

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA BENEDEJČIČ

**DIPLOMSKA NALOGA**  
**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA BENEDEJČIČ

**VEZAVA RAZLIČNO AFINITETNIH PROTITELES  
PROTI  $\beta_2$ -GLIKOPROTEINU I NA ANTIGEN**  
**BINDING OF ANTI- $\beta_2$ -GLYCOPROTEIN I ANTIBODIES  
WITH DIVERSE AFFINITY TO ANTIGEN**

Ljubljana, 2010

Diplomsko naložbo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, Klinični oddelek za revmatologijo, SPS Interna klinika, Klinični center Ljubljana pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol.

## **ZAHVALA**

Rada bi se zahvalila mentorju izr. prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm. in somentorici doc. dr. Saši Čučnik, univ. dipl. biol. za vse strokovne nasvete in vzpodbudo pri izvedbi eksperimentalnega dela in pisanju diplomske naloge. Prav tako bi se rada zahvalila zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, še posebej Urši Žager za vso pomoč pri eksperimentalnem delu.

Zahvala gre tudi staršem in prijateljem, ki so me spodbujali in spremljali v času študija.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol.

Tina Benedejčič

Ljubljana, 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

# VSEBINA

<b><u>POVZETEK</u></b>	<b>3</b>
<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b>4</b>
<b><u>OKRAJŠAVE</u></b>	<b>5</b>
<b><u>1. UVOD</u></b>	<b>6</b>
<b>1.1 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM</b>	6
<b>1.2 <math>B_2</math>-GLIKOPROTEIN I</b>	6
<b>1.3 ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA (APL)</b>	8
<b>1.4 AFINITETA IN AVIDNOST</b>	9
<b>1.5 VEZAVA ANTI-<math>B_2</math>-GPI PROTITELES NA ANTIGEN</b>	9
<b>1.6 OPTIMALNA KONCENTRACIJA <math>B_2</math>-GPI V RAZTOPINI ZA NANOS NA MIKROTITRSKE PLOŠČE</b>	10
<b>1.7 PRINCIPI POSTOPKOV IZOLACIJE IN DETEKCIJE PROTITELES</b>	11
<b>1.7.1 AFINITETINA KROMATOGRAFIJA</b>	11
<b>1.7.2 DIALIZA</b>	11
<b>1.7.3 KATIONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA</b>	12
<b>1.7.4 GELSKA FILTRACIJA</b>	12
<b>1.7.5 ENCIMSKOIMUNSKA METODA (ELISA)</b>	12
<b><u>2. NAMEN</u></b>	<b>14</b>
<b><u>3. MATERIALI IN METODE</u></b>	<b>15</b>
<b>3.1 VZORCI</b>	15
<b>3.2 <math>B_2</math>-GLIKOPROTEIN I</b>	15
<b>3.3 STANDARD HCAL (IGG SAPPORO STANDARD)</b>	15
<b>3.4 SEKUNDARNO PROTITELO (KONJUGAT)</b>	15
<b>3.5 REAGENTI</b>	15
<b>3.6 APARATURE IN UPORABLJENA OPREMA</b>	16
<b>3.7 PUFRJI IN RAZTOPINE</b>	17
<b>3.8 POSTOPKI</b>	24
<b>3.8.1 IZOLACIJA IGG PROTITELES S 5 ML-KOLONO HiTRAP PROTEIN G HP</b>	24
<b>3.8.2 RAZSOLJEVANJE S KOLONO PD-10 (GE HEALTHCARE)</b>	24
<b>3.8.3 KONCENTRIRANJE IGG S KONCENTRIRNO CELICO Z NADLAKOM (AMICON)</b>	25
<b>3.8.4 KAOTROPNA ELISA</b>	25
<b>3.8.5 IZOLACIJA <math>B_2</math>-GPI</b>	26
<b>3.8.6 PRIPRAVA KOLONE <math>B_2</math>-GPI</b>	27
<b>3.8.7 IZOLACIJA ANTI-<math>B_2</math>-GPI PROTITELES S KOLONO <math>B_2</math>-GPI</b>	29

3.8.8 ANTI- $B_2$ -GPI ELISA	29
<b>4. REZULTATI</b>	<b>35</b>
<b>4.1 IZOLACIJA IgG IZ IMUNOADSORBCIJE IN RAZSOLJEVANJE</b>	<b>35</b>
<b>4.2 IZOLACIJA ANTI-<math>B_2</math>-GPI PROTITELES</b>	<b>36</b>
<b>4.3 OPRAZOVANJE VEZAVE ANTI-<math>B_2</math>-GPI PROTITELES NA RAZLIČNE KONCENTRACIJE <math>B_2</math>-GPI S POMOČJO ELISA</b>	<b>39</b>
<b>5. RAZPRAVA</b>	<b>46</b>
<b>5.1 ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM IN ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA</b>	<b>46</b>
<b>5.2 IZOLACIJA IgG</b>	<b>46</b>
<b>5.3 IZOLACIJA ANTI-<math>B_2</math>-GPI</b>	<b>47</b>
<b>5.4 OPRAZOVANJE VEZAVE ANTI-<math>B_2</math>-GPI PROTITELES NA RAZLIČNE KONCENTRACIJE <math>B_2</math>-GPI S POMOČJO ELISA</b>	<b>49</b>
<b>6. SKLEPI</b>	<b>53</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>54</b>

# POVZETEK

Afiniteta protiteles je termodinamska količina, ki predstavlja jakost vezave med paratopom protitelesa in epitopom antigena. Avidnost protiteles je odvisna od afinitete, vendar obsega vezavo večivalentnega protitelesa in večivalentnega antigena in jo merimo s kinetičnimi študijami. Protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I so laboratorijski kriterij antifosfolipidnega sindroma. To je sistemski avtoimunska motnja z značilnim pojavljanjem tromboz in/ali zapletov v nosečnosti v prisotnosti tako imenovanih antifosfolipidnih protiteles, kamor spadajo tudi protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I. Ugotovljeno je bilo, da imajo protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I z visoko avidnostjo za antigen višjo diagnostično uporabnost kot tista z nizko avidnostjo. Za vezavo teh protiteles na antigen so najverjetneje potrebne konformacijske spremembe  $\beta_2$ -glikoproteina I, za vezavo nizko avidnih protiteles pa tudi zadostna koncentracija nanosa antigena, ki omogoči bivalentno vezavo protiteles.

Namen diplomske naloge je opazovati vezavo različno afinitetnih protiteles proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I na antigen. S kaotropno encimskoimunsko metodo smo izbrali tri vzorce bolnikov s primarnim antifosfolipidnim sindromom: prvi je vseboval pretežno visoko avidna protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I, drugi pretežno nizko avidna protitelesa, tretji pa heterogeno avidna protitelesa. Za izolacijo in razsolitev protiteles smo uporabili afinitetno kromatografijo in gelsko filtracijo. S pomočjo encimskoimunske metode smo opazovali trend padanja koncentracij različno afinitetnih protiteles proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I in vezavo teh protiteles na različnih koncentracijah nanosa antigena.

Ugotovili smo, da je vezava nizko avidnih protiteles proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I bolj odvisna od gostote antigena kot vezava visoko avidnih protiteles. Delež vezave protiteles proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I na antigen je odvisen od gostote antigena na površini ter avidnosti protiteles, ne pa od koncentracije protiteles. Boljše poznavanje obnašanja teh protiteles bi pripomoglo tudi k razumevanju nastanka in poteka bolezni, hkrati pa bi omogočilo nove oblike preventive in zdravljenja bolezni.

## ABSTRACT

Antibodies' affinity is the binding force between one molecule's paratope with its corresponding epitope on the antigen molecule. Antibodies' avidity include the binding force between multivalent antigen and multivalent antibody, it is dependent on affinity and is obtained by kinetic measurements. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies belong to the group of antiphospholipid antibodies and are one of laboratory criteria for antiphospholipid syndrome. This is a systemic autoimmune disorder characterized by the occurrence of thrombosis and/or pregnancy morbidity in the presence of antiphospholipid antibodies. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies with high avidity are associated with higher diagnostic use than anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies with low avidity. Binding of these antibodies probably requires conformational changes in structure of  $\beta_2$ -glycoprotein I, binding of antibodies with low avidity also requires sufficient antigen density for bivalent antibody binding.

The aim of our work was to observe binding of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies with diverse affinity to antigen. We isolated anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies from samples of patients with primary antiphospholipid syndrome: the first sample contained mainly high avidity anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies, the second mainly low avidity antibodies and the third sample heterogenous avidity antibodies. Affinity chromatography and gel filtration were used for isolation and desalination of antibodies. We observed a downward trend of concentration of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies with diverse affinity and binding of these antibodies to various antigen density by enzyme-linked immunosorbent assay.

We established that binding of low avidity anti- $\beta_2$ -glycoprotein I to antigen is more dependent on antigen density than binding of high avidity antibodies. Percentage of binding of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies to antigen depends on antigen density and avidity of antibodies, but it is not dependent on concentration of antibodies. Better knowledge of antibodies' behaviour could also help to understand the emergence and course of disease, and could enable new forms of prevention and treatment of the disease.

# OKRAJŠAVE

anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa – protitelesa proti  $\beta_2$ -GPI

aPL – antifosfolipidna protitelesa

APS – antifosfolipidni sindrom

ELISA – encimskoimunski test na trdnem nosilcu

IgA – imunoglobulini razreda A

IgG – imunoglobulini razreda G

PBS – 150 mM pufrana fiziološka raztopina, pH 7,4

PBS-Tween – 150 mM pufrana fiziološka raztopina, pH 7,4 z dodatkom Tween-a (0,05 %)

SLE – sistemski lupus eritematozus

$\beta_2$ -GPI –  $\beta_2$ -glikoprotein I

# 1. UVOD

## 1.1 Antifosfolipidni sindrom

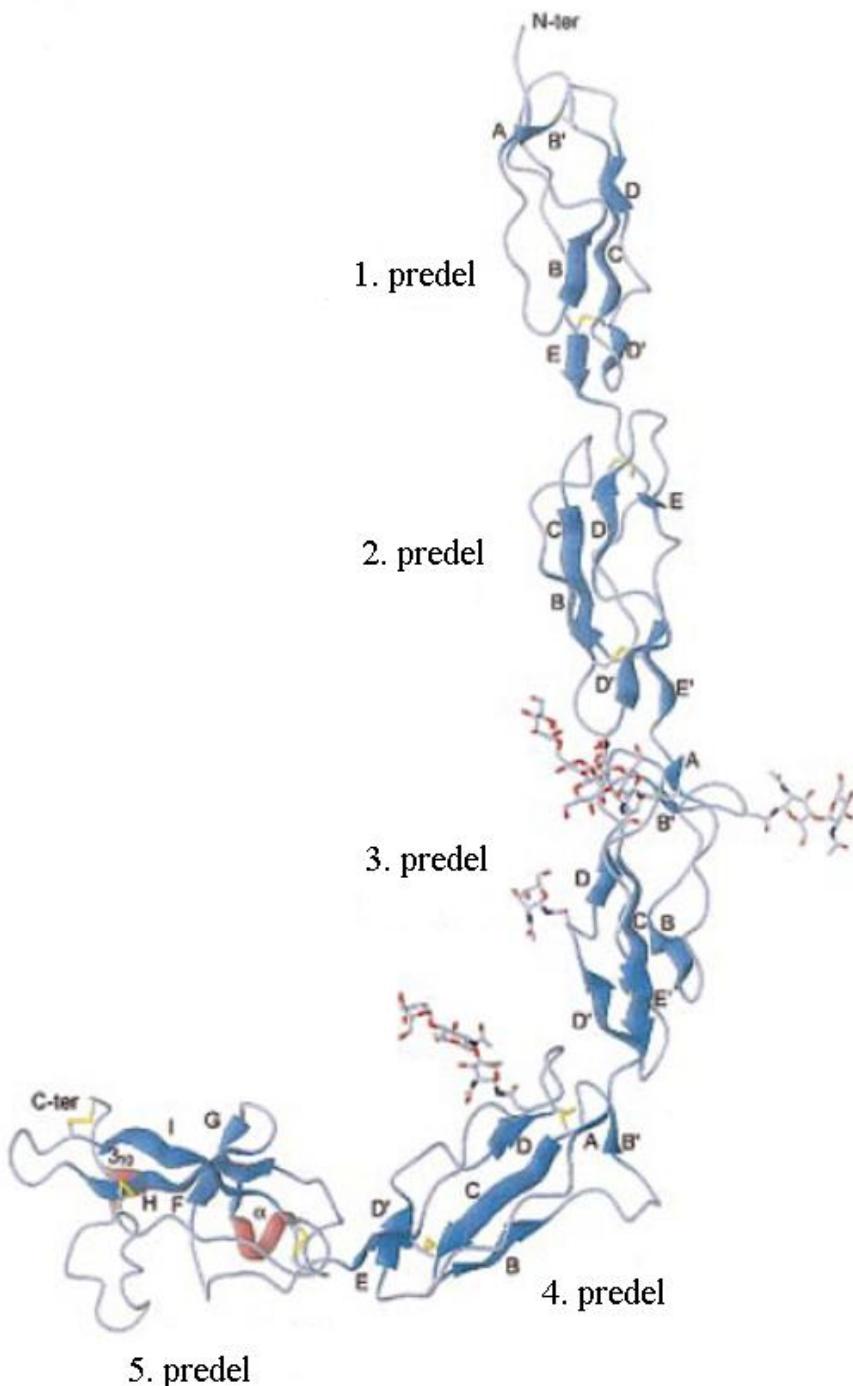
Antifosfolipidni sindrom (APS) je sistemska avtoimunska motnja, za katero je značilno pojavljanje tromboz in/ali nosečniških zapletov (smrt fetusa, insuficienca posteljice, spontani splavi). Poleg kliničnih znakov so v plazmi bolnikov prisotna tudi antifosfolipidna protitelesa proti kardiolipinu,  $\beta_2$ -glikoproteinu in/ali lupusni antikoagulanti. Za postavitev dokončne diagnoze je potrebna potrditev vsaj enega kliničnega in enega laboratorijskega kriterija (1, 2).

APS lahko razdelimo glede na razvoj bolezni: na primarni in sekundarni APS. Pri sekundarnem APS so prisotne še druge bolezni, najpogosteje avtoimunske. Poznan je tudi katastrofični APS, pri katerem gre za hitro napredujočo obliko APS, ki v nekaj dneh ali tednih privede do odpovedi več organov in je pogosto smrtna. Druga razdelitev temelji na prizadetosti žilja, saj se pri nekaterih bolnikih pojavlja samo tromboza arterij, pri drugih tromboza ven in še to po ločenih povirjih (1).

## 1.2 $\beta_2$ -glikoprotein I

$\beta_2$ -glikoprotein ( $\beta_2$ -GPI), poznan tudi kot apolipoprotein H (Apo H), je humani glikoziliran plazemski protein, ki je v plazmi prisoten s koncentracijo med 150–300 mg/l (3). Njegova fiziološka funkcija še ni pojasnjena. Sestavljen je iz 326 aminokislin ( $M_r \sim 50$  kDa) in vsebuje 11 disulfidnih mostov in 4 N- in 1 O- mesto glikozilacije. Spada v superdružino proteinov, za katere so značilne kratke skupne ponovitve iz ~ 60 aminokislin, ki so jih poimenovali SCR (short consensus repeat), CCP (complement control protein) ali Sushi predeli.  $\beta_2$ -GPI je sestavljen iz petih predelov, ki dajejo molekuli proteina obliko črke J (Slika 1). Glede na aminokislisko zaporednje so si prvi štirje SCR predeli zelo podobni, peti predel pa se razlikuje od ostalih in je odgovoren za vezavo na anionske fosfolipide. Prvi štirje predeli vsebujejo centralno antiparalelno  $\beta$ -ploskev (verige B, C in D) in 2 stranski antiparalelni  $\beta$ -ploskvi na N- in C-terminalnem delu (verige A in B' ter D' in E). Struktura predelov je stabilizirana z 2 disulfidnima vezema. Peti predel gradi centralna antiparalelna  $\beta$ -ploskev (verige F, G, H in I),  $\alpha$ -vijačnica med verigama G in H ter

podaljšana zanka. Stabilizirajo jo 3 disulfidne vezi, je bogata z lizini in ima izražen pozitivni nabojo (3, 4).



Slika 1: Struktura  $\beta_2$ -glikoproteina I.

Prvi štirje predeli so sestavljeni iz 1 centralne in 2 stranskih antiparalelnih  $\beta$ -ploskev, peti predel pa gradi večja centralna  $\beta$ -ploskev,  $\alpha$ -vijačnica in podaljšana zanka. Na 3. in 4. predelu je 5 mest za glikozilacijo (4).

Zaradi svoje zgradbe se  $\beta_2$ -GPI veže na negativno nabite površine (heparin, DNA, celične membrane, endotelijske celice, makrofage in anionske fosfolipide). Kompleksi med anionskimi fosfolipidi in  $\beta_2$ -GPI delujejo kot antigeni za antifosfolipidna protitelesa, ki so povezana z APS, lupusom eritematozusom, trombozami in ponavljajočimi splavi (3, 4).

Za vezavo  $\beta_2$ -GPI na membrane je pomemben peti predel proteina. Na njem so opazili veliko pozitivno nabito področje ( $\sim 2 \times 10^{-11} \text{ mm}^2$ ), sestavljeno iz 12 lizinov, 1 arginina in 1 histidina. Pri sidranju proteinske molekule v zunanji sloj fosfolipidnega dvosloja membrane sodeluje fleksibilna zanka Ser311-Lys317, ki vsebuje Trp316, in elektrostatske interakcije med pozitivno nabitim področjem petega predela  $\beta_2$ -GPI in anionsko površino. Fleksibilna in delno hidrofobna zanka se vstavi v lipidno plast in namesti Trp316-Lys317 na mejno površino med acilnimi verigami in fosfatnimi glavami fosfolipidov. S tem se specifično veže na negativno nabite fosfolipidne plasti (3, 4).

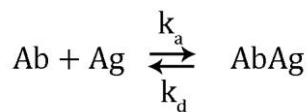
### **1.3 Antifosfolipidna protitelesa (aPL)**

Med antifosfolipidna protitelesa uvrščamo antikardiolipinska protitelesa, lupusne antikoagulante in več različnih protiteles proti proteinom, ki se vežejo na anionske fosfolipide (najpomembnejša sta  $\beta_2$ -GPI in protrombin) in protitelesa, ki se vežejo neposredno na fosfolipide. Slednja protitelesa pri APS najverjetneje nimajo patogenezne vloge (5), za razliko od protiteles proti  $\beta_2$ -GPI (anti- $\beta_2$ -GPI) in protrombinu.

Anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa so specifična skupina protiteles iz zelo heterogene družine antifosfolipidnih protiteles. Kljub visoki specifičnosti se znotraj skupine kaže zelo velika heterogenost, ki se nanaša na jakost vezave med protitelesom in antigenom (afiniteta ali avidnost). Najprej so anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa povezovali z nizko avidnostjo. Kasneje so dokazali tudi obstoj visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, ki so pri bolnikih z antifosfolipidnim sindromom značilno povezana s trombozami, zlasti venskimi (6, 7, 8). Avidnost anti- $\beta_2$ -GPI protiteles se tekom bolezni bistveno ne spremeni. Glede na povezavo visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles in venskih tromboz, je avidnost mogoče boljši pokazatelj nagnjenosti k trombozam in ponavljajočim se splavom kot sam nivo antifosfolipidnih protiteles (9).

## 1.4 Afiniteta in avidnost

Pri vezavi antigena in protitelesa sodelujejo van der Waalsove sile, vodikove in ionske vezi ter hidrofobne interakcije. Energijo vezave antigena in protitelesa lahko označimo kot afiniteto ali avidnost. Afiniteta opredeli vezavo paratopa ene molekule protitelesa na specifičen epitop na molekuli antigena in jo lahko podamo z ravnotežno konstanto K. Reverzibilno reakcijo med protitelesi in antigeni lahko opišemo s spodnjo Enačbo 1. Po določenem času, ko sta hitrost nastajanja kompleksov AbAg in hitrost njihove disociacije enaki, se doseže dinamično ravnotežje.



$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AbAg]}{[Ab] \times [Ag]}$$

Enačba 1: Ravnotežna konstanta, afiniteta protitelesa

V enačbi predstavlja [Ab] koncentracijo nevezanega monovalentnega protitelesa, [Ag] koncentracijo nevezanega monovalentnega antigena, [AbAg] pa koncentracijo kompleksa AgAb.  $k_a$  je asociacijska konstanta,  $k_d$  pa disociacijska konstanta.

V fizioloških pogojih so molekule protiteles najmanj dvovalentne in večina naravnih antigenov je večivalentnih. Vezavo večivalentnega protitelesa na večivalentni antigen tako pravilneje opredelimo z avidnostjo. Njihove vezave ne more opisati afiniteta, saj ionske in hidrofobne interakcije še povečajo moč vezave. Zato je avidnost lahko do 1000 x večja od afinitete (10, 11).

## 1.5 Vezava anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na antigen

Antifosfolipidna protitelesa se prednostno vežejo na  $\beta_2$ -GPI, ki je vezan na anionske fosfolipidne membrane ali (in vitro) na negativno nabite mikrotitrskie ploščice. Obstajata dva modela, ki razlagata vezavo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na vezan  $\beta_2$ -GPI. Prvi model pravi, da se anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa vežejo na nativno obliko  $\beta_2$ -GPI in da vezava ni odvisna od formacije neo-epitopov, ampak od gostote antigena in bivalentne vezave (12). Drugi model pa prikazuje, da povezava  $\beta_2$ -GPI in fosfolipidov povzroči konformacijske spremembe obeh molekul. Znotraj strukture  $\beta_2$ -GPI se izpostavi kriptični epitop, na katerega se vežejo

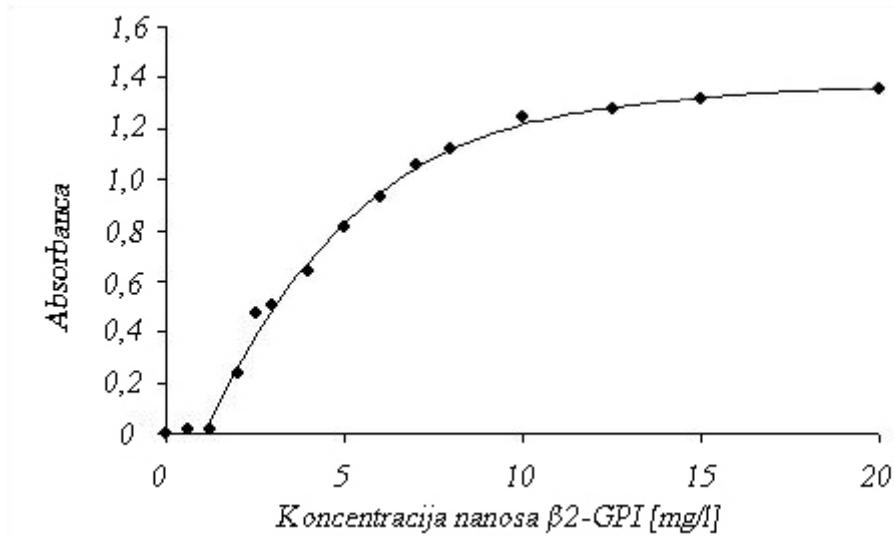
anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa (7). Najverjeteje pa je vezava rezultat obeh modelov: vezava  $\beta_2$ -GPI na mikrotitrsko plošči sproži konformacijske spremembe  $\beta_2$ -GPI, temu sledi povezovanje  $\beta_2$ -GPI med sabo, kar omogoči bivalentno vezavo protiteles (13).

Ugotavljalci so ali je za bivalentno vezavo protiteles potrebna visoka gostota antigena ali pa mogoče njegovo zduževanje v skupke. Ugotovili so, da je gostota  $\beta_2$ -GPI pomembna za vezavo nizko afinitetnih protiteles in ne toliko za vezavo visoko afinitetnih protiteles. (14, 15). Čučnik in sodelavci so dokazali, da niti visoka gostota antigena niti visoka avidnost protiteles sama po sebi ni zadosten pogoj za vezavo  $\beta_2$ -GPI in anti- $\beta_2$ -GPI protiteles. Pri prepoznavi in vezavi poliklonskih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na  $\beta_2$ -GPI so potrebne tudi same konformacijske spremembe, da se posledično izpostavijo neo-epitopi (14).

Interakcije in vezava antifosfolipidnih protiteles na  $\beta_2$ -GPI so pomembni faktorji za razumevanje patogeneze tromboze in vivo. Potencialna mesta za proteinske interakcije na  $\beta_2$ -GPI, ki jih prepoznamo antifosfolipidna protitelesa, se nahajajo predvsem na neglikoziliranih predelih 1, 2 in 5. Tretji in četrti predel imata nalogo povezujočega predela in sta pred interakcijami zaščiteni z glikani (3). Na vseh predelih  $\beta_2$ -GPI so opisali možna mesta za vezavo antifosfolipidnih protiteles. Večina študij pa domneva, da so za APS pomembna antifosfolipidna protitelesa, ki so usmerjena proti predelu 1 na  $\beta_2$ -GPI (2).

## **1.6 Optimalna koncentracija $\beta_2$ -GPI v raztopini za nanos na mikrotitrsko ploščo**

Potrditev prisotnosti lupusnih antikoagulantov, antikardiolipinskih protiteles ali pa anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, poleg prisotnosti vsaj enega kliničnega znaka, je pomembna za postavitev diagnoze APS (2). Prisotnost anti- $\beta_2$ -GPI protiteles določamo z antigensko specifično encimskoimunsko metodo na trdnem nosilcu (ELISA), kjer kot antigen uporabimo  $\beta_2$ -GPI. Optimalna koncentracija  $\beta_2$ -GPI za nanos na mikrotitrsko ploščo je bila določena z metodo anti- $\beta_2$ -GPI ELISA, v katerem so bile uporabljeni različni koncentraciji  $\beta_2$ -GPI od 1 mg/l do 20 mg/l. Učinkovito vezavo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles bolnikov so zaznali pri koncentraciji 2 mg/l, z zviševanjem koncentracije nanosa  $\beta_2$ -GPI pa je absorbanca strmo rasla do koncentracije 8 mg/l (Slika 2). Pri višjih koncentracijah se naklon krivulje zmanjša, kar pomeni, da z zviševanjem koncentracije nanosa nad 10 mg/l ne dosežemo bistveno višjih absorbanc (16).



Slika 2: Odvisnost absorbance od koncentracije nanosa  $\beta_2$ -GPI (16)

## 1.7 Principi postopkov izolacije in detekcije protiteles

### 1.7.1 Afinitetna kromatografija

Vse kromatografske metode temeljijo na potovanju vzorca v mobilni fazi preko stacionarne faze. Afinitetno kromatografijo uporabljamo za ločevanje makromolekul in temelji na specifičnih interakcijah med biološkimi molekulami (antigen-protitelo, encim-substrat, receptor-ligand). Pri izolaciji protiteles s pomočjo afinitetne kromatografije je antigen kovalentno vezan na stacionarno fazo. Zaradi specifičnih interakcij med protitelesom in antigenom pride do upočasnitve potovanja protiteles, ki se vežejo na antigen. Kasneje s spremembjo pH in ionske moči prekinemo vezi med antigenom in protitelesom in s tem izperemo vezana protitelesa. Afinitetna kromatografija je najuspešnejša, ko so interakcije med antigenom in protitelesom visoko specifične (17, 18).

### 1.7.2 Dializa

Z dializo skozi polprepustno membrano lahko ločimo proteine od manjših molekul, ločitev je odvisna od velikosti por. Proteini so preveliki, da bi potovali skozi pore membrane, in ostanejo v dializni vrečki, medtem ko manjši peptidi in ostale manjše molekule ter ioni potujejo v medij zunaj dializne vrečke (17).

### 1.7.3 Kationsko izmenjevalna kromatografija

Proteine lahko ločimo na podlagi njihovega celokupnega naboja. Če ima protein pozitivni nabolj pri pH 7, se bo vezal na negativno nabite delce, medtem ko se protein z negativnim naboljem ne bo vezal in bo potoval skozi kolono. Pozitivno nabite proteine lahko izperemo z naraščajočo koncentracijo NaCl v izpiralnem pufru. Natrijevi ioni tekmujejo s pozitivno nabitimi skupinami za vezavo na kolono. Negativno nabite proteine pa lahko ločujemo na koloni s pozitivno nabitimi delci (17).

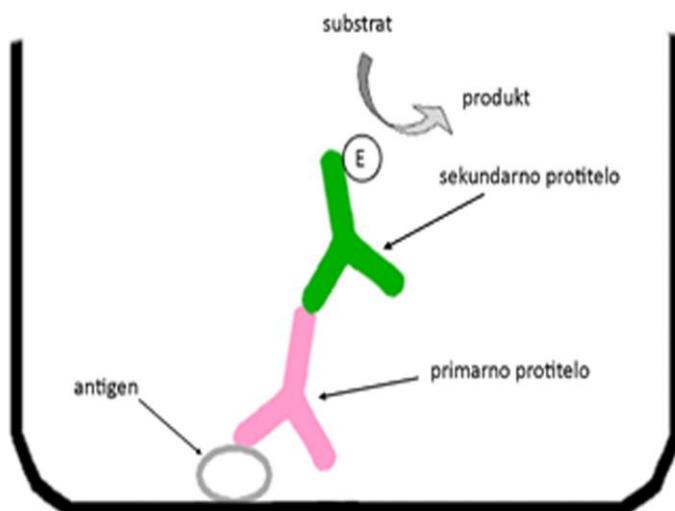
### 1.7.4 Gelska filtracija

Pri tej metodi temelji ločitev proteinov na razliki v njihovi velikosti. Vzorec nanesemo na vrh kolone, ki vsebuje porozne kroglice gela. Kot posledica difuzije bodo manjše molekule zašle v pore kroglic gela, večje pa ne. Velike molekule se bodo zadrževale na koloni najmanj časa, saj se lahko zadržujejo le v prostoru med kroglicami gela (17).

### 1.7.5 Encimskoimunska metoda (ELISA)

Mnoge metode detekcije in izolacije proteinov temeljijo na specifičnih interakcijah med antigeni in protitelesi. V diagnostične namene se pogosto uporablja ELISA, ki se odlikuje po svoji hitrosti in visoki občutljivosti. Pri tej metodi tarčni antigen prepozna specifična protitelesa, na katera je kovalentno vezan encim. Uporabljajo se različni encimi: alkalna fosfataza, peroksidaza ... Če je antigen prisoten, se nanj veže protitelo z encimom in ob dodatku brezbarvnega substrata encim katalizira reakcijo doobarvanega produkta. Torej prisotnost obarvanega produkta kaže na prisotnost antiga.

Razvili so različne variante ELISA, ki so v pomoč pri kvalitativnem ali kvantitativnem določevanju protiteles ali antigenov. Z indirektno ELISA določamo prisotnost protiteles (Slika 3). V vdolbinico na mikrotitrskih ploščah, ki je prekrita z antigenom, nanesemo vzorec, v katerem se nahaja primarno protitelo, specifično za



Slika 3: Indirektna ELISA

antigen. Nevezana protitelesa izperemo, vezana pa določimo s sekundarnimi protitelesi. Ta se vežejo s primarnim protitelesom in so konjugirana z encimom. Po dodatku substrata nastane obarvan produkt, ki mu izmerimo absorbanco (10, 17).

## 2. NAMEN

Pri postavitvi diagnoze antifosfolipidnega sindroma in spremljanju poteka bolezni, je poleg koncentracije anti- $\beta_2$ GPI protiteles pomembno tudi poznavanje avidnosti anti- $\beta_2$ GPI protiteles.

Namen naloge je izolacija visoko, nizko in heterogeno afinitetnih protiteles proti  $\beta_2$  glikoproteinu I iz vzorcev bolnikov z antifosfolipidnim sindromom. Opazovali bomo, kakšni so trendi padanja koncentracij različno afinitetnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles in kako je vezava teh protiteles odvisna od koncentracije nanosa antiga (β<sub>2</sub>-GPI).

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 Vzorci

Uporabili smo 3 vzorce, pridobljene z imunoadsorpcijo dveh bolnikov s primarnim antifosfolipidnim sindromom. Adsorbirani material se zavrže, zato bolniki niso bili dodatno obremenjeni zaradi študije. S kaotropno ELISA metodo smo določili avidnost vzorcev in izbrali vzorce s heterogeno, visoko in nizko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi.

### 3.2 $\beta_2$ -glikoprotein I

$\beta_2$ -glikoprotein I smo izolirali iz plazme krvodajalca s krvno skupino AB. S SDS-PAGE smo potrdili čistost proteina, njegovo koncentracijo pa določili po postopku proizvajalca Bio-Rad (Bradford) (19).

### 3.3 Standard HCAL (IgG Sapporo standard)

HCAL je himerno monoklonsko protitelo, ki je sestavljeno iz humanih  $\gamma 1$  in  $\kappa$  konstantnih regij ter variabilne regije iz mišjega anti- $\beta_2$ GPI monoklonskega protitelesa WBCAL-1, pridobljenega iz mišjega modela APS, ki imajo in vitro lastnosti podobne anti- $\beta_2$ GPI bolnikov z APS. Uporablja se za kontrolo kakovosti pri ELISA za antikardiolipinska in anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa. Pridobili so ga s pomočjo celične linije. IgG Sapporo Standard HCAL 508668, INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, ZDA (20).

### 3.4 Sekundarno protitelo (konjugat)

Kot sekundarna protitelesa smo uporabili kozja protitelesa, ki se vežejo na humane IgG in so konjugirana z alkalno fosfatazo.

### 3.5 Reagenti

- Albumin, goveji serumski albumin brez maščobnih kislin, Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA.
- Dinatrijev 4-nitrofenil fosfat heksahidrat (5 mg tablete),  $C_6H_4NNa_2O_6P$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA.
- Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat,  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ , p.a.
- Glicin,  $C_2H_2NO_2$ , p.a.
- Kalijev dihidrogenfosfat,  $KH_2PO_4$ , p.a.

- Kalijev klorid, KCl, p.a.
- Klorovodikova kislina, HCl, p.a.
- Natrijev acetat,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , p.a.
- Natrijev azid,  $\text{NaN}_3$ , ekstra čist, Merck, Darmstadt, Nemčija.
- Natrijev hidroksid, NaOH, p.a.
- Natrijev klorid, NaCl, p.a.
- Ocetna kislina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , brezvodna, p.a.
- Perklorna kislina,  $\text{HClO}_4$ , p.a.
- Tris, 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , p.a.
- Tween 20, polioksietilen sorbitan monolavrat,  $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija.

### **3.6 Aparature in uporabljena oprema**

- Kolona HiTrap Protein G HP, 5 mL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska.
- Razsoljevalna kolona, PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska.
- Spektrofotometer, Camspec M501 Single Beam Scanning UV/Visable Spectrophotometer, Cambridge, Velika Britanija.
- Filter Minisart, 0,20 in 0,45  $\mu\text{m}$ , Goettingen, Nemčija.
- Tehnica Mettler Toledo, PM2500, Mettler Toledo AG Greifese, Švica.
- pH meter Mettler Toledo Seven Easy, Columbus, Ohio, ZDA.
- Vibracijski mešalnik, Assistant, Nemčija.
- Centrifuga Mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg, Nemčija.
- Ultrafiltracijska celica: Stirres Ultrafiltration Cell Amicon, model 8050, Millipore Corporation, ZDA.
- Polietersulfonska membrana za ultrafiltracijo: Millipore Biomax Ultrafiltration Disc, 30 kDa, premer 44,5 mm, Millipore Corporation, ZDA.
- Črpalka, Pharmacia peristaltic Pump-1, Velika Britanija.
- Zbiralec, Pharmacia RediFrac, Pharmacia LKB, Švedska.
- Pipete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija.
- Pipetni nastavki, Eppendorf, Hamburg, Nemčija.

- Polistirenske mikrotitrskne plošče Costar 3590, 96 Well EIA/RIA Plate, High Binding, Corning Inc., New York, ZDA.
- Spektrofotometer za mikrotitrskne plošče Tecan Sunrise, Švica.
- Laboratorijski pribor (steklovina, injekcijske brizge, mešala, epruvete, stojala za epruvete ...).

