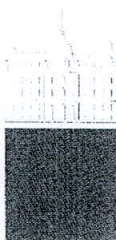


Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta
Vrazov trg 2
1000 Ljubljana



Štev.: 036 – 1 - 18 /05
Datum: 18. 1. 2006
21. 9. 2015

Zadeva: sklep senata ULMF- doktorat v obliki člankov

Senat Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani je na seji dne 3. 10. 2005 oblikoval navodila za doktorat v obliki člankov.

Povzemamo sklep senata UL MF:

»Doktorat mora zajemati minimalno tri članke s prvim avtorstvom. Članki morajo biti objavljeni v reviji, indeksirani v SCI z IF. Vsi objavljeni članki morajo obravnavati temo, ki je zaokrožena celota in oblikovanje naslova ne more predstavljati problema. Delež soavtorstva ni potrebno opredeljevati, ker je avtor doktorata tudi prvi avtor pri člankih. Neobjavljeni članki se v doktorsko disertacijo ne morejo postaviti. Avtor doktorskega dela lahko svoje rezultate raziskav, ki jih še ni objavil doda v tekstu doktorata. Ker morajo članki predstavljati zaokroženo vsebinsko celoto se pripravi skupni uvod in povzetek in ne pri posameznem članku.«

Sklep Komisije za doktorate ULMF (seja 21. 9. 2015)

SKLEP št. 1: Navodilu se doda interpretacija, da je lahko eden od člankov, vključen v doktorsko disertacijo, sprejet v objavo (»Epub ahead of print« in dostopen v elektronski publikaciji]. Doktorand mora v tem primeru pridobiti soglasje uredništva revije, da bo članek pred objavo v reviji že vključen v doktorsko disertacijo in s tem dostopen javnosti.



Dekan
Prof. dr. Dušan Šuput, dr. med., l.r.



Ljubljana, 27.3.1995

**NAVODILA ZA OBLIKOVANJE PUBLIKACIJE – MONOGRAFIJE Z NASLOVOM
DOKTORSKE DISERTACIJE** (Sprejeto na seji ZPS MF 19.12.1994)

1. Naslovna stran (ovojnica):

Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta

Zgoraj: naslov doktorske disertacije v slovenščini in pod tem v angleščini
Desno spodaj: ime in priimek avtorja
kraj in leto

2. Prva stran:

Zgoraj: naslov doktorske disertacije
Spodaj: ISBN (v primeru, da je publikacija v večjem obsegu namenjena javnosti)
Ključne besede (deskriptorji)

3. Druga stran:

Kolefon

4. Tretja stran:

Zgoraj: navedba: UNIVERZA V LJUBLJANI
MEDICINSKA FAKULTETA
Sredina: - najprej navedba: doktorsko delo
- nato naslov disertacije v slovenščini (poudarjen tisk) in pod tem v angleščini (navaden tisk)
Spodaj: - ime in priimek avtorja z akademskimi nazivi (poudarjen tisk, npr.: **mag. XY, dr. med.**)
- nato datum zagovora (npr.: Ljubljana, maj 1994)

5. Četrta stran:

Zgoraj: - Ime in priimek mentorja z akademskimi nazivi in polnim naslovom
- Ime in priimek somentorja z akademskimi nazivi in polnim naslovom
- Člani komisije za oceno (recenzenti)
Spodaj: ISBN:
Pod ISBN navedba (v slovenščini in angleščini) kdo je delo (so)financiral in kdo je pomagal pri izdaji publikacije.

6. Peta stran:

Desno spodaj: posvetilo.

7. Šesta stran:

Prazna

8. Sedma stran:

Zahvala v slovenščini in angleščini

9. Osmo stran:

Prazna

10. Od 9. strani dalje:

Vsebina (kazalo) v slovenščini in angleščini:

- Povzetek /Short summary/
- Predstavitev hipoteze /Outline of the thesis/
- Uporabljene metode /Methods used/
- Poglavlja: npr. Poglavlje 1 /Chapter 1/
Naslov članka v slovenščini
Naslov članka v angleščini
- Pregled in sklepne misli /Overview and general conclusions/
- Skupni seznam citirane literature /General list of references/
- Biografija avtorja /Curriculum vitae/
- Bibliografija avtorja /List of publications/

11. Vsako poglavje je članek (objavljen ali sprejet v tisk). Naslov članka, avtorji in naslov publikacije so objavljeni na posebnem listu, vedno na knjižni desni strani. Nato se na naslednjem listu, ponovno na knjižni desni strani prične članek. Če je članek v tujem jeziku mora za tujim imeti še slovenski povzetek oz. če je članek v slovenščini, mora za slovenskim slediti angleški povzetek.

