

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

META PAVLIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

META PAVLIČ

**VREDNOTENJE IZOLACIJE PLAZEMSKEGA PROTEINA
β₂-GLIKOPROTEINA I Z AFINITETNIMI KOLONAMI Z
RAZLIČNIMI POLNILI**

**EVALUATING OF ISOLATION PLASMA PROTEIN
β₂-GLYCOPROTEIN I USING AFFINITY COLUMN CONTAINING
VARIOUS MEDIA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma na Kliničnem oddelku za revmatologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, spec. med. biokem., in somentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici doc. dr. Saši Čučnik, spec. med. biokem., za strokovno vodenje in pomoč pri izvedbi praktičnega dela ter pri pisanju naloge. Za vse razprave o problemih, koristne nasvete pri zastavljanju ter oblikovanju magistrskega dela se zahvaljujem somentorju prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm. Hvala obema za ves čas, ki sta ga namenila za podroben pregled in popravke, ki so prispevali h končni obliki naloge. Zahvaljujem se tudi Tinki Švec, mag. lab. biomed., za usmerjanje, pomoč, čas in potrpežljivost pri izvajanju eksperimentalnega dela. Zahvala gre tudi sodelavkam Laboratorija za imunologijo revmatizma za prijaznost in pomoč pri delu.

Rada bi se zahvalila še svojim domačim in prijateljem za podporo, spodbudo in potrpežljivost tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, spec. med. biokem., in somentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm.

Ljubljana, oktober 2016

Meta Pavlič

KAZALO

KAZALO.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1. Antifosfolipidni sindrom	1
1.2. β_2-glikoprotein I	2
1.2.1. Struktura β_2 -glikoproteina I.....	3
1.2.2. Konformacija β_2 -glikoproteina I	4
1.3. Anti-β_2GPI protitelesa	5
1.3.1. Vloga kompleksov anti- β_2 GPI - β_2 GPI.....	6
1.4. Heparin	8
1.4.1. Vloga heparina pri izolaciji β_2 GPI	10
1.5. Izolacija β_2GPI.....	11
2. NAMEN DELA.....	12
3. MATERIALI	13
3.1. Kemikalije.....	13
3.2. Reagenti.....	13
3.3. Priprava pufrov	14
3.3.1. Pufri za afinitetno kromatografijo.....	14
3.3.2. Pufri za ionsko-izmenjevalno kromatografijo	15
3.3.3. Pufri za elektroforezo	16
3.3.4. Pufri za ELISA test	16
3.4. Laboratorijska oprema.....	17
3.4.1. Izolacija	17
3.4.2. Določanje čistosti izolata.....	17
4. METODE.....	19
4.1. Izolacija.....	19

4.1.1.	Priprava vzorca	19
4.1.2.	Afinitetna kromatografija	20
4.1.3.	Ionsko-izmenjevalna kromatografija.....	22
4.2.	Določanje čistosti izolata	24
4.2.1.	Denuracijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE).....	24
4.2.2.	Določanje antigenskih lastnosti β_2 gpi z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu	25
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1.	Plazma	28
5.2.	Nespecifično obarjanje s perklorovo kislino	29
5.3.	Sistem za nizekotlačno kromatografijo	30
5.4.	Izolacija z uporabo afinitetne kolone Heparin Sepharose CL-6B	30
5.5.	Izolacija z afinitetno kolono HiPrep Heparin Fast Flow 16/10	35
5.6.	Izolacija z afinitetno kolono Heparin Separopore (Agarose) 4B	37
5.7.	Izolacija z afinitetno kolono Blue-Separopore 6B-CL.....	39
5.8.	Primerjava izolacije s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL.....	44
5.8.1.	Izolacija	44
5.8.2.	SDS-PAGE.....	46
5.8.3.	ELISA	47
5.8.4.	Izkoristek	48
5.9.	Primerjava izolacije β_2 GPI z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4°C in na sobni temperaturi	49
5.9.1.	Izolacija	50
5.9.2.	SDS-PAGE.....	53
5.9.3.	ELISA	53
5.9.4.	Izkoristek	55
5.10.	Zaključek	56
6.	SKLEPI.....	57
7.	LITERATURA.....	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Kristalna struktura β_2 GPI.	4
Slika 2: Interakcija pete domene β_2 GPI z anionskimi fosfolipidi.....	4
Slika 3: Shema pretvorbe β_2 GPI iz krožne v razprto aktivno konformacijo.	5
Slika 4: Analiza β_2 GPI molekule z elektronskim mikroskopom.....	5
Slika 5: Zaporedje dogodkov, ki vodijo do aktivacije celic preko kompleksov protitelo- β_2 GPI.	7
Slika 6: Shematski prikaz interakcije β_2 GPI s heparinom v prisotnosti plazmina.	9
Slika 7: CNBr aktivacija agaroze in vezava liganda.....	10
Slika 8: Matrica heparinske afinitetne kolone.	10
Slika 9: Različne izvedbe metode ELISA.	25
Slika 10: Shematski prikaz prečnih povezav agaroze.....	31
Slika 11: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone Heparin Sepharose CL-6B, izrisan s programom LP Data View..	32
Slika 12: Grafični prikaz izmerjene absorbanca vsake zbrane frakcije pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop, po eluciji iz afinitetne kolone Heparin Sepharose CL-6B.	33
Slika 13: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone Mono S TM 5/50 GL, izrisan s programom LP Data View.....	34
Slika 14: Grafični prikaz izmerjenih absorbanca zbranih frakcij izmerjenih pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop po eluciji s kationske kolone Mono S TM 5/50 GL.	34
Slika 15: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone HiPrep Heparin Fast Flow 16/10, izrisan s programom LP Data View.	36
Slika 16: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone Heparin-Sepapopore Agarose 4B, izrisan s programom LP Data View.....	38
Slika 17: Barvilo Cibacron Blue F3GA kovalentno vezano na agarozno kroglico.	39
Slika 18: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone Blue-Sepapopore 6B-CL, izrisan s programom LP Data View.	41
Slika 19: Grafični prikaz izmerjenih absorbanca vsake zbrane frakcije pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop po eluciji iz afinitetne kolone Blue-Sepapopore 6B-CL.	42
Slika 20: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone Mono S TM 5/50 GL, izrisan s programom LP Data View.....	43
Slika 21: Grafični prikaz izmerjene absorbanca vsake zbrane frakcije pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop po eluciji s kationske kolone Mono S TM 5/50 GL.	43
Slika 22: Primerjava absorbanca eluiranega proteina po frakcijah pri izolaciji s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Sepapopore 6B-CL.	45
Slika 23: Primerjava absorbanca eluiranega proteina s kationske kolone po frakcijah po izolaciji s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Sepapopore 6B-CL.	45
Slika 24: Elektroforezna gela slikana v G:BOX-u.	46
Slika 25: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone pri 4°C, izrisan s programom LP Data View.	51
Slika 26: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone na sobni temperaturi, izrisan s programom LP Data View.	51

Slika 27: Primerjava absorbanc eluiranega proteina iz kationske kolone po frakcijah pri izolaciji β_2 GPI z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4°C in sobni temperaturi.	52
Slika 28: Elektroforezni gel slikan v G:BOX-u.	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz uporabljenih izhodiščnih materialov in pufrov za pripravo različnih afinitetnih kolon.	21
Preglednica 2: Pufri za regeneracijo različnih afinitetnih kolon.	22
Preglednica 3: Primeri ionskih izmenjevalcev.	22
Preglednica 4: Značilnosti polnila Heparin Sepharose CL-6B.	31
Preglednica 5: Zbrani vrhovi izolacije.	35
Preglednica 6: Primerjava značilnosti polnil komercialno pripravljene kolone HiPrep Heparin FF 16/10 in obstoječe Heparin Sepharose CL-6B.	35
Preglednica 7: Značilnosti polnila Heparin Separopore (Agarose) 4B.	37
Preglednica 8: Značilnosti polnila Blue-Separopore 6B-CL.	40
Preglednica 9: Zbrani vrhovi izolacije po ionsko-izmenjevalni kromatografiji.	44
Preglednica 10: Primerjava absorbanc med samim postopkom izolacije z afinitetno kolono Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL.	44
Preglednica 11: Primerjava volumnov in absorbanc posameznih vrhov izolacij s kationsko kolono po izolaciji s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL.	46
Preglednica 12: Primerjava antigenske čistosti 2. in 3. vrha izolacije β_2 GPI s Heparin Sepharose CL-6B z referenčnim vzorcem.	47
Preglednica 13: Primerjava antigenske čistosti 3. vrha izolacije β_2 GPI z Blue-Separopore 6B-CL z referenčnim vzorcem.	48
Preglednica 14: Prikaz volumnov, koncentracij, mas in izkoristka izolacij s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL.	49
Preglednica 15: Značilnosti kationske kolone Mono S TM 5/50 GL.	50
Preglednica 16: Primerjava absorbanc med samim postopkom izolacije z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na 4 °C in sobni temperaturi.	50
Preglednica 17: Primerjava volumnov in absorbanc posameznih vrhov izolacij z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4 °C in na sobni temperaturi.	52
Preglednica 18: Primerjava antigenske čistosti 2. in 3. vrha izolacije β_2 GPI z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na 4 °C glede na referenčni vzorec.	54
Preglednica 19: Primerjava antigenske čistosti 2. vrha izolacije β_2 GPI z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na sobni temperaturi glede na referenčni vzorec.	54
Preglednica 20: Prikaz volumnov, koncentracij, mas in izkoristka izolacij z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na 4 °C in sobni temperaturi.	55

POVZETEK

Antifosfolipidni sindrom je avtoimunska bolezen, za katero je značilna prisotnost antifosfolipidnih protiteles pri bolnikih s trombozami ali z zapleti v nosečnosti. Za potrjevanje diagnostike se s pomočjo encimsko-immunske metode ELISA dokazuje protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I v bolnikovem krvnem obtoku. Kofaktor β_2 -glikoprotein I (β_2 GPI) predstavlja najpomembnejši antigen za nastanek imunskih kompleksov z antifosfolipidnimi protitelesi, ki vodijo v izražanje različnih kliničnih znakov in razvoj bolezni. Postopek izolacije β_2 GPI iz zdravih krvodajalcev vključuje številne metode, med katerimi sta najpomembnejši afinitetna in ionsko-izmenjevalna kromatografija. Namen naše naloge je bil najprej nadomestiti obstoječo afinitetno kolono v postopku izolacije β_2 GPI z novo kolono in preveriti njeno enakovrednost v izkoristku in čistosti ter antigenski uporabnosti β_2 GPI v laboratorijski diagnostiki APS, nato pa še optimizirati ionsko-izmenjevalno kromatografijo v postopku izolacije β_2 GPI. Z obarjanjem proteinov, ultrafiltracijo vzorca, afinitetno in ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo iz plazme izolirali tarčni β_2 -GPI, katerega čistost in ohranjenost antigenskih determinant smo potrdili z elektroforezno ločbo ter s testom ELISA. Za najprimernejšo zamenjavo kolone se je izkazalo polnilo Blue-Sepapopore 6B-CL, ki ima za afinitetni ligand vezano sintetično barvilo Cibacron Blue F3GA. Preizkušeni heparinski koloni HiPrep Heparin Fast Flow 16/10 in Heparin Sepapopore (Agarose) 4B sta se izkazali za neuspešni pri izolaciji zelenega proteina. V drugem delu magistrske naloge smo optimizirali še ionsko-izmenjevalno kromatografijo, pri čemer smo primerjali izvedbo kationske kromatografije pri 4 °C in na sobni temperaturi. Slednja se je izkazala za veliko primernejšo, saj smo uspešno izolirali višji izkoristek tarčnega glikoproteina.

Ključne besede: Antifosfolipidni sindrom, β_2 -glikoprotein I, protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I, afinitetna kromatografija, ionsko-izmenjevalna kromatografija, ELISA.

ABSTRACT

The antiphospholipid syndrome is an autoimmune disease with a characteristic presence of antiphospholipid antibodies in patients with thrombosis or pregnancy morbidity. To confirm the diagnostic, the antibodies for β_2 -glycoprotein I in patient's bloodstream are proven with help of the enzyme-linked immunoassay ELISA. The cofactor β_2 -glykoprotein I (β_2 GPI) represents the most important antigen for the formation of immune complexes with antiphospholipid antibodies that lead into the expression of various clinical manifestations and the development of the disease. The procedure for the isolation of β_2 GPI from plasma pulled from apparently healthy donors includes many methods, the most important being the affinity and the ion-exchange chromatography. The aim of our thesis was to first replace the existing affinity column in the β_2 GPI isolation procedure with a new column and verify its equivalence in yield and purity, and the β_2 GPI antigen functionality, and secondly to optimise the ion-exchange chromatography in the β_2 GPI isolation procedure. Using the precipitation of proteins, an ultrafiltration sample, the affinity and the ion-exchange chromatography we isolated from plasma the target β_2 GPI. The purity and conservation of antigen properties were confirmed with the electrophoretic separation and the ELISA. The most appropriate column replacement proved to be the Blue-Sepapopore 6B-CL matrix that has immobilized the Cibacron Blue F3GA synthetic dye as the affinity ligand. The tested heparin columns HiPrep Heparin Fast Flow 16/10 and Heparin Sepapopore (Agarose) 4B proved to be inefficient in the isolation of the desired protein. In the second part of the master thesis the ion-exchange chromatography was optimised, while the execution of the cation chromatography was compared at 4 °C and at room temperature. The latter proved to be more suitable because we managed to isolate a higher yield of target glycoprotein.

Key words: antiphospholipid syndrome, β_2 -glycoprotein I, antibodies against β_2 -glycoprotein I, affinity chromatography, ion exchange chromatography, ELISA.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	Absorbanca
aCL	Protitelesa proti kardiolipinu
Anti-β_2GPI	Protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I
aPL	Protitelesa proti fosfolipidom
APS	Antifosfolipidni sindrom
DEA	Dietanolamin
ELISA	Encimsko-immunska metoda na trdnem nosilcu
Ig	Imunoglobulini
LA	Lupusni antikoagulanti
LPS	Lipopolisaharid
oxLDL	Oksidiran lipoprotein nizke gostote
PBS	S fosfatom pufrana fiziološka raztopina
SCR	Podobne kratke ponovitve (ang. short consensus repeat)
SDS-PAGE	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza
SF	Sterilna filtracija
T	Temperatura
V	Volumen
β_2GPI	β_2 -glikoprotein I

1. UVOD

1.1. ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM

Antifosfolipidni sindrom (APS) je pridobljena avtoimunska trombofilija, ki vodi v ponavljajoče se tromboze in/ali zaplete v nosečnosti. Za bolezen je značilna prisotnost heterogene populacije avtoprotiteles, usmerjenih proti plazemskim proteinom, ki vežejo fosfolipide (aPL) (1). Raziskave kažejo, da imajo s protitelesi aktivirane endotelijske celice, monociti, trombociti in komplement glavno patološko vlogo (2). Nastanek bolezni in klinični razvoj simptomov pa so pogojeni z genetskimi značilnostmi in okoljem (3). APS se lahko kot primarna motnja pojavi samostojno, običajno pa nastopi v povezavi z drugo avtoimunsko boleznijo, na primer sistemskim lupusom eritematozusom (sekundarni APS) (4).

Za diagnozo APS mora bolnik izpolnjevati enega izmed kliničnih in enega izmed laboratorijskih kriterijev (5). Klinična merila določajo enega ali več primerov tromboz v arteriji, veni ali malem žilju (5, 6). Te lahko prizadenejo katerikoli organ in pri nezdravljenih bolnikih vodijo v sistemske, več organske odpovedi z visoko stopnjo umrljivosti (7). Pomembno klinično merilo postavljajo tudi nosečniški zapleti, kot so ponavljajoče se izgube ploda, prezgodnje rojstvo ter eklampsije in hujše preeklampsije (5, 6). Čeprav imajo bolniki z APS pogosto prisotno trombocitopenijo, bolezen srčnih zaklopk, nevropatijo, kožno bolezen (*livedo reticularis*) ali hemolitično anemijo, te lastnosti zaradi nizke klinične specifičnosti niso vključene v klinične kriterije (8).

Za izključitev ali potrditev diagnoze APS je potrebno opraviti še laboratorijska testiranja z uporabo imunoloških ali koagulacijskih metod. Med imunološka določanja uvrščamo encimsko imunsko metodo na trdem nosilcu (ELISA) za detekcijo protiteles, pri koagulacijskih metodah pa aPL določamo posredno z merjenjem njihovega vpliva na strjevanje krvi (7).

Laboratorijski kriteriji (5):

- 1) Srednje ali visoko pozitivne vrednosti protiteles proti kardiolinu (aCL) izotipa IgG in/ali IgM v serumu ali plazmi, izmerjene vsaj dvakrat v obdobju 12 tednov s standardizirano ELISA.

- 2) Prisotnost protiteles proti β_2 -glikoproteinu I (anti- β_2 GPI) izotipa IgG in/ali IgM v serumu ali plazmi (v titru > 99 percentila), ki so določena ob najmanj dveh dogodkih, ki sta v razmiku najmanj 12 tednov in izmerjena s standardizirano ELISA.
- 3) Lupusni antikoagulant (LA), prisotni v plazmi vsaj dvakrat v razmiku 12 tednov.

Laboratorijske preiskave so zasnovane na dokazovanju povišanih vrednosti patoloških avtoprotiteles, ki jih splošno poimenujemo aPL. Kljub takšnemu izrazu se aPL ne vežejo neposredno na fosfolipide, ampak so njihovi paratopi usmerjeni proti številnim kofaktorjem. Med te sodijo β_2 GPI, protrombin, protein C, protein S, aneksin V in koagulacijski faktor XII (9). Najpomembnejša avtoprotitelesa, odgovorna za podaljšan čas koagulacije pri testu LA, so anti- β_2 GPI in protitelesa proti protrombinu (10). aCL protitelesa se lahko vežejo neposredno na kardiolipin ali na komplekse protein-kardiolipin. Kardiolipin-vezavni proteini so β_2 GPI ali kateri drugi kofaktorji, zato so aCL prisotna tudi pri številnih okužbah (sifilis, hepatitis C, HIV, bakterijska sepsa) (11, 12). Kasneje so ugotovili, da je ravno β_2 GPI najpomembnejši antigen v krvi bolnikov z APS, proti kateremu so usmerjena najbolj razširjena in za bolezen značilna anti- β_2 GPI (13). Od takrat je anti- β_2 GPI-ELISA pogosto uporabljena metoda za diagnostiko sindroma, ki za določanje zahteva izolacijo samega β_2 GPI (11).

1.2. β_2 -GLIKOPROTEIN I

Protein β_2 GPI je bil prvič opisan leta 1961 kot komponenta beta globulinov v humanem serumu (14). Molekulo so uvrstili med apolipoproteine in ji nadelo alternativno ime apolipoprotein H, kot jo nekateri poimenujejo še danes. Dokazali so, da je takšen naziv neustrezen, saj protein ni vgrajen ali povezan z lipoproteinskimi delci (15). Zanimanje za β_2 GPI je poraslo šele od leta 1990, ko so ugotovili njegovo antigensko funkcijo za vezavo aPL pri APS (13). V številnih raziskavah ga povezujejo z nastankom krvnega strdka, fibrinolizo, celično aktivacijo, imunskim odzivom, aterosklerozo, apoptozo, angiogenezo in izgubo ploda (16-20). Čeprav je njegova specifična funkcija še nejasna, naj bi igral ključno vlogo tako pri koagulacijskih kot tudi pri antikoagulacijskih procesih (16). Posamezniki s pomanjkanjem β_2 GPI so kljub vsemu klinično zdravi in brez trombotičnih zapletov ali težav s krvavitvijo (21).

β_2 GPI je enoverižni plazemski glikoprotein z velikostjo 54 kDa, sintetiziran predvsem v jetrih, pa tudi v placenti in črevesnih epiteljskih celicah (22). Pri zdravih posameznikih kroži po krvi

glede na genetski vpliv s spremenljivo koncentracijo 5-50 mg/l (23). S povprečno vrednostjo 20 mg/l je poleg fibrinogena najboljšežnejši plazemski protein, vpleten v koagulacijo (22, 23). Njegova koncentracija se povišuje s starostjo, pri APS ali kroničnih infekcijah, znižuje pa se pri nosečnicah in bolnikih, ki so doživeli možgansko kap ali miokardni infarkt (24). Povišane vrednosti so poleg staranja pogojene s kajenjem, moškim spolom in hiperlipidemijo (25).

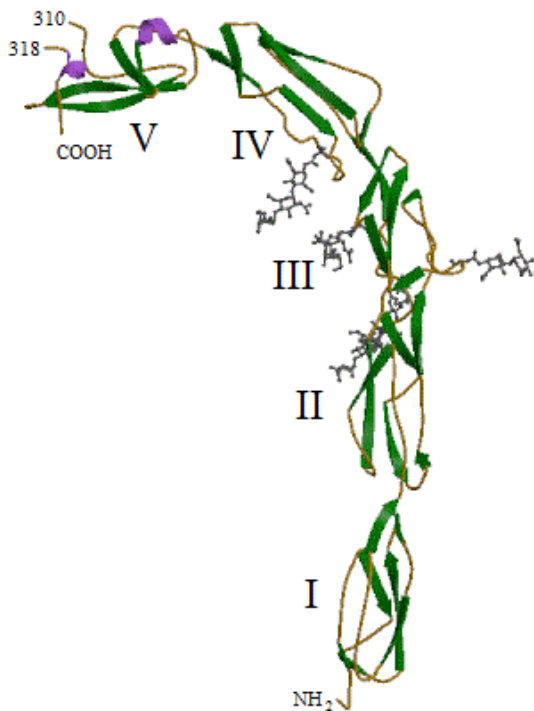
Zaradi specifične aminokislinske sestave je β_2 GPI zelo fleksibilna molekula. V plazmi se običajno nahaja v krožni konformaciji, ki pa jo prilagaja glede na interakcije z okolico (23). Po krvi kroži večinoma v prosti obliki, ker pa gre za adhezijsko molekulo, lahko sodeluje s številnimi drugimi proteini ali veže negativno nabite površine, kot so anionski fosfolipidi, heparin, DNA, oksidirani lipoproteini z nizko gostoto (oxLDL) in apoptotične celice (17). Gen za protein je zapisan na kromosomu 17q23-24 in je med sesalci evolucijsko visoko ohranjen, kar mogoče nakazuje na njegovo pomembno vlogo v našem telesu (23).

1.2.1. STRUKTURA β_2 -GLIKOPROTEINA I

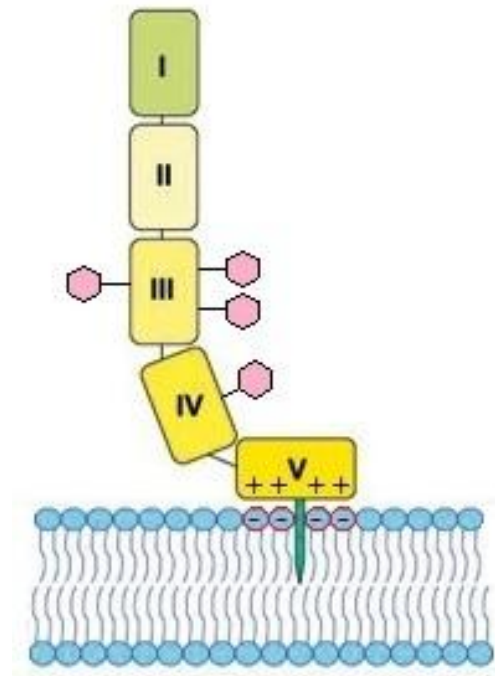
Protein sestavlja 326 aminokislin, sedem N-acetilglukozaminov in štiri manoze (26). Aminokislinsko zaporedje je razporejeno v pet strukturno podobnih kratkih ponovitev (short consensus repeat – SCR), kar β_2 GPI uvršča v družino kontrolnih proteinov komplementa (27). Vsaka od prvih štirih domen je sestavljena iz 61 aminokislin, med katerimi so štirje cisteini, povezani z dvema v celoti ohranjenima disulfidnima vezema (4). Peta domena se strukturno razlikuje od ostalih, saj ima dodatnih 6 aminokislinskih ostankov, C-terminalni podaljšek iz 19 aminokislin in dodatno disulfidno vez, ki povezuje C-terminalni cistein (23).