### 3.7 Pufri in raztopine

#### 3.7.1 Pufri za izolacijo IgG s 5 ml-kolono HiTrap™ Protein G HP iz analiznega seta

- *Pufer 1* (vezavni pufer): 0,2 M natrijev fosfat, pH 7,0
- *Pufer 2* (izpiralni pufer): 1 M glicin-HCl, pH 2,7
- *Pufer 3* (nevtralizacijski pufer): 1M Tris-HCl, pH 9

Pufer 1 in 2 pred nanosom na kolono 10 x redčimo z destilirano vodo.

#### 3.7.2 Pufer za razsoljevanje s kolono PD-10 GE Healthcare

- *Pufer 4*: 150 mM pufrana fiziološka raztopina, pH 7,4 (PBS)

	n (mmol)	m (g)
NaCl	137	8,00
KCl	2,7	0,20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	6,5	1,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	0,20
<b>destilirana voda</b>		<b>do 1 l</b>

pH pufra po potrebi uravnamo z 2 M HCl ali 2 M NaOH.

#### 3.7.3 Pufri za izolacijo $\beta_2$ -glikoproteina I

- *Pufer 5 (osnovni pufer)*: 0,02 M Tris-HCl, 0,03 M NaCl, pH 8,0

	n (mmol)	m (g)
NaCl	300	17,53
Tris	200	24,33
<b>destilirana voda</b>		<b>do 2 l</b>

pH uravnamo z 2 M HCl, raztopino dopolnimo do 10 l z destilirano vodo in dodamo 2 g NaN<sub>3</sub> (0,2 g NaN<sub>3</sub>/1 l pufra).

▪ Pufri za afinitetno kromatografijo:

- *Pufer 6* (spiralni pufer): 0,02 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 8,0. Pufer pripravimo iz 300 ml pufra 5, kateremu dodamo 2,104 g (36 mmol) NaCl.
- *Pufer 7* (izpiralni pufer): 0,02 M Tris-HCl, 0,35 M NaCl, pH 8,0. Pufer propravimo iz 300 ml pufra 5, kateremu dodamo 5,610 g (96 mmol) NaCl.

▪ Pufri za regeneracijo kolone:

- *Pufer 8*: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,5

	<b>n (mmol)</b>	<b>m (g)</b>
<b>NaCl</b>	500	29,22
<b>Tris</b>	100	12,1
<b>destilirana voda</b>		<b>do 0,8 l</b>

pH uravnamo s HCl in dopolnimo z destilirano vodo do 1 l.

- *Pufer 9*: 0,1 M Na-acetat, 0,5 M NaCl, pH 5,0

	<b>n (mmol)</b>	<b>m (g)</b>
<b>NaCl</b>	100	5,84
<b>Na-acetat</b>	20	1,64
<b>destilirana voda</b>		<b>do 0,15 l</b>

pH uravnamo s CH<sub>3</sub>COOH in dopolnimo z destilirano vodo do 0,2 l.

- *Pufer 10*: vezavni pufer za uravnoveženje kolone

	<b>n (mmol)</b>	<b>m (g)</b>
<b>Hepes</b>	12,5	2,978
<b>destilirana voda</b>		<b>do 0,5 l</b>

400 ml 25 mM HEPES pufra dodamo 7,02 g (120 mmol) NaCl, pH uravnamo z 5 M NaOH do 7,9 in dopolnimo z destilirano vodo do 0,5 l.

- Pufri za izpiranje proteinov iz afinitetne in kationske kolone:

- *Pufra 11 in 12:*

**Raztopina A (0,05 M CH<sub>3</sub>COOH)**

	n (mmol)	m (g)
CH <sub>3</sub> COOH	60	3,6
destilirana voda		<b>do 1,2 l</b>

**Raztopina B (0,05 M Na-acetat)**

	n (mmol)	m (g)
Na-acetat	100	8,2
destilirana voda		<b>do 2 l</b>

*Pufer 11 (začetni acetatni pufer):* V 1 l raztopine A dodajamo raztopino B do pH 4,8, nato dodamo še 5,84 g NaCl/1 l pufra (0,1 M NaCl).

*Pufer 12 (končni acetatni pufer):* V 0,1 l raztopine A dodajamo raztopino B do pH 5,2, nato dodamo še 37,96 g NaCl/1 l pufra (0,65 M NaCl).

### 3.7.4 Pufri za pripravo kolone $\beta_2$ -GPI

- *Pufer 13 (vezavni pufer):* 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8,3

	n (mmol)	m (g)
NaHCO <sub>3</sub>	200	16,8
NaCl	1000	58,44
destilirana voda		<b>do 2 l</b>

Pufru uravnamo pH z 2 M HCl ali 2 M NaOH, ga stehtamo in avtoklaviramo. Po avtoklaviranju dopolnimo razliko v masi s sterilizirano vodo.

- 1 mM HCl

	n (mmol)	V
HCl	0,5	42,3 µl (36,6 % HCl, $\rho = 1,179$ kg/l)
destilirana voda		<b>do 0,5 l</b>

Pufer stehtamo in avtoklaviramo. Po avtoklaviranju dopolnimo razliko v masi s sterilizirano vodo.

- 0,2 M glicin, pH 8,0

	n (mmol)	m (g)
<b>glicin</b>	20	1,5
<b>destilirana voda</b>		<b>do 0,1 l</b>

Pufru uravnamo pH z 2 M HCl ali 2 M NaOH, ga stehtamo in avtoklaviramo. Po avtoklaviranju dopolnimo razliko v masi s sterilizirano vodo.

- *Pufer 14:* 0,1 M Na-acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0 (V = 0,5 l)

- 0,1 M ocetna kislina: 572  $\mu$ l brezvodne ocetne kisline ( $\rho = 1,05 \text{ kg/l}$ ) dopolnimo z destilirano vodo do 0,1 l.
  - 0,1 M Na-acetat: 4,102 g natrijevega acetata dopolnimo z destilirano vodo do 0,5 l.
  - 0,1 M raztopini ocetne kisline dodamo 0,1 M natrijev acetat do pH 4,0.
- Pufru izmerimo volumen in dodamo 29,22 g NaCl/l pufra.

Pufer stehtamo in avtoklaviramo. Po avtoklaviranju dopolnimo razliko v masi s sterilizirano vodo.

- *Pufer 15:* 0,5 M pufrana fiziološka raztopina, 0,05 % Tween, pH 7,4

	n (mmol)	m (g)
<b>NaCl</b>	250	14,61
<b>KCl</b>	1,35	0,10
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	3,25	0,575
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,75	0,10
<b>destilirana voda</b>		<b>do 0,5 l</b>
<b>Tween 20</b>	0,05 %	0,25

Pufru uravnamo pH z 2 M HCl ali 2 M NaOH, ga stehtamo in avtoklaviramo. Po avtoklaviranju dodamo Tween 20, dopolnimo razliko v masi s sterilizirano vodo in preverimo pH.

- *Pufer 16:* 0,1 M glicin, 0,5 M NaCl, 0,05 % Tween, pH 2,5

	<b>n (mmol)</b>	<b>m (g)</b>
<b>glicin</b>	50	3,75
<b>NaCl</b>	250	14,61
<b>destilirana voda</b>		<b>do 0,5 l</b>
<b>Tween 20</b>	0,05 %	0,25

Pufru uravnamo pH z 2 M HCl ali 2 M NaOH, ga stehtamo in avtoklaviramo. Po avtoklaviranju dodamo Tween 20, dopolnimo razliko v masi s sterilizirano vodo in preverimo pH.

### 3.7.5 Pufri za izolacijo anti- $\beta_2$ -glikoprotein I protiteles z kolono $\beta_2$ -GPI

- *Pufer 17:* 150 mM pufrana fiziološka raztopina, 0,05 % Tween, pH 7,4 (PBS-Tween)

	<b>n (mmol)</b>	<b>m (g)</b>
<b>NaCl</b>	137	8,00
<b>KCl</b>	2,7	0,20
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	6,5	1,15
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,5	0,20
<b>destilirana voda</b>		<b>do 1 l</b>
<b>Tween 20</b>	0,05 %	0,5

pH pufra po potrebi uravnamo z 2 M HCl ali 2 M NaOH.

- *Pufer 15:* 0,5 M pufrana fiziološka raztopina, 0,05 % Tween, pH 7,4  
Sestava je opisana na strani 20.

- *Pufer 18:* 4 M NaCl v 0,1 M glicinu 0,05 % Tween, pH 2,5

	<b>n (mmol)</b>	<b>m (g)</b>
<b>glicin</b>	100	7,50
<b>destilirana voda</b>		<b>do 1 l</b>
<b>NaCl</b>	4000	233,76
<b>Tween 20</b>	0,05 %	0,5

pH pufra po potrebi uravnamo z 2 M HCl ali 2 M NaOH.

- 1 M TRIS baza

	<b>n (mmol)</b>	<b>m (g)</b>
<b>Tris</b>	0,1	12,114
<b>destilirana voda</b>		<b>do 0,1 l</b>

### 3.7.6 Pufri za anti- $\beta_2$ -GPI ELISA

- *Pufer 4:* 150 mM pufrana fiziološka raztopina, pH 7,4 (PBS)

Sestava je opisana na strani 17.

- *Pufer 17:* 150 mM pufrana fiziološka raztopina, 0,05 % Tween, pH 7,4 (PBS-Tween)

Sestava je opisana na strani 21.

Pufri, ki smo jih uporabili v postopkih izolacije in priprave  $\beta_2$ -GPI ter izolacije in detekcije anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, so podani v Preglednici I.

Preglednica I: Seznam uporabljenih pufrov.

	Pufri za izolacijo IgG	Pufer za razsoljevanje IgG	Pufri za izolacijo $\beta_2$ -GPI	Pufri za pripravo kolone $\beta_2$ -GPI	Pufri za izolacijo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles	Pufri za anti- $\beta_2$ -GPI ELISA
<b>Pufer 1</b>	0,2 M Na-fosfat, pH 7,0					
<b>Pufer 2</b>	1 M glicin-HCl, pH 2,7					
<b>Pufer 3</b>	1 M Tris-HCl, pH 9,0					
<b>Pufer 4</b>		0,15 M PBS, pH 7,4				0,15 M PBS, pH 7,4
<b>Pufer 5</b>			0,02 M Tris-HCl, 0,03 M NaCl, pH 8,0			
<b>Pufer 6</b>			0,02 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 8,0			
<b>Pufer 7</b>			0,02 M Tris-HCl, 0,35 M NaCl, pH 8,0			
<b>Pufer 8</b>			0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,5			
<b>Pufer 9</b>			0,1 M Na-acetat, 0,5 M NaCl, pH 5,0			
<b>Pufer 10</b>			0,02 M Hepes, 0,24 M NaCl, pH 7,9			
<b>Pufer 11</b>			Začetni acetatni pufer			
<b>Pufer 12</b>			Končni acetatni pufer			
<b>Pufer 13</b>				0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , 0,5 M NaCl, pH 8,3		
<b>Pufer 14</b>				0,1 M Na-acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0		
<b>Pufer 15</b>				0,5 M PBS, 0,05 % Tween, pH 7,4	0,5 M PBS, 0,05 % Tween, pH 7,4	
<b>Pufer 16</b>				0,1 M glicin, 0,5 M NaCl, 0,05 % Tween, pH 2,5		
<b>Pufer 17</b>					0,15 M PBS, 0,05 % Tween, pH 7,4	0,15 M PBS, 0,05 % Tween, pH 7,4
<b>Pufer 18</b>					4 M NaCl v 0,1 M glicinu 0,05 % Tween, pH 2,5	

### 3.8 Postopki

#### 3.8.1 Izolacija IgG protiteles s 5 ml-kolono HiTrap Protein G HP

Izolacijo IgG protiteles smo izvajali po postopku proizvajalca (21). Pufer 1 in 2 iz analiznega kompleta (Ab Buffer Kit, GE Healthcare, Uppsala, Švedska) smo 10 x redčili in filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 µm. Vzorce smo filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20 µm. V epruvetke za zbiranje frakcij smo pripravili od 10 do 45 µl pufra 3, da smo ohranili aktivnost IgG občutljivih na kislo okolje.

- Kolono smo vpeli v stojalo, povezali z brizgo, jo sprali s 25 ml destilirane vode in 25 ml pufra 1 s pretokom 1 kapljica/s.
- Z brizgo smo nanesli 3 ml predhodno filtriranega vzorca ter takoj začeli zbirati frakcije po 1,5 ml. Izmerili smo absorbanco frakcij pri 280 nm.
- Kolono smo spirali s 25–50 ml pufra 1 in tem odstranili nevezane proteine.
- Nato smo vezana IgG protitelesa izpirali s pufrom 2 in takoj začeli zbirati frakcije po 1 ml v vnaprej pripravljeni epruvetki s pufrom 3. Preverjeli smo pH frakcij s pH lističi. Če je bil pH frakcij prenizek, smo dodali ustrezno količino pufra 3 in s tem dvignili pH do približno 7. Kolono smo izpirali s pufrom 2, dokler nismo odstranili vezanih proteinov. Nato smo izmerili absorbanco zbranih frakcij pri 280 nm.
- Kolono smo sprali s 25 ml pufra 1 (če je sledila takojšnja izolacija IgG iz novega vzorca) ali s 25 ml 20 % etanola (za daljše shranjevanje) ter shranili kolono in pufre v hladilnik (4–8 °C).

*Sestava pufrov je opisana v Preglednici I.*

#### 3.8.2 Razsoljevanje s kolono PD-10 (GE Healthcare)

Za razsolitev in menjavo pufra smo uporabili razsoljevalno kolono PD-10 (GE Healthcare), napolnjeno s Sephadex G-25, z gelom s porami majhnih dimenzijs.

- Pripravili smo ustrezno število kolon za razsoljevanje. Kolone smo spirali s 25 ml pufra 4, ki smo ga predhodno filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20 µm.
- Nato smo nanesli po 3 ml vzorca na vsako od kolon in takoj lovili frakcije po 1,5 ml.
- Sledilo je spiranje z 12,5 ml pufra 4.
- Frakcijam smo izmerili absorbanco pri 280 nm.
- Kolono smo regenerirali z 20 ml destilirane vode, nato spirali s pufrom 4.

- Pripravili smo 0,02 %  $\text{NaN}_3$  v destilirani vodi (20 ml destilirane vode smo dodali 20  $\mu\text{l}$  20 %  $\text{NaN}_3$ ) in nato konzervirali kolone.

*Sestava pufrja je opisana v Preglednici I.*

### **3.8.3 Koncentriranje IgG s koncentrirno celico z nadlakom (Amicon)**

Koncentriranje IgG je zaradi občutljivosti protiteles potekalo s koncentrirno celico z nadlakom Amicon v hladni sobi pri 4 °C, dušik pa je služil kot potisni plin.

- Navidezna molekulska masa protiteles je 150 kDa, zato smo izbrali membrano z velikostjo por 30 kDa (premer 43 mm), da protiteesa niso šla skozi membrano, ampak so ostala v koncentrirani raztopini. Svetlečo stran membrane smo namočili v destilirani vodi 1 uro, vmes smo 3 x zamenjali destilirano vodo.
- Sestavili smo 50 ml-celico Amicon. Vstavili smo membrano s svetlečo stranjo navzgor, dodali elastiko in privili plastični valj. V celico smo vstavili magnetno mešalo in vanjo nalili destilirano vodo. Celico smo zaprli s pokrovom in jo vstavili v kovinsko ohišje. Nastavili smo želen tlak, vklopili mešalo in odprli ventil za plin. Celica ni puščala, zato smo destilirano vodo zamenjali z vzorcem. Ko smo dosegli želeni volumen, smo zaprli ventil za plin, ustavili mešanje in celico odstranili iz ohišja.

### **3.8.4 Kaotropna ELISA**

S kaotropno ELISA smo določili avidnost IgG protiteles. Uporabili smo enak postopek kot za anti- $\beta_2$ -GPI ELISA, le da smo vzorce pripravili v pufru 17 (PBS-Tween) z naraščajočo koncentracijo NaCl: 0,15, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 in 6 M. Tako smo ustvarili kaotropne pogoje med vezavo protiteles. Koncentracijo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles smo preračunali iz standardne krivulje znanih redčitev monoklonskih protiteles.

Meja med visoko in nizko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi je bila določena arbitrarno. Primerjali smo vezavo protiteles pri vzorcih z 0,15 M NaCl in vezavo protiteles pri 0,5 M NaCl. Visoko avidna protiteesa so bila prisotna, če je pri 0,5 M NaCl ostalo vezanih več kot 70 % protiteles glede na začetno vezavo pri 0,15 M NaCl. Če pa se je vezava protiteles zmanjšala na 25 % ali manj začetne vezave, so bila prisotna nizko avidna protiteesa. Vzorci, pri katerih je bila vezava protiteles med 70 in 25 % začetne vezave, so vsebovali heterogenega protitelesa (6).

### 3.8.5 Izolacija $\beta_2$ -GPI

$\beta_2$ -GPI smo izolirali iz plazme krvodajalca s krvno skupino AB v Laboratoriju za imunologijo revmatizma. Postopek izolacije traja 5 dni:

#### 1. dan: Obarjanje in dializa

- Pripravili smo centrifugo (Sigma 3K30) in dializno membrano (Sigma Dialysis Tubing, Cellulose membrane), ki smo jo spirali 4 ure pod tekočo vodo (dolžina membrane je odvisna od količine raztopine plazme: za 20 ml potrebujemo 10 cm membrane).
- Plazmi smo dodali enak volumen fiziološke raztopine, jo postavili na ledeno kopel in ohlajali do 0 °C.
- Preračunali smo potrebno količino 60 % perklorne kisline (za 100 ml raztopine plazme potrebujemo 3,22 ml 60 % perklorne kisline za končno koncentracijo 0,285 M) in čas dodajanja kisline, ki je odvisen od količine plazme (200 ml plazme dodajamo 60 % perklorno kislino 50 minut).
- Kisline smo dodajali zelo počasi ob mešanju z magnetnim mešalom na ledeni kopeli.
- Po dodatku kisline smo centrifugirali, oborino zavrgli in zbirali supernatant v čaši na ledeni kopeli.
- pH supernatanta smo uravnali na 8,0 z NaOH (najprej z 10 M do pH 6, nato s 5 M do pH 7 in z 0,5 M do pH 8,0).
- V 5 l-erlenmajerico smo nalili 2 l pufra 5, supernatant smo nalili v dializno membrano in jo dali v erlenmajerico s pufrom in magnetnim mešalom. Tako smo dializirali 2 uri v hladni sobi pri 4 °C. Po 2 urah smo zamenjali pufer in dializirali čez noč.

