

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Luka OMAHEN

**DOLOČITEV LASTNOSTI MONOKLONSKIH ANTIIDOTIPSKIH
PROTITELES PROTI MONOKLONSKEMU PROTITELESU V5B2, KI
SELEKTIVNO VEŽE PATOLOŠKO IZOOLIKO PRIONSKEGA
PROTEINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIIDOTYPIC
ANTIBODIES AGAINST MONOCLONAL ANTIBODY V5B2, WHICH
SELECTIVELY BINDS PATHOLOGICAL ISOFORM OF PRION
PROTEIN**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Centru za razvoj in izdelavo diagnostičnih reagentov Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani.

Študijska komisija oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Vladko Čurin Šerbec in za recenzentko prof. dr. Mojca Narat.

Mentorica: prof. dr. Vladka Čurin Šerbec

Recenzentka: prof. dr. Mojca Narat

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Vladka Čurin Šerbec
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Zavod RS za transfuzijsko medicino

Članica: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Luka OMAHEN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616.8-078-085-097:547.96(043)=863
KG	prionski protein/prionske bolezni/patološka izooblika prionskega proteina/kloniranje z metodo omejenega redčenja/ELISA test/specifična antiidiotipska monoklonska protitelesa/nukleotidno zaporedje variabilnih regij/aminokislinsko zaporedje/relativna vezalna afiniteta/notranja podoba epitopa
AV	OMAHEN, Luka
SA	ČURIN ŠERBEC, Vladka (mentorica)/NARAT, Mojca (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	DOLOČITEV LASTNOSTI MONOKLONSKIH ANTIIDOTIPSKIH PROTITELES PROTI MONOKLONSKEMU PROTITELESU V5B2, KI SELEKTIVNO VEŽE PATOLOŠKO IZOOLIKO PRIONSKEGA PROTEINA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 75 str., 11 pregl., 25 sl., 48 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Določitev tridimenzionalne strukture patološke izooblike prionskega proteina (PrP ^{Sc}) je zaradi njegove netopnosti izjemno težavna. Ena izmed metod reševanja strukture molekule temelji na reševanju strukture posameznih epitopov ter kasnejšem računalniškem modeliranju. S kristalografskimi študijami kompleksa za PrP ^{Sc} specifičnega idiotipskega in njegovega anti-idiotipskega (anti-Id) protitelesa bi bilo možno določiti strukturo za PrP ^{Sc} specifičnega epitopa v patološki izoobliki proteina. To bi imelo poleg pomena za reševanje strukture prionskega proteina tudi velik pomen pri načrtovanju terapevtskih učinkovin in potencialnega cepiva. Hibridomske celične linije, ki smo jih pridobili po imunizaciji miši s fragmentom Fab protitelesa V5B2, ki specifično prepozna PrP ^{Sc} , smo klonirali z metodo omejenega redčenja. S tem smo dosegli, da so bile celične kulture monoklonske in so proizvajale samo en tip protiteles. S testom ELISA smo izbrali tiste klone, ki proizvajajo specifična anti-Id monoklonska protitelesa (mAbs) proti variabilnim regijam Fab V5B2. S primerjavo nukleotidnih zaporedij variabilnih regij lahkini in težkih verig protiteles smo izbrali štiri mAbs, ki jih proizvajajo različni kloni. Z izračunom relativne vezalne afinitete smo ugotovili, da se omenjena mAbs z visoko afiniteto vežejo na Fab V5B2. Po določitvi aminokislinskih zaporedij variabilnih regij smo pri enem protitelesu odkrili krajši motiv peptida P1 in s tem potrdili pojav notranje podobe epitopa primarnega antigena v paratopu anti-Id mAb.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Gt
DC UDC 616.8-078-085-097:547.96(043)=863
CX prion protein/prion diseases/pathological isoform of the prion protein/cloning according to the method of limited dilution/ELISA test/specific antiidiotypic monoclonal antibodies/nucleotide sequence of variable regions/amino acid sequence/relative binding affinity/internal image of the epitope
AU OMAHEN, Luka
AA ČURIN ŠERBEC, Vladka (supervisor)/ NARAT, Mojca (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES AGAINST MONOCLONAL ANTIBODY V5B2, WHICH SELECTIVELY BINDS PATHOLOGICAL ISOFORM OF PRION PROTEIN
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 75 p., 11 tab., 25 fig., 48 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The determination of three-dimensional structure of the pathological isoform of prion protein (PrP^{Sc}) is extremely difficult due to its insolubility. One of the methods for resolving molecular structure is based upon the resolution of structures of individual epitopes and later computer modelling. By using crystallographic studies of the complex of PrP^{Sc} specific idiotype and its anti-idiotypic (anti-Id) antibody it is possible to determine the structure of PrP^{Sc} specific epitope on the pathological isoform. This is important not only for the resolution of the prion protein structure but also for planning therapeutic substances and potential vaccines. Hybridoma cell lines obtained after the immunisation of mice with Fab fragment of the antibody V5B2, which specifically recognises PrP^{Sc}, were cloned according to the method of limited dilution, resulting in monoclonal cell cultures, which produced only one type of the antibodies. With ELISA test we selected the clones which produce specific anti-Id monoclonal antibodies (mAbs) directed against variable regions of Fab V5B2. By comparing the nucleotide sequence of variable regions of light and heavy chains we selected four mAbs, produced by unrelated clones. By determination of the relative binding affinity we ascertained that the stated mAbs bound to FabV5B2 with high affinity. Upon determination of the amino acid sequence of variable regions a shortened motif of the peptide P1 was found. We were thus able to confirm the occurrence of an internal image of the structure of the primary antigen within the paratop of anti-Id mAb.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PROTITELESA	2
2.1.1 Zgradba protiteles	2
2.1.2 Razredi in podrazredi protiteles	3
2.1.3 Organizacija in izražanje imunoglobulinskih genov	3
2.1.4 Izključitev alela	5
2.1.5 Selekcija limfocitov B	6
2.1.6 Monoklonska protitelesa	6
2.2 ANTIIDIOTIPSKA PROTITELESA	7
2.2.1 Idiotipske determinante	7
2.2.2 Antiidiotipska protitelesa	7
2.2.3 Uporaba anti-Id protiteles	9
2.3 PRIONSKE BOLEZNI	11
2.4 PRIONSKI PROTEIN	13
2.4.1 Zgradba prionskega proteina	13
2.4.2 Celični in patološki prionski protein	14
2.4.3 Pretvorba PrP ^C v PrP ^{Sc}	15
2.4.4 Imunski odziv proti prionskim proteinom	16
2.4.5 Monoklonska protitelesa proti PrP	17
2.4.5.1 V5B2	18
2.4.5.2 E9/5	18
2.4.5.3 C1/1	18
2.4.5.4 E12/2	19
2.5 CILJ RAZISKOVANJA	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 PRIPRAVA PROTITELES ZA NEGATIVNO SELEKCIJO	21
3.1.1 Čiščenje protiteles	21
3.1.2 Razgradnja s papainom	23
3.1.3 Čiščenje mešanice po razgradnji	24
3.1.4 Test ELISA	25
3.1.4.1 Testiranje učinkovitosti čiščenja fragmentov Fab	25
3.1.5 Prenos proteinov na nitrocelulozno membrano	26
3.1.5.1 NaDS – poliakrilamidna gelska elektroforeza proteinov	26
3.1.5.2 Barvanje gela z barvilom Biosafe CBB	28
3.1.5.3 Prenos proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano (prenos Western)	29

3.1.5.4	Imunodetekcija	29
3.2	DELO S CELICAMI	30
3.2.1	Hibridomske celične linije	30
3.2.2	Gojenje celičnih kultur	31
3.2.3	Štetje celic	32
3.2.4	Odmrzovanje celic	33
3.2.5	Zamrzovanje celic	33
3.2.6	Kloniranje celičnih linij	34
3.2.7	Priprava večje količine supernatantov	34
3.3	KARAKTERIZACIJA ANTIIDIOTIPSKIH PROTITELES	35
3.3.1	Posredni test ELISA	35
3.3.1.1	Presejalni test za iskanje klonov, ki proizvajajo antiidiotipska mAbs	35
3.3.1.2	Določanje podrazreda monoklonskih protiteles	36
3.3.1.3	Preverjanje navzkrižne reaktivnosti	36
3.3.1.4	Določanje titra protiteles in določanje relativne vezalne afinitete	37
3.3.2	Molekularne metode	37
3.3.2.1	Izolacija RNA	37
3.3.2.2	Začetni oligonukleotidi	38
3.3.2.3	Reverzna transkripcija	39
3.3.2.4	Reakcija verižne polimerizacije (PCR)	40
3.3.2.5	Agarozna gelska elektroforeza	41
3.3.2.6	Izolacija DNA iz agaroznega gela	41
3.3.2.7	Določanje nukleotidnega zaporedja	42
3.3.2.8	Računalniška analiza nukleotidnih zaporedij	42
4	REZULTATI	43
4.1	PRIPRAVA PROTITELES ZA NEGATIVNO SELEKCIJO	43
4.1.1	Preverjanje čiščenja mešanice C1/1 po razgradnji	43
4.1.2.	Titer očiščenih fragmentov Fab in Fc	44
4.1.3	Prenos Western in barvanje gela z barvilom Biosafe CBB	45
4.2	HIBRIDOMSKE CELIČNE LINIJE	46
4.2.1	Začetna analiza hibridomskih celičnih linij	47
4.2.2	Spremljanje proizvodnje specifičnih protiteles po pasažah	47
4.3	KLONIRANJE CELIČNIH LINIJ	48
4.3.1	Karakterizacija anti-Id mAbs s posrednim testom ELISA	50
4.3.1.1	Primerjava titra supernatantov zamrznjenih in nezamrznjenih celic	50
4.3.1.2	Preverjanje navzkrižne reaktivnosti	51
4.3.1.3	Določanje podrazreda protiteles	53
4.3.1.4	Titer očiščenih mAbs in določanje relativne vezalne afinitete	53
4.3.2	Karakterizacija anti-Id mAbs z molekularnimi metodami	54
4.3.2.1	Izolacija RNA	54
4.3.2.2	PCR in agarozna gelska elektroforeza	55
4.3.2.3	Izolacija DNA iz gela	56
4.3.2.4	Določanje nukleotidnega zaporedja	56
4.3.2.5	Primerjava nukleotidnih zaporedij	58
4.3.2.6	Določanje aminokislinskega zaporedja	60
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	62
5.1	RAZPRAVA	62

5.2	SKLEPI	68
6	POVZETEK	69
7	VIRI	70

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
PREGLEDNICA 1: Patogeni mikroorganizmi, za katere so v eksperimentalnih modelih z uporabo anti-Id protiteles, ki nosijo notranjo podobo antigena, izzvali imunski odziv pri poskusnih živalih	11
PREGLEDNICA 2: Pregled prionskih bolezni pri ljudeh in živalih	13
PREGLEDNICA 3: Protitelesa, ki smo jih uporabljali pri našem delu in njihove lastnosti	19
PREGLEDNICA 4: Stopnje kloniranja celičnih linij in izbrani kloni	49
PREGLEDNICA 5: Relativna vezalna afiniteta posameznih mAb	54
PREGLEDNICA 6: Koncentracije RNA, izolirane iz izbranih klonov	55
PREGLEDNICA 7: Koncentracije DNA, izolirane iz gela	56
PREGLEDNICA 8: Alikvoti DNA, poslani na sekveniranje in uspešnost določitve nukleotidnega zaporedja	58
PREGLEDNICA 9: Monoklonska protitelesa, ki smo jim določili nukleotidna zaporedja variabilnih regij	60
PREGLEDNICA 10: Poimenovanje genskih segmentov lahkih in težkih s pomočjo baze IMGT	60
PREGLEDNICA 11: Aminokislinska zaporedja hipervariabilnih regij lahkih in težkih verig protiteles izbranih klonov	61

KAZALO SLIK

	str.
SLIKA 1: Prikaz zgradbe protitelesa IgG	5
SLIKA 2: Imunizacija z mAb (Ab-1) specifičnim za epitop (▷) izzove nastanek anti-Id mAb (Ab-2), ki je specifičen za idiotop Ab-1 in zato izraža notranjo podobo prvotnega antigenskega epitopa (▷).	9
SLIKA 3: Modela domnevne terciarne strukture PrP ^C in PrP ^{Sc}	15
SLIKA 4: Modela pretvorbe PrP ^{Sc}	16
SLIKA 5: Gojenje celic	32
SLIKA 6: Celice v logaritemski fazi rasti	35
SLIKA 7: Fotografija mikrotitrne ploščice po testu ELISA za določanje specifičnih klonov po kloniranju celičnih linij	36
SLIKA 8: Določevanje podrazreda protiteles s testom ELISA	36
SLIKA 9: Delež fragmentov Fab in fragmentov Fc protitelesa C1/1 v posameznih frakcijah po čiščenju na protein A-agaroz	43
SLIKA 10: Titer očiščenih protiteles C1/1 ter očiščenih fragmentov Fab in Fc	44
SLIKA 11: Titer očiščenih protiteles E12/2 ter očiščenih fragmentov Fab in Fc	44
SLIKA 12: Analiza Western ter imunodetekcija necepljenega C1/1 ter njegovih fragmentov Fab in Fc z anti-Fab IgG in anti-Fc IgG	45
SLIKA 13: Barvanje gela z barvilom Biosafe CBB	46
SLIKA 14: Proizvodnja anti-Id mAbs pri posameznih celičnih linijah	47
SLIKA 15: Proizvodnja mAbs linij 5D12 in 2C1 pri različnih pasažah	48
SLIKA 16: Celice po kloniranju	49
SLIKA 17: Primerjava titra supernatantov nezamrznjenih in zamrznjenih celičnih klonov linije 5D12	50
SLIKA 18: Primerjava titra supernatantov izbranih klonov	52
SLIKA 19: Določanje navzkrižne reaktivnosti izbranih anti-Id mAbs	52

SLIKA 20:	Določanje podrazreda izbranih protiteles	53
SLIKA 21:	Titer očiščenih anti-Id mAbs	54
SLIKA 22:	Primeri poliakrilamidnih gelov, na katerih smo ločili produkte PCR težkih verig in lahkih verig	55
SLIKA 23:	Kromatogram sekveniranja nukleotidnega zaporedja	57
SLIKA 24:	Primerjava zaporedij težkih verig klonov linij 2F12 in 5D12 ter lahkih verig klonov 5D12/B9 in 2C1/G5	59
SLIKA 25:	Aminokislinsko zaporedje variabilne regije lahke verige mAb 2F12/D7 in težke verige mAb 2F12/E4	61

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_{xyz}	absorbanca pri valovni dolžini xyz nm
Ab (Abs)	protitelo (protitelesa)
AK	aminokislina
anti-Id	antiidiotip
Balb/c	divji tip miši
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
BSE	goveja spongiformna encefalopatija (angl. bovine spongiform encephalopathy)
cDNA	komplementarna DNA (angl. complementary DNA)
CDR	regije, ki določajo komplementarnost (angl. complementarity determining regions)
CJD	Creutzfeldt-Jakobova bolezen (angl. Creutzfeldt-Jakob disease)
CRIDR	Center za razvoj in izdelavo diagnostičnih reagentov
CŽS	centralni živčni sistem
dCJD	dedna CJD
DMEM	Eaglovo minimalno esencialno gojišče, modificirano po Dulbeccu (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleozidtrifosfat (angl. deoxyribonucleosidetriphosphate)
ddNTP	dideoksiribonukleozidtrifosfat (angl. dideoxyribonucleosidetriphosphate)
ELISA	encimskoimunski test (angl. enzyme linked immunosorbent assay)
H1, H2, H3	hipervariabilna regija 1, 2, 3 na težki verigi
HRP	hrenova peroksidaza (angl. horseradish peroxidase)
iCJD	iatrogena CJD
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin razreda G
IgG1	imunoglobulin podrazreda G1
IgG1_Hconst	začetni oligonukleotidi, ki se prilegajo konstantni regiji težke verige $\gamma 1$
IgFR1.2	degenerirani začetni oligonukleotidi, ki se prilegajo variabilni regiji težkih verig
Ig_k_const	začetni oligonukleotidi, ki se prilegajo konstantni regiji lahke verige κ
Ig_k_FR1	degenerirani začetni oligonukleotidi, ki se prilegajo variabilni regiji lahkkih verig
IL	interlevkin
KLH	hemocianin iz školjke (angl. keyhole limpet haemocyanine)
L1, L2, L3	hipervariabilna regija 1, 2, 3 na lahki verigi
mAb	monoklonsko protitelo (angl. monoclonal antibody)
mRNA	informacijska RNA (angl. messenger RNA)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
<i>Prnp</i>	mišji gen za prionski protein
<i>Prnp</i> ^{0/0}	izbiti gen za mišji prionski protein
PrP	prionski protein
PrP ^C	celična oblika prionskega proteina
PrP ^{res}	na proteinazo K odporen del PrP ^{Sc}

PrP ^{Sc}	patološka oblika prionskega proteina
recBoPrP	rekombinantni goveji PrP (angl. recombinant bovine PrP)
recHuPrP	rekombinantni humani PrP (angl. recombinant human PrP)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RVA	relativna vezalna afiniteta
Sc	praskavec (angl. scrapie)
sCJD	sporadična CJD
T _H 1, T _H 2	podvrsti celic T-pomagalk
TSE	prenosljiva spongiformna encefalopatija (angl. transmissible spongiform encephalopathy)
vCJD	različica CJD (angl. variant CJD)

1 UVOD

Prenosljive spongiformne encefalopatije (angl. **Transmissible Spongiform Encephalopathy** – TSE), kot drugače imenujemo prionske bolezni, predstavljajo skupino degenerativnih bolezni centralnega živčnega sistema, ki prizadenejo tako človeka kot nekatere druge sesalce. Osnovni dejavnik patogeneze je sočasno izražanje normalnega celičnega prionskega proteina (PrP^{C}) ter kopičenje strukturno drugačne, na proteinaze odporne, patogene izooblike (PrP^{Sc}).

Določitev tridimenzionalne strukture patološke izooblike prionskega proteina je zaradi njegove netopnosti izjemno težavna. Ena izmed metod ugotavljanja strukture temelji na določanju strukture posameznih epitopov ter kasnejšem računalniškem modeliranju. S kristalografskimi študijami kompleksa med monoklonskim protitelesom (mAb), specifičnim za PrP^{Sc} in njegovim anti-idiotipskim mAb bi bilo možno določiti strukturo PrP^{Sc} specifičnega epitopa na patološki izoobliki proteina. To bi imelo poleg pomena za odkrivanje strukture prionskega proteina tudi velik pomen pri načrtovanju terapevtskih učinkovin in potencialnega cepiva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTITELESA

Pridobljena imunost temelji na sposobnosti imunskega sistema, da razlikuje med lastnim in tujim. Pojem lastno predstavlja molekule, ki so del organizma in so kodirane v njegovem genomu, tuje pa predstavljajo vse ostale molekule. Nastanek protiteles (Abs), ki so pomemben del pridobljene specifične imunosti, sproži srečanje z antigenom. Protitelesa se vežejo na antigen in ga direktno inaktivirajo ali pa posredujejo efektorske funkcije in tako odstranijo tuje snovi v organizmu.

2.1.1 Zgradba protiteles

Protitelesa ali imunoglobulini (Ig) so glikoproteini, sestavljeni iz dveh identičnih lahkih in dveh identičnih težkih verig, ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi (slika 1). Molekulska masa lahke verige je približno 25 kDa in težke 50 kDa, zato ima celotno Ab molekulsko maso 150 kDa. S pomočjo cepljenja s proteolitičnimi encimi so ugotovili, da so Abs sestavljena iz treh približno enakih fragmentov. Fragmenta Fab (angl. **F**ragment **a**ntigen **b**inding) sta istovetna in vsak nosi eno vezišče za antigen. Tretji fragment, imenovan Fc (angl. **F**ragment **c**ristallizable), se ne veže na antigen, ima pa efektorske funkcije. Približno na sredini težke verige, na mestu zgiba, sta oba fragmenta Fab pritrjena na fragment Fc, zato imajo imunoglobulini obliko črke Y. To mesto je gibljivo, kot med fragmentoma Fab se lahko spreminja od 0° do 180°, kar omogoči vezavo tudi dveh oddaljenih epitopov. Lahka in težka veriga sta sestavljeni iz dveh regij, ki se razlikujeta v ohranjenost aminokislin (AK). Lahko verigo sestavljata ena variabilna in ena konstantna domena, težko verigo pa ena variabilna in tri ali štiri konstantne domene, odvisno od razreda Ig. Mesto na molekuli Ig, kamor se veže antigen, imenovano paratop, je sestavljeno iz variabilnih regij težke in lahke verige. Na vezavo antigena najbolj vplivajo tri hipervariabilna področja znotraj variabilne regije obeh verig, imenovana tudi regije CDR (angl. **C**omplementarity **D**etermining **R**egion). S primerjavo AK zaporedij teh

področij v različnih veziščih so opazili številne delecije ali insercije, kar pomeni, da variirajo tako v dolžini kot v AK zaporedju. Aminokislinska zaporedja hipervariabilnih regij so ključnega pomena za specifičnost vezave antigena. K vezavi antigena pa prispevajo tudi bolj ohranjeni ogrodni deli (angl. framework region - Fr), ki obdajajo regije CDR, saj omogočijo takšno zvitje verige v prostoru, da se hipervariabilne regije približajo. Paratop tvori šest hipervariabilnih regij, ki se prilagodijo obliki antigena (Wu in Kabat, 1970).

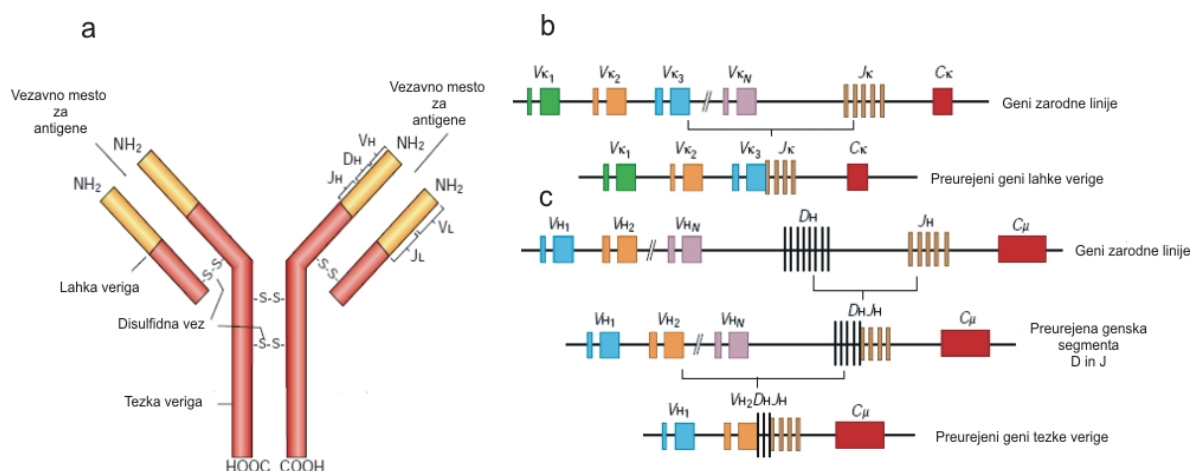
2.1.2 Razredi in podrazredi protiteles

Na podlagi AK zaporedja so raziskovalci ugotovili, da obstaja pet različnih tipov težkih verig in dva tipa lahkih verig. Vsak razred ali izotip imunoglobulinov ima po en par lahkih verig, ki so skupne vsem razredom in en par težkih verig, ki so za vsak razred antigensko značilne. Težke verige so označene z grškimi črkami: veriga α v IgA, veriga γ v IgG, veriga δ v IgD, veriga ϵ v IgE in veriga μ v IgM. Imunoglobuline razreda G lahko pri miših dodatno razdelimo v štiri podrazrede, imunoglobuline razreda A pa v dva podrazreda. Pri lahkih verigah obstajata samo dva izotipa, κ in λ , ki se nahajata pri vsakem posamezniku. Pri človeku sta obe lahki verigi zastopani približno v enakem številu, za miši pa je značilno, da imajo desetkrat več protiteles s κ verigami. Za protitelesa z različnimi lahkimi verigami funkcijske razlike še niso znane, različne težke verige (izotipi) pa vplivajo na efektorske funkcije, na samo vezavo z antigenom pa ne vplivajo. Zato so lahko protitelesa različnih izotipov specifična za isti antigen (Vozelj, 2000).

