivi $N P \times E \times \times D$ in $G \times \times D E L$, ter šibkima motivoma $A \times \times V G S K$ in $I \times \times \times T L$ dodali podobne peptide. Potrdili in razširili smo prej določene motive (**preglednica VII**).

Preglednica VII: Razširjeni skupni motivi dodekapeptidov. V prvem stolpcu je številka skupine peptidov ki tvorijo motiv, v drugem pa motivi. Rdeče označeni sta negativno nabiti aminokislini (D, E), modro pozitivno nabite aminokislino (K, H, R), rožnato aminokislino z amidno skupino (N,Q), oranžno aminokislino s hidroksilno skupino (S, T) zeleno alifatske aminokislino (A, V I, L, M), sivo aromatske aminokislino s sivo (F, Y, W) črno pa aminokislino G in P. \times označuje neznanu aminokislino.

	Motiv
1	- N P (L/I/V) E $\times \times$ (L/I) D -
2	- G F \times D (D/E) (L/V) -
3	- A L \times V G S K -
4	- I \times (T/S) P T L -

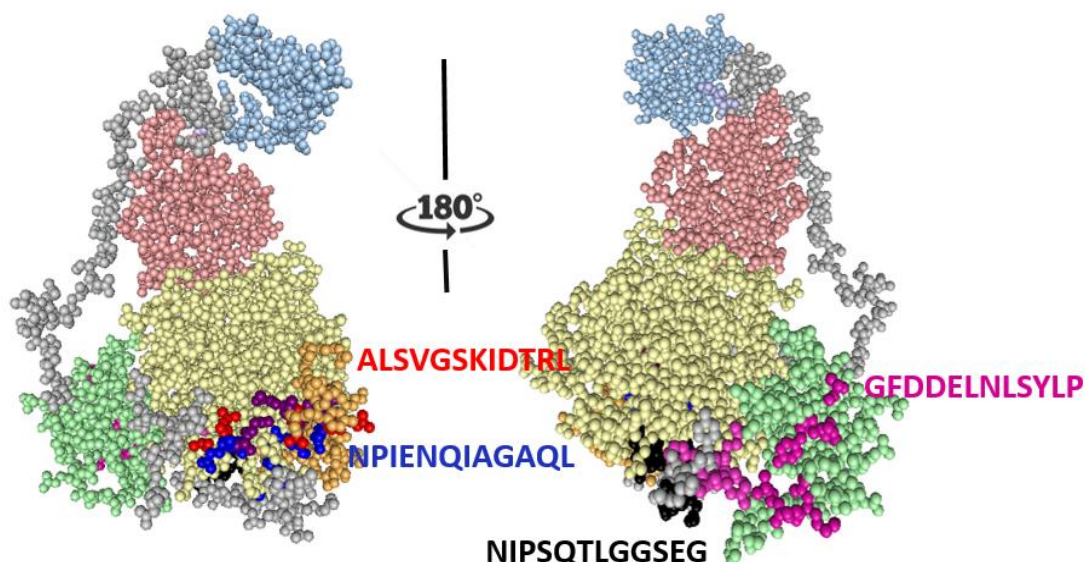
Ob primerjavi združenih peptidov smo okrepili prej razbran motiv $N P \times E \times \times D$. Podoben motiv so v predhodnih raziskavah že opazili (25). Medtem ko pri primerjavi naših peptidov nismo mogli določiti izstopajoče aminokislino na tretjem, petem in šestem mestu, se te ob skupni primerjavi obogatijo (**preglednica VII**). Na tretjem mestu smo opazili, da se večkrat ponovi aminokislina L, kadar je ni, pa se pojavljajo ostale alifatske aminokislino: I, V ali M. Na petem mestu se je obogatila pozitivno nabita aminokislina R, na šestem pa se zopet pojavljajo alifatske aminokislino I, V in L. Motiv $G \times \times D E L$ smo dodali še 3 zaporedja. Opazili smo, da je sedaj na mestu aminokislino E večkrat aminokislina D; obe aminokislino imata negativno nabito skupino. Dodatno izstopa še aminokislina T na tretjem mestu. Tudi motiv $V G \times K$ so že opazili pri predhodnih

selekcijah (25). Ob združitvi peptidov smo motiv razširili na A L × V G S K. K peptidoma, ki sta pri nas kazala na motiv I × × × T L, smo dodali še en podoben peptid in razširili motiv na: I × T P T L. Na tretjem mestu smo opazili namesto aminokislina T tudi S. Obe sta manjši aminokislini s polarnima stranskima verigama.

