

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Miha MIKELJ

**INTERAKCIJE IZBRANIH PROTEINOV NADDRUŽINE  
MACPF/CDC Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI**  
DOKTORSKA DISERTACIJA

**INTERACTIONS OF SELECTED MACPF/CDC SUPERFAMILY  
PROTEINS WITH LIPID MEMBRANES**  
DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 13. 6. 2012 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje znanost o celici. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Tom Turk in za somentorja prof. dr. Gregor Anderluh.

Doktorska naloga je bila opravljena na Katedri za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerze v Ljubljani. Del raziskav je potekal na Katedri za zoologijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerze v Ljubljani, na Kemijskem inštitutu, Ljubljana, Slovenija ter na Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Igor KRIŽAJ  
Inštitut Jožef Stefan, Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti

Član: prof. dr. Nataša POKLAR-ULRIH  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Kristina SEPČIĆ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 21. 4. 2015

Podpisani izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Miha Mikelj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd  
DK UDK 577:602.628(043.3)=163.6  
KG MAC/MACFP/CDC/liposomi/proteini tvorci por (PFP)/domena  
MACPF/listeriolizin O (LLO)/Torso-like (Tsl)  
AV MIKELJ, Miha, univerzitetni diplomirani biotehnolog  
SA TURK, Tom (mentor)/ANDERLUH, Gregor (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni študij Bioznanosti,  
področje znanosti o celici  
LI 2015  
IN INTERAKCIJE IZBRANIH PROTEINOV NADDRUŽINE MACPF/CDC Z  
LIPIDNIMI MEMBRANAMI  
TD Doktorska disertacija  
OP XIII, 123 str., 14 pregl., 52 sl., 215 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Naddružina proteinov MACPF/CDC vsebuje številne tako litične kot nelitične proteine iz skoraj vseh življenjskih oblik. Člani naddružine imajo različne vloge in sodelujejo pri patogenezi, imunosti, plenjenju, razvoju idr., za številne pa je vloga slabo opisana oziroma še neznan. Do zdaj znani proteini naddružine MACPF/CDC opravljajo svojo vlogo preko povezave z membranami, za kar številni poleg skupne domene MACPF/CDC vsebujejo še dodatne domene za vezavo na lipidne membrane. V sklopu naših raziskav smo preučevali pomen domenske organiziranosti proteinov MACPF na vezavo slednjih z lipidnimi membranami. S sistemom *in vitro* transkripcije-translacije smo uspeli izraziti le del izmed 20 izbranih proteinskih konstruktov v topni obliki. Ti niso kazali hemolitične aktivnosti, zato pa se jih je 6 vezalo z lipidnimi membranami, od teh 1 iz patogene bakterije *Chryseobacterium gleum* ter 2 proteinski domeni iz rastlinske patogene bakterije *Ralstonia solanacearum* in iz parazita *Plasmodium falciparum*. Rezultati naših raziskav kažejo, da za interakcijo z lipidnimi membranami vsebnost dodatnih domen ni ključna. Z afinitetno ločbo z magnetnimi kroglicami in drugimi metodami smo podrobneje preučevali vezavo proteina Torso-like (Tsl) na membrane liposomov. Stabilno vezavo posredujejo regije znotraj N-terminalnega dela proteina in domene MACPF. Afiniteta vezave Tsl je večja na predelih lipidnih membran z večjo ukrivljenostjo. Vezava Tsl na liposome je nespecifična. Verjetno je za vezavo bolj kot specifičnost receptorja pomemben njegov hidrofobni značaj. V drugem sklopu raziskav smo izrazili rekombinantni listeriolizin O, pripravili modelni sistem orjaških unilamelarnih veziklov iz eritrocitnih membran in vstavili zeleni fluorescenčni protein v bakterijo *Listeria monocytogenes*.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 577:602.628(043.3)=163.6  
CX MAC/MACFP/CDC/liposomes/pore forming proteins (PFP)/MACPF domain/listeriolysin O (LLO)/Torso-like (Tsl)  
AU MIKELJ, Miha  
AA TURK, Tom (supervisor)/ANDERLUH, Gregor (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field Cell Sciences  
PY 2015  
TI INTERACTIONS OF SELECTED MACPF/CDC SUPERFAMILY PROTEINS WITH LIPID MEMBRANES  
DT Doctoral Dissertation  
NO XIII, 123 p., 14 tab., 52 fig., 215 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB MACPF/CDC protein superfamily comprises a large number of both lytic and non-lytic proteins from almost all domains of life. Its members have different roles and can participate in the pathogenicity, immunity, attacking prey, development, etc. However for the majority of these proteins the role is either unknown or poorly described. MACPF/CDC proteins described to date exert their role through interactions with lipid membranes for which the majority of them contain additional membrane binding domains. The focus of our study was to describe the importance of domain architecture for the interaction of MACPF proteins with lipid membranes. By using the *in vitro* transcription-translation system we produced some of the 20 selected protein constructs in the soluble form. These were not hemolytically active, however 6 of them bound to lipid membranes. One was from pathogenic bacteria *Chryseobacterium gleum*, and 2 protein domains were from plant pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* and from parasite *Plasmodium falciparum*, respectively. The results of our study show that the presence of additional domains is not crucial for membrane binding. By using magnetic beads affinity separation and other techniques we further studied the membrane binding characteristics of Torso-like protein (Tsl). We found that regions within MACPF domain and N-terminal part of Tsl are responsible for stable membrane binding, and that Tsl binds with higher affinity to lipid membrane regions with greater curvature. Tsl binding is non-specific and we assume that rather than the specificity of the receptor its hydrophobic character is important for Tsl binding to lipid membranes. In the second part of our study we expressed recombinant listeriolysin O, prepared a model system of giant unilamellar vesicles from erythrocyte membranes, and prepared bacteria *Listeria monocytogenes* expressing green fluorescent protein.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
1.3 NAMEN RAZISKAVE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PROTEINI NADDRUŽINE MACPF/CDC .....	3
<b>2.1.1 Družina proteinov MACPF .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Družina proteinov CDC .....</b>	<b>9</b>
2.2 PROTEINI TVORCI POR.....	12
<b>2.2.1 Mehanizem tvorbe por proteinov MACPF/CDC .....</b>	<b>12</b>
2.3 VLOGA LISTERIOLIZINA O PRI POBEGU LISTERIJE IZ FAGOSOMA V CITOSOL .....	15
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 MATERIAL .....	17
<b>3.1.1 Kemikalije .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2 Rastopine .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3 Gojišča .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.4 Encimi .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.5 Detergenti .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.6 Inhibitorji .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.7 Lipidi.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.8 Protitelesa .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.9 Reagenti za celične kulture .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.10 Kompleti .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.11 Bakterijski sevi.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.12 Plazmidi .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.13 Začetni oligonukleotidi.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.14 Polnilci kromatografskih kolon in pripravljene kolone.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.15 Laboratorijska oprema .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.16 Ostala oprema .....</b>	<b>30</b>
3.2 METODE .....	31

<b>3.2.1</b>	<b>Bioinformatična analiza proteinov z domeno MACPF .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Izdelava konstruktov izbranih proteinov MACPF .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Izražanje rekombinantnih proteinov .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Izolacija rekombinantnih proteinov .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Opredelitev lastnosti konstruktov izbranih proteinov MACPF in listeriolizina O.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Lipidni vezikli .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Preučevanje interakcij proteinov MACPF z modelnimi membranami .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.8</b>	<b><i>In vitro</i> sistem za preučevanje prehoda listerije iz fagosoma v citosol .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Statistična analiza rezultatov .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>49</b>
4.1	INTERAKCIJE IZBRANIH PROTEINOV MACPF Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI .....	49
<b>4.1.1</b>	<b>Bioinformatična analiza proteinov z domeno MACPF .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Presejalna metoda za študij interakcij izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Protein Torso-like.....</b>	<b>66</b>
4.2	VLOGA LISTERIOLIZINA O PRI POBEGU LISTERIJE IZ FAGOSOMA V CITOSOL .....	83
<b>4.2.1</b>	<b>Izražanje listeriolizina O .....</b>	<b>84</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Permeabilizacija veziklov celičnih velikosti.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Orjaški unilamelarni vezikli iz eritrocitnih membran.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.4</b>	<b><i>In vitro</i> sistem za preučevanje prehoda listerije iz fagosoma v citosol .....</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>88</b>
5.1	BIOINFORMATSKA ANALIZA PROTEINOV Z DOMENO MACPF .....	88
5.2	IZRAŽANJE IZBRANIH PROTEINOV MACPF.....	90
5.3	PREUČEVANJE INTERAKCIJ IZBRANIH PROTEINOV MACPF Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI .....	92
5.4	PREUČEVANJE INTERAKCIJ PROTEINA TORSO-LIKE Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI .....	95
5.5	VLOGA LISTERIOLIZINA O PRI POBEGU LISTERIJE IZ FAGOSOMA V CITOSOL .....	99
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>101</b>
7.1	POVZETEK .....	101
7.2	SUMMARY .....	103
<b>8</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>105</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Proteini MACPF z določeno 3D-strukturo. ....	5
Pregl. 2: Predstavniki od holesterola odvisnih citolizinov z določeno 3D strukturo. ....	10
Pregl. 3: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje krajših fragmentov izbranih proteinov MACPF. ....	27
Pregl. 4: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje konstruktov proteina Torso-like. ....	27
Pregl. 5: Začetna oligonukleotida, ki smo ju uporabili za vstavitvev mutacij v regiji CH1 in CH2 proteina Torso-like z usmerjeno mutagenezo. ....	28
Pregl. 6: Zaporedja sond, ki smo jih uporabili za iskanje po podatkovnih zbirkah ....	31
Pregl. 7: Reakcijska mešanica (levo) in verižna reakcija s polimerazo (PCR) (desno) za vstavljanje produktov PCR krajših fragmentov izbranih proteinov MACPF v plazmid pET8c. ....	33
Pregl. 8: Reakcijska mešanica in verižna reakcija s polimerazo (PCR) za vstavljanje produktov PCR konstruktov proteina Torso-like v plazmid pHLsec. ....	35
Pregl. 9: Protokol za elektroformacijo. ....	42
Pregl. 10: Razširjenost proteinskih zaporedij z domeno MACPF po različnih sistematskih skupinah. ....	49
Pregl. 11: Lastnosti proteinov MACPF, ki smo jih izbrali za preučevanje interakcij z lipidnimi membranami. ....	52
Pregl. 12: Testirani pogoji za sintezo perforina s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije (IVTT). ....	55
Pregl. 13: Velikost (premer) liposomov, ki smo jo pomerili z dinamičnim sipanjem svetlobe. ....	71
Pregl. 14: Število potencialnih glikolizacijskih mest in cisteinskih ostankov pri 'kontrolnih' proteinih: humani perforin (hPFN), pleurotolizin B (PlyB), ostreolizin A (OlyA), listeriolizin O (LLO) in ekvinatoksin II (EqII) ter izbranih evkariontskih proteinih MACPF: Torso-like (Tsl) in plazmodijski proteini (o, r in t) ter njihove C-terminalne domene (p, s in u). ....	91

## KAZALO SLIK

Sl. 1: Struktura domene MACPF proteina C8 $\alpha$ (PDB koda: 2QQH).....	6
Sl. 2: Domenska organiziranost proteinov MACPF. ....	6
Sl. 3: Model aktivacije receptorja Torso na površini plazemske membrane embrija vinske mušice ( <i>Drosophila melanogaster</i> ).....	8
Sl. 4: Modela aktivacije signalne poti Torso: prevladovani model cepitve (ang. cleavage model) in model izločanja .....	9
Sl. 5: Primerjava struktur proteina MACPF (perforin) in CDC (perfringolizin O) .....	11
Sl. 6: Mehanizem tvorbe pore proteinov CDC.....	13
Sl. 7: Atomski model zrelega MAC kompleksa prikazan od zgoraj in od strani. ....	14
Sl. 8: Shematski prikaz obročaste in lokaste MACPF/CDC pore. ....	14
Sl. 9: Shematski prikaz znotrajceličnega življenjskega cikla bakterije <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	15
Sl. 10: Shema plazmidov z vključki.....	26
Sl. 11: Shema sintetiziranih genov za izbrane proteine MACPF.....	33
Sl. 12: Različni tipi lipidnih veziklov iz lipidnega dvosloja .....	40
Sl. 13: Shematski prikaz velikosti GUV s premerom 10 $\mu$ m in 100 nm LUV .....	41
Sl. 14: Shema poskusa afinitetne ločbe proteinov, ki se vežejo na liposome, s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami (Dynabeads).....	44
Sl. 15: Shema <i>in vitro</i> sistema za študij prehoda <i>L. monocytogenes</i> iz fagosoma v citosol.....	47
Sl. 16: Razširjenost proteinov z domeno MACPF po drevesu življenja .....	50
Sl. 17: Poravnava najbolj ohranjenega dela domene MACPF.....	51
Sl. 18: Sinteza kontrolnih proteinov s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije .....	54
Sl. 19: Hemolitična aktivnost kontrolnih proteinov. ....	54
Sl. 20: Ocena količine listeriolizina O, ki smo ga izrazili s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije.....	56
Sl. 21: Primerjava nivoja ekspresije izbranih bakterijskih proteinov MACPF in proteina Torso-like s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije glede na plazmidno DNK .....	57
Sl. 22: Izražanje apikompleksnih proteinov MACPF s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije.....	58
Sl. 23: Posedanje izbranih bakterijskih proteinov MACPF in proteina Torso-like z multilamelarnimi vezikli v polju centrifugalne sile.....	59
Sl. 24: Kontrola posedanja izbranih bakterijskih proteinov MACPF in proteina Torso-like ter njihovih krajših konstruktov brez veziklov v polju centrifugalne sile .....	60
Sl. 25: Vezava ekvinoxina II na liposome, ki smo jih dodali po sintezi s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije.....	61
Sl. 26: Preučevanje interakcij med izbranimi proteini MACPF in liposomi, ki smo jih dodali po sintezi z <i>in vitro</i> transkripcijo-translacijo, z afinitetno ločbo z magnetnimi kroglicami označenimi s streptavidinom.....	63



Sl. 27: Vezava ekvinatoksina II na liposome, ki smo jih dodali ob začetku sinteze s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije.....	64
Sl. 28: Preučevanje vezave izbranih proteinov MAPCF na liposome, ki smo jih dodali ob začetku sinteze s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije z afinitetno ločbo s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami. ....	65
Sl. 29: Domenska arhitektura proteina Torso-like. ....	66
Sl. 30: Izražanje zrelega proteina Torso-like s heksahistidinsko oznako v celicah HEK293T v majhnem obsegu s prehodnim izražanjem gena <i>tsl</i> v pHLsec vektorju.....	67
Sl. 31: Izražanje Torso-like konstruktov z oktahistidinsko oznako v HEK293T v majhnem obsegu s prehodnim izražanjem konstruktov gena <i>tsl</i> v pHLsec vektorju. ....	68
Sl. 32: Izražanje zrelega proteina Torso-like s heksahistidinsko oznako v HEK293T v večjem obsegu s prehodnim izražanjem gena <i>tsl</i> v pHLsec vektorju. ....	68
Sl. 33: Analiza sinteze proteina Torso-like s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije ...	69
Sl. 34: Vpliv dodatka majhnih unilamelarnih veziklov po koncu ali ob začetku sinteze s sistemom <i>in vitro</i> transkripcije-translacije na stopnjo vezave proteina Torso-like na vezikle.....	70
Sl. 35: Vezava proteina Torso-like na liposome v odvisnosti od njihove velikosti. ....	71
Sl. 36: Vezava proteina Torso-like na liposome v odvisnosti od njihove koncentracije. ...	72
Sl. 37: Ireverzibilna vezava proteina Torso-like z liposomi.....	73
Sl. 38: Vezava proteina Torso-like na liposome različnih lipidnih sestav. ....	74
Sl. 39: Vezava domene MACPF proteina Torso-like (konstrukt m iz pregl. 11) na liposome različnih lipidnih sestav .....	75
Sl. 40: Fluorescenca in velikost liposomov po flotaciji v saharoznem gradientu.. ....	76
Sl. 41: Imunodetekcija frakcij po flotaciji v saharoznem gradientu.....	77
Sl. 42: Strukturni model zrelega proteina Torso-like. ....	79
Sl. 43: Poravnava regij skupkov $\alpha$ -vijačnic (CH1 in CH2) človeških proteinov MACPF (perforin in proteini sistema komplementa C9, C8 ( $\alpha$ in $\beta$ ), C7 ter C6) in proteina Torso-like iz vinske mušice. ....	80
Sl. 44: Vpliv aromatskih aminokislin v regiji skupkov $\alpha$ -vijačnic (CH1 in CH2) pri proteinu Torso-like na vezavo na liposome.....	81
Sl. 45: Fotografije velikih unilamelarnih veziklov z in brez proteina Torso-like s presevno elektronsko mikroskopijo.. ....	82
Sl. 46: Imunolokalizacija proteina Torso-like v prisotnosti majhnih unilamelarnih veziklov s presevno elektronsko mikroskopijo. ....	83
Sl. 47: Izražanje in izolacija rekombinantnega listeriolizina O.....	84
Sl. 48: Čiščenje rekombinantnega listeriolizina O z ionsko-izmenjevalno kromatografijo.84	
Sl. 49: Permeabilizacija veziklov celičnih velikosti z rekombinantnim listeriolizinom O. 85	
Sl. 50: Vezilki celičnih velikosti iz membran eritrocitov.....	86
Sl. 51: Shema proteinov MACPF, ki smo jih izbrali za preučevanje interakcij z lipidnimi membranami. ....	89
Sl. 52: Shema vezave proteina Torso-like na lipidne membrane. ....	98

## SLOVARČEK

3D	tridimenzionalna struktura
Ab	protitelo (ang. antibody)
AEBSF	serinski proteazni inhibitor
AK	aminokislina
amp	ampicilin
APC- $\beta$	domnevne ApiPLP C-terminalne domene iz beta ploskev
ApiPLP	perforinu podobni proteini iz debla Apicomplexa (ang. apicomplexan perforin-like proteins)
$A_{\lambda}$	absorbanca pri valovni dolžini $\lambda$
BC-PE	1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin-N-(cap biotinil)
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumine)
Bth-MACPF	protein MACPF iz bakterije <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
CDC	od holesterola odvisni citolizini (ang. cholesterol-dependent cytolysins)
CFTR	cistično fibrozni transmembranski regulator prevodnosti
CH	skupek $\alpha$ -vijačnic (ang. clusters of helices)
CHOL	holesterol
dH <sub>2</sub> O	deionizirana voda
DilC18	1,1'-dioktadecil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbocianin perklorat
DLS	metoda dinamičnega sipanja svetlobe (ang. dynamic light scattering)
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DNA Q-like	domena iz DnaQ-podobne eksonukleazne naddružine proteinov
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DOPC	1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
dt	divji tip
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
EM	eritrocitna membrana
EqII	ekvinatoksin II
FCS	fetusni telečji serum (ang. fetal calf serum)
FD4	4 kDa dekstran označen s FITC
FD10	10 kDa dekstran označen s FITC
FD70	70 kDa dekstran označen s FITC
FITC	fluorescein izotiocianat
FPLC	hitra tekočinska kromatografija (ang. fast protein liquid chromatography)
GFP	zeleni fluorescenčni protein (ang. green fluorescent protein)

GUV	vezikli celičnih velikosti ali orjaški unilamelarni vezikli (ang. giant unilamellar vesicles)
HEK	človeške embrionalne ledvične celice (ang. human embryonic kidney cells)
His6	heksahistidinska oznaka
hly	hemolizin
IgG	protitelo imunoglobulinskega razreda G
IgG <sup>-HRP</sup>	kozja proti-mišja protitelesa IgG sklopljena s hrenovo peroksidazo (ang. horseradish peroxidase)
IMAC	afinitetna kromatografija z imobiliziranim kovinskim ionom (ang. immobilized metal ion affinity chromatography)
InterPro koda	koda proteinov, shranjenih v spletni proteinski bazi InterPro
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozid
IVTT	<i>in vitro</i> transkripcija-translacija
LB	gojišče LB (ang. lysogeny broth)
LLO	listeriolizin O
LUV	veliki unilamelarni vezikli (ang. large unilamellar vesicles)
mAb	monoklonsko protitelo
MAC	proteini sistema komplekta (ang. membrane attack complex)
MACPF	ang. membrane attack complex/perforin
MAOP	ang. membrane attack ookinete protein
MES	2-(N-morfolino)etan sulfonska kislina
MIR	domena poimenovana po manoziltransferaznem, inozitol 1,4,5-trifosfatnem in rianodin receptorju
MLV	multilamelarni vezikli (ang. multilamellar vesicles)
MQ	deionizirana voda filtrirana skozi 0,22 $\mu$ m Milipore filtre (MiliQ H <sub>2</sub> O)
MVV	multivezikularni vezikli (ang. multivesicular vesicles)
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NBD-PE	1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-benzoksadiazol-4-il)
NCBI koda	koda proteinov, shranjenih v spletni bazi NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information)
Ni-NTA	nikljeva nitrilotriocetna kislina
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
OlyA	ostreolizin A
ORI	mesto začetka podvojevanja (ang. origin of replication)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	slani fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline)
PC	fosfatidilholin
PC-PLC	fosfolipaza C širokega spektra (ang. broad-range phospholipase C)

PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PDB koda	koda proteinov, shranjenih v spletni proteinski bazi PDB (ang. protein data bank)
PdI	merilo razpršenosti (ang. polydispersity index)
PE	fosfatidiletanolamin
Penta-His mAb	mišja monoklonska protitelesa proti histidinskemu repu
PFN	perforin
PFO	perfringolizin O
PFP	proteini tvorci por (ang. pore forming proteins)
PfPLP	<i>Plasmodium falciparum</i> PLP
PFT	toksini tvorci por (ang. pore forming toxins)
PI	fosfatidilinozitol
PI-PLC	za fosfatidilinozitol specifična fosfolipaza C (ang. phosphatidylinositol-specific phospholipase C)
Plu-MACPF	protein MACPF iz bakterije <i>Photobacterium luminescens</i>
PlyA	pleurotolizin A
PlyB	pleurotolizin B
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
PLP	perforinu podoben protein iz plazmodija (ang. plasmodium perforin-like protein)
PPLP	plazmodijski PLP
PVDF	polivinil-difluorid
rDHPE	rodamin B 1,2-diheksadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin
RBS	mesto za vezavo ribosoma (ang. ribosome binding site, RBS)
RE	restriksijska endonukleaza
SM	sfingomielin
SPECT	ang. sporozoite microneme protein essential for cell traversal
SUV	majhni unilamelarni vezikli (ang. small unilamellar vesicles)
t50	čas potreben za 50-odstotno hemolizo
TCA	trikloroocetna kislina (ang. trichloroacetic acid)
TEM	transmisijska/presevna elektronska mikroskopija
TgPLP	<i>Toxoplasma gondii</i> PLP
TMH	transmembranska $\beta$ -lasnica (ang. transmembrane hairpin)
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
Tsl	protein Torso-like
tsl	gen za Tsl
UniProt koda	koda proteinov, shranjenih v spletni zbirki proteinskih zaporedij in anotacij UniProt (ang. The Universal Protein Resource)
Vrednost C	mera za oceno kvalitete predvidene 3D strukture proteina (ang. confidence oz C-score)

VM                      vitelinska membrana  
 $\alpha$ -PFT                 $\alpha$ -toksini tvorci por  
 $\beta$ -PFT                    $\beta$ -toksini tvorci por

#### OKRAJŠAVE IMEN AMINOKISLIN

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginska kislina	Asp	D
Cistein	Cys	C
Glutaminska kislina	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glicin	Gly	G
Histidin	His	H
Izolevcin	Ile	I
Levcin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V



## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Proteine MACPF (ang. Membrane Attack Complex/Perforin) in od holesterola odvisne citolizine (CDC, ang. Cholesterol-Dependent Cytolysins) na podlagi nedavnih strukturnih študij uvrščamo v skupno MACPF/CDC naddružino proteinov (Anderluh in Lakey, 2008). V MACPF družini najdemo tako litične kot nelitične proteine iz bakterij, gliv, živali in rastlin (Gilbert in sod., 2012), katerim je skupna domena MACPF, ki je pri litičnih predstavnikih družine odgovorna za nastanek pore v membrani (Steckel in sod., 1983; DiScipio in Berlin, 1999; Pipkin in Lieberman, 2007). Proteini MACPF imajo v organizmih, ki jih proizvajajo, različne vloge – sodelujejo pri imunosti, plenjenju, patogenezi idr., za mnoge pa vloge še ne poznamo (Rosado in sod., 2008; Gilbert in sod., 2012). Za citolizine iz družine CDC, ki jih proizvajajo večinoma po Gramu pozitivne bakterije, je značilno, da je njihova citolitična aktivnost odvisna od prisotnosti holesterola v tarčni membrani, ter da tvorijo velike, od 20 do 40 nm pore (Hotze in Tweten, 2012).

Raziskovalni problem smo razdelili na dva sklopa: v prvem smo na izbranih bakterijskih in evkariontskih proteinih preučevali vlogo domene MACPF, v drugem pa vlogo listeriolizina O (LLO), glavnega virulentnega dejavnika bakterije *Listeria monocytogenes*, pri pobegu bakterije iz fagosoma v citosol.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Za proteine, ki vsebujejo domeno MACPF, sklepamo, da sta za njihovo interakcijo z membranami pomembna prisotnost in položaj dodatnih proteinskih domen (domenska organiziranost). Predvidevamo, da so za prepoznavo in pritrditev/vezavo proteinov MACPF na membrano pomembne domene na C-terminalnem delu. Proteini, ki vsebujejo domeno MACPF, ne pa tudi domene za vezavo na membrane, se po našem mnenju ne bodo vezali na membrano in tvorili por, razen v primeru dvokomponentnega delovanja z drugim proteinom, ki se veže na membrano (npr. kompleks proteina MACPF pleurotolizina B (PlyB) in egerolizinskega proteina ostreolizina A (OlyA)). Sklepamo tudi, da so za vstavev proteinov MACPF v membrano oziroma tvorbo pore pomembne strukturne lastnosti znotraj domene MACPF. Predvidevamo, da se bodo samo tisti proteini, katerih domeno MACPF sestavljajo centralna enota iz štirih  $\beta$ -ravnin in dva skupka  $\alpha$ -vijačnic, ki se lahko razviteta v hidrofobno transmembransko  $\beta$ -strukturo (TMH, ang. transmembrane  $\beta$ -hairpins), sposobni vstaviti v membrano oziroma tvoriti poro (proteini s predvidenima amfipatičnima regijama TMH).

Pričakujemo, da bomo z vezikli celičnih velikosti (GUV) vzpostavili *in vitro* sistem za študij translokacije bakterije *Listeria monocytogenes* iz fagosoma v citosol, s katerim bomo preverili vpliv LLO v tem procesu. Predvidevamo tudi, da bodo nekateri proteini

MACPF/CDC inducirali nastanek uvihkov in internih veziklov v GUV, kot so to že pokazali za perforin (PFN) (Praper in sod., 2011a).

### 1.3 NAMEN RAZISKAVE

Funkcijske lastnosti proteinov MACPF kakor tudi njihove interakcije z lipidnimi membranami so slabo raziskane. Pričakujemo, da bomo uspešno izrazili različne proteine MACPF in s funkcionalnimi študijami dopolnili dosedanje vedenje o njihovi funkciji. Sistematično bomo raziskali interakcije predvsem bakterijskih, kakor tudi nekaterih evkariontskih proteinov MACPF ali samo njihovih posameznih domen z lipidnimi membranami. Pričakujemo, da bomo s tem raziskali pomen domenske organiziranosti proteinov MACPF na interakcije z membranami. Predvidevamo tudi, da bomo z dobljenimi rezultati lažje opredelili zvezo med strukturo in funkcijo tako proteinov MACPF kakor tudi same domene MACPF. S preučevanjem proteinov MACPF, ki jih imajo patogeni organizmi (npr. *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Plasmodium falciparum*) povzročitelji pomembnih bolezni, ter takšnih, ki povzročajo škodo na rastlinah (npr. *Ralstonia solanacearum*), naj bi uspeli vsaj delno pojasniti še nepojasnjeno vlogo teh proteinov v procesu patogeneze. Pričakujemo tudi, da bomo z vzpostavljenim *in vitro* modelom na GUV pojasnili vlogo LLO pri procesu prehoda listerij iz fagosoma v citosol.

Nazadnje pa upamo, da bodo rezultati naših funkcijskih študij na proteinih MACPF dobra osnova za nadaljnje preučevanje teh proteinov in da bodo v nadaljevanju določili tudi njihovo tri-dimenzionalno strukturo.



## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PROTEINI NADDRUŽINE MACPF/CDC

#### 2.1.1 Družina proteinov MACPF

Proteinska družina MACPF (Pfam PF01823) po aktualni verziji podatkovne baze proteinskih družin Pfam (verzija 27.0) vsebuje 1344 različnih zaporedij, ki vsebujejo domeno MACPF (Gilbert in sod., 2012; Finn in sod., 2014). Domeno so poimenovali po proteinih tvorcih por imunskega sistema sesalcev, to so proteini sistema komplementa (MAC, ang. membrane attack complex) in perforin (PFN), kjer so domeno odkrili (Tschopp in sod., 1986).

Proteini, ki vsebujejo domeno MACPF, imajo v organizmih različne vloge. Proteini sistema komplementa in perforin so izjemno pomembni pri obrambi pred virusnimi in bakterijskimi infekcijami kot tudi za odstranjevanje tumorskih celic (Müller-Eberhard, 1988; Voskoboinik in sod., 2006). Protein CAD-1 je pomemben pri obrambi rastlin pred bakterijskimi infekcijami (Morita-Yamamuro in sod., 2005). Proteina AvTX-60A in PsTX-60A sta glavna toksina v strupu morskih vetrnic *Actineria villosa* in *Phyllo-discus semoni* in služita za plenjenje ali odganjanje plenilcev (Oshiro in sod., 2004). Nekateri proteini MACPF imajo pomembno vlogo pri razvoju organizma, npr. insektni protein Torso-like (Tsl) sodeluje pri razvoju anteriornih in posteriornih struktur (Stevens in sod., 1990), sesalčja astrotactin-1 in astrotactin-2 sta pomembna za razvoj živčevja (Zheng in sod., 1996), EPCS50 naj bi imel vlogo pri razvoju trofoblata (Hemberger in sod., 2000), apekstrin iz morskega ježka naj bi imel vlogo pri celični adheziji in razvoju embrija (Haag in sod., 1999), poleg tega pa naj bi sodeloval tudi pri obrambi pred bakterijskimi infekcijami (Huang in sod., 2007). Za večino proteinov z domeno MACPF, ki sodelujejo pri razvoju, ni znano, ali imajo litično ali nelitično funkcijo (Rosado in sod., 2008).

Proteine z domeno MACPF proizvajajo tudi nekateri parazitski in patogeni organizmi. Vsaj 16 različnih jih najdemo v deblu Apicomplexa, v katerega uvrščamo parazite, ki povzročajo številne bolezni, kot so malarija, toksoplazmoza, babezioza idr. (Kafsack in Carruthers, 2010). Trenutno so opredelili lastnosti štirim perforinu podobnim proteinom iz debla Apicomplexa (ApiPLPs, ang. apicomplexan perforin-like proteins): plazmodijska perforinu podobna proteina (PPLP, ang. plasmodium perforin like proteins) PPLP3, imenovan tudi MAOP (ang. membrane attack ookinete protein), in PPLP5, ki sta pomembna za prečkanje ali vdor ookinet v epitelne celice črevesja komarja (Kadota in sod., 2004; Ecker in sod., 2007; Kafsack in Carruthers, 2010). Kafsack in Carruthers domnevata, da naj bi omenjena proteina omogočila parazitu prečkanje epitelnih celic z medsebojno povezavo, analogno interakcijam med proteini sistema komplementa (Kafsack in Carruthers, 2010). PPLP1 ali SPECT2 (ang. sporozoite microneme protein essential for cell traversal) omogoča prečkanje sporozoitov preko jetrnih sinusoidov

(Ishino in sod., 2005). TgPLP1 iz praživali *Toxoplasma gondii* pa omogoča izhod tahizoitov iz gostiteljske celice (Kafsack in sod., 2009).

Proteine z domeno MACPF proizvajajo patogeni organizmi, kot so insektna enterobakterija *Photorabdus luminescens* (Rosado in sod., 2007), obligatni znotrajcelični človeški patogen *Chlamydia trachomatis*, ki je povzročitelj trahoma in spolno prenosljivih bolezni (Taylor in sod., 2010), *Chlamydia pneumoniae*, ki povzroča infekcije zgornjih dihalnih poti (Ponting, 1999), rastlinski patogen *Ralstonia solanacearum*, ki okužuje več kot 200 rastlinskih vrst (Vailleau in sod., 2007) idr. Trenutno še ni znano, ali ti bakterijski proteini, ki vsebujejo domeno MACPF, tvorijo pore in sodelujejo pri patogenezi (Rosado in sod., 2008). Poleg patogenih bakterij proteine z domeno MACPF izražajo tudi številne bakterije, ki sestavljajo normalno mikrofloro sesalcev, npr. protein Bth-MACPF iz črevesne bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* (Xu in sod., 2010b).

Geni za proteine z domeno MACPF pri bakterijah verjetno izhajajo iz horizontalnega prenosa od evkariontov kot posledica prilagoditve na okolje gostitelja (Wolf in sod., 1999; Ponting, 1999; Xu in sod., 2010b). Večinoma gre pri bakterijskih proteinih MACPF za napovedane proteine, saj na njihov obstoj sklepamo iz genomskih zaporedij (Kalman in sod., 1999; Gabriel in sod., 2006). Izjema so proteini Plu-MACPF iz *Photorabdus luminescens* in Bth-MACPF iz *Bacteroides thetaiotaomicron*, ki so jima določili kristalno strukturo, ter CT153 iz *Chlamydia trachomatis* (Rosado in sod., 2007; Taylor in sod., 2010; Xu in sod., 2010b). Plu-MACPF je nelitičen protein z neznano funkcijo, ki se je sposoben vezati na membrano (Rosado in sod., 2007). Fiziološke vloge Bth-MACPF ne poznamo, domnevajo pa, da je vpleten pri transportu snovi skozi membrane (Xu in sod., 2010b). CT153 je potencialni virulentni dejavnik, ki verjetno sodeluje pri vezavi na membrano gostiteljske celice v zgodnji fazi okužbe (Taylor in sod., 2010).

#### 2.1.1.1 Zgradba domene in proteinov MACPF

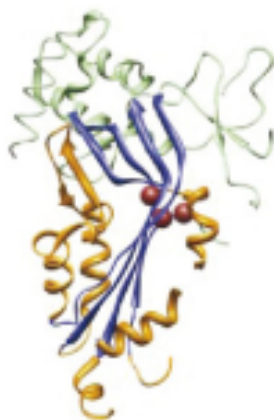
Kristalografske študije na proteinih MACPF (pregl. 1) so omogočile vpogled v njihovo strukturo ter presenetljivo evolucijsko povezanost s proteini iz družine CDC (glej sl. 3 in poglavje 2.1.2.1) (Rosado in sod., 2007, 2008; Anderluh in Lakey, 2008; Gilbert in sod., 2012).

Preglednica 1: Proteini MACPF z določeno 3D-strukturo. C5-9, proteini sistema komplekta (MAC);  $\alpha$ ,  $\gamma$ , podenoti C8; C5b-6, kompleks C5b in C6; sC5b9, topni kompleks proteinov MAC.

Table 1: MACPF proteins with determined 3D structure. C5-9, proteins of membrane attack complex (MAC);  $\alpha$ ,  $\gamma$ , subunits of C8; C5b-6, complex of C5b and C6; sC5b9, soluble complex of MAC proteins.

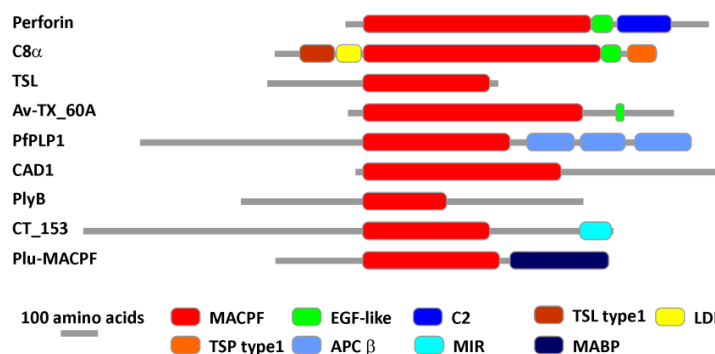
Protein	Organizem	PDB koda	Vir
Plu-MACPF	<i>Photobacterium luminescens</i>	2QP2	(Rosado in sod., 2007)
C8 $\alpha$	<i>Homo sapiens</i>	2QQH	(Hadders in sod., 2007)
C8 $\alpha\gamma$	<i>Homo sapiens</i>	2RD7	(Slade in sod., 2008)
Bth-MACPF	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	3KK7	(Xu in sod., 2010b)
Perforin	<i>Mus musculus</i>	3NSJ	(Law in sod., 2010)
C8	<i>Homo sapiens</i>	3OJY	(Lovell in sod., 2011)
C6	<i>Homo sapiens</i>	3T5O	(Aleshin in sod., 2012b)
C5b-6	<i>Homo sapiens</i>	4E0S	(Aleshin in sod., 2012a)
C5b6 in sC5b9	<i>Homo sapiens</i>	4A5W	(Hadders in sod., 2012)
Pleurotolizin B	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4OEJ	(Lukoyanova in sod., 2015)

Ohranjenost zaporedja domene MACPF znotraj družine je nizka in znaša le okoli 20 %, vsi člani družine pa vsebujejo motiv MACPF (Y/W)-G-(T/S)-H-(F/Y)-X<sub>6</sub>-GG (X predstavlja katerokoli aminokislino) (Ponting, 1999). Ta leži v predelu domene MACPF, ki je odgovoren za fleksibilnost centralnih  $\beta$ -struktur domene MACPF (glej spodaj) (Rosado in sod., 2008). Za fleksibilnost sta ključna predvsem dva glicinska ostanka na mestu 2 in 12 znotraj motiva MACPF, ki sta edina aminokislinska ostanka ohranjena znotraj naddružine MACPF/CDC (Rosado in sod., 2007; Gilbert in sod., 2012; Sonnen in Henneke, 2014). Ključna značilnost domene MACPF je centralna enota iz štirih vzporednih in na sredini upognjenih antiparalelnih  $\beta$ -ploskev ter dveh skupkov  $\alpha$ -vijačnic, CH1 in CH2 (CH, ang. clusters of helices), ki obdajata centralno enoto (Kondos in sod., 2010) (sl. 1). Litični proteini MACPF, kot npr. perforin in C9, naj bi z razvitjem regij CH1 in 2 v amfipatične (tj. izmenjujoči se hidrofobni in polarni deli)  $\beta$ -trakove (pri CDC so to TMH 1 in 2, glej poglavje 2.1.2.1) prečili membrano in tvorili poro (Rosado in sod., 2007; Law in sod., 2010; Aleshin in sod., 2012b; Weiland in sod., 2014). Aminokislinsko zaporedje znotraj regij CH pri preostalih proteinih sistema komplekta (C6, C7, C8 $\alpha$  in  $\beta$ ) ima manj amfipatičen značaj (Hadders in sod., 2007; Rosado in sod., 2007). Regiji CH pri C8 ( $\alpha$  in  $\beta$ ) sta bolj hidrofobni, še posebej C8 $\alpha$ , kar omogoča vstavitve proteina v membrano in sidranje MAC kompleksa na membrani (Steckel in sod., 1983; Hadders in sod., 2007). Pri C6 in C7 sta CH regiji manj hidrofobni in tudi krajši kot pri C8, C9 in perforinu, zaradi česar nista sposobni prečiti membrane, temveč se verjetno zgolj vstavita v vrhnji sloj tarčne membrane (Silversmith in Nelsestuen, 1986; Aleshin in sod., 2012b). Poleg vstavitve proteina v membrano ter tvorbe pore je domena MACPF pomembna tudi za oligomerizacijo, npr. perforinskih monomerov (Baran in sod., 2009), ter domnevno tudi proteinov sistema komplekta (Gilbert in sod., 2012).



Slika 1: Struktura domene MACPF proteina C8 $\alpha$  (PDB koda: 2QQH). *Modro*, centralna enota iz štirih prepognjenih  $\beta$ -ploskev; *zlato*, dva skupka alfa vijačnic (CH1 in CH2); *rdeče kroglice*, ohranjeni glicinski ostanki. Prirejeno po (Lukyanova in Saibil, 2008:52).

Nekateri proteini MACPF, kot je Torso-like, vsebujejo samo domeno MACPF, številni pa vsebujejo še eno ali več dodatnih domen (Gilbert in sod., 2012) (sl. 2).



Slika 2: Domenska organiziranost proteinov MACPF. Prirejeno po (Gilbert in sod., 2012:2085).

Dodatne domene pri proteinih MAC imajo pomembno vlogo pri sestavljanju C5b-8 iniciacijskega kompleksa, pri regulaciji konformacijskih sprememb proteinov in pri stabilizaciji končne pore (Aleshin in sod., 2012b). Nekateri proteini imajo poleg domene MACPF še dodatne domene za vezavo na tarčno membrano, ki so navadno na C-terminalnem delu proteina (Gilbert in sod., 2012). Tak primer je perforinska domena C2 (Voskoboinik in sod., 2005) (glej poglavje 2.1.1.2).

#### 2.1.1.2 Interakcije proteinov MACPF z lipidnimi membranami

Začetno vezavo proteinov MACPF na tarčne membrane v večini primerov posredujejo C-terminalne domene (Anderluh in Lakey, 2008; Gilbert in sod., 2012). Čeprav se razlikujejo v zaporedju in strukturi, so večinoma zgrajene iz  $\beta$ -ploskev (Kafsack in Carruthers, 2010). Pri perforinu je to domena C2, ki se veže na tarčno membrano v odvisnosti od  $\text{Ca}^{2+}$  ionov (Voskoboinik in sod., 2005; Urrea Moreno in sod., 2009), pri

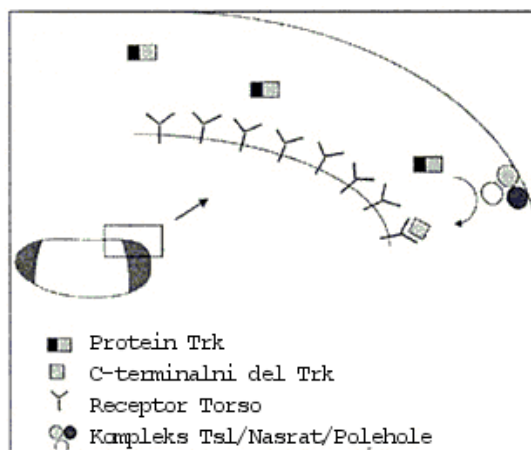
Plu-MACPF domena v obliki  $\beta$ -prizme (Rosado in sod., 2007), pri ApiPLP pa naj bi vezavo na membrane posredovale domnevne ApiPLP C-terminalne domene iz beta ploskev (APC- $\beta$ ) (Kafsack in Carruthers, 2010), kar so dokazali v primeru domene APC- $\beta$  pri TgPLP1 iz *Toxoplasma gondii* (Roiko in Carruthers, 2013). Proteini sistema komplementa ne vsebujejo specifične domene za vezavo, temveč ustvarijo receptor za vezavo na membrano s povezovanjem komponent med sabo. Začetno vezavo kompleksa C5b-7 posreduje razvitje regij CH komponente C7 in verjetno tudi C6 v vrhnji del lipidnega dvosloja, pri čemer domena TSP1 komponente C6 podpira kompleks na membrani. Stabilno vezavo kompleksa pa omogoči sidranje C8 v membrano in zaporedno vstavljanje 12 do 14 komponent C9, ki tvorijo končno poro (Aleshin in sod., 2012b). Proteini MACPF, ki ne vsebujejo dodatne domene na C-koncu, bi se lahko vezali na membrano v sodelovanju z drugim proteinom, kot so to pokazali na primerih nekaterih bi-komponentnih glivnih toksinov. Proteina MACPF iz gobe *Pleurotus ostreatus* in *Pleurotus eryngii*, Pleurotolizin B (PlyB) in erilizin B, sta citolitično aktivna le v kombinaciji z ostreolizinom/pleurotolizinom A (Oly/PlyA) oziroma erilizinom A (Tomita in sod., 2004; Shibata in sod., 2010; Ota in sod., 2013). Nedavna študija skupine Michelle Dunstone na bikomponentnem toksinu iz gobe *Pleurotus ostreatus* je pokazala, da sta za sidranje ene kompone B na membrano potrebni dve komponenti A (Lukoyanova in sod., 2015). Zanimivo so vezavo na nepolaro vitelinsko membrano opazili v primeru proteina Torso-like iz mušice *Drosophila melanogaster*, ki ne vsebuje drugih domen kot MACPF, vendar mehanizem vezave še ni znan (Stevens in sod., 2003).

#### 2.1.1.3 Protein Torso-like iz vinske mušice *Drosophila melanogaster*

Protein Torso-like (Tsl) je edini predstavnik družine proteinov MACPF v vinski mušici *Drosophila melanogaster* (Ponting, 1999). Molekularni mehanizem njegovega delovanja še ni pojasnjen, sodeluje pa tako v embrionalnem razvoju (Stevens in sod., 1990) kakor kasneje v razvoju vinske mušice pri preobrazbi iz ličinke v bubo (Grillo in sod., 2012).

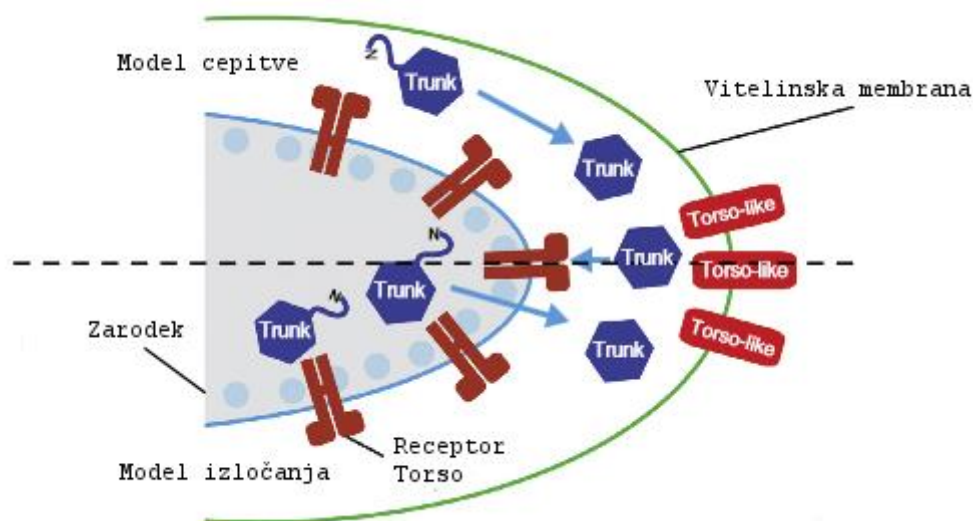
Pri embriogenezi je gen za Tsl eden izmed ključnih genov Torso signalne poti, ki se izražajo v maternih celicah in uravnavajo razvoj terminalnih struktur (glave in repa) pri zarodku vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) (Savant-Bhonsale in Montell, 1993). Glavni korak pri razvoju terminalnih struktur je aktivacija tirozin kinaznega receptorja Torso (Sprenger in sod., 1989), ki preko signalne poti Ras-Raf-MAP-K/ERK povzroči izražanje transkripcijskih faktorjev *tailles* in *huckbein* (Weigel in sod., 1990; Brönner in Jäckle, 1991). Slednja nato preko regulacije izražanja različnih genov določata razvoj terminalnih struktur (Brönner in Jäckle, 1996; Furriols in Casanova, 2003). Torso se nahaja po celotni površini plazemske membrane embrija, vendar se aktivira le na obeh polih (Casanova in Struhl, 1989). Za prostorsko omejeno aktivacijo receptorja Torso je ključen protein Tsl, ki ga izražajo somatske folikularne celice na obeh koncih embrija (Stevens in sod., 1990; Furriols in sod., 2007). Tsl se izloča v perivitelinski prostor med membrano embrija in vitelinsko membrano (VM) (Jiménez in sod., 2002). VM je

nepolarna membrana, ki jo sestavljajo proteinske in ne fosfolipidne molekule (Fargnoli in Waring, 1982). Tsl se lahko veže po celotni površini VM, vendar se nahaja predvsem na koncih obeh polov VM, kjer je tudi njegova aktivnost večja (Stevens in sod., 2003). Za kopičenje in stabilno vstavitve Tsl v VM na polih so potrebni proteini Nasrat, Polehole in Clos, ki sodelujejo tudi pri nastanku VM in pri Torso signalni poti (Jiménez in sod., 2002; Ventura in sod., 2010). Aktivacijo receptorja Torso sproži vezava liganda, ki se nahaja v perivitelinskem prostoru (Sprenger in Nüsslein-Volhard, 1992). Študije so pokazale, da se na receptor Torso veže C-terminalni del proteina Trunk (Casanova in sod., 1995; Casali in Casanova, 2001).



Slika 3: Model aktivacije receptorja Torso na površini plazemske membrane embrija vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Protein Torso-like (Tsl) se nahaja na notranji strani vitelinske membrane v domnevem kompleksu s proteinoma Polehole in Nasrat. Prirejeno po (Furriols in Casanova, 2003:1948).