#### 2. dan: Koncentriranje in afinitetna kromatografija

- Vzorec iz dializne vrečke smo prelili v čašo.
- Membrano za koncentriranje (43 mm, 10 kDa) smo namočili v 1 l destilirane vode. Destilirano vodo smo v 1 uri zamenjali 5 x. Sestavili smo koncentrirno celico z nadtlakom Amicon ( $V = 50$  ml) in preverili njeno delovanje z destilirano vodo. Vodo smo zamenjali z našim vzorcem in koncentrirali.
- Koncentrat smo združili v 50 ml-epruveti ( $V_{koncentrata} \sim 50$  ml) in ga filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20  $\mu\text{m}$ .

- Heparin-Sefarozno CL-6B kolono smo izpirali s pufom 5 s pretokom 2 ml/min, da smo odstranili zrak iz cevk. 50 ml-epruveto s koncentratom smo vstavili v stojalo aparature BioLogic LP System BioRad in vzpostavili sistem za kroženje skozi afinitetno kolono čez noč.

*3. dan: Izpiranje iz afinitetne kolone in dializa*

- Pripravili smo 30 cm dializne membrane in jo spirali pod tekočo vodo.
- Proteine smo izpirali iz Heparin-Sefarozne kolone vpete v aparatujo BioLogic LP System BioRad po programu Elucija proteinov. Frakcije smo zbirali v epruvete in sproti smo merili absorbance pri 280 nm. Frakcije smo zbrali v 50 ml-epruveti in dializirali čez noč v 2 l pufra 11 z magnetnim mešalom.
- Po končanem spiranju smo kolono regenerirali po programu Regeneracija s pufri 8, 9 in 10. Nato smo aparatujo spirali z destilirano vodo po programu Spiranje.

*4. dan: Kationsko izmenjevalna kromatografija*

- Pred začetkom izmenjave smo kationsko kolono Mono S 5/50 GL regenerirali z destilirano vodo ter s pufoma 11 in 12.
- Vzorec smo filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20  $\mu$ m v 50 ml-epruveto. Po pripravi kolone smo vstavili 50 ml-epruveto v držalo, pripravili cevke, na črpalki nastavili hitrost pretoka 1 ml/min in pustili krožiti čez kationsko izmenjevalno kolono čez noč.

*5. dan: Izpiranje iz kationske kolone*

- Izpiranje smo začeli po programu Elucija  $\beta_2$ -glikoproteina I z linearnim gradientom iz kationsko izmenjevalne kolone. Po kroženju smo protein izpirali z linearnim gradientom NaCl in višanjem pH.
- Frakcijam smo merili absorbancijo. Na grafu izpiranja so trije pomembni vrhovi, napomembnejši je drugi vrh.
- Na koncu je sledilo še čiščenje kolone po protokolu.

*Sestava pufrov je opisana v Preglednici I.*

### **3.8.6 Priprava kolone $\beta_2$ -GPI**

Kolono z  $\beta_2$ -GPI smo pripravili po postopku, razvitem v Laboratoriju za imunologijo revmatizma. Priprava kolone  $\beta_2$ -GPI je trajala dva dneva. Uporabili smo  $\beta_2$ -GPI, izoliran v Laboratoriju za imunologijo revmatizma. Dan pred dializo smo protein  $\beta_2$ -GPI prestavili iz zamrzovalnika  $-80^{\circ}\text{C}$  na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pribor, potreben za pripravo  $\beta_2$ -GPI kolone, smo avtoklavirali.

*Prvi dan:*

- $\beta_2$ -GPI smo odtajali na vodni kopeli (22–37 °C).
- S sterilno stekleno pipeto smo prenesli  $\beta_2$ -GPI v dializno vrečko (Sigma dialysis tubing, celulose membrane), katero smo predhodno 4 ure spirali pod tekočo vodo.
- $\beta_2$ -GPI smo dializirali 3 x po 30 minut v 450 ml pufra 14 v 2 l-erlenmajerici ob rahlem mešanju v hladni sobi (4 °C).
- V avtoklavirano čašo smo zatehtali 2,86 g agaroze (za 10 ml gela), dodali 50 ml 1 mM HCl in ob občasnem rahlem mešanju nabrekali 30 minut pri sobni temperaturi.
- Nastali gel smo prenesli v avtoklavirano oz. z alkoholom (70 %) očiščeno Biorezervoar (1,5 x 20 cm) vpeto v stojalo.
- Na spodnji del kolone smo preko pasti (presesalna bučka) priključili vodno črpalko. Kolono smo sprali z 250 ml 1 mM HCl pri pretoku 200 ml/h ter sproti odsesavali na spodnjem delu kolone. Na enak način smo sprali kolono še z dvakratnim volumnom gela s pufrom 13 (20 ml).
- Raztopino proteina iz dializne vrečke smo prenigli v kolono. Dializno vrečko smo sprali s 3 ml pufra 13. Kolono smo rahlo pretresi in jo 2 uri diagonalno vrteli na vrtilniku pri sobni temperaturi.
- Kolono smo vpeli v stojalo. S prostim padom smo odstranili raztopino nad gelom in preverili vsebnost  $\beta_2$ -GPI v raztopini z merjenjem absorbance pri 280 nm in z metodo po Bradfordu.
- Na kolono smo dodali 20 ml 0,2 M glicina, jo pretresli ter gel z vezanim proteinom prenesli v 50 ml-epruveto. Navpično smo jo vrteli na vrtilniku preko noči v hladni sobi (4 °C).

*Drugi dan:*

- Delo je potekalo v hladni sobi pri 4 °C.
- Raztopino gela smo iz 50 ml-epruvete prenigli v kolono vpeto v stojalo. Epruveto smo sprali z 0,2 M glicinom.
- Kolono smo 10 x izmenično sprali z dvakratnim volumnom kolone (= 30 ml) pufra 13 in 14. Pufre smo nanašali s pomočjo rotacijske črpalke ob pretoku 80 ml/h.
- Kolono smo sprali z dvakratnim volumnom kolone pufra 15, nato z dvakratnim volumnom kolone pufra 16 in ponovno z dvakratnim volumnom kolone pufra 15.

- Kolono smo konzervirali s 30 ml 0,02 % NaN<sub>3</sub> (30  $\mu$ l 20 % NaN<sub>3</sub> + 30 ml destilirane vode).

*Sestava pufrov je opisana v Preglednici I.*

### **3.8.7 Izolacija anti- $\beta_2$ -GPI protiteles s kolono $\beta_2$ -GPI**

Izolacijo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles smo izvajali v hladni sobi (4 °C) zaradi občutljivosti  $\beta_2$ -GPI. Pufre in vzorec smo pred nanosom na kolono filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20  $\mu$ m.

- Za črpanje raztopin smo pripravili črpalko, na kateri smo nastavili pretok 140–160 ml/h ( $v = 2,5 \times 10$ ). Najprej smo sprali cevke s 5 ml pufra 17 (PBS-Tween).
- Nato smo črpalko povezali s kolono in jo spirali s 100 ml PBS-Tween.
- Vzorec IgG frakcije smo nanesli na kolono in ga pustili krožiti. Po 90 minutah smo ostanku po kroženju izmerili absorbanco pri 280 nm.
- Kolono smo sprali s 100 ml PBS-Tween. Vmes smo merili absorbanco frakcijam spiranja pri 280 nm.
- Črpalko smo povezali z zbiralcem frakcij, nastavili čas zbiranja (zbiralni način: min, velikost frakcije: 0,9, konec pri: 200) in spremenili pretok na črpalki na 120 ml/h ( $v = 2,0 \times 10$ ).
- Kolono smo sprali s 30 ml pufra 15 in zbirali frakcije nizko avidnih protiteles v epruvete. Frakcijam smo izmerili absorbanco pri 280 nm.
- Kolono smo sprali s 30 ml pufra 18 in zbirali frakcije visoko avidnih protiteles v epruvete. Zbranim frakcijam smo preverjali pH, ga uravnali na pH 7 z 1 M TRIS bazo in izmerili absorbanco pri 280 nm.
- Na črpalki smo nastavili pretok na 140–160 ml/h ( $v = 2,5 \times 10$ ). Kolono smo sprali s 100 ml PBS-Tween in frakcijam merili absorbanco pri 280 nm.
- Kolono smo konzervirali z 0,02 % NaN<sub>3</sub> v destilirani vodi (30  $\mu$ l 20 % NaN<sub>3</sub> smo dodali v 30 ml destilirane vode), zaprli ventile na koloni in odstranili črpalko.

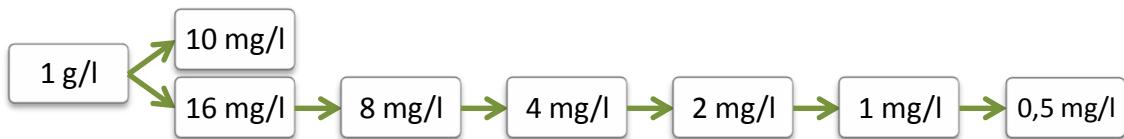
*Sestava pufrov je opisana v Preglednici I.*

### **3.8.8 Anti- $\beta_2$ -GPI ELISA**

Anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa smo merili s spektrofotometrom Tecan Sunrise po prilagojenem rutinskem postopku ELISA, ki ga uporablja v Laboratoriju za imunologijo revmatizma.

- Pripravili smo raztopine z različnimi koncentracijami  $\beta_2$ -GPI v pufru 4 (PBS). Koncentracija  $\beta_2$ -GPI za standarde in kontrole je bila 10 mg/l, za vzorce na prvi

plošči 16, 8 in 4 mg/l, na drugi pa 2, 1 in 0,5 mg/l. Pripravili smo raztopino  $\beta_2$ -GPI s koncentracijo 16 mg/l in jo za pripravo raztopine  $\beta_2$ -GPI s koncentracijo 8 mg/l redčili s PBS v razmerju 1 : 2. Tudi ostale raztopine smo pripravili z redčenjem v razmerju 1 : 2 (Slika 4, Preglednica II).



Slika 4: Priprava raztopin različnih koncentracij  $\beta_2$ -GPI v PBS

Preglednica II: Priprava raztopin z različnimi koncentracijami  $\beta_2$ -GPI v PBS

Koncentracija [mg/l]	$V_{\beta_2\text{GPI} [1 \text{ g/l}]} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{PBS}} [\mu\text{l}]$
<b>10</b>	20	1980
<b>16</b>	44,8	2755,2
Koncentracija [mg/l] $V_{\text{raztopine } \beta_2\text{GPI}} [\mu\text{l}]$ $V_{\text{PBS}} [\mu\text{l}]$		
<b>8</b>	1400 (16 mg/l)	1400
<b>4</b>	1400 (8 mg/l)	1400
<b>2</b>	1400 (4 mg/l)	1400
<b>1</b>	1400 (2 mg/l)	1400
<b>0,5</b>	1400 (1 mg/l)	1400

- Na polistirensko mikrotitrsko ploščico smo v vdolbinice za vzorce nanesli raztopine  $\beta_2$ -GPI v PBS z različnimi koncentracijami (50  $\mu\text{l}/\text{vdolbinico}$ ) in inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi.
- Po končani inkubaciji smo vdolbinice za vzorce blokirali z 1 % albuminom (50  $\mu\text{l}/\text{vdolbinico}$ ). Nato smo v vdolbinice za standarde in kontrole nanesli raztopino

$\beta_2$ -GPI v PBS s koncentracijo 10 mg/l (50  $\mu$ l/vdolbinico). Inkubirali smo 2 uri pri sobni temperaturi.

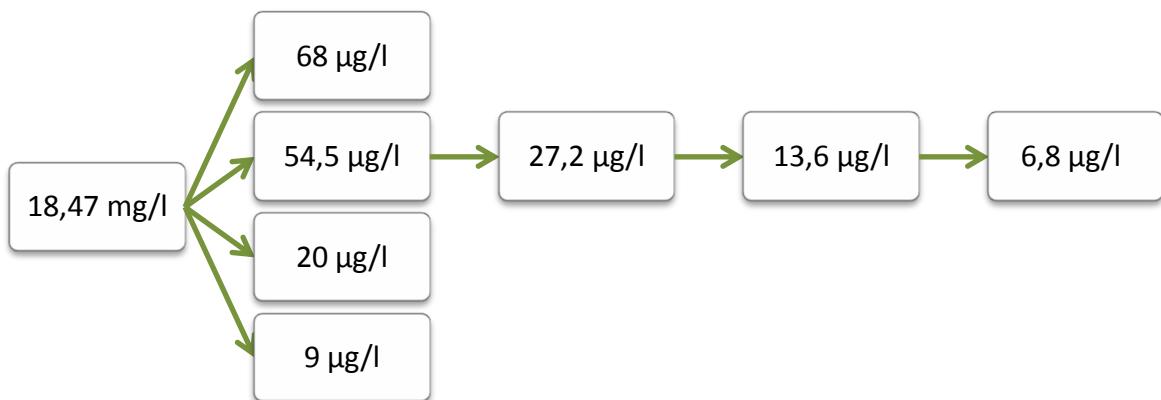
- Pripravili smo redčitveno linijo standarda HCAL s koncentracijo 2,2 mg/l. Prvi vzorec standarda HCAL smo redčili v razmerju 1 : 22 s pufom 17 (PBS-Tween), nadaljnje vzorce v redčitveni liniji pa v razmerju 1 : 2. Kontrole smo redčili v razmerju 1: 100 s PBS-Tween in ustrezno redčili tudi vzorce (glej 3.8.8.1).
- Plošči smo 1 x sprali z 250  $\mu$ l PBS-Tween na vdolbinico.
- Nanesli smo 50  $\mu$ l vzorcev, standardov in kontrol na vdolbinico ter inkubirali 0,5 ure pri sobni temperaturi. Vzorce smo nanašali po tri alikvote, standarde in kontrole pa po dva alikvota.
- Plošče smo 4 x spirali z 250  $\mu$ l PBS-Tween na vdolbinico.
- Pripravili smo konjugat (kozja protitelesa, ki se vežejo na humane IgG, konjugirana z alkalno fosfatazo, v PBS-Tween), nanesli 50  $\mu$ l konjugata na vdolbinico in inkubirali 0,5 ure pri sobni temperaturi.
- Sledilo je 4 x spiranje plošč z 250  $\mu$ l PBS-Tween na vdolbinico.
- Pripravili smo substrat p-nitrofenil fosfat v DEA pufu s koncentracijo 1 g/l in nanesli 100  $\mu$ l substrata na vdolbinico.
- Izmerili smo absorbanco pri 405 nm s spektrofotometrom za merjenje absorbance mikrotitrskih plošč, Tecan.
- Koncentracijo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles smo preračunali glede na standardno krivuljo znanih redčitev monoklonskih protiteles.

#### **3.8.8.1 Redčitve vzorcev izoliranih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles**

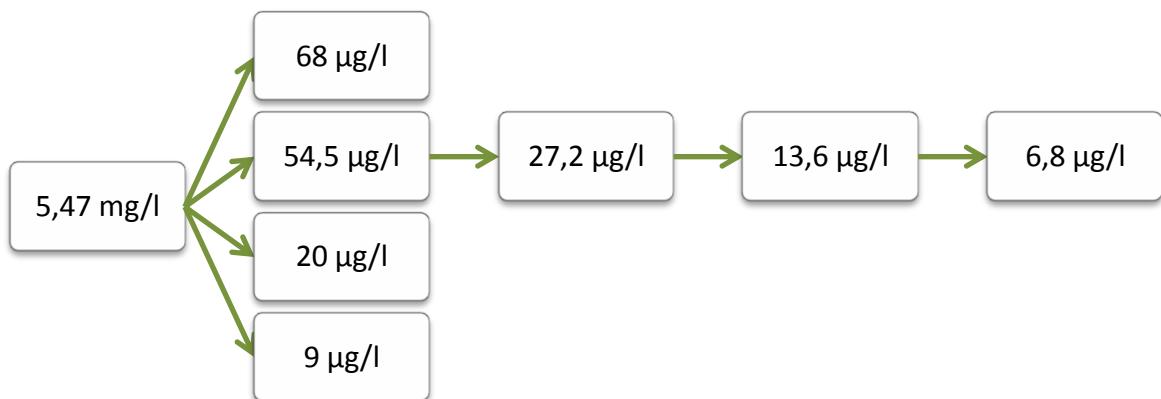
Z metodo ELISA smo določili vsebnost anti- $\beta_2$ -GPI protiteles v vzorcih in jih podali v arbitrarnih AUG enotah. 1 AUG enota je tista koncentracija protiteles, ki da enako absorbanco v metodi ELISA kot monoklonska protitelesa HCAL v koncentraciji 1  $\mu$ g/l. Na mikrotitrskie plošče smo nameravali nanašati naslednje koncentracije anti- $\beta_2$ -GPI protiteles: 68, 54,5, 27,2, 20, 13,6, 9 in 6,8  $\mu$ g/l. Protitelesa smo redčili v PBS-Tween. Koncentracijo anti- $\beta_2$ GPI protiteles smo določili iz odzivov (AUG) protiteles:

- visoko avidna anti- $\beta_2$ GPI protitelesa: 18,47 mg/l;
- nizko avidna anti- $\beta_2$ GPI protitelesa: 5,45 mg/l;
- heterogeno avidna anti- $\beta_2$ GPI protitelesa: 2,43 mg/l.