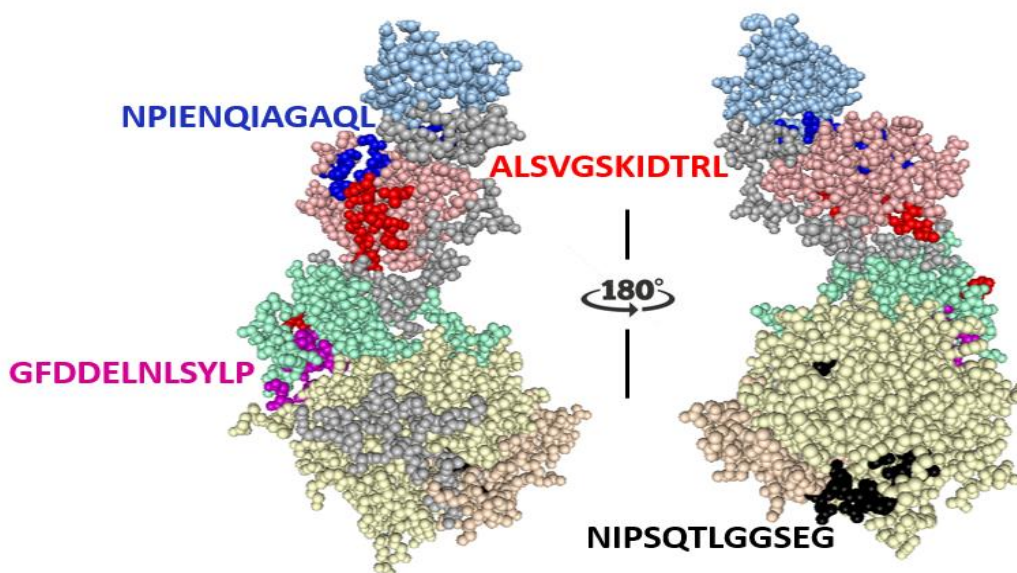
5.5. Prileganje aminokislinskih zaporedij na izbrani kristalni strukturi protrombina in določitev vezavnega mesta protiteles proti protrombinu

V fizioloških pogojih je vzpostavljeno ravnotežje med nezvito in zvito konformacijo protrombina (42). Za primer nezvite konformacije smo izbrali kristalno strukturo protrombina 5EDM (50), za primer zvite konformacije pa kristalno strukturo protrombina 6C2W (43). Pri konformacijskih različicah se na površini molekule združujejo različni aminokislinski ostanki. S prileganjem peptidov smo določali potencialna mesta, kjer se nahajajo epitopi.

Z algoritmom Pepsurf, ki se nahaja na strežniku Pepitope Server, smo prilegali izbrane peptide, ki so v testu ELISA imeli največjo vezavo na tarčna aPT, na tridimenzionalno strukturo zvite molekule protrombina (6C2W) ter nezvite molekule protrombina (5EDM). Izbrali smo po en peptid iz vsake skupine, ki je sestavljala skupen motiv. Izbrani peptidi so imeli najboljšo vezavo pri izvedbi semikvantitativnega testa ELISA. To so bili peptidi NPIENQIAGAQL, GFDDELNSYLP, ALSVGSKIDTRL in NIPSQTLGGSEG. Na **sliki 19** so prikazana prileganja peptidov na zvito kristalno strukturo protrombina (6C2W), na **sliki 20** pa prileganja peptidov na nezvito kristalno strukturo protrombina (5EDM), ki jih je algoritem označil z najvišjo vrednostjo.



Slika 19: Prileganje peptidov na površino zvite molekule protrombina (6C2W). Neizrazite barve označujejo domene protrombina: domena Gla je blede modre barve, blede rdeča je domena »kringle«-1 (K1), zelena domena »kringle«-2 (K2), oranžna prikazuje A, rumena pa B predel domene serinske proteaze. Siva predstavlja aminokislinske ostanke med domenami. Aminokislinski ostanke, kamor smo s programom prilegali peptid NPIENQIAGAQL, so označeni črno, aminokislinske ostanke prileganja peptida GFDDELNSYLP rožnato, ALSVGSKIDTRL rdeče in NIPSQTLGGSEG modro. Vijolično obarvane so aminokislinske ostanke, ki si jih delita peptida NPIENQIAGAQL in ALSVGSKIDTRL. Rezultate smo prikazali s programom Viewer Lite.