Henstridge in sod. so pokazali, da je proteolitična cepitev proteina Trunk nujna za njegovo aktivnost in da ta poteče neodvisno od Tsl. Avtorji predpostavljajo, da Tsl po proteolizi proteina Trunk kontrolira lokalno aktivacijo receptorja Torso (Henstridge in sod., 2014). Duncan in sod. (2014) predlagajo model, kjer Tsl, ki je vstavljen v VM, preko vezave na plazemsko membrano embrija uravnava lokalno izločanje aktivnega proteina Trunk na obeh koncih zarodka (sl. 4).



Slika 4: Modela aktivacije signalne poti Torso: prevladovani model cepitve (ang. cleavage model) (zgoraj) in model izločanja (ang. secretion model) (spodaj). Pri zgornjem naj bi preotelitična cepitev proteina Trunk potekla na obeh koncih zarodka po izločanju proteina v perivitelinski prostor. Pri spodnjem naj bi do proteolitične cepitve proteina Trunk prišlo pred izločanjem. Lokalno izločanje na obeh koncih zarodka pa naj bi reguliral na vitelinsko membrano vezan protein Torso-like in sicer preko vezave s plazemsko membrano zarodka. Prirejeno po (Duncan in sod., 2014:2)

Nedavno so odkrili, da ima receptor Torso pomembno vlogo tudi pri metamorfozi (Rewitz in sod., 2009). Od genov, ki so pomembni za razvoj terminalnih struktur embrija, poleg torso le *tsl* sodeluje tudi pri procesu metamorfoze in je potreben za aktivnost receptorja Torso (Grillo in sod., 2012). Johnson in sod. so pokazali, da *Tsl* neodvisno od Torso vpliva na časovni potek razvoja in na velikost organizma. Poleg tega so v isti študiji pokazali, da se mehanizem delovanja *Tsl* v procesu embriogeneze razlikuje od procesa metamorfoze (Johnson in sod., 2013).

Vloga genov *torso*, *torso-like* in ostalih genov, ki pri zarodku vinske mušice sodelujejo pri razvoju terminalnih struktur, se pri drugih vrst žuželk razlikuje (Schoppmeier in Schröder, 2005; Duncan in sod., 2013; Weisbrod in sod., 2013). Pri sistemu razvoja terminalnih struktur embrija vinske mušice je preko uporabe obstoječih komponent evolucijsko starejših signalnih poti nastala nova signalna pot (Duncan in sod., 2013; Weisbrod in sod., 2013). Weisbrod in sod. domnevajo, da je prvotna vloga *tsl* bila verjetno koordinacija posteriorne rasti (Weisbrod in sod., 2013).

### 2.1.2 Družina proteinov CDC

Proteinska družina CDC (Pfam PF01289) je velika družina proteinov, v katero po aktualni verziji podatkovne baze proteinskih družin Pfam (verzija 27.0) uvrščamo 995 različnih zaporedij iz 457 vrst (Finn in sod., 2014). CDC proizvajajo predvsem številne po Gramu pozitivne bakterije iz rodov *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Streptococcus* idr., kjer so toksine prvotno odkrili (Tweten, 2005). Nedavno pa so predstavnike proteinov CDC odkrili tudi pri po Gramu negativnih bakterijah, dva pa celo med evkarionti (Hotze in

Tweten, 2012; Anderluh in sod., 2014). CDC so pomembni pri patogenezi proizvajajočega organizma. Najbolj znani predstavniki družine so perfringolizin O iz *Clostridium perfringens*, pnevmolizin iz *Streptococcus pyogenes*, listeriolizin O iz *Listeria monocytogenes* idr. (Gilbert, 2010).

#### 2.1.2.1 Zgradba proteinov CDC

Proteini CDC so sodeč po določenih strukturah (pregl. 2) sestavljeni iz dveh regij: C-terminalne regije poimenovane domena 4 (D4) (glej poglavje 2.1.2.2) in N-terminalnega dela iz domen 1, 2 in 3 (D1-3), ki predstavlja večji del proteina (sl. 5) (Rossjohn in sod., 1997).

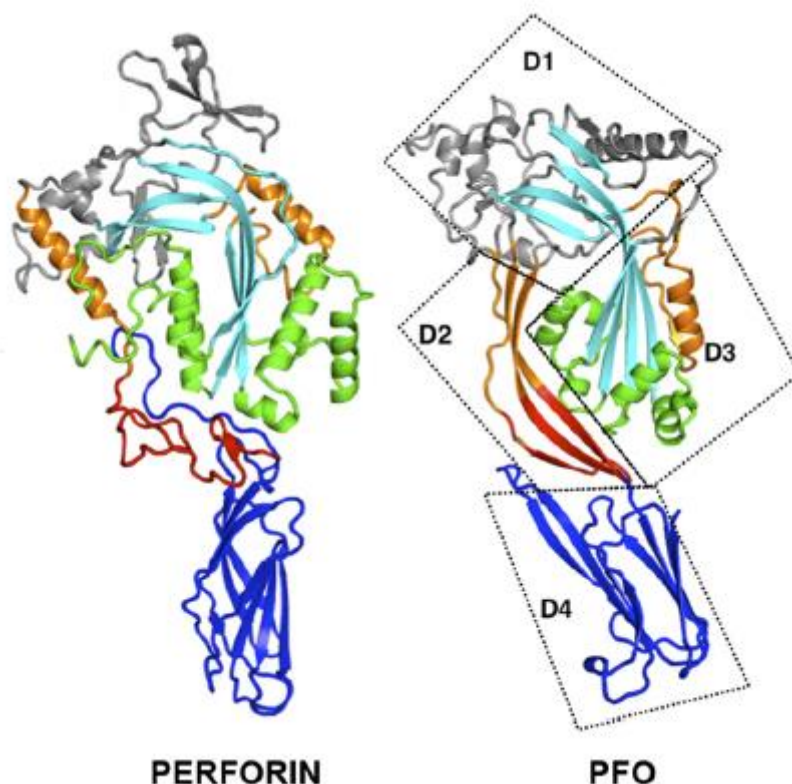
Preglednica 2: Predstavniki od holesterola odvisnih citolizinov z določeno 3D strukturo.

Table 2: Members of cholesterol-dependent cytolysins with determined 3D structure.

Protein	Okrajšava	Organizem	PDB koda	Vir
Perfringolizin O	PFO	<i>Clostridium perfringens</i>	1PFO	(Rossjohn in sod., 1997)
Intermedilizin	ILY	<i>Streptococcus intermedius</i>	1S3R	(Polekhina in sod., 2005)
Antrolizin O	ALO	<i>Bacillus anthracis</i>	3CQF	(Bourdeau in sod., 2009)
Suilizin	SLY	<i>Streptococcus suis</i>	3HVN	(Xu in sod., 2010a)
Streptolizin O	SLO	<i>Streptococcus pyogenes</i>	4HSC	(Feil in sod., 2014)
Listeriolizin O	LLO	<i>Listeria monocytogenes</i>	4CDB	(Köster in sod., 2014)

Jedro N-terminalnega dela predstavlja pet antiparalelnih in prepognjenih beta ploskev. Te so mestoma prekinjene z alfa vijačnicami od katerih dva skupka le-teh, TMH1 in TMH2 (TMH, ang. transmembrane hairpin), iz D3 omogočata tvorbo transmembranskega beta sodčka (Shepard in sod., 1998; Shatursky in sod., 1999). D1 omogoča oligomerizacijo proteinov na membrani, D2 pa deluje kot fleksibilen povezovalec med D4 in N-terminalnim delom proteina in omogoča vstavljanje regij TMH v membrano (Gilbert in sod., 1999; Czajkowsky in sod., 2004; Tilley in sod., 2005). Glede na strukturno podobnost s proteini MACPF (Rosado in sod., 2008; Anderluh in Lakey, 2008) nekateri avtorji predlagajo, da bi domeni D1 in D3 poimenovali zgornji in spodnji segment domene MACPF/CDC, D2 in D4 pa bi lahko označili kot regulatorni del molekule (Aleshin in sod., 2012b; Gilbert in sod., 2012). Pri proteinu sistema komplementa C6 regulatorni del sestavljajo domene EGF, TS 1-3, pri perforinu pa domeni EGF in C2. D2 pri CDC ima enako vlogo kot domeni EGF pri C6 in perforinu, D4 pa je homologna C2 pri perforinu (Gilbert, 2014) in morda domeni TS1 pri C6 (Aleshin in sod., 2012b) (sl. 5).





Slika 5: Primerjava struktur proteina MACPF (perforin) in CDC (perfringolizin O). *Levo*, perforin (PFN), PDB koda: 3NSJ; *desno*, perfringolizin O (PFO), PDB koda: 1PFO. Domene pri PFO so označene z D1-D4. *Turkizno*, centralna enota iz prepognjenih  $\beta$ -ploskev; *zeleno*, CH1 in 2 oziroma TMH 1 in 2; *modro*, domena za vezavo na membrano (C2 pri PFN ter Ig domena 4 pri PFO). Vijačnici označeno z oranžno in domena EGF (rdeče) pri perforinu so funkcionalno analogni domeni 2 pri PFO. Preostali del molekule je označen s sivo. Prirejeno po (Aleshin in sod., 2012b:10214).

#### 2.1.2.2 Interakcije proteinov CDC z lipidnimi membranami

Interakcijo z lipidnimi membranami pri proteinih CDC posredujejo delno domena 3, ki tvori transmembransko poro (glej poglavje 2.1.2.1), ter C-terminalna imunoglobulinska (Ig) domena 4 (D4), ki je odgovorna za začetno vezavo proteinov CDC z membranami (Rossjohn in sod., 1997; Soltani in sod., 2007). Na dnu D4, ki je sestavljena iz beta struktur, se nahajajo ključne regije za vezavo na membrano: ohranjeno zaporedje bogato s triptofani (undekapeptid) (Rossjohn in sod., 1997; Polekhina in sod., 2005; Bourdeau in sod., 2009), ter zlasti tri zanke L1-L3 in aminokislinski par treonin-levcin znotraj zanke L1, ki naj bi bil ključen za prepoznavo holesterola v tarčni membrani (Soltani in sod., 2007; Farrand in sod., 2010). Za vezavo proteinov CDC s holesterolom je ključnega pomena njegova dostopnost v tarčni membrani (Flanagan in sod., 2009). Za razliko od večine proteinov CDC, ki se vežejo na holesterol, se intermedilizin veže na proteinski receptor CD59 (Giddings in sod., 2004).

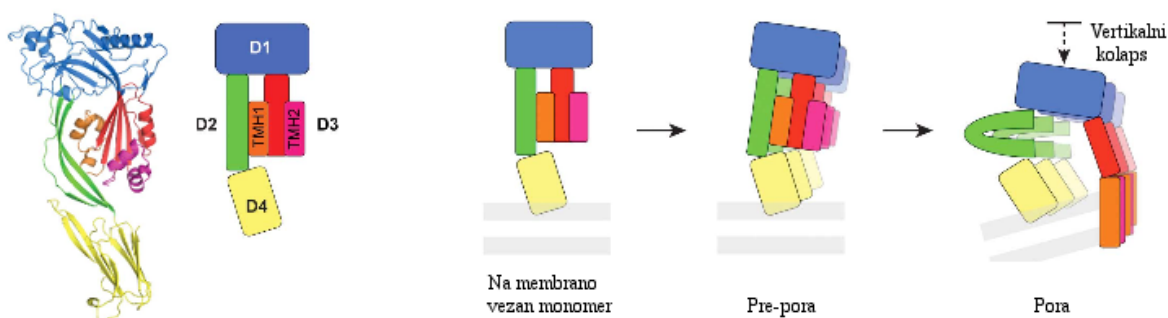
## 2.2 PROTEINI TVORCI POR

Proteine oziroma toksine tvorce por (v nadaljevanju PFP/PFT iz ang. pore forming proteins/toxins), uporabljajo za napad, invazijo ali obrambo živa bitja od bakterij do višjih organizmov, kot so glive, rastline, ožigalkarji in celo sesalci (Gonzalez in sod., 2008). Ti toksini imajo zanimivo lastnost, da so v raztopini prisotni v vodotopni obliki in se lahko konformacijsko spremenijo in vstavijo v membrano ter tvorijo poro (Anderluh in Lakey, 2008). Opisali so več kot 80 različnih družin PFT, ki jih v grobem delimo na  $\alpha$ -toksine tvorce por ( $\alpha$ -PFT) in  $\beta$ -toksine tvorce por ( $\beta$ -PFT), glede na to ali prečkajo membrano z  $\alpha$ -vijačnicami ali  $\beta$ -strukturami. Razlika med  $\alpha$ - in  $\beta$ -PFT je tudi v prisotnosti oziroma odsotnosti hidrofobnih regij znotraj primarnega aminokislinskega zaporedja.  $\alpha$ -PFT vsebujejo hidrofobne regije znotraj vijačnic, s katerimi ti toksini prečkajo lipidni dvosloj. Za razliko od  $\alpha$ -PFT pa  $\beta$ -PFT ni mogoče uvrstiti med transmembranske proteine na podlagi hidrofobnosti.  $\beta$ -PFT ustvarijo hidrofobno površino, ki je potrebna za vstavitve v membrano, s sestavljanjem parov amfipatičnih  $\beta$ -trakov (Iacovache in sod., 2008). Proteine iz naddružine proteinov MACFP/CDC uvrščamo v skupino  $\beta$ -PFT (Anderluh in Lakey, 2008).

### 2.2.1 Mehanizem tvorbe por proteinov MACPF/CDC

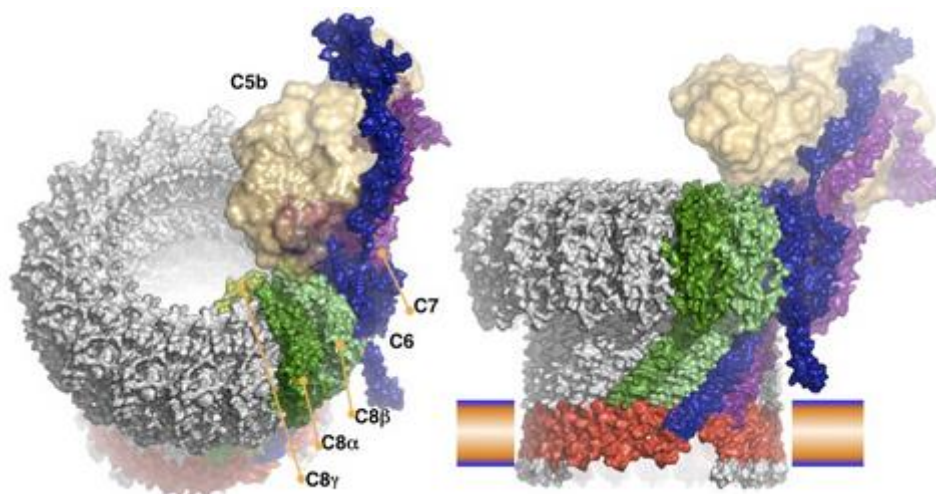
Litični predstavniki naddružine proteinov MACFP/CDC tvorijo pore različnih velikosti: od največjih do sedaj poznanih por velikosti 25 do 40 nm, ki jih tvori 35 do 50 povezanih monomerov CDC (Hotze in Tweten, 2012), do manjših, kot so npr. pore dvokomponentnega PFP iz glive, kjer 13 monomerov pleurotolizina B in 26 monomerov pleurotolizina A tvori poro velikost 4 do 5 nm (Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013; Lukoyanova in sod., 2015). Velikost perforinske pore, ki jo sestavlja od 19 do 24 monomerov, je nekje vmes in znaša med 10 do 25 nm (Law in sod., 2010; Praper in sod., 2011b).

Mehanizem tvorbe pore pri proteinih CDC je bil najbolj preučen na primeru PFO (Tweten, 2005; Gilbert, 2010). Vezava CDC na holesterol v tarčni membrani povzroči konformacijske spremembe in oligomerizacijo proteinskih monomerov (Ramachandran in sod., 2004; Heuck in sod., 2007). Nastane pre-porni kompleks obročaste oblike, ki vključuje med 35 do 50 monomerov (Shepard in sod., 2000). Konformacijske spremembe naj bi omogočila ohranjena glicinska ostanka na pregibu dveh centralnih beta trakov domene 3 (glej poglavje 2.1.1.1 in sl. 1). V zadnjem koraku pride do vstavitve pre-pornega kompleksa v membrano in tvorbe transmembranske pore iz  $\beta$ -sodčka (Shepard in sod., 1998; Shatursky in sod., 1999; Dang in sod., 2005). Ključni pri tem koraku sta domeni D2 in D3.  $\beta$ -sodčkasto poro tvorijo amfipatični  $\beta$ -trakovi, ki nastanejo z razvitjem skupkov  $\alpha$ -vijačnic iz regije TMH1 in 2 domene D3 (Shepard in sod., 1998; Shatursky in sod., 1999). Vstavitve razvitih  $\beta$ -trakov v membrano pa omogoči vertikalni kolaps domene D2 (Czajkowsky in sod., 2004) (sl. 6).



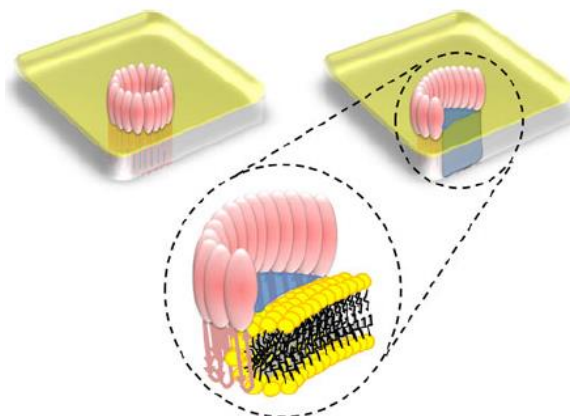
Slika 6: Mehanizem tvorbe pore proteinov CDC. *Levo*, 3D zgradba perfringolizina O (PFO) s shematsko ponazoritvijo domen (D1, modro; D2, zeleno; D3, rdeče z oranžnim TMH1 in rožnatim TMH2 (ang. transmembrane hairpin); D4, rumeno). *Desno*, model tvorbe CDC pore (glej tekst 2.2.1). Prirejeno po (Reboul in sod., 2014:3).

Glede na strukturno podobnost so podoben mehanizem tvorbe pore predlagali tudi za proteine MACPF (Hadders in sod., 2007; Rosado in sod., 2007). Kot pri proteinih CDC naj bi tudi proteini MACPF prečili membrano in tvorili  $\beta$ -sodčkasto poro z razvitjem alfa vijačnic iz regij CH v amfipatične beta trakove (Law in sod., 2010; Aleshin in sod., 2012b). Vendar pa obstajajo tudi razlike v modelu tvorbe por med proteini CDC in MACPF. Poseben primer so npr. proteini sistema komplementa, ki se od ostalih proteinov MACPF/CDC razlikujejo v prvem koraku pri tvorbi pore, tj. vezavi na membrano (glej poglavji 2.1.1.2 in 2.1.2.2). Za tvorbo MAC pore je najprej potrebna izgradnja receptorja C5b-7 na tarčni membrani, ki nato postane del MAC pore (Aleshin in sod., 2012b). Proteini MACPF v centralni regiji domene MACPF/CDC vsebuje le štiri beta trakove, proteini CDC pa pet (glej poglavji 2.1.1.1 in 2.1.2.1). Pri oligomerizaciji CDC monomerov pride do odmika petega traka beta ( $\beta_5$ ) in posledično izpostavitve  $\beta_4$ , ki se poveže z  $\beta_1$  sosednjega monomera (Ramachandran in sod., 2004). Zaradi odsotnosti  $\beta_5$  je oligomerizacija pri proteinih MACPF verjetno regulirana drugače (Sonnen in Henneke, 2014). Ta pri perforinu poteka preko solnih mostičkov med dvema nasprotno nabitima aminokislinskima ostankoma dveh monomerov (Baran in sod., 2009), podobno pa verjetno tudi med komponentami MAC kompleksa (Gilbert in sod., 2012). Za razliko od CDC so regije CH pri proteinih MACPF okoli 2-krat daljše, zato pri zadnjih naj ne bi prišlo do vertikalnega kolapsa (Sonnen in Henneke, 2014). Za perforin so Law in sod. predlagali, da naj bi bil v pori s centralnimi beta trakovi in regijami CH obrnjen proti zunanemu delu pore (Law in sod., 2010). Takšna orientacija je malo verjetna, saj je v nasprotju s preostalimi preučevanimi predstavniki CDC in proteini MAC (Aleshin in sod., 2012b; Hadders in sod., 2012; Gilbert in sod., 2012). Pri perforinu so podobno kot pri proteinih CDC pokazali tvorbo tako por kot pre-por (Praper in sod., 2011b), medtem ko proteini kompleksa MAC tvorijo poro z zaporednim vstavljanjem komponent v rastočo poro (Aleshin in sod., 2012b) (sl. 7).



Slika 7: Atomski model zrelega MAC kompleksa prikazan od zgoraj (levo) in od strani (desno). Vsaka komponenta sistema komplekta je prikazana z drugo barvo, razen transmembranske regije, ki so prikazane rdeče. Membrana na sliki desno je prikazana modro-oranžno. Prirejeno po (Aleshin in sod., 2012b:10218).

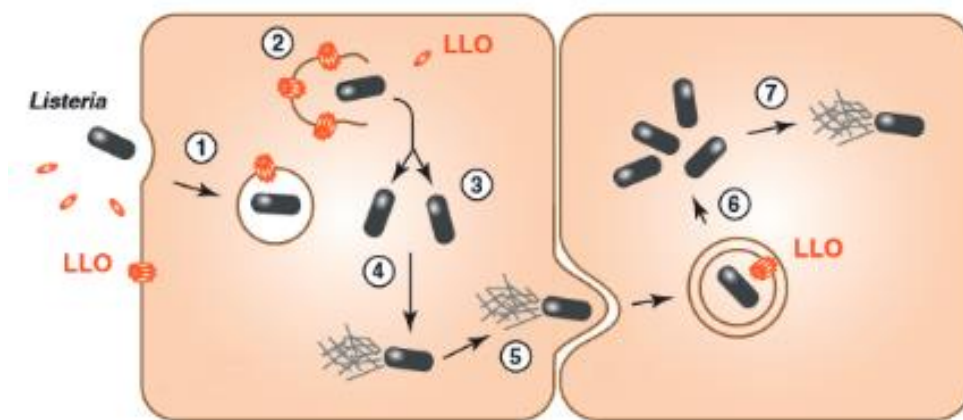
Proteini MACPF/CDC tvorijo pore različnih struktur in posledično različnih velikosti, kot omenjeno na začetku poglavja. Raziskovalci so z različnimi metodami pokazali, da lahko proteini MACPF/CDC tvorijo obročaste pore, ki so v celoti sestavljene iz proteinskih delov, kot tudi lokaste pore, kjer del pore tvorijo lipidne molekule (Gilbert in sod., 2012) (sl. 8). Pri tem lipidna sestava tarčne membrane vpliva na velikost, obliko ter prevodnost pore (Praper in sod., 2011b; Marchioretto in sod., 2013; Gilbert in sod., 2014).



Slika 8: Shematski prikaz obročaste (levo zgoraj) in lokaste (desno zgoraj) MACPF/CDC pore. Prirejeno po (Gilbert in sod., 2012:2091).

### 2.3 VLOGA LISTERIOLIZINA O PRI POBEGU LISTERIJE IZ FAGOSOMA V CITOSOL

Listeriolizin O (LLO) je neobičajen član toksinov tvorcev por iz družine proteinov CDC, saj ga za razliko od drugih članov družine proizvaja znotrajcelični patogen (Schnupf in Portnoy, 2007). *Listeria monocytogenes* je po Gramu pozitivna fakultativno anaerobna bakterija, ki lahko pri imunsko oslabljenih posameznikih povzroča listeriozo. Ta življenjsko ogrožujoča bolezen se pri ljudeh v 20 – 30 % konča s smrtjo (Swaminathan in Gerner-Smidt, 2007). Po vstopu v celico s fagocitozo se listerija znajde v fagosomu, od koder pobegne v citosol, kjer se začne razmnoževati (Tilney in Portnoy, 1989; Schnupf in Portnoy, 2007). LLO je ključni virulentni dejavnik pri infekcijskem ciklu listerije, saj je vpleten v več različnih faz znotrajceličnega življenjskega kroga bakterije (Hamon in sod., 2012). LLO neposredno ali posredno preko tvorbe pore vpliva na: *i*) vstop bakterije v celico gostitelja (Vadia in sod., 2011), *ii*) različne signalne poti gostitelja (Gekara in Weiss, 2004; Gonzalez in sod., 2011), *iii*) sumoilacijo gostiteljskih proteinov (Ribet in sod., 2010), *iv*) avtofagijo (Meyer-Morse in sod., 2010), *v*) izražanje nekaterih genov, ki so pomembni za imunsko obrambo (Hamon in sod., 2007), *vi*) imunski odgovor (Carrero in sod., 2012), *vii*) apoptozo (Carrero in sod., 2004) idr. Ključna vloga LLO pa je uravnavanje pobega bakterije iz fagosoma (Schnupf in Portnoy, 2007) (sl. 9).



Slika 9: Shematski prikaz znotrajceličnega življenjskega cikla bakterije *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* inducira lasten prevzem v gostiteljsko celico, kjer se znajde v fagosomu (1). Pobeg bakterije iz fagosoma omogočijo listeriolizin O (LLO) in fosfolipazi C (PC-PLC in PI-PLC) (glej tekst spodaj) (2). Bakterija se začne v citosolu razmnoževati (3) in izražati protein ActA (4), s katerim povzroči polimerizacijo aktinskih filamentov, ki potiskajo bakterijo skozi citoplazmo v sosednjo gostiteljsko celico (5). Tam bakterijo obdaja vakuola iz dvojne membrane, iz katere bakterija pobegne predvsem s pomočjo LLO in fosfolipaz C (6) in začne z novim znotrajceličnim življenjskim ciklom (7). Prirejeno po (Hamon in sod., 2012:362).

Mutanta *L. monocytogenes*, ki ne proizvaja LLO, ostane v fagosomu in se ne razmnožuje, kar so pokazali na monosloju mišjih makrofagov iz kostnega mozga (Portnoy in sod., 1988; Beauregard in sod., 1997), J774 makrofagni celični liniji (Portnoy in sod., 1988; Henry in sod., 2006), CL.7 celični liniji embrionalnih mišjih fibroblastov, Henle 407

humani epitelni celični liniji (Portnoy in sod., 1988), Caco-2 humani enterocitni celični liniji (Gaillard in sod., 1987), RAW 264.7 mišji levkemični monocitni makrofagni celični liniji (Henry in sod., 2006) in mišjih peritonealnih makrofagih (Kuhn in sod., 1988). Podobno dodatek nevtralizirajočih protiteles proti LLO onemogoči tudi pobeg divjega tipa *L. monocytogenes* (Edelson in Unanue, 2001). LLO je pomemben tudi za lizo sekundarnega fagosoma, ki nastane pri širjenju listerij na sosednje celice (Gedde in sod., 2000; Dancz in sod., 2002). Poleg LLO pa sta za pretrganje membrane primarnega in sekundarnega fagosoma pomembni tudi bakterijska za fosfatidilinozitol specifična fosfolipaza C (PI-PLC, ang. phosphatidylinositol-specific phospholipase C) in fosfolipaza C širokega spektra (PC-PLC, ang. broad-range phospholipase C) (Smith in sod., 1995). Alberti-Segui in sod. (2007) so na mišjih makrofagih iz kostnega mozga pokazali, da obe fosfolipazi C prispevata k porušitvi notranje oziroma primarne membrane, medtem ko je LLO obvezen za lizo zunanje membrane. Na določenih celičnih linijah so znanstveniki pokazali, da ob odsotnosti LLO, fosfolipazi C, zlasti PC-PLC, uravnavata pobeg *L. monocytogenes* iz fagosoma (Portnoy in sod., 1988; Marquis in sod., 1995; Smith in sod., 1995; Paschen in sod., 2000; Cheng in Portnoy, 2003). Pri pobegu listerije iz fagosoma v citosol imajo pomembno vlogo tudi dejavniki iz samega gostitelja. Radtke in sod. (2011) so pokazali, da cistično fibrozni transmembranski regulator prevodnosti (CFTR) začasno poveča koncentracijo klorida v fagosomu, kar pospeši nastanek LLO pore in lizo fagosoma.

Dva različna modela pojasnjujeta mehanizem pobega listerije iz fagosoma. Prvi model predvideva od LLO uravnavan prenos bakterijskega efektorja. Pore LLO omogočijo prenos PLC skozi membrano fagosoma, kjer imajo PLC dostop do fosfolipidov na notranji strani plazmaleme. PLC s porušenjem membrane sprožijo celično signalizacijo gostitelja, ki se konča s prenosom proteinske kinaze C $\beta$  I in II v zgodnji endosom, kar omogoči pobeg listerije iz fagosoma (Wadsworth in Goldfine, 2002; Schnupf in Portnoy, 2007). Drugi model predvideva, da pore LLO preprečijo zorenje fagosoma in fuzijo z lizosomi in omogočijo PLC, da poruši membransko strukturo fagosoma (Schnupf in Portnoy, 2007).



### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Kemikalije

Vse uporabljene kemikalije so bile od proizvajalcev Sigma-Aldrich (ZDA) ali Merck (Nemčija), razen v primerih, ko je navedeno drugače.

##### 3.1.2 Raztopine

Vse raztopine so bile pripravljene v deionizirani vodi (dH<sub>2</sub>O), razen če ni navedeno drugače.

###### 3.1.2.1 Raztopine za agarozno elektroforezo

pufer TAE (10 x)	400 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 10 % (v/v) ledocetna kislina pH 8,0
nanašalni pufer (6 x)	0,25 % (m/v) bromfenol modro 0,25 % (m/v) ksilen cianol FF 30 % (v/v) glicerol

###### 3.1.2.2 Raztopine za pripravo kompetentnih celic

raztopina za spiranje bakterijskih celic	100 mM CaCl <sub>2</sub>
glicerolna založna raztopina	50 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 % (v/v) glicerol

Raztopine smo pripravili v deionizirani vodi, filtrirani skozi 0,22 µm Milipore filtre (MiliQ H<sub>2</sub>O, MQ) in sterilno filtrirali.

###### 3.1.2.3 Raztopine za NaDS-PAGE elektroforezo

pufer za NaDS-PAGE (10 x)	250 mM Tris 1,92 M glicin 1 % (m/v) NaDS pH ~ 8
MOPS pufer za NuPAGE (20 x)	1 M MOPS 1 M Tris 2 % (m/v) NaDS

	20 mM EDTA pH 7,7
MES pufer za NuPAGE (20 x)	1 M MES 1 M Tris 2 % (m/v) NaDS 20 mM EDTA pH 7,3
nanašalni pufer (5 x)	250 mM Tris-HCl 10 % (m/v) NaDS 30 % (v/v) glicerol 0,02 % (m/v) bromfenol modro pH 6,8
pufer za raztapljanje usedline proteinov	500 mM Tris 6,5 % (m/v) NaDS 100 mM DTT 9 % (v/v) glicerol
nanašalni pufer NuPAGE LDS (4 x)	106 mM Tris-HCl 141 mM Tris 2 % (m/v) LDS 10 % (v/v) glicerol 0,51 mM EDTA 0,22 mM Comassie Brilliant Blue 0,175 mM fenol rdeče pH 8,5
raztopina za barvanje Blue	0,25 % (m/v) Comassie Brilliant  10 % (v/v) očetna kislina 40 % (v/v) metanol
raztopina za razbarvanje	10 % (v/v) očetna kislina 40 % (v/v) metanol
3.1.2.4 Raztopine za prenos western in imunodetekcijo	
pufer za prenos western	25 mM Tris 0,1 % (m/v) NaDS 192 mM glicin 10 % (v/v) metanol



	pH 8,0
pufer za spiranje membran (20 x)	200 mM Tris-HCl 1 M NaCl 20 mM EDTA 2 % Tween 20 pH 7,4
pufer za blokado površine membran	1 x pufer za spiranje membran 3 % (m/v) BSA
pufer za razvijanje membran	5 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
peroksidazni substrat	25 mL pufera za razvijanje membran  15 mg 4-kloro-1-naftol 5 mL metonol 50 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 3.1.2.5 Raztopine za izolacijo rekombinantnega listeriolizina O

pufer za lizo	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 10 mM imidazol pH 5,7 20 mM β-markaptoetanol 10 µg/ml DNAza B 20 µg/ml RNAza A 1 mM benzamidin 0,5 mg/ml lizocim 0,5 mM AEBSF 0,5 mM PMSF
pufer za Ni-afinitetno kromatografijo	
za spiranje	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20 mM imidazol pH 6,5
za elucijo	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

	300 mM NaCl 300 mM imidazol pH 6,5
pufer za kationsko kromatografijo (FPLC)	
za vezavo	15 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 150 mM NaCl pH 5,7
za elucijo	15 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M NaCl pH 5,7

Pufre za FPLC smo pripravili v MQ vodi in jih sterilno filtrirali ter odzračili.

#### 3.1.2.6 Raztopine za izolacijo rekombinantnega proteina Torso-like

pufer za dializo	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl pH 7,5
------------------	---

#### pufer za Co-afinitetno kromatografijo

za spiranje	20 mM Tris 300 mM NaCl pH 7,5
za elucijo	20 mM Tris 300 mM NaCl 500 mM imidazol pH 7,5

#### 3.1.2.7 Raztopine za spiranje eritrocitov in test hemolitične aktivnosti

fiziološka raztopina	0,9 % (m/v) NaCl
eritrocitni pufer	20 mM Tris-HCl 130 mM NaCl pH 7,4

#### 3.1.2.8 Raztopine za ekstrakcijo eritrocitnih lipidov

pufer za lizo eritrocitov	5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8,0
---------------------------	---

pufer za spiranje	5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 140 mM NaCl  pH 8,0
-------------------	--

### 3.1.2.9 Raztopine za pripravo lipidnih veziklov

PBS	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 150 mM NaCl pH 7,4
-----	---

### 3.1.2.10 Raztopine za poskuse z GUV

saharozna raztopina	295 mM saharoza 1 mM MES 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>
---------------------	---

glukoza raztopina	295 mM glukoza 1 mM MES 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>
-------------------	--

pufer za GUV	20 mM MES 150 mM NaCl 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> pH 5,5
--------------	--

Vse raztopine in pufre smo pripravili v MQ vodi, ter jim uravnali osmolarnost, tako da so bile izoosmolarne (~ 300 mOsmol/l) in jih sterilno filtrirali. Saharozna in glukoza sta bila od proizvajalca Fluka (Švica).

### 3.1.2.11 Raztopine za pripravo mrežic za elektronsko mikroskopijo

pufer za blokado	20 mM Tris 0,5 M NaCl 1 % (m/v) BSA pH 7,6
------------------	---

pufer za spiranje	20 mM Tris 0,5 M NaCl 10 mM imidazol 1 % (m/v) BSA pH 7,6
-------------------	---

raztopina za kontrastiranje 1 % (m/v) uranil acetat  
3 % amonijev molibdat  
pH 6,33

### 3.1.3 Gojišča

tekoča gojišča SOB, LB in LB<sub>amp</sub>

SOB 20 g/l tripton  
5 g/l kvasni ekstrakt  
0,95 g/l MgCl<sub>2</sub>  
0,5 g/l NaCl  
0,186 g/l KCl

Gojišča smo avtoklavirali. MgCl<sub>2</sub> dodamo v ohlajen sterilen medij.

LB in LB<sub>amp</sub> 10 g/l kazeinski hidrolizat  
5 g/l kvasni ekstrakt  
10 g/l NaCl  
± 100 µg/ml ampicilin (amp)

Gojišča smo avtoklavirali. Za pripravo LB<sub>amp</sub> dodamo antibiotik amp v ohlajen sterilni medij tik pred uporabo.

trdna gojišča SOB, LB in LB<sub>amp</sub>

Trdna gojišča pripravimo enako kot tekoča, le da pred avtoklaviranjem dodamo še agar v končni koncentraciji 15 g/l. Antibiotike dodamo po avtoklaviranju v zmerno ohlajen medij (~50°C). Nazadnje medij vlijemo v sterilne petrijevke.

gojišče DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)  
(DMEM high glucose, D6546) Sigma-Aldrich, ZDA

### 3.1.4 Encimi

*AgeI* (FastDigest® *AgeI*) New England Biolabs, ZDA  
*BamHI* (FastDigest® *BamHI*) New England Biolabs, ZDA  
DNaza B Sigma-Aldrich, ZDA  
*KpnI* (FastDigest® *KpnI*) New England Biolabs, ZDA  
lizocim Sigma-Aldrich, ZDA  
*MluI* (FastDigest® *MluI*) New England Biolabs, ZDA  
*NdeI* (FastDigest® *NdeI*) New England Biolabs, ZDA

RNaza A	Sigma-Aldrich, ZDA
T4 DNA-ligaza	New England Biolabs, ZDA
KOD Hot Start DNA-polimeraza	Merck, Nemčija
<i>Xho</i> I (FastDigest® <i>Xho</i> I)	New England Biolabs, ZDA

### 3.1.5 Detergenti

natrijev dodecil sulfat (NaDS)	Merck, Nemčija
Tween 20	Sigma-Aldrich,
ZDA	

### 3.1.6 Inhibitorji

4-(2-aminoetil)-benzensulfonil fluorid hidroklorid (AEBSF)	Sigma-Aldrich,
ZDA	
etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	Merck, Nemčija
fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich,
ZDA	

### 3.1.7 Lipidi

1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin (DOPC)	Avanti Polar Lipids, ZDA
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin (POPC)	Avanti Polar Lipids, ZDA
fosfatidiletanolamin (PE), izoliran iz možganov	Sigma-Aldrich, ZDA
fosfatidilinozitol (PI), izoliran iz jeter	Avanti Polar Lipids, ZDA
sfgomielin (SM), izoliran iz možganov	Avanti Polar Lipids, ZDA
holesterol (CHOL)	Avanti Polar Lipids, ZDA
ergosterol	Sigma-Aldrich, ZDA
1,1'-dioktadecil-3,3',3'-tetrametilindodikarbocianin perklorat (DiIC18)	Invitrogen, ZDA
Rodamin B 1,2-diheksadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin (rDHPE)	Invitrogen, ZDA

### 3.1.8 Protitelesa

primarna mišja monoklonska protitelesa proti histidinskemu repu (Penta-His mAb)	Qiagen, Nemčija
sekundarna kozja proti-mišja protitelesa IgG sklopljena s hrenovo peroksidazo (IgG <sup>-HRP</sup> )	Santa Cruz Biotechnology, ZDA

### 3.1.9 Reagenti za celične kulture

L-glutamin in ne-esencialne aminokisliline	Gibco, ZDA
fetalni telečji serum (FCS)	Sigma-Aldrich, ZDA
lipofektamin	Invitrogen, ZDA
polietilenimin	Sigma-Aldrich, ZDA

### 3.1.10 Kompleti

Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF buffer Anglija	New England Biolabs,
komplet za čiščenje produktov PCR	
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Scientific, ZDA
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen, ZDA
komplet za izolacijo DNA iz agaroznega gela	
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, ZDA
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, ZDA
komplet za izolacijo plazmidne DNA	
GeneJet Gel Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, ZDA
QiaQuick Miniprep Kit	Qiagen, ZDA
EndoFree Plasmid Giga Kit	Qiagen, ZDA
FastDigest® <i>AgeI</i> , <i>BamHI</i> , <i>KpnI</i> , <i>MluI</i> , <i>NdeI</i> in <i>XhoI</i>	New England Biolabs, ZDA
T4 DNA Ligation Kit	New England Biolabs, ZDA
Phospholipids C	Wako Chemicals, Nemčija

Dynabeads®

Invitrogen, ZDA

M-280 Streptavidin

MyOne™ Streptavidin T1

### 3.1.11 Bakterijski sevi

*E. coli* DH5α

Novagen, ZDA

*E. coli* BL21(DE3)pLysS

Novagen, ZDA

### 3.1.12 Plazmidi

#### **pET8c**

plazmid pET8c (2488 baznih parov) vsebuje zapis za β-laktamazo (odpornost proti amp), promotor in terminator za T7 polimerazo RNA ter mesto za vezavo ribosoma (RBS, ang. ribosome binding site). Temu sledi zapis za heksahistidinsko oznako (His<sub>6</sub>), dva serina in mesto cepitve s trombinom (LVPRGS). Nastali protein vsebuje His<sub>6</sub> na N-terminalnem delu, ki omogoča lažjo izolacijo (Ni-NTA) in detekcijo (Penta-His mAb, Ni-NTA nanozlato) proteina.

#### **pET21c(+)**

plazmid pET8c (5441 baznih parov) ima podobne lastnosti kot pET8c, le da ne vsebuje mesta za cepitev s trombinom in omogoča izražanje protienov s C-terminalnim His<sub>6</sub>.

#### **pHLsec**

plazmid pHLsec omogoča izražanje proteinov v sesalčjih celicah. Aricescu in sod. (2006) so ga pripravili z modifikacijo plazmida pLEXm (4529 baznih parov). Ta vsebuje pBR322 mesto začetka podvojevanja (ORI, ang. origin of replication), amp odpornost, citomegalovirusni ojačevalec, piščančji β-aktinski promotor, zajčji β-globinski intron in poliA rep. pHLsec dodatno vsebuje še Kozakovo zaporedje, signalno zaporedje za sekrecijo ter C-terminalno zaporedje za His<sub>6</sub>.

**pET8c**

*BglIII* T7 promotor *XbaI*  
 AGATCTCGATCCCGCAAAT**TAATACGACTCACTATAGGG**AGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAAT

tr.enhan. RBS *XhoI*  
 TTTGTTTAACTTTAAGA**AGGAGA**TATACCATGCATCACCATCACCATCACTCGAGCCTGGTTCCGCGCGG  
 M H H H H H H S S L V P R G S

*BamHI* *XhoI* *MluI*  
 ATCC...**VKLJUČEK**...CTCGAGTA**ACGCGT**GAGGAATTTTGAAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGA  
 L E \*

T7 terminator  
 AGCTGAGTTGGCTGCTGCC**CCGCTGAGCAATAACTAGC**AATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTG

**pET21c(+)**

T7 promotor *XbaI* tr.enhan.  
**TAATACGACTCACTATAGG**GAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTT

RBS *NdeI* *BamHI* *XhoI*  
 TAAGA**AGGAGA**TATAC**CATATG**GGATCC...**VKLJUČEK**...**CTCGAG**CACCACCACCACCACCCTGAGATCCG  
 M G S L E H H H H H H \*

T7 terminator  
 GCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCC**CCGCTGAGCAATAACTAGC**AATAACCC

**pHLsec**

*EcoRI* *HindIII* Kozak  
 GAATTCAAGCTT**GCCACCATGG**GGATCCTTCCCAGCCCTGGGATGCCTGCGCTGCTCTCC**CTCGTGAGCC**

M G I L P S P G M P A L L S L V S

*AgeI* *KpnI*  
**TTCTCTCCGTGCTGCTGATGGGTTGCGTAGCTGAA****ACCGGT**...**VKLJUČEK**...**GGTACCAAGCACCACCATC**  
 L L S V L L M G C V A E T G G T K H H H

*XhoI*  
 ACCATCACTAATGATCACTCGAG  
 H H H \* \*

Slika 10: Shema plazmidov z vključki. \*, STOP kodon; pod nukleotidnim zaporedjem je eno-črkovno aminokislinsko zaporedje rekombinantnega proteina; *podčrtano*, signalno zaporedje

Figure 10: Schematic presentation the plasmids with inserts (vključek). \*, STOP codon; amino acid sequence of recombinant protein is shown under the nucleotide sequence; *underline*, signal sequence.



### 3.1.13 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi (ZO) za pomnoževanje krajših fragmentov izbranih proteinov MACPF. *Konstrukt*, UniProt pristopna koda proteina MACPF in regija pomnoženega konstrukta v podpisnem načinu (številke predstavljajo aminokisljine). Oznake ZO so povzete iz pregl. 11. +, sprednji ZO; -, obratni ZO.

Table 3: Primers (ZO) for amplification of constructs of selected MACPF proteins with polymerase chain reaction. *Konstrukt*, UniProt accession code of MACPF protein and region of amplified construct denoted in the subscript mode (numbers are amino acids). Marks of ZO are from tab. 11. +, forward ZO; - reverse ZO.

Konstrukt	ZO	Zaporedje (5'→3')
<b>Q9Z908</b> <sub>364-411</sub>	b +	GCGCGGGATCCGACCTGTTTATTCGTTTCAGG
	b -	CGCGCGACGCGTTAGACGGTGATAATGAAAACGG
<b>D8VEJ3</b> <sub>407-456</sub>	d +	GCGCGGGATCCGGTTTTAATTCATCGAGCTC
	d -	CGCGCGACGCGTTAGTAAAAGGACAGCGGCTGTG
<b>O84155</b> <sub>742-810</sub>	f +	GCGCGGGATCCTACTACCCGACGCGCTGCGG
	f -	CGCGCGACGCGTTAGTAACCCGATGACTTTTTTGA
<b>A3RUA0</b> <sub>373-519</sub>	i +	GCGCGGGATCCACGCAAGGCGGTAATGGCGG
	i -	CGCGCGACGCGTTACTTTTTCCATGACGCGGATT
<b>P40689</b> <sub>147-340</sub>	m +	GCGCGGGATCCTCGTACGTTCTGGTCCGTGT
	m -	CGCGCGACGCGTTATTTGACATTGTTATCCAGAA
<b>P40689</b> <sub>20-100</sub>	n +	CGCGCGGATCCGGCCCGCGTGAATCTCAACT
	n -	CGCGCGACGCGTTAGCGACGGTTTTTCGAAAATT
<b>Q9U0J9</b> <sub>610-842</sub>	p +	GAGAGGATCCAAGGTGGTTATGTTGGTTTC
	p -	GAGAACGCGTTATTTGTTATTCTTACACAGCA
<b>Q8I2S3</b> <sub>600-821</sub>	s +	GAGAGGATCCCTGGTGGTTGTCGAATGTGAAG
	s -	GAGAACGCGTTAATAAACGCTCAGCGAGTAGTA
<b>Q8IB29</b> <sub>405-654</sub>	u +	GAGAGGATCCCTGATTCTGTCATGCCCGGT
	u -	GAGAACGCGTTACTTATACGTAAATTTGCGAT

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi (ZO) za pomnoževanje konstruktov proteina Torso-like (Tsl). Številke v podpisnem načinu za Tsl pomenijo za koliko aminokisljin z N-terminalnega konca je krajši končni proteinski konstrukt. *m*, domena MACPF; *n*, N-terminalna regija Tsl (pregl. 11); *His<sub>6</sub>*, heksahistidinska oznaka; *His<sub>8</sub>*, oktahistidinska oznaka; +, sprednji ZO; -, obratni ZO.

Table 4: Primers (ZO) for amplification of constructs of Torso-like protein (Tsl) with polymerase chain reaction. The numbers in the subscript mode following Tsl denote for how many amino acids from N-terminal region of the protein the final construct is shorter than mature protein. *m*, MACPF domain; *n*, N-terminal region of Tsl (Tab. 11); *His<sub>6</sub>*, hexahistidine tag; *His<sub>8</sub>*, octahistidine tag; +, forward ZO; -, reverse ZO.