Opomba: Izjava avtorja, da člankov ni uporabil za doktorsko disertacijo nihče od preostalih soavtorjev pri člankih.

12. Oblikovanje publikacije:

Priporočamo format 16,5 X 24 cm.

Strani, ki sledijo Vsebini (kazalu) naj imajo zgoraj naslednje oznake:

- Vsaka leva stran: Ime in priimek avtorja ter skrajšan oz. tekoči naslov doktorskega dela
- Vsaka desna stran: Številka poglavja (npr.: Poglavlje 1 / Chapter 1/)

Številčenje strani:

- Spodaj, pod besedilom. Številčenje se prične šele s Kratkim povzetkom / Short Summary/ (številka strani: 11).

Na novem listu nato sledi, na knjižni desni strani, Poglavlje 1 / Chapter 1/ (naslovni list), nato na novem listu ponovno na knjižni desni strani poglavje članek.

Hrbtina stran publikacije:

- Desno: naslov dela
- Levo: ime (kratica) in priimek avtorja

Opomba: Kot vzorec za oblikovanje so priložene fotokopije nekaterih strani iz doktorata dr. B. Božiča, ki je svojo disertacijo že oblikoval v skladu s predlaganimi navodili.

Komisija za doktorate
Znanstveno pedagoški svet

**Podrobna specifičnost in pomen avtoprotiteles proti
proteinom ribonukleoproteinskega delca Ro
in fosfolipidom**

ISBN: 90-9004473-6

**Ključne besede
(deskriptorji)**

Borut Božič
Podrobna specifičnost ...

grafična oprema
B.B.

tisk in vezava
Ofset Medvode

.natisnjeno v 50 izvodih

Kopiranje za javno uporabo je dovoljeno le s soglasjem avtorja oziroma izvirnega vira objave (revije).
To velja za kopiranje v vsakršni obliki ali tehniki tako teksta kot slikovnega materiala deloma ali v celoti.

UNIVERZA V LJUBLJANI
MEDICINSKA FAKULTETA

doktorsko delo

**Podrobna specifičnost in pomen avtoprotiteles proti
proteinom ribonukleoproteinskega delca Ro
in fosfolipidom**

The fine specificity and significance of autoantibodies against
proteins of the ribonucleoprotein particle Ro
and phospholipids

mag.sc. BORUT BOŽIČ dipl.ing.pharm

Ljubljana maj 1994.

Mentor: prof. dr. Blaž Rozman, dr.med.
Klinični center, Revmatološka klinika, Ljubljana, Slovenija
Komentor: Ass. Prof. Dr. Walther J. van Venrooij, Ph.D.
University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands

Recenzenti:

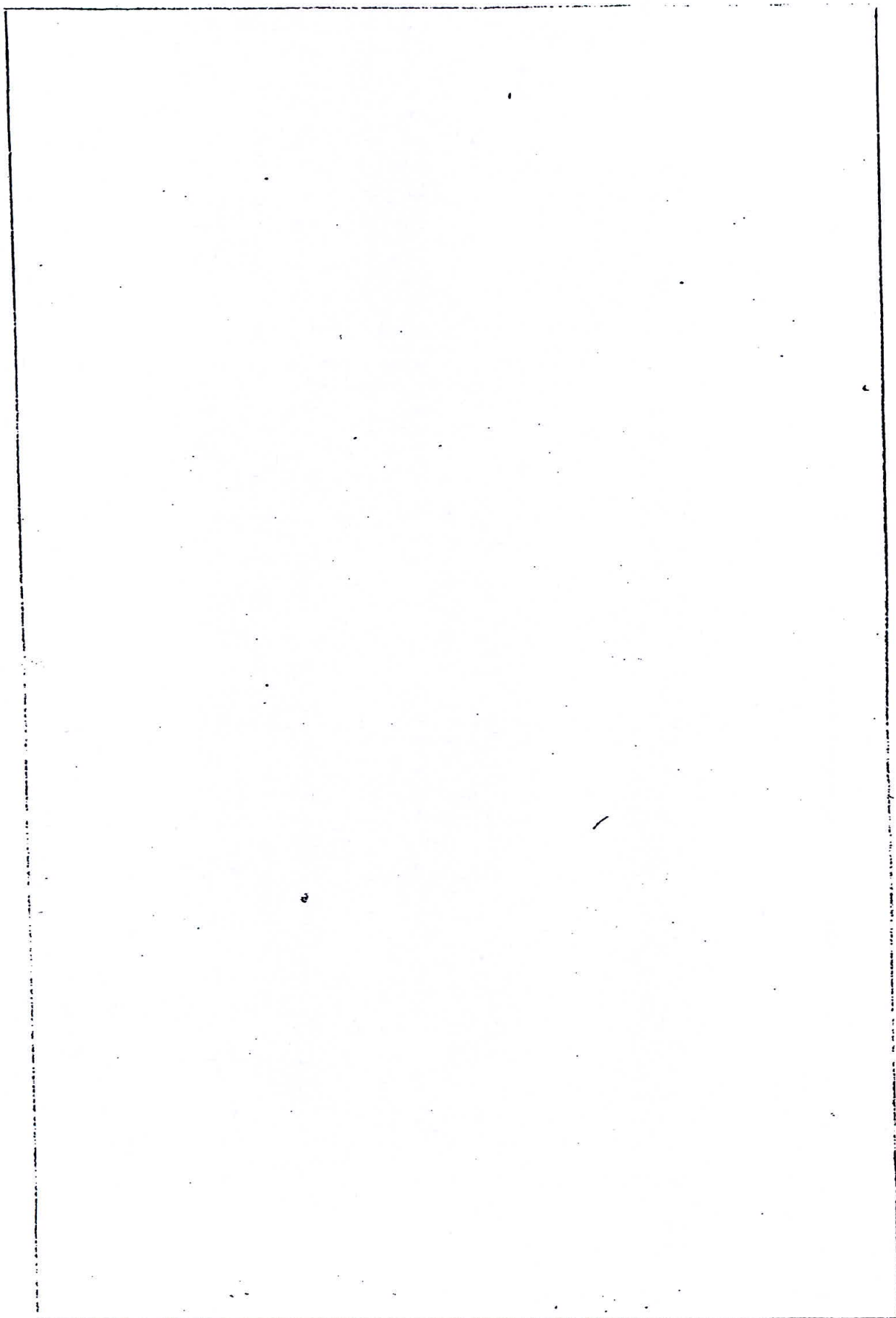
ISBN: 90-9004473-6

Raziskave, predstavljene v tej tezi, so bile izpeljane v okviru raziskovalnega programa Ministrstva za znanost in tehnologijo Republike Slovenije in deloma s finančno pomočjo Evropske lige za boj proti revmatizmu (EULAR) ter Univerze v Nijmegnu, Nizozemska.

The investigations presented in this thesis were carried out in part under the auspices by the Ministry of the Republic of Slovenia for Science and Technology and with financial add from the European League against Rheumatism (EULAR) and from the University of Nijmegen, The Netherlands.

Naslovnica: shematičen prikaz protitelesa, ribonukleoproteinskega delca Ro in heksagonsko povezanih fosfolipidov
Cover illustration: schematically shown antibody, Ro ribonucleoprotein particle and hexagonal organized phospholipids

Vsem radovednim!



ZAHVALA / DANKWOORD

Otroška radovednost in radost nad odkrivanjem sta lastnosti, zaradi katerih nisem obupal niti takrat, ko so bili rezultati več deset tisoč poskusov negativni in neuporabni. To je zasluga mojih staršev, ki sta me vzgojila v nepopravljivega optimista, za kar se jima iz srca zahvaljujem.

Prof.dr.sc. Mateja Bohinjec in akademik prof.dr.sc. Mitja Zupančič sta "glavna krivca", da nisem otopel v svoji prvi službi, ampak sem zamenjal redno zaposlitev za izziv, ki ga je dojal status mladega raziskovalca. Tega nisem niti enkrat obžaloval.

