

2018 • 2019
Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Opzuivering van Gc-globiline uit serum/plasma via Cohn
fractionatie & affiniteitschromatografie

PROMOTOR :

ing. Liesbet PAULS

PROMOTOR :

ing. Bart THEWISSEN

COPROMOTOR :

Dhr. Eugène BOSMANS

Bjorn Smeets

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

Gezamenlijke opleiding UHasselt en KU Leuven



2018•2019

Faculteit Industriële ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterthesis

Opzuivering van Gc-globuline uit serum/plasma via Cohn
fractionatie & affiniteitschromatografie

PROMOTOR :

ing. Liesbet PAULS

PROMOTOR :

ing. Bart THEWISSEN

COPROMOTOR :

Dhr. Eugène BOSMANS

Bjorn Smeets

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



KU LEUVEN

Woord vooraf

Na 3 maanden als stagiair bij Epsilon Biotech te Zonhoven is het einde van de studie Industriële Ingenieurswetenschappen in de Biochemie in zicht. Tijdens mijn onderzoek naar het opzuiveren van Gc-globuline uit humaan serum en plasma, heb ik veel bijgeleerd op wetenschappelijk en persoonlijk vlak. Ik wil graag mijn dank betuigen aan de mensen die mij tijdens deze periode geholpen en gesteund hebben.

Eerst en vooral zou ik mijn externe promotors ing. Bart Thewissen en Eugene Bosmans willen bedanken. Ik bedank Bart voor alle hulp die hij mij heeft geboden tijdens het onderzoek en de gezellige werksfeer. Ik bedank Eugene voor alle kennis die hij mij heeft bijgebracht en de nuttige insteken die van groot belang waren tijdens het onderzoek.

Daarnaast zou ik mijn interne promotor ing. Liesbet Pauls willen bedanken voor het goed opvolgen van het onderzoekstraject. Ze stond letterlijk dag en nacht voor me klaar.

Ten slotte zou ik mijn medestudent Laurens Ignoul willen bedanken voor alle leuke gesprekken, de vriendelijkheid en de collegialiteit.

Inhoud

Tabellenlijst	7
Figurenlijst	9
Abstract.....	11
Abstract in English	13
1 Inleiding	15
1.1 Situering	15
1.2 Probleemstelling	16
1.3 Doelstellingen	17
1.4 Methode.....	17
2 Het vitamine D bindend proteïne	19
2.1 Vitamine D	19
2.2 Gc-globuline	21
2.2.1 Vitamine D transport	23
2.2.2 Vetzuurtransport.....	24
2.2.3 Chemotaxis	25
2.2.4 Actine scavenger systeem	25
2.2.5 GcMAF	26
2.3 Het Cohn-fractioneringsproces	27
2.3.1 IGF1.....	29
2.3.2 Transferrine	29
2.3.3 α 2-macroglobuline.....	29
2.3.4 α 1-antitrypsine	30
2.3.5 Proteïne C	30
3 Materiaal en methode	31
3.1 Staalbehandeling	31
3.2 Cohn-fractionering	31
3.3 Affiniteitschromatografie	31
3.4 Sandwich ELISA	33
3.5 Spectrofotometrie	35
3.6 Albumine antiserum turbidimetrie	36
3.7 SDS-PAGE.....	37
3.8 Gelfiltratiechromatografie.....	38
4 Resultaten & Discussie	41
4.1 De Cohn fractionering	41
4.2 Massa Gc-globuline in de Cohn-fracties	43

4.3	Massa albumine in de Cohn-fracties	46
4.4	Zuiverheid van de Cohn-fracties van serum en plasma	49
4.4.1	De massaverhouding van Gc-globuline ten opzichte van het totale eiwitgehalte 50	
4.4.2	De massaverhouding van albumine ten opzichte van het totale eiwitgehalte	51
4.5	Affiniteitschromatografie van fractie 2/3	52
4.6	SDS PAGE van de Cohn-fracties.....	54
4.7	Gelchromatografie van fractie 4-1	57
5	Conclusie	61
	Bibliografie	63
	Bijlagen.....	69

Tabellenlijst

Tabel 1: Verschillende Isovormen van Gc-globuline	22
Tabel 2: De eiwitinhoud per fractie van het Cohn-fractioneringsproces	29
Tabel 3: Overzicht van de verschillende volumes van supernatant en fracties van het Cohn-proces.....	41
Tabel 4: Overzicht van de verschillende gels	52
Tabel 5: Overzicht met de verschillende nummers en overeenkomende stalen.....	54
Tabel 6: Overzicht van de eiwitten in de eiwitladder met hun molecuulmassa's.....	55
Tabel 7: Overzicht van de gemiddelde molecuulmassa van de eiwitten in de Cohn-fracties ..	56
Tabel 8: Overzicht van de concentratie Gc-globuline van de verschillende fracties na gelfiltratie	59

Figurenlijst

Figuur 1: Isovormen Van Vitamine D, Vitamine D ₃ en Vitamine D ₂	19
Figuur 2: Vitamine D ₃ Synthese, Activatie en Katabolisme	20
Figuur 3: De Werking van de Genomische Functie van 1,25D ₃	21
Figuur 4: Aminozuursequentie van Gc-globuline, Verdeeld in 3 Domeinen: 1,2 en 3 met op Domein 1 de Vitamine D Bindingsplaats en Tussen Domein 2 en 3 de Actinebindingsplaats	22
Figuur 5: Verschillende werkingsmechanismen voor de opname van vitamine D in de cel met behulp van het vitamine D bindend proteïne, 25D = 25 hydroxy vitamine D (rode bolletje), DBP = Vitamine D bindend proteïne (blauwe ovaal), VDR = Vitamine D receptor, 1,25D = 1,25 dihydroxy vitamine D (groene bolletje) en de nucleus (lichtblauwe bol)	23
Figuur 6: Verschillende modellen voor vetzuurtransport	24
Figuur 7: Actine scavenger systeem en de werking van gelsoline, profiline, thymosine β ₄ en GC-Globuline (Gc-proteïn)	26
Figuur 8: Proteïne extractie van humaan bloedplasma volgens de Cohn-fractionering met de verschillende Cohn fracties	28
Figuur 9: Reactie van de Toyopearl tresylgel met calciferol of calcidiol als ligand	32
Figuur 10: Reactie van de Toyopearl epoxygel met calciferol of calcidiol als ligand.....	32
Figuur 11: De verschillende stappen en de werking van een sandwich ELISA	33
Figuur 12: De oxidatie en de vorming van het complex van TMB (blauw), de volledige oxidatie van TMB (geel).....	34
Figuur 13: Een voorbeeld van een vijfparameterberekening van het programma Workout 2.5 met op de x-as de concentratie en op de y-as de absorbantie.....	34
Figuur 14: De absorptiespectra van tyrosine (roze), tryptofaan (blauw), fenylalanine (groen) en runderserum albumine (rood)	35
Figuur 15: Het signaal bij te veel antiserum (links), een goede verhouding/albumine antiserum (midden) en te lage hoeveelheid antiserum (rechts)	36
Figuur 16: Verschillende stappen van SDS-page van staalbehandeling tot gel	37
Figuur 17: De vorm van de korrels bij gelfiltratie, met poriën en kanaaltjes, grote eiwitten (blauw), middelgrote eiwitten (rood) en kleine eiwitten (groen)	38
Figuur 18: Opstelling van de gelchromatografie.....	39
Figuur 19: Foto van de neerslag in een conische centrifugeerbuis (links) en de zichtbare vetvlokken (rechts).....	41
Figuur 20: Absorbantie in functie van verdunning voor de verschillende Cohn-fracties.....	43
Figuur 21: Absorbantie in functie van verdunning bij de verschillende Cohn-fracties.....	44
Figuur 22: De massa Gc-globuline voor alle fracties van de Cohn-fractionering.....	45
Figuur 23: Absorbantie in functie van concentratie bij het zoeken van het lineair gebied voor albumine in serumpool met antiserum turbidimetrie.....	46
Figuur 24: Absorbantie in functie van concentratie bij het zoeken van het lineair gebied voor albumine in serumpool bij antiserum turbidimetrie.....	47
Figuur 25: Absorbantie in functie van tijd van albumine uit serumpool bij antiserum turbidimetrie bij het zoeken van de incubatietijd.....	47
Figuur 26: Absorbantie in functie van concentratie bij het gelijkstellen van serumpool met het gekende staal	48
Figuur 27: Massa albumine in alle Cohn-fracties berekend met sELISA	48
Figuur 28: Totale eiwitmassa in de verschillende Cohn-fracties berekend met antiserum turbidimetrie	49
Figuur 29: Zuiverheid van Gc-globuline uitgedrukt in mg Gc-globuline per g eiwit	50
Figuur 30: Zuiverheid van albumine uitgedrukt in mg albumine per g eiwit	51
Figuur 31: Massaverhouding van Gc-globuline ten opzichte van he totale eiwitgehalte na affiniteitschromatografie voor de verschillende gels.....	53
Figuur 32: Foto van de verschillende polyacrylamidegels	54
Figuur 33: R _f in functie van log(M _r) als ijklijn voor de molecuulmassa's van de eiwitmerker	55

Figuur 34: Absorbantie in functie van retentietijd bij het kalibreren van de kolom.....	57
Figuur 35: De retentietijd in functie van het logaritme van de molecuulmassa.....	58
Figuur 36: Absorbantie in functie van fractienummer bij gelfiltratie	59

Abstract

Epsilon Biotech in Zonhoven is een biotechnologisch bedrijf dat momenteel onderzoek doet naar het opzuiveren van Gc-globuline uit humaan plasma voor therapeutische toepassingen. Epsilon Biotech merkte op dat Gc-globuline zich in fractie 4-1 van de Cohn-fractionering bevindt die tot op heden niet wordt gebruikt. In dit onderzoek werd een methode opgesteld om de Cohn-fractionering te reconstrueren. Daarnaast werd een procedure opgesteld om Gc-globuline op te zuiveren uit de Cohn-fracties.

De opzuivering van Gc-globuline werd gehinderd door de aanwezigheid van andere serumproteïnen zoals fibrinogeen en albumine. Door gebruik te maken van gelfiltratie met een Sephadex kolom kon de scheiding tussen Gc-globuline en albumine niet verwezenlijkt worden. Dit onderzoek beoogde het efficiënt opzuiveren van Gc-globuline uit storende serumproteïnen. Via de Cohn-fractionering werden de serumeiwitten opgedeeld in verschillende fracties. De concentratie Gc-globuline werd bepaald in de verschillende fracties. Affiniteitschromatografie met een epoxygel werd uitgevoerd op de fractie met de hoogste concentratie Gc-globuline. Na de affiniteitschromatografie werden de concentraties aan Gc-globuline, eiwit en albumine in de bekomen fracties bepaald met respectievelijk ELISA, spectrofotometrie en antiserum turbidimetrie.

Er werd een zuiverheid behaald van 7,94mg/g in serum en 8,85mg/g in plasma via de Cohn-fractionering. Na affiniteitschromatografie werd er een zuiverheid van 17,3mg/g bekomen. De zuiverheid is hiermee met factor 4,4 gestegen.

Abstract in English

Epsilon Biotech in Zonhoven is a biotechnological company that is currently researching the purification of Gc-globulin from human plasma for therapeutical applications. Epsilon Biotech noticed that fraction 4-1 from the Cohn-fractionation contains Gc-globulin. This research contains a method to reproduce the Cohn-fractionation. In addition, a procedure was developed to purify Gc-globulin from the Cohn-fractions of serum.

The purification of Gc-globulin was impeded by the presence of other serum proteins like fibrinogen and albumin. The separation of Gc-globulin and albumin could not be realised by using gel filtration with a Sephadex column. This research targeted the efficient separation of Gc-globulin and other impeding serum proteins. By using conventional Cohn-fractionation resulting in five fractions, serum proteins were separated with major Gc-globulin concentration in fraction 4-1. Vitamin D-affinity chromatography was carried out on the fraction containing high Gc-globulin concentration. Gc-globulin, total protein and albumin were quantified using ELISA, spectrophotometry and antibody turbidimetry respectively.

A Gc-globulin-purity of 7,94 mg/g in serum and 8,85 mg/g in plasma was accomplished by using the Cohn-fractionation. Using affinity chromatography, a purity of 17,3 mg/g was accomplished. Using this process, the Gc-globulin purity could be increased 4,4 fold.

1 Inleiding

1.1 Situering

Epsilon Biotech is een bedrijf in Zonhoven dat zich specialiseert in onderzoek voor andere bedrijven en instellingen. Momenteel wordt er vooral onderzoek gedaan naar GcMAF, een macrofaagactiverende factor die gevormd wordt uit *group specific component* globuline (Gc-globuline).

Gc-globuline oftewel het vitamine D bindend proteïne is een serumproteïne dat zich in het menselijk bloed bevindt. Het wordt hoofdzakelijk aangemaakt door levercellen, maar andere cellen zoals niercellen hebben een secundaire productie [1].

Gc-globuline bestaat uit 458 aminozuren en bevat op aminozuur 420 threonine een suikerderivaatketen die bestaat uit galactose-siaalzuur-galactose-N-Acetyl. Deze suikerketen kan gedeglycoliseerd worden door de enzymen β -galactosidase van B-lymfocyten en sialidase van T-lymfocyten. Hierbij wordt galactose en siaalzuur afgesplitst en ontstaat de group specific component macrofaag activerende factor (GcMAF). Uit studies blijkt dat GcMAF ook een rol speelt in osteoclastactivatie en angiogenese [2].

Gc-globuline omvat meerdere functies. Het staat ten eerste in voor het transport van vitamine D metabolieten. Er bestaat een grote affiniteit tussen het vitamine D metaboliet 25-hydroxyvitamine D en Gc-globuline. Dit is dan ook het metaboliet dat het meest is gebonden aan Gc-globuline. Slechts 10% van de totale Gc-globuline concentratie in serum beoefent deze functie. Het grootste aandeel van Gc-globuline doet mee aan het *actine scavenger* systeem [3]. Beschadigde cellen geven hun intracellulair actine vrij in de bloedbaan. Filamenteer actine kan dan zorgen voor verstopping van bloedvaten. Gelsoline, ook een eiwit in het menselijk bloed bindt en zorgt voor een conformatieverandering in de filamenten waardoor globulair actine wordt afgesplitst [4]. Gc-globuline bindt dan aan het monomere globulair actine en voorkomt zo polymerisatie en filamentvorming. Daarnaast speelt Gc-globuline ook een rol in de chemotactische activiteit van het anafylatoxine C5a, het transport van vetzuren en macrofaagactivatie [5].

Bij tumorcellen in kankerpatiënten wordt het enzym α -N-acetylgalactosaminidase (NaGalase) gevormd. Het zorgt voor een splitsing van de O-glycosidische binding tussen alfa-N-acetylgalactosamine en de zijketen van serine of threonine. Bij Gc-globuline komt deze binding ook voor en nagalase werkt bijgevolg ook hierop in volgens de literatuur. Het zorgt ervoor dat de galactose-N-Acetyl suikerketen wordt afgesplitst. Zo wordt GcMAF vorming verhinderd wat leidt tot een verzwakt immuunsysteem [6]. Dit reactiemechanisme wordt echter tegengesproken in het eindwerk van mijn medestudent [7].

Angiogenese of bloedvatvorming is typerend voor tumorweefsel en vormt een gevaar bij het operatief verwijderen. Bij het toedienen van GcMAF aan kankerpatiënten werd een vermindering van angiogenese vastgesteld in tumorweefsel, waardoor operaties vergemakkelijkt worden. GcMAF kan dus een gunstig therapeutisch middel zijn [8].

1.2 Probleemstelling

GcMAF bevindt zich in zeer lage concentraties in humaan serum omdat Gc-globuline eerst moet worden omgezet met de nodige enzymen: β -galactosidase en sialidase. Deze enzymen komen enkel vrij wanneer macrofagen geactiveerd moeten worden als een eerste lijndefensie in het immuunsysteem. Gc-globuline komt daarentegen wel voor in humaan serum en kan na ex vivo conversie tot GcMAF dienen als therapeutisch middel. Het GcMAF moet zeer zuiver alvorens het als therapeutisch middel kan fungeren.

Het scheiden van Gc-globuline van albumine uit serum en daarna isoleren van Gc-globuline uit de bekomen fractie is echter minder gemakkelijk. Momenteel bestaat er nog geen vereenvoudigde methode voor het extraheren van Gc-globuline uit serum. Daarnaast bevat het serum veel andere proteïnen wat de extractie van één proteïne bemoeilijkt. Eén van de eiwitten die de extractie van Gc-globuline bemoeilijkt, is albumine. Albumine komt in grote overmaat voor in het humaan serum (35 tot 55 g/L) terwijl Gc-globuline slechts een concentratie heeft van 300 tot 600 mg/L.

Albumine is net zoals Gc-globuline een serumewit en speelt een rol in de regulering van de osmotische druk en vetzuurtransport. Gc-globuline en albumine behoren tot de albumine-superfamilie. De structuren van beide proteïnen zijn bijgevolg gelijkaardig wat het moeilijker maakt om ze elk apart te bestuderen in dezelfde oplossing [9].

Humaan serum bevat nog andere therapeutische proteïnen zoals immunoglobuline A, M, G en een belangrijke fractie stollingsfactoren [10]. Om deze proteïnen effectief uit het serum/plasma te isoleren werd een methode ontwikkeld op basis van ethanolprecipitatie, namelijk het Cohn-fractioneringsproces. Het proces gaat ervan uit dat de eiwitten in serum/plasma hun isoëlektrisch punt bereiken bij verschillende pH-waarden, temperaturen en ethanolconcentraties. Bij deze verschillende waarden precipiteren enkele eiwitten en kan er steeds een fractie afgescheiden worden via centrifugatie. Zo ontstaan er fracties van 1 tot en met 5 met allemaal verschillende proteïne-inhoud waarbij fractie 4 wordt opgedeeld in fractie 4-1 en 4-4. Het Cohn proces zorgt ervoor dat Gc-globuline en albumine van elkaar gescheiden worden in respectievelijk fractie 4-1 en supernatant 4-1. Voor de verdere isolatie van Gc-globuline uit Cohn fractie 4-1 moet een gemakkelijke economisch rendabele methode ontwikkeld worden.

Momenteel wordt Cohn-fractie 4-1 niet verder gebruikt. Het wordt gestockeerd, maar wordt gezien als afvalproduct. Het zou economisch interessant zijn om deze fractie te kunnen valoriseren door therapeutische eiwitten hieruit te extraheren. Dat was ook de oorspronkelijke bedoeling van dit eindwerk, maar door regulatorische wetgeving omtrent donormateriaal (plasmadonatie) kon de waardeloze Cohn-fractie 4-1 niet beschikbaar gemaakt worden voor onderzoek.

Cohn-fractie 4-1 bevat naast Gc-globuline onder andere transferrine, insuline like growth factor 1 (IGF1), α_2 macroglobuline (α_2 M), α_1 antitrypsine (AAT) en proteïne C. Indien in dit onderzoeksproject de zuivering van Gc-globuline economisch rendabel en technisch succesvol verloopt, is de start gemaakt om methodes te ontwikkelen om andere therapeutische eiwitten uit Cohn-fractie 4-1 te extraheren. [11] [12] [13] [14] [15]

1.3 Doelstellingen

Het is de bedoeling dat er een zo efficiënt mogelijk scheiding ontstaat van Gc-globuline uit humaan plasma en serum. De efficiëntie van de isolatiestap en de zuiverheid moet zo hoog mogelijk zijn.

Er wordt getracht om een methode te ontwikkelen voor het isoleren van Gc-globuline uit humaan plasma. Hiervoor wordt in eerste instantie gebruik gemaakt van het Cohn-fractioneringsproces voor het afzonderen van albumine. De Cohn-methode moet eerst getest en geoptimaliseerd worden voor Gc-globuline. Een goede optimalisatie houdt in dat Cohn-fractie 4-1 zo veel mogelijk Gc-globuline bevat en zo weinig mogelijk albumine.

Daarna wordt Cohn-fractie 4-1 onderworpen aan een epoxy- of tresylgel die gecoat is met een vitamine D-metaboliet. Het coaten van de kolom is een ander onderzoek en wordt uitgevoerd door de bachelorstudenten van 3ABA FIIW Chemie.

Een alternatief bestaat uit het verdergaan op de masterproef van Naomi Bongaerts waarin gebruikt wordt gemaakt van een gelfiltratie/chromatografiekolom [16]. Zij ondervond moeilijkheden bij de isolatie van Gc-globuline uit serum door de aanwezigheid van albumine. Dit obstakel wordt vermeden door Cohn-fractie 4-1 te gebruiken. Ook hier moet gestreefd worden naar een zo hoog mogelijke zuiverheid van Gc-globuline.

1.4 Methode

Vooraleer de scheiding van Gc-globuline kan gerealiseerd worden, moet albumine worden verwijderd. Dit wordt gedaan met behulp van het Cohn-fractioneringsproces. Epsilon Biotech heeft veel gecitreeerd plasma in stock. Dit wordt gebruikt als startoplossing. Het plasma wordt onderworpen aan een bepaalde temperatuur, ethanolconcentratie en pH-waarde. Daarna moet het mengsel rusten. Via centrifugatie wordt het precipitaat gescheiden van het supernatans. Bij elke zuiveringsstap wordt verder gewerkt met het supernatans. Deze stappen leveren verschillende fracties. De beoogde fractie is fractie 4-1. Na deze fractie wordt het proces dan ook niet verdergezet.

Na het Cohn-fractioneringsproces moet gecontroleerd worden of fractie 4-1 wel Gc-globuline bevat en of albumine afwezig is. Gc-globuline kan aangetoond worden met behulp van een Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) met het anti-Gc-globuline antibody. Albumine kan aangetoond worden met behulp van een turbidimetrische techniek. Hierbij wordt de Albumin AUT KIT gebruikt van Aptec Diagnostics. De controles op Gc-globuline en albumine worden uitgevoerd op alle supernatans-fracties alsook op alle precipitaat-fracties. Hierdoor kan men nagaan tijdens welke stap albumine is verwijderd en/of Gc-globuline nog aanwezig was.

Als Gc-globuline goed gescheiden is van albumine kan er overgegaan worden naar de isolatie uit Cohn-fractie 4-1. Er zijn twee methodes die gebruikt kunnen worden namelijk een vitamine D-affiniteitskolom en gelfiltratie/affiniteitschromatografie. De vitamine D-kolom wordt ontwikkeld doorheen het semester. Het is een nieuwe kolom waarvoor de elutieparameters nog moeten worden bepaald zoals verdunning, eluens en flowsnelheid. Van de tweede methode, namelijk de affiniteitschromatografie, zijn al enkele parameters gekend [16]. Hierbij moet enkel getest worden welke verdunning van Gc-globuline op de kolom moet worden gebracht.

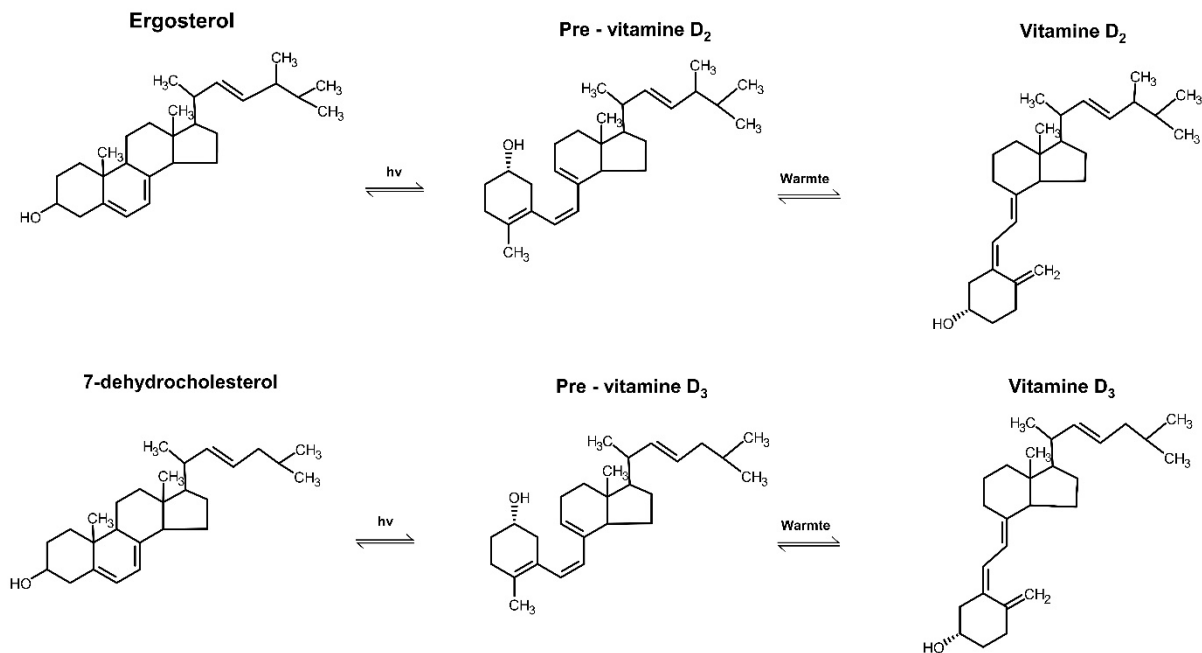
Na het scheiden van Gc-globuline uit fractie 4-1 wordt de zuiverheid gecontroleerd behulp van ELISA en spectrofotometrie. Door middel van de ELISA met het anti-Gc-globuline antibody kan de concentratie aan Gc-globuline achterhaald worden.