Slika 20: Prileganje peptidov na površino nezvite molekule protrombina (5EDM). Neizrazite barve označujejo domene protrombina: domena Gla je blede modre barve, blede rdeča je domena »kringle«-1 (K1), zelena »kringle«-2 (K2), oranžna prikazuje A, rumena pa B predel domene serinske proteaze. Siva predstavlja aminokislinske ostanke med

domenami. Aminokislinski ostanki, kamor smo s programom prilegali peptid NPIENQIAGAQL, so označeni črno, aminokislina prileganja peptida GFDDELNSYLP rožnato, ALSVGSKIDTRL rdeče in NIPSQTLGGSEG modro. Vijolično obarvane so aminokislina, ki si jih delita peptida NPIENQIAGAQL in ALSVGSKIDTRL. Rezultate smo prikazali s programom Viewer Lite.

Na začetku raziskovanj so na podlagi študije fragmentov protrombina domnevali, da se aPT vežejo zgolj na protrombin, pretrombin 1 (ne vsebuje domene Gla domene in K1) in fragment 1 (domena Gla in K1), ne pa tudi na trombin (18; 22). V drugih kliničnih raziskavah so predpostavili, da najverjetneje obstaja več epitopov, ki so hkrati skupni protrombinu, trombinu in β -glikoproteinu I (26). Dokazali so, da so med izoliranimi aPT tudi taka, ki se vežejo na trombin. Vezavno mesto naj bi se nahajalo na epitopu za antitrombin. Na podlagi tega smo se odločili, da vključimo tudi prileganja peptidov, ki se nahajajo na domeni serinske proteaze.

Peptida NPIENQIAGAQL in ALSVGSKIDTRL je algoritem na zviti molekuli protrombina (6C2W) prilegal na domeno serinske proteaze. Peptida si delita 6 aminokislinskih ostankov. Mesto prileganja je v neposredni bližini K2. Ista peptida je algoritem na nezviti molekuli protrombina (5EDM) prilegal na K1. Na nezviti molekuli protrombina si ne delita skupni aminokislinskih ostankov.

Peptid z aminokislinskim zaporedjem GFDDELNSYLP je na zviti molekuli protrombina (6C2W) algoritem prilegal polovico na K2, polovico pa na domeno serinske proteaze. Pri prileganju na nezvito molekulo protrombina (5EDM) se peptid prav tako nahaja na K2, dve aminokislini segata preko domene serinske proteaze, vendar se aminokislinski ostanki ne ponavljajo. Aminokislina na zviti molekuli protrombina (6C2W), ki ustrezajo peptidu NIPSQTLGGSEG, se nahajajo na K2 in domeni serinske proteaze. Ob prileganju na nezvito molekulo protrombina (5EDM) je prileganje celotnega peptida predvideno na domeni serinske proteaze.

Iste peptide je na različnih molekulah protrombina algoritem predvidel na različnih mestih. Na zviti molekuli protrombina (6C2W) je algoritem predvidel obstoj epitopov na K2 ali domeni serinske proteaze, vedno v bližini njunega stika. Na nezviti molekuli protrombina (5EDM) pa je dva epitopa predvidel na K1, enega na domeni serinske proteaze, enega pa na stiku domen serinske proteaze in K2. Zaključimo lahko, da je predstavitev protrombina bistvena za mesto vezave protiteles. aPT se verjetno v telesu vežejo na obe konformaciji protrombina (zvito v kompleksih in nezvito v raztopini). Ker naj bi zvita oblika v telesu

prevladovala in izkazovala aminokislinske ostanke, ki se izpostavijo pri kompleksih protrombin-fosfatidilserin in protrombin-protrombin, je možno, da so ti epitopi pri razvoju bolezni bolj pomembni.