Konstrut	ZO	Zaporedje (5'→3')
<b>Tsl-<i>His<sub>6</sub></i></b>	+	TTTACCGGTGGCCGCGTGAATCTCAAC
	-	AAAGGTACCGCGCGTGGGTGAGACTGCGGC
<b>Tsl-<i>His<sub>8</sub></i></b>	+	TTTACCGGTGGCCGCGTGAATCTCAAC
	-	AAAGGTACCTTAGTGATGGTGGTGGTGATGATGGCGCGTGGGTGAGACTGCGGCATATTCAG
<b>Tsl<sub>18</sub>-<i>His<sub>8</sub></i></b>	+	TTTACCGGTATGGTTATCTGGGTATTTCTATGC
	-	AAAGGTACCTTAGTGATGGTGGTGGTGATGATGGCGCGTGGGTGAGACTGCGGCATATTCAG
<b>Tsl<sub>30</sub>-<i>His<sub>8</sub></i></b>	+	TTTACCGGTCTGAACGATAATAGCGAACCGGACC
	-	AAAGGTACCTTAGTGATGGTGGTGGTGATGATGGCGCGTGGGTGAGACTGCGGCATATTCAG

se nadaljuje



aparatura za NaDS-PAGE in prenos western

elektroforetska enota Mini-Protean II	Bio-Rad, ZDA
enota za prenos western Mini Trans-Blot®	Bio-Rad, ZDA
usmernik PowerPac HC	Bio-Rad, ZDA
elektroforetska enota Xcell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen, ZDA
usmernik Consort E835	Consort NV, Belgija
iBlot® Dry Blotting System	Invitrogen, ZDA

kromatografski sistem Äkta FPLC

Pharmacija, Švedska

centrifuge

Beckman SW 65 Ti	Beckman Coulter, ZDA
Centric 322A	Tehtnica, Slovenija
Eppendorf 5415D	Eppendorf, Nemčija
Rotanta 460	Hettich Centrifuges, Nemčija
Sigma 3K-30	Sigma, Nemčija

spektrofotometra

Shimadzu UV-2101 PC	Shimadzu, Japonska
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, ZDA

mikročitalca

Dynex MRX	Dynex technologies, Nemčija
Zenyth 3100	Anthos Labtec, ZDA

ekstrudor Avestin Lipid Extrudor

Avestin, Kanada

sonikator Sonics Vibra-cell VCX 750

Sonics, ZDA

funkcijski generator GFG-3015

GW Instek, Tajska

elektronski mikroskop Phillips CM 100

Phillips, Nizozemska

CCD kameri BioScan 792 in Orius SC 200

Gatan, ZDA

fluorescenčni mikroskop AxioImager Z1

Carl Zeiss, Nemčija

rotavapor R-134, V700 in vodna kopel B-480

Büchi, Švica

vakuumski koncentrador miVac

GeneVac, VB

termostatirana stresalnika

Thermo Shaker TS100

Lab4You GmbH, Nemčija

Innova 2300

New Brunswick Scientific, ZDA

vibracijski stresalnik Vibromix 114EV

Tehtnica, Slovenija

magnetno mešalo MM540

Tehtnica, Slovenija

pH-meter

Mettler Toledo, Nemčija

aparatus za merjenje DLS-Zetasizer Nano

Malvern, VB

### 3.1.16 Ostala oprema

5 nm Ni-NTA nanozlato

Nanoprobes, ZDA

barvilo Coomassie modro

Fermentas, Švica

fliter papir Whatman

Sigma-Aldrich, ZDA

iBlot® Transfer Stack, nitrocelulozni

Invitrogen, ZDA

injekcijski filtri Minisart NML

Sartorius Stedim Biotec, Nemčija

membrane za ekstruzijo

Avestin, Kanada

mrežica za elektronsko mikroskopijo

Agar Scientific, ZDA

NuPAGE® Novex Bis-Tris gel

Invitrogen, ZDA

PVDF membrana Immobilion-P

Millipore, ZDA

steklene kroglice

Sigma-Aldrich, ZDA

ultrafiltratorji Amicon 0,5, 4 in 15

Amicon, ZDA

uranil-acetat

Sigma-Aldrich, ZDA

plošče z 12 vdolbinicami za celične kulture

Greiner Bio-One, Avstrija

standardne 75 cm<sup>2</sup> posode za celične kulture

Nunc, ZDA

standardne 2125 cm<sup>2</sup> polistirenske okrogle

posode (ang. roller bottles) za celične kulture

Greiner Bio-One, Avstrija

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Bioinformatična analiza proteinov z domeno MACPF

#### 3.2.1.1 Iskanje zaporedij po podatkovnih zbirkah

Proteinska zaporedja z domeno MACPF smo iskali v različnih podatkovnih zbirkah na NCBI (Geer in sod., 2010) (nr, refseq\_protein, swissprot, pat, pdb, env\_nr) in EMBL-EBI (UniProt-TrEMBL) (Consortium, 2014) s PSI-BLAST in tBLASTn algoritmi (z zadnjim samo na NCBI) (Altschul in sod., 1997; Gertz in sod., 2006). PSI-BLAST (ang. position-specific iterative basic local alignment search tool) omogoča iskanje daljno sorodnih proteinov z matriko, ki da ohranjenim delom zaporedja večjo težo in se z vsako ponovitvijo iskanja (iteracijo) izboljšuje, tBLASTn pa omogoča iskanje prevedenih nukleotidnih zaporedij s pomočjo proteinskega zaporedja. Pri iskanju s PSI-BLAST smo naredili štiri do pet iteracij in uporabili privzete nastavitve, razen izbrane opcije "low complexity regions", s čimer smo izločili regije s ponavljajočimi se aminokislinami.

Iskanje smo začeli s tremi sondami z aminokislinskim zaporedjem domene MACPF treh proteinov MACPF: *i*) človeškega perforina-1 (h-PFN-1, UniProt koda: P14222), ter dveh proteinov z določeno tri-dimenzionalno (3D) strukturo, *ii*) proteina MACPF iz *Photorhabdus luminescens* (Plu-MACPF, UniProt koda: Q7N6X0) in *iii*) proteina iz *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bth-MACPF, UniProt koda: Q8A267) (pregl. 6). Iskanje smo nato ponovili z vrstno specifičnimi zaporedji znotraj taksonomskih skupin (npr. znotraj bakterij, gliv, rastlin,...). Vse zadetke z E-vrednostjo manjšo od 0,005 smo zbrali v lastni zbirki proteinov MACPF, katero smo dopolnili še z ročnim pregledom proteinskih zbirk PFAM (Finn in sod., 2014) in SMART (Schultz in sod., 1998; Letunic in sod., 2012). Naša zbirka vsebuje proteine MACPF iz naštetih podatkovnih zbirk z dne 24. 4. 2011.

Preglednica 6: Zaporedja sond, ki smo jih uporabili za iskanje po podatkovnih zbirkah. hPFN-1, človeški perforin-1 (UniProt koda: P14222); Plu-MACPF, protein MACPF iz *P. luminescens* (UniProt koda: Q7N6X0); Bth-MACPF, protein MACPF iz *B. thetaiotaomicron* (UniProt koda: Q8A267).

Table 6: Query sequences used for searching public databases. hPFN-1, human perforin-1 (UniProt code: P14222); Plu-MACPF, MACPF protein from *P. luminescens* (UniProt code: Q7N6X0); Bth-MACPF, MACPF protein from *B. thetaiotaomicron* (UniProt koda: Q8A267).

> hPFN-1

```
ARSECKRSHKFFVPGAWLAGEGVDVTSLRRSGSFPVDTQRFLRPDGTCTLCENALQEGTLQRLPLALTNWR  
AQGGSGCQRHVTRAKVSSTEAVARDAARSIRNDWKVGLDVT PKPTS NVHVS VAGSHSQAANFAAQKTHQDQ  
YSFSTDTVECRFYSFHVVHTPPLHPDFKRALGDLPHHFNASTQPAYLRLLISNYGTHFIRAVELGGRISAL  
TALRTCELALEGLTDNEVEDCLTVEAQVNIIGHSISAEAKACEEKKKKHMTASFHQTYRERHSEVVG  
HHTSINDLLFGIQAGPEQYSAWVNSLPGSPGLVDYTLLEPLHVLLDSQDPRREALRRALSQYLTDRARWR
```

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 6: Zaporedja sond, ki smo jih uporabili za iskanje po podatkovnih zbirkah. hPFN-1, človeški perforin-1 (UniProt koda: P14222); Plu-MACPF, protein MACPF iz *P. luminescens* (UniProt koda: Q7N6X0); Bth-MACPF, protein MACPF iz *B. thetaiotaomicron* (UniProt koda: Q8A267).

> Plu-MACPF

```
RKLSLFD DDTVIAGAEMIGTSYDVFGKYCNV GSCMNSLFDERKINASEDNFKKVTILGKTLKVPYYIDCYS  
VGD LKYTNASGESIESYQSNISSKSRIKGNLFFSASLKVDFD TDSLTD FENAFSRIQYTYDLYILKSSA  
EALKEFLKESVKTALDKADTEEDMNDL FNTW GSHFLSGVVMGGCAQYSSSTNKYTSNL TNSFDVVAAS F  
AGF IGLSARTGNSFMEDIK KFRSASNIKTHAIGDLSRFD PFGGATSADQPSAEEIAAAKAFEDWKASV  
PNAPELVNFADSNPLTGIWELCSDRTQKAKLKKHFETVWAPAESAKRRVHADYIDEIIIGINN TNPPEG  
YIGLKSTK DENLNSKGNICLFMHKAKYDPNIDNKDCITELKFITVRDKSPEGDWVKIPQDIYISP
```

> Bth-MACPF

```
FTDATDFLGC SYAVENGTSIIGDFANAKYPVVMKLLERYPSYINPKELRTTETKALSYSDFDRLEKNK  
TFTKTVKSGFSLNLGPFKFRQKTIKETFVHNTDDSEKVVH GELSIEVVNGMLNLQTAPSALRKIAADYL  
DELFDALYNSSMVELMQSYGEFVLTGYTGGRASALFYGVDTNSIQFDSKEKDMDVAINASYEWKKNKP  
TAPSDTIHSASGNLSIGTKRENSETITNKFSALSYSIKTLGGAYGYSISTPPYDITNYSIDLTPWLQSLN  
DPKTHMTMIDLQDGLYPISDFILEENFKQRYNDTHMDFQYQESL
```

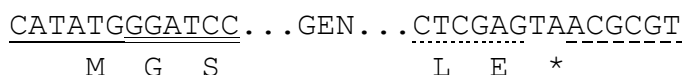
### 3.2.1.2 Analiza zaporedij s prostodostopnimi bioinformatičnimi orodji

Iz zbirke proteinov MACPF smo s pomočjo poravnave zaporedij v programu Vector NTI (Lu in Moriyama, 2004) izločili podvojene vnose in združili zaporedja iz iste taksonomske vrste z več kot 95-% identičnostjo. Proteinom smo s prostodostopnimi bioinformatičnimi orodji poiskali oziroma določili *i*) proteinske domene (InterProScan in Pfam) (Zdobnov in Apweiler, 2001; Finn in sod., 2014), *ii*) topnost (PROSO II) (Smialowski in sod., 2012), *iii*) signalna zaporedja (Signal P in TargetP) (Emanuelsson in sod., 2000; Petersen in sod., 2011) in *iv*) transmembranske regije (TMHMM Server v. 2.0) (Sonnhammer in sod., 1998),  $\Delta G$  predictor (Hessa in sod., 2007), MPEX (Snider in sod., 2009), SOSUI (Hirokawa in sod., 1998) in Tmpred (Hofmann in Stoffel, 1993). Izbranim proteinom smo določili potencialno mesto glikozilacije s spletno programsko opremo GlycoPP za prokariotske proteine (Chauhan in sod., 2012), oziroma GlycoEP za evkariontske proteine (Chauhan in sod., 2013). Aminokislinska zaporedja domen MACPF izbranih proteinov smo poravnali s programom M-Coffee (Wallace in sod., 2006; Moretti in sod., 2007; Di Tommaso in sod., 2011) in ClustalW (Larkin in sod., 2007) za analizo ohranjenosti strukturnih elementov domene MACPF in fizikalno-kemijskih lastnosti aminokislinskih ostankov v regiji CH1-2. Poravnave smo uredili s programom GeneDoc (Nicholas in sod., 1997). Izbranim proteinom MACPF smo določili sekundarno proteinsko organiziranost (jpred) (Cole in sod., 2008) in pripravili strukturne modele s spletnim programom za napoved strukture in funkcije proteinov I-TASSER (Zhang, 2008; Roy in sod., 2010; Yang in sod., 2013). Zanesljivost napovedi strukture proteinov z I-TASSER je podana z vrednostjo C (ang. confidence oz. C-score), ki je mera za oceno kvalitete predvidene 3D strukture modela. Podana je v razponu [-5, 2], pri čemer višja številka pomeni bolj zanesljiv model. Strukture smo izrisali s programom UCSF Chimera (Pettersen in sod., 2004).

### 3.2.2 Izdelava konstruktov izbranih proteinov MACPF

#### 3.2.2.1 Priprava nukleotidnih zaporedij za izbrane proteine MACPF

Sintetizirane gene za izbrane proteine MACPF (pregl. 11), optimizirane za izražanje v *E. coli* in brez signalnega zaporedja smo naročili pri podjetju GeneScript. Zaporedja smo zasnovali tako, da so vsebovala po dve mesti za prepoznavo z restrikcijskimi endonukleazami (RE) pred (*NdeI* in *BamHI*) in za (*XhoI* in *MluI*) vsakim genom.



Slika 11: Shema sintetiziranih genov za izbrane proteine MACPF. *Zgornja vrstica*, nukleotidno zaporedje pred in za genom. Podčrtano so označena prepoznavna mesta za restrikcijske endonukleaze (RE): *NdeI*, *BamHI*, *XhoI* in *MluI*. *Spodnja vrstica*, eno-črkovna aminokislinska koda; \*, stop kodon.

Figure 11: Scheme of synthesised genes for selected MACPF proteins. *Upper row*, the nucleotide sequence before and after the gene. Underlined are marked recognition sites for restriction endonucleases RE: *NdeI*, *BamHI*, *XhoI* and *MluI*. *Bottom line*, one-letter amino acid code; \*, stop codon.

Nukleotidna zaporedja krajših fragmentov izbranih proteinov MACPF - večinoma C terminalne domene (glej pregl. 11), smo pridobili s pomnoževanjem tarčnega gena v plazmidu pET8c z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, ang. Polymerase Chain Reaction) (pregl. 7) z uporabo začetnih oligonukleotidov iz pregl. 3. Mutacije v genu *tsl* smo vnesli z usmerjeno mutagenezo z uporabo začetnih oligonukleotidov iz pregl. 5. Produkta PCR smo očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR po navodilih proizvajalca (Thermo Scientific ali Qiagen, ZDA).

Preglednica 7: Reakcijska mešanica (levo) in verižna reakcija s polimerazo (PCR) (desno) za vstavljanje produktov PCR krajših fragmentov izbranih proteinov MACPF v plazmid pET8c. *ZO*, začetni oligonukleotid; +, sprednji *ZO*; -, obratni *ZO*; *pDNK*, plazmidna DNK; *polimeraza*, KOD Hot Start DNA polymerase (Merck, Nemčija).

Table 7: Reaction mixture (left) and polymerase chain reaction (PCR) (right) for insertion of PCR products of constructs of selected MACPF proteins into pET8c plasmid. *Komponenta*, component; *ZO*, primers; +, forward *ZO*; - reverse *ZO*; *pDNK*, plasmid DNA; *polimeraza*, KOD Hot Start DNA polymerase (Merck, Germany); *puffer*, buffer; *korak*, step; step 1, initial denaturation, 2, denaturation, 3, annealing, 4, extension, 5, final extension and 6, hold.

<b>Komponenta</b>	<b>V [μl]</b>	<b>Korak</b>	<b>T [°C]</b>	<b>t [s]</b>
H <sub>2</sub> O (MQ)	32,6	1. Prvotna denaturacija	95	120
+ ZO (100 μM)	1,5	2. Denaturacija	95	20
- ZO (100 μM)	1,5	3. Prileganje ZO	60	20
pDNK	0,4	4. Podaljševanje	70	60
Pufer (10 x)	5	Korak 2-4: 35x		
dNTP	5	5. Končno podaljševanje	70	420
MgSO <sub>4</sub>	3	6. Ustavitev	4	∞
Polimeraza	1			

### 3.2.2.2 Vstavljanje konstruktov v plazmide

#### **pET8c in pET21c(+)**

Različica ekspresijskega plazmida pET8c kodira za heksahistidinsko oznako (His<sub>6</sub>) in prepoznavno mesto za trombin pred vstavljenim genom, plazmid pET21c(+) pa kodira za His<sub>6</sub> za vstavljenim genom (sl. 10 in poglavje 3.1.12). Sintetizirane gene v vektorju pUC57 smo po navodilih proizvajalca (New England Biolabs, Anglija) rezali bodisi s parom RE *BamHI* in *MluI*, bodisi z *NdeI* in *XhoI*. S prvim parom RE smo rezali tudi vektor pET8c, z drugim pa pET21c(+). Režane gene in plazmida smo ločili z agarozno elektroforezo, jih izrezali iz gela, ter očistili s kompletom za izolacijo DNK iz gela po navodilih proizvajalca (Thermo Scientific ali Qiagen, ZDA). Režane gene smo nato s T4 DNK ligazo vstavili v primerno rezan plazmid pET8c oz. pET21c(+) po navodilih proizvajalca (New England Biolabs, Anglija) (sl. 10). Po istem postopku smo v pET8c vektor vstavili produkte PCR krajših fragmentov izbranih proteinov MACPF in mutante proteina Torso-like.

#### **pHLsec**

Gen za protein Torso-like in njegove krajše fragmente smo vstavili v vektor pHLsec (Aricescu in sod., 2006) (sl. 10) za izražanje proteinov v sesalskih celicah. Vključke smo pripravili s PCR (pregl. 8), pri čemer smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so vsebovali mesto za prepoznavo restrikcijskega encima *AgeI* oziroma *KpnI* (pregl. 4). Vstavljanje vključkov v vektor je potekalo po enakem postopku kot zgoraj, le da smo vključke in plazmid pHLsec rezali z *AgeI* in *KpnI* restrikcijskima endonukleazama (New England Biolabs, ZDA).



Preglednica 8: Reakcijska mešanica (levo) in verižna reakcija s polimerazo (PCR) (desno) za vstavljanje produktov PCR konstruktov proteina Torso-like v plazmid pHLsec. *ZO*, začetni oligonukleotid; +, sprednji *ZO*; -, obratni *ZO*; *pDNK*, plazmidna DNK; *IZ*, izhodiščna zmes (ang, master mix) (Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF buffer) (New England Biolabs, ZDA); \*, pri reakcijah PCR z *ZO* za konstrukte s oktahistidinsko oznako (glej pregl. 4) smo naredili dvostopenjsko reakcijo PCR, brez koraka 3. Pri slednjih *ZO* je bila temperatura tališča večja od 72 °C.

Table 8: Reaction mixture (left) and polymerase chain reaction (PCR) (right) for insertion of PCR products of constructs of Torso-like protein into pHLsec plasmid. *Komponenta*, component; *ZO*, primers; +, forward *ZO*; - reverse *ZO*; *pDNK*, plasmid DNA; *polimeraza*, KOD Hot Start DNA polymerase (Merck, Germany); *IZ*, master mix (Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF buffer) (New England Biolabs, USA); *korak*, step; step 1, initial denaturation, 2, denaturation, 3, annealing, 4, extension, 5, final extension and 6, hold; \*, when using primers for constructs with octahistidine tag (tab. 4) (with melting T above 72 °C) we performed 2-step thermocycling protocol (without step 3).

<b>Komponenta</b>	<b>V (μl)</b>	<b>Korak</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (s)</b>
H <sub>2</sub> O (MQ)	do 50 (19,5)	1. Prvotna denaturacija	98	30
+ <i>ZO</i> (10 μM)	2,5	2. Denaturacija	98	10
- <i>ZO</i> (10 μM)	2,5	3. Prileganje <i>ZO</i> *	69	10
<i>pDNK</i>	0,5	4. Podaljševanje*	72	20
PCR <i>IZ</i> (2x)	25	Korak 2-4: 35x		
		5. Končno podaljševanje	72	600
		6. Ustavitev	4	∞

Pravilnost nukleotidnega zaporedja vključkov PCR produktov v plazmidu smo preverili z določitvijo zaporedja (sekvenciranjem).

### 3.2.2.3 Priprava kompetentnih celic

Za pripravo kompetentnih celic smo uporabili različna seva bakterije *Escherichia coli*, za namnoževanje plazmidov sev DH5α, za izražanje proteinov pa sev BL21(DE3)pLysS. Celice smo nacepili v medij SOB ter jih gojili do absorbance ~ 0,5 pri 600 nm. Po 10 min inkubaciji na ledeno-vodni kopeli smo celice centrifugirali (1800 g, 10 min, 4 °C) ter resuspendirali usedlino bakterij v ledenem 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Po ponovnem centrifugiranju smo usedle celice resuspendirali v ledeno hladni raztopini CaCl<sub>2</sub>-Tris-glicerola, razdelili na 100 μl deleže, zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -80 °C.

### 3.2.2.4 Pomnoževanje in izolacija plazmidov

Plazmide z zapisom za proteine MACPF oziroma njihovih krajših fragmentov ali ligacijsko mešanico smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH5α. Po pomnožitvi celic preko noči v tekoči kulturi LB<sub>amp</sub> smo izolirali plazmide s kompletom za izolacijo plazmidne DNK (Thermo Scientific ali Qiagen, ZDA). Čistost in količino izoliranih plazmidov smo preverjali spektrofotometrično z aparaturo NanoDrop. Za potrebe izražanja z IVTT (poglavje 3.2.3.2) smo izolirano plazmidno DNK dodatno očistili s kompletom za čiščenje produktov PCR po navodilih proizvajalca (Thermo Scientific, ZDA), s čimer smo se znebili RNaz. Tako očiščeni plazmidni DNK smo

odstranili topilo z vakuumskim koncentradorjem miVac (GeneVac, VB) in jo raztopili v vodi brez DNaz in RNaz do končne koncentracije ~ 750 ng/ $\mu$ l.

### 3.2.3 Izražanje rekombinantnih proteinov

#### 3.2.3.1 Izražanje rekombinantnih proteinov v *E. coli*

Za pripravo rekombinantnega listeriolizina O (LLO) v *E. coli* smo uporabili protokol Andreja Bavdka (Bavdek in sod., 2011). Na kratko: s plazmidom pET8c z zapisom za LLO (Bavdek in sod., 2011) smo transformirali ekspresijski sev *E. coli* BL21(DE3)pLysS. S 5 mL prekonočno bakterijsko kulturo smo nacepili 500 mL tekoče gojišče LB<sub>amp</sub> (C<sub>amp</sub> = 0,1 mg/ml) pri 30 °C in pri A<sub>600</sub> med 0,6 do 0,8 vzbudili izražanje LLO z dodatkom 0,5 mM IPTG (izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozida). Po 5 h nadaljnega gojenja smo celice centrifugirali (7500 g, 30 min, 4 °C) ter usedlino raztopili v pufru za lizo. Raztopljeno usedlino smo z ultrazvokom sonicirali v ledenohladni vodni kopeli 10-krat po 30 s. Ostanke celic smo od dobljenega homogenata odstranili s centrifugiranjem (7500 g, 1 h 30 min, 4 °C).

#### 3.2.3.2 Izražanje rekombinantnih proteinov z *in vitro* transkripcijo-translacijo

Rekombinantne izbrane proteine MACPF smo proizvedli s komercialnim kompletom za brezcelično sintezo proteinov oziroma z *in vitro* transkripcijo-translacijo (IVTT) (Invitrogen, ZDA). Sestavine kompleta izhajajo iz *E. coli*. Proteine smo sintetizirali po navodilih proizvajalcev, vendar v določenih primerih z majhnimi spremembami: *i*) dodatek dopolnilnega pufru (ang. feed buffer) ob začetku reakcije, *ii*) namesto vode smo uporabili ali PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4) ali liposome v PBS ter *iii*) reakcija je potekala preko noči pri 25 °C s stresanjem pri 900 vrt./min.

#### 3.2.3.3 Izražanje rekombinantnih proteinov v sesalskih celicah

Rekombinantne proteine v sesalskih celicah smo izražali po postopku, ki so ga opisali Aricescu in sod. (Aricescu in sod., 2006). Celice HEK293T smo vzdrževali v standardnih 75 cm<sup>2</sup> posodah za celične kulture (Nunc, ZDA) v mediju Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM high glucose, D6546, Sigma-Aldrich, ZDA) z dodatkom L-glutamina in ne-esencialnih aminokislin (oboje 1 % v/v) (Gibco, ZDA) in fetusnim telečjim serumom (FCS, 10 % v/v) (Sigma-Aldrich, ZDA). V manjšem obsegu smo ekspresijo izvedli na plošči za celične kulture z 12 vdolbinicami (Greiner Bio-One, Avstrija), vsaka je vsebovala 1 mL celične kulture HEK293T. Prehodno transfekcijo celic smo izvedli s pHLsec plazmidom, ki je vseboval gen za protein Torso-like ali njegove krajše fragmente (pregl. 4 in sl. 10), pri čemer smo kot transfekcijski reagent uporabili lipofektamin (Invitrogen, ZDA). Ekspresijo v večjem obsegu (3 l celične kulture HEK293T) smo izvedli v večjih (2125 cm<sup>2</sup>) okroglih posodah (Greiner Bio-One, Avstrija), za transfekcijski reagent pa smo uporabili polietilenimin (Sigma-Aldrich, ZDA). Pred

transfekcijo smo dodali svež medij z 2 % FCS. Izražanje v manjšem obsegu je potekala 3, v večjem pa 5 dni. Celice smo gojili v CO<sub>2</sub> inkubatorju z vlažno atmosfero pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.2.4 Izolacija rekombinantnih proteinov**

#### **3.2.4.1 Izolacija rekombinantnega listeriolizina O**

LLO smo izolirali iz homogenata po sonikaciji v pufru za lizo (poglavje 3.2.3.1) z nikljevo afinitetno kromatografijo (Ni-NTA) po navodilih proizvajalca z višanjem koncentracije imidazola (Qiagen, ZDA). Po dializi proti fosfatnemu pufru (pH 5,7) smo ga očistili s hitro tekočinsko kromatografijo (FPLC, ang. fast protein liquid chromatography) na koloni s kationskim izmenjevalcem (MonoS) po navodilih proizvajalca z višanjem koncentracije soli (Pharmacia, Švedska). Čistost proteina v frakcijah smo določili z NaDS-PAGE (poglavje 3.2.5.3). Frakcije, ki so vsebovale LLO, smo združili, jim spektroskopsko določili koncentracijo (poglavje 3.2.5.5.1) in shranili pri -20 °C.

#### **3.2.4.2 Izolacija rekombinantnega proteina Torso-like**

Po sintezi proteina v celicah HEK293T (poglavje 3.2.3.3) smo gojišče filtrirali skozi 0,22 µm filter in dializirali v pufru za dializo preko noči. Protein smo očistili z afinitetno kromatografijo z imobiliziranim kovinskim ionom (IMAC, ang. immobilized metal ion affinity chromatography) kromatografijo s Talon kroglicami, prekritimi s kobaltom po navodilih proizvajalca z višanjem koncentracije imidazola (Clontech, ZDA). Eluirane frakcije smo združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo (Merck Millipore, ZDA).

### **3.2.5 Opredelitev lastnosti konstruktov izbranih proteinov MACPF in listeriolizina O**

#### **3.2.5.1 Obarjanje s trikloroacetno kislino (TCA)**

Obarjanje s trikloroacetno kislino (TCA) smo uporabljali za proteinske vzorce pred ločbo na NaDS-PAGE. Vzorcju smo dodali ustrezen volumen 100 % TCA (m/v), tako da je bila končna koncentracija TCA v vzorcju 20 % (m/v). Mešanico smo 10 min inkubirali na ledu, nato pa 12 min centrifugirali pri 13200 vrt./min na 4 °C. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa sprali s 300 µl ledeno-hladnega acetona ter centrifugirali 5 min pri 13200 vrt./min in 4 °C. Spiranje smo ponovili z 200 µl ledeno-hladnega acetona. Po ponovnem centrifugiranju smo odstranili aceton in usedlino posušili na sobni temperaturi. Posušeno usedlino smo resuspendirali v 500 mM Tris, 6,5 % NaDS, 100 mM DTT, 9 % glicerol na 55 °C (20 min – 1h), z večkratnim stresanjem na vibracijskem mešalniku. Nazadnje smo suspenziji dodali 2 x NaDS-DTT nanašalni pufer.

### 3.2.5.2 NaDS-PAGE

S poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE) smo preverjali stopnjo izražanja proteinov, molekulsko maso proteinov ter čistost vzorcev. NaDS-PAGE smo izvedli na elektroforeznih sistemih *i*) Mini-Protean II po navodilih proizvajalca (BioRad, ZDA), pri čemer smo pripravili 10 ali 12 % zamrežene gele, in na *ii*) XCell SureLock Mini-Cell po navodilih proizvajalca (Invitrogen, ZDA) s predizdelanimi NuPage Bis-Tris geli različne ramreženosti (10, 12 in 4-12 %). Proteine v gelu smo obarvali s Coomassie modrim barvilom ali jih prenesli po westernu na PVDF ali nitrocelulozno membrano.

### 3.2.5.3 Prenos western in imunodetekcija

Prenos western in imunodetekcijo s protitelesi proti His<sub>6</sub> oznaki smo uporabljali za identifikacijo proteinov, ter za primerjavo količin proteinov v frakcijah.

Proteine smo po ločbi z NaDS-PAGE prenesli z gela z mokrim ali suhim prenosom po navodilih proizvajalca: *i*) mokri prenos na membrano PVDF Immobilion-P (Millipore, ZDA) smo opravili z aparatom Mini Trans-Blot (BioRad, ZDA) pri 150 mA, 90 min oziroma 300 mA, 90 min pri dveh hkratnih prenosih, *ii*) suhega pa na nitrocelulozno membrano z aparatom iBlot Gel Transfer Device (Invitrogen, ZDA) v 7 min. Po koncu prenosa smo membrano blokirali 2 h ali preko noči v pufru za blokado. Nato smo membrano 2h inkubirali s primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti heksahistidinskim oznakam (mišja IgG Penta His) redčenimi v pufru za blokado (1:1000). Po spiranju s pufrom za spiranje (3 x 5-10 min) je sledila 2 h inkubacija s sekundarnimi protitelesi, konjuguranimi s hrenovo peroksidazo v pufru za blokado (1:2000). Po spiranju s pufrom za spiranje (3 x 5-10 min) smo dodali peroksidazni substrat za kolorimetrično ali kemiluminiscentno detekcijo proteinskih lis. Inkubacije in spiranja so potekala na stresalniku na sobni temperaturi (razen čez noč na 4 °C).

### 3.2.5.4 Določanje koncentracije proteinov

#### 3.2.5.4.1 UV spektroskopija

Za določitev koncentracije proteinov z UV spektroskopijo smo merili absorpcijo pri valovni dolžini 280 nm, kjer močno absorbirajo aromatske aminokisljine, predvsem triptofan in tirozin, ter disulfidne vezi. Meritve smo opravili na UV/VIS spektrofotometru UV-21'1 PC (Shimadzu) v kvarčnih kivetah dolžine 1 cm pri 20 °C. S pomočjo spletnega programa ProtParam na bioinformatškem portalu ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) smo proteinom določili molarni absorpcijski koeficient ( $\epsilon$ ) in nato koncentracijo po Beer-Lambertovem zakonu po formuli:

$$c = \frac{A}{\epsilon l} \quad \dots (1)$$

kjer je  $c$  koncentracija v mol/l,  $A$  vrednost absorbance pri valovni dolžini 280 nm in  $l$  dolžina optične poti.

#### 3.2.5.4.2 Bradfordova metoda

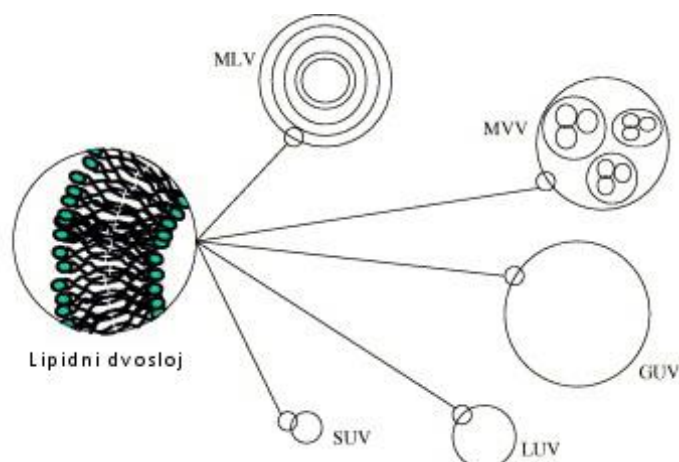
Bradfordova metoda določanja koncentracije proteinov je kolorimetrična metoda, ki temelji na vezavi Coomassie modrega barvila na molekule proteina. Umeritveno krivuljo smo naredili z znanimi koncentracijami govejega serumskega albumina.

#### 3.2.5.4.3 Denzitometrija

Proteinske lise na nitrocelulozni ali PVDF membrani po imunodetekciji po prenosu western smo kvantificirali denzitometrično s programom Image Studio Lite (LI-COR Biotechnology, ZDA) s pomočjo umeritvene krivulje znanih koncentracij govejega serumskega albumina.

### 3.2.6 Lipidni vezikli

Izraz vezikel ima v biologiji več pomenov, v kontekstu te doktorske disertacije pa označuje zaprto strukturo, ki jo sestavljajo ena ali več plasti lipidnega dvosloja oz. membran in nastane *in vitro* v vodnem mediju (Walde in sod., 2010). Gradniki membran veziklov so amfifilne molekule. Vezikle, ki jih sestavljajo lipidi, normalni gradniki bioloških membran, imenujemo lipidni vezikli (Szoka in Papahadjopoulos, 1980) ali liposomi (Lasic, 1993). Liposomi nam služijo kot modelni sistem za študij bioloških membran. Z njimi lahko npr. preučujemo interakcije proteinov z lipidi, dinamiko membran, strukturo membranskih proteinov, dostavne sisteme za vstop molekul v celice idr. Glavni tipi liposomov so multilamelarni vezikli (MLV, ang. multilamellar vesicles), multivezikularni vezikli (MVV, ang. multivesicular vesicles), veliki unilamelarni vezikli (LUV, ang. large unilamellar vesicles), majhni unilamelarni vezikli (SUV, ang. small unilamellar vesicles) in vezikli celičnih velikosti ali orjaški unilamelarni vezikli (GUV, ang. giant unilamellar vesicles) (sl. 12) (Gómez-Hens in Manuel Fernández-Romero, 2005). Lastnosti liposomov so odvisne predvsem od lipidnih gradnikov ter od načina priprave in temperature, pri kateri ta priprava poteka. V začetnih stopnjah priprave liposomov najprej dobimo MLV, ki imajo lahko premer preko 1  $\mu\text{m}$ . MLV lahko razbijemo na manjše vezikle z dodatkom zunanje energije: s soniciranjem dobimo SUV s premerom pod 50 nm, LUV s premerom okoli 100 nm pa dobimo z ekstruzijo MLV skozi polikarbonatne membrane s porami (Huang, 1969; Mayer in sod., 1986; Gómez-Hens in Manuel Fernández-Romero, 2005; Walde in sod., 2010).



Slika 12: Različni tipi lipidnih veziklov iz lipidnega dvosloja: MLV, multilamelnari vezikli (ang., multilamellar vesicles); MVV, multivezikularni vezikli (ang., multivesicular vesicles); GUV, vezikli celičnih velikosti (ang., Giant unilamellar vesicles); LUV, veliki unilamelarni vezikli (ang., large unilamellar vesicles); SUV, majhni unilamelarni vezikli (ang., small unilamellar vesicles). Povzeto po (Gómez-Hens in Manuel Fernández-Romero, 2005:9).

### 3.2.6.1 Priprava multilamelarnih veziklov (MLV)

V stekleno bučko smo prenesli ustrezno mešanico lipidov, raztopljenih v kloroformu s koncentracijo okrog 10 mg/ml in jih tri ure sušili na rotavaporju. Nastalemu lipidnemu filmu smo najprej dodali majhno količino etanola (končna koncentracija etanola < 1 % v/v), stresali par sekund na vibracijskem mešalniku, nato pa dodali še steklene kroglice in pufer PBS (segret na okrog 5 °C višjo temperaturo kot je bila najvišja  $T_m$  lipida v lipidni mešanici). Za pripravo biotiniliranih veziklov iz eritrocitnih membran smo najprej izolirali celokupne lipide iz govejih eritrocitnih membran po postopku, ki so ga opisali Mikelj in sod. (2013) (poglavje 3.2.6.4.2) in jih uporabili za raztapljanje BC-PE lipidnega filma. Stekleno bučko z raztopljenimi lipidi v PBS ali s celokupnim lipidnim ekstraktom eritrocitnih membran smo nato za 30 min vrteli v topli vodni kopeli (temperatura enaka temperaturi pufru PBS) in jo vmes 2-3 x stresali na vibracijskem mešalniku. Dodatek etanola in višja temperatura pomagata v vodnem pufru raztopiti nekatere lipide kot so sfingomielin (SM), fosfatidiletanolamin (PE) in holesterol (CHOL). Nastale multilamelarne vezikle smo prenesli v kriovialo in jih nato 6-8 x izmenično zamrzili v tekočem dušiku in odtajali v topli vodni kopeli.

### 3.2.6.2 Priprava majhnih unilamelarnih veziklov (SUV) s sonikacijo

SUV smo pripravili s sonikacijo MLV. Sonicirali smo pri 40 % amplitudi v ledeno-vodni kopeli po 10 sek z 10 sek premori, skupno 30 min. Po sonikaciji smo vzorec 45 min inkubirali v vodni kopeli na 40 °C in centrifugirali na namizni centrifugi 5 min pri 6000 vrt./min, za odstranitev titanovih delcev sonde. SUV smo hranili pri 4 °C in jih uporabili na dan priprave.

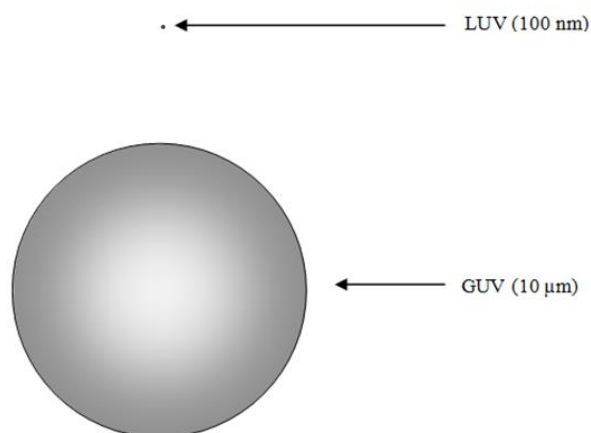
### 3.2.6.3 Priprava velikih unilamelarnih veziklov (LUV) z iztiskanjem

LUV smo pripravili iz MLV z ekstruzijo (31 x) skozi polikarbonatne filtre z definirano velikostjo por (100, 200, 400 nm). V primeru kompleksne lipidne sestave veziklov smo ekstrudirali v topli vodni kopeli (temperatura okrog 60 °C), sicer pa pri sobni temperaturi. LUV smo do uporabe hranili pri 4 °C.

### 3.2.6.4 Vezikli celičnih velikosti (GUV)

GUV lahko zaradi njihove velikosti (premer GUV znaša od 1 – 100  $\mu\text{m}$ ), ki je primerljiva z večino bioloških celic (Becker in sod., 2009), opazujemo z optično mikroskopijo in so uporabni kot model za študij različnih fizikalno-kemijskih lastnosti bioloških membran (Walde in sod., 2010). Tako je na GUV moč preučevati mehanske lastnosti veziklov (Vitkova in sod., 2004), termodinamiko membran (Nichols-Smith in sod., 2004), membransko ukrivljenost (Khalifat in sod., 2008), morfologijo membran (Praper in sod., 2011a), lipidne domene (Roux in sod., 2005; Wośowska in sod., 2009), brstenje (ang. budding) ali fisijo (Döbereiner in sod., 1993) in fuzijo membran (Pantazatos in MacDonald, 1999).

Z GUV lahko izvajamo meritve na posameznih veziklih v realnem času, za razliko od manjših LUV in SUV, pri katerih rezultat predstavlja povprečno vrednost posameznega vezikla, dobljeno iz številnih veziklov in se zato lahko veliko informacij izgubi (sl. 13). GUV so tako veliko bolj primerni kot manjši liposomi za preučevanje fizikalnih lastnosti veziklov, za preučevanje integritete membrane in morfologije veziklov, za spremljanje reakcij znotraj ali na površini vezikla idr. (Tamba in Yamazaki, 2005; Walde in sod., 2010). Zaradi slednjega so GUV primerni tudi za študij mehanizma tvorbe toksinskih por (Ambroggio in sod., 2005; Tamba in Yamazaki, 2005; Schön in sod., 2008; Praper in sod., 2011b).



Slika 13: Shematski prikaz velikosti GUV s premerom 10  $\mu\text{m}$  in 100 nm LUV. Prirejeno po (Walde in sod., 2010:848).

Ena prvih metod za pripravo GUV je počasna hidracija lipidov, ki sta jo leta 1969 opisala Reeves in Dowben (Reeves in Dowben, 1969). Obstaja pa vsaj še sedem drugih načinov za pripravo GUV, npr. elektroformacija (Angelova in Dimitrov, 1986), metoda počasnega izhlapevanja topila (Moscho in sod., 1996), invertna emulzijska metoda (Pautot in sod., 2003) in mikroinjiciranje (Funakoshi in sod., 2007; Stachowiak in sod., 2008).

Walde in sod. (2010) navajajo, da se trenutno se za pripravo GUV največ uporablja metoda elektroformacije. V osnovi gre za modifikacijo metode počasne hidracije lipidov. Lipide, raztopljene v organskih topilih, nanesejo na električno prevoden material, npr. na stekleno površino ali platinasto elektrodo in izpostavijo električnemu polju (Angelova in Dimitrov, 1986). Elektroformacija navadno poteka v vodnih raztopinah ali v raztopinah z nizko ionsko jakostjo in omogoča ponovljivo sintezo večinoma unilamelarnih veziklov iz različnih amfifilnih molekul ali mešanice le-teh (Bagatolli in sod., 2000; Walde in sod., 2010). Problem pri pripravi GUV z elektroformacijo predstavlja lipidni film iz pretežno nabitih lipidov (Rodriguez in sod., 2005). Elektroformacijo se navadno izvaja v raztopini saharoze, od koder se GUV prenese v izoosmolarno glukozno raztopino (Mally in sod., 2002). Razlika v gostoti med saharozno raztopino znotraj vezikla in zunanjo glukozno raztopino omogoča sedimentacijo GUV na dno epice oz. komore, kjer poteka elektroformacija in hkrati večji kontrast med notranjostjo vezikla in okolico (Walde in sod., 2010). Z običajnimi metodami se pripravljata GUV iz definiranih lipidnih mešanic pri nizkih koncentracijah soli, nedavno pa so razvili metode za pripravo GUV v fizioloških razmerah iz sintetičnih ali naravnih lipidov (Estes in Mayer, 2005; Montes in sod., 2007; Pott in sod., 2008; Mikelj in sod., 2013).

#### 3.2.6.4.1 Priprava GUV z elektroformacijo iz sintetičnih lipidov

Na par platinastih elektrod smo nanegli mešanico lipidov (12,5  $\mu$ l na elektrodo), katere smo raztopili v kloroformu do končne koncentracije 10 mM. Lipide na elektrodi smo posušili z rotavaporjem (50 mbar, 3 h), nato pa elektrodo prenesli v stekleničko s sterilno saharozno raztopino (1,4 ml,  $\sim$ 300 mOsmol) in priključili na funkcijski generator GFG-3015 (GW Instek, Tajska). Elektroformacijo smo izvedli pri sobni temperaturi po metodi, ki sta jo opisala Peterlin in Arrigler (2008).

Preglednica 9: Protokol za elektroformacijo.

Table 9: Electroformation protocol.

<b>Frekvenca/napetost [Hz/V]</b>	<b>Čas [min]</b>
10 Hz / 4 V	120
5 Hz / 2 V	15
2,5 Hz / 1 V	15
1 Hz / 1 V	30



Po elektroformaciji smo GUV sprostili z elektrode z rahlim stresanjem (~ 5 sek), prenesli saharozno raztopino z GUV v sterilno 15 mL falkonko in jih sedimentirali s sterilno izoosmolarno glukozno raztopino (1 ml). Po > 10 min smo s počasnim pipetiranjem dodali izoosmolarni pufer za GUV (7,5 ml). Naslednji dan smo odstranili vrhno plast pufra, spodnjih ~ 200 µl pa razdelili na ~ 10 enakih delov.

#### 3.2.6.4.2 Priprava GUV z elektroformacijo iz eritrocitnih membran

GUV iz eritrocitnih membran smo pripravili po protokolu opisanem v Mikelj in sod. (2013). Na kratko: eritrocite smo najprej večkrat sprali v pufru za spiranje eritrocitov, nato smo jih lizirali s pufrom za lizo eritrocitov in po centrifugiranju odstranili supernatant, membrane pa sprali z ohlajeno deionizirano vodo. Tako pridobljene membrane smo označili z DilC<sub>18</sub> in nanegli na par platinastih elektrod. Po prekonočnem sušenju membran pri tlaku ~ 50 mbar smo elektrode potopili v 1,4 ml sterilne saharozne raztopine v viali ter priključili na funkcijski generator. Postopek elektroformacije in posedanja GUV smo izvedli kot je opisano v poglavju 3.2.6.4.1, le da je elektroformacija potekala pri 37 °C.

#### 3.2.6.5 Določanje koncentracije lipidov

Koncentracijo fosfolipidov v veziklih smo določili po navodilih proizvajalca z encimskim kolorimetričnim testom Phospholipids C (Wako Chemicals GmbH, Nemčija). Absorbanco vzorcev smo merili pri valovni dolžini 570 nm s čitalcem mikrotitrskih ploščic Dynex MRX (Dynex Technologies, Nemčija).

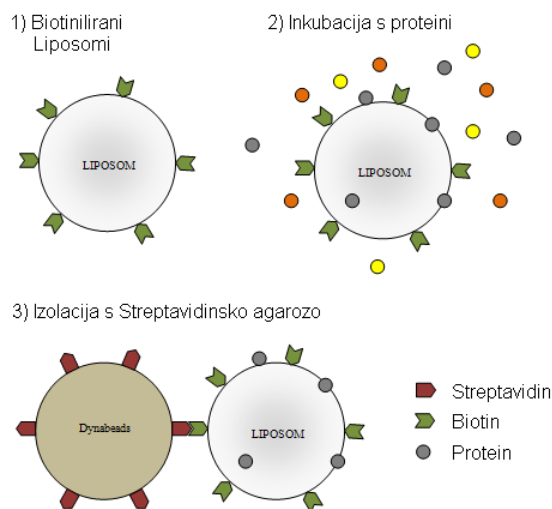
### 3.2.7 Preučevanje interakcij proteinov MACPF z modelnimi membranami

#### 3.2.7.1 Merjenje hemolitične aktivnosti

Hemolitično aktivnost smo merili na govejih eritrocitih s turbidimetrično metodo (Maček in Lebez, 1981) pri sobni temperaturi na čitalcu mikrotitrskih plošč. Vzorec smo dodali eritrocitnemu pufru in ga dvakrat redčili vzdolž plošče. Nato smo jamicam dodali 100 µl suspenzije govejih eritrocitov z navidezno absorpcijo 0,5 pri 630 nm do končnega volumna 200 µl in 1 h merili spremembo absorpcije pri 630 nm. Hemolitično aktivnost smo prikazali s časom  $t_{50}$  [min]).  $t_{50}$  je čas, ki je potreben za 50 % hemolizo, tj. padec navidezne absorpcije na polovico začetne vrednosti pred dodatkom vzorca.

#### 3.2.7.2 Afinitetna ločba s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami

Pri tej metodi smo izkoristili visoko afiniteto vezave proteina streptavidina z biotinom. S prvim so bile označene magnetne kroglice, drugega pa smo vstavili v lipidni dvosloj liposomov. Iz raztopine smo tako lahko z uporabo magneta ločili molekule, ki so se vezale na liposome in/ali magnetne kroglice od nevezanih molekul, ki so ostale v raztopini.



Slika 14: Shema poskusa afinitetne ločbe proteinov, ki se vežejo na liposome, s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami (Dynabeads).

Figure 14: Scheme of the experiment for the affinity separation of proteins which bind to liposomes, with streptavidine labeled magnetic beads (Dynabeads).

Izbrane rekombinantne proteine MACPF smo proizvedli preko noči z IVTT v prisotnosti liposomov ali PBS. Uporabili smo biotinilirane liposome (v lipidni dvosloj smo vgradili 2 mol % BC-PE), razen pri kontroli. V primeru, da smo liposome dodali po sintezi proteinov, smo predtem centrifugirali 10  $\mu$ l reakcijske mešanice IVTT (10000 g, 15 min) in k 10  $\mu$ l liposomov dodali samo supernatant. Mešanico proteina in liposomov smo po 30 min inkubaciji (700 vrt./min) na sobni temperaturi dodali 25  $\mu$ l s streptavidinom označenih magnetnih kroglic (Dynabeads M-280 Streptavidin ali MyOne Streptavidin T1) in mešanico 30 min inkubirali na stresalniku (700 vrt./min) na sobni temperaturi. V primeru kotranslacije z liposomi smo magnetne kroglice dodali k celotni 20  $\mu$ l reakcijski mešanici IVTT in postopali enako kot je opisano zgoraj. Zatem smo mikroepreveto z mešanico dali na magnet in po 2-3 min ločili supernatant od usedline. Usedlino smo nato sprali s 45  $\mu$ l PBS in ponovno z magnetom ločili supernatant od usedline. Postopek spiranja smo nato še 2x ponovili. Usedlino smo raztopili v 1 x NaDS-DTT nanašalnem pufu, združene supernatante in sprane frakcije pa oborili s TCA (poglavje 3.2.5.2) in raztopili v NaDS-DTT nanašalnem pufu. Vezavo proteinov MACPF na liposome smo analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

### 3.2.7.3 Testi na osnovi ultracentrifugiranja

Z različnimi tehnikami, ki temeljijo na ultracentrifugiranju, lahko ločimo frakcije liposomov z vezanimi proteini od prostih, nevezanih proteinov. Po ločbi lahko ocenimo količino proteinov v obeh frakcijah npr. z določitvijo intenzitete lis po barvanju po gelski elektroforezi ali po prenosu western. Problem pri teh metodah lahko predstavlja nespecifična adsorbcija proteinov na stene centrifugirk (Cho in sod., 2001).

### 3.2.7.3.1 Posedanje z MLV

Pri tej metodi gre za posedanje liposomov z vezanimi proteini. Vezikli morajo imeti dovolj veliko gostoto oziroma visoko sposobnost usedanja (ang. high pelleting efficiency), da se posedejo v polju centrifugalne sile. V ta namen se uporabljajo multilamelarni vezikli ali unilamelarni vezikli napolnjeni npr. s saharozo (Cho in sod., 2001). Metoda ni primerna za proteine, ki radi agregirajo ali tvorijo večje komplekse, ki se posedejo neodvisno od vezave na vezikle (Höfer in sod., 2010).