2 Het vitamine D bindend proteïne

2.1 Vitamine D

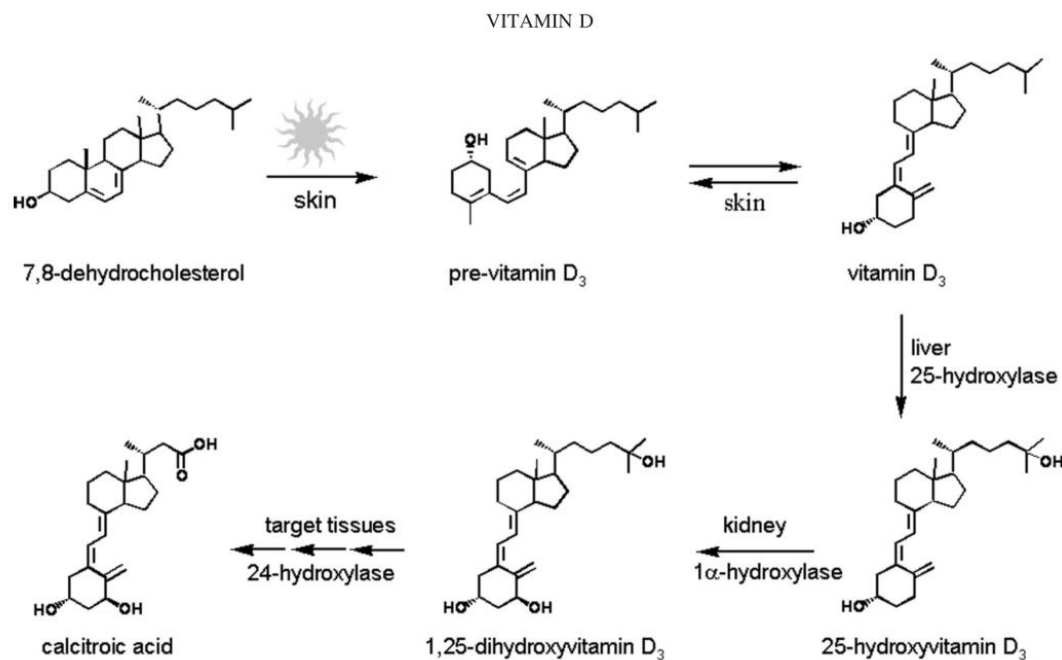
Vitamine D is een essentiële voorloper van het hormoon 1,25 dihydroxyvitamine D en behoort tot de familie van de steroïde hormonen. Vitamine D tekort wordt gelinkt aan kanker, auto-immuunziekten en hoge bloeddruk [17]. Voorbeelden hiervan zijn auto-immune schildklierontsteking [18] en prostaatkanker [19]. Het wordt gevormd in het lichaam na blootstelling van de huid aan de zon of door de inname van voeding of supplementen die cholecalciferol of ergocalciferol bevatten [20].

Wanneer men spreekt over vitamine D kunnen er twee relevante isovormen gedifferentieerd worden namelijk vitamine D₂ en D₃. Het verschil bevindt zich op de zijgroep op koolstofnummer vierentwintig. Vitamine D₂ bevat een methylgroep terwijl vitamine D₃ deze niet heeft. Daarnaast heeft vitamine D₂ ook een dubbele binding tussen C22 en C23. Vitamine D₃ wordt gevormd uit 7-dehydrocholesterol dat voorkomt in dierlijke producten en komt ook meer dan vitamine D₂ voor in het menselijk lichaam [21]. Vitamine D₂ wordt gevormd uit ergosterol dat vooral aanwezig is in plantaardige producten [22] (Figuur 1).



Figuur 1: Isovormen Van Vitamine D. Vitamine D₃ en Vitamine D₂ [23]

Vitamine D kan dus opgenomen worden in het menselijk lichaam via voeding, maar het grootste deel wordt aangemaakt met behulp van zonlicht. Blootstellen van de huid aan UV-B stralen met een golflengte van 290 tot 315 nm uit zonlicht induceert de fotolytische conversie van 7-dehydrocholesterol naar pre-vitamine D₃ [24] gevolgd door thermische isomerisatie naar de stabielere vorm vitamine D₃. Vitamine D₃ wordt vervoerd naar de lever. Daar wordt het omgezet naar 25-hydroxyvitamine D₃ (25D₃) door het cytochroom P450 enzyme 27A1 (CYP27A1) [17]. De laatste activatiestap gebeurt grotendeels in de nieren waar 1,25 dihydroxyvitamine D₃ (1,25D₃) wordt gevormd door het 1 α -hydroxylase enzym CYP27B1. Uiteindelijk wordt het katabolisme afgesloten in het bestemde weefsel waar een 24-hydroxylase het eindproduct calcitriol vormt als afvalproduct (Figuur 2).

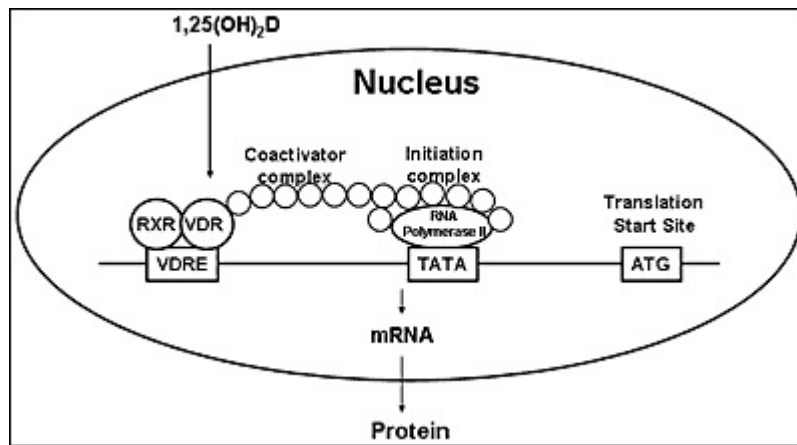


Figuur 2: Vitamine D₃ Synthese, Activatie en Katabolisme [17]

25D₃ is de meest voorkomende vorm in de bloedcirculatie. Vitamine D waarden in het menselijk lichaam worden dan ook achterhaald met behulp van deze vorm [20]. Na omzetting wordt de hormonaal actieve vorm 1,25D₃ bekomen. Het enzym dat verantwoordelijk is voor de omzetting van de 1 α -hydroxylatie in de nieren is CYP27B1. Dit enzym wordt geïnduceerd door het parathyreoïd hormoon (PTH), hypocalcemie en hypofosfatemie [25]. Aan de andere kant onderdrukken fibroblast growth factor 23 (FGF23), hypercalcemie en hyperfosfatemie CYP27B1 [26]. FGF23 en 1,25D₃ zijn ook verantwoordelijk voor de inductie van het enzym CYP24A1 dat op zijn beurt instaat voor de omzetting van 1,25D₃ naar calcitroïsch zuur.

Een belangrijke functie van 1,25D₃ is het reguleren van absorptie en transport van essentiële mineralen zoals calcium, fosfor en magnesium, die belangrijk zijn in het onderhoud van botweefsel. Daarbuiten staat het ook centraal in enkele cellulaire functies zoals groei, differentiatie en apoptose [27].

1,25D₃ treedt de cel binnen en bindt met de vitamine D receptor (VDR) die gelegen is op de nucleus van de cel. VDR is een transcriptiefactor en familie van de steroïde hormoon nucleaire receptoren. Het bindend gedeelte bestaat uit 12 helices. Wanneer het ligand wordt gebonden, vormt er zich het complex 1,25D₃-VDR. Het complex interageert met de nucleaire retinoïdezuur X receptor (RXR). Hierdoor verhoogt de affiniteit voor het vitamine D responsief element (VDRE), een sequentie van nucleotiden in de promotor regio. Het binden van het VDR/RXR complex trekt proteïnen aan die dienen als co-activators. De co-activators vormen een brug tussen het VDRE en RNA polymerase II en andere proteïnen in het transcriptie-initiatiegebied die zich bevinden rond de Goldberg-Hogness-box, ook een sequentie in de promotor regio die een functie heeft in de eerste stappen van de transcriptie. De steroïde receptor co-activators zorgen ervoor dat histon acetyl transferases (HAT) worden aangetrokken naar het gen waardoor de genstructuur beschikbaar wordt voor transcriptie [23].



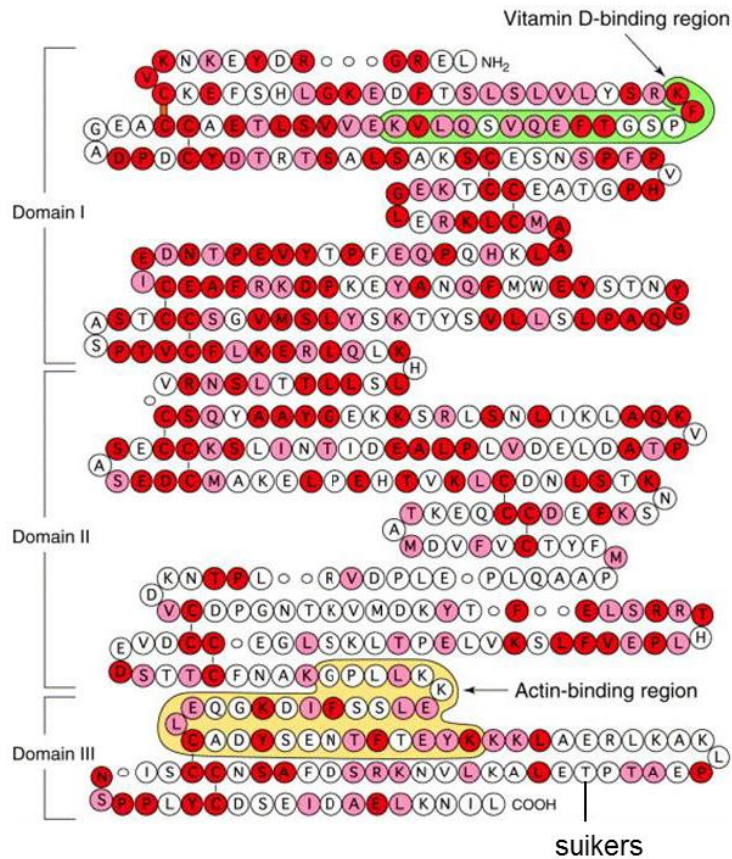
Figuur 3: De Werking van de Genomische Functie van 1,25D₃ [23]

Op deze manier kunnen verschillende eiwitten geproduceerd worden met behulp van 1,25D₃. Bij enterocyten in de darmen zorgt 1,25D₃ voor de expressie van transiënt receptor potentieel kation kanaal (TRPV6) en plasma membraan Ca²⁺ ATP-ase (PMCA). Deze factoren reguleren de opname van Ca²⁺ en fosfaten in de dunne darm [28].

2.2 Gc-globuline

De vitamine D en zijn metabolieten moeten dus opgeslagen worden en verder worden vervoerd doorheen het lichaam de diverse transformatiesites. Daarvoor is een bijzonder proteïne nodig namelijk Gc-globuline oftewel vitamine D bindend proteïne genoemd. Gc-globuline is een polymorf transport-/opslageiwit in het bloed met een concentratie tussen 300 en 600 mg per liter. Het is verantwoordelijk voor meerdere functies waaronder het binden en transporteren van vitamine D metabolieten, het binden en afzonderen van globulair actine, het binden van vetzuren en functies bij inflammatoire reacties in het immuunsysteem [3]. Gc-globuline wordt vooral aangemaakt in de lever en in mindere mate in andere organen zoals de nieren, testes en abdominaal vetweefsel [1].

Het humaan Gc-globuline mRNA bevat 1690 nucleotiden en beschrijft een sequentie van 458 aminozuren [29]. Serum Gc-globuline is een polymorf, monomeer serum α -globuline met een molecuulmassa van ongeveer 58 kDa [30]. Het bevat 28 cysteïne residu's waardoor een secundaire structuur gekenmerkt wordt door middel van disulfidebruggen. Door deze tertiaire structuur wordt het eiwit in drie interne domeinen verdeeld die bestaan uit α -helices [31]. Het eerste domein bevat de aminozuursequentie die bindt aan vitamine D₃ liganden. Het bestaat uit 1-6 helices met aan de N-terminus een spleet op het oppervlak die dient als bindingsplaats voor de vitamine D receptor [32] [33]. Tussen aminozuur 373 en 403 bevindt zich de bindingsplaats voor actine verdeeld over domein 2 en 3. Op aminozuur 420 threonine bevindt zich een suikerboom die immunologische toepassingen heeft die later worden besproken. Aminozuursequentie van Gc-globuline, Verdeeld in 3 Domeinen: 1,2 en 3 met op Domein 1 de Vitamine D Bindingsplaats en Tussen Domein 2 en 3 de Actinebindingsplaats (Figuur 4).



Figuur 4: Aminozuursequentie van Gc-globuline, Verdeeld in 3 Domeinen: 1,2 en 3 met op Domein 1 de Vitamine D Bindingsplaats en Tussen Domein 2 en 3 de Actinebindingsplaats [34]

Het gen dat codeert voor de expressie van Gc-Globuline bevindt zich op chromosoom 4q11-q13 [35]. Deze locatie overlapt met de genlocatie van albumine wat wijst op een homologe structuur van Gc-globuline met albumine.

Gc-globuline bestaat uit drie codominante isovormen namelijk Gc1s, Gc1f en Gc2, maar er zijn meer dan 120 varianten gevonden. De isovormen verschillen op basis van aminozuursubstituties en glycolisatie patronen [36]. De aminozuursequentie verschilt op plaatsen 416 en 420. Gc1f bevat hier respectievelijk asparaginezuur en threonine terwijl Gc1s hier glutaminezuur en threonine bevat. Gc2 bevat op deze plaatsen dan weer asparaginezuur en lysine [37]. Aan de andere kant bestaat er ook een verschil in glycolisatie. Gc1f en Gc1s bevatten glycolisaties op plaatsen 418 en 420 terwijl Gc2 deze enkel op plaats 418 heeft [38].

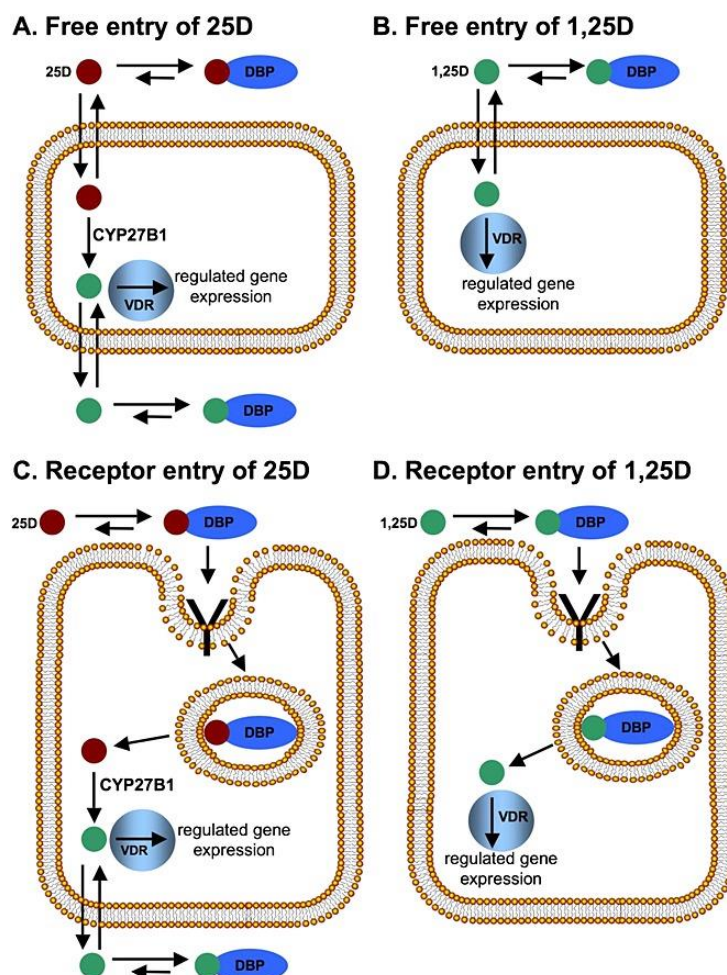
Tabel 1: Verschillende Isovormen van Gc-globuline [34]

Gc type	Gc1F	Gc1S	Gc2
Oligosacharide	<p>418 of 420</p> <p>Gal - GalNac SA</p>	<p>418 of 420</p> <p>Gal - GalNac α-Man</p>	<p>420</p> <p>Gal - GalNac</p>

2.2.1 Vitamine D transport

Het voornaamste proteïne dat instaat voor het transport van $25D_3$ is het Gc-globuline zoals blijkt uit de naam. Het vervoert meer dan 95% van het aanwezige $25D_3$. Albumine en lipoproteïnen vervoeren slechts een kleine fractie terwijl er hier grotere hoeveelheden van voorkomen in serum. Dit wijst dus op een hoge affiniteit van $25D_3$ voor Gc-globuline.

Gc-globuline moet er dus ook voor zorgen dat $25D_3$ beschikbaar wordt voor weefsel. In dit weefsel zorgt het CYP27B1 enzym dan voor de omzetting naar de hormonaal actieve vorm $1,25D_3$. De precieze werking van dit mechanisme is nog niet duidelijk, maar er zijn enkele theorieën opgesteld. Een eerste theorie omvat de opname van $25D_3$ door vrije liganden die zich op het celmembraan bevinden (Figuur 5 A). $25D_3$ wordt hierbij afgegeven door Gc-globuline aan de extracellulaire zijde van het celmembraan en wordt getransporteerd doorheen het celmembraan. In de cel gebeurt dan de omzetting naar $1,25D_3$ door CYP27B1 waarna het zijn genregulerende functies kan beoefenen. Een tweede model gaat er van uit dat $1,25D_3$ als endocrien hormoon wordt opgenomen en dan direct inwerkt op het VDR (Figuur 5 B). Daarnaast kan vitamine D ook opgenomen worden gebonden aan het Gc-globuline. $25D_3$ of $1,25D_3$ gebonden aan Gc-globuline treedt dan de cel binnen. In de cel ondergaat Gc-globuline transformatieveranderingen waardoor het vitamine D metaboliet wordt vrijgesteld (Figuur 5 C & D).



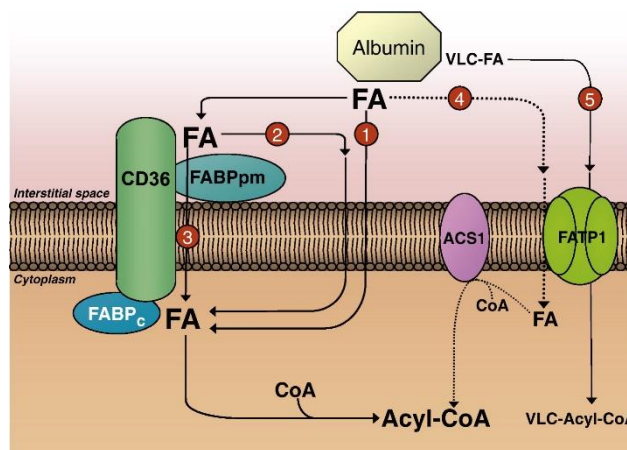
Figuur 5: Verschillende werkingmechanismen voor de opname van vitamine D in de cel met behulp van het vitamine D bindend proteïne, $25D$ = 25 hydroxy vitamine D (rode bolletje), DBP = Vitamine D bindend proteïne (blauwe ovaal), VDR = Vitamine D receptor, $1,25D$ = 1,25 dihydroxy vitamine D (groene bolletje) en de nucleus (lichtblauwe bol) [37]

2.2.2 Vetzuurtransport

Omdat Gc-globuline deel uitmaakt van de albumine superfamilie, speelt het ook een rol in het transport van vetzuren [9]. Het eiwit dat de meeste vetzuren transporteert is echter albumine. Het grote verschil tussen Gc-globuline en albumine is de affiniteit voor vetzuren. Albumine heeft meerdere bindingsplaatsen voor vetzuren zowel met hoge en lage affiniteit, terwijl Gc-globuline slechts één vetzuurbindingsplaats heeft met hoge affiniteit [39]. Hierdoor speelt Gc-globuline slechts een kleine rol in het vetzuurtransport.

De oplosbaarheid van vetzuren met lange ketens in waterige oplossingen is zeer laag [40]. Vetten worden gekenmerkt door hun hydrofoob karakter waardoor het transport in het bloed wordt gehinderd. Vet bindende proteïnen zoals albumine zijn wel oplosbaar in het bloedplasma en binden met vetten. Hierdoor verandert het hydrofoob karakter van het vet naar het hydrofoob karakter van het bindend proteïne [41]. Tevens zorgen deze proteïnen ervoor dat het transport naar en buiten de cel gereguleerd wordt. Zonder regulatie zou de opname van vetzuren enkel afhangen van diffusie en niet van de behoeften van de cel. Via proteïnen zoals albumine en Gc-globuline is de vetzuuropname afhankelijk van de regulatie van de eiwitexpressie.

De precieze werking van de opname van vetzuren van de cel is nog niet gespecificeerd. Er zijn wel enkele modellen opgesteld die de werking voorstellen: (Figuur 6 1) transport op basis van hydrofobe gedrag van vetzuren via diffusie; (Figuur 6 2) CD36 werkt als acceptor op het celoppervlak (met of zonder fatty acid binding protein (FABP)) waardoor de concentratie aan vetzuren gelokaliseerd wordt en zo diffusiemechanismen in gang zet; (Figuur 6 3) CD36 zorgt voor actief transport over het celmembraan, binnen het celmembraan wordt de vetzuurketen gebonden aan FABP; (Figuur 6 4) Vetzuren worden overgebracht via transporteiwitten waarna direct de vetzuurverwerking met acyl-CoA synthetase wordt opgestart; (Figuur 6 5) Vetzuren met zeer lange ketens worden opgenomen door vetzuurtransporters. Door de activiteit van deze transporters worden de vetzuren omgezet in acyl-CoA esters die dan deel uit kunnen maken van het vetzuurmetabolisme.



Figuur 6: Verschillende modellen voor vetzuurtransport [42]

2.2.3 Chemotaxis

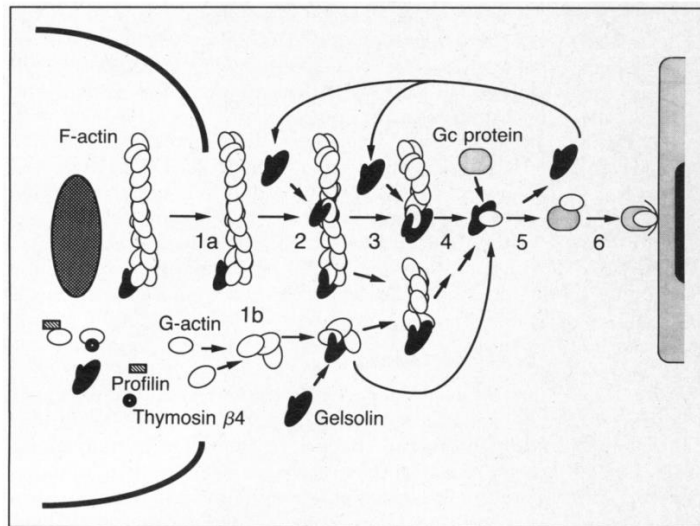
Het aantrekken van neutrofielen naar een inflammatoire omgeving wordt gereguleerd door chemotaxis. Deze aantrekking van cellen hangt af van enkele inhiberende en versterkende factoren. Gc-globuline is één van deze factoren en speelt een rol in de complement-gemedieerde aantrekking van het anafylatoxine C5a [43]. Gc-globuline heeft geen enzymatische activiteit [44] en er is dus een bindingsplaats nodig op de cel. Na de productie van C5a in het complement systeem, bindt Gc-globuline met C5a of de geïnactiveerde vorm C5a des Arg. Gc-globuline bevat een C5a/C5a des Arg bindende regio tussen aminozuur 126 en 175 [45]. Gc-globuline clustert samen met cluster of differentiation 44 (CD44) en annexine A2 receptoren op het celmembraan van neutrofielen. Deze twee receptoren reguleren de pathways die de C5a gemedieerde chemotaxis verbeteren [46]. CD44 en annexine A2 receptoren komen voor op de meerderheid van de cellen. Hierdoor worden deze cellen beïnvloed worden door Gc-globuline wanneer C5a wordt geproduceerd [47].

2.2.4 Actine scavenger systeem

Actinen zijn proteïnen die deel uitmaken van het cytoskelet van de cel en kunnen onderverdeeld worden in globulair actine (G-actine) en filamentair actine (F-actine). Ze zijn betrokken bij de beweeglijkheid en vormgeving van de cel. De intracellulaire actinen worden vrijgelaten in de systemische circulatie wanneer het celmembraan gebroken wordt door beschadiging van weefsel. Er kunnen dan lange filamenten gevormd worden in het bloedplasma, gevormd uit actine en coagulatie factor Va. Onder deze omstandigheden treedt intravasculaire coagulatie op. Het is dus essentieel dat er een actine scavenging systeem bestaat in de bloedvaten. Dit systeem wordt gereguleerd door meerdere proteïnen namelijk thymosine β_4 , profiline, Gc-globuline en gelsoline [5].