2.1.3 Organizacija in izražanje imunoglobulinskih genov

Ena izmed najpomembnejših lastnosti imunskega sistema vretenčarjev je, da lahko odgovori na ogromno število tujih antigenov. Celotna zbirka protiteles ali protitelesni repertoar pri ljudeh predstavlja najmanj 10^{11} različnih imunoglobulinov, od katerih ima vsak svojo afiniteto in specifičnost. Postavilo se je vprašanje, kakšen mehanizem omogoča takšno raznolikost, saj teorija, da za vsako Ig verigo obstaja poseben gen, tega ni razložila. Geni, ki bi kodirali posamezno verigo, bi tako zasedli večino genoma. Po drugi teoriji pa naj bi obstajalo omejeno število genov za protitelesa, raznolikost med njimi pa povzročajo

somatske rekombinacije. To je potrdil Tonegawa leta 1983 z ugotovitvijo, da imajo Ig verige istega izotipa popolnoma enaka aminokislinska zaporedja v konstantni domeni in različna zaporedja v variabilni domeni (Tonegawa, 1983). Z metodo prenosa Southern so ugotovili, da se velikosti fragmentov DNA z Ig geni razlikujejo med celicami, ki proizvajajo protitelesa in med celicami, ki jih ne proizvajajo. Geni, ki kodirajo lahke verige κ in λ ter lokus, kjer so geni za različne težke verige, se nahajajo na različnih kromosomih. Sestavljeni so iz številnih genskih segmentov, med seboj ločenih z odseki DNA, ki se ne prepisujejo. Poleg variabilnih (V) in konstantnih (C) genskih segmentov se v lokusih nahajajo še segmenti J (angl. **j**oining – povezovalni) ter v lokusu težke verige še segmenti D (angl. **d**iversity – raznoliki) (slika 1). Preureditev zapisa za celotno imunoglobulinsko verigo v času zorenja limfocita B omogočijo encimi rekombinaze. Encim je aktiven samo v zgodnjih razvojnih stopnjah limfocita, v protitelesa izdelujočih celicah (plazmatkah) pa ne. Celice, ki že izdelujejo protitelesa, zato ne morejo preurediti dodatnih Ig genov in posledično tudi ne morejo spremeniti njihove specifičnosti. Pri preurejanju genskih segmentov težke verige rekombinaza najprej spoji segment D z enim izmed segmentov J, nato pa še z enim od segmentov V. Nastali kompleks se poveže s segmentom C, ki določa izotip protitelesa. Rekombinacija lokusa lahke verige poteka podobno, razen segmenta D, ki ga tu ni. Variabilno regijo Ig lahke verige torej kodirajo segmenti V in J, težko verigo pa V, J in D. Segmenta J in D (samo pri težki verigi) kodirata terminalne konce variabilne domene, vključno z zadnjo regijo CDR, ki vpliva na komplementarnost paratopa. Ko so genski segmenti zlepljeni, se zapis prepisuje v primarno mRNA, čemur sledi procesiranje v zrelo mRNA. Pri tem se izrežejo introni in odvečni segmenti C. Lahke in težke verige nastajajo na ribosomih zrnatega endoplazmatskega retikuluma (GER). V postranslacijskih modifikacijah v GER se verige z disulfidnimi vezmi povežejo, na njih se pripenjajo tudi oligosaharidi. Glikozilacija se zaključi v cisternah Golgijevega aparata, kjer dobijo ogljikovi hidrati končno obliko. Molekule protiteles se v mešičkih prenesejo v plazmalemo, kjer se zasedrjo v celično membrano ali izločijo. Zaradi preurejanja genskih segmentov imajo zrele celice B genomsko DNA, ki ni več enaka genomska DNA drugih celic. Ta proces omogoča nastanek več kot $1,8 \times 10^7$ različnih protiteles, somatske mutacije in drugi mehanizmi pa omogočajo še večjo raznolikost (Vozelj, 2000).



SLIKA 1: Prikaz zgradbe protitelesa IgG (a). Variabilne domene so obarvane rumeno, konstantne rdeče. Označena so mesta, ki jih kodirajo različni genski segmenti. Na desni sliki je prikazano preurejanje genov lahke verige (b) in genov težke verige (c) (Nossal, 2003).

2.1.4 Izključitev alela

Pri rekombinaciji imunoglobulinskih genov celica B najprej preuredi genske segmente za težko verigo. Protein težke verige, ki je nastal s preureditvijo gena na enem kromosomu ireverzibilno zavre preureditev na drugem kromosomu in tako izključi alel težke verige Ig. Alel težke verige na drugem kromosomu se preuredi le, če je prva preureditev neuspešna, kar je lahko posledica mutacij ali napačne rekombinacije. Preureditev težke verige vzpodbudi tudi preureditev genov lahke verige, ki se začne v lokusu κ . Če je preureditev κ neuspešna, nastane protein κ in preureditev λ je inhibirana. Lokus λ se preuredi samo v primeru, če preurejeni lokusi κ na obeh starševskih kromosomih niso zmožni kodirati funkcionalnega proteina. Če se en alel težke ali lahke verige neuspešno preuredi, lahko pride do rekombinacije na drugem alelu. Če pa pride do neuspešnih rekombinacij v obeh alelih, celica ne more izdelovati protiteles in propade. Na ta način propade približno dve tretjini razvijajočih se limfocitov B. Z izključitvijo alela limfocit prepreči prepis genov za lahke in težke verige iz obeh starševskih kromosomov naenkrat. To bi povzročilo, da bi ena celica proizvajala dve različni lahki in dve različni težki verigi in posledično štiri protitelesa različnih specifičnosti (Vozelj, 2000).

2.1.5 Selekcija limfocitov B

Po uspešni somatski rekombinaciji genskih segmentov in sintezi se protitelo nahaja v obliki, vezani na membrano nezrelega limfocita B. Limfociti so nato v kostnem mozgu izpostavljeni organizmu lastnim antigenom in gredo skozi proces negativne selekcije. To preživijo samo tisti limfociti B, katerih membranska protitelesa ne vežejo organizmu lastnih antigenov, v nasprotnem primeru pa odmrejo (90 % limfocitov B). Preživele celice potujejo v sekundarne limfatične organe, kjer so izpostavljene tujim antigenom (pozitivna selekcija) ter tako dozoriijo v zrele limfocite ali spominske celice (Vozelj, 2000).

2.1.6 Monoklonska protitelesa

Kot odgovor na prisotnost antigena v organizmu se v serumu pojavijo protitelesa, ki jih proizvajajo številni limfociti B. Dejstvo, da poliklonska protitelesa z različno afiniteto in specifičnostjo reagirajo z istim antigenom, je bilo moteče pri preučevanju imunskih pojavov in tudi v klinični imunologiji. Leta 1975 sta Köhler in Milstein razvila metodo za pridobivanje monoklonskih protiteles (mAbs) z isto specifičnostjo in afiniteto, ki so proizvod enega limfocita B (Köhler in Milstein, 1975). Metoda temelji na zlitju limfocitov B in mielomskih celic (tumorske hematopoetske celice). Vsaka izmed nastalih hibridnih celic (hibridomov), ki je produkt enega limfocita B in ene mielomske celice, proizvaja enaka protitelesa kot izvorni limfocit. V začetnem stadiju je celica še nestabilna, se razmnožuje in izgublja kromosome, dokler se končno ne stabilizira. Naključna izguba kromosomov lahko povzroči, da celica odmre ali da preneha proizvajati protitelesa. Po fuziji so poleg hibridomov prisotne tudi nezlite celice, tako limfociti kot mielomi. Prvi propadejo sami od sebe po nekaj dneh, nesmrtni mielomske celice pa bi se brez selekcije lahko namnožile in prerasle bolj občutljive hibridome. Temu se izognemo z uporabo mutirane mielomske celične linije, ki ji manjka encim hipoksantin gvanin fosforibozil transferaza (HGPRT) za sintezo nukleotidov po pomožni poti. Z dodatkom aminopterina v medij pa zavremo tudi de novo sintezo nukleinskih kislin, kar povzroči počasen propad mielomskih celic, zlite celice, ki imajo delujočo HGPRT, pa lahko ob dodatku hipoksantina in timidina preživijo in uporabljajo pomožno pot za sintezo nukleotidov (Vozelj, 2000). Ko se hibridomi ustrezno razrastejo, testiramo prisotnost zelenih Abs v

supernatantu ter tiste linije, ki proizvajajo protitelesa ustrezne specifičnosti, kloniramo in s tem zagotovimo monoklonalnost.

2.2 ANTIIDIOTIPSKA PROTITELESA

2.2.1 Idiotipske determinante

Z izrazom idiotip so označene antigenske značilnosti variabilne regije na posameznem protitelesu. Sprva so predpostavljali, da so le-te edinstvene in da imata dve protitelesi z isto specifičnostjo različno AK zaporedje, torej nehomologne idiotipe. Danes je znano, da je idiotip sestavljen iz idiotipskih determinant ali idiotopov, posamezni idiotopi pa se lahko pojavljajo tudi na protitelesih različnih razredov. Vsak fragment Fab imunoglobulina nosi en paratop in set idiotopov (Vozelj, 2000). Idiotopi se nahajajo kjerkoli na variabilni domeni protitelesa, vse do prve konstantne domene, obsegajo lahko tako hipervariabilne regije kot tudi ogrodne regije. Ena sama zamenjava AK pa lahko povzroči spremembo idiotopa (Greenspan in Bona, 1993).

Če je gen, ki kodira AK zaporedje idiotopa, nastal s somatsko mutacijo v segmentih V, J in D (težka veriga), je zelo majhna verjetnost, da se ta idiotop pojavlja tudi pri drugem posamezniku, ne glede na to, da gre za protitelesa iste specifičnosti. Take idiotope imenujemo zasebni idiotopi. V primeru, da gen zarodne linije določa idiotop, se slednji nahaja tudi pri drugih posameznikih s tem genom. Te dedne idiotope imenujemo navzkrižno reaktivni idiotopi (Nisonoff, 1991).

2.2.2 Antiidiotipska protitelesa

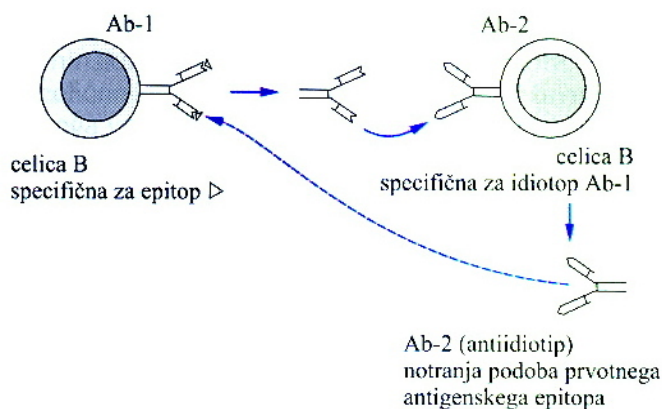
Leta 1974 je Jerne predpostavil, da lahko idiotope, ki jih izraža posamezno protitelo, prepoznajo druga protitelesa, imenovana antiidiotipska (anti-Id) protitelesa, ki nastajajo v lastnem organizmu. Postavil je teorijo idiotipske mreže, ki prikaže celoten imunski sistem kot mrežo medsebojno reagirajočih paratopov, ki prepoznava sete idiotopov. Protitelesa so torej molekule, ki vsebujejo paratope, hkrati pa tudi epitope, ki jih prepoznajo anti-Id protitelesa. Idiotipske interakcije naj bi imele ključno vlogo pri regulaciji normalnega

imunskega odziva ter pri vzpostavitvi učinkovitega B celičnega repertoarja. Iz teorije idiotipske mreže izhaja tudi ugotovitev, da je lahko paratop sestavljen iz segmentov, ki se obnašajo kot epitopi. To pomeni, da se na isto mesto na protitelesu lahko vežeta antigen in hkrati anti-Id protitelo, kar pomeni, da sta strukturno podobna. Sklepamo torej lahko, da je antiidiotip notranja podoba antigena, zato bi lahko anti-Id protitelo posnemalo delovanje antigena v bioloških reakcijah, čemur pravimo molekularna mimikrija (Jerne, 1974) (slika 2).

V raziskavi, v kateri so prvič uporabili metodo rentgenske difrakcije za določevanje zgradbe kompleksa idiotop – antiidiotop, pa molekularne mimikrije niso v celoti potrdili. Analizirali so kompleks fragmentov Fab protitelesa proti lizocimu in njegovega anti-Id protitelesa. Sedem od trinajstih AK, ki so sestavljale idiotop protitelesa in so se nahajale na hipervariabilnih regijah lahkih in težkih verig, je interagiralo tudi z antigenom - lizocimom. V tem primeru se paratop in idiotop nista popolnoma prekrivala. Fragmenta Fab v kompleksu sta interagirala večinoma preko variabilnih domen lahkih verig, protitelo pa je z antigenom interagiralo s težkimi verigami. Ker se je vezavno mesto protitelesa razlikovalo v odvisnosti od tega, ali je bilo v kompleksu z antigenom ali z antiidiotipom, so raziskovalci sklepali, da anti-Id protitelesa ne odražajo vedno notranjih podob osnovnega antigena (Pan in sod., 1995).

Pri sledečih raziskavah se je nedvomno potrdila teza o molekularni mimikriji. Ban je s sodelavci raziskoval kompleks fragmentov Fab mAb proti glikoproteinu E2 iz kapside virusa mačjega peritonitisa ter njegovega anti-Id protitelesa. Fragmenta sta tudi v tem primeru interagirala preko CDR regij, večji del idiotopa mAb se je nahajal na težki verigi. Ker je protitelo lahko vezalo tudi denaturirani antigen, so predpostavili, da je za vezavo bolj pomembno AK zaporedje kot pa prostorska ureditev antigena. S primerjavo AK zaporedja CDR regij anti-Id protitelesa in antigena so ugotovili visoko stopnjo homologije. Zaporedji dveh hipervariabilnih regij na lahki in težki verigi sta se skoraj popolnoma ujemali z zaporedjem antigena, v vsaki sekvenci pa je bila ena konzervativna AK zamenjava (Ban in sod., 1994). V naslednjem poskusu so pripravili kunčje mAbs proti peptidnemu hormonu angiotenzinu II (AII) ter z njimi ponovno imunizirali kunce in pridobili anti-Id protitelesa. Slednja so izolirali, z njimi imunizirali miši ter tako pridobili anti-anti-Id protitelesa, ki so imela približno enako afiniteto vezave antigena – AII kot primarna mAbs. S primerjavo AK zaporedij variabilnih regij omenjenih protiteles so zopet

potrdili visoko stopnjo homologije s samo nekaj zamenjanimi AK. Na podlagi rezultatov so sklepali, da je anti-Id protitelo izražalo notranjo podobo antigena AII in je hkrati imelo vlogo epitopa pri vezavi anti-anti-Id protitelesa (Garcia in sod., 1992).



SLIKA 2: Imunizacija z mAb (Ab-1) specifičnim za epitop (▷) izzove nastanek anti-Id mAb (Ab-2), ki je specifičen za idiotop Ab-1 in zato izraža notranjo podobo prvotnega antigenkega epitopa (▷) (Vozelj, 2000).

2.2.3 Uporaba anti-Id protiteles

Spoznanje, da lahko del variabilne regije anti-Id protitelesa ponazarja strukturo antigena, je odprlo številne nove možnosti za njihovo uporabo v raziskavah, diagnostiki in terapiji. S številnimi raziskavami so dokazali, da lahko protitelo, ki je analogno epitopu antigena, opravlja enako biološko vlogo kot sam antigen.

Omenjena protitelesa je moč uporabiti v raziskavah delovanja encimov, kjer prevzamejo katalitično aktivnost encima, zato taka anti-Id protitelesa imenujemo tudi abcima. Prvi tak primer je bil dokazan s pomočjo encima acetilholinesteraze. Anti-Id protitelesa so pridobili z imunizacijo miši z mAbs proti encimu. Kljub temu, da aktivno mesto abcima po primarni strukturi ni bilo podobno katalitičnemu centru encima, pa je abcim uspešno hidroliziral enake substrate. Njegova katalitična aktivnost je posledica tridimenzionalne strukture, v kateri se ključne AK nahajajo v pravilni orientaciji, ki je potrebna za hidrolizo substrata (Izadyar in sod., 1993). Podobno encimsko mimikrijo so odkrili tudi Ward in sodelavci, ko so z imunizacijo miši pripravili anti-Id protitelesa proti kutinazi, encimu, ki hidrolizira

kutin (komponenta celične stene rastlin, sestavljena iz hidroksi maščobnih kislin). Njeno delovanje lahko inhibirajo organofosfatni pesticidi, ki so se včasih široko uporabljali v kmetijstvu in zaradi njihove akumulacije v okolju danes predstavljajo velik ekološki problem. Raziskovalci so ugotovili, da paratopi pridobljenih anti-Id protiteles proti kutinazi izražajo podobno strukturo kot katalitično mesto encima ter z visoko afiniteto vežejo omenjene pesticide in jih tudi delno razgradijo. Zaradi te lastnosti so potencialno uporabni v hitrih presejalnih testih za ugotavljanje kontaminacije okoljskih vzorcev (Ward in sod., 1999).

Možnost uporabe anti-Id protiteles se obeta tudi v raziskovanju površinskih celičnih receptorjev, ki jih je težko izolirati v količinah, zadostnih za imunizacijo. Z omenjenimi protitelesi, ki kot imunogeni posnemajo vezišče receptorja, pa lahko na enostaven način pridobimo mAbs proti receptorju, ki ga želimo izolirati. Na ta način so izolirali že številne celične receptorje za hormone in signalne molekule, kot npr. receptor za inzulin, glukagon, gonadotropin, bradikinin, alprenolol, morfin in druge (Greenspan in Bona, 1993).

Zaradi notranje podobe so anti-Id protitelesa uporabna tudi v terapevtske namene za razvoj cepiv. To je zlasti uporabno v primerih, ko je antigen toksičen in ga ni možno uporabiti kot imunogen, za nadomestitev cepiv, ki imajo preveč stranskih učinkov ali pa v primeru, ko so antigeni sestavljeni iz ogljikovih hidratov, proti katerim s klasičnimi metodami ni mogoče vzpodbuditi učinkovitega imunskega odziva. V preglednici 1 so zbrani patogeni mikroorganizmi, proti katerim so z uporabo anti-Id cepiv izzvali določen imunski odziv (Greenspan in Bona, 1993). S skrbno izbranim antigenom posameznega patogenega mikroorganizma so imunizirali poskusne živali in tako pridobili idiotipska protitelesa. Z imunizacijo z idiotipskimi mAbs so pridobili anti-Id protitelesa, ki so jih zopet uporabili kot antigene za cepljenje poskusnih živali ter tako izzvali imunski odziv. Uporaba omenjenih protiteles pa predstavlja tudi nov način boja proti raku. Z uporabo mišjih anti-Id mAbs z notranjo podobo humanih tumorskih antigenov je uspelo vzpodbuditi aktivno protitumorsko imunost pri več bolnikih z rakom, kar je velika vzpodbuda za razvoj novih terapij (Bhattacharya – Chatterjee in sod., 2000).

PREGLEDNICA 1: Patogeni mikroorganizmi, za katere so v eksperimentalnih modelih z uporabo anti-Id protiteles, ki nosijo notranjo podobo antigena, izzvali imunski odziv pri poskusnih živalih (Greenspan in Bona, 1993).

Patogeni mikroorganizem	Imunski odziv na anti-Id mAbs
Hepatitis B	Zaščitna protitelesa
Reovirus tipa 3	Nevtralizirajoča protitelesa
Virus stekline	Protitelesa proti hemaglutininu
Virus gripe	Nevtralizirajoča protitelesa
<i>Escherichia coli</i>	Protitelesa proti proteinu kapsule
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Protitelesa proti ogljikovim hidratom celične stene
<i>Legionella pneumophila</i>	Protitelesa proti citolizinu
<i>Schistosoma mansoni</i>	Zaščitna protitelesa
<i>Trypanosoma spp.</i>	Zaščitna protitelesa

Antiidiotipska protitelesa so želeli pridobiti tudi raziskovalci v Centru za razvoj in izdelavo diagnostičnih reagentov (CRIDR) Zavoda RS za transfuzijsko medicino, kjer se ukvarjajo z razvojem monoklonskih protiteles, uporabnih v diagnostiki in morda tudi terapiji prionskih bolezni. Ena od možnih metod za pridobivanje mAbs temelji tudi na imunizaciji miši z antiidiotipskimi protitelesi, ki bi ponazarjala strukturo epitopa kužnega prionskega proteina – povzročitelja prionskih bolezni in bi tako učinkovito posnemala prvotni antigen. Taka anti-Id protitelesa bi bila hkrati tudi uporabna za bazične raziskave omenjenih bolezni, za razvoj aktivnih cepiv ter pri preučevanju tridimenzionalne zgradbe prionskega proteina.

2.3 PRIONSKE BOLEZNI

Prenosljive spongiformne encefalopatije, kot tudi imenujemo prionske bolezni, so degenerativna obolenja centralnega živčnega sistema (CŽS), ki prizadenejo tako ljudi kot živali. Po dolgi inkubacijski dobi se bolezen kaže na različne načine, največkrat se pojavi izguba spomina ter motnje v obnašanju in gibanju. Smrt je v primeru TSE neizogibna, saj zdravilo zanjo še ne obstaja. Na histoloških preparatih možganov umrlih se opazi

kopičenje amiloidnih plakov in pojavljanje luknjic zaradi propada nevronov in glioze, kar daje možganom spužvast izgled (Prusiner, 1998). Za bolnika pa je značilna tudi vsakršna odsotnost imunskega odziva.

Prionske bolezni se pri človeku lahko pojavijo v več oblikah (preglednica 2). Prva je bila opisana sporadična Creutzfeldt-Jakobova bolezen (angl. sporadic Creutzfeldt-Jacob disease - sCJD), katere izvora še ne poznamo, predvidevajo pa, da se razvije spontano (85 % primerov CJD). Najverjetnejši vzrok je somatska mutacija gena, ki kodira prionski protein ali pa spontana naključna konformacijska sprememba celičnega prionskega proteina v patološko obliko. Dedne oblike - dCJD (10-15 % primerov CJD) nastopajo v posameznih družinah in so posledica mutacij prionskega gena v spolnih celicah (Pedersen in Smith, 2002). Pri nekaj sto bolnikih so odkrili tudi iatrogeno CJD (iCJD), ki naj bi bila posledica kirurških posegov. Bolezen so prenesli s presaditvijo roženice, možganskih ovojnic ali z ekstraktom rastnega hormona in gonadotropina ljudi, umrlih za CJD. Možen je tudi prenos s kontaminiranimi kirurškimi instrumenti in elektrodami med operativnimi posegi na možganih. Podobno obliko bolezni so odkrili tudi pri plemenu Fore na Papui Novi Gvineji. Bolezen, imenovana Kuru, se je pojavila pri ženskah in otrocih, ki so v kanibalističnih obredih pripravljali in uživali posmrtno ostanke, vključno z možgani svojih preminulih sorodnikov (Gajdusek in Zigas, 1957). V zadnjem času je največ pozornosti usmerjeno na preučevanje različice CJD (angl. variant CJD - vCJD), ki se je pojavila sredi devetdesetih let v Veliki Britaniji. Ta se od sporadične oblike loči po precej krajši inkubacijski dobi in zelo nizki povprečni starosti obolelih ter prisotnosti prionov v limfatičnem tkivu. Zanje obolevajo predvsem mlajše osebe povprečne starosti 29 let, medtem ko je pri sCJD povprečna starost 60 let (Collins in sod., 2004). Velja hipoteza, da se je bolezen prenesla na človeka z goveda in sicer z uživanjem mesnih izdelkov, ki so bili okuženi s povzročiteljem goveje spongiformne encefalopatije (angl. **Bovine Spongiform Encephalopathy – BSE**). Govedo pa naj bi se okužilo pri krmljenju s kostno moko, ki je vsebovala ostanke s praskavcem (angl. scrapie) okuženih ovac, ki ni bila dovolj termično obdelana. Poleg prenosa bolezni na ljudi s hrano pa je v zadnjih letih skrb zbujajoč tudi prenos s transfuzijo krvi dajalcev, ki so subklinični prenašalci bolezni (Bird, 2004). Ker še ne obstaja specifičen diagnostični test za odkrivanje s prioni okužene krvi, se raziskovalci bojijo, da lahko kljub trenutnemu zatišju sledi nov val obolelih z vCJD.

PREGLEDNICA 2: Pregled prionskih bolezni pri ljudeh in živalih (Prusiner, 1998)

Bolezen	Gostitelj	Vzrok
Kuru	Pleme Fore	Obredni kanibalizem
iCJD	Človek	Okužba s prioni okuženega humanega darovanega tkiva , hormonov ali preko okuženih medicinskih instrumentov
vCJD	Človek	Okužba z govejimi prioni
sCJD	Človek	Somatska mutacija ali spontana pretvorba PrP ^C v PrP ^{Sc}
dCJD	Človek	Mutacija v <i>PRNP</i> genu zarodne linije
GSS	Človek	Mutacija v <i>PRNP</i> genu zarodne linije
FFI	Človek	Mutacija v <i>PRNP</i> genu zarodne linije
FSI	Človek	Somatska mutacija ali spontana pretvorba PrP ^C v PrP ^{Sc}
Praskavec	Ovce, koze	Somatska mutacija ali spontana pretvorba PrP ^C v PrP ^{Sc}
BSE	Govedo	Okužba z mesno-kostno moko
TME	Kune	Okužba z govejimi ali ovčjimi prioni
CWD	Jelenjad, losi	Neznan
FSE	Mačke	Okužba z govejim tkivom ali mesno-kostno moko

iCJD: iatrogena CJD; vCJD: različica CJD; sCJD: sporadična CJD; dCJD: dedna CJD; GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinkerjeva bolezen; FFI: usodna družinska nespečnost; FSI: sporadična družinska nespečnost; BSE: goveja spongiformna encefalopatija; TME: prenosljiva spongiformna encefalopatija pri kunah; CWD: kronično hiranje jelenjadi; FSE: mačja spongiformna encefalopatija.

2.4 PRIONSKI PROTEIN

Zaenkrat velja t. i. "protein only" hipoteza, da so povzročitelji prionskih bolezni najverjetneje proteinski kužni delci, ki jih je Nobelov nagrajenec za medicino leta 1997, Stanley B. Prusiner poimenoval prioni (angl. **proteinaceous infectious particle**) (Prusiner, 1982). Do objave v reviji Science leta 1982 je namreč veljalo, da kužne bolezni povzročajo patogeni mikroorganizmi, ki imajo lastnosti zapisane v genomu, za prione pa je značilno, da so odporni na metode, ki modificirajo nukleinske kisline.