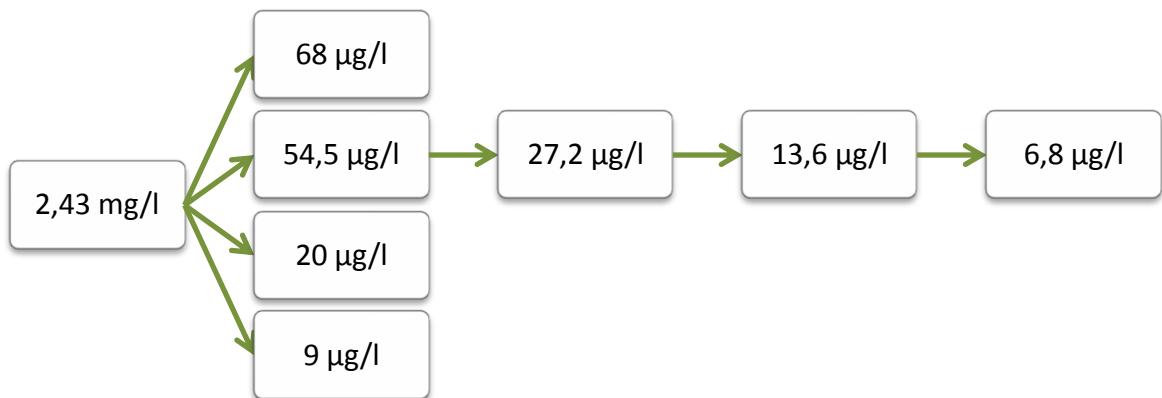
Vzorce smo redčili po naslednjih shemah (Slika 5, Preglednica III, Slika 6, Preglednica IV, Slika 7, Preglednica V). Pripravili smo raztopine s koncentracijo protiteles 68, 54,5, 20 in 9  $\mu\text{g/l}$  v PBS-Tween. Raztopino s koncentracijo protiteles 54,5  $\mu\text{g/l}$  smo redčili s PBS-Tween v razmerju 1 : 2, nato dobljeno raztopino s koncentracijo protiteles 27,2  $\mu\text{g/l}$  prav tako redčili s PBS-Tween v razmerju 1 : 2. Redčenje smo ponovili še 1 x.



Slika 5: Redčenje visoko avidnih anti- $\beta_2$ GPI protiteles ( $c_0 = 18,47 \text{ mg/l}$ ) s PBS-Tween



Slika 6: Redčenje nizko avidnih anti- $\beta_2$ GPI protiteles ( $c_0 = 5,47 \text{ mg/l}$ ) s PBS-Tween



Slika 7: Redčenje heterogeno avidnih anti- $\beta_2$ GPI protiteles ( $c_0 = 2,43$  mg/l) s PBS-Tween

Preglednica III: Redčitve visoko avidnih anti- $\beta_2$ GPI protiteles s PBS-Tween

koncentracija VA Pt (18,47 mg/l)	V VA Pt (µl)	V PBS-Tween (µl)
<b>68 µg/l</b>	4,41	1195,59
<b>20 µg/l</b>	1,3	1198,7
<b>9 µg/l</b>	100 x redčenje: 2 µl VA Pt + 198 µl PBS-Tween	20,52 x redčenje: 58,48 µl 100 x red.VA Pt + 1141,52 µl PBS-Tween
<b>54,5 µg/l (1)</b>	7,08	2392,92
<b>27,2 µg/l (2)</b>	1200 (1)	1200
<b>13,6 µg/l (3)</b>	1200 (2)	1200
<b>6,8 µg/l</b>	1200 (3)	1200

Preglednica IV: Redčitve nizko avidnih anti- $\beta_2$ GPI protiteles s PBS-Tween

<b>konzentracija NA Pt (5,45 mg/l)</b>	<b>V NA Pt (<math>\mu</math>l)</b>	<b>V PBS-Tween (<math>\mu</math>l)</b>
<b>68 <math>\mu</math>g/l</b>	14,96	1185,04
<b>20 <math>\mu</math>g/l</b>	4,40	1195,60
<b>9 <math>\mu</math>g/l</b>	1,98	1198,02
<b>54,5 <math>\mu</math>g/l (1)</b>	24	2376
<b>27,2 <math>\mu</math>g/l (2)</b>	1200 (1)	1200
<b>13,6 <math>\mu</math>g/l (3)</b>	1200 (2)	1200
<b>6,8 <math>\mu</math>g/l</b>	1200 (3)	1200

Preglednica V: Redčitve heterogeno avidnih anti- $\beta_2$ GPI protiteles s PBS-Tween

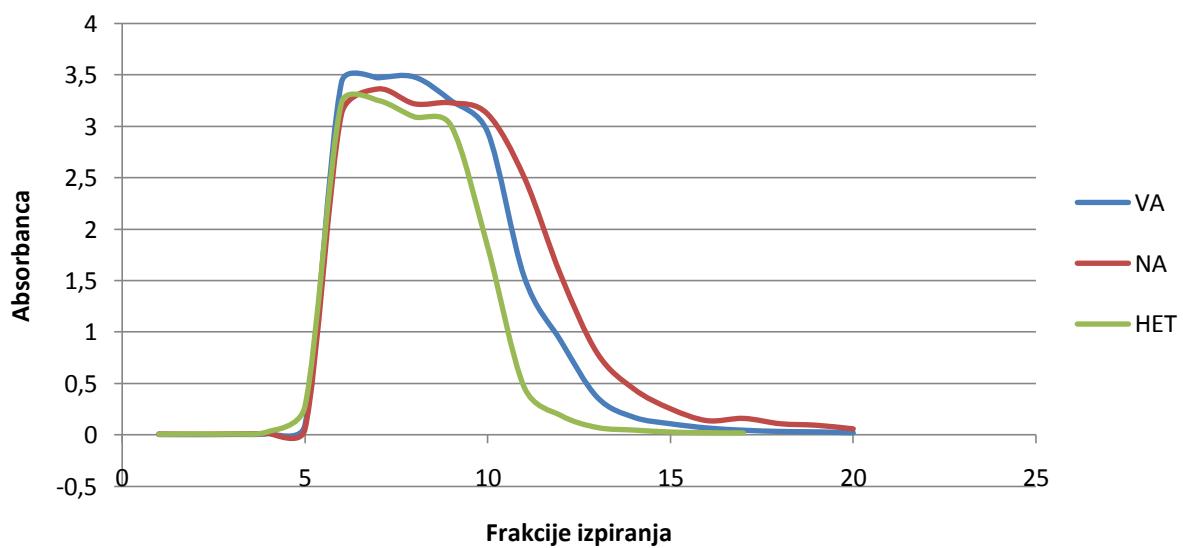
<b>konzentracija HET Pt (2,43 mg/l)</b>	<b>V HET Pt (<math>\mu</math>l)</b>	<b>V PBS-Tween (<math>\mu</math>l)</b>
<b>68 <math>\mu</math>g/l</b>	33,62	1166,38
<b>20 <math>\mu</math>g/l</b>	9,89	1190,11
<b>9 <math>\mu</math>g/l</b>	4,45	1195,55
<b>54,5 <math>\mu</math>g/l (1)</b>	53,89	2346,11
<b>27,2 <math>\mu</math>g/l (2)</b>	1200 (1)	1200
<b>13,6 <math>\mu</math>g/l (3)</b>	1200 (2)	1200
<b>6,8 <math>\mu</math>g/l</b>	1200 (3)	1200

## 4. REZULTATI

### 4.1 Izolacija IgG iz imunoadsorbcije in razsoljevanje

Naš začetni vzorec je bil pridobljen z imunoadsorpcijo na kolonah s proteinom A. To je postopek, kjer se s pomočjo imunoadsorbenta odstrani protitelesa ali antogene iz plazme bolnika. Naš vzorec je vseboval IgG in IgA, zato smo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma s pomočjo afinitetne kolone s proteinom G izolirali frakcijo IgG, ki smo jo potrebovali za nadaljnje delo. Izolirali smo IgG iz vzorca, ki je vseboval pretežno visoko avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa, nato na drugi koloni IgG iz vzorca s pretežno nizko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi in nazadnje še IgG iz vzorca s heterogeno avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi.

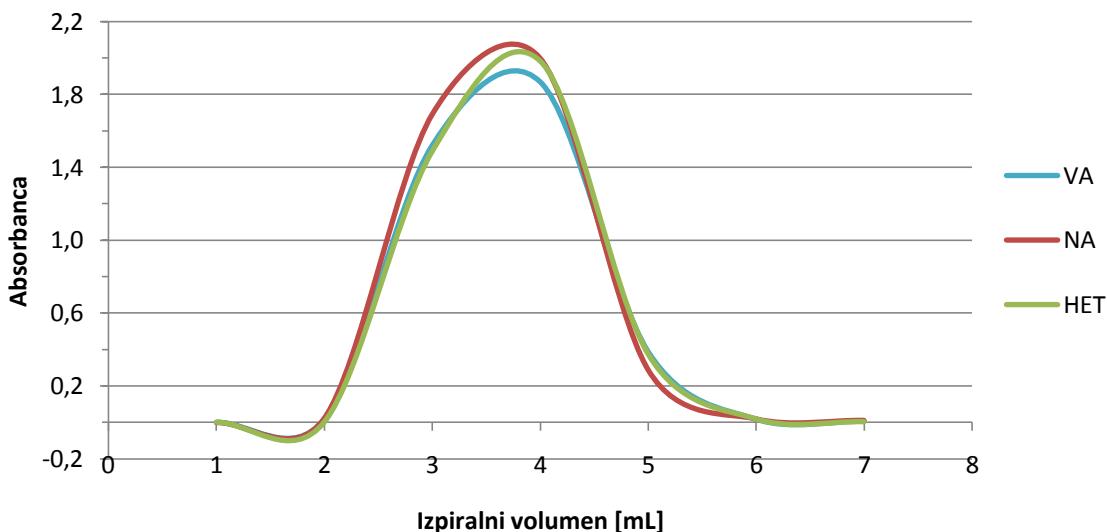
Na kolono smo nanesli vzorec. Najprej smo kolono izpirali z vezavnim puferom (pufer 1) toliko časa, da smo odstranili nevezane proteine. S sprememboto pH izpiralnega pufera (pufer 2) smo izprali vezane proteine (Slika 8), frakcijam izpiranja pa smo dodali nevtralizacijski pufer (pufer 3).



Slika 8: Izpiranje vezanih IgG z izpiralnim pufrom

Frakcije IgG smo razsolili z uporabo razsoljevalne kolone. Za razsolitev in menjavo pufra smo uporabili gel s porami majhnih dimenzij. Frakcije IgG smo nanesli na kolono in spirali s PBS. Visoko, nizko in heterogeno avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa so se kot največje molekule zadrževale na koloni najmanj časa (Slika 9), medtem ko so manjše molekule

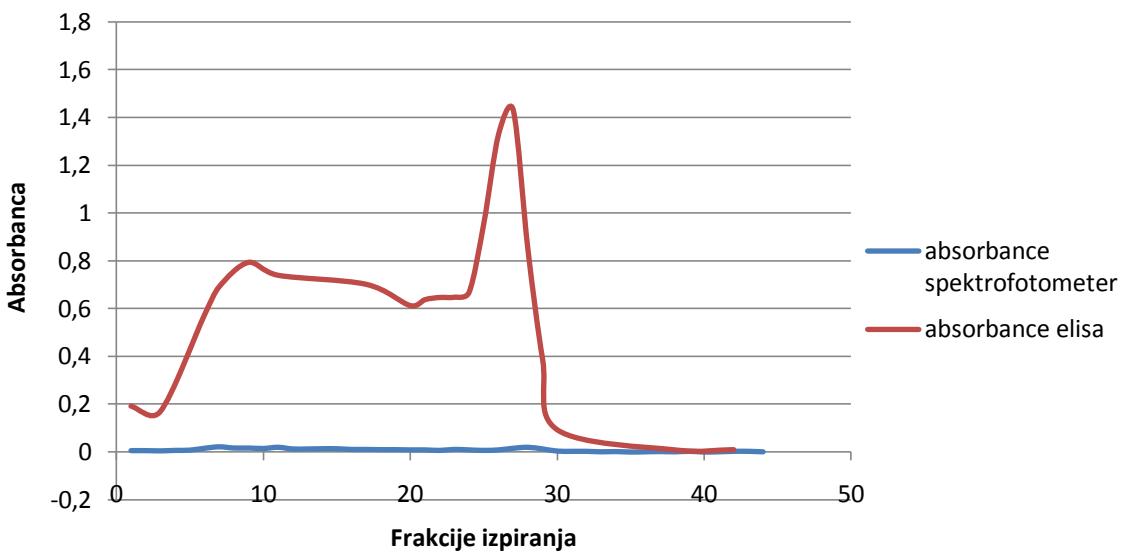
zašle v pore gela. Pred nanosom nove frakcije IgG smo kolono sprali z destilirano vodo, da smo iz nje sprali prisotne soli. Razsoljene frakcije smo zdužili. Ko smo izolirali in razsolili zadostno količino vseh treh vzorcev, smo vsakega posebej koncentrirali s pomočjo koncentrirne celice z nadtlakom Amicon.



Slika 9: Razsoljevanje IgG frakcij

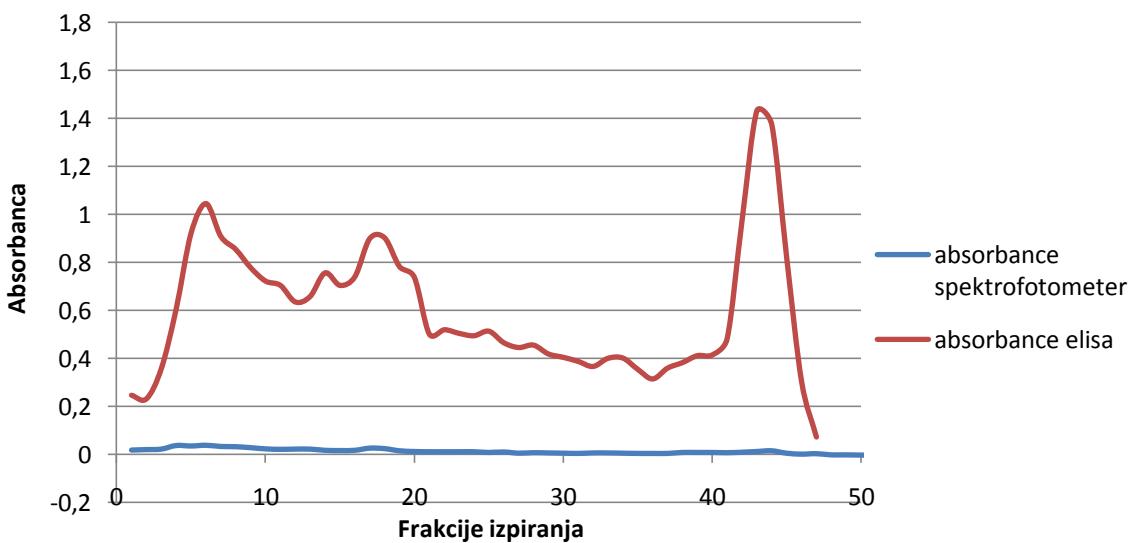
#### 4.2 Izolacija anti- $\beta_2$ -GPI protiteles

Anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa smo iz IgG frakcij izolirali s pomočjo afinitetne kolone z  $\beta_2$ -GPI vezanim na stacionarno fazo. Kolono smo povezali s črpalko in sprali s PBS-Tween. Nanesli smo vzorec in ga pustili krožiti. Po 90 minutah smo nevezane IgG izpirali s PBS-Tween. Upočasnili smo pretok na črpalki in izpirali nizko avidna protitelesa z 0,5 M pufrano fiziološko raztopino 0,05 % Tween pH 7,4 (pufer 15). Nato pa smo izpirali visoko avidna protitelesa s 4 M NaCl 0,1 M glicin 0,05 % Tween pH 2,5 (pufer 18). Pri izolaciji heterogeno avidnih protiteles smo izpirali samo s 4 M NaCl 0,1 M glicin 0,05 % Tween pH 2,5 (pufer 18). Frakcijam heterogeno in visoko avidnih protiteles smo preverili pH in ga uravnali na pH 7 z 1 M Tris bazo. Frakcije smo zbirali v epruvete in jim izmerili absorbanco pri 280 nm. Iz vzorca, ki smo mu s kaotropno ELISA določili prisotnost visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, smo izolirali visoko in nizko avidna protitelesa (Slika 10), prav tako tudi iz vzorca z nizko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi (Slika 11). Heterogeno avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa pa smo izpirali s pufrom z veliko ionsko močjo in nizkim pH-jem in tako izpirali heterogeno frakcijo protiteles (Slika 12).



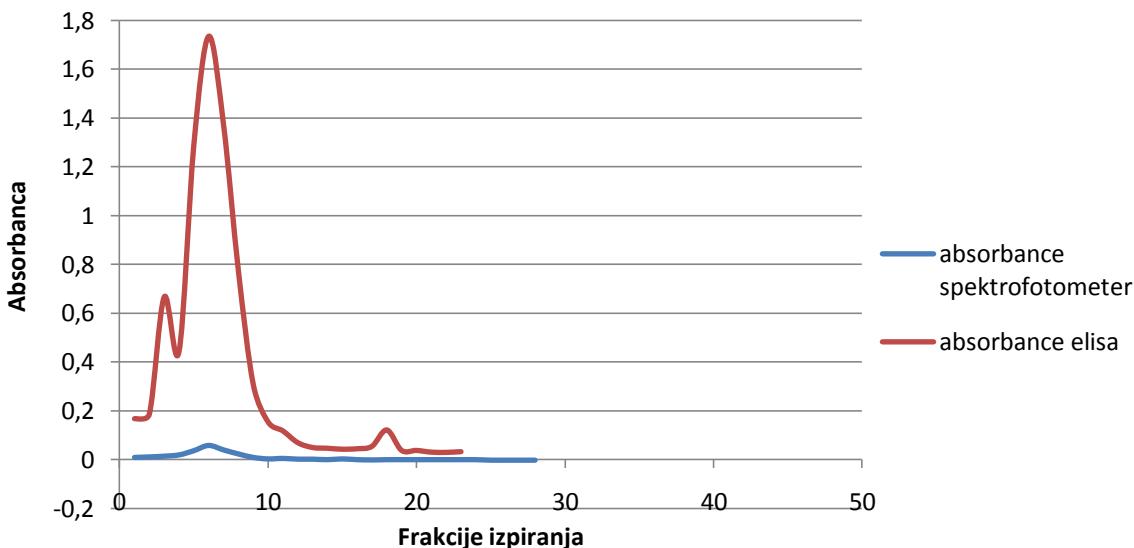
Slika 10: Izpiranje visoko avidnih protiteles

Modra krivulja prikazuje absorbance, merjene s spektrofotometrom, rdeča pa absorbance, ki smo jih detektirali z ELISA. V frakcijah od 1 do 21 smo izpirali nizko avidna protitelesa, od frakcije 22 do 44 pa visoko avidna protitelesa.