Kristalna struktura β_2 GPI, izoliranega iz humane plazme, prikazuje "J" oblikovano molekulo (slika 1). Čeprav se protitelesa lahko vežejo na vsako izmed petih domen, avtoprotitelesa bolnikov z APS primarno reagirajo z aminokislinama Arg39 in Arg43 znotraj prve domene (28). Tretja SCR je s tremi N-glikoziliranimi mesti najbolj glikozilirana, četrti glikan pa se nahaja na četrti domeni (26). Ogljikovi hidrati predstavljajo približno 17 % molekulske mase proteina in delno ščitijo domeni pred interakcijami protein-protein in proteolizo (29). Terminalni podaljšek pete SCR je bogat z lizini, kar daje domeni celokupno pozitiven naboj. Sestava hidrofobne zanke Ser311-Lys317 ima odlične lastnosti za tvorjenje elektrostatskih sil z negativnimi amfifilnimi strukturami (26). Tako pozitivni naboj pete domene interagira z

anionskimi fosfolipidi, omenjena fleksibilna zanka pa zasidra molekulo β_2 GPI v lipidno membrano, kot je prikazano na sliki 2 (29).



Slika 1: Kristalna struktura β_2 GPI (30).
Raztegnjena veriga zaporedno nanizanih pet SCR domen z N-glikoziliranimi mesti.

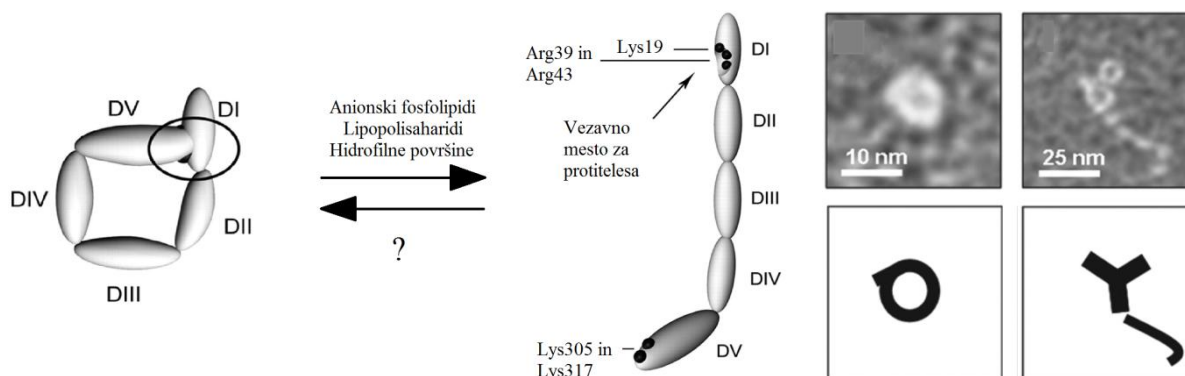


Slika 2: Interakcija pete domene β_2 GPI z anionskimi fosfolipidi (31).
Grafični prikaz petih domen β_2 GPI z glikani kot šesterokotniki in hidrofobno zanko umeščeno v membranski dvosloj. Pozitivni naboj terminalnega podaljška pete domene označen s + veže negativno nabite fosfolipide označene z -.

1.2.2. KONFORMACIJA β_2 -GLIKOPROTEINA I

Kljub veliki koncentraciji β_2 GPI in aPL v bolnikovem krvnem obtoku, niso uspeli dokazati krožečih kompleksov protitelo-antigen. Iz tega so sklepali, da mora biti epitop za avtoprotitelesa na β_2 GPI kriptičen. Posledično se mora konformacija v plazmi razlikovati od konformacije proteina na mikrotiterski plošči za detekcijo protiteles z ELISA (32). Ugotovili so, da se β_2 GPI v plazmi lahko nahaja v dveh različnih konformacijah (slika 3). Elektronska mikroskopija je pokazala, da z vezavo protitelesa protein zavzema obliko črke "J", v odsotnosti aPL pa je le-ta v nativni krožni obliki, kot je prikazano na sliki 4 (28). V plazmi se aminokislina Lys19, Arg39 in Arg43 na prvi domeni stikajo z Lys305 in Lys317 pete domene glikoproteina. Iz slike 3 je razvidno, da so v takem primeru glavni epitopi skriti in za imunski sistem neprepoznalni (16). To pojasni prisotnost aPL tudi pri asimptomatičnih posameznikih, kjer lahko proteini in protitelesa ločeno krožijo po krvi (32). Po izpostavitvi β_2 GPI anionskim

strukturam, kot so negativno nabiti fosfolipidi, lipopolisaharidi ali hidrofilne površine, se peta domena z njimi poveže in krožna struktura se razpre. Pri konformacijski spremembi se prikažejo kriptični epitopi, prepoznavni za aPL, ki odprto strukturo z vezavo še stabilizirajo (28, 33).



Slika 3: Shema pretvorbe β_2 GPI iz krožne v razprto aktivno konformacijo (28).

β_2 GPI z označenimi petimi domenami se v plazmi nahaja v zaprti obliki. S krogom je označeno mesto stikanja prve in pete domene, pri čemer so aminokisliline odgovorne za vezavo anti- β_2 GPI protiteles skrite. Pri vezavi na negativno nabite površine se molekula razpre in razkrije vezavno mesto za protitelesa.

Slika 4: Analiza β_2 GPI molekule z elektronskim mikroskopom (28).

Na levi je izoliran plazemski protein v nativni krožni obliki. Na desni je fotografija β_2 GPI v "J" konformaciji v prisotnosti protitelesa, usmerjenega proti prvi domeni glikoproteina.

Zaradi izjemne fleksibilnosti se oblika β_2 GPI prilagaja glede na okolje, kar so dokazali z dializiranjem izoliranega proteina pri visokem pH in visoki ionski jakosti. Rezultat so bile razprte, kljukaste molekule, ki so se z dializo v nizkem pH ponovno zaprle v krožno konformacijo. Ugotovili so, da je plazemski protein 91 % v krožni in 9 % v kljukasti J-konfiguraciji (28).

1.3. ANTI- β_2 GPI PROTITELESA

Anti- β_2 GPI se določajo rutinsko kot laboratorijski klasifikacijski označevalec pri opredelitvi APS z metodo anti- β_2 GPI ELISA. Anti- β_2 GPI so izredno heterogena skupina protiteles, ki so sicer usmerjena proti istemu antigenu, a različna v prepoznavanju epitopov, avidnosti in mehanizmu delovanja. Razlika v delovanju protiteles se kaže v različni patogenosti in klinični manifestaciji bolezni (34).

Z raziskavo razlik v avidnosti med protitelesi so ugotovili, da visoko avidna anti- β_2 GPI ustvarjajo komplekse z β_2 -GPI pri nižji koncentraciji kot protitelesa z nizko avidnostjo, pri čemer oblikujejo tudi močnejšo vezavo antigen-protitelo (35). Poleg tega visoko avidna anti-

β_2 GPI prepoznajo nativne epitope ne glede na konfiguracijo glikoproteina, za razliko od nizko afinitetnih protiteles, katerih epitopi so v krožni molekuli β_2 GPI nedostopni (33). Prav zaradi takšnih razlik naj bi bili bolniki s homogenejšo populacijo visoko avidnih anti- β_2 GPI bolj nagnjeni k razvoju hujše oblike APS kot posamezniki s heterogenim profilom protiteles (35). Čučnik in sodelavci pa so dokazali še, da je prisotnost visoko avidnih anti- β_2 GPI povezana z venskimi trombozami v preteklosti, s katerimi bolniki z nizko avidnimi protitelesi niso imeli težav (36). Iz naštetih razlogov je bolnikom smiselno spremljati avidnost anti- β_2 GPI, ki z napredovanjem patogeneze APS narašča.

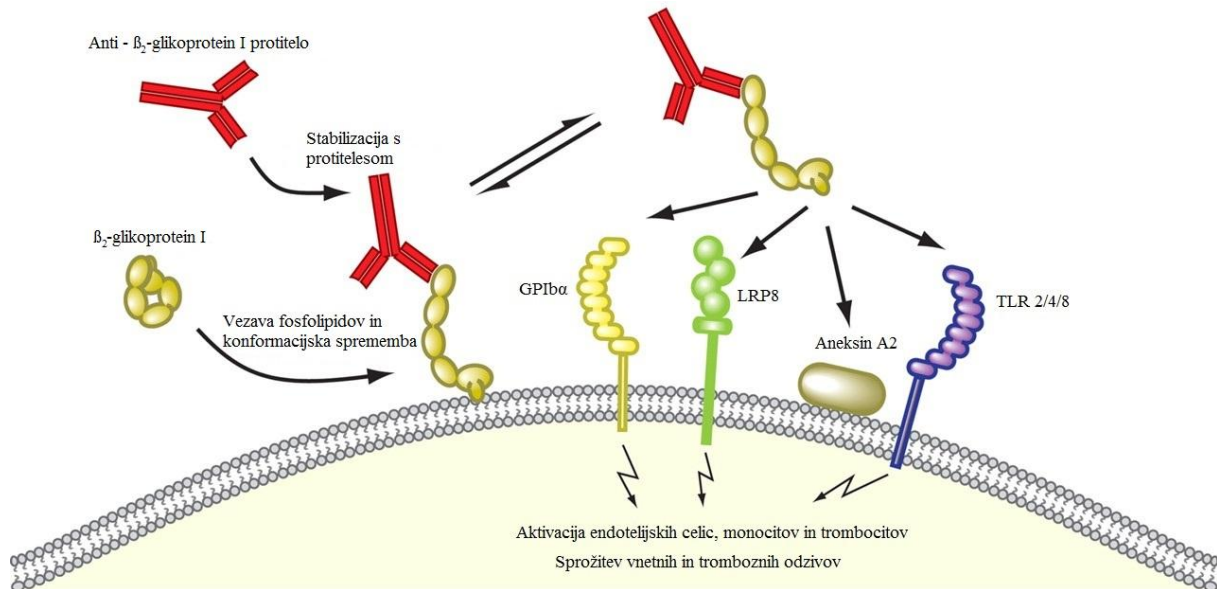
Heterogenost protiteles se kaže tudi v paratopski raznolikosti, saj se vežejo na različne domene β_2 GPI molekule. Raziskave protiteles proti prvi domeni kažejo močnejšo korelacijo s trombozami in nosečniškimi zapleti glede na protitelesa, ki vežejo preostale domene (37). 4. in 5. domeno SCR prepoznavajo predvsem protitelesa pri aPL-pozitivnih asimptomatskih osebah, posameznikov z gobavostjo in otrocih z atopičnim dermatitisom (38). Vezana protitelesa se razlikujejo tudi v izotipu. Podskupina IgG protiteles, usmerjenih proti prvi domeni β_2 GPI, ima najpomembnejšo vlogo pri patologiji in trombotičnih zapletih APS (34). IgM so redkeje povezana s kliničnimi znaki. V nedavni študiji so bolnikom, ki so izpolnjevali diagnostične kriterije APS, a bili negativni glede na laboratorijska merila, dokazali prisotnost imunoglobulinov A proti β_2 GPI. IgA anti- β_2 GPI naj bi bila tudi neodvisen rizični kazalec pri razvoju ateroskleroznih znakov, kot so akutni miokardni infarkt in ishemična možganska kap (38).

Etiologija anti- β_2 GPI naj bi izhajala iz naravnega protitelesnega repertoarja. Takšna protitelesa so prisotna v cirkulaciji že pred antigenskim dražljajem in lahko reagirajo s številnimi (tudi telesu lastnimi) antigeni. Raziskave kažejo, da imajo številni zdravi posamezniki nizek titer nizko-avidnih protiteles, razlog za njihov prehod iz neškodljivih v patogeno pa ostaja nepojasnen (37).

1.3.1. VLOGA KOMPLEKSOV ANTI- β_2 GPI - β_2 GPI

Glikoprotein s svojo hidrofobno zanko interagira z negativno nabitimi fosfolipidi, ki so pri APS najpogosteje fosfatidilserini, fosfatidilinozitol, fosfatidilna kislina in seveda kardiolipini. V kompleksu se protitelo- β_2 GPI veže tudi na številne receptorje, kot so Tollu-podobni receptorji (TLR 2, TLR 4), aneksin A2, trombocitni adhezivni receptor glikoprotein Iba in LDL

receptor-vezani protein (LRP8, poznan tudi kot ApoER2), ki so prisotni na različnih celičnih vrstah, vključno z endotelijskimi celicami, trombociti, monociti in trofoblasi. Vezava lahko povzroči znotrajcelično signalizacijo in vnetne odzive (slika 5) (38).



Slika 5: Zaporedje dogodkov, ki vodijo do aktivacije celic preko kompleksov protiteleso-β₂GPI (37).

Patogena anti-β₂GPI v krvnem obtoku ne prepoznavajo β₂GPI. Pri izpostavitvi negativnih fosfolipidov na površini se protein β₂GPI veže in spremeni konformacijo. Z izpostavitvijo kriптиčnih epitopov postane prepoznaven za avtoprotitelesa, ki stabilizirajo kompleks in sčasoma interagirajo z receptorji, kot so GPIIbα (glikoprotein Iba), LRP8 (LDL receptor-vezani protein), aneksin A2 in TLR 2/4/8 (Tollu podobni receptor 2, 4 ali 8).

Naravna asimetrija celične membrane se lahko pri aktivaciji celice, apoptozi ali nekaterih patoloških stanjih poruši. Zaradi povišanega vdora kalcijevih ionov pride do reorganizacije lipidov. Na površini se izpostavijo številni fosfolipidi, ki so običajno na citosolni strani celice, kar poruši ravnotežje membranskega dvosloja. Monociti in makrofagi so odgovorni za prepoznavo ter odstranitev tako poškodovanih celic. V kolikor so pri svoji nalogi neuspešni, lahko pride do razvoja vnetja in avtoimunskih bolezni (23, 39).

1.3.1.1. Aktivacija celice

Z anti-β₂GPI aktivirane endotelijske celice povzročijo izražanje številnih adhezijskih molekul in sproščanje tkivnega faktorja, ki je začetnik zunanje poti koagulacije. Slednjega poleg citokinov povečano proizvajajo tudi aktivirani monociti (18). Interakcija β₂GPI z glikoproteinskim Iba receptorjem in LRP8 omogoča anti-β₂GPI prečno povezavo z receptorji in s tem aktivacijo trombocitov. Ekspresija glikoproteina 2b-3a in sinteza tromboksana A2 povečuje agregacijo krvnih ploščic, ki imajo ključno vlogo za nastanek tromboze pri APS (19).

1.3.1.2. Aktivacija komplementa

V zadnjem času se aktivacijo komplementa predvsem povezuje z nosečniškimi zapleti pri patofiziologiji APS (20). Kompleksi anti- β_2 GPI- β_2 GPI se pri nosečnici usmerijo v trofoblastne celice placente, katere sprožijo aktivacijo komplementnega sistema po klasični poti. Preko C3 in kasneje konvertaze C5 se sprosti anafilatoksin C5a, ki aktivira polimorfonuklerane levkocite in monocite ter spodbuja izločanje vnetnih mediatorjev. Končni rezultat vodi do nastanka tromboz v posteljici in poškodb ploda, kar poveča verjetnost spontanega splava pri nosečnicah z APS.

1.3.1.3. Čistilec

β_2 GPI se v krvnem obtoku obnaša tudi kot čistilec apoptoznih celic. Izpostavljeni fosfatidilserini na površini apoptozne celice so tarča za β_2 GPI, nastali kompleks pa prepoznavajo receptorji LRP makrofagov, ki spodbujajo fagocitozo (32). Glikoprotein se je izkazal tudi pri nevtralizaciji lipopolisaharidov (LPS), prisotnih v zunanji steni Gramnegativnih bakterij. Aktivno kljukasto obliko β_2 GPI v kompleksu z LPS prepoznavajo in internalizirajo makrofagi. Čiščenje LPS prepreči njihovo vezavo na TLR4 receptorje, kar zmanjša ekspresijo vnetnih mediatorjev, kot so TNF- α , IL-6 in IL-8 (40).

1.3.1.4. Ateroskleroza

Dislipidemija (oksidativne modifikacije LDL – oxLDL), kronično vnetje in imunski procesi v arterijski steni lahko s pomočjo β_2 GPI povzročijo znotraj celično kopičenje lipidov v makrofagih, kar igra ključno vlogo v inicijaciji in napredovanju ateroskleroznih sprememb. V nasprotju z nativnim LDL se β_2 GPI lahko veže na oxLDL, kar tvori stabilen imunogen in aterogen kompleks. Glikoprotein služi kot tarča avtoimunih anti- β_2 GPI, kar pospeši dotok oxLDL v makrofage. Avtoimunski odziv je pomemben korak pri razvoju maščobne lehe in aterosklerotičnega strdka (17, 18).

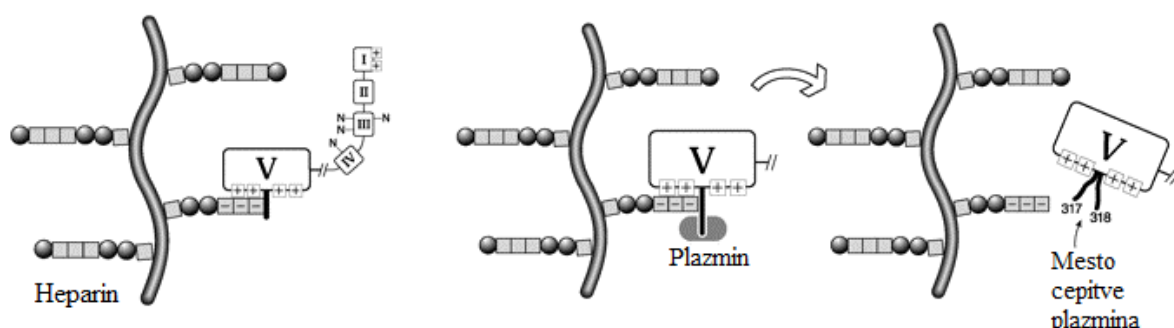
1.4. HEPARIN

Bolnikom z diagnosticiranim APS predpišejo antikoagulacijska in antiagregacijska zdravila (6). Za preprečevanje koagulacije in trombotičnih zapletov se običajno uporablja antagonist vitamina K, ki zavirajo gama-glutamil karboksilacijo faktorjev II, VII, IX, X ter proteina C in S. Zaradi ozkega terapijskega okna je potrebno spremljati pacientov protrombinski čas (41, 42). Trenutno zdravljenje nosečnic z APS temelji na nizkem odmerku acetilsalicilne kisline in

višjem preventivnem odmerku nizkomolekulskega heparina. S takšno kombinacijo zdravljenja od začetka nosečnosti in še najmanj 6 tednov po porodu kar 78 % nosečnic z APS rodi zdravega otroka (6, 41).

Naravni heparin je polimer, sestavljen iz ponavljajočih sulfatnih disaharidnih enot in je predstavnik glukozaminoglikanov iz družine ogljikovih hidratov. Deluje kot naravni antikoagulant, ki ga proizvajajo bazofilci in mastociti. V primeru poškodbe tkiva se iz sekretornih granul sprosti v krvni obtok in preprečuje nastanek ali razširjanje krvnega strdka. Z injiciranjem se ga medicinsko uporablja za preprečevanje globokih venskih tromboz, pljučne embolije in miokardnega infarkta. Heparin in njegovi nizkomolekulski derivati se vežejo na encimski inhibitor antitrombin III, ki inaktivira trombin in druge proteaze, vključene v strjevanje krvi (43).

Vendar pa heparin nima le direktnega učinka na preprečevanje koagulacije pri bolnikih z APS. Zaradi njegovega negativnega naboja je primerna tarča tudi za krožeči β_2 GPI (42). Pozitivni naboj pete domene glikoproteina privlači negativni heparin, ki deluje kot kompetitivni inhibitor za vezavo na fosfolipide (slika 6). Pri visokih koncentracijah terapevtsko dodanega heparina se poveča proteolitična cepitev vezanega β_2 GPI s pomočjo plazmina. Plazmin prereže C-terminalno hidrofobno zanko β_2 GPI in s tem spremeni elektrostatično okolje domene. Proteolitično razcepljen protein izgubi možnost vezave na heparin in negativne fosfolipide ter postane neprepoznaven za anti- β_2 GPI. Tak β_2 GPI pri APS bolnikih preprečuje protrombotična stanja (44).



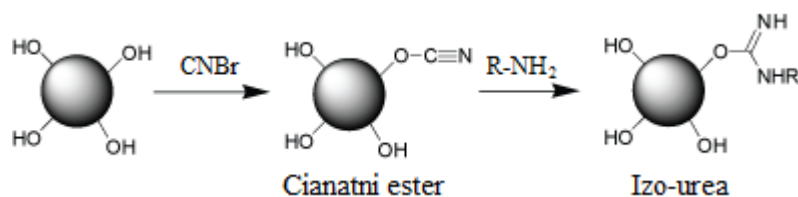
Slika 6: Shematski prikaz interakcije β_2 GPI s heparinom v prisotnosti plazmina (44).

Interakcija med heparinom in β_2 GPI se vrši na peti, pozitivno nabiti domeni glikoproteina. Heparin spodbudi vezavo plazmina, ki razcepi hidrofobno zanko β_2 GPI med 317. in 318. aminokislinskim ostankom. Deaktivirana peta domena ne tvori več povezave s heparinom ali fosfolipidi.

1.4.1. VLOGA HEPARINA PRI IZOLACIJI β_2 GPI

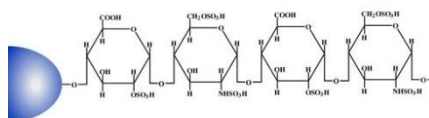
Zaradi njegovih lastnosti heparin že vrsto let uporabljajo v kromatografske namene. Kot ligand, kovalentno pritrjen na netopno podlago, ima izjemno afinitetno sposobnost vezave številnih plazemskih proteinov. Med njimi je tudi β_2 GPI, ki se ga s pomočjo heparinskih afinitetnih kolon izolira za uporabo v diagnostične namene.

Osnova za vezavo heparina so porozne agarozne kroglice, ki so v kromatografiji pogosto uporaben nosilec zaradi dobrih pretočnih lastnosti, prenašajo ekstremne pH in ionske razmere, so odporne na denaturante in ne absorbirajo biomolekul (45). Pred vezavo heparina je potrebna aktivacija agaroznih kroglic s cianogenim bromidom (CNBr). CNBr reagira s hidroksilnimi skupinami agaroze in tvori reaktivne cianatne estre. Heparin v vlogi liganda s svojo primarno amino skupino veže aktivirane izocianatne skupine, pri čemer nastane uretanska vezava z agarozo (slika 7). Zaradi toksičnosti CNBr in njegove občutljivosti na oksidacijo se običajno uporablja komercialno pripravljene medije, ki služijo kot stacionarna faza v afinitetni kromatografiji (slika 8) (46, 47).



Slika 7: CNBr aktivacija agaroze in vezava liganda (47).

Agarozna kroglica z izpostavljenimi -OH hidroksilnimi skupinami reagira s CNBr, pri čemer se tvori cianatni ester z -OCN skupino. Po reakciji z amini nastane substituirana izosečnina oziroma uretanska vezava.



Slika 8: Matrica heparinske afinitetne kolone (48).

Na agarozno kroglico zaetren heparin.

Visoka gostota negativnega naboja uvršča heparin med najbolj negativno nabite biološke makromolekule. Takšen naboj je posledica številnih negativnih karboksilnih in sulfatnih skupin, ki delujejo afinitetno na β_2 GPI (49). Med glikoproteinom in heparinom se namreč vzpostavijo reverzibilne elektrostatske interakcije, na katere ima močan vpliv ionska jakost. S

spreminjanjem ionske moči mobilne faze lahko tako dosežemo vezavo tarčne molekule kot tudi prekinitev vezi in njegovo elucijo iz afinitetne kolone (50).

