



## NAVODILA ZA IZDELAVO DOKTORSKE DISERTACIJE V OBLIKI ČLANKOV:

Senat Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani je na predlog Komisije za doktorate znanosti na 5. redni seji z dne 14.3.2022 sprejel naslednji sklep:

### Navodila za izdelavo doktorske disertacije v obliki člankov:

Doktorska disertacija, napisana v obliki člankov, **mora zajemati minimalno tri izvirne znanstvene raziskovalne članke**. Vsi članki morajo biti objavljeni ali sprejeti v objavo v reviji, indeksirani v SCI, SSCI oz. SCIE s faktorjem vpliva (IF), od tega mora vsaj en članek ustrezati pogojem za zaključek doktorske disertacije, skladno s sklepom Senata UL MF z dne 15. 11. 2021.

**Doktorand mora biti prvi avtor pri vseh treh člankih.**

Izjemoma je lahko **eden** od izvirnih znanstvenih člankov objavljen oz. sprejet v objavo z deljenim prvim avtorstvom. V primeru deljenega prvega avtorstva mora biti izvirni znanstveni članek objavljen v reviji, ki jo indeksira SCI oz. SSCI z **IF večjim od štiri (4)**. Tak članek kot pogoj za pridobitev doktorata znanosti lahko uveljavlja samo eden od avtorjev, ki si deli prvo avtorstvo. Mentor doktoranda mora s svojo izjavo zagotoviti, da je delež doktoranda v članku pomemben in da nihče drug od soavtorjev tega članka ne bo uveljavljal kot pogoja za doktorat.

Vsi izvirni znanstveni raziskovalni članki morajo biti vsebinsko povezani in rezultat doktorandovega dela na potrjeni dispoziciji doktorske disertacije. Doktorand mora poleg člankov dodatno napisati uvod in sklep doktorske disertacije, s katerima predstavi teoretsko in metodološko zasnovo svojega raziskovanja, poveže vsebino posameznih člankov ter poda ključne ugotovitve.

Dekan:

prof. dr. Igor Švab, dr. med.





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 avtoprofiteles 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

natiskano v 50 izvodih

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

UNIVERZA V LJUBLJANI  
MEDICINSKA FAKULTETA

doktorsko delo

**Podrobna specifičnost in pomen avtoprofiteles 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

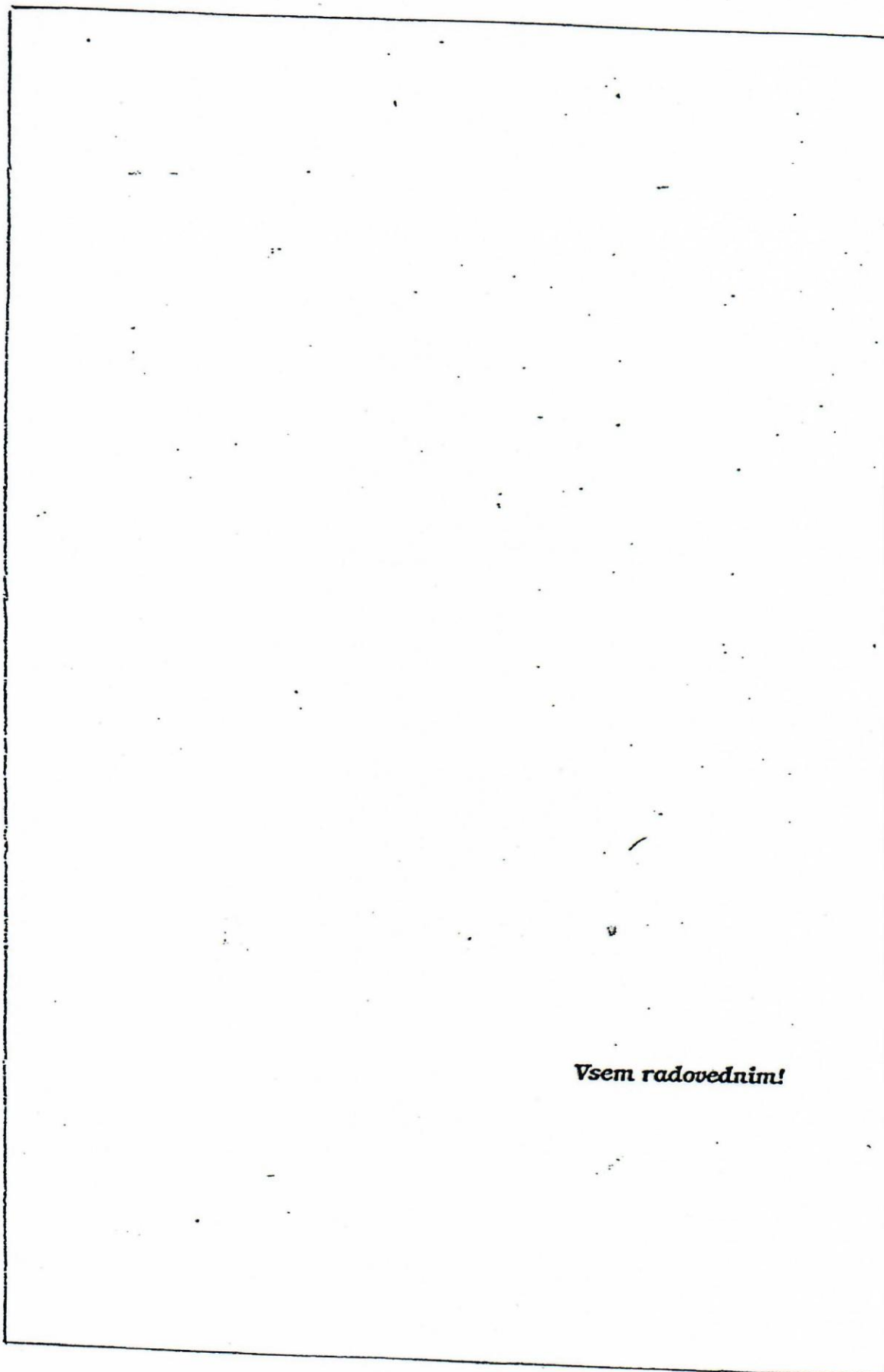
Recenzenti:

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.

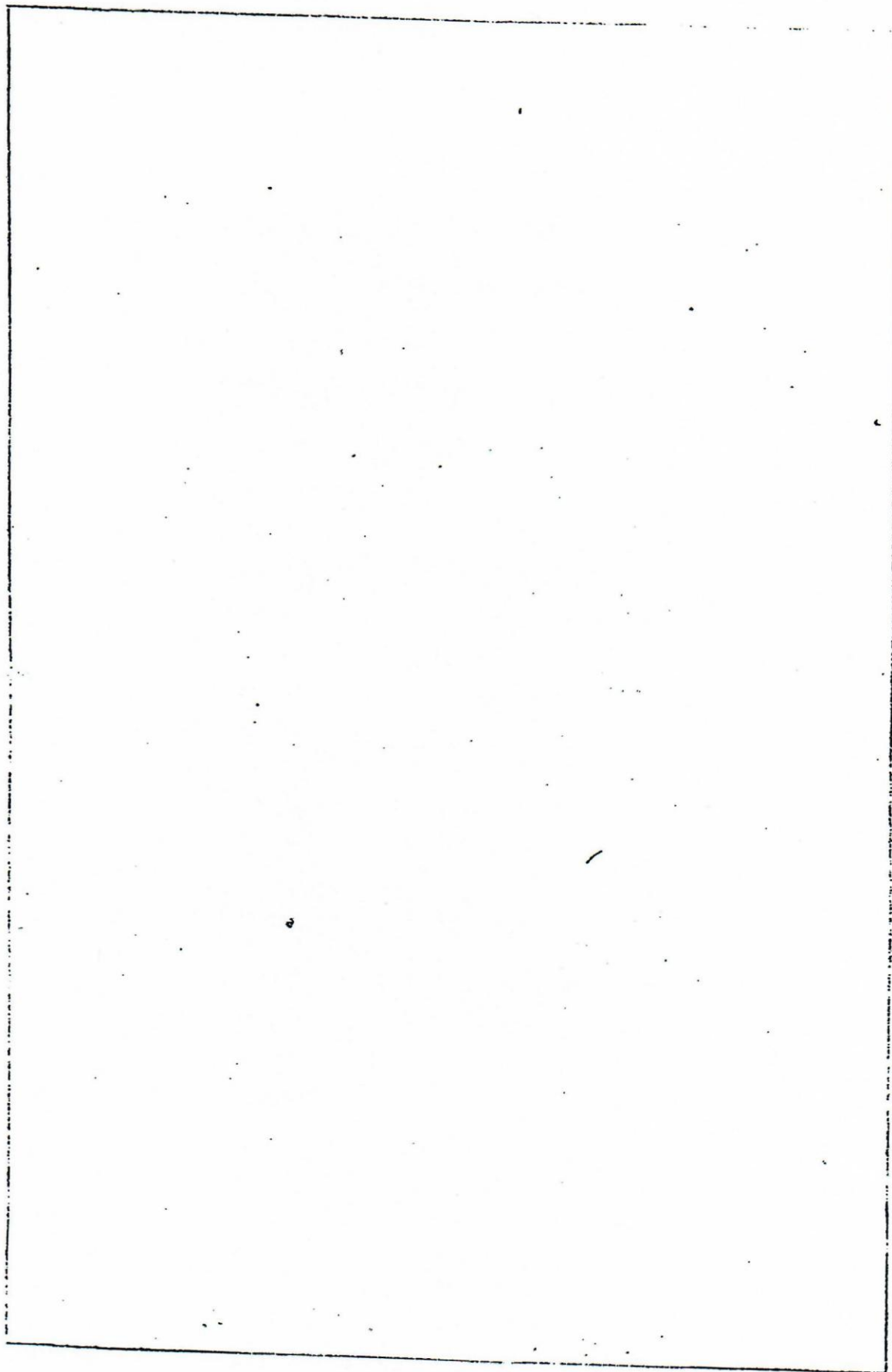
Naslovnica: shematičen prikaz protitelesa, ribonukleoproteinskega delca Ro in heksagonsko povezanih fosfolipidov  
Cover illustration: schematically shown antibody, Ro ribonucleoprotein particle and hexagonal organized phospholipids



