

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HANA BRELIH

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HANA BRELIH

**DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI VEZAVE PROTITELES PROTI
PEPTIDOM BETA 2-GLIKOPROTEINA I Z
ENCIMSKOIMUNSKIMI METODAMI**

**DETERMINATION OF ANTIBODY BINDING SPECIFICITY
AGAINST PEPTIDES ON β_2 -GLYCOPROTEIN I WITH ENZYME-
LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY**

Ljubljana, 2013

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

ZAHVALA

Iz srca hvala mentorju, prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., spec. med. biokem., za lepa predavanja, za strokovno vodstvo in pomoč pri oblikovanju diplomske naloge. Hvala Vam za vse spodbudne besede in nasvete.

Najlepša hvala doc. dr. Saši Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem., za strokovne nasvete in pregled naloge. Spoštovani, tudi Vaša predavanja so mi bila v veselje.

Hvala dr. Tanji Kveder, univ. dipl. inž. kem., ker ste mi omogočili delo v laboratoriju.

Hvala dr. Andreju Artenjaku, mag. farm., za vso potrpežljivost in čas, ki si mi ju naklonil.

Hvala, ker si mi bil s svojimi nasveti vedno na razpolago.

Hvala tudi Dragici, Janji, Tini, Tinki, Miri, Evi, Katji in Katjuši, ker ste mi pomagale pri delu in lepšale dneve v laboratoriju.

Hvala mami in tatiju, ker sta me naučila optimizma. Hvala sestri Mariji, ker že od vrtca skrbiš zame. Hvala tebi, Sean, ker si z mano.

Posebej se zahvaljujem nonotu, ker si moj učitelj v enajsti šoli.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Boruta Božiča mag. farm., spec. med. biokem., in somentorice doc. dr. Saše Čučnik, univ. dipl. biol., spec. med. biokem.

VSEBINA

POVZETEK	3
ABSTRACT	4
KLJUČNE BESEDE	5
SEZNAM OKRAJŠAV	5
1 UVOD	6
1.1 Antifosfolipidni sindrom	6
1.2 Antifosfolipidna protitelesa	6
<i>Antikardiolipinska protitelesa</i>	6
<i>Lupusni antikoagulanti (LA)</i>	7
<i>Anti-β_2-glikoprotein I protitelesa</i>	7
1.3 β_2-glikoprotein I	7
1.3.1 Zgradba β_2 -glikoproteina I	7
1.3.2 Razlike med kristalno strukturo človeškega β_2 -glikoproteina I in strukturo β_2 -glikoproteina I v raztopini	10
1.3.3 β_2 -GPI in klinični znaki	10
<i>β_2-GPI in proces koagulacije</i>	10
<i>β_2-GPI in ateroskleroza</i>	10
<i>β_2-GPI in pojav splava v nosečnosti</i>	11
1.4 Afiniteta in avidnost medmolekulskih interakcij	11
1.5 Pomen vodikovih in elektrostatskih interakcij za vezavo protiteles proti β_2-glikoproteinu I na β_2-glikoprotein I	12
1.6 Metode za določanje specifične vezave protiteles na tarčni antigen	12
1.6.1 Izvedbe ELISA	12
<i>Direktna ELISA</i>	12
<i>Sendvič ELISA</i>	13
<i>Indirektna ELISA</i>	13
2 NAMEN	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 Vzorci	15
3.2 Kontrolni vzorci	15
3.3 Antigeni	15
3.4 Priprava pufrov in raztopin	17
3.5 Priprava peptidov	18
3.5.1 Reagenti	22
3.5.2 Aparature in pripomočki	23
3.6 Metode dela	24
3.6.1 Statistične metode	25
4 REZULTATI	26

4.1	Določitev pogojev za izvedbo encimsko imunskega testa _____	26
4.2	Določanje prazne vrednosti _____	27
4.3	Končne koncentracije peptidov _____	30
4.4	Prisotnost aminokislinskega repa _____	31
4.5	Izkazovanje pozitivnosti na več peptidov hkrati _____	32
4.6	Avidnost protiteles proti β_2 -glikoproteinu I in pozitivnost vzorčnih serumov na določen peptid _____	34
4.7	Povezava med pozitivnostjo proti posameznim peptidom in avidnostjo protiteles proti β_2 -glikoproteinu I ter kliničnimi znaki pri bolnikih z APS _____	35
4.8	Pojav antifosfolipidnega sindroma in drugih avtoimunskih bolezni s prisotnostjo protiteles proti β_2 -glikoproteinu I, vendar brez prisotnih kliničnih znakov antifosfolipidnega sindroma _____	38
5	RAZPRAVA _____	43
6	SKLEPI _____	48
7	LITERATURA _____	49

POVZETEK

Antifosfolipidni sindrom je sistemska avtoimunska bolezen, za katero so značilne tromboze in/ali zapleti v nosečnosti ter povišane ravni antifosfolipidnih protiteles. Med njimi so najpogosteje študirana protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I, ki izkazujejo veliko heterogenost tako v podrobni specifičnosti (raznolikost epitopov) kot v avidnosti. Za obe lastnosti obstajajo podatki o njunem pomenu v patogenezi bolezni. Namen našega dela je bil določiti povezavo med avidnostjo protiteles proti β_2 -glikoproteinu I in pozitivnostjo vzorčnih serumov na posamezen peptid, ki je sestavni del domen β_2 -glikoproteina I. Z encimsko imunskim testom smo preverjali specifičnost vezave visoko, heterogeno in nizko avidnih protiteles iz serumov 217 bolnikov iz šestih držav, pridobljenih v okviru multicentrične študije Evropskega foruma za antifosfolipidna protitelesa, na devet različnih peptidov. Preverili smo tudi, ali na specifičnost vezave vplivajo aminokislinski podaljški z zaporedjem GGGS-NH₂ pri treh peptidih. Ugotovili smo, da se je največ protiteles (n = 146) iz vzorcev vezalo na peptid z aminokislinskim zaporedjem F N P Y W Y V GGGS-NH₂, ki je del II. domene β_2 -glikoproteina I, najmanj (n = 21) pa na peptid z zaporedjem Q G P A H S K GGGS-NH₂, ki je del III. domene β_2 -glikoproteina I. Specifičnost vezave protiteles se je izkazala za nizko, saj je 73 odstotkov vzorcev bilo pozitivnih na najmanj dva peptida hkrati. K večji specifičnosti je pripomogel aminokislinski podaljšek, najverjetneje zaradi vsebnosti dodatne aminokislinske S, ki z β_2 -glikoproteinom I lahko tvori močno vodikovo vez. Na vse peptide, z izjemo enega, je bilo reaktivnih največ vzorcev s heterogeno avidnimi protitelesi proti β_2 -glikoproteinu I. Za pojav tromboz je bila vezava visoko avidnih protiteles proti β_2 -glikoproteinu I na peptide z aminokislinskim zaporedjem K D K A T F in N G P A N S K statistično pomembna.

ABSTRACT

The antiphospholipid syndrome is a systemic autoimmune disorder, with typical manifestations such as thrombosis and/or complications during pregnancy. The syndrome is strongly associated with elevated levels of antiphospholipid antibodies, among which antibodies against β_2 -glycoprotein I are one of the most researched. Important characteristics of these antibodies is their avidity and epitopic specificity and these two characteristics represent the most heterogenic attributes of antibodies against β_2 -glycoprotein I. The aim of our work was to determine the relation between avidity of antibodies against β_2 -glycoprotein I and immunoreactivity of tested serum samples against nine different peptides, which are parts of β_2 -glycoprotein I structure. 217 samples were acquired from six different countries as a part of multicentre study of European antiphospholipid antibodies forum. Binding specificity of antibodies with high, heterogeneous and low avidity was determined using enzyme-linked immunosorbent assay. Effect of addition of amino acid extension (GGGS-NH₂) to three of the peptides on binding specificity was also determined. We established that most of the samples (n = 146) were immunoreactive against peptide with amino acid sequence F N P Y W Y V GGGS-NH₂, which is a part of domain II of β_2 -glycoprotein I. The fewest samples (n = 21) were immunoreactive against peptide with amino acid sequence Q G P A H S K GGGS-NH₂, which is a part of domain III of β_2 -glycoprotein I. Because 73 percent of tested samples displayed binding with at least two peptides simultaneously, their binding specificity was determined as low. The amino acid extension increased the binding specificity, most probably due to its additional amino acid S, which can form additional strong hydrogen bond with β_2 -glycoprotein I. Most of the antibodies that were immunoreactive against different peptides were of heterogeneous avidity. For the occurrence of thrombosis, binding of high avidity antibodies against β_2 -glycoprotein I to peptides with amino acid sequence K D K A T F and N G P A N S K was statistically significant.

KLJUČNE BESEDE

Antifosfolipidni sindrom, klinični zapleti, epitopska specifičnost, ionska vez, β_2 -glikoprotein I, protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I.

KEY WORDS

Antiphospholipid syndrome, clinical manifestations, epitopic specificity, ionic bond, β_2 -glycoprotein I, antibodies against β_2 -glycoprotein I.

SEZNAM OKRAJŠAV

anti- β_2 -GPI	Protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I
aCL	Antikardiolipinska protitelesa
aPL	Antifosfolipidna protitelesa
APS	Antifosfolipidni sindrom
β_2 -GPI	β_2 -glikoprotein I
BSA	Goveji serumski albumin
CCP	Proteini, ki kontrolirajo komplement
DEA	Dietanolaminski pufer
ELISA	Encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu
IgG	Imunoglobulini razreda G
IgM	Imunoglobulini razreda M
LA	Lupusni antikoagulanti
OxLDL	Oksidirani lipoproteini z nizko gostoto
PBS	S fosfatom pufrana fiziološka raztopina
p-NPP	Dinatrijev 4-nitrofenil fosfat
SAXS	Sipanje rentgenskih žarkov pod majhnimi koti
SCR	Kratke skupne ponovitve
SLE	Sistemski lupus eritematozus

1 UVOD

1.1 Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom (APS) je definiran kot sistemska avtoimunska bolezen s prisotnostjo antifosfolipidnih protiteles (aPL) v krvi bolnikov s trombozami ali ponavljajočimi nosečniškimi zapleti (1). V literaturnih virih zasledimo različne patogene mehanizme: prvi vključuje aktivacijo endotelijskih celic z vezavo antifosfolipidnih protiteles (aPL), drugi opisuje oksidativno poškodbo žilnega endotelija, tretji mehanizem pa predvideva vpletanje aPL s fosfolipide-vezočimi proteini, ki so vključeni v koagulacijsko kaskado, ali njihovo uravnavanje itd. (2). Sprva so predvidevali, da so aPL usmerjena proti anionskim fosfolipidom, zdaj pa velja, da so klinično bolj pomembna aPL, usmerjena proti β_2 -glikoproteinu I (β_2 -GPI) (3).

APS delimo v več kategorij; APS, pri katerem bolnik nima kliničnih dokazov drugih avtoimunskih bolezni, APS, ki se pojavlja v povezavi z drugo boleznijo, največkrat s sistemskim lupusom eritematozusom (SLE), in katastrofični APS, za katerega je značilna hkratna zamašitev več žil po celotnem organizmu in se največkrat konča s smrtjo (2, 3). Nekatero novejšo študijo omenjajo tudi serološko negativni APS, pri katerem imajo bolniki številne klinične znake, ki so potrebni za potrditev diagnoze APS, vendar nimajo dokazanih prisotnih aPL niti po večkratnem laboratorijskem testiranju. Raziskovalne skupine opozarjajo na možnost pomena aPL, ki še niso razvrščena v dozdajšnje klasifikacijske kriterije, in na problem do zdaj uveljavljenih testov, ki bi tudi lahko bili vzrok za negativne rezultate (4-6).

1.2 Antifosfolipidna protitelesa

Antikardiolipinska protitelesa

Kardiolipin (1,3 difosfatidil-sn-glicerol) je anionski fosfolipid, ki je lokaliziran v notranji mitohondrijski membrani. Največ ga je v srcu, najdemo pa ga v vseh tkivih sesalcev. Ima dimerno strukturo, v kateri sta dve fosfatidilni funkcionalni skupini med seboj povezani z glicerolom. Zaradi štirih maščobnokislinskih acilnih skupin je kardiolipin hidrofobne narave, hkrati pa je zaradi dveh fosfatov kisel. Kardiolipin reagira s širokim spektrom mitohondrijskih proteinov preko tvorbe hidrofobnih in elektrostatskih interakcij (7). Interakcija s številnimi proteini je verjetno najbolj pomembna fizikalna lastnost

kardiolipina. Med proteini, ki vežejo kardiolipin z visoko afiniteto, najdemo respiratorne komplekse I, III, IV in V, družino prenašalcev (ATP-ADP, fosfatni) in dva periferna membranska proteina (citokrom c in kreatinska kinaza) (8). Prav tako so ugotovili, da je celica, ki ji primanjkuje kardiolipin, podvržena hitrejšemu staranju in apoptozi (7). Antikardiolipinska protitelesa (aCL) niso usmerjena proti kardiolipinu, temveč proti kardiolipin- β_2 -GPI kompleksu. Po nekaterih raziskavah naj bi aCL aktivirala žilne endotelijske celice in tako povzročila žilne poškodbe (9). Eno glavnih podskupin aCL predstavljajo prav protitelesa proti β_2 -GPI (anti- β_2 -GPI) (10).

Lupusni antikoagulanti (LA)

Lupusni antikoagulanti (LA) so heterogena skupina protiteles, ki so prisotna pri bolnikih s SLE in drugimi avtoimunskimi boleznimi. Ta protitelesa podaljšajo in-vitro koagulacijske teste, vežejo se lahko na kardiolipin in druge fosfolipide, ki so prisotni pri bolnikih z APS, lahko pa se vežejo tudi na β_2 -GPI (2, 11).

Anti- β_2 -glikoprotein I protitelesa

β_2 -GPI oz. apolipoprotein H (podrobneje opisan v poglavju 1.3) je glavni antigen, na katerega se vežejo protitelesa, prisotna pri bolnikih z APS (12). Podatki kažejo, da je med drugim vpleten v proces koagulacije in aterosklerozo (13). Anti- β_2 -GPI predstavljajo najpomembnejši znak prisotnosti APS, čeprav nimajo vsi bolniki s povišanimi anti- β_2 -GPI kliničnih znakov. Razlog za to je najverjetneje heterogena specifičnost epitopov anti- β_2 -GPI protiteles in njihova jakost vezave na antigen oziroma avidnost (14). Anti- β_2 -GPI tako izkazujejo izrazito heterogenost v avidnosti, v skupini z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI pa je veliko več bolnikov z APS kot v tisti z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI (10).

