

2017 • 2018
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis
Isolatie van Gc-globuline uit serum

PROMOTOR :
ing. Liesbet PAULS
PROMOTOR :
ing. Bart THEWISSEN

COPROMOTOR :
Dhr. Eugène BOSMANS

Naomi Bongaerts
Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



2017•2018

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Isolatie van Gc-globuline uit serum

PROMOTOR :

ing. Liesbet PAULS

PROMOTOR :

ing. Bart THEWISSEN

COPROMOTOR :

Dhr. Eugène BOSMANS

Naomi Bongaerts

Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie



KU LEUVEN

Woord vooraf

Het schrijven van mijn eindwerk is de laatste kilometer die moet worden afgelegd in de marathon naar mijn ingenieursdiploma. Het omzetten van mijn theoretische kennis naar praktisch onderzoek gaat natuurlijk niet altijd van een leien dakje. Bij het vallen en opstaan heb ik veel hulp gehad van anderen die ik oprecht wil bedanken.

Allereerst wil ik mijn externe promotoren, Eugene Bosmans en Bart Thewissen, bedanken. Bedankt Eugène voor het delen van een ongelofelijke hoeveelheid kennis. Die neem ik zeker mee in mijn professionele carrière. Bart bedankt om dagelijks voor mij klaar te staan en te helpen met elk probleem dat ik voorlegde, maar ook voor de leuke babbels doorheen de dag.

Vervolgens wil ik ook mijn interne promotor, Liesbet Pauls, bedanken. De wekelijkse mails met aanmoedigen en hulp wanneer het even niet vlotte heb ik erg geapprecieerd. Het is ook zeker mede dankzij u dat ik zo ver geraakt ben met het onderzoek van mijn eindwerk.

Gudrun Conings, het plezier dat we samen op de stage hebben gemaakt zal ik nooit vergeten. Ook de mentale steun en de kracht om mijn geklaag af en toe te aanhoren werden op prijs gesteld.

Als laatste wil ik mijn familie bedanken in het bijzonder mijn zus Brenda. De studententijd was een zware tijd, maar dankzij jou heb ik de moed gekregen om door te zetten. Ook Raf Maes, voor het nalezen van teksten en het geven van opbouwende kritiek, bedankt.

Inhoudsopgave

Lijst van tabellen	5
Lijst van figuren	7
Abstract	11
Abstract in English	13
1 Inleiding	15
1.1 <i>Situering</i>	15
1.2 <i>Probleemstelling</i>	15
1.3 <i>Doelstellingen</i>	16
1.4 <i>Methode</i>	16
2 Vitamine D-bindend proteïne	19
2.1 <i>Gc-globulinestructuur</i>	19
2.2 <i>Functies van Gc-globuline</i>	20
2.2.1 Transport van vitamine D.....	20
2.2.2 Extracellulair Actine Scavenger Systeem.....	22
2.2.3 Co-activatie van het complementsysteem.....	23
2.2.4 Gc-MAF	25
2.3 <i>Toepassingen van Gc-globuline</i>	27
2.3.1 Kankerbehandeling met Gc-MAF	27
3 Materiaal en methoden	29
3.1 <i>Gelfiltratie of Size Exclusion Chromatography</i>	29
3.1.1 Staalbehandeling	29
3.1.2 Chromatografiekolom	29
3.2 <i>Dot blotting van Gc-globuline</i>	31
3.3 <i>Sandwich-ELISA</i>	32
3.4 <i>Affiniteitskolom</i>	33
3.5 <i>Dot blotting van albumine</i>	34
4 Resultaten	35
4.1 <i>Gelfiltraties</i>	35
4.1.1 Karakterisering van de Econo-kolom	36
4.1.2 Design of Experiment	40
4.1.3 Dot blotting	43
4.2 <i>Affiniteitschromatografie</i>	49
4.2.1 Dot blotting	49
5 Besluit	56
6 Referenties	59
Bijlagen	65

Lijst van tabellen

Tabel 1 Sephadex® G: Cut-off molecuulgewicht voor globulaire proteïnen [65].....	30
Tabel 2 Parameters bepaald met behulp van de karakterisering van de gel met Dextran Blue en Cytochroom c	36
Tabel 3 Regressieanalyse uitgevoerd op grafiek van het elutievolume i.f.v. log(M) voor Sephadex G-75: fractioneringsgebied voor globulaire proteïnen: 3000-80000 Da.....	38
Tabel 4 Design of Experiments	40
Tabel 5 Resultaten ELISA van fracties van de gelfiltratie G-75 met v.l.n.r. de <i>wells</i> met blauw substraat; in het midden de <i>wells</i> met het geel substraat na aanzuren met HCl; en het meest rechts een leeg sjabloon om de positie van de stalen weer te geven.....	47
Tabel 6 Bijkomende resultaten van de sandwich-ELISA van experiment 3 van de G-75 gelfiltratie geëluëerd met PBS	48

Lijst van figuren

Figuur 1 Structuur van het vitamine D-bindend proteïne [14]	19
Figuur 2 In vivo pathway voor productie van vitamine D [21]	21
Figuur 3 Vitamine D opnamemechanismen [13]	22
Figuur 4 Extracellulair Actine Scavenger Systeem [4]	23
Figuur 5 Schematische weergave van het complementsysteem [31]	24
Figuur 6 Enzymatische omzetting van Gc-globuline tot GcMAF (in vivo) [40]	26
Figuur 7 Antigen presenterende cel met MHC I (links) gebonden op CD8+ T-lymfocyt ter activatie van de cytotoxische T-lymfocyt en APC met MHC II (rechts) gebonden op CD4+ T-lymfocyt ter activatie van de T-helper cel [30]	27
Figuur 8 Eerste voorstel voor de werking van Nagalase [40]	28
Figuur 9 Isolatieproces tijdens een gelfiltratie [63]	30
Figuur 10 Opbouw van dot blot membraan waarbij het blauwe bolletje het Gc-globuline (Ag) voorstelt en het groene bolletje het HRP enzym voorstelt [68]	31
Figuur 11 Enzymatische reactie op TMB gekatalyseerd door HRP	32
Figuur 12 Sandwich-ELISA opbouw met volgende voorstellingen: het paarse As is het primair As, de roze zeshoek VBP, het gele As is het secundair As geconjugerd aan HRP en het en het substraat is TMB [68]	33
Figuur 13 Cibacron Blue F3GA covalent gebonden op agarosegel [69]	33
Figuur 14 Absorbantie van proteïnen bij een golflengte van 280 nm afkomstig van fracties van de gelfiltraties in de glazen kolom van 30 cm op serumstaal geëluëerd met fosfaatgebufferde zoutoplossing	35
Figuur 15 Karakterisering van kolom met Dextran Blue en cytochroom c	36
Figuur 16 Elutiepatroon kalibratie kolom(G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van Dextran Blue (absorbantie gemeten bij 405 nm) en Cytochroom C (absorbantie gemeten bij 600 nm)	37
Figuur 17 Elutievolume i.f.v. log (M) voor Sephadex® G-75: fractioneringsgebied: 3000 Da- 80000 Da: zwarte rechte=regressieanalyse; groene en rode coördinaten geven exclusielimiet weer; paarse coördinaten=Gc-globuline; blauwe coördinaten=albumine .	37
Figuur 19 Elutiepatroon van referentiegelfiltratie(G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van humaan (eerste piek) en kippen albumine (tweede piek)	39
Figuur 20 Optimale absorptiespectrum van albumine [72].....	39
Figuur 21 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 3 ml/min	41
Figuur 22 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 2 ml/min	41
Figuur 23 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 2,5 ml/min	42
Figuur 24 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 1 ml/min en 1 ml staalvolume.....	43
Figuur 25 Indeling van het PVDF-membraan voor de dot blot met verdunning van de serumpool (bovenaan) en verdunning van het Detection As (onderaan) in elk vakje.....	44
Figuur 26 Dot blot van het verdunningsraster van de serumpool en het Detection antibody	44

Figuur 27 Dot blot 1 van de pieken en schouders van experimenten 1 t.e.m. 5 met Sephadex G-75; Exp = Experiment; NC = Negatieve Controle	45
Figuur 28 Dot blot 2 van de pieken en schouders van experiment 6 met Sephadex G-75	46
Figuur 29 Overzicht van de uitgevoerde ELISA met links de blauwe kleuring van het TMB-substraat in de wells; in het midden de gele kleuring van het TMB-substraat na stopzetting van de reactie met HCl; en rechts een overzicht van een wellplaat	47
Figuur 30 Overzicht van de dot blot met stalen gespot van nummer 1 t.e.m. 55 en een positieve en negatieve controle gespot op respectievelijk plaats 56 en 57	50
Figuur 31 Dot blot Affi-gel Blue fracties geëluëerd met fosfaatbuffer; stalen gespot van 1 t.e.m. 28 en 31 t.e.m. 52; positieve controle van serumpool gespot op 29 en 53; negatieve controle van fosfaatbuffer gespot op 30 en 54	52
Figuur 32 Dot blot van albumine van de opgevangen affi-gel Blue affiniteitschromatografie fracties geëluëerd met fosfaatbuffer en zoutgradiënt	53
Tabel 7 Overzicht van de resultaten van de sandwich-ELISA van de opgevangen fracties afkomstig van het tweede affiniteitschromatografie-experiment met Affi-gel Blue geëluëerd met fosfaatbuffer	54
Figuur 33 Elutiepatroon van gedialyseerd serum via Affi-gel Blue affiniteitschromatografie bekomen in het onderzoek van Gianazza & Arnaud, 1982	55
Figuur 34 Verdunningsschema voor het opstellen van de ijklijn.....	70

Veel gebruikte afkortingen

VBP	Vitamine D-bindend proteïne
7-DHC	7-dehydrocholesterol
25(OH)D	25-hydroxyvitamine D
1,25(OH) ₂ D	1,25-dihydroxyvitamine D
CYP2R1	D-25-hydroxylase
CYP27B1	25(OH)D-1 α -hydroxylase
VDR	Vitamine D receptoren
PTH	Parathyroidhormoon
EASS	Extracellulair Actine Scavenger Systeem
APC	Antigenpresenterende cel
CTL	Cytotoxische T-lymfocyten
Th	T-helper cellen
GalNac	N-acetylgalactosamine
HRP	Horse radish peroxidase
PBS	fosfaatgebufferde zoutoplossing
PVDF	Polyvinylideenfluoride

Abstract

Epsilon Biotech te Zonhoven doet onder andere onderzoek naar de productie van GcMAF om te kunnen gebruiken als adjuvans dat het eigen immuunsysteem stimuleert. Om GcMAF te kunnen produceren, moet eerst Gc-globuline uit serum geïsoleerd worden op een zo rendabel mogelijke manier. Tot op heden werd dit nog niet gerealiseerd. Ook werd een kwalitatieve methode ontwikkeld om Gc-globuline aan te tonen.

Om Gc-globuline te isoleren uit het serum werden er twee afzonderlijke zuiveringsstappen ondernomen. Eerst wordt gelfiltratie toegepast waarbij Gc-globuline op basis van zijn molmassa gescheiden wordt van minerale zouten en kleine ongewenste proteïnen, maar ook van grotere proteïnen en proteïnecomplexen. Met behulp van een fosfaatgebufferde zoutoplossing als elutiebuffer wordt het serum gefractioneerd opgevangen. De tweede zuiveringsstap die uitgevoerd werd is affiniteitschromatografie waarbij een kleurstof, Cibacron Blue F3GA, specifiek bindt met verschillende proteïnen afhankelijk van de milieuomstandigheden en elutiebuffers die gebruikt worden. Tussentijdse controles om Gc-globuline aan te tonen worden gedaan met behulp van kwalitatieve dot blots, die volledig opgestart werd, en een kwantitatieve sandwich-ELISA.

Het resultaat van het onderzoek toont aan dat Gc-globuline wel degelijk geïsoleerd kan worden met behulp van gelfiltratie en affiniteitschromatografie. Naast de isolatie van Gc-globuline werd ook een kwalitatieve dot blot met succes opgestart om snel en eenvoudig Gc-globuline aan te tonen.

Abstract in English

Epsilon Biotech situated in Zonhoven performs, amongst other things, research in the production of GcMAF for the use as an adjuvant which stimulates the immune system. For the production of GcMAF, isolation of Gc-globulin from serum is necessary in the most cost-effective way possible. This goal was not yet realized. An additional qualitative test for the identification of Gc-globulin was developed.

For the isolation of Gc-globulin multiple steps are necessary. In the first place gel filtration is applied in which Gc-globulin is separated from mineral salts and small proteins based on its molecular weight, but also larger proteins or protein complexes. A phosphate buffer in saline is used as the elution buffer for the fractionation of the serum samples. The second step in the purification of Gc-globulin is affinity chromatography in which the pigment Cibacron Blue F3GA binds specifically to a wide variety of serum proteins, depending on the environment and elution buffer used in the experiments. Interim controls for the identification of Gc-globulin are performed using qualitative dot blots and quantitative sandwich-ELISA's.

The results of this research show that isolation of Gc-globulin using gel filtration and affinity chromatography is possible. Alongside isolation of Gc-globulin, a qualitative dot blot was started up to detect Gc-globulin in serum in a fast and simple way.

1 Inleiding

1.1 Situering

Deze masterproef wordt uitgevoerd in Epsilon Biotech te Zonhoven. Dit is een bedrijf dat vooral focust op onderzoek in functie van andere onderzoekscentra. Zo zijn ze enkele jaren geleden bij het onderwerp rond Gc-globuline beland.

Gc-globuline of ook wel het vitamine D-bindend proteïne (VBP) is een eiwit dat in ons lichaam geproduceerd wordt in de lever. De aminozuursequentie van het eiwit bevat een bindingsplaats voor vitamine D en zijn respectievelijke metaboliëten 25-hydroxyvitamine D₃ en 1 α ,25-dihydroxy-vitamine D₃ alsook een bindingsplaats voor G-actine. Verder bevat VBP nog een suikerstaart van drie suikers (of derivaten), namelijk galactose, siaalzuur en N-acetylgalactosamine (GalNac) [1].

Gc-globuline is in het lichaam verantwoordelijk voor meerdere belangrijke functies [2]. De belangrijkste functie is het transport van vitamine D en zijn metaboliëten. Vitamine D is een essentieel vitamine dat verantwoordelijk is voor het in stand houden van de calcium- en fosforspiegels in het bloed om zo verscheidene metabole functies aan te sturen, waaronder de botvorming [3]. Vervolgens maakt het VBP ook deel uit van het Extracellulair Actine Scavenger Systeem (EASS) waar het instaat voor transport van G-actine om zo microtromboses te voorkomen in de bloedsomloop [4], [5]. Bijkomend speelt Gc-globuline ook een belangrijke rol bij infecties. Wanneer er een infectie optreedt in het lichaam zal Gc-globuline enzymatisch omgevormd worden tot Gc-MAF in twee stappen. Eerst zal β -galactosidase, gelokaliseerd op de B-lymfocyten, het galactose afsplitsen van het N-acetylgalactosamine op de suikerrest van het VBP. Vervolgens zal het sialidase, gelokaliseerd op de T-lymfocyten, siaalzuur van de suikerstaart afsplitsen ter vorming van GcMAF [6], [7].

GcMAF is een macrofaag activerende factor die ervoor zorgt dat tijdens de infectie de macrofagen via chemotaxis naar de plaats van infectie worden gelokt en differentiëren om zo de infectie te bestrijden [1]. Bepaalde (tumor)cellen produceren een enzym, α -N-acetylgalactosaminidase - ook wel Nagalase genoemd - die de volledige suikerstaart deglycosyleert. Hierdoor wordt er geen functioneel GcMAF geproduceerd en kunnen cellen ongecontroleerd groeien [8], [9]. Uiteraard is hierdoor GcMAF een interessante factor om te onderzoeken of het gebruikt kan worden als adjuvans ter stimulatie van het eigen immuunsysteem of bijvoorbeeld bij behandelingen van verschillende kankers.

1.2 Probleemstelling

Om GcMAF te kunnen gebruiken voor medische toepassingen moet het in een zuivere vorm geproduceerd worden. Hier zijn verschillende mogelijkheden voor. De eerste mogelijkheid is om GcMAF met behulp van recombinante methodes te produceren. Dit is echter een zeer prijzige methode waardoor ze niet wordt toegepast. Een andere optie zou zijn om het VBP, dat in overmaat in bloedserum aanwezig is, te isoleren en in vitro om te vormen tot GcMAF. Er is echter nog geen gestandaardiseerde methode om Gc-globuline uit serum te isoleren op een rendabele manier. Sommige toepassingen maken gebruik van een affiniteitskolom voor Gc-globuline met een packed

bed waarop vitamine D covalent gebonden zit op de beads. Wanneer een serumstaal over deze kolom gebracht wordt, bindt Gc-globuline specifiek op vitamine D waardoor het op de kolom blijft gebonden en alzo geïsoleerd kan worden. De methode voor het maken van een kolom met vitamine D als affiniteitsligand is echter een chemisch ingewikkeld proces en wordt weinig beschreven in de literatuur. Vandaar dat Epsilon Biotech nu meer conventionele methodes tracht toe te passen. Zo heb ik het onderwerp van mijn masterproef gekregen.

1.3 Doelstellingen

Het doel van deze masterproef is de ontwikkeling van een methode om Gc-globuline uit humaan serum te isoleren op een zo efficiënt en goedkoop mogelijke manier, om ze later op grootschalig niveau toe te passen. Bijkomend moet er ook een snelle methode opgestart worden waarmee Gc-globuline en albumine kwalitatief kunnen worden aangetoond in serumstalen en geïsoleerde fracties.

Wanneer de methode voor de isolatie van Gc-globuline in humaan serum op punt staat zou het mogelijk zijn om over te stappen op dierlijk serum. Dierlijk serum is in grote hoeveelheden verkrijgbaar, denk maar aan het bloed dat bij het slachten vrijkomt en dat gebruikt kan worden om bovine VBP te isoleren. Dit geïsoleerd bovine VBP kan dan gebruikt worden om een *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) op te starten specifiek voor runder Gc-globuline.

1.4 Methode

Om Gc-globuline uit het serum te isoleren zijn meerdere stappen nodig. Allereerst wordt het plasma van citraatbloed gercalcificeerd met CaCl_2 (Sigma-Aldrich) om het tekort aan calcium aan te vullen en zo serum te vormen. Tijdens de toevoeging van calcium wordt niet alleen calcium terug aangevoerd in het plasma, maar wordt ook een stolsel gevormd door de activatie van de stollingsfactoren. Door het verwijderen van het stolsel worden de stollingsfactoren verwijderd en is het serum klaar voor gebruik. Uit dit verkregen serum wordt dan het Gc-globuline geïsoleerd.

Een eerste stap in de opzuivering van Gc-globuline is een size exclusion chromatografie (SEC) of gelfiltratie waarbij het serum wordt gefractioneerd om de aanwezige zouten en kleinere proteïnen in het serum te verwijderen.

Bij gelfiltratie wordt op basis van molecuulgrootte het serum gefilterd door gebruik te maken van een medium (of gel) in een kolom (Bio-Rad) dat poriën bevat met een zeer kleine diameter waarin de kleinere moleculen kunnen binnendringen. De grotere eiwitten zijn groter dan de gemiddelde doorsnede van de poriën in de packing waardoor ze rond de packing migreren en als eerste uit de kolom komen. De kleinere eiwitten hebben echter een langere verblijftijd door de langere afstand of weg die ze in de poriën moeten afleggen, waardoor ze gescheiden worden van de rest. Vervolgens worden de opgevangen fracties van de gelfiltratie onderzocht op aanwezigheid van Gc-globuline aan de hand van een dot blot analyse. Deze methode is een snelle en kwalitatieve manier om te achterhalen welke fracties de grootste hoeveelheid Gc-globuline bevatten. Hiervoor wordt een kleine hoeveelheid van de fractie gepipetteerd op een polyvinylchloridefluoride

(PVDF)-membraan (Whatman, Merck). Na incubatie wordt een hoeveelheid *Polyclonal Rabbit Anti-Human Gc-globulin HRP conjugate* (Dako) toegevoegd. Deze antistof bindt enkel specifiek op het aanwezige Gc-globuline in de fractie. Na een korte incubatie en een wasstap wordt vervolgens een substraat toegevoegd dat door het gebonden horseradish peroxidase (HRP) omgezet wordt tot een blauw gekleurd product. De fracties die een sterke verkleuring vertonen bevatten een grote hoeveelheid Gc-globuline en kunnen dus samengevoegd worden voor verder onderzoek.

Daarna volgt een kwantificering van de concentratie aan Gc-globuline in de bekomen fracties. Dit wordt gedaan met behulp van een sandwich-ELISA. Hierbij wordt het Gc-globuline gesandwichd tussen een polykloonaal anti-Gc-globuline (Dako), dat gebonden zit op de *wells* van een microtiter plaat, en een polykloonaal anti-Gc-globuline dat gelinkt is aan HRP (Dako). Dan wordt een substraat toegevoegd dat door het HRP wordt omgezet in een blauw gekleurd product. Na toevoegen van HCl wordt de enzymatische reactie stopgezet en wordt het blauwe product geel. Vervolgens wordt de absorbantie gemeten van de fracties bij een golflengte van 450 nm met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer). Door gebruik te maken van een standaard ijklijn wordt de concentratie Gc-globuline in de fracties berekend.

In de tweede zuiveringsstap wordt het Gc-globuline gescheiden van albumine. Dit gebeurt in de samengevoegde fracties die een hoge concentraties VBP bevatten na analyse met de dot blot en ELISA.