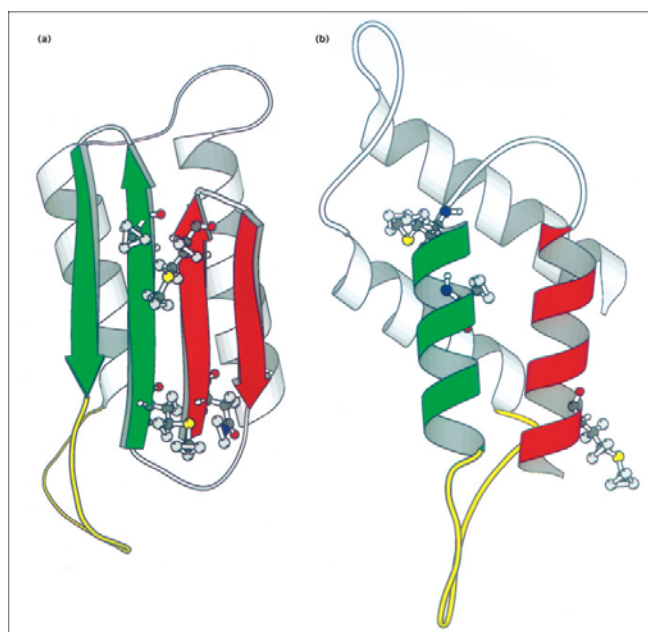
2.4.1 Zgradba prionskega proteina

Celični prionski protein je približno 33 kDa velik glikoprotein, ki je prisoten na vseh celicah organizma, največ pa se ga izraža v CŽS. Sestavljen je iz 253 aminokislin, ki ga

kodira 16 kb velik gen (*PRNP* pri človeku, *Prnp* pri miših). Med posttranslacijsko modifikacijo se odcepi začetnih 22 ter končnih 23 aminokislin, na C konec pa se pripne glikozilfosfatidilinozitolno (GPI) sidro, preko katerega je prionski protein (PrP) vezan na zunanjo celično površino. PrP se običajno nahaja v specializiranih membranskih domenah, imenovanih lipidni rafti, ki so bogati s proteini, holesterolom in glikosfingolipidi (Prado in sod., 2004). Biološka vloga PrP^C zaenkrat še ni znana, domnevajo pa, da naj bi celice ščitil pred oksidativnim stresom in apoptozo, sodeloval naj bi v metabolizmu bakra, vplival pa naj bi tudi na celično signalizacijo, prenos signalov v sinapsah ter na cirkadiani ritem (Prusiner, 1998). Kljub naštetemu pa pri transgenih miših z izbitim genom za prionski protein (*Prnp*^{0/0}) niso odkrili večjih sprememb.

2.4.2 Celični in patološki prionski protein

PrP obstaja v dveh izooblikah, ki predstavljata stabilni konformaciji: celična PrP^C in patološka oblika PrP^{Sc} (angl. **sc**rapie - Sc). Primarna struktura PrP^C in PrP^{Sc} sta popolnoma identični, razlikujeta pa se v strukturah višjih stopenj. Za PrP^C je značilno, da vsebuje 43 % α -vijačnic in 3 % β -ploskev, medtem ko je v molekuli PrP^{Sc} 30 % α -vijačnic in 43 % β -ploskev (Pan in sod., 1993) (slika 3). Lastnosti obeh izooblik so odvisne od njune strukture. PrP^C je topen v detergentih, proteinaze ga popolnoma razgradijo, njegov razpolovni čas je zelo kratek. PrP^{Sc} pa je izjemno stabilen, odporen na visoke temperature in ni topen v detergentih. Proteinaza K ga le delno razgradi, pri čemer ostane 27 kDa velik protein PrP^{res} (angl. **re**sistant - res), ki je tudi infektiven. PrP^{Sc} se v možganih akumulira in polimerizira v fibrile in tvori značilne amiloidne plake. Natančne zgradbe PrP^{Sc} ne poznamo, saj zaradi netopnosti proteina znanstvenikom zaenkrat še ni uspelo določiti njegove tridimenzionalne strukture.

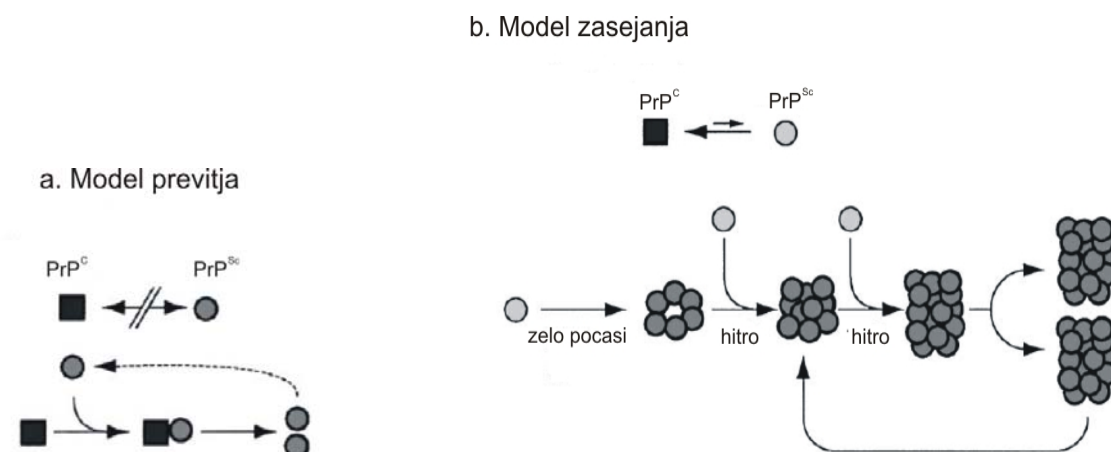


SLIKA 3: Modela domnevne terciarne strukture PrP^C (a) in PrP^{Sc} (b) (Huang in sod., 1995)

2.4.3 Pretvorba PrP^C v PrP^{Sc}

Danes je uveljavljena teza, da so prionske bolezni posledica pretvorbe normalno funkcionalnih proteinov v patološko izoobliko, ki lahko polimerizira in izgubi primarno biološko vlogo (Prusiner, 1998). Še vedno pa ni natančno jasno, kakšen je mehanizem pretvorbe PrP^C v patološko obliko. Nekateri raziskovalci menijo, da do pretvorbe pride v lipidnih raftih, kjer je večja koncentracija celičnih PrP. Drugi pa predpostavljajo, da do pretvorbe pride znotrajcelično, saj PrP^{Sc} najpogosteje najdemo v lizosomih okuženih celic, redkeje pa na površini. Sama pretvorba je posttranslacijski proces, v katerem pride do konformacijskih sprememb v proteinu. V zadnjem času se pojavljata dva modela pretvorbe prionskega proteina v patološko obliko (slika 4). Prvi je model previtja, ki predpostavlja, da naj bi PrP^{Sc} nastal po predhodnem prileganju delno razvitega PrP^C na že obstoječ matrični PrP^{Sc}. Pri tem naj bi nastal heterodimer, ki naj bi znižal aktivacijsko energijo in tako omogočil nadaljnjo pretvorbo (slika 4a). Model zasejanja (slika 4b) pa predvideva, da sta PrP^C in PrP^{Sc} v dinamičnem ravnotežju, ki je v normalnih bioloških pogojih pomaknjeno v smer PrP^C. V primeru, da pride do tvorbe v PrP^{Sc}, je ta oblika stabilna samo, če se veže v skupek z drugimi patološkimi PrP. Nastali skupek premakne ravnotežje

ireverzibilno v smer PrP^{Sc} . Oba modela dopuščata možnost, da na pretvorbo vplivajo še kakšne druge molekule, kot na primer protein X (Dormont, 2002) ali nukleinske kisline (Deleault in sod., 2003), ki naj bi delovale kot katalizatorji pretvorbe.



SLIKA 4: Modela pretvorbe PrP^{Sc} (Weissmann, 2002)

2.4.4 Imunski odziv proti prionskim proteinom

Pomembna lastnost prionskih bolezni je, da pri obolelih niso zasledili nobenega imunskega odziva. Prusiner je opazil, da bolnica, ki ji je bolezen v dveh mesecih razkrojila možgane, ni imela nobenih bolezenskih znakov in tudi protitelesnega odziva niso zaznali (Prusiner, 1998). Danes je znano, da sta obe izoobliki PrP^{C} in PrP^{Sc} zelo slabo imunogeni, zato je imunski odziv nanju možno izzvati samo v organizmu druge vrste (Paraf, 1998). Dodaten problem predstavlja dejstvo, da je PrP zelo ohranjen pri različnih vrstah. Vzrok za odsotnost imunskega odziva je toleranca do lastnih in lastnim podobnih proteinov, odpornost PrP^{Sc} na proteolitsko razgradnjo in zato slaba predstavljivost na antigen predstavitevni celicah ter imunska privilegiranost CŽS, ki onemogoča razvoj klasičnega imunskega odziva (White in Hawke, 2003). Šibka imunogenost PrP predstavlja težavo pri pridobivanju kakovostnih monoklonskih protiteles, potrebnih za raziskave ter za razvoj diagnostičnih in terapevtskih metod.

Slabemu imunskemu odzivu so se raziskovalci izognili z imunizacijo miši $\text{Prnp}^{0/0}$. Kascaku in sodelavcem je že pred tem uspelo pridobiti visoko afinitetna mAbs proti PrP. Protitelo 3F4, ki se še danes uporablja pri posmrtni diagnostiki CJB, so pridobili z

imunizacijo miši Balb/c z velikimi dozami PrP^{Sc} fibril, izoliranih iz možganov okuženega hrčka. Na ta način so potrdili, da je imunski odziv možno sprožiti tudi pri živalih divjega tipa (Kascak in sod., 1987). Ker pa je izolacija PrP težavna in nevarna, so se raziskovalci usmerili v razvoj boljšega imunogena, ki bi vzpodbudil imunski odziv. Tako so uporabili različne peptidne dele iz primarne strukture PrP ter rekombinantne proteine različnih sesalcev (Korth in sod., 1997). Peptidi, ki so zaradi večje imunogenosti vezani na nosilno molekulo govejega serumskega albumina (angl. **bovine serum albumin** - BSA) ali hemocianina iz školjke (angl. **keyhole limpet haemocyanine** - KLH), lahko zavzamejo številne različne konformacije, tudi telesu tuje in se zato izognejo imunski toleranci.

Tako so tudi v CRIDR poskušali izzvati imunski odziv z uporabo različnih imunogenov. Najbolje se je izkazal peptid P1, proti kateremu so pridobili za PrP^{Sc} specifična mAbs (Čurin Šerbec in sod., 2004). Peptid P1 iz zaporedja humanega prionskega proteina AK 214-226 zavzema del α -vijačnice 3 iz C-terminalnega dela in je sestavljen iz 13 AK: H₂N - cistein – izolevcin – treonin – glutamin – tirozin – glutaminska kislina – arginin – glutaminska kislina – serin – glutamin – alanin – tirozin – tirozin – COOH (CITQYERESQAYY). C214 se v PrP s S-S mostičkom veže s C179. Za to zaporedje so se odločili na podlagi znanih dejavnikov imunogenosti, kot so dolžina peptida, vsebnost hidrofilnih ter aromatskih AK. Tako vsebuje peptid večji delež hidrofilnih aminokislin, dvojico YY, ki daje peptidu obliko (Paramithiotis in sod., 2003), AK 215 in 219 pa naj bi bili domnevni vezavni mesti za protein X. Verjetnost za nastanek nespecifičnih protiteles so izključili, saj po podatkih programa BLAST peptida P1 ne najdemo v primarni strukturi nobenega drugega znanega proteina. Peptid P1 lahko v raztopini zavzame različne konformacije, tudi take, ki so prisotne izključno na PrP^{Sc}, zato lahko vzbudi nastanek specifičnih protiteles. Peptid ima molekulsko maso 1653,8 Da in hitro oksidira (Čurin Šerbec in sod., 2004; Pretnar Hartman, 2005; Vranac, 2005; Vranac in sod., 2006, v tisku).

2.4.5 Monoklonska protitelesa proti PrP

V predhodnih raziskavah so v skupini pripravili številna monoklonska protitelesa proti PrP. Eno od njih (V5B2) smo v naši raziskavi uporabili za pripravo imunogena, ostala pa za načrtovanje in optimizacijo testa za izbiro ustreznih protiteles.

2.4.5.1 V5B2

MAb V5B2, ki je najpodrobneje okarakterizirano protitelo, so pridobili z imunizacijo miši s peptidom P1, kovalentno vezanim na KLH. Protitelo razreda IgG1 naj bi prepoznavalo dimere in/ali oligomere peptida P1, ki naj bi ponazarjali strukturo epitopa na PrP^{Sc}, ne pa tudi na PrP^C (Poklar Ulrih in sod., 2006). Zanj je značilno, da selektivno veže različne tipe agregata PrP^{Sc} brez kakršnekoli predpriprave vzorca ali odstranjevanja PrP^C, ne prepozna denaturirane niti nativne oblike recPrP ter PrP^C v možganih in se z enako afiniteto veže na humano in mišje zaporedje peptida P1. Je torej specifično za nativno obliko PrP^{Sc} brez encimske razgradnje ter tako uporabno v diagnostičnih metodah IHK (imunohistokemična reakcija), testu ELISA in modificiranem postopku po Westernu (Čurin Šerbec in sod., 2004; Vranac, 2005; Pretnar Hartman, 2005; Vranac in sod., 2006, v tisku).

V naši raziskavi smo z imunizacijo miši s fragmentom Fab mAb V5B2 želeli pridobiti anti-Id mAbs proti FabV5B2, ki bi vsebovala notranjo podobo peptida P1.

2.4.5.2 E9/5

Protitelo podrazreda IgG2a je pridobljeno po imunizaciji miši Balb/c (izražajo PrP) s P1-KLH. Tudi E9/5 spada v družino mAbs, specifičnih za PrP^{Sc}. V imunoloških tehnikah je precej podobno protitelesu V5B2, vendar s pomembno razliko: medtem ko V5B2 z enako afiniteto prepozna tako P1 kot mišjo različico peptida P1 (P1m), je E9/5 specifično le za humano zaporedje P1. Minimalna epitopa protiteles sta torej različna, kljub temu pa specifična za PrP^{Sc}. Epitop protitelesa E9/5 naj bi se nahajal na skrajnem C- terminalnem delu peptida P1, ki ga sestavlja AK zaporedje SQAYY (Vranac, 2005; Vranac in sod., 2006, v tisku).

2.4.5.3 C1/1

Pridobljeno je po imunizaciji miši Balb/c s peptidom P1 vezanim na KLH. Protitelo je podrazreda IgG1, veže se na P1 in se ne veže na KLH ali konjugat. V IHK reagira tako z vzorci zdravih kot tudi okuženih možganov, ne prepozna pa nativne oblike PrP^C. Znan je tudi minimalni epitop na mišjem PrP, čigar AK zaporedje je ERSQA(Y), prva E

(glutaminska kislina) in R (arginin) pa sta lahko zamenjana s Q (glutamin) in K (lizin) (Vranac, 2005; Vranac in sod., 2006, v tisku).

2.4.5.4 E12/2

Protitelo E12/2, ki je pridobljeno po imunizaciji miši Balb/c s celotnim rekombinantnim govejim PrP (angl. **recombinant bovine** PrP - recBoPrP), prepoznajo tako recBoPrP in recHuPrP (angl. **recombinant human** PrP) kot tudi celični in patološki obliki PrP, ne prepoznajo pa mišjega PrP^C. So podrazreda IgG1, epitop pa sestavlja AK zaporedje 144-156, ki se nahaja na področju α -vijačnice 1 na osrednjem delu molekule PrP (Černilec in sod., 2006, v pripravi).

Podatki za vsa mAbs so zbrani v preglednici 3.

PREGLEDNICA 3: Protitelesa, ki smo jih uporabljali pri našem delu in njihove lastnosti

Protitelo	Antigen	Podrazred	Specifičnost
V5B2	P1-KLH	IgG1	PrP ^{Sc}
E9/5	P1-KLH	IgG2a	PrP ^{Sc}
C1/1	P1-KLH	IgG1	PrP ^C , PrP ^{Sc}
E12/2	recBoPrP	IgG1	PrP ^C , PrP ^{Sc}

2.5 CILJ RAZISKOVANJA

Namen našega dela sodi v širši projekt določevanja tridimenzionalne strukture epitopa patološke izooblike prionskega proteina. Ena od metod temelji na reševanju strukture posameznih epitopov proteina ter kasnejšem računalniškem modeliranju. S kristalografskimi študijami kompleksa fragmenta Fab idiotipskega in antiidiotipskega monoklonskega protitelesa bi radi določili strukturo specifičnega PrP^{Sc} epitopa.

Cilj pričujočega diplomskega dela je bila izbira monoklonskih anti-Id protiteles, ki se selektivno vežejo na variabilne regije mAb V5B2. Z izolacijo nukleinskih kislin izbranih klonov smo želeli določiti nukleotidno zaporedje variabilnih regij lahkih in težkih verig protiteles ter primerjati njihovo aminokislinsko zaporedje z AK zaporedjem peptida P1 iz primarne strukture humanega prionskega proteina, proti kateremu je bilo mAb V5B2 pripravljeno. V AK zaporedju hipervariabilnih regij anti-Id mAbs smo poskušali najti motiv peptida P1. Pri raziskavi so nas vodila sledeča pričakovanja:

- imunizacija miši z Fab V5B2, ki selektivno prepozna patološko obliko priona, bi povzročila nastanek mAbs proti različnim epitopom na fragmentu Fab;
- anti-idiotipsko mAbs, ki bi bilo usmerjeno proti hipervariabilni regiji Fab V5B2, bi lahko ponazarjalo strukturo PrP^{Sc} specifičnega epitopa;
- klone, ki proizvajajo anti-Id mAbs, ki selektivno prepoznavajo hipervariabilno regijo mAb V5B2, bi izbirali na podlagi presejalnih testov, kjer bi kot antigene za negativno selekcijo uporabili fragmente Fab različnih mAbs proti prionskemu proteinu;
- informacija o aminokislinskem zaporedju antigena (v našem primeru peptida P1) bi se lahko ohranila v idiotipskem protitelesu proti antigenu ter se ponovno pojavila v hipervariabilni regiji antiidiotipskega protitelesa.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA PROTITELES ZA NEGATIVNO SELEKCIJO

Preden smo lahko začeli uporabljati protitelesa, ki smo jih kot antigene uporabili za negativno selekcijo, jih je bilo potrebno še ustrezno pripraviti. Na razpolago smo imeli zamrznjen supernatant izčrpanih celičnih linij, ki proizvajajo mAbs C1/1, mAbs E12/2 so bila že očiščena na proteinu G in pripravljena za razgradnjo, mAbs E9/5 pa so bila očiščena, alikvotirana in zamrznjena.

3.1.1 Čiščenje protiteles

V supernatantih izčrpanih celic se poleg protiteles nahaja tudi veliko drugih proteinov, kot so albumin, transferin, serumski imunoglobulini. Ti proteini, ki izvirajo iz govejega seruma, dodanega v medij za gojenje celic, lahko motijo izvedbo testov, zato jih je potrebno odstraniti. Za čiščenje in izolacijo protiteles iz supernatanta centrifugiranih izčrpanih celic se najpogosteje uporablja afinitetna kromatografija, ki temelji na specifičnih, nekovalentnih in reverzibilnih reakcijah. Če eno od komponent para kovalentno vezemo na matriks in na tako pripravljen gel nanesemo vzorec, lahko pride do nekovalentne vezave druge komponente, ki jo lahko ob spremenjenih kemijskih pogojih (pH, ionska jakost) eluiramo. Za čiščenje protiteles smo uporabili protein G, vezan na sefarozo (Sigma, ZDA). Protein G je rekombinanten, v *E. coli* izražen protein, ki ima odstranjeno regijo za vezavo albumina. Tak protein specifično veže regije Fc imunoglobulinov razreda IgG skoraj vseh sesalskih vrst.

Kolono (12 ml) z omočeno frito smo napolnili s 3 ml proteina G, vezanega na sefarozo v 20 % etanolu. Vezalna kapaciteta tako pripravljene kolone je več kot 20 mg humanih IgG na ml proteina G, vezanega na sefarozo (po navodilih proizvajalca). Ko se je gel posedel, smo ga po principu natege sprali z 20 ml ledeno hladnega spiralnega pufra, nato je sledil nanos 100 ml supernatanta izčrpanih centrifugiranih celic C1/1 ter inkubacija 30 minut pri +4 °C. Kolono smo sprali s 100 ml spiralnega pufra, s čimer smo s kolone odstranili vse

nevezane snovi, ki so se v gelu zadržale zaradi kapilarnosti. Protitelesa, vezana na protein G, smo eluirali z elucijskim pufrom, ki ima pH 2,7. V epruvetke smo lovili frakcije po 2 ml, katerim smo izmerili pH s pH indikatorskim papirjem ter ga takoj nevtralizirali z dodatkom nekaj kapljic 1 M Tris. Vsaki frakciji smo odvzeli 10 μ l vzorec ter ga zmešali s 100 μ l Bradfordovega reagenta, ki se ob prisotnosti proteinov v vzorcu obarva modro. Obarvanim frakcijam smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 280 nm. Koncentracijo proteinov v mg/ml smo izračunali po enačbi:

$$c = A / l \times \epsilon$$

Absorbanca (A) je brez enote, dolžino optične poti (l) merimo v cm, molarni ekstincijski koeficient (ϵ) za IgG pa znaša 1,43 ml/(mg x cm). Frakcije z zadostno količino proteinov ($A_{280} > 0,1$) smo združili, dializirali proti pufru PBS (phosphate buffered saline – PBS) ter koncentrirali s pomočjo Centripeg YM-30 (Amicon, Millipore, ZDA) do koncentracije približno 1 mg/ml. Centripeg YM-30 je priprava, ki zadržuje molekule večje od 30 kDa, prepušča pa ione, vodo ter molekule z manjšo molekulsko maso. Tudi končno koncentracijo smo izračunali s pomočjo merjenja absorbance pri 280 nm. Očiščena protitelesa smo v primernih alikvotih shranili pri -20 °C. Kolono smo regenerirali s 100 ml spiralnega pufra, nato pa še s 100 ml 1M NaCl. Visoka ionska jakost naj bi povzročila elucijo tudi zelo močno vezanih molekul, vendar smo se kljub temu izogibali uporabe iste kolone za čiščenje različnih protiteles. Za dolgotrajnejše shranjevanje smo kolono sprali in jo shranili v 20 % etanolu pri +4 °C.

Materiali:

spiralni pufer: 20 mM natrijev fosfat, 0,5 M NaCl, pH 8,0;

elucijski pufer: 0,1 M glicin, pH 2,7;

nevtralizacijski pufer: 1 M Tris, pH 9,0;

regeneracija kolone: 1 M NaCl.

3.1.2 Razgradnja s papainom

Pri ELISA testih smo kot antigene, s katerimi smo prekrili dno vdolbinic na mikrotitrski ploščici, uporabljali fragmente Fab protiteles C1/1 in E12/2. Fragmente Fab smo uporabljali zato, ker smo kot sekundarna protitelesa uporabljali kozja anti-mišja anti-IgG protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo. S tem smo preprečili pojav lažno pozitivne reakcije. Fragmente Fab smo pridobili po cepitvi protiteles z imobiliziranim papainom (Pierce, ZDA). Papain je nespecifična rastlinska endopeptidaza, ki vsebuje v aktivnem mestu sulfhidrilno skupino. Za aktivnost encima mora biti sulfhidrilna skupina v reducirani obliki. V prisotnosti cisteina encim cepi protitelesa IgG na mestu zgiba med C_{H1} in C_{H2} domenama težke verige, pri čemer nastaneta dva identična fragmenta Fab in en fragment Fc. Po razgradnji lahko fragmente ločimo s pomočjo proteina A ali z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Imobiliziran papain nam je omogočil pridobivanje čistih končnih vzorcev s fragmenti Fab in Fc, v katerih ni prisotnega encima. Imobiliziran papain ima tudi večjo toplotno odpornost, zmanjšano stopnjo avtolize in zato daljši rok uporabe.

Očiščena protitelesa C1/1 in E12/2 smo dializirali v vzorčnem pufru ter koncentrirali s pomočjo kolone Centripeg YM-30 do koncentracije 20 mg/ml. Koncentracijo smo izračunali s pomočjo merjenja absorbance pri 280 nm. Stekleničko s papainom smo dobro premešali ter v epruvetko odpipetirali 0,5 ml suspenzije. Nato smo dodali 4 ml pufru za razgradnjo, ki smo ga pripravili tik pred uporabo ter centrifugirali 5 minut pri 700 x g, da smo encim sprali. Supernatant smo zavrgli, spiranje s pufrom še enkrat ponovili ter encim resuspendirali v 0,5 ml istega pufru. V 0,5 ml vzorca protiteles smo dodali enak volumen pufru za razgradnjo in vse zmešali z imobiliziranim encimom. Sledila je peturna inkubacija na stresalniku pri 1400 obratih na minuto in pri +37 °C. Reakcijo smo zaustavili z dodatkom 1,5 ml Tris – HCl, centrifugirali (5 minut, 700 x g) ter supernatant shranili pri -20 °C.

Materiali:

vzorčni pufer: 20 mM natrijev fosfat, 10 mM EDTA, pH 7,0;

pufer za razgradnjo: 20 mM natrijev fosfat, 10 mM EDTA, 20 mM cistein-HCl, pH 7,0;

ustavitev encimske reakcije: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.

3.1.3 Čiščenje mešanice po razgradnji

Po razgradnji protiteles s papainom smo morali ločiti fragmente Fab in Fc. To smo ponovno izvedli z metodo afinitetne kromatografije, s pomočjo proteina A, vezanega na agarozo (Pierce, ZDA). Protein A je komponenta celične stene bakterije *Staphylococcus aureus* z molekulsko maso 42000 Da. Ima visoko afiniteto za vezavo regij Fc protiteles razreda G številnih vrst sesalcev.