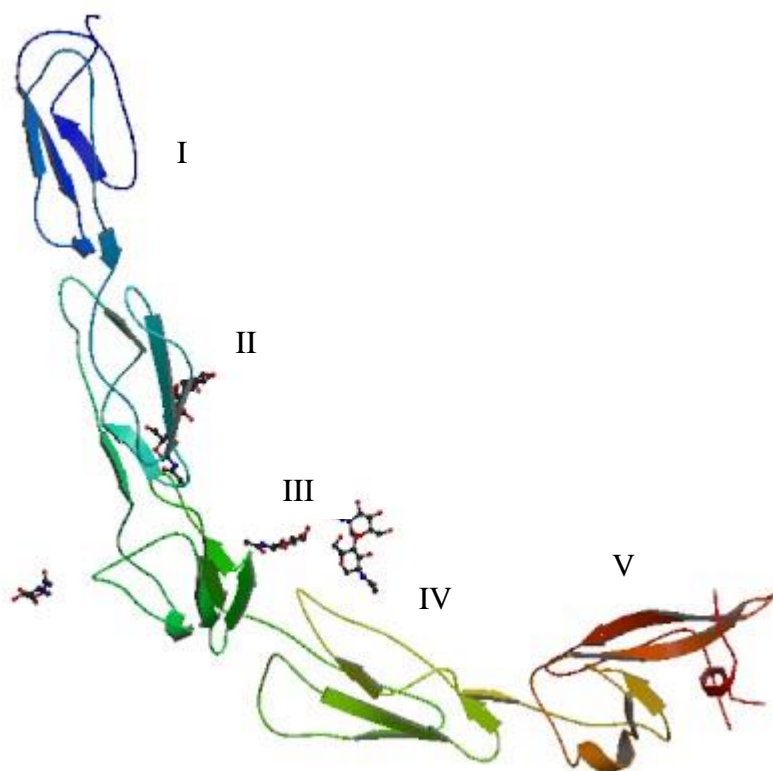
1.3 β_2 -glikoprotein I

β_2 -GPI je 43-kDa velik humani protein s plazemsko koncentracijo 50-300 mg/L, ki se sintetizira predvsem v jetrih, nekaj pa tudi v placenti. V plazmi je v prosti obliki ali v obliki lipoproteinskih frakcij (12, 15). Predvidevajo, da je pomemben kofaktor pri vezavi serumskih protiteles pri APS, povezujejo pa ga tudi s trombozami, nosečniškimi zapleti, še posebej s ponavljajočimi spontanimi splavi, in SLE (16, 17).

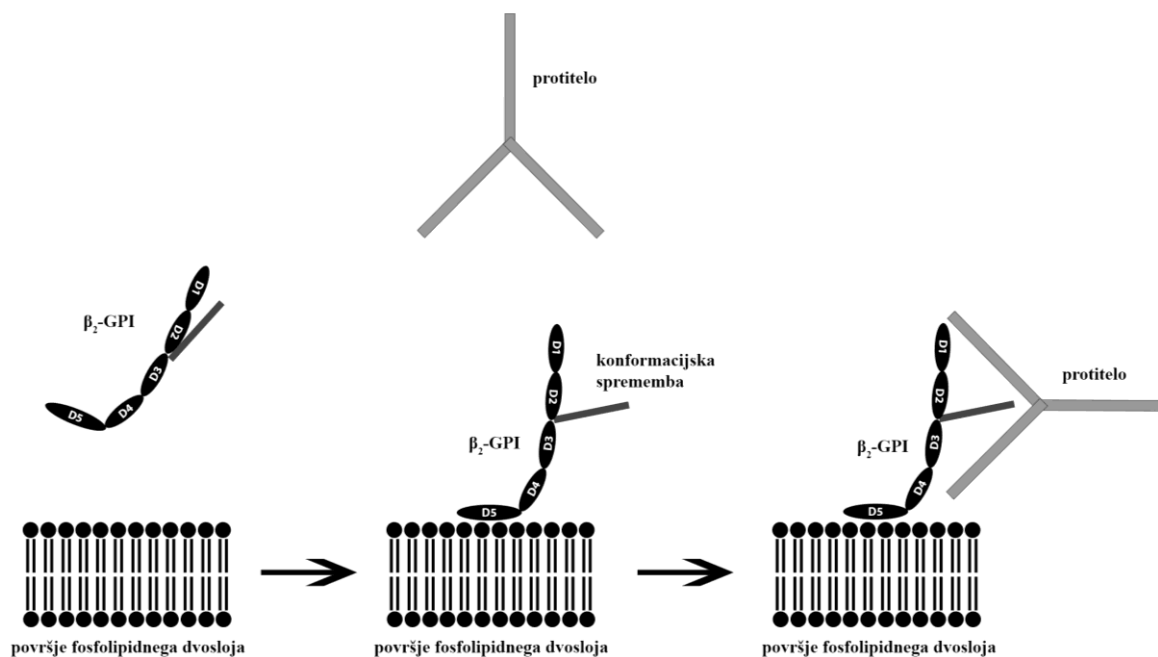
1.3.1 Zgradba β_2 -glikoproteina I

Imunski odziv, regulacija komplementa in mehanizmi prepoznavne receptorjev so pogosto olajšani zaradi specifičnih proteinov, ki so zgrajeni iz kratkih ponovitev (SCR; ang. short

consensus repeats). β_2 -GPI tako vsebuje štiri SCR in dodatno peto domeno s C-terminalnim podaljškem. Poimenovali so jih sushi domene (I-V). Skupaj dajejo proteinu obliko črke J (Slika 1), protein pa sestavlja 326 aminokislin, ki so razporejene v pet kratkih zaporednih domen. Vsako izmed prvih štirih domen sestavlja 60 aminokislin, od teh ima vsaka štiri cisteine, peta domena pa ima dodatnih šest aminokislinskih ostankov in 19-aminokislinski C-terminalni podaljšek. Prav te dodatne aminokisliline naj bi bile odgovorne za oblikovanje pozitivno nabitega žepa v peti (V) domeni β_2 -GPI z aminokislinsko sekvenco $^{281}\text{CKNKEKKC}^{288}$, ki predstavlja vezavno mesto za anionske fosfolipide, kot so kardiolipin, fosfatidilserin in fosfatidilinozitol (1, 17, 18). Po vezavi β_2 -GPI spremeni konformacijo in izpostavi skrit epitop, na katerega se lahko vežejo protitelesa (Slika 2). β_2 -GPI posledično dimerizira, kompleks, ki ga tvorijo fosfolipidi, β_2 -GPI in anti- β_2 -GPI, pa lahko vpliva na hemostatične reakcije in številne celične receptorje, kar posledično vodi v tromboze in zaplete v nosečnosti (16, 19).



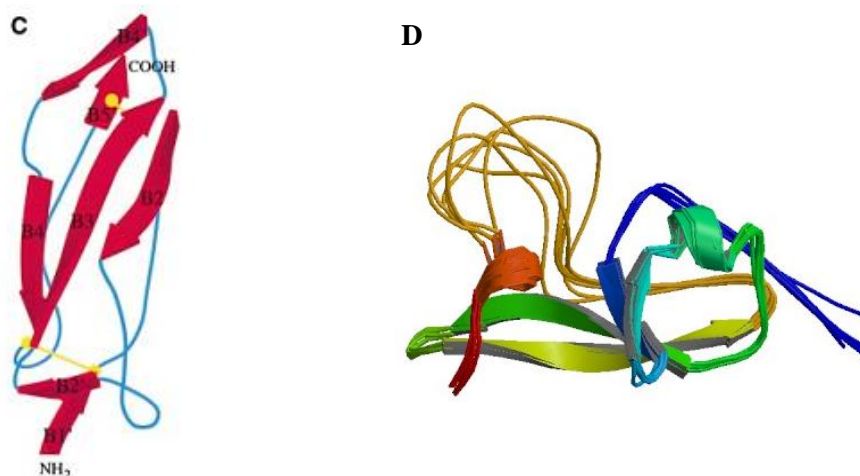
Slika 1: Shema zgradbe β_2 -GPI. Številke od I-V predstavljajo domene.



Slika 2: Shema vezave protitelesa na epitop β_2 -GPI. D1-D5; domena I-domena V.

Domene I-IV β_2 -GPI sestavljajo SCR, ki so si med sabo zelo podobni, sestavlja pa jih osrednja antipararelna β -ploskev (B2-B3-B4) in dve stranski antipararelni β zanki na N- in C-terminalnem koncu (B1'-B2' in B4'-B5') (Slika 3C) (20).

Zgradba domene V se precej razlikuje. Ima centralno antiparalelno β -ploskev, ki jo sestavljajo štiri verige in kratko α -vijačnico med dvema izmed teh štirih verig (Slika 3D). Domena V ima šest dodatnih aminokislinskih ostankov v področju hiper-variabilne zanke, s čimer tvori dodatno β -verigo (16, 20).



Slika 3: Shema strukture domen I-IV (C) in domene V (D) (21).

Domene so med sabo povezane s kratkimi regijami treh (med domenama IV in V) in štirih aminokislinskih ostankov (med ostalimi domenami), če štejemo ostanke med C-terminalnim cisteinom prve domene in N-terminalnim cisteinom druge domene (20).

1.3.2 Razlike med kristalno strukturo človeškega β_2 -glikoproteina I in strukturo β_2 -glikoproteina I v raztopini

Študije kažejo, da so N-terminalne domene CCP1, CCP2 in CCP3 vpletene v tvorbo specifičnih proteinskih skupkov, ki jih prepoznajo anti- β_2 -GPI (22, 23, 24). Zaradi ugibanj, da naj bi po izpostavitvi epitopa v kompleksu z β_2 -GPI le ta spremenil konformacijo, ki je drugačna kot v raztopini, in da naj bi se s tem zmanjšala njegova imunoreaktivnost, je Hammel s sipanjem rentgenskih žarkov pod majhnimi koti (SAXS) na β_2 -GPI v vodni raztopini ugotovil, da je struktura β_2 -GPI v raztopini daljša in obsežnejša (15). Agar s sodelavci je ugotovil, da zavzame β_2 -GPI v raztopini krožno konformacijo in kot tako jo lahko prepoznajo le visoko avidna protitelesa, ki so sposobna prekiniti hidrofilno vez med prvo in peto domeno in s tem izpostaviti kriptične epitope (1).

1.3.3 β_2 -GPI in klinični znaki

β_2 -GPI in proces koagulacije

β_2 -GPI naj bi bil pomemben v več stopnjah koagulacije in fibrinolize, njegova vloga v procesu pa še ni točno pojasnjena, saj izkazuje tako prokoagulacijske kot tudi antikoagulacijske lastnosti (12). Pokazalo se je, da dodatek anti- β_2 -GPI zdravi človeški plazmi podaljša tvorbo trombina (12, 25). β_2 -GPI inhibira aktivacijo faktorja XII v prisotnosti negativno nabitih fosfolipidov in s tem intrizično pot koagulacije (26).

β_2 -GPI in ateroskleroza

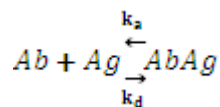
V aterosklerotični lehi so zaznali imuoreaktivnost proti β_2 -GPI, prav tako lahko β_2 -GPI veže lipoprotein A, ki naj bi bil najbolj odgovoren za pojav ateroskleroze (12). Matsura s sodelavci je ugotovil, da oksidirani lipoproteini z nizko gostoto (oxLDL) in-vitro reagirajo z β_2 -GPI preko specifičnih ligandov iz LDL, tako da tvorijo komplekse oxLDL/ β_2 -GPI. Prisotnost teh kompleksov kaže na žilne poškodbe in oksidativni stres, pogosto pa se pojavijo pri bolnikih s SLE in APS. Prav tako so ugotovili, da so serumske koncentracije IgG anti-oxLDL/anti- β_2 -GPI pomembno višje pri bolnikih s SLE, ki imajo hkrati prisoten APS, kot pri tistih brez APS. Visoke titre teh protiteles so določili tudi pri tistih APS bolnikih, ki so že imeli pojav arterijske tromboze (27).

β_2 -GPI in pojav splava v nosečnosti

Čeprav njihova vloga še ni točno pojasnjena oz. je možnih več mehanizmov delovanja, je znano, da lahko anti- β_2 -GPI inhibirajo proliferacijo in sekretorno aktivnost humanih trofoblastnih celic placente, prav tako pa naj bi preprečila implantacijo in vivo. Njihova pravočasna detekcija lahko odločilno vpliva na potek nosečnosti (12).

1.4 Afiniteta in avidnost medmolekulskih interakcij

Pri interakciji antigena s protitelesom so vključene nekovalentne sile (vodikove, elektrostatske, Van der Waalove in hidrofobne interakcije), jakost katerih je šibka in vsaka deluje na zelo kratke razdalje. Zato je za močno vez antigen-protitelo potreben tesen stik, kar povzroči visoko specifičnost reakcij antigen-protitelo (22). Afiniteta pomeni vezavno energijo monovalentnega protitelesa z enim samim epitopom antigena, kar lahko lepo prikažemo z enačbo 1. V enačbi pomeni K asociacijsko konstanto in predstavlja afiniteto posameznega vezavnega mesta, da z antigenom tvori stabilen kompleks.



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

Enačba 1: Izračun afinitete. $[Ab]$ = koncentracija prostih vezavnih mest, $[Ag]$ = koncentracija prostega antigena, $[Ab][Ag]$ = koncentracija zasedenih mest.

Za izračun afinitete mora biti zadoščenih več pogojev: protitelo mora biti monovalentno in posledično mora imeti eno afiniteto, tako protitelo kot antigen morata biti v raztopini in reakcija mora doseči ravnotežje brez nespecifične vezave na ostale komponente. Ker pa so antigeni in protitelesa v fizioloških pogojih kompleksni in najmanj dvovalentni, izmerjena energija vezave med antigenom in protitelesom predstavlja avidnost protiteles, ki je lahko tudi tisočkrat višja kot afiniteta (25, 28, 29). Avidnost je tako vezavna energija med večvalentnim protitelesom in večvalentnim antigenom (24).

Pomen avidnosti sega tudi na področje vezavnih značilnosti aPL, specifično anti- β_2 -GPI, saj so v multicentrični študiji ugotovili, da je v skupini bolnikov z visoko avidnimi

protitelesi več bolnikov z APS, medtem ko je v skupini bolnikov z nizko avidnimi protitelesi manj bolnikov z APS in več s SLE. Prav tako so potrdili, da je tromboza, predvsem venska, glavni zaplet, ki je povezan s prisotnostjo visoko avidnih anti- β_2 -GPI (29-31).