K 50  $\mu$ l MLV iz celokupnih lipidov govejih eritrocitnih membran s koncentracijo fosfolipidov 2 mg/ml smo dodali 5  $\mu$ l IVTT reakcijske mešanice s sintetiziranim proteinom in inkubirali 30 min na stresalniku pri 450 vrt./min na sobni temperaturi. Mešanico smo nato centrifugirali 1 h pri 60000 g, pri 4 °C (Sigma 3K30). Supernatant smo ločili od usedline, obe frakciji raztopili v NaDS-DTT nanašalnem pufru in analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

### 3.2.7.3.2 Flotacija v saharoznem gradientu

S flotacijo v saharoznem gradientu smo med seboj ločili nevezane in na liposome vezane proteine po sintezi z IVTT, pri čemer so slednji lebdeli na površini gradienta. Za razliko od prejšnje, je metoda primerna tudi za proteine, ki tvorijo agregate (Höfer in sod., 2010).

100  $\mu$ l reakcijo IVTT z ali brez proteina in fluorescentno označenih liposomov (v lipidni dvosloj smo vgradili 2 mol % NBD-PE) smo centrifugirali (13200 vrt./min, 1 min, sobna temperatura), da smo odstranili agregate, ter zmešali supernatant z 1,566 ml 51-% saharoze v PBS. Mešanico smo nanesli na dno ultracentrifugirke in jo s počasnim pipetiranjem prekrili z 2,734 ml 41-% saharoze v PBS, povrhu te pa še z 0,6 ml 27-% saharoze v PBS. Vzorec smo centrifugirali pri 100.000 g, 2 h pri 4 °C z rotorjem s spremenljivim nagibom (Beckman SW 65 Ti) (Beckman Coulter, ZDA). Po končanem centrifugiranju smo z dna pobrali frakcije po 1 ml, pomerili fluorescenco NBD (poglavje 3.2.7.6.1) in določili velikost liposomov z DLS (poglavje 3.2.7.4). Frakcije smo oborili s TCA, raztopili v NaDS-DTT nanašalnem pufru in analizirali z imunodetekcijo po prenosu western. Optično gostoto lis smo analizirali s programom Image Studio Lite.

### 3.2.7.4 Dinamično sipanje svetlobe (DLS)

Z dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS, ang. dynamic light scattering) smo določili velikost liposomov. DLS meri časovno odvisno nihanje v intenziteti odbojne svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Slednje je odvisno od velikosti delca ter viskoznosti in temperature medija. Z analizo nihanja intenzitet lahko določimo difuzijski koeficient delcev iz česar dobimo porazdelitev velikosti delcev. Z DLS smo merili na inštrumentu Zetasizer Nano (Malvern, VB) v kivetah za enkratno uporabo pri 20 °C, 633 nm in 173° kotu povratnega sipanja (ang., backscatter angle).

### 3.2.7.5 Fluorescenca NBD

Fluorescenca je pojav pri katerem nekatere snovi ob ekscitaciji s svetlobo določene valovne dolžine oddajo svetlobo daljše valovne dolžine. Za spremljanje liposomov po flotaciji v saharoznem gradientu s fluorescenco smo v lipidni dvosloj uvedli 2 mol% fosfatidiletanolamina, ki ima preko polarne glave kovalentno vezan fluorescentni označevalce NBD (7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-il) (18:1 NBD-PE, Avanti Polar Lipids, ZDA). NBD fluorescenca smo merili na fluorimetskem čitalcu mikrotitrnih plošč (Anthos Labtec, ZDA) pri valovni dolžini 535 nm z vzbujanjem pri 485 nm.

### 3.2.7.6 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Za vizualizacijo vezave proteina Torso-like na liposome smo uporabili presevno (transmisijsko) elektronsko mikroskopijo (TEM). Vzorce smo pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom CM 100 (Philips, Nizozemska), mikrografije pa posneli s kamerama Bioscan 792 (Gatan, ZDA) in Orius SC 200 (Gatan, ZDA), pri čemer smo uporabili programsko opremo Digital Micrograph (Gatan, ZDA).

#### 3.2.7.6.1 Negativno kontrastiranje

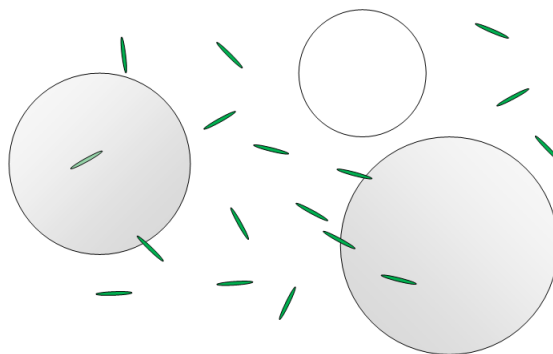
Na bakreno mrežico za elektronsko mikroskopijo, ki smo jo predhodno prekrili s Formvar folijo in tanko plastjo ogljika, smo nanесли 1,5  $\mu$ l vzorca 1) LUV-POPC:SM:CHOL  $\approx$  27:22:51 (razmerje mol/mol) po ekstruziji, 2) supernatant (1 min, 13200 vrt./min) po IVTT v prisotnosti LUV (enaki kot pri 1)) in 3) enako kot 2), le da s Tsl. Po kratki inkubaciji ( $\sim$  30 sek) smo vzorec popivnali s filtrirnim papirjem (Whatman) ali pa mrežico sprali z deionizirano vodo, da smo odstranili pufirske soli. Nato smo vzorec kontrastirali z 1-% (m/v) uranil-acetatom ali s 3-% amonijevim molibdatom (pH 6,33). Kontrastirno sredstvo smo odpivnali s filter papirjem, ter posušili mrežico.

#### 3.2.7.6.2 Imunolokalizacija z Ni-NTA zlatom

Po nanosu vzorcev 1) supernatant (1 min, 13200 vrt./min) po IVTT v prisotnosti SUV s sestavo POPC:SM:CHOL  $\approx$  27:22:51, 2) enako kot 1) le da s Tsl in 3) frakcija 5 vzorca 2) po flotaciji v saharoznem gradientu) na bakreno mrežico za elektronsko mikroskopijo (glej poglavje 3.2.7.6.1) smo mrežice sprali s pufrom (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, 1-% BSA, pH 7,6), nato smo jih inkubirali 20 min v pufri s 5 nm Ni-NTA nanozlatom (Nanoprobes, ZDA), ter sprali s pufrom, ki je vseboval imidazol (5 x 1 min) v deionizirani vodi (5 x 1 min). Vzorec smo kontrastirali z amonijevim molibdatom (pH 6,33).

### 3.2.8 *In vitro* sistem za preučevanje prehoda listerije iz fagosoma v citosol

Za preučevanje prehoda *L. monocytogenes* iz fagosoma v citosol in ugotavljanje vloge LLO pri tem procesu smo nameravali vzpostaviti modelni sistem z vezikli celičnih velikosti (GUV). Takim veziklom bi dodali listerije, ki izražajo zeleni fluorescenčni protein (GFP) in s fluorescenčno mikroskopijo spremljali prehajanje listerij skozi membrane v notranjost GUV. Za poskuse bi uporabili dva seva listerij, divji tip (dt) in sev, ki ne izraža LLO (hly-), za kontrolo pa nam bi služil heterologno izražen LLO. Pripravili bi GUV iz različnih sintetičnih lipidov ter iz lipidov iz eritrocitnih membran, s čimer bi preverili odvisnost prečnega membrana od njihove sestave. Notranjost GUV bi z nevtralnimi pH posnemala model citosolnega okolja, kisel pH (okoli 5,5) v zunanosti GUV pa bi predstavljal okolje fagosoma. pH fagosoma je med 4,5 (Vergne in sod., 1998) in 6,5 (Horwitz in Maxfield, 1984; Lukacs in sod., 1990). S spreminjanjem pH pufrov, v katerih bi inkubirali GUV, bi preverili tudi vpliv pH na aktivnost listerij in LLO.



Slika 15: Shema *in vitro* sistema za študij prehoda *L. monocytogenes* iz fagosoma v citosol. Krogi predstavljajo vezikle celičnih velikosti (GUV) s premerom  $> 10 \mu\text{m}$ , zelene palčke pa bakterije *L. monocytogenes*, ki izražajo zeleni fluorescenčni protein (GFP). pH znotraj GUV je nevtralen in predstavlja citosol, kisel pH v okolici pa predstavlja okolje fagosoma. Prehajanje bakterij bi spremljali s fluorescenčno mikroskopijo. Kot indikator prehoda bi služili od pH odvisni fluorescenčni označevalci, npr. piranin, kateremu se zviša intenziteta fluorescence pri višjem pH ob osvetlitvi pri  $\sim 465 \text{ nm}$ .

Figure 15: Scheme of the *in vitro* system for the study of the translocation of *L. monocytogenes* from phagosome into cytosol. Circles represent the giant unilamellar vesicles (GUV) with a diameter  $> 10 \mu\text{m}$ , while green rods represent bacteria *L. monocytogenes* expressing green fluorescent protein (GFP). pH within the GUV is neutral and represents the cytosol whereas acidic pH in the surrounding area represents the environment of phagosome. The fluorescence microscopy would serve for monitoring the translocation of bacteria. pH-sensitive fluorescent dyes would serve as an indicator of the translocation (*i.e.* pyranine, which increases the intensity of fluorescence at a higher pH at the excitation wavelength  $\sim 465 \text{ nm}$ ).

### 3.2.8.1 Permeabilizacija veziklov celičnih velikosti

Permeabilizacijo GUV z LLO smo preučevali s pomočjo fluorescenčno označenih dekstranov različnih velikosti. 6  $\mu$ l GUV smo zmešali z 0,5  $\mu$ l raztopine fluorescenčno označenih dekstranov (FD4, FD10 in FD70) in 0,5  $\mu$ l 100 nm LLO ali pufra LLO za kontrolo. Končna koncentracija FD4 je bila 0,1 mM, 0,07 mM pri FD10 in 0,01 mM pri FD70. Po 30 min inkubaciji na sobni temperaturi smo s fluorescenčnim mikroskopom določili delež permeabiliziranih GUV.

### 3.2.8.2 Fluorescenčna mikroskopija

Fluorescenčno mikroskopijo smo izvedli na mikroskopu AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Nemčija) pri 10- in 40- kratni povečavi. Za boljšo ločljivost smo uporabili ApoTome, ki omogoča fluorescenco s strukturirano osvetlitvijo. Dekstrane konjugirane s fluoresceinom smo vzbujali pri 450-490 nm in merili emisijo pri 515 nm. DilC18 in/ali rodamin-DHPE pa smo vzbujali pri 510-560 nm in merili emisijo pri 590 nm.

## 3.2.9 Statistična analiza rezultatov

V večini primerov smo naredili vsaj 3 neodvisne ponovitve poskusov ter pri rezultatih s histogrami prikazali aritmetično sredino in standardni odklon. Za statistično analizo rezultatov smo uporabili Studentov t-test, s 95-odstotno stopnjo zaupanja.

## 4 REZULTATI

Rezultate doktorske naloge smo razdelili na dva sklopa in sicer na rezultate *i*) interakcij izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami in *ii*) pilotne študije o vlogi LLO pri pobegu bakterije *L. monocytogenes* iz fagosoma v citosol. LLO nam je pri določenih poskusih rabil tudi kot kontrola pri poskusih iz prvega sklopa doktorata.

### 4.1 INTERAKCIJE IZBRANIH PROTEINOV MACPF Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI

V prvem sklopu doktorske naloge smo najprej s pomočjo bioinformatičnih orodij analizirali proteinsko družino MACPF. Nato smo izmed številnih članov družine, ki smo jih našli z bioinformatično analizo, izbrali 11 proteinov MACPF, s katerimi smo preučevali interakcije z lipidnimi membranami.

#### 4.1.1 Bioinformatična analiza proteinov z domeno MACPF

##### 4.1.1.1 Razširjenost proteinske domene MACPF

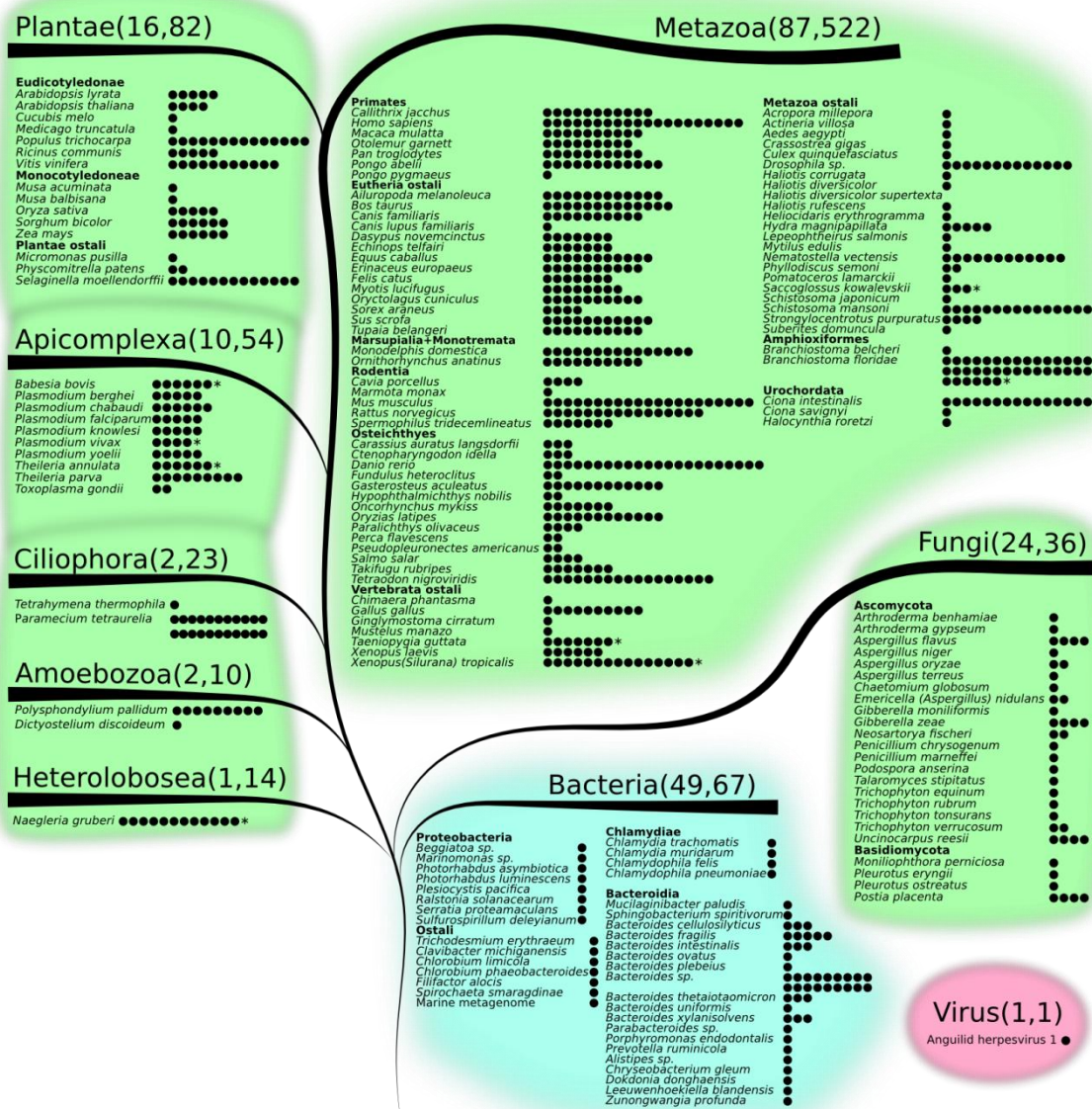
Z iskanjem po različnih podatkovnih zbirkah smo v lastni proteinski zbirki dne 24. 4. 2011 zbrali 809 različnih proteinskih zaporedij z domeno MACPF iz 192 različnih vrst. 91,6 % vseh dobljenih zaporedij smo našli pri 142 evkariontskih vrstah, preostala zaporedja pa so, razen enega virusnega, prokariontska (pregl. 10 in sl. 16). Podrobnejšo analizo o razširjenosti domene MACPF po drevesu življenja in o lastnostih proteinov MACPF je v svojem diplomskem delu pripravil Matic Kisovec (Kisovec, 2012).

Preglednica 10: Razširjenost proteinskih zaporedij z domeno MACPF po različnih sistematskih skupinah.

Table 10: Distribution of protein sequences with MACPF domain throughout the tree of life.

Takson	Kraljestvo	Število taksonomskih vrst s proteini MACPF	Število različnih zaporedij z domeno MACPF
<b>Evkarionti</b>		142	741
	Živali	87	522
	Rastline	16	82
	Glive	24	36
	Ostali evk.	15	101
<b>Bakterije</b>		49	67
<b>Virusi</b>		1	1
		$\Sigma=192$	$\Sigma=809$





Slika 16: Razširjenost proteinov z domeno MACPF po drevesu življenja (slika ni pravo filogenetsko drevo). Števila v oklepaju povedo, koliko vrst (prvo število) in koliko različnih proteinskih zaporedij (drugo število) z domeno MACPF je znotraj sistemske skupine. Število polnih krogcev (●) pomeni število različnih aminokislinskih zaporedij z domeno MACPF znotraj vrste; \*, več domen MACPF znotraj enega zaporedja. Zeleno, evkarionti; turkizno, bakterije in rožnato, virus (Kisovec, 2012: 24).

#### 4.1.1.2 Domenska zgradba proteinov MACPF

S prosto dostopnimi bioinformatičnimi orodji (poglavje 3.2.1.1) smo dobri polovici proteinov v zbirki določili prisotnost dodatnih proteinskih domen. Te smo našli pri polovici od 410 analiziranih zaporedij. Domenska arhitektura je kompleksnejša pri evkariontih. V kraljestvu živali smo našli 39 različnih dodatnih domen, pri bakterijah pa 22. Nekatere od teh domen bi lahko bile pomembne za vezavo na membrane (npr. MABP in C2) ali na sladkorje (npr. Ricin B lectin in MIR).



#### 4.1.1.3 Poravnava domen MACPF

Poravnava domen MACPF nekaterih značilnih predstavnikov vrst iz različnih taksonomskih skupin (živali, rastline, bakterije in virus) kaže na nizko ohranjenost na nivoju aminokislinskega zaporedja. Znotraj družine MACPF je med 15 do 20 % identičnost na nivoju zaporedja znotraj domene MACPF. Edini ohranjeni del zaporedja je t. i. motiv MACPF (Y/W-G-T/S-H-F/Y-X6-G-G) (Ponting, 1999), ki je skupen vsem proteinom MACPF. Znotraj motiva MACPF sta dva zelo ohranjena glicinska ostanka na mestu 2 in 12 (sl. 17).

	*	200	*	*	280	*	320	*																									
<i>H. sap</i> _Pfn_P14222	:	AVLRLESN	RAVEL	SRISAL	EDC	SEVV	GLD	YTL	EP	HVL	IDS	:	331																				
<i>D. rer</i> _Pfn_E7FA66	:	RFYKFIN	TKVTL	SNVHS	PAN	TEVT	SHS	HE	ES	HEL	IPT	:	342																				
<i>D. mel</i> _TSL_P40689	:	SAVRFMED	YNSYTT	NSLYQ	SKL	VKVV	LL	GN	DAI	QLD	KS	KPT	PRE	323																			
<i>A. vil</i> _AvTX_60A_Q76DT2	:	KYKVLLEK	IKESIS	SSIQY	ACVS	LVVR	KTET	INR	LIEAET	DE	SP	QYK	WT	IKW	330																		
<i>T. gon</i> _PLP1_A1E348	:	IWISFLEQ	FVRLPA	SRMTRY	QVTA	MGT	KTQ	TLVI	GRFP	LE	MP	KFE	W	YHLL	FPV	778																	
<i>P. fai</i> _PLP1_Q9U0J9	:	LWMKFFDI	IYESQL	SRITK	INV	NGV	S	KAK	LIV	GNPI	HE	MP	N	K	TP	SDS	FDS	551															
<i>P. ost</i> _PlyB_Q5W9E8	:	ALQNLQPB	HVFRTR	VHIS	SVLSA	HTME		VKQ	D	KAG		YIVN	CD	DYTK		3	TEE	VA	TNQ	SE	HWR	VIE	W	TE	TAV	ADL	332						
<i>E. nid</i> _SpoC1-C1C_Q00785	:	APAKFPAT	IVTTGCCL	ARYQL	QVTR		--E-H-	ETE		(27)	CSVM	GH	HPQ		(14)	FSQ	IR	IGA	SGT	QDV	HVL	A	DS	YN	FLLR	298							
<i>A. tha</i> _CAD1_Q9C7N2	:	SLASFLEN	ISITV	TSVTI	GRD	VVY	IRQ		--N-Y-	NDM	(27)	FRRR	GD	DD	(4)	HAR	AE	VPA	AE	DI	NMT	F	TP	V	SLL	LEG	286						
<i>Z. may</i> _MACPF_prot_B6SXM9	:	ALSWFKIN	IIVEMGI	GGQ	DV	ICV	QK		--H-	EDL	(56)	CSKR	GE	EA	(4)	HSK	LO	VAK	KE	DA	MPK	F	VP	T	SLL	TG	300						
<i>P. lum</i> _Plu-MACPF_Q7N6X0	:	DMNDL	FN	TS	CV	SCA	QYSS	ST	(8)	NSF	D	VAA	(31)	THA	CD	DL	SR	(24)	FED	KA	V	PN	AE	EL	NFA	DS	N	TCT	NEL	329			
<i>B. the</i> _Bth-MACPF_Q8A267	:	SMVEL	MQS	DFV	TGY	YTS	GR	ASAL	FFYG	(14)	MDV	A	NAS	(44)	IKT	CG	AYG	(15)	LTP	LC	LND	PK	TH	M	DL	Q	GG	V	SD	FLE	369		
<i>C. pne</i> _CT153_Q9Z908	:	SLNAFV	KEV	YAS	VY	SG	IG	FQ	VLKM	(12)	ISE	S	AAA	(26)	TVF	CG	TVL	(9)	FKD	SE	V	PN	EE	IP	AI	S	V	SS	T	DLI	IP	199	
<i>C. pne</i> _MACPF_prot_Q9Z908	:	SLNAFV	KEV	YAS	VY	SG	IG	FQ	VLKM	(12)	ISE	S	AAA	(26)	TVF	CG	TVL	(9)	FKD	SE	V	PN	EE	IP	AI	S	V	SS	T	DLI	IP	363	
<i>C. tra</i> _CT_153_Q84155	:	SWSAF	IQR	YAS	ATF	SG	IG	FQ	VLKL	(12)	ISE	E	TAAA	(26)	TVF	CG	TVL	(9)	FKD	SE	V	HL	EE	VP	Q	V	S	V	SS	T	DLI	IP	594
<i>S. spi</i> _Hip_prot_C2FV94	:	SAQEIV	SY	CV	CTN	IVL	AK	FS	FSYRT	(10)	LAA	G	AV	(29)	YRS	V	GD	GT	(17)	INO	QS	CKP	QN	AIL	DFG	N	GG				303		
<i>R. soi</i> _RRSL_02063_A3RUA0	:	ELRNF	FRS	DAF	SSI	TT	SE	YVA	YTF	(10)	VSI	E	KAN	(31)	NIS	I	AN	(8)	MID	AL	AF	PS	LP	IDA	AI	AFA	V	TG	YE	H	VPN	265	
<i>C. gle</i> _Hip_prot_D7VYK3	:	TPQQI	VQD	CA	VAV	DI	AK	LD	VLFQA	(10)	ARI	G	KVG	(27)	YKTR	CD	PSK	(16)	ISN	QN	SNA	SN	SVL	DF							304		
<i>P. rum</i> _Lipoprot_D5EWP2	:	SAERIVER	CAV	KCALM	INIL	S	YRS			(10)	CF	CS	FR	(24)	VQCH	ENT	QR	(18)	IAR	WN	QANN	DN	LSL	LLT	GDD	V	IP	Y	OLL	TN	329		
<i>A. her</i> _ORF65_D2E8B6	:	TLDE	FTD	AVGF	AH	VEM	SMFYR	IMTV		(10)	LDE	T	QDC	(46)	TLQ	CG	GT	(4)	MSD	QH	E	KD	DE	KA	QYK	F	VPY	T	M	KDV	717		

Slika 17: Poravnava najbolj ohranjenega dela domene MACPF. Poravnava je senčena glede na ohranjenost aminokislinskih ostankov med zaporedji (črna, 100 %; temno sivo, > 80 %; svetlo sivo, > 60 %). Zaporedja predstavnikov različnih taksonomskih skupin so od zgoraj navzdol ločeni s prazno vrstico: živali, glive, rastline, bakterije in virus. Vsako zaporedje vsebuje informacijo o izvornem organizmu, imenu in UniProt pristopni številki proteina. Oštevilčenje nad poravnavo so aminokislinski ostanki zrelega človeškega perforina, število skrajno desno je zadnja aminokislina, uporabljena pri poravnavi, dolžina neohranjenega dela zaporedja je zapisana v oklepajih. Prirejeno po (Gilbert in sod., 2012:2085)

#### 4.1.1.4 Lastnosti izbranih proteinov MACPF

Izmed 809 proteinov MACPF iz naše zbirke smo izbrali 20 različnih, večinoma bakterijskih, proteinov in njihovih krajših konstruktov za preučevanje interakcij z lipidnimi membranami (pregl. 11). Cilj je bil pridobiti proteine, ki bi jih lahko uspešno izrazili v bakterijskem ekspresijskem sistemu in bi nam omogočili pojasniti mehanizme interakcij proteinov MACPF z biološkimi membranami. Glavna merila izbora so bila: *i*) napovedana topnost, *ii*) domenska organiziranost (prisotnost dodatnih domen, posebej tistih z morebitno sposobnostjo vezave na membrane), *iii*) velikost, *iv*) odsotnost transmembranskih regij in *v*) patogenost izvornega organizma (npr. *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydia trachomatis*, *Ralstonia solanacearum*, *Plasmodium falciparum*,...).

Preglednica 11: Lastnosti proteinov MACPF, ki smo jih izbrali za preučevanje interakcij z lipidnimi membranami. *Regija*, del proteina, uporabljenega za sintezo (številke predstavljajo aminokisljine (AK)). *Oznaka*, okrajšava za izbrane proteine, ki jo uporabljamo v nadaljevanju naloge. *Domene*: *MIR*, poimenovana po manoziltransferaznem, inozitol 1,4,5-trifosfatnem in rianodin receptorju (InterPro koda: IPR016093); *Jacalin*, domena za vezavo sladkorjev (InterPro koda: IPR001229); *DNA-Q-like*, domena iz DnaQ-podobne eksonukleazne naderdružine proteinov (NCBI koda: c110012); *APC-β*, ApiPLP (ang. apixoplexan perforin-like proteins) C-terminalna domena, sestavljena iz 5 beta trakov (Kafsack in Carruthers, 2010). Za podrobnosti o določanju lastnosti proteinov glej poglavje 3.2.1.2.

Table 11: Characteristics of MACPF proteins selected for studying interactions with lipid membranes. *Oznaka*, short mark for the selected proteins, which is used throughout the dissertation; *UniProt pristopna koda*, UniProt accession code; *Organizem*, organism; *Domenska organiziranost*, domain architecture; *Velikost*, size in kDa; *Dolžina*, length of the protein (numbers represent amino acids (AK)); *Regija*, the region of the protein used for the synthesis (numbers represent AK). *Napovedana topnost*, predicted solubility (*topen*, soluble; *netopen*, insoluble). *Domains*: *MIR*, domain named after protein mannosyltransferase, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and ryanodine receptor (InterPro code: IPR016093); *Jacalin*, sugar-binding protein domain (InterPro code: IPR001229); *DNA-Q-like*, domain that belongs to DnaQ-like exonuclease superfamily (NCBI code: c110012); *APC-β*, ApiPLP (apixoplexan perforin-like proteins) C-terminal domain composed of 5 β-strands (Kafsack and Carruthers, 2010). For details about determination of the protein properties see chapter 3.2.1.2.

Protein	Oznaka in UniProt pristopna koda	Organizem	Domenska organiziranost	Velikost [kDa]	Dolžina [AK]	Regija [AK]	Napovedana topnost
CT153 hipotetični protein	a Q9Z908	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[MACPF]-[MIR]	46	411	1-411	netopen
C terminalna regija	b		[MIR]	5,3	48	364-411	netopen
MAC-perforin domain protein	c D8VEJ3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[MACPF]	50	456	1-456	netopen
C-terminalna regija	d		-	5,5	50	407-456	topen
Hipotetični protein CT_153	e O84155	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	[MACPF]-[MIR]	90,8	810	1-810	topen
C-terminalna regija	f		[MIR]	7,8	69	742-810	topen
Hipotetični protein HMPREF0765_1250	g C2FV94	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	[MACPF]	33,9	308	1-308	netopen
Hipotetični protein RRSL_02063	h A3RUA0	<i>Ralstonia solanacearum</i>	[MACPF]-[Jacalin]	55,4	519	1-519	topen
C-terminalna regija	i		[Jacalin]	15,4	147	373-519	topen
Hipotetični protein HMPREF0204_11601	j D7VYK3	<i>Chryseobacterium gleum</i>	[MACPF]-[DNAQ-like]	49,5	438	23-460	topen
Domnevni lipoprotein	k D5EWP2	<i>Prevotella ruminicola</i>	[MACPF]	36,7	327	23-349	netopen
Torso-like	l P40689	<i>Drosophila melanogaster</i>	[MACPF]	39	334	20-353	topen
domena MACPF	m		[MACPF]	22,6	194	147-340	topen
N-terminalna regija	n		-	9,5	81	20-100	topen
PIPLP1/SPECT2	o Q9U0J9	<i>Plasmodium falciparum</i>	[MACPF]-[APC-β]	94,5	842	1-842	topen
domena APC-β	p		[APC-β]	25,5	233	610-842	topen
PIPLP3/MAOP	r Q8I2S3	<i>Plasmodium falciparum</i>	[MACPF]-[APC-β]	93,3	821	1-821	netopen
domena APC-β	s		[APC-β]	25,3	222	600-821	netopen
PIPLP4	t Q8IB29	<i>Plasmodium falciparum</i>	[MACPF]-[APC-β]	73,6	631	25-654	netopen
domena APC-β	u		[APC-β]	29,1	250	405-654	topen

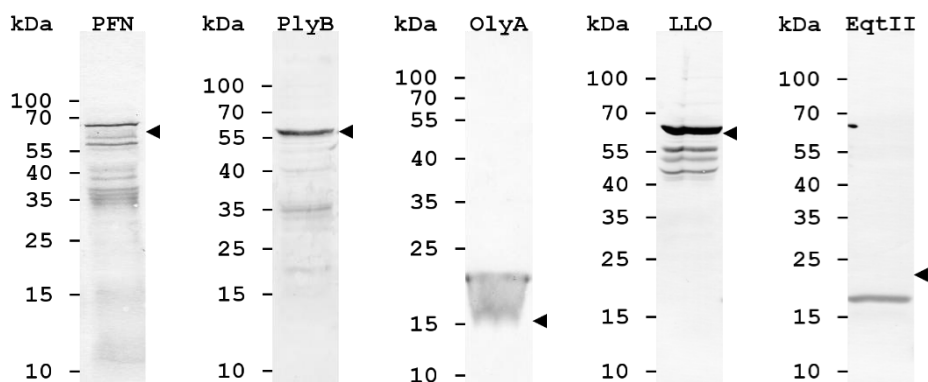
#### 4.1.2 Presejalna metoda za študij interakcij izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami

Sistem transkripcije-translacije za izražanje proteinov *in vitro* (IVTT) smo uporabili kot del visokozmogljive metode (ang. high throughput method) za študij interakcij proteinov z lipidnimi membranami. Za razliko od običajnih bioloških sistemov za izražanje rekombinatnih proteinov IVTT omogoča dodajanje različnih snovi med sintezo, npr. liposomov ali detergentov za izražanje membranskih proteinov ali celo takšnih, ki bi bili za celico toksični. Druga velika prednost sistema IVTT pa je hitrost sinteze proteinov. Le-te lahko z IVTT sintetiziramo v zgolj nekaj urah. Po drugi strani pa sistem IVTT ni najbolj primeren za izražanje večjih količin proteinov, ter za proteine, ki se *in vivo* posttranslacijsko modificirajo.

Po sintezi z IVTT smo interakcije proteinov z lipidnimi membranami preverili z *i*) merjenjem hemolitične aktivnosti, s *ii*) posedanjem z liposomi ali z *iii*) afinitetno ločbo z magnetnimi kroglicami, označenimi s streptavidinom. S slednjo smo v ~1 h ločili usedlino liposomov z vezanimi proteini od supernatanta z nevezanimi proteini. Vezavo proteinov na liposome smo v primeru *i*) in *ii*) analizirali z imunodetekcijo po prenosu western.

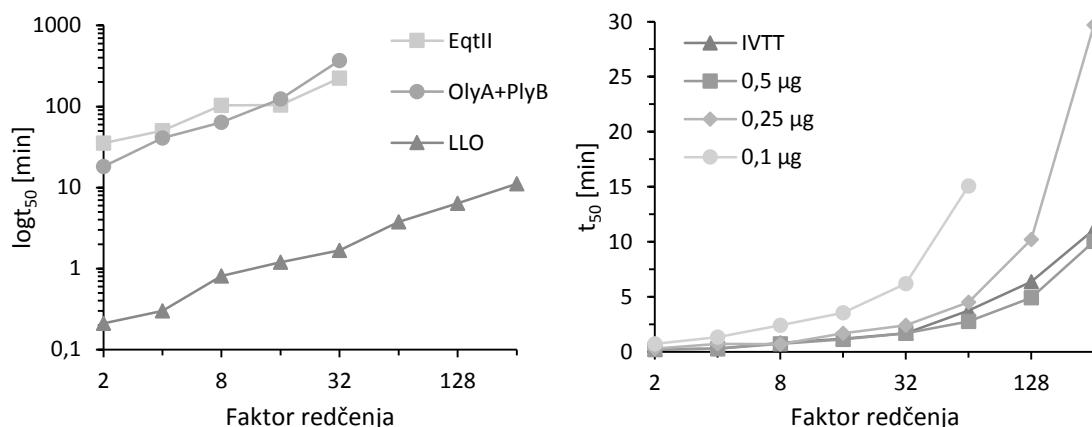
##### 4.1.2.1 Testiranje sistema *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) s kontrolnimi proteini

Preden smo izrazili izbrane proteine MACPF, smo preverili uporabnost sistema IVTT za izražanje proteinov tvorcev por: perforina (PFN) in pleurotolizina B (PlyB, Q5W9E8) iz družine proteinov MACPF, listeriolizina O (LLO) iz družine proteinov CDC in ekvinatoksina II (EqtII, P61914) iz aktinoporinske družine proteinov. Ply B je citolitično aktiven le v kombinaciji z ostreolizinom A (OlyA, P83467) iz egerolizinske družine proteinov, zato smo z IVTT izrazili tudi tega. Gene za t. i. kontrolne proteine smo vstavili v plazmid pET8c, razen gena za Oly A, ki smo ga vnesli v plazmid pET21c(+), po postopku, ki smo ga opisali v poglavju 3.2.2.2. Sintezo proteinov smo preverili z imunodetekcijo po prenosu western, njihovo aktivnost pa z merjenjem hemolitične aktivnosti (poglavje 3.2.7.1) (sl. 18 in 19).



Slika 18: Sinteza kontrolnih proteinov s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT). *PFN*, perforin; *PlyB*, pleurotolizin B; *OlyA*, ostreolizin A; *LLO*, listeriolizin O in *EqtII*, ekvinatoksin II. Na teh in vseh preostalih membranah (razen če ni drugače navedeno) smo proteine pred prenosom western ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE). Membrano smo nato inkubirali v prisotnosti mišjih primarnih protiteles proti histidinski oznaki (Penta-His mAb) in kozjimi proti mišjim sekundarnimi protitelesi, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo (IgG<sup>HRP</sup>). Lise proteinov smo detektirali kolorimetrično. Puščice označujejo predvidene pozicije izraženih proteinov.

Figure 18: Synthesis of the control proteins with the *in vitro* transcription-translation (IVTT) system. *PFN*, perforin; *PlyB*, pleurotolysin B; *OlyA*, ostreolysin A; *LLO*, listeriolysin O and *EqtII*, equinatoxin II. On these and on all other membranes (unless otherwise stated), proteins were separated with polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) prior to Western blot transfer. The membrane was then incubated in the presence of mouse anti-histidine tag primary antibodies (Penta-His mAb) and goat anti-mouse secondary antibody labelled with horseradish peroxidase (IgG<sup>HRP</sup>). Protein bands were detected colorimetrically. The arrows indicate the expected positions of the expressed proteins.



Slika 19: Hemolitična aktivnost kontrolnih proteinov. Potek hemolize smo prikazali s časom, ko je potekla 50-odstotna hemoliza ( $t_{50}$  [min]) v odvisnosti od faktorja redčenja. *Levo*, hemolitična aktivnost kontrolnih proteinov, ki smo jih sintetizirali z *in vitro* transkripcijo-translacijo (IVTT). V prve jamice smo nanjali po 1  $\mu$ l reakcijske mešanice IVTT s sintetiziranim proteinom ekvinatoksinom II (EqtII), listeriolizinom O (LLO), perforinom (PFN), ostreolizinom A (OlyA) ali pleurotolizinom B (PlyB) in serijsko redčili vzdolž plošče. OlyA in PlyB smo inkubirali v jamico posamič (ni hemolitične aktivnosti) ter skupaj v razmerju 1:1 (v/v). *Desno*, primerjava hemolitične aktivnosti LLO, ki smo ga proizvedli z IVTT, z različnimi količinami rekombinantnega LLO, ki smo ga pridobili v *E. coli*. 1  $\mu$ l LLO, ki smo ga sintetizirali s sistemom IVTT, ustreza ~ 0,5  $\mu$ g LLO, ki smo ga proizvedli v *E. coli*.

Figure 19: Haemolytic activity of the control proteins. Progress of haemolysis is shown as time needed for 50 % haemolysis ( $t_{50}$  [min]) as a function of the dilution factor. *Left*, haemolytic activity of the control proteins synthesised with *in vitro* transcription-translation (IVTT). 1  $\mu$ l of IVTT reaction mixture with

synthesised protein (equinatoxin II (EqII), listeriolysin O (LLO), perforin (PFN), ostreolysin A (OlyA) or pleurotolysin B (PlyB)) was added to the first well and serially diluted along the plate. OlyA and PlyB were incubated individually (no haemolysis) as well as together in 1:1 ratio (v/v). *Right*, haemolytic activity of LLO synthesised with the IVTT compared with the haemolytic activity of different amount of recombinant LLO produced in *E. coli*. 1 µl of LLO, which was synthesized with the IVTT system corresponds to ~ 0.5 µg LLO produced in *E. coli*.

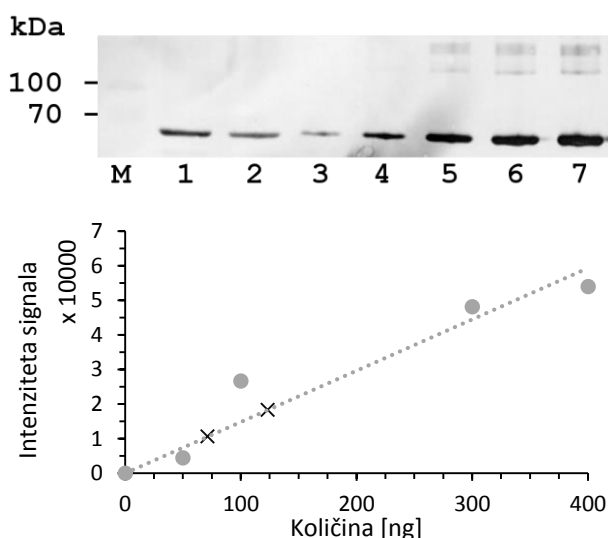
S sistemom IVTT nam je uspelo izraziti vse kontrolne proteine, vendar le LLO, EqII, OlyA in PlyB v njihovi aktivni obliki. Hemolitično aktivnega PFN nam ni uspelo pridobiti niti ob spreminjanju pogojev sinteze (različen pH, dodatek EDTA, proteaznih inhibitorjev, s testiranjem na eritrocitih iz različnih organizmov idr.) (pregl. 11).

Preglednica 12: Testirani pogoji za sintezo perforina s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT). *His<sub>6</sub>*, heksahistidinska oznaka; *EDTA*, etilendiamintetraoetna kislina; *AEBSF*, serinski proteazni inhibitor; *pH*, končni pH v reakcijski mešanici IVTT.

Table 12: Synthesis of perforin with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system under different conditions. *His<sub>6</sub>*, hexahistidine tag; *EDTA*, ethylenediaminetetraacetic acid; *AEBSF*, serine protease inhibitor; *pH*, final pH value in the IVTT reaction mixture.

<b>His<sub>6</sub></b>	<b>EDTA</b>	<b>AEBSF</b>	<b>Eritrociti</b>	<b>pH</b>	<b>Pufer</b>
N			goveji	~ 8	
N	2 mM		goveji	~ 8	
N	2 mM	0,1 mM	goveji	~ 8	
N			človeški	~ 8	
N	2 mM		človeški	~ 8	
N	2 mM		človeški	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2
N	2 mM		goveji	~ 8	10 mM acetatni pufer pH 4
N	2 mM		goveji	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2
N	2 mM		goveji	~ 6 - 7	10 mM KCl-HCl pufer pH 1
C			goveji	~ 8	
C	2 mM		goveji	~ 8	
C	2 mM		človeški	~ 8	
C	2 mM		goveji	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2
C	2 mM	0,1 mM	goveji	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2
C	2 mM		človeški	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2
Brez			goveji	~ 8	
Brez	2 mM		goveji	~ 8	
Brez	2 mM		človeški	~ 8	
Brez	2 mM		goveji	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2
Brez	2 mM	0,1 mM	goveji	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2
Brez	2 mM		človeški	~ 7 - 8	10 mM Gly-HCl pufer pH 2,2

Za OlyA in PlyB smo potrdili ugotovitve Ota in sod. (2013), da sta citolitično aktivna le v kombinaciji drug z drugim. Slednja sta lizirala eritrocite podobno hitro kot EqII, medtem ko je bil hemolitično najbolj aktiven LLO (sl. 19). S pomočjo znanih koncentracij LLO, ki smo ga proizvedli v *E. coli*, smo na podlagi hemolitične aktivnosti in intenzitete lis po imunodetekciji po prenosu western ocenili, da smo s sistemom IVTT v 20  $\mu$ l pridobili med 1,4 do 10  $\mu$ g LLO (sl. 19 in 20).



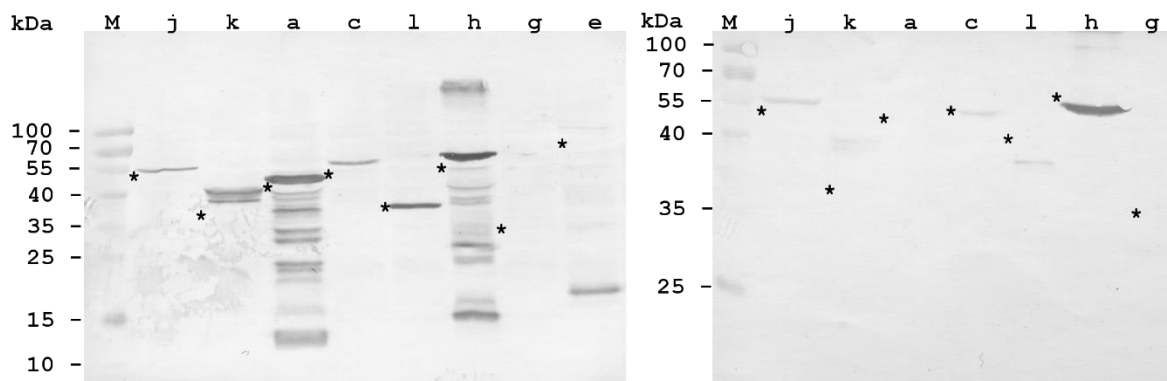
Slika 20: Ocena količine listeriolizina O (LLO), ki smo ga izrazili s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT). *Zgoraj*, imunodetekcija lis LLO na membrani po prenosu western. *M*, označevalec molekulskih mas v kDa; *1*, 1  $\mu$ l reakcijske mešanice IVTT s sintetiziranim LLO; *2*, 1  $\mu$ l supernatanta LLO po sintezi z IVTT (13200 vrt./min, 1 min); *3-7*, naraščajoče količine LLO, ki smo ga sintetizirali v *E. coli* – *3*, ~ 50 ng, *4*, ~ 100 ng, *5*, ~ 200 ng, *6*, ~ 300 ng, *7*, ~ 400 ng. *Spodaj*, graf odvisnosti intenzitete lis od količine LLO. S sistemom IVTT smo v 20  $\mu$ l pridobili 1,4 do 2,4  $\mu$ g LLO.

Figure 20: Estimation of listeriolysin O (LLO) expression levels with *in vitro* transcription-translation (IVTT). *Top*, immunodetection of LLO bands on membrane after Western blot. *M*, molecular weight size marker in kDa; *1*, 1  $\mu$ l of IVTT reaction mixture with synthesised LLO; *2*, 1  $\mu$ l of the supernatant after IVTT synthesis of LLO (13.200 rpm, 1 min); *3-8*, increasing amounts of LLO synthesized in *E. coli* – *3*, ~ 50 ng, *4*, ~ 100 ng, *5*, ~ 200 ng, *6*, ~ 300 ng, *7*, ~ 400 ng. *Bottom*, correlation between band intensities and LLO concentration. The amount of LLO synthesised with the IVTT in 20  $\mu$ l reaction corresponds to app. 1.4 to 2.4  $\mu$ g.

#### 4.1.2.2 Izražanje izbranih proteinov MACPF s sistemom IVTT

Gene za izbrane bakterijske proteine MACPF in protein Torso-like (Tsl) iz vinske mušice brez signalnih zaporedij smo uspešno vstavili tako v plazmid pET8c kakor v plazmid pET21c(+), razen v primeru gena za protein *e* (pregl. 11), katerega smo uspeli vstaviti le v plazmid pET8c. S sistemom IVTT smo preverili, kakšna je raven izražanja proteinov iz enega in drugega plazmida in ugotovili, da je v primeru, ko smo gen vstavili v plazmid pET8c in se protein izrazi, tega bistveno več kakor v primeru vnosa v plazmid pET21c(+). Zato smo za vse nadaljnje poskuse uporabili plazmid pET8c. Položaj lis na membrani po prenosu western v večini primerov ustreza molekulskim masam proteinov, razen v primeru proteina *e*, kjer je viden samo krajši fragment in proteina *g*, ki se sploh ni izrazil.

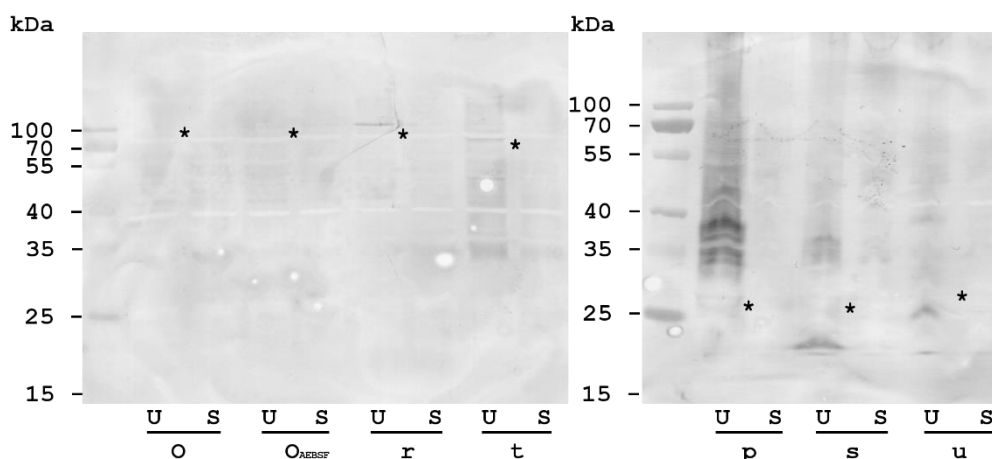
Pri proteinih *a* in *h* so poleg lise z največjo intenziteto, ki ustreza molekulske masi zrelega proteina, vidne tudi lise v območju manjših molekulkih mas, pri proteinu *h* pa tudi v območju večjih molekulkih mas. Očitno prihaja med sintezo obeh proteinov do fragmentacije bodisi proteina ali pa mRNK, pri proteinu *h* pa še do agregacije (sl. 21).



Slika 21: Primerjava nivoja ekspresije izbranih bakterijskih proteinov MACPF in proteina Torso-like s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) glede na plazmidno DNK – pET8c (levo) in pET21c(+) (desno). Imunodetekcija po prenosu western. *M*, označevalec molekulkih mas v kDa; *a-l*, oznake proteinov iz pregl. 11. Zvezdice označujejo predvidene pozicije izraženih proteinov. Gena, ki kodira za protein *e*, nam ni uspelo vstaviti v vektor pET21c(+).