Gelsoline is een cytoplasmatisch eiwit dat actinefilamenten depolymeriseert. Het is familie van actinesplitsende proteïnen waaronder villine, fragmine en severine. Gesecreteerd gelsoline bevat 25 aminozuren meer en heeft een molecuulmassa van 83 kDa. Het komt voor in bloedplasma met een concentratie van 190 tot 300 milligram per liter. Gelsoline heeft 3 specifieke actinebindingsplaatsen [48]. Het bindt met het uiteinde van F-actine waardoor er geen monomeer actine additie meer kan gebeuren. Het bindt ook in het midden van de F-actine filamenten en zorgt voor conformatieveranderingen. Hierdoor wordt er G-actine afgesplitst van de filamenten [4]. Gelsoline alleen zou moeilijk voor het wegruimen van actinen kunnen zorgen aangezien het al snel verzadigd zou zijn door G-actinen. Daarom speelt Gc-globuline ook een belangrijke rol.

Gc-globuline, thymosine β_4 of profiline binden niet-covalent met G-actine. Verschillend met gelsoline, kunnen ze enkel binden met het monomere G-actine. De affiniteit van Gc-globuline, thymosine β_4 of profiline voor G-actine is groter dan de affiniteit van gelsoline voor G-actine. Hierdoor gaat de actine-gelsoline binding bijvoorbeeld over naar een actine-Gc-globuline binding en kan gelsoline terug een actine filament binden en splitsen (Figuur 7). Het Gc-globuline-actine complex wordt door de lever verwijderd uit de circulatie [49].



Figuur 7: Actine scavenger systeem en de werking van gelsoline, profiline, thymosine β 4 en GC-Globuline (Gc-proteïne) [48]

2.2.5 GcMAF

Misschien één van de belangrijkste functies van Gc-globuline is het vormen van het Gc-globuline macrofaag activerende factor (Gc-MAF). GcMAF werkt in op macrofagen die als eerstelijnsdefensie werken in het immuunsysteem. Op aminozuur 420, threonine, bevindt zich een suikerboom bestaande uit galactose-siaalzuur-galactose-N-Acetyl. Na deglycolylatie van het eindstandig galactose en siaalzuur door respectievelijk β -galactosidase en sialidase, wordt de vitamine D bindend macrofaag activerende factor gevormd (Gc-MAF). B-lymfocyten reguleren β -galactosidase productie en T-lymfocyten sialidase productie. De verschillende Gc-globuline isovormen beïnvloeden de vorming van Gc-MAF aangezien ze verschillen in aminozuursequentie (16).

α -N-acetylgalactosaminidase (Nagalase) is een glycoside-hydrolase dat voorkomt in onder andere het menselijk bloed [6]. Nagalase wordt gecodeerd door het gen op het chromosoom 22q13 \rightarrow qter [50]. Het heeft een moleculair gewicht van ongeveer 46 kDa en is vrij homolog met het menselijk α -galactosidase A [51]. Het hydrolyseert de O-glycosidische binding tussen de eindstandige alfa-N-acetylgalactosamine helft van serine of threonine [52]. Door deze hydrolyse uit te voeren op de N-acetylgalactosamine groep van Gc-globuline kan de vorming van Gc-MAF verhinderd worden.

2.3 Het Cohn-fractioneringsproces

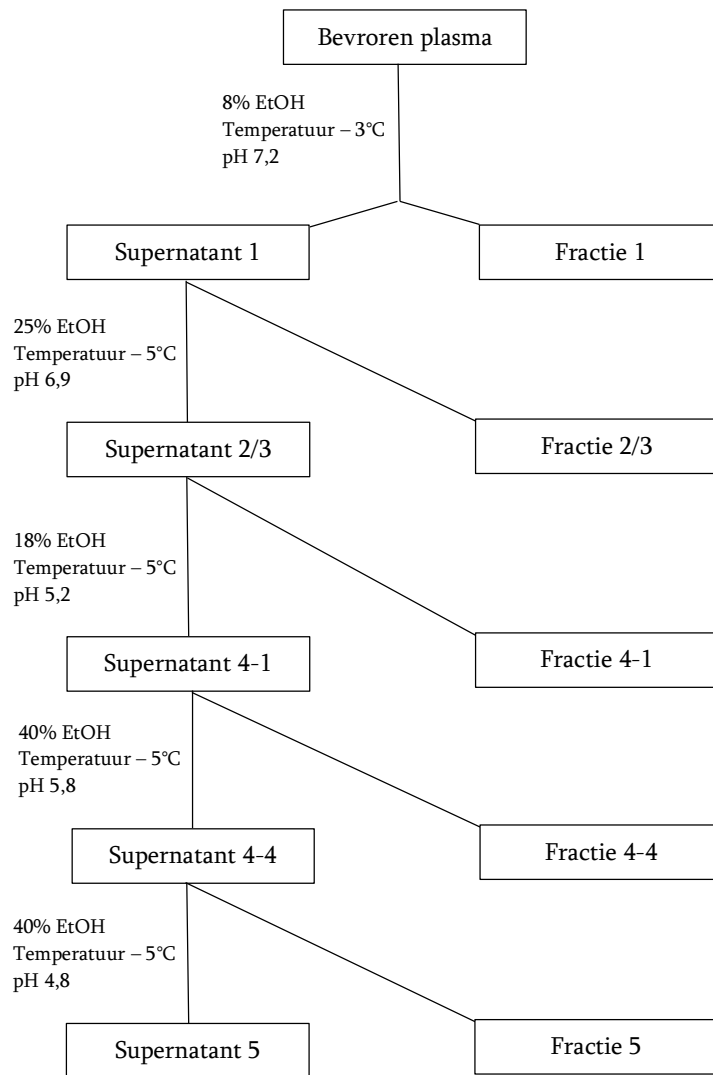
Het humaan bloedplasma bevat een aantal interessante moleculen die gebruikt kunnen worden voor therapeutische doeleinden. Het belangrijkste eiwit hierin is albumine. Albumine speelt een rol in het behouden van de juiste osmotische druk en dient als carrier voor veel substanties in het bloed [53]. Het wordt vaak toegediend aan patiënten met brandwonden, shock, hypoalbumie en bloedverlies [10]. Het is een monomeer van 66kDa met drie homologe domeinen die een rol spelen in de opname en het transport van medicijnen [54].

Het menselijk plasma bevat natuurlijk veel meer stoffen dan enkel albumine. Daarom is er een methode nodig voor opzuivering. Een mogelijke methode is de Cohn-fractionering, een scheidingsproces dat gebaseerd is op precipitatie met alcohol. Het proces wordt opgedeeld in 5 fracties, waarbij fractie 5 het meeste albumine bevat. De vier andere fracties worden afgezonderd en bevatten zo goed als geen albumine. Desalniettemin bevatten deze fracties nog therapeutisch interessante producten zoals immunoglobuline A, M, G en stollingsproteïnen [10].

Het proces berust echter niet op het verschil in diëlektrische constante zoals normale precipitatie. Door het toevoegen van ethanol aan het plasma verandert de diëlektrische constante slechts minimaal onder lage temperaturen. De drijfkracht dat achter het proces zit is de dehydratatie van de plasma eiwitten die veroorzaakt wordt door ethanol. Ethanol bindt veel sterker met water dan de eiwitten. De plasmaeiwitten trekken elkaar aan wanneer ze gedehydrateerd zijn voornamelijk door Lifshitz-van der Waals-krachten wanneer ze hun iso-elektrisch punt bereiken bij de respectievelijke pH-waarde [55].

Het Cohn fractioneringsproces bestaat uit verschillende stappen met verschillende concentraties ethanol, temperaturen en pH-waarden (Figuur 8). Bij elke stap wordt een fractie afgezonderd via centrifugatie die elk een andere proteïne-inhoud heeft. Cohn fractie 1 bevat bijvoorbeeld vooral fibrinogeen en stollingsfactor 8 en Cohn fractie 4-1 bevat grotendeels α - en β -globulines, α_1 -antitrypsine en antithrombine 2 (Tabel 2).

Gc-globuline is een α -globuline en bevindt zich dus in Cohn fractie 4-1. Momenteel wordt deze fractie in fractionatiecentra als afval beschouwd [56]. Nochtans zou deze fractie interessant zijn voor onderzoek naar Gc-globuline. Het albumine dat normaal gezien metingen of scheidingen verhindert vanwege het gelijkaardige karakter, is hier nagenoeg niet meer in aanwezig.



Figuur 8: Proteïne extractie van humaan bloedplasma volgens de Cohn-fractionering met de verschillende Cohn fracties [10]

Tabel 2: De eiwitinhoud per fractie van het Cohn-fractioneringsproces [10]

Nummer van fractie	% eiwit	Soort eiwit
I	5-10	Fibrinogeen Stollingsfactor VIII
II + III	25	IgG IgA IgM
IV -1	5-10	α - en β -globulines α 1-antitrypsine Antithrombine III
IV -4	5-10	Complement componenten Ceruloplasmine Haptoglobine Transferrine
V	50-60	Albumine

Buiten Gc-globuline bevinden zich er nog een aantal andere therapeutische stoffen in Cohn fractie 4-1 en 4-4 zoals insuline like growth factor 1 (IGF1) [15], transferrine [11], α 2 macroglobuline (α 2M) [12], α 1 antitrypsine (AAT) [13] en proteïne C [14].

2.3.1 IGF1

IGF1 is de meest voorkomende groeifactor in de botmatrix. Het speelt een rol in het differentiëren van mesenchymale stamcellen (MSC). De MSC differentiëren naar osteoblasten. Dit zijn twee celsoorten die zorgen voor de regeneratie bij schade aan het botweefsel. Hoe IGF1 deze differentiatie precies beïnvloedt is nog niet gekend. Het effect van IGF1 op MSC-differentiatie is wel aangetoond in vitro. Indirect is de functie van IGF1 dus het onderhouden van botmassa en de homeostase tijdens het herstel van botweefsel [57].

2.3.2 Transferrine

Transferrine is een eiwit van 679 aminozuren met een molecuulmassa van ongeveer 79 kDa [58]. Het is een serumproteïne dat voornamelijk instaat voor het transport van ijzer doorheen de bloedbaan. Ijzer speelt een centrale rol in de DNA replicatie [59]. Het dient als cofactor voor het ribonucleotide reductase. Ongebonden ijzer kan echter schadelijke radicalen vormen en is daardoor toxisch [60]. Het is dus essentieel dat het wordt opgevangen en zijn oxidatieve karakter verliest. Transferrine zorgt dus niet enkel voor het transport van ijzer, maar ook dat ijzer onschadelijk wordt [61].

2.3.3 α 2-macroglobuline

α 2-macroglobuline (α 2M) is een glycoproteïne van 720kDa dat veel voorkomt in lichaamsvloeistoffen [62]. Het komt in hoge concentraties voor in Cohn fractie 4 [63]. α 2M wordt vooral geproduceerd door levercellen. Het is een zink bindend proteïne dat zo goed als elk soort van endopeptidasen kan inhiberen en het kan de regeneratie van levercellen verbeteren [64]. De excretie van pathogene proteasen door micro-organismen kan opgevangen worden door α 2M.

2.3.4 *α 1-antitrypsine*

AAT oftewel α 1 proteïnase inhibitor is een proteïne van 52kDa. Het zorgt voor de afbraak van eiwit-afbrekende enzymen zoals elastase en trypsine [65]. Elastase kan ook het lichaamseigen elastine aantasten. Het is dus belangrijk dat het elastase op tijd wordt afgebroken. AAT zorgt voor de inhibitie van dit enzym waarbij het zelf ook wordt vernietigd [66].

2.3.5 *Proteïne C*

Proteïne C is een vitamine K afhankelijk proteïne met een molecuulmassa van 62kDa dat circuleert in het bloed. Het zorgt ervoor dat de propagatiefase van bloedstolling door stollingsfactoren V en VIII wordt geïnhibeerd. Tijdens de bloedstolling zorgt trombine ervoor dat bloedplaatjes worden aangetrokken. Wanneer de stolling start, moet trombineproductie geremd worden. Trombine bindt aan trombomoduline en vormt een complex dat proteïne C activeert. Proteïne C zorgt er dan weer voor dat de stollingsfactoren V en VIII proteolytisch gesplitst worden. Factor V en VIII zijn dan niet meer in staat om pre-trombine om te vormen naar trombine waardoor trombineproductie wordt afgeremd. [67]

3 Materiaal en methode

3.1 Staalbehandeling

In dit onderzoek wordt gebruikt gemaakt van humaan citraatplasma dat werd opgeslagen door Epsilon Biotech en van humaan serum. Voor het plasma werd bloed gecentrifugeerd en het supernatant werd opgeslagen als plasma. Serum werd aangemaakt door de stollingsfactoren te activeren met calciumchloride (Sigma Aldrich) om zo fibrinogeen neer te laten slaan als fibrine. Na centrifugatie werden het fibrine en de stollingsfactoren verwijderd en het supernatant werd als serum opgeslagen.

Er werd gebruik gemaakt van een serumpool als referentie voor Gc-globulineconcentraties. Deze werd opgesteld volgens de procedure van *Bongaerts et al.* met een gemiddelde concentratie van 450mg/L.

3.2 Cohn-fractionering

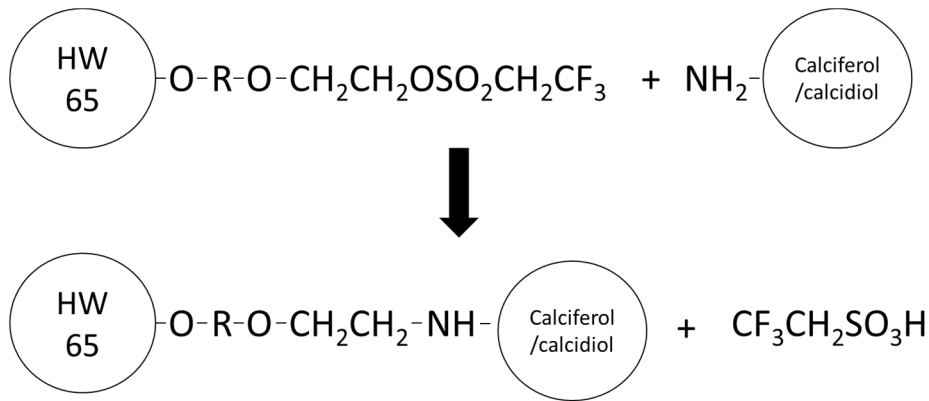
Zoals vermeld in 2.3 is de Cohn-fractionering een precipitatieproces dat berust op een verschil in pH-waarden, temperatuur en alcoholconcentraties. Eiwitten bereiken hun isoëlektrisch punt bij deze verschillende waarden en slaan neer door middel van onderlinge interacties.

Het staal werd overgebracht in een 500ml conische centrifugeerbuis (Corning) voor optimale scheiding van neerslag en supernatant. De ethanolconcentraties werden op punt gebracht met behulp van 53,3%v en 98,8%v ethanoloplossingen (Yvsolab). De pH-waarden werden opgemeten met behulp van een Eutech pH 6+ pH-sensor (Thermo Scientific) en aangepast door het toedienen van een natriumacetaat/azijnzuur buffer die bereid werd met een 4M natriumacetaatoplossing en een 10M azijnzuuroplossing, beide van Sigma Aldrich. De neerslag werd gecentrifugeerd met een Rotixa 50 RS centrifuge van Hettich en opgeslagen in een 30ml flesje (VWR) in een 0,9% NaCl voor opslag en verdere analyse. Voor het exacte protocol wordt naar bijlage 1 verwezen.

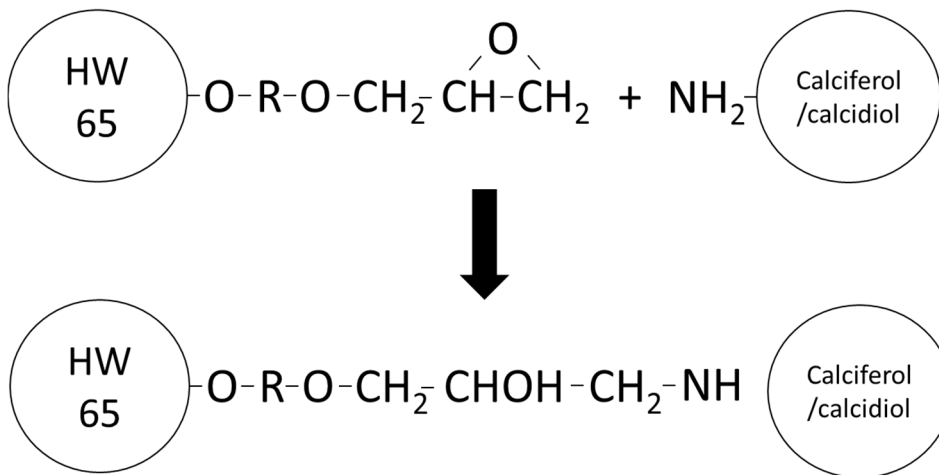
3.3 Affiniteitschromatografie

Na het scheiden van verschillende eiwitten met behulp van de Cohn-fractionering, wordt Gc-globuline verder opgezuiverd met een affiniteitschromatografie. Deze selectieve techniek zuivert een component op uit complexe mengsels gebaseerd op specifieke interacties tussen twee moleculen. De interactie is meestal reversibel en de opzuivering wordt uitgevoerd door een tweefasige interactie namelijk de stationaire fase en de mobiele fase. De stationaire fase bestaat uit een gel waar een ligand is op gebonden met een hoge affiniteit voor het targetmolecule. De gel wordt uiteindelijk gespoeld met een eluens waardoor een zuivere eiwitoplossing overblijft [68].

In dit onderzoek werd er gebruik gemaakt van actieve epoxy 650M en tresyl 650M affiniteitsgels van Toyopearl. Deze gels zijn reactief met aminegroepen van de liganden waardoor een aminebinding wordt gevormd. De liganden die gebruikt werden zijn de vitamine D-metaboliëten calciferol (Sigma Aldrich) en calcidiol (CarboSynth). Door de hoge affiniteit voor vitamine D-metaboliëten voor Gc-globuline zijn deze liganden gunstig voor het binden van Gc-globuline. Voor de exacte procedure voor het maken van de gel wordt verwezen naar het protocol Affinity Chromatography van Tosoh Bioscience [69].



Figuur 9: Reactie van de Toyopearl tresylgel met calciferol of caldiol als ligand [69]



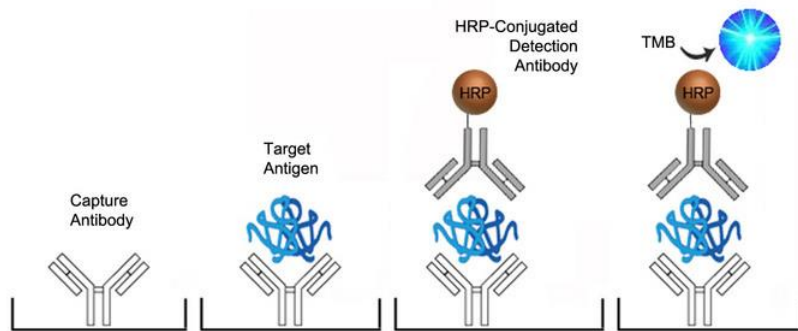
Figuur 10: Reactie van de Toyopearl epoxygel met calciferol of caldiol als ligand [69]

De gels werden in een 50ml buisje (VWR) gebracht samen met *fosfaatgebufferde zoutoplossing* (PBS) voor bewaring. Voor de proeven werd PBS verwijderd met een glazen pipet en staal werd toegevoegd. Het buisje werd op een RM 5 buizenroller van CAT gebracht voor incubatie zodat er voldoende contact was tussen gel en staal. De suspensie werd gecentrifugeerd met een Rotixa 50 RS centrifuge en het supernatant werd overgebracht voor bewaring en metingen. Na incubatie werd gespoeld met PBS om niet gebonden eiwitten te verwijderen. De gel werd blootgesteld aan een gradiënt van NaCl-oplossingen (MERCK) voor het uitzouten van de gebonden eiwitten. Het protocol is terug te vinden in bijlage 2.

3.4 Sandwich ELISA

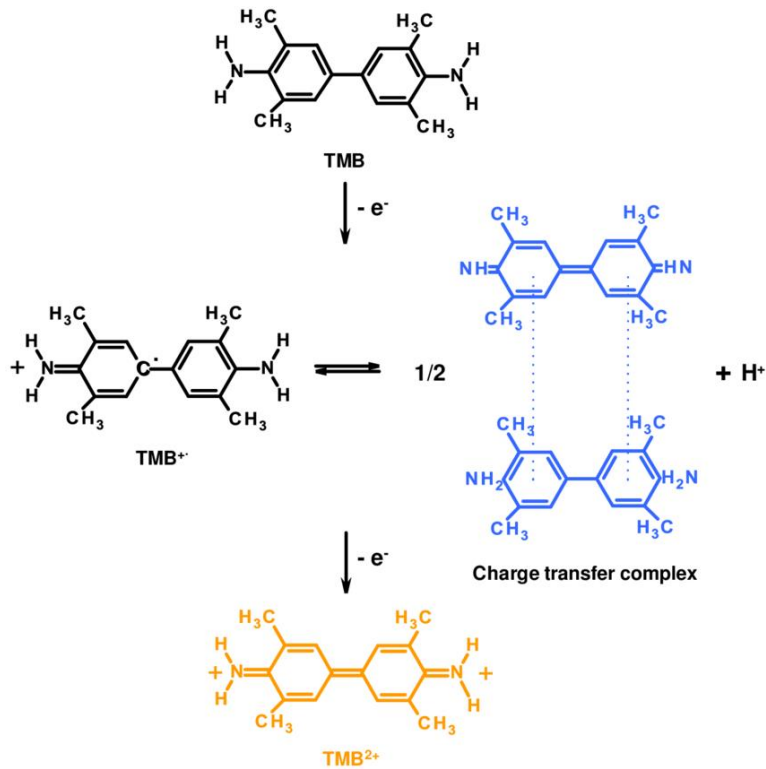
Door middel van een sandwich enzyme linked immunosorbent assay of sELISA wordt de concentratie Gc-globuline in de verschillende stalen gemeten. Deze techniek is gebaseerd op de binding tussen een antilichaam en zijn antistof en is specifiekker dan een standaard ELISA.

Een microwell plaat wordt gecoat met een capture antibody. Het zorgt dat een antigen wordt gevangen op de plaat. De plaat wordt dan gespoeld met een wasoplossing zodat niet-gebonden eiwitten worden verwijderd. Dan wordt er een secundair antibody-enzymconjugaat toegevoegd dat ook specifiek bindt op het antigen. Na het toevoegen van substraat zal het enzym een reactie katalyseren. Deze reactie kan gevolgd worden door een kleurverandering. Uiteindelijk wordt de reactie stopgezet door een zuur toe te voegen.



Figuur 11: De verschillende stappen en de werking van een sandwich ELISA [70]

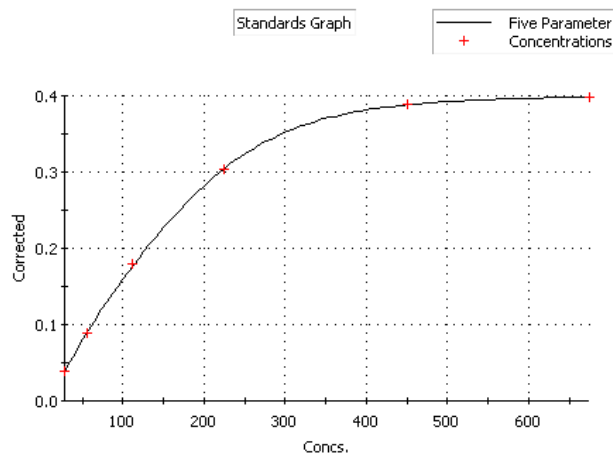
Het capture antibody dat gebruikt werd was antihumaan Gc-globuline van konijnen (Dako) dat Gc-globuline bindt als zijn antigen. Het secundair antibody bestond uit een antihumaan Gc-globuline (Dako) geconjugeerd met het enzym horse radish peroxidase (HRP). Dit conjugaat heeft ook een hoge affiniteit voor Gc-globuline en katalyseert de reactie van tetramethylbenzidine (TMB) met waterstofperoxide. TMB (KPL) wordt geoxideerd door de aanwezigheid van H_2O_2 (KPL) en HRP. Er ontstaat een complex dat een blauwe kleur geeft en absorbeert bij een golflengte van 652nm. Na het toevoegen van 0,2M HCl als stopoplossing wordt TMB verder geoxideerd en er ontstaat een gele kleur die absorbeert bij 450nm [71]. Voor het protocol wordt doorverwezen naar bijlage 3.



Figuur 12: De oxidatie en de vorming van het complex van TMB (blauw), de volledige oxidatie van TMB (geel) [71]

De 96-well plate (Greiner bio-one) wordt dan in een Victor X4 2030 Multilabel Reader van PerkinElmer gebracht. Hierin wordt de absorptie gemeten bij een golflengte van 450nm. Stalen worden vergeleken met een standaard verdunningsreeks van een serumpool met gekende Gc-globuline concentratie.