1.5 Pomen vodikovih in elektrostatskih interakcij za vezavo protiteles proti β_2 -glikoproteinu I na β_2 -glikoprotein I

Žager s sodelavci (32) je dokazala, da vezava anti- β_2 -GPI na β_2 -GPI poteka predvsem preko vodikovih in ionskih interakcij, pri čemer je avidnost vezave sorazmerna številu vodikovih vezi med paratopom in epitopom. Avidnost protiteles pada s padanjem vsebnosti aminokislin v epitope predstavljaljajočih peptidih, ki sodelujejo pri tvorbi vodikove vezi, poveča pa se delež bazičnih in kislih aminokislin, ki z antigenom tvorijo elektrostatske vezi. Aminokislina S, T, Y, N, Q in W imajo veliko hidrofilnih stranskih skupin, ki delujejo kot donorji in akceptorji vodikove vezi, aminokislina K, H, R in D pa veliko nabitih stranskih skupin in sodelujejo v ionskih interakcijah (32).

1.6 Metode za določanje specifične vezave protiteles na tarčni antigen

Za merjenje specifičnih vezav protiteles na antigene obstaja vrsta orodij, vendar so najpogosteje uporabljene encimsko-immunske metode na trdnem nosilcu (ELISA). ELISA omogoča hitro reševanje in kvantifikacijo antigena v vzorcu. Test temelji predvsem na reakciji encima (npr. alkalna fosfataza, peroksidaza), ki je konjugiran s protitelesom, z brezbarvnim substratom, produkt reakcije pa je obarvan. Poznamo veliko različnih ELISA testov, glavni namen pa je določitev protiteles ali antigenov s pripravo umeritvene krivulje z znanimi koncentracijami le-teh:

1.6.1 Izvedbe ELISA

Direktna ELISA

Pri direktni ELISA antigen vežemo na trdni nosilec in inkubiramo. Nevezan antigen speremo in nanesimo z encimom konjugirano protitelo, specifično za antigen. Po inkubaciji speremo prost konjugat in dodamo substrat, ki se po reakciji z encimom obarva.

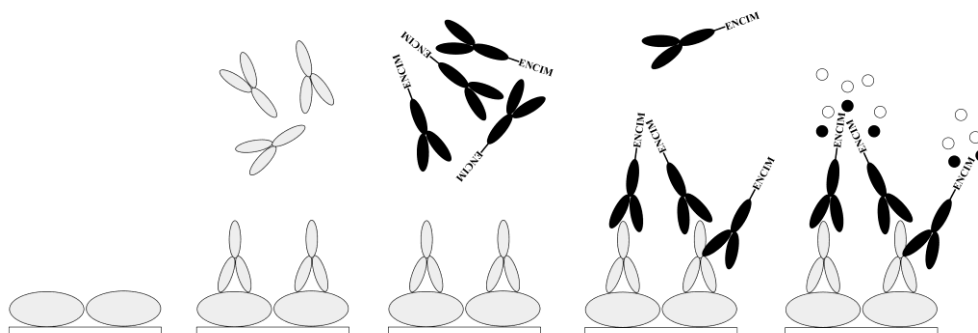
Sendvič ELISA

Sendvič ELISA lahko razdelimo v dve skupini, in sicer v direktno sendvič ELISA in indirektno sendvič ELISA.

Pri direktni sendvič ELISA pasivno vežemo protitelesa na trden nosilec, ki vežejo antigene, dodane v naslednji fazi. Antigeni so raztopljeni v pufru, ki preprečuje nespecifične vezave na nosilec. Po inkubaciji in spiranju je kompleks protitelo-antigen vezan na trdni nosilec. Vezane antigene detektiramo z dodatkom encimsko označenih protiteles. Indirektna sendvič ELISA je zelo podobna direktni, razlikuje se le v dodatku protiteles, ki v tem primeru niso encimsko označena.

Indirektna ELISA

Pri indirektni ELISA (Slika 4) vzorec s primarnim protitelesom nanese v mikrotitrsko vdolbinico, ki smo jo prekrili z antigenom, in pustimo, da poteče reakcija. Nevezana protitelesa speremo in dodamo z encimom konjugirano sekundarno protitelo, ki se veže s primarnim. Po spiranju prostih sekundarnih protiteles dodamo substrat za encim in obarvanemu produktu reakcije spektrofotometrično izmerimo absorbanco (33).



Slika 4: Shema indirektne ELISE.

2 NAMEN DELA

Kljub več-desetletnemu določanju anti- β_2 -GPI je njihova specifična vezava na epitope različnih domen β_2 -GPI še nejasna.

Namen diplomske naloge je določiti povezavo med avidnostjo anti- β_2 -GPI in pozitivnostjo vzorčnih serumov na določen peptid, ki je sestavni del domen β_2 -GPI. Postavili bomo pogoje za izvedbo encimsko-immunske metode za določanje prisotnosti protiteles proti devetim različnim aminokislinskim zaporedjem in preverili tudi, ali aminokislinski podaljški (repi) pri določenih peptidih vplivajo na specifičnost vezave.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

Peptide smo testirali na 217 vzorcih serumov bolnikov iz šestih držav (Slovenija, Češka, Italija, Poljska, Nizozemska in Srbija), pridobljenih v okviru multicentrične študije Evropskega foruma za aPL, in so pripadali bolnikom z diagnosticiranim primarnim APS, APS, ki se pojavlja v povezavi z drugo avtoimunsko boleznijo, največkrat s SLE, ali z drugimi boleznimi brez kliničnih znakov APS.

3.2 Kontrolni vzorci

Humani serumi iz obstoječih bank Laboratorija za imunologijo revmatizma, Klinični oddelek za revmatologijo, SPS interne klinike, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Vse osebe so bile seznanjene in so soglašale z namenom uporabe svojega biološkega materiala.

3.3 Antigeni

Uporabili smo devet peptidov z različnimi aminokislinskimi zaporedji. Tri zaporedja je Žager s sodelavci predhodno pridobila z rešetanjem heptapetidne fagne knjižnice (32), tri zaporedja predstavljajo aminokislinske segmente na površini β_2 -GPI, pridobljene na podlagi mimotopov (32) in tri iz literaturnih virov (34) (Preglednica I). Vsakemu peptidu posebej smo določili optimalno koncentracijsko območje s pomočjo umeritvene krivulje absorbanc v odvisnosti od koncentracije peptida (od 2,5 g/L do 100 g/L) in optimalen čas inkubacije peptida na mikrotitrstki plošči (12-14 ur), kar je podrobneje opisano v poglavju Rezultati.

Peptid 1 z aminokislinskim zaporedjem **QGPAHSKGGGS-NH₂** je bil pridobljen z rešetanjem fagne peptidne knjižnice in v njem GGGS-NH₂ predstavlja dodan aminokislinski rep (32). Optimalna koncentracija za nanos peptida na ploščico je bila **10 mg/L**, čas inkubacije pa **12-14 ur** oz. čez noč pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 2 z aminokislinskim zaporedjem **FNPYWYVGGGS-NH₂** je bil določen z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI in v njem GGGS-NH₂ predstavlja dodan aminokislinski rep (32). Optimalna koncentracija za nanos peptida je bila **20 mg/L**, čas inkubacije pa **12-14 ur** oz. čez noč pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 3 z aminokislinskim zaporedjem **KMDGNHPGGGS-NH₂** je bil določen z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI in v njem GGGS-NH₂ predstavlja dodan aminokislinski rep (32). Optimalna koncentracija za nanos peptida na ploščico je bila **10 mg/L**, čas inkubacije pa **12-14 ur** oz. čez noč pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 4 z aminokislinskim zaporedjem **LKTPRV** je bil pridobljen z rešetanjem heksapeptidne fagne knjižnice in človeškega monoklonskega anti- β_2 -GPI ILA-1 (32). Optimalna koncentracija za nanos peptida je bila **20 mg/L**, čas inkubacije pa **12-14 ur** (čez noč) pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 5 z aminokislinskim zaporedjem **KDKATF** je bil pridobljen z rešetanjem heksapeptidne fagne knjižnice in človeškega monoklonskega anti- β_2 -GPI ILA-3 (34). Optimalna koncentracija za nanos peptida je bila **10 µg/ml**, čas inkubacije pa **čez noč** pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 6 z aminokislinskim zaporedjem **NGPANSK** se nahaja na tri dimenzionalni strukturi β_2 -GPI, njegova aminokislinska sekvenca je najbolj podobna sekvenci peptida 1 (32). Optimalna koncentracija za nanos peptida je bila **10 mg/L**, inkubacija je potekala **čez noč** pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 7 z aminokislinskim zaporedjem **TLRVYK** je bil pridobljen z rešetanjem heksapeptidne fagne peptidne knjižnice in človeškega monoklonskega anti- β_2 -GPI H-3 (34). Optimalna koncentracija za nanos peptida je bila **20 mg/L**, inkubacija je potekala **čez noč** pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 8 z aminokislinskim zaporedjem **KMDGNHP** se nahaja na tri dimenzionalni strukturi β_2 -GPI, njegova aminokislinska sekvenca pa je podobna sekvenci peptida 3 (32). Optimalna koncentracija za nanos peptida 8 je bila **10 mg/L**, inkubacija pa je potekala **12-14 ur** (čez noč) pri **4 °C** (Preglednica I).

Peptid 9 z aminokislinskim zaporedjem **YNPLWFV** se prav tako nahaja na tri dimenzionalni strukturi β_2 -GPI. Njegovo aminokislinsko zaporedje je najbolj podobno

zaporedju peptida 2 (32). Optimalna koncentracija za nanos peptida 9 je bila **10 mg/L**, inkubacija pa je potekala **12-14 ur** (čez noč) pri **4 °C** (Preglednica I).

Preglednica I: Peptidi in njihove lastnosti.

Peptid	Aminokislinska sekvenca	Domena na β 2-GPI	Vir
P1	QGPAHSKGGG-NH ₂	III	Mimotopi - Žager et al. fagna knjižnica, visoko avidna, nizko avidna anti- β 2-GPI (32).
P2	FNPYWYVGGGS-NH ₂	II	
P3	KMDGNHPGGGS-NH ₂	III-IV	
P4	LKTPRV	I-II	Heksapeptidna fagna knjižnica (34).
P5	KDKATF	IV	Heksapeptidna fagna knjižnica (34).
P6	NGPANSK	III	Aminokislinski segmenti na površini β 2-GPI, ki ustrezajo peptidu P1 (32).
P7	TLRVYK	III	Heksapeptidna fagna knjižnica (34).
P8	KMDGNHP	III-IV	Aminokislinski segmenti na površini β 2-GPI, ki ustrezajo peptidu P3 (32).
P9	YNPLWFV	II	Aminokislinski segmenti na površini β 2-GPI, ki ustrezajo peptidu P2 (32).

3.4 Priprava pufrov in raztopin

- PBS pufer (s fosfatom pufrana slanica; pH = 7,4)
 - pH izmerimo s pH metrom in ga po potrebi uravnamo ali z 1 M NaOH ali z 1 M HCl

Sestava	Masa/Volumen
Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Prečiščena H₂O	do 1000 mL

- DEA pufer (dietanolaminski pufer; pH = 9,8)

- pH izmerimo s pH metrom in ga po potrebi uravnamo ali z 1 M NaOH ali z 1 M HCl

Sestava	Masa/Volumen
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
NaN ₃	0,2 g
(CH ₂ OHCH ₂) ₂ NH	102 g
dH ₂ O	500 mL
2M HCl	do pH 9,8 (≈70 mL)
Prečiščena H₂O	do 1000 mL

- 0,5 % raztopina BSA-PBS za spiranje dveh mikrotitrskih plošč

Sestava	Masa (g)
BSA	0,552
PBS	109,848

- 3 % raztopin BSA-PBS za blokado dveh mikrotitrskih plošč

Sestava	Masa (g)
BSA	1,632
PBS	52,768

- Substrat pNPP v DEA pufru (pH = 9,8)
 - pH izmerimo s pH metrom in ga po potrebi uravnamo ali z 1 M NaOH ali z 1 M HCl

Sestavina	Količina
p-NPP tablete (5mg/ml)	2 tableti (2 x 5 mg=10 mg)
DEA pufer (1mg/ml)	10 mL

3.5 Priprava peptidov

Peptid 1

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 1	4 mg
PBS pufer	1 mL
Koncentracija prve redčitve (1)	4 mg/mL
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	100 μ L
PBS pufer	9900 μ L
Končna koncentracija peptida 1	10 mg/L

Peptid 2: zaradi slabe topnosti peptida smo kot topilo uporabili etanol

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 2	4 mg
PBS pufer	1530 μ L
Etanol (96%)	1808 μ l
Koncentracija prve redčitve (1)	1,1983 mg/mL
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	200 μ L
PBS pufer	9800 μ L
Končna koncentracija peptida 2	20 mg/L

Peptid 3

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 3	4 mg
PBS pufer	1 mL
Koncentracija prve redčitve (1)	4 mg/mL
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	100 μ L
PBS pufer	9900 μ L
Končna koncentracija peptida 3	10 mg/L

Peptid 4

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 4 (čistota 95,41%)	10,2 mg x 0,9541 = 9,732 mg
PBS pufer	973,2 µL
Koncentracija prve redčitve (1)	10 g/L
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	200 µL
PBS pufer	9800 µL
Končna koncentracija peptida 4	20 mg/L

Peptid 5

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 5 (čistota 95,39%)	10,4 mg x 0,9539=9,92 mg
PBS pufer	992 µL
Koncentracija prve redčitve (1)	10 g/L
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	100 µL
PBS pufer	9900 µL
Končna koncentracija peptida 5	10 mg/L

Peptid 6

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 6 (čistota 99,28%)	10,0 mg x 0,9928=9,93 mg
PBS pufer	993 µL
Koncentracija prve redčitve (1)	10 g/L
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	100 μ L
PBS pufer	9900 μ L
Končna koncentracija peptida 6	10 mg/L

Peptid 7

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 7 (čistota 96,81%)	10,2 mg x 0,9681=9,87 mg
PBS pufer	987 μ L
Koncentracija prve redčitve (1)	10 g/L
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	200 μ L
PBS pufer	9800 μ L
Končna koncentracija peptida 7	20 mg/L

Peptid 8

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 8 (čistota 99,57 %)	10,0 mg x 0,9957=9,96 mg
PBS pufer	996 μ L
Koncentracija prve redčitve (1)	10 g/L
Koncentracija druge redčitve (2)	1 g/L

- raztopina 2 (za nanos na ELISA ploščo)

Sestavina	Količina
Raztopina druge redčitve (2) (c = 1 mg/mL)	100 μ L
PBS pufer	9900 μ L
Končna koncentracija peptida 8	10 mg/L

Peptid 9: zaradi slabe topnosti peptida smo kot topilo uporabili etanol

- raztopina 1

Sestavina	Količina
Peptid 9 (čistota 97,54%)	10,3 mg x 0,9754=10,05 mg
Etanol (96%)	1005 µL
Koncentracija prve redčitve (1)	10 g/L