6. Sklep

V okviru magistrske naloge smo dosegli zadane cilje:

1. Iz bakteriofagnih knjižnic Ph.D.-7TM in Ph.D.-12TM smo v 3 selekcijskih stopnjah uspeli selekcionirati peptide, ki se vežejo na aPT, izolirana iz seruma pacientov z APS in venskimi trombozami.
2. Identificirali smo izbrane peptide in s testom ELISA ovrednotili njihovo avidnost do tarčnih protiteles. Identificirane peptide smo po podobnosti razporedili v štiri skupine in našli štiri motive, za katere predvidevamo, da oponašajo del konformacijskih epitopov na protrombinu.
3. Peptide z najboljšimi vezavami smo prilegali na primarno in terciarno strukturo protrombina, ter predvideli najverjetnejša epitopska mesta.

Tekom dela smo prišli do naslednjih zaključkov:

1. Z nadaljevanjem 4. stopnje selekcije nismo uspeli dodatno obogatiti vezalcev.
2. Primerjava pridobljenih dodekapeptidov med sabo in s peptidi, ki so jih pridobili v predhodnih raziskavah na isti tarči, je izpostavila 4 motive, ki naj bi oponašali fizikalno-kemijske lastnosti epitopov protrombina.
3. S prileganjem peptidnih mimetikov epitopov na dve konformacijsko različni strukturi protrombina smo določili različna potencialna epitopska področja. Na molekuli, ki ima bolj zvito konformacijo (6C2W), naj bi se epitopi nahajali na domeni serinske proteaze ali pa na K2, vedno v bližini njunega stičišča, medtem ko se na nezviti konformaciji protrombina (5EDM) epitopi nahajajo na različnih domenah molekule (dvakrat na K1, enkrat na domeni serinske proteaze, enkrat pa se epitop razprostira med domeno serinske proteaze in K2).

Domnevamo, da najdeni motivi predstavljajo del konformacijskih epitopov za aPT, saj so se pojavljali že pri predhodnih raziskavah. Zanesljiva lokalizacija epitopa nam še vedno predstavlja izziv, saj je možno da se pri kompleksu dveh protrombinov, kjer je molekula sicer v zviti konformaciji, še vedno ne izpostavijo popolnoma isti neoepitopi, kakor bi se v kompleksu protrombina s fosfatidilserinom. Smiselno bi bilo testirati vezavo aPT posameznih bolnikov z različnimi kliničnimi zapleti na peptide, ki smo jih pridobili s selekcijo. S tem bi ugotovili korelacijo motiva in zapleta bolezni. Zaradi prisotnosti številnih zapletov bi morale biti število pacientov v klinični študiji izredno veliko, ali pa bi morali izbirati paciente z zgolj enim zapletom. Določitev najpomembnejših epitopov bi

omogočilo razvoj zdravilnih učinkovin, kar bi bistveno izboljšalo kvaliteto življenja bolnikov z APS.

7. Viri

1. Ambrožič A, Žigon P, Božič B, Čučnik S: Protitelesa Proti Protrombinu. Zdravstveni vestnik 2015; 84; 209-21.
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW in drugi: International consequences statemen on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). Journal of Thrombosis and Haemostasis 2006; 4(2): 259-306.
3. Atsumi T, Oku K, Amengual O, Koike T: Antiprothrombin Antibody Testing: Detection and Clinical Utility. Seminar of Thrombosis and Haemostasis 2008; 34: 335-39.
4. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML: GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. Rheumatology 2013; 52(8): 1397-1403.
5. Žigon P, Ambrožič A, Čučnik S, Kveder T, Rozman B, Božič B: Modified phosphatidylserine-dependent antiprothrombin [corrected] ELISA enables identification of patients negative for other antiphospholipid antibodies and also detects low avidity antibodies. Clinical chemistry and laboratory medicine 2011; 49(6): 1011-1018.
6. Atsumi T, Koike T: Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? Lupus 2010; 19(4): 436-9.
7. Mojca Božič-Žigon P, Frank Bertoneclj M, Ambrožič A, Hočever A, Tomšič M, Borut Božič B, Šemrl S, Kveder T, Čučnik S: Laboratory Methodology Important in the Diagnosis. Thrombosis, Atherosclerosis and Atherothrombosis 2015; 6; 105-142.
8. Žigon P, Čučnik S, Ambrožič A, Sodin Šemrl S, Kveder T, Božič B: Antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex as an additional diagnostic marker of APS? Lupus 2012; 21(7): 790-2.
9. GR. Hughes: Hughes syndrome (the antiphospholipid syndrome):a disease of our time. Inflammopharmacology 2011; 19: 69-73.
10. Willis R, Gonzalez EB, Brasier AR: The journey of antiphospholipid antibodies from cellular activation to antiphospholipid syndrome. Current Rheumatology Reports 2015; 17(3): 16.