V čisto kolono z omočeno frito smo dodali 3 ml proteina A, vezanega na agarozo, počakali, da se gel usede ter sprali s 25 ml pufru HSG. Vezalna kapaciteta tako pripravljene kolone je več kot 34 mg humanih IgG na 1 ml gela. V mešanici z razgrajenimi protitelesi C1/1 ali E12/2 smo raztopili NaCl (končna koncentracija je 3 M) in jo nanесли na kolono. Ko je mešanica poniknila v gel, smo kolono zaprli ter inkubirali pol ure pri sobni temperaturi. Fragmente Fab smo s kolone spirali s pufrom HSG in zbirali frakcije po 1 ml. Koncentracijo proteinov v posamezni frakciji smo izračunali s pomočjo merjenja absorbance pri 280 nm, pri čemer smo upoštevali, da je $\epsilon_{\text{Fab}} 1,53 \text{ ml}/(\text{mg} \times \text{cm})$. Frakcije z najvišjo koncentracijo proteinov smo združili, dializirali proti pufru PBS in koncentrirali s kolono Centriprep YM-30. Tudi končno koncentracijo vzorca smo izračunali po merjenju absorbance, vzorec alikvotirali in ga shranili pri -20°C . Preden smo začeli spirati fragmente Fc, smo kolono sprali s 50 ml pufru HSG. Fragmente Fc smo eluirali z elucijskim pufrom z nižjo pH vrednostjo ter ponovno zbirali frakcije po 1 ml. Posamezni frakciji smo takoj izmerili pH in ga nemudoma z nevtralizacijskim pufrom umerili na pH 7,0. Tudi koncentracijo fragmentov Fc smo izračunali s pomočjo merjenja absorbance ($\epsilon_{\text{Fc}} = 1,38 \text{ ml}/(\text{mg} \times \text{cm})$). Frakcije z najvišjo koncentracijo smo združili, koncentrirali, dializirali ter shranili pri -20°C . Po uporabi smo kolono sprali s 100 ml elucijskega pufru, nato pa še z 0,02 % Na-azidom in jo v njem tudi shranili.

Materiali:

pufer HSG: 1,5 M glicin, 3M NaCl, pH 8,9;

uravnavanje pH: 1M Tris, pH 9,0;

shranjevanje kolone: 0,02 % Na-azid.

3.1.4 Test ELISA

Test ELISA (ang. **E**zyme-linked **i**munosorbent **a**ssay) je izredno občutljiva raziskovalna in diagnostična metoda, primerna za analizo večjega števila vzorcev hkrati. S to metodo na podlagi specifične vezave antigena in protitelesa določamo prisotnost molekul v vzorcu. Običajno delamo v mikrotitrskih ploščicah, ki imajo dno vdolbinic prevlečeno z materialom, na katerega adsorbiramo želene molekule. V vzorcih lahko iščemo antigene, pri čemer gre za sendvič test ELISA, ali pa določamo protitelesa z neposrednim ali posrednim testom ELISA. Pri posrednem testu se na antigen vežejo iskana specifična protitelesa, nastale komplekse zaznamo po dodatku sekundarnih protiteles, označenih z encimom. Pri neposrednem testu pa se na antigen vežejo primarna specifična protitelesa, ki so označena z encimom. Pri vseh različicah torej potrebujemo protitelesa, ki so konjugirana z encimom (konjugat). Običajno se uporablja hrenova peroksidaza (HRP), ki katalizira pretvorbo kromogenega substrata, pri čemer pride v vdolbinicah, kjer je potekla uspešna vezava v vseh stopnjah, do barvne reakcije, ki jo izmerimo spektrofotometrično. Izmerjene vrednosti odražajo koncentracijo molekul, ki jih določamo.

3.1.4.1 Testiranje učinkovitosti čiščenja fragmentov Fab

S posrednim testom ELISA smo želeli ugotoviti kakovost razgradnje mAbs. Kot antigen smo uporabili peptid P1 ali recBoPrP, proti katerima so bila protitelesa C1/1 in E12/2 pripravljena. Kot primarna protitelesa smo uporabili vzorce očiščenih nerazgrajenih protiteles, očiščene fragmente Fab in očiščene fragmente Fc. Za vsak vzorec smo pripravili serijo 10-kratnih redčitev ter vsako redčitev nanесли v dve vdolbinici sosednjih stolpcev na mikrotitrski plošči. Test ELISA smo izvedli po standardnem postopku na mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinicami (Corning Costar, ZDA):

- prekrivanje dna vdolbinic s 50 μ l raztopine peptida P1 ali recBoPrP v pufru A (konc. 5 μ g/ml), inkubacija pri +4 °C preko noči;
- 3-kratno spiranje nevezanega antigena s pufrom B na spiralcu ploščic (Washer, Tecan, Švica);

- blokiranje nezasedenih mest s sveže pripravljnim pufrom C (100 μ l/vdolbinico), inkubacija 30 minut pri +37 °C;
- 3-kratno spiranje nevezanega albumina s pufrom B na spiralcu ploščic;
- inkubacija z vzorci očiščenih protiteles ali fragmentov, vzorce redčimo v pufru C (50 μ l/vdolbinico), inkubacija 90 minut pri +37 °C ;
- 3-kratno spiranje nevezanih protiteles ali fragmentov s pufrom B na spiralcu ploščic;
- inkubacija s sekundarnimi s HRP konjugiranimi protitelesi, 90 minut pri +37 °C (50 μ l/vdolbinico); kot sekundarna protitelesa smo uporabili 5000-krat v pufru C redčena kozja anti-mišja anti-IgG protitelesa, specifična za Fab ali 3000-krat redčena kozja anti-mišja anti-IgG protitelesa, specifična za Fc;
- 3-kratno spiranje nevezanega konjugata s pufrom B na spiralcu ploščic;
- inkubacija s 50 μ l/vdolbinico substrata, 20 minut pri +37 °C; kot substrat smo uporabili 10 mg ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolin-6-sulfonska kislina) Sigma, ZDA), raztopljenega v 10 ml pufru D, tik pred nanosom na ploščico smo dodali 4 μ l 30 % H₂O₂;
- spektrofotometrično merjenje intenzivnosti barvne reakcije pri valovni dolžini 405 nm in referenčnem filtru 620 nm (Sunrise, Tecan, Švica).

Materiali:

pufer A: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 3 mM NaN₃, pH 9,6;

pufer B: 150 mM NaCl, 7,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2,5 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 0,05 % Tween 20, pH 7,2;

pufer C: 1 % goveji serumski albumin v pufru B, pH 7,2;

pufer D: 100 mM C₈H₈O₇ x H₂O, 100 mM Na₂HPO₄x2H₂O, pH 4,5.

3.1.5 Prenos proteinov na nitrocelulozno membrano

3.1.5.1 NaDS – poliakrilamidna gelska elektroforeza proteinov

NaDS (poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata) elektroforeza je analitska metoda, s katero določamo molekulsko maso proteinov in peptidov. Metoda temelji na uporabi anionskega detergenta, ki denaturira proteinske

molekule in jih obda s svojimi molekulami. Ker imajo molekule NaDS negativen naboj, bodo imeli tudi z NaDS denaturirani proteini negativen naboj. Detergent se veže na polipeptidne verige, ne glede na njihovo aminokislinsko sestavo v razmerju 1,4:1 (Shi in Jackovsky, 1998). Velikost naboja je tako odvisna samo od velikosti proteinske molekule. V električnem polju bodo vse molekule potovale proti anodi, večje molekule bodo potovale počasneje od manjših, zato se bo kompleksen proteinski vzorec ločil v serijo diskretnih proteinskih pasov, urejenih glede na molekulsko maso posameznega proteina. Na rob nosilca nanese standarde z znanimi molekulskimi masami, ki nam pomagajo oceniti molekulsko maso proteinov v vzorcu. NaDS elektroforeza poteka na poliakrilamidnih nosilcih z različno zamreženostjo, ki jo izberemo glede na velikost molekul, katerim določamo maso, saj je zamreženost gela obratno sorazmerna z maso proteina. S to metodo lahko ugotavljamo tudi zgradbo proteina. Če pred reakcijo vzorcem dodamo reducente, bo, v kolikor je protein sestavljen iz večih podenot, razpadel na posamezne podenote, tem pa lahko določamo njihovo maso. NaDS elektroforezo lahko izvedemo v kontinuiranem ali diskontinuiranem puferskem sistemu. Pri slednjem ima gel, na katerega nanašamo vzorec (koncentracijski gel), manjšo zamreženost kot gel, na katerem pride do ločevanja molekul (ločitveni gel). Vse molekule pripotujejo do meje med obema geloma v izredno tanki liniji, zaradi česar v ločitvenem gelu ne pride do prekrivanja pasov, kot je to pogosto pri kontinuiranem sistemu. Tako ločene proteine lahko detektiramo z barvilom Biosafe CBB ali jih prenesemo na nitrocelulozno membrano, z metodo prenosa Western.

Za izvedbo elektroforeze smo uporabljali Mini Protean celico. Pripravili smo gele v velikosti 10 x 8 cm in debeline 0,8 cm, z žepki volumna 30 µl. En gel smo po elektroforezi uporabili za proteinsko barvanje z barvilom Biosafe CBB, preostala gela pa za prenos Western. Uporabljali smo 4 % koncentracijski gel in 9 % ločitveni gel. Najprej smo v okvirček nalili ločitveni gel, na vrh dodali 100 µl izopropanola, da je bila površina pokrita ter pustili 30 minut pri sobni temperaturi, da se je gel strdil. Nato smo odstranili izopropanol ter na ločitveni gel nalili sveže pripravljen koncentracijski gel in v okvirček vstavili glavniček. Po polurni polimerizaciji smo glavniček odstranili in okvir z gelom vstavili v celico ter vanjo nalili pufer za elektroforezo. Vzorce protiteles C1/1 ter fragmentov Fab in Fc, ki smo jih nanegli na gel, smo redčili v TBS do koncentracije 5

µg/žepke (barvanje gela z Biosafe CBB) in 0,5 µg/žepke (Western prenos) ter dodali NaDS-PAGE vzorčni pufer (Novex, ZDA). Vsak vzorec smo imeli v dveh epruvetkah, v eno epruvetko smo dodali β-merkaptotanol, ki reducira disulfidne vezi. Vse vzorce in molekulski standard (Precision plus Protein Standard, BioRad, ZDA) smo pred nanosom na gel inkubirali 5 minut pri +95 °C, s čimer smo toplotno denaturirali proteine. V žepke smo nanесли 13 µl vzorca ter inkubirali 50 - 60 minut pri napetosti 130 V (usmernik PowerPac Basic, BioRad).

Materiali:

4 % koncentracijski gel: 40 % akrilamid (BioRad, ZDA), 10 % SDS, 10 % APS, TEMED (vse Sigma, ZDA), 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8;

9 % ločitveni gel: 40 % akrilamid, 10 % SDS, 10 % APS, TEMED, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8;

elektroforezni pufer: 25 mM Tris, 0,22 M glicin, 0,16 % SDS, pH 8,3;

TBS pufer: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6.

3.1.5.2 Barvanje gela z barvilom Biosafe CBB

Po elektroforezi lahko proteine v gelu detektiramo z barvanjem gela z barvilom Biosafe CBB. Barvilo tvori elektrostatične interakcije z aminokislinami polipeptidnih verig. Meja ločljivosti na gelu naj bi bila 0,5 µg proteina.

Takoj po končani elektroforezi smo prenesli gel v barvilo in ga na stresalniku inkubirali pol ure pri sobni temperaturi. Nato smo gel predstavili v vodo ter ga ob stresanju toliko časa inkubirali, da je postal na mestih brez proteinov zopet prozoren (60 – 90 minut). Med postopkom smo vodo po potrebi zamenjali.

Materiali:

Biosafe CBB (BioRad, ZDA).

3.1.5.3 Prenos proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano (prenos Western)

Elektroforetski prenos makromolekul iz občutljivih gelov na odpornejše membrane poveča občutljivost, hitrost in enostavnost detekcije elektroforetsko ločenih molekul. Pri prenosu proteinov uporabljamo električni tok, ki povzroči prehod ločenih makromolekul iz gela na površino membran. Molekule se s hidrofobnimi interakcijami vežejo na membrano. Skoncentrirani pasovi na površini membran so pripravljeni za nadaljnjo analizo.

Za prenos Western iz gela na membrano (TransBlot, 0,22 μ m, BioRad, ZDA) smo uporabili celico Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, ZDA), ki smo jo sestavili po navodilih proizvajalca. Vanjo smo do vrha nalili pufer za prenos ter jo priključili na vmesnik. Prenos proteinov je potekal 60 minut ob stalnem mešanju in hlajenju pufra, pri konstantnem toku 220 mA. Po prenosu smo prosta mesta na membrani blokirali z inkubacijo v 5 % mleku v TTBS pri +4 °C preko noči.

Materiali:

pufer za prenos: 0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 20 % metanol, pH 8,3.

pufer TBS: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 4 mM HCl, pH 7,6;

pufer TTBS: 0,1 % Tween 20 v TBS;

nemastno mleko: 5 % v TTBS.

3.1.5.4 Imunodetekcija

Membrano s prenesenimi proteini smo spirali 15 minut ter nato še trikrat po 5 minut v TTBS pufru pri sobni temperaturi, medtem smo pripravili raztopine kozjih anti-mišjih anti-Fab IgG protiteles (5000-krat redčena) in kozjih anti-mišjih anti-Fc IgG protiteles (4000-krat redčena). Redčili smo jih v 1 % mleku, obe protitelesi sta bili konjugirani s HRP. Vsako membrano smo inkubirali s svojim konjugatom 90 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Ponovnemu spiranju membran s pufrom TTBS je sledila detekcija vezanih protiteles z reagentom ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham LifeScience, VB). Reagent vsebuje luminol, vodikov peroksid in spodbujevalce reakcije. Pod vplivom HRP in peroksida luminol oksidira, pri čemer seva svetlobo z maksimalno emisijo pri 428 nm.

Po minutni inkubaciji smo membrano odcedili, jo zavili v prozorno folijo ter jo prenesli v temnico. Tam smo jo položili v fotografsko kaseto (Kodak, Nemčija), čez pa še fotografski film (Hyperfilm ECL, Amersham LifeScience, VB), kaseto zaprli ter eksponirali tri minute. Film smo razvili v razvijalcu (Ilford Ilfotec, Švica), sprali z vodo ter fiksirali s fiksirjem (Ilford Rapid Fixer, Švica).

Materiali:

pufer TBS: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 4 mM HCl, pH 7,6;

pufer TTBS: 0,1 % Tween 20 v TBS;

nemastno mleko: 1 % v TTBS.

3.2 DELO S CELICAMI

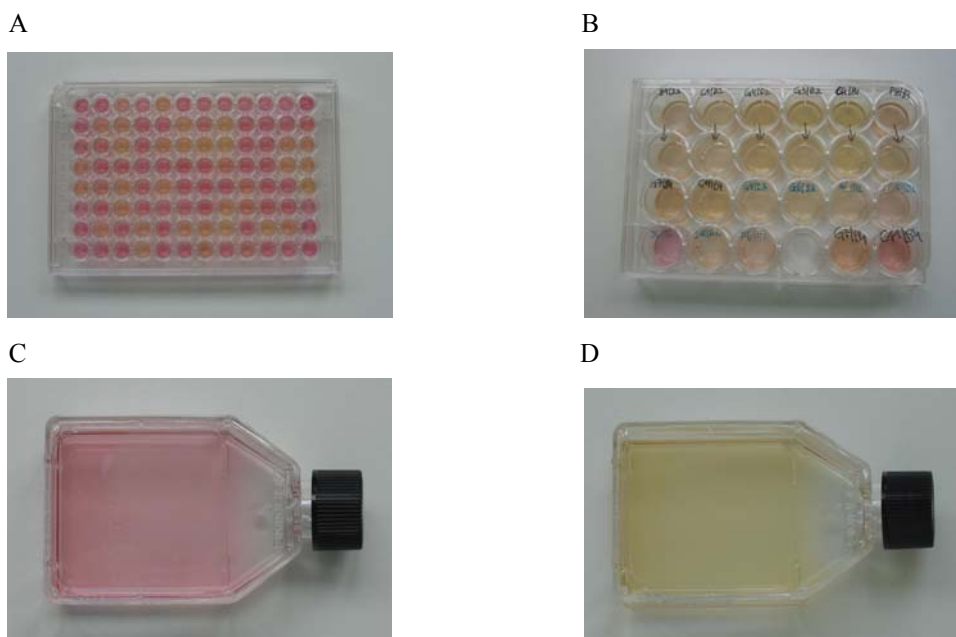
3.2.1 Hibridomske celične linije

Celične linije, ki smo jih proučevali, so bile pripravljene v predhodnih raziskavah skupine z imunizacijo miši divjega tipa Balb/c s fragmentom Fab V5B2 ali Fab V5B2-KLH. Limfocite B, ki so jih izolirali iz vranic miši, so v procesu celične fuzije zlili z mielomskimi celicami NS1 po standardnem postopku, ki se uporablja v laboratoriju. Hibridomske celice so po zlitju sprva gojili v selektivnem mediju, ki vsebuje hipoksantin, aminopterin in timidin (HAT). V HAT mediju lahko preživijo le hibridomi, mielomi pa v selektivnem mediju propadejo. Pri našem delu smo uporabljali celične linije 5D12, 2F12, 2C1, 3A11, ki so bile pripravljene v fuziji vraničnih limfocitov miši imuniziranih z Fab V5B2 (1. fuzija) ter liniji 3K5 in 2K1 pripravljenih v fuziji limfocitov miši, imuniziranih z Fab V5B2-KLH (2. fuzija).

3.2.2 Gojenje celičnih kultur

Za gojišče sesalskih celičnih kultur smo uporabljali Eaglovo minimalno esencialno gojišče, modificirano po Dupleccu (**D**ublecco's **m**odified **E**agle's **m**edium - DMEM). Medij vsebuje 4,5 g/l glukoze, potrebne soli (dodatno še 1,85 g/l NaHCO₃ in 10 mM HEPES), aminokisline in fenol rdeče kot indikator pH medija. Kislost mora biti uravnana na pH 7,2. Medij smo prefiltrirali preko sterilnega, apirogenega membranskega filtra s porami velikosti 0,22 µm (Corning Costar, ZDA). To gojišče smo uporabljali kot osnovo za pripravo drugih gojišč, pri odmrzovanju, zamrzovanju celičnih kultur ter pri kloniranju celic v fazi redčenja. Za gojenje hibridomskih celic smo ga dopolnili v kompletni DME medij, ki vsebuje še 13 % toplotno inaktiviranega govejega seruma (HyClone, ZDA), 200 mM L-glutamina (Sigma, ZDA) ter penicilin (Pliva, Hrvaška) in streptomycin (Sigma, ZDA) v končni koncentraciji 100 µg/ml. Antibiotike dodajamo v gojišče, da preprečimo bakterijsko kontaminacijo, saj je kompletni DME medij zelo dobro gojišče za mikroorganizme. L-glutamin predstavlja alternativni vir ogljika in je prekurzor nukleotidov, pri višjih temperaturah pa hitro razpade, zato ga je treba dodajati v gojišče vsakih 14 dni.

Celične kulture smo gojili na plastičnih ploščicah s 96-imi vdolbinicami (96 well plate, Corning Costar, ZDA), 24-imi vdolbinicami (24 well plate, Corning Costar, ZDA) ter v plastičnih stekleničkah s površino dna 25 cm² in 75 cm² (Corning Costar, ZDA) (slika 5). Celicam smo po potrebi dnevno odstranjevali izčrpan medij, dohranjevali s kompletnim DME medijem ter zagotavljali ustrezno gostoto. Če je bilo v steklenički preveliko število celic ali preveč odmrlih celic, smo manjši volumen suspenzije prenesli v novo stekleničko ter tako naredili novo pasažo. Delo s celicami smo opravljali sterilno v brezprašni komori (Heto-Holten, Danska), uporabljali smo plastične pipete različnih volumnov za enkratno uporabo (Corning Costar, ZDA). Hibridomske celice smo gojili v sterilnem okolju, v inkubatorju pri ustrezni vlažnosti ter 5 % CO₂, ki služi uravnavanju konstantne vrednosti pH medija.



SLIKA 5: Gojenje celic. Potekalo je na ploščici s 96 (A) in s 24 (B) vdolbinicami ter v 25 cm² stekleničkah s svežim medijem (C) in z izčrpanim medijem (D).

3.2.3 Štetje celic

Pred zamrzovanjem in kloniranjem celic je bilo potrebno določiti število celic v vzorcu. Iz suspenzije celic, ki smo jo predhodno premešali na vibracijskem mešalniku (Vibromix, Tehnica) ter tako zagotovili homogenost vzorca, smo odvzeli alikvot. Ker je bila gostota celic v vzorcu ponavadi visoka, je bilo potrebno alikvot redčiti v razmerju 1:3 z 0,2 % raztopino barvila nigrozin (Sigma, ZDA). Žive celice so po barvanju ostale nespremenjene, v mrtve celice pa je barvilo prodrlo in jih obarvalo črno. Žive celice smo prešteli na osmih poljih hemocitometra in izračunali povprečno vrednost. Z upoštevanjem redčitve in volumnskega indeksa (10^4) smo izračunali število celic v mililitru vzorca. Za natančnejše meritve je bilo treba štetje večkrat ponoviti.

3.2.4 Odmrzovanje celic

Pred odmrzovanjem smo prenesli ampulice s celicami iz tekočega dušika v zamrzovalno transportno kaseto. Vsebinsko zamrzovalne ampulice (Corning Costar, ZDA) smo odmrznili v topli vodi, nato pa celice sterilno prenesli v 20 ml nekompletnega DME medija, ki je služil hitremu razredčenju toksičnega dimetilsulfoksida (DMSO). Suspenzijo celic smo nato centrifugirali 5 minut pri 490 x g pri +20 °C (Centric 2000 R, Tehnica). Supernatant smo po centrifugiranju zavrgli, celice pa resuspendirali v 7 ml kompletnega DME medija, segretega na +37 °C. Stanje odmrznjenih celic smo preverili pod mikroskopom takoj po odmrzovanju in nato še po 2 urah.

3.2.5 Zamrzovanje celic

Postopka zamrzovanja in odmrzovanja sta zelo stresna za celice, zato moramo oba postopka kar najhitreje opraviti. Celice, ki smo jih želeli zamrzniti, so morale biti v logaritemski fazi rasti, zagotoviti pa smo morali tudi ustrezno gostoto celic, to je 3 - 5 x 10⁶ celic na ml zamrzovalnega medija. Celice smo najprej prešteli in izračunali ustrezno količino potrebnega zamrzovalnega medija, ki je sestavljen iz 45 % nekompletnega DME medija, 45 % govejega seruma in 10 % DMSO. Slednji je krioprotektant, ki se vgradi v lipidni dvosloj celičnih membran in celice ščiti pred poškodbami s kristali vode, ki nastanejo pri zamrzovanju. Pri temperaturah nad 0 °C pa je zelo toksičen za celice, zato smo postavili zamrzovalni medij, celice in ampulice za zamrzovanje za pol ure v zamrzovalnik na -20 °C, da so se ohladile. Ohlajeno suspenzijo celic smo nato 5 minut centrifugirali na 490 x g pri +4 °C, odlili supernatant, celice v usedlini pa resuspendirali v ohlajenem zamrzovalnem mediju ter alikvotirali po 1 ml v zamrzovalne ampule. Ampule smo čim hitreje prenesli v zamrzovalnik na -70 °C, po 24 urah pa smo jih prenesli v tekoči dušik (-179 °C), kjer lahko celice dolgotrajno shranjujemo. Po nadaljnjih 24 urah smo eno ampulico odmrznili, da smo preverili kakovost zamrzovanja.

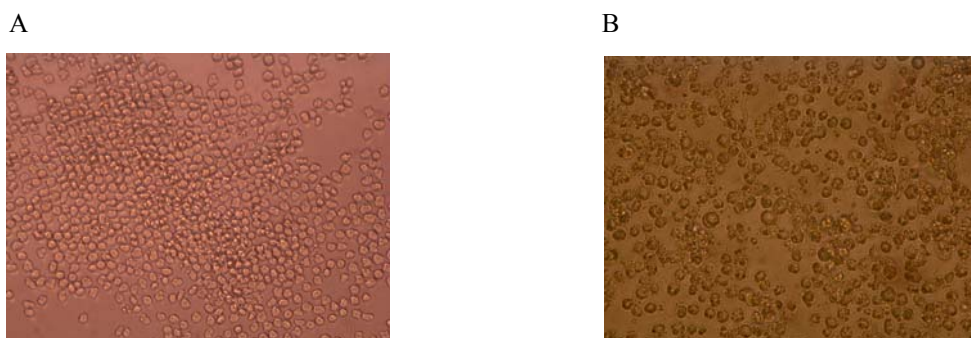
3.2.6 Kloniranje celičnih linij

Namen kloniranja je osamiti eno samo celično linijo, ki proizvaja specifična protitelesa in na tak način dobiti monoklonsko celično linijo. Pri kloniranju celičnih linij je pomembno, da so celice v logaritemski fazi rasti, ko so v najboljši fizični kondiciji.

Hibridomske linije smo klonirali po najpogostejše uporabljeni metodi omejenega redčenja. Celicam, ki smo jih želeli klonirati, smo določili gostoto v suspenziji in nato izračunali ustrezno redčitev. Pri našem delu smo uporabljali redčitve 0.7, 1, 2.5, ali 3 celice na vdolbinico. S serijo postopnih redčitev v nekompletnem DME mediju smo pridobili končno redčitev v kompletnem DME mediju. Ustrezno redčitev celic smo nakapljali na ploščico s 96 vdolbinicami (100 μ l/vdolbinico) in inkubirali pri +37 °C. Po nekaj dneh je bilo potrebno ploščico natančno pregledati pod mikroskopom ter označiti tiste vdolbinice, v katerih je zrasel en sam klon celic. Prisotnost antiidiotipskih protiteles v posameznih vdolbinicah smo ugotavljali po približno enem tednu od dneva kloniranja s posrednim testom ELISA. Nekaj celičnih linij, za katere smo določili prisotnost najboljših anti-Id protiteles, smo prenesli na ploščice s 24 vdolbinicami in kasneje v male stekleničke. Nato smo celice zamrznili in/ali nagojili do večjih količin.