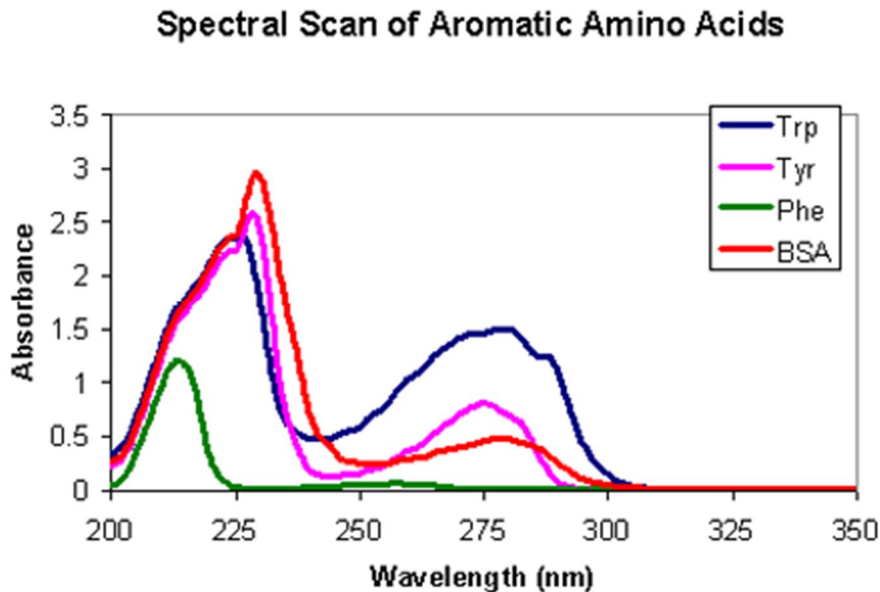
Na de metingen worden de resultaten verwerkt door het programma Workout 2.5. Dit programma laat toe om een data analyse uit te voeren met een vijf-parameter vergelijking. Met de vijf-parameter berekening kan er een vergelijking opgesteld worden voor de afvlakking van de curve. Er wordt zo een betere benadering voor de concentratie en absorptie-verhouding gevormd.



Figuur 13: Een voorbeeld van een vijfparameterberekening van het programma Workout 2.5 met op de x-as de concentratie en op de y-as de absorptie

3.5 Spectrofotometrie

De eiwitconcentratie wordt bepaald met een spectrofotometrische techniek die gebaseerd is op de absorptie van bepaalde aminozuren in eiwitten. De aminozuren tyrosine, tryptofaan en fenylalanine bevatten aromatische groepen in hun zijketens. De aromaticiteit zorgt voor een hogere absorptie. π -elektronen kunnen gemakkelijker van energietoestand wijzigen dan σ -elektronen. Dubbele bindingen absorberen daarom bij een hogere golflengte dan enkelvoudige bindingen. Bij een golflengte van 280nm vertonen tryptofaan en tyrosine een verhoogde absorptie [72].



Figuur 14: De absorptiespectra van tyrosine (roze), tryptofaan (blauw), fenylalanine (groen) en runderserum albumine (rood) [72]

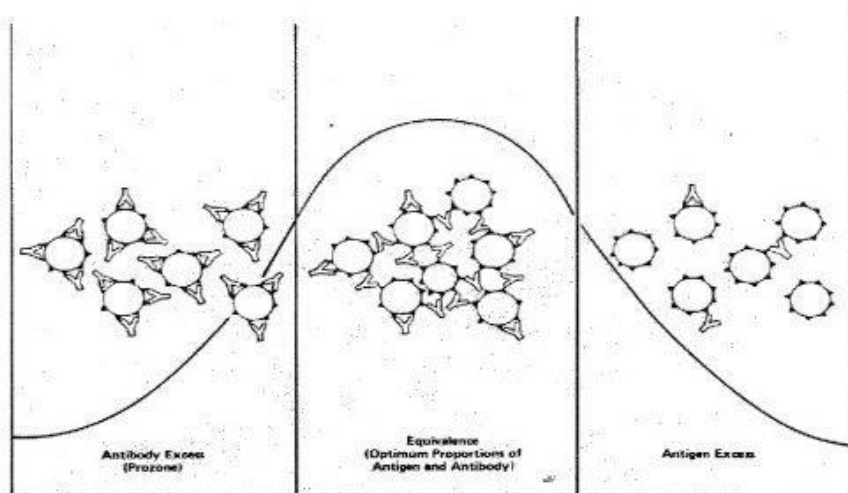
De stalen werden in een UV-cuvet van Eppendorf gebracht en de absorptie werd gemeten bij een golflengte van 280nm met een BioPhotometer van Eppendorf. Er werd een standaard van runder serum albumine (Sigma Aldrich) gebruikt voor het maken van een standaard verdunningsreeks. Runderserum albumine is een goede referentie aangezien het een voldoende hoge absorptie heeft bij 280nm [73]. Voor het exacte protocol wordt verwezen naar bijlage 4.

3.6 Albumine antiserum turbidimetrie

De techniek die gebruikt werd voor het bepalen van de albumineconcentratie is een antiserum turbidimetrie. Een techniek die gebaseerd is op de verstrooiing van licht in troebele oplossingen.

Turbidimetrie meet het licht dat door een vloeistof schijnt. Deeltjes die groot genoeg zijn verstrooien het licht en zorgen voor een troebele oplossing. Het deeltje absorbeert het inkomend licht en zendt het terug uit in alle richtingen. Dit is in tegenstelling met absorptie waarbij het licht ook wordt geabsorbeerd, maar wordt omgezet naar een andere vorm van energie zoals warmte. Zowel verstrooiing als absorptie treden op. Lichtverstrooiing is afhankelijk van enkele factoren van de verstrooiende deeltjes zoals concentratie, vorm en grootteverdeling. Een turbidimeter meet de intensiteit van het licht dat doorheen het staal wordt gezonden. De intensiteit na het staal is lager dan die van de ingaande lichtstraal en geeft een maat voor de lichtverstrooiing en absorptie [74].

In de juiste verhoudingen vormt albumine samen met zijn antilichaam een troebele oplossing. De antilichamen binden aan verschillende albuminepartikels en vormen zo een groter geheel. Het gevormde grotere deeltje verstrooit het licht volgens het Tyndall-effect. Bij een te hoge concentratie aan antilichamen worden alle bindingsplaatsen van albumine bezet en kan er geen interactie ontstaan tussen verschillende albuminedeeltjes. Wanneer er te weinig antilichaam aanwezig is, zijn er ook te weinig albumine-antilichaam interacties om een groter partikel te vormen. Een juiste verhouding tussen albumine en zijn antilichaam is dus essentieel. De binding tussen albumine en zijn antilichaam kan versneld worden door de aanwezigheid van polyethyleenglycol (PEG) [75]. Voor het protocol wordt verwezen naar bijlage 5.



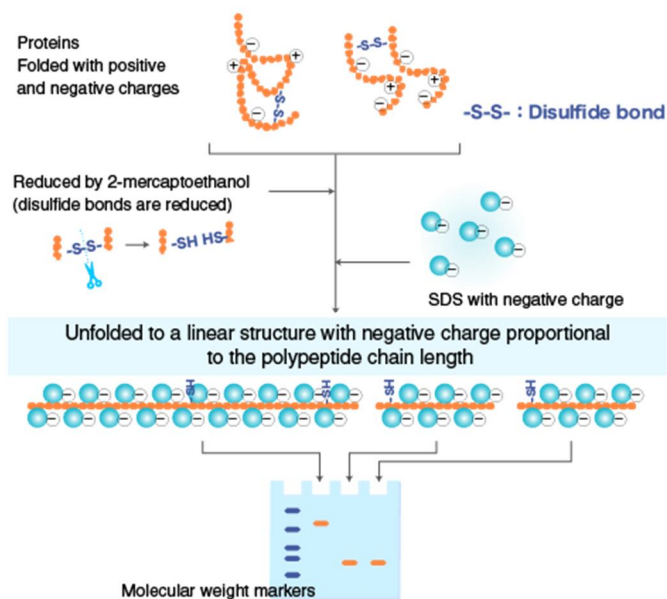
Figuur 15: Het signaal bij te veel antiserum (links), een goede verhouding/albumine antiserum (midden) en te lage hoeveelheid antiserum (rechts) [76]

Zowel antiserum als PEG-buffer uit de AUT albumin kit van Aptec diagnostics werden gebruikt. De turbiditeit werd gemeten met een Victor X4 2030 Multilabel Reader van PerkinElmer. Hiervoor werd een programma gebruikt dat de intensiteit meet bij een golflengte van 340nm.

3.7 SDS-PAGE

De grootte van de eiwitten die aanwezig zijn in de verschillende fracties werd gecontroleerd door middel van een *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), een meettechniek gebaseerd op de lengte van polypeptideketens.

SDS is een detergent en zorgt voor de denaturatie van eiwitten. Het bindt op de eiwitten met een verhouding evenredig aan de ketenlengte. SDS ontbindt de kleinschalige interacties van eiwitten die zorgen voor de eiwitstructuur zoals dipoolkrachten. De disulfidebindingen tussen twee cysteïnen blijven echter onaangeraakt. De disulfidebindingen worden gebroken via reductie door het toevoegen van β -mercapto-ethanol. Zo worden lineaire eiwitketens gevormd, gebonden met negatief geladen SDS moleculen. De oplossing met lineaire eiwitten wordt dan in een polyacrylamide gel geladen. Polyacrylamide wordt gevormd door radicale polymerisatie tussen acrylamide en een crosslinker. Het is ideaal voor het scheiden van eiwitten omdat het chemisch inert, elektrisch neutraal, hydrofiel en transparant is [77]. Na het inladen van de gel wordt er een spanning aangebracht op de gel. Door de negatieve lading van SDS op de eiwitten zal er een kracht uitgeoefend worden op de eiwitten. De eiwitten migreren richting de positieve pool met verschillende snelheden afhankelijk van hun grootte. Grote eiwitten worden meer gehinderd door het netwerk van de gel en zullen minder snel migreren dan de kleinere eiwitten. De kleine eiwitten zullen dan ook bovenaan de gel eindigen. Voor het protocol wordt verwezen naar bijlage 6.

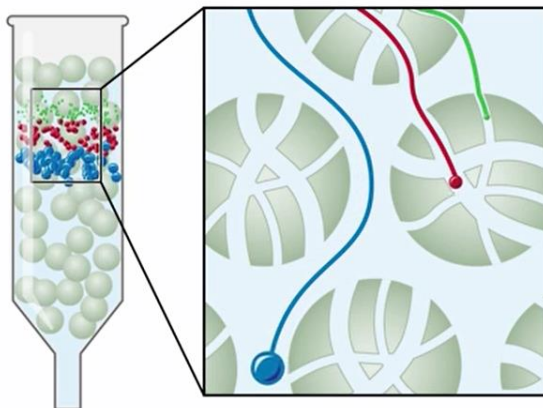


Figuur 16: Verschillende stappen van SDS-page van staalbehandeling tot gel [78]

3.8 Gelfiltratiechromatografie

Het opzuiveren van Gc-globuline werd naast de affiniteitschromatografie ook getracht met een gelfiltratiechromatografie, een scheidingstechniek op basis van deeltjesgrootte.

De gel die gebruikt wordt bestaat uit een matrix van korrels met zeer kleine poriën en kanaaltjes. Hoe groter het molecuul is dat door de gel wordt gestuurd, hoe moeilijker het is om deze poriën en kanaaltjes te betreden. Grote moleculen zullen eerder langs en tussen de korrels stromen dan binnen te dringen. Kleinere moleculen zullen wel in de korrels treden en verblijven langer in de kolom. De grote deeltjes zullen dus als eerste uit de kolom elueren. Naast de deeltjesgrootte speelt ook de vorm van het deeltje een rol. Lineaire moleculen treden de korrels moeilijker binnen dan bolvormige moleculen. Zo kan er schijnbaar een scheiding zijn op massa terwijl deze van beide vormen gelijk is [79].



Figuur 17: De vorm van de korrels bij gelfiltratie, met poriën en kanaaltjes, grote eiwitten (blauw), middelgrote eiwitten (rood) en kleine eiwitten (groen) [80]

De gel die werd gebruikt was een Aca 44 Ultrogel van Sigma Aldrich. Deze gel heeft een fractioneringsgebied van 10 tot 130 kDa voor globulaire proteïnen. Gc-globuline ligt met een molecuulmassa van 58 kDa in dit gebied en kan dus gescheiden worden met deze gel. De gel werd geëluëerd met een PBS-oplossing met een flowsnelheid van 1ml/min met behulp van een P-50 pomp van Pharmacia biotech. Het eluens werd opgevangen in fracties van 1,8ml door een Model 2110 fractiecollector van Biorad. Voor de procedure wordt verwezen naar bijlage 7.



Figuur 18: Opstelling van de gelchromatografie

4 Resultaten & Discussie

4.1 De Cohn fractionering

Na elke stap van de Cohn fractionering werd er zichtbaar neerslag opgemerkt na centrifugatie. Daarnaast werd er in verschillende stalen vlokvorming vastgesteld. Dit is mogelijk te wijten aan vetten die zich in het plasma bevinden. Zoals *Cohn et al.* vermeld, slaan α -globulinen samen met vetten neer in fractie 4-1. Hierna werd geen vlokvorming meer gezien in het supernatant wat aangeeft dat er vetten aanwezig waren.



Figuur 19: Foto van de neerslag in een conische centrifugeerbuis (links) en de zichtbare vetvlokken (rechts)

De Cohn-fractionering werd uitgevoerd op zowel plasma als serum. De hoeveelheid neerslag in fractie-1 van het serum werd lager verwacht dan fractie-1 van het plasma. In deze fractie bevinden zich alle stollingsfactoren alsook fibrinogeen. Bij het maken van het serum zouden deze eiwitten verwijderd moeten zijn. De fractionering werd in viervoud uitgevoerd. Het gemiddelde van de volumes van alle neerslagen en supernatanten werden genoteerd voor verdere berekeningen (Tabel 3). Het volume in serum bedraagt 2ml en in plasma 8,5ml. Er is een duidelijke vermindering van fractie-1 in de overgang van plasma naar serum.

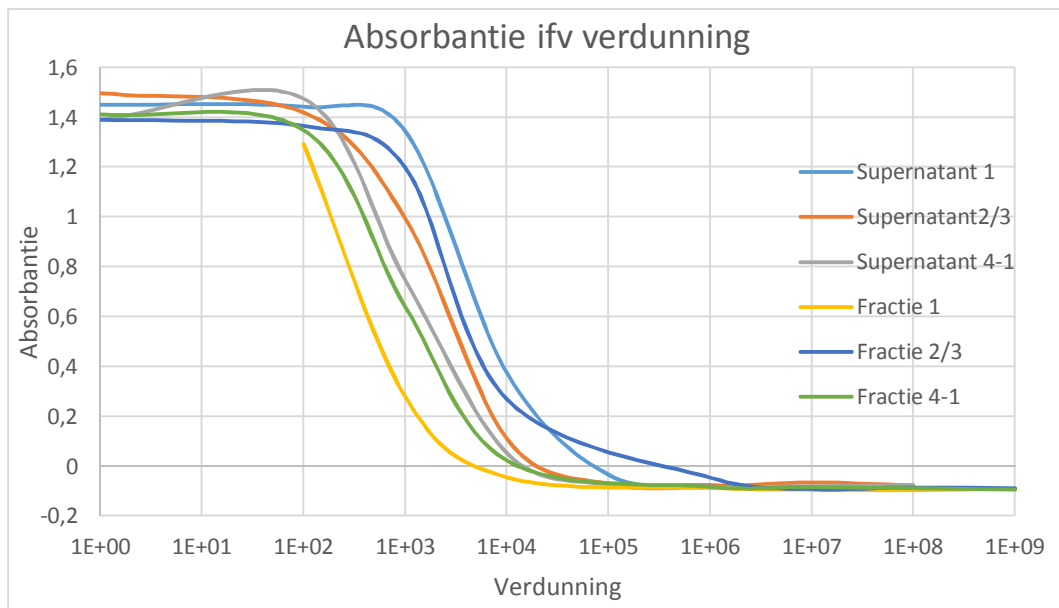
Tabel 3: Overzicht van de verschillende volumes van supernatant en fracties van het Cohn-proces

Naam	Volume in serum (ml)	Volume in plasma (ml)
Origineel	400	400
Supernatant 1	469,2	462,7
Supernatant 2/3	442,6	443,87
Supernatant 4-1	412,45	413,7
Fractie 1	2	8,5
Fractie 2/3	38,75	37,5
Fractie 4-1	4,25	2

Naast het verschil in volume werd er ook een stollende werking vastgesteld in de opgeslagen stalen van fractie 1. De stalen werden opgeslagen in 0,9% NaCl voor het simuleren van de lichamelijke zoutconcentratie. Na een periode van 1 dag vormde er zich een klont in het flesje. Ook dit indiceert de aanwezigheid van de stollingsfactoren in fractie 1.

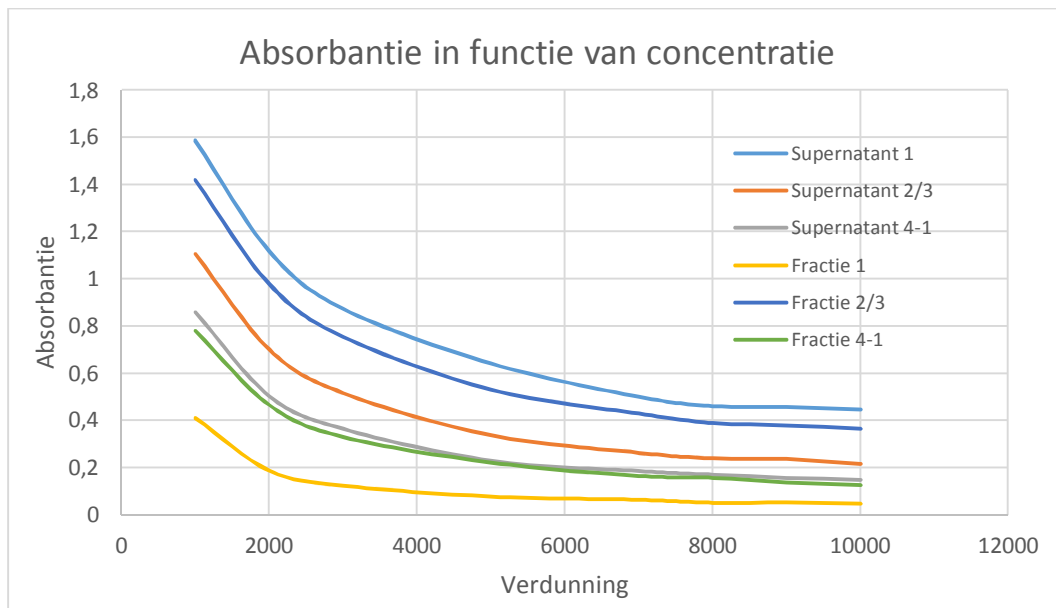
4.2 Massa Gc-globuline in de Cohn-fracties

De Gc-globuline concentratie werd gemeten met een sELISA en de massa Gc-globuline werd berekend. Voor efficiënt meten van de Gc-globuline concentratie moest eerst een lineair gebied gezocht worden waar de concentratie evenredig was met de absorbantie. Hiervoor werden de verschillende fracties en supernatanten van de Cohn-fracties op plasma verdund van 10^0 tot 10^9 in logaritmische stappen van 10. De absorbantie werd uitgezet in functie van de verdunding in Figuur 20.



Figuur 20: Absorbantie in functie van verdunding voor de verschillende Cohn-fracties

Er is een lineair gebied zichtbaar bij een verdunding van 10^3 tot 10^4 voor alle supernatanten en fracties. Bij fractie 1 is er een afbuiging te zien bij een verdunding van 10^4 . De curve van supernatant 1 en fractie 2/3 heeft nog een hoge absorbantiewaarde bij een verdunding van 10^3 . Er is een tweede verdunningsreeks nodig om uitsluitsel te geven voor het lineair gebied. Dit werd gedaan met een lineaire verdunding van 10^3 tot 10^4 in stappen van 10^3 . Opnieuw werd de absorbantie uitgezet in functie van de verdunding (Figuur 21).



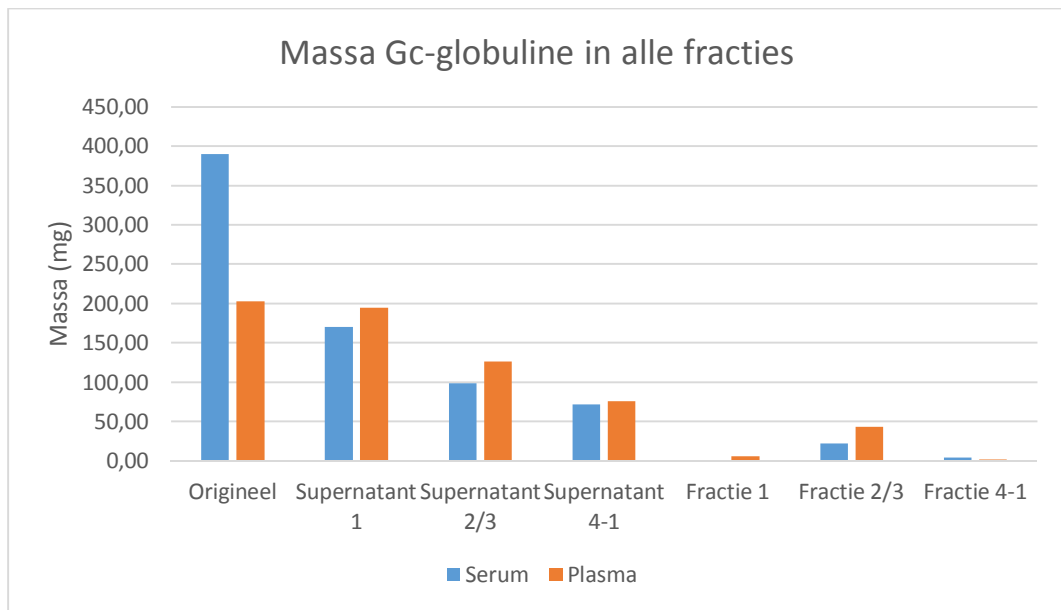
Figuur 21: Absorbantie in functie van verdunning bij de verschillende Cohn-fracties

De absorbantie heeft een duidelijke afbuiging vanaf een verdunning van 3000 voor alle stalen. Er werd gekozen om verder te werken met een verdunning van 2000. De massa Gc-globuline werd vervolgens bepaald voor plasma, serum en alle Cohn-fracties.

Er is een opmerkelijk verschil tussen de originele stalen van serum en plasma. Dit kan te verklaren zijn door het concentratie verschil. In plasma bedroeg de concentratie 322 mg/L en in serum 976 mg/L. Van zowel serum als plasma werd 400 ml gebruikt voor de Cohn-fractionering en dit zou het verschil in massa kunnen verklaren. Doordat er eiwitten worden verwijderd uit plasma bij het vormen van serum, stijgt de concentratie aan Gc-globuline. De procentuele hoeveelheid Gc-globuline in het mengsel zal dus hoger liggen dan bij plasma.

Onder ideale omstandigheden zou de som van de massa's van een supernatant en zijn opvolgende fractie en supernatant gelijk moeten zijn. De massa in supernatant₁ zou bijvoorbeeld gelijk moeten zijn aan de som van supernatant_{2/3} en fractie 2/3. De som van supernatant₁ en fractie₁ zou gelijk moeten zijn aan de originele massa. Bij het plasma klopt dit, maar bij serum niet. Dit kan te wijten zijn aan denaturatie van eiwitten bij het ontdooien, overbrengen, centrifugeren of schudden.

Volgens *Hosseini et al.* zou Gc-globuline moeten neerslaan in fractie₄₋₁ bij een pH van 5,2, een ethanolconcentratie van 18% en een temperatuur van -5°C. Ten eerste is niet al het Gc-globuline neergeslagen zoals te zien is in supernatant₄. Het isoëlektrisch punt van 5,2 van Gc-globuline zou niet optimaal bereikt kunnen zijn [81]. Een afwijking van de pH-waarde van de oplossing zou ervoor kunnen zorgen dat niet alle Gc-globulinedeeltjes neutraal geladen zijn, waardoor ze minder aantrekkingsinteracties aangaan met elkaar. Ten tweede bevat fractie_{2/3} meer Gc-globuline dan fractie₄₋₁. Fractie 2/3 bevat 25% van de serumproteïnen. Een groot deel slaat dus neer in deze fractie, wat ook al merkbaar was in Tabel 3. Het feit dat er een grotere massa Gc-globuline in fractie_{2/3} zit zou er op kunnen wijzen dat er interacties bestaan tussen Gc-globuline en andere eiwitten. Gc-globuline wordt dan gedeeltelijk meegenomen in fractie_{2/3}.