11. Gerard E, Cervera R: Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome Current Opinion in Pulmonary Medicine. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2009; 5(5): 413–417.
12. Vozelj M: Temelji imunologije. Ljubljana, Državna založba. 2000: 1.izdaja.
13. Žager U: Značilnosti vezave protiteles proti β 2-glikoproteoinu I na antigen. Ljubljana 2011; doktorska dizertacija.
14. Microbiology and Immunology, University of South Carolina.
<http://www.microbiologybook.org/mayer/ab-ag-rx.htm>. (zadnjič dostopano 7.6.2018).
15. Su Dong Kim, Ki-Roo Shin, Byoung-Tak Zhang: Molecular immunocomputing with application to alphabetical pattern recognition mimics the characterization of ABO blood type. Evolutionary Computation. 2003; 4: 2549 - 56
16. Galli M, Barbui T: Antiprothrombin antibodies:detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. Blood journal 1999; 93(7): 2149-57.
17. Arvieux J, Darnige L, Caron C: Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with Lupus antikoagulants. Thrombosis and Haemostasis 1995; 74(4): 1120-5.
18. Rao LV, Hoang AD, Rapaport SI: Mechanism and Effects of the Binding of Lupus Anticoagulant IgG and Prothrombin to Surface Phospholipid. Blood 1996; 88: 4173-4182.
19. Akimoto T, Akama T, Kono I, Yamane K, Sumida T: Detergent and antigen fragility affect ELISA for measurement of anti - ptothrombin autoantibodies. Journal of Rheumatology 1999; 26(3): 580-7.
20. Amengual O, Atsumi T, Koike T: Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. Arthritis Rheumatology 2003; 48(4): 886-95.
21. Catalogue CPW.
<http://cambridgeproteinworks.com/catalogue/prothrombin-and-fragments/> (zadnjič dostopano 30.5.2018).
22. Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T: Relationship between clinical features and binding doma-ins of anti-prothrombin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipide syndrome. Lupus 1999; 8(9): 761–6.

23. Pengo V, Biasiolo A, Brocco T, Tonetto S, Ruffatti A: Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins in patients with thrombosis and phospholipid-reactive antibodies. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 75(5): 721-4.
24. A. Krone K, L. Allen K, R. McCrae K: Impaired fibrinolysis in the antiphospholipid syndrome. *Current Rheumatology Reports* 2011; 12(1): 53–57.
25. Kapš, P: Uporaba peptidne knjižnice pri določanju vezavnih značilnosti protiteles proti protrombinu. Magistrska naloga; *enoviti magistrski študij farmacije Ljubljana, 2018*.
26. Hwang KK, Grossman JM, Visvanathan S, Chukwuocha RU, Woods VL, Le DT, Hahn BH, Chen PP: Identification of anti-thrombin antibodies in the antiphospholipid syndrome that interfere with the inactivation of thrombin by antithrombin. *Journal of Immunology* 2001; 167(12): 7192-8.
27. Wu JR, Lentz BR: Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thrombosis and Haemostasis* 1994; 71(5): 596-604.
28. Chena Q, Stone PR, Woonb ST, Chingb LM, Hungb S, McCowanaL LME, Chamleya W: Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease? *Thrombosis Research* 2004; 122(2): 101-111.
29. Meroni L, Riboldi P: Pathogenic mechanisms of antiphospholipid syndrome: a new autoimmune disease. *Drug Discovery Today:disease mechanisms*. 2004; 1(3): 309-314.
30. Mayrose I, Penn O, Erez E, Rubinstein ND, Shlomi T, Freund NT, Bublil EM, Ruppin E, Sharan R, Gershoni JM, Martz E, Pupko T: Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics* 2007; 23(23): 3244-6.
31. Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-TOV DD, Tarnovidski Freund N, Weiss Y: Epitope mappsing: the first step in developing epitope-based Vaccines. *Biodrugs* 2007; 21(3): 145-156.
32. Bardelli M, Livoti E, Simonelli L, Pedotti M, Moraes A, Valente AP, Varani L: Epitope mapping by solution NMR spectroscopy. *Journal of Molecular Recognition* 2015; 28(6): 393-400.
33. Mimotopes the peptide company.