3.2.7 Priprava večje količine supernatantov

Klonom posameznih hibridomskih linij v stekleničkah za gojenje smo z ustreznim redčenjem zagotovili logaritemsko rast in nasičenje kulture ter nato pustili, da so celice propadle in v gojišče izločile čim več protiteles. Izčrpan medij smo prenesli v centrifugirke ter 15 minut centrifugirali pri 2000 obratih na minuto, pri sobni temperaturi. Supernatant smo odpipetirali in ga shranili pri +4 °C ali -20 °C.



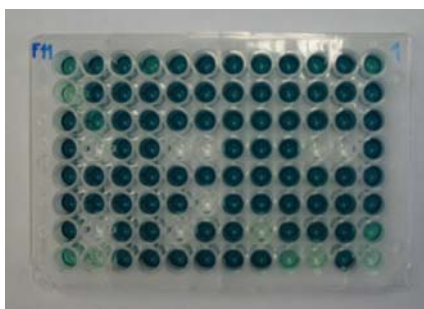
SLIKA 6: Celice v logaritemski fazi rasti. 100x povečava (A), celice v fazi odmiranja, 200x povečava (B), konfokalni mikroskop

3.3 KARAKTERIZACIJA ANTIIDIOTIPSKIH PROTITELES

3.3.1 Posredni test ELISA

3.3.1.1 Presejalni test za iskanje klonov, ki proizvajajo antiidiotipska mAbs

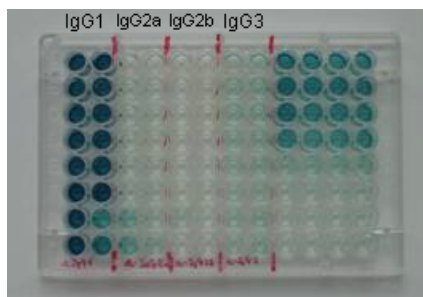
Po kloniranju hibridomskih celičnih linij smo nekaj dni opazovali rast celic v vsaki vdolbinici posebej in označili tiste, ki so vsebovale le po en klon. Ko so celice prerasle vsaj četrtno vdolbinice, smo odvzeli 50 μ l supernatanta in s posrednim ELISA testom določili tiste klone, ki so proizvajali antiidiotipska mAbs. Kot antigen smo uprabljali fragment Fab mAb V5B2 v koncentraciji 2 μ g/ml, kot konjugat pa 3000-krat redčena kozja anti-mišja anti-Fc IgG protitelesa, konjugirana s HRP. Naslednje stopnje so potekale enako kot je opisano pod točko 3.1.4.1. V primeru, ko smo ugotovili prisotnost antiidiotipskih mAbs v vdolbinici z dvema ali več kloni (razsuti klon), je bilo potrebno te celice ponovno klonirati.



SLIKA 7: Fotografija mikrotitrne ploščice po testu ELISA za določanje specifičnih klonov po kloniranju celičnih linij

3.3.1.2 Določanje podrazreda monoklonskih protiteles

Na dno vdolbinic mikrotitrne plošče smo vezali Fab V5B2 v koncentraciji 5 $\mu\text{g/ml}$ v pufri A. Po spiranju in blokiranju prostih mest smo dodali vzorce supernatanta s protitelesi izbranih klonov. Za detekcijo smo uporabili niz kozjih anti-mišjih protiteles, ki specifično reagirajo samo z enim podrazredom mišjih Ig: IgG1, IgG2a, IgG2b in IgG3. Postopek je potekal enako kot pri točki 3.1.4.1.



SLIKA 8: Določevanje podrazreda protiteles s testom ELISA

3.3.1.3 Preverjanje navzkrižne reaktivnosti

Za preverjanje navzkrižne reaktivnosti anti-Id mAbs v supernatantih smo kot antigene uporabljali fragmente Fab protiteles C1/1 in E12/2. Uporabljali smo tudi nerazgrajeno protitelo E9/5 (to spada v podrazred IgG2a) in peptid P1. Različne antigene smo v vdolbinice nanесли v koncentraciji 5 $\mu\text{g/ml}$. Za konjugate smo uporabili 3000-krat redčena kozja anti-mišja anti-IgG1 mAbs. Celoten postopek je zopet potekal tako, kot je opisano pod točko 3.1.4.1.

3.3.1.4 Določanje titra protiteles in določanje relativne vezalne afinitete

Shranjene supernatante izbranih klonov hibridomskih linij so po mojem opravljenem praktičnem delu očistili na proteinu G – sefarozi in iz njih izolirali anti-Id protitelesa. Titer izbranih mAbs so določili s testom ELISA, kjer so na ploščico vezali Fab V5B2 v koncentraciji 5 µg/ml, kot primarna protitelesa pa so uporabili očiščena mAbs, serijsko redčena v sedmih korakih. Za konjugat so uporabili 3000-krat redčena kozja anti-mišja anti-Fc IgG, vezana s HRP. Postopek je potekal tako kot je opisano pod točko 3.1.4.1.

Iz titra posameznega očiščenega protitelesa smo določili relativno vezalno afiniteto (RVA). Postopek za izračun RVA je sledeč: polovico vrednosti absorbance pri nasičenju, ki jo odčitamo na ordinatni osi, intrapoliramo na ustrezno krivuljo in na abscisni osi odčitamo ustrezno koncentracijo protiteles ter jo preračunamo v molaro koncentracijo. Vrednosti RVA se pri mAbs običajno gibljejo med 10^{-8} do 10^{-12} mol/l.

3.3.2 Molekularne metode

Molekularne metode se uporabljajo na vseh biomedicinskih področjih in verjetno predstavljajo doslej najmočnejše poznano orodje za razumevanje osnovnih življenjskih procesov. S pomočjo teh metod smo določili nukleotidna zaporedja variabilnih delov lahkkih in težkih verig antiidiotipskih mAbs, kar nam je omogočilo določitev njihovih AK zaporedij in primerjavo z zaporedjem peptida P1.

3.3.2.1 Izolacija RNA

Značilnost evkariontskega genoma je, da poleg kodirajočih regij vsebuje tudi regije, ki ne kodirajo proteinov in se med procesiranjem informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) izrežejo. Med razvojem limfocitov B prihaja do preurejanja genskih segmentov, zato imajo vsak klon in njegove hčerinske celice unikaten genom. Pojavljajo pa se tudi razlike pri procesiranju primarne mRNA v zrelo mRNA. Zaradi teh lastnosti smo si za sekveniranje in določanje AK zaporedja izbrali RNA namesto DNA. Metoda izolacije RNA je nekoliko težje izvedljiva, potrebna je večja natančnost in previdnost. Najtežje je preprečiti

razgradnjo RNA, saj so RNA-ze bolj stabilne kot DNA-ze, aktivnost ohranijo tudi po običajnem avtoklaviranju. Poleg tega pa so tudi zelo splošno razširjene, na primer v telesnih tekočinah.

Za izolacijo RNA smo uporabljali RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija) ter sledili navodilom proizvajalca. Potrebovali smo $1 - 3 \times 10^6$ celic v logaritemski fazi rasti, ki smo jih najprej centrifugirali, da smo odstranili gojišče. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v pufru PBS (20 ml), s tem smo s celic sprali ostanke gojišča. Zopet smo odstranili supernatant, celice pa lizirali z reagentom, ki je vseboval detergente ter gvanidinijev tiocianat in β -merkaptotanol, ki inaktivirata nukleaze. Lizat smo 5-krat potegnili skozi injekcijsko iglo in ga s tem homogenizirali, hkrati pa natrgali DNA, ki smo jo želeli odstraniti iz vzorca. Fragmentov DNA smo se znebili, ko smo vzorec nanесли na kolono za vezavo DNA, nato pa smo filtrat obdelali še s 70-odstotnim etanolom. Pri tem smo izkoristili lastnost DNA, da se obori pri višji koncentraciji etanola kot RNA. V nadaljnjih korakih smo vzorce z RNA očistili na koloni, nato pa s 100 μ l vode eluirali RNA. Po končani izolaciji smo z merjenjem absorbanca pri 260 nm izračunali koncentracijo RNA in vzorce shranili pri -70°C .

3.3.2.2 Začetni oligonukleotidi

Pri reakcijah reverzne transkripcije, verižne polimerizacije in pri določanju nukleotidnega zaporedja smo uporabljali sledeče začetne oligonukleotide:

IgG1_Hconst

5'-GGAAGATCTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC-3'

Ig_k_const

5'-GGTGCATGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC-3'

IgFR1.2

5'-CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG-3'

Ig_k_FR1

5'-GGGAGCTCGAYATTGTG**MTSACMCARWCTMCA**-3'

Krepko so označena degenerirana mesta, ki so lahko: S = G ali C; R = G ali A; N = poljuben nukl.; M = A ali C; W = A ali T; Y = C ali T.

Za pomnoževanje variabilnih domen mišjih imunoglobulinov obstajajo različni pristopi. Težko je najti take začetne oligonukleotide, ki se dovolj specifično vežejo na matrično zaporedje, hkrati pa ne določijo napačnega zaporedja na mestih, kjer prihaja do razlik med matrico in začetnimi oligonukleotidi. Pri delu smo uporabili degenerirane oligonukleotide, ki so jih opisali Wang in sodelavci (2000). So sicer manj specifični, lahko pa pomnožijo zapis za večino variabilnih regij. Začetna oligonukleotida Ig_k_FR1 (za lahko verigo) in IgFR1.2 (za težko verigo) sta se prilegala prvi regiji ogrodka variabilne domene na 5' strani, oligonukleotida Ig_k_const (za lahko verigo) in IgG1_Hconst (za težko verigo) pa sta se prilegala prvi konstantni domeni na 3' strani. Znano je, da je 95 % lahkih verig mišjih imunoglobulinov tipa κ (Montano in Morrison, 2002), zato smo uporabljali oligonukleotide samo za ta tip in ne tudi za tip λ . Vse začetne oligonukleotide so sintetizirali v podjetju Invitrogen (ZDA).

3.3.2.3 Reverzna transkripcija

Pri tej metodi s pomočjo encima reverzne transkriptaze prevedemo RNA v cDNA (ang. complementary DNA).

Za reakcijo smo uporabili 2 μ g izolirane RNA, ki smo jo redčili z vodo. Nato smo jo 10 minut denaturirali pri +70 °C ter jo takoj postavili na led, da smo preprečili renaturacijo. Medtem smo pripravili reakcijsko mešanico iz reakcijskega pufra, dNTP-jev (deoksiribonukleozidtrifosfat) v končni koncentraciji 0,5 mM, ribonukleaznega inhibitorja (RNasin, Promega, ZDA), reverzne transkriptaze M-MLV (200 enot, Promega, ZDA) in začetnih oligonukleotidov (konc. 0,5 μ g/ml). RNA smo prenesli v reakcijsko mešanico in inkubirali 1 uro pri +42 °C v napravi Mastercycler Gradient (Eppendorf, Nemčija). Po končani reakciji smo vzorec shranili pri -20 °C.

3.3.2.4 Reakcija verižne polimerizacije (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (ang. **P**olymerase **C**hain **R**eaction – PCR) je metoda za hitro pomnoževanje DNA *in vitro*. V reakcijski mešanici so osnovni fragment DNA (v našem primeru cDNA), dva začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna vsak enemu koncu fragmenta, vsi dNTP-ji, termostabilna DNA – polimeraza in pufer, ki zagotavlja optimalno delovanje encima. Mešanico za kratek čas inkubiramo pri treh točno določenih temperaturah, kar predstavlja en cikel PCR. Denaturacija dvojne vijačnice DNA poteka pri 92 – 95 °C, 15 sekund do 1 minute. Prileganje začetnih oligonukleotidov na komplementarno verigo poteka pri 40 – 65 °C, 30 sekund do 1 minute, sinteza nove verige v smeri od 5' proti 3' koncu s pomočjo DNA – polimeraze in ob prisotnosti Mg⁺ ionov pa pri 72 – 80 °C (1 minuto). Novi verigi DNA sta komplementarni in sposobni v novem ciklu vezati enake začetne oligonukleotide. Vsak naslednji cikel podvoji količino tarčne DNA. Ponavadi sestavlja PCR 30 ciklov, končni produkt pa je eksponento kopičenje tarčnih fragmentov DNA.

Po reverzni transkripciji smo 1 µl vzorca zmešali z reakcijsko mešanico ter izvedli reakcijo v napravi Mastercycler Gradient. Za pomnoževanje variabilnih regij posameznega klona, smo PCR izvedli dvakrat, prvič za težko verigo (začetni oligonukleotidi: IgFR1.2 in IgG1_Hconst) in drugič za lahko verigo (Ig_k_FR1 in Ig_k_const) po programu:

za težko verigo: 94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min; 45 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 30 ciklov

za lahko verigo: 94 °C, 5 min; 94 °C, 1 min; 45 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 10 ciklov;

94 °C, 1 min; 47 °C, 1min; 72 °C, 1 min; 10 ciklov; 94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 10 ciklov.

Materiali:

reakcijska mešanica: 10 µl reakcijskega pufru z barvili za agarozno gelsko elektroforezo (Promega, ZDA), 1'25 enote GoTaq polimeraze (Promega, ZDA), 1 µl začetnih oligonukleotidov (končna konc. 0,2 µM), 4 µl dNTP (končna konc. 0,2 mM, Promega, ZDA).

3.3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza je standardna metoda za ločevanje, prepoznavo in čiščenje DNA fragmentov. Z barvanjem gela lahko direktno zaznamo DNA in določimo položaj pasov, ki vsebujejo več kot 10 ng nukleinske kisline. Gele pripravimo tako, da trdno agarozo s segrevanjem raztopimo v elektroforeznem pufru. Z ohlajanjem raztopine tvori agaroz gel, katerega gostota je odvisna od koncentracije agaroze. S takimi geli lahko v električnem polju ločujemo molekule, velike od 100 bp do 50 kb.

Za ločevanje produktov PCR smo uporabili 1 % gel, v katerega smo dodali barvilo etidijev bromid (končna konc. 0,005 %). Gel s takšno gostoto, ki jo zahteva proizvajalec kolone za izolacijo DNA iz gela, sicer nima dovolj dobre sposobnosti ločevanja med majhnimi fragmenti DNA, vendar smo predpostavili, da bomo z reverzno transkripcijo in PCR dovolj dobro pomnožili le želene produkte in bo tudi 1 % gel ustrezal. Vsak vzorec pomnožene DNA za težko in lahko verigo smo nanесли v dva žepka na gelu, po 25 µl v vsakega. Elektroforeza je potekala v elektroforeznem pufru 25 minut, pri konstantni napetosti 100 V

Materiali:

gel: 0,4 g agaroze, 45 ml elektroforeznega pufru, 2 µl EtBr;

elektroforezni pufer: 40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA (Millipore, ZDA).

3.3.2.6 Izolacija DNA iz agaroznega gela

Po končani elektroforezi smo pod UV svetilko gel slikali ter s spatulo izrezali pasove s produkti PCR. Vzorčke smo prenesli v kolono za izolacijo DNA iz gela (DNA Gel Extraction Kit, Millipore, ZDA) in jih centrifugirali 10 minut na 5000 x g. DNA je iz gela prešla v pufer, ki smo ga shranili pri -20 °C.

3.3.2.7 Določanje nukleotidnega zaporedja

Za določanje nukleotidnega zaporedja se najpogosteje uporablja dideoksi metoda. Temelji na uporabi DNA – polimeraze, ki na matrični verigi sintetizira novo verigo DNA. Pred začetkom reakcije moramo na matrično enoverižno DNA vezati začetni oligonukleotid. V reakcijsko zmes damo vse štiri dNTP-je, označene s fluoroforji ter 2',3'-dideksinukleozidtrifosfate (ddNTP). Te se naključno vgradijo v nastajajočo verigo ter preprečijo nadaljnje podaljševanje verige, saj tvorba fosfodiesterne vezi z naslednjim dNTP-jem ni možna. Po končani reakciji dobimo zmes različno dolgih fragmentov, ki jih ločimo s kapilarno elektroforezo ter z avtomatskim sekvenatorjem določimo nukleotidno zaporedje.

Nukleotidno zaporedje variabilnih regij težkih in lahkih verig izbranih klonov so nam določili v podjetju Macrogen (Koreja). Za vsak izbrani klon smo poslali DNA za težko in lahko verigo ter njim pripadajoče začetne oligonukleotide. Pogoji za uspešno izvedeno reakcijo so 10 – 15 µl očiščene DNA (50 ng/µl) in 10 µl začetnih oligonukleotidov (5 pmol/ µl).

3.3.2.8 Računalniška analiza nukleotidnih zaporedij

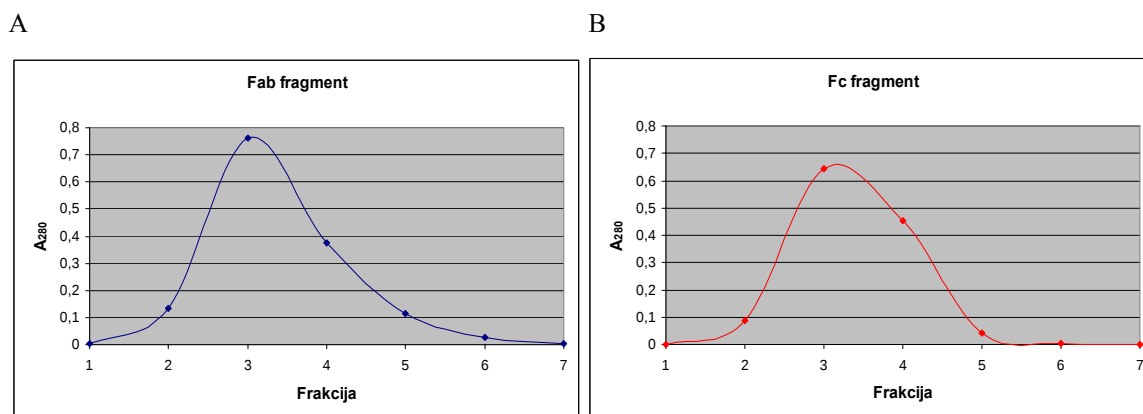
Dobljena nukleotidna zaporedja smo dobili v obliki kromatogramskih zapisov. Analizirali smo jih s programom Chromas, ki je prosto dostopen na svetovnem spletu (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Za poravnavo in primerjavo genskih segmentov izbranih celičnih klonov smo uporabljali CLUSTAL W (<http://align.genome.jp>), za prevod v AK zaporedje in njeno karakterizacijo pa smo uporabili bazo podatkov IMGT (<http://imgt.cines.fr>, Lefranc in sod., 2004).

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA PROTITELES ZA NEGATIVNO SELEKCIJO

4.1.1 Preverjanje čiščenja mešanice C1/1 po razgradnji

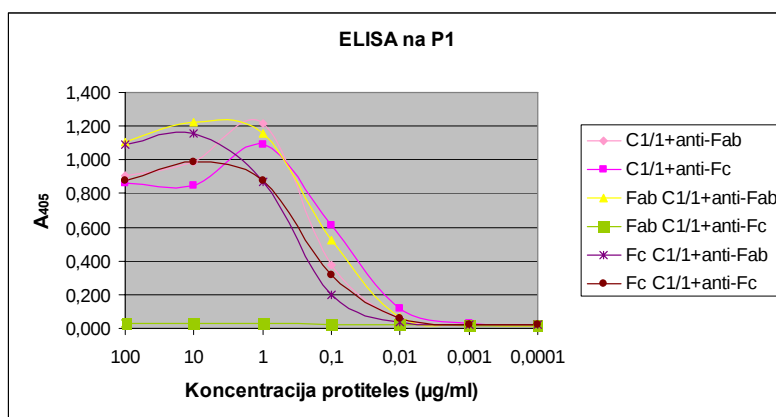
Očiščene vzorce protiteles C1/1 smo s pomočjo papaina cepili na fragmente Fab in Fc. Sledilo je čiščenje mešanic po razgradnji s pomočjo proteina A, vezanega na agarozo ter zbiranje frakcij v dveh ločenih serijah. V prvi seriji smo s kolone, s pomočjo pufru HSG spirali fragmente Fab (slika 9A), v drugi pa z elucijskim pufrom še fragmente Fc (slika 9B). Vsem frakcijam smo izmerili absorbanco pri 280 nm, ki je premosorazmerna s koncentracijo fragmentov v vzorcu. Koncentracije fragmentov v frakcijah so eksponentno naraščale do tretje frakcije, kjer so dosegle vrh. Z nadaljnjim spiranjem so koncentracije padale, v sedmi frakciji tako ni bilo več fragmentov. Po čiščenju smo združili tiste frakcije fragmentov Fab in Fc, kjer je absorbanca presegla vrednost 0,1.



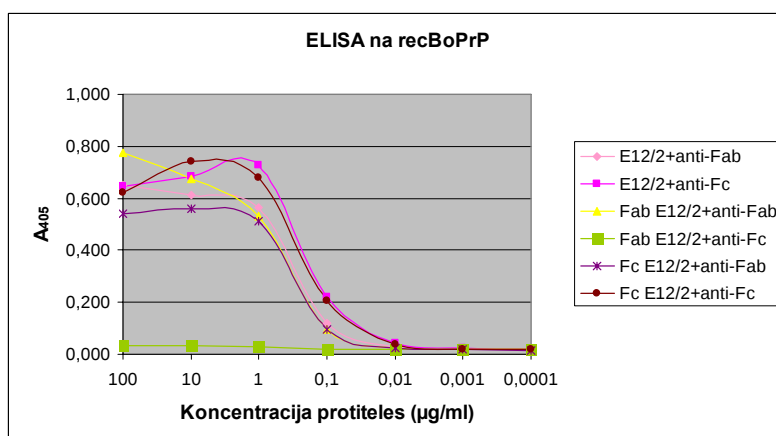
SLIKA 9: Delež fragmentov Fab (A) in fragmentov Fc (B) protitelesa C1/1 v posameznih frakcijah po čiščenju na protein A-agarози. Fragmente Fab smo spirali s pufrom HSG (pH 8,9), fragmente Fc pa z elucijskim pufrom (pH 2,7).

4.1.2. Titer očiščenih fragmentov Fab in Fc

Titer fragmentov Fab in Fc protiteles C1/1, ločenih afinitetno kromatografijo in že pripravljenih fragmentov protiteles E12/2, smo določali s testom ELISA. V vdolbinice z vezanim antigenom smo nanесли serijo redčitev z znanimi koncentracijami necepljenih protiteles ter očiščenih fragmentov Fab in Fc. Začetna koncentracija proteinov v vzorcih je bila 100 µg/ml, izračunali smo jo s pomočjo merjenja absorbance pri 280 nm. Kot sekundarna protitelesa smo uporabili specifična anti-Fab IgG in anti-Fc IgG protitelesa. Rezultati so prikazani na slikah 10 in 11.



SLIKA 10: Titer očiščenih protiteles C1/1 ter očiščenih fragmentov Fab in Fc. Graf prikazuje odvisnost absorbance pri 405 nm od koncentracije necepljenih protiteles ali obeh fragmentov.

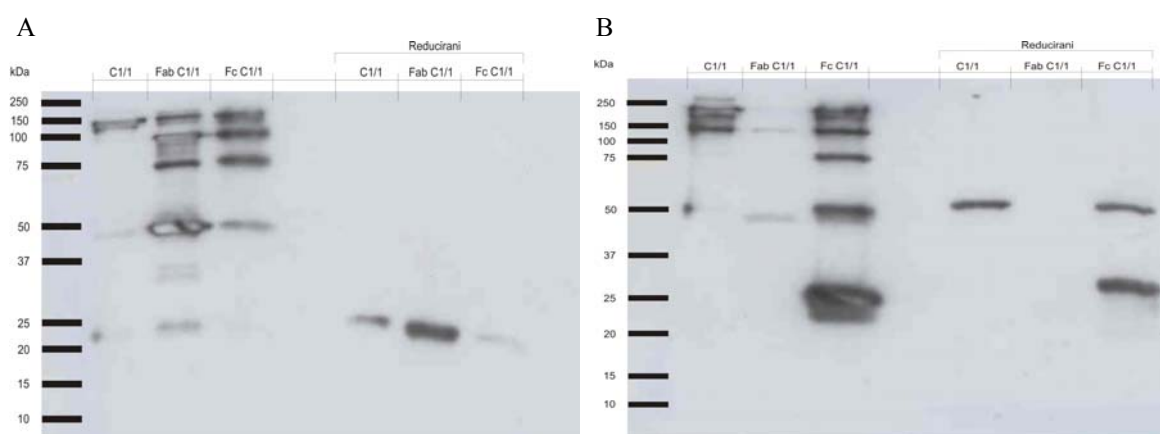


SLIKA 11: Titer očiščenih protiteles E12/2 ter očiščenih fragmentov Fab in Fc. Graf prikazuje odvisnost absorbance pri 405 nm od koncentracije necepljenih protiteles ali obeh fragmentov.