1.5. IZOLACIJA β_2 GPI

Izolacija β_2 GPI iz plazme je zaradi navedenih lastnosti proteina še vedno njegov glavni vir za uporabo v laboratorijski diagnostiki. Sam postopek izolacije β_2 GPI je zelo kompleksen proces, ki obsega nespecifično obarjanje proteinov, ultrafiltracijo, dializiranje vzorca ter afinitetno in ionsko-izmenjevalno kromatografijo (51-53). Čistost izolata se nato preveri z elektroforezno ločbo na poliakrilamidnem gelu, ohranjenost antigenskih determinant pa s testom ELISA (54, 55). V grobem se opisane metode izolacije ne razlikujejo mnogo, vendar se izkaže, da so za imunokemijsko uporabnost izoliranega proteina pomembne tudi nekatere podrobnosti sicer istih postopkov (56, 57). Tehnične težave izolacije predstavlja lahko že na primer zamenjava proizvajalca afinitetne kolone. Polnila za afinitetno kromatografijo se med proizvajalci namreč razlikujejo tako v materialu in premreženosti osnovne stacionarne matrice kot v načinu vezave afinitetne molekule ter vrsti in koncentraciji izbranega liganda. To daje polnilu edinstvene pretočne lastnosti in osnovo za vezavo tarčnega proteina. Glede na izbran afinitetni medij je potrebno zagotoviti zahtevane pogoje, ki vplivajo na vezavo in izpiranje želene molekule. Ključno vlogo igra že postopek same priprave kolone, delovna temperatura kromatografije, določeni pretoki in pritiski skozi polnilo ter izbrani vezavni in elucijski pufri. Ob zamenjavi je potrebno pred uporabo izvesti temeljito preverjanje izplena in imunokemijskih lastnosti izoliranega proteina. Sicer neupravičeno potrošimo dragocen biološki material.

2. NAMEN DELA

Ena izmed ključnih metod v postopku izolacije β_2 GPI je afinitetna kromatografija, za katero se je kot polnilo uporabljalo Heparin Sepharose CL-6B, ki pa na tržišču ni več na voljo. Namen magistrske naloge je nadomestiti obstoječo afinitetno kolono z novim, komercialno dostopnim medijem, ki bo zagotavljal enakovrednost v izkoristku, čistosti in antigenski uporabnosti β_2 GPI v laboratorijski diagnostiki.

Drugi del namena je optimizacija ionsko-izmenjevalne kromatografije v postopku izolacije β_2 GPI, pri čemer primerjamo izkoristke z vezavo in izpiranjem tarčnega proteina na 4 °C in sobni temperaturi.

3. MATERIALI

3.1. KEMIKALIJE

Ime	Formula	Čistost	Proizvajalec
96% etanol	C ₂ H ₅ OH		Alkaloid, Makedonija
Borova kislina	H ₃ BO ₃	99,8 %	Zorka Šabac
Dinatrijev hidrogen ortofosfat dihidrat	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	≥ 99,5 %	Kemika, Hrvaška
Dušik (utekočinjen)	N ₂	≥ 99,9 %	Linde Plin, Celje, Slovenija
Glicin	C ₂ H ₅ NO ₂	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Nemčija
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich, Nemčija
Kalijev dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	≥ 99,5 %	Merck, Nemčija
Kalijev klorid	KCl	≥ 99,5 %	Merck, Nemčija
Kalijev tiocianat	KSCN	≥99,0 %	Sigma-Aldrich, Nemčija
Kaprilna kislina	C ₈ H ₁₆ O ₂		Kemika, Hrvaška
Magnezijev klorid	MgCl ₂	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich, Nemčija
Natrijev acetat	CH ₃ COONa	≥ 99,0 %	Merck, Nemčija
Natrijev azid	NaN ₃	Ultra čist	Merck, Nemčija
Natrijev hidroksid	NaOH	≥ 98,0 %	Kemira, Hrvaška
Natrijev klorid	NaCl	≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich, Nemčija
Ocetna kislina	CH ₃ COOH	≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich, Nemčija
Perklorova kislina 60%	HClO ₄		Sigma-Aldrich, Nemčija
Tris-HCl	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ - HCl	≥99,5 %	Sigma-Aldrich, Nemčija
Sečnina	(NH ₂) ₂ CO	≥99,5 %	Kemika, Hrvaška

3.2. REAGENTI

REAGENT	SESTAVA	PROIZVAJALEC
10% Natrijev dodecilsulfat	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Bio-Rad, ZDA
Fiziološka raztopina	0,9% raztopina NaCl v H ₂ O	
IgG standard	IgG Sapporo Standard HCAL, c = 23,4 µg/ml	INNOVA Diagnostic, INC, ZDA
IgM standard	IgM Sapporo Standard EY2C9, c = 15,3 µg/ml	INNOVA Diagnostic, INC, ZDA
IgA standard	Serum bolnika z arbitrarno določenimi enotami	
Konjugati	Afinitetno prečiščena kozja	Accurate Chemical and

	protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, IgM oziroma IgA, konjugirana z alkalno fosfatazo	Scientific Corporation, ZDA
Liofiliziran marker	Chemiluminiscent Blue Ranger,	Pierce Biotechnology, ZDA
Pozitivna in negativna kontrola	Serumi bolnikov, katerim se je z 20-kratno določitvijo določilo meje	
Substrat	P-nitrofenil fosfat natrijev heksahidrat v tableti	Sigma-Aldrich, Nemčija

3.3.PRIPRAVA PUFROV

3.3.1. PUFRI ZA AFINITETNO KROMATOGRAFIJO

- 0,02 M Tris-HCl / 0,03 M NaCl + NaN₃, pH 8,0
- 0,01 M natrijev kaprilat (C₈H₁₅NaO₂)
 - o 100 ml 0,1 M NaOH
 - o 1,585 ml kaprilne kisline
- Spiralni pufer za:
 - o Heparin Sepharose CL-6B, HiPrep Heparin Fast Flow: 0,02 M Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 8,0
 - o Heparin Separopore (Agarose) 4B: 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0
 - o Blue-Separopore 6B-CL: 0,02 M Tris-HCl/ 0,15 M NaCl + 25 mM Na-kaprilat, pH 7,4
- Elucijski pufer za:
 - o Heparin Sepharose CL-6B: 0,02 M Tris-HCl / 0,35 M NaCl, pH 8,0
 - o HiPrep Heparin Fast Flow: 0,02 M Tris-HCl / 1 M NaCl, pH 8,0
 - o Heparin Separopore (Agarose) 4B: 0,01 M Tris-HCl / 1,5 M NaCl, pH 8,0
 - o Blue-Separopore 6B-CL: 0,02 M Tris-HCl / 1,5 M NaCl, pH 7,4
- Pufri za regeneracijo afinitetne kolone Heparin Sepharose CL-6B:
 - I. 0,1 M Tris-HCl / 0,5 M NaCl, pH 8,5
 - II. 0,1 M NaAc / 0,5 M NaCl, pH 5,0
 - III. Vezavni pufer za uravnoteženje kolone

- 400 ml 25 mM HEPES + 7,02 g NaCl
 - S 5 M NaOH uravnamo pH na 7,9
 - Z dH₂O dopolnimo do 500 ml
- IV. Pufer za shranjevanje kolone: 50 ml absolutni etanol + 200 ml pufra III
- Pufri za regeneracijo HiPrep Heparin Fast Flow 16/10:
- I. 2 M NaCl
 - II. Spiralni pufer 0,02 M Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 8,0
 - III. Pufer za shranjevanje kolone: 20 % etanol + 0,05 M Na-acetat
- Pufri za regeneracijo Heparin Separopore (Agarose) 4B:
- I. 0,1 M borova kislina / 1M NaCl, pH 9,7
 - II. 0,1 M borova kislina, pH 9,7
 - III. Destilirana H₂O
 - IV. 2 M NaCl
 - V. Pufer za shranjevanje kolone: 20% etanol + 0,05 M Na-acetat
- Pufri za regeneracijo Blue-Separopore 6B-CL
- I. 0,1 M NaOH
 - II. 2 M KSCN
 - III. Spiralni pufer 0,02 M Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 8,0
 - IV. Pufer za shranjevanje kolone: 20 % etanol + 0,1 M KH₂PO₄, pH 8,0

3.3.2. PUFRI ZA IONSKO-IZMENJEVALNO KROMATOGRFIJO

- Začetni acetatni pufer: 0,05 M Na-acetat / 0,1 M NaCl, pH 4,8
- Končni acetatni pufer: 0,05 M Na-acetat / 0,65 M NaCl, pH 5,2
- S fosfatom pufrana fiziološka raztopina (PBS), pH 7,4
 - 2,68 mM KCl
 - 136,89 mM NaCl
 - 1,47 mM KH₂PO₄
 - 6,46 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O

3.3.3. PUFRI ZA ELEKTROFOREZO

- Spodnji pufer (10-krat koncentriran: pred uporabo ga razredčimo)
 - 25 mM Tris-HCl
 - 129 mM glicin
- Zgornji pufer
 - 1-krat koncentriran spodnji pufer
 - 10% SDS do koncentracije 0,1%
- Pufer za vzorce (4-krat koncentriran)

▪ 1 M Tris-HCl, pH 6,9	1,25 ml
▪ Natrijev dodecilsulfat	0,4 g
▪ Glicerol	2 ml
▪ 2-merkaptoetanol	1 ml
▪ Bromfenol modro	1 mg
▪ dH ₂ O	15,75 ml
- Barvilo

▪ Coomassie brilliant blue	1,0 g
▪ Ledocetna kislina	100 ml
▪ 96% etanol	450 ml
▪ H ₂ O	do 1000 ml
- Raztopina za razbarvanje

▪ Ledocetna kislina	100 ml
▪ 96% etanol	250 ml
▪ H ₂ O	do 1000 ml

3.3.4. PUFRI ZA ELISA TEST

- PBS-0,05 % Tween 20, pH 7,4
 - 10 l PBS pufera z dodanim 5 ml Tween-a 20
- Dietanolaminski (DEA) pufer, pH 9,8:

▪ Dietanolamin	970 mM
▪ Magnezijev klorid	0,49 mM
▪ Natrijev azid	3,1 mM

3.4. LABORATORIJSKA OPREMA

3.4.1. IZOLACIJA

APARATURA	NAZIV	KRAJ	DRŽAVA
Centrifuga	Sigma 3K 30	Osterode am Harz	Nemčija
Dializna cevka	Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich	St. Luis	Missouri ZDA
Kolone za afinitetno kromatografijo	Heparin Sepharose CL-6B, GE Healthcare	Buckinghamshire	Velika Britanija
	HiPrep Heparin Fast Flow 16/10 GE Healthcare	Buckinghamshire	Velika Britanija
	Heparin Separopore (Agarose) 4B, BioWorld	Dublin	Ohio ZDA
	Blue-Separopore 6B-CL, BioWorld	Dublin	Ohio ZDA
Kolona za ionsko-izmenjevalno kromatografijo	Mono S™ 5/50 GL, GE Healthcare	Buckinghamshire	Velika Britanija
Koncentracijska celica	Amicon Stirred Cell model 8400, 400 ml, EMD Millipore	Billerica	Massachusetts ZDA
Membrana za ultrafiltracijo	Premer: 76 mm, velikost por: 10 kDa, Millipore	Billerica	Massachusetts ZDA
Nizkotlačni kromatografski sistem	Bio-Rad Biologic LP System	Hercules	Kalifornija ZDA
Ohišje kolone	Višina: 15 cm, premer: 1,5 cm, Bio-Rad	Hercules	Kalifornija ZDA
pH meter	SevenEasy, Mettler Toledo	Greifensee	Švica
Zbiralnik frakcij	Bio-Rad Model 2110 Fraction Collector	Hercules	Kalifornija ZDA

3.4.2. DOLOČANJE ČISTOSTI IZOLATA

APARATURA	NAZIV	KRAJ	DRŽAVA
Celica za vertikalno elektroforezo	Bio-Rad Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Hercules	Kalifornija ZDA
Čitalec mikrotitrskih plošč	Tecan Sunrise	Männedorf	Švica
Elektroforezni geli	Bio Rad Mini-Protean TGX Precast gels	Hercules	Kalifornija ZDA

Grelec	2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems	Carlsbad	ZDA
Komora za slikanje elektroforeznega gela	G:BOX Chemi HR, Syngene International	Cambridge	Velika Britanija
Polistirenske mikrotitrne plošče	Costar High binding 3590, 96 well EIA/RIA plate, Corning Incorporated	New York	ZDA
Spiralec	BioTek Elx405 Select CW	Winooski	Vermont ZDA
Sušilec	Gel dryer model 543, Bio-Rad	Hercules	Kalifornija ZDA
Usmernik električnega toka	Bio Rad Power Pac Basic Power Supply	Hercules	Kalifornija ZDA

4. METODE

4.1. IZOLACIJA

Izolacija β_2 GPI je zelo kompleksen postopek, ki zajema tako afinitetno kromatografijo na heparinu kot ionsko izmenjevalno kromatografijo in preverjanje čistosti izoliranega proteina ter na koncu njegove funkcionalne uporabnosti kot antigena za detekcijo protiteles proti β_2 -GPI (anti- β_2 GPI), ki je eden od laboratorijskih klasifikacijskih kriterijev pri klinični opredelitvi antifosfolipidnega sindroma (Shema 1) (5).

4.1.1. PRIPRAVA VZORCA za afinitetno kolono Heparin Sepharose CL-6B, Heparin-Separopore (Agarose) 4B in HiPrep Heparin Fast Flow 16/10

Vzorci plazme smo hranili na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in jih pred uporabo odtalili ali v topli kopeli, če smo izolacijo izvedli isti dan, ali v hladni sobi na $4\text{ }^\circ\text{C}$ čez noč. Volumen plazme smo še enkrat preverili z merilnim valjem in ji dodali enak volumen ohlajene fiziološke raztopine. Mešanico smo ob mešanju hranili na ledu, da je temperatura padla na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Celokupno količino mešanice plazme s fiziološko raztopino smo nato razdelili na tri dele po približno 160 ml. Posameznemu alikvotu smo v ledeni kopeli ob mešanju po kapljicah dodajali 60% perklorno kislino do končne koncentracije 0,285 M. Na vsakih 100 ml mešanice smo dodali 3,22 ml kisline, čas dodajanja pa smo prilagodili glede na volumen uporabljene plazme. Po končanem obarjanju smo vzorec 14 minut centrifugirali pri $1\text{ }^\circ\text{C}$ s frekvenco $10\ 000\ \text{min}^{-1}$ in $\text{RCF} = 12\ 000 \times g$ ter na ta način pospešili sedimentacijo netopnih proteinov. Zbranemu supernatantu vseh treh alikvotov smo po vsakem centrifugiranju z NaOH uravnali pH na 8,0 ter ga nato prelili v dializno črevo in mu s pomočjo pasivne difuzije izmenjali puferni sistem v 2 l 0,02 M Tris-HCl / 0,03 M NaCl. Za dokončno izmenjavo molekul smo pufer po dveh urah zamenjali in vzorec dializirali še čez noč v hladni sobi.

Naslednji dan smo dializat s pomočjo koncentracijske celice Amicon skoncentrirali na volumen, manjši od 50 ml. Pri tem smo uporabili membrano z velikostjo por $10\ \text{kDa}$, kot potisni plin pa dušik (2,5 bar). Koncentriranje je potekalo v hladni sobi. Membranske pore prepustijo molekule in ione topila z nizko molekulsko maso, v koncentratu pa ostanejo le proteini, katerih velikost presega dimenzijo izbranih rež. Vzorec smo nato sterilno filtrirali z mikrobiološkim filtrom skozi pore velikosti $0,2\ \mu\text{m}$. Tako pripravljen vzorec je bil primeren za nanos na afinitetno kolono s heparinom.

4.1.1.1. Priprava vzorca za afinitetno kolono Blue-Sepapopore 6B-CL

Ker ima kolona Blue-Sepapopore 6B-CL močno afiniteto do vezave albumina, smo vzorcu po koncentriranju dodali natrijev kaprilat do končne vrednosti 25 mM. Pri tem se albumin veže na kaprilno kislino in tako izgubi afiniteto do sintetičnega barvila na naši koloni. Mešanico smo inkubirali eno uro na 4 °C in ji nato umerili pH na 7,4. Pred nanosom na kolono smo vzorec še sterilno filtrirali.

4.1.2. AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Z afinitetno kromatografijo smo analite iz vzorca ločili na osnovi nekovalentnih interakcij med tarčno molekulo in specifičnim ligandom, imobiliziranim na matrico. Ključnega pomena za uspešno afinitetno ločbo je na matrico kovalentno pritrjen biospecifični ligand. Ta mora ohranjati specifično vezavno afiniteto do tarčne molekule in po spiranju nevezanega materiala zagotavljati reverzibilno elucijo proteina v njegovi aktivni obliki.

4.1.2.1. Priprava afinitetne kolone

Za pripravo 20 ml gela smo zatehtali oziroma odmerili ustrezno količino izhodiščnega materiala (Preglednica 1) in ga suspendirali v vsaj 20 ml dH₂O. Po končanem nabrekanju smo mešanico prenesli na sterilni TTP filter z velikostjo por 0,2 μm. Gel smo pri nizkem vakuumu spirali z 1 l dH₂O ter se tako znebili prisotnih primesi. Po čiščenju smo medij prelili v kolono in z zibanjem v vodoravni legi pazili, da se pri posedanju ne bi ujeli mehurčki zraka. Kolono smo nato priklopili na črpalko in pri pretoku 5 ml/min prečrpali 100 ml sterilno filtriranega pufra navedenega v preglednici 1.

Preglednica 1: Prikaz uporabljenih izhodiščnih materialov in pufrov za pripravo različnih afinitetnih kolon.

MEDIJ ZA AFINITETNO KROMATOGRAFIJO	IZHODIŠČNI MATERIAL	PUFER
Heparin-Sepharose CL-6B	1 g liofiliziranega praška → 4 ml gela	PBS
Heparin-Separopore (Agarose) 4B	Suspenzija	0,01 M Tris-HCl
HiPrep Heparin Fast Flow 16/10	Komercialno pripravljena kolona	1. 100 ml 0,02 M Tris-HCl / 0,03 M NaCl 2. 100 ml 0,02 M Tris-HCl / 1 M NaCl 3. 100 ml 0,02 M Tris-HCl / 0,03 M NaCl
Blue-Separopore 6B-CL	1 g liofiliziranega praška → 5 - 7 ml gela	0,02 M Tris / 0,03 M NaCl

4.1.2.2. Postopek afinitetne kromatografije

V hladni sobi smo pripravljeno kolono priklopili na sistem za nizkotlačno kromatografijo (Bio Rad Biologic LP) in jo pri pretoku 2 ml/min spirali s 70 ml spiralnega pufra. Po končanem spiranju smo v sistem vnesli koncentriran vzorec in ga pustili krožiti skozi kolono 15 do 18 ur. Ta čas je potekala afinitetna vezava plazemskih proteinov na medij kolone. Po vezavi smo nevezane proteine in nečistoče izprali s spiralnim pufrom, nato pa tarčne proteine eluirali z večjo ionsko jakostjo elucijskega pufra. Izpirek smo po frakcijah ($V = 1,3$ ml, pretok 2-3 ml/min) zbirali v epruvete in s pomočjo računalniškega programa LP Data View spremljali potek elucije. Frakcijam smo nato z Nanodropom izmerili absorbanco pri 280 nm z ekstinkcijskim koeficientom 10,00 ter združili epruvete, katerih absorbanca je presegala 0,1. Zbran vzorec smo nato dializirali v 2 l začetnega acetatnega pufra čez noč pri 4 °C.

4.1.2.3. Regeneracija afinitetne kolone

Različne afinitetne kolone smo po končani kromatografiji sprali s priporočenimi pufri za regeneracijo. Vsak pufer, naveden v preglednici 2, smo glede na uporabljeno polnilo skozi kolono črpali toliko časa, da se je prevodnost ustalila. Po končani regeneraciji smo afinitetni medij namočili v pufer za konzerviranje.

Preglednica 2: Pufri za regeneracijo različnih afinitetnih kolon.

KOLONA	PUFRI ZA REGENERACIJO KOLONE
Heparin Sepharose CL-6B	I. 0,1 M Tris-HCl / 0,5 M NaCl, pH 8,5 II. 0,1 M NaAc / 0,5 M NaCl, pH 5,0 III. Vezavni pufer za uravnoteženje kolone IV. Pufer za shranjevanje kolone
HiPrep Heparin Fast Flow 16/10	I. 2 M NaCl II. 0,02 M Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 8,0 III. Pufer za shranjevanje kolone
Heparin-Separopore (Agarose) 4B	I. 0,1 M borova kislina / 1M NaCl, pH 9,7 II. 0,1 M borova kislina, pH 9,7 III. SF dH ₂ O IV. 2 M NaCl V. Pufer za shranjevanje kolone
Blue-Separopore 6B-CL	I. 0,1 M NaOH II. 2 M KSCN III. 0,02 M Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 8,0 IV. Pufer za shranjevanje kolone

4.1.3. IONSKO-IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA

Na koncu smo za ločbo proteinov na osnovi razlik v njihovem neto površinskem naboju uporabili še ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Pri tem s spremembo vrednosti pH ali ionske moči pufru vplivamo na neto naboj proteina, ki tvori elektrostatske interakcije z negativno ali pozitivno nabito stacionarno fazo. Izbira nabite funkcionalne skupine stacionarne faze določa tip in moč ionskega izmenjevalca (preglednica 3).

Preglednica 3: Primeri ionskih izmenjevalcev.

Anionski izmenjevalci	Funkcionalna skupina
Aminoetil (AE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
Dietilaminoetil (DEAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
Kvartarni aminoetil (QAE-)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
Kationski izmenjevalci	
Karboksimetil (CM-)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$
Metil sulfonat (S-)	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
Sulfopropil (SP-)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

Proteine smo izpirali z zveznim oziroma gradientnim spreminjanjem pH pufru, ki manjša intenzivnost vezave na matrico s spremembo naboja proteina. Sočasno pa lahko višamo

ionsko jakost elucijskega pufru, s čimer številčnejši ioni tekmujejo z molekulami proteina za vezavo na nasprotno nabit izmenjevalec (52, 58).

4.1.3.1. Priprava kationske kolone

V postopku ionsko-izmenjevalne kromatografije smo uporabili kationsko kolono Mono S™ 5/50 GL. To je komercialno pripravljena kolona, ki smo jo pred nanosom vzorca spirali na sobni temperaturi po naslednjem postopku:

1. 5 ml dH₂O pri pretoku 1 ml/min
2. 5 ml začetni acetatni pufer pri pretoku 2 ml/min
3. 5 ml končni acetatni pufer pri pretoku 2 ml/min
4. 5 ml začetni acetatni pufer pri pretoku 2 ml/min

4.1.3.2. Postopek ionsko-izmenjevalne kromatografije

Po spiranju smo na kolono nanесли sterilno filtriran dializat in ga pustili krožiti s pretokom 1 ml/min 15 do 18 ur. Vezava proteina je s pomočjo nizekotlačnega sistema potekala na sobni T ali na 4 °C. Sledilo je izpiranje s kationske kolone, ki je glede na izolacijo potekala na sobni T oziroma 4 °C. Kolono smo najprej spirali z začetnim acetatnim pufrom (V = 5 ml, pretok = 1 ml/min), da smo se znebili nevezanih nečistoč. Vezane proteine smo izpirali pri pretoku 0,25 ml/min s pomočjo linearnega gradienta, pri čemer smo višali ionsko moč in pH elucijskega pufru. To smo dosegli z mešanjem začetnega in končnega acetatnega pufru, s katerima smo postopno prehajali od 0,1 M NaCl do 0,65 M NaCl in iz pH 4,8 na 5,2. Z linearnim gradientom smo poskušali doseči dobro ločitev vrhov, kar je pomembno pri nadaljnjem vzorčenju izoliranega proteina. Eluiranim frakcijam smo izmerili absorbance z Nanodropom ter jih razdelili na posamezne vrhove. Frakcije vsakega vrha smo združili in jih dializirali v 2 l PBS pufru na 4 °C. Pufer smo po dveh urah zamenjali in nato pri istih pogojih dializirali čez noč.