- raztopina 2

Sestavina	Količina
Raztopina prve redčitve (1) (c = 10 g/L)	1000 µL
Etanol 96%	3000 µL
PBS pufer	1000 µL
Koncentracija druge redčitve (2)	2,5 g/L

- raztopina 3

Sestavina	Količina
Raztopina 2. redčitve (2) (c = 2,5 mg/mL)	2000 µL
PBS pufer	3000 µL
Končna koncentracija tretje redčitve (3)	1 g/L

- raztopina 4

Sestavina	Količina
Raztopina tretje redčitve (3) (c = 1 g/L)	100 µL
PBS pufer	9900 µL
Končna koncentracija peptida 9	10 mg/L

3.5.1 Reagenti

- natrijev klorid, analitske čistote, NaCl, Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Nemčija
- kalijev klorid, analitske čistote, KCl, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, analitske čistote, Na₂HPO₄X2H₂O, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- kalijev dihidrogen fosfat, analitske čistote, KH₂PO₄, Merck, Darmstadt, Nemčija
- natrijev hidroksid, analitske čistote, NaOH, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- klorovodikova kislina, analitske čistote, HCl, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- magnezijev diklorid heksahidrat, analitske čistote, MgCl₂ x 6H₂O, Merck, Darmstadt, Nemčija

- natrijev azid, ekstra čist, NaN_3 , Merck, Darmstadt, Nemčija
- etanol 96%, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, LEX, Portorož, Slovenija p-nitrofenilfosfat (p-NPP tablete), $\text{C}_6\text{H}_4\text{NNa}_2\text{O}_6\text{P}$, 5 mg tablete, Sigma, St. Louis, ZDA
- dietanolamin, analitske čistote, $(\text{CH}_2\text{OHCH}_2)_2\text{NH}$, Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
- himerna monoklonska protitelesa razreda G, IgG Sapporo Standard, Inova Diagnostic, San Diego, CA, ZDA
- goveji serumski albumin brez esencialnih maščobnih kislin, BSA Cohn Fraction V, Sigma-Aldrich CO., St. Louis, ZDA

3.5.2 Aparature in pripomočki

- spektrofotometrični čitalec mikrotiterskih plošč RainBow Thermo, Tecan Sunrise, Mannedorf, Švica
- pH meter Mettler Toledo SevenEasy, Columbus, Ohio, ZDA
- precizna tehnica Mettler Toledo, tip PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica
- vrtilčno mešalo, Assister, Nemčija
- polistirenske mikrotitrne ploščice Costar High Binding 3590, 96 Well EIA/RIA Plates, Corning, New York, ZDA
- pipete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pipetni nastavki 10 μL , 100 μL , 300 μL , 1000 μL , 5000 μL , Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- droben laboratorijski material (magnetno mešalo, steklovina, epice, sterilni filtri,...)

3.6 Metode dela

Pozitivnost na posamezne peptide (peptid 1-9) smo testirali z indirektnim ELISA testom po nekoliko prirejenem postopku, kot je opisan v literaturi (34). Po predhodni določitvi pogojev ELISA testa (podrobneje opisano v poglavju Rezultati 4.1.) smo v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče Costar High binding nanesti 100 μ L oz. 200 μ L končne raztopine peptida v PBS (pH 7,4) in tako dosegli končno koncentracijo 10 mg/L za peptide 1, 3, 5, 8 in 9 oz. 20 mg/L za peptide 2, 4 in 7. Ploščo smo inkubirali 12-14 ur pri 4°C. Po inkubaciji smo vdolbinice enkrat sprali z 250 μ L PBS na vdolbinico. Uporabljali smo ročni spiralec. Ploščo smo nato dobro otresli in v vsako vdolbinico nanesti 200 μ L 3 % raztopine BSA-PBS, ki smo jo pripravili neposredno pred nanosom. Sledila je enourna inkubacija plošče pri sobni temperaturi. Ploščo smo nato sprali štirikrat s po 250 μ L PBS (pH 7,4) na vdolbinico, jo dobro otresli in v vsako vdolbinico nanesti 100 μ L vzorcev, kontrol in standardov redčenih z 0,5 % raztopino BSA-PBS v razmerju 1:100. Nanesli smo tri slepe vzorce (0,5 % BSA-PBS), sedem standardov, eno kontrolo in 37 vzorčnih serumov v duplikatih. Sledila je dvourna inkubacija plošče pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo pripravili raztopino sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti človeškemu IgG, konjugirana z alkalno fosfatazo) redčenih 1 : 1000 z 0,5 % BSA-PBS. Po štirikratnem spiranju plošče smo v vsako vdolbinico nanesti 100 μ L raztopine sekundarnih protiteles in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi. Po ponovnem štirikratnem spiranju s PBS (pH 7,4) smo v vsako vdolbinico nanesti 100 μ L substrata s koncentracijo 1 g/L (pNPP v DEA pufri, pH 8,9 ki smo ga pripravili pet minut pred nanosom). Po dodatku substrata so se zaradi tvorbe p-nitrofenola raztopine v vdolbinicah obarvale rumeno.

Absorbanco smo merili spektrofotometrično (RainBow Thermo, Tecan Sunrise, Mannedorf, Švica) pri 405 nm in referenčnim filtrom pri 690 nm, dokler kontrola ni dosegla vrednosti 1000 mOD. Iz dobljenih podatkov smo nato s programom Microsoft Excel izračunali absorbance za posamezen vzorec tako, da smo od absorbance vzorca odšteli povprečno absorbanco treh slepih kontrol. Izračunali smo tudi koeficient variacije. Če je ta pri posameznem vzorcu odstopal za več kot 18 %, smo s tem vzorcem ponovili analizo.

3.6.1 Statistične metode

Ko imamo opravka z binominalnimi podatki, uporabimo za statistično analizo 2 x 2 kontingenčne tabele, kjer iščemo razlike med dvema skupinama. Gre za χ^2 test, pri katerem primerjamo opazovane frekvence s pričakovanimi, in se zaradi uporabe približne ocenitve verjetnosti lahko uporablja le, če so pričakovane frekvence večje od 5. V raziskovalnih študijah, posebej v farmacevtski stroki, so pričakovane frekvence velikokrat nižje od 5, zato je bolje uporabiti Fisherjev natančni test, kjer namesto približne ocenitve verjetnosti dobimo natančen izračun verjetnosti opazovanih frekvenc. Če je vsota verjetnosti opazovanih frekvenc manjša od α , lahko zaključimo, da dve opazovani skupini nista neodvisni in med njima obstaja statistično značilna razlika (če je $\alpha = 0,05$, obstaja razlika s 5 % tveganjem). Če pa je vsota večja od α , sprejmemo ničelno hipotezo, ki predpostavlja, da ni dovolj dokazov, da bi lahko sklepali o razlikah med skupinama (35).

V diplomski nalogi smo bolnike, ki so bili pozitivni na posamezen peptid, razdelili na več različnih načinov v dve skupini. Na ta način smo dobili dve neodvisni kategoriji podatkov, ki sta imeli le dva med seboj izključujoča se možna izida. Primer kontingenčne tabele za peptid 7 je predstavljen v Preglednici II.

Preglednica II: Primer kontingenčne tabele za peptid 7.

	Vzorci, negativni na peptid 7	Vzorci, pozitivni na peptid 7	Skupaj
Prisoten APS	119	40	159
APS ni prisoten	41	17	58
Skupaj	160	57	217

4 REZULTATI

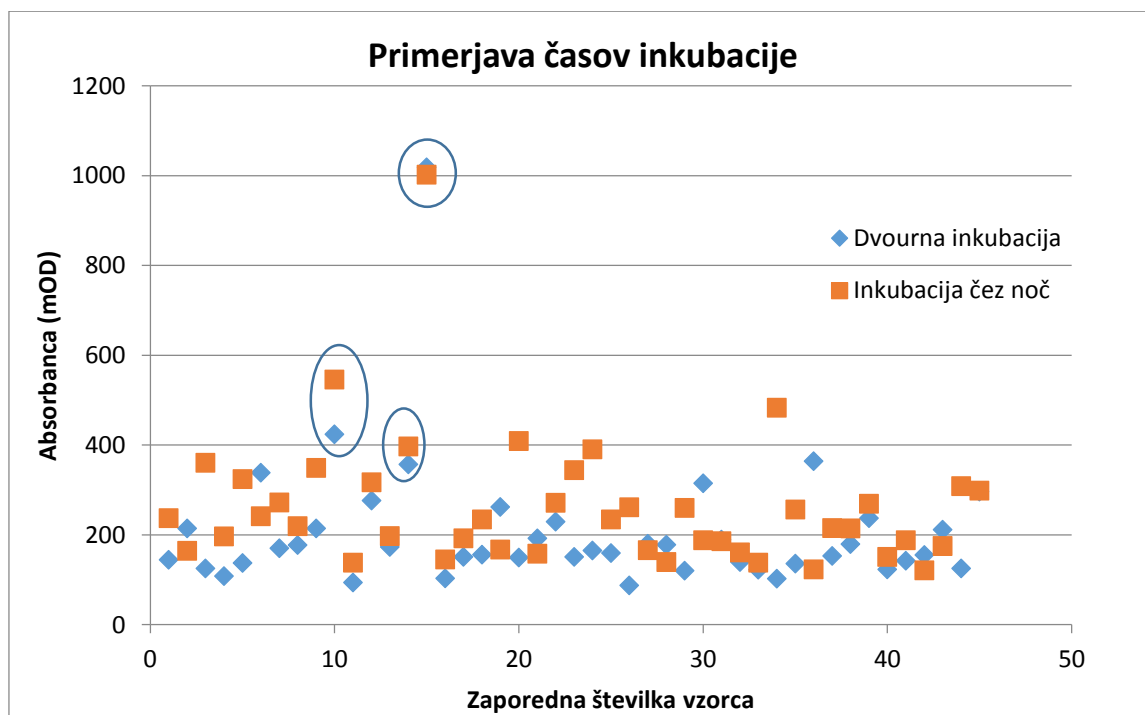
4.1 Določitev pogojev za izvedbo encimsko imunskega testa

Izbira ploščic za ELISA

Pri izvedbi ELISA smo v prvem koraku uporabili analizne ploščice z visoko stopnjo vezave dveh različnih proizvajalcev. Ugotovili smo, da ob uporabi enih in drugih ne prihaja do razlik v rezultatih, zato smo se zaradi lažje dosegljivosti odločili za uporabo ploščic Costar High binding.

Čas inkubacije

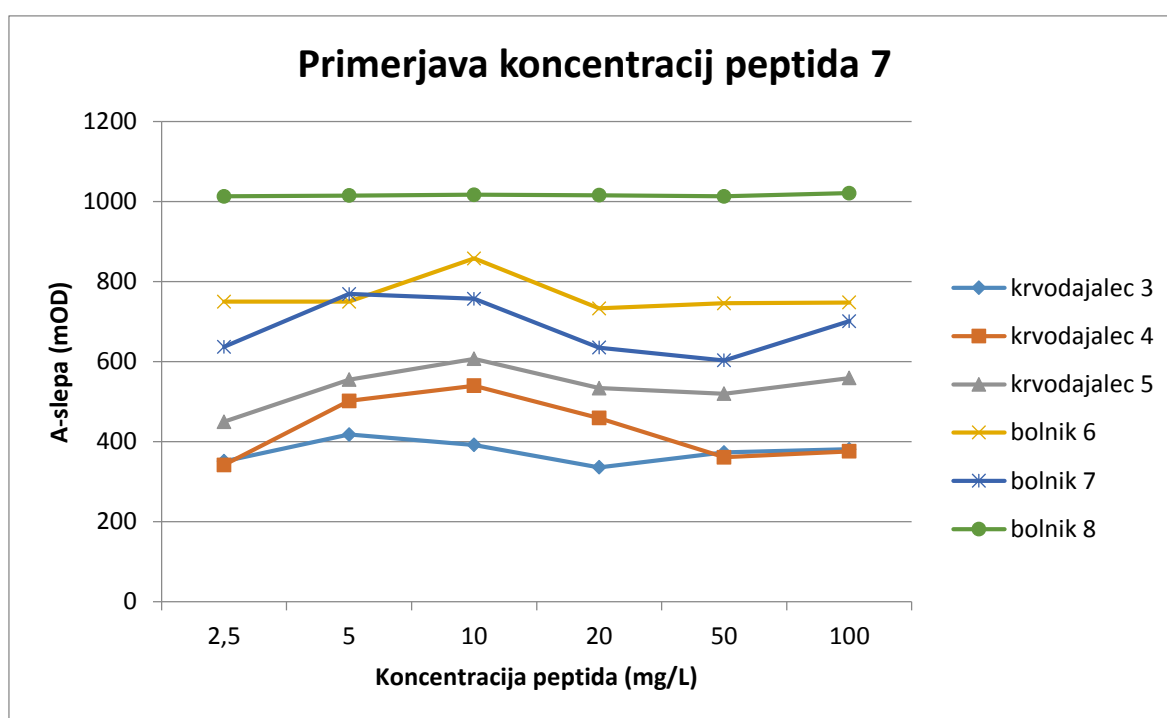
Primerjali smo inkubacijo mikrotitrne plošče po nanosu antigena. Eno ploščo smo inkubirali dve uri pri sobni temperaturi (21 °C), drugo pa čez noč (12-14 ur) pri 4°C. Absorbance slepih raztopin po inkubaciji čez noč so bile bistveno nižje kot tiste po dvourni inkubaciji. Tudi čas vezave protiteles iz vzorcev na antigen je bil po inkubaciji čez noč krajši, predvsem pri pozitivnih kontrolah, kar nam je zagotavljalo možnost ustrezne zaustavitve časa zadnje inkubacije, saj so se pozitivne kontrole bistveno hitreje obarvale rumeno kot ostali vzorci na ploščici (Slika 5). Posledično smo se odločili po nanosu antigena na ploščice le-te inkubirati čez noč pri 4°C.



Slika 5: Primerjava časov inkubacije za peptid 1. Obkrožene so pozitivne kontrole.

Izbira ustrezne koncentracije peptidov

Za vsak peptid posebej smo pred izvedbo ELISA poiskali ustrezno koncentracijo za testiranje. Na ploščico smo nanegli peptid v koncentracijah 2,5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L in 100 mg/L ter določili optimalno koncentracijsko območje s pomočjo umeritvene krivulje absorbanca v odvisnosti od koncentracije peptida, pri kateri je vezava protiteles iz vzorcev dosegla plato. S to koncentracijo smo nato za posamezen peptid izvedli ELISA za vse vzorce (Slika 6).