<http://www.mimotopes.com/peptideLibraryScreening.asp?id=94> (zadnjič dostopano 20.5.2018).

34. Weiss GA, Watanabe CK, Zhong A, Goddard A, Sidhu SS: Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. PNAS. 2000; 97(16): 8950-8954.

35. Abbott WM, Damschroder MM, Lowe DC: Current approaches to fine mapping of antigen–antibody interactions. Immunology. 2014; 142(4): 526–535.

36. New England BioLabs. Ph.D.TM Phage display libraries: Instruction manual 2.1.

37. Volker Böttger A: Epitope Mapping Using Phage Display Peptide Libraries. Epitope Mapping Protocols Human Press 2009: 181-201.

38. UMBC.

<https://allenlab.umbc.edu/research-interests-2/phage-display/>. (zadnjič dostopano 7.6.2018).

39. Smith GP: Filamentous Fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985; 228(4705): 1315-7.

40. Georgieva Y, Konthur Z: Design and Screening of M13 Phage Display cDNA Libraries Molecules. Molecules 2011; 16: 1667-1681.

41. PDB.

<https://www.rcsb.org/> (zadnjič dostopano 25.5.2018)

42. Chinnaraj M, Chen Z, Pelc LA, Grese Z, Bystranowska D, Di Cera E, Pozzi N: Structure of prothrombin in the closed form reveals new details on the mechanism of activation. Scientific Reports 2018; 8(1): 2945.

43. Chinnaraj M, Chen Z, Pelc L, Grese Z, Bystranowska D, Di Cera E, Pozzi N. 6C2W-Crystal structure of human prothrombin mutant S101C/A470C. PDB Protein data bank.

44. Absorption spectrum and quantitation of filamentous phage.

<http://www.biosci.missouri.edu/smithGp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html>. (zadnjič dostopano 11.6.2018).

45. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H:

ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Research* 2012; 40(W1): 597-603.

46. Huang J, Ru B, Li S, Lin H, Guo FB: SAROTUP: scanner and reporter of target-unrelated peptides. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 10: 19-32.

47. Huang J, Ru B, Zhu P, Nie F, Yang J, Wang X, Dai P, Lin H, Guo FB, Rao N: MimoDB 2.0: a mimotope database and beyond. *Nucleic Acids Research* 2012; 40 (Database issue): D271-D277.

48. Mayrose I, Penn O, Erez E, Rubinstein ND, Shlomi T, Tarnovitski Freund N, Bublil E, Rupin E, Sharan R, Gershoni JM, Martz E, Pupko T: Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics* 2007; 23(23): 3244-3246.

49. Mayrose I, Shlomi T, Rubinstein ND, Gershoni JM, Ruppin E, Sharan R, Pupko T: A graph-based algorithm for epitope mapping using combinatorial phage-display libraries. *Nucleic Acid Research* 2007; 35(1): 69-78.

50. Di Cera E, Pozzi N, Chen Z: How the Linker Connecting the Two Kringles Influences Activation and Conformational Plasticity of Prothrombin. *Journal of Biology and Chemistry*. 2016; 291: 6071-6082

51. 't Hoen PA, Jirka SM, Ten Broeke BR, Schultes EA, Aguilera B, Pang KH, Heemskerk H, Aartsma-Rus A, van Ommen GJ, den Dunnen JT: Phage display screening without repetitious selection rounds. *Analytical Biochemistry* 2012; 421(2): 622-631.

52. Kabir ME, Krishnaswamy S, Miyamoto M, Furuichi Y, Komiyama T: An improved phage-display panning method to produce an HM-1 killer toxin anti-idiotypic antibody. *BMC Biotechnology* 2009; 9: 99.

53. Nguyena TH, Adamkiewicz A, Heberta E, Zygiela M, Boylea R, Martonea M, Meléndez-Ríos M, Noren A: Identification and characterization of mutant clones with enhanced propagation rates from phage-displayed peptide libraries. *Analytical Biochemistry* 2014; 462: 35-43.

54. Sequence, Web logo.

<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>. (zadnjič dostopano 5.6.2018).