Naslednji dan smo vzorcju posameznega vrha izmerili volumen in absorbanco pri 280 nm ter dializate shranili v zamrzovalnik na -80 °C.

4.1.3.3. Regeneracija kationske kolone

Po uporabi smo kationsko kolono Mono S™ 5/50 GL spirali pri pretoku 0,5 ml/min na sobni temperaturi po sledečem postopku:

1. 4 ml 2 M NaCl
2. 8 ml 1 M NaOH
3. 4 ml 2 M NaCl
4. 4 ml dH₂O
5. 8 ml 20% etanola

4.2. DOLOČANJE ČISTOSTI IZOLATA

4.2.1. DENATURACIJSKA POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA (SDS-PAGE)

Za določanje čistosti izoliranega β_2 GPI smo uporabili separacijsko metodo SDS-PAGE, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Zaradi reducirajočih pogojev je elektroforezna mobilnost skozi zamrežen gel določena le z negativnim nabojem, ki je sorazmeren velikosti molekul. Na ta način lahko določamo relativno molekulsko maso proteinov v vzorcu.

4.2.1.1. Priprava vzorca

Vzorec mora za nanos na elektroforezni gel vsebovati 7,5 μ g β_2 -GPI. Potrebni volumen vzorca smo preračunali iz izmerjene koncentracije in mu dodali 10 μ l 4-krat koncentriranega vzorčnega pufra. Da so imeli vsi vzorci enak končni volumen 40 μ l, smo vsakemu dodali še potrebno količino dH₂O. Tako pripravljene vzorčke smo v mikrocentrifugirkah 5 minut segrevali v PCR Cycler-ju na 98 °C, s čimer smo zaradi prisotnosti SDS in 2-merkaptetanola porušili sekundarno in terciarno strukturo proteina ter prekinili disulfidne vezi. Pripravili smo še liofiliziran označevalec, ki ga je potrebno raztopiti z 10 μ l dH₂O.

4.2.1.2. Elektroforeza

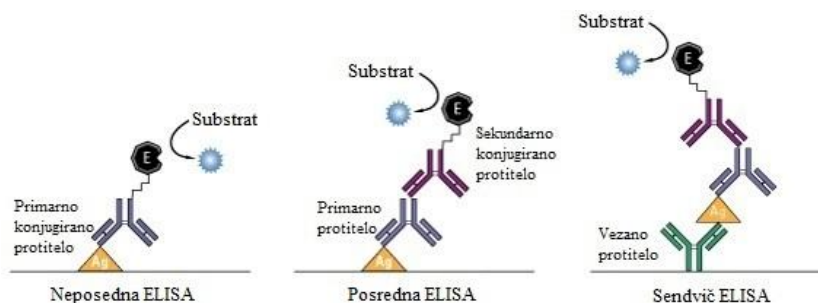
Uporabili smo komercialno pripravljen 7,5 % zamrežen poliakrilamidni gel Mini-Protean TGX™. Tega smo vstavili v kadičko in vanjo nalili zgornji pufer. Kadičko smo umestili v celico za vertikalno elektroforezo s 60 ml spodnjega pufra. V žepke gela smo nato s Hamiltonovo brizgo nanесли 10 μ l označevalca s standardi in po 30 μ l vsakega vzorca. Celico smo priključili na usmerjevalec električnega toka in pognali elektroforezo pri konstantnem toku $I = 12,5$ mA in napetosti $U = 125$ V. Po 15 minutah smo tok povišali na 25,0 mA. Gel smo po končani

elektroforezi 30 minut barvali s Coomassiejevim briljantno modrim barvilom ter nato odvečno barvilo odstranili z raztopino za razbarvanje. Sledilo je slikanje v komori G:BOX in sušenje elektroforeznega gela na 80 °C.

4.2.2. DOLOČANJE ANTIGENSKIH LASTNOSTI β_2 GPI Z ENCIMSKO IMUNSKO METODO NA TRDNEM NOSILCU

Ker je velikost reduciranega β_2 GPI približno 50 kDa, smo po končani elektroforezi izbrali vzorce s čisto linijo našega proteina. Tem je bilo potrebno določiti še ohranjenost antigenih determinant, ki je ključna za uspeh analize za določanje anti- β_2 GPI. Z encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu ELISA (ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) smo primerjali vezavo anti- β_2 GPI iz vzorca bolnika na izoliran protein β_2 GPI z referenčnim vzorcem.

ELISA je ena najbolj občutljivejših in specifičnih imunskih metod za kvantitativno določanje antigenov ali protiteles. Temelji na specifični interakciji antigen-protitelo, ki jih prepoznava z encimom konjugirana protitelesa. Količino označenih, v imunske komplekse vezanih protiteles, določamo z dodatkom encimskega substrata, ki se pretvori v obarvan produkt. Poznamo različne izvedbe testov ELISA (slika 9) (55, 59).

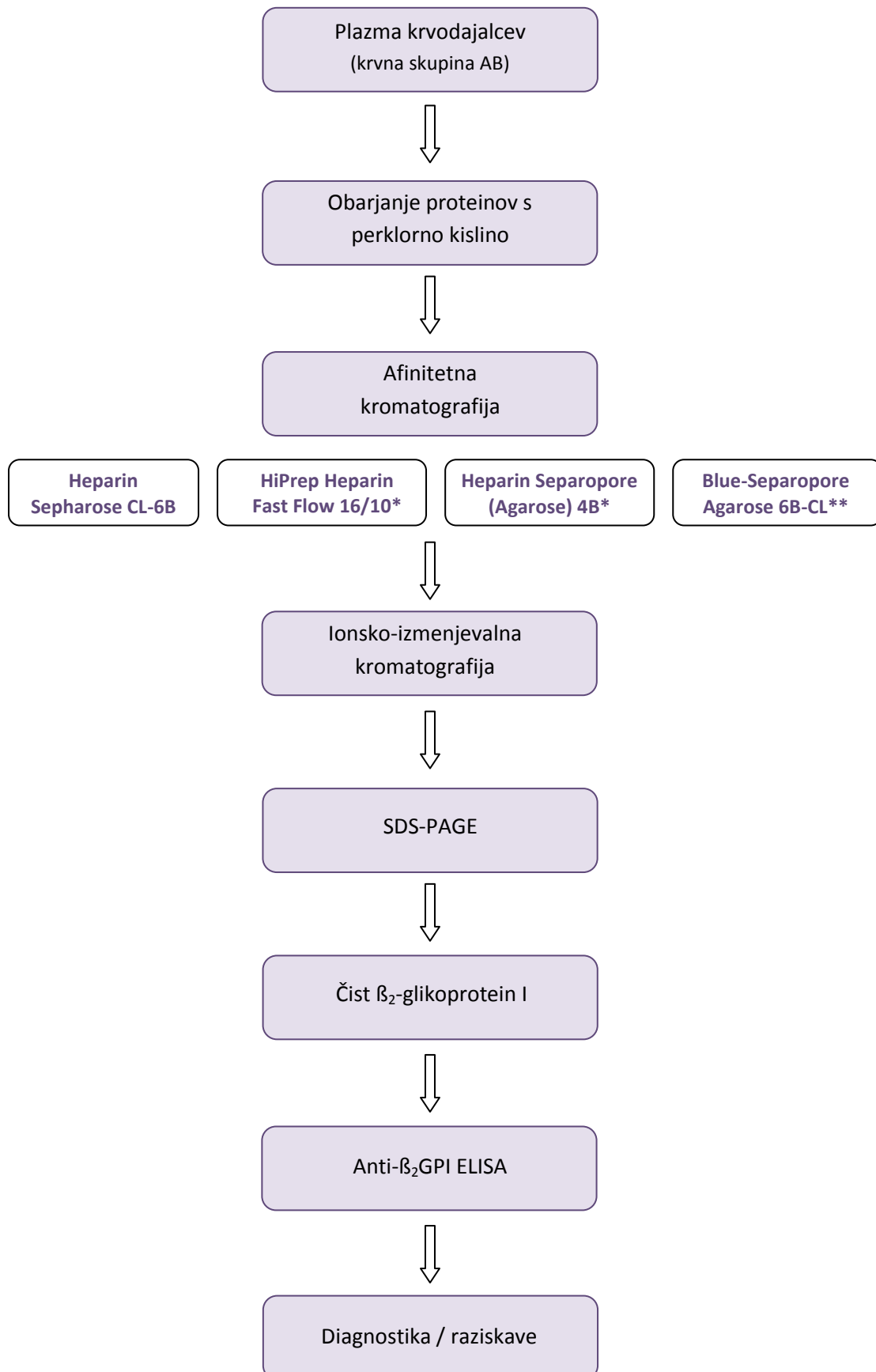


Slika 9: Različne izvedbe metode ELISA (59).

Ključni korak pri metodi ELISA je imobilizacija preiskovanega antigena z direktno adsorpcijo na mikrotitersko ploščico ali indirektno z vezavo protitelesa. Antigen se nato lahko detektira neposredno z označenim primarnim protitelesom ali posredno s konjugiranim sekundarnim protitelesom. Pogosto uporabljena tehnika je tudi sendvič ELISA, pri kateri je merjen analit, vezan med dvema primarnima protitelesoma.

Funkcionalnost proteina smo tako določili s hišno anti- β_2 GPI ELISA, pri čemer smo uporabili polistirenske mikrotitrske ploščice z visoko vezavnostjo ter 96 vdolbinami. Te smo prekrili s 50 μ l izoliranega β_2 GPI, razredčenega na 10 mg/l v PBS in ga inkubirali 2 uri na sobni temperaturi. Ploščice smo nato sprali s 300 μ l PBS-0,05 % Tween pufrom na vdolbinico. Sledil je nanos vzorcev in standardov v paralelkah po 50 μ l na vdolbinico. Serume bolnikov s

pozitivnimi titri protiteles smo razredčili v razmerju 1:100 s PBS-Tween, za standarde pa smo pripravili redčitveno lestvico od 1:100 do 1:3200 z vmesnim redčenjem 1:2. Pri vsaki analizi smo dodali še ustrezno pozitivno in negativno kontrolo. Tako pripravljene mikrotitrne plošče smo inkubirali 30 minut pri sobni T. Te smo po končani inkubaciji s pomočjo spiralca 4-krat sprali in odvečno tekočino popivnali. V vdolbinice smo nanegli po 50 μ l z alkalno fosfatazo konjugirana sekundarna protitelesa proti IgG, IgM in IgA, razredčena v razmerju 1:100 s PBS-Tween pufrom in ponovno inkubirali 30 minut na sobni T. Med tem časom smo raztopili 30 mg p-nitrofenil fosfata (6 tablet) v 30 ml DEA pufra in pripravljen substrat nanegli po 100 μ l/vdolbinico po 4-kratnem spiranju plošče. Razvoj reakcije smo spremljali z merjenjem absorbanca pri 405 nm in referenčnim filtrom 690 nm proti reagenčni slepi. Vsake pol minute smo s čitalnikom mikrotiterskih plošč ponovili meritve, dokler nismo dobili optimalno ujemanje s predhodno določenimi vrednostmi standardov.

Shema 1: Shematski prikaz poteka izolacije β_2 GPI.

Legenda: *Primerjalna heparinska kolona, **Primerjalna kolona z vezanim sintetičnim barvilom.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Z izolacijo β_2 GPI v diagnostične namene so začeli po ugotovitvi, da glikoprotein deluje kot kofaktor za vezavo aPL pri avtoimunski bolezni APS. Anti- β_2 GPI so namreč eden od klasifikacijskih laboratorijskih kriterijev za opredelitev APS. V Laboratoriju za imunologijo revmatizma se predvsem zaradi finančne ekonomičnosti poslužujejo lastne izolacije β_2 GPI, ki ga uporabljajo kot antigen v hišni ELISA za detekcijo IgG, IgM in IgA anti- β_2 GPI, saj so tako stroški precej nižji od komercialno pridobljenega proteina. Seveda je za ustrezne rezultate anti- β_2 GPI ELISA potrebno zagotoviti čistost in uporabnost antigena, kar zahteva premišljeno izdelan postopek izolacije ter natančnost izvajanja posameznih korakov.

5.1. PLAZMA

Za določanje prisotnih aPL v bolnikovem serumu se, kljub podobnostim z govejim ali podganjim, uporablja izključno človeški β_2 GPI. Ugotovili so namreč, da se določeni odseki proteina razlikujejo v sestavi aminokislinske verige, kar zmanjšuje občutljivost vezave oziroma detekcijo protiteles proti β_2 GPI (60). Zato je naš osnovni material humana polna kri, kateri se s centrifugiranjem loči sedimentne celice, tako da dobimo čist, rumenkasto obarvan supernatant, ki vsebuje raztopljene proteine, faktorje strjevanja krvi, glukozo, elektrolite, hormone in pline. S hitro zamrznitvijo plazme, najkasneje do 8 ur po odvzemu krvi, dosežemo stabilnost komponent koagulacijskega, fibrinolitičnega in komplementnega sistema. Svežo zmrznjeno plazmo se običajno hrani v mehanskih hladilnikih, ki dosežejo temperaturo do -80 °C. Takšen vzorec je najprimernejši za izolacijo številnih plazemskih beljakovin vključno z β_2 GPI, ki ga potrebujemo za laboratorijsko diagnostiko APS.

Za postopek izolacije β_2 GPI smo uporabili svežo zamrznjeno plazmo domnevno zdravih krvodajalcev s krvno skupino AB, hranjeno na -80 °C. Po ugotovitvah Klinca (61) se iz AB skupine izolira največji izkoristek proteina v primerjavi z drugimi krvnimi skupinami. Ta namreč ne vsebuje protiteles ABO sistema proti-A in proti-B eritrocitnim antigenom, ki z nespecifičnimi vezavami na β_2 GPI ovirajo izolacijo tarčnega proteina. Volumen vzorca so prilagodili za doseganje največje zmogljivosti kolone, s čimer se izognemo ponavljanju postopka kromatografije. Končina (62) je v diplomskem delu dokazala, da se s 300 ml plazme lahko izvede eno uspešno izolacijo z maksimalnim izkoristkom kapacitete kolon, brez trošenja izhodiščnega materiala. Plazma je heterogen in med posamezniki zelo variabilen

biološki vzorec. Ker se koncentracija posameznih komponent med osebkami razlikuje, smo za večjo primerljivost združili plazme štirih krvodajalcev ter mešanico razdelili na štiri enakovredne približno 240 ml alikvot. Na ta način smo lahko uporabili isti izhodiščni vzorec za primerjavo rezultatov izolacij β_2 GPI na afinitetnih kolonah z različnimi polnili. Vzorce smo hranili na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in jih pred uporabo odtajali v hladni sobi.

5.2. NESPECIFIČNO OBARJANJE S PERKLOROVO KISLINO

Pred testiranjem posameznih afinitetnih medijev smo humano plazmo odtalili in pripravili na obarjanje proteinov. Alikvot vzorca smo najprej razredčili z enakim volumnom fiziološke raztopine (0,9 % NaCl), s čimer smo preprečili nespecifična obarjanja (63). Mešanici smo v ledeni kopeli vzdrževali temperaturo pri $0\text{ }^\circ\text{C}$. Pri tako hladnih pogojih se molekule gibljejo počasneje, trki med encimi in substrati so manj verjetni, kar znižuje encimsko aktivnost v vzorcu.

Prvi najpomembnejši korak pri izolaciji β_2 GPI se začne z odstranjevanjem nečistoč v vzorcu. Proteini zahtevajo za topnost v krvi pH v območju med 7,35 in 7,45, zato smo z nižanjem pH nameravali doseči koagulacijo večine na pH občutljivih beljakovin. Najpogostejša metoda za odstranjevanje številnih proteinov iz vzorca je obarjanje s 60 % perklorno kislino. To je zelo nekontroliran proces, saj lahko kislina oksidira cisteine, metionine in lizine proteina, kar vpliva na aminokislinsko sestavo sekvenc za prepoznavo ter vezavo fosfolipidov in protiteles. Prehitro zakisanje okolja lahko vodi tudi do cepitve β_2 GPI znotraj pete domene, ki na ta način izgubi zmožnost vezave na negativno nabite površine, hkrati pa perklorna kislina denaturira plazmin, ki prav tako cepi glikoprotein. β_2 GPI lahko med obarjanjem zaščitimo s časom izpostavljenosti sami kislini in z njeno končno koncentracijo. Kationska narava proteina ima zaščitno vlogo pred denaturacijo pri 0,285 M perklorni kislini, z zmanjšanjem volumna vzorca pa skrajšamo čas dodajanja kisline in s tem čas izpostavljenosti proteina nizkemu pH-ju. Prav tako je pomemben način dodajanja kisline v raztopino, da ob prehitrem dodatku velike količine kisline ne pride do lokalno prehitrih padcev pH. Zato smo alikvot vzorca razdelili na tri dele ter vsakemu posebej ob mešanju na ledu po kapljicah dodajali perklorno kislino 20 ± 1 minut. Po obarjanju smo vzorce centrifugirali, supernatante združili in jim z NaOH takoj zvišali pH na 8,0 (56, 64). Po dializi supernatanta smo vzorec s koncentriranjem in sterilnim filtriranjem pripravili za afinitetno kromatografijo.

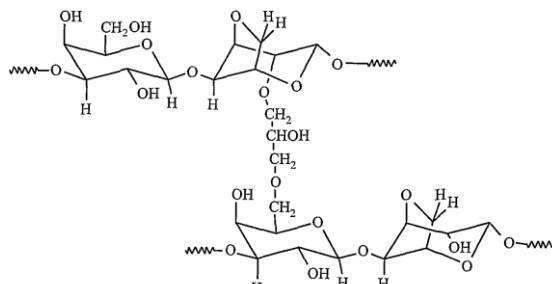
5.3. SISTEM ZA NIZKOTLAČNO KROMATOGRAFIJO

Kromatografija je časovno zelo potraten proces, zato smo se poslužili avtomatiziranega postopka z uporabo BioLogic LP sistema za nizkotlačno tekočinsko kromatografijo. Sistem deluje s pritiski < 3 barov, kar nam zadostuje za ločbo proteinov, ki ne zahtevajo visoke resolucije. Na aparaturi smo lahko po želji optimizirali program za posamezno izolacijo s prilagajanjem različnih parametrov. Zaradi uporabe kolon z različnimi specifikacijami smo s peristaltično črpalko lahko prilagajali pretok glede na uporabljeno polnilo med 0,5 in 5 ml/min. Možnost mešanja dveh različnih pufrov smo izkoristili pri gradientnem izpiranju proteinov, čiščenje kolone pa je potekalo z avtomatskim spiranjem s petimi različnimi pufri. Priloženemu zbiralniku frakcij smo lahko določili volumen zbranega alikvota (1,3 ml) za afinitetno kromatografijo oziroma čas zbiranja posamezne frakcije (4 minut in 30 sekund) pri izpiranju iz kationske kolone. Poleg tega nam je v analizator vgrajen optični modul z živosrebrno žarnico in filtrom pri 280 nm meril absorbanco prisotnih proteinov na vsake 3 μ l izpranega vzorca in s pomočjo celice za merjenje prevodnosti spremljal spreminjanje ionske moči raztopin. Oba parametra smo preko programske opreme opazovali na računalniškem zaslonu, ki nam je v realnem času podajal grafični prikaz absorbance v arbitrarnih enotah (A.U.) in prevodnost v mili-Siemensih na centimeter (mS/cm).

Izolacija bi lahko hitreje potekala z uporabo visokotlačnih sistemov, vendar so nizkotlačne aparature enostavnejše za uporabo, čiščenje in vzdrževanje ter manj nagnjene k puščanju sistema. Poleg tega, da so visokotlačni analizatorji dražji, tudi samo vzdrževanje in popravilo zahtevata višjo ceno (65). Izkušnje so že od uvajanja rutinske metode pokazale, da nam nižji pritiski dajejo zadostno resolucijo za ločevanje iskanega proteina.

5.4. IZOLACIJA Z UPORABO AFINITETNE KOLONE HEPARIN SEPHAROSE CL-6B

Prvo izolacijo smo izvedli po standardnem postopku z uporabo obstoječe afinitetne kolone Heparin Sepharose CL-6B. Sepharose je trgovsko ime (**Separation-Pharmacia-Agarose**) blagovne znamke GE Healthcare za kromatografski gel iz agaroznih kroglic, na katere je z aktivacijo s CNBr imobiliziran heparin iz črevesne sluznice prašiča. Afinitetni medij vsebuje 6% agarozo, ki je s prečnimi povezavami (CL – cross-linked) kemično in fizično bolj odporna od navadne agaroze (slika 10).



Slika 10: Shematski prikaz prečnih povezav agaroze (66).

Heparin Sepharose CL-6B je tarčno specifično afinitetno polnilo, obsežno uporabljeno za čiščenje serumskih proteinov, vključno s koagulacijskimi faktorji, lipazami, lipoproteini in hormonskimi receptorji. Medij v liofiliziranem prašku z navedenimi specifikacijami (preglednica 4) smo pred uporabo po priporočilih proizvajalca suspendirali in ga prenesli v stekleno kolono.

Preglednica 4: Značilnosti polnila Heparin Sepharose CL-6B.

Gostota liganda	≈ 2 mg prašičjega heparina / ml suhega medija
Metoda vezave liganda	CNBr aktivacija agaroze
Struktura kroglic	6% prečno povezana agarosa
Povprečna velikost kroglice	90 μm (45-165 μm)
Volumen pripravljenega polnila	21 ml
Maksimalni linearni pretok skozi kolono	5 ml/min
pH stabilnost	5 – 10

Po obarjanju, dializi in ultrafiltraciji plazme smo vzorec nanegli na pripravljeno heparinsko kolono. Da smo preverili vezavo proteinov na afinitetno matrico, smo izmerili absorbanco vzorca pred nanosom na kolono in absorbanco po končanem kroženju na afinitetni koloni. Za analizo ozadje smo za vsako izolacijo uporabili spiralni pufer.