Slika 11: Izpiranje nizko avidnih protiteles

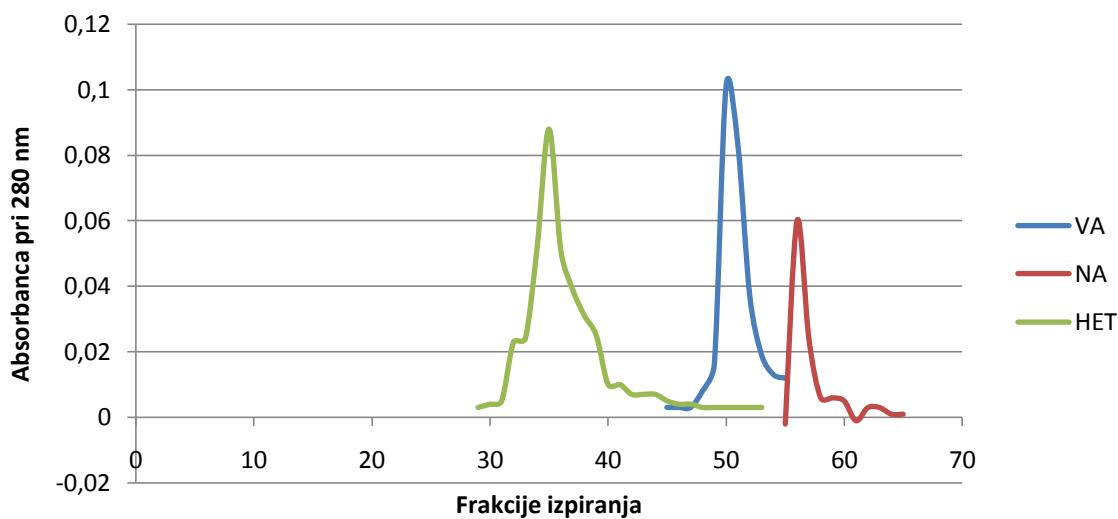
Modra krivulja prikazuje absorbance, merjene s spektrofotometrom, rdeča pa absorbance, ki smo jih detektirali z ELISA. V frakcijah od 1 do 37 smo izpirali nizko avidna protitelesa, od frakcije 38 do 50 pa visoko avidna protitelesa.



Slika 12: Izpiranje heterogeno avidnih protiteles

Modra krivulja prikazuje absorbance, merjene s spektrofotometrom, rdeča pa absorbance, ki smo jih detektirali z ELISA. V frakcijah od 1 do 28 smo izpirali heterogeno avidna protitelesa.

Po izpiranju s 4 M NaCl 0,1 M glicin 0,05 % Tween pH 2,5 (pufer 18) smo kolono sprali še PBS-Tween. V teh frakcijah smo pri vseh izolacijah opazili povečano absorbanco (Slika 13), kar nakazuje na to, da se vsa protitelesa, ki so se vezala na  $\beta_2$ -GPI v afinitetni koloni, niso izprala z izbranimi pufromi za izpiranje nizko in visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles (pufra 15 in 18).



Slika 13: Izpiranje kolone s PBS-Tween po izpiranju s 4 M NaCl 0,1 M glicin 0,05 % Tween pH 2,5

Modra barva predstavlja visoko avidna protitelesa (VA), rdeča nizko avidna protitelesa (NA) in zelena heterogeno avidna protitelesa (HET).

Po končanih izolacijah smo zaradi nizkih absorbanc, merjenih s spektrofotometrom pri 280 nm, preverili prisotnost anti- $\beta_2$ -GPI v posameznih frakcijah še z ELISA. Dobili smo višje odzive pri vseh treh vzorcih (Slika 10, Slika 11, Slika 12).

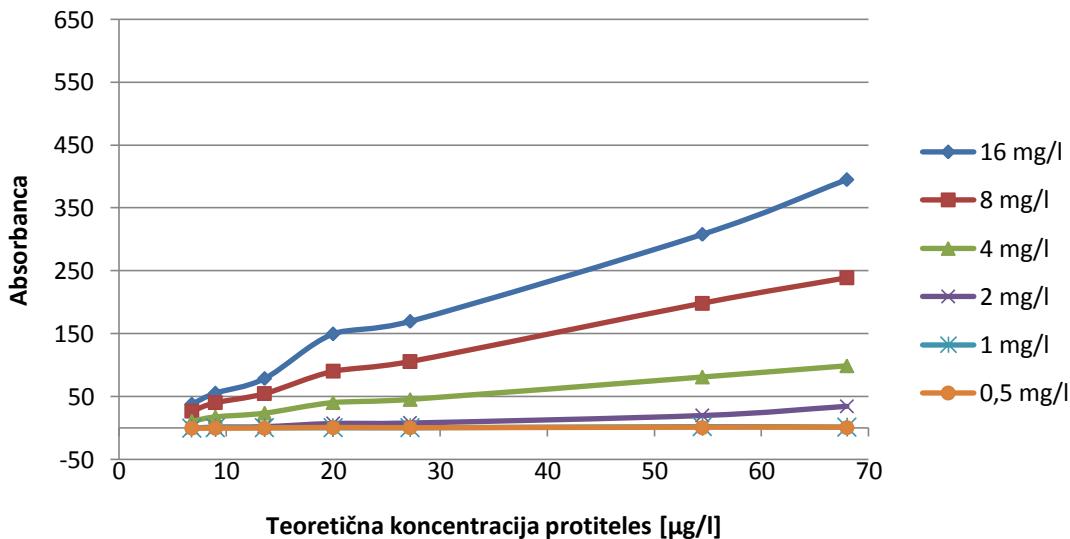
Vzorce smo združili glede na njihove odzive pri ELISA, jih razsolili in skoncentrirali z uporabo koncentrirne celice z nadtlakom Amicon.

#### **4.3 Opazovanje vezave anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na različne koncentracije $\beta_2$ -GPI s pomočjo ELISA**

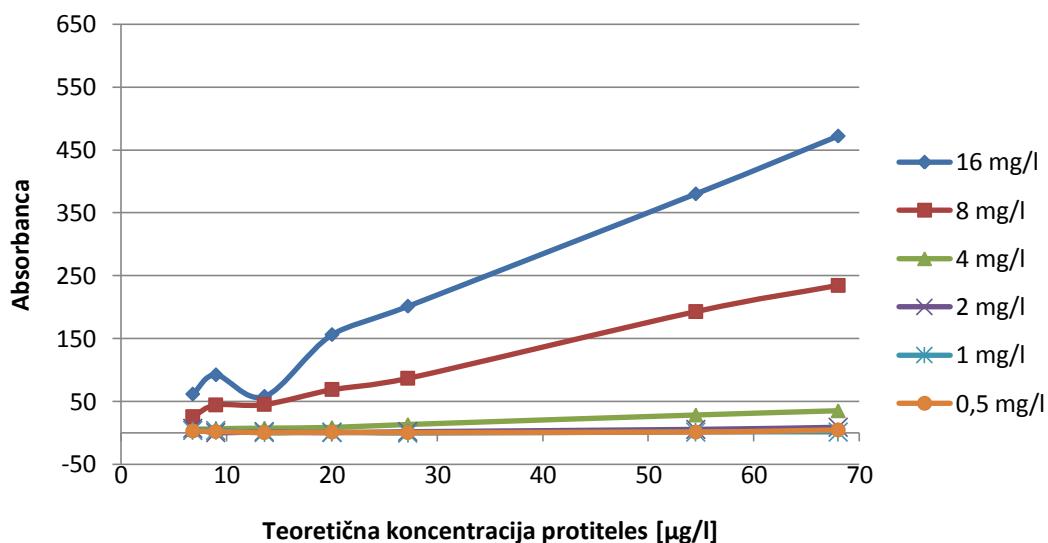
Visoko, nizko in heterogeno avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa smo redčili s PBS-Tween v razmerju 1 : 100 in preverili njihove odzive pri ELISA. Vsa protitelesa smo nameravali izenačiti v koncentracijah glede na njihov odziv, zato smo jih ustrezno redčili (glej 3.8.8.1). Izbrali smo si teoretične koncentracije protiteles (68, 54,5, 27,2, 20, 13,6, 9 in 6,8  $\mu\text{g/l}$ ) in različne koncentracije nanosa antiga (16, 8, 4, 2, 1 in 0,5 mg/l). Opazovali smo, kako se odziv protiteles pri ELISA spreminja glede na koncentracijo nanesenega  $\beta_2$ -GPI in glede na različno avidnost in koncentracijo protiteles.

Anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa smo merili po prilagojenem rutinskem postopku ELISA, ki ga uporabljajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma. Pripravili smo raztopino  $\beta_2$ -GPI v PBS s koncentracijo 10 mg/l za standarde in kontrole in raztopine z različnimi koncentracijami za vzorce. Na polistirensko mikrotitrsko ploščo smo nanesli raztopine  $\beta_2$ -GPI v PBS za vzorce, standarde in kontrole, blokirali z 1 % albuminom v PBS in jih inkubirali z izoliranimi nizko, srednje in visoko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi v PBS-Tween z različnimi koncentracijami. Za detekcijo protiteles smo uporabili konjugat (kozja protitelesa, ki se vežejo na humane IgG, konjugirane z alkalno fosfatazo) v PBS-Tween in substrat (p-nitrofenil fosfat) v DEA pufru. Absorbance smo izmerili pri 405 nm s spektrofotometrom za merjenje absorbance mikrotitrskih plošč, Tecan.

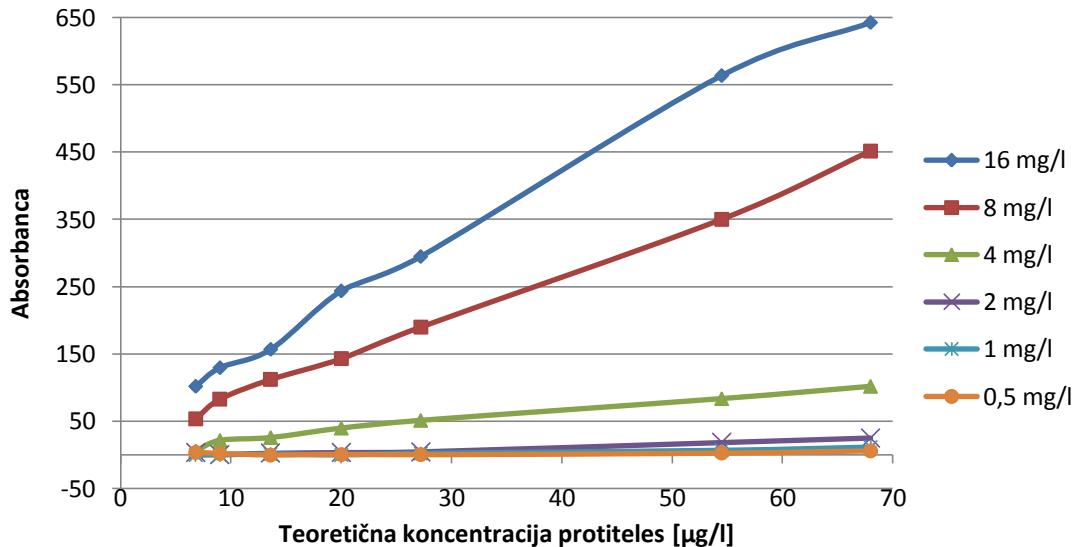
Absorbance protiteles smo primerjeli glede na koncentracijo nanesenega antiga. Posebej smo spremljali obnašanje visoko (Slika 14), nizko (Slika 15) in heterogeno avidnih (Slika 16) anti- $\beta_2$ -GPI protiteles. Pri visoko avidnih protitelesih lahko opazimo, da je vezava protiteles sorazmerna s koncentracijo nanesenega antiga (Slika 14), torej več kot je bilo antiga, več protiteles se je vezalo. Pri nizko avidnih protitelesih pa vidimo, da se opazna vezava protiteles pojavi šele pri višjih koncentracijah nanesenega antiga (Slika 15).



Slika 14: Absorbance visoko avidnih protiteles različnih teoretičnih koncentracij na različnih koncentracijah nanosa antigena

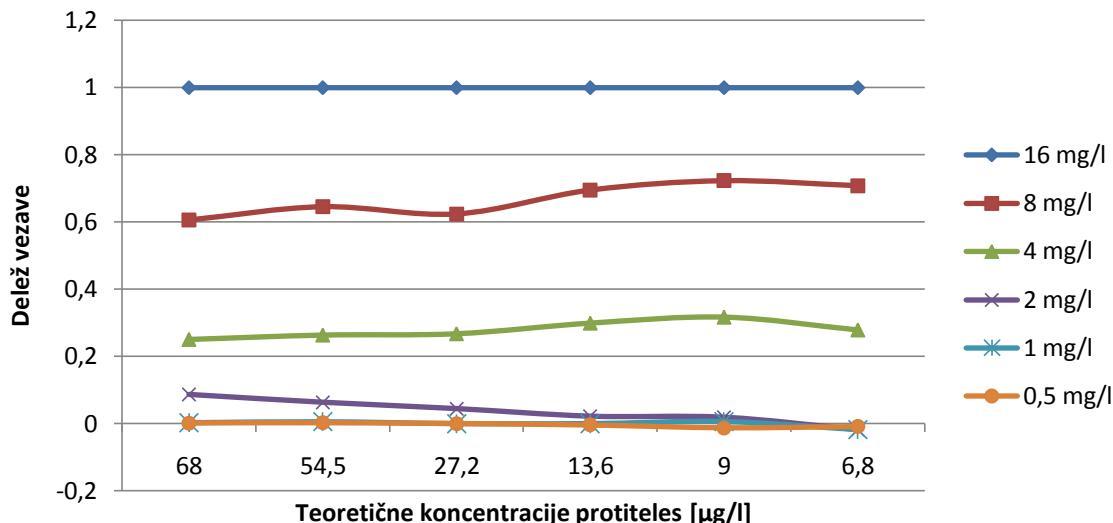


Slika 15: Absorbance nizko avidnih protiteles različnih teoretičnih koncentracij na različnih koncentracijah nanosa antigena

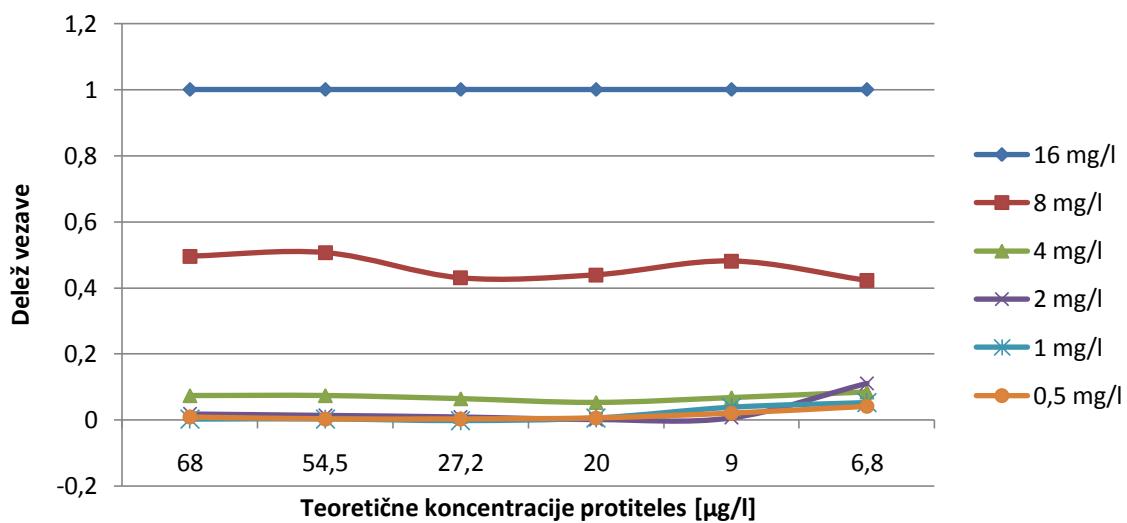


Slika 16: Absorbance heterogeno avidnih protiteles različnih teoretičnih koncentracij na različnih koncentracijah nanosa antigena

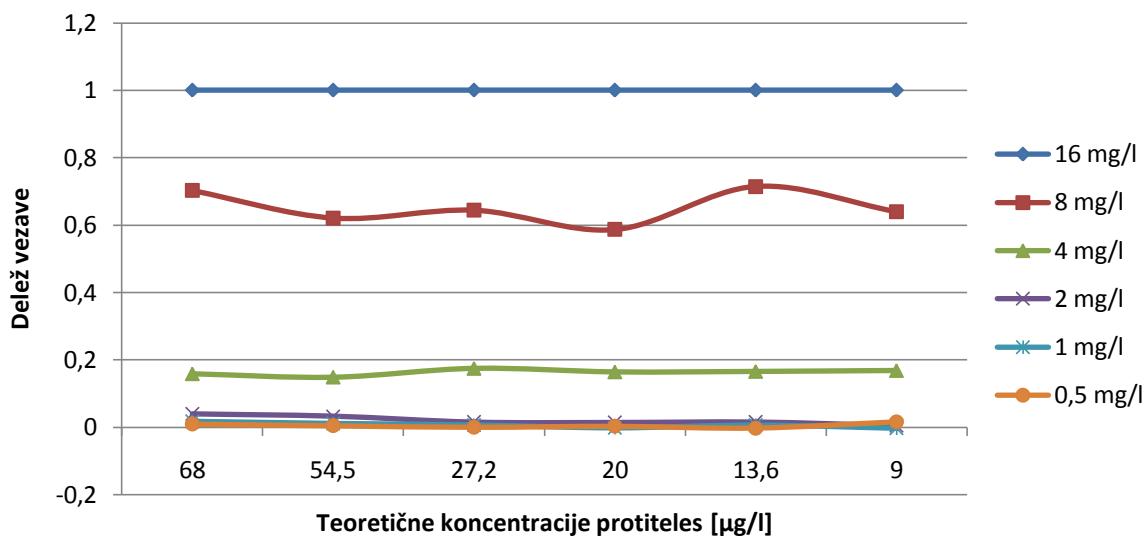
Iz izmerjenih absorbanc smo izračunali deleže vezave protiteles. Najvišjo vrednost absorbance protiteles določene koncentracije smo vzeli za 100 % vrednost in nato vsako absorbanco delili s to vrednostjo (Slika 17, Slika 18, Slika 19).



Slika 17: Delež vezave visoko avidnih protiteles na različne koncentracije nanosa antigena. Krivulje prikazujejo deleže vezave različnih koncentracij visoko avidnih protiteles na enaki gostoti antigena. Na x-osi so nanesene različne koncentracije protiteles, na y-osi pa so naneseni deleži vezave protiteles na antigen.