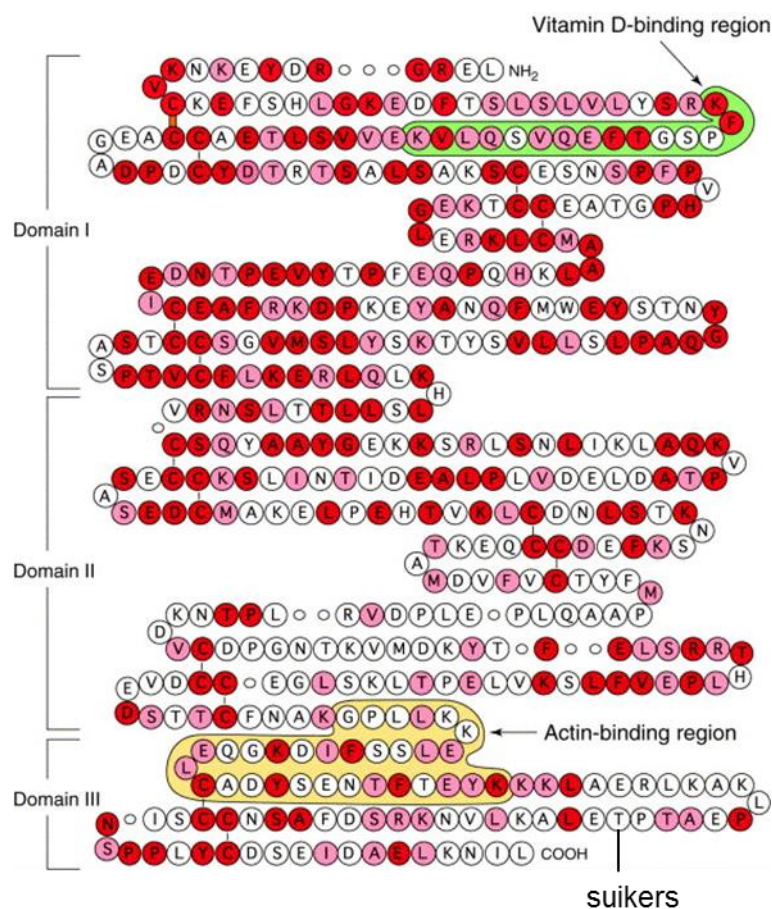
Albumine maakt ongeveer 60 % van de totale hoeveelheid eiwitten in het serum uit en heeft een vergelijkbaar molecuulgewicht als Gc-globuline [9], [10]. Dit maakt de scheiding van de twee eiwitten bij een gelfiltratie veel moeilijker. Affiniteitschromatografie biedt echter een oplossing door een affiniteitskolom te maken met cibacron blue F3GA (CB) covalent gebonden op Affi-gel Blue® (Bio-rad). CB is een kleurstof die afhankelijk van de proefcondities specifiek bindt met serumeiwitten met behulp van ionische en in mindere mate hydrofobe interacties. Hier is het doel om de juiste condities te vinden waarbij Gc-globuline in een zo hoog mogelijke concentratie en zo hoog mogelijke zuiverheid in een fractie door de affiniteitskolom komt en albumine op CB in de kolom gebonden blijft. Vervolgens wordt met de kwalitatieve dot blot gecontroleerd in welke fracties en bij welke condities het meest Gc-globuline van de kolom geëluëerd wordt en in welke fracties albumine aanwezig is. Fracties die blauw kleuren met de dot blot worden ook gekwantificeerd met behulp van de sandwich-ELISA.

Deze masterproef start met een korte theoretische achtergrond van het onderwerp, waarna in een nieuw hoofdstuk de gebruikte materialen en methodes worden beschreven. In het vierde hoofdstuk komen de resultaten aanbod die in het laatste hoofdstuk in een conclusie of besluit kort besproken worden.

2 Vitamine D-bindend proteïne

2.1 Gc-globulinestructuur

Het vitamine D-bindend proteïne (VDB) wordt ook wel Gc-globuline genoemd waarbij Gc staat voor de Groep-specifieke component. Het is een globuline met een α -helixstructuur dat deel uitmaakt van dezelfde superfamilie als albumine, afamine en α -fetoproteïne [11],[12]. Het proteïne van 458 aminozuren heeft net zoals de andere leden van de albuminefamilie een groot aantal cysteïne's in zijn structuur die verantwoordelijk zijn voor zwavelbruggen. Dit resulteert in een molecuulgewicht dat rond de 52 kilodalton (kDa) ligt. Het gen van het VBP bestaat uit 13 exons en 12 introns en staat gecodeerd op chromosoom 4 op locus of plaats 4q11-q13 in de buurt van de andere genen van de albuminefamilie [13]. Er zijn in totaal ongeveer 120 varianten van Gc-globuline, maar de meest voorkomende vormen in het humaan bloedplasma zijn Gc-2, Gc-1F en Gc-1S [1]. Deze drie vormen zijn opgebouwd uit identieke aminozuren, behalve voor de aminozuurplaatsen 416 en 420. In de quaternaire structuur van Gc-globuline zijn 2 bindingsplaatsen aanwezig, namelijk een bindingsplaats voor vitamine D en zijn metabolieten en een bindingsplaats voor G-actine. Verder is er op de structuur nog een trisacharidesuikerrest gebonden die is opgebouwd uit galactose, N-acetylgalactosamine en siaalzuur. Op Figuur 1 wordt de vitamine D-bindende en G-actinebindende regio's weergegeven. Onderaan is te zien dat via threonine (locatie 420) de suikerrest gebonden zit op Gc-globuline.



Figuur 1 Structuur van het vitamine D-bindend proteïne [14]

2.2 Functies van Gc-globuline

Gc-globuline speelt in verscheidene processen een belangrijke rol. Zo is het verantwoordelijk voor de binding en transport van vitamine D en zijn metabolieten om de calcium- en fosfaathuishouding in het lichaam te controleren en zo het botmetabolisme aan te sturen. Maar het VBP is ook een belangrijke factor in het extracellulair actine scavenger systeem en de inflammatoire pathways van het aangeboren immuunsysteem.

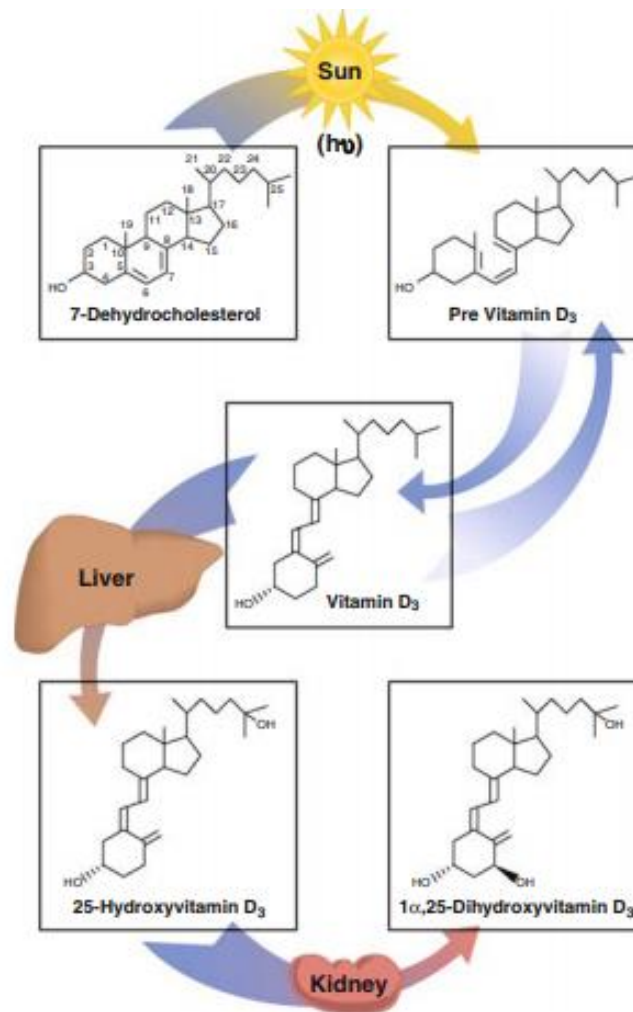
2.2.1 Transport van vitamine D

Het menselijk lichaam heeft nood aan diverse moleculen om te kunnen overleven. Zo spelen onder andere vitamines een essentiële rol in verscheidene metabolismen, de vertering en de immuniteit. Een vitamine is een organisch micronutriënt dat in een zeer lage concentratie nodig is in het dieet. Vitaminen fungeren meestal als co-enzymen en helpen bij het katalyseren van biochemische reacties in het lichaam[15]. Vitamine D wordt opgenomen via de voeding of supplementen en wordt gevormd na UV-bestraling [16].

De huid is een van de grootste organen die de mens bezit. Ze is opgebouwd uit verschillende soorten lagen en cellen. Keratinocyten zijn de cellen waaruit de epidermis is opgebouwd. In het plasmamembraan tussen de fosfolipiden van deze keratinocyten komt 65 tot 80% van het totale 7-dehydrocholesterol (7-DHC) of provitamine D₃ voor [17],[18]. Het overige percentage zit in de plasmamembranen van de dermale fibroblasten. Dit cholesterol is een natuurlijke precursor van vitamine D₃. Wanneer de huid in contact komt met zonlicht zorgt UV-B-straling ervoor dat 7-DHC een fotolyse ondergaat ter vorming van previtamine D₃. Het zonlicht wordt door de dubbele bindingen in de ringstructuur van 7-DHC geabsorbeerd waardoor één ring geopend wordt en de dubbele bindingen herschikt worden en previtamine D₃ gevormd wordt [17],[19]. Previtamine D₃ wordt al snel omgevormd tot vitamine D₃, omdat deze structuur thermodynamisch veel stabiel is. Tijdens dit proces wordt vitamine D₃ uit het plasmamembraan gekatapulteerd en komt zo in de bloedcirculatie terecht. De verklaring hiervoor ligt bij de verstoring van de hydrofobe en hydrofiele interacties tussen previtamine D₃ en de fosfolipendubbellaag van het celmembraan bij de omzetting van previtamine D₃ naar vitamine D₃ [20]. In de circulatie wordt vitamine D₃ al snel omgevormd door 2 hydroxylaties te ondergaan ter vorming van het vitamine D hormoon [21], [22]. Eerst wordt ter hoogte van de lever vitamine D₃ omgezet door D-25-hydroxylase (CYP2R1) in het inactieve 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D). De tweede hydroxylatie vindt plaats ter hoogte van de nieren waar 25(OH)D-1 α -hydroxylase (CYP27B1) het 25(OH)D omzet tot het actieve vitamine D₃ of het vitamine D hormoon dat de chemische naam 1 α ,25-dihydroxy-vitamine D (1,25(OH)₂D) draagt[13], [18], [23].

Om hypervitaminose D te voorkomen wordt bij langdurige blootstelling aan zonlicht de overmaat aan previtamine D₃ in de huid, onder invloed van UV-B, omgevormd tot de inactieve producten lumisterol en tachysterol. Ook vitamine D₃ kan onder invloed van UV-B stralen omgevormd worden tot suprasterol 1, suprasterol 2 en 5,6-transvitamine D [3]. Deze regulatie is zeer belangrijk omdat vitamine-D-intoxicatie kan leiden tot hypercalcemie, aangezien vitamine D een belangrijke rol speelt in de calcium- en

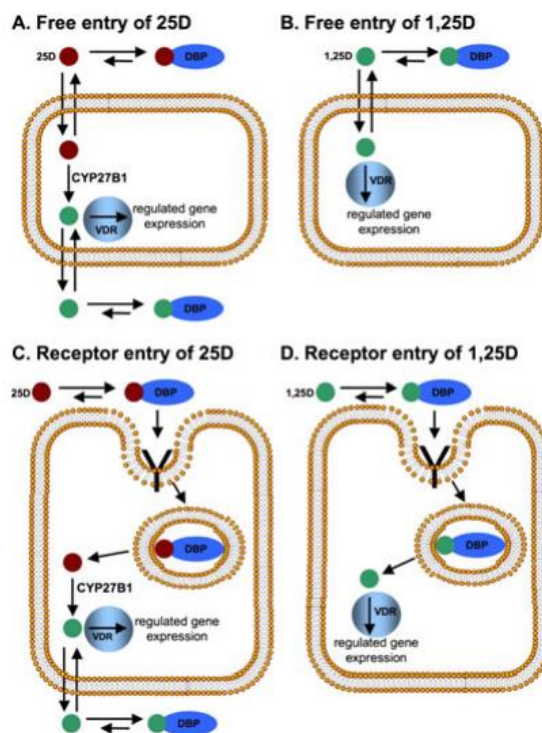
fosforhuishouding (zie 2.2.1.1) [24]. Wanneer de hypercalcemie chronisch is gaat dit meestal gepaard met milde, maar constante symptomen terwijl een acute hypercalcemie veel gevaarlijker is en een fatale afloop kan hebben indien het niet herkend en behandeld wordt [25].



Figuur 2 In vivo pathway voor productie van vitamine D [21]

2.2.1.1 Functies van het vitamine D

Omdat vitamine D essentieel is voor het lichaam, is het belangrijk dat dit in voldoende hoge concentraties in de juiste weefsels terecht komt. Dit wordt mogelijk gemaakt op verschillende manieren die weergegeven worden in Figuur 3 [13]. Zowel het 25(OH)D als het 1,25(OH)₂D kunnen vanuit de bloedcirculatie in de cellen treden met behulp van diffusie doorheen het plasmamembraan van de doelwitcellen (A en B). Maar soms kan dit ook via endocytose met behulp van een specifieke vitamine D receptor op het celmembraan (C en D). In de cel zelf wordt 25(OH)D eerst enzymatisch omgezet door CYP27B1 tot 1,25(OH)₂D. Dit actief metaboliet kan vervolgens de regulatie van ongeveer 200 tot 2000 genen up- of down reguleren door te binden op de vitamine D receptor (VDR) [23]. Het gevormde vitamine D-VDR-complex bindt dan met een tweede receptor, namelijk de retinezuur X receptor en vormt een heterodimeer complex dat in staat is te binden met specifieke nucleotidesequenties in het DNA om zo de genexpressie te reguleren [3].



Figuur 3 Vitamine D opnamemechanismen [13]

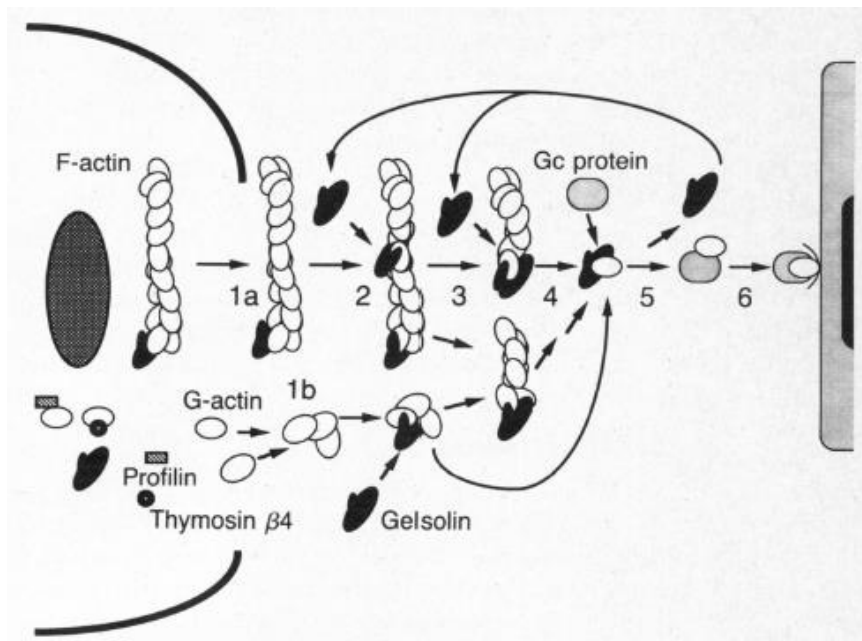
Zoals eerder vermeld is de belangrijkste functie van vitamine D de regulatie van calcium- en fosforconcentraties in een gezonde range in het serum, dat op zijn beurt belangrijk is voor een goed evenwicht in botmetabolisme. Doordat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ bindt met de VDR op het darmepitheel verhoogt de intestinale opname van calcium in de dunne darm van 10% tot 15% naar ongeveer 30% [22]. Ook de adsorptie van fosfor verhoogt hierdoor naar 60% tot 80% [3].

$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ bindt eveneens op de VDR van de osteoblasten. Hierdoor wordt in deze immature cellen de expressie van een receptor activator van de nucleaire factor- κB ligand gestimuleerd. Deze factor interageert met de factor- κB receptor die zich bevindt op de osteoclasten met als gevolg dat de osteoblasten matureren ter vorming van osteoclasten [26]. Deze mature cellen kunnen nu calcium en fosfor verwijderen uit de botten en transporteren naar de bloedsomloop om zo het gehalte van serumcalcium en- fosfor in een gezonde range te houden [3]. Wanneer er een tekort aan calcium in het bloed is, wordt dit waargenomen door calciumsensoren in de bij schildklier met als resultaat dat er een verhoogde expressie, productie en secretie van het parathyroidhormoon (PTH) ontstaat. Dit hormoon zorgt voor een verhoogde renale resorptie van calcium uit het glomerulair filtraat naar de bloedcirculatie, een verhoogde omzetting van vitamine D_3 naar $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en een verhoogde verwijdering van calcium en fosfor uit de botten naar de bloedcirculatie. Al deze effecten zorgen voor een toename van het gehalte aan calcium in het serum [27].

2.2.2 Extracellulair Actine Scavenger Systeem

Actine is een proteïne dat in een grote hoeveelheid voorkomt in het cytosol van zoogdiercellen en instaat voor de celmotiliteit en de verandering van grootte en vorm van de cel. Er zijn globulaire monomeren, G-actine, en filamentaire polymeren ook wel F-actine genoemd. Wanneer de cel schade ondervindt en necrotiseert komt de celinhoud

vrij, waaronder ook de beide vormen van het actine. Wanneer het G-actine vrijkomt in de bloedvaten heeft het een sterke neiging om te polymeriseren tot F-actine. Polymerisatie van G-actine tot F-actine wordt gekatalyseerd met behulp van nucleatie en elongatie factoren. In het lichaam komen verschillende factoren voor en afhankelijk in welke combinatie deze factoren aanwezig zijn, wordt de plaats van polymerisatie en lengte van het polymeer bepaald [28]. Bijkomend kan actine bloedplaatjes activeren en reageren met fibrine ter vorming van bloedklonters [4]. Om de vorming van deze bloedklonters te voorkomen wordt het Extracellulair Actine Scavenger Systeem (EASS) gebruikt (Figuur 4).



Figuur 4 Extracellulair Actine Scavenger Systeem [4]

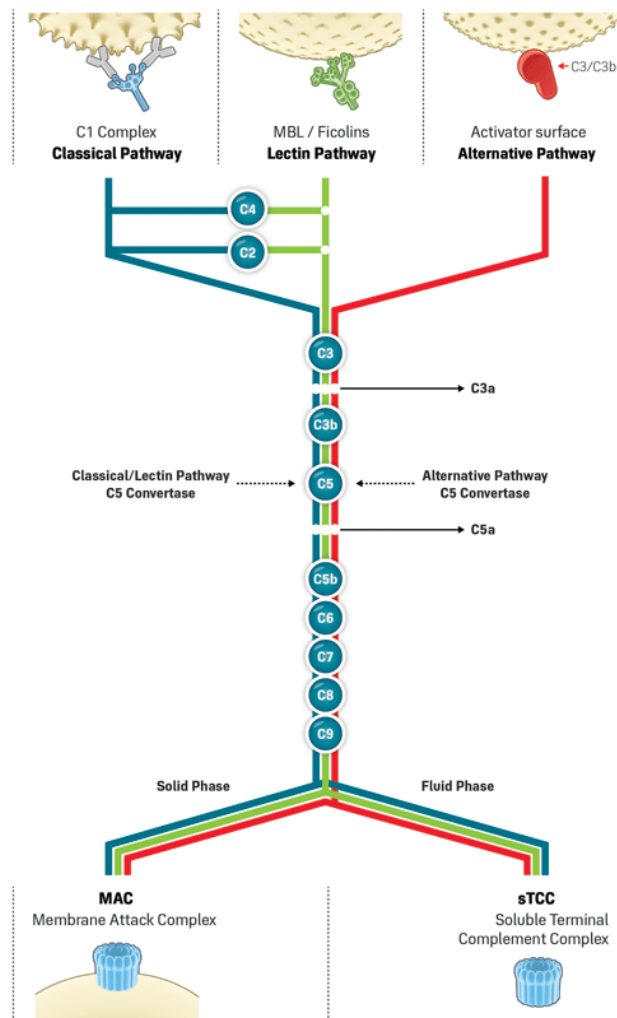
Wanneer de cel lyseert komt niet enkel actine vrij, maar ook andere actinebindende proteïnes zoals gelsoline, profiline en thymosine β_4 . Profiline en thymosine β_4 zijn 2 intracellulaire eiwitten die G-actine binden en bufferen in de cel. Hierdoor wordt spontane polymerisatie van G-actine in de cel voorkomen [28]. Gelsoline is een actinebindend eiwit dat op 2 specifieke manieren bindt met F-actine. Het gelsoline bindt eerst op één uiteinde van F-actine om verdere polymerisatie te voorkomen. Andere gelsolinemoleculen binden op de zijkanten van de filamentaire actine en zorgen zo voor capping van het polymeer ter vorming van monomeren. Toch zou nog polymerisatie kunnen optreden indien enkel gelsoline aanwezig is op het uiteinde van F-actine[4]. Daarom is de aanwezigheid van Gc-globuline van groot belang omdat dit bindt met G-actine en de monomeren meteen afvoert naar de lever waar ze worden afgebroken om zo microthrombes te voorkomen [12],[29].

2.2.3 Co-activatie van het complementsysteem

Het lichaam beschikt over een complementsysteem dat deel uitmaakt van de aangeboren immuniteit. Het kan op drie verschillende manieren geactiveerd worden, namelijk via de klassieke-, lectine- of alternatieve route. Het resultaat is altijd hetzelfde, ongeacht via welke weg het complementsysteem wordt geactiveerd. Namelijk de vorming van

meerdere Membrane Attack Complexen (MAC) in de celmembranen van nabij gelegen geïnfecteerde lichaamseigen cellen of in het celmembraan van lichaamsvreemde cellen zoals virussen en bacteriën (zie Figuur 5). Het gevolg hiervan is dat hun celmembraan meerdere poriën krijgt waardoor de celinhoud naar buiten lekt en de cel afsterft [30].

De klassieke activatie bevat de aanwezigheid van immunocomplexen (Ag-As), terwijl de lectine route een binding tussen suikergroepen op de bacteriële celwand met lectine vereist om het complementsysteem te activeren. Bij de alternatieve pathway wordt het complementsysteem spontaan geactiveerd door hydrolyse van de eerste complementfactor. Het complementsysteem vindt altijd plaats op de cellen van het immuunsysteem, meer bepaald de neutrofielen.



Figuur 5 Schematische weergave van het complementsysteem [31]

Bij de activatie van het complementsysteem komen ook fracties van glycoproteïnen precursoren C₃ en C₅ vrij namelijk, C_{3a} en C_{5a} (zie Figuur 5). Deze factoren zijn anaphylatoxines die ook een belangrijke rol spelen in het immuunsysteem doordat ze zorgen voor chemotaxis van lymfocyten en macrofagen naar de ontstekingsplaats, voor degranulatie van neutrofielen, voor betere doorlaarbaarheid van de bloedvaten zodat de cellen van het immuunsysteem sneller naar de plaats van infectie kunnen migreren, voor contractie van glad spierweefsel, voor activatie van de bloedplaatjes die kleine capillairen

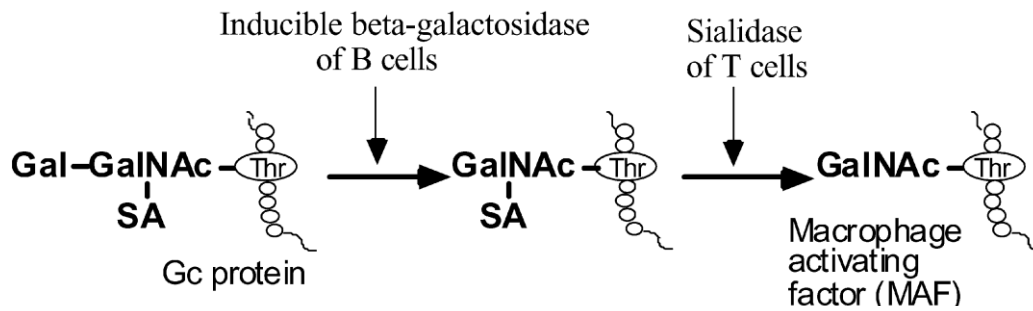
afdekken en zo voorkomen dat infecties de bloedbaan bereiken en tenslotte productie van cytokines [32], [33].