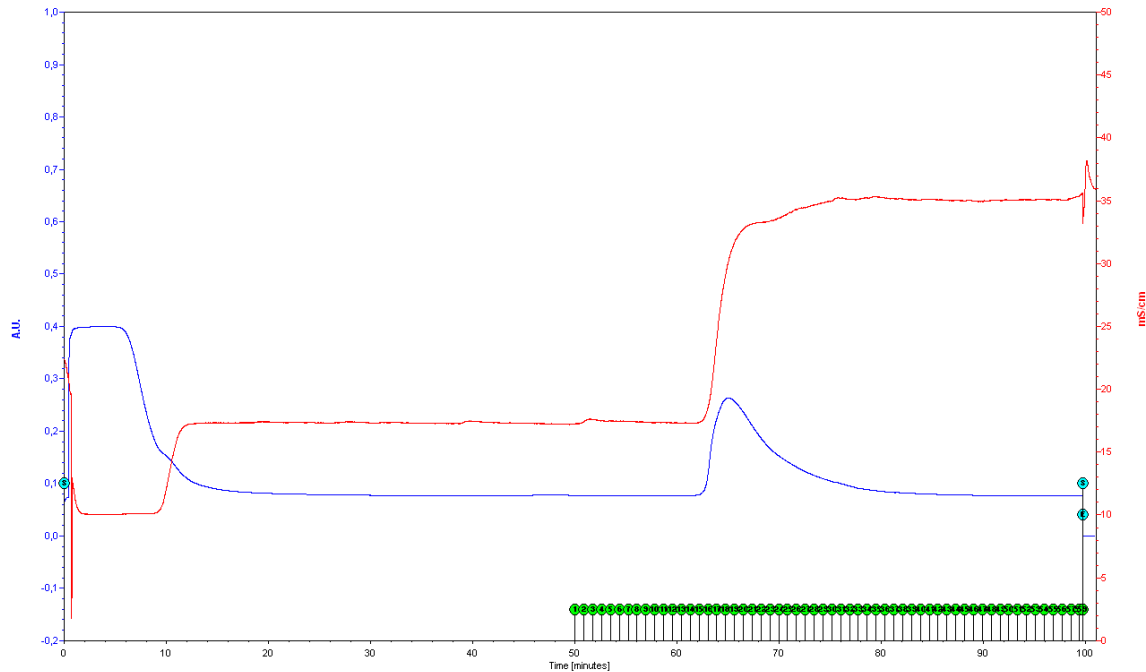
$$A_{\text{pred kroženjem na CL-6B koloni}} = 2,732$$

$$A_{\text{po kroženju na CL-6B koloni}} = 1,779$$

Po vezavi smo vezane proteine stopenjsko eluirali s pomočjo pufru z višjo ionsko močjo:

- Spiralni pufer: 0,02 M Tris-HCl / 0,15 M NaCl, pH 8,0
- Elucijski pufer: 0,02 M Tris-HCl / 0,35 M NaCl, pH 8,0

Afinitetno kromatografijo na nizkotlačnem sistemu Biologic LP smo lahko spremljali preko računalniškega programa LP Data View. Program nam v realnem času izrisuje graf prevodnosti in absorbance, ki ju aparatura meri med zbiranjem frakcij (slika 11).

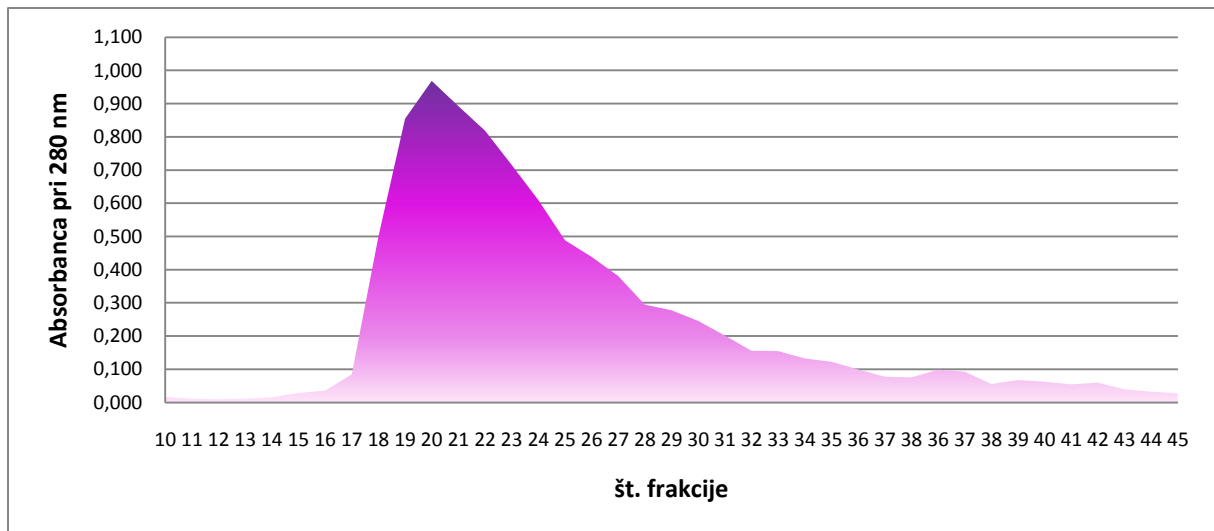


Slika 11: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone Heparin Sepharose CL-6B, izrisan s programom LP Data View.

Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbanco eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.

Slika 11 nam z rdečo prikazuje graf prevodnosti v odvisnosti od časa. Jasno razločimo stopenjski prehod iz spiralnega na elucijski pufer z višjo slanostjo in posledično z višjo prevodnostjo. Program nam z modro črto izrisuje tudi absorbanco pri 280 nm v odvisnosti od časa. V realnem času lahko spremljamo elucijo proteina, kar se kaže v povišani absorbanci. Zaporedje zbranih frakcij je prikazano s številkami v zelenih oznakah.

Ker nam aparatura običajno izmeri veliko prenizke rezultate, je potrebno frakcijam določiti absorbance z občutljivejšo metodo. Mi smo za merjenje uporabili spektrofotometer Nanodrop, ki nam je vsebnost proteinov izmeril z valovno dolžino 280 nm in ekstinkcijskim koeficientom 10,00 (slika 12). Za analizo ozadje smo uporabili elucijski pufer.

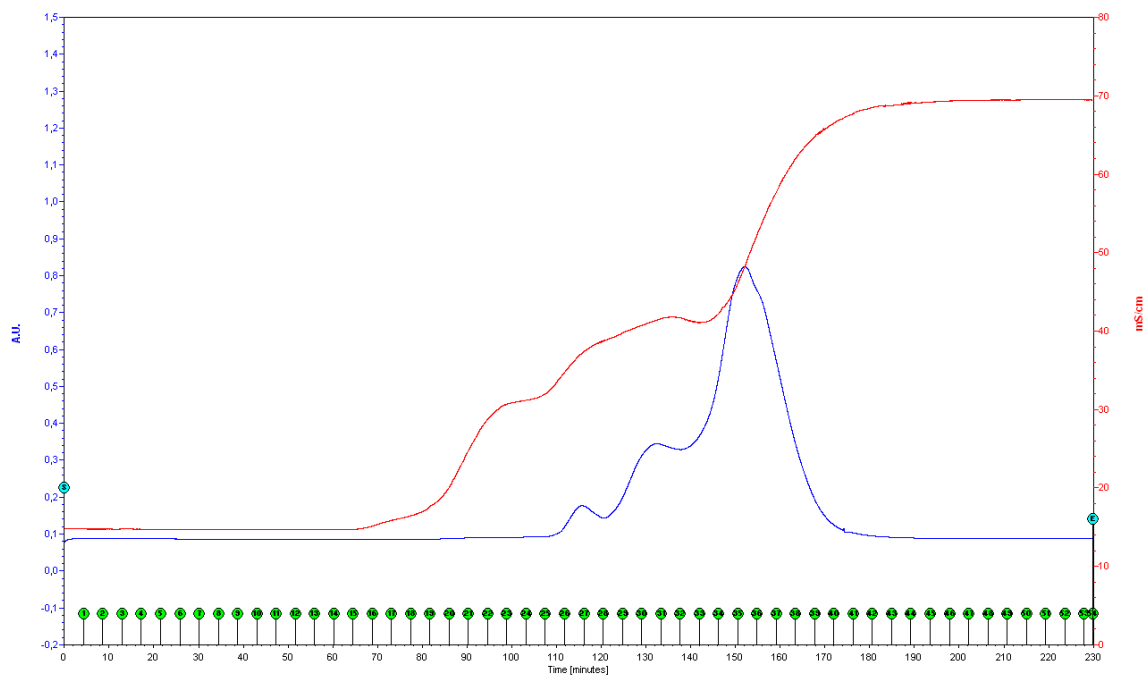


Slika 12: Grafični prikaz izmerjene absorbanca vsake zbrane frakcije pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop po eluciji iz afinitetne kolone Heparin Sepharose CL-6B.

Frakcije z višjo absorbanco imajo višjo vsebnost proteina, zato smo frakcije z izmerjeno absorbanco, višjo od 0,1, združili v skupen vzorec.

- Izbrane frakcije = 18 - 36
- Volumen = 23,4 ml
- Absorbanca = 0,469

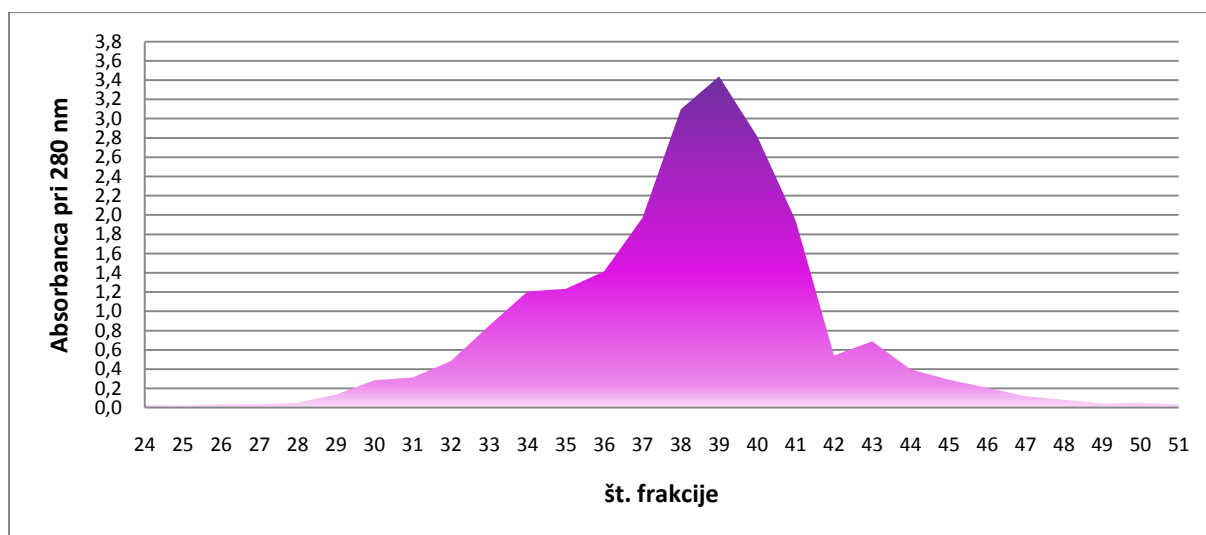
Po dializi vzorca je sledila še ionsko-izmenjevalna kromatografija s komercialno pripravljeno kationsko kolono Mono STM 5/50 GL. Vezane proteine smo z gradientnim višanjem ionske moči in pH izprali iz kolone, kar je analizator preko vgrajenega optičnega modula in detektorja prevodnosti prikazoval s pomočjo računalniškega programa (slika 13).



Slika 13: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone Mono S™ 5/50 GL, izrisan s programom LP Data View.

Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbanco eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.

Kot prikazuje slika 13, smo dobili tri absorpcijske vrhove, katerim smo natančnejše vrednosti absorbanc izmerili še z Nanodropom (slika 14).



Slika 14: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc zbranih frakcij izmerjenih pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop po eluciji s kationske kolone Mono S™ 5/50 GL.

Graf, ki prikazuje absorbance frakcij, izmerjenih na Nanodropu, se precej razlikuje od grafičnega prikaza izpiranja proteina na BioLogic LP sistemu. Frakcije smo morali z ozirom na

obe meritvi razdeliti na tri vrhove (preglednica 5). Pri ločevanju smo pazili, da zajamemo celoten prvi vrh, v katerem so prisotni imunski kompleksi, ki jih nočemo prenesti v količinsko in koncentracijsko največji drugi vrh. Prav tako je pomembna čim natančnejša ločitev tretjega vrha, katerega sestavljata dva proteina z manjšim deležem β_2 GPI. Pri razdeljevanju frakcij se najpogosteje opiramo na predhodno pridobljene izkušnje.

Preglednica 5: Zbrani vrhovi izolacije.

VRHOVI	ŠT. FRAKCIJ	VOLUMEN [ml]	ABSORBANCA [OD]
1. VRH	29 – 32	1,7	0,260
2. VRH	33 – 41	4,0	1,818
3. VRH	42 – 47	2,7	0,433

Vsak vrh posebej smo dializirali v PBS pufru in vzorce zamrznili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5. IZOLACIJA Z AFINITETNO KOLONO HIPREP HEPARIN FAST FLOW 16/10

Obstoječo heparinsko kolono CL-6B smo najprej poskusili nadomestiti s komercialno pripravljeno HiPrep Heparin Fast Flow 16/10, ki ima podobne karakteristike (preglednica 6).

Preglednica 6: Primerjava značilnosti polnil komercialno pripravljene kolone HiPrep Heparin FF 16/10 in obstoječe Heparin Sepharose CL-6B.

	HiPrep Heparin Fast Flow 16/10	Heparin Sepharose CL-6B
Gostota liganda	≈ 5 mg prašičjega heparina / ml medija	≈ 2 mg prašičjega heparina / ml suhega medija
Metoda vezave liganda	Redukcijska aminacija agaroze	CNBr aktivacija agaroze
Struktura kroglic	6% visoko premrežena agarozna	6% prečno povezana agarozna
Povprečna velikost kroglice	90 μm (45-165 μm)	90 μm (45-165 μm)
Volumen polnila	20 ml	21 ml
Maksimalni pretok skozi kolono	10 ml/min	5 ml/min
pH stabilnost	5 – 12	5 – 10

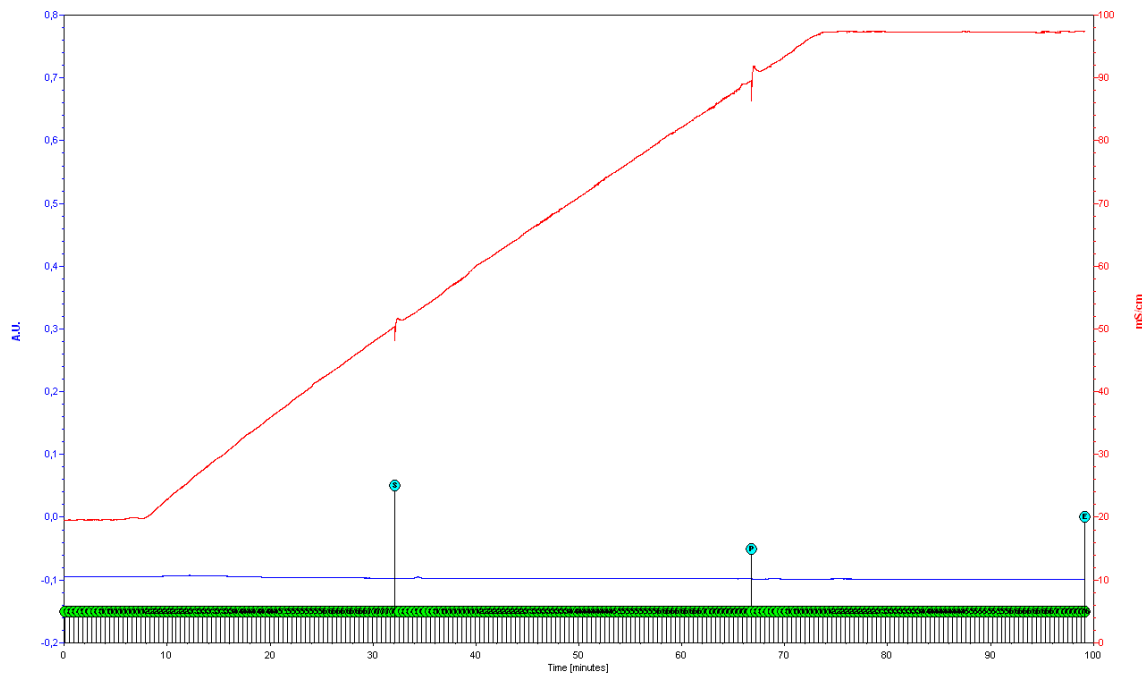
Samega postopka izolacije nismo spreminjali, prilagodili smo le molarost NaCl elucijskega pufru po priporočilih proizvajalca.

$$A_{\text{vzorca pred kroženjem na HiPrep}} = 2,711$$

$$A_{\text{vzorca po kroženju na HiPrep}} = 1,792$$

Iz absorbanc vzorca pred in po kroženju skozi kolono je razvidno, da se je protein vezal na heparinsko polnilo. Vezane proteine smo izprali z gradientno elucijo (slika 15), pri čemer smo uporabili naslednje pufre:

- Spiralni pufer: 0,02 M Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 8,0
- Elucijski pufer: 0,02 M Tris-HCl / 1 M NaCl, pH 8,0



Slika 15: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone HiPrep Heparin Fast Flow 16/10, izrisan s programom LP Data View.
 Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbanco eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.

Iz grafičnega prikaza elucije na sliki 15 vidimo, da se kljub višji ionski jakosti elucijskega pufra protein ni spral s kolone. Vrednosti izmerjenih absorbanc vseh frakcij so bile vselej 0.

HiPrep Heparin FF 16/10 kolona ima poleg tega, da je že pripravljena in s tem enostavnejša za uporabo, še številne druge prednosti glede na obstoječo kolono. Odlikuje jo višja vsebnost heparina in s tem več možnih vezavnih mest za vezavo tarčne molekule ter večja odpornost na pritisk zaradi številnih prečnih povezav. Omogoča tudi uporabo večjih pretokov, kar naj bi skrajšalo postopek same elucije. Toda v našem primeru se te prednosti niso izkazale kot uporabne, saj se protein s kolone ni izpral. Eden od razlogov, zakaj do izpiranja proteina ni prišlo, je lahko zaradi razlike v osnovni matrici, ki je nekoliko drugačna od Heparin Sepharose CL-6B. Razlikuje se že v načinu aktivacije agaroznih kroglic, saj je za vezavo heparina uporabljena metoda redukcijske aminacije, preko katere se oblikuje zelo močna vezava tudi

v alkalnih pogojih. Najverjetneje pa je glavni problem polnila visoka vsebnost heparina, ki se lahko kaže v zmanjšani učinkovitosti vezave proteina zaradi steričnih ovir. Tarčna in predvsem večje molekule lahko ostanejo ujete v polnilu, kar otežuje izpiranje proteinov. Pri zelo visoki koncentraciji heparina se tudi poveča število nespecifičnih povezav z molekulami vzorca in posledično zmanjša selektivnost kolone (67). Glede na to, da je kolona primerna tudi za delovanje pod pritiskom, bi se proteini lahko pod večjo silo lažje izprali iz afinitetnega polnila. Zaradi odličnih pretočnih lastnosti gela smo β_2 GPI poskušali izprati pri priporočenem pretoku 5 ml/min, a smo ga morali zaradi izgubljanja vzorca med frakcijami zmanjšati na 3 ml/min.

5.6. IZOLACIJA Z AFINITETNO KOLONO HEPARIN SEPAROPORE (AGAROSE) 4B

Po neuspešnem poskusu izolacije β_2 GPI s komercialno pripravljeno kolono HiPrep Heparin Fast Flow 16/10, smo preizkusili še afinitetno polnilo iz Heparin Separopore (Agarose) 4B z naslednjimi lastnostmi (preglednica 7).

Preglednica 7: Značilnosti polnila Heparin Separopore (Agarose) 4B.

Gostota liganda	5 mg prašičjega heparina / ml medija
Metoda vezave liganda	CNBr aktivacija agaroze
Struktura kroglic	4% agarosa
Povprečna velikost kroglice	50-175 μ m
Volumen pripravljenega polnila	26,5 ml
Maksimalni pretok skozi kolono	3 ml/min
pH stabilnost	2 – 11

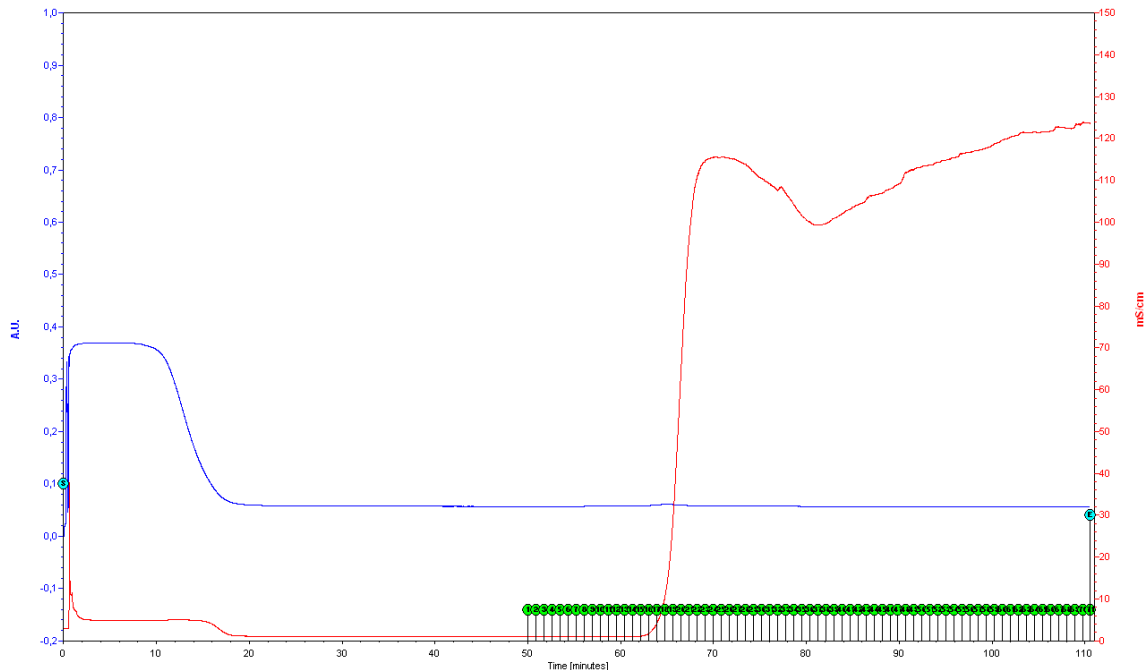
Separopore je trgovsko ime za afinitetni medij blagovne znamke BioWorld, ki je v vseh fizičnih in kemijskih lastnostih enaka Sepharosi, bila naj bi le bolj ekonomična (68). Za razliko od prejšnjih gelov, vsebuje ta manjšo gostoto agaroze (4%) brez prečnih povezav. Polnilo v obliki suspenzije smo pripravili po priporočilih proizvajalca (69) in ga prelili v stekleno kolono. Postopek priprave vzorca je ostal nespremenjen.

$$A_{\text{pred kroženjem na Heparin Separopore 4B koloni}} = 3,336$$

$$A_{\text{po kroženju na Heparin Separopore 4B koloni}} = 1,726$$

Za pripravo kolone in potek elucije (slika 16) smo uporabili priporočene pufre:

- Spiralni pufer: 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0
- Elucijski pufer: 0,01 M Tris-HCl / 1,5 M NaCl, pH 8,0



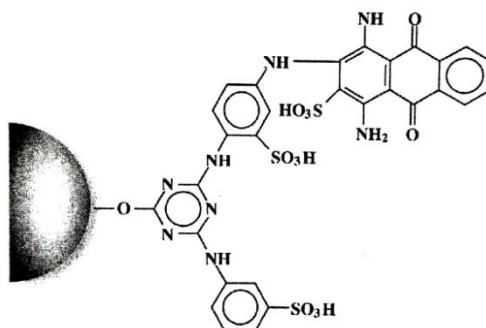
Slika 16: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone Heparin-Sepapopore (Agarose) 4B, izrisan s programom LP Data View. Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbanco eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.

Kot je razvidno iz slike 16, nam proteina s stopenjsko elucijo ni uspelo eluirati, saj so bile izmerjene absorbance frakcij prav tako 0. Glede na razliko v izmerjenih absorbancah vzorca pred in po končanem kroženju na koloni je očitno prišlo do vezave proteinov, kar pomeni, da se le-ti premočno zadržujejo v polnilu. Z enournim namakanjem kolone v 0,01 M Tris-HCl / 4 M NaCl pufru z višjo ionsko jakostjo, smo nameravali zagotoviti čas za boljšo disociacijo proteinov. Nadaljevali smo z elucijo z uporabljenim pufrom, a se tarčne molekule tudi tokrat niso izprale. Proizvajalec za čiščenje kolone priporoča uporabo sečnine, saj deluje kot beljakovinski denaturant, ki bi denaturiral naš protein in ga sčistil iz kolone. Postopek izpiranja smo ponovno ponovili in za elucijski pufer uporabili 4 M sečnino. V zbranih frakcijah tudi tokrat ni prišlo do izluženja proteina, saj so bile vrednosti izmerjenih absorbanc še vedno 0.