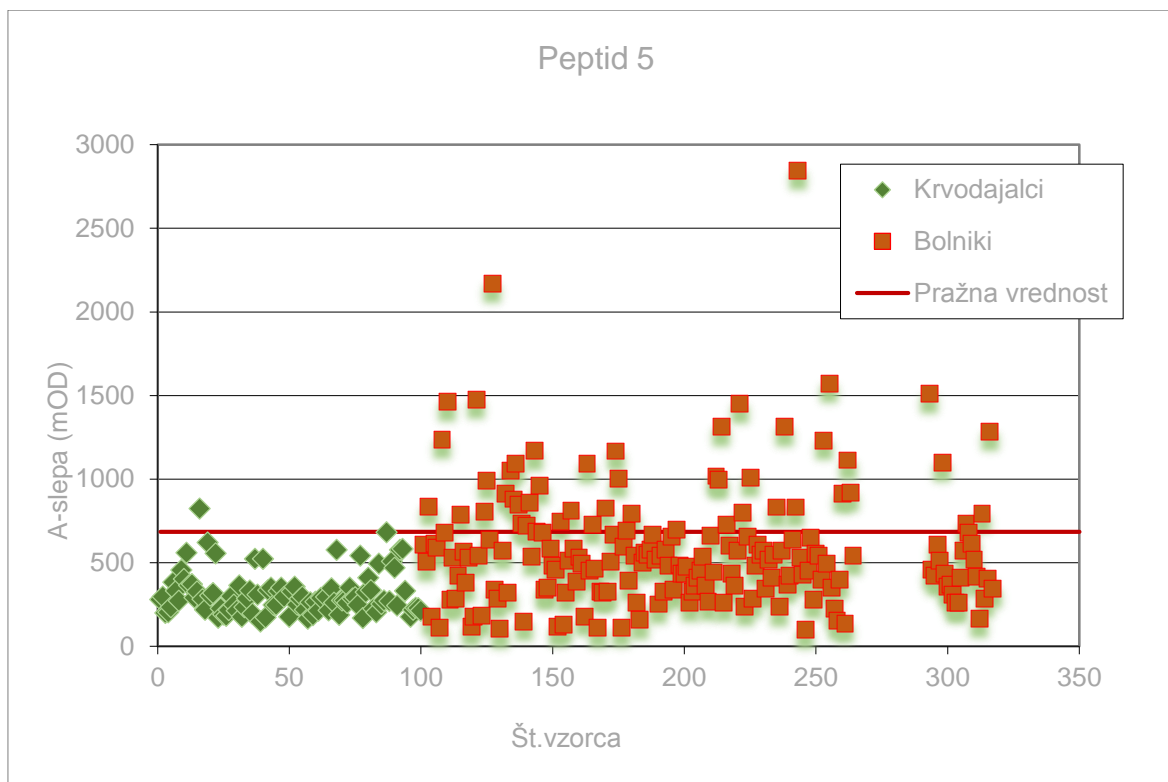


Slika 6: Doseganje platoja pri koncentraciji peptida 7 = 20 mg/L.

Pri peptidu 7 smo plato dosegli pri koncentraciji 20 mg/L. Pri tej koncentraciji se tudi vzorci krvodajalcev lepo ločijo od pozitivnih kontrol, kar nam je omogočalo jasnejšo določitev praznih vrednosti.

4.2 Določanje prazne vrednosti

Za določitev prazne vrednosti smo na vseh devet peptidov testirali 100 zdravih krvodajalcev. ELISA smo ustavili, ko je absorbanca pozitivne kontrole dosegla 1000 mOD, izločili smo pozitivne vzorce krvodajalcev in iz ostalih rezultatov izračunali povprečje. Za mejno vrednost smo uporabili 99.percentil (Slika 7).



Slika 7: Določanje pražne vrednosti za peptid 5 (zeleno) in izmerjene vrednosti vzorcev bolnikov (oranžno).

Po postavitvi pražne vrednosti smo na isti peptid testirali še vseh 217 vzorcev. Vse, ki so po ustavitvi ELISA imeli absorbanco nad pražno vrednostjo, smo označili za pozitivne.

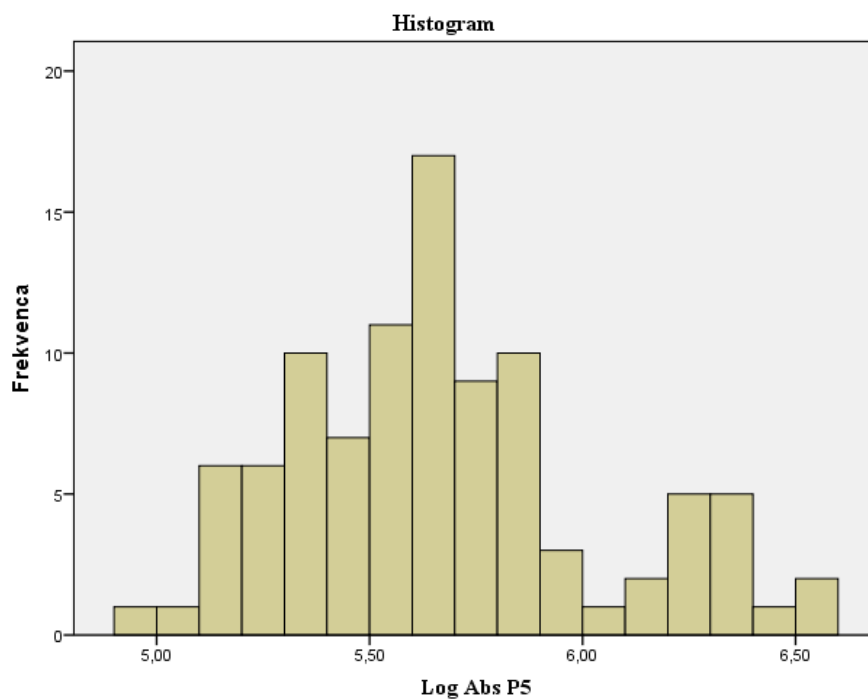
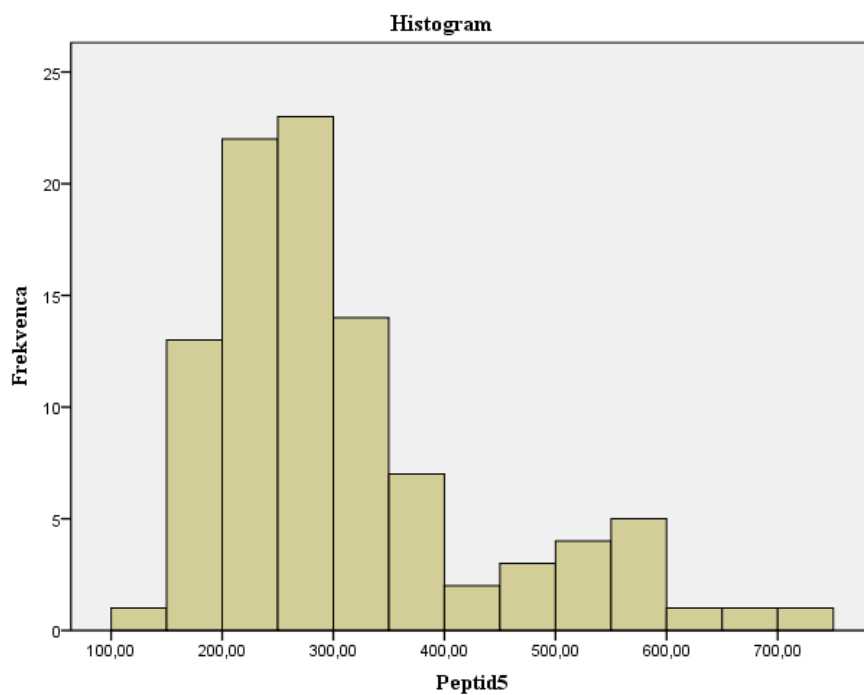
Pražne vrednosti za posamezne peptide so zbrane v Preglednici III.

Preglednica III: Pražne vrednosti za posamezne peptide.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Pražna vrednost	0,598	0,495	0,578	0,994	0,684	0,739	0,840	0,890	0,857

P1-P9; peptid 1-peptid 9.

Za uporabo 99. percentila smo se odločili po izvedbi testa normalne porazdelitve za rezultate 100 krvodajalcev. Zaradi same narave rezultatov smo pridobljene absorbance logaritmirali in šele nato preverili normalnost porazdelitve pri tveganju $\alpha = 0,05$. Pri peptidih 2, 5 in 9 nismo ugotovili normalne porazdelitve niti po logaritmiranju rezultatov, kar je razvidno iz Slike 8, pri peptidu 3 pa so bili rezultati na meji normalne porazdelitve ($p = 0,053$). Za statistično obdelavo smo uporabili Shapiro-Wilk test (Preglednica IV).



Slika 8: Histogram normalne porazdelitve za peptid 5 pred in po logaritmiranju rezultatov.

Preglednica IV: Rezultati testa normalne porazdelitve (pri tveganju $\alpha = 0,05$).

	Shapiro-Wilk	
	Statistika	p vrednosti
Peptid1	0,899	0,000
Peptid2	0,860	0,000
Peptid3	0,877	0,000
Peptid4	0,894	0,000
Peptid5	0,871	0,000
Peptid6	0,909	0,000
Peptid7	0,925	0,000
Peptid8	0,907	0,000
Peptid9	0,903	0,000
Log Abs P1	0,982	0,210
Log Abs P2	0,965	0,010
Log Abs P3	0,974	0,053
Log Abs P4	0,987	0,447
Log Abs P5	0,964	0,009
Log Abs P6	0,985	0,311
Log Abs P7	0,980	0,134
Log Abs P8	0,990	0,651
Log Abs P9	0,968	0,018

Log Abs P1-P9, logaritmirane absorbance vzorcev krvodajalcev za peptide 1 do 9.

4.3 Končne koncentracije peptidov

Končne koncentracije peptidov, ki smo jih uporabili za testiranje vseh vzorcev, so bile 10 mg/L za peptide 1, 3, 5, 6, 8 in 9 ter 20 mg/L za peptide 2, 4 in 7 (Preglednica V).

Preglednica V: Optimalne koncentracije posameznih peptidov za izvedbo ELISA.

Peptid	Sekvenca peptida	Koncentracija peptida za ELISA [mg/L]
1	QGPAHSKGGG-NH ₂	10
2	FNPYWYVGGGS-NH ₂	20
3	KMDGNHPGGGS-NH ₂	10
4	LKTPRV	20
5	KDKATF	10
6	NGPANSK	10
7	TLRVYK	20
8	KMDGNHP	10
9	YNPLWFV	10

4.4 Prisotnost aminokislinskega repa

Peptid 1 z aminokislinama Q in S tvori dve vodikovi vezi, z aminokislinama H in K pa dve ionski vezi. Po aminokislinskem zaporedju je peptid 1 najbolj podoben peptidu 6, ki lahko z aminokislinami N, N in S tvori tri vodikove vezi, in z aminokislino K eno ionsko vez z anti- β_2 -GPI. Peptida se razlikujeta v aminokislinskem repu, ki je prisoten pri peptidu 1. Za podoben primer gre pri peptidih 2 in 9 ter 3 in 8.

Na peptid 2, ki lahko tudi tvori največ vodikovih vezi, je pozitivnih kar 67 % vseh vzorcev. Če ga primerjamo s peptidom 9, ki ima podobno aminokislinsko sekvenco, le da je brez repa, ugotovimo, da je na peptid 9 pozitivnih le 25 % vzorcev.

Pri peptidih 1 in 6 opazimo drugačno obnašanje. Na peptid 1 se je vezalo malo vzorcev (10 %), na peptid 6 pa kar 31 % (Preglednica VI).

Preglednica VI: Lastnosti posameznih peptidov in delež vzorcev, ki se je vezal na posamezen peptid.

Peptid	Aminokislinska sekvenca	Domena na β_2 -GPI	Št. vodikovih vezi	Št. ionskih vezi	Delež pozitivnih vzorcev (n=217) (%)
P1	QGPAHSKGGG-NH ₂	III	3	2	10
P2	FNPYWYVGGGS-NH ₂	II	5	/	67
P3	KMDGNHPGGGS-NH ₂	III-IV	2	3	34
P4	LKTPRV	I-II	1	2	10
P5	KDKATF	IV	1	3	29
P6	NGPANSK	III	3	1	31
P7	TLRVYK	III	2	2	26
P8	KMDGNHP	III-IV	1	3	23
P9	YNPLWFV	II	3	/	25

P1-P9; peptid 1-peptid 9.

Vpliv repa za peptida 3 in 8 smo preverili z izvedbo Chi-kvadrat testa in dobili naslednje rezultate:

Preglednica VII: Rezultati Chi-kvadrat testa za ugotovitev vpliva aminokislinskega podaljška na vezavo vzorcev na peptida 3 in 8.

Št. vzorcev		Peptid 3		Skupaj
		<i>Neg.</i>	<i>Poz.</i>	
Peptid 8	<i>Neg.</i>	129	38	167
	<i>Poz.</i>	11	37	48
Skupaj		140	75	215

$p = 0,000$, iz česar lahko zaključimo, da aminokislinski rep statistično značilno vpliva na število pozitivnih rezultatov (Preglednica VII).

4.5 Izkazovanje pozitivnosti na več peptidov hkrati

Nekateri vzorci so imeli populacijo protiteles, ki so imunoreaktivna proti več domenam β_2 -GPI hkrati. Največ vzorcev se je vezalo na peptid 2 (146/217), od teh je bilo hkrati največ vzorcev pozitivnih na peptid 3 (45 %). Največ vzorcev, ki so se vezali na peptid 1, je bilo hkrati pozitivnih na peptid 2 in peptid 3 (oba 86 %), od tistih, ki so se vezali na peptid 4, pa je bilo hkrati največ pozitivnih na peptida 5 in 6 (oba 95 %). Od vzorcev, ki so se vezali na peptid 5, je bilo hkrati največ pozitivnih na peptid 6 (81 %), tisti, ki so se vezali na peptid 6, pa so bili v največjem deležu hkrati imunoreaktivni na peptid 9 (72 %). Vzorci, ki so bili imunoreaktivni na peptid 7, so se hkrati v največjem deležu vezali na peptid 8 (74 %) (Preglednica VIII). Na vse peptide je bilo hkrati pozitivnih le sedem vzorcev (3 %), od tega štirje, katerih protitelesa izkazujejo nizko avidnost proti β_2 -GPI, in trije, katerih protitelesa izkazujejo heterogeno avidnost proti β_2 -GPI.