Wanneer bij infecties het complementsysteem geactiveerd wordt en er chemotactische factoren vrijkomen, meer bepaald C_{5a} dan wordt dit in de bloedcirculatie meteen door het enzym carboxypeptidase-N omgevormd tot “C_{5a} des Arg” doordat het enzym het Arginine van C_{5a} aan het carboxyl-uiteinde afsplitst. Het C_{5a} des Arg is een complementfactor die echter een veel minder krachtig anaphylatoxine is, waardoor het carboxypeptidase-N fungeert als een anti-anaphylatoxine [34]. In aanwezigheid van Gc-globuline is de anaphylatoxine sterkte van C_{5a} des Arg echter even groot als deze van C_{5a}. Gc-globuline is als het ware een up-regulator voor de complement geactiveerde neutrofielchemotaxis [35], [36]. In het weefsel wordt zowel C_{5a} als C_{5a} des Arg specifiek geactiveerd door Gc-globuline, maar de sterkte van de combinatie Gc-globuline met C_{5a} is groter dan deze van Gc-globuline en C_{5a} des Arg.

Het mechanisme van de co-activatie is nog niet helemaal achterhaald. Gc-globuline moet echter wel op de neutrofielen, waar het complementsysteem zich afspeelt, binden om C_{5a} en C_{5a} des Arg te kunnen co-activeren. Extracellulair Gc-globuline bindt op het plasmamembraan van de cellen aan een chondroitine sulfaat proteoglycaanreceptor met een lage affiniteit [37]. Opdat er een *steady state*-binding plaatsvindt tussen Gc-globuline en de proteoglycaanreceptor is elastase nodig. Dit enzym is voornamelijk intracellulair aanwezig in azurophil granules, maar komt in kleine hoeveelheden voor op het celmembraan van neutrofielen. Elastase kan ook Gc-globuline van het celoppervlak van de neutrofielen afsplitsen wat dan gepaard gaat met een verlies aan co-activatie van chemotaxis. Gc-globuline zou dus op het celmembraan op proteoglycanen binden in een elastase-rijke zone waar het vervolgens een intracellulaire signalisatie pathway activeert waarna co-activatie van C_{5a} chemotaxis ontstaat [38].

2.2.4 Gc-MAF

Een bijkomende functie van Gc-globuline is de omzetting tot GcMAF waarna macrofagen geactiveerd worden. Hierdoor kunnen infecties in het lichaam bestreden worden. Gc-globuline wordt enzymatisch omgevormd tot GcMAF, wat de macrofaag activerende factor wordt genoemd, met behulp van 2 membraangebonden enzymen op het celmembraan van geactiveerde B- en T-lymfocyten. De reactie vindt plaats ter hoogte van de suikerrest van VBP. Op Figuur 6 wordt een overzicht van de enzymatische omzetting weergegeven. Eerst splitst het β -galactosidase op het celmembraan van de B-lymfocyten het galactose af. Vervolgens splitst *Neu-I* sialidase op het celmembraan van T-lymfocyten sialzuur af. Het suikerderivaat N-acetylgalactosamine blijft nog gebonden op GcMAF. Door het vormen van MAF worden de macrofagen geactiveerd om vervolgens te differentiëren en te prolifereren zodat de aanwezige infectie in het lichaam bestreden wordt [39].



Figuur 6 Enzymatische omzetting van Gc-globuline tot GcMAF (in vivo) [40]

2.2.4.1 Inflammatoire respons

Tijdens infecties scheiden geïnfecteerde weefsels lysofosfatidylcholine en lysofosfolipiden af die macrofagen efficiënt kunnen activeren met expressie van Fc-receptoren op hun celmembraan als gevolg [41]. Om infecties in het lichaam efficiënt te bestrijden is het essentieel dat er geactiveerde B- en T-lymfocyten als zowel Gc-globuline aanwezig zijn [42].

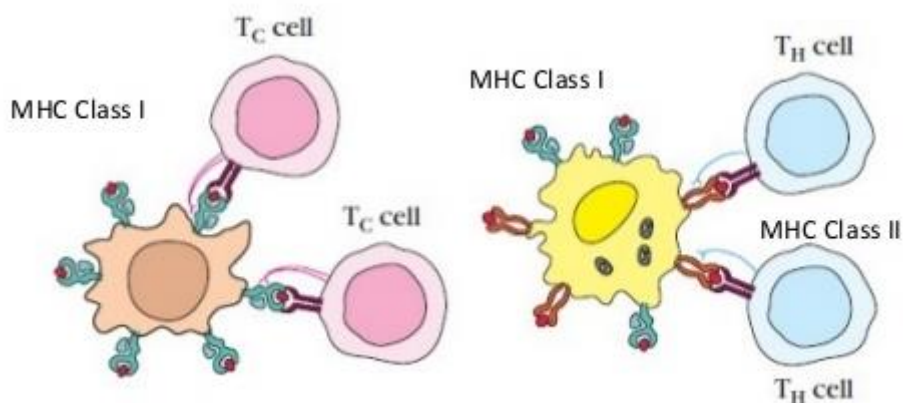
Inflammatie van weefsels ontstaat bij bacteriële infecties, bij aanwezigheid van virale indringers of bij chemische/fysische schade van weefsels. Doordat lymfocyten en nabij gelegen weefselcellen rondom het ontstoken weefselgebied chemokines produceren en secreteren worden fagocyten, macrofagen en dendritische cellen geactiveerd. Via chemotaxis migreren ze dan naar de plaats van infectie.

De fagocyten zorgen eerst voor fagocytose van de antigenen (Ag) om het aantal indringers te verminderen. Macrofagen en dendritische cellen fungeren op hun beurt als antigen-presenterende cellen (APC). Deze cellen nemen de Ag op nemen via endocytose, verwerken ze enzymatisch en presenteren ze uiteindelijk op hun celmembraan aan T-lymfocyten met behulp van een Major Histocompatibility Complex (MHC). De APC beschikken over MHC klasse I of II. MHC I en II binden specifiek op 1 transmembranaire CD-receptor die aanwezig zijn op de celmembranen van T-lymfocyten (zie Figuur 7).

De APC met een MHC I interageren met CD8+ T-lymfocyten [30]. De T-cellen worden door een intracellulaire signalisatie pathway geactiveerd en prolifereren en differentiëren ter vorming van cytotoxische T-lymfocyten (CTL).

APC met MHC II presenteren het verwerkte Ag aan CD4+ T-lymfocyten die geactiveerd worden en differentiëren tot T-helper cellen (Th).

CTL zorgen voor apoptose van bacteriële cellen, terwijl de Th voornamelijk de B-lymfocyten activeren zodat ze specifieke antistoffen (As) produceren en secreteren waardoor de APC geactiveerd worden en intracellulaire Ag fagocyteren [43]. De As gaan een specifieke binding aan met de Ag ter vorming van immuuncomplexen. Deze immuuncomplexen worden dan getransporteerd met behulp van complementfactor C3b naar de lever waar ze vervolgens afgebroken worden [30].



Figuur 7 Antigen presenterende cel met MHC I (links) gebonden op CD8+ T-lymfocyt ter activatie van de cytotoxische T-lymfocyt en APC met MHC II (rechts) gebonden op CD4+ T-lymfocyt ter activatie van de T-helper cel [30]

De effecten van Gc-globuline op infecties in het lichaam met behulp van het immuunsysteem zijn wel gekend, maar het mechanisme erachter is nog niet uitvoerig bestudeerd [13]. Zo suggereert Pacini *et al.*, dat de activatie van de macrofagen door GcMAF gebeurt doordat MAF bindt met een C-type lectine dat aanwezig is op het celmembraan van de macrofagen. Dit lectine is een eiwit dat uit 110 tot 130 aminozuren bestaat. De secundaire structuur van het eiwit bestaat uit 3 dubbele loops van β -vouwplaten die door 2 α -helici-structuren worden samengehouden. In het lectine is een suikerbindingsplaats aanwezig die men de Carbohydrate-recognition Domain (CRD) noemt. In dit CRD zijn 2 zwavelbruggen aanwezig, die zorgen voor het behoud van een stabiele structuur, en tot 4 bindingsplaatsen voor Ca^{2+} . De CRD kan de GalNac van GcMAF specifiek herkennen en binden met behulp van waterstofbruggen in aanwezigheid van Ca^{2+} [44]. Door de binding ontstaat waarschijnlijk een intracellulair transductie signaal pathway dat zorgt voor een up of downregulatie van bepaalde genen waardoor de macrofagen geactiveerd worden [45], [46]. De macrofagen ontwikkelen als antwoord op het signaal Fc-receptoren die instaan voor het herkennen en fagocyteren van de Ag[47].

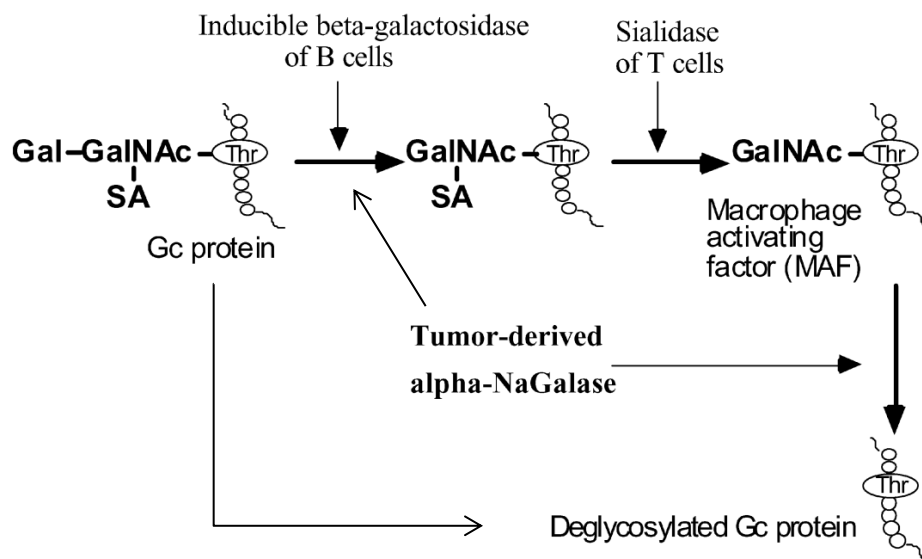
2.3 Toepassingen van Gc-globuline

2.3.1 Kankerbehandeling met Gc-MAF

De meest voorkomende doodsoorzaak bij mensen is kanker, zowel in industriële landen als in ontwikkelingslanden [48]. Wanneer in cellen mutaties ontstaan in essentiële delen van het DNA kan er een tumor ontwikkelen. De gemuteerde cel zou normaal apoptose ondergaan. Soms gaat dit mis en ondergaat de cel een celdeling in plaats van een gecontroleerde celdood. Hierdoor ontstaat er een ongecontroleerde groei van een gemuteerde cel met ophoping in het weefsel tot gevolg. Deze ophoping noemt men dan een tumor [49]. Deze tumoren kunnen goed- of kwaadaardig zijn.

Maligne of kwaadaardige tumoren blijken een bepaald enzym te secreteren, namelijk N-acetyl- α -D-galactosaminidase (Nagalase). Nagalase belet dat Gc-globuline omgevormd wordt tot GcMAF[50]. Eerst dacht men dat Nagalase GalNac van de suikerrest van Gc-globuline deglycolyseerde, waardoor GcMAF niet meer gevormd kon worden. Ook is

het mogelijk dat Nagalase GalNac deglycosyleert vanaf GcMAF, waardoor MAF wordt afgebroken (zie Figuur 8) [40],[51].



Figuur 8 Eerste voorstel voor de werking van Nagalase [40]

Maar recenter onderzoek wijst meer in de richting van een inhiberende werking van Nagalase door te binden op Gc-globuline ter vorming van een enzym-substraatcomplex. Waarschijnlijk bindt Nagalase op een bindingsplaats van Gc-globuline waardoor Gc-globuline een structuurverandering ondergaat. En als Nagalase gebonden blijft, wordt ook de omvorming van Gc-globuline naar GcMAF geblokkeerd [52], [53].

De eerste stap in de ontwikkeling van het immuunsysteem is de activatie van de macrofagen. Maar bij de ontwikkeling van een tumor accumuleert Nagalase in het weefsel waardoor de eerste verdediging van het immuunsysteem volledig wordt uitgeschakeld en de patiënt een ernstige immunosuppressie ontwikkelt [40]. Omdat GcMAF een macrofaag activerende factor is, kan dit glycoproteïne een veelbelovende parameter zijn in de behandeling voor vele kankers [50], [54], [55]. Zo heeft onderzoek uitgewezen dat een therapie met GcMAF een afname van Nagalase in het serum doet ontstaan [54]. Daarom zou het gehalte aan Nagalase in het serum een goede prognosticator kunnen zijn voor het stadium van bepaalde kankers zoals borst-, prostaat- en darmkanker [50], [56].

Bijkomend heeft GcMAF ook een inhiberende werking op de angiogenese. Vorming van bloedvaten in tumoren is een van de belangrijkste factoren die ervoor zorgen dat tumoren kunnen groeien en uitzaaien [57].

Tumorweefsel secreteert enkele groeifactoren zoals FGF-2, VEGF-A en Ang2 die zorgen voor de ontwikkeling van bloedvaten. Door toediening van GcMAF worden echter de angiogenetische signalen geblokkeerd [50], [58]. De kankerbestrijdende respons van een GcMAF therapie is afhankelijk van het type kankercel. Zo blijkt de respons beter en sneller te zijn bij ongedifferentieerde kankercellen [41], [59]. GcMAF wordt echter nog niet in de kankerbehandeling gebruikt, maar er wordt wel onderzoek naar gedaan met veelbelovende resultaten.

3 Materiaal en methoden

3.1 Gelfiltratie of Size Exclusion Chromatography

3.1.1 Staalbehandeling

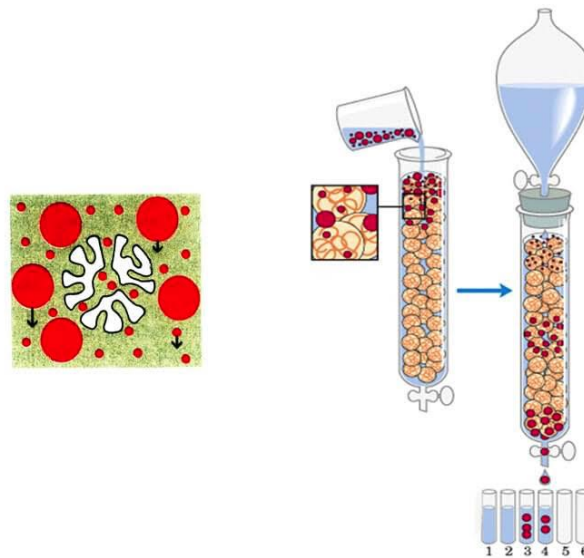
Om Gc-globuline uit het serum te isoleren, is het nodig om allereerst het verzamelde citraatplasma (restafval van bloedafnames) om te zetten naar serum. Dit wordt gedaan door CaCl_2 (Sigma-Aldrich) toe te voegen aan het plasma. Het toegevoegde calcium vult de hoeveelheid calcium aan die het citraat in de bloedbuis heeft opgenomen om stolling te voorkomen. Ook verwijdert CaCl_2 de resterende stollingsfactoren in het serum. Het bekomen serum wordt dan aseptisch onder een trekkast gefiltreerd over een filter met een gemiddelde poriëgrootte van $0,20 \mu\text{m}$ (Corning). Dit om microbiële groei te voorkomen [60]. Als laatste worden stalen van verschillende patiënten samengevoegd om zo een serumpool aan te maken met een gemiddelde Gc-globuline concentratie. Deze methode zorgt ervoor dat doorheen alle experimenten met eenzelfde serum gewerkt wordt. Dit maakt dat er geen fluctuaties zijn in de Gc-globulineconcentratie.

3.1.2 Chromatografiekolom

Voor de gelfiltratie wordt een glazen Econo-column® van Bio-Rad gebruikt met een diameter van 2,5 cm, een lengte van 1 m en een inhoud van 491 ml [61]. De kolom wordt gevuld met een filtermedium Sephadex® G-75 (Sigma-Aldrich) dat één dag op kamertemperatuur in een fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) heeft kunnen zwellen [62]. De gel in de kolom heeft een bedhoogte van 96 cm.

Om de kolom te karakteriseren wordt een mengsel van Dextran Blue (Pharmacia Fine Chemicals) met een molmassa van 2000 kilodalton (kDa) en Cytochroom c (Biochemika) met een molmassa van 12,3 kDa op de kolom gebracht als staal. De twee gekleurde moleculen worden gescheiden in de gel op basis van molecuulgrootte en in fracties opgevangen. Van de fracties worden de absorbanties gemeten bij een golflengte van 405 en 600 nm om het elutievolume van respectievelijk Cytochroom c en Dextran Blue te bepalen. Van het verkregen elutiepatroon, waarbij de absorbantie in functie van het elutievolume wordt uitgezet, kan ook de resolutiefactor R_s bepaald worden. Deze resolutiefactor geeft de kwaliteit van de scheiding weer.

De eerste stap in het opzuiveren van Gc-globuline in serum is gelfiltratie. Sephadex® G-75 werd gekozen vanwege de gemiddelde grootte van de poriën in de partikels van de gel. Moleculen die kleiner zijn dan de diameter van de poriën, kruipen erin en worden vertraagd waardoor ze een langere weg afleggen. Moleculen die groter zijn dan de grootste poriën kunnen hier niet intreden en migreren rond de partikels met een veel kortere weglengte. De grote moleculen komen dus als eerste uit de kolom, gevolgd door de kleinere moleculen (zie Figuur 9). Zo wordt Gc-globuline al gescheiden van de kleinere proteïnen zoals apolipoproteïnen A, - C, - D en - E die een veel langere weg afleggen. Maar ook van de grotere proteïnen zoals transferrine, α_2 -macroglobuline, haptoglobine, apolipoproteïnen B en immunoglobulines die niet in de poriën kunnen treden en bijgevolg sneller uit de kolom komen.



Figuur 9 Isolatieproces tijdens een gelfiltratie [63]

Gc-globuline is het targetmolecuul dat een molecuulgewicht heeft van ongeveer 52 kDa. Het is echter niet het meest voorkomende proteïne in het serum. Het meest voorkomende eiwit is albumine dat een molecuulgewicht van ongeveer 69 kDa heeft [64]. Met behulp van gelfiltratie kunnen onder beredeneerde omstandigheden fracties opgevangen worden om Gc-globuline zo goed mogelijk te isoleren van de andere serumproteïnen, waaronder albumine. Hiervoor moet er rekening gehouden worden met de verschillende cut-off waarden van de verschillende filtermedia (zie Tabel 1). Door Sephadex® G-75 te kiezen kan de grootst mogelijke scheiding tussen Gc-globuline en albumine bekomen worden. Cut-off-waarden of exclusielimieten geven de molecuulgewichten weer van moleculen die niet meer in de poriën kunnen treden.

Wanneer Sephadex® G-50 gebruikt wordt voor de gelfiltratie komen zowel Gc-globuline als albumine gelijktijdig als eerste uit de kolom en is een scheiding dus niet mogelijk. Wanneer echter Sephadex® G-75 wordt gebruikt, vallen beide molecuulgewichten onder de exclusielimiet en in het fractioneringsgebied, waardoor zowel Gc-globuline als albumine in de poriën treden. Doordat er een bepaalde spreiding ligt op de diameter van de poriën in het filtermedium, is een scheiding mogelijk tussen Gc-globuline en albumine. Omdat het in de eerste stap van de isolatie niet noodzakelijk is om een volledige scheiding te bekomen tussen Gc-globuline en albumine, maar wel om veel kleinere en grotere proteïnen af te zonderen wordt voor Sephadex® G-75 gekozen.

Tabel 1 Sephadex® G: Cut-off molecuulgewicht voor globulaire proteïnen [65]

	Cut-off Globulaire proteïnen (Dalton)
Sephadex® G-10	≤700
Sephadex® G-15	≤1500
Sephadex® G-25	1000-5000
Sephadex® G-50	1500-30000
Sephadex® G-75	3000-80000
Sephadex® G-100	4000-150000

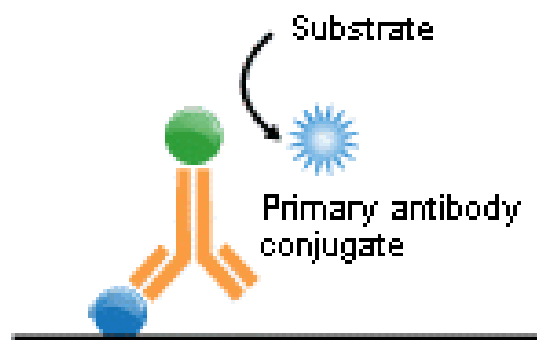
Een gelbed kan hergebruikt worden om gelfiltraties uit te voeren indien het altijd nat bewaard wordt in een hoeveelheid PBS voor een korte periode, maar in 20% ethanol wanneer de kolom voor een lange tijd niet gebruikt wordt. Voor de volledige werkwijze zie bijlage 1.

Om te bepalen welke opgevangen fracties een hoog gehalte aan proteïnen bevatten, wordt de absorbantie van alle fracties gemeten met de Biophotometer (Eppendorf) op een golflengte van 280 en 320 nm. Een golflengte van 280 nm is specifiek voor het meten van de aanwezigheid van proteïnen in het staal. De grootte van het signaal is recht evenredig met de hoeveelheid proteïnen in de fractie. De golflengte van 320 nm wordt ook meegenomen, omdat het signaal bij deze golflengte een waarde is voor ruis afkomstig van lichtverstrooiing door partikels en oude of vuile cuvetten [66]. Fracties met een hoge absorbantie worden verder onderzocht op de aanwezigheid van Gc-globuline met een kwalitatieve dot blot en sandwich-ELISA (zie 3.2 en 3.3).