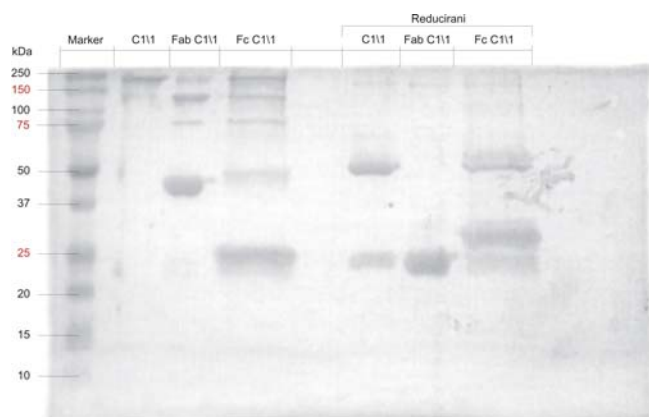
Necepljena protitelesa C1/1 in E12/2 smo uporabili kot kontrole za preverjanje obeh specifičnih sekundarnih protiteles. Pri vzorcih s fragmenti Fab in Fc, na katere smo vezali njim pripadajoče konjugate, doseže absorbanca vrh pri koncentraciji proteinov med 10 in 1 $\mu\text{g/ml}$, nato absorbanca pada. Pri fragmentih Fab, na katere smo vezali konjugat anti-Fc IgG, je po pričakovanju absorbanca nizka, saj smo ta vzorec očistili fragmentov Fc. Pri vzorcu s fragmenti Fc, na katere smo vezali anti-Fab IgG protitelesa, pa smo dobili pozitivno reakcijo, kar nakazuje na to, da so v vzorcu še vedno prisotna necepljena protitelesa. Vsi vzorci s pozitivnimi reakcijami dosežejo najvišjo absorbanco pri koncentraciji proteinov okrog 1 $\mu\text{g/ml}$, pri koncentracijah 0,01 $\mu\text{g/ml}$ in več pa v vzorcih ni zaznati več protiteles ali fragmentov.

4.1.3 Prenos Western in barvanje gela z barvilom Biosafe CBB

Čistost fragmentov protiteles C1/1 smo določili tudi z drugimi metodami. Tako smo z NaDS elektroforezo proteine iz vzorcev, ki so vsebovali celotno protitelo C1/1 ter iz vzorcev, ki so vsebovali fragmente Fab in Fc, ločili glede na molekulsko maso. Nato smo en gel barvali z barvilom Biosafe CBB, iz drugih dveh pa smo z metodo Western prenesli proteine na nitrocelulozno membrano ter jih analizirali z imunodetekcijo. Rezultati so prikazani na slikah 12 in 13.



SLIKA 12: Analiza Western ter imunodetekcija necepljenega C1/1 ter njegovih fragmentov Fab in Fc z anti-Fab IgG (A) in anti-Fc IgG (B). V žepke smo nanesti vzorce 0,5 μg nereduciranih in reduciranih proteinov.



SLIKA 13: Barvanje gela z barvilom Biosafe CBB. V žepke smo nanесли vzorce s 5 μ g nereduciranih ter reduciranih proteinov.

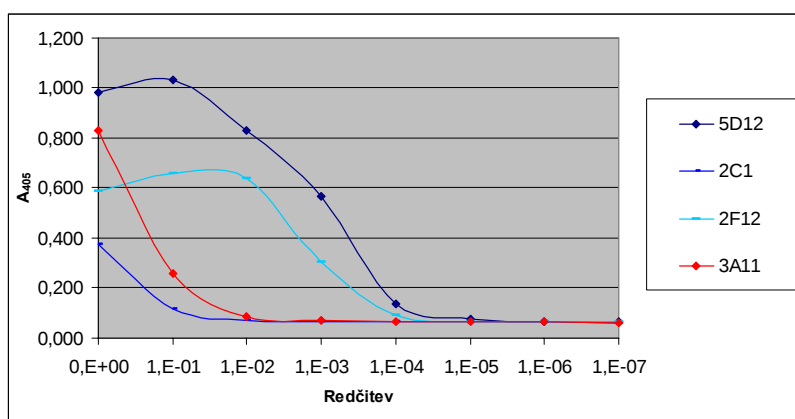
Za protitelo C1/1 smo detektirali lise pri 150 kDa, pri reduciranem vzorcu pa na višinah 50 kDa (proste težke verige) in 25 kDa (proste lahke verige). Pri vzorcu, ki je vseboval fragmente Fab mAb C1/1, smo opazili najmočnejšo liso na višini 50 kDa. Lise smo zaznali tudi pri molekulskih masah od 75 kDa do 150 kDa, kar je nakazovalo prisotnost kompleksov Fab (na membrani s konjugatom anti-Fc IgG jih nismo zasledili), ki pa so pri redukciji razpadli. Pri reduciranem Fab C1/1 smo zaznali lise pri 25 kDa. Pri Fc C1/1 pa je bilo prisotnih največ lis. Lisa na višini 50 kDa je odgovarjala fragmentom Fc, najmočnejša lisa pa je bila na višini 25 kDa in je verjetno posledica predolge inkubacije protiteles s papainom. Papain lahko cepi molekule IgG1 poleg mesta na zgibu (med C γ 1 in C γ 2 domenama) tudi znotraj regije Fc, tako nastanejo manjši fragmenti (Fc'). Pri istem vzorcu smo opazili tudi lise z večjimi molekulskimi masami, ki so bile posledica prisotnih necepljenih protiteles C1/1 (zasledili smo jih z obema konjugatoma). To sta nam potrdili lisi pri 50 kDa reduciranih celotnih C1/1 in reduciranih Fc C1/1 (slika 12B).

4.2. HIBRIDOMSKE CELIČNE LINIJE

Po odmrzovanju hibridomskih celičnih linij smo celice do tretje pasaže gojili v malih stekleničkah (25 cm²), da so si opomogle in se namnožile do ustrezne gostote. Za nadaljnjo analizo smo pri -20 °C shranili po 5 ml izčrpanih supernatantov posameznih pasaj.

4.2.1 Začetna analiza hibridomskih celičnih linij

Izčrpane supernatante linij 5D12, 2C1, 2F12 in 3A11 smo analizirali s testom ELISA. Želeli smo potrditi, da odmrznjene linije še vedno proizvajajo anti-Fab mAbs. Kot antigen smo uporabili Fab V5B2, kot primarna protitelesa serijo redčitev izčrpanih supernatantov, kot sekundarna protitelesa pa za mišji Fc specifičen konjugat (slika 14).

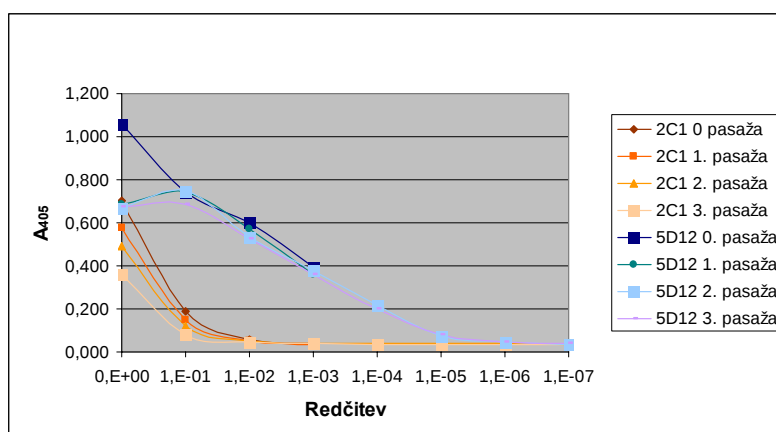


SLIKA 14: Proizvodnja anti-Id mAbs pri posameznih celičnih linijah. Absorbance pri 405 nm predstavljajo relativne vsebnosti protiteles v redčitvah supernatantov.

Najvišji titer anti-Fab protiteles sta dosegli liniji 5D12 in 2F12 (z nižjimi vrednostmi absorbance pri nasičenju), z redčenjem pa je titer pričakovano počasi padel. Liniji 3A11 in 2C1 sta dali slabše rezultate, saj je titer protiteles zelo hitro padel. Verjetno je, da je bilo v slednjih linijah zelo malo klonov, ki so proizvajali specifična mAbs oz. je bila specifična proizvodnja nizka.

4.2.2 Spremljanje proizvodnje specifičnih protiteles po pasažah

Pri linijah 5D12 in 2C1 smo poskušali ugotoviti, ali se proizvodnja anti-Fab mAbs med gojenjem celičnih linij spreminja (slika 15).

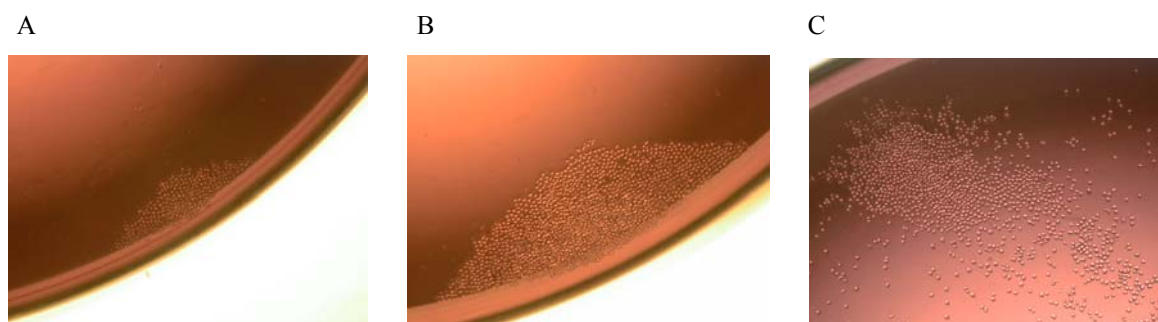


SLIKA 15: Proizvodnja mAbs linij 5D12 in 2C1 pri različnih pasažah. Absorbance pri 405 nm predstavljajo relativne vsebnosti protiteles v redčitvah supernatantov.

Za linijo 5D12 je bilo značilno, da se vsebnost mAbs med pasažami ni bistveno razlikovala. Edino v neredčenem supernatantu odmrznjenega vzorca (0. pasaža) je bil delež mAbs višji, že po prvem redčenju pa se je krivulja ujemala z ostalimi. Pri liniji 2C1 smo zopet opazili nizko začetno vsebnost anti-Fab V5B2 Abs ter padanje proizvodnje protiteles pri naslednjih pasažah. Titer protiteles je padel na zanemarljivo raven že pri 100-kratni redčitvi.

4.3 KLONIRANJE CELIČNIH LINIJ

Po nekaj dneh, ko so celične linije dosegle ustrezno gostoto, smo jih klonirali z metodo omejenega redčenja, z različnimi stopnjami redčenja. Manjše redčitve (2,5 in 3 celice na vdolbinico) smo uporabili pri tistih linijah, za katere smo menili, da vsebujejo malo klonov, ki proizvajajo specifična protitelesa. S tem smo povečali možnost preživetja klonov tistih celičnih linij, ki počasneje rastejo ali pa so občutljive na redčenje. Z večjimi redčitvami (0,7 in 1 celica na vdolbinico) pa smo povečali verjetnost, da bodo hibridomi, ki zrastejo v eni vdolbinici proizvod enega klona in bodo proizvajali monoklonska protitelesa. Na sliki 16 je prikazan primer celičnega klona v različnih dneh po začetku kloniranja, v preglednici 4 pa so zbrani podatki o kloniranju vseh celičnih linij.



SLIKA 16: Celice po kloniranju. 3 dni star klon (A), 5 dni star klon (B), razsute celice 5 dni po kloniranju (C), 40x povečava, konfokalni mikroskop.

S pomočjo ELISA testov, ki smo jih izvedli 7 do 10 dni po kloniranju, smo izbrali klone, ki so proizvajali anti-Id protitelesa, ki so reagirala z Fab V5B2. Na izbiro klonov so vplivali rezultati ELISA testa in pa tudi fiziološke lastnosti celic. Izbrane klone smo nagojili do večjih volumnov in shranili izčrpan supernatant, iz celic smo izolirali RNA ter jih zamrznili za nadaljnje analize.

PREGLEDNICA 4: Stopnje kloniranja celičnih linij in izbrani kloni

Linija	Stopnja kloniranja	Izbrani kloni
5D12	2 plošči po 0,7 celice/vdolbinico	5D12/B9 5D12/A3 5D12/C1
2F12	1 plošča po 0,7 celice/vdolbinico 1 plošča po 2,5 celic/vdolbinico	2F12/D7 2F12/E4 2F12/C2 2F12/B7
2C1	3 plošče po 0,7 celice/vdolbinico 1 plošče po 2,5 celic/vdolbinico 5 plošč po 1 celico/vdolbinico	2C1/G5
3A11	1 plošča po 0,7 celice/vdolbinico 1 plošča po 1 celico/vdolbinico 1 plošča po 2,5 celic/vdolbinico	3A11/D12
3K5	1 plošča po 1 celico/vdolbinico 1 plošča po 2,5 celic/vdolbinico	Nismo izolirali specifičnega klona
2K1	2 plošči po 3 celice/vdolbinico	Nismo izolirali specifičnega klona

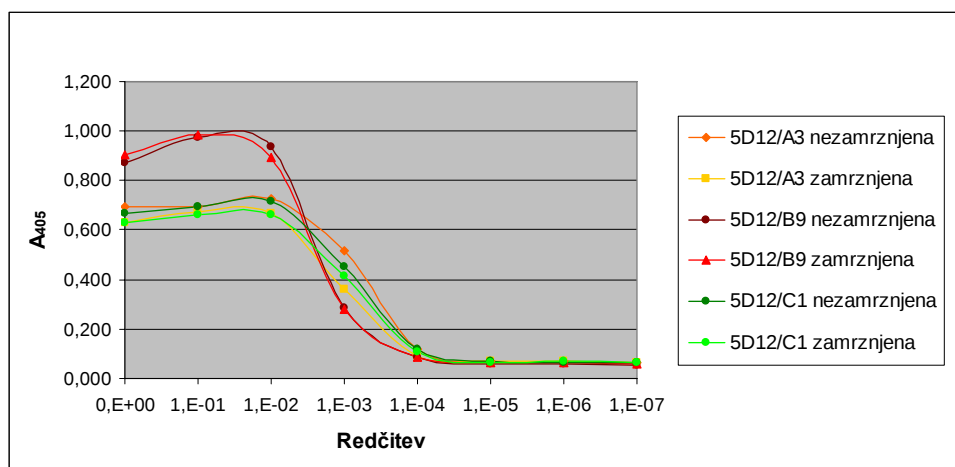
Pri kloniranju sta nam največ težav povzročali liniji 2C1 in 3A11, saj smo morali postopek večkrat ponoviti, da smo uspeli izolirati klon, ki je proizvajal anti-Fab V5B2 protitelesa. Pri linijah 3K5 in 2K1 pa kljub nizki stopnji redčenja nismo uspeli osamiti specifičnega

klona. Za vse klone linije 2F12 smo izolirali RNA ter jih zamrznili, do večjih volumnov pa smo nagojili samo klona 2F12/D7 in 2F12/E4. Pri gojenju klonov linije 5D12 pa smo opazili dva različna fenotipa celic. Za klon 5D12/B9 je bila značilna počasnejša rast in delitev celic kot pri ostalih klonih iste linije.

4.3.1 Karakterizacija anti-Id mAbs s posrednim testom ELISA

4.3.1.1 Primerjava titra supernatantov zamrznjenih in nezamrznjenih celic

Nekaj dni po zamrzovanju izbranih klonov celičnih linij, smo po eno ampulico vsakega klona odmrznili, celice nagojili do ustrezne gostote ter pripravili izčrpan supernatant. Z ELISA testom smo želeli primerjati proizvodnjo specifičnih mAbs odmrznjenih klonov in klonov, ki jih nismo zamrznili.



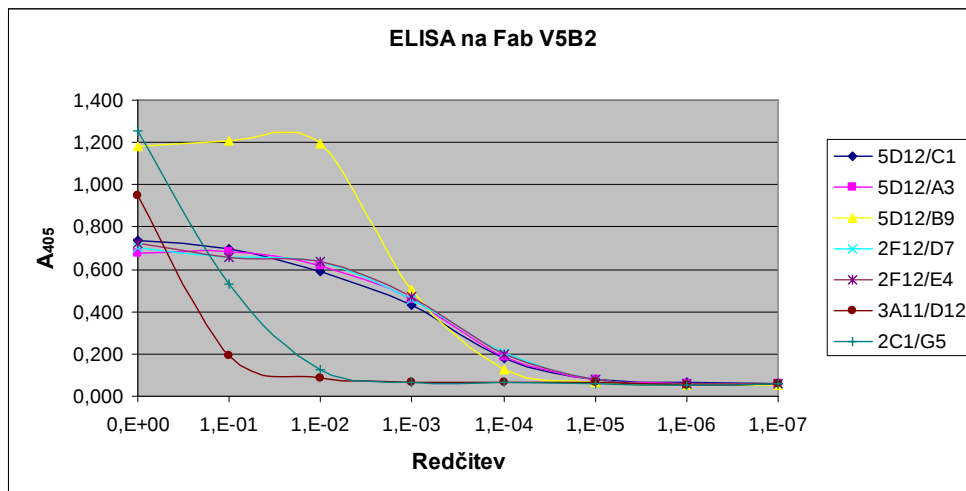
SLIKA 17: Primerjava titra supernatantov nezamrznjenih in zamrznjenih celičnih klonov linije 5D12. Absorbance pri 405 nm predstavljajo relativne vsebnosti protiteles v redčitvah supernatantov.

Na klone celične linije 5D12 zamrzovanje ni vplivalo, saj so imeli kloni, ki smo jih zamrznili, primerljive titre supernatantov z nezamrznjenimi kloni. Največ delež anti-Fab mAbs je vseboval supernatant klona 5D12/B9 (slika 17). Podobne teste smo izvedli tudi za monoklonske celične linije drugih hibridomskih linij.

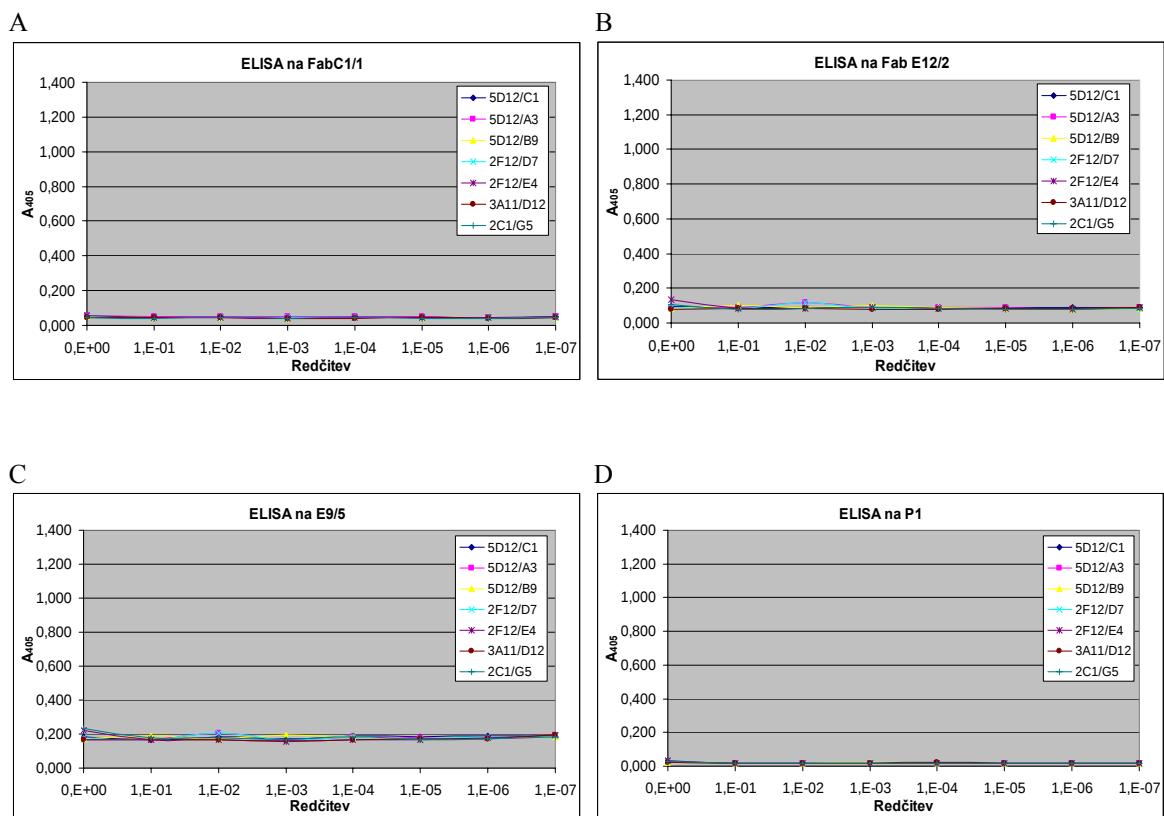
4.3.1.2 Preverjanje navzkrižne reaktivnosti

Supernatanti vseh izbranih klonov so reagirali s fragmentom Fab V5B2, kar je prikazano na sliki 18. Pri izčrpanih supernatantih omenjenih klonov smo preverjali navzkrižno reaktivnost s pomočjo Fab C1/1, Fab E12/2, mAb E9/5 in peptida P1 (slika 19).

Na podlagi rezultatov smo sklepali, da naša protitelesa niso reagirala z nobenim od izbranih protiteles oz. fragmentom Fab, niti s peptidom P1. Vrednosti so bile najnižje pri testih, kjer smo na ploščico vezali Fab C1/1 in peptid P1. Tudi pri testih z Fab E12/2 in E9/5, kjer so bile vrednosti sicer višje ($A_{405} > 0,1$), smo potrdili negativne rezultate, saj smo podobno visoke absorbance izmerili tudi pri negativnih kontrolah, kjer smo namesto supernatantov uporabili pufre A, B, C in D, ki smo jih potrebovali za izvedbo ELISA testov.



SLIKA 18: Primerjava titra supernatantov izbranih klonov. Kot antigen smo uporabili Fab V5B2.

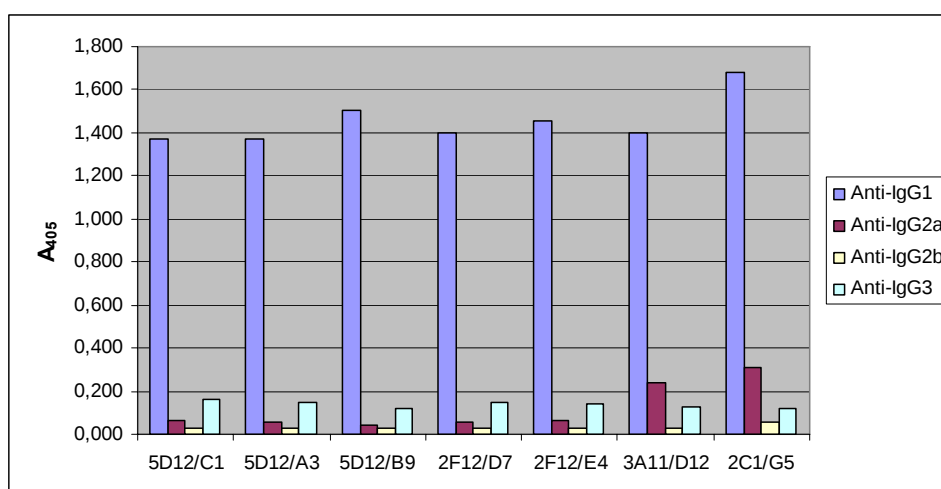


SLIKA 19: Določanje navzkrižne reaktivnosti izbranih anti-Id mAbs. Kot antigen smo uporabili Fab C1/1 (A), Fab E12/2 (B), protitel E9/5 (C) in peptid P1 (D).

4.3.1.3 Določanje podrazreda protiteles

Monoklonskim anti-Id protitelesom smo določali podrazred tako, da smo na ploščico vezali Fab V5B2, nanесли redčitve supernatantov, za konjugat pa smo uporabili anti-mišja protitelesa, usmerjena proti različnim γ verigam IgG protiteles.

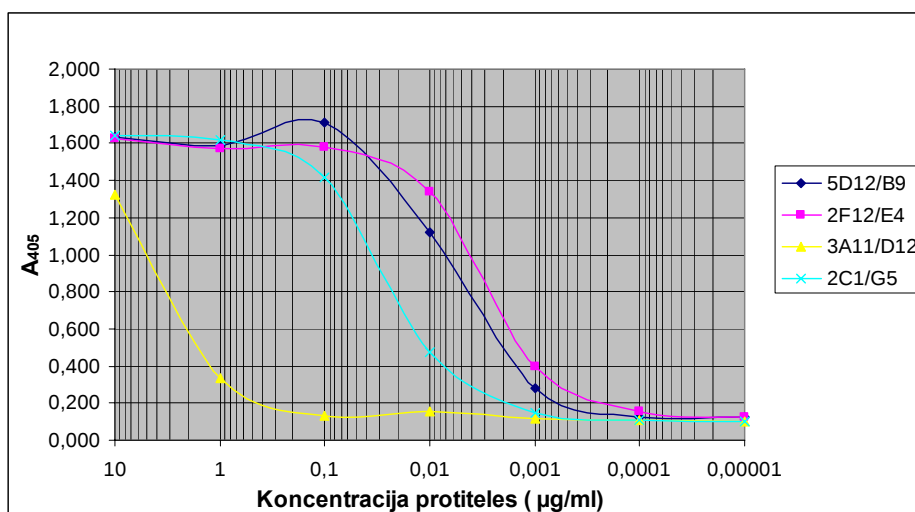
Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da so vsa monoklonska protitelesa podrazreda IgG1. Prisotnost protiteles ostalih podrazredov smo lahko izključili (slika 20).



SLIKA 20: Določanje podrazreda izbranih protiteles

4.3.1.4 Titer očiščenih mAbs in določanje relativne vezalne afinitete

Titer očiščenih protiteles so v naši skupini določili za klone 5D12/B9, 2F12/E4, 3A11/D12 in 2C1/G5. Za izvedbo testa ELISA so mAbs serijsko redčili od 10 $\mu\text{g/ml}$ do 10 pg/ml (slika 21).



SLIKA 21: Titer očiščenih anti-Id mAbs. Graf prikazuje odvisnost absorbance pri 405 nm od koncentracije protiteles (Venturini in sod., 2006).

Iz titra posameznega protitelesa smo določili relativno vezalno afiniteto (preglednica 5), ki predstavlja molarno koncentracijo protitelesa, pri kateri je dosežena polovica maksimalnega signala. Čim nižja je vrednost RVA, tem višja je afiniteta protitelesa do antigena. Na izvedbo testa ELISA in s tem določitev titra vpliva veliko dejavnikov, zato lahko s to metodo določimo samo velikostni red RVA, natančnejših vrednosti pa ne.