Figure 21: Comparison of the expression level of selected bacterial MACPF proteins and Torso-like protein with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system according to the plasmid DNA - pET8c (left) and the pET21c (+) (right). Immunodetection after Western blot. *M*, molecular weight size marker in kDa; *a-l*, short mark for the selected proteins from tab. 11. Asterisks indicate the expected positions of the expressed proteins. We failed to insert the gene coding for the protein *e* into the vector pET21c (+).

Izražanje apikompleksnih proteinov MACPF (proteini *o* – *u*, pregl. 11) s sistemom IVTT je bila precej nižja od bakterijskih proteinov MACPF in Tsl, poleg tega je bila večja tudi stopnja fragmentacije. Pri proteinu *o* smo po imunodetekciji opazili šibke lise vzdolž membrane, kar pomeni, da se protein ni izrazil oz. se je izrazil le v sledovih, ter poleg tega še fragmentiral. Enak rezultat smo dobili tudi, ko smo reakciji IVTT dodali proteazni inhibitor (sl. 22, levo). C terminalni del proteina *o*, konstrukt *p* oz. domeno APC- $\beta$ , smo uspeli izraziti, vendar je agregiral in bil netopen. Do podobne ekspresije je prišlo tudi v primeru domen APC- $\beta$  *s* in *u* (sl. 22, desno). Preostala dva zrela apikompleksna proteina, *r* in *t*, sta se izrazila, vendar v zelo nizki količini in večinoma v netopni obliki. Podobno kot protein *o* sta tudi *r* in *t* fragmentirala, vendar položaj ene izmed najbolj intenzivnih lis po imunodetekciji kaže na to, da večji del proteina vendarle ostaja nerazgrajen (sl. 22, levo).



Slika 22: Izražanje apikompleksnih proteinov MACPF (ApiPLP) s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT). Imunodetekcija po prenosu western. *Levo*, zreli proteini; *desno*, C-terminalne domene ApiPLP proteinov (APC- $\beta$ ). *o-u*, oznake proteinov iz pregl. 11; prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *U* in *S*, usedlina in supernatant po centrifugiranju IVTT reakcijske mešanice (13200 vrt./min, 1 min); *AEBSF*, serinski proteazni inhibitor. Zvezdice označujejo predvidene pozicije izraženih proteinov.

Figure 22: The expression of Apicomplexan MACPF proteins (ApiPLP) by means of *in vitro* transcription-translation (IVTT) system. Immunodetection after Western blot. *Left*, the mature proteins; *right*, the C-terminal ApiPLP domains (APC- $\beta$ ). *o-u*, protein marks from tab. 11; first column, molecular weight size marker in kDa; *U* and *S*, pellet and the supernatant, respectively, after centrifugation of IVTT reaction mixture (13,200 rpm, 1 min); *AEBSF*, a serine protease inhibitor. Asterisks indicate the expected positions of the expressed proteins.

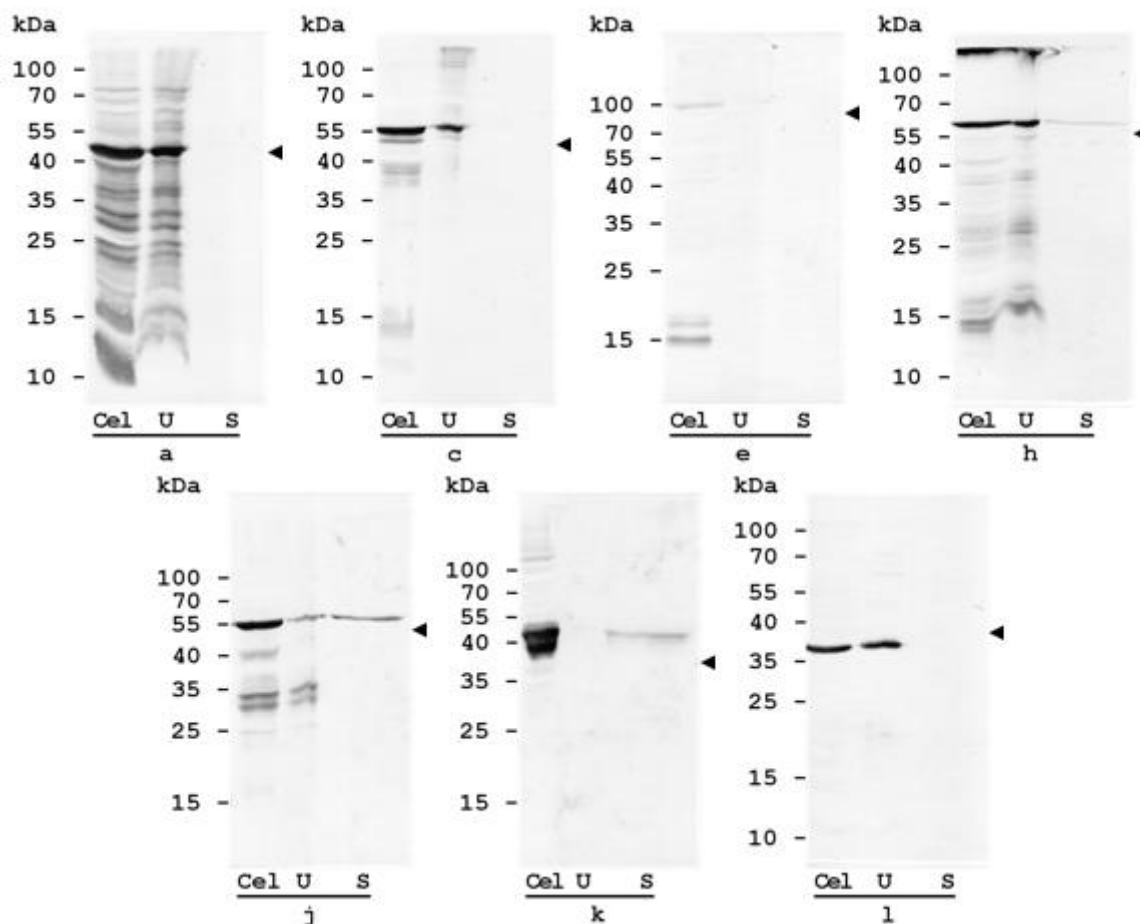
#### 4.1.2.3 Hemolitična aktivnost izbranih proteinov MACPF

Niti eden od izbranih proteinov MACPF, ki nam jih je uspelo sintetizirati, ni liziral govejih rdečih krvničk. Do lize ni prišlo niti ob dodatku egerolizina OlyA, ki smo ga dodali v jamico mikrotitrne plošče z izbranim proteinom MACPF v razmerju 1:1 (v/v). Za OlyA smo predvidevali, da bi lahko omogočil vezavo izbranih proteinov MACPF na eritrocite. OlyA namreč deluje kot vezavni protein za protein PlyB, s katerim tvorita poro v membrani (Ota in sod., 2013; Lukoyanova in sod., 2015) (sl. 19).

#### 4.1.2.4 Posedanje proteinov z MLV

Interakcije izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami smo preučevali s posedanjem proteinov z liposomi (poglavje 3.2.7.3.1). V ta namen smo uporabili multilamelarne vezikle, ki se v polju centrifugalne sile posedejo na dno centrifugirke. Po centrifugiranju smo ločili frakcije supernatanta z nevezanimi proteini od usedline, kjer so bili liposomi, na katere so se vezali proteini. Obe frakciji smo analizirali z imunodetekcijo po prenosu western (sl. 23).

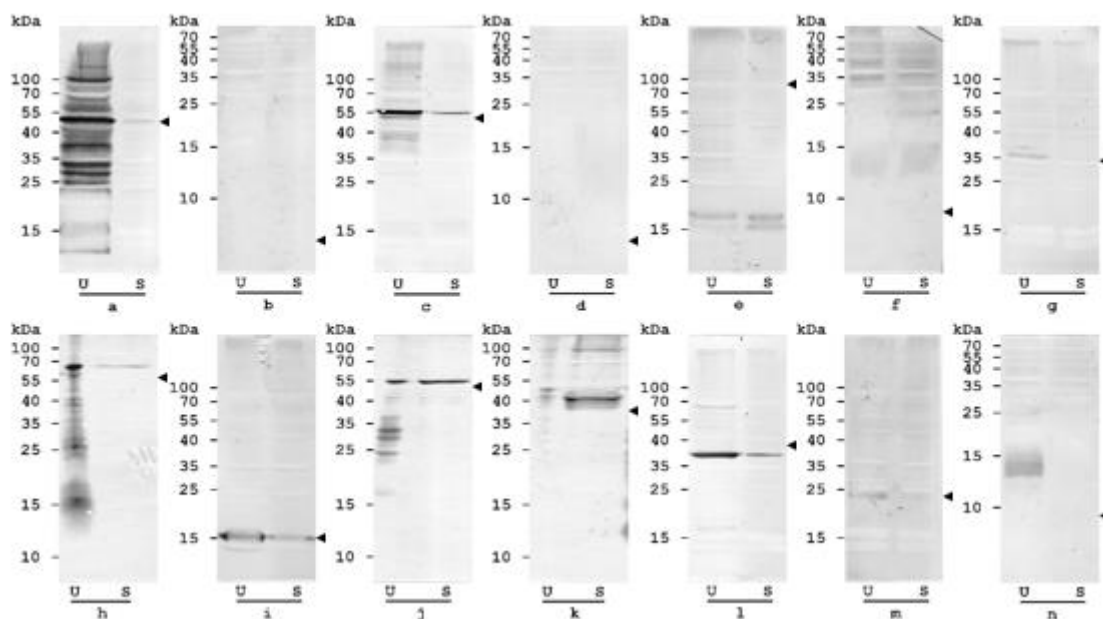




Slika 23: Posedanje izbranih bakterijskih proteinov MACPF in proteina Torso-like z multilamelarnimi vezikli (MLV) v polju centrifugalne sile. Imunodetekcija po prenosu western. *Cel*, celokupna količina proteina, uporabljenega v poskusu; *U* in *S*, usedlina in supernatant po centrifugiranju (60000 g, 1 h, 4 °C); *a-l*, oznake proteinov iz pregl. 11. MLV smo pripravili iz celokupnih lipidov govejih eritrocitnih membran s koncentracijo fosfolipidov ~ 2 mg/ml. Puščice označujejo predvidene pozicije proteinov.

Figure 23: Sedimentation of selected bacterial MACPF proteins and Tosro-like protein with multilamellar vesicles (MLV) with centrifugation. Immunodetection after Western blot. *Cel*, the total amount of protein used in the experiment; *U* and *S*, pellet and supernatant, respectively, after centrifugation (60,000 g, 1 h, 4 °C); *a-l*, protein marks from tab. 11. MLV were prepared from the total lipid extract of bovine red blood cell membranes. The concentration of phospholipids in MLV was ~ 2 mg/ml. The arrows indicate the expected positions of the proteins.

Sodeč po poskusu posedanja z MLV, se na vezikle iz lipidov govejih eritrocitnih membran vežejo proteini *a*, *c*, *h* in *l*, ter v manjši meri tudi protein *j*, medtem ko je protein *k* prisoten le v supernatantu. Ker metoda ni primerna za proteine, ki radi agregirajo ali tvorijo večje komplekse, ki se posedejo v polju centrifugalne sile neodvisno od vezave na vezikle, smo naredili poskus posedanja proteinov v odsotnosti veziklov (sl. 24).



Slika 24: Kontrola posedanja izbranih bakterijskih proteinov MACPF in proteina Torso-like ter njihovih krajših konstruktov brez veziklov v polju centrifugalne sile. Imunodetekcija po prenosu western. *U* in *S*, usedlina in supernatant po centrifugiranju (10000 g, 15 min, 4 °C); *a-n*, oznake proteinov iz pregl. 11. Puščice označujejo predvidene pozicije proteinov.

Figure 24: Control of sedimentation of selected bacterial MACPF proteins, Torso-like protein, and their shorter constructs without vesicles after centrifugation. Immunodetection after Western blot. *U* and *S*, pellet and supernatant, respectively, after centrifugation (10,000 g, 15 min, 4 °C); *a-n*, protein marks from tab. 11. The arrows indicate the expected positions of the proteins.

Kontrolni poskus posedanja izbranih proteinov MACPF je pokazal, da je v vseh primerih dobršen del proteina, v večini primerov več kot pol ali pa kar ves, prisoten v usedlini po centrifugiranju. To kaže na agregacijo proteinov, zaradi česar metoda posedanja z MLV ni primerna za študij interakcij izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami.

#### 4.1.2.5 Afinitetna ločba s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami

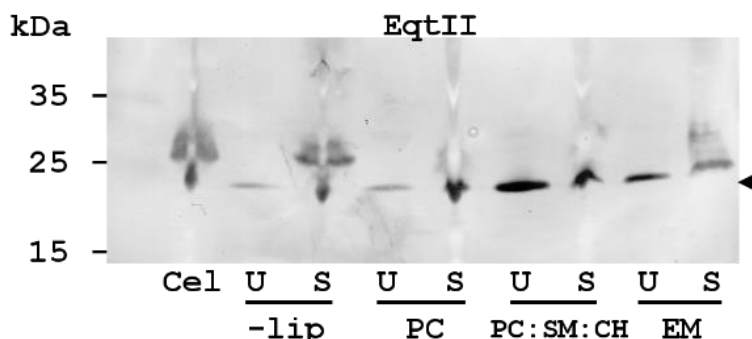
V nadaljevanju smo za preučevanje interakcij proteinov MACPF z lipidnimi membranami uporabili metodo afinitetne ločbe proteinov vezanih na biotinizirane vezikle s pomočjo magnetnih kroglic, označenih s streptavidinom (poglavje 3.2.7.2). Ta metoda je za razliko od prejšnje uporabna tudi za proteine, ki agregirajo. Ti se posedejo na dno mikropruvete ali pa so s preostalimi snovmi, ki se ne vežejo na liposome, v supernatantu. Tega lahko učinkovito ločimo od usedline, kjer so magnetne kroglice z liposomi in proteini, ki so se vezali na liposome in/ali magnetne kroglice. V bližini magneta je usedlina na steni mikropruvete, ki jo lahko nato še večkrat speremo s pufrom, da odstranimo snovi, ki so se nespecifično vezale na liposome in/ali magnetne kroglice.

Poskus smo izvedli bodisi tako, da smo *i*) proteine najprej sintetizirali čez noč s sistemom IVTT, jih nato inkubirali z liposomi, nazadnje pa to mešanico dodali k magnetnim

kroglicam; *ii*) liposome dodali ob začetku sinteze v reakcijsko mešanico IVTT in nato celotno mešanico dodali k magnetnim kroglicam.

#### 4.1.2.5.1 Dodatek liposomov po sintezi

Za kontrolo sistema smo sprva uporabili LLO, za katerega smo ugotovili, da se nespecifično veže na magnetne kroglice (neprikazani rezultati). Zato smo namesto LLO za kontrolo sistema uporabili EqtII, za katerega so pokazali, da se veže na lipidne membrane, če te vsebujejo sfingomielin (Bonev in sod., 2003; Bakrač in sod., 2008). EqtII smo sintetizirali s sistemom IVTT in ga nato inkubirali z *i*) LUV, ki smo jih pripravili iz sintetičnih lipidov POPC, SM in CHOL; *ii*) samo iz POPC; *iii*) z MLV, ki smo jih pripravili iz eritrocitnih membran (EM); *iv*) s pufrom PBS (kontrola poskusa). V membrane veziklov smo vstavili majhen delež biotiniliranega fosfatidiletanolamina (BC-PE). Sintetične lipide POPC, SM in CHOL smo zmešali v podobnem razmerju kakor je razmerje med njimi v membranah eritrocitov (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2) (Virtanen in sod., 1998). Mešanico proteina in veziklov (oziroma pufru PBS pri kontroli) smo nato inkubirali z magnetnimi kroglicami in s pomočjo magneta ločili usedlino od supernatanta in frakcij po spiranju. Iz sl. 25 je razvidno, da je EqtII precej več v usedlini z liposomi iz poskusa *i*) in *iii*) v primerjavi s poskusom *ii*) in kontrolo, kar potrjuje odvisnost vezave EqtII na lipidne membrane od vsebnosti sfingomielina in s tem uporabnost sistema za preučevanje interakcij med proteini in lipidnimi membranami.

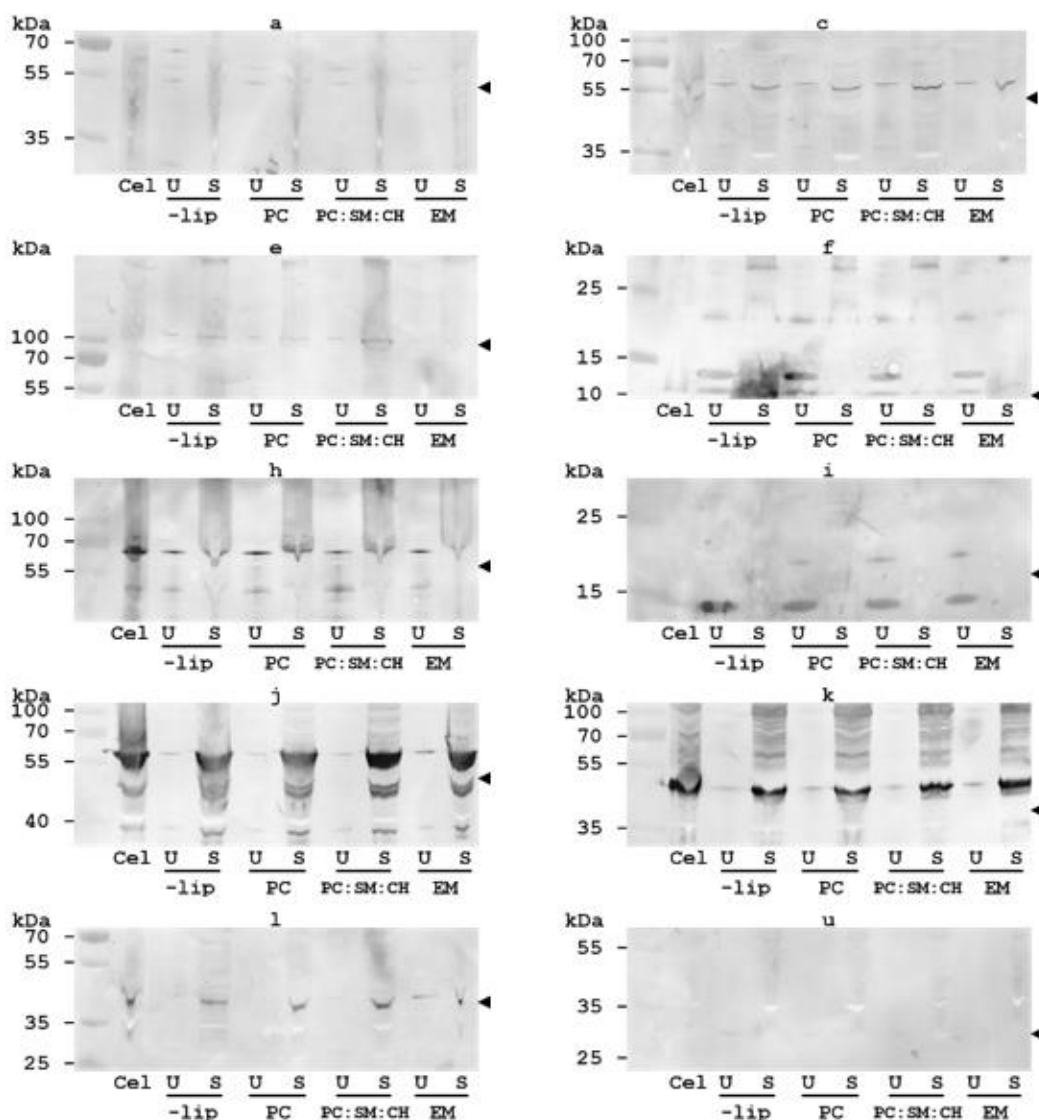


Slika 25: Vezava ekvinatoksina II (EqII) na liposome, ki smo jih dodali po sintezi s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije. Kontrola sistema preučevanja interakcij med proteini in lipidnimi membranami z afinitetno ločbo s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami. Imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *Cel*, celokupna količina proteina, uporabljenega v poskusu; *U* in *S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; *-lip*, kontrola poskusa brez dodanih liposomov; *PC*, veliki unilamelarni vezikli (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM:CH*, LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2; *EM*, multilamelarni vezikli iz govejih eritrocitnih membran. Vsa lipidna razmerja so v mol/mol. Koncentracija fosfolipidov izhodnih liposomov je bila naslednja: *PC*,  $\sim$  1 mg/ml, *PC:SM:CH*,  $\sim$  0,5 mg/ml in *EM*,  $\sim$  1,1 mg/ml. Puščica označuje predvideno pozicijo proteina.

Figure 25: Equinatoxin II (EqII) binding to liposomes, which were added after the synthesis with *in vitro* transcription-translation system. Control of the system for studying interactions of proteins with lipid membranes by an affinity separation with streptavidin-labelled magnetic beads. Immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *Cel*, the total amount of protein used in the experiment; *U* and *S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet; *-lip*, a control of the experiment without liposomes added; *PC*, large unilamellar vesicles (LUV)-POPC:BC-

PE  $\approx$  50:1; PC:SM:CH, LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2; EM, multilamellar vesicles from bovine erythrocyte membranes. All lipid ratios are in mol/mol. The concentration of phospholipids in the liposomes was as follows: PC,  $\sim$  1 mg/ml, PC:SM:CH,  $\sim$  0.5 mg/ml and EM,  $\sim$  1.1 mg/ml. The arrow indicates the expected position of the protein.

Z enakim poskusom, kot smo ga opisali za EqtII, smo preverili interakcije med lipidnimi vezikli in izbranimi proteini MACPF, ki smo jih uspeli sintetizirati s sistemom IVTT (sl. 21). Večjo intenziteto lis po imunodetekciji v usedlini z liposomi v primerjavi s kontrolo smo opazili pri proteinih *i*, *j* in *l* (oznake iz pregl. 11). Rezultati nakazujejo, da se je protein *i* oziroma C-terminalna domena proteina *h* iz bakterije *R. solanacearum* - domena Jacalin, vezal tako na preproste vezikle sestavljene samo iz POPC, kot tudi na take z bolj kompleksno lipidno sestavo (POPC:SM:CHOL in EM). Protein *j* iz bakterije *C. gleum* je prisoten v usedlini v vseh razmerah, vendar ga je več ob prisotnosti EM. Protein *l* oziroma protein Torso-like iz vinske mušice je v vseh razmerah, razen ob dodatku EM, samo v supernatantu (sl. 26).



Slika 26: Preučevanje interakcij med izbranimi proteini MACPF in liposomi, ki smo jih dodali po sintezi z *in vitro* transkripcijo-translacijo, z afinitetno ločbo z magnetnimi kroglicami označenimi s streptavidinom. Imunodetekcija po prenosu western. *a-u*, oznake proteinov iz pregl. 11; prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *Cel*, celokupna količina proteina, uporabljenega v poskusu; *U* in *S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; *-lip*, kontrola poskusa brez dodanih liposomov; *PC*, veliki unilamelarni vezikli (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM:CH*, LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2; *EM*, multilamelarni vezikli iz govejih eritrocitnih membran. Vsa lipidna razmerja so v mol/mol. Koncentracija fosfolipidov izhodnih liposomov je bila naslednja: *PC*,  $\sim$  1 mg/ml, *PC:SM:CH*,  $\sim$  0,5 mg/ml in *EM*,  $\sim$  1,1 mg/ml. Puščice označujejo predvidene pozicije proteinov.

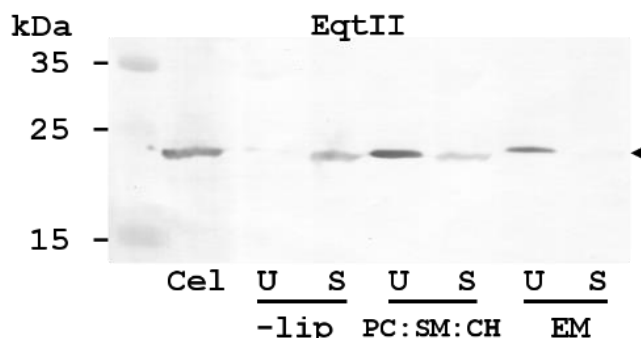
Figure 26: The study of the interactions of selected MACPF proteins with liposomes by affinity separation using streptavidin-labelled magnetic beads. Liposomes were added after the synthesis with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system. Immunodetection after Western blot. *a-u*, protein marks from tab. 11; first column, molecular weight size marker in kDa; *Cel*, the total amount of protein used in the experiment; *U*, pellet, and *S* supernatant after affinity separation with a magnet; *-lip*, a control of the experiment without liposomes added; *PC*, large unilamellar vesicles (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM:CH*, LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2; *EM*, multilamellar vesicles from bovine erythrocyte membranes. All lipid ratios are in mol/mol. The concentration of phospholipids in the liposomes was as follows: *PC*,  $\sim$  1 mg/ml, *PC:SM:CH*,  $\sim$  0.5 mg/ml and *EM*,  $\sim$  1.1 mg/ml. The arrows indicate the expected positions of the proteins.

#### 4.1.2.5.2 Dodatek liposomov ob začetku sinteze

Pri tej različici preučevanja interakcij proteinov z lipidnimi membranami s pomočjo afinitetne ločbe z magnetnimi kroglicami smo preverjali učinek prisotnosti liposomov ob začetku sinteze proteinov na intenziteto interakcije z lipidnimi vezikli. Proteine smo sintetizirali s sistemom IVTT enako kot prej, le da smo pri pripravi reakcijske mešanice vodo nadomestili z *i*) LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE, *ii*) LUV-POPC:BC-PE, *iii*) MLV-EM:BC-PE, *iv*) pufrom PBS (kontrola poskusa). Reakcijsko mešanico IVTT smo nato inkubirali z magnetnimi kroglicami, označenimi s streptavidinom in s pomočjo magneta ločili usedlino od supernatanta in frakcij po spiranju.

Poleg EqtII, ki nam je zopet rabil za kontrolo, smo poskus izvedli še s proteinoma z oznako *j* in *l*, s konstruktom *u*, ter s krajšima fragmentoma proteina *l* (Tsl) *m* (domena MACPF) in *n* (N-terminalni del proteina).

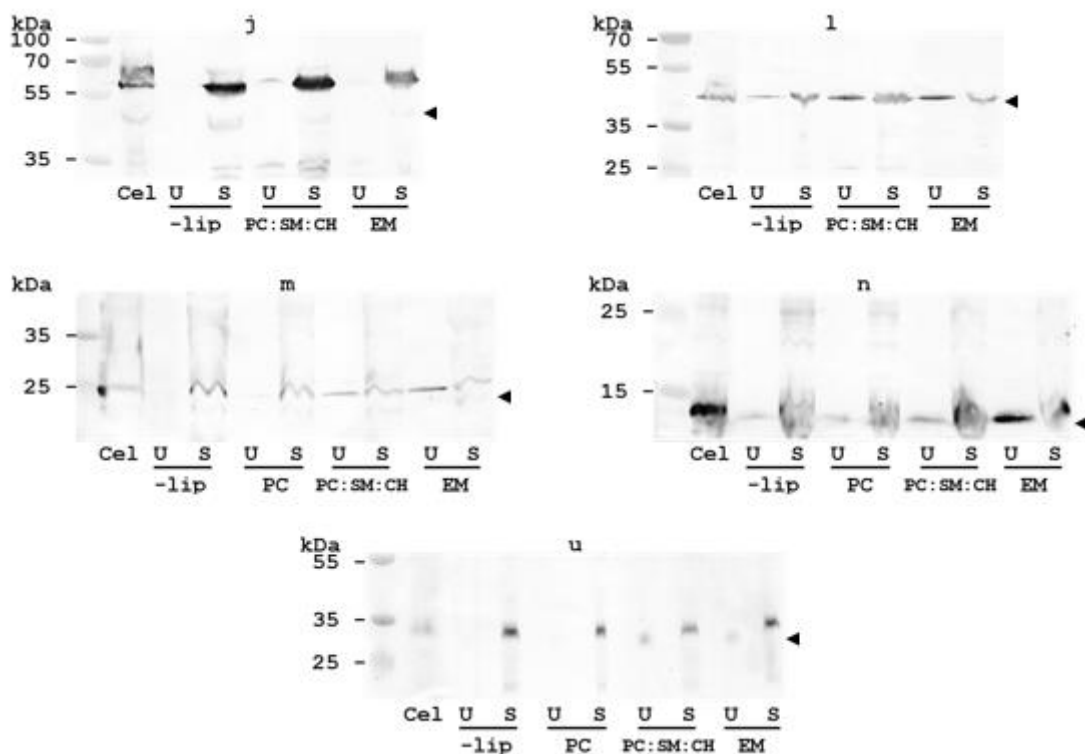
Za razliko od prejšnjega poskusa z EqtII, kjer smo liposome dodali po sintezi (sl. 25), je bil pri kontroli praktično ves EqtII v supernatantu. Nasprotno pa je bil v primeru, ko smo k reakcijski mešanici dodali MLV-EM, ves EqtII v usedlini. Največ EqtII smo izrazili ob dodatku LUV-POPC:SM:CH, na katere se je vezal skoraj ves protein (sl. 27).



Slika 27: Vezava ekvinatoksina II (EqtII) na liposome, ki smo jih dodali ob začetku sinteze s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT). Kontrola sistema preučevanja interakcij med proteini in lipidnimi membranami z afinitetno ločbo s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami. Imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *Cel*, celokupna količina proteina, uporabljenega v poskusu; *U* in *S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; - *lip*, kontrola poskusa brez dodanih veziklov; *PC:SM:CH*, veliki unilamelarni vezikli iz POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol)); *EM*, multilamelarni vezikli iz govejih eritrocitnih membran. Koncentracija fosfolipidov v liposomih v IVTT reakcijski mešanici je bila  $\sim$  0,35 mg/ml za *PC:SM:CH* in *EM*. Puščica označuje predvideno pozicijo proteina.

Figure 27: The study of equinatoxin II (EqtII) binding to liposomes by affinity separation with streptavidin-labelled magnetic beads. Liposomes were added at the beginning of the synthesis with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system. Immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *Cel*, the total amount of protein used in the experiment; *U* and *S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet; - *lip*, a control of the experiment without added vesicles; *PC:SM:CH*, large unilamellar vesicles (LUV)-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (mol/mol ratio)); *EM*, multilamellar vesicles from bovine erythrocyte membranes. The concentration of phospholipids in the liposomes in IVTT reaction was  $\sim$  0.35 mg/ml for *PC:SM:CH* and *EM*. The arrow indicates the expected position of the protein.

Protein *j* je, podobno kakor prej (sl. 26), v usedlini z MLV-EM, ter še posebej v usedlini z LUV-POPC:SM:CHOL, medtem ko smo ga pri kontroli zaznali samo v supernatantu (sl. 28). Tsl (*l*) smo našli v usedlini v vseh razmerah, vendar ga je več v usedlinah veziklov kompleksne lipidne sestave. Domena MAPCF proteina Tsl (*m*) je podobno kakor zrel protein Tsl samo v usedlini z LUV-POPC:SM:CHOL in MLV-EM, medtem ko je v usedlini LUV-POPC v zelo nizkih količinah, v usedlini kontrole brez veziklov pa je ni. Problem detekcije okoli 10-15 kDa proteinov s Penta-His mAb pri tej metodi je nespecifična vezava protiteles na ~ 10-15 kDa protein iz magnetnih kroglic (glej ~ 10-15 kDa liso pri proteinih z oznako *f* in *i* na sliki 26). N-terminalni del proteina Tsl (*n*) po ločbi z NaDS-PAGE prepotuje enako razdaljo kot protein iz magnetnih kroglic, zato z imunodetekcijo s Penta-His mAb po prenosu western ne moremo ločiti med enim in drugim proteinom. Vseeno pa lahko s primerjanjem intenzitete lis usedlin sklepamo, da se *n* najbolj intenzivno veže na MLV-EM in nekoliko bolj intenzivno še na LUV-POPC:SM:CHOL v primerjavi s kontrolama brez veziklov in LUV-POPC. Domena APC-β apikompleksnega proteina PfPLP4, *u*, se veže na liposome kompleksne lipidne sestave.



Slika 28: Preučevanje vezave izbranih proteinov MAPCF na liposome, ki smo jih dodali ob začetku sinteze s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) z afinitetno ločbo s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami. Imunodetekcija po prenosu western. *j-u*, oznake proteinov iz pregl. 11; prvi stolpec, označevalec molekularnih mas v kDa; *Cel*, celokupna količina proteina, uporabljenega v poskusu; *U in S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; *-lip*, kontrola poskusa brez dodanih veziklov; *PC*, veliki unilamelarni vezikli (LUV)-POPC:BC-PE ≈ 50:1; *PC:SM:CH*, LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE ≈ 27:21:50:2; *EM*, MLV iz govejih eritrocitnih membran. Vsa lipidna razmerja

so v mol/mol. Koncentracija fosfolipidov v liposomih v reakcijski mešanici IVTT je bila ~0,8 mg/ml za PC, ter ~ 0,35 mg/ml za PC:SM:CH in EM. Puščice označujejo predvidene pozicije proteinov.

Figure 28: The study of the interactions of selected MACPF proteins with liposomes by affinity separation with streptavidin-labelled magnetic beads. Liposomes were added at the beginning of the synthesis with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system. Immunodetection after Western blot. *j-u*, protein marks from tab. 11; first column, molecular weight size marker in kDa; *Cel*, the total amount of protein used in the experiment; *U*, pellet, and *S*, supernatant after affinity separation with a magnet; *- lip*, a control of the experiment without added vesicles; *PC*, large unilamellar vesicles (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM:CH*, LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2; *EM*, MLV from bovine erythrocyte membranes. All lipid ratios are in mol/mol. The concentration of phospholipids in the liposomes in the IVTT reaction was as follows: PC, ~ 0.8 mg/ml and ~ 0.35 mg/ml for PC:SM:CH and EM. The arrows indicate the expected positions of the proteins.

### 4.1.3 Protein Torso-like

Protein Torso-like (Tsl) je eden izmed najmanjših znanih proteinov MACPF. Večino proteina predstavlja domena MACPF, poleg te pa protein vsebuje še N-terminalno regijo s signalnim peptidom (sl. 29).



Slika 29: Domenska arhitektura proteina Torso-like. *Modro*, signalni peptid; *rdeče*, domena MACPF.

Figure 29: Domain architecture of the Torso-like protein. *Blue*, signal peptide; *red*, MACPF domain.

Tsl je vpleten v razvoj terminalnih struktur zarodka in kasneje v razvoju vinske mušice, vendar molekularni mehanizem njegovega delovanja še ni pojasnjen (Stevens in sod., 1990; Grillo in sod., 2012). Z namenom, da bi osvetlili vlogo Tsl v razvoju, smo v nadaljnjih poskusih preučevali mehanizem interakcije Tsl z lipidnimi membranami. Ta je zanimiv tudi zaradi preučevanja pomena domene MACPF pri interakcijah z membranami. Do zdaj opisani proteini MACPF za vezavo na membrano potrebujejo dodatne domene, kot je npr. domena C2 pri perforinu (Voskoboinik in sod., 2005), ali pa dodatne proteine, kot je npr. OlyA v primeru PlyB (Ota in sod., 2013). Glede na rezultate vezave Tsl na liposome (poglavje 4.1.2.5) in raziskav Stevens in sod. (2003), kjer so opazili, da se Tsl veže na hidrofobno vitelinsko membrano na notranjem sloju jajčne lupine, se Tsl očitno povezuje z membranami na drugačen način kakor do zdaj opisani proteini MACPF

#### 4.1.3.1 Izražanje Tsl

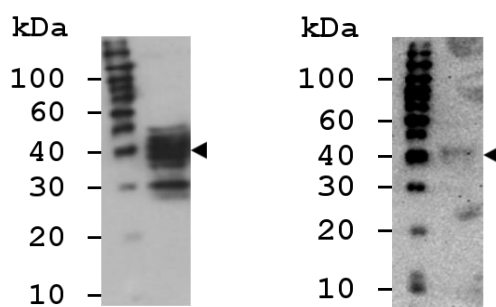
Zrelo obliko proteina Tsl smo izražali v brezceličnem sistemu sinteze z *in vitro* transkripcijo-translacijo in v sesalskih celicah. Sistem IVTT, ki smo ga uporabljali za izražanje proteinov MACPF, smo pridobili iz lizata bakterij *E. coli*, zato ni najbolj primeren za izražanje evkariontskih proteinov, saj ne omogoča posttranslacijskih modifikacij proteinov kot sta nastanek disulfidnih mostičkov in glikozilacija. Poleg tega IVTT ne vsebuje molekularnih šaperonov, ki pomagajo pri pravilnem zvijanju nastajajočega proteina. Tsl vsebuje en cistein, s katerim bi lahko tvoril intermolekularni



disulfidni mostiček, in šest asparaginov, preko katerih bi se lahko pritrtili glikani. V študiji identifikacije N-glikozilacije proteinov iz centralnega živčnega sistema vinske mušice *D. melanogaster* so Koles in sod. (2007) ugotovili, da je Tsl N-glikoziliran preko asparagina na mestu 246.

#### 4.1.3.1.1 Izražanje Tsl v sesalskih celicah

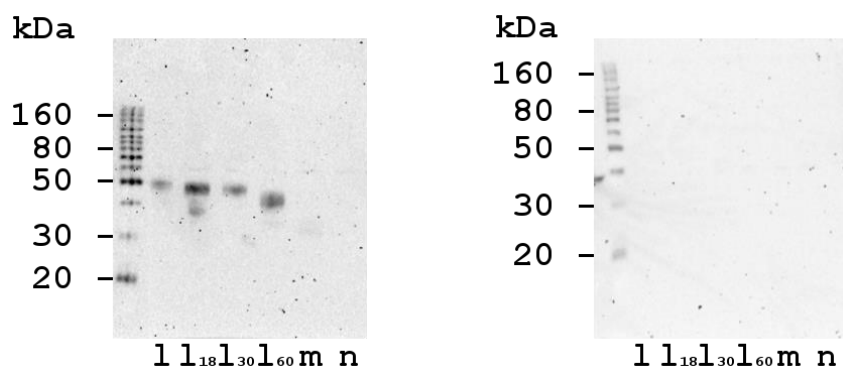
Tsl smo poskusili sintetizirati v človeških embrionalnih ledvičnih celicah HEK293T s prehodnim izražanjem gena *tsl* v vektorju pHLsec (poglavje 3.2.2.2). S tem ekspresijskim sistemom in vektorjem so kolegi iz raziskovalne skupine prof. dr. Roberta Gilberta iz Oxforda uspešno izrazili nekatere druge proteine MACPF. Po izražanju v majhnem obsegu smo nivo ekspresije Tsl preverili z imunodetekcijo po prenosu western (sl. 30). Večji del proteina je bil znotraj celic, majhna količina pa se je izločila v medij. To namiguje, da se je del proteina sintetiziral v pravilno zvito obliko, saj naj bi sekrecija zagotavljala optimalno okolje za zvitje in/ali stabilnost proteina.



Slika 30: Izražanje zrelega proteina Torso-like (Tsl) s heksahistidinsko oznako v celicah HEK293T v majhnem obsegu s prehodnim izražanjem gena *tsl* v pHLsec vektorju. Imunodetekcija po prenosu western. *Levo*, celice in *desno*, medij po ekspresiji. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa. Kemiluminiscentni signal smo detektirali s pomočjo fotografskega filma. S puščico so označene predvidene pozicije Tsl.

Figure 30: Small-scale expression of mature Torso-like (Tsl) with hexahistidine tag in HEK293T cells with transient expression of *tsl* gene in pHLsec plasmid. Immunodetection after Western blot. *Left*, cells and *right*, medium after expression. The first column, molecular weight size marker in kDa. Chemiluminescent signal was detected with photographic film. The arrow indicates the expected position of the expressed Tsl.

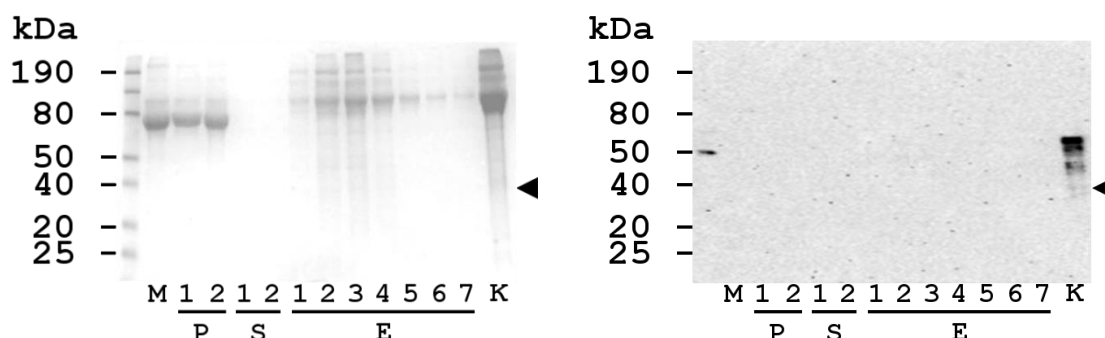
Za optimizacijo ekspresije smo pripravili različico gena *tsl* ter 5 krajših *tsl* konstruktov z zapisom za 8 histidinov, ki smo jih klonirali v vektor pHLsec (pregl. 4 in 8). Nivo ekspresije v majhnem obsegu je bil podoben ali manjši kakor v primeru Tsl s heksahistidinsko oznako (sl. 31).



Slika 31: Izražanje Torso-like (Tsl) konstruktov z oktahistidinsko oznako v HEK293T v majhnem obsegu s prehodnim izražanjem konstruktov gena *tsl* v pHLsec vektorju. Imunodetekcija po prenosu western. *Levo*, celice in *desno*, medij po ekspresiji. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa. Črkovne oznake pod grafom so iz pregl. 11 - *l*, zrel Tsl; *m*, domena MACPF proteina Tsl; *n*, N-terminalni konec proteina Tsl. Številke v podpisnem načinu kažejo, za koliko aminokislin z N-terminalnega konca je krajši končni proteinski konstrukt (-18, -30 in -60 AK). Kemiluminiscentni signal smo zaznali s pomočjo digitalnega sistema za zajem slik.

Figure 31: Small-scale expression of Torso-like (Tsl) constructs with octahistidine tag in HEK293T cells with transient expression of *tsl* gene in pHLsec plasmid. Immunodetection after Western blot. *Left*, cells and *right*, medium after expression. The first column, molecular weight size marker in kDa. The letter marks below the fig. are from tab. 11 - *l*, mature Tsl; *m*, Tsl MACPF domain; *n*, N-terminal region of Tsl. The numbers in the subscript mode denote for how many amino acids from the N-terminus the construct is shorter than the mature Tsl. Chemiluminescent signal was detected with photographic film.

Nivoja ekspresije nam z dodatnimi konstrukti ni uspelo izboljšati, zato smo ekspresijo v večjem obsegu izvedli s prvotnim, zrelem proteinom Tsl s heksahistidinsko oznako. Po gojenju smo Tsl iz gojišča izolirali s pomočjo IMAC kromatografije in ovrednotili nivo sintetiziranega proteina z NaDS-PAGE in prenosom western (sl. 32). Na kolono se je nespecifično vezal okoli 70 kDa velik protein, najverjetneje goveji serumski albumin, ki ga je v gojišču celičnih kultur največ. Lisa, ki ustreza položaju Tsl, je zelo šibka. Sintezo Tsl smo sicer uspeli potrditi s prenosom western, vendar je bila ta izredno šibka, saj smo protein zaznali zgolj v koncentratu zbranih eluiranih frakcij po ultrafiltraciji.



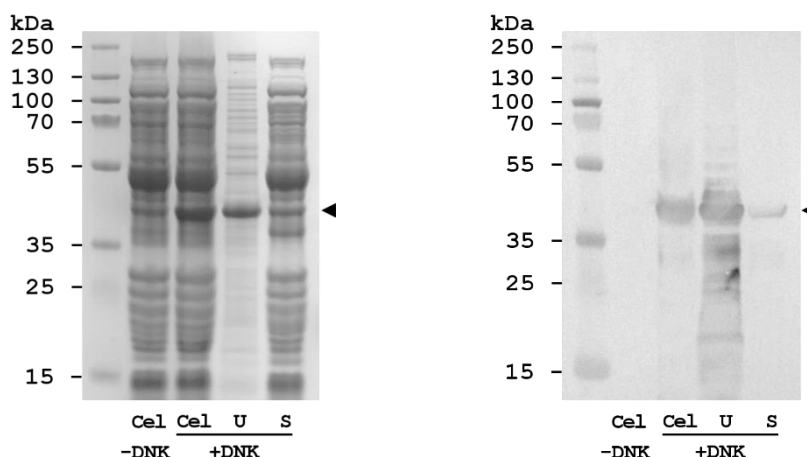
Slika 32: Izražanje zrelega proteina Torso-like (Tsl) s heksahistidinsko oznako v HEK293T v večjem obsegu s prehodnim izražanjem gena *tsl* v pHLsec vektorju. *Levo*, NaDS-PAGE; *desno*, imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *M*, medij celične kulture; *P*, pretočne frakcije medija celičnih kultur po izstopu iz IMAC kolone; *S*, frakcije po spiranju s pufrom za spiranje; *E*, frakcije po spiranju z elucijskim pufrom; *K*, koncentrat zbranih eluiranih frakcij po ultrafiltraciji.

Kemiluminiscentni signal smo detektirali s pomočjo fotografskega filma. S puščico je označena predvidena pozicija Tsl proteina.

Figure 32: Large-scale expression of mature Torso-like (Tsl) with hexahistidine tag in HEK293T cells with transient expression of *tsl* gene in pHLsec plasmid. *Left*, SDS-PAGE; *right*, immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *M*, cell culture medium; *P*, flow-through fractions; *S*, wash fractions; *E*, elution fractions from the IMAC column; *K*, combined elution fractions and concentrated by ultrafiltration. Chemiluminescent signal was detected with photographic film. The arrow indicates the expected position of the expressed proteins.

#### 4.1.3.1.2 Izražanje Tsl z *in vitro* transkripcijo-translacijo

Kljub pomanjkljivostim sistema IVTT iz lizata *E. coli* za produkcijo evkariontskih proteinov smo uspeli sintetizirati več topnega Tsl proteina kakor v sesalskih celicah v ~ 1000 x manjših volumnih. Proteinsko liso, ki ustreza velikosti proteina Tsl, smo opazili že po barvanju NaDS-PAGE gela s Commassie modrim barvilom. Da gre za protein Tsl, smo potrdili z imunodetekcijo po prenosu western. Večina Tsl tvori agregate, ki se posedejo po centrifugiranju (sl. 24 in 33).



Slika 33: Analiza sinteze proteina Torso-like (Tsl) s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT). *Levo*, NaDS-PAGE; *desno*, prenos western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *Cel*, celotna reakcijska mešanica IVTT; *U in S*, usedlina in supernatant celotne reakcijske mešanice IVTT po centrifugiranju (1 min, 13200 vrt./min); *-DNK*, reakcijska mešanica IVTT brez dodatka plazmidne DNK z genom za Tsl; *+DNK*, reakcijska mešanica IVTT z dodatkom plazmida pET8c z vstavljenim genom za Tsl. Puščica označuje predvideno pozicijo proteina Tsl.

Figure 33: Analysis of Tsl expression with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system. *Left*, SDS-PAGE; *right*, Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *Cel*, total IVTT reaction mixture; *U and S*, pellet the supernatant, respectively, after centrifugation (1 min, 13.200 rpm); *-DNK*, IVTT reaction mixture without plasmid DNA for Tsl expression; *+DNK*, IVTT reaction mixture with pET8c plasmid with inserted gene for Tsl. The arrow indicates the expected position of the expressed Tsl.

Pri preučevanju interakcij proteina Tsl z lipidnimi membranami s pomočjo afinitetne ločbe z magnetnimi kroglicami smo opazili, da je stopnja vezave Tsl na lipidne membrane večja, če liposome dodamo ob začetku sinteze (sl. 34 in poglavji 4.1.2.5.1 in 4.1.2.5.2).



Slika 34: Vpliv dodatka majhnih unilamelarnih veziklov (SUV) po koncu ali ob začetku sinteze s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) na stopnjo vezave proteina Torso-like (Tsl) na vezikle. Imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *U* in *S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom. Brez (-lip) in z (+SUV) dodatkom SUV k IVTT reakcijski mešanici po sintezi (t≈12h) ali ob začetku sinteze (t=0). SUV so bili sestavljeni iz mešanice sintetičnih lipidov POPC:SM:CHOL:BC-PE v razmerju 27:21:50:2 (mol/mol)). Koncentracija fosfolipidov v SUV v reakcijski mešanici IVTT je bila ~ 0,14 mg/ml. Puščica označuje predvideno pozicijo proteina Tsl.

Figure 34: The impact of addition of small unilamellar vesicles (SUV) after or at the beginning of the synthesis with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system on the expression levels of Torso-like protein (Tsl) and on the degree of Tsl binding to the vesicles. Immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *U* and *S*, pellet the supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet. Without (-lip) and with (+SUV) the addition of SUV to the IVTT reaction mixture after synthesis (t≈12h) or at the beginning of the synthesis of (t = 0). SUV were composed of a mixture of synthetic lipids POPC:SM:CHOL:BC-PE in molar ratio 27:21:50:2. The concentration of phospholipids in SUV in the IVTT reaction mixture was ~ 0.14 mg/ml. The arrow indicates the expected position of the expressed Tsl.