Izključno na peptide 3, 4, 5, 6 in 9 se ni vezal noben vzorec, izključno na peptid 2 pa se je vezalo kar 55 vzorcev (25 %), katerih protitelesa so v največji meri izkazovala heterogeno avidnost proti β_2 -GPI (45 %). Izključno na peptid 1 in na peptid 8 se je vezal po en vzorec hkrati, protitelesa, ki jih je vseboval, pa so izkazovala visoko avidnost proti β_2 -GPI (Preglednica IX).

Preglednica VIII: Izkazovanje pozitivnosti na dva peptida hkrati. Vrednosti v sivih poljih predstavljajo število vzorcev, vrednosti v belih (modre številke) pa delež vzorcev, ki so reaktivni proti dvema peptidoma hkrati. Npr.: Na peptid 3 se je vezalo 74 vzorcev, kar predstavlja 100 % delež. Od 74 vzorcev se jih je 19 vezalo hkrati še na peptid 4, kar predstavlja 26 % delež vseh vzorcev, ki so bili reaktivni na peptid 3.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
P1	100% 21	86	86	38	76	67	52	62	71
P2	18	100% 146	45	15	39	40	32	28	30
P3	18	66	100% 74	26	70	61	57	50	53
P4	8	22	19	100% 22	95	95	82	76	86
P5	16	57	52	21	100% 63	81	67	59	62
P6	14	59	45	21	51	100% 67	63	60	72
P7	11	47	42	18	42	42	100% 57	74	72
P8	13	41	37	16	37	40	42	100% 50	82
P9	15	44	39	19	39	48	41	41	100% 55

P1-P9; peptid 1-peptid 9.

Preglednica IX: Prikaz števila vzorcev, katerih protitelesa so se vezala samo na ustrezen peptid, in avidnost teh protiteles.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Št. vzorcev, katerih protitelesa so se vezala samo na ustrezen peptid	1	55	0	0	0	0	1	1	0
Št. vzorcev z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI	1	14	/	/	/	/	/	1	/
Št. vzorcev s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI	/	25	/	/	/	/	1	/	/
Št. vzorcev z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI	/	16	/	/	/	/	/	/	/
Skupaj	1	55	0	0	0	0	1	1	0

P1-P9; peptid 1-peptid 9.

4.6 Avidnost protiteles proti β_2 -glikoproteinu I in pozitivnost vzorčnih serumov na določen peptid

Na skoraj vse peptide je reaktivnih največ vzorcev s protitelesi, ki izkazujejo heterogeno avidnost proti β_2 -GPI. Največ takih vzorcev se je vezalo na peptid 4 (55 %). Izjema je peptid 1, na katerega so se v enakem deležu vezali vzorci z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI in s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI (38%). Če upoštevamo, da so med heterogeno avidnimi protitelesi zajeta tako visoko kot tudi nizko avidna protitelesa, vidimo, da so se na peptid 4 in na peptid 9 v večjem deležu vezali vzorci z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI (32 % in 27 %, zaporedoma) (Preglednica X).

Preglednica X: Delež vezave vzorcev na posamezen peptid in avidnost anti- β_2 -GPI.

	ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV	Delež poz.(%) glede na skupno število vzorcev (n=217)	Vzorci z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI	Vzorci s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI	Vzorci z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI
<i>PEPTID1</i>	21	10	8 (38 %)	8 (38 %)	5 (24 %)
<i>PEPTID2</i>	146	67	39 (27 %)	71 (49 %)	36 (25 %)
<i>PEPTID3</i>	74	34	22 (30 %)	35 (47 %)	17 (23 %)
<i>PEPTID4</i>	22	10	3 (14 %)	12 (55 %)	7 (32 %)
<i>PEPTID5</i>	63	29	20 (32 %)	30 (48 %)	13 (21 %)
<i>PEPTID6</i>	67	31	19 (28 %)	33 (49 %)	15 (22 %)
<i>PEPTID7</i>	57	26	14 (25 %)	30 (53 %)	13 (23 %)
<i>PEPTID8</i>	50	23	12 (24 %)	25 (50 %)	13 (26 %)
<i>PEPTID9</i>	55	25	13 (24 %)	27 (49 %)	15 (27 %)

Statistična obdelava podatkov

Po statistični obdelavi podatkov s Fischerjevim natančnim testom smo ugotovili, da se na peptid 7 in peptid 8 statistično značilno vežejo visoko avidna anti- β_2 -GPI (Preglednica XI).

Preglednica XI: Rezultati Fischerjevega natančnega testa za signifikantnost vezave različno avidnih protiteles proti β_2 -GPI posameznih vzorcev na ustrezne peptide. S krepkim so označeni statistično pomembni rezultati (pri tveganju $\alpha = 0,05$).

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Visoko avidna anti-β_2-GPI	0,272	1,000	1,000	0,343	0,265	0,696	0,013	0,041	0,353
Heterogeno avidna anti-β_2-GPI	0,430	0,814	0,502	1,000	1,000	0,265	0,252	0,215	0,095
Nizko avidna anti-β_2-GPI	1,000	0,171	0,753	1,000	1,000	0,344	1,000	1,000	0,344

P1-P9; peptid 1-peptid 9.

4.7 Povezava med pozitivnostjo proti posameznim peptidom in avidnostjo protiteles proti β_2 -glikoproteinu I ter kliničnimi znaki pri bolnikih z APS

Pri vseh peptidih je največ bolnikov imelo diagnosticirano trombozo, najpogosteje vensko trombozo. Izjema je peptid 1, na katerega so se v najvišjem deležu pozitivno odzvali bolniki s prisotno arterijsko trombozo (38%). Ob primerjavi peptida 1 in 6, 2 in 9 ter 3 in 8 smo ugotovili, da je pojav arterijske in venske tromboze primerljiv, vpliva repa pa ni opaziti.

Bolniki s prisotnimi heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI so imeli v največ primerih diagnosticirano vensko trombozo. Tudi tukaj je bil izjema peptid 1, pri katerem je delež bolnikov z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI enak deležu bolnikov s heterogeno avidnimi protitelesi (38 %) in so nanj v največjem deležu bili pozitivni bolniki z arterijsko trombozo (Preglednica XII).

Preglednica XII: Pregled avidnosti anti- β_2 -GPI, manifestacije bolezni in pozitivnosti vzorcev na posamezne peptide.

	Št. pozitivnih vzorcev	Št. in delež (%) vzorcev z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI	Št. in delež (%) vzorcev s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI	Št. in delež (%) vzorcev z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI	Število in delež (%) bolnikov z AT	Število in delež (%) bolnikov z VT	Število in delež (%) bolnikov z μ T	Število in delež (%) bolnikov s T
PEPTID1	21	8 (38 %)	8 (38 %)	5 (24 %)	8 (38 %)	6 (29 %)	2 (10 %)	13 (62 %)
PEPTID2	146	39 (27 %)	71 (49 %)	36 (25 %)	42 (29 %)	56 (38 %)	12 (8 %)	93 (64 %)
PEPTID3	74	22 (30 %)	35 (47 %)	17 (23 %)	17 (23 %)	25 (34 %)	3 (4 %)	41 (55 %)
PEPTID4	22	3 (14 %)	12 (55 %)	7 (32 %)	5 (23 %)	6 (27 %)	2 (9 %)	13 (59 %)
PEPTID5	63	20 (32 %)	30 (48 %)	13 (21 %)	14 (22 %)	20 (32 %)	4 (6 %)	34 (54 %)
PEPTID6	67	19 (28 %)	33 (49 %)	15 (22 %)	16 (21 %)	20 (30 %)	4 (6 %)	37 (55 %)
PEPTID7	57	14 (25 %)	30 (53 %)	13 (23 %)	15 (26 %)	19 (33 %)	4 (7 %)	32 (56 %)
PEPTID8	50	12 (24 %)	25 (50 %)	13 (26 %)	13 (26 %)	20 (40 %)	3 (6 %)	28 (56 %)
PEPTID9	55	13 (24 %)	27 (49 %)	15 (27 %)	17 (31 %)	18 (33 %)	2 (4 %)	31 (58 %)

AT; arterijska tromboza. VT; venska tromboza. μ T; mikrožilna tromboza. T; tromboza.

Statistična obdelava podatkov

Ko smo rezultate tudi statistično obdelali, smo ugotovili, da so statistično značilni klinični znaki le tromboze pri vezavi visoko avidnih anti- β_2 -GPI na peptide 5, 7 in 8 (Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Rezultati statistične analize podatkov s Fischerjevim natančnim testom. S krepkim so označeni statistično značilno pomembni rezultati (pri tveganju $\alpha = 0,05$).

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
AT	avid V	0,392	1,000	0,232	1,000	0,395	1,000	0,492	0,269	1,000
	avid H	0,694	0,632	1,000	1,000	0,233	0,488	1,000	1,000	0,461
	avid N	1,000	0,725	0,343	1,000	0,739	0,527	1,000	0,739	0,527
VT	avid V	0,127	0,472	1,000	1,000	0,295	0,486	0,133	0,347	0,220
	avid H	0,708	0,501	0,136	0,358	0,268	0,277	0,825	0,638	1,000
	avid N	0,309	0,703	0,492	0,659	0,464	0,288	1,000	0,713	0,725
μT	avid V	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	avid H	0,287	0,320	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,572
	avid N	0,571	0,175	1,000	0,276	0,377	0,664	0,377	1,000	1,000
T	avid V	0,200	1,000	0,260	1,000	0,042	0,129	0,045	0,013	0,163
	avid H	0,471	0,826	0,201	0,535	0,191	0,829	1,000	0,814	0,493
	avid N	1,000	0,165	0,761	0,682	1,000	0,355	1,000	1,000	0,355

Avid V, H, N; visoko, heterogeno in nizko avidna anti- β_2 -GPI. AT; arterijska tromboza. VT; venska tromboza. μ T; mikrožilna tromboza. T; tromboza. P1-P9; peptid 1-peptid 9.

Delež bolnic z obstetričnimi zapleti je 33 %, od tega jih je 42 % imelo prisoten APS.

Deleži obstetričnih zapletov so pri posameznih peptidih primerljivi in se gibljejo med 27 % in 38 %, z izjemo peptida 4, kjer je delež bolnic pozitivnih na ta peptid in s prisotnimi obstetričnimi zapleti nižji, le 17 %. Največji delež protiteles bolnic z obstetričnimi zapleti se je vezalo na peptid 1 (38 %) (Preglednica XIV).

Preglednica XIV: Delež pozitivnih bolnic s prisotnimi obstetričnimi zapleti.

	Št. pozitivnih bolnic	Št. obstetričnih zapletov pri pozitivnih bolnicah	Delež obstetričnih zapletov (%)
PEPTID1	16	6	38
PEPTID2	113	36	32
PEPTID3	62	18	29
PEPTID4	18	3	17
PEPTID5	52	17	33
PEPTID6	56	19	34
PEPTID7	48	13	27
PEPTID8	39	12	31
PEPTID9	44	14	32

Statistična obdelava podatkov

Po statistični obdelavi podatkov s Fischerjevim testom smo ugotovili, da povezava med vezavo anti- β_2 -GPI na posamezen peptid in pojavom obstetričnih zapletov pri bolnicah ni statistično značilna (Preglednica XV).

Preglednica XV: Rezultati statistične analize podatkov s Fischerjevim natančnim testom. Analizirali smo obstetrične manifestacije pri bolnicah v povezavi z avidnostjo protiteles proti β_2 -GPI.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Visoko avidna anti-β_2-GPI	1,000	1,000	1,000	0,467	1,000	1,000	0,061	0,689	1,000
Heterogeno avidna anti-β_2-GPI	0,359	0,403	0,798	1,000	0,283	0,113	0,592	0,772	0,278
Nizko avidna anti-β_2-GPI	0,556	0,424	0,064	0,308	0,228	0,279	1,000	1,000	1,000

Avid V, H, N; visoko, heterogeno in nizko avidna anti- β_2 -GPI. P1-P9; peptid 1-peptid 9.

4.8 Pojav antifosfolipidnega sindroma in drugih avtoimunskih bolezni s prisotnostjo protiteles proti β_2 -glikoproteinu I, vendar brez prisotnih kliničnih znakov antifosfolipidnega sindroma

Vseh bolnikov z APS je bilo 159, kar predstavlja 73 % delež vseh bolnikov. Največji delež vzorcev bolnikov z APS se je vezal na peptid 2 (68 %), najmanjši pa na peptid 4 (9 %), kar je le en odstotek razlike s peptidom 1 (10 %). Če posebej pogledamo delež pozitivne vezave na posamezen peptid glede na celotno število vzorcev bolnikov, ki so bili pozitivni na ta posamezen peptid, vidimo, da so deleži med sabo podobni in se gibljejo od 68 do 76 %. Pri bolnikih, ki so imeli prisotna anti- β_2 -GPI, vendar niso imeli prisotnih kliničnih znakov APS (skupina brez APS), smo ugotovili, da je največji delež primerov bil prav tako pozitiven na peptid 2 (66 %), najmanjši pa na peptid 1 (9 %). Tudi pri tej skupini so deleži pozitivnih vzorcev glede na število bolnikov, ki so bili pozitivni na posamezen peptid, med sabo primerljivi in se gibljejo med 24 in 32 % (Preglednica XVI).

Preglednica XVI: Prikaz frekvence APS med bolniki, imunoreaktivnimi na posamezen peptid.

	<i>Št. pozitivnih vzorcev na posamezen peptid</i>	<i>Št. bolnikov z APS</i>	<i>Delež (%) glede na št. vseh bolnikov z APS (N=159)</i>	<i>Delež (%) glede na št. bolnikov, ki so bili imunoreaktivni na posamezen peptid</i>	<i>Št. bolnikov brez APS</i>	<i>Delež (%) glede na št. vseh bolnikov brez APS (N=58)</i>	<i>Delež (%) glede na št. bolnikov, ki so bili imunoreaktivni na posamezen peptid</i>
<i>PEPTID1</i>	21	16	10	76	5	9	24
<i>PEPTID2</i>	146	108	68	74	38	66	26
<i>PEPTID3</i>	74	51	32	69	23	40	31
<i>PEPTID4</i>	22	15	9	68	7	12	32
<i>PEPTID5</i>	63	44	28	70	19	33	30
<i>PEPTID6</i>	67	49	31	73	18	31	27
<i>PEPTID7</i>	57	40	25	70	17	29	30
<i>PEPTID8</i>	50	36	23	72	14	24	28
<i>PEPTID9</i>	55	40	25	73	15	26	27

Statistična obdelava podatkov

Statistična obdelava podatkov nam je pokazala, da je samo vezava visoko avidnih anti- β_2 -GPI na peptid 7 statistično značilna za pojav APS (Preglednica XVII).

Preglednica XVII: Rezultati statistične analize podatkov s Fischerjevim natančnim testom. Analizirali smo povezavo med avidnostjo anti- β_2 -GPI, vezavo na posamezne peptide in prisotnostjo APS.