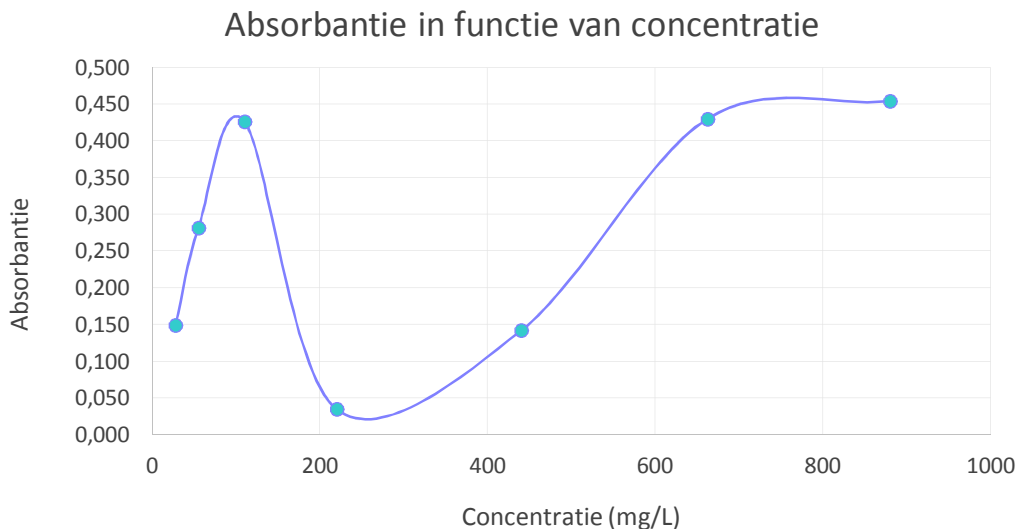
Figuur 22: De massa Gc-globuline voor alle fracties van de Cohn-fractionering

4.3 Massa albumine in de Cohn-fracties

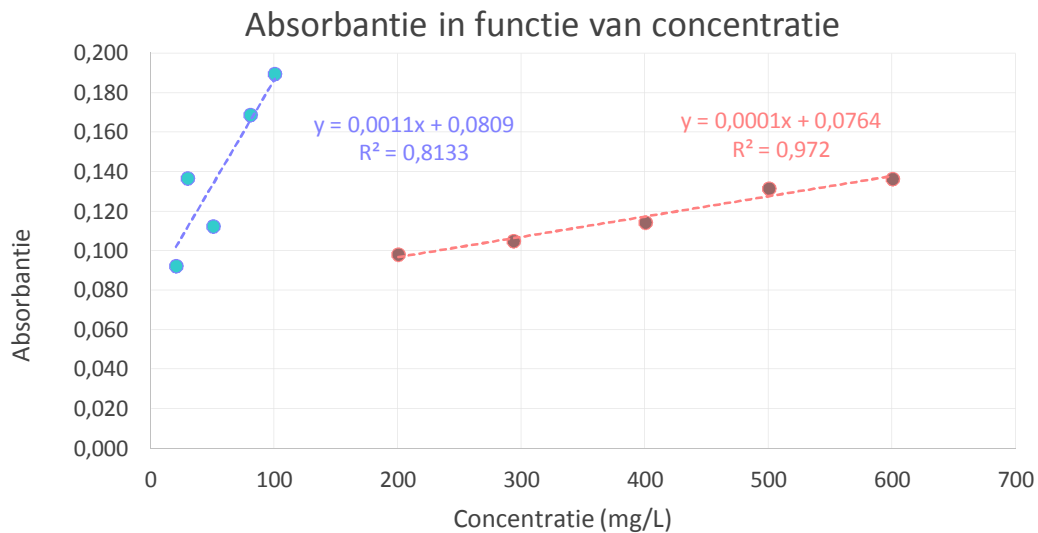
In vorige onderzoeken bij Epsilon Biotech bleek albumine een storende factor te zijn in metingen en scheidingen. Via de Cohn-fractionering zou albumine gescheiden moeten worden van andere serumproteïnen. Via antiserum turbidimetrie wordt nu nagegaan welke fracties albumine bevatten en welke niet.

De serumpool is een mengsel van verschillende stalen om zo een gemiddelde waarde te krijgen. De exacte albumineconcentratie hierin is echter niet gekend. De gemiddelde albumineconcentraties schommelen tussen 35 en 55g/L in het menselijk bloed. De serumpool bevat dus een gemiddelde van 45g/L. Op basis van deze waarde werd een verdunningsreeks van serumpool gemaakt om eerst het lineair gebied te zoeken waar in gewerkt kan worden. De verdunningsreeks bevatte volgende concentraties in mg/L: 27,5; 55; 110; 220; 440; 660 en 880. De absorbantie bij 340nm werd uitgezet in functie van concentratie in Figuur 23. Er zijn twee lineaire gebieden zichtbaar namelijk in het gebied 27,5 tot 110 mg/L en 220 tot 660 mg/L. Er werd een tweede verdunningsreeks opgesteld in deze twee gebieden Figuur 24. De R^2 -waarde van het tweede gebied bedraagt 0,972 terwijl deze van het eerste gebied slechts 0,8133 bedraagt. Het tweede gebied werd gekozen om verder te werken aangezien hier een beter lineaire verhouding aanwezig is.

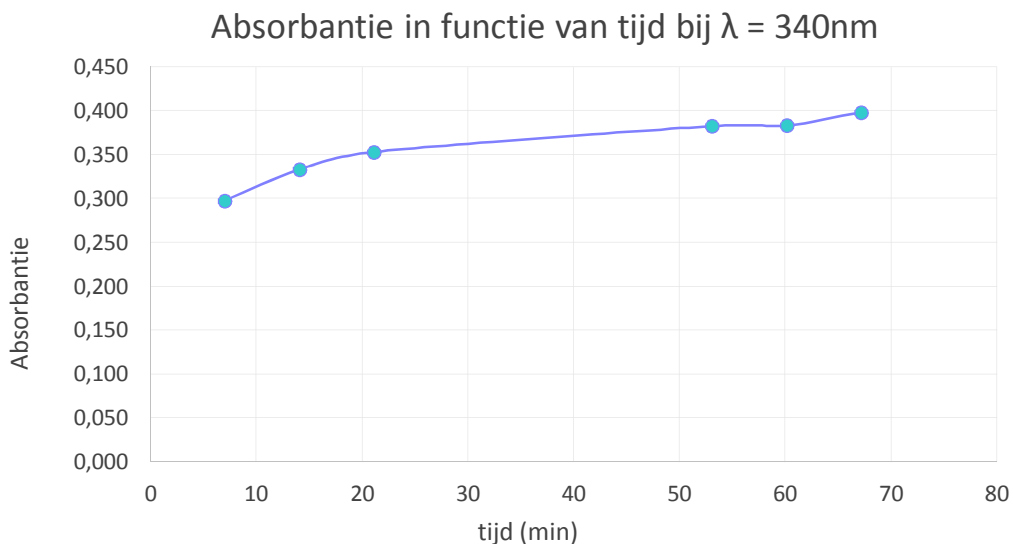
Naast de concentratiemetingen werd ook een controle gedaan op de incubatietijd van het experiment. Absorbantie werd gemeten in tijdsintervallen (Figuur 25). De absorbantie blijkt constant te zijn na een tijd van 20 minuten. Volgende experimenten werden uitgevoerd met een incubatietijd van 30 minuten om zeker te zijn van de constante waarden.



Figuur 23: Absorbantie in functie van concentratie bij het zoeken van het lineair gebied voor albumine in serumpool met antiserum turbidimetrie



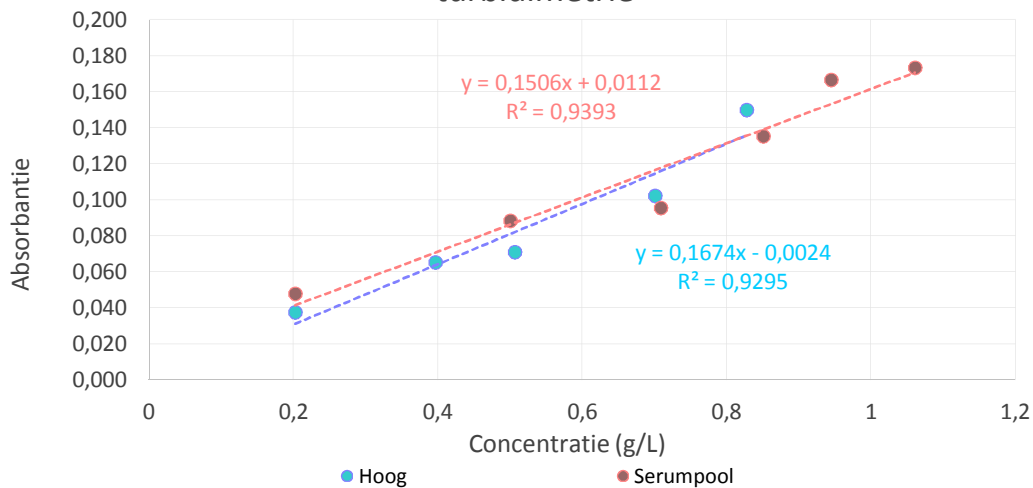
Figuur 24: Absorbantie in functie van concentratie bij het zoeken van het lineair gebied voor albumine in serumpool bij antiserum turbidimetrie



Figuur 25: Absorbantie in functie van tijd van albumine uit serumpool bij antiserum turbidimetrie bij het zoeken van de incubatietijd

Een oplossing met gekende albumineconcentratie van 91g/L werd gebruikt voor het berekenen van de exacte albumineconcentratie in de serumpool. Van beide stalen werd een verdunningsreeks gemaakt in hetzelfde concentratiegebied (Figuur 26). De absorbanties van de serumpool stalen werden teruggerekend aan de hand van de lineaire regressie van het gekende staal. Voor alle verdunningen werd een oorspronkelijke concentratie berekend en hiervan werd het gemiddelde genomen. Dit resulteerde in een gemiddelde waarde van $46,6 \pm 2,5$ g/L voor de serumpool. Dit komt overeen met de gemiddelde waarde van de theorie die 45g/L bedraagt.

Absorbantie in functie van concentratie bij albumine-turbidimetrie



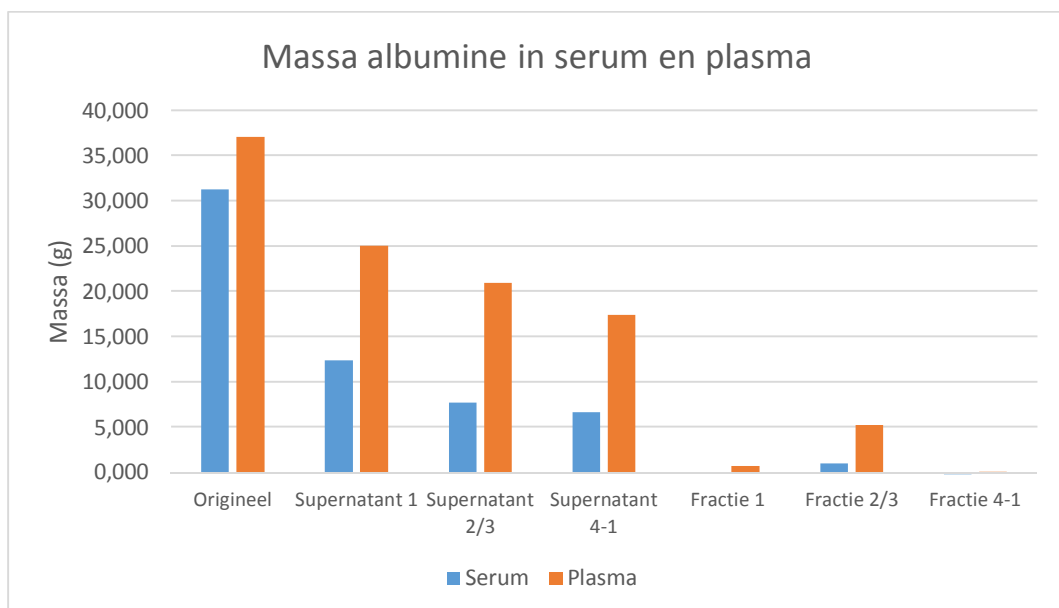
Figuur 26: Absorbantie in functie van concentratie bij het gelijkstellen van serumpool met het gekende staal

Uiteindelijk werd de albumineconcentratie gemeten in de verschillende Cohn-fracties. Er werd gebruik gemaakt van een verdunningsreeks van de serumpool waarvan de exacte concentratie nu gekend is (Figuur 27).

Gelijkaardig met de Gc-globulinemetingen is er een verschil van 18g merkbaar tussen de originele serumstalen en bijhorend supernatant 1. Ook hier is er een vermoeden van denaturatie in één van de stappen van het experiment.

Fractie 1 en fractie 4-1 bevatten opmerkelijk minder albumine dan de overige fracties met zelfs waarden onder het laagste ijkpunt. We kunnen dus zeggen van fractie 1 en fractie 4-1 dat albumine niet detecteerbaar is met de gestipuleerde methode.

Fractie 2/3 bevat minder albumine in serum dan in plasma. Dit verschil is ook te zien bij de originele stalen van plasma en serum. Het albumine dat neerslaat in fractie 2/3 kan al verwijderd zijn bij het vormen van serum uit plasma.



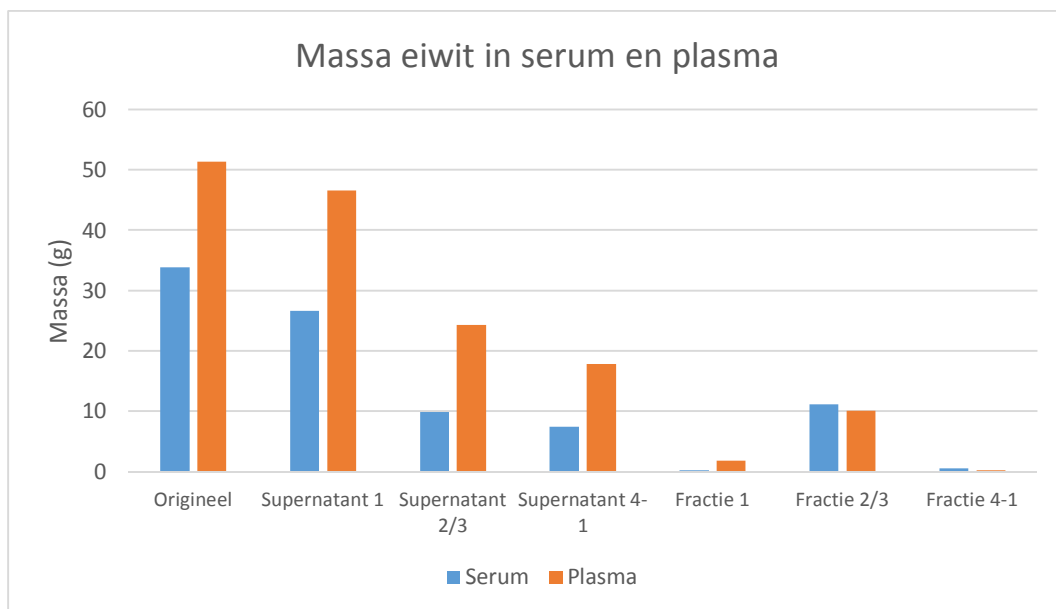
Figuur 27: Massa albumine in alle Cohn-fracties berekend met sELISA

4.4 Zuiverheid van de Cohn-fracties van serum en plasma

Om de zuiverheid na te gaan van Gc-globuline in de verschillende fracties, werd de totale hoeveelheid eiwit gemeten met spectrofotometrie bij 280nm. Dit werd gedaan met behulp van een ijklijn van runderserum albumine (Figuur 28).

Het verschil in massa tussen serum en plasma is 17,4g. Dit is opnieuw te wijten aan het neerslaan van de stollingsfactoren met CaCl_2 . De verwachting is dan dat de stollingsfactoren neer zouden slaan in fractie 1 van het plasma. Deze fractie bevat echter een kleine massa eiwit van 1,79g en supernatant 1 van plasma bevat nog een aanzienlijk hoge waarde van 46,6g. Dit doet vermoeden dat niet alle stollingsfactoren zijn neergeslagen bij de Cohn-fractionering. De opzuivering van de stollingsfactoren is effectiever met CaCl_2 dan met de Cohn-fractionering.

In tegenstelling met Figuur 22 en Figuur 27 is er bij de totale eiwitmassa geen verschil te zien tussen het originele staal en de opvolgende stap bij serum. Het vermoeden van denaturatie bij de Gc-globuline- en albuminediagrammen klopt hier niet. De stabiliteit van Gc-globuline en albumine kan afhankelijk zijn van andere serumproteïnen. Door het verwijderen van eiwitten via de Cohn-fractionering kan de stabiliteit van Gc-globuline en albumine in gedrang komen. Dit verklaart echter niet waarom het verschil in massa van Gc-globuline en albumine niet merkbaar is bij de eiwitmassa. Bij de meettechnieken ELISA en antiserum turbidimetrie voor respectievelijk Gc-globuline en albumine moeten reagentia toegevoegd worden. De eiwitmetingen gebeuren via een spectrofotometrie zonder reagentia. Gc-globuline en albumine kunnen makkelijker denatureren bij de toebehorende meettechniek dan bij de spectrofotometrie. Tijdens de meting zou er dus denaturatie kunnen plaatsvinden. Dit verklaart ook de hogere waarden van albumine en Gc-globuline in de originele stalen door aanwezigheid van alle serumproteïnen.



Figuur 28: Totale eiwitmassa in de verschillende Cohn-fracties berekend met antiserum turbidimetrie

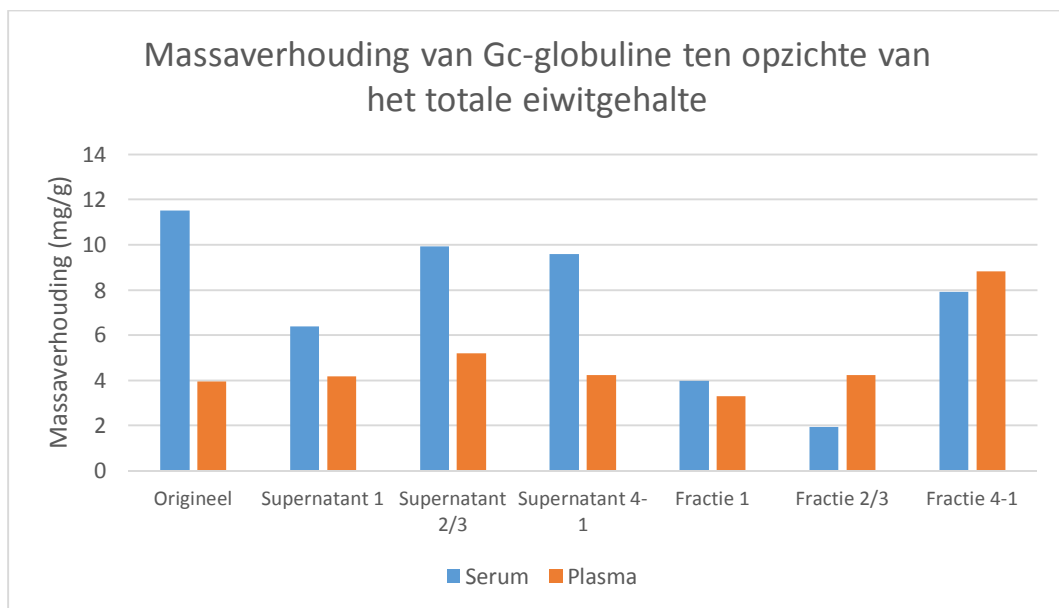
Als maat voor zuiverheid werd verhouding van de massa van een eiwit en de totale eiwitmassa berekend. Dit werd gedaan voor zowel Gc-globuline als albumine. De massaverhouding van de eiwitten is geen exacte waarde voor de zuiverheid aangezien er nog andere moleculen aanwezig zijn in plasma en serum zoals suiker en zouten. De massaverhouding is dus een schatting voor de zuiverheid.

4.4.1 De massaverhouding van Gc-globuline ten opzichte van het totale eiwitgehalte

Volgens de theorie van de Cohn-fractionering zou het grootste aandeel per gram eiwit in fractie 4-1 moeten zitten. Als er enkel gekeken wordt naar de fracties in Figuur 29, dan is er een stijgende trend zichtbaar. Fractie 1 en fractie 2/3 bevatten beide Gc-globuline, maar fractie 4-1 bevat de hoogste zuiverheid.

In het origineel serumstaal is de hoogste massaverhouding van 11,8mg/g zichtbaar. Dit kan te wijten zijn aan een vermindering van de eiwitconcentratie en verhoging van de Gc-globulineconcentratie. Zoals blijkt uit Figuur 22 en Figuur 28, bevat serum meer Gc-globuline en minder eiwit. Dit verklaart de verhoogde waarde voor de massaverhouding.

De zuiverheid in fractie 4-1 in serum en plasma is respectievelijk 7,95mg/g en 8,85mg/g met een gemiddelde zuiverheidsgraad van 12%. Ten opzichte van het oorspronkelijke plasmastaal met een zuiverheid van 3,96mg/g, is dit een opzuivering met factor 2,23. Fractie 4-1 van serum heeft een lagere zuiverheid dan zijn oorspronkelijke staal. Het oorspronkelijke staal bevat echter nog albumine. Eén van de doelstellingen van dit project was om albumine te scheiden van Gc-globuline. De massaverhouding van albumine ten opzichte van het totale eiwitgehalte wordt bestudeerd in 4.4.2.

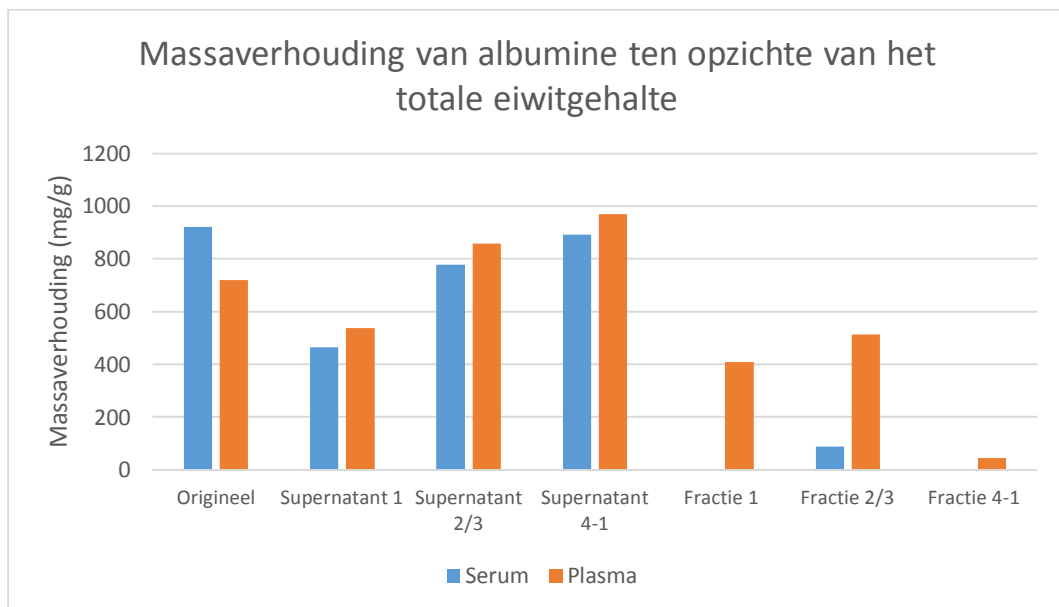


Figuur 29: Zuiverheid van Gc-globuline uitgedrukt in mg Gc-globuline per g eiwit

4.4.2 De massaverhouding van albumine ten opzichte van het totale eiwitgehalte

Volgens de theorie van de Cohn-fractionering wordt er een stijgende massaverhouding van albumine verwacht in de supernatanten. In Figuur 30 is er een duidelijke stijgende trend te zien in de supernatanten. Albumine blijft steeds in oplossing in het supernatant. De Cohn-fractionering wordt normaal gezien dan ook gebruikt voor de opzuivering van albumine. In fractie1 en fractie2/3 van plasma is een massaverhouding van 400 tot 500mg/g aanwezig. Dit is een hoge waarde aangezien albumine niet zou mogen neerslaan in de fracties. Fractie 1 bevat ook een lage massa eiwit, wat een verhoogde waarde voor de massaverhouding zou verklaren. Fractie2/3 aan de andere kant heeft een hogere eiwitmassa dan fractie1. Fractie2/3 bevat 25% van de serumproteïnen volgens *Hosseini et al.* Doordat er veel eiwitten neerslaan in deze fractie kan albumine megedragen worden door andere eiwitten. Plasma bevat meer proteïnen in zijn origineel staal dan serum. In het plasma zitten dus nog eiwitten die neerslaan in fractie2/3 en albumine meedragen. Welke eiwitten dit precies zijn, moet verder onderzocht worden.

Fractie1 en fractie4-1 van serum bevatten niet detecteerbare waarden. Er kan geen exacte massaverhouding worden bepaald voor deze fracties. Er kan enkel gezegd worden daar deze zeer laag is. De waarden werden gelijkgesteld aan 0mg/g.



Figuur 30: Zuiverheid van albumine uitgedrukt in mg albumine per g eiwit

4.5 Affiniteitschromatografie van fractie2/3

De affiniteitschromatografie werd uitgevoerd met verschillende epoxy- en tresylgels. Alle gels werden gecoat met verschillende ligandconcentratie. Eén tresylgel werd gecoat met calcidiol, het vitamine D-metabool met de hoogste affiniteit voor Gc-globuline. Andere gels werden gecoat met calciferol om kosten te drukken. De gebonden ligandconcentratie werd berekend met behulp van HPLC-methoden. De hoeveelheid vitamine D-metaboliëten werd gemeten voor en na het binden met de kolom.