PREGLEDNICA 5: Relativna vezalna afiniteta posameznih mAb

mAb	RVA (mol/l)
5D12/B9	$3,3 \times 10^{-11}$
2F12/E4	$1,8 \times 10^{-11}$
3A11/D12	$1,6 \times 10^{-8}$
2C1/G5	$1,7 \times 10^{-10}$

4.3.2 Karakterizacija anti-Id mAbs z molekularnimi metodami

4.3.2.1 Izolacija RNA

Za vse izbrane klone smo s pomočjo kompleta RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Nemčija) izolirali RNA. Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 nm. Izmerjena $A_{260} = 1$ pomeni, da je v vzorcu koncentracija RNA

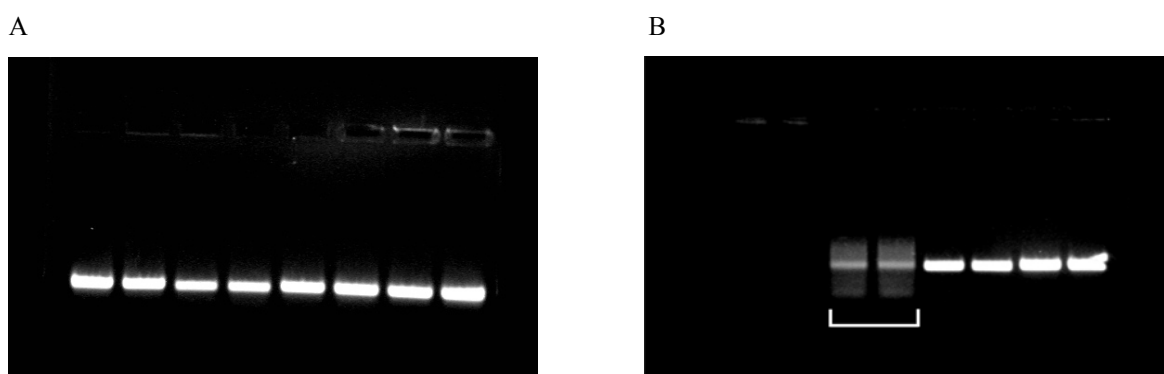
40 µg/ml. Razmerje absorbanc pri 260 nm in 280 nm ter 260 nm in 230 nm nam pove, kako čist je vzorec. Primerne vrednosti za A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} naj bi bile 1,7 – 2,1 in 1,8 – 2,2. Vrednosti izven teh meja pa so lahko posledica kontaminacije vzorca s proteini ali z DNA. Izmerjene vrednosti so prikazane v preglednici 6.

PREGLEDNICA 6: Koncentracije RNA, izolirane iz izbranih klonov

Izbrani kloni	Št. celic za izolacijo ($\times 10^6$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Koncentracija (µg/ml)
5D12/B9	2,9	1,75	1,73	404
5D12/A3	2,5	1,85	2,00	874
5D12/C1	3,0	1,84	1,85	602
2F12/D7	3,0	1,87	1,88	474
2F12/E4	3,0	1,90	2,01	735
2F12/C2	3,0	1,87	1,76	938
2F12/B7	3,0	1,83	2,04	1610
3A11/D12	1,0	1,90	1,90	460
2C1/G5	3,0	1,86	1,91	630

4.3.2.2 PCR in agarozna gelska elektroforeza

Z reverzno transkripcijo smo izolirano RNA prevedli v cDNA. Pri tem smo uporabljali specifična začetna oligonukleotida Ig_k_const za lahko ter IgG1_Hconst za težko verigo. Po reakciji smo za vsak klon dobili vzorec cDNA, ki smo ga s PCR pomnožili do večjih količin. Uspešnost reakcij reverzne transkripcije in PCR smo lahko preverili šele, ko smo produkte ločili na agaroznem gelu. Kadar sta bili reakciji uspešni, smo na gelu videli samo ostre pasove (slika 22A). Dolžine produktov nam ni uspelo natančno oceniti, saj se na 1 % agaroznem gelu naši standardi preslabo ločujejo.



SLIKA 22: Primera poliakrilamidnih gelov, na katerih smo ločili produkte PCR težkih verig (A) in lahkih verig (B). Vsak vzorec smo nanegli v dve sosednji vdolbinici na gelu. Za izolacijo DNA smo iz gela izrezali samo čiste pasove.

4.3.2.3 Izolacija DNA iz gela

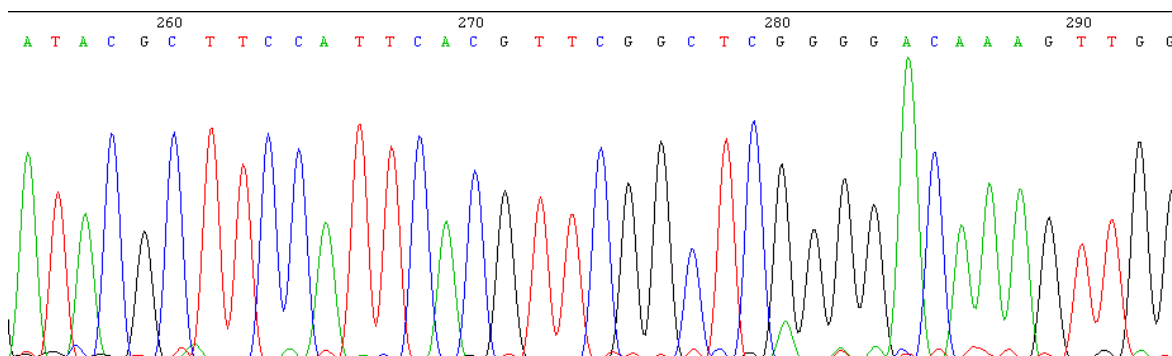
Za določanje nukleotidnega zaporedja smo potrebovali čisto DNA v raztopini, zato smo pasove z DNA produkti izrezali iz gela in jih s pomočjo kolone za izolacijo DNA ekstrahirali ter prenesli v pufer. S tem smo očistili produkte PCR vseh ostankov iz reakcijskih mešanic, ki bi nas lahko kasneje motili. V primeru, da na gelu nismo dobili jasno omejenih pasov (slika 22B, označena vzorca), smo reverzno transkripcijo in PCR za določen vzorec še enkrat ponovili. V končni fazi nam je uspelo izolirati DNA lahkih in težkih verig vseh izbranih klonov. Koncentracijo DNA v raztopini smo izmerili spektrofotometrično, pri čemer je vrednost 1 absorbance pri 260 nm pomenila, da je v vzorcu 50 µg/ml DNA. Čistost vzorca smo zopet ocenili iz razmerja A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} .

PREGLEDNICA 7: Koncentracije DNA, izolirane iz gela

Izbrani kloni	Tip verige	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Koncentracija (ng/µl)
5D12/B9	težka	1,87	0,65	48
	lahka	1,65	0,68	60
5D12/A3	težka	2,07	0,63	56
	lahka	1,63	0,65	60
5D12/C1	težka	2,40	0,60	44
	lahka	1,58	0,77	60
2F12/D7	težka	1,98	0,78	36
	lahka	1,65	0,74	60
2F12/E4	težka	1,87	0,79	56
	lahka	1,81	0,70	44
2F12/C2	težka	1,85	0,74	68
	lahka	1,73	0,67	40
2F12/B7	težka	1,80	0,75	72
	lahka	1,79	0,68	48
3A11/D12	težka	1,77	0,68	52
	lahka	1,76	1,04	80
2C1/G5	težka	1,48	0,84	40
	lahka	2,04	0,90	84

4.3.2.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

DNA variabilnih regij lahkih in težkih verig izbranih klonov smo ustrezno alikvotirali (preglednica 8) ter vzorce s hitro pošto poslali v Korejo (Macrogen). Rezultate določanja nukleotidnega zaporedja smo dobili v obliki kromatogramskih zapisov, ki smo jih nato analizirali (slika 23).



SLIKA 23: Kromatogram sekveniranja nukleotidnega zaporedja. Prikazan je zapis s srednjega dela segmenta, ki mu določamo zaporedje. Segment pripada lahki verigi klon 5D12/A3. Zaporedja smo analizirali s programom Chromas.

Za vsak tip verige smo imeli po dva kromatogramska zapisa. Prvi zapis je predstavljal nukleotidno zaporedje, pridobljeno s pomočjo začetnega oligonukleotida, ki se je prilegal 5' koncu matrične verige, drugi pa z vezavo začetnega oligonukleotida na 3' konec enoverižne DNA. V primeru, ko smo za vsako verigo določili zaporedji obeh komplementarnih verig, smo z njuno primerjavo lahko določili zaporedje tudi na mestih, ki jih na podlagi enega samega izpisa ne bi bilo mogoče določiti. Če pa smo imeli kakovosten kromatogram samo za eno komplementarno verigo, na takih mestih nismo uspeli nedvoumno določiti zaporedja. Zaradi lastnosti sekvenčne reakcije tudi ni bilo mogoče natančno določiti zaporedja nukleotidov na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov ter na koncu zapisa. V preglednici 8 so prikazani rezultati sekveniranja. Nukleotidna zaporedja smo lahko določili samo tistim tipom verig, za katere smo imeli kakovostne kromatograme za obe sekvenirani komplementarni verigi. Tako nam ni uspelo določiti nukleotidnega zaporedja težkih verig klonov 5D12/B9, 5D12/A3, 2F12/D7 in 3A11/D12 ter lahkih verig klonov 5D12/C1 in 2F12/C2.

PREGLEDNICA 8: Alikvoti DNA, poslani na sekveniranje in uspešnost določitve nukleotidnega zaporedja

Izbrani kloni	Tip verige	Koncentracija (ng/ μ l)	Volumen (μ l)	Določitev nukl. zaporedja
5D12/B9	težka	48	15	neuspešno
	lahka	50	15	uspešno
5D12/A3	težka	50	15	neuspešno
	lahka	50	15	uspešno
5D12/C1	težka	44	15	uspešno
	lahka	50	15	neuspešno
2F12/D7	težka	36	15	neuspešno
	lahka	50	15	uspešno
2F12/E4	težka	50	15	uspešno
	lahka	44	15	uspešno
2F12/C2	težka	50	15	uspešno
	lahka	40	15	neuspešno
2F12/B7	težka	50	15	uspešno
	lahka	48	15	uspešno
3A11/D12	težka	50	15	neuspešno
	lahka	50	15	uspešno
2C1/G5	težka	40	15	uspešno
	lahka	50	15	uspešno

4.3.2.5 Primerjava nukleotidnih zaporedij

Za primerjavo nukleotidnih zaporedij lahkih in težkih verig izbranih klonov smo uporabili tudi tista zaporedja verig, za katere prej nismo uspeli nedvoumno določiti zaporedja (imeli smo en kromatogramski zapis lahke ali težke verige). Pri analizi zaporedij nas je presenetilo dejstvo, da so bila zaporedja lahkih in težkih verig nekaterih protiteles različnih celičnih linij identična.

Zaporedji obeh verig protiteles klonov 5D12/A3 in 5D12/C1 sta bili identični, zato smo predpostavili, da sta oba potomca enega klona. Primerjavo zaporedij med omenjenima klonoma in klonom 5D12/B9 smo lahko izvedli samo na podlagi rezultatov za lahke verige ter ugotovili, da se razlikujejo. Zaporedja težke verige 5D12/B9 nam ni uspelo določiti, zato nismo mogli zagotoviti, da so tudi težke verige med seboj različne.

Pri liniji 2F12 smo s primerjavo zaporedja lahkih in težkih verig ugotovili, da so kloni identični, torej so vsi potomci enega klona. Najbolj pa nas je presenetilo dejstvo, da so bila tudi zaporedja variabilnih domen različnih celičnih linij med sabo enaka. Tako smo ugotovili identičnost lahkih verig pri klonih 5D12/A3, 5D12/C1 in 2F12/D7, 2F12/B7, 2F12/E4 ter težkih verig 5D12/A3, 5D12/C1 in 2F12/C2, 2F12/B7, 2F12/E4 (slika 24A).

Zaporedja lahkkih in težkih verig protiteles 2C1/G5 in 3A11/D12 se razlikujejo od vseh ostalih, razen zaporedij lahkkih verig klonov 2C1/G5 in 5D12/B9, ki sta zelo podobni, ne pa identični (slika 24B). Zaporedij težkih verig pa nismo mogli preveriti. Rezultati so zbrani v preglednici 9.

A

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
težka_2F12/E4      CCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGATTTTCATTAAC
težka_5D12/C1_5D12/A3 -----GCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGATTTTCATTAAC
težka_2F12/C2      -----TCCATCACTTGCACTGTCTCTGGATTTTCATTAAC
težka_2F12/B7      -----TCTCTGGATTTTCATTAAC
                    *****

težka_2F12/E4      CGCCTATGGTGTACACTGGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGCTGGAGT
težka_5D12/C1_5D12/A3 CGCCTATGGTGTACACTGGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGCTGGAGT
težka_2F12/C2      CGCCTATGGTGTACACTGGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGCTGGAGT
težka_2F12/B7      CGCCTATGGTGTACACTGGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGCTGGAGT
                    *****

težka_2F12/E4      GGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGGCACAGATTATAATTGGGCTCTC
težka_5D12/C1_5D12/A3 GGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGGCACAGATTATAATTGGGCTCTC
težka_2F12/C2      GGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGGCACAGATTATAATTGGGCTCTC
težka_2F12/B7      GGCTGGGAGTAATATGGGCTGGTGGAGGCACAGATTATAATTGGGCTCTC
                    *****

težka_2F12/E4      ATGTCCAGAGTGAACATTAAACAGAGACAACCTCAAGAACCAAGTTTCTT
težka_5D12/C1_5D12/A3 ATGTCCAGAGTGAACATTAAACAGAGACAACCTCAAGAACCAAGTTTCTT
težka_2F12/C2      ATGTCCAGAGTGAACATTAAACAGAGACAACCTCAAGAACCAAGTTTCTT
težka_2F12/B7      ATGTCCAGAGTGAACATTAAACAGAGACAACCTCAAGAACCAAGTTTCTT
                    *****

težka_2F12/E4      AAAAATTAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCA
težka_5D12/C1_5D12/A3 AAAAATTAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCA
težka_2F12/C2      AAAAATTAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCA
težka_2F12/B7      AAAAATTAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCA
                    *****

težka_2F12/E4      GAGATTTTGACGGCCTGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTTTTCACAGTC
težka_5D12/C1_5D12/A3 GAGATTTTGACGGCCTGGACTA-----
težka_2F12/C2      GAGATTTTGACGGCCTGGACTACT-----
težka_2F12/B7      GAGATTTTGACGGCCTGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTTTTCACAGTC
                    *****
```

B

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
lahka_5D12/B9      -----TCTCTTGCAATCTAGTCAGA
lahka_2C1/G5      CACTCTCCCTGCCTGTCACTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAATCTAGTCAGA
                    *****

lahka_5D12/B9      GCATTCTTCATAGTAATGGAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGT
lahka_2C1/G5      GCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGT
                    *****

lahka_5D12/B9      CTCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGCTCA
lahka_2C1/G5      CTCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA
                    *****

lahka_5D12/B9      GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACGCTCAGGATCAACAGAGTGGAGGCTGAGGATC
lahka_2C1/G5      GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATC
                    *****

lahka_5D12/B9      TGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATATTCGCTACACGTTTCGGAGGGGGACCA
lahka_2C1/G5      TGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCA
                    *****

lahka_5D12/B9      AGCTGGAAATAAAGCGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGCATG
lahka_2C1/G5      AGCTGGAAATAAAGCGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCGCATG
                    *****
```

SLIKA 24: Primerjava zaporedij težkih verig klonov linij 2F12 in 5D12 (A) ter lahkkih verig klonov 5D12/B9 in 2C1/G5 (B). Zaporedja klonov linij 2F12 in 5D12 so enaka, pri klonih 5D12/B9 in 2C1/G5 pa so s pikami označena mesta, kjer se pojavljajo razlike (CLUSTAL W, 2006).

PREGLEDNICA 9: Monoklonska protitelesa, ki smo jim določili nukleotidna zaporedja variabilnih regij. Z rdečo so označena protitelesa, ki imajo identično zaporedje, z modro pa protitelesi s podobnim zaporedjem lahkkih verig.

Celična linija	Izbrani kloni
5D12	5D12/B9, 5D12/C1, 5D12/A3
2F12	2F12/D7, 2F12/E4, 2F12/C2, 2F12/B7
3A11	3A11/D12
2C1	2C1/G5

4.3.2.6 Določanje aminokislinskega zaporedja

Nukleotidna zaporedja variabilnih regij težkih in lahkkih verig smo s pomočjo baze podatkov IMGT prevedli v aminokislinska zaporedja. Podatkovna baza avtomatsko primerja naše nukleotidno zaporedje z zaporedjem posameznih genskih segmentov variabilnih regij mišjih imunoglobulinov, zbranih v bazi, ki so jih določili iz genomske DNA. V preglednici 10 so genski segmenti težkih in lahkkih verig izbranih protiteles, poimenovani na podlagi poznanih zaporedij, shranjenih v bazi IMGT.

PREGLEDNICA 10: Poimenovanje genskih segmentov lahkkih in težkih verig s pomočjo baze IMGT

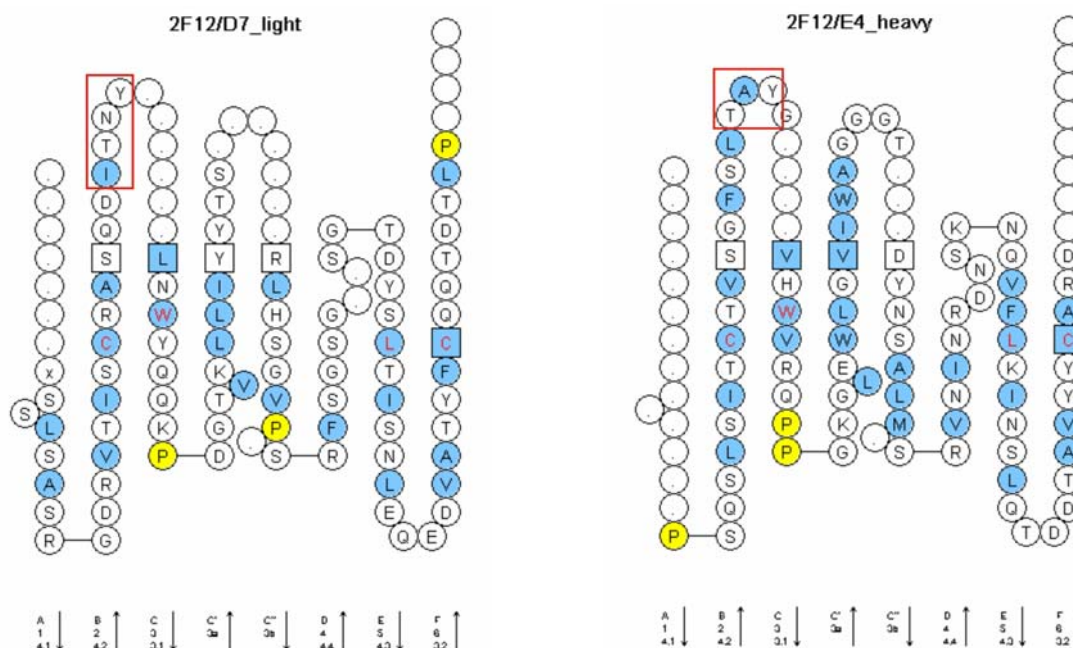
Protitelo	Tip verige	V segment	J segment	D segment
5D12/A3, 5D12/C1, 2F12/D7, 2F12/E4, 2F12/C2, 2F12/B7	težka	IGHV2-9-1*01	IGHJ2*01	IGHD1-1*01
	lahka	IGKV10-96*01	IGKJ4*01	
5D12/B9	lahka	IGKV1-117*01	IGKJ2*01	
3A11/D12	lahka	IGKV4-53*01	IGKJ5*01	
2C1/G5	težka	IGHV1-9*01	IGHJ3*01	IGHD2-13*01
	lahka	IGKV1-117*01	IGKJ2*01	

Aminokislinsko zaporedje variabilne regije smo dobili v obliki peptidne verige (Collier de Perles), na kateri so bile označene hipervariabilne regije (Lefranc in sod., 2003). Pri primerjavi lahkkih verig med sabo in težkih verig med sabo smo se osredotočili na te regije ter skušali odkriti določene podobnosti. Tako smo ponovno potrdili veliko podobnost lahkkih verig klona 5D12/B9 in 2C1/G5 (preglednica 11).

PREGLEDNICA 11: Aminokislinska zaporedja hipervariabilnih regij lahkih in težkih verig protiteles (po IMGT) izbranih klonov. Protitelesa v enem polju imajo enako AK zaporedje, z rdečo so označene konzervativne zamenjave AK.

Protitelo	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
5D12/A3, 5D12/C1, 2F12/D7, 2F12/E4, 2F12/C2, 2F12/B7	QDITNY	YTS	QQTDTLP	GFSLTAYG	IWAGGGT	ARD
5D12/B9	QSI L HSNGNTY	KVS	FQGS H IPY			
3A11/D12	SSISSN	GTS	QQWSSYPL			
2C1/G5	QSI V HSNGNTY	KVS	FQGS H V P Y	GYTFSTYW	ILPGSGVP	AR

V hipervariabilnih delih smo iskali tudi motiv peptida P1 (CITQYERESQAYY). Največjo podobnost smo odkrili pri zaporedju lahke verige 2F12/D7 (slika 25) in sicer zaporedje ITNY, kjer bi asparagin (N) lahko nadomeščal glutamin (Q) iz peptida P1 (ITQY). Tudi pri težki verigi 2F12/E4 smo odkrili zaporedje TAY, ki bi lahko predstavljalo zaporedje QAY iz peptida (zamenjava polarnih AK treonina in glutamina). Rezultati so shematsko prikazani na sliki 24.



SLIKA 25: Aminokislinsko zaporedje variabilne regije lahke verige mAb 2F12/D7 (levo) in težke verige mAb 2F12/E4 (desno). Oba proizvajata celica, potomka istega klona, z rdečim okvirjem sta označeni zaporedji hipervariabilnega dela (CDR 1), ki sta podobni AK zaporedju iz peptida P1 (IMGT, 2006).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Zaradi pojava goveje spongiformne encefalopatije, ki je prerasla v epidemijo in zaradi možnosti prenosa bolezni na ljudi ter nenavadnih lastnosti povzročitelja – infektivnega agensa, so prionske bolezni postale zelo zanimivo raziskovalno področje. Veliko težav pri proučevanju mehanizma patogenosti predstavlja odsotnost vsakršnega imunskega odziva na prionski protein, ki je posledica tolerance do lastnih oziroma lastnim podobnih proteinov. Netopnost patološke oblike prionskega proteina otežuje določitev tridimenzionalne strukture, ki pa je pomembna informacija pri razvoju terapevtskih sredstev in potencialnega cepiva.

V skupini na CRIDR si prizadevajo določiti del prostorske strukture PrP^{Sc} s pomočjo uporabe antiidiotipskih protiteles. Zanje je namreč značilno, da lahko v določenih primerih prepoznavajo vezavno mesto za antigen določenega protitelesa ter posnemajo tridimenzionalno strukturo osnovnega antigena. S kristalografskimi študijami kompleksa fragmentov Fab idiotipskega in antiidiotipskega mAbs bi radi določili strukturo za PrP^{Sc} specifičnega epitopa ter tako doprinesli k reševanju strukture prionov.

Po predhodni imunizaciji miši z Fab V5B2 smo izolirali celične linije, ki proizvajajo poliklonska protitelesa proti antigenu. Na podlagi teorije molekularne mimikrije (Jerne, 1974) je fragment Fab ustrezen antigen, saj se lahko na njegovih variabilnih regijah ohrani informacija o aminokislinskem zaporedju antigena, v našem primeru peptida P1, ki se ponovno pojavi v variabilni regiji anti-Id protitelesa. Želeli smo izolirati tista anti-Id protitelesa, ki interagirajo s paratopom na Fab V5B2, torej z mestom, kamor se veže tudi peptid P1.

Po odmrzovanju hibridomskih celičnih linij smo izčrpane supernatante testirali in potrdili, da vse linije proizvajajo anti-Fab V5B2 protitelesa, vendar pa so bili rezultati linij 2C1 in 3A11 mnogo slabši kot linij 5D12 in 2F12. Tudi med gojenjem celičnih linij se

proizvodnja mAbs ohranja na isti ravni, kar smo dokazali s testiranjem izčrpanih supernatantov, izoliranih iz štirih pasaž. Razlike v titracijskih krivuljah med pasažami iste linije so najverjetneje posledica lastnosti supernatantov, ki niso bili enako izčrpani. Problem pri testih ELISA, kjer smo kot vzorce uporabljali supernatante izčrpanih linij ali klonov je, da ne poznamo točne koncentracije protiteles v vzorcu. Vedno smo poskušali pripraviti supernatante izčrpanih linij. Te smo prepoznali na podlagi morfologije celic in barve gojišča (bledo rumena). Največ protiteles se tvori in izloči ob propadanju celic, tako lahko njihova koncentracija v gojišču narašča še nekaj dni po propadu večine celic (Pretnar Hartman, 2005). Predolgo shranjevanje gojišča v neustreznih pogojih, kot npr. v inkubatorju pa močno zniža aktivnost protiteles zaradi delovanja proteaznih encimov, ki se sprostijo v gojišče ob propadanju celic.