#### 4.1.3.2 Odvisnost velikosti in količine liposomov na vezavo s Tsl

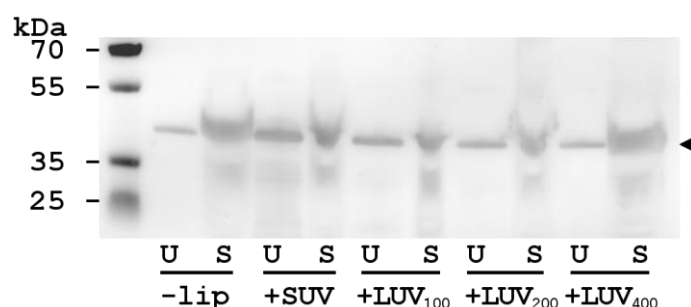
Afinitetno ločbo s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami smo v nadaljnjih korakih uporabili za opis narave interakcije Tsl z lipidnimi membranami. Najprej smo preučili vpliv velikosti liposomov na vezavo s Tsl. Iz MLV, ki smo jih pripravili iz mešanice sintetičnih lipidov (POPC:SM:CHOL:BC-PE ≈ 27:21:50:2 (razmerje mol/mol)), smo s sonikacijo pripravili SUV s premerom ~ 90 nm, z ekstruzijo skozi membrane z velikostjo por 100, 200 in 400 nm pa smo pripravili LUV s premerom ~ 150, 170 in 450 nm (velikosti premera so povprečne vrednosti intenzitete treh neodvisnih poskusov, ki smo jih pomerili z DLS (poglavje 3.2.7.4). Glej pregl. 13 za podrobnosti).

Preglednica 13: Velikost (premer) liposomov, ki smo jo pomerili z dinamičnim sipanjem svetlobe. Majhne unilamelarne vezikle (SUV) smo pripravili s sonikacijo, velike unilamelarne vezikle (LUV) pa smo ekstrudirali skozi membrane z velikostjo por 100, 200 in 400 nm. Velikosti premera liposomov so izražene s povprečjem intenzitete signala ( $I_{povp}$ ), iz katere program izračuna relativno količino posameznih velikostnih razredov snovi v raztopini glede na njihovo število ( $N_{povp}$ ) in volumen ( $V_{povp}$ ). PdI, (ang. polydispersity index) merilo razpršenosti velikostne porazdelitve.  $N = 3$ .

Table 13: Size (diameter) of liposomes measured with the dynamic light scattering. Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared with sonication and large unilamellar vesicles (LUV) were extruded through membranes with 100, 200 and 400 nm pores.  $N_{mean}$ ,  $I_{mean}$  and  $V_{mean}$  are mean number, intensity and volume of samples, respectively; PdI, polydispersity index.  $N=3$

Vzorec	$I_{povp}$	$N_{povp}$	$V_{povp}$	PdI
SUV	$89 \pm 8$	$46 \pm 7$	$63 \pm 9$	$0,14 \pm 0,02$
LUV <sub>100</sub>	$151 \pm 4$	$107 \pm 3$	$140 \pm 4$	$0,08 \pm 0,02$
LUV <sub>200</sub>	$171 \pm 7$	$124 \pm 10$	$166 \pm 9$	$0,1 \pm 0,04$
LUV <sub>400</sub>	$455 \pm 153$	$114 \pm 47$	$1814 \pm 1158$	$0,27 \pm 0,06$

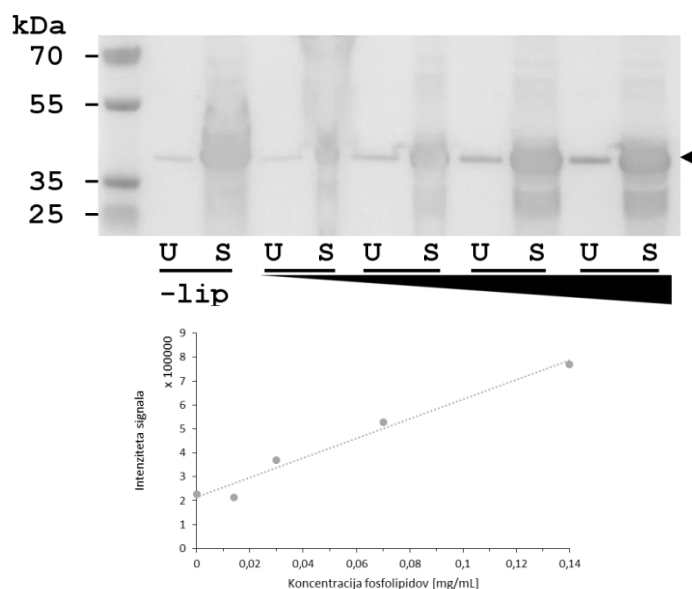
Vezikle smo dodali k reakcijski mešanici IVTT ob začetku sinteze in z imunodetekcijo po prenosu western analizirali količino Tsl v usedlini in supernatantu po afinitetni ločbi z magnetnimi kroglicami. Rezultati nakazujejo, da je stopnja vezava Tsl večja v primeru najmanjših liposomov (SUV) (sl. 35).



Slika 35: Vezava proteina Torso-like (Tsl) na liposome v odvisnosti od njihove velikosti. *Levo*, imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *U in S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom. Brez (*-lip*) in z (*+SUV/LUV*) (SUV, majhni unilamelarni vezikli; LUV, veliki unilamelarni vezikli) dodatkom liposomov različnih velikosti k reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) ob začetku sinteze. Puščica označuje predvideno pozicijo proteina Tsl. *Desno*, graf, ki prikazuje povprečno relativno količino Tsl in standardni odklon v usedlini ob dodatku liposomov v primerjavi s kontrolo (pufer PBS) ( $N=2$ ). Liposomi so bili sestavljeni iz mešanice sintetičnih lipidov POPC:SM:CHOL:BC-PE v razmerju 27:21:50:2 (mol/mol)). Koncentracija fosfolipidov v liposomih v IVTT reakcijski mešanici je bila  $\sim 0,24 \pm 0,02$  mg/ml.

Figure 35: Binding of a Torso-like protein (Tsl) to the liposomes as a function of their size. *Left*, immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *U and S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet. Without (*-lip*) and with (*+SUV/LUV*) (SUV, small unilamellar vesicles; LUV, large unilamellar vesicles) the addition of liposomes of various sizes to the *in vitro* transcription-translation (IVTT) reaction mixture at the beginning of the synthesis. The arrow indicates the expected position of the expressed Tsl. *Right*, fold increase of Tsl amount in pellets of liposomes compared to control (PBS buffer). Liposomes were composed of a mixture of synthetic lipids POPC:SM:CHOL:BC-PE in a molar ratio of 27:21:50:2. The concentration of phospholipids in liposomes in the IVTT reaction mixture was  $\sim 0.24 \pm 0.02$  mg/ml.

S podobnim poskusom smo preverili še vpliv količine veziklov na vezavo s Tsl. SUV smo serijsko redčili in dodali k začetku reakcije IVTT. Iz intenzitet lis v usedlini po afinitetni ločbi s streptavidinom označenimi kroglicami je razvidno, da je vezava Tsl na liposome proporcionalna količini liposomov (sl. 36).



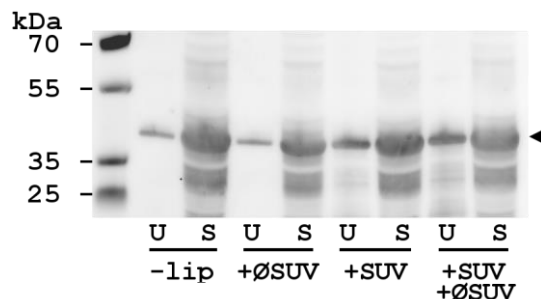
Slika 36: Vezava proteina Torso-like (Tsl) na liposome v odvisnosti od njihove koncentracije. *Levo*, Imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *U* in *S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; *-lip*, kontrola brez liposomov; količina majhnih unilamelarnih veziklov (SUV) (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol)) narašča od leve proti desni (koncentracija fosfolipidov v SUV v reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije od leve proti desni je bila: 0,014, 0,03, 0,07 in 0,14 mg/ml). Puščica označuje predvideno pozicijo proteina Tsl. *Desno*, graf odvisnosti intenzitete signala na liposome vezanega Tsl v odvisnosti od količine liposomov.

Figure 36: Binding of a Torso-like protein (Tsl) to the liposomes as a function of their concentration. *Left*, Immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *U* and *S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet; *-lip*, a control of the experiment without the addition of liposomes; concentration of small unilamellar vesicles SUV (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (mol/mol ratio)) increases from left to right (the concentration of phospholipids in SUV in the *in vitro* transcription-translation reaction mixture from left to right was: 0,014, 0,03, 0,07 and 0,14 mg/ml). The arrow indicates the expected position of the expressed Tsl. *Right*, dependence of signal intensities of liposome-bound Tsl on the amount of liposomes.

#### 4.1.3.3 Ireverzibilna in nespecifična vezava na lipidne membrane

Za oceno jakosti vezave Tsl na liposome smo izvedli prekonočno sintezo Tsl s sistemom IVTT v prisotnosti biotiniliranih SUV (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol)), nato pa mešanici po sintezi dodali prebitek ne-biotiniliranih SUV (POPC:SM:CHOL  $\approx$  27:22:51). Po polurni inkubaciji s stresanjem smo s pomočjo afinitetne ločbe s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami ločili usedlino od supernatanta in z imunodetekcijo po prenosu western analizirali frakcije. Intenziteta lise proteina Tsl v usedlini ob dodatku biotiniliranih SUV (+SUV) se ne zmanjša ob dodatku

večje količine ne-biotiniliranih SUV (+SUV+ ØSUV), kar kaže, da se Tsl stabilno veže na liposome (sl. 37).

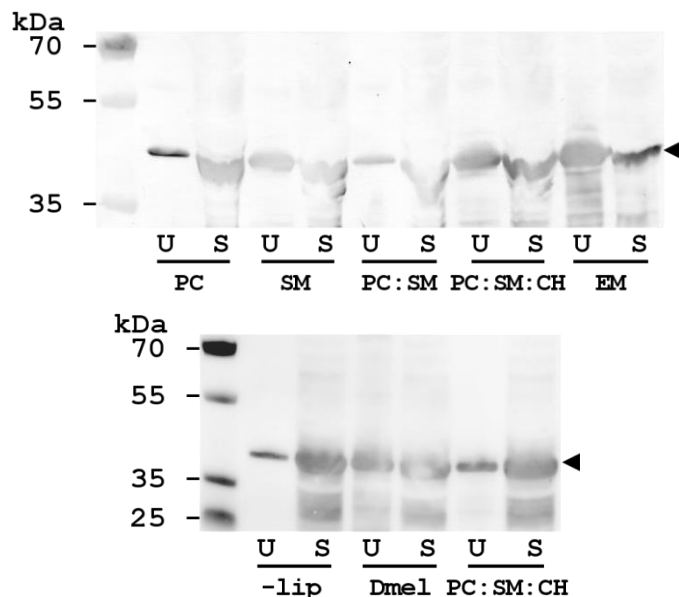


Slika 37: Ireverzibilna vezava proteina Torso-like (Tsl) z liposomi. Imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *U in S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; *-lip*, kontrola brez liposomov; +, dodatek biotiniliranih majhnih unilamelarnih veziklov (SUV) (+SUV) oziroma nebiotiniliranih SUV (+ØSUV) k reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT); *+SUV+ØSUV*, sinteza Tsl v prisotnosti biotiniliranih SUV in dodatek ne-biotiniliranih SUV naslednji dan po sintezi. SUV so bili sestavljeni iz mešanice sintetičnih lipidov (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol)). Koncentracija fosfolipidov v SUV v IVTT reakcijski mešanici je bila  $\sim$  0,8 mg/ml (+SUV) oziroma  $\sim$  0,85 mg/ml (+ØSUV). Končna koncentracija nebiotiniliranih SUV v presežku v vzorcu s TSL in biotiniliranimi SUV je bila  $\sim$  1,75 mg/ml (končna koncentracija biotiniliranih SUV v istem vzorcu pa  $\sim$  0,35 mg/ml). Puščica označuje predvideno pozicijo proteina Tsl.

Figure 37: Irreversible binding of Torso-like protein (Tsl) to liposomes. Immunodetection after Western blot The first column, molecular weight size marker in kDa; *U and S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet; *-lip*, a control of the experiment without the addition of small unilamellar vesicles (SUV); +, the addition of biotinylated SUV (+SUV) or non-biotinylated SUV (+ØSUV) to IVTT reaction mixture; *+SUV+ØSUV*, synthesis of TSL in the presence of biotinylated SUV and the addition of non-biotinylated SUV after synthesis. SUV were composed of a mixture of synthetic lipids (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (mol/mol ratio)). The concentration of phospholipids in SUV in the IVTT reaction mixture was  $\sim$  0.8 mg/ml (+SUV) and  $\sim$  0.85 mg/ml (+ØSUV). The final concentration of non-biotinylated SUV in the superabundance in the sample with Tsl and biotinylated SUV was  $\sim$  1.75 mg/ml (the final concentration of biotinylated SUV in the same sample was  $\sim$  0.35 mg/ml). The arrow indicates the expected position of the expressed Tsl.

Z uporabo afinitetne ločbe s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami smo preverili še lipidno specifičnost interakcije Tsl z liposomi. V ta namen smo pripravili liposome z različno lipidno sestavo, in sicer takšne, ki so vsebovali zgolj enega ali dva sintetična lipida in take, ki smo jih pripravili iz kompleksnih lipidnih mešanic. Pri slednjih smo poleg LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol), ki v grobem predstavljajo lipidno sestavo plazmaleme eritrocitov in MLV-EM iz eritrocitnih membran pripravili še liposome s podobno lipidno sestavo kakor v membranah embrija žuželke *Drosophila melanogaster*, a brez sfingolipidov (vinska mušica vsebuje v svojih membranah kompleksne glikosfingolipide in fosfoetanolamin ceramid za razliko od sfingomielina, ki ga najdemo v membranah sesalcev (Rietveld in sod., 1999) (PE:POPC:Ergosterol:PI:Ceramid:BC-PE  $\approx$  57,3:20:3,8:11,4:5,5:2 (razmerje mol/mol)) (PI, fosfatidilinozitol) (Guan in sod., 2013). Vezava je bila najnižja v primeru liposomov iz POPC in POPC:SM. Tsl je največ v usedlinah z liposomi iz SM in v tistih iz

kompleksnih lipidnih mešanic. Na te se je Tsl vezal s podobno intenziteto, kar kaže, da se Tsl veže na liposome nespecifično, neodvisno od lipidne sestave membran (sl. 38).



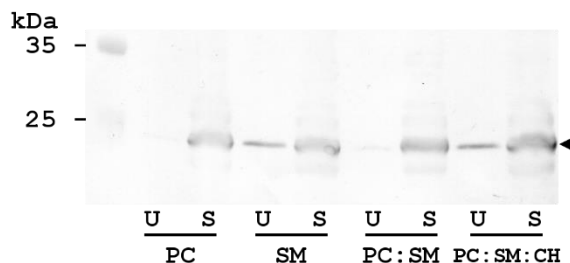
Slika 38: Vezava proteina Torso-like (Tsl) na liposome različnih lipidnih sestav. Imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec obeh sl., označevalec molekulskih mas v kDa; *U in S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; *-lip*, kontrola brez veziklov; *PC*, veliki unilamelarni vezikli (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *SM*, LUV-SM:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM*, LUV-POPC:SM:BC-PE  $\approx$  54:44:2; *PC:SM:CH*, LUV (sl. levo) oziroma SUV (majhni unilamelarni vezikli) (sl. desno) - POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2; *EM*, multilamelarni vezikli iz govejih eritrocitnih membran; *Dmel*, SUV s podobno lipidno sestavo kot v membranah embrija žuželke *Drosophila melanogaster*-PE:POPC:Ergosterol:PI:Ceramid:BC-PE  $\approx$  57,3:20:3,8:11,4:5,5:2. Vsa lipidna razmerja so v mol/mol. Koncentracije fosfolipidov v liposomih v reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije: POPC,  $\sim$  0,65 mg/ml; SM,  $\sim$  0,35 mg/ml; POPC:SM,  $\sim$  0,5 mg/ml; POPC:SM:CH, 0,1 mg/ml (levo) in 0,8 mg/ml (desno); EM,  $\sim$  0,25 mg/ml; Dmel,  $\sim$  0,45 mg/ml. Puščica označuje predvideno pozicijo proteina Tsl.

Figure 38: Binding of Torso-like protein (Tsl) to liposome with different lipid compositions. Immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *U and S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet; *-lip*, a control of the experiment without added vesicles; *PC*, large unilamellar vesicles (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *SM*, LUV-SM:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM*, LUV-POPC:SM:BC-PE  $\approx$  54:44:2; *PC:SM:CH*, LUV (fig. left) or SUV (small unilamellar vesicles) (fig. right) - POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2; *EM*, multilamellar vesicles from bovine erythrocyte membranes; *Dmel*, SUV composed of representative membrane lipids of *Drosophila melanogaster* embryo - PE:POPC:Ergosterol:PI:Ceramid:BC-PE  $\approx$  57.3:20:3.8:11.4:5.5:2. All lipid ratios are in mol/mol. The concentrations of phospholipids in the liposomes in the *in vitro* transcription-translation reaction mixture were as follows: PC,  $\sim$  0.65 mg/ml; SM,  $\sim$  0.35 mg/ml; PC: SM,  $\sim$  0.5 mg/ml; PC: SM: CH, 0.1 mg/ml (left) and 0.8 mg/ml (right); EM,  $\sim$  0.25 mg/ml; Dmel,  $\sim$  0.45 mg/ml. The arrows indicate the expected positions of the expressed Tsl.

Enak poskus, vendar z manjšim naborom liposomov različnih lipidnih sestav, smo izvedli še z domeno MACPF in N-terminalno regijo Tsl proteina (konstrukta *m in n* iz pregl. 11). Domena MACPF proteina Tsl se veže na liposome sestavljene samo iz SM ali mešanice POPC:SM:CHOL, ne pa na liposome sestavljene samo iz POPC ali POPC:SM (sl. 28 in 39).



Zaradi navzkrižne reaktivnosti protiteles, ki smo jih uporabljali pri imunodetekciji, s proteinom, ki ga vsebujejo magnetne kroglice označene s streptavidinom in ki je enake velikosti kot konstrukt *n*, pri slednjem iz rezultatov pridobljenih z uporabljenimi metodami nismo uspeli sklepati na lipidno specifičnost vezave.



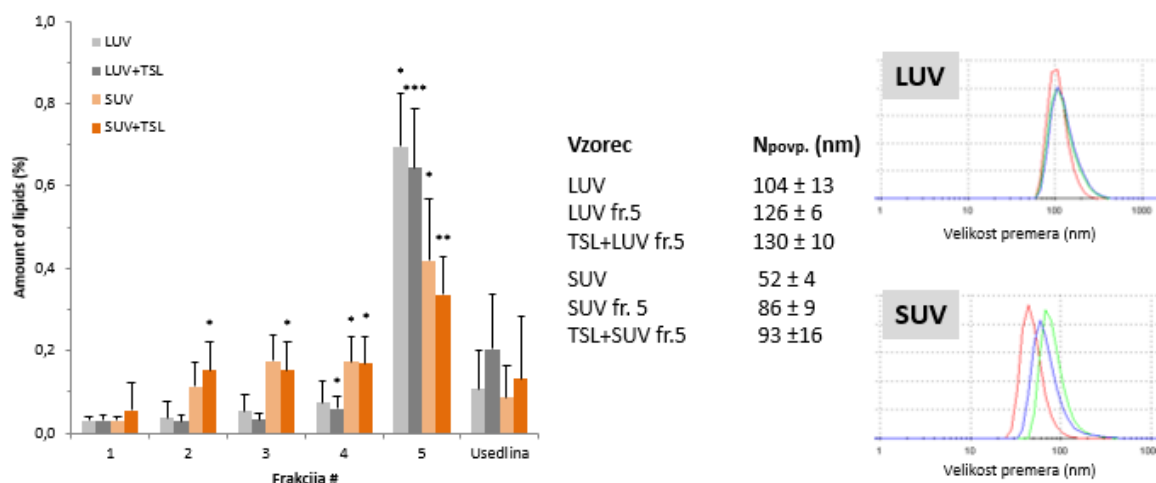
Slika 39: Vezava domene MACPF proteina Torso-like (konstrukt *m* iz pregl. 11) na liposome različnih lipidnih sestav. Imunodetekcija po prenosu western. Prvi stolpec, označevalec molekulskih mas v kDa; *U* in *S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; *PC*, veliki unilamelarni vezikli (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *SM*, LUV-SM:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM*, LUV-POPC:SM:BC-PE  $\approx$  54:44:2; *PC:SM:CH*, LUV-POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2. Vsa lipidna razmerja so v mol/mol. Koncentracije fosfolipidov v liposomih reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije: *PC*,  $\sim$  0,65 mg/ml; *SM*,  $\sim$  0,55 mg/ml; *PC:SM*,  $\sim$  0,5 mg/ml; *PC:SM:CH*,  $\sim$  0,1 mg/ml. Puščica označuje predvideno pozicijo konstrukta *m*.

Figure 39: Binding of Torso-like MACPF domain (construct *m* from tab. 11) to liposomes with different lipid compositions. Immunodetection after Western blot. The first column, molecular weight size marker in kDa; *U* and *S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet; *PC*, large unilamellar vesicles (LUV)-POPC:BC-PE  $\approx$  50:1; *SM*, LUV-SM:BC-PE  $\approx$  50:1; *PC:SM*, LUV-POPC:SM:BC-PE  $\approx$  54:44:2; *PC:SM:CH*, LUV - POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2. All lipid ratios are in mol/mol. The concentrations of phospholipids in the liposomes in the *in vitro* transcription-translation reaction mixture were as follows: *PC*,  $\sim$  0.65 mg/ml; *SM*,  $\sim$  0.55 mg/ml; *PC:SM*,  $\sim$  0.5 mg/ml; *PC:SM:CH*,  $\sim$  0.1 mg/ml. The arrow indicates the expected position of the expressed construct *m*.

#### 4.1.3.4 Flotacija v saharoznem gradientu

Za potrditev vezave Tsl z liposomi smo uporabili neodvisni poskus flotacije v saharoznem gradientu (poglavje 3.2.7.3.2). Po ultracentrifugiranju vzorca reakcijske mešanice IVTT s sintetiziranim Tsl in fluorescentno označenimi liposomi v saharoznem gradientu smo z merjenjem fluorescence (poglavje 3.2.7.5) preverili, v katerih frakcijah so prisotni liposomi, z imunodetekcijo po prenosu western pa v katerih frakcijah je Tsl. Liposomi so se glede na velikost in sestavo v saharoznem gradientu različno porazdelili. Večina ( $\sim$  70 %) LUV, sestavljenih iz POPC:SM:CHOL:NBD-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol), se je zbralo v zgornjem sloju, v območju najnižje gostote. Tudi SUV z enako lipidno sestavo je bilo največ v zgornjem sloju, vendar je bila razporeditev bolj razpršena. V obeh primerih je okrog 15-20 % liposomov ostalo v usedlini po centrifugiranju reakcijske mešanice IVTT z namizno centrifugo (sl. 40). SUV s podobno lipidno sestavo kot v membrani zarodka vinske mušice (PE:POPC:Ergosterol:PI:Ceramid:NBD-PE  $\approx$  57,3:20:3,8:11,4:5,5:2 (razmerje mol/mol)) je bilo največ v spodnjem območju večje gostote (frakciji 1 in 2). Verjetno so zaradi nestabilnosti popokali (neprikazani rezultati). Z merjenjem dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) smo izmerili velikost liposomov po

pripravi, po sintezi z IVTT in v 5. frakciji po flotaciji v saharoznem gradientu z ali brez Tsl. Liposomi v 5. frakciji po flotaciji imajo v primerjavi z izhodnimi večji premer (za ~ 20 % pri LUV oziroma za ~ 65 % pri SUV). Ta se ob prisotnosti Tsl poveča še za dodatnih ~ 3 % pri LUV in okrog ~ 8 % pri SUV (velikosti premera so povprečne vrednosti številčno najbolj zastopanega velikostnega razreda liposomov v treh neodvisnih poskusih) (sl. 40).

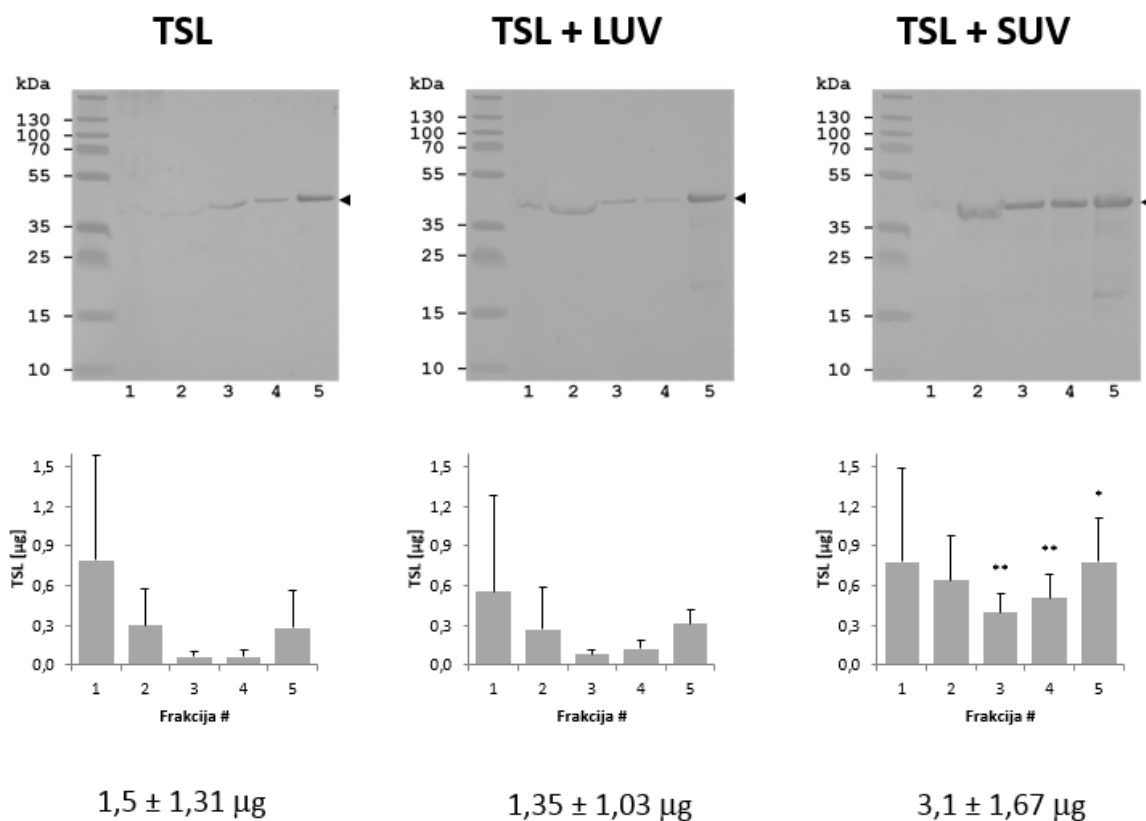


Slika 40: Fluorescenca in velikost liposomov po flotaciji v saharoznem gradientu. *Levo*, delež velikih (LUV) in majhnih (SUV) unilamelarnih veziklov v frakcijah po flotaciji v saharoznem gradientu (gostota saharoze pada od spodnje frakcije 1 proti vrhnji, 5. frakciji) z in brez proteina Torso-like (Tsl). Prisotnost veziklov v frakcijah smo določili z merjenjem NBD-fluorescence. Graf prikazuje povprečje in standardni odklon. Z zvezdico smo označili statistično značilno razliko med deležem veziklov v posamezni frakciji v primerjavi z deležem veziklov v prvi frakciji brez proteina: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ .  $n = 3-8$ . *Desno*, povprečna velikost premera številčno najbolj zastopanega razreda veziklov s standardnim odklonom 3 do 14 neodvisnih poskusov. Velikost veziklov smo pomerili z dinamičnim sipanjem svetlobe po ekstruziji (LUV) oziroma sonikaciji (SUV) in po flotaciji v saharoznem gradientu z (TSL+LUV/SUV fr. 5) in brez Tsl (LUV/SUV fr. 5). Liposomi so vsebovali POPC:SM:CHOL:NBD-PE  $\approx 27:21:50:2$  (mol/mol). Koncentracija fosfolipidov v liposomih v reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije je bila okrog  $0,4 \pm 0,1$  mg/ml za LUV ter  $\sim 1,1 \pm 0,05$  mg/ml za SUV.

Figure 40: Fluorescence and the size of liposomes after flotation assay. *Left*, the percentage of large and small unilamellar vesicles (LUV and SUV, respectively) in fractions after flotation in sucrose gradient (density of sucrose is highest in the 1<sup>st</sup> fraction at the bottom and lowest in the top 5<sup>th</sup> fraction) with and without Torso-like protein (Tsl). The presence of vesicles in the fractions was determined by measuring NBD-PE fluorescence. Graph shows average and standard deviation. Asterisks marks statistical significant difference between the amount of vesicles present in the individual fraction compared with the amount of vesicles in the first fraction: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ .  $n = 3-8$ . *Rigth*, average number size distribution of liposomes diameter with standard deviation of 3 – 14 independant experiments. Diameter size of vesicles was measured by dynamic light scattering after extrusion or sonication (LUV or SUV, respectively) and after IVTT and flotation in the presence or absence of Tsl (TSL+LUV/SUV fr.5 or LUV/SUV fr. 5, respectively). Liposomes were composed of a mixture of synthetic lipids (POPC:SM:CHOL:NBD-PE  $\approx 27:21:50:2$  (mol/mol ratio)). Phospholipid concentration in liposomes in the IVTT reaction mixture was app.  $0.4 \pm 0.1$  mg/ml for LUV and app.  $1.1 \pm 0.05$  mg/ml for SUV. *Frakcija*, fraction; *usedlina*, pellet; *vzorec*, sample; *povp.*, average; *velikost premera*, diameter size.

Z analizo frakcij po flotaciji v saharoznem gradientu z imunodetekcijo smo detektirali Tsl v vseh frakcijah ne glede na prisotnost liposomov (POPC:SM:CHOL:NBD-PE  $\approx$

27:21:50:2 (mol/mol)). Največ Tsl je bilo v 1. in 2. frakciji, vendar je bil v večini primerov v omenjenih frakcijah prisoten čez celoten stolpec, zato slednji nista bili primerni za statistično analizo. Opazili smo, da se je Tsl nespecifično vezal na stene centrifugirke, kar je zaradi tehničnih omejitev pri ločevanju frakcij vplivalo tudi na količino proteina v posamezni frakciji. Verjetno je posledica tega povišan nivo proteina pri kontroli v 5. frakciji. V zgornjih frakcijah smo statistično značilno razliko v količini Tsl med poskusom z liposomi in kontrolo dokazali samo v primeru dodatka SUV. Poleg tega rezultati testa flotacije nakazujejo, da se je v primeru, ko smo k sintezi dodali SUV, izrazilo več Tsl (sl. 41). Poskus z liposomi s podobno lipidno sestavo kot v membrani zarodka vinske mušice (PE:POPC:Ergosterol:PI:Ceramid:NBD-PE  $\approx$  57.3:20.1:3.8:11.4:5.5:2 (razmerje mol/mol)) je nakazal, da je tam donos proteina morda še večji (neprikazani rezultati).



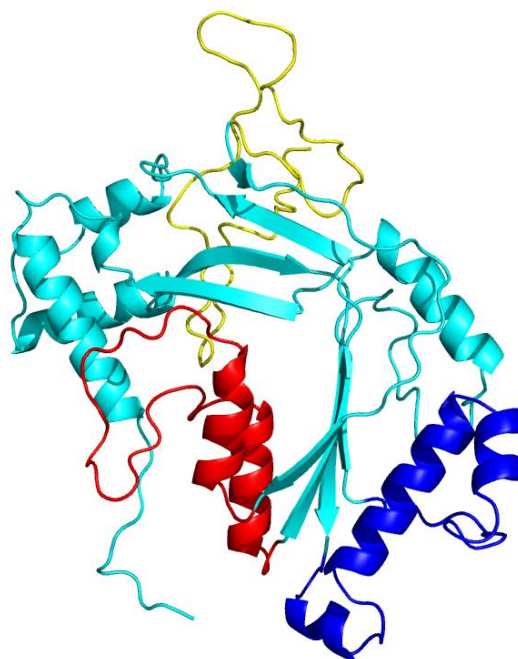
Slika 41: Imunodetekcija frakcij po flotaciji v saharoznem gradientu. Zgoraj, Kolorimetrična detekcija lis proteina Torso-like (Tsl) v frakcijah od 1 do 5 (1, spodnja frakcija z največjo gostoto saharoze; 5, zgornja frakcija z najnižjo gostoto saharoze) po flotaciji v saharoznem gradientu po prenosu western. Tsl smo sintetizirali s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) v prisotnosti velikih (LUV) ali majhnih (SUV) unilamelarnih veziklov ali v prisotnosti pufru PBS (kontrola, membrana na levi). Spodaj, povprečna količina Tsl v vsaki frakciji s standardnim odklonom. \*,  $p < 0,15$ ; \*\*,  $p < 0,05$ .  $n = 2$  (LUV) oziroma 3 (kontrola brez veziklov in SUV). Intenziteto lis smo določili s programom Image Studio Lite in ocenili količino Tsl s pomočjo umeritvene krivulje znanih koncentracij listeriolizina O (LLO) (vsaka membrana je vsebovala tri stolpce različnih koncentracij LLO). Liposome smo pripravili iz POPC:SM:CHOL:NBD-PE  $\approx$  27:21:50:2 (mol/mol). Koncentracija fosfolipidov v liposomih v reakcijski mešanici IVTT je bila okrog  $0,4 \pm 0,1$  mg/ml za LUV ter  $\sim 1,1 \pm 0,05$  mg/ml za SUV. Puščica označuje predvideno pozicijo proteina Tsl.

Figure 41: Immunodetection of fractions after flotation assay. *Top*, Colorimetric detection of Torso-like protein (Tsl) bands from 1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> fraction (density of sucrose is highest in the 1<sup>st</sup> fraction at the bottom and lowest in the top 5<sup>th</sup> fraction) after flotation in sucrose gradient and Western blot. Tsl was synthesized with *in vitro* transcription-translation (IVTT) system in the presence of large (LUV) or small (SUV) unilamellar vesicles or PBS buffer (control – blot on the left). *Bottom*, average amount of Tsl in each fraction with standard deviation. \*,  $p < 0,15$ ; \*\*,  $p < 0,05$ .  $n = 2$  (LUV) or 3 (control without vesicles and SUV). Band intensities were determined by Image Studio Lite software and the quantity of protein was estimated from the calibration curve made by known amounts of listeriolysin O (LLO) (each membrane contained three lanes with different concentrations of LLO). Liposomes were composed of a mixture of synthetic lipids (POPC:SM:CHOL:NBD-PE  $\approx 27:21:50:2$  (mol/mol ratio)). The concentration of phospholipids in the liposomes in the IVTT reaction mixture was around  $0.4 \pm 0.1$  mg/ml in case of LUV and  $\sim 1.1 \pm 0.05$  mg/ml in case of SUV. The arrow indicates the expected position of the expressed Tsl. *Frakcija*, fraction.

S flotacijo v saharoznem gradientu smo preverili še vezavo N-terminalnega dela in domene MACPF proteina Tsl (konstrukta *n* in *m* iz pregl. 11) na LUV z lipidno sestavo POPC:SM:CHOL:NBD-PE  $\approx 27:21:50:2$  (mol/mol). Rezultati nakazujejo, da sta podobno kot zreli protein Tsl tudi krajša konstrukta prisotna vzdolž celega saharoznega gradienta, največ v območju nižje gostote saharoze. Nadalje rezultati nakazujejo, da je v primeru, ko smo k vzorcu dodali LUV, več konstrukta (zlasti konstrukta *n*) v zgornjih frakcijah v primerjavi s kontrolo brez veziklov.

#### 4.1.3.5 Domnevna Tsl vezavna mesta

Da bi ugotovili, kateri del proteina Tsl se povezuje z lipidnimi membranami, smo s pomočjo spletnega programa I-TASSER za napoved strukture in funkcije proteinov pripravili strukturni model Tsl (Zhang, 2008; Roy in sod., 2010; Yang in sod., 2013) (poglavje 3.2.1.2) (sl. 42). 3D strukturni model Tsl ima nizko vrednost C (-3,03) in je strukturno najbolj podoben mišjemu perforinu (PDB koda: 3NSJ). Strukturni model Tsl sestavlja centralna enota domene MACPF iz štirih  $\beta$ -ravnin, ki jo obdajata skupka  $\alpha$ -vijačnic.



```

GRRESQLRIGKAINIFLRYGYLGISMRVIPLNDNSEPDRWVFKEPTKNIYRNLSGLAESHEDTTPGIFHG
---HH-----HHHHHHH---SSSSSSS-----SS---HHH---HHHHHHH-----

DFHMEFCENRRQLFQAYFRDFSIERMDKPWEAFTGGWFPDNAAKKLGINTSFIQGDYSYVLVRVRFRET
---SSS---HHHHHHHHH-----HHHHHHH---HHHHHHH-----SSSSSSSS-----

GRLNAEIPVHQPLEPDVRSRMDQLQIGNITSAVRFMEDVGTHYVNSYTTGNSLYQVFVYSRKNYSMIKER
-----HH--HHHHHH-----HHHHHHHHHH---SSSSSSSS--SSSSSSSS-HHHHHHHHHH

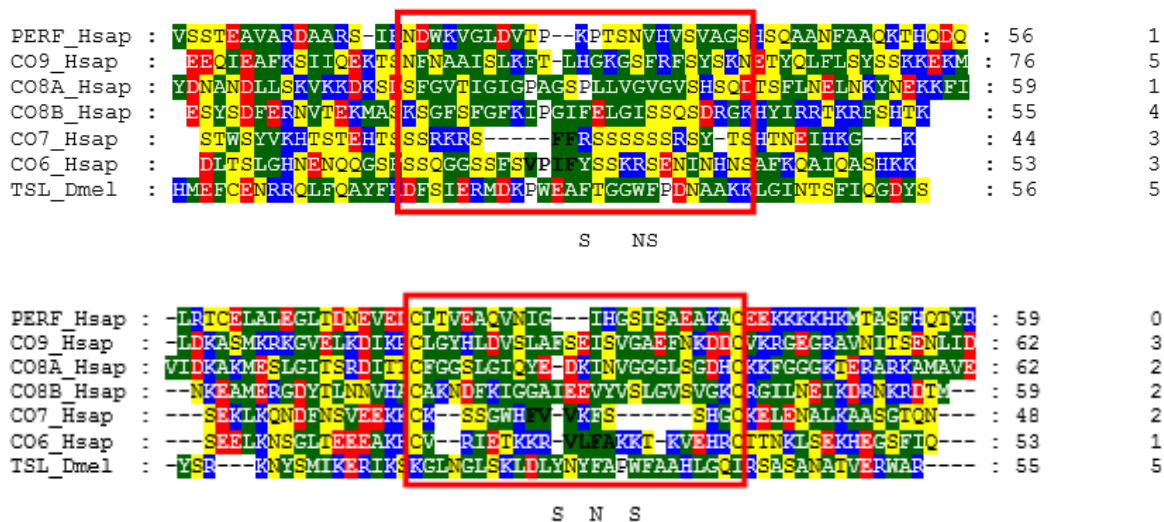
IKSKGLNGLSKLDLYNYFAPWFFAAHLGQIRSASANATVERWARRKLYEYYVVKYVTLCLKLHGNSTLLRS
HHH-----HHHHHHH---HHHHH---SSS---HHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHH---HHHHHH

LDLLGNDAILQLDLKSLKPIFREEPEKESWYHEVLDNNVKLWELNMPQSHPTR
HHHHH---SS---HHHHHHHHH---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
    
```

Slika 42: Strukturni model zrelega proteina Torso-like (Tsl). *Zgoraj*, tri-dimenzionalni strukturni model Tsl, ki ga na podlagi poravnave zaporedij s podobnimi proteini z eksperimentalno določeno strukturo predlaga I-TASSER. *Spodaj*, aminokislinsko (AK) zaporedje proteina Tsl (zgornja vrstica) z napovedano sekundarno proteinsko organiziranostjo (spodnja vrstica: *H*,  $\alpha$ -vijačnica; *S*,  $\beta$ -struktura). Z rumeno je označenih okoli 50 nezmodeliranih AK ostankov N-terminalnega dela proteina. Z rdečo in modro pa regiji alfa vijačnic (CH1 in CH2), ki naj bi bile vpletene v vezavo na membrano. *Odebeljeno*, N-terminalni del proteina (konstrukt *n* iz pregl. 11); *odebeljeno in ležeče*, aromatski AK ostanki v CH1 in CH2 regiji, ki smo jih zamenjali v polarni AK serin ali asparagin; *podčrtano*, domena MACPF (konstrukt *m* iz pregl. 11); *črni okvir*, motiv MACPF.

Figure 42: Structural model of mature Torso-like protein (Tsl). *Above*, three-dimensional structural model of the Tsl determined by I-TASSER on the basis of sequence alignments with similar proteins with experimentally determined structure. *Below*, amino acid (AA) sequence of Tsl (top row) with the predicted protein secondary organization (bottom row: *H*,  $\alpha$ -helix; *S*,  $\beta$ -structure). Around 50 AA in the N-terminal part of the protein are unmodeled (yellow). The putative membrane binding regions - cluster of helices (CH) 1 and 2 are coloured in red and blue, respectively. *Bold*, N-terminal protein region (construct *n* from tab. 11); *Bold and italic*, aromatic AA residues in CH1 and CH2 regions, which we have mutated into a polar AA serine or asparagine; *underline*, MACPF domain (construct *m* from tab. 11); *black square*, MACPF motif.

Sodeč po strukturnem modelu naj bi Tsl vseboval 2 regiji alfa vijačnic, CH1 in CH2 (CH, ang. clusters of helices), kar je podobno človeškim proteinom MACPF (perforin in proteini sistema komplementa C6, C7, C8 ( $\alpha$  in  $\beta$ ) ter C9). Ker sta pri slednjih proteinih regiji CH1 in CH2 pomembni za interakcijo proteina z membrano, smo regije proteina Tsl poravnali s človeškimi proteini MACPF (sl. 42). Dolžino regij CH1 in CH2 za perforin smo določili iz kristalne strukture (Law in sod., 2010), za C6 in C7 iz sl. 9 iz dodatka članka Aleshin in sod. (2012b), za C8 $\alpha$  in C9 pa iz sl. 2 iz članka Hadders in sod. (2007).

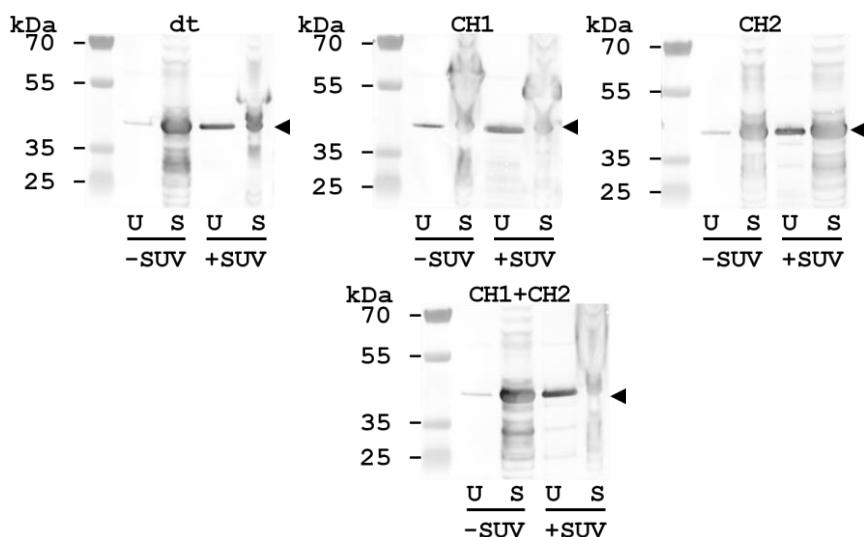


Slika 43: Poravnava regij skupkov  $\alpha$ -vijačnic (CH1 in CH2) človeških proteinov MACPF (perforin in proteini sistema komplementa C9, C8 ( $\alpha$  in  $\beta$ ), C7 ter C6) in proteina Torso-like (Tsl) iz vinske mušice. Zgoraj, CH1; spodaj, CH2. Poravnave smo obarvali glede na fizikalno-kemijske lastnosti aminokislin (AK) (zeleno, nepolarne; rumeno, polarne nenabite; rdeče, kisle; modro, bazične). AK iz segmenta, ki je označen z rdečim okvirjem, naj bi se vstavile v membrano (Hadders in sod., 2007; Law in sod., 2010; Aleshin in sod., 2012b). Število desno od zaporedja je dolžina regije CH1/CH2 (izraženo v št. AK) (del zaporedja CH1 pri C9 ni prikazan), skrajno desno pa število aromatskih AK znotraj rdečega kvadrata. Hidrofobne AK pri C6 in C7, poudarjene s krepko pisavo, naj bi bile odgovorne za vezavo proteina na membrano (Aleshin in sod., 2012b; Dod. sl. 9). Pod poravnavo so označena mesta, kjer smo zamenjali aromatske aminokisliline s polarnimi.

Figure 43: Alignment of regions of clusters of helices (CH1 and CH2) of human MACPF proteins (perforin and proteins of the complement system, C9, C8 ( $\alpha$  and  $\beta$ ), C7 and C6) and Torso-like protein (Tsl) from fruit fly. Above, CH1; below, CH2. Alignment is coloured according to the physico-chemical properties of amino acids (AA) (green, non-polar, yellow, polar uncharged; red, acidic; blue, alkaline). Putative region that is inserted into the lipid bilayer is indicated by a red square (Aleshin et al., 2012b; Hadders et al., 2007; Law et al., 2010). The number at the right of the sequence denotes the length of the region CH1/CH2 (number of AA) (part of a series CH1 at C9 not shown), and the number at the extreme right is the number of aromatic AA inside the red square. Bold are hydrophobic AA at C6 and C7 which are believed to be responsible for the binding of the protein to the membrane (Aleshin et al., 2012b; Supl. fig. 9). Aromatic AA that we have replaced with polar ones are depicted under the alignment.

Dolžine regij CH se med človeškimi proteini MACPF razlikujejo. Najkrajše so pri proteinih C6 in C7, ki se samo delno vstavita v lipidni dvosloj, a ga ne prečita. Perforin, C8 in C9 imajo daljši regiji CH1 in CH2, s katerimi prečijo lipidni dvosloj. Regiji CH pri Tsl sta po dolžini nekje vmes. Regija CH1 je enako dolga kot pri perforinu in C8 $\beta$ , vendar

krajša kakor pri C9 in C8 $\alpha$ , ter daljša od C6 in C7. Regija CH2 je prav tako daljša od C6 in C7, vendar krajša kot pri drugih človeških proteinih MACPF. Tsl vsebuje v segmentu regij CH, ki naj bi bil odgovoren za vezavo na membrane pri človeških proteinih MACPF (rdeč kvadrat na sl. 43), kar pet aromatskih aminokislin. Za te smo domnevali, da sodelujejo pri vezavi Tsl na lipidne membrane. Tri od teh v vsaki regiji CH smo z usmerjeno mutagenozo zamenjali s polarnima aminokislinama serinom ali asparaginom (sl. 42 in 43). Pripravili smo tri različne mutante Tsl (dve enojni (CH1 in CH2) in eno dvojno (CH1+CH2)), s katerimi smo z uporabo presejalne metode za študij interakcij z lipidnimi membranami preverili pomen teh aromatskih AK pri vezavi na liposome. Ugotovili smo, da med mutantami in divjim tipom Tsl proteina ni razlike v vezavi na liposome (sl. 44).