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
APS	avid V	0,242	1,000	1,000	0,226	0,672	1,000	0,029	0,117	0,609
	avid H	0,675	0,436	1,000	1,000	1,000	0,204	0,187	0,592	0,104
	avid N	1,000	0,455	0,749	1,000	1,000	0,519	1,000	1,000	0,519

Avid V, H, N; visoko, heterogeno in nizko avidna anti- β_2 -GPI. P1-P9; peptid 1-peptid 9.

Skupino bolnikov z APS smo podrobneje razdelili na tiste s primarnim APS in tiste, ki so imeli poleg APS prisotno še drugo bolezen. Ugotovili smo, da je bilo največ testiranih bolnikov diagnosticiranih s primarnim APS (40 %), 33 % bolnikov pa je imelo prisoten APS hkrati s še eno boleznijo. Primarni APS je prevladoval pri peptidih 1, 2, 5 in 6, APS z drugo pridruženo boleznijo pa pri peptidih 4, 7, 8 in 9. Pri peptidu 3 sta bila primarni APS in APS s prisotno še eno boleznijo diagnosticirana v enakem deležu (32 %) (Preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: Pojav primarnega APS in APS, ki se pojavlja v povezavi z drugo boleznijo, pri vseh testiranih bolnikih.

	Št. bolnikov s primarnim APS, ki so pozitivni na posamezen peptid (N=87)	Delež (%) glede na št. vseh bolnikov s primarnim APS	Št. bolnikov z APS, ki se pojavlja v povezavi z drugo boleznijo, ki so pozitivni na posamezen peptid (N=72)	Delež (%) glede na št. vseh bolnikov z APS, ki se pojavlja v povezavi z drugo boleznijo
P1	12	14	4	6
P2	65	75	43	60
P3	28	32	23	32
P4	7	8	8	11
P5	28	32	16	22
P6	26	30	23	32
P7	16	18	24	33
P8	14	16	22	31
P9	17	20	23	32

P1-P9; peptid 1-peptid 9.

Skupino vzorcev bolnikov z APS smo razdelili tudi glede na klinične znake. Od vzorcev, pozitivnih na peptid 2 (67 %), je največ imelo prisotna heterogeno avidna anti- β_2 -GPI (45 %) in večini se je bolezen manifestirala v obliki venske tromboze (51 %). Pri večini bolnikov z APS je prevladovala venska tromboza, razliko smo opazili le pri peptidu 1, na

katerega se je vezal največji delež vzorcev bolnikov s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI (44 %), bolezen pa se je večini manifestirala v obliki arterijske tromboze (50%) (Preglednica XIX).

Preglednica XIX: Prikaz avidnosti anti- β_2 -GPI pri bolnikih z APS.

	Št. in delež (%) vzorcev z APS (n=159), ki so se vezali na ustrezen peptid	Delež (%) vzorcev z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI	Delež (%) vzorcev s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI	Delež (%) vzorcev z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI	Delež (%) bolnikov z AT	Delež (%) bolnikov z VT	Delež (%) bolnikov z μ T	Delež (%) bolnikov s T
P1	16 (10)	38	44	19	50	38	13	81
P2	108 (68)	31	45	23	39	51	11	85
P3	51 (32)	37	43	20	33	49	6	80
P4	15 (9)	13	53	34	33	40	13	87
P5	44 (28)	36	45	19	32	45	9	77
P6	49 (31)	33	51	16	33	41	8	76
P7	40 (25)	23	58	19	38	48	10	80
P8	36 (23)	22	56	22	36	56	8	78
P9	40 (25)	25	55	20	43	45	5	80

P1-P9; peptid 1-peptid 9. AT; arterijska tromboza. VT; venska tromboza. μ T; mikrožilna tromboza. T; tromboza.

Pri 114 bolnikih od 217, ki so bili vključeni v študijo, je bila postavljena diagnoza SLE. Od teh je bilo največ vzorcev bolnikov pozitivnih na peptid 2 (59 %) in so imeli v največjem deležu prisotna heterogeno avidna anti- β_2 -GPI (48 %). Od kliničnih znakov je prevladovala venska tromboza (31 %). Najmanjši delež bolnikov s SLE se je vezal na peptid 1 (8 %), od teh je največji delež vzorcev imel prisotna heterogeno avidna anti- β_2 -GPI. Tukaj je bil delež bolnikov z arterijsko trombozo enak deležu tistih z vensko (22 %).

Malenkost več vzorcev (11 %) se je vezalo na peptid 4, od teh je kar 54 % imelo prisotna heterogeno avidna anti- β_2 -GPI. Arterijska, venska in mikrožilna tromboza so se pri peptidu 4 pojavile v enakem deležu (15 %) (Preglednica XX).

Preglednica XX: Prikaz avidnosti anti- β_2 -GPI in kliničnih znakov pri bolnikih s SLE.

	Št. in delež (%) bolnikov s SLE (n=114)	Delež (%) vzorcev z visoko avidnimi anti- β_2 -GPI	Delež (%) vzorcev s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI	Delež (%) vzorcev z nizko avidnimi anti- β_2 -GPI	Delež (%) bolnikov z AT	Delež (%) bolnikov z VT	Delež (%) bolnikov z μ T	Delež (%) bolnikov s T
P1	9 (8)	22	44	33	22	22	11	44
P2	67 (59)	16	48	36	18	31	10	48
P3	39 (34)	18	49	33	18	21	5	38
P4	13 (11)	8	54	38	15	15	15	46
P5	30 (26)	23	50	27	7	20	7	33
P6	35 (31)	20	51	29	11	26	6	43
P7	36 (32)	19	53	28	17	31	6	44
P8	35 (31)	20	49	31	20	34	3	46
P9	33 (29)	12	52	36	27	33	6	54

P1-P9; peptid 1-peptid 9. AT; arterijska tromboza. VT; venska tromboza. μ T; mikrožilna tromboza. T; tromboza.

5 RAZPRAVA

APS je avtoimunska bolezen, za klasifikacijo katere morajo biti pri bolniku prisotni vsaj en klinični znak in vsaj en laboratorijski kriterij. Pod klinične znake uvrščamo prisotnost trombotičnih (venske tromboze, arterijske tromboze ali mikrožilne tromboze) in/ali nosečniških zapletov, pod laboratorijske kriterije pa sodi prisotnost LA v plazmi, srednje visok ali visok titer aCL izotipa IgG in/ali IgM in/ali prisotnost anti- β_2 -GPI izotipa IgG in/ali IgM v serumu ali plazmi. Navedene laboratorijske preiskave morajo biti pozitivne na najmanj dveh testiranjih, ki sta izvedeni vsaj 12 tednov narazen (34, 36). Od odkritja, da je β_2 -GPI eden izmed glavnih antigenov za aCL protitelesa, je veliko raziskovalnih skupin raziskovalo njihovo epitopsko specifičnost, saj nekateri bolniki s prisotnimi protitelesi nimajo kliničnih znakov bolezni. Pomembnost določanja prisotnosti anti- β_2 -GPI za potrditev diagnoze APS kaže na pomembnost visoke specifičnosti testov za njihovo zaznavo. V praksi se namreč velikokrat zgodi, da so in-vitro aPL testi lažno pozitivni prav zaradi premajhne specifičnosti testov, še posebej aCL ELISA. aPL lahko zaznamo tako pri avtoimunskih boleznih kot tudi pri bolnikih z infekcijskimi in malignimi boleznimi, njihova heterogenost v delovanju in specifičnosti pa predstavlja velik problem pri laboratorijski diagnostiki. Prav tako predstavlja diagnostični problem anti- β_2 -GPI ELISA, saj kljub številnim poizkusom še ni standardizirana. Uporabljajo se mikrotitrne plošče in antigeni različnih proizvajalcev, kar povzroča neskladnost rezultatov (38, 39).

Mehanizmi, ki so odgovorni za nastanek aPL še niso popolnoma raziskani, nekaj raziskovalnih skupin pa ga povezuje z infekcijami. Tako so npr. peptid T L R V Y K, ki je prisoten v antigenih bakterij in katerega zaporedje je podobno zaporedju na III domeni β_2 -GPI, prepoznala anti- β_2 -GPI v miših, odgovoren pa naj bi bil tudi za nastanek aPL, vključno z anti- β_2 -GPI (40). Ista raziskovalna skupina je ugotovila, da ima zaporedje 15 aminokislin iz *citomegalovirusa*, ki je podobno zaporedju peptida G D K V na domeni V β_2 -GPI, trombogen učinek, inducira aktivacijo endotelijskih celic in splav v nosečnosti. Podoben učinek naj bi prav tako imeli tudi drugi virusi, med njimi virus *Varicella Zoster*, *HIV*, *hepatitis C* in *Epstein Barr* (40, 41).

Žager U. je v okviru svoje doktorske disertacije s pomočjo bakteriofagne peptidne knjižnice identificirala tri peptide, ki ustrezajo prvim trem peptidom v našem raziskovalnem delu. Ker je želela nadaljevati raziskavo z afinitetno kromatografijo, je

vsem trem peptidom dodala aminokislinski podaljšek GGGS-NH₂, ki bi omogočal vezavo na kolono (32). V prvem delu našega raziskovalnega dela smo želeli pogledati, če ima ta aminokislinski podaljšek vpliv na vezavo protiteles iz vzorcev na peptide, kar smo izvedli s primerjavo peptidov z aminokislinskimi podaljški s peptidi, ki so imeli podobno aminokislinsko zaporedje, vendar so bili brez podaljška. Peptid 1 smo tako primerjali s peptidom 6, peptid 2 s peptidom 9 in peptid 3 s peptidom 8. Iz rezultatov smo ugotovili, da prisotnost aminokislinskega repa povzroči vezavo protiteles iz vzorcev na β_2 -GPI v več primerih. Na peptid z največ vodikovimi vezmi, v našem primeru je bil to peptid 2, ki lahko z anti- β_2 -GPI tvori pet vodikovih vezi, je bilo pozitivnih kar 67 odstotkov vseh vzorcev. Ob primerjavi s peptidom 9, ki lahko z anti- β_2 -GPI tvori samo tri vodikove vezi, smo ugotovili, da je na peptid 9 pozitivnih le 22 odstotkov vzorcev. Najboljši način za ugotovitev vpliva aminokislinskega repa je zagotovo primerjava peptida 3 s peptidom 8, saj je njuno aminokislinsko zaporedje enako, razlikujeta se le v prisotnosti podaljška. Prav tako lahko z anti- β_2 -GPI tvorita enako število ionskih vezi, peptid 3 pa zaradi prisotnosti podaljška lahko tvori z anti- β_2 -GPI eno vodikovo vez več. Delež pozitivnih vzorcev je bil pri peptidu 3 kar za 11 odstotkov višji od deleža pozitivnih vzorcev pri peptidu 8. Ko smo primerjali peptid 1 s peptidom 6, smo ugotovili, da se je na peptid 1 vezalo precej manj vzorcev kot na peptid 6, kljub istemu številu vodikovih vezi, ki jih lahko tvorita. Do razlike v primerjavi s prejšnjima skupinama peptidov bi lahko prišlo zaradi drugačnega razmerja med številom vodikovih in ionskih vezi. Peptid 1 lahko tvori z anti- β_2 -GPI eno ionsko vez več kot peptid 6, ki ima torej razmerje med številom vezi v prid vodikovim vezem.

Iskali smo tudi statistične povezave med prisotnostjo aminokislinskega repa in številom pozitivnih vzorcev. Obravnavali smo le peptida 3 in 8, ker imata isto aminokislinsko sekvenco, le da je peptid 8 brez aminokislinskega repa, in s tem zagotovili relevantnost testa. Ob izvedbi Chi-kvadrat testa smo ugotovili, da prisotnost repa statistično značilno vpliva na število pozitivnih vzorcev.

Zaradi epitopske raznolikosti β_2 -GPI smo preverjali tudi pozitivnost serumskih vzorcev na dva peptida hkrati. Ugotovili smo, da se izmed vseh vzorcev nobeden ni izključno vezal na peptide 3, 4, 5, 6 in 9. Samo na peptid 2 se je vezalo kar 55 vzorcev (25 %), katerih protitelesa so v največji meri izkazovala heterogeno avidnost na β_2 -GPI (45 %), kar smo pripisali največjemu deležu vodikovih vezi, ki jih peptid 2 lahko tvori z anti- β_2 -GPI. Ko smo vseh 217 vzorcev razdelili glede na hkratno vezavo na dva peptida, smo ugotovili, da

se je največ vzorcev (95 %) vezalo hkrati na peptid 4 in peptid 5 ter na peptid 4 in peptid 6. Le malo manjši delež hkratne vezave imata peptid 1 in peptid 2, peptid 1 in peptid 3 ter peptid 4 in peptid 9 (86 %). Tisti vzorci, ki so se vezali na peptid 2, so bili v najmanjšem deležu pozitivni še na drugi peptid. Od 146 vzorcev se jih je samo 15 odstotkov vezalo hkrati na peptid 4. Opazili smo, da peptid 4 izstopa, saj ima najvišje deleže hkratne vezave še na enega izmed ostalih peptidov. Ugotovili smo, da lahko peptid 4, v primerjavi z ostalimi peptidi, tvori najmanjše število vezi z anti- β_2 -GPI, le tri, in od tega samo eno vodikovo. Tako smo potrdili trende v povezavi s številom vodikovih vezi in specifičnostjo vezave vzorcev na posamezen peptid, kar je potrdila tudi Žager v okviru svoje doktorske disertacije, ki je opozorila na pomembnost vodikovih vezi za specifično interakcijo β_2 -GPI – anti- β_2 -GPI (32).

Visoko avidna anti- β_2 -GPI so že dokazano značilno povezana s pojavom trombotičnih zapletov pri bolnikih z APS. Irman Š. je v okviru svoje doktorske disertacije dokazala, da visoko avidna anti- β_2 -GPI preprečijo nastanek neprekinjenega kristalnega aneksinskega ščita na fosfolipidnem dvosloju, ki je eden izmed mehanizmov vpliva protiteles na β_2 -GPI (44). V naših rezultatih smo opazovali, če je prisotna povezava med avidnostjo anti- β_2 -GPI in vezavo vzorcev na posamezen peptid, ki je del β_2 -GPI. Ugotovili smo, da se je na skoraj vse peptide vezal največji delež tistih vzorcev, katerih protitelesa so izkazovala heterogeno avidnost proti β_2 -GPI. Izjema je le peptid 1, na katerega se je vezalo enako število vzorcev z visoko avidnimi in heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI.