S kloniranjem celičnih linij smo želeli doseči, da bo celična kultura monoklonska in bo zato proizvajala samo en tip protiteles, ki smo ga poimenovali po klonu. Klone smo izbirali glede na proizvodnjo protiteles in njihovo sposobnost vezave na antigen. Pri linijah 5D12 in 2F12 smo izbrali po tri in štiri klone. Klon 5D12/B9 se je po hitrosti v rasti razlikoval od ostalih dveh klonov iste linije, zato smo pričakovali, da gre v resnici samo za dva različna klona. Pri linijah 2C1 in 3A11 smo morali kloniranje večkrat ponoviti, da smo uspeli izolirati stabilne klone z želenimi protitelesi. Na podlagi titra supernatantov linij smo predvidevali, da liniji verjetno vsebujeta zelo malo klonov, ki prepoznajo Fab V5B2. Pri kloniranju, kjer smo uporabljali močnejše redčenje, smo te klone izgubili, zato smo kasneje uporabili redčenje z večjim številom celic na luknjico. V gostejših kulturah si celice namreč lažje ustvarijo posebno mikrookolje, ki je obogateno z mikrohranili, rastnimi faktorji in hormoni, zato lahko tudi počasneje rastoče celice preživijo (Glad in Nillson, 1994). Kljub temu smo pri vsaki od omenjenih linij izolirali samo po en klon. Pri linijah 3K5 in 2K1 pa nismo uspeli izolirati specifičnega klona. Možna razlaga za to je, da se v celični liniji nahaja malo celic proizvajalk anti-Id Abs, ki pa proizvajajo velike količine protiteles. Velika proizvodnja pa negativno vpliva na celično rast, zato jih lahko druge celice, ki ne proizvajajo protiteles, prerastejo.

Za vse izbrane klone smo s posrednim testom ELISA potrdili, da proizvajajo anti-Id mAbs proti Fab V5B2. Supernatant klona 5D12/B9 je dosegel najvišji titer, kar pomeni, da ta

klon proizvaja največ protiteles ali pa najbolj afinitetna protitelesa. Velika proizvodnja je lahko tudi vzrok za njegovo počasnejšo rast. Za titracijske krivulje ostalih dveh klonov linije 5D12 in vseh klonov linije 2F12 je bilo značilno, da so se prekrivale. Na podlagi tega smo sklepali, da so omenjeni kloni verjetno potomci enega klona in zato proizvajajo enaka protitelesa.

Zamrzovanje klonov ni vplivalo na proizvodnjo protiteles. Po odmrzovanju so si celice namreč hitro opomogle in kmalu začele s proizvodnjo specifičnih mAbs v enakem obsegu kot pred zamrzovanjem.

Iz predhodnih raziskav smo imeli na razpolago mAbs proti različnim konformacijam peptida P1 ter celotni molekuli PrP, da smo lahko načrtovali ustrezno selekcijo (Vranac, 2005; Vranac in sod., 2006, v tisku; Černilec in sod., 2006, v pripravi). Za določanje navzkrižne reaktivnosti anti-Id protiteles smo kot antigene uporabljali peptid P1, protitelo E9/5 ter fragmente Fab mAbs C1/1 in E12/2, ki jih je bilo potrebno ustrezno pripraviti. Po cepljenju omenjenih protiteles s papainom smo pri čiščenju mešanic s kolone najprej sprali nevezane fragmente Fab, s kislo elucijo pa še fragmente Fc. Za nadaljnjo uporabo smo združili frakcije z najvišjimi koncentracijami posameznih fragmentov. S testom ELISA smo potrdili, da v vzorcu s fragmenti Fab ni prisotnih fragmentov Fc. Vzorec s fragmenti Fc pa ni bil tako čist, saj smo zaznali tudi necepljena mAbs. To smo potrdili tudi s prenosom Western, kjer smo v omenjenem vzorcu zaznali tudi večje komplekse z molekulsko maso okrog 150 kDa. Lastnost papaina, da v določenem času cepi omejeno število imunoglobulinov, je vzrok, da smo imeli v vzorcu poleg fragmentov Fc tudi necepljena protitelesa, ki pa jih ne moremo ločiti s čiščenjem z afinitetno kromatografijo na proteinu A-agarozu. Ob kisli eluciji se namreč s kolone sperejo tako prosti fragmenti Fc kot tudi necepljena protitelesa. Za naše nadaljnje delo smo potrebovali samo fragmente Fab, ki pa so bili dovolj dobro očiščeni.

Anti-Id protitelesa, ki smo jih izolirali, niso navzkrižno reagirala z nobenim izmed izbranih antigenov, ki smo jih uporabili za negativno selekcijo. Za peptid P1 lahko rezultat najlažje razložimo, saj je peptid primarni imunogen za idiotipska mAbs V5B2, proti katerim smo pridobili anti-Id protitelesa. Na podlagi naših predvidevanj naj bi namreč paratopi anti-Id

protiteles ponazarjali strukturo peptida P1. Pokazali smo, da anti-Id protitelesa ne prepoznajo fragmenta Fab mAbs C1/1 niti E12/2. Protitelo E12/2 prepozna AK zaporedje 144 – 156 na PrP, ki pa ni vključeno v peptidu P1. Epitop protitelesa C1/1 pa sestavlja AK zaporedje ERESQAY, ki je sicer del peptida P1, vendar pa to protitelo kot tudi E12/2 ne loči med celičnim in patološkim PrP (Vranac, 2005; Černilec in sod., 2006, v pripravi). To pomeni, da v epitopu, ki ga prepozna C1/1, ni strukturnih razlik med PrP^C in PrP^{Sc}, za katere pričakujemo, da se bodo pojavile v paratopu anti-Id protiteles. Poleg tega smo želeli s protitelesoma C1/1 in E12/2 izključiti tudi lažno pozitivne reakcije. Omenjeni protitelesi, kot tudi mAb V5B2, so namreč imunoglobulini podrazreda IgG1. Za njih je značilno, da imajo enake konstantne domene C_H1, ki se nahajajo na fragmentih Fab. V primeru, da bi anti-Id mAbs razen z Fab V5B2 interagirala tudi z Fab C1/1 in Fab E12/2, bi to pomenilo, da se v resnici vežejo na konstantne domene in ne na variabilne domene Fab V5B2. Zato taka anti-Id protitelesa v paratopu ne bi ponazarjala motiva peptida P1. Tudi pri protitelesu E9/5, ki je po seroloških lastnostih zelo podobno protitelesu V5B2 (Vranac, 2005; Vranac in sod., 2006, v tisku), smo potrdili negativen rezultat. Kljub temu da sta obe protitelesi specifični za PrP^{Sc}, pa se razlikujeta v minimalnih epitopih. mAb V5B2 z enako afiniteto prepozna tako P1 kot mišjo različico peptida P1, protitelo E9/5 pa je specifično le za humano zaporedje P1. V okviru druge diplomske naloge je skupina potrdila tudi veliko razliko v nukleotidnem zaporedju variabilnih regij lahkih in težkih verig omenjenih protiteles (Kosmač, 2006).

Vsa anti-Id protitelesa so podrazreda IgG1, ki je posledica T_H2 odgovora. Na tip celičnega imunskega odziva vpliva več dejavnikov, med drugim lokalne tkivne razmere v času antigenske aktivacije in tudi višina odmerka pri imunizaciji. T_H1 odziv je pogostejši pri nizkih ali zelo visokih koncentracijah antigena, pri srednjih koncentracijah pa se razvije T_H2 odziv. Z imunizacijo miši Balb/c s fragmentom Fab V5B2 smo tako povzročili diferenciacijo celic T pomagalk v T_H0 celice, ki izdelujejo številne citokine, med drugim IL-4, ki povzroči razvoj T_H2 celic. Slednje nato izdelujejo IL-4, IL-5, IL-6 in IL-13 ter tako pospešijo tvorbo protiteles (poleg IgG1 tudi druge izotipe), hkrati pa zavirajo delovanje citotoksičnih limfocitov. Posledica prevlade imunskega odziva T_H2 je učinkovito odstranjevanje tujkov, ki manj škoduje tkivu, saj ni prisotnega močnega vnetja. (Vozelj, 2000).

Na podlagi titra očiščenih antiidiotipskih mAbs smo za protitelesa, ki jih proizvajajo nesorodni kloni, izračunali relativno vezalno afiniteto, ki je dober približek njihovih relativnih afinitet. Za protitelo 2F12/E4 smo pokazali, da ima najvišjo afiniteto za vezavo Fab V5B2, kar je bilo vidno tudi pri izračunu RVA, ki je dosegla red velikosti 10^{-11} mol/l. Titracijske krivulje protiteles 5D12/B9 in 2C1/G5 so bile sicer vzporedne s krivuljo mAb 2F12/E4, bile pa so pomaknjene v levo, kar kaže na nekoliko nižjo afiniteto vezave. Za protitelo 3A11/D12 smo ugotovili najvišji RVA, red velikosti je 10^{-8} mol/l. Zaključimo lahko, da so naša anti-Id protitelesa visoko afinitetna za Fab V5B2, v ta razred namreč spadajo protitelesa z RVA med 10^{-8} in 10^{-12} mol/l.

S primerjavo nukleotidnih zaporedij variabilnih regij smo ugotovili, da so vsi kloni linije 2F12 identični, prav tako sta identična tudi klona 5D12/A3 in 5D12/C1. Ugotovili smo tudi, da je zaporedje omenjenih klonov homologno zaporedju klonov linije 2F12, kar pomeni, da so vsi potomci enega klona. To smo domnevali že na podlagi titracijskih krivulj supernatantov, saj so se le-te skoraj popolnoma prekrivale. Identičnost linij je lahko posledica tega, da so bile vse celične linije pripravljene v eni fuziji vraničnih limfocitov z mielomskimi celicami. Tako je možno, da sta se potomki enega limfocita B v procesu fuzije zlili z različnima mielomskima celicama. S tem smo potrdili, da smo v procesu kloniranja pri vsaki od celičnih linij 2F12, 3A11 in 2C1 izolirali po en klon, ki proizvaja anti-Fab V5B2 mAbs, pri liniji 5D12 pa dva klona, pri čemer je eden identičen klonom linije 2F12. Dejansko smo izolirali štiri različne klone, ki proizvajajo anti-Id protitelesa: 5D12/B9, 2F12/E4 (predstavnik skupine identičnih klonov), 3A11/D12 in 2C1/G5.

S primerjavo nukleotidnih zaporedij lahkih verig klonov 5D12/B9 in 2C1/G5 smo ugotovili skoraj popolno ujemanje. To je bilo še bolj očitno, ko smo primerjali njuni AK zaporedji. Od 22 AK, ki sestavljajo CDR regije lahke verige, sta se klona razlikovala v dveh AK, v obeh primerih pa je šlo za konzervativne zamenjave hidrofobnih AK (levcin z valinom in izolevcin z valinom). Naravna selekcija limfocitov B pri imunizaciji ter nato še strogo izbiranje klonov glede na čim višjo proizvodnjo protiteles in njihovo selektivno vezavo na antigen, je lahko vzrok, da smo izolirali dva klona s skoraj identičnim zaporedjem variabilnih delov. To bi pomenilo, da tako zaporedje pomembno vpliva na

specifičnost protitelesa. Druga razlaga pa je, da sta kloni 5D12/B9 in 2C1/G5 potomca istega limfocita B, pri čemer je pri enem klonu prišlo do mutacije, ki je vzrok za zamenjavo aminokisline v variabilni regiji.

Z iskanjem motiva peptida P1 v AK zaporedju hipervariabilnih delov lahkih in težkih verig smo želeli odkriti AK zaporedje za PrP^{Sc} specifičnega epitopa. V regijah CDR1 lahke in težke verige protitelesa 2F12/E4 (in s tem tudi pri identičnih protitelesih) smo odkrili zaporedje nekaj aminokislin, ki odgovarja delu zaporedja peptida P1. Zaporedje ITNY na lahki verigi je homologno zaporedju ITQY iz peptida P1, na težki verigi pa zaporedje TAY odgovarja zaporedju QAY istega peptida. V obeh primerih je prisotna ena konzervativna zamenjava polarnih aminokislin. Tudi Ban s sodelavci je pokazal, da so se večji odseki homologije anti-Id protitelesa in antigena pojavljali na CDR1 regijah lahke in težke verige, prav tako sta bili prisotni tudi dve konzervativni AK zamenjavi (Ban in sod., 1994). Sklepamo torej, da se je del zaporedja peptida P1 zopet izrazil v paratopu anti-Id protitelesa. V hipervariabilnih regijah ostalih protiteles sicer nismo opazili daljšega zapisa peptida, kar pa ne izključuje možnosti pojava notranje podobe peptida P1 v paratopu. Tega namreč sestavlja šest hipervariabilnih regij, ki se v terciarni strukturi približajo in tvorijo vezavno mesto za antigen. Za natančno iskanje motiva peptida P1 je zato potrebno analizirati ne le AK zaporedje, temveč tudi tridimenzionalno strukturo paratopa. Poleg tega vemo, da mAb V5B2 prepozna agregate peptida P1, v agregatih pa je struktura P1 verjetno podobna strukturi, ki jo ima P1 v molekuli PrP^{Sc} (Poklar Ulrih in sod., 2006; Vranac, 2005). To pomeni, da postanejo določene aminokisline iz primarnega zaporedja posameznega peptida šele v agregatu pravilno prostorsko orientirane in tako tvorijo epitop. Zato je lahko paratop anti-Id mAbs odraz epitopa agregiranega peptida in ne epitopa posameznega peptida P1. Posebej je treba omeniti prisotnost tirozinov (Y), ki smo jih odkrili v prvi in tretji CDR regiji lahkih verig ter CDR1 regiji težkih verig protiteles. Po trditvah Paramithiotisa in sodelavcev (Paramithiotis in sod., 2003), naj bi bila dvojica YY na PrP bistvenega pomena za prepoznavanje PrP^{Sc}. Ker sta bila tirozina vključena v peptid P1 (AK 225, 226), lahko domnevamo, da se v paratopu anti-Id protiteles tudi nahajata skupaj, česar pa v primarni strukturi nismo potrdili.

V nadaljnjih raziskavah bo potrebno s kristalografskimi študijami kompleksa fragmentov Fab mAb V5B2 in ustreznega anti-Id mAb določiti prostorsko strukturo za PrP^{Sc} specifičnega epitopa. To je izredno pomembno za razvoj učinkovitih diagnostičnih in terapevtskih metod za prionske bolezni. Tudi ideja o anti-Id protitelesih kot cepivih je zelo vzpodbudna. Taka cepiva, ki ne predstavljajo nevarnosti za okužbo, bi lahko v organizmu izzvala učinkovit imunski odziv.

5.2 SKLEPI

- Z imunizacijo miši Balb/c s fragmentom Fab za PrP^{Sc} specifičnega protitelesa V5B2, smo pridobili celične linije, ki proizvajajo anti-Fab V5B2 specifična protitelesa.
- S kloniranjem smo dobili več klonov, ki proizvajajo anti-Id mAbs proti Fab V5B2.
- S pomočjo komercialnih reagentov nam je uspelo iz vseh klonov izolirati RNA, ki smo jo nato prevedli v DNA. Nukleotidno zaporedje smo določili za variabilne regije lahkih in težkih verig.
- Na podlagi primerjave nukleotidnih zaporedij smo izbrali štiri nesorodne klone, ki proizvajajo anti-Id mAbs istega izotipa, se z visoko afiniteto vežejo na Fab V5B2 in navzkrižno ne reagirajo z drugimi protitelesi proti PrP, ki smo jih vključili v raziskavo.
- Vsem protitelesom smo določili AK zaporedja variabilnih regij lahkih in težkih verig.
- Pri enem protitelesu smo v primarnem zaporedju našli krajši motiv peptida P1.
- Natančno notranjo podobo peptida P1 v paratopu anti-Id protiteles oz. kemijsko okolje je potrebno poiskati z uporabo kristalografskih metod in metod molekularnega modeliranja v nadaljnjih študijah.

6 POVZETEK

Strukturna sprememba celičnega prionskega proteina PrP^{C} v patološko izoobliko prionskega proteina PrP^{Sc} je razlog za pojav prionskih bolezni, ki so v zadnjem času postale zelo popularno raziskovalno področje. Odsotnost vsakršnega imunskega odziva pri obolelih otežuje proučevanje omenjenih bolezni, netopnost PrP^{Sc} pa onemogoča določitev tridimenzionalne zgradbe prionskega proteina. To povzroča težave pri razvoju učinkovitih diagnostičnih testov, terapij in potencialnih cepiv. Ena izmed metod reševanja strukture PrP^{Sc} temelji na reševanju zgradbe posameznih epitopov ter kasnejšem računalniškem modeliranju. S kristalografskimi študijami kompleksa za PrP^{Sc} specifičnega idiotipskega in njegovega antiidiotipskega (anti-Id) protitelesa bi bilo možno določiti strukturo za PrP^{Sc} specifičnega epitopa na patološki izoobliki proteina. Za anti-Id protitelesa je namreč značilno, da lahko v določenih primerih na variabilnih regijah ponazarjajo notranjo podobo epitopa prvotnega antigena.

Cilj diplomskega dela je bila izbira monoklonskih anti-Id protiteles (anti-Id mAbs), ki se selektivno vežejo na variabilne regije mAb V5B2. Protitelo V5B2, ki je specifično za PrP^{Sc} , je bilo pridobljeno s predhodno imunizacijo miši s peptidom P1 iz humanega prionskega proteina.

Po imunizaciji miši z Fab V5B2 smo pridobili celične linije z anti-Id Fab V5B2 poliklonskim odzivom. Da bi izbrali monoklonske celične kulture, smo celične linije klonirali z metodo omejenega redčenja. Z negativno selekcijo - s testom ELISA, kjer smo kot antigene uporabljali druga protitelesa proti prionskim proteinom, smo izbrali nekaj klonov, proizvajalcev specifičnih anti-Id mAbs podrazreda IgG1, ki interagirajo z variabilno regijo mAb V5B2. S primerjavo nukleotidnih zaporedij variabilnih regij lahkih in težkih verig protiteles smo izbrali štiri protitelesa, ki jih proizvajajo različni kloni. Za protitelesa teh klonov je značilno, da z visoko afiniteto vežejo fragmente Fab V5B2. Po določitvi aminokislinskega (AK) zaporedja variabilnih regij lahkih in težkih verig izbranih protiteles smo pri enem protitelesu našli krajši motiv peptida P1. V AK zaporedju hipervariabilnih regij ostalih protiteles sicer nismo odkrili zapisa peptida, kar pa ne izključuje možnosti pojava notranje podobe peptida P1 v tridimenzionalni strukturi paratopa anti-Id protiteles.

7 VIRI

Ban N., Escobar C., Garcia R., Hasel K., Day J., Greenwood A., McPherson A. 1994. Crystal structure of an idiotype-anti-idiotype Fab complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 5: 1604-1608

Bhattacharya-Chatterjee M., Chatterjee S.K., Foon K.A. 2000. Anti-idiotype vaccine against cancer. *Immunology Letters*, 74: 51-58

Bird S.M. 2004. Recipients of blood or blood products "at vCJD risk". *British Medical Journal*, 328: 118-119

Chromas. Softwear. 2006. Australia, Technelysium Pty Ltd.
<http://www.technelysium.com.au/chromas.html> (22. maj 2006)

CLUSTAL W: Multiple Sequence Alignment. 2006. Kyoto, Kyoto University Bioinformatics Center. <http://align.genome.jp> (2. jun. 2006)

Collins S.J., Lawson V.A., Masters C.L. 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*, 363, 9402: 51-61

Černilec M., Vranac T., Hafner-Bratkovič I., Popović M., Junes P., Čurin Šerbec V. 2006. Identification of an epitope on the recombinant bovine PrP that is able to elicit prominent immune response in wild-type mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Članek v pripravi.

Čurin Šerbec V., Bresjanac M., Popović M., Pretnar Hartman K., Galvani V., Ruprecht R., Černilec M., Vranac T., Hafner I., Jerala R. 2004. Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jakob's disease-affected and normal brain tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 5: 3694-3698

Delault N.R., Lucassen R.W., Supattapone S. 2003. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 425, 6959: 717-720

Dormont D. 2002. Prion disease: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Letters*, 529: 17-21

Gajdusek, D.C., Zigas V. 1957. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. *New England Journal of Medicine*, 257: 974-978

Garcia K.C., Desiderio S.V., Ronco P.M., Verroust P.J., Amzel L.M. 1992. Recognition of angiotensin II: antibodies at different levels of an idiotypic network are superimposable. *Science*, 257: 528-537

Glad C., Nilsson I. 1994. Large-scale production of monoclonal antibodies. V: *Antibody techniques*. Malik V.S., Lillehoy E.P. (eds.). San Diego, Academic Press, Incorporated: 153-157

Greenspan N.S., Bona C.A. 1993. Idiotypes: structure and immunogenicity. *FASEB Journal*, 7, 5: 437-444

Huang Z., Prusiner S.B., Cohen F.E. 1995. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding & Design*, 1: 13-19

IMGT: The International ImmunoGenetics Information System. 2006. Montpellier, Université Montpellier. <http://imgt.cines.fr/> (2. jun. 2006)

Izadyar L., Friboulet A., Remy M.H., Roseto A., Thomas D. 1993. Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 19: 8876-8880

Jerne N.K. 1974. Towards a network theory of immune system. *Annals of Immunology*, 125C, 1-2: 373-389

Kascak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna DeMasi M., Fersko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diring H. 1987. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *Journal of Virology*, 61, 12: 3688-3693

Köhler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 5517: 495-497

Korth C., Stierli B., Streit P., Moser M., Schaller O., Fischer R., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H., Raeber A., Braun U., Ehrensperger F., Hornemann S., Glockshuber R., Riek R., Billeter M., Wutrich K., Oesch B. 1997. Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 390, 6655: 74-77

Kosmač M. 2006. Peptid P1 iz zaporedja človeškega prionskega proteina selektivno vzbuja nastanek monoklonskih protiteles z identičnim hipervariabilnim področjem. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 71 str.

Lefranc M.P., Pommié C., Ruiz M., Giudicelli V., Foulquier E., Truong L., Thouvenin-Contet V., Lefranc G. 2003. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Developmental and Comparative Immunology*, 27: 55-77

Lefranc M.P., Giudicelli V., Ginestoux C. 2004. IMGT-ONTOLOGY for immunogenetics and immunoinformatics. *In Silico Biology*, 4, 1: 17-29

Montano R.F., Morrison S.L. 2002. Influence of the isotype of the light chain on the properties of IgG. *Journal of Immunology*, 168, 1: 224-31

Nissonof A. 1991. Idiotypes: concepts and applications. *Journal of Immunology*, 147, 8: 2429-2438

Nossal G.J. 2003. The double helix and immunology. *Nature*, 421, 6921: 440-444

Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Cohen F.E., Prusiner S.B. 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 10962-10966

Pan Y., Stacieann C., Amzel L.M. 1995. Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. *FASEB Journal*, 9: 43-49

Paraf A. 1998. An immunological approach to prion diseases. *Medical Hypotheses*, 50, 1: 85-90

Paramithiotis E., Pinard M., Lawton T., LaBoissiere S., Leathers V.L., Zou W.Q., Estey L.A., Lamontagne J., Lehto M.T., Kondejewsky L.H., Francoeur G.P., Papadopoulos M., Haghighat A., Spatz S.J., Head M. in Will R. 2003. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nature Medicine*, 9, 7: 893-899

Pedersen N.S., Smith E. 2002. Prion diseases: Epidemiology in man. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 110, 1: 14-22

Poklar Ulrih N., Skrt M., Veranič P., Galvani V., Vranac T., Čurin Šerbec V. 2006. Oligomeric forms of peptide fragment PrP (214-226) in solution are preferentially recognized by PrP(Sc)-specific antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344, 4: 1320-1326

Prado M.A., Alves Silva J., Magalhaes A.C., Prado V.F., Linden R., Martins V.R., Brentani R.R. 2004. PrP^C on the road: trafficking of the cellular prion protein. *Journal of Neurochemistry*, 88, 4: 769-781

Pretnar Hartman K. 2005. Monoklonska protitelesa proti epitopni sekvenci patološke oblike prionskega proteina, uporabna v diagnostiki. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 124 str.

Prusiner S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216: 136-144

Prusiner S. B. 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 23: 13363-83

Shi Q., Jackowski G. 1998. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. V: *Gel electrophoresis of proteins*. Hames B. D. (ed). 3rd ed. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press: 1-52

Tonegawa S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302: 575-581

Venturini A., Koren S., Vranac T., Omahen L., Narat M., Čurin Šerbec V. 2006. Antiidiotypic antibodies against PrPSc-specific monoclonal antibody. V: 16th European Congress of Immunology, Pariz, avgust 2006

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS d.d.: 552 str.

Vranac T. 2005. Protitelesni odziv miši BALB/c in *Prnp*^{0/0} na izbrane peptidne dele prionskega proteina. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 117 str.

Vranac T., Pretnar Hartman K., Popović M., Venturini A., Žerovnik E., Čurin Šerbec V. 2006. A single prion protein peptide can elicit a panel of isoform specific monoclonal antibodies. *Peptides*. Članek v tisku.

Wang Z., Raifu M., Howard M., Smith L., Hansen D., Goldsby R., Ratner D. 2000. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *Journal of Immunological Methods*, 233, 1-2: 167-77

Ward C.M., Wilkinson A.P., Lee H.A., Morgan M.R. 1999. Monoclonal anti-idiotypic antibody mimicking the pesticide binding site of cutinase: potential for broad specificity organophosphate recognition. *Journal of Immunological Methods*, 224: 197-202

Weissmann C., Enari M., Klöhn P.C., Rossi D., Flechsig E. 2002. Transmission of prions. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 2: 157-165

White A.R., Hawke S.H. 2003. Immunotherapy as a therapeutic treatment for neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*, 87, 4: 801-808

Wu K.K., Kabat E.A. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *Journal of Experimental Medicine*, 132, 2: 211-250

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA
ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Luka OMAHEN

**DOLOČITEV LASTNOSTI MONOKLONSKIH
ANTIIDIOTIPSKIH PROTITELES PROTI
MONOKLONSKEMU PROTITELESU V5B2, KI
SELEKTIVNO VEŽE PATOLOŠKO IZOObLIKO
PRIONSKEGA PROTEINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006