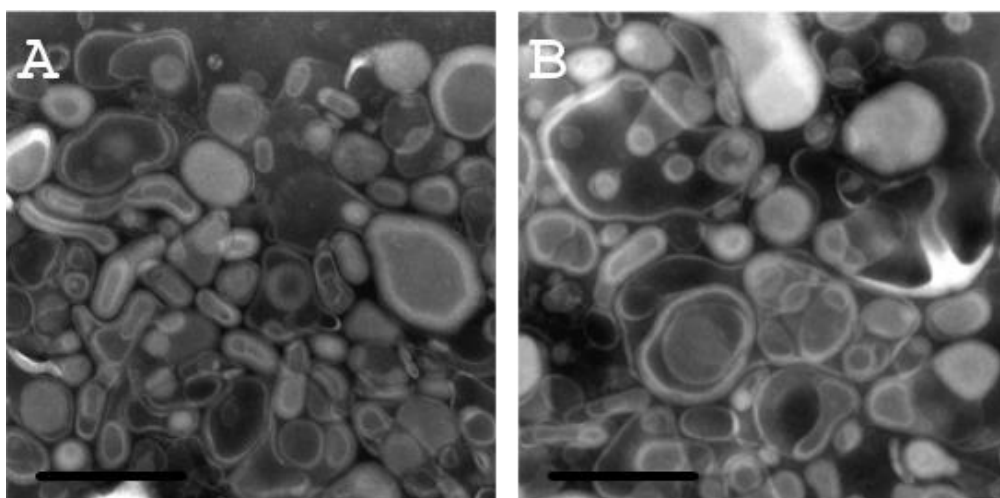


Slika 44: Vpliv aromatskih aminokislin (AK) v regiji skupkov  $\alpha$ -vijačnic (CH1 in CH2) pri proteinu Torso-like (Tsl) na vezavo na liposome. Imunodetekcija po prenosu western. Proteine smo sintetizirali s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) v prisotnosti majhnih unilamelarnih veziklov (SUV) in preverili interakcije s SUV z afinitetno ločbo s streptavidinom označenimi magnetnimi kroglicami. *dt*, divji tip; *CH1*, mutanta z zamenjanimi AK v CH1 regiji (F122S, W126N in F127S); *CH2*, mutanta z zamenjanimi AK v CH2 regiji (Y244S, F247N in W250S); *CH1+CH2*, dvojna mutanta. Prvi stolpec pri vseh membranah, molekularski mas v kDa; *U in S*, usedlina in supernatant po afinitetni ločbi z magnetom; - *SUV*, kontrola poskusa brez dodanih veziklov; + *SUV*, dodatek SUV POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol). Koncentracija fosfolipidov v liposomih v IVTT reakcijski mešanici je bila  $\sim$  0,6 mg/ml. Puščice označujejo predvidene pozicije proteinov.

Figure 44: The effect of aromatic amino acids (AA) in the region of clusters of helices (CH1 and CH2) of Torso-like protein (Tsl) on binding to liposomes. Immunodetection after Western blot. Proteins were synthesized with the *in vitro* transcription-translation (IVTT) system in the presence of small unilamellar vesicles (SUV). The interactions of mutants of Tsl protein with liposomes was studied by affinity separation with streptavidin-labelled magnetic beads. *dt*, wild type; *CH1*, mutant with the substituted AA in the CH1 region (F122S, W126N and F127S); *CH2*, mutant with the substituted AA in the CH2 region (Y244S, F247N and W250S); *CH1 + CH2*, the double mutant. The first column for all membranes, molecular weight size marker in kDa; *U and S*, pellet and supernatant, respectively, after affinity separation with a magnet; - *SUV*, a control of the experiment without the addition of SUV; + *SUV*, addition of SUV – (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (mol/mol ratio)). The concentration of phospholipids in the liposomes in the IVTT reaction mixture was  $\sim$  0.6 mg/ml. The arrow indicates the expected position of the expressed proteins.

#### 4.1.3.6 Prikaz vezave Tsl na liposome s presevnim elektronskim mikroskopom

Za vizualizacijo vezave Tsl na lipidne membrane smo s presevnim (transmisijskim) elektronskim mikroskopom (TEM) z negativnim kontrastiranjem opazovali spremembe na liposomih ob prisotnosti Tsl (poglavje 3.2.7.6.1) (sl. 45). Tsl smo sintetizirali v prisotnosti LUV (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol)) s sistemom IVTT in po prekonočni sintezi nanесли supernatant reakcijske mešanice IVTT na EM mrežico. Za kontrolo nam je rabila reakcijska mešanica IVTT z LUV brez dodatka plazmidne DNK. Med kontrolo in poskusom, kjer smo liposome izpostavili Tsl, nismo opazili strukturnih razlik (sl. 45).

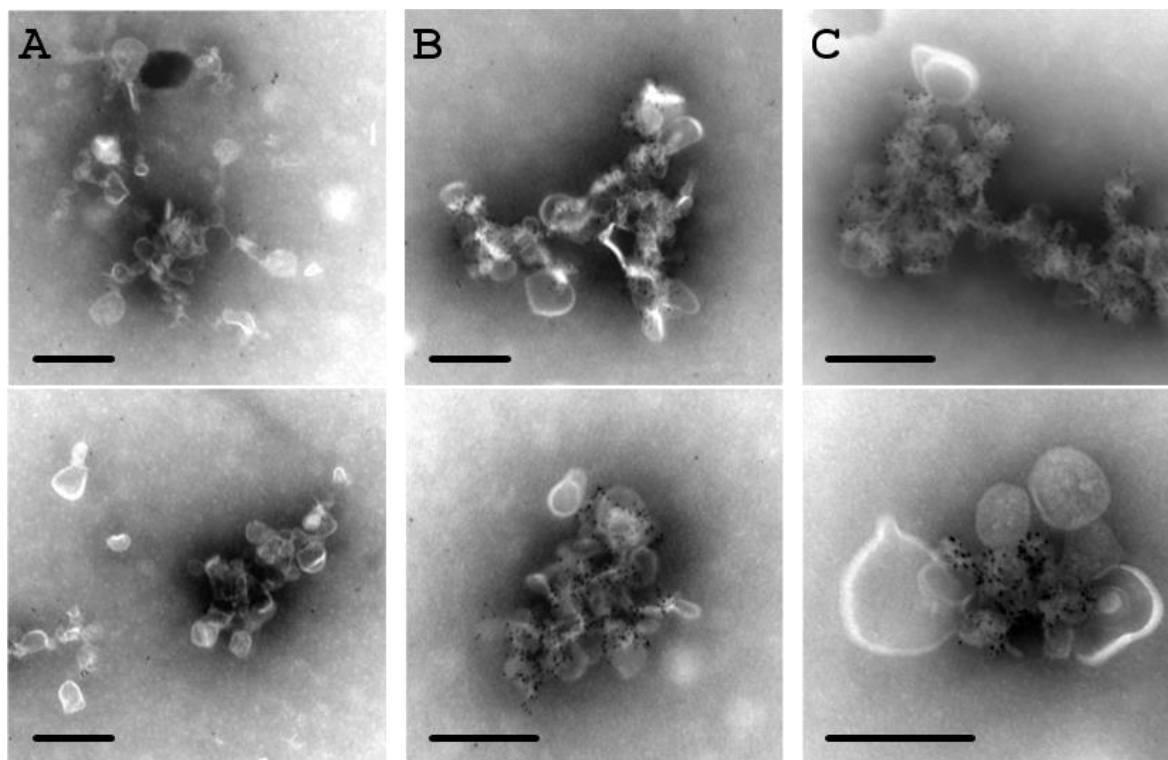


Slika 45: Fotografije velikih unilamelarnih veziklov (LUV) z in brez proteina Torso-like (Tsl) s presevno elektronsko mikroskopijo. LUV (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol)) smo dodali k reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) z (B) in brez (A) plazmidne DNK z genom za Tsl. Koncentracija fosfolipidov v liposomih v reakcijski mešanici IVTT je bila  $\sim$  0,6 mg/ml. Merilo ustreza dolžini 500 nm.

Figure 45: Transmission electron microscopy images of large unilamellar vesicles (LUV) with and without Torso-like protein (Tsl). LUV (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (mol/mol ratio)) were added to the *in vitro* transcription-translation reaction mixture without (A) and with (B) the plasmid DNA with inserted *tsl* gene. The concentration of phospholipids in the liposomes in the IVTT reaction mixture was  $\sim$  0.6 mg/ml. Scalebar = 500 nm.

Rezultati imunolokalizacije kažejo na vezavo Tsl na liposome (sl. 46). Poskus smo zasnovali podobno, kot smo opisali zgoraj, le da smo uporabili SUV namesto LUV, ter dodali 5 nm Ni-NTA nanozlato, ki se veže na proteine s heksahistidinsko oznako (poglavje 3.2.7.6.2). Poleg tega smo uporabili še dodaten vzorec, in sicer frakcijo 5 po flotaciji v saharoznem gradientu v prisotnosti SUV in Tsl. Nekaj zrnca zlata se ujame na površini mrežice tudi pri negativni kontroli brez Tsl. Tu so se delci Ni-NTA nanozlata naključno razporedili po preparatu (sl. 46A), medtem ko so bili ob prisotnosti Tsl delci Ni-NTA nanozlata skoraj izključno na liposomih (sl. 46B in C).





Slika 46: Imunolokalizacija proteina Torso-like (Tsl) v prisotnosti majhnih unilamelarnih veziklov (SUV) s presevno elektronsko mikroskopijo. SUV (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (razmerje mol/mol)) smo dodali k reakcijski mešanici *in vitro* transkripcije-translacije (IVTT) z (B) in brez (A) plazmidne DNK z genom za Tsl. C, frakcija 5 po flotaciji v saharoznem gradientu v prisotnosti SUV in Tsl. Za imonolokalizacijo Tsl s heksahistidinsko oznako smo uporabili 5 nm Ni-NTA nanozlato. Koncentracija fosfolipidov v liposomih v reakcijski mešanici IVTT je bila  $\sim$  0,8 mg/ml. Merilo ustreza dolžini 200 nm.

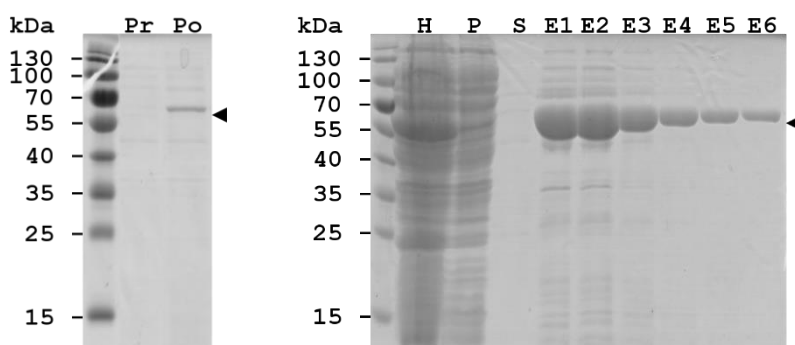
Figure 46: Immunolocalisation of Torso-like protein (Tsl) in the presence of small unilamellar vesicles (SUV) with transmission electron microscopy. SUV (POPC:SM:CHOL:BC-PE  $\approx$  27:21:50:2 (mol/mol ratio)) were added to the *in vitro* transcription-translation (IVTT) reaction mixture without (A) and with (B) the plasmid DNA with inserted *tsl* gene. C, 5<sup>th</sup> fraction after flotation assay in the presence of SUV and Tsl. Ni-NTA 5 nm nanogold was used for immunolocalisation of hexahistidine tagged Tsl. The concentration of phospholipids in the liposomes in the IVTT reaction mixture was  $\sim$  0.8 mg/ml. Scalebar =200 nm.

#### 4.2 VLOGA LISTERIOLIZINA O PRI POBEGU LISTERIJE IZ FAGOSOMA V CITOSOL

V drugem sklopu doktorske naloge smo preučevali vlogo LLO pri pobegu bakterije *L. monocytogenes* iz fagosoma v citosol. Najprej smo pripravili rekombinantni LLO in preverili njegovo sposobnost permeabilizacije GUV. V nadaljevanju smo vzpostavili metodo za pripravo GUV iz eritrocitnih membran. S slednjimi lahko pripravimo bolj realen modelni sistem za preučevanje prehoda listerij iz fagosoma v citosol kakor v primeru GUV iz sintetičnih lipidov. V divji tip listerij (dt) in v sev, ki ne izraža LLO (*hly*-), je GFP vstavil sodelavec viš. zn. sod. dr. Zdravko Podlesek.

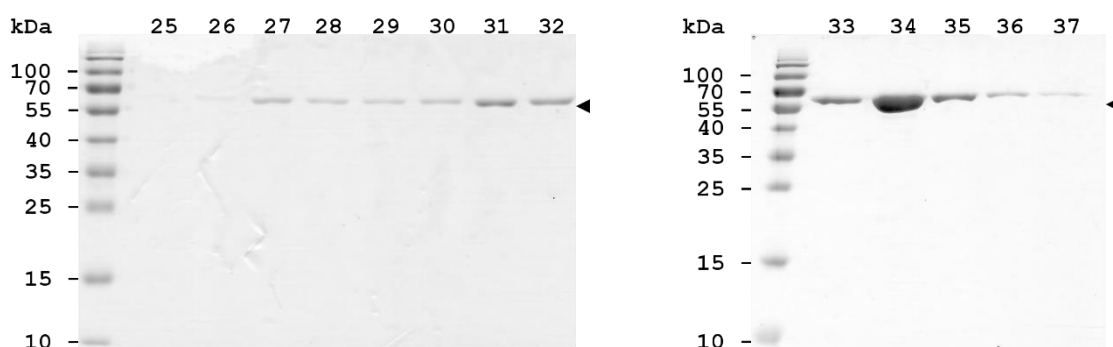
#### 4.2.1 Izražanje listeriolizina O

Protein LLO smo heterologno izrazili v ekspresijskem sevu *E. coli* BL21(DE3)pLysS (poglavje 3.2.3.1). Stopnjo izražanja in čistost LLO med postopkom izolacije smo spremljali z NaDS-PAGE (sl. 47 in 48). Koncentracijo očiščenega rekombinantnega LLO smo določili iz molekulske mase proteina (57,6 kDa) in molarnega ekstinkcijskega koeficienta ( $7,575 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Slednja parametra smo dobili s pomočjo spletnega programa ProtParam (Gasteiger in sod., 2005). Po čiščenju z ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo izolirali čisti rekombinantni LLO s heksahistidinsko oznako (sl. 48).



Slika 47: Izražanje in izolacija rekombinantnega listeriolizina O (LLO). NaDS-PAGE gel po posameznih stopnjah ekspresije in izolacije LLO iz *E.coli* BL21(DE3)pLysS. Prvi stolpec obeh gelov, označevalec molekulskih mas v kDa. *Levo*, pred (*Pr*) in po (*Po*) indukciji z IPTG. *Desno*, frakcije po nikljevi afinitetni kromatografiji (*H*, supernatant po homogenizaciji; *P*, pretočna frakcija homogenata po izstopu iz Ni-NTA kolone; *S*, frakcija po spiranju s pufrom za spiranje; *E*, frakcije po spiranju z elucijskim pufrom). S puščico je označena predvidena pozicija LLO.

Figure 47: Expression and isolation of recombinant listeriolysin O (LLO). SDS-PAGE gels of different stages of LLO expression and isolation from *E. coli* BL21 (DE3) pLysS are shown. The first column of the two gels, molecular weight size marker in kDa. *Left*, before (*Pr*) and after (*Po*) induction with IPTG. *Right*, fractions after Ni-affinity chromatography (*H*, supernatant after homogenization; *P*, flow-through; *S*, wash; *E*, elution fractions). The arrow indicates the expected position of the recombinant LLO.



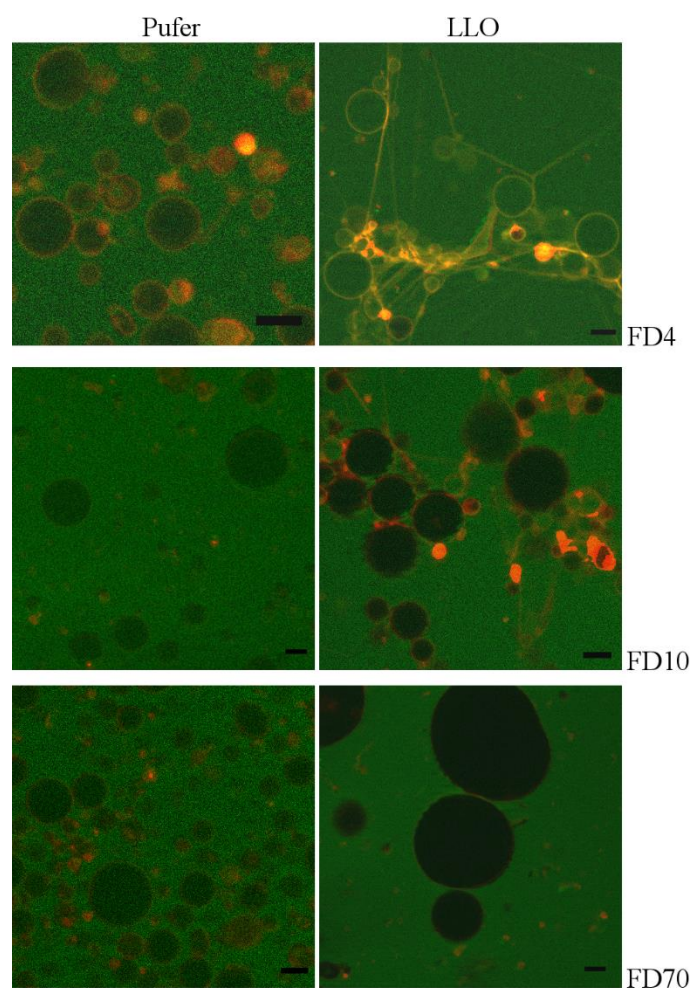
Slika 48: Čiščenje rekombinantnega listeriolizina O (LLO) z ionsko-izmenjevalno kromatografijo. NaDS-PAGE gel frakcij spiranja s kationskega izmenjevalca. Prvi stolpec obeh gelov, označevalec molekulskih mas v kDa. Največ proteina se je s kolone spralo pri ~ 0,8 M koncentraciji NaCl (frakcija 34). S puščico je označena predvidena pozicija LLO.

Figure 48: Purification of recombinant listeriolysin O (LLO) by ion-exchange chromatography. SDS-PAGE gel of fractions from cation-exchange chromatography. The first column of the two gels, molecular

weight size marker in kDa. The majority of the protein was washed from the column with ~ 0,8 M concentration of NaCl (fraction 34). The arrow indicates the expected position of the recombinant LLO.

#### 4.2.2 Permeabilizacija veziklov celičnih velikosti

Za preverjanje aktivnosti LLO smo izvedli test hemolitične aktivnosti (sl. 19) ter poskus prehajanja fluorescenčno označenih dekstranov preko LLO pore v GUV iz sintetičnih lipidov (poglavje 3.2.8.1) (sl. 49). Za poskus permeabilizacije smo suspenziji GUV dodali LLO in različno velike fluorescenčno označene dekstrane z molekulsko maso 4, 10 in 70 kDa (FD4, FD10 in FD70). Prisotnost dekstranov v GUV po 30 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo preverili s fluorescenčno mikroskopijo (sl. 49).



Slika 49: Permeabilizacija veziklov celičnih velikosti (GUV) z rekombinantnim listeriolizinom O (LLO). Membrane GUV, ki smo jih označili z R-DHPE (DOPC:CHOL:R-DHPE = 79:20:1), svetijo rdeče, s FITC označeni dekstrani (FD4, FD10 in FD70) pa zeleno. *Levo*, kontrola (puffer); *desno*, poskus z LLO. Končna koncentracija je bila: 0,1 mM (FD4), 0,07 mM (FD10), 0,01 mM (FD70) in 100 nM (LLO). Posnetki so narejeni s fluorescenčnim mikroskopom. Merilo ustreza dolžini 10  $\mu$ m.

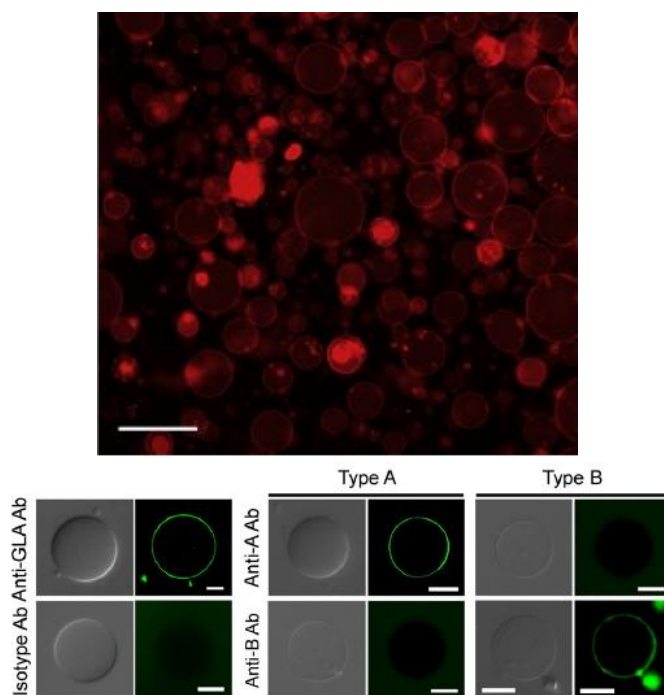
Figure 49: Permeabilisation of giant unilamellar vesicles (GUV) with recombinant listeriolysin O (LLO). GUV membranes were labelled with R-DHPE (DOPC:CHOL:R-DHPE = 79:20:1) and glow red whereas FITC-labelled dextrans (FD4, FD10 and FD70) glow green. *Left*, control (buffer (puffer)); *right*, experiment

with LLO. The final concentration was as follows: 0.1 mM (FD4), 0.07 mM (FD10), 0.01 mM (FD70) and 100 nM (LLO). The images were taken with a fluorescent microscope. Scalebar = 10  $\mu$ m.

S štetjem GUV, ki so bili napolnjeni z dekstrani, smo izračunali delež permeabilizacije. Okoli 90 % GUV je vsebovalo FD4, okrog 6 % FD10, medtem ko FD70 ni prehajal skozi LLO pore. Velikost LLO por, glede na rezultate permeabilizacije GUV s sestavo DOPC:CH-R-DHPE = 79:20:1, je med 4,5 – 5 nm, kolikor znaša hidrodinamski premer FD10.

#### 4.2.3 Orjaški unilamelarni vezikli iz eritrocitnih membran

Za preučevanje procesov, ki vključujejo biološke membrane, smo razvili metodo za pripravo GUV iz membran eritrocitov pri nizki koncentraciji soli (poglavje 3.2.6.4.2). Pri pripravi GUV s to metodo se ohranijo nativni lipidi, proteini in oligosaharadi, ne pa tudi lipidna asimetrija. GUV pripravljeni iz eritrocitnih membran so tako uporabni model za funkcionalne študije, ki zahtevajo kompleksno sestavo membran (Mikelj in sod., 2013).



Slika 50: Vezikli celičnih velikosti iz membran eritrocitov (RBC-GUV). *Levo*, sedimentacija RBC-GUV, ki vsebujejo saharozo z izoosmolarno glukozno raztopino. Membrane RBC-GUV vsebujejo DiIc18 (rdeče). Merilo ustreza dolžini 50  $\mu$ m. *Desno*, imunodetekcija glikoforina A in krvnih antigenov A in B na površini RBC-GUV s fluorescenčno označenimi protitelesi. Merilo ustreza dolžini 10  $\mu$ m. Prirejeno po (Mikelj in sod., 2013).

#### **4.2.4 *In vitro* sistem za preučevanje prehoda listerije iz fagosoma v citosol**

Za preučevanje prehoda bakterije *L. monocytogenes* iz fagosoma v citosol in ugotavljanje vloge LLO pri tem procesu smo nameravali vzpostaviti modelni sistem z GUV. Tekom eksperimentov smo ugotovili, da bi poskus morali izvajati v realnem času, saj so GUV zelo občutljivi na mehanske spremembe, osmotski šok idr., zaradi česar ne moremo narediti trajnih preparatov. Poskuse z bakterijo *Listeria monocytogenes* pa je potrebno izvajati v laboratoriju za delo z GSO iz 2. varnostnega razreda, v katerega bi zaradi narave poskusa moral biti vključen tudi konfokalni mikroskop. Ker teh pogojev nismo izpolnjevali, nismo uspeli izvesti poskusa preučevanja prehoda bakterije *L. monocytogenes* iz fagosoma v citosol z *in vitro* sistemom z vezikli celičnih velikosti.

## 5 RAZPRAVA

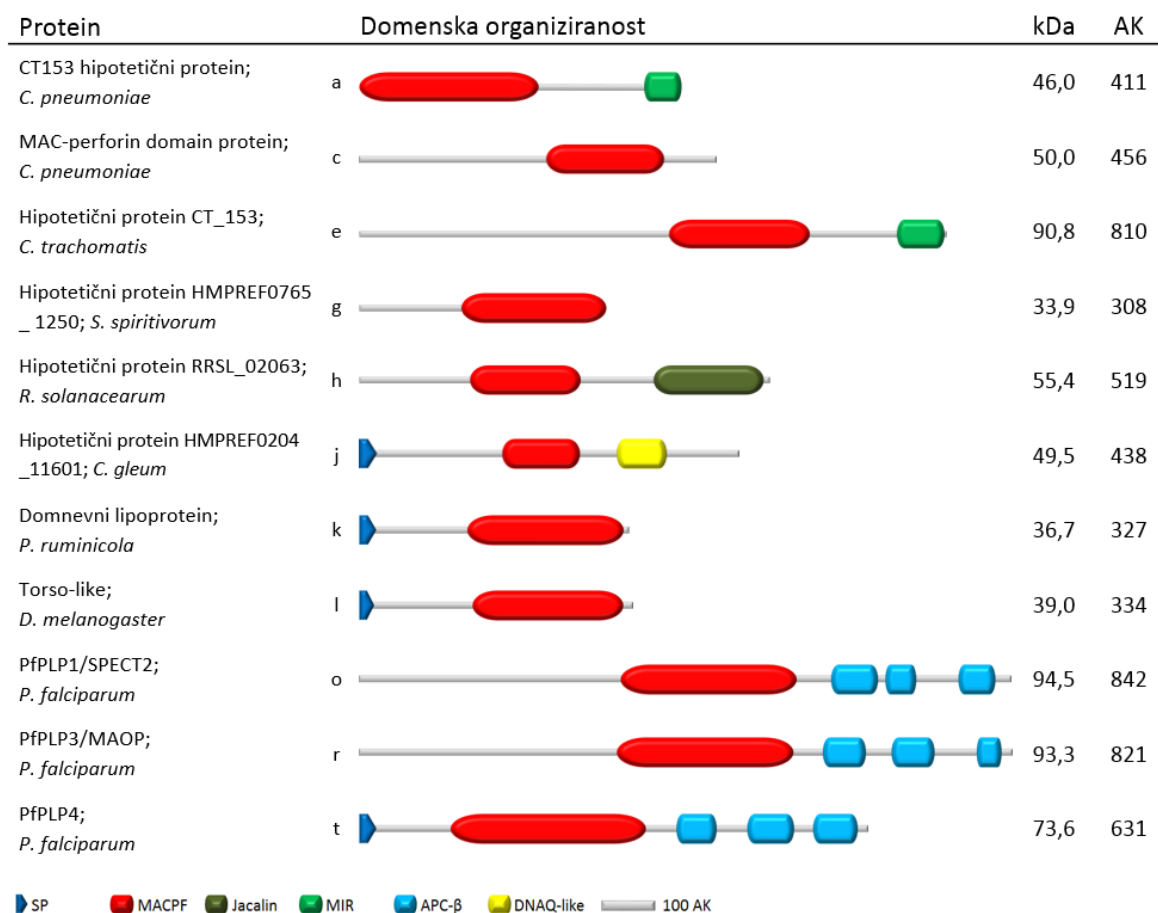
### 5.1 BIOINFORMATSKA ANALIZA PROTEINOV Z DOMENO MACPF

Proteine glede na evolucijsko sorodnost, strukturo, funkcijo in podobnost v aminokislinskem zaporedju uvrščamo v proteinske družine. Podatke o teh lahko najdemo v podatkovnih zbirkah proteinskih družin, kot je npr. Pfam (Finn in sod., 2014). Te neprestano dopolnjujejo z novimi vnosi zahvaljujoč 'poplavi' genomskih podatkov. Rosado in sod. (2008) so v letu objave z orodji BLAST našli okrog 500 zaporedij z domeno MACPF, leta 2011 pa je bilo takšnih zaporedij v podatkovni zbirki Pfam že preko 700. Da bi zajeli čim več proteinskih zaporedij z zapisom za domeno MACPF, ki so bile v času začetka doktorske naloge dostopne na različnih podatkovnih zbirkah, ne pa tudi nujno v zbirkah proteinskih družin, smo z bioinformacijsko analizo pripravili lastno zbirko proteinov MACPF. Naša končna zbirka je na dan 24. 4. 2011 vsebovala 809 različnih proteinskih zaporedij z domeno MACPF iz 192 različnih vrst organizmov. Našli smo kakšnih 100 predstavnikov več, kot jih je bilo takrat v podatkovni zbirki Pfam (zaradi hitrosti določanja zaporedij celotnim genomom (v letu 2011 je bilo dokončanih 2118 projektov določanja zaporedij genomov, v letu 2013 pa 9102 (Reddy in sod., 2015)), je bila naša zbirka zastarela že takoj po nastanku (decembra 2014 je družina proteinov MACPF v Pfam štela preko 1300 članov)).

Na nivoju aminokislinskega zaporedja je domena MACPF med različnimi sistematskimi skupinami slabo ohranjena. Skupna lastnost proteinov MACPF je seveda motiv MACPF (Ponting, 1999), ki vsebuje dva ohranjena glicinska ostanka, medtem ko so ostali aminokislinski ostanki bolj variabilni (sl. 17). Zaporedje motiva MACPF je edino vsaj delno ohranjeno pri proteinih MACPF in ima očitno pomembno funkcijo. Pri predstavnikih družine, ki se vstavijo v membrano, je ta del proteina pomemben za uravnavanje konformacijskih sprememb delov proteina, ki se vstavijo v membrano (Rosado in sod., 2008; Aleshin in sod., 2012b). Vzrok za slabo ohranjenost med proteini MACPF na nivoju zaporedja je med drugim lahko v raznolikosti proteinov MACPF glede na njihovo vlogo, ter ta, da so za različne funkcije (npr. interakcija z, vstavljanje v, in prečenje membran) bolj pomembne fizikalno-kemijske lastnosti aminokislin kakor njihovo specifično zaporedje (Rosado in sod., 2008).

Dobra polovica proteinov MACPF iz zbirke, ki smo jih analizirali z bioinformacijskimi orodji, ima poleg MACPF še dodatne napovedane proteinske domene. Nekatere od določenih C-terminalnih domen z napovedano funkcijo vezave na membrane ali na sladkorje (npr. MABP, MIR, Jacalin idr.), bi lahko imele podobno vlogo kot domena C2 pri perforinu, ki je odgovorna za začetno vezavo proteina na membrano (Voskoboinik in sod., 2005) (več v poglavju 5.3).

Namen zbiranja in analiziranja proteinskih zaporedij z domeno MACPF z bioinformacijskimi orodji je bil pridobiti čim večji nabor proteinov, izmed katerih smo jih nato izbrali 11, za preučevanje interakcij z lipidnimi membranami (sl. 51). Izbrani proteini imajo vsaj eno izmed naštetih lastnosti: napovedano topnost v bakterijskem ekspresijskem sistemu, vsebujejo poleg MACPF še dodatne domene, imajo relativno majhno molekulsko maso, ne vsebujejo transmembranskih regij ter izvirajo iz patogenega organizma. Poleg zrelih izbranih proteinov smo interakcije z lipidnimi membranami preučevali tudi na 9 krajših konstruktih istih proteinov, večinoma C-terminalnih domen (pregl. 11).



Slika 51: Shema proteinov MACPF, ki smo jih izbrali za preučevanje interakcij z lipidnimi membranami. *Protein*, ime proteina, izvorni organizem ter oznaka proteina, ki smo jo uporabljali v doktorski nalogi (pregl. 11); *kDa*, molekulska masa; *AK*, dolžina proteina podana s številom aminokislin. *Domene*: *SP*, signalni peptid; *MIR*, domena poimenovana po manoziltransferaznem, inozitol 1,4,5-trifosfatnem in rianodin receptorju (InterPro koda: IPR016093); *Jacalin*, domena za vezavo sladkorjev (InterPro koda: IPR001229); *DNA-Q-like*, domena iz DnaQ-podobne eksonukleazne superdružine proteinov (NCBI: cl10012); *APC-beta*, ApiPLP (ang.: apixoplexan perforin-like proteins) C-terminalna domena, sestavljena iz 5 trakov beta (Kafsack in Carruthers, 2010)

Figure 51: The scheme of selected MACPF proteins, which we have chosen for studying the interaction with lipid membranes. *Protein*, protein name, the producing organism and label of the protein that was used in the doctoral thesis (tab. 11); *kDa* molecular weight; *AK*, the length of the protein given by the number of amino acids (AK, AA). *Domains*: *SP*, signal peptide; *MIR*, domain named after protein

mannosyltransferase, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and ryanodine receptor (InterPro code: IPR016093); *Jacalin*, sugar-binding protein domain (InterPro code: IPR001229); *DNA-Q-like*, domain that belongs to DnaQ-like exonuclease superfamily (NCBI code: c110012); *APC-β*, ApiPLP (apixoplexan perforin-like proteins) C-terminal domain composed of 5 β-strands (Kafsack and Carruthers, 2010).

Za podrobnejšo analizo o razširjenosti domene MACPF po drevesu življenja in o lastnostih proteinov MACPF svetujemo branje diplomskega dela Matica Kisovca (Kisovec, 2012) ter poglavje *Distribution of MACPF/CDC Proteins* v knjigi *MACPF/CDC Proteins – Agents of Defence, Attack and Invasion* (Anderluh in sod., 2014).

## 5.2 IZRAŽANJE IZBRANIH PROTEINOV MACPF

Za preučevanje interakcij z lipidnimi membranami smo izbrali 7 bakterijskih ter 4 evkariontske proteine MACPF (pregl. 11 in sl. 51). Izmed bakterijskih smo uspeli s sistemom za brezcelično sintezo oziroma z *in vitro* transkripcijo-translacijo (IVTT) uspešno izraziti pet zrelih proteinov MACPF (sl. 21). Protein z oznako *g* se ali ni izrazil (sl. 21) ali pa je bil netopen (sl. 24), kar se ujema z napovedano topnostjo za ta protein (pregl. 11). V primeru proteina z oznako *e* pa je prisoten samo krajši fragment. Fragmentacijo smo opazili tudi pri proteinih *a* in *h*. Zadnji tudi agregira. Večina proteinov se sintetizira v netopni obliki, kar smo preverjali s centrifugiranjem reakcijske mešanice IVTT. Večjo količino topnega proteina smo uspeli pridobiti le v primeru proteinov z oznako *j* in *k* (sl. 24). Izmed C-terminalnih domen bakterijskih proteinov sta se izrazili samo domeni z oznakama *f* in *i*, v obeh primerih pa je bila količina topnega in netopnega produkta podobna. Izmed evkariontskih proteinov nam je z IVTT uspelo izraziti zrelo obliko proteina Torso-like iz vinske mušice (sl. 21 in 24), medtem ko nam je apikompleksne proteine uspelo izraziti zgolj v sledovih (sl. 22). Večina Tsl se izrazi v netopni obliki, še posebej pa oba krajša konstrukta Tsl, *m* in *n* (sl. 24). Izmed apikompleksnih proteinov nam proteina z oznako *o* praktično ni uspelo izraziti, preostala dva zrela proteina in APC-β C-terminalne domene pa so se izrazili v netopni obliki (sl. 22). Domeno APC-β z oznako *u* smo uspeli izraziti ob spremembi pogojev sinteze, tj. ob dodatku liposomov ali PBS k reakcijski mešanici IVTT (sl. 28). Rezultati ekspresije se večinoma ujemajo z napovedano topnostjo (pregl. 11), s to razliko, da nam je uspelo pridobiti vsaj majhno količino topnega proteina v primeru proteinov z oznakami *a*, *c* ter *k* kljub napovedani netopnosti. In obratno, kljub pričakovani boljši topnosti, so bili proteinski konstrukti z oznako *d*, *m*, *n*, *o* in *p* slabo topni oziroma netopni. Iz tega sledi, da s programi za določanje topnosti dobimo dobro oceno o topnosti proteinov, vendar ta ni popolnoma zanesljiva in še ni jamstvo za dejansko topnost. Vzrok za neizražanje ali netopnost proteinov s sistemom IVTT je lahko tudi pomanjkanje posttranslacijskih modifikacij. Nastanek disulfidnih mostičkov in/ali glikozilacija vplivata na stabilnost, predvsem slednja tudi na zvijanje in topnost proteinov. Npr. pri proteinu sistema komplementa C9 je N-glikozilacija potrebna za njegovo hemolitično aktivnost (Kontermann in Rauterberg, 1989). Do posttranslacijskih modifikacij prihaja predvsem



pri evkariontskih proteinih. Tsl vsebuje en cisteinski ostanek preko katerega bi lahko med monomeri tvoril intermolekularni disulfidni mostiček, ter šest potencialnih N-glikolizacijskih in štiri O-glikozilacijskih mest. V študiji identifikacije N-glikozilacije proteinov centralnega živčnega sistema vinske mušice so ugotovili, da je Tsl N-glikoziliran preko asparagina na mestu 246 (Koles in sod., 2007). Veliko potencialnih mest za glikozilacijo ter predvsem veliko cisteinskih ostankov vsebujejo tudi apikompleksni proteini in njihove domene APC- $\beta$  (pregl. 14).

Preglednica 14: Število potencialnih glikolizacijskih mest in cisteinskih ostankov pri 'kontrolnih' proteinih: humani perforin (hPFN), pleurotolizin B (PlyB), ostreolizin A (OlyA), listeriolizin O (LLO) in ekvinatoksin II (EqII) ter izbranih evkariontskih proteinih MACPF: Torso-like (Tsl) in plazmodijski proteini (o, r in t) ter njihove C-terminalne domene (p, s in u). *N in O*, N- in O-glikozilacijska mesta smo določili s spletno programsko opremo GlycoPP za prokariotske proteine (Chauhan in sod., 2012) oziroma GlycoEP za evkariontske proteine (Chauhan in sod., 2013). *Cys*, število cisteinskih ostankov v zaporedju proteina.

Table 14: The number of potential glycolization sites and cysteine residues in 'control' proteins: human perforin (hPFN), pleurotolysin B (PlyB), ostreolysin A (OlyA), listeriolysin O (LLO) and equinatoxin II (EqII) and selected eukaryotic MACPF proteins: Torso-like (Tsl) and the *Plasmodium* proteins (o, r and t), and their C-terminal domains (p, s, and u). *N and O*, N- and O-glycosylation sites were determined by the online software GlycoPP for prokaryotic proteins (Chauhan et al., 2012) or GlycoEP for eukaryotic proteins (Chauhan et al., 2013). *Cys*, the number of cysteine residues in the protein sequence.

	hPFN	PlyB	OlyA	LLO	EqII	Tsl	o	p	r	s	t	u
<b>N</b>	2	2	0	20	3	6	14	2	8	1	4	1
<b>O</b>	7	21	8	26	8	4	20	6	16	2	5	3
<b>Cys</b>	20	1	2	1	0	1	21	9	18	12	18	12

Izmed kontrolnih proteinov nam je uspelo v aktivni obliki izraziti vse razen perforina (sl. 18 in 19). Čeprav vsi vsebujejo več potencialnih mest za glikozilacijo, so za človeški perforin eksperimentalno dokazali, da je N-glikoziliran preko asparagina na mestu 205 (Chen in sod., 2009; Law in sod., 2010). Predvsem pa se perforin od drugih kontrolnih proteinov razlikuje po številu cisteinov, s katerimi tvori kar devet disulfidnih mostičkov (Law in sod., 2010). Podobno veliko število cisteinov vsebujejo plazmodijski proteini MACPF, ki so s cisteini bogati predvsem v delu domnevnih domen APC- $\beta$ . Vzrok za neizražanje plazmodijskih proteinov je morda predvsem nezmožnost nastanka disulfidnih mostičkov, čeprav pri zrelih proteinih verjetno pomembno vlogo pri tem igra tudi velikost proteina. Večji kot je protein, manjša je verjetnost, da se bo zvil v pravilno obliko. Tsl smo poleg z IVTT poskusili pridobiti v sesalskih celicah, saj slednje omogočajo postranslacijske modifikacije. Vendar pa nam razen zanemarljivo nizkih količin proteina s prehodnim izražanjem v celicah HEK293T ni uspelo sintetizirati.

Sinteza proteinov MACPF predstavlja ozko grlo pri njihovem preučevanju, o čemer so poročali že drugi (Rosado in sod., 2007). To je verjetno skupna lastnost številnih proteinov MACPF, saj so povečini veliki in kompleksno zviti, vsebujejo številne hidrofobne regije, poleg tega pa so nekateri še posttranslacijsko modificirani ali z disulfidnimi mostički ali so glikozilirani, oziroma oboje.

### 5.3 PREUČEVANJE INTERAKCIJ IZBRANIH PROTEINOV MACPF Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI

Po sintezi izbranih proteinov MACPF smo najprej preverili njihovo sposobnost liziranja rdečih krvničk s testom hemolitične aktivnosti. Nobeden izmed izbranih proteinov ni bil hemolitično aktiven. Do lize ni prišlo niti ob prisotnosti predstavnika egerolizinske družine proteinov ostreolizina A (OlyA) iz glive *Pleurotus ostreatus*. Spomnimo, da OlyA skupaj s pleurotolizinom B deluje kot dvokomponentni citolitični kompleks, pri čemer je OlyA odgovoren za začetno vezavo na membrane (Ota in sod., 2013; Lukoyanova in sod., 2015). Čeprav nam ni uspelo dokazati hemolitične aktivnosti izbranih proteinov MACPF, ni nujno, da nativni proteini ne delujejo litično. Vzrok za negativni rezultat je lahko nepravilna zvitost in posledično nefunkcionalnost proteinov ali odsotnost vezavnega partnerja za prepoznavo membranskega vezavnega mesta. Slednjega bi namesto OlyA morali iskati v posameznem organizmu, ki proizvaja izbrani protein MACPF. Za proteine iz družine CDC velja, da imajo na svojem C-terminalnem delu Ig domeno iz  $\beta$ -struktur, ki je odgovorna za vezavo na membrano. To je značilno tudi za nekatere predstavnike družine MACPF, npr. domeno C2 perforina in ne nazadnje tudi za OlyA, kar lepo pokaže model 3D zgradbe tega proteina (Ota in sod., 2013). Zato bi se pri iskanju potencialnega vezavnega partnerja za proteine MACPF morali pri iskanju v organizmu osredotočiti na prisotnost egerolizinskih proteinov ali na kakšne druge podobno velike proteine sestavljene iz  $\beta$ -struktur.

Kljub temu, da testirani proteini MACPF ne kažejo hemolitične aktivnosti, se lahko povezujejo z lipidnimi membranami na druge načine. Lep primer je protein C7 sistema komplementa, ki se zgolj delno vstavi v membrano, vendar je ne preči (Aleshin in sod., 2012b). Za razliko od proteinov sistema komplementa se pri interakciji z lipidnimi membranami proteini navadno vežejo na specifičen receptor v tarčni membrani. Ta je lahko lipid, kot v primeru vezave proteinov CDC na holesterol (Hotze in Tweten, 2012), ekvinatoksina II na sfingomielin (Bakrač in sod., 2008) ali ostreolizina A na membranske rafte iz holesterola in sfingomielina (Ota in sod., 2013). Receptorji so lahko tudi membranski proteini, npr. CD59 v primeru intermedilizina iz družine CDC (Giddings in sod., 2004) idr. Za preučevanje interakcij izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami in ugotavljanje morebitne specifičnosti vezave na membrane smo pripravili liposome sestavljene iz: *i*) eritrocitnih membran (MLV-EM), pri katerih so ohranjeni nativni lipidi, proteini in oligosaharadi, ne pa tudi lipidna asimetrija (Mikelj in sod., 2013), *ii*) sintetičnih lipidov PC, SM in CHOL v takšnem razmerju, da v grobem predstavljajo lipidno sestavo plazmaleme rdečih krvničk in *iii*) samo iz PC. Ker je večji del sintetiziranih izbranih proteinov MACPF sam po sebi agregiral in se oboril, preučevanje interakcij takih proteinov z lipidnimi membranami z metodo posedanja proteinov z npr. rdečimi krvničkami ali liposomi v polju centrifugalne sile, ni primerno. Zato smo uporabili drug pristop, metodo afinitetne ločbe proteinov vezanih na biotinitirane vezikle s pomočjo magnetnih kroglic, označenimi s streptavidinom. Metoda

je uporabna tudi za proteine, ki agregirajo, poleg tega omogoča relativno hitro ločbo proteinov, ki so se vezali na liposome od nevezanih proteinov (glej poglavje 4.1.2.5). Kot pozitivna kontrola sistema nam je rabil EqtII, ki se veže na sfingomielin. Specifično vezavo EqtII na s sfingomielinom obogatene lipidne membrane smo pokazali v primeru dodatka liposomov ob začetku ali po koncu sinteze (sl. 25 in 27). S to metodo smo pokazali, da se na liposome, predvsem take iz kompleksnih lipidnih mešanic, vežeta proteina z oznako *j* in *l*. Rezultati nakazujejo, da se na liposome vežejo tudi krajši proteinski konstrukti *i*, *m*, *n* in *u* (sl. 26 in 28).

Naša osnovna delovna hipoteza je bila, da proteini MACPF za začetno interakcijo z lipidnimi membranami potrebujejo dodatne proteinske domene. Te so pri večini do sedaj opisanih proteinih MACPF na C-terminalnem koncu proteina. Pričakovali smo, da se bodo izmed izbranih proteinov MACPF na membrane vezali proteini z oznakami *a*, *e*, *h*, *o*, *r* in *t*, ter njihove C-terminalne domene: MIR (*b* in *f*), Jacalin (*i*) in domene APC- $\beta$  (*p*, *s* in *u*). Predvidene domene APC- $\beta$  naj bi sodelovale pri vezavi apikompleksnih proteinov MACPF na tarčno membrano (Kafsack in Carruthers, 2010). Domena MIR naj bi imela funkcijo prenosa liganda (InterPro koda: IPR016093), domena Jacalin pa predstavlja lektinsko domeno za vezavo manoze (InterPro koda: IPR001229). Nekateri proteini z domeno Jacalin stimulirajo delovanje imunskih celic T in B, npr. istoimenski protein Jacalin, ki se veže na antigen T in deluje kot aglutinin (Jeyaprakash in sod., 2002). Domene MIR, Jacalin in APC- $\beta$  naj bi, sodeč po literaturi in 3D modelih, ki smo jih pripravili s pomočjo spletnega programa I-TASSER (neprikazani rezultati), sestavljale  $\beta$ -strukture (Sankaranarayanan in sod., 1996; Ponting, 2000; Kafsack in Carruthers, 2010). Kot že omenjeno, številni proteini naddružine MACPF/CDC za vezavo na membrane potrebujejo C-terminalne domene, ki so večinoma zgrajene iz  $\beta$ -struktur. Izmed proteinskih konstruktoev, za katere smo pričakovali, da bodo povezani z membrano, smo vezavo opazili le pri C-terminalni domeni z oznako *i* (Jacalin) in *u* (APC- $\beta$ ). Večino od preostalih (vsi apikompleksni proteini in njihove C-terminalne domene – *o*, *r*, *t*, *p* in *s*, ter domena MIR *b*) nam ni uspelo pridobiti v topni obliki. Slabo topna sta bila tudi proteina *a* in *e*. V topni obliki smo uspeli sintetizirati domeno MIR *f*, ki pa ne kaže vezave na membrane. Presenetljivo pa smo interakcije z membranami zasledili pri proteinih *j* in *l*, saj pri teh s spletnimi programi za napoved domen nismo zaznali nobene dodatne domene, ki bi lahko bila odgovorna za vezavo na membrane. Zlasti zanimiv je protein *l* oziroma Torso-like, saj je eden izmed najmanjših predstavnikov družine MACPF in ga sestavlja skoraj izključno le sama domena MACPF (sl. 29). Vezavo na lipidne membrane smo opazili tudi v primeru krajših konstruktoev Tsl, domene MACPF (*m*) in N-terminalnega dela proteina (*n*) (več o interakcijah Tsl v poglavju 5.4).

Za izbrane proteine MACPF smo sklepali, da so za vstavitev v lipidni dvosloj oziroma tvorbo pore pomembne strukturne lastnosti znotraj domene MACPF. Poleg centralne enote iz štirih  $\beta$ -ravnin smo sklepali, da sta za vstavitev v lipidni dvosloj potrebna dovolj dolga dela skupkov  $\alpha$ -vijačnic, ki se lahko razvitjeta v hidrofobno transmembransko  $\beta$ -

strukturo (TMH), za tvorbo pore pa takšna s predvidenima amfipatičnima regijama TMH. Proteina *j* in Tsl se vežeta na lipidne membrane, vendar jih ne lizirata. Za oba proteina smo pripravili 3D strukturni model in naredili poravnavo domnevnih regij CH z regijami CH človeških proteinov MACPF. Našo hipotezo smo potrdili, saj sta domnevni regiji CH pri proteinu *j* prekratki (43 in 41 AK), da bi lahko z njima prečil lipidni dvosloj (neprikazani rezultati), pri proteinu Tsl pa morda dovolj dolgi za prečenje lipidnega dvosloja, toda preveč hidrofobni za tvorbo pore (sl. 43 in poglavji 4.1.3.5 ter 5.4).