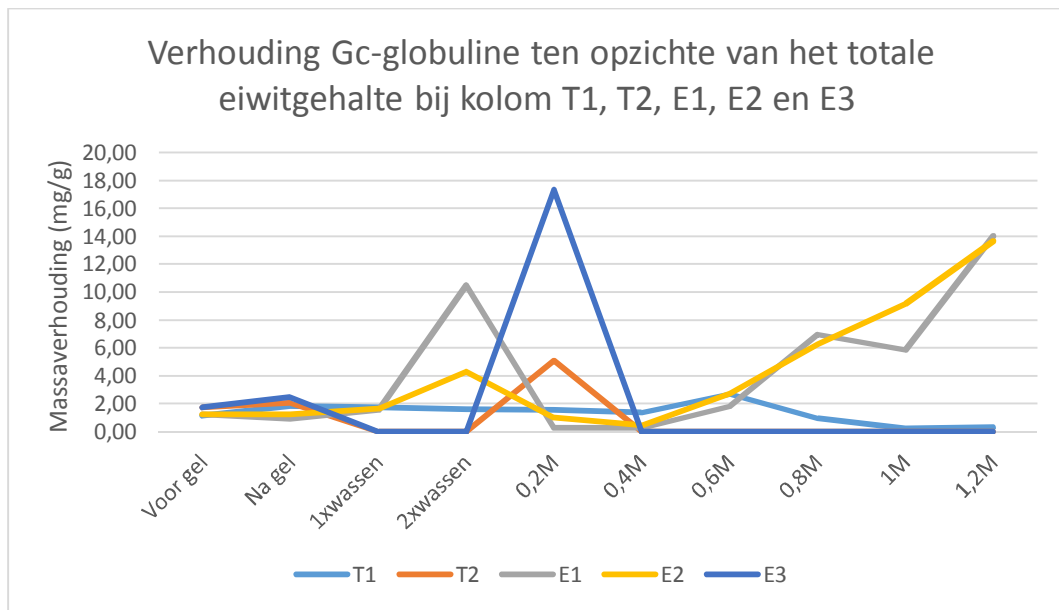
Tabel 4: Overzicht van de verschillende gels

Naam	Gel	Coating	Hoeveelheid ligand gebonden
T1	Tresyl	Calciferol	0,055 mmol
T2	Tresyl	Calciferol	0,12 mmol
E1	Epoxy	Calciferol	32,37 µmol
E2	Epoxy	Calciferol	89,53 µmol
E3	Epoxy	Calcidiol	6,24 µmol

Fractie2/3 van plasma werd aangebracht op de verschillende gels. Deze fractie werd gekozen omdat de concentratie aan Gc-globuline in deze fractie het hoogste bleek te zijn na sELISA. Zoals in Figuur 30 te zien is, bevat deze fractie nog albumine. Aangezien het om affiniteitschromatografie gaat, zou dit geen probleem mogen zijn. De gel zou een hogere affiniteit voor Gc-globuline moeten hebben. Door deze fractie te gebruiken wordt de gel getest op affiniteit en efficiëntie.

Na incubatie werd de gel aan een concentratiegradiënt van een NaCl-oplossing onderworpen voor het desorberen van de gebonden eiwitten. Er werd verwacht dat de kolom enkel een affiniteit heeft voor Gc-globuline en minder voor andere eiwitten. Ter controle werden het totale eiwitgehalte en de massa Gc-globuline van deze verschillende fracties gemeten. Er bleek een grotere massa eiwit aanwezig te zijn dan enkel Gc-globuline. Dit wijst op een niet-selectieve affiniteit van de kolom. Andere eiwitten zijn ook op de kolom gebonden. Het protocol voor het maken van de gel zou hier een verklaring voor kunnen zijn. De gel werd afgeschermd met ethanolamine volgens *Swamy et al.* [82]. Eiwitten ondergaan interacties met alcoholgroepen. Hierdoor heeft de gel een affiniteit voor andere eiwitten [83].

Kolom E3 gaf de beste resultaten ook was hieraan de kleinste hoeveelheid ligand gebonden (Tabel 4). Calcidiol heeft dan ook een veel hogere affiniteit voor Gc-globuline dan calciferol. Bij een concentratie van 0,2M NaCl bleek Gc-globuline te desorberen. In deze fractie werd een zuiverheid van 17,3mg/g bekomen en is dus 4,4 keer zuiverder dan het origineel plasmastaal (Figuur 31). Indien er gewerkt werd met fractie 4-1 met een zuiverheidsgraad van 12% in plaats van fractie 2/3, zou er een zuiverheid 52,8% bekomen worden.

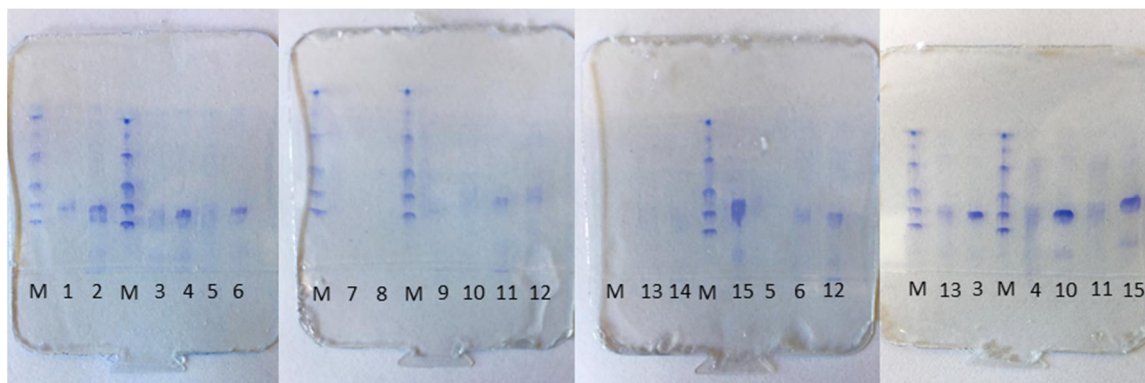


Figuur 31: Massaverhouding van Gc-globuline ten opzichte van het totale eiwitgehalte na affiniteitschromatografie voor de verschillende gels

4.6 SDS PAGE van de Cohn-fracties

De Cohn-fracties van serum en plasma werden op een polyacrylamide gel geladen om de grootte van de eiwitten in de verschillende fracties te bestuderen (Figuur 32). Tabel 5 geeft een weergave van alle stalen die overeenkomen met de getallen op de gels. De lanen van nummers 7, 8, 13 en 14 zijn geen eiwitten zichtbaar, maar ook geen broomfenolblauw. Mogelijk komt dit door een fout bij het laden van de stalen in de gels. Nummer 15 bevat een grotere, uitgesmeerde band. Dit komt doordat het zuiver Gc-globuline met een te hoge concentratie is aangebracht op de gel. De banden van nummers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12 en 13 liggen allemaal ter hoogte van nummer 15. Dit zou een indicatie kunnen zijn van de aanwezigheid van Gc-globuline met een molecuulmassa van 58kDa. Albumine ligt met een molecuulmassa van 66kDa ook in deze buurt. Het onderscheid tussen albumine en Gc-globuline bij onze stalen kan hier niet gemaakt worden wegens een te geconcentreerde vlek.

Aan de hand van de intensiteit van de kleuren kan ook een schatting gemaakt worden voor de concentratie Gc-globuline die per staal aanwezig is. Nummer 15 heeft bijvoorbeeld een donkere kleur en bevat ook zuiver Gc-globuline omdat dezelfde concentratie in elke laan werd aangebracht. Nummers 3, 4 en 10 hebben donkerdere kleur in vergelijking met andere nummers. Hier zou een hogere concentratie aan Gc-globuline aanwezig zijn. Dit komt ook overeen met de sELISA metingen uit Figuur 22.



Figuur 32: Foto van de verschillende polyacrylamidegels

Tabel 5: Overzicht met de verschillende nummers en overeenkomende stalen

Nummer	Staal
M	Eiwitladder
1	Supernatant 1 van plasma
2	Fractie 1 van plasma
3	Supernatant 2/3 van plasma
4	Fractie 2/3 van plasma
5	Supernatant 4-1 van plasma
6	Fractie 4-1 van plasma
7	Plasma
8	Supernatant 1 van serum
9	Fractie 1 van serum
10	Supernatant 2/3 van serum
11	Fractie 2/3 van serum
12	Supernatant 4-1 van serum
13	Fractie 4-1 van serum
14	Serum
15	Zuiver Gc-globuline

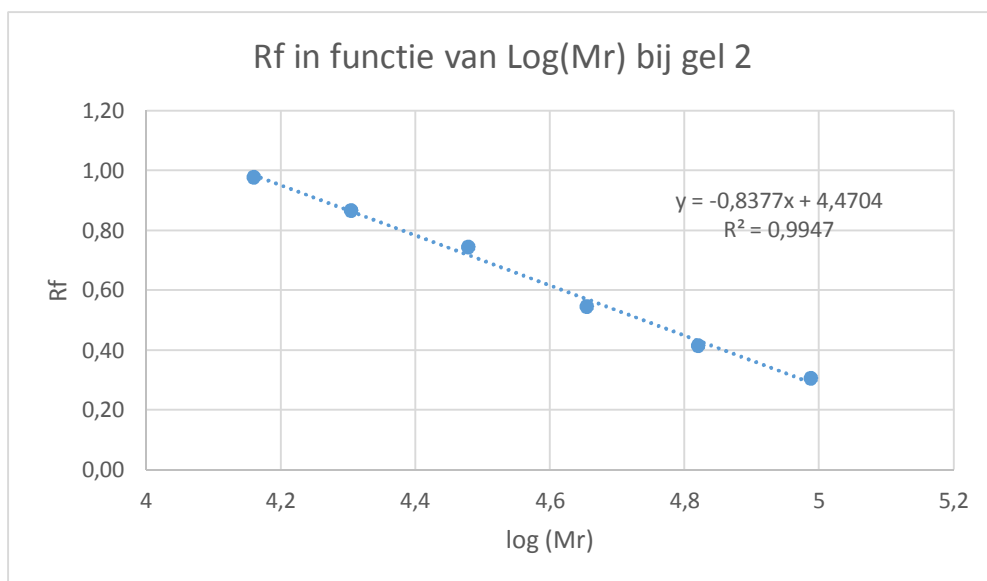
De eiwitladder die gemerkt werd met letter “M” op de foto’s bevatte een aantal eiwitten met gekende massa (Tabel 6). De Rf waarde werd berekend aan de hand van volgende formule:

$$R_f = \frac{D_x}{D_o}$$

Met D_x de afgelegde afstand van het staal in millimeter en D_o de afstand afgelegd door de kleurstof oftewel de totale afgelegde afstand in millimeter. De R_f -waarden werden uitgezet in functie het logaritme van de molecuulmassa. Per gel werd een ijklijn opgesteld voor het omrekenen van de afgelegde afstand naar een molecuulmassa.

Tabel 6: Overzicht van de eiwitten in de eiwitladder met hun molecuulmassa's

Eiwit	Molecuulmassa (Da)
Fosforylase b	97000
Albumine	66000
Ovalbumine	45000
Carbonanhydrase	30000
Trypsine inhibitor	20100
Alfa-lactalbumine	14400



Figuur 33: Rf in functie van log(Mr) als ijklijn voor de molecuulmassa's van de eiwitmerker

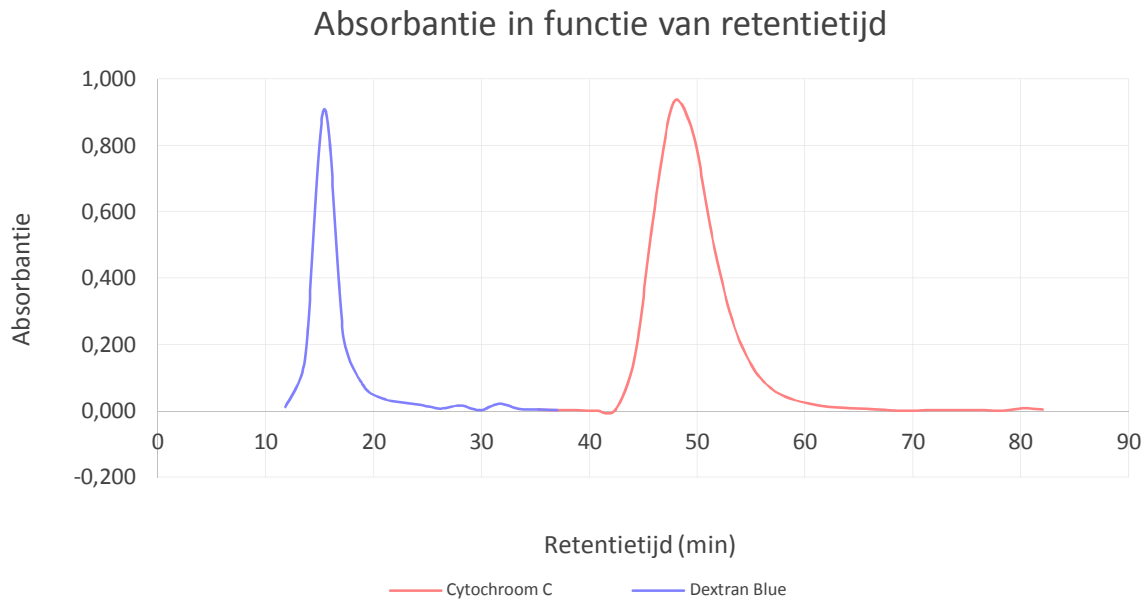
Tabel 7 geeft een overzicht van alle molecuulmassa's met bijhorende stalen. Zuiver Gc-globuline heeft een molecuulmassa van 66kDa en ligt hoger dan de theoretische waarde van 55kDa. Dit kan te maken hebben met de spreiding van de band van nummer 15 en dus een te hoge concentratie van staal 15 (Figuur 32). De band ligt niet op één specifieke plaats. Gc-globuline zou dus in een range kunnen liggen van het begin van de band tot aan het einde. Voor plasma en supernatant1 uit serum kon geen molecuulmassa berekend worden omdat hier geen band aanwezig was op de gel. De overige fracties hebben een molecuulmassa groter dan zuiver Gc-globuline. Dit zou ook een indicatie kunnen zijn van interacties van Gc-globuline met andere moleculen in het plasma/serum. Verder onderzoek moet uitwijzen welke eiwitten dit zijn.

Tabel 7: Overzicht van de gemiddelde molecuulmassa van de eiwitten in de Cohn-fracties

Naam	Mr (kDa)
Zuiver Gc-globuline	55
Plasma	/
Supernatant 1 Plasma	72
Supernatant 23 Plasma	81
Supernatant 4 Plasma	81
Fractie 1 Plasma	79
Fractie 23 Plasma	79
Fractie 4 plasma	80
Serum	92
Supernatant 1 serum	/
Supernatant 23 serum	75
Supernatant 4 serum	78
Fractie 1 serum	91
Fractie 23 serum	73
Fractie 4 serum	82

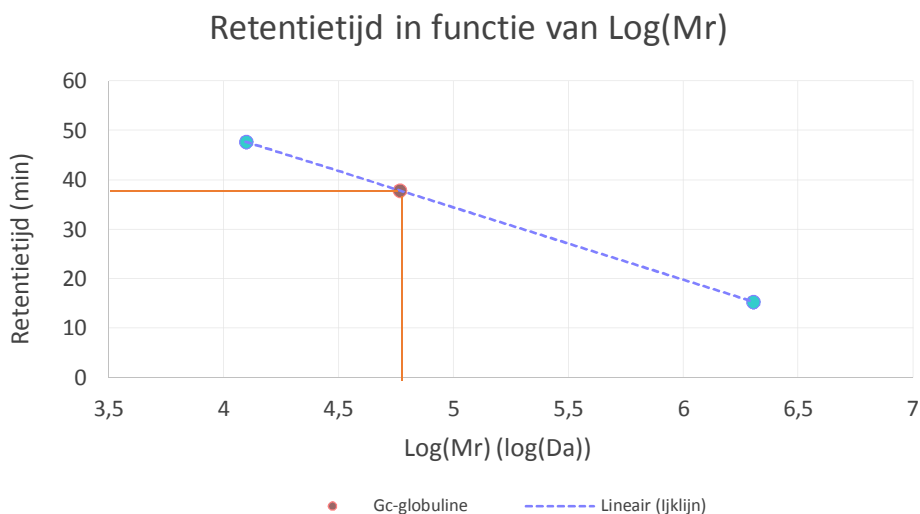
4.7 Gelchromatografie van fractie 4-1

De kolom werd gekalibreerd met een mengsel van Dextran Blue en cytochroom C. Het eluens werd opgevangen in fracties van 1,8ml en de absorbantie werd gemeten per fractie. Dextran blue werd gemeten met een golflengte van 600nm en cytochroom C met golflengte van 450nm. Zoals te zien is in Figuur 34 zijn er twee pieken te zien bij 15 en 50 minuten. Het volume waar nog geen eiwit meetbaar was, is het dode volume en bedraagt 11,8ml. Om een effectieve scheiding te realiseren moet een resolutie van minstens 1,5 behaald worden. De resolutie werd berekend en bedraagt 2,16. De scheiding van beide eiwitten was dus effectief.



Figuur 34: Absorbantie in functie van retentietijd bij het kalibreren van de kolom

Er werd een schatting gemaakt voor de retentietijd van Gc-globuline. De retentietijden van Dextran Blue en cytochroom C werden uitgezet ten opzichte van het logaritme van de toebehorende molecuulmassa's (Figuur 35). Het logaritme van de molecuulmassa werd uitgezet op de bekomen rechte en een retentietijd van 37,9 min werd berekend. Wanneer het staal op de kolom gebracht wordt, zal de fractie die Gc-globuline bevat rond een retentietijd van 37,9 min uit de kolom komen.

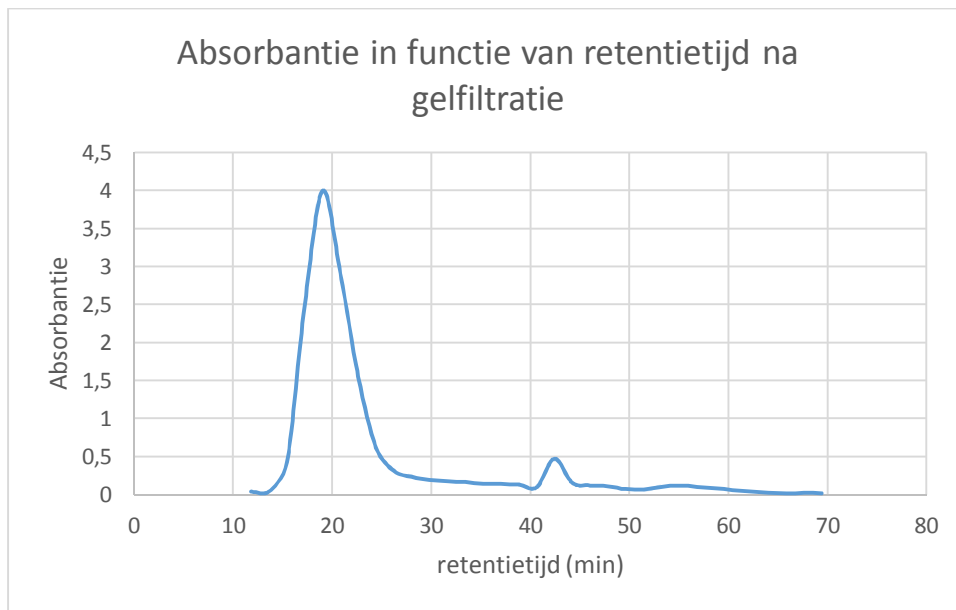


Figuur 35: De retentietijd in functie van het logaritme van de molecuulmassa

Fractie 4-1 werd op de Ultrogel kolom gebracht. Deze fractie werd gekozen omdat ze geen albumine bevat (Figuur 30) en een hogere massaverhouding Gc-globuline (Figuur 29). Albumine en Gc-globuline hebben een respectievelijke molecuulmassa van 66 kDa en 58 kDa. Deze massa's liggen dicht bij elkaar en zouden moeilijk te scheiden zijn met een massascheidingsstechniek zoals gelfiltratiechromatografie. Daarnaast is de Gc-globuline concentratie hoog genoeg zodat de signalen per fractie voor de sELISA sterk genoeg zouden zijn.

Het eluens werd opgevangen in fracties van 1,8ml. De eiwitconcentratie werd gemeten om na te gaan in welke fracties de eiwitten zijn geëluëerd. Absorbantie werd uitgezet in functie van het fractienummer (Figuur 36).

Bij fractie 4 en fractie 18 zijn twee pieken merkbaar. Fractie 5 bevat een opmerkelijk hoge absorbantie. Meeste eiwitten bevinden zich in deze fractie en hebben een grotere molecuulmassa. Aan de hand van Figuur 35 kon een gemiddelde molecuulmassa berekend worden. Fractie 4 bevat een theoretische retentietijd van 19 min en daarmee een molecuulmassa van 1136 kDa. Fractie 18 heeft een theoretische retentietijd van 42,4 min en komt hiermee in de buurt van de schatting van Gc-globuline.



Figuur 36: Absorbantie in functie van fractienummer bij gelfiltratie

Fractie 5 en 18 werden beschouwd als “interessante” fractie aangezien deze een verhoogde eiwitconcentratie bevatten. De Gc-globulineconcentratie van de fracties werd gemeten met een sELISA. Hierbij werden ook fracties genomen juist voor en juist na de pieken (Tabel 8).

De resultaten van de sELISA vertoonden echter fluctuaties. Mogelijk heeft dit te maken met de pH-waarde van het staal. De selectiviteit van gelfiltratie chromatografie kan beïnvloed worden door een lage pH-waarde en hoge zoutconcentraties. Een meer zure pH zorgt ervoor dat het oppervlak van de gel wordt aangetast. Fractie 4-1 heeft een pH-waarde van 5,2 en heeft daarmee een iets zuurdere waarde. Volgens *Ma Lin et al.* werd een Sepharose 6B kolom aangetast bij een pH van 5,4 en een ammoniumsulfaatconcentratie van 1,3M. De zouten bleken hierbij samen uit de kolom te elueren met monoamine oxidase uit konijnenplasma. In dit onderzoek werd er gewerkt met een PBS-oplossing van 0,15M. De invloed van de zoutconcentratie is dus onwaarschijnlijk, maar dit wil niet zeggen dat de pH-waarde geen effect kan hebben. Mogelijk is het oppervlak van de kolom beschadigd waardoor de selectiviteit van de kolom in gedrang is gekomen en de zoutconcentratie in sommige fracties dus verhoogd kan zijn [84]. Een te hoge zoutconcentratie heeft een negatieve invloed op een sELISA.

Fractie 18 had een absorbantie van 1,444 die bijna gelijkaardig was aan de absorbantie van fractie 4-1 (Tabel 8). 95% van de massa Gc-globuline uit fractie 4-1 zit in fractie 18. De scheiding op basis van massa geeft belovende vooruitzichten. Om de exacte zuiverheid en Gc-globulineconcentraties te meten, moet verder onderzoek gedaan worden.

Tabel 8: Overzicht van de concentratie Gc-globuline van de verschillende fracties na gelfiltratie

Naam	Absorbantie Gc-globuline	Concentratie Gc-globuline (mg/L)	Zuiverheidsgraad
Fractie 4-1	1,522	975	12%
#18	1,444	875	95%

5 Conclusie

In dit onderzoek werd er getracht om Gc-globuline op te zuiveren uit humaan plasma en humaan serum. Er werd gebruik gemaakt van het Cohn-fractioneringsproces om de scheiding tussen Gc-globuline en albumine te realiseren. De fracties werden verder opgezuiverd met affiniteitschromatografie en gelfiltratie. Daarnaast werd nog een SDS-page gedaan voor het controleren van de eiwitgrootte.

De massaverhouding van Gc-globuline ten opzichte van het totale eiwitgehalte in plasma en serum werd gemeten in de oorspronkelijke stalen en bedroeg respectievelijk 3,96 mg/g en 11,52 mg/g. Deze stalen moesten verder opgezuiverd worden aangezien de massa albumine aanzienlijk hoog was namelijk: 37,09 g in 400ml plasma en 31,25 g in 400ml serum.

Na het uitvoeren van de Cohn-fractionering werd in fractie 4-1 een Gc-globulinezuiverheid van 7,94 mg/g in serum (12% zuiverheidsgraad) en 8,86 mg/g in plasma behaald. De massa albumine daalde in fractie 4-1 tot 11,52 mg in plasma. In fractie 4-1 van het serumstaal lag de albumineconcentratie onder het laagste punt van de ijkcurve. De scheiding van Gc-globuline met albumine werd gerealiseerd in fractie 4-1.

SDS-page toonde aan dat er eiwitten aanwezig waren in de Cohn-fracties met molecuulmassa's in de buurt van de theoretische waarde van Gc-globuline.

Vergeleken met de zuiverheidsgraad van Gc-globuline in plasma is de zuiverheid van Gc-globuline tot 12% na Cohn fractionatie van serum/ plasma bekomen. Dit is echter niet voldoende voor therapeutische doeleinden.

Alternatieven voor een verdere opzuivering van Cohn fractie 4-1 zijn o.a. gelfractionatie en affiniteitschromatografie op een affiniteitsgel met geïmmobiliseerde vitamine D-metabolieten.

Na affiniteitschromatografie van fractie 2/3 uit plasma werd een massaverhouding van 17,3 mg Gc-globuline per g eiwit behaald. Ten opzichte van het originele plasmastaal is hiermee een opzuivering met een factor 4,4 verwezenlijkt. Indien deze factor echter zou toegepast worden op Cohn fractie IV met een zuiverheidsgraad van 12% zouden we wel een finale zuiverheidsgraad van 52,8% bekomen wat nog onvoldoende is voor therapeutische toepassingen maar toch een aanzienlijke verbetering is ten opzichte van de oorspronkelijke Cohn fractie 4-1.

Tenslotte kon aangetoond worden in een preliminair experiment dat de finale opzuivering van Cohn fractie 4-1 met gelfiltratie de zuiverheidsgraad van 12% in de Cohn-4 fractie tot 95% kon verbeteren wat een veelbelovend resultaat is voor toekomstig werk.