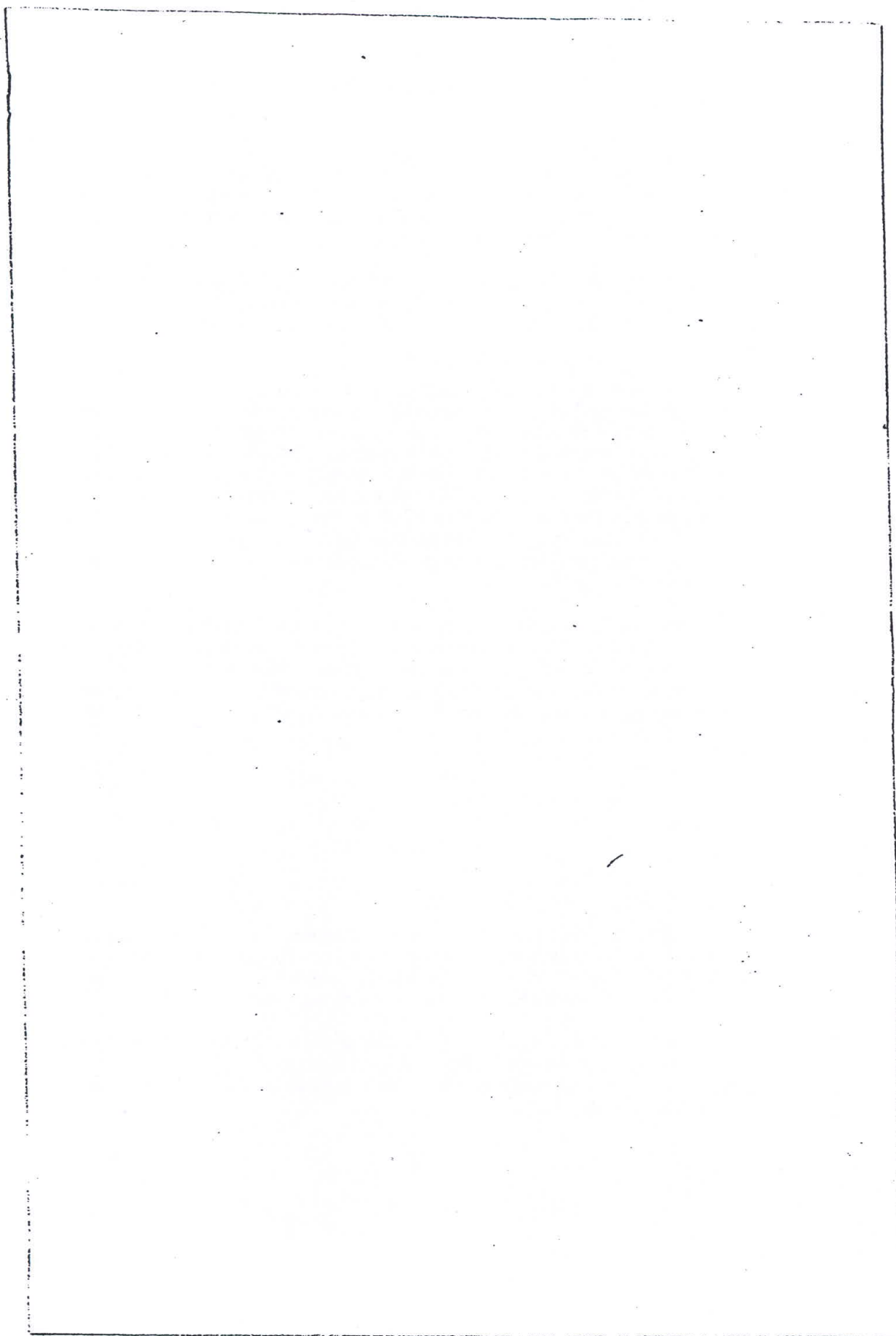
Zahvaljujem se svojemu mentorju prof.dr.sc. Blažu Rozmanu. Ob njegovem 6-letnem mentorstvu sem razvijal in uresničeval svoje zamisli ter jih z njegova pomočjo preverjal na domačih in tujih stokovnih srečanjih. Tako sem lahko objektivno ocenil vrednost in odzivnost posameznih rezultatov. Prof.dr.sc. Walther J. van Venrooij je bil moj mentor v času, ko sem delal v raziskovalni skupini na Nizozemskem. Omogočil mi je, da sem usmeril v laboratorijsko delo maksimum energije in sem v tistih mesecih opravil nekajkrat več analiz, kot je običajno. S tem, ko me je vključil v vse aktivnosti skupine, sem pridobil pomembne izkušnje o organizaciji dela, načrtovanju raziskav in predstavitvi rezultatov mednarodni javnosti. Hartelijk bedankt.