3.2 Dot blotting van Gc-globuline

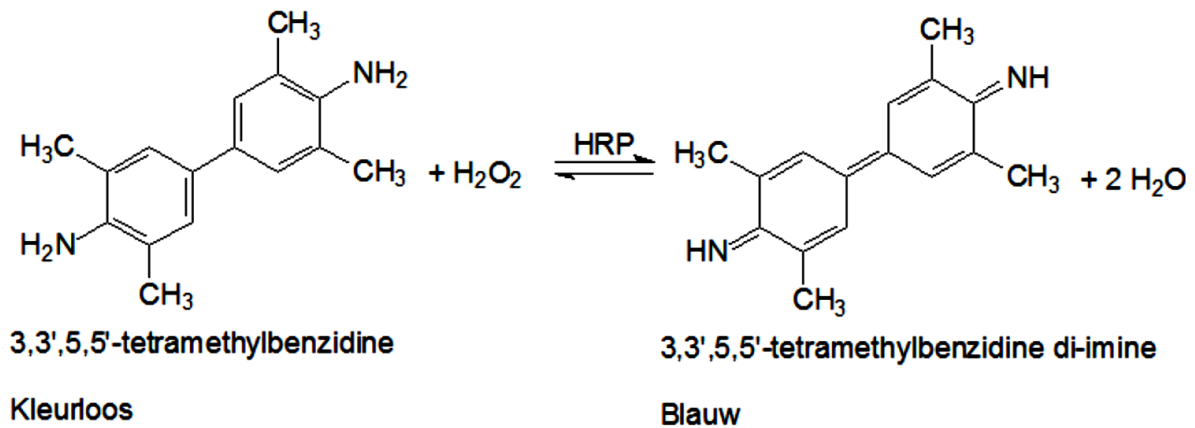
Om snel te kunnen analyseren in welke opgevangen fracties van de gelfiltratie een hoge concentratie aan Gc-globuline aanwezig is, wordt een dot blot uitgevoerd op polyvinylideenfluoride(PVDF)-membranen (Bio-rad). Deze membranen hebben een proteïnebindingscapaciteit van meer dan 200 µg proteïnen per cm² membraan.

De opgevangen fracties worden in een kleine hoeveelheid gepipetteerd of gespot op het PVDF-membraan. De proteïnen die in het serum of in de fracties aanwezig zijn, binden dan op de PVDF [67]. Om enkel het signaal van Gc-globuline zichtbaar te maken, wordt polykonaal konijn Anti-humaan Gc-globuline-HRP conjugaat (Dako) toegevoegd. Deze As binden specifiek op humaan Gc-globuline in het serum. Doordat de As gekoppeld zijn aan het HRP-enzym kan als laatste een substraat toegevoegd worden, namelijk TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), dat door HRP enzymatisch tot een gekleurd product wordt omgevormd (zie Figuur 10).



Figuur 10 Opbouw van dot blot membraan waarbij het blauwe bolletje het Gc-globuline (Ag) voorstelt en het groene bolletje het HRP enzym voorstelt [68]

Het kleurloze substraat ondergaat een oxidatie die gekatalyseerd wordt door het HRP-enzym, waardoor er een blauw product gevormd wordt (zie Figuur 11). Hoe intenser de blauwe kleur, hoe meer Gc-globuline aanwezig is in de fracties. De fracties met een hoog Gc-globulinegehalte worden verder met een Sandwich-ELISA onderzocht om de concentratie te achterhalen. Zie bijlage 2 voor het protocol van de Dot blot.

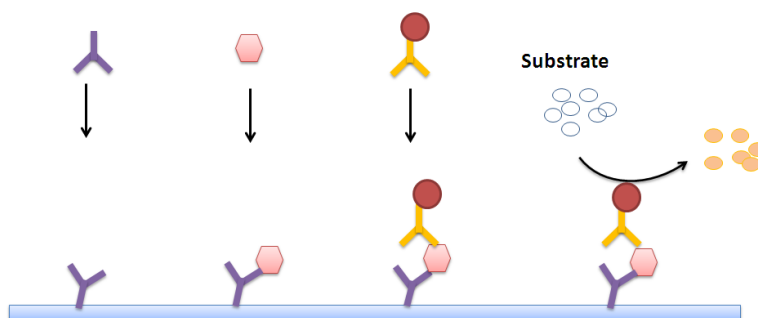


Figuur 11 Enzymatische reactie op TMB gekatalyseerd door HRP

3.3 Sandwich-ELISA

Om de concentratie aan Gc-globuline in de fracties te bepalen, wordt een *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) gebruikt.

Een kleurloze multiwellplaat wordt gecoat met polykonaal Anti-humaan Gc-globuline afkomstig van konijnen met een concentratie van 2,0 mg/ml (Dako). Vervolgens wordt het serumstaal afkomstig van de opgevangen fracties in de *wells* gebracht. Het aanwezige VBP in het serumstaal bindt met de gecoate As op de *wells*. Om de hoeveelheid gebonden VBP te meten wordt een secundair As toegevoegd (0,0018 mg/ml) dat gekoppeld is aan een enzym, namelijk het polykonaal Anti-humaan Gc-globuline HRP conjugaat (Dako). Het VBP dat hier fungeert als het Ag wordt dus tussen een primaire en secundaire As gesandwich, vandaar de benaming sandwich-ELISA (zie Figuur 12). Als laatste wordt dan een kleurloos substraat toegevoegd dat door het horseradish peroxidase enzym (HRP) omgezet wordt naar een blauw gekleurd product. Om de enzymatische reactie na een bepaalde tijd stop te zetten wordt een stopsolution van 0,2 mol/l HCl (Sigma) toegevoegd. Hierdoor wordt het blauw product omgevormd naar een geel product. Als laatste wordt de absorbantie gemeten met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) bij een golflengte van 450 nm.

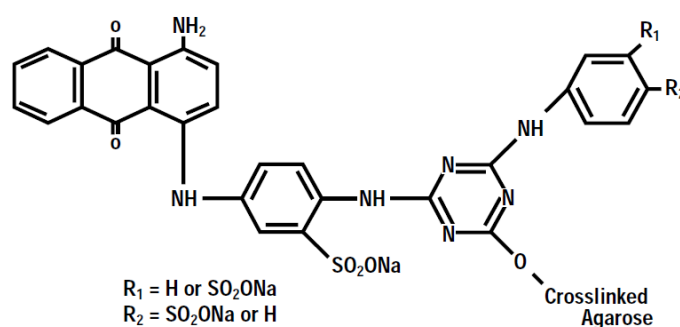


Figuur 12 Sandwich-ELISA opbouw met volgende voorstellingen: het paarse As is het primair As, de roze zeshoek VBP, het gele As is het secundair As geconjugeerd aan HRP en het en het substraat is TMB [68]

Bij elke uitgevoerde ELISA wordt een ijklijn gemaakt met behulp van een standaard serumpool waarvan simultaan de absorptie bij een golflengte van 450 nm wordt gemeten. De absorptie is recht evenredig met de concentratie van Gc-globuline in de serumpool en kan gebruikt worden om het Gc-globulinegehalte in de fracties te bepalen. Een hoog signaal betekent dus een hoge concentratie VDB. Voor een meer gedetailleerd protocol zie bijlage 3.

3.4 Affiniteitskolom

De laatste stap in de isolatie van Gc-globuline is het gebruik van affiniteitschromatografie. Voor het maken van de affiniteitskolom wordt een korte glazen Econo-column® van Bio-Rad gebruikt met een diameter van 1,5 cm, een lengte van 30 cm en een inhoud van 53 ml. Omdat in deze stap de weglengte niet van belang is voor het scheiden van de moleculen voldoet een kolom van 30 cm. In deze scheidingsstap is wel de specifieke binding van het medium met de serumproteïnen in het staal van belang. Daarom dat er gekozen wordt voor Affi-gel Blue® (Bio-Rad). De Affi-gel is een gecrosslinkte agarosegel die covalent gebonden is aan cibacron blue F3GA (zie Figuur 13).



Figuur 13 Cibacron Blue F3GA covalent gebonden op agarosegel [69]

Cibacron Blue F3GA is een kleurstof die specifiek bindt met behulp van ionische en in mindere mate hydrofobe interacties aan verschillende eiwitten. Door het serumstaal in verschillende milieus op de kolom te brengen zal het elutiepatroon verschillen en het Gc-globuline in een bepaalde fractie, geïsoleerd van de andere proteïnen, uit de kolom komen. Bij deze opzuiveringsstap wordt gesteund op het onderzoek van Gianazza & Arnoud, 1982 [70], [71].

De Econo-column® wordt met de Affi-gel blue® gevuld en heeft een bedhoogte van 25 cm wat de totale kolominhoud brengt op 44 ml. De gel wordt geëquilibreerd door 2 kolomvolumes fosfaatbuffer door de kolom te laten lopen. Vervolgens wordt het staal opgebracht en geëluëerd met fosfaatbuffer en een NaCl-zoutgradiënt gaande van 0 M tot 1,4M. De opgevangen fracties van de affiniteitsfiltratie worden ook nu geanalyseerd met de dot blot (zie 3.2) en sandwich ELISA (zie 3.3). Zie bijlage 4 voor het volledige protocol.

3.5 *Dot blotting van albumine*

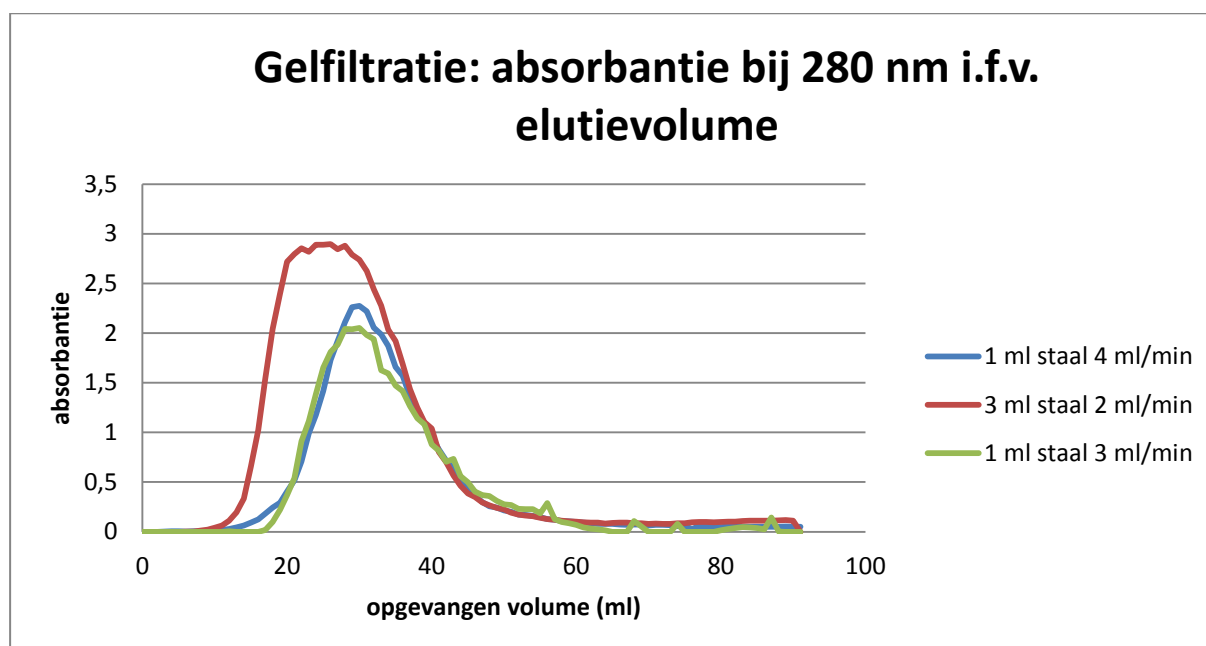
Om aan te kunnen tonen of de affiniteitschromatografie werkelijk albumine van Gc-globuline heeft gescheiden moet er een detectiemethode voor albumine ontwikkeld worden. Om dit te kunnen verwezenlijken wordt hetzelfde principe van de kwalitatieve dot blot voor het aantonen van Gc-globuline overgenomen. De werkwijzen zijn identiek aan elkaar, behalve het gebruik van de andere antistoffen. Voor de detectie van albumine in de fracties wordt Polykonaal schaap Anti-humaan albumine-HRP conjugaat (Bio-rad) gebruikt. Doordat hetzelfde enzym gekoppeld zit op de antistoffen kan ook hier het TMB-substraat gebruikt worden. Voor het volledige protocol, zie bijlage 2.

4 Resultaten

4.1 Gelfiltraties

Allereerst werden gelfiltraties uitgevoerd in een glazen kolom van Pharmacia Biotech met een lengte van 30 cm en een diameter van 1,5 cm gevuld met Sephadex® G-75. Het maximale debiet werd bepaald onder zwaartekracht. Dit werd gedaan door een gekend volume op de kolom aan te brengen en de tijd te meten die nodig was om het volume volledig in de gel te laten trekken. Dit resulteerde in een debiet van 4 ml/min. Vervolgens werd gekozen om het debiet van de fosfaatgebufferde zoutoplossing te laten variëren tussen 2 en 4 ml/min. Het staalvolume werd gevarieerd tussen 1 en 3 ml. Deze volumes zijn gebaseerd op de aangeraden volumes voor gelfiltratie in de handleiding: 'Gel filtration: method and principles' van GE Healthcare.

De absorbanties van de opgevangen fracties worden bepaald bij een golflengte van 280 nm bij een cuvetdiameter van 0,1 cm. Indien er een scheiding opgetreden zou zijn tijdens de gelfiltratie, dan moest er een schouder of in het beste geval een tweede piek aanwezig zijn in het elutiepatroon. Op Figuur 14 is te zien dat bij elk uitgetest debiet (dus zowel bij de rode, blauwe als groene curve) geen schouder of tweede piek aanwezig is, wat dus betekent dat er geen scheiding opgetreden is tussen de aanwezige serumproteïnen. De groene curve vertoont wel kleine pieken, maar door de lage absorbanties kan dit beschouwd worden als ruis.



Figuur 14 Absorbantie van proteïnen bij een golflengte van 280 nm afkomstig van fracties van de gelfiltraties in de glazen kolom van 30 cm op serumstaal geëluëerd met fosfaatgebufferde zoutoplossing

Om de scheiding te verbeteren wordt de kolomlengte verlengd naar 1 m. Door het verlengen van de kolom, wordt de weglengte die kleine moleculen moeten afleggen in de poriën van de korrels veel groter in vergelijking met de weglengte die de grote moleculen moeten afleggen. Door het grotere verschil in afstand zou de scheiding beter zichtbaar worden door de vorming van een schouder of in het beste geval een tweede piek.

4.1.1 Karakterisering van de Econo-kolom

Om de Econo-column® (van 1 m lang, 2,5 cm diameter) gevuld met Sephadex® G-75 te gebruiken, moet ze eerst gekarakteriseerd worden. Hiervoor worden 2 kleurstoffen gebruikt, namelijk Dextran Blue (Pharmacia Fine Chemicals) en Cytochroom C (Biochemika) met een molecuulgewicht van respectievelijk 2000 kilodalton en 12,4 kilodalton. Er wordt een mengsel gemaakt van de 2 kleurstoffen in fosfaatgebufferde zoutoplossing en deze worden als staal op de kolom gebracht en geëluëerd met dezelfde oplosbuffer. Dextran Blue is een zeer groot molecuul en zal niet in de poriën van de korrels kunnen treden. Hierdoor migreert het rond de gelkorrels door uit de kolom. Cytochroom C is een zeer klein eiwit dat wel in de poriën van de korrels treedt. Het wordt dus weerhouden en legt een langere weglengte af. Er ontstaat een scheiding tussen de 2 moleculen die visueel zichtbaar wordt (zie Figuur 15). Het kleurloos volume eluens dat voor Dextran Blue uit de kolom komt, wordt het void of dood volume genoemd en bedraagt voor het gelbed van 96 cm ongeveer 120 ml. Het void volume is het volume eluens van de mobiele fase die rond de korrels in de kolom zit en volledig vrij is van andere moleculen. Dit volume is voor elke gelfiltratie ongeveer hetzelfde en kan steeds in één geheel opgevangen worden. Vervolgens worden fracties opgevangen van ongeveer 1 ml en worden de absorbanties van deze fracties gemeten voor de bepaling van Dextran Blue en Cytochroom C met een golflengte van respectievelijk 600 nm en 405 nm met de Victor X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer).



Figuur 15
Karakterisering van kolom met Dextran Blue en

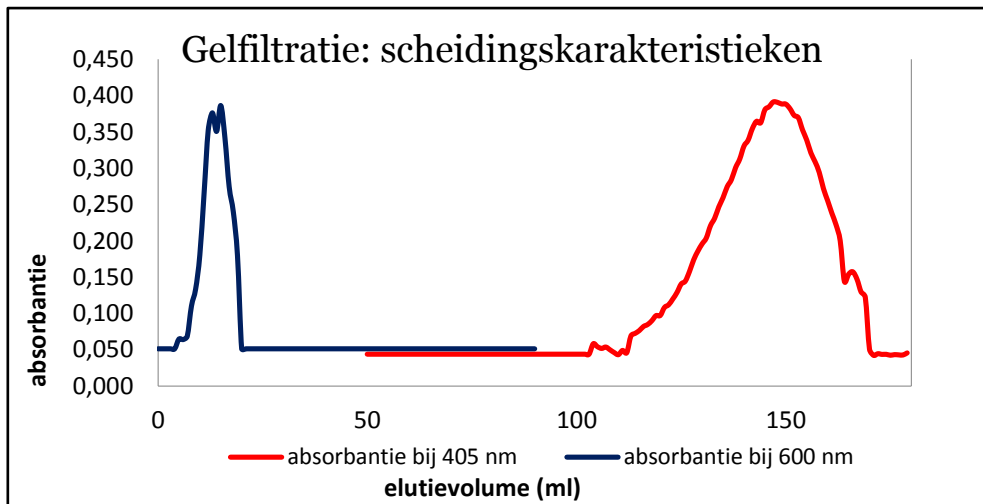
Figuur 16 geeft het elutiepatroon weer van de karakterisering. De resolutiefactor R_s tussen Dextran Blue en Cytochroom C wordt als volgt bepaald:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{r2} - t_{r1})}{(w_1 + w_2)}$$

Deze formule geeft de verhouding tussen 2 keer de piekafstand van de piektoppen en de som van de breedte van de piekbasissen weer. Een resolutiefactor groter dan 1,5 betekent dat de scheiding gelukt is. Tabel 2 geeft weer dat de resolutiefactor R_s voor deze karakterisering 4,5 bedraagt. De scheiding is dus gelukt en kan voor verdere experimenten gebruikt worden om Gc-globuline af te scheiden van grotere en kleinere proteïnen.

Tabel 2 Parameters bepaald met behulp van de karakterisering van de gel met Dextran Blue en Cytochroom c

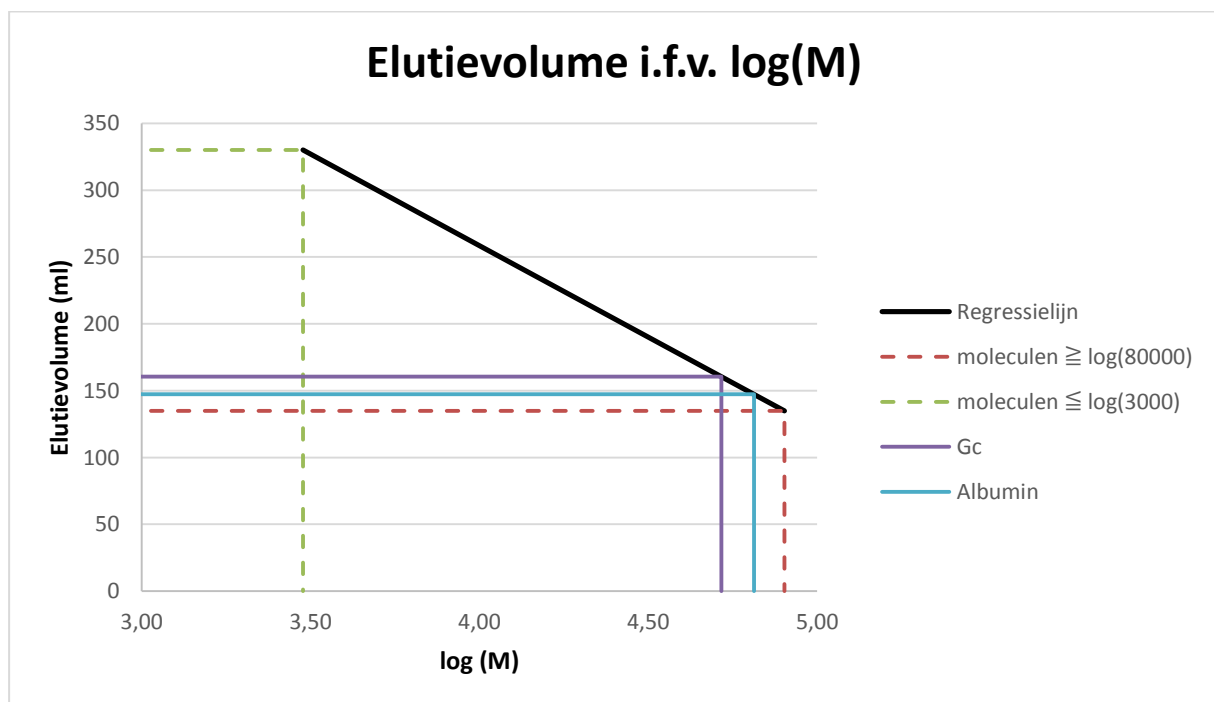
Parameter	Waarde
Void volume	± 120 ml
Resolutiefactor (Dextran Blue/Cytochroom C)	4,5
Elutievolume Dextran Blue	135 ml
Elutievolume Cytochroom C	243 ml



Figuur 16 Elutiepatroon kalibratie kolom(G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van Dextran Blue (absorbantie gemeten bij 405 nm) en Cytochroom C (absorbantie gemeten bij 600 nm)

Dan wordt de grafiek opgesteld waarin het elutievolumen i.f.v. het $\log(M)$ wordt uitgezet. Op de punten van de Dextran Blue en Cytochroom C wordt een regressieanalyse toegepast die toelaat om het verwachte elutievolumen van albumine en Gc-globuline, maar ook van andere aanwezige serumproteïnen te bepalen bij experimenten die nog volgen. Door de regressieanalyse wordt een eerstegraadsvergelijking bekomen waarmee de voorspelde elutievolumes van de serumproteïnen kunnen bepaald worden:
 $y = -136.857x + 806,021$

Figuur 17 en Tabel 3 geven de resultaten van de regressieanalyse:



Figuur 17 Elutievolumen i.f.v. $\log(M)$ voor Sephadex[®] G-75: fractioneringsgebied: 3000 Da- 80000 Da: zwarte rechte=regressieanalyse; groene en rode coördinaten geven exclusielimiet weer; paarse coördinaten=Gc-globuline; blauwe coördinaten=albumine

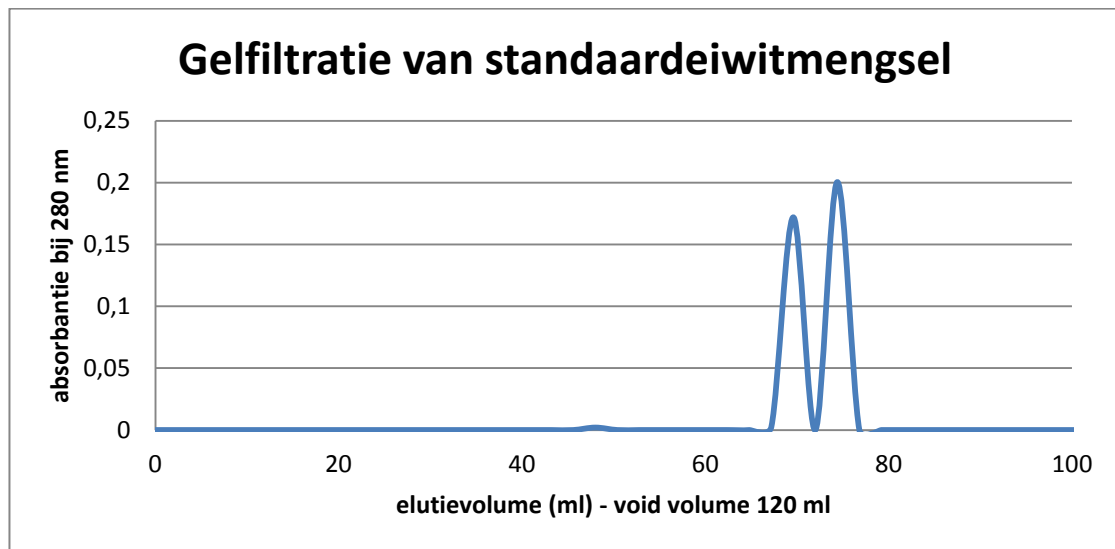
Tabel 3 Regressieanalyse uitgevoerd op grafiek van het elutievolume i.f.v. log(M) voor Sephadex G-75: fractioneringsgebied voor globulaire proteïnen: 3000-8000 Da

Molecuul	M (Da)	log M	Elutievolume (ml)
Dextran Blue	2000000	6,30103	135
Alfa-2-macroglobuline	720000	5,857332	135
Apolipoproteïne B-100	500000	5,69897	135
Apolipoproteïne B-48	241000	5,382017	135
Immunoglobulines	150000	5,176091	135
Exclusielimiet	80000	4,90309	135
Albumine	69000	4,838849	143,791
Gc-globuline	52000	4,716003	160,603
Apolipoproteïne E	34145	4,533327	185,603
Apolipoproteïne D	33000	4,518514	187,603
Apolipoproteïne A-I	28331	4,452262	196,698
Apolipoproteïne A-II	17380	4,24005	225,741
Cytochroom C	13000	4,113943	242,999
Apolipoproteïne C-II	8837	3,946305	265,942
Apolipoproteïne C-I	7000	3,845098	279,792
Ondergrens fractioneringsgebied	3000	3,477121	330

In Tabel 3 en Figuur 17 is te zien dat albumine bij een elutievolume van ca. 144 ml uit de kolom komt, terwijl Gc-globuline bij een volume van ca. 160 ml uit de kolom zou komen. Uit deze resultaten is dus duidelijk dat de scheiding tussen Gc-globuline en albumine niet efficiënt zal zijn. Het is dus wel mogelijk dat andere serumproteïnen afgezonderd worden van Gc-globuline. De proteïnen met een molecuulgewicht groter dan 80 kDa zullen, net zoals Dextran Blue, als eerste in groep uit de kolom komen bij een elutievolume van 135 ml. Hiertussen zal geen scheiding optreden. Terwijl proteïnen met een molecuulgewicht kleiner dan 3000 Da gegroepeerd als laatste uit de kolom komen, zoals Cytochroom C. Deze worden dus zeker van Gc-globuline afgescheiden. Andere proteïnen, weergegeven in Tabel 3, kunnen mogelijk ook van Gc-globuline afgescheiden worden mits efficiënte fractionering. Er moet wel gesteld worden dat de elutievolume's berekend zijn met het void volume van ongeveer 120 ml inbegrepen.