Bibliografie

- [1] J. F. MeCleod en N. E. Cooke, „The vitamin D-binding protein, alpha-fetoprotein, albumin multigene family: detection of transcripts in multiple tissues,” *Journal of biological chemistry*, pp. 21760-21769, 1988.
- [2] T. Ravnsborg, D. T. Olsen, A. Hammerich Tysen, M. Christiansen, G. Houen en P. Hojrup, „The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, pp. 909-917, 2010.
- [3] D. Feldman, W. J. Pike en J. S. Adams, Vitamin D third edition, Elsevier Science & technology, 2011.
- [4] H. Q. Sun, M. Yamamoto, M. Mejilano en H. L. Yin, „Gelsolin, a Multifunctional Actin Regulatory Protein,” *Journal of biological chemistry Vol. 274 No. 47 Issue. 19*, pp. 33179-33182, 1999.
- [5] U. Meier, O. Gressner, F. Lammert en A. M. Gressner, „Gc-Globulin: roles in response to injury,” *Clinical chemistry*, p. 1247, 2006.
- [6] I. B. Tomasic, M. C. Metcalf, A. I. Guce, N. E. Clark en S. C. Garman, „Interconversion of the specificities of human lysosomal enzymes associated with Fabry and Schindler diseases,” *The journal of biological chemistry*, pp. 21550-21566, 2010.
- [7] L. Ignoul, *Kankerscreening met Behulp van Nagalase en het Nagalase-DBP-MAF Complex*, 2019.
- [8] K. Shigeru, Y. Mochizuki, Y. Miyata, H. Kanetake en N. Yamamoto, „Effects of Vitamin D3-Binding Protein-Derived Macrophage Activating Factor (GcMAF) on Angiogenesis,” *Journal of the National Cancer Institute*, pp. 1311-1319, 2002.
- [9] N. Swamy en R. Ray, „Fatty acid-binding site environments of serum vitamin D-binding protein and albumin are different,” *Bioorganic chemistry*, pp. 165-168, 2008.
- [10] K. Mousavi Hosseini en M. Ghasemzadeh, „Implementation of Plasma Fractionation in Biological Medicines Production,” *Iranian journal of biotechnology*, pp. 213-220, 2016.
- [11] E. Ascione, L. Muscariello, V. Maiello, V. Romano, P. Giovacchini, I. Nardini en C. Farina, „A simple method for large-scale purification of plasma-derived apo-transferrin,” *Biotechnology and applied biochemistry*, pp. 87-95, 2011.
- [12] C. Huangfu, Y. Ma, M. Lv, J. Jia, X. Zhao en J. Zhang, „Purification of alpha-2 macroglobuline from Cohn fraction IV by immobilized metal affinity chromatography: a promising method for the better use of plasma,” *Journal of chromatography*, pp. 68-75, 2016.
- [13] C. Huangfu, J. Zhang, Y. Ma, J. Jia, M. Lv, X. Zhao en J. Zhang, „New process for purifying high purity alfa1-antitrypsine from Cohn fraction IV by chromatography: A promising method for the better utilisation of plasma,” *Journal of chromatography B*, pp. 156-164, 2017.

- [14] S. Rezania, D. G. Ahn en K. A. Kang, „Separation of protein C from Cohn fraction IV-1 by mini antibody,” *Advances in experimental medicine and biology*, pp. 125-131, 2007.
- [15] J. Straczek, M. Heulin, A. Chenut en A. Lasbennes, „Purification and characterization of three molecular forms of insulin-like growth factor II from human Cohn paste IV,” *Journal of chromatography*, pp. 237-248, 1990.
- [16] N. Bongaerts, *Opzuivering van Gc-globuline*, 2018.
- [17] A. S. Dusso, A. J. Brown en E. Slatopolsky, „Vitamin D,” *American Journal of Physiology - Renal Physiology volume 289*, pp. 8-28, 2005.
- [18] J. M. Lemire, „Immunomodulatory actions of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃,” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Vol. 53 No. 1-6*, pp. 599-602, 1995.
- [19] M. R. Haussler, W. G. Kerr, C. A. Haussler, J.-C. Hsieh, P. D. Thompson, S. H. Selznick, C. Encinas Dominguez en P. W. Jurutka, „The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed,” *Journal of bone and mineral research Vol. 13 Nr. 3*, pp. 325-349, 1998.
- [20] Henry en H. L., „Regulation of vitamin D metabolism,” *Best Practice & Clinical Endocrinology & Metabolism 25*, pp. 531-541, 2011.
- [21] F. Alshahrani en N. Aljohani, „Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity,” *Nutrients*, pp. 3605-3616, 2013.
- [22] R. B. Jäpelt en J. Jakobsen, „Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis,” *Frontiers in plant science*, 2013.
- [23] D. D. Bikle, „Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications,” *Cell press Volume 21 Issue 3*, pp. 319-329, 2014.
- [24] P. Chandra, L. L. Wolfenden, T. R. Ziegler, J. Tian, M. Luo, A. A. Stecenko, T. C. Chen, M. F. Holick en V. Tangpricha, „Treatment of vitamin D deficiency with UV light in patients with malabsorption syndromes: a case series,” *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, pp. 179-185, 2007.
- [25] M. F. Holick, „Vitamin D: From photosynthesis, metabolism, and action to clinical application,” *Annals of epidemiology*, pp. 73-78, 2009.
- [26] X.-Y. Bai, D. Miao, D. Goltzman en A. C. Karaplis, „The Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets R176Q Mutation in Fibroblast Growth Factor 23 Resists Proteolytic Cleavage and Enhances in Vivo Biological Potency,” *Journal of biological chemistry*, pp. 9843-9849, 2003.
- [27] A. Kutner en G. Brown, „Vitamins D: Relationships between structure and biological activity,” *Internation journal of molecular sciences vol.19 iss.7*, 2018.
- [28] P. Capuano, T. Radanovic, C. A. Wagner, D. Bacic, K. Shigeaki, Y. Uchiyama, R. St-Arnaud, H. Murer en J. Biber, „Intestinal and renal adaptation to a low-Pi diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1 α OHase-deficient mice,” *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, pp. 429-434, 2005.

- [29] F. Yang, J. M. Bergeron, L. A. Linehan, P. A. Lallet, A. Y. Sakaguchi en B. H. Bowman, „Mapping and conservation of the group-specific component gene in mouse,” *Genomics*, pp. 509-516, 1990.
- [30] J. G. J. Haddad en J. Walgate, „25-Hydroxyvitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calcifidiol-binding protein,” *The journal of Biological Chemistry*, pp. 4803-4809, 1976.
- [31] F. Schoentgen, M.-H. Metz-Boutigue, J. Jollès, J. Constans en P. Jollès, „Complete amino acid sequence of human vitamin D-binding protein (group specific component) : evidence of a three-fold internal homology as in serum albumin and alfa-fetoprotein,” *Biochimica et Biophysica*, pp. 189-198, 1986.
- [32] J. R. Delanghe, R. Speeckaert en M. M. Speeckaert, „Behind the scenes of vitamin D binding protein: More than vitamin D binding,” *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, pp. 773-786, 2015.
- [33] C. Verboven, A. Rabijns, M. De Maeyer, H. Van Baelen, R. Bouillon en C. De Ranter, „A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein,” *Nature Structural & Molecular Biology*, pp. 131-136, 2002.
- [34] H. Nagasawa, Y. Uto, H. Sasaki, N. Okamura, A. Murakami, S. Kubo, K. L. Kirk en H. Hori, „Gc protein (vitamin D binding protein): Gc genotyping and GcMAF Precursor activity,” *Anticancer research*, pp. 3689-3696, 2005.
- [35] N. Cooke, H. Willard, E. David en D. George, „Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of an associated DNA polymorphism,” *Human genetics*, 1986.
- [36] A. Braun, R. Bichlmaier en R. Cleve, „molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group specific component): allelic differences of the common genetic GC types,” *Hum Genet*, pp. 401-6, 1992.
- [37] R. F. Chun, „New perspectives on the vitamin D binding protein,” *Cell biochemistry & function*, pp. 445-456, 2012.
- [38] C. Borges, J. Jarvis, P. Oran en R. Nelson, „Population studies of Vitamin D Binding Protein microheterogeneity by mass spectrometry lead to characterization of its genotype-dependent O-glycosylation patterns,” *Journal of proteome research*, pp. 4143-4153, 2008.
- [39] M. Calvo en J. M. Ena, „Relations between vitamin D and fatty acid binding properties of vitamin D-binding protein,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 14-17, 1989.
- [40] H. Vorum, R. Brodersen, U. Kragh-Hansen en A. O. Pedersen, „Solubility of long-chain fatty acids in phosphate buffer at pH 7.4,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, pp. 135-142, 1992.
- [41] J. F. Glatz, „Lipids and lipid binding proteins: A perfect match,” *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, nr. 2015, pp. 45-49, 2014.
- [42] R. R. Schwenk, G. P. Holloway, J. J. Luiken, A. Bonen en J. F. Glatz, „Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters,” *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, pp. 149-154, 2010.

- [43] G. Trujillo, D. M. Habel, L. Ge, M. Ramadass, N. E. Cooke en R. R. Kew, „Neutrophil recruitment to the lung in both C5a- and CXCL1-induced alveolitis is impaired in vitamin D-binding protein-deficient mice,” *The journal of immunology*, pp. 848-856, 2013.
- [44] S. J. DiMartino, G. Trujillo, L. A. McVoy, J. Zhang en R. R. Kew, „Upregulation of vitamin D binding protein (Gc-globulin) binding sites during neutrophil activation from a latent reservoir in azurophil granules,” *Molecular Immunology*, pp. 2370-2377, 2007.
- [45] J. Zhang en R. R. Kew, „ Identification of a region in the vitamin D-binding protein that mediates its C5a chemotactic cofactor function,” *Journal of biological chemistry*, pp. 53282-53287, 2004.
- [46] L. A. McVoy en R. R. Kew, „CD44 and annexin A2 mediate the C5a chemotactic cofactor function of the vitamin D binding protein,” *The journal of immunology*, pp. 4754 - 4760, 2005.
- [47] U. Rescher en V. Gerke, „Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions,” *Journal of cell science*, pp. 2631 - 2639, 2004.
- [48] F. H. Epstein, „The extracellular actin scavenger system and actin toxicity,” *Mechanisms of disease*, pp. 1335-1332, 1992.
- [49] S. Dueland, M. Nenseter en C. Drevon, „Uptake and degradation of filamentous actin and vitamin D-binding protein in the rat,” *Biochemical journal*, pp. 237-241, 1991.
- [50] A. Wang, D. Schindler en R. Desnick, „Schindler disease: The molecular lesion in the alpha-N-acetylgalactosaminidase gene that causes an infantile neuroaxonal dystrophy,” *The journal of clinical investigation*, pp. 1752-1756, 1990.
- [51] S. Tsuji, T. Yamauchi, M. Hiraiwa, T. Isobe, T. Okuyama, K. Sakimura, Y. Takahashi, M. Nichisawa, Y. Uda en T. Miyatake, „Molecular cloning of a full-length cDNA for human alpha-N-acetylgalactosaminidase (alpha-galactosidase B),” *Biochemical and biophysical research communications*, pp. 1498-1504, 1989.
- [52] A. Zhu, Z. Wang en R. Beavis, „Structural Studies of a-N-Acetylgalactosaminidase: Effect of Glycosylation on the Level of Expression, Secretion Efficiency, and Enzyme Activity,” *archives of biochemistry and biophysics*, pp. 1-8, 1998.
- [53] P. T. Jr., *All About Albumin, Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, San Diego: Academic Press, 1996.
- [54] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri en S. Curry, „Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin,” *Journal of molecular biology - Volume 353 - Issue 1*, pp. 38-52, 2005.
- [55] C. van Oss, „On the mechanism of cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation,” *Journal of protein Chemistry Vol.8 No.5*, pp. 661-668, 1989.
- [56] Y. Kong, X. Li, G. Bai, G. Ma en Z. Su, „An automatic system for multidimensional integrated protein chromatography,” *Journal of chromatography A*, pp. 6898-6904, 2010.
- [57] L. Xian, X. Wu, L. Pang, M. Lou en C. J. Rosen, „Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells,” *Nature medicine Volume 18 Issue 7*, pp. 1095 - 1101, 2012.

- [58] J. Parkkinen, L. von Bonsdorff, F. Ebeling en L. Sahlstedt, „Function and therapeutic development of apotransferrin,” *Vox sanguinis*, pp. 321-326, 2002.
- [59] H. Li en Z. Qian, „Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery,” *Medicinal research reviews*, pp. 225-250, 2002.
- [60] A. van Campenhout, C. van Campenhout, A. Lagrou en B. Manuel-y-Keenoy, „Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus,” *Free radical research*, pp. 1069-1077, 2003.
- [61] P. T. Gomme en K. B. McCan, „Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions,” *Drug discoveries and therapeutics*, pp. 267 - 273, 2005.
- [62] I. Kushner, „The phenomenon of the acute phase response,” *Annals of the New York academy of sciences*, pp. 39-48, 1982.
- [63] R. Ahrends, B. Lichtner, A. Bertsch, O. Kohlbacher, H. Diana, T. Maria en H. Schlüter, „Application of displacement chromatography for the proteome analysis of a human plasma protein fraction,” *Journal of chromatography A*, pp. 3321-3329, 2010.
- [64] M. Hanna, P. Netteheim, W. Fisher, L. C. Peters en M. W. Francis, „Serum alpha globulin fraction: survival-and-recovery effect in irradiated mice,” *Science*, pp. 1458-1461, 1967.
- [65] E. Mattes, H. Mathiessen, P. Tureek en H. Schwarz, „Preparation and properties of an alpha-1-protease inhibitor concentrate with high specific activity,” *Vox Sanguinis*, pp. 29-36, 2001.
- [66] M. Brantly, T. Nukiwa en R. G. Crystal, „Molecular Basis of Alpha-1-Antitrypsin Deficiency,” *The American journal of medicine Volume 84*, pp. 13 - 31, 1988.
- [67] E. Norström en g. Escolar, „CHAPTER 36 - Natural anticoagulants and thrombophilia,” in *Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition)*, Churchill Livingstone, 2011, pp. 583 - 595.
- [68] M. Urh, D. Simpson en K. Zhao, „Affinity Chromatography: General Methods,” in *Methods in enzymology Volume 463 Guide to protein purification 2nd edition*, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2009, pp. 417-438.
- [69] TOSOH BIOSCIENCE LL, *Affinity Chromatography*, Montgomeryville Pennsylvania.
- [70] LifeSpan BioSciences, „Human Acetylcholine ELISA Kit (Sandwich ELISA) - LS-F26688,” [Online]. Available: <https://www.lsbio.com/elisakits/human-acetylcholine-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f26688/26688>. [Geopend 25 mei 2019].
- [71] S. Frasca, „Biocatalysis on nanostructured surfaces : investigation and application of redox proteins using spectro-electrochemical methods,” in *Thesis*, Potsdam, 2012.
- [72] P. Held, *Quantitation of Peptides and Amino Acids with a Synergy™HT using UV Fluorescence*, Highland Park, Vermont: BioTek Instruments, 2003.
- [73] A. Onasanya, O. Adewale, T. Obafemi, A. Ojo, A. Prebor, M. Abu, F. Omakhuale, A. Afolabi, B. Afolabi en J. Falode, „Comparison of protein yields of four protein extraction methods from leaf and seed of Moringa olifeira,” *International Journal of Applied Research and Technology*, vol. 2016, pp. 98-109, 2015.

- [74] D. Lawler, „Turbidimetry and nephelometry,” *Spectrophotometry*, vol. 2005, pp. 343-351, 2005.
- [75] A.-M. Teppo, „Immunoturbidimetry of Albumin and Immunoglobulin G in Urine,” *Clinical Chemistry Vol. 28 Iss. 6*, pp. 1359-1361, 1982.
- [76] T. Acharya, „Antigen-Antibody reactions: Agglutination and types,” Microbeonline, 20 april 2010. [Online]. Available: <https://microbeonline.com/immunology-note/>. [Geopend 25 mei 2019].
- [77] BIO-RAD, „Introduction to Polyacrylamide Gels,” BIO-RAD, [Online]. Available: <http://www.bio-rad.com/en-be/applications-technologies/introduction-polyacrylamide-gels?ID=LUSPBRM5B>. [Geopend 25 mei 2019].
- [78] MBL life science, „The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),” MBL life science, [Online]. Available: <https://www.mblbio.com/bio/g/support/method/sds-page.html>. [Geopend 25 mei 2019].
- [79] L. Hagel, „Gel-filtration chromatography,” *Current protocols in molecular biology Chapter 10 Unit 10.9*, 2001.
- [80] Darlington, „CHROMATOGRAPHY MAIN TYPES,” [Online]. Available: <http://www.adareng.com/es/articulo/chromatography-types/n-41>. [Geopend 25 mei 2019].
- [81] R. Bouillon, H. Van Baelen, W. Rombauts en P. de Moor, „The Isolation and Characterization of the Vitamin D-binding Protein from Rat Serum,” *The Journal of Biological Chemistry Vol. 253 Iss. 12*, pp. 4426-4431, 1978.
- [82] N. Swamy, A. Roy, R. Chang, M. Brisson en R. Ray, „Affinity Purification of Human Plasma Vitamin D-Binding Protein,” *Protein Expression and Purification Vol 6*, pp. 185-188, 1995.
- [83] M. Yaacobi en A. Ben-Naim, „Hydrophobic interaction in water-ethanol mixtures,” *Journal of Solution Chemistry Vol. 2 Iss. 5*, pp. 425-443, 1973.
- [84] A. W.-S. Ma Lin en D. O. Castell, „Evidence of the Importance of pH and Salt Concentration on Column Chromatography with Sepharose Gel Filtration in Separation of Proteins,” *Analytical Biochemistry Vol 86*, pp. 345-356, 1978.
- [85] F. V. Schiodt, „Gc-globulin in liver disease,” *Danish medical bulletin vol.55*, pp. 131-146, 2008.

Bijlagen

Bijlagenlijst

Bijlage 1 : Het Cohn-fractioneringsproces	71
Bijlage 2 : Affiniteitschromatografie	75
Bijlage 3 : Gc-globuline ELISA	79
Bijlage 4 : Eiwitbepaling – Spectrofotometrie	83
Bijlage 5 : Albumine antiserum turbidimetrie	85
Bijlage 6 : Phast gel SDS-PAGE	87
Bijlage 7 : Gelfiltratie chromatografie	93

5.1 Bijlage 1 : Het Cohn-fractioneringsproces

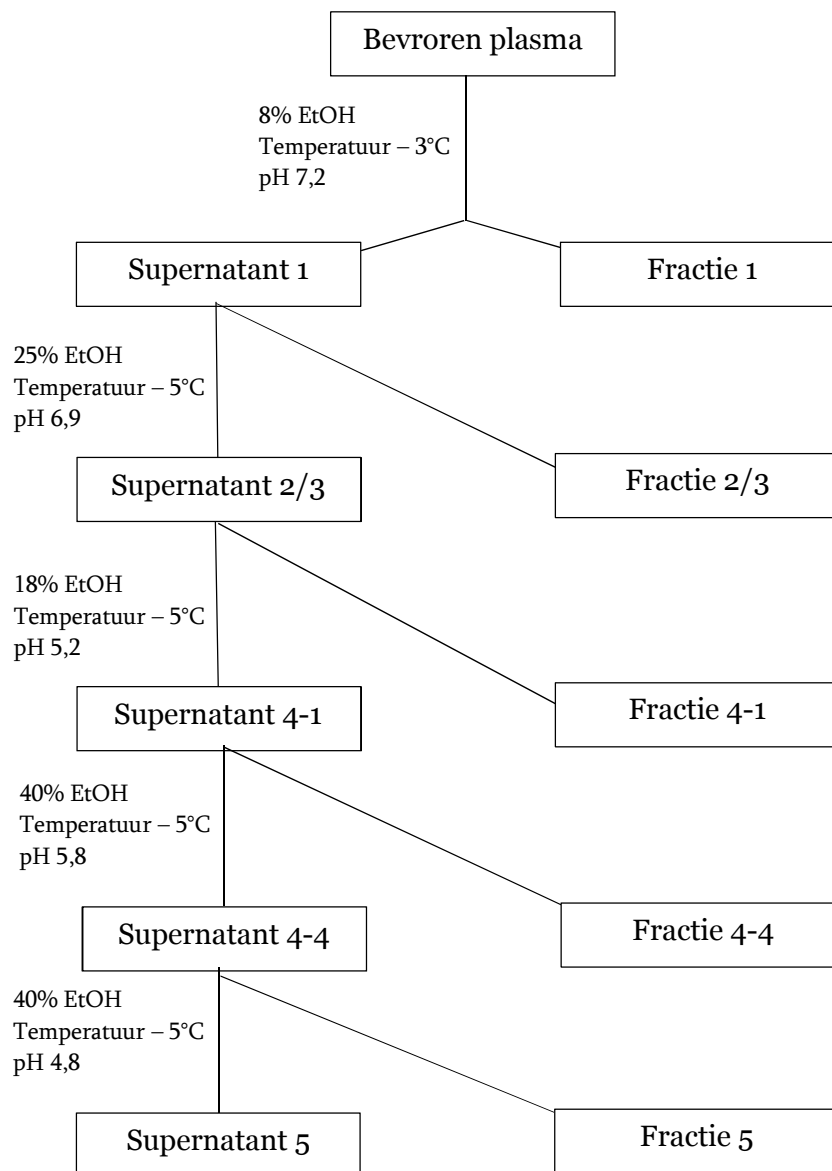
Benodigheden

- Gecitreerd plasma
- Gedemineraliseerd water
- EtOH 98,8%

- EtOH 53,3%
 - o 534 ml 99,8% EtOH
 - o 466 ml H₂O
- 4M Natriumacetaat (NaAc)
 - o 54,432g NaAc
 - o 100ml H₂O
- 10M Azijnzuur (HAc)
 - o
- NaAc/HAc-buffer
 - o 50ml NaAc
 - o 100ml HAc
 - o 100ml H₂O

- pH-sensor/pH-strips
- centrifuge met koeling tot -5 °C

Schema



Werkwijze

Fractie 1

- 1) Stel koudwaterbad en centrifuge in op -3°C
- 2) Neem plasma uit diepvriezer en breng al roerend naar 0°C
- 3) Pipetteer 400 ml plasma in een centrifugefles
- 4) Voeg 70,8 ml 53,3% EtOH toe en 0,4 ml NaAc/HAc-buffer toe
- 5) Controleer pH ($7,2 \pm 0,2$)
 - a. pH te hoog? \rightarrow NaAc/Hac buffer toevoegen tot pH = 7,2
 - b. pH te laag? \rightarrow 4M NaAc toevoegen tot pH = 7,2
- 6) Mengen en laat 1,5u – 2u rusten op -3°C in koudwaterbad of centrifuge (enkel voor koeling)
- 7) Zet de fles in de centrifuge
 - a. $t = 2\text{h}$, $T = -3^{\circ}\text{C}$ en $g = 1500\text{ rcf}$
- 8) Neem fles uit centrifuge en breng in koudwaterbad
- 9) Extraheer 300 ml **supernatant 1** in een andere fles
 - a. Breng ook 1ml **supernatant 1** in een 2ml epje voor verdere metingen
 - b. Extraheer **fractie 1** (bezinksel) en breng in een 2ml epje voor verdere metingen
- 10) Zet de fles met **supernatant 1** in centrifuge of koudwaterbad op -3°C voor bewaring

Fractie 2/3

- 1) Stel koudwaterbad en centrifuge in op -5°C
- 2) Breng de fles met **supernatant 1** in het koudwaterbad en wacht tot $T = -5^{\circ}\text{C}$
- 3) Wanneer $T = -5^{\circ}\text{C}$, voeg volgende producten toe:
 - a. 180,3 ml 53,3% EtOH
 - b. 0,26 ml 10M HAc
 - c. 0,13ml 4M NaAc
 - d. 0,66 ml 98,8% EtOH
- 4) Controleer als pH = 6,9
 - a. pH te hoog? \rightarrow NaAc/Hac buffer toevoegen tot pH = 6,9
 - b. pH te laag? \rightarrow 4M NaAc toevoegen tot pH = 6,9
- 5) Mengen en laat 5 uur staan op $T = -5^{\circ}\text{C}$
- 6) Zet de fles met **supernatant 1** in de centrifuge, met tegengewicht
 - a. $t = 2\text{h}$, $T = -5^{\circ}\text{C}$ en $g = 1500\text{ rcf}$
- 7) Neem fles uit centrifuge en breng in koudwaterbad
- 8) Extraheer 300 ml **supernatant 2/3** in een andere fles
 - a. Breng ook 1ml supernatant in een 2ml epje voor verdere metingen
 - b. Extraheer fractie 2/3 (bezinksel) en breng in een 2ml epje voor verdere metingen
 - c. Zet beide epjes in de diepvries (-20°C) voor bewaring
- 9) Zet de fles met **supernatant 2/3** in centrifuge of koudwaterbad op -5°C voor bewaring