Največ vzorcev s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI se je vezalo na peptid 4, ki lahko z anti- β_2 -GPI tvori najmanj vodikovih vezi, s čimer smo še enkrat potrdili, da so te najbolj pomembne za specifično vezavo protiteles na β_2 -GPI. Ko smo podrobneje obravnavali rezultate, smo ugotovili, da imajo peptidi 2, 3 in 5, ki lahko tvorijo veliko ionskih vezi, prisotnih največ protiteles, ki izkazujejo visoko avidnost, saj so med hetero avidnimi protitelesi prav tako prisotna visoko in nizko avidna protitelesa. Na drugi strani pa imamo peptid 9, ki ima v svoji aminokislinski sekvenci prisotne samo aminokislino, ki lahko z anti- β_2 -GPI tvorijo vodikove vezi, z največjim deležem nizko avidnih anti- β_2 -GPI. Žager U. je ugotovila, da so nizko avidna anti- β_2 -GPI veliko bolj odvisna od gostote β_2 -GPI kot visoko avidna (32), kar bi lahko vplivalo na neujemanje rezultatov s pričakovanimi pri peptidu 9.

Pogled iz strani kliničnih znakov bolezni nam je pokazal, da je pri vseh peptidih največ bolnikov imelo diagnosticirano trombozo, od tega je bila v največjem deležu prisotna venska tromboza. Izjema je bil le peptid 1, na katerega so se v najvišjem deležu vezali vzorci bolnikov z arterijsko trombozo.

Tudi posamezna obravnava vzorcev bolnic z obstetrično komplikacijo nam ni pokazala večjih razlik med peptidi. Tukaj je bil trend vpliva vodikovih vezi bolj opazen, saj se je najmanjši delež vzorcev bolnikov z obstetričnimi komplikacijami vezal na peptid 4 (17 %), Odstopanje pri peptidu 4 je moč pripisati sami naravi tega peptida oziroma zmožnosti tvorbe vodikovih in ionskih vezi, ki je pri tem peptidu najmanjša.

Dokazano je že, da je med bolniki z visoko avidnimi protitelesi največ tistih z APS (10, 29, 31). Ko smo iskali povezavo med pojavom APS oz. prisotnostjo anti- β_2 -GPI brez kliničnih znakov APS in pozitivnostjo na določen peptid, smo ugotovili, da se je največ vzorcev bolnikov z APS vezalo na peptid 2 (68%), ki posnema lastnosti epitopov visoko avidnih anti- β_2 -GPI in vsebuje največ polarnih aminokislin, najmanj vzorcev pa na peptid 4 (9 %), ki lahko tvori najmanj vezi z anti- β_2 -GPI.

Tako pri bolnikih z APS kot pri tistih s prisotnimi anti- β_2 -GPI brez kliničnih znakov bolezni smo opazili, da so, kot v več prejšnjih primerih, izjeme peptidi 1, 2 in 4. Na peptid 2 se je ponovno vezalo največ vzorcev, na peptid 1 in 4 pa najmanj. Ponovno lahko razliko pripišemo številu vodikovih vezi, ki jih lahko tvorijo: peptid 2 jih lahko tvori 5, peptid 4 pa le eno in so zato vezi, ki jih tvori s protitelesom, šibkejše.

Prvi testi za odkrivanje APS so vključevali lažno pozitiven test za sifilis, LA in aCL. Bolniki z lažno pozitivnim testom so imeli večje tveganje za razvoj SLE ali druge vezivno-ktivne bolezni, na drugi strani pa niso imeli večjih možnosti za tromboze ali splave (41, 42). V naši študiji je od 217 bolnikov bila pri 114 bolnikih postavljena diagnoza SLE. Ponovno smo opazovali trend pri peptidih 1, 2 in 4 in ugotovili smo, da je bilo zopet največ vzorcev pozitivnih na peptid 2 (59 %), ki so imeli v največjem deležu prisotna heterogeno avidna anti- β_2 -GPI (48 %). Pri teh bolnikih je prevladovala venska tromboza (31 %).

Najmanj vzorcev se je vezalo na peptid 1 (8 %), med katerimi so prevladovali vzorci s heterogeno avidnimi anti- β_2 -GPI, bolezen pa se je v največ primerih izrazila v obliki venskih in arterijskih tromboz. Na peptid 4 se je vezalo 11 % bolnikov s SLE, prevladovala

so heterogeno avidna anti- β_2 -GPI. Arterijska, venska in mikrožilna tromboza so se pri peptidu 4 pojavili v enakem deležu (15 %).

Ker smo pri vseh testih opazili trend povezave med številom vodikovih vezi, ki jih lahko tvori peptid z anti- β_2 -GPI in številom pozitivnih vzorcev na posamezen peptid, smo vse rezultate tudi statistično obdelali in izvedli Fischerjev natančni test. Za peptid 7 in peptid 8 smo ugotovili, da je statistično značilno, da se nanju vežejo visoko avidna anti- β_2 -GPI. Prav tako se je za statistično značilno izkazala povezava tromboze s peptidom 6, na peptid 5 pa se morajo za manifestacijo bolezni v obliki tromboz vezati visoko avidna anti- β_2 -GPI. Isti pojav smo opazili pri peptidih 7 in 8, ki tudi zahtevata vezavo visoko avidnih anti- β_2 -GPI za klinični zaplet v obliki tromboz. Zanimivo je, da v nasprotju z opazovanji nismo ugotovili nobene statistično pomembne povezave med peptidom 2 in kliničnimi znaki bolezni ter peptidom 4 in kliničnimi znaki bolezni, čeprav sta se po rezultatih, poleg peptida 1, v več različnih testih najbolj razlikovala od ostalih peptidov.

V diplomski nalogi smo ugotovili, da je specifičnost vezave protiteles proti peptidom na β_2 -GPI nizka, saj so se protitelesa iz vzorcev v velikem deležu hkrati vezala na različne peptide, zelo malo protiteles vzorcev pa je bilo takih, ki so se specifično vezala samo na enega izmed devetih peptidov. K specifičnosti vezave je pripomogel aminokislinski podaljšek GGGS-NH₂, saj ima v svojem zaporedju dodatno aminokislino S, ki lahko z anti- β_2 -GPI tvori močnejšo vodikovo vez. Za natančnejše razumevanje povezave oziroma vpliva avidnosti protiteles na klinične zaplete pri bolnikih z APS, bi bilo smiselno raziskati in opredeliti tudi samo jakost vezave protiteles proti posameznim domenam β_2 -GPI ali še bolj specifično proti peptidnim zaporedjem na različnih domenah β_2 -GPI. Samo tako bi lahko nedvoumno dokazali pomembnost prisotnosti visoko avidnih anti- β_2 -GPI za klinične zaplete, kar bi pomenilo tudi odkritje novih potencialnih tarč za zdravljenje APS.

6 SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo ugotovili, da:

- anti- β_2 -GPI tvorijo z β_2 -GPI vodikove in ionske interakcije, od katerih so vodikove vezi najbolj pomembne za vezavo visoko avidnih protiteles.
- prisotnost repa z aminokislinskim zaporedjem GGGS-NH₂ signifikantno značilno vpliva na število pozitivnih vzorcev, saj ima aminokislinski rep prisotno dodatno aminokislino, ki lahko z anti- β_2 -GPI tvori močno vodikovo vez.
- na aminokislinski sekvenci T L R V Y K (domena III) in K M D G N H P (domena IV) se statistično značilno vežejo visoko avidna anti- β_2 -GPI.
- pojav tromboze je povezan z vezavo visoko avidnih protiteles na peptide z aminokislinskima sekvencama K D K A T F (domena IV) in N G P A N S K (domena III).
- večji delež aminokislin, ki z anti- β_2 -GPI lahko tvorijo vodikove vezi, pripomore k večji epitopski specifičnosti.

7 LITERATURA

1. Cetin A., Gwendolyn M.A.van Os, Mörgelin M., Sprenger RR., Marguart JA, Urbanus RT, Derksen, RHWM., Meijers JCM., de Groot PG: β_2 -Glycoprotein I can exist in 2 conformations: implications for our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2010; 116: 1336-1343.
2. Levine JS, Branch DW, Rauch J: The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*, 2002; 346: 752-763.
3. Di Simone N, Meroni PL, Asta MD, Di Nicuolo F, Alessio MCD, Caruso A: Pathogenic role of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies on human placenta: functional effects related to implantation and roles of heparin. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 189-196.
4. Favaloro EJ, Wong RC. Laboratory testing for the antiphospholipid syndrome: making sense of antiphospholipid antibody assays. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 447-61.
5. Cervera R, Conti F, Doria A, Iaccarino L, Valesini G. Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist? *Autoimmun Rev* 2012; 11: 581-4.
6. Nayfe R, Uthman I, Aoun J, Saad Aldin E, Merashli M, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2013.
7. Joshi AS, Zhou J, Gohil VM, Chen S, Greenberg ML: Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2009; 212-218.
8. Schlame M, Ren M: The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788: 2080-2083.
9. Shahin M, El-Diasty AM, Mabed M: Anticardiolipin antibodies in proliferative diabetic retinopathy: An additional risk factor. *Saudi Journal of Ophthalmology*; 23: 165-169.
10. Čučnik S, Kveder T, Križaj I, Rozman B, Božič B: High avidity anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in patients with antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1478-1482
11. Forero Y, Escobar J, Vernot JP: The detection of lupus anticoagulant using the kaolin clotting time test: a comparative study of the different forms of analysis. *Thromb Res* 1995; 79: 289-296.

12. Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA: Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease. *Thromb Res* 2004; 114: 335-346.
13. Sodin-Šemrl S, Rozman B: β_2 -Glycoprotein I and its clinical significance: From gene sequence to protein levels. *Autoimmun Rev* 2007; 547-552.
14. Žager U, Irman Š, Lunder M, Škarabot M, Mušević I, Hodnik V, Anderluh G, Čučnik S, Kveder T, Rozman B, Božič B: Immunochemical properties and pathological relevance of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies of different avidity. *Int Immunol* 2011; 23: 511-518.
15. Hammel M, Kriechbaum M, Gries A, Kostner MG, Laggner P, Prassl R: Solution Structure of human and bovine β_2 -glycoprotein I revealed by small-angle X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 2002; 321: 85-97.
16. Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, Gries A, Kostner G, Laggner P, Prassl R: Crystal structure of human β_2 -glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *The EMBO Journal* 1999; 18: 6228-6239.
17. Li Z, Krilis SA: Anti- β_2 -glycoprotein I antibodies and the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2003 Sep; 2: 229-34.
18. Nunez-Alvarez CA, Cabiedes J: Pathogenic mechanisms of the anti-phospholipid antibodies. *Reumatologia Clinica* 2011; 7: 72-76.
19. Espinosa G, Cervera R.: Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: 230.
20. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JMH, Ravelli RBG, Schouten A, Simmelink MJA, Derksen RHW, Kroon J, Gros P.: Adhesion mechanism of human β_2 -glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *The EMBO Journal* 1999; 18: 5166-5174.
21. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1G4F>, 7.11.2013.
22. Hammel M, Schwarzenbacher R, Gries A, Kostner GM, Laggner P, Prassl R: Mechanism of the interaction of beta(2)-glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes. *Biochemistry* 2001; 40: 14173-14181.
23. Lutters BC, Meijers JC, Derkse RH, Arnout J, de Groot PG: Dimers of beta 2-glycoprotein I mimic the in vitro effects of beta 2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I antibody complexes; *J.Biol.Chem* 2001; 276: 3060-3067.

24. Hagihara Y, Hong DP, Hoshino M, Enjyoji K, Kato H, Goto Y: Aggregation of beta(2)-glycoprotein I induced by sodium lauryl sulfate and lysophospholipids. *Biochemistry* 2002; 41: 1020-1026.
25. Sheng Y, Hanly JG, Reddel SW, Kouts S, Guerin J, Kioke T: Detection of antiphospholipid antibodies: a single chromogenic assay of thrombin generation sensitively detects lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies, plus antibodies binding β_2 -glycoprotein I and prothrombin. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 502-8.
26. Schousboe I: beta 2-glycoprotein I: a plasma inhibitor of a contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985; 66: 1086-91.
27. Matsuura E, Kobayashi K, Hurley BL, Lopez LR: Atherogenic oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I (oxLDL/beta2GPI) complexes in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2006; 15: 478-83.
28. Vozelj M: Temelji imunologije. 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000; 92-120.
29. Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B: Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. *Autoimmun Rev* 2005 Jun; 4: 303-8.
30. Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B: Affinity and avidity of autoantibodies. *Autoantibodies (Second Edition)*. Elsevier 2007; 21-28.
31. Čučnik S, Kveder T, Ulcova GZ, Swadzba J, Musial J, Valesini G, Avčín T, Rozman B, Božič B: The avidity of anti- β_2 -glycoprotein I antibodies in patients with or without antiphospholipid syndrome: a collaborative study in the frame of the European forum on antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2011; 0: 1-6.
32. Žager U: Značilnosti vezave protiteles proti β_2 -glikoproteinu I na antigen. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011; 83-104.
33. Crowther JR: *The ELISA Guidebook*, 2nd Ed., Humana Press, New York, 2009: 9-78.
34. Blank M, Shoenfeld Y, Cabilly S, Heldman Y, Fridkin M, Katchalski-Katzir E: Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 5164-8.
35. Bolton S, Bon C: *Pharmaceutical Statistics, Practical and Clinical Applications*, 4th Ed., Marcel Dekker Inc., New York, 2004; 464-495.
36. Wallace DJ, Hahn BH: *Dubois' Lupus Erythematosus*, Sixth edition, Philadelphia, 2002; 1093-1112.

37. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHW, 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.
38. de Laat B, Mertens K, de Groot PG: Mechanisms of Disease: antiphospholipid antibodies—from clinical association to pathologic mechanism. *Nature* 2008, 4: 192–199.
39. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, de Laat B, Forastiero R, Kutteh WH, Lambert M, Matsubayashi H, Murthy V, Petri M, Rand JH, Sanmarco M, Tebo AE, Pierangeli SS: ‘Non-criteria’ aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2011; 20: 191–205.
40. Pierangeli SS, Blank M, Liu X, Espinola R, Fridkin M, Ostertag MV, Roye-Green K, Harris EN, Shoenfeld Y: A peptide that shares similarity with bacterial antigens reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in vivo. *J Autoimmun* 2004; 22: 217–225.
41. Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Harris EN: Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 545–52.
42. Moore JE, Mohr CF: Biologically false positive serologic tests for syphilis. *JAMA* 1952; 150: 467–473.
43. Moore JE, Lutz WB: The natural history of systemic lupus erythematosus: an approach to its study through chronic biologic false-positive reactors. *J Chronic Dis* 1955; 1: 297–316.
44. Irman Š: Vpliv podskupin antifosfolipidnih protiteles na kristalizacijo aneksina A5 na fosfolipidnem dvosloju. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010; 39–75.