Ger Pruijn, Ben de Jong, Titia Meesters, Rob Nelissen, Ron Verheijen, Rob Slobbe, Rene Hoef, Frans Schoute, Eric Jansen, Wilbert Boelens, . . . eerst mijn instructeurs, dan mijn collega's en vrienden. Jullie garen mij de gelegenheid, niet alleen in Nederland te overleven, maar daar ook echt te kunnen leven. In het bijzonder was dat belangrijk tijdens de aanval op Slovenië toen ik niet samen met mijn familie kon zijn.

ACKNOWLEDGEMENT

A child's curiosity and joy of discovery are the factors which made me persevere, even at times when the results of many thousands of experiments were negative and useless. I owe this to my parents, who brought me up to be an incorrigible optimist, for which I would like to thank them from my heart.

Prof. Mateja Bohinjec Ph.D. and Academician Prof. Mitja Zupančič Ph.D. are those mainly responsible for me not becoming numb in my first job, but trading a regular job for the challenge of having the status of a young researcher. I have not regretted it once.



VSEBINA / CONTENTS

Povzetek	stran/page
Summary	11
Namen in oris teze	
Purpose and outline of the thesis	
Uporabljene metode (Used methods)	
Poglavje/Chapter 1.	
Specifičnost avtoprotiteles in njihova povednost	
Specificity of autoantibodies and their informativeness	
Poglavje/Chapter 2.	
Prečiščena opredelitev 56K in drugih avtoantigenov v območju 50-60 kDa	
Refined definition of the 56K and other autoantigens in the 50-60kDa region	
Poglavje/Chapter 3.	53
Serumi bolnikov z revmatskimi boleznimi prepoznajo različne epitopske regije na antigenu Ro/SS-A 52 kDa	
Sera from patients with rheumatic diseases recognize different epitopes on the Ro/SS-A 52 kDa antigen	
Dodatek/Appendix	70
Poglavje/Chapter 4.	77
Antifosfolipidni sindrom	
Antiphospholipid syndrome	
Dodatek/Appendix	86
Poglavje/Chapter 5.	89
Prevalenca antifosfolipidnih protiteles pri globoki venski trombozi in njihov odnos s koagulacijo in fibrinolizo	
Prevalence of antiphospholipid antibodies in deep venous thrombosis and their relationship to blood coagulation and fibrinolysis	
Poglavje/Chapter 6.	103
Razlike v podrobni specifičnosti antifosfolipidnih protiteles pri bolnikih s tromboembolijo s sistemskimi avtoimunskimi motnjami ali brez njih	
Differences in the fine specificity of antiphospholipid antibodies in thromboembolism with or without autoimmune disorders	
Pregled in sklepne misli	119
Overview and general conclusions	126
Skupni seznam citirane literature (General list of references)	131
Seznam objav (List of publications)	145
Curriculum vitae	149

Borut Božič: Podrobna specifičnost in pomen avtoprofiliteles

Splošni uvod/General introduction

POVZETEK

.....
.....

Borut božič: Podrobna specifičnost...

SHORT SUMMARY

.....
.....

Splošni uvod/General introduction

PREDSTAVITEV HIPOTEZE

.....
.....

Borut božič: Podrobna specifičnost...

PURPOSE AND OUTLINE OF THE THESIS

.....
.....

UPORABLJENE METODE / USED METHODS

V oklepaju je označeno poglavje, v katerem je metoda navedena.