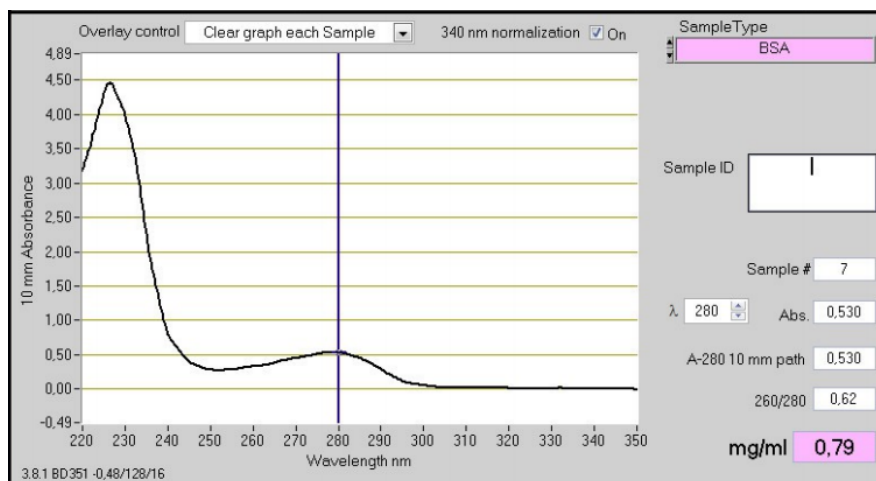
Vervolgens wordt een gelfiltratie uitgevoerd op een standaardeiwitmengsel om als referentie te gebruiken. Er wordt een oplossing gemaakt van albumine afkomstig van kippeneieren (Serva) met een molecuulgewicht van 45 kDa en humaan albumine (Serva) met een molecuulgewicht van 69 kDa met PBS als oplosmiddel. Van de opgevangen fracties worden de absorbanties bij een golflengte van 280 nm gemeten. De absorbanties worden dan uitgezet in functie van het opgevangen volume om het elutiepatroon weer te geven. Uit deze grafiek (zie Figuur 18) kan afgeleid worden dat Gc-globuline, met een molecuulgewicht van ± 52 kDa, bij een elutievolume van ongeveer 190 ml uit de kolom moet komen (ligt wel hoger dan de voorspelde 160 ml). Bij deze 190 ml is het void volume al in verrekend. Dit volume wijkt ongeveer 30 ml af van het elutievolume voor Gc-globuline dat bepaald werd met de regressieanalyse. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de regressieanalyse die uitgevoerd werd op twee punten die altijd een rechte geeft. Om een beter resultaat te bekomen zou dus een regressieanalyse moeten worden uitgevoerd van meerdere punten om een beter resultaat te bekomen. Voor verder onderzoek werd

het elutievolume altijd gebaseerd op 190 ml dat bekomen werd met het standaardeiwitmengsel dat ongeveer hetzelfde molecuulgewicht heeft als Gc-globuline.



Figuur 18 Elutiepatroon van referentiegelfiltratie(G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van humaan (eerste piek) en kippen albumine (tweede piek)

De lage absorptantiesignalen zijn te wijten aan het feit dat de absorptanties gemeten zijn bij een golflengte van 280 nm. Een golflengte van 280 nm wordt gebruikt om proteïneconcentraties te bepalen. Omdat tryptofaan en tyrosine 2 veelvoorkomende aromatische aminozuren zijn in eiwitten wordt de optimale absorptantie van het UV-licht door deze 2 aminozuren gebruikt als maatstaf voor het meten van eiwitten. Albumine is echter een eiwit dat minder van deze aminozuren bevat. Hierdoor is de optimale golflengte lager dan 280 nm (zie Figuur 19), namelijk ongeveer 225 nm [72]. Het toestel dat gebruikt wordt voor de absorptantie-metingen (Biophotometer, Eppendorf) beschikt niet over een functie om absorptanties te meten bij een golflengte van 225 nm.



Figuur 19 Optimale absorptiespectrum van albumine [72]

De bovenstaande resultaten worden gebruikt als een gids voor verder onderzoek. Door rekening te houden met het void volume, dat niet gefractioneerd moet worden opgevangen en het elutievolume waarin humaan en kippen albumine uit de kolom

migreerden wordt efficiëntie verzekerd en wordt voorkomen dat het opvangen van de fracties van Gc-globuline vroegtijdig gestopt wordt.

4.1.2 Design of Experiment

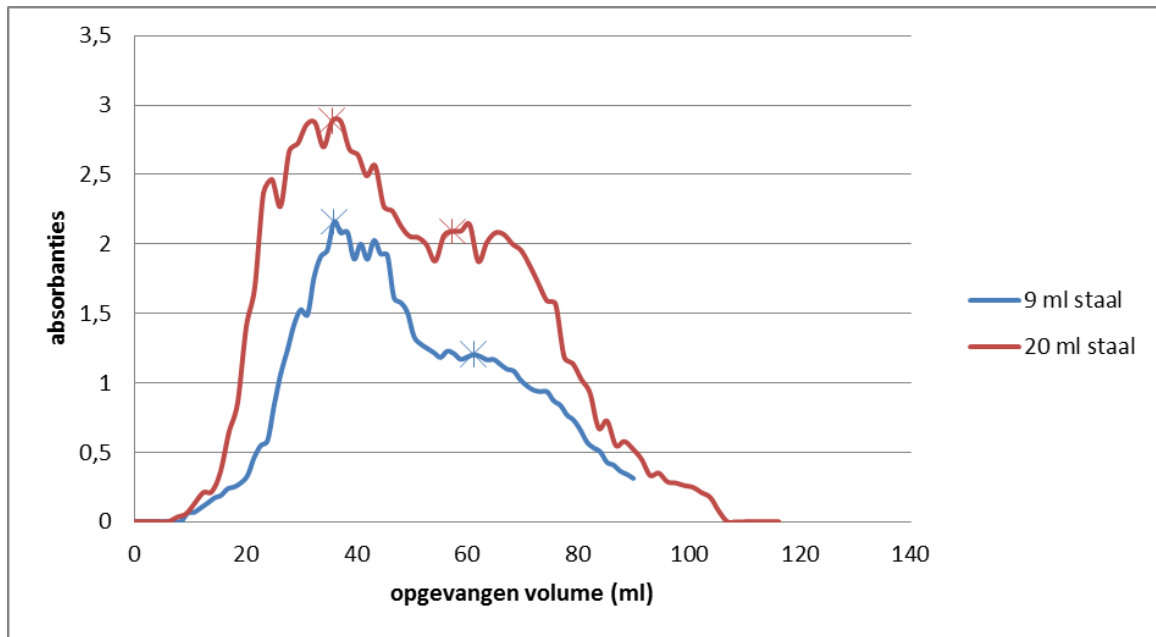
Om het effect van het debiet en het staalvolume op de scheiding van de serumproteïnen in de Sephadex® G-75 in de lange kolom zichtbaar te maken, wordt een Design of Experiment (DoE) opgesteld en uitgevoerd (zie Tabel 4). Hierbij wordt zowel het debiet als het staalvolume gevarieerd tussen specifiek gekozen grenswaarden. Een bepaald aantal fracties wordt opgevangen en de absorpties bij een golflengte van 280 nm worden gemeten met een cuvetdiameter van 0,1 cm.

Tabel 4 Design of Experiments

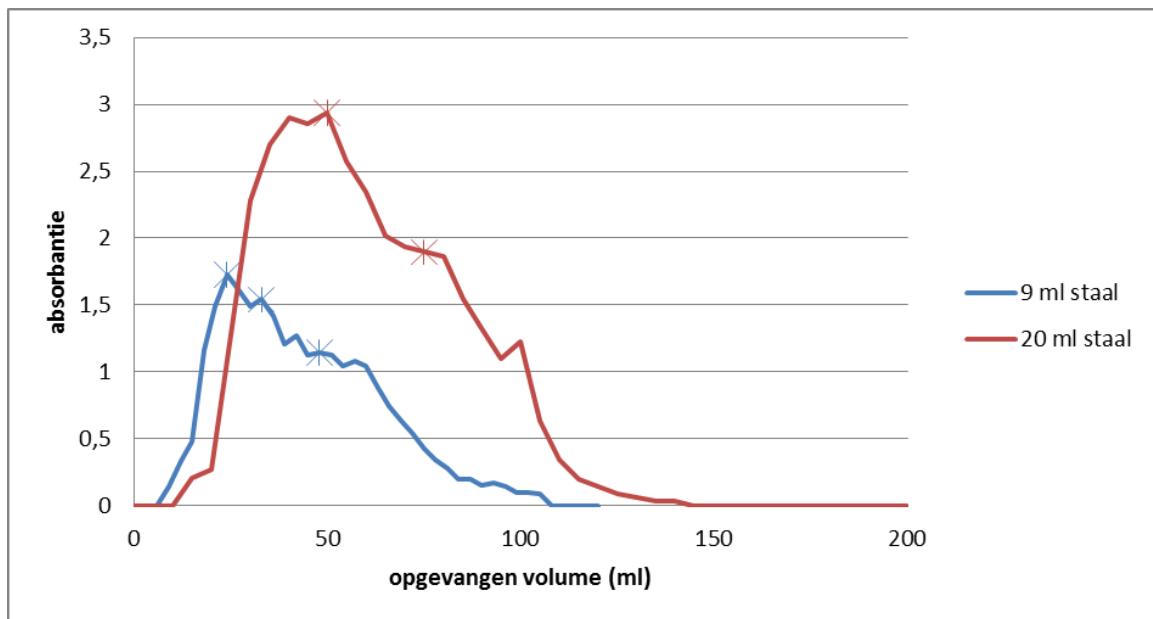
Experiment	Debiet	Staalvolume	Debiet (ml/min)	Staalvolume (ml)
1	1	-1	3	9
2	-1	1	2	20
3	1	1	3	20
4	-1	-1	2	9
5 (centrumpunt)	0	0	2,5	14,5
6	0	-2	2,5	1

De volumes van het staal zijn gekozen op basis van percentages van het totale kolomvolume die worden aangeraden in de handleiding: ‘*Gel filtration: method and principles*’ van GE Healthcare. Omdat het doel is om fracties te bekomen waarin Gc-globuline afgezonderd zit, kan de gelfiltratie ingedeeld worden bij de High Resolution Fractionations (HRF). Om een acceptabele scheiding te bekomen bij HRF mag het staalvolume variëren tussen 0,5 % en 4 % van het totale kolomvolume. Daarom wordt gekozen om metingen uit te voeren bij 0,5 % van het totale kolomvolume, bij 2% van het totale kolomvolume en bij 4% van het totale kolomvolume [73]. Vervolgens werd het handboek van Pharmacia Fine Chemicals geraadpleegd om het maximale debiet van de fosfaatgebufferde zoutoplossing te bepalen [74].

Bij een debiet van 3 ml/min is na de eerste piek van proteïnen een schouder zichtbaar (zie Figuur 20). Deze schouder is ook aanwezig in de curve bij een debiet van 2 ml/min (zie Figuur 21). Het beste resultaat werd bekomen bij het centrumpuntdebiet van 2,5 ml/min (Figuur 22 oranje curve). Hier werden 2 afzonderlijke pieken bekomen.



Figuur 20 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 3 ml/min

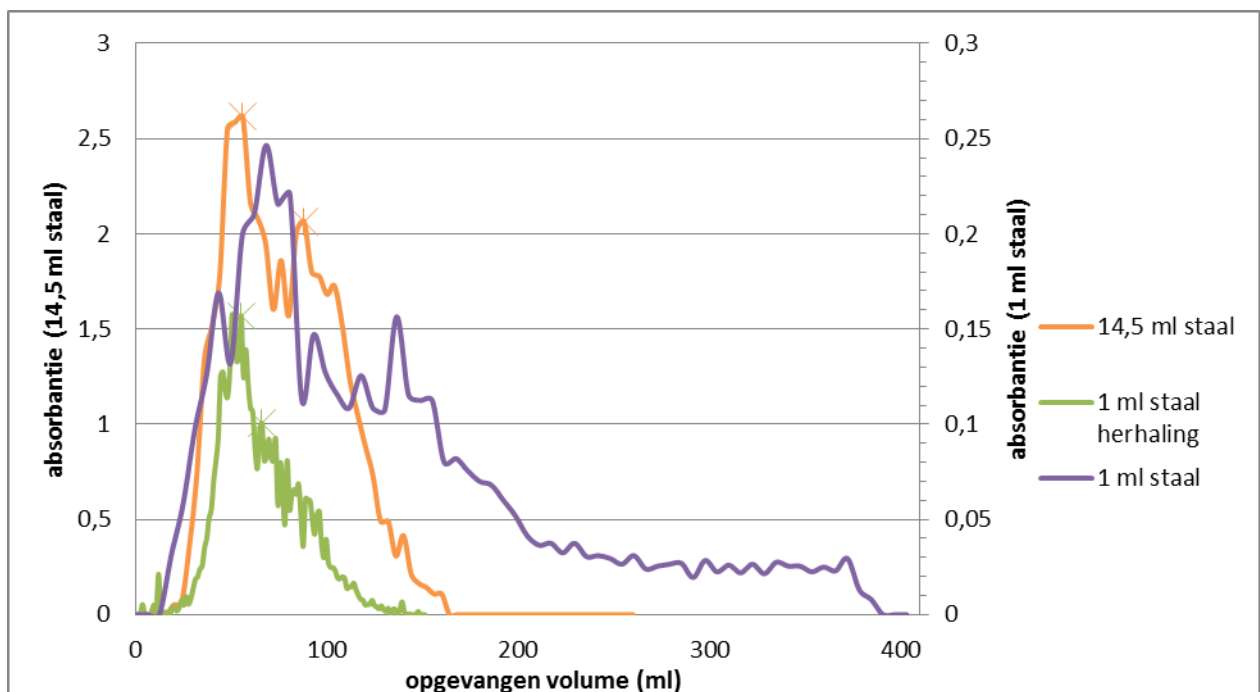


Figuur 21 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 2 ml/min

Om te controleren of de schouders aan de eerste pieken, bij een debiet van 2 en 3 ml/min, te wijten zijn aan het ongelijk opbrengen van het staal op de gel moet er een secundaire test uitgevoerd worden. Het kan immers zijn dat de schouder ontstaat door het traag intrekken van het staal in de gel wanneer er met grotere staalvolumes wordt gewerkt. Daarom wordt een bijkomende gelfiltratie uitgevoerd bij het debiet van het centrumpunt namelijk 2,5 ml/min, omdat dit de beste scheiding gaf. Om traag intrekken van het staal te voorkomen wordt er met een staalvolume van 1 ml gewerkt. Dit volume is gebaseerd op de berekening van een smalle band in de kolom met een hoogte van 0,1 cm en een kolomdiameter van 2,5 cm. Ook hier werden 2 pieken gedetecteerd (zie parse curve Figuur 22).

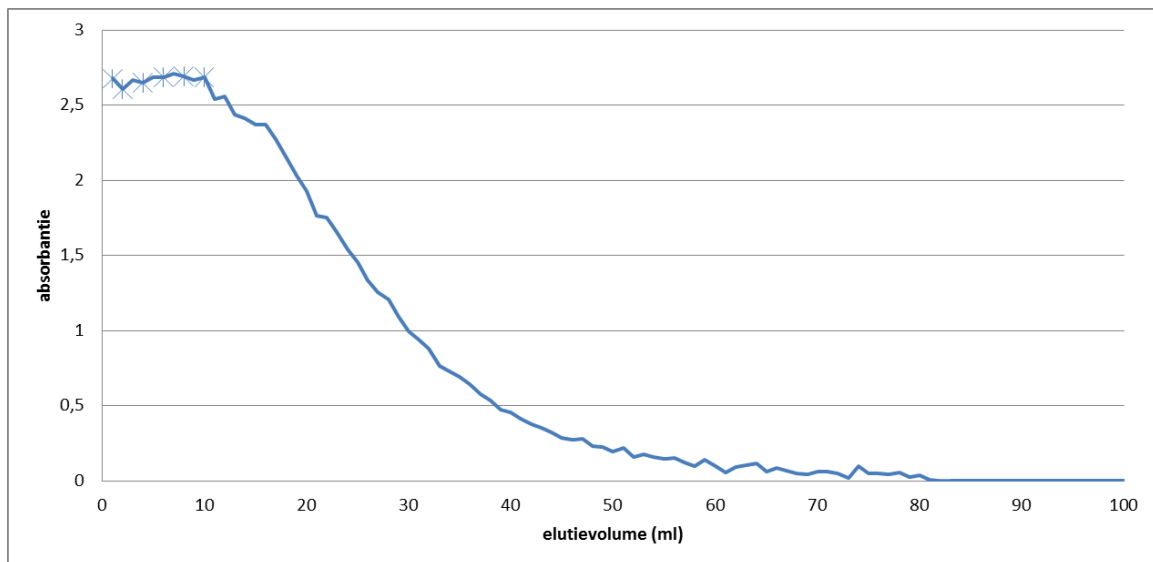
Door het laag staalvolume (1 ml in vergelijking met 14,5 ml staal – oranje curve) zijn er minder proteïnen in het serum aanwezig en wordt een lagere absorptantie gemeten bij een cuvetdiameter van 0,1 cm (Figuur 22 oranje curve). Hierdoor zijn er meer schommelingen zichtbaar (zie paarse curve) in het elutiepatroon. Om te controleren of de tweede piek in de paarse curve ontstaan is door ruis wordt dezelfde gelfiltratie opnieuw uitgevoerd, maar worden kleinere volumes gefractioneerd opgevangen (zie groene curve Figuur 22). Ook werd de gevoeligheid van de absorptantie-metingen verhoogd door de fracties te meten bij een cuvetlengte van 1 cm. De wet van Lambert-Beer stelt namelijk dat de absorptantie recht evenredig is met de weglengte van de UV-straal doorheen de cuvet: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$.

De groene curve in Figuur 22 is het resultaat van de laatste gelfiltratie. Hier worden geen 2 afzonderlijke pieken meer teruggevonden en kan er besloten worden dat de tweede piek bij de paarse curve afkomstig is van ruis die makkelijker zichtbaar wordt bij lagere absorptanties.



Figuur 22 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 2,5 ml/min

Vervolgens werd nog een gelfiltratie uitgevoerd om de schouder van het elutiepatroon beter te onderzoeken. Er werden bij dit experiment meer fracties met een kleiner volume (1 ml t.o.v. 4 ml) opgevangen. Zo zouden mogelijke kleine pieken in de schouder zichtbaar worden. Om mogelijke scheiding nog meer te versterken werd het debiet verlaagd naar 1 ml/min, omdat theoretisch een lager debiet zorgt voor een betere scheiding. Voor dit experiment werd een volume van ongeveer 180 ml ongefractioneerd opgevangen. Dit volume is gebaseerd op 120 ml void volume met ongeveer 60 ml eluens dat geen absorptatiesignaal gaf bij de referentiegelfiltratie (zie Figuur 18). Onderstaande Figuur 23 toont het elutiepatroon als resultaat:



Figuur 23 Elutiepatroon (G-75, 96 cm hoogte, eluens: PBS) van proteïnen bij een golflengte van 280 nm en debiet van 1 ml/min en 1 ml staalvolume

Er wordt geen betere scheiding bekomen door het opvangen van kleinere fracties. Het beeld dat Figuur 23 weergeeft komt overeen met de schouders van de eerdere gelfiltraties. Hieruit kan besloten worden dat Gc-globuline waarschijnlijk in deze fracties aanwezig is. Daarom worden alle fracties van de schouder van deze gelfiltratie geanalyseerd samen met de fracties van de pieken en schouders van vorige gelfiltraties met de dot blot.