**Vsem radovednim!**



Sesta stran



## 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 dajal status mladega raziskovalca. Tega nisem niti enkrat obžaloval.

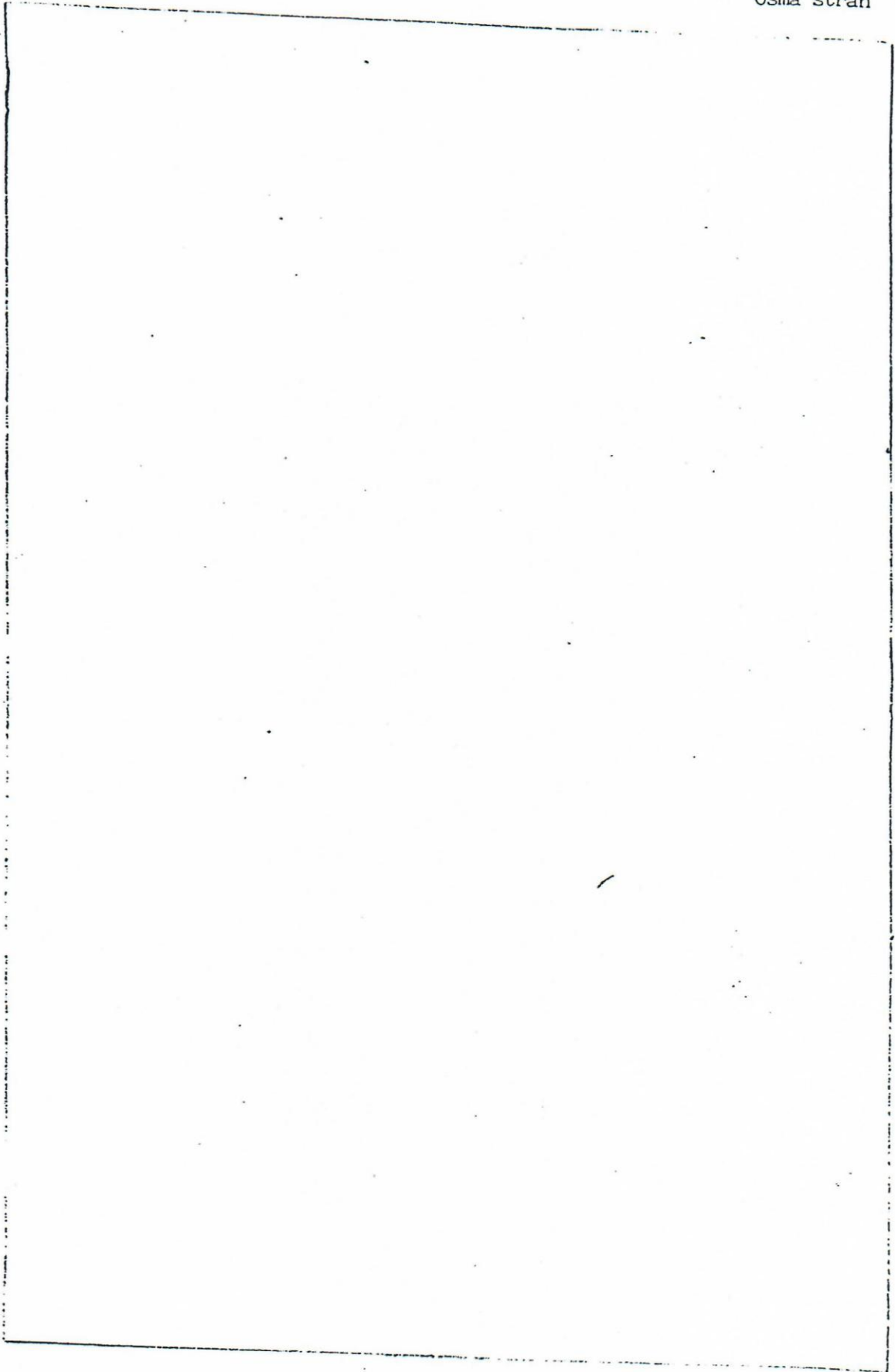
Zahvaljujem se svojemu mentorju prof.dr.sc. Blažu Rozmanu. Ob njegovem 6-letnem mentorstvu sem razvijal in uresničeval svoje zamisli ter jih z njegova pomočjo preverjal na domačih in tujih stokovnih srečanjih. Tako sem lahko objektivno ocenil vrednost in odzivnost posameznih rezultatov. Prof.dr.sc. Walthter 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 Stobbe, Rene Hoef, Frans Schoute, Eric Jansen, Wilbert Boelens, . . . eerst mijn instructeurs, dan mijn collega's en vrienden. Jullie gaven 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