Fractie 4-1

- 1) Stel koudwaterbad en koudwaterbad in op -5°C
- 2) Breng de fles met supernatant 2/3 in het koudwaterbad
- 3) Wanneer $T = -5^{\circ}\text{C}$ voeg volgende producten toe
 - a. 93,3 ml H_2O (311ml per L plasma)
 - b. Meet de pH en voeg NaAc/HAc buffer toe tot $\text{pH} = 5,2$, noteer het aantal ml toegevoegd
 - c. Voeg (**23,4 – (... ml NaAc/HAc buffer in b)**) ml H_2O toe
- 4) Controleer $\text{pH} = 5,2$
- 5) Meng 1 uur op -5°C
- 6) Laat 6 uur tot 8 uur rusten op -5°C
- 7) Zet de fles met **supernatant 2/3** in de centrifuge, met tegengewicht
 - a. $t = 2\text{h}$, $T = -5^{\circ}\text{C}$ en $g = 1500\text{ rcf}$
- 8) Neem fles uit centrifuge en zet in koudwaterbad
- 9) Extraheer het **supernatant 4-1** in een andere fles
 - a. Breng ook 1ml **supernatant 4-1** in een 2ml epje voor verdere metingen
 - b. Extraheer **fractie 4-1** (bezinksel) en breng in een 2ml epje voor verdere metingen
 - c. Zet beide epjes in de diepvries (-20°C) voor bewaring
- 10) Schudt de fles met supernatant 4-1 af in een beker zodat fractie 4-1 overblijft

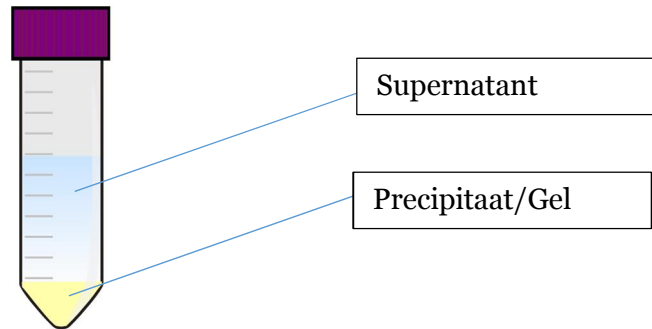
5.2 Bijlage 2: Affiniteitschromatografie

Materialen

- Cohn fractie 2/3
 - o Onverdund
- 0,2M NaCl
 - o 0,935 g NaCl
 - o 80ml gedemineraliseerd water
- 0,4M NaCl
 - o 1,870 g NaCl
 - o 80ml gedemineraliseerd water
- 0,6M NaCl
 - o 2,805 g NaCl
 - o 80ml gedemineraliseerd water
- 0,8M NaCl
 - o 3,740 g NaCl
 - o 80ml gedemineraliseerd water
- 1M NaCl
 - o 4,675 g NaCl
 - o 80ml gedemineraliseerd water
- 1,2M NaCl
 - o 5,610 g NaCl
 - o 80ml gedemineraliseerd water
- PBS 0,15M
 - o 16,013g NaCl
 - o 4,026g KCl
 - o 2,643g Na₂HPO₄·2H₂O
 - o 0,408g KH₂PO₄
 - o 2L gedemineraliseerd water
- PBS 0,03M
 - o 200ml PBS 0,15M
 - o 800ml gedemineraliseerd water

Werkwijze

- 1) Fractie 2/3 van de Cohn-fractionering wordt gebruikt om de kolommen te testen
- 2) Breng 20ml van de fractie in een flesje samen met de gel
- 3) Breng het flesje overnacht op een buizenroller zodat contact van het staal met de gel optimaal is
- 4) Centrifugeer de gel op 200g gedurende 15 minuten en wacht hierna tot er geen korrels meer zichtbaar zijn in het supernatant
- 5) Pipetteer het supernatant af en breng over in een ander flesje voor opslag



- 6) De gel blijft over als precipitaat in het flesje
- 7) Voeg hieraan 40ml 0,03M PBS toe om te wassen
- 8) Incubeer 15 minuten op de buizenroller
- 9) Centrifugeer 15 minuten op 200g
- 10) Pipetteer het supernatant af en breng over in een ander flesje voor opslag
- 11) Herhaal vanaf stap 5 tot het supernatant helder is, indien het helder is, ga verder naar stap 12
- 12) Voeg 15ml van een 0,2M NaCl-oplossing toe
- 13) Incubeer 15 minuten op de buizenroller
- 14) Centrifugeer 15 minuten op 200g
- 15) Pipetteer het supernatant af en breng over in een ander flesje voor opslag
- 16) Herhaal vanaf stap 12, maar nu met zoutoplossingen van respectievelijk 0,4M; 0,6M; 0,8M; 1M en 1,2M
- 17) Voeg hierna opnieuw 40ml 0,03M PBS toe om te wassen
- 18) Incubeer 15 minuten op de buizenroller
- 19) Centrifugeer 15 minuten op 200g
- 20) Pipetteer het supernatant af en breng over in een ander flesje voor opslag
- 21) Herhaal vanaf stap 17 nog enkele keren

!!! Indien het proces niet in één keer kan doorlopen worden, dan moet er 40ml 0,03M PBS toegevoegd worden. Deze oplossing moet overnacht op de buizenroller worden gezet en wordt dan gezien als extra wasstap.

Overzicht

Stap	Oplossing toegevoegd
1	0,03M PBS (wassen)
2	0,03M PBS (wassen)
3	0,2M NaCl
4	0,4M NaCl
5	0,6M NaCl
6	0,8M NaCl
7	1M NaCl
8	1,2M NaCl
9	0,03M PBS (wassen)
10	0,03M PBS (wassen)
11	0,03M PBS (wassen)

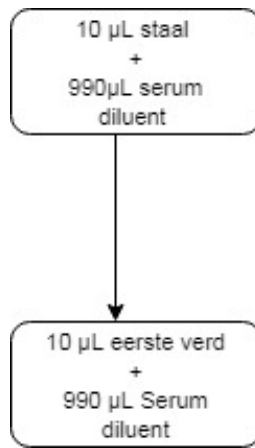
5.3 Bijlage 3: Gc-globuline ELISA

Benodigdheden

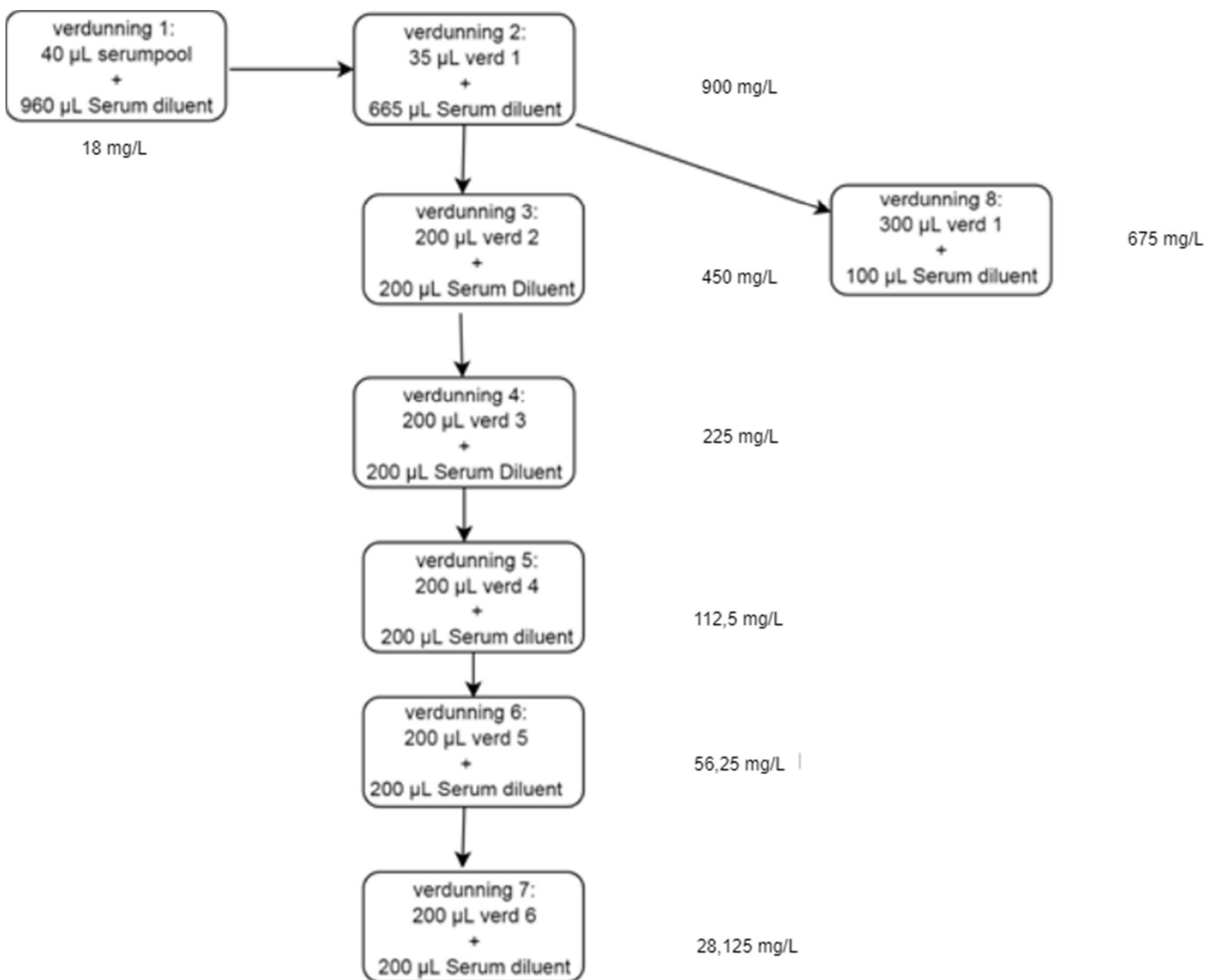
- coating buffer (1l)
 - 8,18 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
 - 6 g NaHCO_3
- washsolution (2l)
 - 16,013 g NaCl
 - 4,026 g KCl
 - 2,643 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,408 g KH_2PO_4
 - 1 ml TWEEN-20®
- reagent diluent
 - 10 ml TWEEN-20®
 - 190 ml PBS
- substraatoplossing
 - TMB Microwell Peroxidase Substrate System 1:1
- stopsolution
 - 0,2 M 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 200 keer in coating buffer
 - a. 75 μl Capture Ab in 14,925 ml coatingbuffer
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 1u op kamertemp
 - a. 5% Tween van Merck in
7. was de plaat 3x met washsolution
8. verdun het serumstaal (gefiltreerd en niet gefiltreerd) 10 000 keer



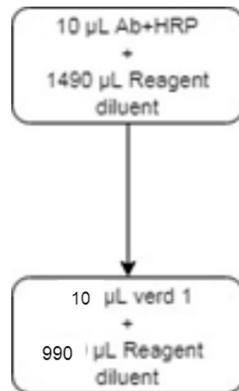
9. maak de standaardreeks voor de ijklijn



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 Ab-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. pipetteer 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

5.4 Bijlage 4: Eiwitbepaling - spectrofotometrie

Materialen

- Gedemineraliseerd water
- UV cuvet
- Spectrofotometer

Werkwijze

- 1) Pipetteer 200µl van het blanco staal (afhankelijk van waarin het staal is opgelost, serumdiluent of PBS) in een UV-cuvet
- 2) Breng de cuvet in de spectrofotometer en duw op het knopje met blanco, de stalen worden nu gemeten ten opzichte van deze blanco bij 280nm
- 3) Haal de cuvet uit de spectrofotometer en was deze uit met gedemineraliseerd water
- 4) Pipetteer 200µl van het te meten staal in de cuvet en meet de absorbantie bij 280nm
- 5) Haal de cuvet uit de spectrofotometer en was deze uit met gedemineraliseerd water
- 6) Herhaal vanaf stap 4 voor de te meten stalen

Er kan een standaard opgesteld worden met runder serum albumine om zo een waarde voor eiwitconcentratie aan de stalen te geven.

5.5 Bijlage 5: Albumine antiserum turbidimetrie

Benodigheden

- 96 well plaat
- Staal
- Albumine AUT kit
 - o PEG buffer
 - o Albumine antiserum
- Victor Multilabel Platereader

Werkwijze

- 1) Voeg 1,5 μ L staal in een well
- 2) Voeg 150 μ L staal toe in de well
- 3) Meet de turbiditeit bij 340nm
- 4) Voeg 15 μ L antiserum toe
- 5) Zet de plaat in de multilabel platereader en laat 5 minuten schudden
- 6) Meet de turbiditeit bij 340nm in tijdsintervallen van 5 minuten tot en met 30 minuten
- 7) Controleer of de laatste twee metingen constant zijn

5.6 Bijlage 6: Phast gel SDS-PAGE

Reagentia

- **0,5 M Tris-HCl pH 6,8**
 - o (bewaar op 4°C): los 6 g Tris op in ± 60 ml ged. H₂O; breng op pH 6,8 met HCl_{conc} (onder de ZK) en leng aan tot 100 ml
- **Ladings- of lysisbuffer** : bereid onder de trekkast en bewaar op kamertemperatuur:

	Totaal volume: 8,00 ml
ged. H ₂ O	4,00 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,00 ml
glycerol	0,80 ml
10 m/V% SDS	1,60 ml
β-mercaptoethanol	0,40 ml
0,5 m/V% broomfenolblauw	0,20 ml

- **Kleuroplossing:**

0,1 m/V% PhastGel Blue R oplossing in 30 v/V% methanol en 10 v/V% CH₃COOH in ged. water wordt als volgt bereid.

Stockoplossing: los 1 tablet PhastGel Blue R op in 80 ml ged. water en roer 5 tot 10 minuten. Voeg 120 ml methanol toe en roer 2 tot 3 minuten.

Dit geeft een 0,2 m/V% oplossing.

Finale kleuroplossing: meng één deel (= 100 ml) gefilterde stockoplossing met één deel (= 100 ml) 20 v/V% CH₃COOH in ged. water.

Bewaar deze oplossing in de frigo.

- **Ontkleuringsoplossing:**

30 v/V% methanol en 10 v/V% CH₃COOH in ged. water. Bereid 1 liter. 300 ml van deze oplossing is voldoende om de kamer 3x te vullen.

- **Bewaaroplossing:**

5 v/V% glycerol en 10 v/V% CH₃COOH in ged. water. Bereid 1000 ml van deze oplossing.

Deze oplossing zorgt ervoor dat de gels flexibel blijven en niet breken tijdens het bewaren. Deze oplossing is niet te hergebruiken.

Staalvoorbereiding

Doe dit onder de trekkast, de ladingsbuffer bevat immers een mercaptaan.

- Voor de **onbekende eiwitstalen** : meng 100 μl fractie met 300 μl ladingsbuffer in een epje.
- Voor de **LMW-merker** (deze bevat eiwitten met gekende MM: Pharmacia): één vial bevat 575 μg . Voeg hieraan in een epje 200 μl ladingsbuffer toe; schud zachtjes tot alles opgelost is.

Doorprik de dekseltjes van alle epjes. Plaats alle epjes in een isomhoudertje en zet het in een kokend waterbad gedurende 10 minuten. Laat het geheel afkoelen.

Stalen laden

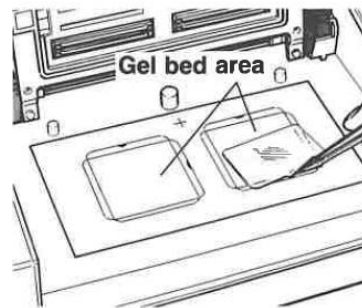
- Pipetteer onder de trekkast, even voordat de elektroforese gestart wordt, op een 'sample-well' (bedekt met parafilm) 3 μl van alle stalen.
- Zuig met de gepaste applicator (kam) 1 μl van de stalen op.

Klaarmaken van het gelcompartiment

1. Breng een druppel H_2O op de plaat in het midden van het gelbed-oppervlak.

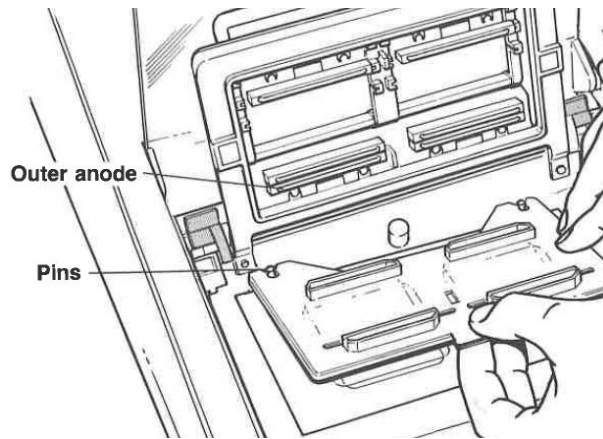
Let op: draag handschoenen als je gels manipuleert (want ongepolymeriseerd acrylamide is neurotoxisch). En neem de gel steeds vast met het lipje.

2. Knip de gel uit de verpakking, en positioneer met de hulp van een pincet de gel met haar plastic-kant op de gelplaat perfect binnen de rode lijnen.



Zorg ervoor dat de luchtbelletjes tussen de gel en gelplaat verdwenen zijn door een lichte druk uit te oefenen op de folie-kant. Zuig het overtollig water op dat zich buiten de lijnen bevindt met stofvrij papier. Indien geen tweede gel mee gerund wordt moet ook die plaat droog zijn.

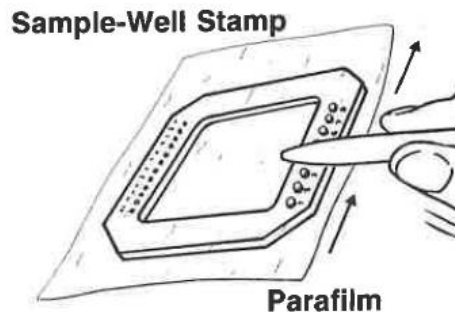
3. Neem voorzichtig de folie van het gel met een pincet.
4. Plaats de plastic bufferstriphouder er op.



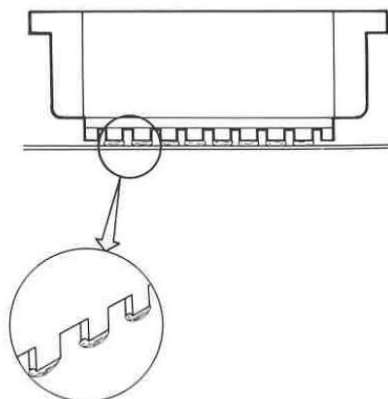
5. Knip twee bufferstrips uit hun verpakking en duw ze in de uitsparingen. Draag handschoenen (om bevuilding van de elektroden met eiwitten van de vingers te vermijden).
6. Breng vervolgens langzaam de elektroden (anode en kathode, niet met de vingers aanraken) tegen de bufferstrips.
7. Laat de staalapplicator-arm zakken.

Klaarmaken van de staalapplicator

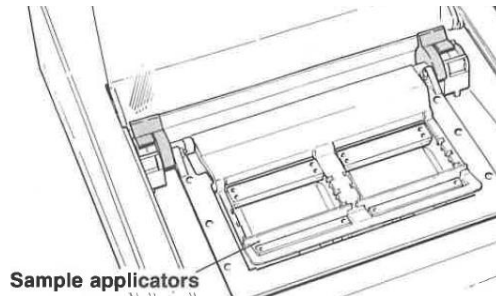
8. Breng parafilm op één zijde van de zwarte plastic plaat met welletjes (welke zijde is afhankelijk van het aantal stalen) en druk lichtjes aan met een pincet. Breng ongeveer 3 μ l staal in elk welletje, vermijd luchtballen.



9. Zuig met de overeenkomstige applicator via capillariteit de stalen op. Vermijd dat staal aan de buitenzijde van de kammetjes hangt.



10. Hang de staalapplicator in de allereerste uitsparing van de elektroforesecel (= kathodekant) en sluit de elektroforesecel.



Starten van de elektroforese = separation (duur = ± 25 min)

11. Druk op “SEP start/stop”. Geef aan of je 1 of 2 gels laat lopen en bevestig met “do” (rode toets).
12. Geef het nummer van de geprogrammeerde separation-methode in. **Let op dit is verschillend voor beide toestellen!**. Bevestig met “do”.

	<u>Phast System linkerkant</u>	<u>Phast System rechterkant (Canada)</u>
Separation methode	nr. 3	nr. 8

13. De elektroforese start als het gelbed gekoeld is tot 15°C. Het apparaat geeft een alarmgeluid om het einde van de elektroforese aan te geven. Controleer wel eerst of de stalen voldoende ver gemigreerd zijn (= frontlijn aangegeven door broomfenolblauw), indien niet laat nog even verder elektroforeseren.
14. Stop de elektroforese met een druk op de “SEP start/stop”-knop en bevestig met “do”.

Ontwikkelen van de gel = development (duur = ± 45 min + 5 min voorbereiding)

Let op: de development unit van het toestel aan de rechterkant (Canada) mag enkel via de transformator verbonden worden aan het stopcontact, anders branden contacten door!

15. Verbind de separation unit met de development unit via de interface-kabel.
16. Breng de slangetjes in de juiste flessen. **Let op dit is verschillende voor beide toestellen:**

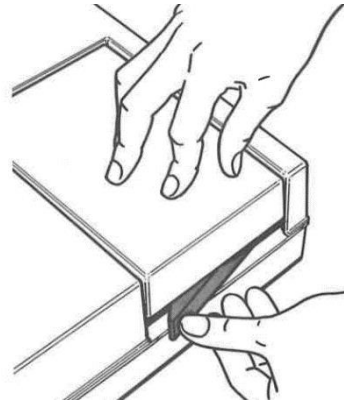
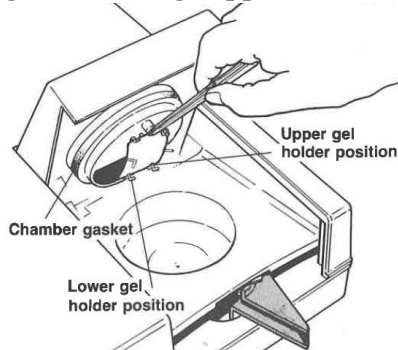
	<u>Phast System linkerkant</u>	<u>Phast System rechterkant (Canada)</u>
Kleuroplossing	nr. 7	nr. 4
Ontkleuringsoplossing	nr. 8	nr. 5
Fixeer- of bewaaroplossing	nr. 3	nr. 9
Afvalfles	nr. 0	nr. 0

Van de kleuroplossing moet minstens 100 ml aanwezig zijn in de fles, van de ontcleuringsoplossing minstens 300 ml en van de bewaaroplossing minstens 100 ml.

17. Sluit de flessen af met parafilm.

18. Verwijder met hulp van een pincet de gel van het gelbed via het lipje.

19. Hang de bovenste gel met haar geloppervlak naar beneden in de kleurkamer en de onderste gel met haar geloppervlak naar boven. Sluit de kleurkamer.



20. Druk op “DEV start/stop” en geef het nummer van de geprogrammeerde development-methode in. **Let op dit is verschillend voor beide toestellen!**
Bevestig met “do”.

	Phast System linkerkant	Phast System rechterkant (Canada)
Development methode	nr. 3	nr. 8

21. Het einde van de development-methode wordt aangegeven (METHOD ... DONE). Schakel het apparaat uit aan de achterzijde en trek de stekkers uit de stopcontacten.

22. Haal de slangetjes uit de flessen, veeg ze droog aan de buitenzijde en sluit ze af met parafilm. Sluit de flessen af met hun stop.

23. Haal de gel(s) uit de kleurkamer.

24. De gels moeten onmiddellijk gedroogd worden om achtergrondstoring te vermijden. Droog daarom de plastic-zijde (om bevuilding met stof te vermijden) van de gel een paar minuten met lauwe lucht van een haardroger. Aan de lucht drogen duurt een 4-tal uren.

25. Maak een foto van de gel en plaats dit in het verslag. Meet onmiddellijk migratieafstanden op.

5.7 Bijlage 7: Gelfiltratie chromatografie

Benodigdheden

- PBS 0,15M
 - o 16,013g NaCl
 - o 4,026g KCl
 - o 2,643g Na₂HPO₄·2H₂O
 - o 0,408g KH₂PO₄
 - o 2L gedemineraliseerd water

- Ultrogel Aca 44 kolom
- Bio-Rad Fractiecollector
- P50 Pomp (Pharma Biotech)
- Dextran Blue en Cytochroom C
- Maatbeker

Werkwijze

- 1) Spoel de kolom met PBS met een flow van 1ml/min totdat 3X het kolomvolume is geëluëerd, doe het uiteinde van de kolom hiervoor in een maatbeker
- 2) Laat PBS uit de kolom lopen totdat er geen PBS meer op de bovenste gellaag te zien is
- 3) Open de het bovenste sluitstuk van de kolom
- 4) Breng het staal in de kolom met behulp van een pipet, zorg ervoor dat dit rustig gebeurt en de korrels niet naar boven komen
- 5) Wacht tot het staal is gezakt en opnieuw de bovenste gellaag zichtbaar is
- 6) Voeg 2ml PBS toe met behulp van een pipet
- 7) Sluit de kolom met het sluitstuk en zet de flowsnelheid op 1ml/min
- 8) Sluit het uiteinde van de kolom aan op de fractiecollector
- 9) Zet de fractiecollector op fracties per 2 minuten en duw op RUN
- 10) Wacht tot de langste retentietijd behaald is (berekend na kalibratie met Dextran Blue en Cytochroom C)
- 11) Breng het uiteinde van de kolom terug in de maatbeker
- 12) Spoel de kolom met PBS tot 3X het kolomvolume
- 13) Sluit het kraantje onderaan de kolom
 - a. Zorg ervoor dat er ongeveer 2ml bovenop de gel staat vooraleer het kraantje te sluiten
- 14) Zet de pomp uit
- 15) Haal het buisje boven uit het sluitstuk en draai het dopje van het sluitstuk er op

! Bij iedere aanpassing aan de kolom dient de pomp uitgezet te worden en het kraantje onderaan de kolom dichtgedraaid te worden