Razlogov, zakaj elucija proteinov ni bila uspešna, je lahko veliko, vendar je v tako optimiziranem postopku težko določiti, kje točno je prišlo do napake. Ključno vlogo pri izolaciji proteina lahko igra že priprava samega gela. Paziti moramo, da med nabrekanjem s pretiranim mešanjem ne poškodujemo agaroznih kroglic, da pri pakiranju polnila odstranimo vse zračne mehurčke in da med pripravo medija ne uporabljamo previsokih pritiskov. Vse nepravilnosti pri pripravi kolone lahko vodijo do neenakomernih pretokov, neenakomernega posedanja ter posledično stisnjene gela, ki lahko povzroči pretočni upor in protitlak, s katerim smo tudi mi imeli manjše težave (70). Slab pretok skozi kolono je tudi posledica agregatov proteinov, ki so lahko nastali zaradi previsoke ionske moči elucijskega pufra (71). Čeprav smo uporabljali od proizvajalca priporočene pufre, bi to lahko bil tudi razlog, zakaj β_2 GPI nismo uspeli izprati iz kolone.

5.7. IZOLACIJA Z AFINITETNO KOLONO BLUE-SEPAROPORE 6B-CL

Nazadnje smo β_2 GPI poskusili izolirati še s pomočjo polnila Blue-Separopore 6B-CL, ki ima za razliko od ostalih heparinskih kolon na agarozo kovalentno vezano barvilo Cibacron Blue F3GA (slika 17).



Slika 17: Barvilo Cibacron Blue F3GA kovalentno vezano na agarozno kroglico (72).

Cibacron Blue F3GA, derivat monoklorotriazinskega barvila, imobiliziran na trdno podlago, predstavlja alternativo naravnim afinitetnim polnilom, saj se uporablja za izolacijo in ločbo številnih proteinov (72). Sintetični ligand strukturno in stereokemično imitira naravne biološke molekule, kot so kofaktorji, substrati ali vezavna sredstva (73, 74). Deprotonirano barvilo vsebuje tri negativno nabite sulfatne skupine, ki predstavljajo pomembna mesta za reverzibilno interakcijo z β_2 GPI (75). Glavne prednosti uporabe umetnega barvila v kromatografskem procesu so visoka kemična in mehanska stabilnost, kar omogoča večkratno uporabnost, neobčutljivost na biodegradacijo in visoke koncentracije denaturantov, poleg

tega je ekonomično in netoksično (72, 75). Tehnične značilnosti afinitetnega polnila Blue-Separepore 6B-CL so zbrane v preglednici 8.

Preglednica 8: Značilnosti polnila Blue-Separepore 6B-CL.

Gostota liganda	8 μ M Cibacrone Blue / ml medija
Metoda vezave liganda	Etrska povezava s triazinom
Struktura kroglic	6% visoko premrežena agarozna
Povprečna velikost kroglice	50-175 μ m
Volumen pripravljenega polnila	25,6 ml
Maksimalni pretok skozi kolono	4 ml/min
pH stabilnost	3 – 13

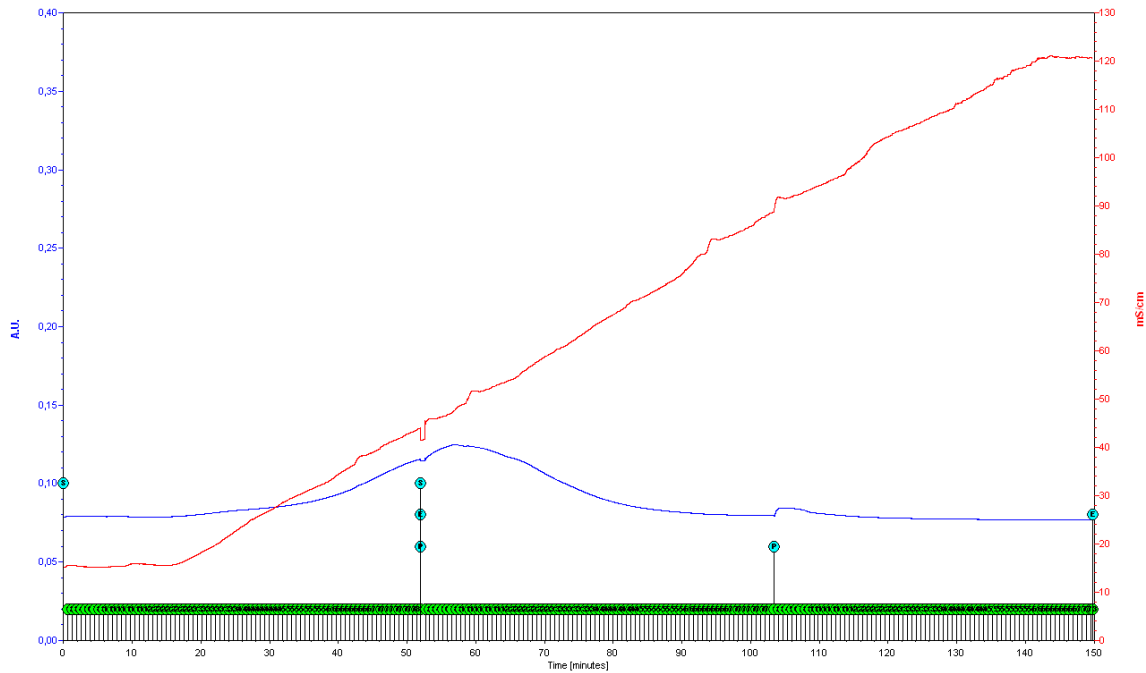
Medij v obliki liofiliziranega praška smo z dH₂O nabrekli do končnega volumna in kolono pred uporabo pripravili po priporočilih proizvajalca (72). Potrebno je dobro spiranje polnila, saj prosto barvilo hitreje in ireverzibilno veže proteine v vzorcu (73). Cibacron Blue F3GA je znano po močni afiniteti do albumina, ki lahko nasiti vezavna mesta v koloni. Da bi preprečili vezavo albumina na sintetični medij, smo z ozirom na raziskovalni članek (76) uporabili natrijev kaprilat. Kaprilna kislina veže albumin v vezavnem mestu za maščobne kisline in s tem onemogoči vezavo albumina na polnilo. Zato smo po obarjanju plazemskih proteinov, dializi ter koncentriranju, vzorcu in spiralnemu pufru dodali natrijev kaprilat do končne koncentracije 25 mM. Zaradi dodatka kisline smo tako vzorcu kot spiralnemu in elucijskemu pufru uravnali pH na 7,4. Pred in po nanosu vzorca na kolono smo izmerili naslednje absorbance:

$$A_{\text{pred kroženjem na Blue-Separepore 6B-CL koloni}} = 2,185$$

$$A_{\text{po kroženju na Blue-Separepore 6B-CL koloni}} = 1,246$$

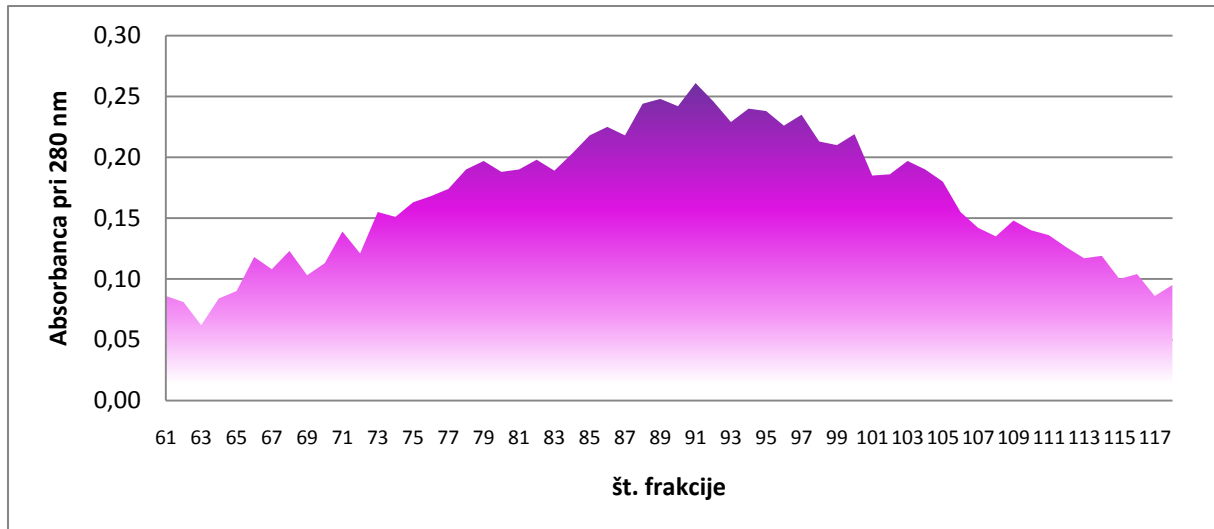
Izvedli smo elucijo z gradientnim višanjem ionske moči pufra (Slika 18):

- Spiralni pufer: 0,02 M Tris-HCl / 0,15 M NaCl + 25 mM Na-kaprilat, pH 7,4
- Elucijski pufer: 0,02 M Tris-HCl / 1,5 M NaCl, pH 7,4



Slika 18: Grafični prikaz elucije iz afinitetne kolone Blue-Sepharopore 6B-CL, izrisan s programom LP Data View. Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbanco eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.

Deprotonirane skupine barvila se pri dvigu ionske jakosti prednostno obdajo s kationi soli, ki nadomestijo vezane proteine, kar vodi v njihovo elucijo. Med razvijanjem in optimizacijo nove metode se raje poslužujemo gradientne elucije, da zagotovimo in nato lažje določimo optimalne vezavne in elucijske pogoje. Ker smo z gradientno elucijo zelo počasi dvigali ionsko jakost pufru, se je tudi protein zelo počasi izpiral (slika 18). Glede na meritve aparature, smo v številnih frakcijah dobili vrh z zelo nizko absorbanco. Frakcije smo analizirali še s spektrofotometrom Nanodrop (slika 19).

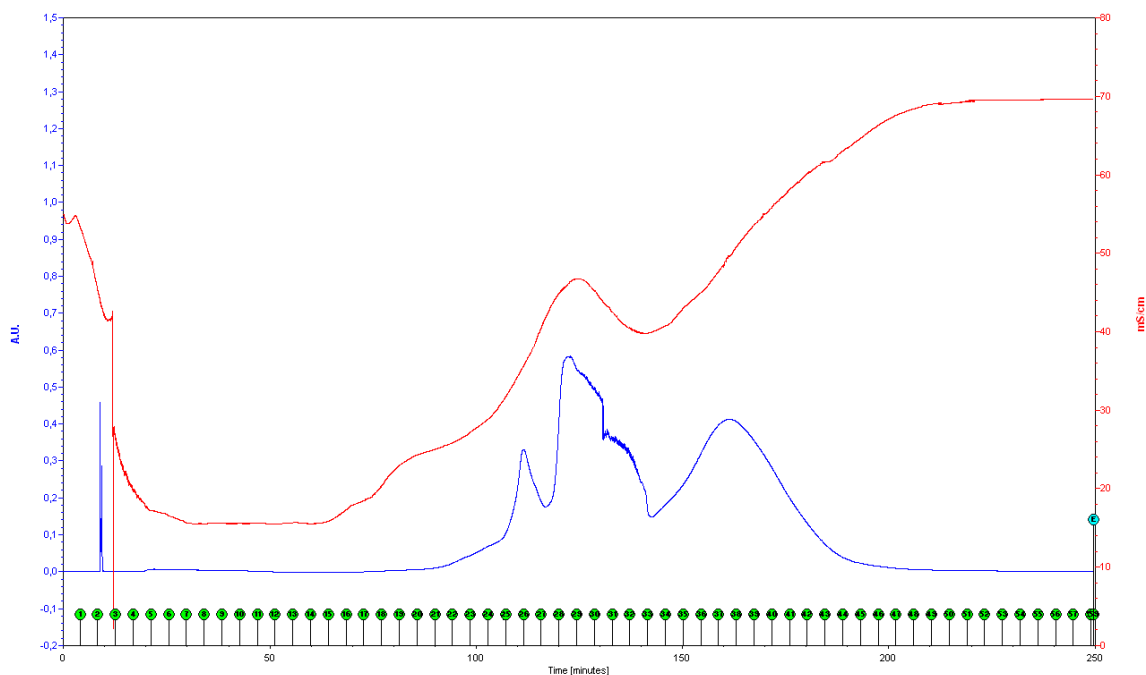


Slika 19: Grafični prikaz izmerjenih absorbanca vsake zbrane frakcije pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop po eluciji iz afinitetne kolone Blue-Separepore 6B-CL.

Nanodrop je kar 51 frakcijam izmeril absorbanco nad 0,1 (slika 19). Vse te frakcije smo združili v skupni vzorec in ga dializirali proti začetnemu acetatnemu pufri.

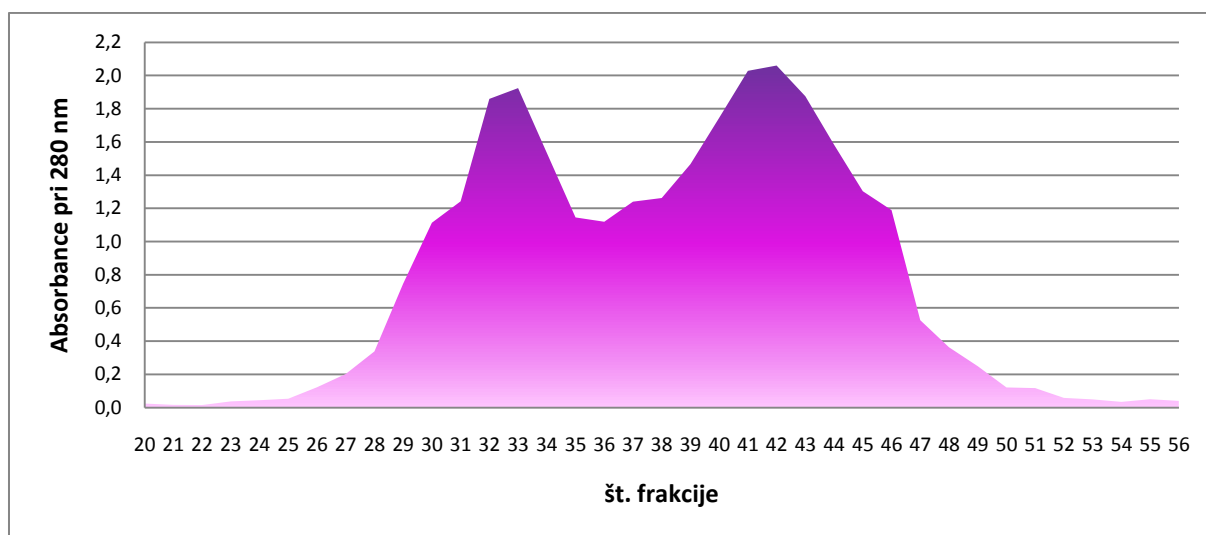
- Izbrane frakcije = 61 - 115
- Volumen = 58 ml
- Absorbanca = 0,169

Ker je bil vzorec volumsko prevelik za nanos na kationsko kolono, smo ga z uporabo ultrafiltracijske celice Amicon skoncentrirali na volumen 25,5 ml. Koncentrat smo pred kroženjem na koloni sterilno filtrirali in mu izmerili absorbanco 0,369. Elucijo proteinov smo izvedli po standardnem postopku (slika 20).



Slika 20: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone Mono S™ 5/50 GL, izrisan s programom LP Data View. Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbance eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.

Čeprav se nam glede na rdečo krivuljo pufrji niso enakomerno mešali in posledično prevodnost ni konstantno naraščala, se nam je protein izločil v treh vrhovih (slika 20). To smo preverili še z merjenjem absorbance posameznih frakcij (slika 21).



Slika 21: Grafični prikaz izmerjene absorbance vsake zbrane frakcije pri 280 nm na spektrofotometru Nanodrop po eluciji s kationske kolone Mono S™ 5/50 GL.

Iz pridobljenih rezultatov obeh grafov smo na podlagi izkušenj in že prej omenjenih razlogov frakcije porazdelili na tri vrhove (preglednica 9), ki smo jih pred zamrznitvijo dializirali v PBS pufri.

Preglednica 9: Zbrani vrhovi izolacije po ionsko-izmenjevalni kromatografiji.

VRHOVI	ŠT. FRAKCIJ	VOLUMEN [ml]	ABSORBANCA [OD]
1. VRH	26 - 29	1,3	0,478
2. VRH	30 - 37	2,8	1,311
3. VRH	38 - 49	4,4	1,183

5.8. PRIMERJAVA IZOLACIJE S HEPARIN SEPHAROSE CL-6B IN BLUE-SEPAROPORE 6B-CL

5.8.1. IZOLACIJA

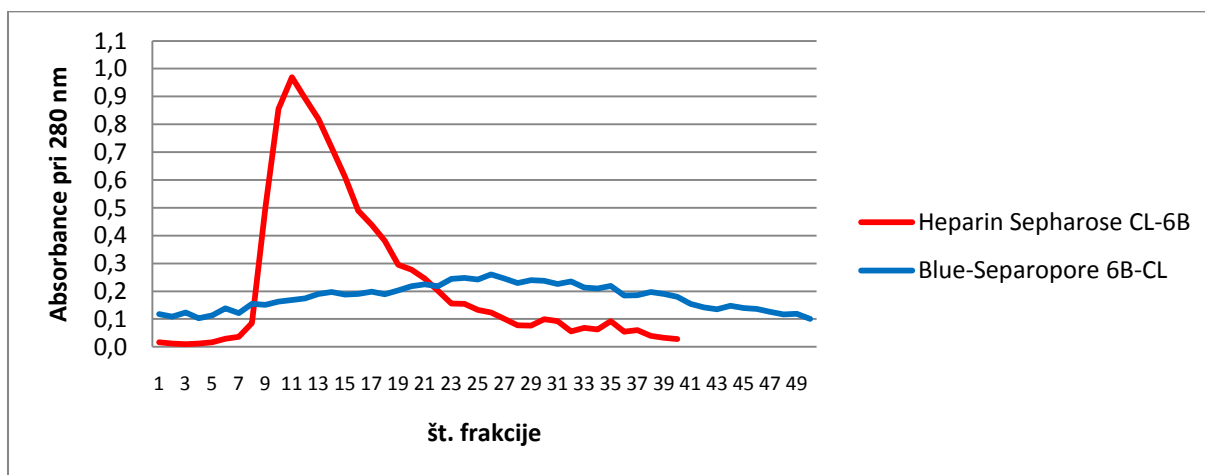
Za lažjo primerjavo med različnimi izolacijami proteina smo na določenih korakih preverjali absorbanco vzorca. V preglednici 10 so zbrani podatki izolacije z obstoječo afinitetno heparinsko kolono (Heparin Sepharose CL-6B) ter uspešno izolacijo z Blue-Separopore 6B-CL.

Preglednica 10: Primerjava absorbanc med samim postopkom izolacije z afinitetno kolono Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL.

ABSORBANCE	HEPARIN SEPHAROSE CL-6B	BLUE-SEPAROPORE 6B-CL
1. A - po obarjanju/po dializi	0,338	0,334
2. A - po koncentriranju/pred SF	2,758	3,390
3. A - odpad po koncentriranju	0,102	0,107
4. A - po SF/pred kroženjem/ proti spiralnem pufri	2,747	2,128*
5. A - po SF/pred kroženjem/ proti elucijskem pufri	2,732	2,185
6. A - po kroženju/ostanek v falkonki	1,779	1,246
7. A - skupna abs. zbranih frakcij po afin. krom.	0,469	0,169
8. A - po dializi/pred nanosom na kationsko kolono	0,409	0,369**
9. A - po kroženju/ostanek v falkonki	0,010	0,027

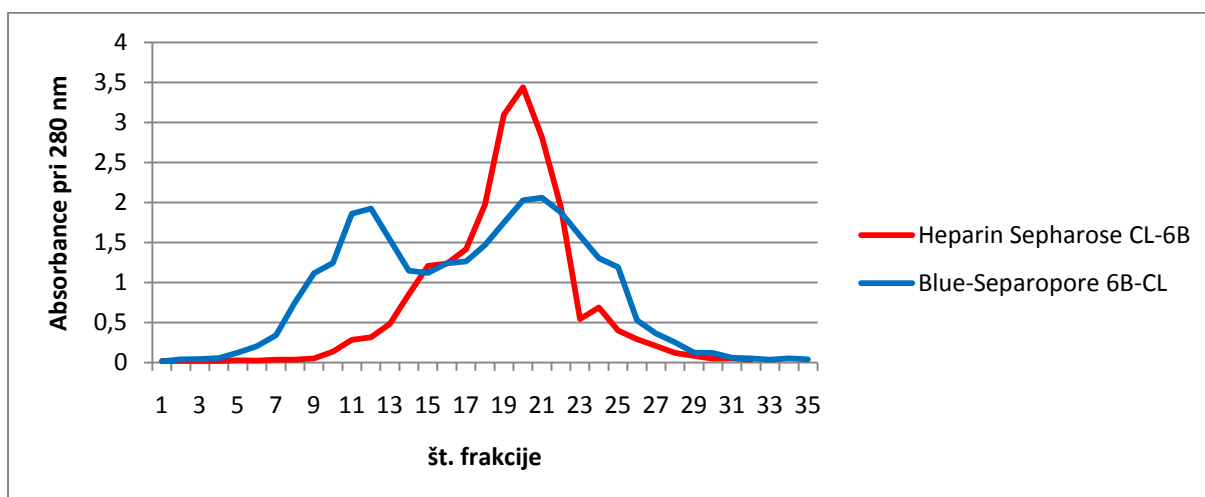
Legenda: A - absorbanca [OD]; SF - sterilno filtriranje; * - Po koncentriranju smo vzorcu dodali ustrezno količino natrijevega kaprilata, ki je močno razredčil vzorec, zato neposredna primerjava absorbanc ni možna; ** - Vzorec smo po dializi zaradi prevelikega volumna zbranih frakcij za nanos na kationsko kolono skoncentrirali na 25,5 ml, zato neposredna primerjava absorbanc ni možna.

Pri eluciji iz kolone s polnilom Blue-Separopore 6B-CL smo izprali več frakcij proteina (večji volumen), a z nižjo koncentracijo (slika 22). Za optimizacijo metode bi lahko uporabili stopenjsko izpiranje, ki je zaradi takojšnje spremembe v ionski jakosti primernejša v primeru enega absorpcijskega vrha. Tako bi dobili tudi ožji vrh z višjo absorbanco v krajšem času. V postopku bi lahko tudi zmanjšali ionsko jakost elucijskega pufra na 1 M NaCl, saj so pri tej molarosti že vsi proteini izprani.



Slika 22: Primerjava absorbanc eluiranega proteina po frakcijah pri izolaciji s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL.

Pri primerjavi elucije β_2 GPI s kationske kolone vidimo višji vrh pri izolaciji s standardnim postopkom in nižje, vendar širše vrhove pri izolaciji z novo kolono (slika 23).



Slika 23: Primerjava absorbanc eluiranega proteina s kationske kolone po frakcijah po izolaciji s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL.