	stran/page
Povzetek	
Summary	11
Namen in opis 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 avtoprotiteles**

---

Splošni uvod/General introduction

---

POVZETEK

.....  
.....

Borut božič: Podrobna specifičnost...

---

SHORT SUMMARY

.....  
.....

Splošni uvod/General introduction

---

PREDSTAVITEV HIPOTEZE

.....  
.....



Borut boziči 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)
- # diazno 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 = razjedjevanje) (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 tromboplastinski čas, trombinski čas, koagulacija fibrinogena, aktivnost antifibrinogena III, proteina C, plazminogena, ključnega 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 imunsko 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 odmiki ali rangi z medianami,  $\chi^2$ , 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 AVTOPROTITELES 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 AVTOPROTIITELES IN NJIHOVA POVEDNOST

### IZVLEČEK

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

Kot model smo uporabili dve družini avtoprotiteles 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 avtoprotiteles.

**Ključne besede:** avtoprotitelesa, specifičnost, antifosfolipidna protitelesa, anti-Ro protitelesa

### UVOD

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

Protitelesni odziv obsega proizvodnjo beljakovin - protiteles (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 aminokislisine. Vezava protiteles inaktivira viruse in bakterijske toksine tako, da blokira njihovo vezavo na receptorje tarčne celice. Mikroorganizmi, "označeni" s protitelesi so izpostavljeni razgradnji z encimi po fagocitozi ali s sistemom proteinov, imenovanim komplement.

Cellčno 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.

### AVTOPROTIITELESA

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. PRULIN<sup>1</sup>, B. BOŽIČ<sup>2</sup>, F. SCHOUTE<sup>1</sup>, L.A. ROKEACH<sup>3</sup>,  
W.J. van VENROOIJ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, University of Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands.

<sup>2</sup>Department of Rheumatology, University Medical Center, Ljubljana, Slovenia.

<sup>3</sup>Département 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 katretikulina 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 katretikulina so potrdile, da (1.) 56K avtoantigen ni ne identičen ne soroden katretikulinu in (2.), da katretikulin 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, katretikulin, imunski blotting, Sjögrenov sindrom, sistemski lupus eritematosus

**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 catreticulon 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 catreticulon showed that (i) the 56K autoantigen is neither identical nor related to catreticulon and (ii) catreticulon 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, Catreticulon, Immunoblotting, Sjögren's syndrome, Systemic lupus erythematosus