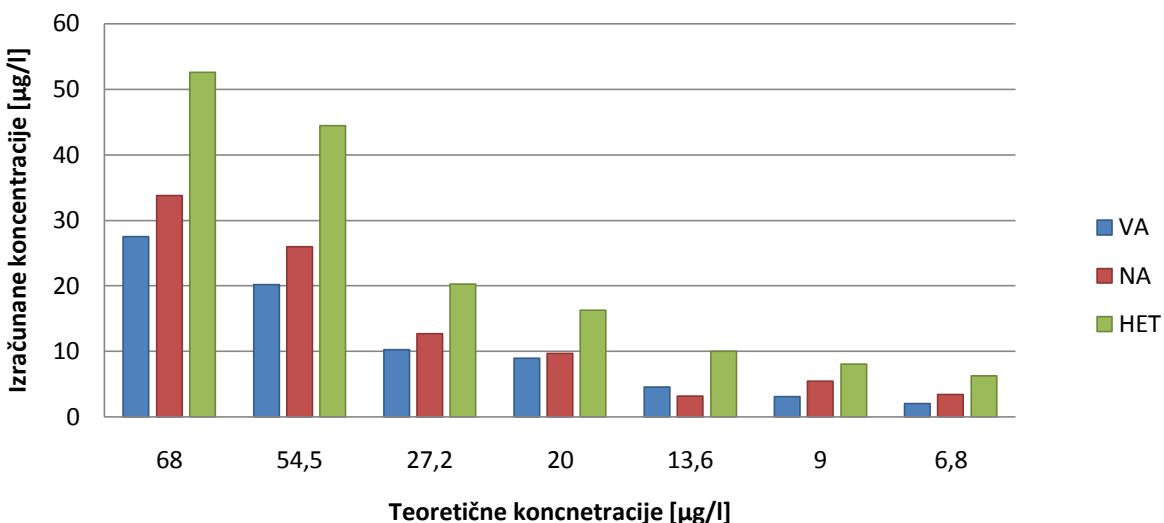


Slika 18: Delež vezave nizko avidnih protiteles na različne koncentracije nanosa antiga. Krivulje prikazujejo deleže vezave različnih koncentracij nizko avidnih protiteles na enaki gostoti antiga. Na x-osi so nanesene različne koncentracije protiteles, na y-osi pa so naneseni deleži vezave protiteles na antigen.



Slika 19: Delež vezave heterogeno avidnih protiteles na različne koncentracije nanosa antiga. Krivulje prikazujejo deleže vezave različnih koncentracij heterogeno avidnih protiteles na enaki gostoti antiga. Na x-osi so nanesene različne koncentracije protiteles, na y-osi pa so naneseni deleži vezave protiteles na antigen.

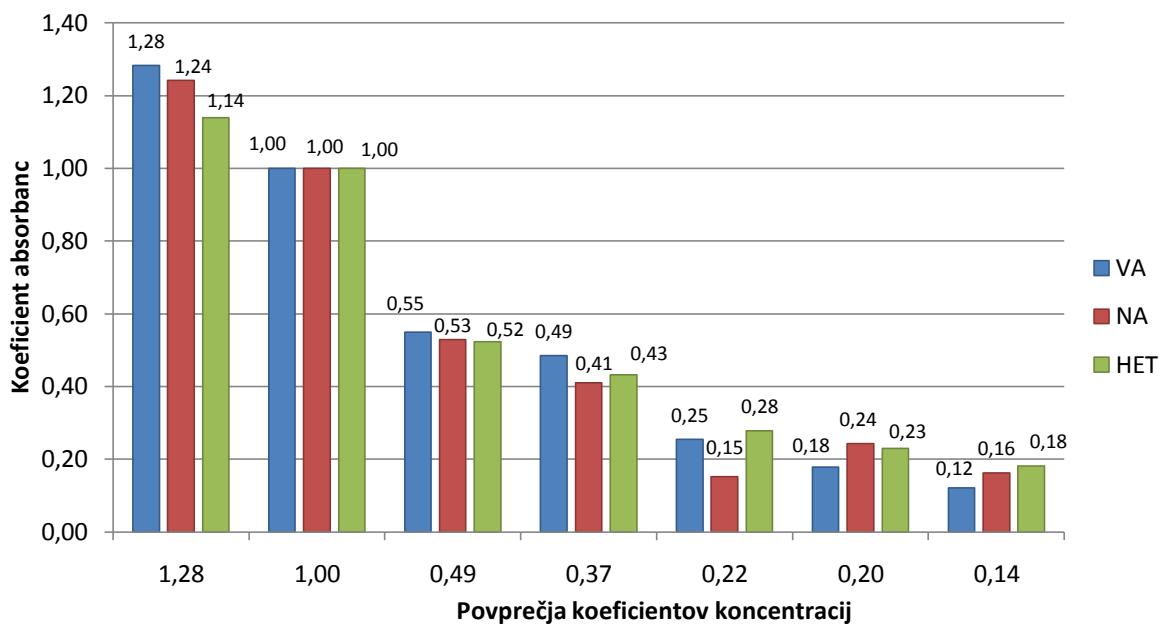
S pomočjo umeritvene krivulje za HCAL in izmerjenih absorbanc smo izračunali dejanske koncentracije protiteles, ki so se vezala na antigen. Izračunane koncentracije so bile manjše od teoretičnih (Slika 20). Izračunane koncentracije visoko avidnih protiteles so v povprečju predstavljale 37,0 % teoretičnih koncentracij (koeficient variacije = 12,8 %), koncentracije nizko avidnih protiteles 46,8 % (koeficient variacije = 24,0 %), izračunane koncentracije heterogeno avidnih protiteles pa so predstavljale 81,6 % teoretičnih koncentracij (koeficient variacije = 8,9 %).



Slika 20: Primerjava teoretičnih in izračunanih koncentracij  
*Modra barva predstavlja visoko avidna protitelesa (VA), rdeča nizko avidna protitelesa (NA) in zelena heterogeno avidna protitelesa (HET).*

Preverili smo, kako se spreminja odziv protiteles z njihovo koncentracijo. Pri koncentraciji nanosa antigena 16 mg/l smo izračunali koeficiente absorbanc in koncentracij. Za 100 % vrednost absorbance smo vzeli absorbanco pri teoretični koncentraciji protiteles 58,5  $\mu\text{g/l}$  in nato vsako absorbanco delili s to absorbanco. Tako smo izračunali koeficiente absorbanc in jih nanesli na y-os. Na x-os pa smo nanesli povprečja koeficientov koncentracij protiteles. Za 100 % vrednost smo vzeli izračunano koncentracijo pri teoretični koncentraciji 58,5  $\mu\text{g/l}$  in nato vse koncentracije delili s 100 % vrednostjo. Na koncu smo še izračunali povprečja koeficientov. Pri koncentracijah  $\beta_2$ -GPI 16, 8 in 4 mg/l odziv protiteles pada z njihovo koncentracijo. Torej, če pada koncentracija protiteles na polovico,

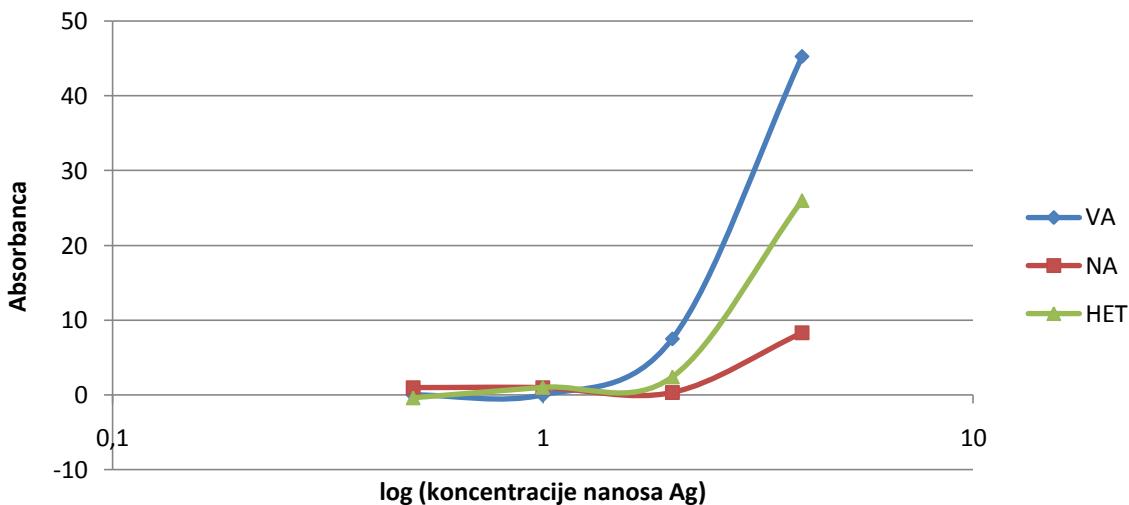
se s tem sorazmerno zmanjša tudi odziv (Slika 21). Pri koncentraciji nanesenega antigena pod 4 mg/l je težko slediti spremjanju koncentracije pri vseh treh vzorcih.



Slika 21: Spreminjanje odziva v odvisnosti od spremembe koncentracije protiteles pri koncentraciji nanosa antigena 16 mg/l

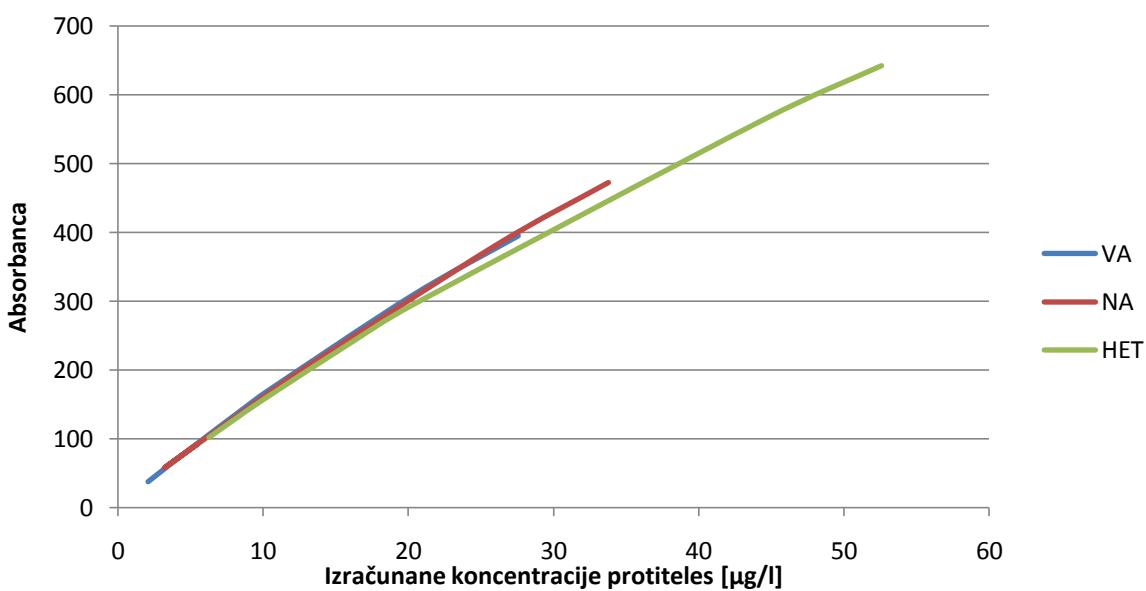
*Modra barva predstavlja visoko avidna protitelesa (VA), rdeča nizko avidna protitelesa (NA) in zelena heterogeno avidna protitelesa (HET). Na y-osi so koeficienti A ( $A_x/A_{pri teoretični koncentraciji protiteles 58,5 \mu g/l}$ ), na x-osi so povprečja koeficientov koncentracij protiteles ( $c_x/c_{pri teoretični koncentraciji protiteles 58,5 \mu g/l}$ ).*

Izbrali smo po eno čim bolj podobno koncentracijo za visoko ( $c = 10,30 \mu g/l$ ), nizko ( $c = 9,69 \mu g/l$ ) in heterogeno avidna protitelesa ( $c = 10,00 \mu g/l$ ) ter spremljali vezavo različno avidnih protiteles na različne koncentracije nanesenega antigena. Prag za vezavo visoko avidnih protiteles je nižji kot pri nizko avidnih protitelesih. Na Sliki 22 vidimo, da se vezava visoko avidnih protiteles začne pri koncentraciji nanesenega antigena  $\sim 2 \text{ mg/l}$ , pri nizko avidnih pa pri  $\sim 4 \text{ mg/l}$ . Heterogeno avidna protitelesa pa so nekje vmes in se pri višjih koncentracijah nanesenega antigena obnašajo kot visoko avidna, pri nižjih koncentracijah pa kot nizko avidna.



Slika 22: Absorbanca v odvisnosti od logaritma koncentracije nanosa Ag

Primerjali smo tudi absorbance in teoretične koncentracije protiteles pri koncnetraciji nanesenega antiga 16 mg/l (Slika 23). Opazili smo, da je trend naraščanja visoko, nizko avidnih in hetrogenih protiteles podoben, zato smo izračunali še naklon k. Najvišji k pripada premici, ki prikazuje visoko avidna protitelesa ( $k = 14,094$ ), sledi ji premica z nizko avidnimi protitelesi ( $k = 13,662$ ) in najmanj strmo narašča absorbanca heterogeno avidnih protiteles ( $k = 11,616$ ).



Slika 23: Primerjava absorbanc in izračunanih koncentracij protiteles pri koncentraciji nanesenega antiga 16 mg/l

## 5. RAZPRAVA

### 5.1 Antifosfolipidni sindrom in antifosfolipidna protitelesa

Glede na klasifikacijske kriterije Sapporo za antifosfolipidni sindrom (APS), ki so ji določili leta 1999 in jih posodobili leta 2006, je za postavitev diagnoze potrebno potrditi kombinacijo najmanj enega kliničnega in enega laboratorijskega kriterija. Med klinične kriterije spadajo tromboze in nosečniški zapleti. Laboratorijski kriteriji pa vključujejo potrditev prisotnosti lupusnih antikoagulantov, antikardiolipinskih protiteles IgG in/ali IgM izotipa srednjega ali visokega titra ali anti- $\beta_2$ -GPI protiteles IgG in/ali IgM izotipa, ki so jih nazadnje dodali med laboratorijske kriterije. Prisotnost protiteles je potrebno potrditi v obdobju 12 tednov. Če so prisotna antifosfolipidna protitelesa brez kliničnih znakov, to še ne potrdi diagnoze APS. Njihova prisotnost pa nakazuje na večjo možnost razvoja bolezni. Anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa so dejavnik tveganja za nastanek tromboz in kažejo večjo klinično specifičnost pri postavitvi diagnoze APS kot antikardiolipinska protitelesa (2, 22, 23).

### 5.2 Izolacija IgG

Na začetku dela smo izbrali 3 vzorce bolnikov s primarnim APS za opazovanje obnašanja različno avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles. Pri izboru vzorcev smo si pomagali s kaotropno metodo ELISA. Izbrali smo vzorec, v katerem smo s kaotropno ELISA določili, da prevladujejo visoko avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa. Prav tako smo izbrali vzorca s pretežno nizko avidnimi in heterogeno avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi. Vzorci so vsebovali IgG in IgA, zato je bilo najprej potrebno izolirati IgG.

Izolacijo smo izvedli s pomočjo afinitetne kolone, ki ima vezan protein G. To je površinski bakterijski protein skupine G *Streptococcus*, ki ima vezavno mesto za Fc regijo IgG. Rekombinantni protein G ( $M_r$  17000) je proizведен v *E. coli* in ima 2 vezavni regiji za IgG. Nativni protein G vsebuje še regijo za vezavo albumina, ki pa je bila izbrisana v rekombinantnem proteinu G. Z uporabo rekombinantnega proteina G v kolonah se tako izognemo neželenim reakcijam z albuminom. Mehanizem vezave je podoben vezavi na protein A iz *Staphylococcus aureus*. Protein G ima večjo afiniteto za IgG kot protein A. Vezavna kapaciteta proteina G za IgG je odvisna od več dejavnikov, kot so izvor vzorca, hitrost pretoka in koncentracija vzorca. Na kolono nismo nanašali motnih vzorcev. Pred nanosom na kolono smo vzorce filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20  $\mu\text{m}$ , pufre pa

skozi filter z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$ . S tem smo se izognili mikrobiološki kontaminaciji kolone. Vzorce in pufre smo na kolono nanašali z brizgo in pazili na pretok na koloni 1 kapljica/s. Na kolono smo nanesli vzorec in nevezane IgG izpirali z vezavnim pufrom. Vezane proteine smo odstranili z izpiralnim pufom z nižjim pH in s tem prekinili vezi med IgG in proteinom G. Frakcije smo zbirali v epruvetke, v katere smo dodali nevtralizacijski pufer, s pomočjo katerega smo izravnali pH raztopine na 7 in ohranili aktivnost IgG, ki so občutljivi na kislo okolje. Večino IgG smo sprali v frakcijah od 5 do 15 (Slika 8). Vzorci IgG, ki so vsebovali visoko, nizko in heterogeno avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa, so se na koloni z vezanim proteinom G obnašali podobno. Združili smo frakcije z absorbancami nad 0,1. Frakcij z nižjimi absorbancami nismo združevali, saj se je volumen vzorca s tem povečeval, skupna absorbanca pa zmanjševala. Ker so se proteini nahajali v neugodnem okolju, smo vzorce razsolili na razsoljevalnih kolonah. Frakcije od 3 do 5 smo združili (Slika 9). Tudi na razsoljevalni koloni ni bilo večjih razlik v spiranju visoko, nizko in heterogeno avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi. Ko smo izolirali večjo količino vzorcev, smo jih koncentrirali s pomočjo koncentrirne celice Amicon. Tako smo dobili manjše volumne vzorcev z višjo absorbanco.