- # afinitetno čiščenje serumov s fosfolipidi v polistirenski koloni: izolacija specifičnih protiteles (6)
- # avtoradiografija na gelu ločenih peptidov s predhodno obdelavo gela za ojačitev signalov (3)
- # čiščenje ribonukleinskih kislin (RNA) s fenolnim izluževanjem in etanolnim obarjanjem (3)
- # denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza: osnovna izvedba in prilagoditve (2,3)
- # dializno čiščenje frakcij (6)
- # enodimenzionalna tenkoplastna kromatografija visoke ločljivosti (HPTLC) (6)
- # encimsko imunski test na trdnem nosilcu s fosfolipidi (ELISA): osnovna izvedba in prilagoditve (4,5,6)
- # enukleacija celic (ločevanje citoplazme in jeder = razjedrjevanje) (2)
- # gelska filtracija (3)
- # imunofluorescenca na Hep-2 celicah z različnimi fiksacijskimi postopki (2)
- # imunska detekcija s peroksidazo in z radioizotopsko označenim proteinom A (125 I) (immunoblotting) (2,3)
- # imunske obarjanje mutantov s polnim ali z afinitetno prečiščenim serumom na protein-A agaroznih zrnih (3)
- # imunske posredno obarjanje radioizotopsko označene (32 P) ribonukleinske kisline (RNA) in avtoradiografija denaturacijskega RNA gela (2)
- # *in vitro* prepis komplementarne kopije deoksiribonukleinske kisline (cDNA) (osnovnega - divjega tipa in mutantov) v informacijsko ribonukleinsko kislino (mRNA) (3)
- # *in vitro* prevod informacijske ribonukleinske kisline v radioizotopsko označene proteine - 35 S metionin (3)
- # izdelava mutantnih cDNA z restrikcijskimi encimi: odprtje (linearizacija) vektorja in cepitev (digestija) z izbranimi restrikcijskimi encimi (3)
- # koagulacijski in fibrinolizni testi: protrombinski čas, aktivirani delni trombotoplastinski čas, trombinski čas, koagulacija fibrinogena, aktivnost antitrombina III, proteina C, plazminogena, tkivnega plazminogenega aktivatorja in njegovega inhibitorja, čas lize euglobulinskega strdka in fibrinolitični odgovor na venski zažem (4,5)
- # priprava različnih celičnih izvlečkov: celotni, citoplazemski, jedrski (2,3)
- # proteinsko imunske obarjanje iz celičnega izvlečka, označenega z izotopom 35 S, v fizioloških in nefizioloških pogojih (2)
- # protitočna imunska elektroforeza (3)
- # statistične analize: aritmetične srednje vrednosti s standardnimi odniki ali rangi z medianami, χ^2 , Studentov t test, Man-Whitney U test, Spearmanov test korelacij, Wilcoxonov neparametrični test korelacij (3,4,5,6)
- # elektroprenos proteinov iz gela na nitrocelulozni list (western blotting) (2,3)

POGLAVJE 1 / CHAPTER 1

SPECIFIČNOST AVTOPROTELES IN NJIHOVA POVEDNOST
SPECIFICITY OF AUTOANTIBODIES AND THEIR INFORMATIVENESS

Borut BOŽIČ

Klinični center v Ljubljani, Interna klinika Boln. dr. Petra Držaja
Laboratorij za imunologijo revmatizma, Ljubljana, Slovenija

Objavljeno v: / Published in:

Farmaceutski vestnik 1993;44:119-126

SPECIFIČNOST AVTOPROTITELES IN NJIHOVA POVEDNOST

-IZVLEČEK

V članku predstavljamo pomen poznavanja podrobne specifičnosti avtoproteles v diagnostičnem delu in v študiju osnovnih mehanizmov delovanja.

Kot model smo uporabili dve družini avtoproteles in ustreznih antigenov, ki se paroma razlikujejo: ribonukleoproteinski delci Ro predstavljajo proteinske znotrajcelične antigene, fosfolipidi pa neproteinske antigene celičnih površin (membran).

Dobljene informacije lahko smiselno uporabimo za celotno področje avtoproteles.

Ključne besede: avtoprotelesa, specifičnost, antifosfolipidna protelesa, anti-Ro protelesa

UVOD

Obrambni sistem vretenčarjev je zelo zapleten in vključuje tudi imunski sistem, ki nas varuje pred infekcijami. Sednji se izraža na dva načina:

Protelesni odziv obsega proizvodnjo beljakovin - proteles (imunoglobulinov). Ta krožijo v krvnem obtoku in drugih telesnih tekočinah, kjer se specifično vežejo na antigene (antibody generator). Antigen je vsaka snov, ki je sposobna izzvati imunski odziv. Imunski sistem ločuje antigene celo, če se razlikujejo v optični izomeriji ali znotraj vezavnega mesta (epitopa) v eni sami molekuli na primer aminokisliline. Vezava proteles inaktivira viruse in bakterijske toksine tako, da blokira njihovo vezavo na receptorje tarčne celice. Mikroorganizmi, "označeni" s protelesi so izpostavljeni razgradnji z encimi po fagocitozi ali s sistemom proteinov, imenovanim komplement.