Preglednica 11, v kateri so zbrani volumni in absorbance za vrhove obeh izolacij, prikazuje primerljive rezultate novega afinitetnega polnila z obstoječo kolono. Razlikuje se le v

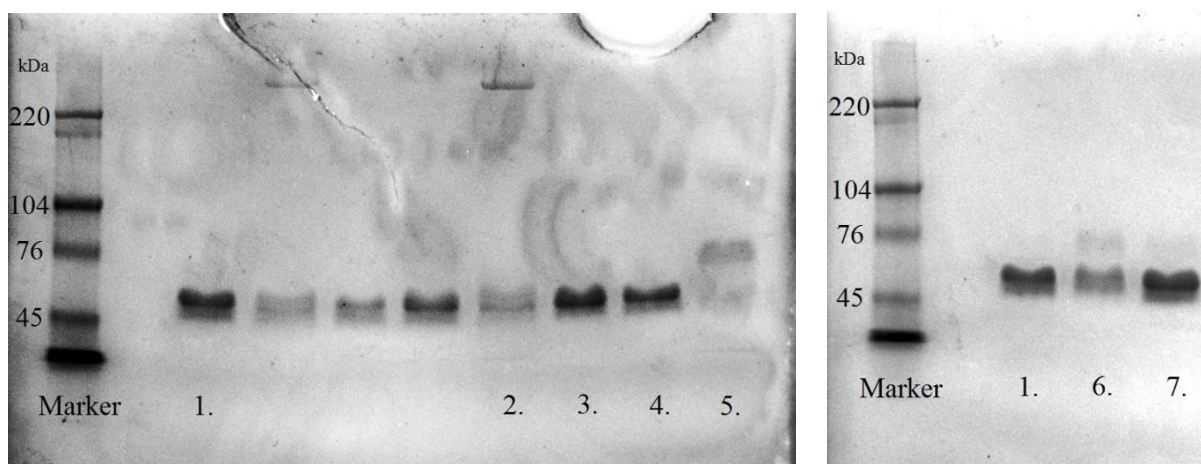
volumsko manjšem drugem vrhu, a zato večjem tretjem vrhu po kationski kromatografiji. Za nadaljnje vrednotenje rezultatov se je potrebno prepričati še o čistosti izolatov ter ohranjenosti antigenih determinant tarčnega proteina.

Preglednica 11: Primerjava volumnov in absorbancc posameznih vrhov izolacij s kationsko kolono po izolaciji s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Sepapopore 6B-CL.

		HEPARIN SEPHAROSE CL-6B		BLUE-SEPAROPORE 6B-CL	
		Volumen [ml]	Absorbanca [OD]	Volumen [ml]	Absorbanca [OD]
Kationsko- izmenjevalna kolona	1. VRH	1,7	0,260	1,3	0,478
	2. VRH	4,0	1,818	2,8	1,311
	3. VRH	2,7	0,433	4,4	1,183

5.8.2. SDS-PAGE

Z elektroforezno ločbo vzorcev smo se nameravali prepričati o čistosti izoliranega proteina β_2 GPI z navidezno molekulsko maso približno 50 kDa. Po barvanju proteinov in razbarvanju ozadja smo elektroforezni gel poslikali v G:BOX-u (slika 24).



Slika 24: Elektroforezna gela slikana v G:BOX-u.

Legenda:

- | | |
|---|---|
| 1. Referenčni vzorec - čist | 5. Blue-Sepapopore 6B-CL: 1. vrh - nečist |
| 2. Heparin Sepharose CL-6B: 1. vrh - nečist | 6. Blue-Sepapopore 6B-CL: 2. vrh - nečist |
| 3. Heparin Sepharose CL-6B: 2. vrh - čist | 7. Blue-Sepapopore 6B-CL: 3. vrh - čist |
| 4. Heparin Sepharose CL-6B: 3. vrh - čist | |

Na levi strani gela je prikazana lestvica molekulskih označevalcev za lažje določanje molekulske mase preiskovanih proteinov. Poleg označevalca smo nanesti še referenčni vzorec, ki je čist β_2 GPI. Prvi vrhovi običajno vsebujejo imunske komplekse imunoglobulinov z

β_2 GPI, zato ni presenetljivo, da 2. in 5. vzorec vsebujeta dodatne lise (56). V molekulski masi se razlikujejo tudi lise 6. ter rahlo pri 7. vzorcu. Samo ena vrsta linije se kaže pri čistih vzorcih drugega in tretjega vrha standardne izolacije, kar pomeni da smo vrhove dobro ločili.

5.8.3. ELISA

Da je izoliran protein primeren za laboratorijsko diagnostiko, se je potrebno prepričati še s hišno anti- β_2 GPI ELISA. Pri tej metodi s pomočjo monoklonskih anti- β_2 GPI protiteles določimo ohranjenost antigenih lastnosti očiščenega proteina. Primerjali smo titre naših izolatov z referenčnim vzorcem. Uporabili smo 6 vzorcev bolnikov s pozitivno določenimi titri IgG, IgM oziroma IgA anti- β_2 GPI. V preglednici 12 imamo tudi primerjavo standardov ter pozitivne in negativne kontrole.

Preglednica 12: Primerjava antigenske čistosti 2. in 3. vrha izolacije β_2 GPI s Heparin Sepharose CL-6B z referenčnim vzorcem.

	IgG	Titer				IgM	Titer				IgA	Titer		
		RV	H-2.	H-3.			RV	H-2.	H-3.			RV	H-2.	H-3.
	Vzorec 1	5	3	3		Vzorec 1	3	4	3		Vzorec 1	3	1	1
	Vzorec 2	0	0	1		Vzorec 2	6	5	5		Vzorec 2	8	4	4
	Vzorec 3	10	7	7		Vzorec 3	4	6	4		Vzorec 3	9	4	5
	Vzorec 4	1	2	7		Vzorec 4	2	2	2		Vzorec 4	3	1	2
	Vzorec 5	7	8	8		Vzorec 5	10	12	10		Vzorec 5	4	2	2
	Vzorec 6	0	0	0		Vzorec 6	0	0	-1		Vzorec 6	0	0	0
IgG-	100	34	34	34	IgM-	1000	24	24	24	IgA-VA	1000	25	24	24
HCAL	50	17	17	17	EY2C9	670	12	12	12		615	12	12	12
ng/ml	25	8	8	8		400	6	5	6		350	6	6	6
	12,5	4	4	4		220	3	3	2		172	3	3	3
	6,25	2	2	2		125	1	1	1		92	1	1	1
	3,12	1	1	1		60	0	0	0		40	0	0	0
POZ	3-7	3	6	4	POZ	3-7	5	5	4	POZ	6-10	3	2	3
NEG	<2	0	1	2	NEG	<2	0	0	0	NEG	<2	0	0	0

Legenda: RV-referenčni vzorec, H-2.- 2. vrh izolacije s kolono Heparin Sepharose CL-6B, H-3.- 3. vrh, HCAL - himerno monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgG anti- β_2 GPI; EY2C9 - monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgM anti- β_2 GPI, VA - interni standard (serum bolnika z določenimi titri) za detekcijo IgA anti- β_2 GPI.

Za testiranje antigenih determinant smo uporabili le čiste vrhove po SDS-PAGE. Pri izolaciji s pomočjo Heparin Sepharose CL-6B smo dobili dva vrhova, ki sta bila primerna za testiranje z ELISA testom. V preglednici 12 vidimo, da rezultati titrov med seboj niso povsod enaki, so pa primerljivi, kar pomeni, da sta oba vzorca primerna za diagnostično določanje protiteles.

Na antigensko čistost smo z izvedbo ELISA preverili še tretji vrh izolacije z novo kolono, kar je prikazano v preglednici 13.

Preglednica 13: Primerjava antigenske čistosti 3. vrha izolacije β_2 GPI z Blue-Separopore 6B-CL z referenčnim vzorcem.

	IgG	Titer			IgM	Titer			IgA	Titer			
		RV	B-3.			RV	B-3.			RV	B-3.		
		Vzorec 1	4	3		Vzorec 1	3	3		Vzorec 1	2	2	
		Vzorec 2	0	0		Vzorec 2	5	4		Vzorec 2	8	6	
		Vzorec 3	8	7		Vzorec 3	5	4		Vzorec 3	10	8	
		Vzorec 4	1	1		Vzorec 4	2	2		Vzorec 4	4	3	
		Vzorec 5	8	7		Vzorec 5	10	9		Vzorec 5	4	3	
		Vzorec 6	0	0		Vzorec 6	0	0		Vzorec 6	0	0	
IgG-	100	34	34		IgM-	1000	24	24		IgA-VA	1000	0	0
HCAL	50	17	17		EY2C9	670	12	12		615	25	25	
ng/ml	25	8	8			400	6	6		350	12	12	
	12,5	4	4			220	3	3		172	6	6	
	6,25	1	1			125	1	1		92	3	3	
	3,12	1	1			60	0	0		40	0	0	
POZ	3-7	3	3		POZ	3-7	5	4		POZ	6-10	3	2
NEG	<2	0	0		NEG	<2	0	0		NEG	<2	0	0

Legenda: RV - referenčni vzorec, B-3.- 3. vrh izolacije s kolono Blue-Separopore 6B-CL, HCAL - himerno monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgG anti- β_2 GPI; EY2C9 - monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgM anti- β_2 GPI, VA - interni standard (serum bolnika z določenimi titri) za detekcijo IgA anti- β_2 GPI.

Čeprav je vzorec 3. vrha na SDS-PAGE vseboval blede nečistočo, se je izkazalo, da je izolat primeren za uporabo v diagnostične namene. Najverjetneje šibko liso predstavlja sočasna izolacija inhibitorja proteina C z navidezno molekulsko maso 57 kDa, ki pa zaradi redko prisotnih protiteles proti njemu ne moti analize (56). Ker je bila na elektroforeznem gelu vidna zelo močna lisa izoliranega proteina, lahko predvidevamo tudi, da je vzorec vseboval veliko število molekul, ki so se na poti skozi premrežen gel med seboj ovirale in izrisale blede senco. Naslednjič bi lahko s testiranjem drugega vrha izolacije preverili, ali nečistota pri okoli 60 kDa vpliva na imunokemične rezultate.

5.8.4. IZKORISTEK

Začetni alikvot plazme pri izolaciji z afinitetno kolono Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Separopore 6B-CL je bil 250 ml. Z upoštevanjem povprečne koncentracije β_2 GPI v krvnem obtoku zdravega posameznika, ki znaša 0,2 g/l, bi s 100% izkoristkom izolirali 50 mg proteina. V preglednici 14 sta izračunana izkoristka iz čistih in antigensko uporabnih vzorcev obeh izolacij.

Preglednica 14: Prikaz volumnov, koncentracij, mas in izkoristka izolacij s Heparin Sepharose CL-6B in Blue-Sepapopore 6B-CL.

VZOREC	V [ml]	c [g/l]	m [mg]	η [%]
2. in 3. vrh izolacije s Heparin Sepharose CL-6B	6,4	1,319	8,4411	16,88
3. vrh izolacije z Blue-Sepapopore 6B-CL	4,4	1,183	5,2052	10,41

Legenda: V - volumen, c - koncentracija, m - masa, η - izkoristek

Čeprav je β_2 GPI v krvi prisoten v visoki koncentraciji, je zaradi številnih postopkov pri njegovi izolaciji končni izkoristek za diagnostično uporabnost zelo nizek. Velik del proteinske frakcije izgubimo že z obarjanjem s perkloro kislino, s katero oborimo tudi β_2 GPI vezan na razne lipoproteinske delce, poleg tega pa lahko kislina kljub kontroliranim pogojem vpliva na integriteto molekule (61). Do tako nizkih izkoristkov glikoproteina pridemo še z upoštevanjem možnosti tvorbe imunskih kompleksov ter oksidacijskih in degradacijskih učinkov na β_2 GPI zaradi samega postopka in dolgotrajnosti izolacije (56). Čeprav nam z novim polnilom ni uspelo zvišati izkoristka izolacije, bo Blue-Sepapopore 6B-CL z optimizacijo postopka primerna zamenjava za obstoječo heparinsko afinitetno kolono.

5.9. PRIMERJAVA IZOLACIJE β_2 GPI Z IONSKO-IZMENJEVALNO KROMATOGRAFIJO PRI 4 °C IN NA SOBNI TEMPERATUR

V drugi polovici raziskovalnega dela smo se osredotočili na optimizacijo postopka ionsko-izmenjevalne kromatografije kot koraka pri izolaciji β_2 GPI, ki se po standardnem protokolu izvaja v hladni sobi na 4 °C. Pri tem uporabljamo kationsko kolono Mono STM 5/50 GL, katere delavna temperatura po priporočilih proizvajalca znaša od 4 do 40 °C. Da bi se izognili izvajanju kromatografije v hladni sobi, smo kroženje in izpiranje vzorca s kationske kolone poskusili opraviti na sobni T. Kolona Mono STM 5/50 GL vsebuje hidrofilno matrico s končnimi -CH₂-SO₃ skupinami, kar uvršča polnilo med močne kationske izmenjevalce (preglednica 15). Stabilnost medija v širokem pH območju omogoča izbiro najprimernejših pogojev za vezavo in elucijo posameznih proteinov, majhne dimenzije delcev polnila izboljšujejo resolucijo, enotnost kroglic pa jamči dobre pretočne lastnosti kolone (67).

Preglednica 15: Značilnosti kationske kolone Mono S™ 5/50 GL.

Funkcionalna skupina	-O-CH ₂ CHOHCH ₂ OCH ₂ CHOHCH ₂ SO ₃ ⁻
Ionska kapaciteta kolone	0,12 – 0,15 mmol H ⁺ / ml medija
Struktura kroglic	Monodispergirane porozne kroglice iz polistiren/divinil benzena
Povprečna velikost kroglice	10 µm
Volumen pripravljenega polnila	1 ml
Maksimalni pretok skozi kolono	3 ml/min
Maksimalni pritisk čez kolono	40 bar
pH stabilnost	2 – 12

5.9.1. IZOLACIJA

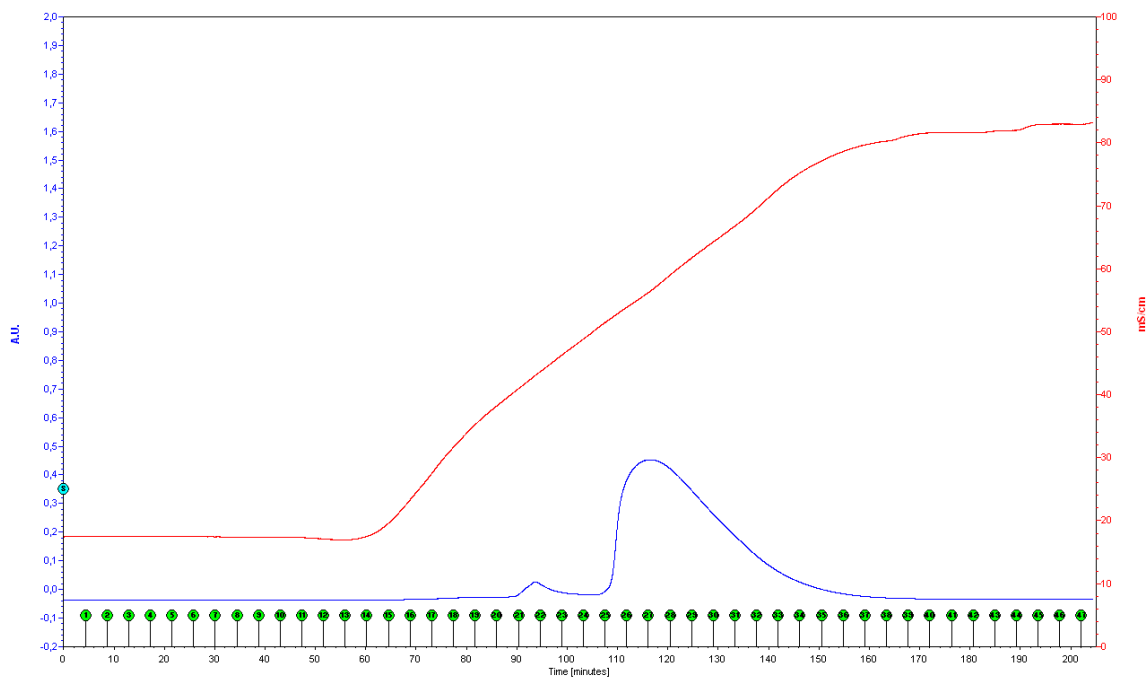
Za primerljive rezultate smo uporabili mešanico dveh plazem. En alikvot smo porabili za izolacijo proteina po standardnem protokolu, pri katerem sta vezava in izpiranje β₂GPI potekala na 4 °C, pri preostali mešanici pa se je celotni postopek ionsko-izmenjevalne kromatografije izvršil na sobni T (20 - 25 °C). Ostali koraki v postopku izolacije so ostali nespremenjeni. Afinitetno kromatografijo smo izvajali na obstoječi koloni Heparin Sepharose CL-6B. Med potekom obeh izolacij smo izmerili naslednje absorbance vzorca (preglednica 16):

Preglednica 16: Primerjava absorbanc med samim postopkom izolacije z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na 4 °C in sobni temperaturi.

ABSORBANCE	4 °C	Sobna temperatura
1. A - po obarjanju/po dializi	0,234	0,272
2. A - po koncentriranju/pred SF	2,029	2,546
3. A - odpad po koncentriranju	0,052	0,083
4. A - po SF/pred kroženjem/proti 0,02 M Tris-HCl / 0,15 M NaCl	2,389	2,518
5. A - po SF/pred kroženjem/ proti 0,02 M Tris-HCl / 0,35 M NaCl	2,238	2,455
6. A - po kroženju/ostanek v falkonki	0,097	1,395
7. A - skupna abs. zbranih frakcij po afinitetni kromatografiji	0,322	0,554
8. A - po dializi/pred nanosom na kationsko kolono	0,298	0,401
9. A - po kroženju/ostanek v falkonki	0,004	0,015

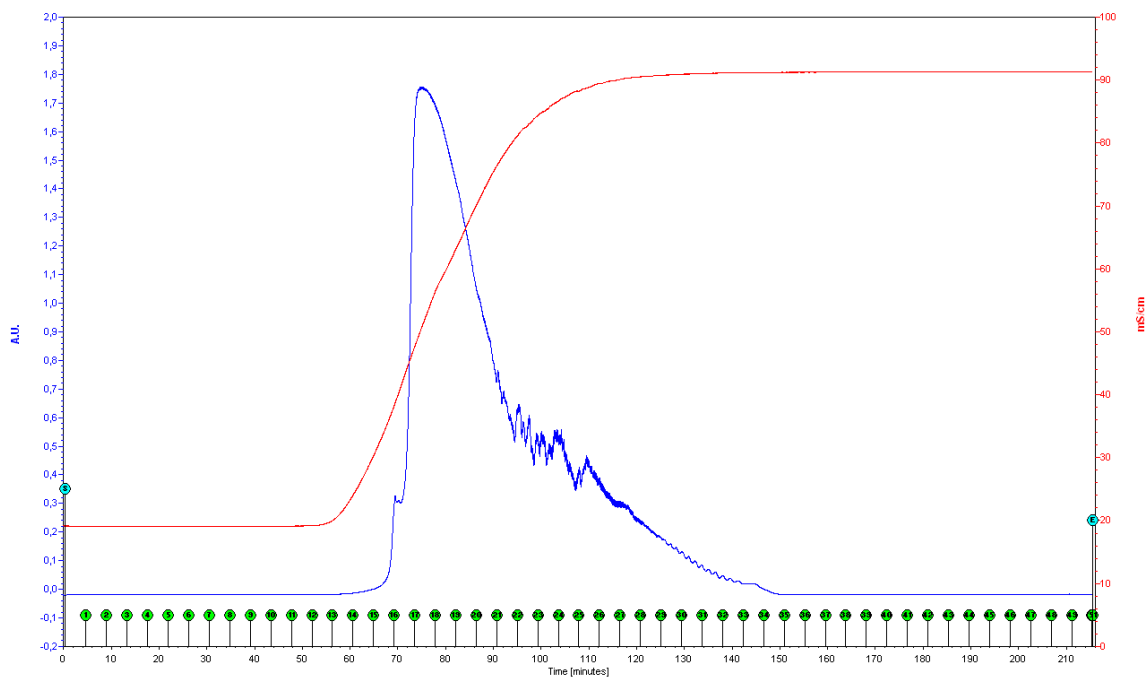
Legenda: A - absorbanca [OD], SF - sterilno filtriranje

Pri primerjavi krivulj, izrisanih z aparaturom Biologic LP, ob izpiranju na 4 °C (slika 25) in na sobni T (slika 26), se pokažejo ključne razlike z večjim izkoristkom na sobni T.



Slika 25: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone pri 4 °C, izrisan s programom LP Data View.

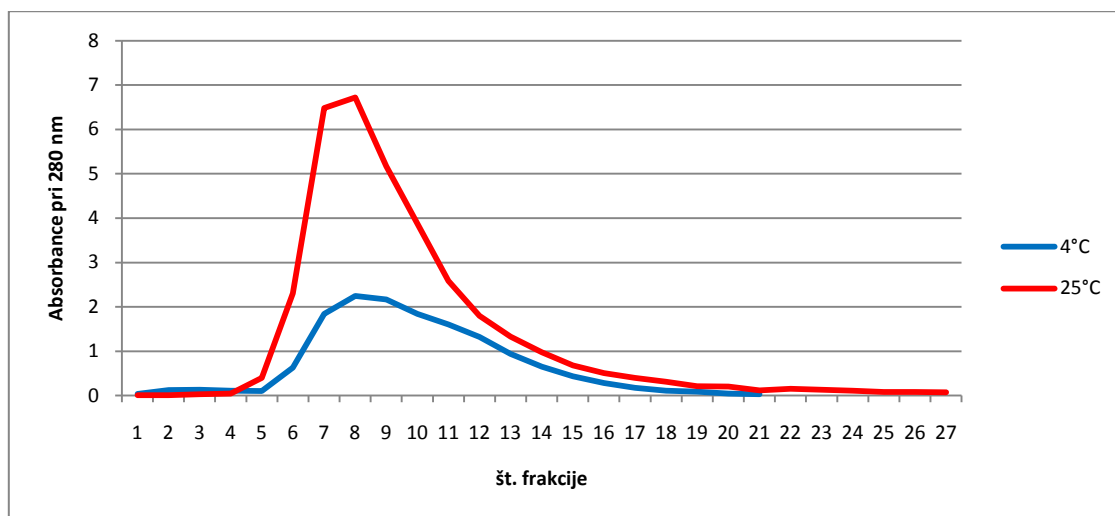
Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbanco eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.



Slika 26: Grafični prikaz elucije iz kationske kolone na sobni temperaturi, izrisan s programom LP Data View.

Legenda: rdeča krivulja prikazuje prevodnost, modra krivulja absorbanco eluiranega proteina in oštevilčene zelene oznake označujejo zaporedje zbranih frakcij.

Vrednosti absorbanc obeh izolacij smo primerjali še z meritvijo frakcij na Nanodropu (slika 27).



Slika 27: Primerjava absorbanc eluiranega proteina iz kationske kolone po frakcijah pri izolaciji β_2 GPI z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4 °C in sobni temperaturi.

Grafi nam prikazujejo volumsko in koncentracijsko višjo količino izoliranega β_2 GPI s postopkom ionsko-izmenjevalne kromatografije na sobni temperaturi. Pri sami eluciji je pomembno postopno zviševanje pH in ionske jakosti z mešanjem začetnega in končnega acetatnega pufra. Uporaba linearnega gradienta in nizkih pretokov nam z večjo resolucijo loči posamezne komponente vzorca, kar je pomembno pri alikvotiranju dobljenih vrhov (77). Iz drugega vrha izolacije pridobimo največji donos čistega β_2 GPI, zato ga moramo pravilno ločiti od imunskih kompleksov, prisotnih v prvem elucijskem vrhu. Sočasno se z β_2 GPI v večjem deležu tretjega vrha izpere še inhibitor proteina C, ki pa načeloma ne moti ELISA testa (56). V preglednici 17 so zbrani volumni in absorbance dobljenih vrhov izolacij, ki prikazujejo višjo absorbanco in posledično več izoliranega proteina s kationsko kromatografijo na sobni temperaturi.