4.1.3 Dot blotting

In het begin werd de dot blot uitgevoerd met de werkingsconcentratie van het detection As (10 000 keer verdund) die bij de geoptimaliseerde sandwich-ELISA voor Gc-globuline gebruikt werd. Dit leidde tot geen zichtbare blauwe kleur bij de verdunningsreeks van de ongefilterde serumpool en een heel zwakke blauwe kleur bij de spots van de eerste pieken. Dit zou kunnen betekenen dat het gehalte van Gc-globuline in de fracties hoger is dan het Gc-globulinegehalte in het ongefilterd serumstaal, maar dit kan ook te wijten zijn aan het feit dat er in het ongefilterd serumstaal een veel grotere variatie aan proteïnen aanwezig is waardoor er minder Gc-globuline op het PVDF-membraan kan binden. Om echte concentraties te achterhalen moet de sandwich-ELISA uitgevoerd worden.

Om de dot blot assay zonder problemen te gebruiken is het noodzakelijk dat de werkingsconcentratie van het detectie antistof (As-HRP) voldoende hoog. Na het toevoegen van het TMB-substraat moet er immers een blauwe kleur zichtbaar worden, die gevormd wordt door de oxidatie van het TMB-substraat gekatalyseerd door het HRP-enzym, op de PVDF-membranen. En de concentratie van het detection As moet zodanig zijn dat alle gebonden Gc-globuline gecaptureerd worden. Na de wasstap en toevoeging van het substraat zal de blauwe kleur intenser zijn en correcter de hoeveelheid Gc-globuline weergeven. Om te controleren bij welke As-HRP-concentratie een duidelijke blauwe kleur zichtbaar is, wordt er een verdunningsreeks gemaakt van het detectie As en van de gebruikte ongefilterde serumpool. Er wordt een soort raster bekomen (zie Figuur 24)

waarbij in elk vakje de verdunning van de serumpool en de verdunning van het detectie As vermeld is:

Verdunning serumpool $\xrightarrow{\hspace{15em}}$

Verdunning As \downarrow	1:1 1:300	1:2 1:300	1:4 1:300	1:8 1:300	1:16 1:300	Negatieve controle 1:300
	1:1 1:600	1:2 1:600	1:4 1:600	1:8 1:600	1:16 1:600	Negatieve controle 1:600
	1:1 1:1200	1:2 1:1200	1:4 1:1200	1:8 1:1200	1:16 1:1200	Negatieve controle 1:1200
	1:1 1:2400	1:2 1:2400	1:4 1:2400	1:8 1:2400	1:16 1:2400	Negatieve controle 1:2400

Figuur 24 Indeling van het PVDF-membraan voor de dot blot met verdunning van de serumpool (bovenaan) en verdunning van het Detection As (onderaan) in elk vakje

Het bekomen resultaat van de dot blot wordt weergegeven in Figuur 25, hierin is zichtbaar dat een verdunning van maximaal 1:600 van het Detection As nodig is om een zichtbare blauwe kleur geeft.



Figuur 25 Dot blot van het verdunningsraster van de serumpool en het Detection antibody

Vervolgens zijn de fracties van de gelfiltraties geselecteerd voor de dot blot. In de grafieken worden deze weergegeven door een kruisje. Niet alle fracties van de piek en de schouder van één gelfiltratie worden geblot. Er worden er enkele uitgekozen om een globaal kwalitatief resultaat te bekomen.

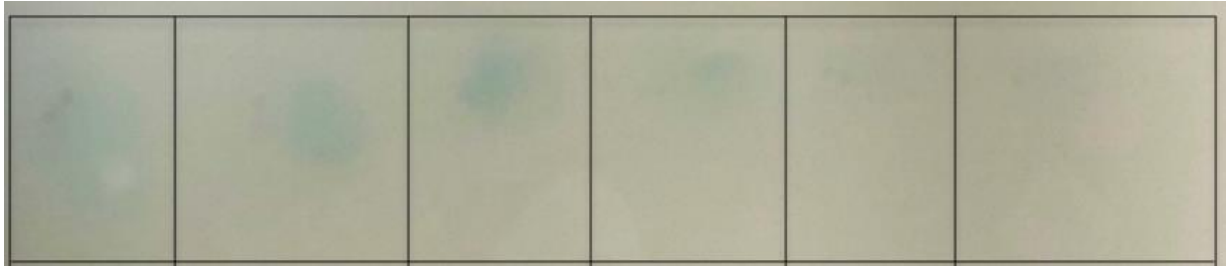
Onderstaand schema (zie Figuur 26) toont een overzicht van de verschillende fracties die geblot werden van alle bekomen gelfiltraties. Er werden fracties van zowel de schouder als de piek met de hoogste absorpties geselecteerd om een globaal beeld te krijgen:

Exp 1 piek	Exp 1 schouder	Exp 2 piek	Exp 2 schouder	Exp 3 piek	NC
Exp 3 schouder	Exp 4 piek	Exp 4 schouder	Exp 5 piek	Exp 5 schouder	NC

Figuur 26 Dot blot 1 van de pieken en schouders van experimenten 1 t.e.m. 5 met Sephadex G-75; Exp = Experiment; NC = Negatieve Controle

De fracties werden gespot per experiment waarbij telkens eerst de piek gevolgd werd door een fractie van de schouder. De experimenten worden oplopend van experiment 1 t.e.m. experiment 5 gespot. De meest rechtse spot van elke rij is een negatieve controle waarbij enkel PBS-buffer werd aangebracht als staal. Hier werd geen blauwe kleur teruggevonden.

Het eindresultaat van de dot blot toont een blauwe kleur bij zowel de pieken als bij de schouders. Dit betekent dat Gc-globuline zowel bij de eerste piek als bij de schouder uit de kolom komt. Om te weten of Gc-globuline over de gehele schouder uit de kolom komt, worden de spots van het laatste experiment van de hele schouder geblot. Figuur 27 toont de blot van de schouder met op het einde een negatieve controle die weer met PBS-buffer als staal gespot werd.



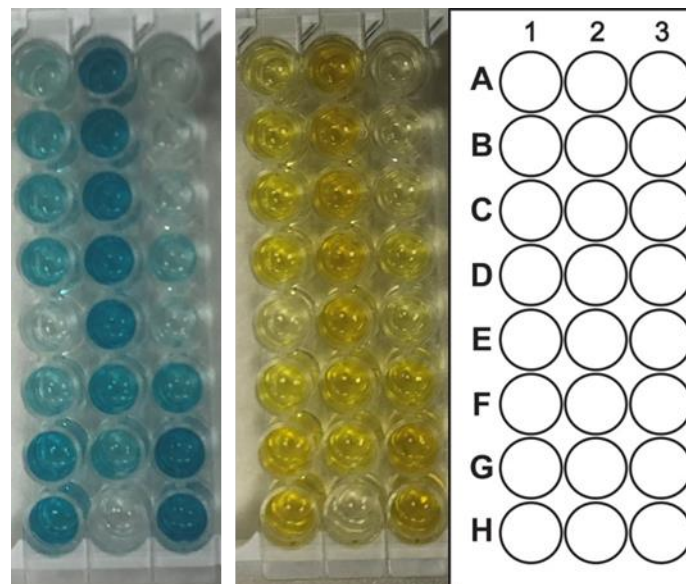
Figuur 27 Dot blot 2 van de pieken en schouders van experiment 6 met Sephadex G-75

Ook in deze dot blot werd elke spot blauw. Er kan wel opgemerkt worden dat de spots op het einde van de schouder minder en minder blauw worden. Dit betekent dat het Gc-globuline gehalte afneemt en uiteindelijk er geen Gc-globuline meer aanwezig is in de laatste spot. In vergelijking met experimenten 1 t.e.m. 5 is de blauwe kleur van de spots van experiment 6 veel zwakker. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het staalvolume dat gebruikt werd om de gelfiltratie uit te voeren. Bij de experimenten 1 t.e.m. 5 werd een staalvolume gebruikt dat varieert van 9 tot 20 ml terwijl bij experiment 6 een staalvolume van 1 ml werd gebruikt.

In de dot blot werd Gc-globuline teruggevonden zowel in de piek als in de schouder van het elutiepatroon. Het feit dat Gc-globuline in de piek aanwezig is kan erop duiden dat het bindt met andere moleculen in het serum om een complex te vormen. Hierdoor wordt het molecuulgewicht van het complex groter, waardoor het complex sneller uit de kolom migreert. In de schouder is waarschijnlijk ongebonden Gc-globuline aanwezig met een lager molecuulgewicht.

4.1.4 Sandwich-ELISA

De sandwich-ELISA van enkele fracties wordt uitgevoerd. Bij het kiezen van de fracties worden zowel fracties van de schouder als fracties van de piek, van de verkregen elutiepatronen van de gelfiltraties, gekozen. Dit werd gedaan omdat bij de dot blots zowel een signaal zichtbaar was bij de pieken als bij de schouders. Omdat de dot blot echter kwalitatief is, is het niet mogelijk om een hoeveelheid Gc-globuline bij elke fractie te plaatsen. Om de concentratie aan Gc-globuline in de fracties te berekenen wordt een ijklijn opgesteld met een standaard serumpool. In Figuur 28 en Tabel 5 zijn het overzicht van de ELISA en de resultaten van de concentratiebepaling terug te vinden:



Figuur 28 Overzicht van de uitgevoerde ELISA met links de blauwe kleuring van het TMB-substraat in de wells; in het midden de gele kleuring van het TMB-substraat na stopzetting van de reactie met HCl; en rechts een overzicht van een wellplaat

Op Figuur 28 is duidelijk de toenemende intensiteit van de kleuring in de ijklijn te zien. In *well* H2 werd de blanco gepipetteerd die enkel bestaat uit serum diluent. De rest van kolom 2 bevat een ijklijn die van G2 t.e.m. A2 oploopt. De concentratie ligt in stijgende lijn van *well* G2 naar A2, en dus ook de intensiteit van de blauwe en gele kleur. De laagste Gc-globulineconcentratie van de ijklijn bedraagt 56,25 mg/ml. De hoogste concentratie van de ijklijn bedraagt 1350 mg/ml.

Tabel 5 Resultaten ELISA van fracties van de gelfiltratie G-75 met v.l.n.r. de wells met blauw substraat; in het midden de wells met het geel substraat na aanzuren met HCl; en het meest rechts een leeg sjabloon om de positie van de stalen weer te geven

Absorbantie	Gc-globuline-concentratie (mg/ml)	Experiment	Fractie	p / s	Positie in wellplaat
0,54	< 56,25	1	33	piek	A1
1,45	84,31	1	47	schouder	B1
1,37	76,79	1	50	schouder	C1
1,44	83,53	1	51	schouder	D1
0,25	< 56,25	2	15	piek	E1
0,99	< 56,25	2	18	piek	F1
2,34	160,29	2	42	schouder	G1
2,70	241,71	2	43	schouder	H1
0,14	< 56,25	3	24	piek	A3
0,19	< 56,25	4	8	piek	B3
0,32	< 56,25	4	10	schouder	C3
0,85	< 56,25	4	14	schouder	D3
0,35	< 56,25	5	14	piek	E3
1,76	107,83	5	22	schouder	F3

In Tabel 5 wordt het overzicht gegeven van de bepaling van de Gc-globulineconcentratie.

Hier is duidelijk de trend te zien dat de concentratie van Gc-globuline hoger is in de schouders dan in de pieken. In de meeste pieken is het gehalte aan Gc-globuline lager dan de laagste concentratie van de standaard van de ijklijn, waardoor er geen specifieke concentratie kan berekend worden met het programma van de Victor X4 Multilabel Plate Reader. Hierdoor kan enkel gesteld worden dat de Gc-globulineconcentratie in de fracties van deze pieken lager is dan 56,25 mg/ml. Het feit dat in de piek ook een lage concentratie aan Gc-globuline aanwezig is, kan staven dat een kleine hoeveelheid Gc-globuline met andere moleculen in het serum een complex vormt zoals in de dot blot ook al werd vermoed.

Experiment 4 wijkt wel af doordat zowel de concentratie aan Gc-globuline in de piek als in de schouder laag is. Maar uit het overzicht van de DoE op pagina 40 blijkt dat het laag signaal te wijten kan zijn aan het 'lager' staalvolume gecombineerd met het laag debiet, waardoor de Gc-globuline trager uit de kolom komt en in een lagere hoeveelheid in de fracties zit. Bij experiment 1 wordt ook een staalvolume van 9 ml gebruikt, maar hier is de concentratie van Gc-globuline in de schouder wel hoger. Dit kan verklaard worden door het hoger debiet dat gebruikt werd, waardoor Gc-globuline sneller uit de kolom migreert en bijgevolg in een hoger gehalte in de fracties aanwezig is.

Door het randomiseren van de keuze van de ingezette stalen voor de sandwich-ELISA werd van experiment 3 maar 1 fractie van de schouder van het elutiepatroon gemeten. Ter controle werden van dit experiment 5 nieuwe stalen ingezet waarvan 3 fracties van de piek en 2 fracties van de schouder van het elutiepatroon. Onderstaande Tabel 6 geeft de resultaten weer:

Tabel 6 Bijkomende resultaten van de sandwich-ELISA van experiment 3 van de G-75 gelfiltratie geëluëerd met PBS

Absorbantie	Gc-globuline-concentratie (mg/ml)	Experiment	Fractie	p / s
0,806189	28,693	3	20	Piek
0,979184	39,9957	3	21	Piek
1,30542	63,8139	3	22	Piek
3,01753	815,509	3	42	schouder
2,98724	659,709	3	43	schouder

Ook hier is een hoge concentratie aan Gc-globuline aanwezig in de schouderfracties en een lage concentratie aan Gc-globuline in de fracties van de piek. Er is dus wel duidelijk een verband waar te nemen tussen de concentratie en het staalvolume. Bij hogere staalvolumes zijn de Gc-globulineconcentraties in de fracties hoger. Dit is logisch, omdat er bij grotere staalvolumes meer Gc-globuline aanwezig is waardoor de opgevangen Gc-globuline in de fracties ook hoger is.

De fracties van de schouders van de verschillende experimenten worden samengevoegd, omdat hier de grootste hoeveelheid afgezonderd Gc-globuline in aanwezig is. Dit

samengevoegd staal wordt verder gebruikt voor de analyse met de affiniteitschromatografie.

4.2 Affiniteitschromatografie

De eerste run die op de Affi-gel Blue kolom wordt gedaan is met de serumpool die op voorhand gemaakt en aseptisch gefilterd werd. Het serumstaal werd gedialyseerd in gedeïoniseerd water om zouten en andere kleine moleculen te verwijderen. Deze kunnen namelijk interfereren met de bindingsplaatsen op Cibacron Blue F3GA waardoor albumine en andere serumproteïnen misschien minder goed binden op de kleurstof met als gevolg dat er geen echte scheiding optreedt.

De Econo-column van 30 cm wordt gevuld met Affi-gel Blue en heeft een bedhoogte van 24 cm wat de inhoud van de kolom op 42 ml brengt. Na equilibratie van de gel met 2 kolomvolumes fosfaatbuffer kan het staal opgebracht worden. De handleiding van Bio-rad geeft een richtlijn van 1 ml staal per 5 ml gel. Omdat de kolom een inhoud van 42 ml heeft, bedraagt het maximaal staalvolume 8 ml. Er wordt een debiet van 0,5 ml/min gehanteerd voor het opbrengen van alle oplossingen op de kolom. Fracties van $\pm 3,3$ ml worden opgevangen met behulp van de Fraction Collector van Bio-rad.

Het staal wordt eerst geëluëerd met 2 kolomvolumes (84 ml) fosfaatbuffer met een pH van 7. Omdat enkel albumine sterk bindt aan Cibacron Blue elueren de meeste serumproteïnen in deze stap. Vervolgens wordt een zouttrap van toenemende NaCl-concentraties van 0,2 mol/l t.e.m. 1,4 mol/l met stappen van 0,2 mol/l over de kolom gebracht. De hele zouttrap neemt 2 kolomvolumes in en elke trap heeft hetzelfde volume, namelijk 12 ml. Albumine bindt zo sterk aan Cibacron Blue dat het mogelijk is dat na de zouttrap albumine nog niet geëluëerd is. Daarom worden nog 2 kolomvolumes van een chaotroop reagens, namelijk een 6 mol/l ureumoplossing, op de kolom gebracht. Een chaotroop reagens is een reagens dat de hydrofobe interacties tussen de restgroepen van aminozuren verstoort. Hierdoor wordt de plooiing van de proteïnen verstoort en denatureert het uiteindelijk [75]. Omdat in dit stadium enkel nog albumine gebonden zit op de kolom zal enkel albumine denatureren en loskomen van de kolom. Belangrijk is wel dat steeds met 2 kolomvolumes fosfaatbuffer nagespoeld wordt zodat het volgende staal niet in contact komt met de ureum en de serumproteïnen denatureert.

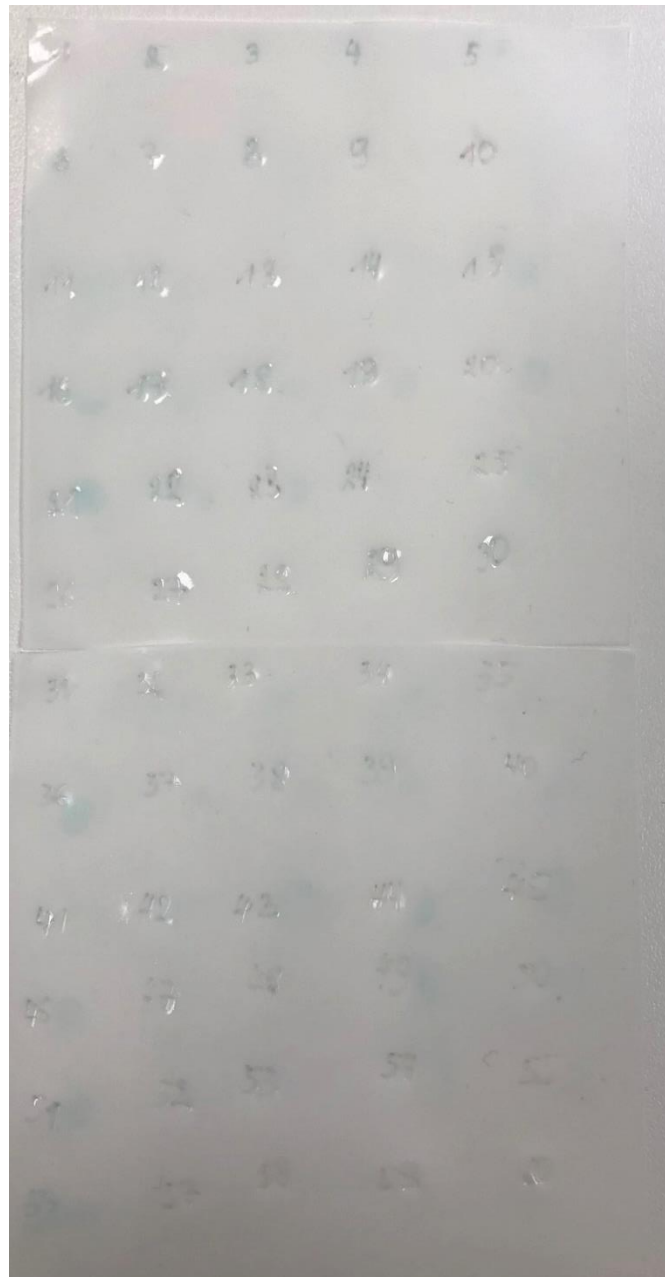
Alle opgevangen fracties worden met de dot blot geanalyseerd (zie 4.2.1) om te achterhalen of Gc-globuline wel werkelijk en met welke buffer geëluëerd wordt.

Vervolgens wordt het gecollecteerd staal van de schouderfracties van de gelfiltraties op de Affi-gel Blue gebracht. Ook nu wordt een debiet van 0,5 ml/min gehanteerd en fracties van ongeveer 3,3 ml opgevangen. Alle fracties van deze affiniteitschromatografie worden met de dot blot en sandwich-ELISA geanalyseerd.

4.2.1 Dot blotting

Alle fracties van de affiniteitschromatografie worden gespot op een PVDF-membraan. Op Figuur 29 wordt het resultaat van de dot blot weergegeven. Er werd tevens een positieve en negatieve controle gespot op het einde van het PVDF-membraan op de respectievelijke plaatsen 56 en 57. De positieve controle was een spot van de serumpool

die gebruikt werd voor de gelfiltratie, maar nog niet op de gelkolom was gebracht. In dit staal is een bepaalde hoeveelheid Gc-globuline aanwezig, waardoor de spot altijd blauw zal kleuren. De negatieve controle werd gemaakt door enkel fosfaatbuffer, die ook gebruikt werd voor de affiniteitschromatografie, te spotten. Hierin is geen Gc-globuline aanwezig waardoor deze nooit blauw kleurt, omdat de Anti-Gc-globuline-HRP niet kan binden en dus ook het TMB-substraat niet kan oxideren. Dit is wel het geval bij de positieve controle.



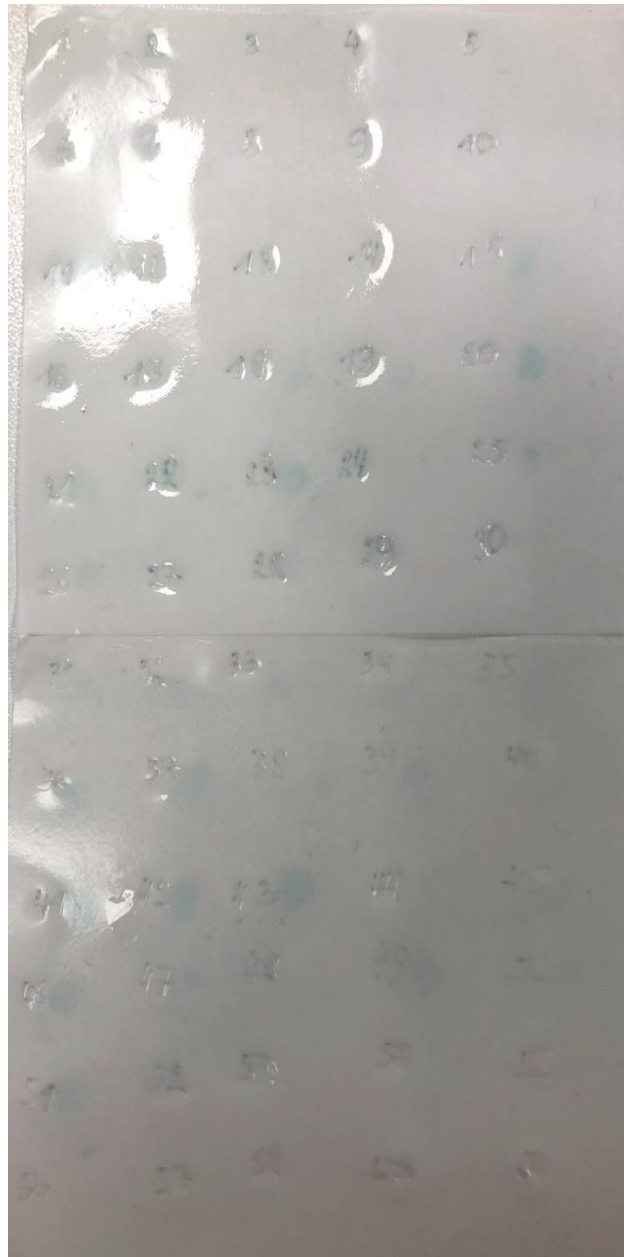
Figuur 29 Overzicht van de dot blot met stalen gespot van nummer 1 t.e.m. 55 en een positieve en negatieve controle gespot op respectievelijk plaats 56 en 57

Op Figuur 29 is te zien dat er in de eerste twee rijen van 1 t.e.m. 10 geen blauwe kleur werd waargenomen. In deze fracties zit dus geen Gc-globuline wat erop kan duiden dat dit volume het void volume van de kolom is. Verder werd over de hele affiniteitschromatografie Gc-globuline waargenomen, maar vooral daar waar geëluëerd werd met fosfaatbuffer (fracties 11 t.e.m. 36). Vanaf fractie 35-36 worden fracties

opgevangen die met een stijgende zoutgradiënt geëluëerd werden. Ook hier zijn zwakke signalen van Gc-globuline zichtbaar.