### 5.3 Izolacija anti- $\beta_2$ -GPI

Pripravili smo afinitetno kolono z vezanim  $\beta_2$ -GPI, ki smo ga predhodno izolirali iz plazme krvodajalca s krvno skupino AB. Z  $\beta_2$ -GPI kolono smo delali v hladni sobi pri 4 °C. Na koloni smo izolirali anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa iz koncentrirane frakcije IgG. Vsa poliklonska protitelesa so heterogena v svoji avidnosti. Ločili smo protitelesa s pretežno visoko avidnostjo in protitelesa s pretežno nizko avidnostjo. Protitelesa, ki se niso uvrstila med pretežno visoko avidna ali pretežno nizko avidna, pripradajo skupini heterogeno avidnih protiteles. Pufre in vzorce smo pred nanosom na kolono filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20  $\mu\text{m}$  in s tem preprečili možnost kontaminacije kolone z bakterijami. Te bi motile oz. onemogočile izolacijo protiteles in uničile kolono. Vzorec smo pustili krožiti na koloni, da so se anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa vezala. Nevezane IgG smo izpirali s PBS-Tween. Sledilo je izpiranje nizko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles z 0,5 M PBS-Tween in nato izpiranje visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles s 4 M NaCl, 0,1 M glicin, 0,05 % Tween, pH 2,5. Iz vseh vzorcev smo najprej izolirali nizko in nato še visoko avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa. Le pri vzorcu s heterogeno avidnimi protitelesi smo izolirali frakcijo protiteles, ki je vsebovala zmes heterogeno avidnih protiteles. Vezi med nizko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi in  $\beta_2$ -

GPI smo prekinili s spremembo ionske moči. Nizko avidna protitelesa smo izprali v frakcijah od 1 do 37, kar je prikazano na Sliki 11. Opazili smo dva večja vrhova, vmes pa še več manjših. Prvi večji vrh priprada nizko avidnim protitlesom. Visoko avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa so bila močneje vezana na  $\beta_2$ -GPI, zato smo uporabili pufer z večjo ionsko močjo in nižjim pH. Izpirali smo jih v frakcijah od 21 do 42 (Slika 10). Prav tako smo opazili dva večja vrhova. Drugi vrh je višji in pripada visoko avidnim protitlesom. Heterogeno avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa smo izolirali v frakcijah od 1 do 28 (Slika 12) z izpiranjem s 4 M NaCl, 0,1 M glicin, 0,05 % Tween, pH 2,5, torej s puferom z veliko ionsko močjo in nizkim pH. Opazili smo en večji vrh. Zaradi občutljivosti protiteles na kislo okolje smo frakcijam dodali Tris pufer. Izmerili smo absorbanco pri 280 nm. Dobili smo zelo nizke vrednosti. Po ponovnem izpiranju kolone s PBS-Tween, smo opazili povečanje absorbance (Slika 13). Najverjetneje s spiranjem s prvim puferom (0,5 M PBS-Tween) nismo izprali vseh nizko avidnih protiteles, vezanih na kolono. Prav tako z drugim puferom (4 M NaCl, 0,1 M glicin, 0,05 % Tween, pH 2,5) nismo izprali vseh visoko avidnih protiteles. Po spremembi ionske moči in pH pufra smo izprali še nekaj protiteles, ki jih nismo mogli uvrstiti med visoko ali nizko avidna, zato smo jih dali krožiti skozi  $\beta_2$ -GPI kolono pri ponovni izolaciji protiteles.

Z UV-VIS spektrofotometrom kvantitativno določujemo proteine, ki vsebujejo aromatske aminokisline (triptofan, tirozin in fenilalanin), te pa močno absorbirajo pri valovni dolžini 280 nm (10). Na spektrofotometru smo dobili nizke absorbance, zato smo prisotnost in odziv protiteles preverili še z indirektno ELISA. Dobili smo absorbance, ki so bile tudi do 100 x večje od absorbanc, merjenih s spektrofotometrom pri 280 nm (Slika 10, Slika 11, Slika 12). Mogoče anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa vsebujejo manjši delež aromatskih aminokislín in so bile zaradi tega absorbance merjene s spektrofotometrom toliko nižje. Z ELISA s pomočjo intezitete obarvanega produkta zaznamo količino protiteles, ki je v vzorcu prisotna. Vsak encim na sekundarnem protitelesu, ki je vezan na eno molekulo tarčnih protiteles, katalizira razcep večih molekul substrata. (10, 17). Tako pride pri ELISA do ojačitve odziva. ELISA ima v primerjavi z neposrednim merjenjem absorbance nižjo analitsko specifičnost, a bistveno večjo analitično občutljivost. Lahko pa je meritve motil tudi dodan emulgator Tween 20, ki smo ga dodali k puferu za izolacijo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, saj preprečuje nespecifično vezavo protiteles.

Frakcije smo združili glede na odzive pri ELISA in jih razsolili. Želeli smo zmanjšati skupni volumen vzorcev protiteles, zato smo jih koncentrirali in dobili manjše volumne z višjimi absorbancami.

#### **5.4 Opazovanje vezave anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na različne koncentracije $\beta_2$ -GPI s pomočjo ELISA**

Izolirali smo visoko, nizko in heterogeno avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa. Želeli smo opazovati obnašanje visoko, nizko in heterogeno avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na različnih koncentracijah nanosa  $\beta_2$ -GPI. S pomočjo indirektne ELISA smo jih primerjali med sabo. Pripravili smo raztopine 100 x redčenih protiteles. Glede na njihove odzive na ELISA smo preračunali ustrezne koncentracije in jih s tem izenačili glede na njihov odziv. Pripravili smo raztopine  $\beta_2$ -GPI z izbranimi koncentracijami in izvedli indirektno ELISA. Dobili smo absorbance in AUG vrednosti, ki so predstavljale koncentracije protiteles v vzorcih (1 AUG enota je tista koncentracija protiteles, ki da enako absorbanco v metodi ELISA kot monoklonska protitelesa HCAL v koncentraciji 1  $\mu\text{g/l}$ ).

Visoko avidna protitelesa so se vezala sorazmerno s koncentracijo. Ko je naraščala gostota antigena, je naraščala tudi vezava visoko avidnih protiteles (Slika 14). Na Sliki 15 lahko vidimo, da nizko avidna protitelesa za isti odziv kot visoko avidna protitelesa potrebujejo višjo koncentracijo nanesenega antigena, torej so bolj odvisna od gostote antigena. Vezavo nizko avidnih protiteles smo opazili pri koncentraciji nanesenega antigena 4 mg/l, vendar so bile izmerjene absorbance nizke. Do opazne vezave pride šele pri višjih koncentracijah nanosa antigena (16 in 8 mg/l). Tudi na Sliki 22 smo opazili, da so nizko avidna protitelesa bolj odvisna od gostote antigena, saj je bilo povišanje absorbance opaziti šele pri gostoti antigena 4 mg/l. Visoko avidna protitelesa pa so se vezala že pri nižjih gostotah antigena.

$\beta_2$ -GPI se najverjetneje veže po vsej površini vdolbinice, ki je izpostavljena raztopini antigena. Za monovalentno protitelo lahko pričakujemo, da vezava protiteles narašča s koncentracijo antigena na površini vdolbinice, za bivalentno protitelo pa pričakujemo drugačno obnašanje. Vezava protiteles je enaka nič (tudi ko narašča koncentracija antigena na površini vdolbinice), dokler ni dosežena tista koncentracija antigena, ko postane najmanjša razdalja med sosednjima epitopoma manjša od razdalje med enim in drugim paratopom na bivalentnem protitelesu. V tej točki se vezava protiteles strmo poveča, vse do točke, kjer postanejo sterične ovire in disociacijska kinetika pomembnejše od

razpoložljivosti antigena. Tu se krivulja spet zravna (24). Na Sliki 22 vidimo, da je vezava protiteles pri nizkih koncentracijah nanosa  $\beta_2$ -GPI blizu ničle, ko pa doseže prag, začne strmo naraščati. Čeprav nismo dosegli točke pri višjih koncentracijah antigena na površini vdolbinice, kjer bi se krivulja spet zravnala, bi lahko sklepali, da je vezava treh vzorcev različno avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles podobna vezavi bivalentnih protiteles. Pri nižjih gostotah antigena na površini se nekaj protiteles verjetno veže tudi monovalentno. Vendar je vez med antigenom in protitelesom šibkejša, zato se monovalento vezana protitelesa hitreje sperejo iz vdolbinice pri vmesnem spiranju ploščice.

Koncentracije protiteles niso bile izenačene (Slika 20). Pri koncentraciji nanosa antigena 16 mg/l in teoretični koncentraciji protiteles 68  $\mu\text{g/l}$  smo z ELISA detektirali naslednje koncentracije: visoko avidna protitelesa s koncentracijo 27,6  $\mu\text{g/l}$ , nizko avidna protitelesa s koncentracijo 33,8  $\mu\text{g/l}$  in heterogena protitelesa s koncentracijo 52,6  $\mu\text{g/l}$ . Najmanj so odstopale izračunane koncentracije heterogeno avidnih protiteles, sledile so jim koncentracije nizko avidnih protiteles in nato koncentracije visoko avidnih protiteles. Možni razlogi za odstopanja so tako eksperimentalne napake pri pripravi vzorcev kot tudi višja temperatura v laboratoriju, saj smo eksperimentalno delo izvajali v mesecu juliju. Eksperimentalne napake opazimo tudi pri pripravi vzorcev. Najprej smo pripravili raztopino protiteles s teoretično koncentracijo 54  $\mu\text{g/l}$ , jih redčili v razmerju 1 : 2 in dobili raztopine s teoretičnimi koncentracijami 27,2, 13,6 in 6,8  $\mu\text{g/l}$ . Posebej smo pripravili še raztopine s koncentracijami 68, 20 in 9  $\mu\text{g/l}$ . Na Sliki 14 opazimo dvig krivulje v točki, kjer je teoretična koncentracija 20  $\mu\text{g/l}$  in spust krivulje v točki, kjer je teoretična koncentracija 9  $\mu\text{g/l}$ . Podobno lahko opazimo tudi na Sliki 15 in Sliki 16. Premiki krivulj so najverjetnejše nastali zaradi eksperimentalnih napak, saj smo pri pripravi raztopin protiteles delali z zelo majhnimi količinami vzorcev. Mogoče vzorcev nismo zadosti premešali, lahko so v pipetnih nastavkih zastali mehurčki in s tem zmanjšali količino protiteles. Do napak je lahko prišlo tudi zaradi napačnega držanja pipete.

Delež protiteles, ki se vežejo na antigen, je odvisen od njihove avidnosti in gostote antigena na površini, ni pa odvisen od koncentracije protiteles. Na Sliki 17, Sliki 18 in Sliki 19 lahko vidimo, da je delež vezave protiteles z različnimi koncentracijami na enaki gostoti antigena podoben. Visoko avidna protitelesa so se na polovično količino antigena vezala 66,7 % ( $\text{kv} = 7,3 \%$ ), nizko avidna 46,3 % ( $\text{kv} = 7,8 \%$ ), heterogeno avidna pa 65,2 % ( $\text{kv} = 7,5 \%$ ) glede na vezavo na antigen s koncentracijo nanosa 16 mg/l. Delež vezave

heterogeno avidnih protiteles pri koncentraciji nanosa antiga 8 mg/l je podoben deležu vezave visoko avidnih protiteles. Pri koncentraciji nanosa antiga 4 mg/l pa je delež vezave heterogeno avidnih protiteles (16,4 %, kv = 5,5 %) nekje na sredini med deležem vezave visoko (27,9 %, kv = 8,7 %) in nizko avidnih protiteles (7,3 %, kv = 10,5 %). Pri nižjih koncentracijah nanosa antiga pa je opazna le vezava visoko avidnih protiteles. Delež vezave heterogeno avidnih protiteles je bil pri višjih koncentracijah antiga podoben deležu vezave visoko avidnih protiteles, pri nižjih koncentracijah antiga pa deležu vezave nizko avidnih protiteles.

Vplive koncentracij antiga in protiteles na vezavo protiteles so opazovali tudi z inhibicijo visoko in nizko avidnih protiteles z antigenom v tekoči fazi. Ugotovili so, da je delež protiteles, ki se vežejo na antigen v tekoči fazi, odvisen samo od koncentracije antiga in ni odvisen od koncentracije protiteles. Opazili so tudi, da se visoko avidna protitelesa vežejo na antigen v večji meri kot nizko avidna protitelesa pri enaki koncentraciji antiga (25). Delež protiteles, ki se vežejo na imobiliziran antigen in antigen v tekoči fazi, torej ni odvisen od njihove koncentracije, ampak od njihove avidnosti in koncentracije antiga.

Avidnost anti- $\beta_2$ -GPI protiteles je pomemben in stabilen laboratorijski parameter in bi lahko bil koristen pri oceni imunskega statusa bolnika z APS (9). Čučnik in sodelavci so dokazali, da je bilo v skupini z visoko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi statistično značilno več bolnikov z APS v primerjavi s skupino z nizko avidnimi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesi, v kateri pa je bilo več bolnikov s SLE brez APS (6). Opazovali so tudi povezavo med trombozami in prisotnostjo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles. S študijami so potrdili, da so tromboze bolj povezane s prisotnostjo visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles kot s prisotnostjo nizko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles. Povezavo so prikazali predvsem z venskimi trombozami (6, 8). Avidnost protiteles je torej pomembna zaradi povezave med domnevno patogenimi visoko avidnimi protitelesi in trombozami. Če visoko avidna anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa nakazujejo večjo klinično specifičnost, potem bi bilo smiselno določati prisotnost visoko in nizko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles ali mogoče samo prisotnost visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles (7).

V diplomske nalogi smo opazovali vezavo različno avidnih protiteles z različnimi koncentracijami na različne gostote antiga. Ugotovili smo, da je vezava nizko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles bolj odvisna od gostote antiga kot vezava visoko anti- $\beta_2$ -GPI

avidnih protiteles. Delež protiteles, ki so se vezala na antigen, ni odvisen od njihove koncentracije. Razlike v deležu vezave so se pojavile zaradi različne avidnosti protiteles in različnih gostot antiga na površini. Z večjim številom vzorcev z različno avidnostjo bi še dodatno potrdili domnevno obnašanje teh protiteles in s tem omogočili natančnejše določevanje visoko, nizko in heterogeno avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles.

## 6. SKLEPI

V diplomske nalogi smo prišli do naslednjih spoznanj:

- Delež vezave anti- $\beta_2$ -GPI protiteles je odvisen od gostote antigena na površini ter avidnosti protiteles, ni pa odvisen od koncentracije protiteles.
- Vezava nizko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na antigen je bolj odvisna od gostote antigena na površini kot vezava visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles.
- Vezava anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na antigen je občutljiva na višje temperature ( $> 25$  °C).
- Pri nižjih koncentracijah antigena je delež vezave heterogeno avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles bolj podoben deležu vezave nizko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, pri višjih koncentracijah antigena pa deležu vezave visoko avidnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles.

## 7. LITERATURA

1. Rozman B, Kveder T. Merila in razvrstitev antifosfolipidnega sindroma. Med Razgl 2003; 42: S 3: 21–24.
2. De Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies - from clinical association to pathologic mechanism. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008; 4 (4): 192–9.
3. Bouma B et al. Adhesion mechanism of human  $\beta$ 2-glycoprotein I to phospholipids on its crystal structure. The EMBO Journal 1999; 18 (19): 5166–5174.
4. Schwarzenbacher R et al. Crystal structure of human  $\beta$ 2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. The EMBO Journal 1999; 18 (22): 6228–6239.
5. Kveder T, Božič B. Imunoseroliške preiskave pri sistemskih boleznih vezivnega tkiva. Med Razgl 2003; 42: S 3: 61–69.
6. Čučnik S, Kveder T, Križaj I, Rozman B, Božič B. High avidity anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. Ann Rheum Dis 2004; 63: 1478–1482.
7. Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B. Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. Autoimmun Rev 2005; 4 (5): 303–8.
8. De Laat B, Derkx RHWM, De Groot PG. High-avidity anti- $\beta_2$  glycoprotein I antibodies highly correlate with thrombosis in contrast to low-avidity anti- $\beta_2$  glycoprotein I antibodies. J Thromb Haemost 2006; 4: 1619–1621.
9. Čučnik S, Božič B, Kveder T, Tomšič M and Rozman B. Avidity of anti- $\beta_2$ -glycoprotein I and thrombosis or pregnancy loss in patients with antiphospholipid syndrome. Ann NY Acad Sci 2005; 1051: 141–147.
10. Vozelj M. Temelji imunologije. DZS, 2000: 91–120.
11. Shoenfeld Y, Gershwin M E, Meroni P L. Autoantibodies. 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier B V 2007, USA, 21–28.
12. Sheng Y et al. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I autoantibodies from patients with the »Antiphospholipid« syndrome bind to  $\beta_2$ -glycoprotein I with low affinity: Dimerization of  $\beta_2$ -glycoprotein I induces a significant increase in anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibody affinity. J Immunol 1998; 161(4): 2038–43.

13. Hayashi A et al. Self-inetraction of soluble and surface-bound  $\beta_2$ -glycoprotein I and its enhancement by lupus anticoagulants. FEBS Letters 2008; 582: 3308–3312.
14. Čučnik S, Kveder T, Rozman B, Božič B. Binding of high avidity anti- $\beta_2$ -glycoprotein I antibodies. Rheumatology 2004; 43: 1353–1356.
15. Roubey RAS, Eisenberg RA, Harper MF, Winfield JB. »Anticardiolipin« Autoantibodies Recognize  $\beta_2$ -Glycoprotein I in the Absence of Phospholipid. The Journal of Immunology, 1995; 154: 954–960.
16. Ambrožič A. Lastnosti in mehanizmi trombogenega delovanja protiteles proti beta2-glikoproteinu 1. Doktorsko delo; 2004: 30–31.
17. Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L. Biochemistry. 5<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman and Company 2002, England, 80–102.
18. Kuhelj R. Biokemija v praksi: načela in tehnike. FKKT 2003: 38–53.
19. Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, SIG 093094, ZDA.
20. IgG Sapporo Standard (HCAL), 508668, INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, USA.
21. HiTrap Protein G HP 1ml and 5 ml, Instruction 71-7001-00 AO, HiTrap affinity columns, GE Healthcare.
22. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derkzen RHWM, de Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2006; 4: 295–306.
23. Tuthill JI, Khamashta MA. Management of antiphospholipid syndrome. Journal of Autoimmunity 2009; 33: 92–98.
24. Reddel SW, Wang YX, Krilis SA. Anti- $\beta_2$ -glycoprotein I autoantibodies require an antigen density treshold, consistent with divalent binding. Lupus 2003; 12: 37–45.
25. Vahtarič B. Inhibicija nizko in visoko avidnih protiteles proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I z antigenom v tekoči fazi. Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.