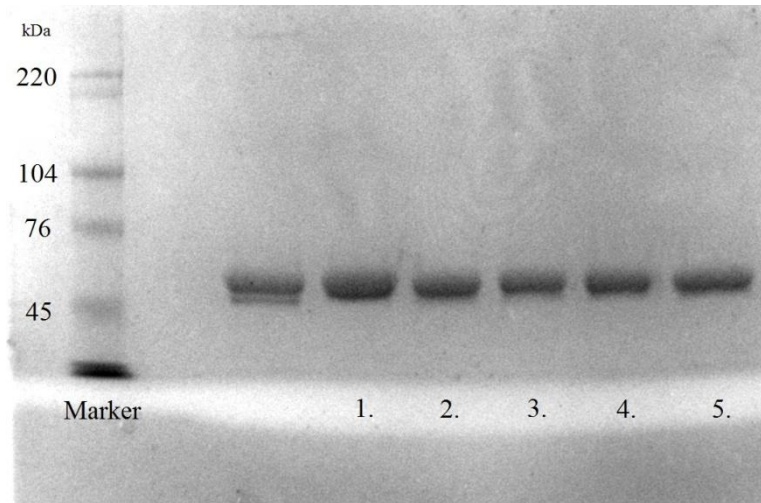
Preglednica 17: Primerjava volumnov in absorbanc posameznih vrhov izolacij z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4 °C in na sobni temperaturi.

		4 °C		Sobna temperatura	
		Volumen [ml]	Absorbanca [OD]	Volumen [ml]	Absorbanca [OD]
Po ionsko-izmenjevalni kromatografiji	1. VRH	1,15	0,122	/*	/
	2. VRH	2,40	1,424	2,10	3,010
	3. VRH	1,65	0,268	3,90	0,149

* - Volumen 1. vrha je bil premajhen za dializo

5.9.2. SDS-PAGE

Z elektroforezno ločbo proteinov smo preverili čistost izbranih vrhov (slika 28). Z gela lahko razberemo, da vsi izolati vsebujejo izključno β_2 GPI.



Slika 28: Elektroforezni gel slikan v G:BOX-u.

Legenda: 1. - sobna T: 2. vrh, 2. - sobna T: 3. vrh, 3. - referenčni vzorec, 4. – 4 °C: 2. vrh, 5. – 4 °C: 3. vrh

5.9.3. ELISA

Z ELISA testom smo nameravali preveriti še, ali je daljša izpostavljenost vzorca sobni T pri kationski kromatografiji vplivala na antigenske lastnosti β_2 GPI. Titre vzorcev bolnikov smo najprej primerjali z izolatom, pridobljenim po standardnem postopku (preglednica 18) ter nato še z izolatom, pridobljenim na sobni temperaturi (preglednica 19).

Preglednica 18: Primerjava antigenske čistosti 2. in 3. vrha izolacije β_2 GPI z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4 °C glede na referenčni vzorec.

	IgG	Titer				IgM	Titer				IgA	Titer			
		RV	4°-2	4°-3			RV	4°-2	4°-3			RV	4°-2	4°-3	
		Vzorec 1	4	3	3		Vzorec 1	3	3	3		Vzorec 1	2	1	1
		Vzorec 2	0	0	0		Vzorec 2	5	5	5		Vzorec 2	7	6	5
		Vzorec 3	10	8	8		Vzorec 3	5	5	6		Vzorec 3	8	7	6
		Vzorec 4	1	1	1		Vzorec 4	2	2	2		Vzorec 4	4	3	3
		Vzorec 5	9	6	7		Vzorec 5	10	11	13		Vzorec 5	4	3	2
		Vzorec 6	0	0	0		Vzorec 6	0	0	0		Vzorec 6	0	-1	0
IgG-	100	35	34	34	IgM-	1000	24	24	24	IgA-VA	1000	25	25	24	
HCAL	50	17	17	17	EY2C9	670	12	12	12	615	12	12	12		
ng/ml	25	9	8	9	400	400	6	6	6	350	6	6	6		
	12,5	4	4	4	220	220	3	3	3	172	3	3	3		
	6,25	2	2	2	125	125	1	1	1	92	1	1	1		
	3,12	1	1	1	60	60	0	0	0	40	0	0	0		
POZ	3-7	4	2	3	POZ	3-7	5	3	4	POZ	6-10	3	3	3	
NEG	<2	0	0	0	NEG	<2	0	0	0	NEG	<2	0	0	0	

Legenda: RV - referenčni vzorec, 4 °C-2 - 2. vrh izolacije z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4 °C, 4 °C-3 - 3. vrh izolacije z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4 °C, HCAL - himerno monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgG anti- β_2 GPI; EY2C9 - monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgM anti- β_2 GPI, VA - interni standard (serum bolnika z določenimi titri) za detekcijo IgA anti- β_2 GPI.

Preglednica 19: Primerjava antigenske čistosti 2. vrha izolacije β_2 GPI z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na sobni temperaturi glede na referenčni vzorec.

	IgG	Titer			IgM	Titer			IgA	Titer		
		RV	ST-2			RV	ST-2			RV	ST-2	
		Vzorec 1	5	4		Vzorec 1	3	2		Vzorec 1	2	1
		Vzorec 2	0	0		Vzorec 2	4	4		Vzorec 2	7	5
		Vzorec 3	9	10		Vzorec 3	5	4		Vzorec 3	9	5
		Vzorec 4	1	1		Vzorec 4	2	2		Vzorec 4	4	3
		Vzorec 5	8	9		Vzorec 5	10	10		Vzorec 5	4	2
		Vzorec 6	0	0		Vzorec 6	0	0		Vzorec 6	0	0
IgG-	100	34	34	IgM-	1000	24	24	IgA-VA	1000	24	24	
HCAL	50	17	17	EY2C9	670	12	12	615	12	12		
ng/ml	25	8	8	400	400	5	6	350	5	6		
	12,5	4	4	220	220	3	3	172	3	3		
	6,25	2	2	125	125	1	1	92	1	1		
	3,12	1	1	60	60	0	0	40	0	0		
POZ	3-7	4	4	POZ	3-7	6	4	POZ	6-10	4	3	
NEG	<2	0	0	NEG	<2	0	0	NEG	<2	0	0	

Legenda: RV - referenčni vzorec, ST-2 - 2. vrh izolacije z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na sobni T, HCAL - himerno monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgG anti- β_2 GPI, EY2C9 - monoklonsko protitelo kot standard za detekcijo IgM anti- β_2 GPI, VA - interni standard (serum bolnika z določenimi titri) za detekcijo IgA anti- β_2 GPI.

Iz rezultatov testa ELISA smo s primerjavo titrov določili vzorce kot primerne za diagnostično analizo, kar pomeni da izpostavitve vzorca višjim temperaturam ni poškodovala samega proteina. Koncentracija 3. vrha izolacije na sobni temperaturi je bila za izvedbo postopka prenizka.

5.9.4. IZKORISTEK

Pri primerjavi ionsko-izmenjevalne kromatografije pri različnih temperaturah smo za izolacijo β_2 GPI uporabili 460 ml plazme dveh krvodajalcev. Vzorca smo združili in vsako izolacijo izvedli z 230 ml alikvotom. V tolikšnem volumnu plazme se pri zdravem posamezniku s povprečno koncentracijo 0,2 g/l nahaja 46 mg β_2 GPI. Glede na rezultate SDS-PAGE in ELISA, smo končnim vzorcem določili izkoristek izolacije pri 4 °C in na sobni T (preglednica 20).

Preglednica 20: Prikaz volumnov, koncentracij, mas in izkoristka izolacij z ionsko-izmenjevalno kromatografijo pri 4 °C in sobni temperaturi.

VZOREC	V [ml]	c [g/l]	m [mg]	η [%]
2. in 3. vrh izolacije pri 4 °C	4,05	0,953	3,856	8,39
2. vrh izolacije na sobni T	2,10	3,010	6,321	13,74

Legenda: V - volumen, c - koncentracija, m - masa, η - izkoristek

Izolacija z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na sobni T je bila uspešnejša, saj smo glede na izkoristek izolirali kar 63,8 % več proteina kot pri 4 °C. Iz praktičnega vidika diagnostične uporabnosti izoliranega β_2 GPI upoštevamo, da za eno hišno ELISA analizo, kar pomeni 48 testov, porabimo 50 μ L vzorca z 1 mg/l β_2 GPI. Glede na izkoristek smo z izolatom po standardnem protokolu lahko opravili približno 3700 testov, z izboljšavo postopka pa lahko izvedemo približno 6000 analiz. To pomeni, da smo diagnostično uporabnost izoliranega proteina izboljšali za dodatnih \approx 2300 testov.

Med izolacijo so prisotni številni faktorji, ki lahko pri enakem postopku vodijo do razlik v končni količini čistega proteina. Ker se izkoristki od izolacije do izolacije lahko razlikujejo, smo opravili še eno primerjavo, kjer smo v postopku spremenili zgolj temperaturo kroženja vzorca in elucijo proteina s kationske kolone. Dodatna primerjava nam je potrdila ugotovitev, da kationsko-izmenjevalna kromatografija na sobni T vodi do boljšega izkoristka izoliranega proteina. Učinek temperature je odvisen od strukture tarčnega analita, same kolone in sestave pufrov ter ima vpliv na ionsko-izmenjevalne reakcije in učinkovitost kolone. Za

večino spojin velja, da se z višanjem temperature krajša retencijski čas (čas zadrževanja analita v koloni), kar vodi v slabšo ločbo oziroma resolucijo. Vendar predvsem pri ionsko-izmenjevalni kromatografiji to vedno ne drži. Zaradi višje temperature se zmanjša viskoznost vzorca, kar se kaže v manjšem protitlaku v koloni in posledično v učinkovitejši ločbi proteinov (78). Poleg tega naj bi z višanjem temperature naraščalo število teoretskih podov, ki nam povedo, kolikokrat se vzorec prerazporedi med mobilno in stacionarno fazo na poti skozi kolono. Večje število teoretskih podov je kvantitativni pokazatelj boljše učinkovitosti kolone (79). Glede na to, da pufrom umerjamo pH na sobni temperaturi, je lahko razlog v boljšem izkoristku proteina tudi zaradi uporabe primernejšega pH elucijskega pufra, saj na majhne spremembe v pH vplivajo tudi temperaturne spremembe (80). Slabša stran izvajanja kromatografije pri povišani temperaturi so hitrejše poškodbe kolone zaradi degradacije polnila, kar smo opazili tudi na naši kationski koloni Mono STM 5/50 GL (81) in pa večja možnost neugodnih sprememb proteina pri višjih temperaturah, čemur se izognemo s čim krajšim časom izpostavljanja vzorca sobni T pred in po sami kromatografiji.

5.10. ZAKLJUČEK

Glavni namen magistrske naloge je bil najti nadomestitev za obstoječo afinitetno kolono v rutinskem postopku izolacije β_2 GPI. Iz raziskovalnega dela smo ugotovili, da je najprimernejša zamenjava komercialno dostopno afinitetno polnilo Blue-Separopore 6B-CL blagovne znamke BioWorld. Z optimizacijo postopka in posledično še višjim izkoristkom izoliranega proteina, bo nova kolona odlično služila za pridobivanje čistega in antigensko uporabnega β_2 GPI za določanje anti- β_2 GPI protiteles pri bolnikih z APS.

6. SKLEPI

V magistrski nalogi smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Koloni HiPrep Heparin Fast Flow 16/10 in Heparin Separopore (Agarose) 4B sta se izkazali za neprimerni v našem postopku izolacije. Tarčnega proteina nam namreč kljub številnim poskusom in optimizacijam ni uspelo izprati iz obeh medijev.
- S preverjanjem izkoristka in imunokemijskih lastnosti izoliranega β_2 GPI smo dokazali, da postopek izolacije z uporabo kolone Blue-Separopore 6B-CL ustrezno nadomešča kolono Heparin sepharose CL-6B, ki ni več dobavljiva.
- Izkoristek izoliranega β_2 GPI smo izboljšali tudi z optimizacijo ionsko-izmenjevalne kromatografije s kolono Mono STM 5/50 GL. Dokazali smo, da kroženje in izpiranje vzorca na sobni temperaturi vodi v količinsko in koncentracijsko več čistega in antigensko ohranjenega izoliranega β_2 GPI v primerjavi s postopkom kromatografije v hladni sobi pri 4 °C.

7. LITERATURA

1. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010;376(9751):1498-509.
2. Pierangeli SS, Chen PP, Raschi E, Scurati S, Grossi C, Borghi MO, et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: pathogenic mechanisms. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2008;34(3):236-50.
3. Dusse LM, Silva FD, Freitas LG, Rios DR, Armond SC, Marcolino MS. Antiphospholipid syndrome: a clinical and laboratorial challenge. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2014;60(2):181-6.
4. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA. Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease. *Thrombosis research*. 2004;114(5-6):335-46.
5. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(2):295-306.
6. Mojca Kos-Golja SP, editor. *Revmatološki priručnik za družinskega zdravnika* 2008.
7. Devreese K, Hoylaerts MF. Challenges in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Clinical chemistry*. 2010;56(6):930-40.
8. Meroni PL, Chighizola CB, Rovelli F, Gerosa M. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(2):209.
9. Urbanus RT, Derksen RH, de Groot PG. Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Blood reviews*. 2008;22(2):93-105.
10. de Laat HB, Derksen RH, Urbanus RT, Roest M, de Groot PG. beta2-glycoprotein I-dependent lupus anticoagulant highly correlates with thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2004;104(12):3598-602.
11. Vlachoyiannopoulos PG, Samarkos M, Sikara M, Tsiligros P. Antiphospholipid antibodies: laboratory and pathogenetic aspects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2007;44(3):271-338.
12. Pengo V, Denas G, Padayattil SJ, Zoppellaro G, Bison E, Banzato A, et al. Diagnosis and therapy of antiphospholipid syndrome. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2015;125(9):672-7.
13. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(11):4120-4.
14. Schultze HE. [Glycoproteins of human plasma]. *Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften*. 1961;17:77-91.
15. Agar C, de Groot PG, Levels JH, Marquart JA, Meijers JC. Beta2-glycoprotein I is incorrectly named apolipoprotein H. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009;7(1):235-6.
16. Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, Krilis SA. New insights into the biology and pathobiology of beta2-glycoprotein I. *Current rheumatology reports*. 2011;13(1):90-5.
17. Matsuura E, Shen L, Matsunami Y, Quan N, Makarova M, Geske FJ, et al. Pathophysiology of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010;19(4):379-84.
18. Willis R, Pierangeli SS. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013;1285:44-58.
19. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *The New England journal of medicine*. 2013;368(11):1033-44.
20. Koike T. Antiphospholipid syndrome: 30 years and our contribution. *International journal of rheumatic diseases*. 2015;18(2):233-41.

21. Rahgozar S. Revisiting beta 2 glycoprotein I, the major autoantigen in the antiphospholipid syndrome. *Iranian journal of immunology* : IJI. 2012;9(2):73-85.
22. Miyakis S, Robertson SA, Krilis SA. Beta-2 glycoprotein I and its role in antiphospholipid syndrome-lessons from knockout mice. *Clinical immunology*. 2004;112(2):136-43.
23. de Groot PG, Meijers JC. beta(2) -Glycoprotein I: evolution, structure and function. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH. 2011;9(7):1275-84.
24. Lin F, Murphy R, White B, Kelly J, Feighery C, Doyle R, et al. Circulating levels of beta2-glycoprotein I in thrombotic disorders and in inflammation. *Lupus*. 2006;15(2):87-93.
25. Probert DN. The relation of sex, smoking status, birth rank, and parental age to beta2-glycoprotein I levels and phenotypes in a sample of Australian Caucasian adults. *Human genetics*. 1978;43(3):281-8.
26. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner GM, Laggner P, et al. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *The EMBO journal*. 1999;18(22):6228-39.
27. Steinkasserer A, Estaller C, Weiss EH, Sim RB, Day AJ. Complete nucleotide and deduced amino acid sequence of human beta 2-glycoprotein I. *The Biochemical journal*. 1991;277 (Pt 2):387-91.
28. Agar C, van Os GM, Morgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. Beta2-glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2010;116(8):1336-43.
29. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *The EMBO journal*. 1999;18(19):5166-74.
30. https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=beta+2-glycoprotein+i&lang=1. [15.2.2016].
31. <http://www.cli-online.com/index.php?id=767&fromEmag=1&qry=24380>. [15.2.2016].
32. Agar C, De Groot, P., Meijers, J. Structural changes in β 2-glycoprotein I and the Antiphospholipid syndrome. In: Bulikova E, editor. *Antiphospholipid syndrome 2012*.
33. Zager U, Kveder T, Cucnik S, Bozic B, Lunder M. Anti-beta2-glycoprotein I paratopes and beta2-glycoprotein I epitopes characterization using random peptide libraries. *Autoimmunity*. 2014;47(7):438-44.
34. Artenjak A, Locatelli I, Brelih H, Simonic DM, Ulcova-Gallova Z, Swadzba J, et al. Immunoreactivity and avidity of IgG anti-beta2-glycoprotein I antibodies from patients with autoimmune diseases to different peptide clusters of beta2-glycoprotein I. *Immunologic research*. 2015;61(1-2):35-44.
35. Zager U, Irman S, Lunder M, Skarabot M, Musevic I, Hodnik V, et al. Immunochemical properties and pathological relevance of anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies of different avidity. *International immunology*. 2011;23(8):511-8.
36. Cucnik S, Kveder T, Krizaj I, Rozman B, Bozic B. High avidity anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63(11):1478-82.
37. de Groot PG, Urbanus RT. The significance of autoantibodies against beta2-glycoprotein I. *Blood*. 2012;120(2):266-74.
38. Misasi R, Capozzi A, Longo A, Recalchi S, Lococo E, Alessandri C, et al. "New" antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Journal of immunology research*. 2015;2015:858542.
39. Sodin-Šemrl S FM, Ambrožič A, Pavlič J, Šuštar V, Čučnik S, et al. Interactions of Phospholipid Binding Proteins with Negatively Charged Membranes: β 2-Glycoprotein I as a Model Mechanism. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. 8: Elsevier; 2008. p. 243–73.
40. Agar C, de Groot PG, Morgelin M, Monk SD, van Os G, Levels JH, et al. beta(2)-glycoprotein I: a novel component of innate immunity. *Blood*. 2011;117(25):6939-47.

41. Chighizola CB, Raschi E, Borghi MO, Meroni PL. Update on the pathogenesis and treatment of the antiphospholipid syndrome. *Current opinion in rheumatology*. 2015;27(5):476-82.
42. Chighizola CB, Ubiali T, Meroni PL. Treatment of Thrombotic Antiphospholipid Syndrome: The Rationale of Current Management-An Insight into Future Approaches. *Journal of immunology research*. 2015;2015:951424.
43. <https://en.wikipedia.org/wiki/Heparin> [7.3.2016].
44. Guerin J, Sheng Y, Reddel S, Iverson GM, Chapman MG, Krilis SA. Heparin inhibits the binding of beta 2-glycoprotein I to phospholipids and promotes the plasmin-mediated inactivation of this blood protein. Elucidation of the consequences of the two biological events in patients with the antiphospholipid syndrome. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(4):2644-9.
45. <https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose> [9.3.2016].
46. Affinity chromatography - Principles and methods.
47. <http://www.bio-rad.com/en-si/applications-technologies/activated-supports> [11.3.2016].
48. <http://www.emelcambio.com/contents/en-us/d426.html>. [11.3.2016].
49. Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angewandte Chemie*. 2002;41(3):391-412.
50. Bohlin ME, Blomberg LG, Heegaard NH. Effects of ionic strength, temperature and conformation on affinity interactions of beta(2)-glycoprotein I monitored by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2011;32(6-7):728-37.
51. Harris ELV, Angal S. *Protein purification methods : a practical approach*. Oxford ; New York: IRL Press at Oxford University Press; 1989. xvi, 317 p. p.
52. Kuhelj R. *Biokemija v praksi: načela in tehnike*. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani; 2003.
53. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2011. 1428 p.
54. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical chemistry : techniques, principles, correlations*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
55. Kotnik V, Čurin Šubec V, Hartman Pretnar K., Ihan A., Jeras M., Kopitar A. N., Malovrh T., Simčič S., Stopinšek S., Skvarč M., Vidan Jeras B., Wraber B. *Imunološki priročnik*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo; 2010.
56. Cucnik S, Krizaj I, Rozman B, Kveder T, Bozic B. Concomitant isolation of protein C inhibitor and unnicked beta2-glycoprotein I. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2004;42(2):171-4.
57. Brighton TA, Dai YP, Hogg PJ, Chesterman CN. Microheterogeneity of beta-2 glycoprotein I: implications for binding to anionic phospholipids. *The Biochemical journal*. 1999;340 (Pt 1):59-67.
58. *Ion exchange chromatography: principles and methods*. Švedska: Pharmacia LKB Biotechnology; 1987.
59. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>. [8.5.2016].
60. Kato H, Enjyoji K. Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine beta 2 glycoprotein I: the presence of five Sushi domains. *Biochemistry*. 1991;30(50):11687-94.
61. Klinc I. Optimizacija izolacije β 2-glikoproteina I z nizkotlačnim kromatografskim postopkom. *Diplomska naloga*. Ljubljana: Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani; 2007.
62. Končina A. *Humana plazma kot vir β 2-glikoproteina I za detekcijo antifosfolipidnih protiteles*. Ljubljana: Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani; 2003.
63. Cucnik S, Ambrozic A, Bozic B, Skitek M, Kveder T. Anti-beta2-glycoprotein I ELISA: methodology, determination of cut-off values in 434 healthy Caucasians and evaluation of monoclonal antibodies as possible international standards. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2000;38(8):777-83.
64. Artenjak A, Leonardi A, Krizaj I, Ambrozic A, Sodin-Semrl S, Bozic B, et al. Optimization of unnicked beta2-glycoprotein I and high avidity anti-beta2-glycoprotein I antibodies isolation. *Journal of immunology research*. 2014;2014:195687.
65. <http://www.bio-rad.com/en-si/applications-technologies/introduction-low-pressure-chromatography>. [3.4.2016].

66. https://www.google.si/search?q=cross+linked+agarose&espv=2&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewj2O74zarMAhUH3SwKHbX2Ce0Q_AUIBigB#imgrc=fBz5OTUN_V9MnM%3A. [28.3.2016].
67. Affinity Chromatography: Principles and methods. <https://uofa.ualberta.ca/biological-sciences/-/media/science/departments/biological-sciences/mbsu/protein-purification-and-fplc/affinity-chrom.pdf>: Amersham Pharmacia Biotech; 2001.
68. <https://www.bio-world.com/site/catalogs/bioWorld-bioAffinity-Matrix-Separopore-Catalog.pdf>. [3.4.2016].
69. Heparin-Separopore Agarose 4B. BioWorld.
70. Sephadex: Gel filtration in theory and practice. Švedska: Pharmacia Fine Chemicals; 1975.
71. Tsumoto K, Ejima D, Senczuk AM, Kita Y, Arakawa T. Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2007;96(7):1677-90.
72. Blue-Separopore 6B-CL. BioWorld.
73. Subramanian S. Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. *CRC critical reviews in biochemistry*. 1984;16(2):169-205.
74. Denizli A, Piskin E. Dye-ligand affinity systems. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2001;49(1-3):391-416.
75. Salih B, Zenobi R. MALDI mass spectrometry of dye-peptide and dye-protein complexes. *Analytical chemistry*. 1998;70(8):1536-43.
76. Williams SC, Sim RB. Dye-ligand affinity purification of human complement factor B and beta 2 glycoprotein I. *Journal of immunological methods*. 1993;157(1-2):25-30.
77. Sephadex ion exchangers: A guide to ion exchange chromatography. Švedska: Pharmacia Fine Chemicals; 1976.
78. http://www.nestgrp.com/pdf/Zp1/Sp1/ION_Manual.pdf [10.4.2016].
79. Kulisa K. The Effect of Temperature on the Cation-Exchange Separations in Ion Chromatography and the Mechanism of Zone Spreading. *Chem Anal*. 2004;49(665).
80. <http://www.reachdevices.com/Protein/ProteinPurification.html>. [10.4.2016].
81. <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Catalogs%20&%20Brochures/Chromatography/Ion%20Chromatography/SP-70916-Improve-Cation-Exchange-Separations-SP70916-EN.pdf>. [10.4.2016].