Het feit dat fracties tot op het einde van de affiniteitschromatografie een blauwe kleur geven, wat duidt op de aanwezigheid van Gc-globuline, kan verklaard worden met het feit dat affiniteitschromatografie geen scheiding op basis van molecuulgewicht is. Er wordt wel een scheiding veroorzaakt doordat Cibacron Blue bindt met de verschillende serumproteïnen met verschillende sterkte. Afhankelijk van de elutiebuffer (fosfaatbuffer of een stijgende zoutgradiënt) die gebruikt wordt, komen verschillende proteïnen los van Cibacron Blue en uit de kolom. Om te bepalen met welke elutiebuffer de hoogste concentratie Gc-globuline loskomt van Cibacron Blue moet een sandwich-ELISA uitgevoerd worden. Van dit experiment werd echter geen ELISA gedaan, omdat dit een verkennende chromatografie was waarin onderzocht werd waar en of Gc-globuline van de kolom geëluëerd werd.

Er wordt wel een sandwich-ELISA uitgevoerd van de dot blot waarbij de fracties van de schouders samengevoegd werden tot 1 staal. Figuur 30 geeft de resultaten van de spots van deze fracties weer. De stalen zijn gespot van spot 1 t.e.m. 28 en van 31 t.e.m. 52. Ook bij deze dot blot werd 2 keer een positieve en negatieve controle gespot op respectievelijk 29&53 en 30&54.



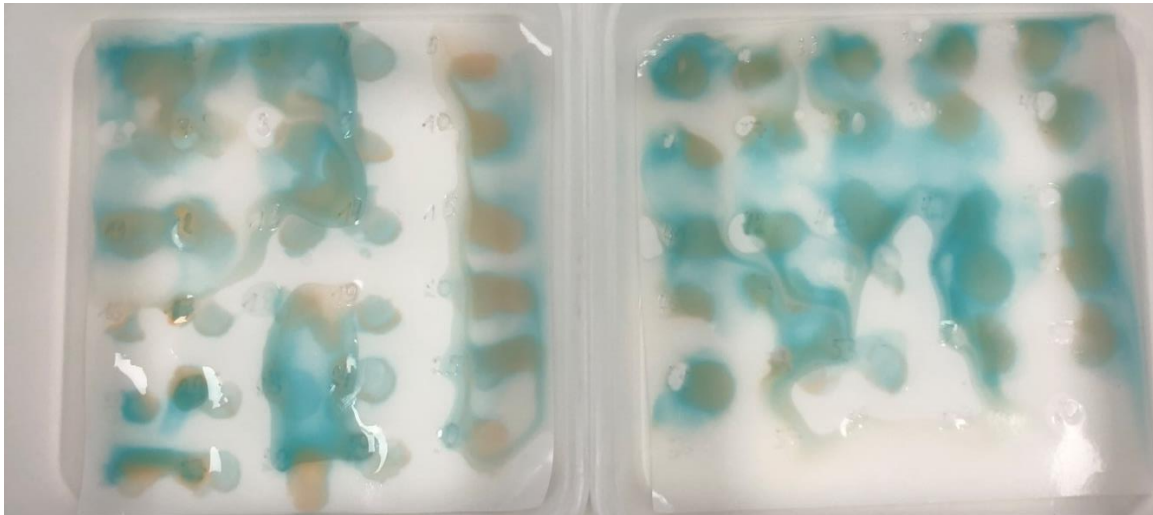
Figuur 30 Dot blot Affi-gel Blue fracties geëlueerd met fosfaatbuffer; stalen gespot van 1 t.e.m. 28 en 31 t.e.m. 52; positieve controle van serumpool gespot op 29 en 53; negatieve controle van fosfaatbuffer gespot op 30 en 54

Het resultaat van deze dot blot komt ongeveer overeen met de resultaten van de dot blot op Figuur 29. Ook hier werd weer geen blauwe kleur teruggevonden in de eerste 10 spots. Verder kwam wel gedurende de hele affiniteitschromatografie Gc-globuline uit de kolom.

De fracties die werden opgevangen met de zoutgradiënt beginnen ongeveer vanaf spot 35-36. De meeste blauwe spots komen voor spot 40. Deze fracties werden geëlueerd met fosfaatbuffer. Er zijn ook nog enkele spots blauw gekleurd in de zoutgradiëntzone, maar in mindere mate dan bij de elutie met fosfaatbuffer.

Omdat het doel van de affiniteitschromatografie is om het storend albumine van Gc-globuline af te scheiden wordt dezelfde procedure van de dot blot voor de detectie van Gc-globuline toegepast op albumine.

Als eerste test wordt Polyklonaal schaap Anti-humaan Albumine-HRP conjugaat gebruikt (Bio-rad). De antistoffen worden naar dezelfde concentratie verdund als voor het Gc-globuline proces. De stockoplossing van Polyklonaal Anti-humaan Gc-globuline-HRP conjugaat heeft een concentratie van 1,08 mg/ml. Deze wordt 600 keer verdund, om te gebruiken voor de dot blot, met een resulterende concentratie van 0,0018 mg/ml. Het aangekocht Polyklonaal Anti-humaan albumine-HRP heeft een concentratie van 5 mg/ml en moet dus ongeveer 2500 keer verdund worden om een concentratie van 0,0018 mg/ml te bekomen. Figuur 31 geeft de resultaten van de eerste albumine-dot blot weer:



Figuur 31 Dot blot van albumine van de opgevangen affi-gel Blue affiniteitschromatografie fracties geëluëerd met fosfaatbuffer en zoutgradiënt

De fracties van de affiniteitschromatografie werden op net dezelfde manier gespot als de dot blot die wordt weergegeven in Figuur 30. Op plaats 55 werd een fractie van de elutie met ureum gespot. Deze fractie werd meegenomen om te controleren of albumine van de kolom geëluëerd werd met het chaotroop reagens ureum.

Wanneer het TMB-substraat op de spots werd toegevoegd was er meteen een blauwe kleur zichtbaar bij alle spots. Ook de negatieve controle, die bestond uit fosfaatbuffer, kleurde intens blauw. De hevige oxidatiereactie wijst erop dat de concentratie van de detectie antistof veel te hoog was. Dit komt waarschijnlijk doordat de verdunning van het polyklonaal Anti-humaan albumine-HRP conjugaat gebaseerd was op de concentratie van de detectie antistof die gebruikt werd voor de kwalitatieve dot blot van Gc-globuline. Gc-globuline heeft een normaalwaarde van 200-600 mg/l in het bloed [76], terwijl albumine een normaalwaarde van 34-50 g/l [77]. Dit betekent dat albumine in een veel hogere concentratie (ca. factor 100) in het bloed of serum aanwezig is waardoor een veel grotere verdunning nodig is.

Het feit dat elke spot blauw kleurde, waaronder ook de negatieve controle kan te wijten zijn aan het onvoldoende strippen van proteïnen op het PVDF-membraan. Het membraan wordt ongeveer 4 keer hergebruikt en na elke dot blot worden de aanwezige proteïnen gestript. Het is mogelijk dat albumine van vorige experimenten niet volledig werd verwijderd waardoor nu alle spots blauw kleuren. Dit probleem is waarschijnlijk niet eerder aan het licht gekomen doordat Gc-globuline in een veel lagere concentratie in het serum aanwezig is en dus makkelijker gestript kan worden.

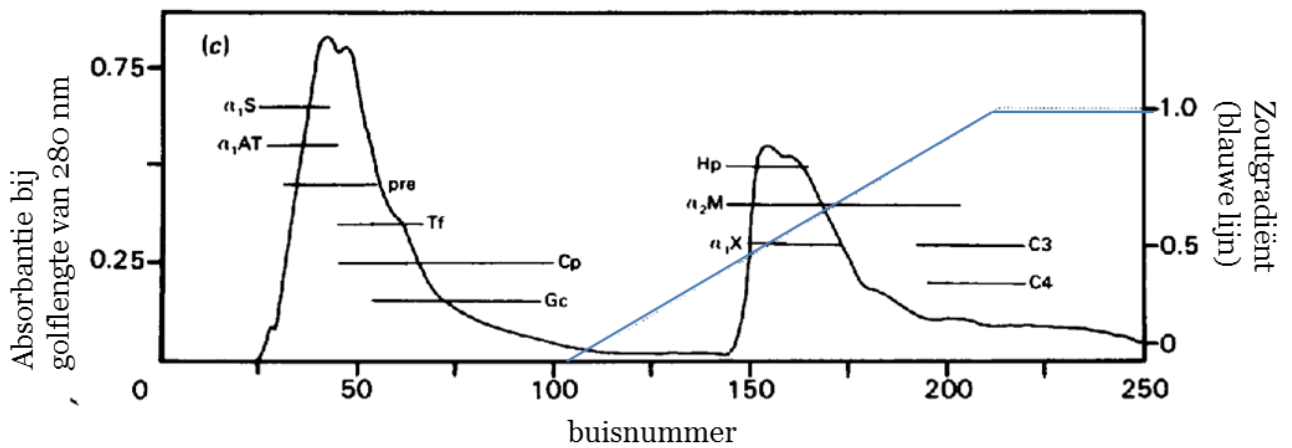
4.2.2 Sandwich ELISA

Om te kunnen concluderen of Gc-globuline afgezonderd wordt met behulp van de affiniteitschromatografie zoals Gianazza & Arnaud, 1982 beschreven hebben, moet de concentratie aan Gc-globuline in de fracties bepaald worden [78]. Dit wordt gedaan met de sandwich-ELISA. Tabel 7 geeft een overzicht van de resultaten:

Tabel 7 Overzicht van de resultaten van de sandwich-ELISA van de opgevangen fracties afkomstig van het tweede affiniteitschromatografie-experiment met Affi-gel Blue geëluëerd met fosfaatbuffer

Absorbantie	Gc-globuline-concentratie (mg/ml)	Fractie	Positie in wellplaat	Dot blot
0,252901	≈0	5	A4	Kleurloos
0,271985	0,304066≈0	10	B4	Kleurloos
0,282257	0,645377≈0	11	C4	Kleurloos
1,1101	49,1301	15	D4	Blauw
0,604035	16,5628	18	E4	Blauw
0,410438	6,24055	20	F4	Blauw
0,370816	4,35116	23	G4	Blauw
0,355837	3,66554	25	H4	Blauw
0,320478	2,12642	28	A5	Licht blauw
0,304668	1,48414	30	B5	Licht blauw
0,239514	≈0	33	C5	Zeer licht blauw
0,234999	≈0	35	D5	Zeer licht blauw
0,233349	≈0	40	E5	Zeer licht blauw
0,269401	0,225063≈0	41	F5	Licht blauw
0,252574	≈0	44	G5	Licht blauw
0,310524	1,718	45	H5	Licht blauw
0,312799	1,81019	47	A8	Licht blauw
0,261957	0,025934≈0	49	B8	Licht blauw

Zoals Tabel 7 aantoont elueert Gc-globuline vanaf fractie 15. De elutie met fosfaatbuffer werd opgevangen vanaf fractie 10 t.e.m. ongeveer fractie 35. Dit betekent dat door het elueren met fosfaatbuffer Gc-globuline loskomt van Cibacron Blue en dus geëluëerd wordt. In het onderzoek van Gianazza & Arnaud, 1982 werd Gc-globuline ook geëluëerd met fosfaatbuffer (Figuur 32).



Figuur 32 Elutiepatroon van gedialyseerd serum via Affi-gel Blue affiniteitchromatografie bekomen in het onderzoek van Gianazza & Arnaud, 1982

Zoals in Figuur 32 weergegeven wordt, wordt Gc-globuline vanaf het midden tot net voor het einde (buis 55-100) van de elutie met fosfaatbuffer geëluëerd. Ook hier werd Gc-globuline ongeveer in het midden van de fosfaatbuffer-elutie geëluëerd. Er kan vermoed worden dat de andere serumproteïnen die gedetecteerd werden in het onderzoek van Gianazza en Arnaud, ook in dit onderzoek gescheiden worden. Hier is echter geen experimenteel bewijs van.

Aan de concentratie van de fracties kan wel besloten worden dat de Gc-globuline verdund wordt door het elueren met fosfaatbuffer tijdens de affiniteitschromatografie, maar ook door het elueren met PBS tijdens gelfiltratie. In het serum is gemiddeld 400 mg/ml Gc-globuline aanwezig. Na de affiniteitschromatografie bevat de fractie met de hoogste Gc-globulineconcentratie ongeveer 50 mg/ml. Dit is een verdunning van 1:8. Dit is in eerste instantie niet erg, omdat het Gc-globuline wel geïsoleerd wordt.

5 Besluit

Het doel van dit eindwerk was om een methode te vinden om Gc-globuline uit serum af te zonderen. Bijkomend moest een kwalitatieve test opgestart worden die gebruikt kon worden voor het aantonen van Gc-globuline en albumine in serum.

De resultaten van het onderzoek tonen aan dat Gc-globuline wel geïsoleerd wordt met behulp van gelfiltratie en affiniteitschromatografie. Er is ook een grote overeenkomst in de resultaten van de uitgevoerde affiniteitschromatografie en de resultaten van het onderzoek uitgevoerd door Gianazza & Arnaud, 1982. In de toekomst moeten nog experimenten uitgevoerd worden die andere serumproteïnen detecteren in de opgevangen fracties om te achterhalen of ook deze proteïnen door de affiniteitschromatografie met Affi-gel Blue afgescheiden worden van het VBP. Dit kan voorlopig enkel vermoed worden. Verder kon ook geconcludeerd worden dat het Gc-globuline door elutie met een grote hoeveelheid buffers verdund wordt. Om de verdunning tegen te gaan kan nog onderzocht worden of de verdunning van VBP lager is wanneer eerst de affiniteitschromatografie wordt uitgevoerd en dan de gelfiltratie. Ook kan in de toekomst nog gewerkt worden naar het opstarten van een vitamine D-kolom waarbij Gc-globuline specifiek bindt aan het vitamine D. Dit zou de storing met andere serumproteïnen nog meer verminderen.

Het opstarten van de kwalitatieve test van Gc-globuline is gelukt. De kwalitatieve dot blot toonde aan dat er een concentratie van 0,0018 mg/ml van het polykonaal konijn anti-humaan Gc-globuline-HRP nodig was. Deze test kan gebruikt worden voor het kwalitatief aantonen van het VBP. De kwalitatieve test voor het aantonen van albumine staat nog niet op punt. Door tijdsgebrek is deze pas opgestart op het einde van de stageperiode. Er was dus maar tijd om 1 test uit te voeren. Om in de toekomst een dot blot voor het aantonen van albumine te kunnen gebruiken moeten dus meer experimenten uitgevoerd worden met verschillende concentraties van het polykonaal schaap anti-humaan albumine-HRP. Wanneer de concentratie van het detectie antistof op punt staat kan ook onderzocht worden of het hergebruik van de PVDF-membranen geen storende werking heeft. Er kan een hardere strippingsmethode getest worden om de gebonden proteïnen van het membraan te verwijderen en nagaan vanaf wanneer er een achtergrondkleuring op de spots van het PVDF-membraan zichtbaar wordt.

Het isoleren van Gc-globuline is gelukt, maar er is echter nog meer onderzoek nodig naar het ontwikkelen van controles voor de detectie van in de eerste plaats albumine. Daarnaast kan ook de aanwezigheid van andere serumproteïnen in de gecollecteerde fracties bepaald worden om zo het volledige onderzoek van Gianazza & Arnaud, 1982 na te gaan.

6 Referenties

- [1] H. Nagasawa *et al.*, “Gc protein (Vitamin D-binding Protein): Gc Genotyping and GcMAF Precursor Activity,” *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6A, pp. 3689–3696, 2005.
- [2] N. E. Cooke and E. V David, “Serum vitamin D-binding protein is a third member of the albumin and alpha fetoprotein gene family.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 76, no. 6, pp. 2420–2424, Dec. 1985.
- [3] A. Hossein-Nezhad and M. F. Holick, “Vitamin D for Health: A Global Perspective,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 88, no. 7, pp. 720–755, 2013.
- [4] W. Lee M. and R. M. Galbraith, “The Extracellular Actin-Scavenger System And Actin Toxicity,” *New Engl. J. Med. Downloaded*, vol. 326, no. 20, pp. 1335–1341, 1992.
- [5] W. Smith and S. M. Daniels¹, “Purification of Phytochrome by Affinity Chromatography on Agarose-Immobilized Cibacron Blue 3GA,” *Plant Physiol*, vol. 68, pp. 443–446, 1981.
- [6] H. Nagasawa, H. Sasaki, Y. Uto, S. Kubo, and H. Hori, “Association of the Macrophage Activating Factor (MAF) Precursor Activity with Polymorphism in Vitamin D-binding Protein,” *Anticancer Res.*, vol. 24, pp. 3361–3366, 2004.
- [7] T. Ravnsborg, D. T. Olsen, A. Hammerich Thysen, M. Christiansen, G. Houen, and P. Højrup, “The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor,” *BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1804, pp. 909–917, 2010.
- [8] N. Yamamoto, M. Ueda, and K. Hashinaka, “Immunotherapy of breast cancer with Gc protein-derived macrophage activating factor, GcMAF,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 8 Supplement, pp. 5532–5532, Apr. 2011.
- [9] N. Yamamoto, M. Ueda, and K. Hashinaka, “Administration of the most potent macrophage activating factor, GcMAF, to cancer patients eradicates a variety of cancers indiscriminately,” *Cancer Res.*, vol. 71, no. 8 Supplement, pp. 5531–5531, Apr. 2011.
- [10] M. Speeckaert, G. Huang, J. R. Delanghe, and Y. E. C. Taes, “Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 372, no. 1–2, pp. 33–42, 2006.
- [11] U. Meier, O. Gressner, F. Lammert, and A. M. Gressner, “Gc-Globulin: Roles in Response to Injury.”
- [12] T.-J. Huang, Y.-J. Weng, Y.-Y. Li, C.-C. Cheng, and R. W.-W. Hsu, “Actin-Free Gc-Globulin after Minimal Access and Conventional Anterior Lumbar Surgery,” *J. Surg. Res.*, vol. 164, no. 1, pp. 105–109, Nov. 2010.
- [13] R. F. Chun, “New perspectives on the vitamin D binding protein,” *Cell Biochem. Funct.*, vol. 30, no. 6, pp. 445–456, Aug. 2012.

- [14] H. Nagasawa *et al.*, “Gc protein (Vitamin D-binding Protein): Gc Genotyping and GcMAF Precursor Activity,” *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6A, pp. 3689–3696, 2005.
- [15] N. A. Campbell, *Dutch Glossary For Campbell Biology*, 9th ed. Benjamin/Cummings Pub. Co, 1990.
- [16] A. McLaughlin, “The Importance of Vitamins To Your Body | Healthy Eating | SF Gate.” [Online]. Available: <http://healthyeating.sfgate.com/importance-vitamins-body-5846.html>. [Accessed: 04-Mar-2018].
- [17] A. Hossein-Nezhad and M. F. Holick, “Vitamin D for Health: A Global Perspective,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 88, no. 7, pp. 720–755, 2013.
- [18] A. Slominski *et al.*, “A novel pathway for sequential transformation of 7-dehydrocholesterol and expression of the P450scc system in mammalian skin,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, no. 21, pp. 4178–88, Nov. 2004.
- [19] A. W. Norman, “The History of the Discovery of Vitamin D and Its Daughter Steroid Hormone,” *Ann Nutr Metab*, vol. 61, pp. 199–206, 2012.
- [20] M. F. Holick, X. Q. Tian, and M. Allent, “Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals,” *Evolution (N. Y.)*, vol. 92, pp. 3124–3126, 1995.
- [21] H. F. DeLuca, “History of the discovery of vitamin D and its active metabolites,” *Bonekey Rep.*, vol. 3, Jan. 2014.
- [22] M. F. Holick, “Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 6, p. 1678S–1688S, Dec. 2004.
- [23] L. A. Plum and H. F. DeLuca, “The Functional Metabolism and Molecular Biology of Vitamin D Action,” in *Vitamin D*, Totowa, NJ: Humana Press, 2010, pp. 61–97.
- [24] D. A. Bell, M. J. Crooke, N. Hay, and P. Glendenning, “Prolonged vitamin D intoxication: presentation, pathogenesis and progress,” *Intern. Med. J.*, vol. 43, no. 10, pp. 1148–1150, Oct. 2013.
- [25] M. D. Sur and K. J. Weber, “Hypercalcemia,” in *Common Surgical Diseases*, New York, NY: Springer New York, 2015, pp. 103–105.
- [26] M. F. Holick, “Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular diseases,” *Clin. Nutr.*, vol. 80, pp. 1678–1688, 2004.
- [27] E. M. Brown *et al.*, “Calcium-Ion-Sensing Cell-Surface Receptors,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, no. 4, pp. 234–240, Jul. 1995.
- [28] M. A. Chesarone and B. L. Goode, “Actin Nucleation and Elongation Factors: Mechanisms and Interplay.”