Celično posredovan odziv vključuje razmnoževanje specializiranih celic, ki reagirajo z antigenom na površini gostiteljeve celice. Imunsko reagirajoča celica lahko okuženo celico uniči, torej jo odstrani, še preden se virus razmnoži ali pa izloča kemične signale (citokine) z različnim delovanjem, vključno z aktivacijo makrofagov.

AVTOPROTELESA

Eden glavnih izzivov v imunologiji je razumevanje specifičnega prepoznavanja in delovanja proti množici tujkov (tujih antigenov), ne da bi bil pri tem poškodovan lasten organizem, sestavljen iz prav tako množice makromolekul, potencialnih antigenov, oziroma razumevanje možnih vzrokov za motnje pri tem prepoznavanju, ki privedejo do avtoimunskih bolezni.

POGLAVJE 2 / CHAPTER 2

REFINED DEFINITION OF THE 56K AND OTHER AUTOANTIGENS IN
THE 50-60 kDa REGION

G.J.M. PRUJN¹, B. BOŽIČ², F. SCHOUTE¹, L.A. ROKEACH³,
W.J. van VENROOIJ¹

¹Department of Biochemistry, University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands.

²Department of Rheumatology, University Medical Center, Ljubljana, Slovenia.

³Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada

Objavljeno v: / Published in:

Molecular Biology Reports 1992; 16: 267-276.

PREČIŠČENA OPREDELITEV 56K IN DRUGIH AVTOANTIGENOV V OBMOČJU 50-60 kDa

IZVLEČEK

Sprememba v razmerju akrilamida in bisakrilamida v denaturacijskem poliakrilamidnem gelu, uporabljenem za elektroprenos proteinov na nitrocelulozni list (Western blotting), močno izboljša nedvoumno določitev protiteles iz seruma bolnikov z avtoimunskimi motnjami proti antigenom v območju 50-60kDa. Relativna hitrost gibanja Ro52, 56K avtoantigena in kalretikulina se poveča z znižanjem razmerja med akrilamidom in bisakrilamidom v primerjavi s hitrostjo Ro60, La in Jo-1. Analize so pokazale, da omenjenih šest antigenov ustreza šestim različnim polipeptidom.

Nadaljnje analize z uporabo rekombinantnega kalretikulina so potrdile, da (1.) 56K avtoantigen ni ne identičen ne soroden kalretikulinu in (2.), da kalretikulin ni Ro avtoantigen.

Vrsta poskusov za boljše poznavanje 56K avtoantigena je razkrila, da (1.) tega antigena ni možno določiti v fiksiranih celicah, verjetno zaradi zakrivanja epitopov; (2.) približno enaka količina antigena je najdena v jedrski in citoplazemski frakciji po enukleaciji (razjedrjevanju) celic; (3.) 56K avtoantigen ni stabilno povezan ne z RNK ne z drugimi proteini.

Ključne besede: 56K antigen, avtoimunost, kalretikulin, imunski blotting, Sjögrenov sindrom, sistemski lupus eritematozus

REFINED DEFINITION OF THE 56K AND OTHER AUTOANTIGENS IN THE 50-60 kDa REGION

ABSTRACT

Alteration of the acrylamide:bisacrylamide ratio in the SDS-polyacrylamide gel used for Western blotting strongly improved the unambiguous detection of antibodies against 50-60 kDa autoantigens present in autoimmune patient sera. The relative migration of Ro52, the 56K autoantigen and calreticulin increased with reduced acrylamide: bisacrylamide ratios in contrast to that of Ro60, La and Jo-1. These analyses indicated that these six antigens correspond to six distinct polypeptides.

Further analyses using recombinant calreticulin showed that (i) the 56K autoantigen is neither identical nor related to calreticulin and (ii) calreticulin is not a Ro autoantigen.

A series of experiments designed to better characterize the 56K autoantigen showed that (i) the antigen is not detectable in fixed cells, presumably due to masking of the epitopes; (ii) about equal amounts of the antigen were recovered in nuclear and cytoplasmic cell fractions after enucleation of the cells; (iii) the 56K autoantigen is not stably associated with either RNA or other proteins.

Key words: 56K autoantigen, Autoimmunity, Calreticulin, Immunoblotting, Sjögren's syndrome, Systemic lupus erythematosus