- [29] C. A. Vasconcellos and S. E. Lind, “Coordinated Inhibition of Actin-Induced Platelet Aggregation by Plasma Gelsolin and Vitamin D-Binding Protein.”
- [30] T. J. Kindt, R. A. Goldsby, B. A. Osborne, and J. Kuby, *Kuby immunology*. W.H. Freeman, 2007.
- [31] “Complement system Overview,” *Euro Diagnostica*, 2010. [Online]. Available: <http://www.complementsystem.se/Complement System>. [Accessed: 28-Mar-2018].
- [32] T. E. Hugli, “Structure and function of the anaphylatoxins.,” *Springer Semin. Immunopathol.*, vol. 7, no. 2–3, pp. 193–219, 1984.
- [33] J. T. Farmer, R. R. Dietert, and R. R. Dietert, “Immunotoxicology Assessment in Drug Development,” in *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*, Elsevier, 2013, pp. 247–262.
- [34] R. Kew, G. T. Trujillo, D. H. Habiell, L. G. Ge, and M. R. Ramadass, “Diminished neutrophil chemotaxis to C5a in vitamin D binding protein deficient mice,” *Mol. Immunol.*, vol. 48, no. 14, p. 1670, Aug. 2011.
- [35] P. J. José, M. J. Forrest, and T. J. Williams, “Human C5a des Arg increases vascular permeability.,” *J. Immunol.*, vol. 127, no. 6, pp. 2376–80, Dec. 1981.
- [36] R. R. Kew and R. O. Webster, “Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 82, no. 1, pp. 364–9, Jul. 1988.
- [37] F. Petersen, L. Bock, H. D. Flad, and E. Brandt, “A chondroitin sulfate proteoglycan on human neutrophils specifically binds platelet factor 4 and is involved in cell activation.,” *J. Immunol.*, vol. 161, no. 8, pp. 4347–55, Oct. 1998.
- [38] S. J. DiMartino, A. B. Shah, G. Trujillo, and R. R. Kew, “Elastase controls the binding of the vitamin D-binding protein (Gc-globulin) to neutrophils: a potential role in the regulation of C5a co-chemotactic activity.,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 4, pp. 2688–94, Feb. 2001.
- [39] R. R. Kew, J. A. Fisher, and R. O. Webster, “Co-chemotactic effect of Gc-globulin (vitamin D binding protein) for C5a. Transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils.,” *J. Immunol.*, vol. 155, no. 11, pp. 5369–74, Dec. 1995.
- [40] S. B. Mohamad, H. Nagasawa, Y. Uto, and H. Hori, “Tumor cell alpha-N-acetylgalactosaminidase activity and its involvement in GcMAF-related macrophage activation,” *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 132, no. 1, pp. 1–8, May 2002.
- [41] N. Yamamoto and V. R. Naraparaju, “Immunotherapy of BALB/c mice bearing Ehrlich ascites tumor with vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor.,” *Cancer Res.*, vol. 57, no. 11, pp. 2187–92, Jun. 1997.
- [42] B. Ngwenya and N. Yamamoto, “Effects of inflammation products on immune

- systems,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 21, no. 3, pp. 174–182, Apr. 1986.
- [43] D. L. Hamilos, “Antigen presenting cells,” *Immunol. Res.*, vol. 8, no. 2, pp. 98–117, Jun. 1989.
- [44] R. D. Cummings and R. P. McEver, *C-type Lectins*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [45] S. Pacini, G. Morucci, T. Punzi, M. Gulisano, and M. Ruggiero, “Gc protein-derived macrophage-activating factor (GcMAF) stimulates cAMP formation in human mononuclear cells and inhibits angiogenesis in chick embryo chorionallantoic membrane assay,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 60, no. 4, pp. 479–485, Apr. 2011.
- [46] I. M. Dambuza and G. D. Brown, “C-type lectins in immunity: recent developments,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 32, pp. 21–27, Feb. 2015.
- [47] N. Yamamoto and S. Homma, “Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 88, no. 19, 1991.
- [48] S. Cheon *et al.*, “The accuracy of clinicians’ predictions of survival in advanced cancer: a review,” *Ann. Palliat. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 22–9, Jan. 2016.
- [49] D. E. Brash, “Preprocancer: Normal skin harbors cancer-causing mutations,” *Science (80-.)*, vol. 348, no. 6237, pp. 1261359–1261498, 2015.
- [50] E. Saburi, A. Saburi, and M. Ghanei, “Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: from bench to bedside,” *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 228–238, 2017.
- [51] A. L. Reddi, K. Sankaranarayanan, H. S. Arulraj, N. Devaraj, and H. Devaraj, “Serum α -N-acetylgalactosaminidase is associated with diagnosis/prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix,” *Cancer Lett.*, vol. 158, no. 1, pp. 61–64, Sep. 2000.
- [52] S. P. J. Albracht and J. van Pelt, “Multiple exo-glycosidases in human serum as detected with the substrate DNP- α -GalNAc. II. Three α -N-acetylgalactosaminidase-like activities in the pH 5 to 8 region,” *BBA Clin.*, vol. 8, pp. 90–96, Dec. 2017.
- [53] S. P. J. Albracht, E. Allon, and J. van Pelt, “Multiple exo-glycosidases in human serum as detected with the substrate DNP- α -GalNAc. I. A new assay for lysosomal α -N-acetylgalactosaminidase,” *BBA Clin.*, vol. 8, pp. 84–89, Dec. 2017.
- [54] N. Yamamoto, H. Suyama, and N. Yamamoto, “Immunotherapy for Prostate Cancer with Gc Protein-Derived Macrophage-Activating Factor, GcMAF,” *Transl. Oncol.*, vol. 1, no. 2, pp. 65–72, Jul. 2008.
- [55] J. Jeffrey Bradstreet, emar Vogelaar, and L. Thyer, “Initial Observations of

- elevated Alpha-n-Acetylgalactosaminidase Activity Associated with Autism and Observed Reductions from GC Protein–Macrophage Activating Factor Injections,” *Autism Insights*, vol. 4, pp. 31–384, 2012.
- [56] D. S. Rehder, R. W. Nelson, and C. R. Borges, “Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients,” *Protein Sci.*, vol. 18, no. 10, pp. 2036–2042, Oct. 2009.
- [57] S. Pacini *et al.*, “Effect of paricalcitol and GcMAF on angiogenesis and human peripheral blood mononuclear cell proliferation and signaling,” *J. Nephrol.*, vol. 25, no. 4, pp. 577–581, 2012.
- [58] S. Kanda, Y. Mochizuki, Y. Miyata, H. Kanetake, and N. Yamamoto, “Effects of Vitamin D₃-Binding Protein-Derived Macrophage Activating Factor (GcMAF) on Angiogenesis,” *CancerSpectrum Knowl. Environ.*, vol. 94, no. 17, pp. 1311–1319, Sep. 2002.
- [59] Y. Koga, V. R. Naraparaju, and N. Yamamoto, “Antitumor Effect of Vitamin D-Binding Protein-Derived Macrophage Activating Factor on Ehrlich Ascites Tumor-Bearing Mice,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 220, no. 1, pp. 20–26, Jan. 1999.
- [60] “Corning® Syringe Filters - Corning Plastic Filters | Sigma-Aldrich.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=17192549>. [Accessed: 11-Apr-2018].
- [61] “Glass Econo-Column® Columns | Life Science Research | Bio-Rad.” [Online]. Available: <http://www.bio-rad.com/en-be/product/glass-econo-column-columns?ID=2cfb1c6e-32e8-4c72-b532-dd39013d707d>. [Accessed: 11-Apr-2018].
- [62] “Sephadex® G-75 Medium | Sigma-Aldrich.” [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g75120?lang=en®ion=BE&gclid=CjoKCQjw5LbWBRDCARIsALAbcOeDedFjyzuWDPFEktJEXn4Rvforo_trE-pHonDvmqdZQVfR8ZAXuwoaAivnEALw_wcB. [Accessed: 11-Apr-2018].
- [63] “Enzyme Purification by Size Exclusion (SEC) and Gel Filtration (GF).” [Online]. Available: https://www.creative-enzymes.com/service/enzyme-purification-by-size-exclusion-sec-and-gel-filtration-gf-_349.html. [Accessed: 11-Apr-2018].
- [64] C. D. C. He Min Xiao, “Atomic structure and chemistry of human serum albumin,” *Int. J. Sci.*, vol. 358, pp. 209–215, 1992.
- [65] G. Healthcare, “Gel Filtration Principles and Methods.”
- [66] GE Healthcare, *Spectrophotometry*. .
- [67] “Whatman® Westran® PVDF membranes Westran S, 0.2 µm PVDF blotting membrane, 10 x 10 cm sheet, 10/pk | Sigma-Aldrich.” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z671010?lang=en®ion=BE>. [Accessed: 12-Apr-2018].

- [68] Sino Biological, “Sandwich ELISA,” 2007. [Online]. Available: <https://www.sinobiological.com/sandwich-elisa.html>. [Accessed: 12-Apr-2018].
- [69] “Affi-Gel ® Blue Gel Instruction Manual.”
- [70] E. Gianazza and P. Arnaud, “Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA Mechanism of the molecular interaction.”
- [71] E. Gianazza and P. Arnaud, “Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction.,” *Biochem. J.*, vol. 203, no. 3, pp. 637–41, Jun. 1982.
- [72] M. Jeltsch, “Protein detection & quantification,” 2014.
- [73] A. Biosciences, “Handbooks from Amersham Biosciences Ficoll-Paque Plus GST Gene Fusion System Antibody Purification The Recombinant Protein Handbook Protein Purification Hydrophobic Interaction Chromatography Gel Filtration Reversed Phase Chromatography Expanded Bed Adsorption Microcarrier cell culture Gel filtration.”
- [74] Pharmacia Fine Chemicals, *Gel Filtration: Theory and Practice*. Sweden: Upplands Grafiska AB, 1975.
- [75] G. Salvi, P. De Los Rios, and M. Vendruscolo, “Effective interactions between chaotropic agents and proteins,” *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 61, no. 3, pp. 492–499, Sep. 2005.
- [76] C. S. Jørgensen *et al.*, “Gc globulin (vitamin D-binding protein) levels: an inhibition ELISA assay for determination of the total concentration of Gc globulin in plasma and serum,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 64, no. 2, pp. 157–166, 2004.
- [77] AZ Sint Lucas, “WEGWIJS IN UW BLOEDUITSLAGEN,” 2014, vol. 561, p. 6, 12AD.
- [78] E. Gianazza and P. Arnaud, “Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction.,” *Biochem. J.*, vol. 203, no. 3, pp. 637–41, Jun. 1982.

Bijlagen

Bijlage 1: Protocol Size Exclusion Chromatography Sephadex G-75

Benodigheden :

- Sephadex® G-75 (Sigma-Aldrich);
- 0,1 mol/l fosfaatgebufferde zoutoplossing, pH 7 (PBS);
 - > 8 g NaCl,
 - > 0,2 g KCl,
 - > 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O,
 - > 0,24 g KH₂PO₄,
 - > 1l gedemineraliseerd water,
- Dextran Blue en cytochroom c mengsel (10 ml),
 - > 10 mg Dextran Blue,
 - > 20 mg Cytochroom c,
- serumpool,
- 0,2 mol/l NaOH,
- gedemineraliseerd water.

Kalibratie kolom :

1. weeg ongeveer 41 g Sephadex® G-75 af en laat zwellen in 130% kolomvolume of 640 ml PBS;
 - > 1 g Sephadex® G-75 zwelt op tot een volume van 12-15 ml;
2. laat Sephadex® G-75 gedurende 24 uur zwellen op kamertemperatuur;
3. meng met een glazen roerstaaf de gel voorzichtig tot er een slurry gevormd wordt;
4. breng de Sephadex slurry in de kolom langs de roerstaaf om luchtballen te vermijden;
5. spoel wand van de kolom na met PBS en laat leeglopen tot ±1 mm boven het geloppervlak;
6. duw de adapter vast op de kolom;
7. laat het buffervolume zakken tot de gel net niet droog staat;
8. breng het Dextran Blue en Cytochroom C mengsel voorzichtig op de kolom en laat het in de gel trekken;
9. start de buffertoevoer met het gewenste debiet van;
10. vang het void volume op in een maatcilinder;
11. vang na het void volume fracties van 1 ml op;
12. meet de absorbantie van de opgevangen fracties bij 405 en 600 nm.

Werkwijze :

1. doe de bovenkant van de kolom open;
 - > breng het gewenste staalvolume van de serumpool op de kolom met behulp van een pipet;
2. laat het staalvolume bijna volledig in de gel lopen;
3. duw de adapter terug vast op de bovenkant van de kolom;
4. start de bufferpomp met het gewenste debiet;
5. laat ongeveer 490 ml PBS buffer door de kolom stromen;
 - > controleer met behulp van de absorbantie door het opvangen van een kleine hoeveelheid vloeistof die uit de kolom komt.

Wassen van de kolom :

1. spoel de kolom met 2 kolomvolumes 0,2 mol/l NaOH;
2. spoel de kolom met 2-3 kolomvolumes PBS.

Bewaring van de kolom :

1. bewaar de kolom op 2-8 °C in 20v/v% ethanol

Bijlage 2: Protocol dot blot assay voor detectie van Gc-globuline

Benodigdheden :

- PVDF-membranen,
- 100% methanol,
- fosfaatgebufferde zoutoplossing,
 - 8 g NaCl,
 - 0,2 g KCl,
 - 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O,
 - 0,24 g KH₂PO₄,
- washsolution,
 - 16,013 g NaCl,
 - 4,026 g KCl,
 - 2,643 g Na₂HPO₄·2H₂O,
 - 0,408 g KH₂PO₄,
 - 1 ml TWEEN-20®,
- reagent diluent,
 - 10 ml TWEEN-20®,
 - 190 ml PBS,
- polykonaal konijn Anti-humaan Gc-globuline-HRP conjugaat (1,08mg/ml) OF polykonaal schaap Anti-humaan albumine-HRP (5 mg/ml)
- TMB substraat (1:1),
- strippingbuffer (pH 2,2) (1l),
 - 15 g glycine,
 - 1 g SDS,
 - 20 ml TWEEN-20®,
- Tris buffer in saline pH 7,4 – 7,7 TBST (250 ml);
 - 15,14 g TRIS,
 - 2,19 g NaCl,
 - 0,250 ml TWEEN-20®.

Werkwijze :

1. plaats nummers met potlood op het PVDF-membraan;
2. activeer de PVDF-membranen 1 minuut in 100% methanol;
3. was het PVDF-membraan 5 minuten op de schudplaat met washsolution;
4. spot 5 µl van de fracties met hoge absorptie op het PVDF-membraan;
5. laat 45 minuten drogen op kamertemperatuur;
6. blokkeer het PVDF-membraan met reagent diluent voor 1 uur kamertemperatuur;
7. was het PVDF-membraan 3 keer gedurende 5 minuten met washsolution;
8. verdun het Detection As 600 x in reagent diluent;
9. voeg 10 µL verdund Detection As in de cirkeltjes op de PVDF en incubeer 3h op 37°C;
10. was het PVDF-membraan 3 keer gedurende 5 minuten met washsolution;
11. maak het TMB substraat (1:1) en voeg 30 µl hiervan toe op de spots;
12. incubeer 15 minuten in het donker op kamertemperatuur.

Stripping :

1. vul een bakje met strippingbuffer tot het membraan onder staat en incubeer 10 minuten op kamertemperatuur;
2. laat het membraan 2 keer 10 minuten in PBS op de schudplaat staan;
3. laat het membraan 2 keer 10 minuten in TBST op de schudplaat staan;
4. herbruik het membraan maximaal 4 keer.

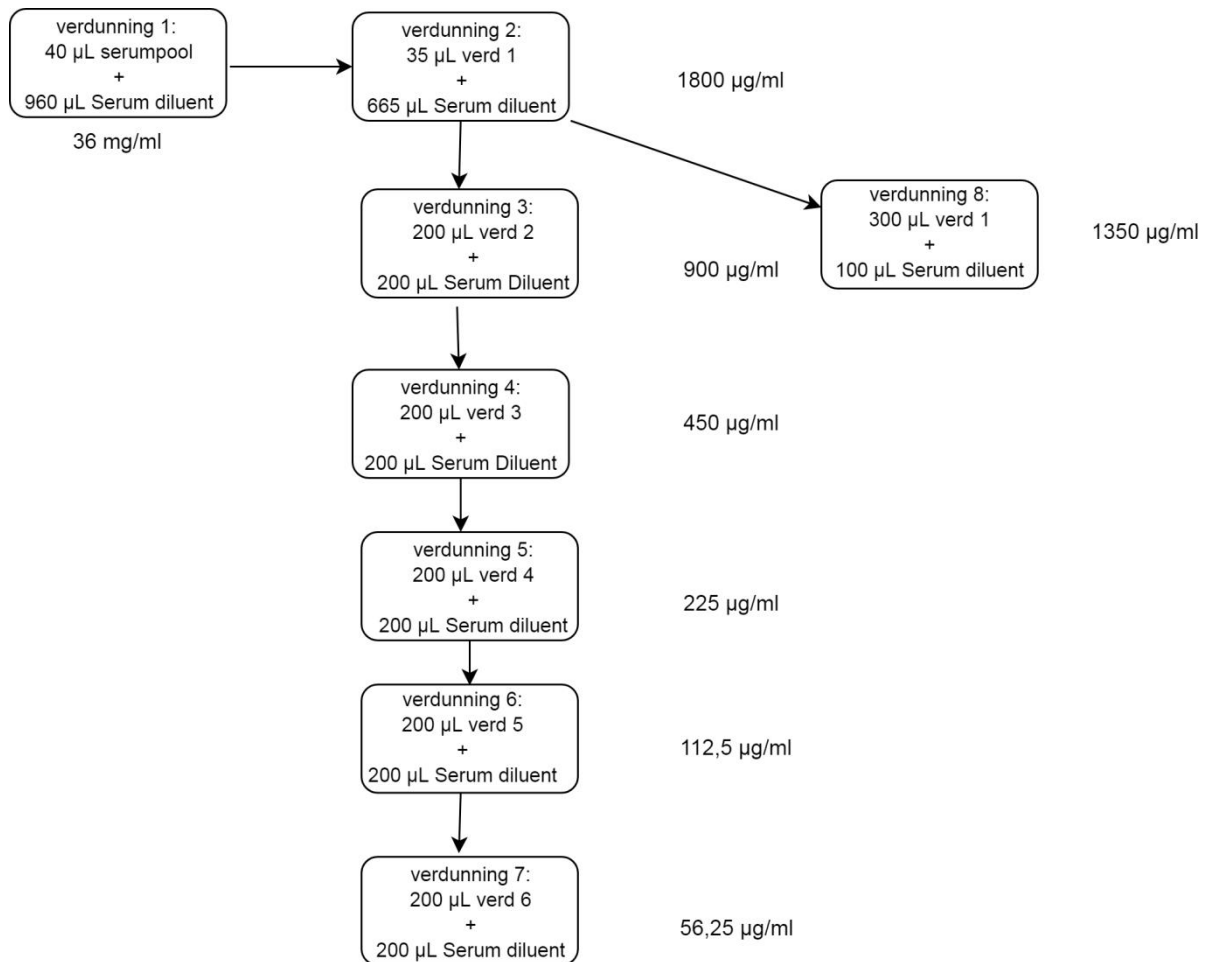
Bijlage 3: Protocol sandwich-ELISA voor kwantificatie van Gc-globuline

Benodigheden :

- coating buffer (1l),
 - 8,18 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$,
 - 6 g NaHCO_3 ,
- washsolution,
 - 16,013 g NaCl ,
 - 4,026 g KCl ,
 - 2,643 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
 - 0,408 g KH_2PO_4 ,
 - 1 ml TWEEN-20®,
- reagent diluent,
 - 10 ml TWEEN-20®,
 - 190 ml PBS,
- substraatoplossing,
 - TMB Microwell Peroxidase Substrate System 1:1,
- stopsolution,
 - 0,2 mol/l HCL ,
- serum diluent (1l),
 - 70 g solugel,
 - 3 g natriumcitraatdihydraat,
 - 7 g NaCl ,
- serumstalen,
- primair As: polyclonal Rabbit Anti-Human Gc-globuline,
- secundair As: polyclonal Rabbit Anti-Human Gc-globuline HRP conjugate.

Werkwijze :

1. verdun het primair As 2000 keer in coating buffer;
2. voeg 150 μL verdund primair As in de nodige wellen;
3. dek de plaat af met parafilm en deksel;
4. plaats de plaat op kamertemperatuur op de schudplaat gedurende 12 uur;
5. was de plaat 3 keer met washsolution;
6. voeg in elk welletje 300 μL reagent diluent toe om de platen te blokkeren;
 - a. 5% Tween van Merck in PBS (200 mL Diluent: 10 mL Tween aanlengen met PBS tot 200 mL);
7. was de plaat 3x met washsolution;
8. verdun het serumstaal (gefiltreerd en niet gefiltreerd) 10 000 keer;
9. maak de standaardreeks voor de ijklijn (zie Figuur 33);



Figuur 33 Verdunningschema voor het opstellen van de ijklijn

10. pipetteer 100 µL van de stalen en standaarden in de welletjes;
11. incubeer 1 uur op kamertemperatuur in de Victor: stel in op 300 sec voor 12 metingen;
12. verdun het secundair As met reagent diluent 15 000 keer;
13. was de plaat 3 keer met de washsolution;
14. pipetteer 150 µL van het verdund gelabeld As-HRP in elk welletje;
15. incubeer 30 minuten op kamertemperatuur in Victor: stel in op 300 sec voor 6 metingen;
16. maak het 1:1 substraat;
17. was de plaat 3 keer met de washsolution;
18. pipeteer 100 µL substraat in elk welletje;
19. incubeer 15 min op kamertemperatuur in het donker;
20. voeg 100 µL stopsolution toe in elk welletje;
21. meet absorbantie bij 450 nm met behulp van de Victor X4 Multilabel Plate Reader.

Bijlage 4: Protocol affiniteitschromatografie met Affi-gel Blue(100-200 mesh)

Benodigheden :

- 0,02 mol/l fosfaatbuffer (PB) pH 7 (2l),
 - 4,414 g KH_2PO_4 ,
 - 2,0684 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
- 0,2-1,4 mol/l NaCl in 0,02 M PB(0,1l),
 - 0,2 mol/l: 1,168 g NaCl,
 - 0,4 mol/l: 2,336 g NaCl,
 - 0,6 mol/l: 3,504 g NaCl,
 - 0,8 mol/l : 4,672 g NaCl,
 - 1 mol/l : 5,840 g NaCl,
 - 1,2 mol/l : 7,008 g NaCl,
 - 1,4 mol/l : 8,176 g NaCl,
- 6 mol/l ureum opgelost in 0,02 M PB,
 - 90,09 g ureum,
- Spectra dialyse membraan.

Werkwijze :

1. vul kolom met affi-gel blue met 50 ml gel;
2. equilibreer de kolom met 2 CV (100 ml) PB;
3. breng het dialyse membraan 15-30 minuten in gedeïoniseerd water;
4. sluit dialysemembraan aan 1 kant af met een elastiek;
5. breng maximaal 1,5 ml staal per 1 cm dialysemembraan in het dialysemembraan en sluit af met elastiek;
6. breng het dialysemembraan in PB en laat overnacht staan;
7. breng maximum 1 ml staal per 5 ml gel op de kolom (hier 8 ml serumstaal);
8. laat staal intrekken tot net boven het geloppervlak;
9. elueer met 2 CV fosfaatbuffer gevolgd door 2 CV van een NaCl-zouttrap
10. vang fracties van 2,5 ml op in buisjes;
11. breng 2 CV PB over de kolom met een debiet van 0,5 ml/min;
12. breng de NaCl gradiënt aan op de kolom met een debiet van 0,5 ml/min;
13. strip de kolom met 6M ureum;
14. spoel de Affi-Gel blue met 1 CV PB.

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:
Isolatie van Gc-globuline uit serum

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**
Jaar: **2018**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Bongaerts, Naomi

Datum: **11/06/2018**