Največji problem pri preučevanju interakcij izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami predstavlja sama sinteza ter (ne)topnost proteinov (glej poglavje 5.2). Nizka stopnja izražanja in netopnost sta bili še posebej oviri pri preučevanju apikompleksnih proteinov. Izmed proteinskih konstruktov, ki nam je jih uspelo pridobiti v relativno topni obliki, smo šibko vezavo na vse tri različne testirane liposome opazili zgolj pri domeni Jacalin (*i*). Površina liposomov iz PC ima zaradi narave gradnika tako pozitivni kot negativni naboj. Iz tega bi lahko sklepali, da se proteinski konstrukt *i* veže na tarčno membrano preko elektrostatskih interakcij. Proteina *j* in Tsl (*l*) sta se vezala zgolj na liposome s kompleksno lipidno sestavo. Morda prepoznata t. i. membranske rafte oz. membranske domene bogate s sfingomielinom in holesterolom. Podobno sta se na tarčne membrane vezala tudi domena MACPF proteina Tsl (*m*) in domena APC- $\beta$  plazmodijskega perforinu podobnega proteina PfPLP4 (*u*). Domena MACPF proteina Tsl se je vezala z večjo intenziteto na MLV-EM, kar pomeni, da se na membrane veže z večjo afiniteto, če te poleg PC, SM in CHOL vsebujejo še druge lipide in/ali morda tudi druge makromolekule, kot so proteini ali ogljikovi hidrati. Podobno velja za N-terminalni del proteina Tsl (*n*), ki se je preferenčno vezal na MLV-EM. Obratno domena APC- $\beta$  (*u*) za vezavo očitno ne potrebuje ogljikovih hidratov in proteinov, saj je bila intenziteta vezave večja v primeru membran iz PC:SM:CHOL. Podobno kot proteina *j* in zrel Tsl se domena APC- $\beta$  (*u*) v tarčni membrani morda veže na membranske rafte oziroma zgolj na sfingomielin ali holesterol.

S preučevanjem interakcij izbranih proteinov MACPF z lipidnimi membranami smo delno uspeli raziskati pomen domenske organiziranosti proteinov MACPF na interakcije in le v manjšem obsegu dopolniti vedenje o funkciji teh proteinov ter njihovi vlogi pri patogenezi. Kot že omenjeno, je glavni vzrok za to sinteza proteinov. Glede domenske organiziranosti lahko na podlagi dobljenih rezultatov zaključimo, da za interakcije z lipidnimi membranami dodatne domene poleg MACPF niso nujno potrebne. Namreč proteina z oznako *j* in *l* (Tsl) sta se vezala na lipidne membrane, kljub temu, da ne vsebujeta nobene znane dodatne domene, ki bi bila odgovorna za vezavo na membrane. Prav tako smo vezavo na membrane opazili tudi pri konstrukt *m*, ki predstavlja samo domeno MACPF proteina Tsl. Nadalje je na podlagi napovedanih domen težko sklepati na interakcije z membranami. V primeru domene Jacalin (*i*) in APC- $\beta$  (*u*) smo po pričakovanjih opazili interakcijo z lipidnimi membranami, nasprotno pa v primeru domene MIR (*f*) interakcije nismo zaznali.

Za C-terminalno domeno proteina iz rastlinske patogene bakterije *Ralstonia solanacearum* (Jacalin) in domeno proteina PfPLP4 iz protozojskega parazita *Plasmodium falciparum* (APC- $\beta$ ) smo opazili vezavo na tarčne lipidne membrane, kar bi lahko proteinoma omogočilo delovanje na tarčne celice preko poškodbe membran, spremembe njihove morfologije ipd. Poleg delovanja na membrane tarčne celice imajo lahko proteini MACPF iz patogenih in parazitskih organizmov, ki smo jih preučevali, drugačne vloge, npr. varovanje organizma pred imunskim sistemom gostitelja s kemičnim prikrivanjem ipd., česar z našimi testi nismo mogli ugotoviti. Za potrditev zgoraj opisanih rezultatov in domnev bi morali izvesti dodatne raziskave, kar velja zlasti za področje določitve receptorskih molekul tarčnih membran in regij proteinov, ki so udeležene pri interakcijah. Pred tem pa bi morali poiskati primerno metodo, s katero bi lahko izrazili večje količine proteinov v topni obliki.

#### 5.4 PREUČEVANJE INTERAKCIJ PROTEINA TORSO-LIKE Z LIPIDNIMI MEMBRANAMI

Po preliminarnih testih vezave izbranih proteinov MACPF na lipidne membrane (poglavje 5.3) smo se osredotočili na opis mehanizma interakcije proteina Torso-like s tarčnimi membranami. Tsl je namreč eden izmed najmanjših znanih proteinov MACPF in poleg MACPF ne vsebuje nobenih drugih domen (sl. 29 in 51). Za preučevanje je zanimiv ravno zaradi svoje zgradbe, saj se očitno veže na membrane na drugačen način kakor do sedaj opisani proteini MACPF. Večina teh za vezavo na membrano potrebuje dodatne domene, perforin npr. domeno C2 ali vezavne partnerje (OlyA v primeru PlyB). Za PlyB so sicer pokazali, da se tudi v odsotnosti OlyA veže na membrano, vendar s precej nižjo afiniteto (Ota in sod., 2013). Poleg strukturnih lastnosti pa ima Tsl zelo pomembno vlogo v embriogenezi pri razvoju terminalnih struktur in tudi kasneje pri razvoju vinske mušice, čeprav njegova funkcija še ni povsem pojasnjena. Z namenom osvetlitve vloge Tsl pri razvoju kakor tudi vloge domene MACPF pri interakcijah z membranami, smo preučili mehanizem interakcije Tsl z lipidnimi membranami.

Ugotovili smo, da je stopnja vezave Tsl na liposome večja, če smo te dodali ob začetku sinteze. Membrane liposomov, morda na podoben način kot šaperoni, verjetno zamaskirajo hidrofobne aminokislinske ostanke pri nastajanju proteina, saj ti sestavljajo kar dobro tretjino Tsl. Liposomi bi lahko omogočili ali pravilno zvitje proteina v nativno obliko ali pa obratno, da se je zaradi hidrofobnih aminokislinskih ostankov, ki se med sintezo izpostavijo okolju, protein nespecifično vezal na hidrofobne membrane in se tako sintetiziral v nepravilno zvito obliko.

Preverili smo stopnjo vezave Tsl v odvisnosti od velikosti in količine liposomov (sl. 35 in 36, poglavje 4.1.3.2). Pokazali smo, da je vezava odvisna od količine liposomov. V primeru večje količine liposomov, torej večje količine razpoložljivih lipidnih membran, se je nanje vezalo več Tsl. Pri poskusih vezave Tsl v odvisnosti od velikosti liposomov

smo opazili trend večje stopnje vezave Tsl na manjše lipidne vezikle (SUV). Večjo stopnjo vezave na membrane manjših SUV v primerjavi z LUV smo opazili tudi pri testu flotacije v saharoznem gradientu (sl. 41). Podobno so tudi za protein MACPF C9 sistema komplementa ugotovili, da se povezuje s SUV ne pa tudi z LUV (Dankert in sod., 1985). Domnevamo, da se Tsl veže predvsem na dele lipidnih membran z večjo ukrivljenostjo in da je gostota pakiranja lipidnih gradnikov pomemben dejavnik pri vezavi Tsl na lipidne membrane. Verjetno se Tsl lažje poveže z membranami preko svojih hidrofobnih regij v bolj ukrivljenih delih membrane, kjer so hidrofobni deli lipidnih gradnikov bolj izpostavljeni okolju. *In vivo* se Tsl stabilno veže na nepolarno vitelinsko membrano (to ni membrana v klasičnem pomenu, saj ni sestavljena iz lipidov, temveč iz proteinov zunajceličnega matriksa (Fargnoli and Waring, 1982)) in sicer na anteriornem in posteriornem polu izleženih jajčec, kjer je ukrivljenost membrane večja (Stevens in sod., 2003; Riechmann, 2007).

Prav tako smo pokazali, da je vezava Tsl na lipidne membrane stabilna (poglavje 4.1.3.3). Po prekonočni sintezi Tsl ob prisotnosti biotiniziranih liposomov je ta ostal vezan nanje tudi ob dodatku ~ 5x večje koncentracije ne-biotiniziranih liposomov (sl. 37). Po afinitetni ločbi z magnetnimi kroglicami, označenimi s streptavidinom, se ne-biotinizirani liposomi znajdejo v supernatantu. V usedlini smo dobili približno enako količino Tsl kot pri kontrolnem poskusu, pri katerem nismo dodali ne-biotiniziranih liposomov. To pomeni, da Tsl ni prešel iz prvotnih liposomov na liposome, ki smo jih dodali naknadno oziroma, da se Tsl stabilno veže na prvotne liposome.

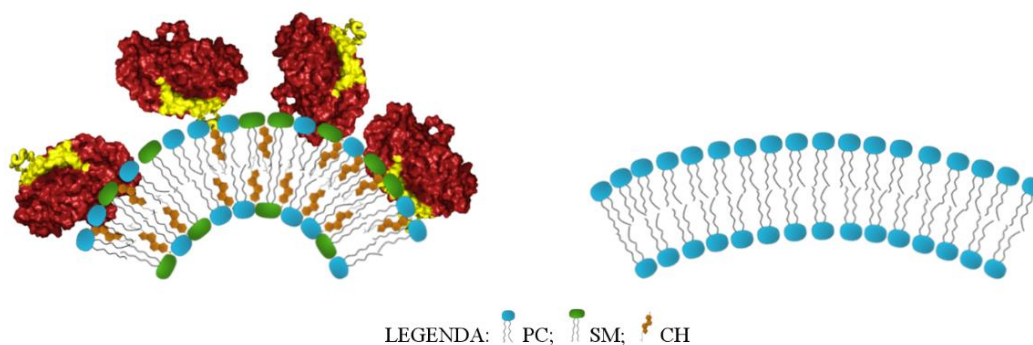
V nadaljevanju smo preučili specifičnost vezave Tsl na lipidne membrane, kar smo na kratko že omenili v prejšnjem poglavju (poglavje 5.3). Poleg liposomov iz PC in kompleksnih lipidnih mešanic (MLV-EM in LUV/SUV PC:SM:CHOL) smo pripravili še liposome sestavljene samo iz SM in take iz mešanice PC in SM. Ker insekti namesto SM in CHOL vsebujejo drugačne lipide (ceramide in ergosterole), smo pripravili še liposome s podobno lipidno sestavo kot je v membranah embrija vinske mušice (Dmel: PE:PC:Ergosterol:PI:Ceramid) (poglavje 4.1.3.3). Tsl se je najmočneje vezal na liposome iz kompleksnih lipidnih mešanic ter na liposome samo iz SM, medtem ko je bila količina Tsl v usedlini liposomov samo iz POPC in POPC:SM približno enaka kakor pri kontroli brez liposomov (sl. 38). Sklepamo, da se Tsl nespecifično veže na lipidne membrane. Intenziteta vezave Tsl na MLV-EM, ki vsebujejo poleg lipidov še proteine in ogljikove hidrate, je podobna vezavi na liposome iz kompleksnih mešanic sintetičnih lipidov. Predvidevamo, da so receptorji za vezavo različne lipidne molekule ali pa, da za vezavo Tsl na membrane ni pomembna specifičnost receptorja, temveč njegov hidrofobni značaj. Podobne rezultate smo dobili tudi s konstruktom domene MACPF Tsl (*m*), le da v tem primeru nismo preverjali vezave na MLV-EM in na liposome-Dmel. Specifičnost vezave N-terminalnega dela proteina Tsl s tem testom nismo uspeli preveriti zaradi navzkrižne reaktivnosti protiteles, ki smo jih uporabljali za detekcijo heksahistidinske oznake, s proteinom enake molekulske mase iz magnetnih kroglic.

Vezavo Tsl na lipidne membrane smo potrdili z neodvisnim testom flotacije v saharoznem gradientu. Glede na zgornje rezultate vezave Tsl na liposome iz kompleksnih lipidnih mešanic smo vse poskuse izvedli s SUV/LUV PC:SM:CHOL. Liposomi-Dmel niso bili primerni, saj očitno niso dovolj stabilni in so med poskusom popokali. Tsl je bil razporejen vzdolž saharoznega gradienta, največ v spodnjem, najbolj gostem delu gradienta. Ob dodatku liposomov, ki so se zaradi manjše gostote porazdelili proti vrhu, v območje nizke gostote gradienta, pa je bilo v primerjavi s kontrolnim poskusom v primeru dodatka SUV več Tsl v zgornjih frakcijah (sl. 41). Veziklom se je med sintezo z IVTT in/ali po ultracentrifugiranju v saharoznem gradientu povečal premer, najverjetneje zaradi zlivanja veziklov kot posledice trkov med njimi. Ob prisotnosti Tsl se premer še dodatno poveča, kar je še dodaten indikator interakcije Tsl z liposomi (sl. 40). Tsl bi lahko imel podoben vpliv na liposome, kot jih imajo nekateri drugi proteini MACPF, npr. protein sistema komplementa C9, ki povzroča aglutinacijo liposomov (Dankert in sod., 1985). Podobni poskusi vezave obeh krajših konstruktov Tsl – domene MACPF (*m*) in N-terminalnega dela proteina (*n*) nakazujejo, da se tudi slednja, še zlasti pa *n*, vežeta na liposome (neprikazani rezultati). Očitno so pri vezavi Tsl na lipidne membrane vključene različne regije proteina oziroma vsaj dve, ena znotraj domene MACPF in druga znotraj N-terminalnega dela proteina.

Da bi ugotovili, kateri del proteina vstopa v povezave z lipidnimi membranami, smo pripravili strukturni model Tsl (sl. 42, poglavje 4.1.3.5). 3D model Tsl je najbolj podoben mišjemu perforinu. Sestavlja ga centralna enota iz domene MACPF, ki naj bi imela podobno zvitje in lastnosti kakor do zdaj znani proteini MACPF: štiri vzporedne  $\beta$ -ravnine, ki jih obdajata skupka  $\alpha$ -vijačnic (CH1 in CH2). Pri proteinih sistema komplementa in perforinu se deli proteina CH1 in CH2 razlikujejo tako po dolžini kot po hidrofobnosti. Najdaljše vsebujejo perforin, C9 in C8. Pri perforinu in C9 naj bi se centralni del območij CH1 in CH2 razvil v amfipatične  $\beta$ -trakove in s tem omogočil tvorbo stabilne transmembranske pore (Law in sod., 2010; Aleshin in sod., 2012b). CH1 in CH2 pri C8 ( $\alpha$  in  $\beta$ ) sta hidrofobni, kar omogoča sidranje MAC kompleksa v membrano (Steckel in sod., 1983; Hadders in sod., 2007), pri C7 in C6 pa sta regiji krajši in manj hidrofobni, zaradi česar nista sposobni prečiti membrane, temveč se verjetno samo vstavita v zunanji sloj tarčne membrane (Silversmith in Nelsestuen, 1986; Aleshin in sod., 2012b). Glede na poravnavo s človeškimi proteini MACPF so regije Tsl morda dovolj dolge, da bi omogočile prečenje membrane in vsebujejo precej hidrofobnih aminokislin, s katerimi bi se lahko Tsl stabilno vezal v lipidni dvosloj (sl. 43). Za Tsl smo pokazali, da se stabilno veže na lipidne membrane, vendar jih glede na rezultate hemolize ne lizira, kar je v skladu z našo hipotezo, da so se proteini s hidrofobnimi skupki  $\alpha$ -vijačnic sposobni vstaviti v membrano, ne pa tudi tvoriti pore. V segmentu regij CH, ki naj bi se glede na poravnavo s človeškimi proteini MACPF vstavil v membrano, Tsl vsebuje po pet aromatskih aminokislin. Za te smo domnevali, da so vključene pri vezavi Tsl na membrano. Našo hipotezo smo preverili z mutantami Tsl, pri katerih smo po tri aromatske

aminokislina iz vsake regije CH zamenjali s polarnimi aminokislinskimi ostanki serina ali asparagina. Z uporabo afinitetne ločbe z magnetnimi kroglicami, označenimi s streptavidinom, nismo uspeli potrditi naše hipoteze, saj pri nobeni izmed mutant ni prišlo do razlik v vezavi na liposome (sl. 44). Kot smo omenili zgoraj, Tsl očitno vsebuje vsaj dve regiji za vezavo na membrane (znotraj domene MACPF in znotraj N-terminalnega dela proteina), zato bi bilo za preverjanje vpliva zamenjanih aminokislina na vezavo Tsl bolj smiselno poskus izvesti samo z domeno MACPF. Kljub vsemu pa izbrane aminokislina, ki smo jih zamenjali, očitno ne vplivajo na vezavo Tsl na lipidne membrane, saj bi v nasprotnem primeru opazili vsaj manjšo spremembo v intenziteti signala vezanega Tsl. Za določitev regij Tsl, ki so odgovorne za vezavo na lipidne membrane, bi morali zasnovati še več različnih mutant, saj so te lahko kje drugje v predvidenih regijah CH oziroma v kakšnem drugem delu domene MACPF ali proteina.

Nazadnje smo vezavo Tsl na liposome pokazali še s presevno elektronsko mikroskopijo v kombinaciji z imunolokalizacijo (sl. 46).



Slika 52: Shema vezave proteina Torso-like (Tsl) na lipidne membrane. Stopnja vezave je večja na lipidne membrane z večjo ukrivljenostjo in s kompleksno lipidno sestavo. Tsl se stabilno veže na lipidni dvosloj, pri vezavi pa sodeluje tako N-terminalni del proteina (rumeno) kakor tudi domena MACPF (rdeče). *PC*, fosfatidilholin; *SM*, sfingomielin; *CH*, holesterol.

Figure 52: Schematic presentation of Torso-like protein (Tsl) binding to the lipid membrane. The degree of binding is greater to the lipid membranes with a greater curvature and a complex lipid composition. Both N-terminal region of Tsl and its MACPF domain contribute to stable binding of Tsl to the lipid bilayer. *PC*, phosphatidylcholine; *SM*, sphingomyelin; *CH*, cholesterol.



## 5.5 VLOGA LISTERIOLIZINA O PRI POBEGU LISTERIJE IZ FAGOSOMA V CITOSOL

Pri preučevanju vloge listeriolizina O pri pobegu bakterije *Listeria monocytogenes* zaradi tehničnih omejitev nismo uspeli narediti več kot teoretične zasnove poskusa ter preliminarnih poskusov. Evropska direktiva 93/88/EEC (COUNCIL DIRECTIVE ..., 1993) bakterijo *Listeria monocytogenes* uvršča med patogene biološke dejavnike 2. skupine in zahteva za delo z njo zadrževalne ukrepe 2. stopnje. Po Zakonu o ravnanju z GSO delo z listerijo uvrščamo v 2. varnostni razred. Zasnovan poskus zahteva opazovanje sprememb na GUV v prisotnosti listerije v realnem času s konfokalno mikroskopijo. Od razpoložljivih mikroskopov nobeden ni bil vključen v laboratorij za delo z GSO v 2. varnostnem razredu. Za poskus nam je uspelo izraziti rekombinantni LLO v topni obliki, ki bi nam rabil za kontrolni poskus. S permeabilizacijo GUV smo pokazali, da je LLO aktiven in da tvori pore s hidrodinamskim premerom med 4,5 - 5 nm. Za ta poskus in na splošno za poskuse na GUV iz membran kompleksne sestave smo razvili metodo za pripravo GUV iz eritrocitnih membran (Mikelj in sod., 2013). Čeprav nam ni uspelo preučiti vloge LLO pri pobegu listerije iz fagosoma v citosol, upamo, da bodo naši preliminarni poskusi služili kot dobra osnova za nadaljnje preučevanje vloge LLO pri tem procesu.

## 6 SKLEPI

- Izražanje rekombinantnih (izbranih) proteinov MACPF v topni obliki je problematično, saj so večinoma veliki, kompleksno zviti in vsebujejo številne hidrofobne regije, poleg tega nekateri vsebujejo več potencialnih mest za glikozilacijo in/ali tvorbo disulfidnih mostičkov.
- Izbrani proteini MACPF tudi ob prisotnosti OlyA niso hemolitično aktivni.
- S pomočjo visokozmogljive presejalne metode s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije in afinitetne ločbe s pomočjo magnetnih kroglic, označenih s streptavidinom smo interakcije z lipidnimi membranami pokazali za hipotetični protein patogene bakterije *Chryseobacterium gleum*, Torso-like (Tsl), domeno MACPF in N-terminalni del Tsl iz vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Interakcije z lipidnimi membranami smo opazili tudi pri domeni Jacalin hipotetičnega proteina iz rastlinske patogene bakterije *Ralstonia solanacearum*, ter pri domnevni C-terminalni domeni APC- $\beta$  proteina PfPLP4 iz parazita *Plasmodium falciparum*.
- Prisotnost dodatnih domen poleg MACPF z napovedano vezavo na membrane ne pomeni nujno interakcije proteina z membrano. Poleg tega se nekateri proteini z domeno MACPF lahko povezujejo z lipidnimi membranami, tudi če ne vsebujejo drugih domen.
- Strukturne lastnosti domene MACPF so pomembne za vstavitvev proteina v lipidni dvosloj oziroma za tvorbo pore. Domnevna skupka  $\alpha$ -vijačnic hipotetičnega proteina iz bakterije *C. gleum* sta prekratka za prečenje lipidnega dvosloja, pri Tsl pa dovolj dolga, da bi proteinu lahko omogočila stabilno vstavitvev v membrano a preveč hidrofobna za tvorbo pore.
- Pri vezavi Tsl na lipidne membrane sta vključeni vsaj dve regiji: ena znotraj N-terminalnega dela proteina in ena znotraj domene MACPF.
- Tsl se stabilno veže na lipidne vezikle. Afiniteta vezave je večja na lipidne membrane oziroma na predele membran z večjo ukrivljenostjo. Tsl se nespecifično veže na membrane in za vezavo verjetno ni pomembna specifičnost receptorja, temveč njegov hidrofobni značaj.
- Za listeriolizin O nismo opazili, da bi induciral nastanek uvihkov ali internih veziklov v GUV. Poleg tega nam ni uspelo pojasniti vloge listeriolizina O pri pobegu bakterije *Listeria monocytogenes* iz fagosoma v citosol.

## 7 POVZETEK

### 7.1 POVZETEK

Naddružina proteinov MACPF/CDC vsebuje veliko število tako litičnih kot nelitičnih proteinov iz skoraj vseh življenjskih oblik. Člani naddružine imajo različne vloge in sodelujejo pri patogenezi, imunosti, plenjenju, razvoju idr., za večino pa je vloga slabo opisana oziroma še neznana. To velja zlasti za proteine MACPF, ki jih med drugim najdemo pri različnih parazitskih in patogenih organizmih, pri katerih se domneva, da zanje ti proteini pomenijo pomemben dejavnik pri patogenosti. Pri nekaterih drugih organizmih so proteini MACPF vključeni v razvoj organizma, vendar je njihovo delovanje slabo raziskano. Do sedaj opisani proteini naddružine MACPF/CDC svojo vlogo opravljajo preko interakcij z membranami, za kar številni, poleg skupne domene MACPF/CDC, vsebujejo še dodatne domene za vezavo na lipidne membrane.

V sklopu naših raziskav smo želeli preučiti pomen domenske organiziranosti, zlasti prisotnost dodatnih proteinskih domen in strukturnih lastnosti domene MACPF, na interakcije proteinov MACPF z lipidnimi membranami. V ta namen smo pripravili 20 različnih konstruktov tako zrelih proteinov MACPF kot njihovih krajših domen in jih izrazili s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije ter z različnimi metodami preučevali interakcije izraženih proteinov z lipidnimi vezikli različnih velikosti in sestave.

Ugotovili smo, da je izražanje rekombinantnih izbranih proteinov MACPF (in verjetno proteinov MACPF na splošno) zahtevno, saj nam nekaterih proteinov ni uspeli izraziti, večina pa se je izrazila v netopni obliki. V nekaterih primerih smo uspeli donos in topnost proteinov izboljšati z dodatkom lipidnih veziklov pred sintezo. Izbrani proteini niso bili hemolitično aktivni, aktivnost se prav tako ni izboljšala ob prisotnosti ostreolizina A, ki v primeru glivnega proteina MACPF pleurotolizina B deluje kot posrednik za vezavo na membrano. Vzrok za neaktivnost je lahko nepravilna zvitost proteinov, odsotnost pravega vezavnega partnerja za interakcijo z membranami ali pa vloga teh proteinov ne vključuje lize celic. Kljub temu, da niso hemolitično aktivni, smo s pomočjo visokozmogljive presejalne metode s sistemom *in vitro* transkripcije-translacije in afinitetne ločbe z magnetnimi kroglicami, označenimi s streptavidinom za šest izbranih proteinskih konstruktov pokazali vezavo na membrane lipidnih veziklov. Izmed 11 konstruktov, za katere smo glede na bioinformacijsko napoved pričakovali vezavo na membrano, smo vezavo opazili le pri domeni Jacalin hipotetičnega proteina iz rastlinske patogene bakterije *Ralstonia solanacearum* in domnevni C-terminalni domeni APC- $\beta$  proteina PfPLP4 iz parazita *Plasmodium falciparum*. Večine drugih proteinov nam ni uspelo pridobiti v topni obliki. Presenetljivo smo interakcije z membranami zasledili pri hipotetičnemu proteinu patogene bakterije *Chryseobacterium gleum* in pri proteinu Torso-like (Tsl) iz vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) ter krajšima konstruktoma Tsl, domeni MACPF ter N-terminalnemu delu Tsl. Slednji za razliko od prej omenjenih

11 konstruktov, ne vsebujejo dodatnih napovedanih domen za vezavo na membrano. Glede na rezultate vsebnost dodatnih domen z napovedano vezavo na membrane ne pomeni nujno, da se protein res veže na membrano. Velja tudi nasprotno, da se lahko nekateri proteini MACPF povezujejo z lipidnimi membranami tudi brez dodatnih domen.

Z zgoraj opisano visokozmogljivo presejalno metodo ter s testom flotacije v saharoznem gradientu smo podrobneje preučevali vezavo proteina Torso-like na membrane liposomov. Ugotovili smo, da se Tsl veže na vezikle z različnimi lipidnimi sestavami in da je vezava Tsl na lipidne membrane stabilna. Glede na strukturne in fizikalno-kemijske značilnosti dveh regij skupkov vijačnic alfa znotraj domene MACPF, bi se Tsl lahko stabilno vgradil v lipidni dvosloj. Vezavo proteina na lipidne membrane pa poleg domene MACPF posreduje tudi regija znotraj N-terminalnega dela proteina. Predvidevamo, da se Tsl veže predvsem na dele membran z večjo ukrivljenostjo in da za vezavo verjetno ni pomembna specifičnost receptorja, temveč njegov hidrofobni značaj.

V drugem sklopu naših raziskav smo želeli pojasniti vlogo listeriolizina O iz družine proteinov CDC pri pobegu bakterije *Listeria monocytogenes* iz fagosoma v citosol. Zaradi tehničnih omejitev nam to ni uspelo, kljub temu pa bodo naša teoretična zasnova poskusa in preliminarni poskusi lahko služili, kot podlaga za nadaljnje preučevanje vloge listeriolizina O pri tem procesu.

## 7.2 SUMMARY

MACPF/CDC protein superfamily comprises a large number of both lytic and non-lytic proteins from almost all domains of life. Members of this superfamily have different roles and can participate in either the pathogenicity, immunity, attacking prey, development, etc. However for the majority the role is either unknown or poorly described. This is particularly true for MACPF proteins which are, among others, produced by a variety of parasitic and pathogenic organisms where they are thought to play an important role in pathogenicity. In some other organisms MACPF proteins are involved in the development of the organism however their function is poorly understood. MACPF/CDC proteins described to date exert their role through interactions with lipid membranes for which the majority of them contain additional membrane binding domains beside the common MACPF/CDC domain.

The aim of our study was to describe the importance of domain architecture on the interaction of MACPF proteins with lipid membranes, particularly how the presence of additional protein domains and structural properties of the MACPF domain affect the binding. For this purpose, we have prepared 20 different constructs of both mature MACPF proteins and their shorter domains which we have expressed by an *in vitro* transcription-translation system and used different methods to study their interactions with lipid vesicles of different size and composition.

We have found that the selected recombinant MACPF proteins (and probably MACPF proteins in general) are hard to produce. We were unable to synthesise some of the proteins and the majority of others were expressed in insoluble form. In some cases we were able to improve the yield and solubility of the proteins with the addition of the lipid vesicles to the synthesis. Selected proteins were not hemolytically active on their own and not even in the presence of ostreolysin A, which is responsible for membrane binding of the fungal MACPF protein PlyB. The reason for this could be the improper protein fold, the absence of binding partner for interaction with membranes, or simply because the role of these proteins is mediated by other means than cell lysis. By using high throughput screening method for detecting protein-membrane interactions we showed that six of the selected protein constructs interact with liposomes. The above mentioned method combines the *in vitro* transcription-translation system for protein synthesis and streptavidin-coupled magnetic beads for separation of free and membrane bound proteins. Based on the bioinformatics prediction of additional domains for binding to membranes we expected interactions with liposomes for eleven of our selected constructs. However we observed binding to lipid membranes for only two of them: Jacalin domain from the hypothetical protein from plant pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* and for predicted C-terminal APC- $\beta$  domain of protein PfPLP4 from *Plasmodium falciparum*. Most of the remainder nine proteins we were unable to produce in soluble form. Surprisingly we observed interactions with membranes in the case of a hypothetical

protein from pathogenic bacteria *Chryseobacterium gleum* and Torso-like protein (Tsl) from fruit fly (*Drosophila melanogaster*) and its shorter constructs: MACPF domain and N-terminal region. These constructs, in contrast to the previously mentioned eleven ones do not contain any additional domains for membrane binding. According to the results the presence of additional domains with the predicted binding to membranes does not necessarily mean that the protein interacts with a membrane. Conversely, some MACPF proteins are able to bind to lipid membranes in the absence of additional domains.

With the use of the above-described high throughput screening method and with the flotation assay we further studied the membrane binding characteristics of protein Torso-like. We have found that Tsl binds to vesicles of different lipid composition and that the binding is stable. Based on the structural and physico-chemical characteristics of the two regions of clusters of helices within the MACPF domain stable binding could be achieved by partial insertion of this protein region into the lipid bilayer. In addition to the MACPF domain we showed that N-terminal region of the protein is also responsible for interactions with lipid membranes. We assume that Tsl binds mainly to the parts of the membranes with greater curvature and that rather than the specificity of the receptor its hydrophobic character is important for Tsl binding to lipid membranes.

In the second section of our research we wanted to illustrate the role that the listeriolysin O from CDC protein family has in escape of bacteria *Listeria monocytogenes* from phagosome into the cytosol. However due to technical limitations we were unsuccessful in doing so. Nonetheless our theoretical design of the experiment and preliminary experiments may serve as a basis for further study of the role of listeriolysin O in this process.

## 8 VIRI

- Alberti-Segui C., Goeden K. R., Higgins D. E. 2007. Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. *Cellular Microbiology*, 9, 1: 179–195
- Aleshin A. E., DiScipio R. G., Stec B., Liddington R. C. 2012a. Crystal Structure of C5b-6 Suggests Structural Basis for Priming Assembly of the Membrane Attack Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 23: 19642–19652
- Aleshin A. E., Schraufstatter I. U., Stec B., Bankston L. A., Liddington R. C., DiScipio R. G. 2012b. Structure of complement C6 suggests a mechanism for initiation and unidirectional, sequential assembly of membrane attack complex (MAC). *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 13: 10210–10222
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 17: 3389–3402
- Ambroggio E. E., Separovic F., Bowie J. H., Fidelio G. D., Bagatolli L. A. 2005. Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophysical journal*, 89, 3: 1874–1881
- Anderluh G., Kisovec M., Kraševc N., Gilbert R. J. C. 2014. Distribution of MACPF/CDC proteins. *Sub-Cellular Biochemistry*, 80: 7–30
- Anderluh G., Lakey J. H. 2008. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 10: 482–490
- Angelova M. I., Dimitrov D. S. 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 81: 303
- Aricescu A. R., Lu W., Jones E. Y. 2006. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 62, Pt 10: 1243–1250
- Bagatolli L. A., Parasassi T., Gratton E. 2000. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods: a two photon fluorescence microscopy study. *Chemistry and physics of lipids*, 105, 2: 135–147
- Bakrac B., Gutiérrez-Aguirre I., Podlesek Z., Sonnen A. F.-P., Gilbert R. J. C., Macek P., Lakey J. H., Anderluh G. 2008. Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 27: 18665–18677
- Baran K., Dunstone M., Chia J., Ciccone A., Browne K. A., Clarke C. J. P., Lukoyanova N., Saibil H., Whisstock J. C., Voskoboinik I., Trapani J. A. 2009. The molecular

- basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity*, 30, 5: 684–695
- Bavdek A., Kostanjšek R., Antonini V., Lakey J. H., Dalla Serra M., Gilbert R. J. C., Anderluh G. 2011. pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. *FEBS Journal*, 279, 1: 126–141
- Beauregard K. E., Lee K. D., Collier R. J., Swanson J. A. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 7: 1159–1163
- Becker W. M., Kleinsmith L. J., Hardin J., Bertoni G. P. 2009. *The World of the Cell*, 7<sup>th</sup> ed. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings Publishing: 912 str.
- Bonev B. B., Lam Y.-H., Anderluh G., Watts A., Norton R. S., Separovic F. 2003. Effects of the eukaryotic pore-forming cytolysin Equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin. *Biophysical Journal*, 84, 4: 2382–2392
- Bourdeau R. W., Malito E., Chenal A., Bishop B. L., Musch M. W., Villereal M. L., Chang E. B., Mosser E. M., Rest R. F., Tang W.-J. 2009. Cellular functions and X-ray structure of anthrolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin secreted by *Bacillus anthracis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 21: 14645–14656
- Brönner G., Jäckle H. 1991. Control and function of terminal gap gene activity in the posterior pole region of the *Drosophila* embryo. *Mechanisms of Development*, 35, 3: 205–211
- Brönner G., Jäckle H. 1996. Regulation and function of the terminal gap gene *huckebein* in the *Drosophila* blastoderm. *The International Journal of Developmental Biology*, 40, 1: 157–165
- Carrero J. A., Calderon B., Unanue E. R. 2004. Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 172, 8: 4866–4874
- Carrero J. A., Vivanco-Cid H., Unanue E. R. 2012. Listeriolysin o is strongly immunogenic independently of its cytotoxic activity. *PloS One*, 7, 3: e32310
- Casali A., Casanova J. 2001. The spatial control of Torso RTK activation: a C-terminal fragment of the Trunk protein acts as a signal for Torso receptor in the *Drosophila* embryo. *Development* (Cambridge, England), 128, 9: 1709–1715
- Casanova J., Furriols M., McCormick C. A., Struhl G. 1995. Similarities between trunk and *spätzle*, putative extracellular ligands specifying body pattern in *Drosophila*. *Genes & Development*, 9, 20: 2539–2544
- Casanova J., Struhl G. 1989. Localized surface activity of torso, a receptor tyrosine kinase, specifies terminal body pattern in *Drosophila*. *Genes & Development*, 3, 12B: 2025–2038



- Chauhan J. S., Bhat A. H., Raghava G. P. S., Rao A. 2012. GlycoPP: A Webserver for Prediction of N- and O-Glycosites in Prokaryotic Protein Sequences. *PLoS ONE*, 7, 7: e40155, doi: 10.1371/journal.pone.0040155: 13 str.
- Chauhan J. S., Rao A., Raghava G. P. S. 2013. In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. *PLoS ONE*, 8, 6: e67008, doi: 10.1371/journal.pone.0067008: 10 str.
- Cheng L. W., Portnoy D. A. 2003. *Drosophila* S2 cells: an alternative infection model for *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, 5, 12: 875–885
- Chen R., Jiang X., Sun D., Han G., Wang F., Ye M., Wang L., Zou H. 2009. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *Journal of Proteome Research*, 8, 2: 651–661
- Cho W., Bittova L., Stahelin R. V. 2001. Membrane binding assays for peripheral proteins. *Analytical Biochemistry*, 296, 2: 153–161
- Cole C., Barber J. D., Barton G. J. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 36: W197–W201
- Consortium T. U. 2014. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 42: D191–D198
- COUNCIL DIRECTIVE 93/88/EEC of 12 October 1993 amending Directive 90/679/EEC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. *Official Journal*, 1993, L268: 71-82
- Czajkowsky D. M., Hotze E. M., Shao Z., Tweten R. K. 2004. Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. *The EMBO journal*, 23, 16: 3206–3215
- Dancz C. E., Haraga A., Portnoy D. A., Higgins D. E. 2002. Inducible control of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*: temporal requirement of listeriolysin O during intracellular infection. *Journal of Bacteriology*, 184, 21: 5935–5945
- Dang T. X., Hotze E. M., Rouiller I., Tweten R. K., Wilson-Kubalek E. M. 2005. Prepore to pore transition of a cholesterol-dependent cytolysin visualized by electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 150, 1: 100–108
- Dankert J. R., Shiver J. W., Esser A. F. 1985. Ninth component of complement: self-aggregation and interaction with lipids. *Biochemistry*, 24, 11: 2754–2762
- DiScipio R. G., Berlin C. 1999. The architectural transition of human complement component C9 to poly(C9). *Molecular Immunology*, 36, 9: 575–585
- Döbereiner H. G., Käs J., Nopp D., Sprenger I., Sackmann E. 1993. Budding and fission of vesicles. *Biophysical Journal*, 65, 4: 1396–1403

- Duncan E. J., Benton M. A., Dearden P. K. 2013. Canonical terminal patterning is an evolutionary novelty. *Developmental Biology*, 377, 1: 245–261
- Duncan E. J., Johnson T. K., Whisstock J. C., Warr C. G., Dearden P. K. 2014. Capturing embryonic development from metamorphosis: how did the terminal patterning signalling pathway of *Drosophila* evolve? *Current Opinion in Insect Science*, 1: 45–51
- Ecker A., Pinto S. B., Baker K. W., Kafatos F. C., Sinden R. E. 2007. *Plasmodium berghei*: plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Experimental Parasitology*, 116, 4: 504–508
- Edelson B. T., Unanue E. R. 2001. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity*, 14, 5: 503–512
- Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300, 4: 1005–1016
- Estes D. J., Mayer M. 2005. Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochimica et biophysica acta*, 1712, 2: 152–160
- Fargnoli J., Waring G. L. 1982. Identification of vitelline membrane proteins in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 92, 2: 306–314
- Farrand A. J., LaChapelle S., Hotze E. M., Johnson A. E., Tweten R. K. 2010. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 9: 4341–4346
- Feil S. C., Ascher D. B., Kuiper M. J., Tweten R. K., Parker M. W. 2014. Structural studies of *Streptococcus pyogenes* streptolysin O provide insights into the early steps of membrane penetration. *Journal of Molecular Biology*, 426, 4: 785–792
- Finn R. D., Bateman A., Clements J., Coghill P., Eberhardt R. Y., Eddy S. R., Heger A., Hetherington K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer E. L. L., Tate J., Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42, D1: D222–D230
- Flanagan J. J., Tweten R. K., Johnson A. E., Heuck A. P. 2009. Cholesterol exposure at the membrane surface is necessary and sufficient to trigger perfringolysin O binding. *Biochemistry*, 48, 18: 3977–3987
- Funakoshi K., Suzuki H., Takeuchi S. 2007. Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 42: 12608–12609

- Furriols M., Casanova J. 2003. In and out of Torso RTK signalling. *The EMBO journal*, 22, 9: 1947–1952
- Furriols M., Ventura G., Casanova J. 2007. Two distinct but convergent groups of cells trigger Torso receptor tyrosine kinase activation by independently expressing torso-like. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 28: 11660–11665
- Gabriel D. W., Allen C., Schell M., Denny T. P., Greenberg J. T., Duan Y. P., Flores-Cruz Z., Huang Q., Clifford J. M., Presting G., González E. T., Reddy J., Elphinstone J., Swanson J., Yao J., Mulholland V., Liu L., Farmerie W., Patnaikuni M., Balogh B., Norman D., Alvarez A., Castillo J. A., Jones J., Saddler G., Walunas T., Zhukov A., Mikhailova N. 2006. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 1: 69–79
- Gaillard J. L., Berche P., Mounier J., Richard S., Sansonetti P. 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and Immunity*, 55, 11: 2822–2829
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. V: The Proteomics Protocols Handbook. Walker J.M. (ed.). Totowa, New Jersey, Humana Press: 571–607
- Gedde M. M., Higgins D. E., Tilney L. G., Portnoy D. A. 2000. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 68, 2: 999–1003
- Geer L. Y., Marchler-Bauer A., Geer R. C., Han L., He J., He S., Liu C., Shi W., Bryant S. H. 2010. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research*, 38, (suppl1): D492–496
- Gekara N. O., Weiss S. 2004. Lipid rafts clustering and signalling by listeriolysin O. *Biochemical Society Transactions*, 32, Pt 5: 712–714
- Gertz E. M., Yu Y.-K., Agarwala R., Schäffer A. A., Altschul S. F. 2006. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC biology*, 4: 41
- Giddings K. S., Zhao J., Sims P. J., Tweten R. K. 2004. Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 12: 1173–1178
- Gilbert R. J. C., Dalla Serra M., Froelich C. J., Wallace M. I., Anderluh G. 2014. Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends in Biochemical Sciences*, 39, 11: 510–516

- Gilbert R. J. C., Mikelj M., Dalla Serra M., Froelich C. J., Anderluh G. 2012. Effects of MACPF/CDC proteins on lipid membranes. *Cellular and molecular life sciences*, 70, 12: 2083–98
- Gilbert R. J. C. 2010. Cholesterol-dependent cytolysins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 677: 56–66
- Gilbert R. J., Jiménez J. L., Chen S., Tickle I. J., Rossjohn J., Parker M., Andrew P. W., Saibil H. R. 1999. Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell*, 97, 5: 647–655
- Gilbert R. 2014. Structural features of cholesterol dependent cytolysins and comparison to other MACPF-domain containing proteins. *Sub-Cellular Biochemistry*, 80: 47–62
- Gómez-Hens A., Manuel Fernández-Romero J. 2005. The role of liposomes in analytical processes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24, 1: 9–19
- Gonzalez M. R., Bischofberger M., Frêche B., Ho S., Parton R. G., van der Goot F. G. 2011. Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cellular Microbiology*, 13, 7: 1026–1043
- Gonzalez M. R., Bischofberger M., Pernot L., van der Goot F. G., Frêche B. 2008. Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cellular and molecular life sciences*, 65, 3: 493–507
- Grillo M., Furriols M., de Miguel C., Franch-Marro X., Casanova J. 2012. Conserved and divergent elements in Torso RTK activation in *Drosophila* development. *Scientific Reports*, 2, 762: 1-7
- Guan X. L., Cestra G., Shui G., Kuhrs A., Schittenhelm R. B., Hafen E., van der Goot F. G., Robinett C. C., Gatti M., Gonzalez-Gaitan M., Wenk M. R. 2013. Biochemical membrane lipidomics during *Drosophila* development. *Developmental cell*, 24, 1: 98–111
- Haag E. S., Sly B. J., Andrews M. E., Raff R. A. 1999. Apextrin, a novel extracellular protein associated with larval ectoderm evolution in *Heliocidaris erythrogramma*. *Developmental Biology*, 211, 1: 77–87
- Hadders M. A., Beringer D. X., Gros P. 2007. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science*, 317, 5844: 1552–1554
- Hadders M. A., Bubeck D., Roversi P., Hakobyan S., Forneris F., Morgan B. P., Pangburn M. K., Llorca O., Lea S. M., Gros P. 2012. Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Reports*, 1, 3: 200–207

- Hamon M. A., Batsché E., Régnault B., Tham T. N., Seveau S., Muchardt C., Cossart P. 2007. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 33: 13467–13472
- Hamon M. A., Ribet D., Stavru F., Cossart P. 2012. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in Microbiology*, 20, 8: 360–368
- Hemberger M., Himmelbauer H., Ruschmann J., Zeitz C., Fundele R. 2000. cDNA subtraction cloning reveals novel genes whose temporal and spatial expression indicates association with trophoblast invasion. *Developmental Biology*, 222, 1: 158–169
- Henry R., Shaughnessy L., Loessner M. J., Alberti-Segui C., Higgins D. E., Swanson J. A. 2006. Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, 8, 1: 107–119
- Henstridge M. A., Johnson T. K., Warr C. G., Whisstock J. C. 2014. Trunk cleavage is essential for *Drosophila* terminal patterning and can occur independently of Torso-like. *Nature Communications*, 5: 3419
- Hessa T., Meindl-Beinker N. M., Bernsel A., Kim H., Sato Y., Lerch-Bader M., Nilsson I., White S. H., von Heijne G. 2007. Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. *Nature*, 450, 7172: 1026–1030
- Heuck A. P., Savva C. G., Holzenburg A., Johnson A. E. 2007. Conformational changes that effect oligomerization and initiate pore formation are triggered throughout perforin O upon binding to cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 31: 22629–22637
- Hirokawa T., Boon-Chieng S., Mitaku S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14, 4: 378–379
- Hofmann K., Stoffel W. 1993. A database of membrane spanning protein segments. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 374: 166–166
- Höfer C. T., Herrmann A., Müller P. 2010. Use of liposomes for studying interactions of soluble proteins with cellular membranes. *Methods in molecular biology*, 606: 69–82
- Horwitz M. A., Maxfield F. R. 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *The Journal of cell biology*, 99, 6: 1936–1943
- Hotze E. M., Tweten R. K. 2012. Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818, 4: 1028–1038

- Huang C. 1969. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8, 1: 344–352
- Huang G., Liu H., Han Y., Fan L., Zhang Q., Liu J., Yu X., Zhang L., Chen S., Dong M., Wang L., Xu A. 2007. Profile of acute immune response in Chinese amphioxus upon *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 31, 10: 1013–1023
- Iacovache I., van der Goot F. G., Pernot L. 2008. Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778, 7-8: 1611–1623
- Ishino T., Chinzei Y., Yuda M. 2005. A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cellular Microbiology*, 7, 2: 199–208
- Jeyaprakash A. A., Geetha Rani P., Banuprakash Reddy G., Banumathi S., Betzel C., Sekar K., Surolia A., Vijayan M. 2002. Crystal structure of the jacalin-T-antigen complex and a comparative study of lectin-T-antigen complexes. *Journal of Molecular Biology*, 321, 4: 637–645
- Jiménez G., González-Reyes A., Casanova J. 2002. Cell surface proteins Nasrat and Polehole stabilize the Torso-like extracellular determinant in *Drosophila* oogenesis. *Genes & development*, 16, 8: 913–918
- Johnson T. K., Crossman T., Foote K. A., Henstridge M. A., Saligari M. J., Beadle L. F., Herr A., Whisstock J. C., Warr C. G. 2013. Torso-like functions independently of Torso to regulate *Drosophila* growth and developmental timing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 36: 14688-14692
- Kadota K., Ishino T., Matsuyama T., Chinzei Y., Yuda M. 2004. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 46: 16310–16315
- Kafsack B. F. C., Carruthers V. B. 2010. Apicomplexan perforin-like proteins. *Communicative & Integrative Biology*, 3, 1: 18–23
- Kafsack B. F. C., Pena J. D. O., Coppens I., Ravindran S., Boothroyd J. C., Carruthers V. B. 2009. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science*, 323, 5913: 530–533
- Kalman S., Mitchell W., Marathe R., Lammel C., Fan J., Hyman R. W., Olinger L., Grimwood J., Davis R. W., Stephens R. S. 1999. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genetics*, 21, 4: 385–389
- Khalifat N., Puff N., Bonneau S., Fournier J.-B., Angelova M. I. 2008. Membrane deformation under local pH gradient: mimicking mitochondrial cristae dynamics. *Biophysical journal*, 95, 10: 4924–4933

- Kisovec M. 2012. Razširjenost proteinske domene MACPF. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 48 str.
- Koles K., Lim J.-M., Aoki K., Porterfield M., Tiemeyer M., Wells L., Panin V. 2007. Identification of N-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Glycobiology*, 17, 12: 1388–1403
- Kondos S. C., Hatfaludi T., Voskoboinik I., Trapani J. A., Law R. H. P., Whisstock J. C., Dunstone M. A. 2010. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens*, 76, 5: 341–351
- Kontermann R., Rauterberg E. W. 1989. N-deglycosylation of human complement component C9 reduces its hemolytic activity. *Molecular Immunology*, 26, 12: 1125–1132
- Köster S., van Pee K., Hudel M., Leustik M., Rhinow D., Kühlbrandt W., Chakraborty T., Yildiz Ö. 2014. Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation. *Nature Communications*, 5: 3690
- Kuhn M., Kathariou S., Goebel W. 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 56, 1: 79–82
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 21: 2947–2948
- Lasic D. D. 1993. *Liposomes: from physics to applications*. Michigan, Elsevier: 575 str.
- Law R. H. P., Lukoyanova N., Voskoboinik I., Caradoc-Davies T. T., Baran K., Dunstone M. A., D'Angelo M. E., Orlova E. V., Coulibaly F., Verschoor S., Browne K. A., Ciccone A., Kuiper M. J., Bird P. I., Trapani J. A., Saibil H. R., Whisstock J. C. 2010. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*, 468, 7322: 447–451
- Letunic I., Doerks T., Bork P. 2012. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 40: D302–D305
- Lovelace L. L., Cooper C. L., Sodetz J. M., Lebioda L. 2011. Structure of human C8 protein provides mechanistic insight into membrane pore formation by complement. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 20: 17585–17592
- Lu G., Moriyama E. N. 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 4: 378–388
- Lukacs G. L., Rotstein O. D., Grinstein S. 1990. Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 34: 21099–21107

- Lukoyanova N., Kondos S. C., Farabella I., Law R. H. P., Reboul C. F., Caradoc-Davies T. T., Spicer B. A., Kleifeld O., Traore D. A. K., Ekkel S. M., Voskoboinik I., Trapani J. A., Hatfaludi T., Oliver K., Hotze E. M., Tweten R. K., Whisstock J. C., Topf M., Saibil H. R., Dunstone M. A. 2015. Conformational Changes during Pore Formation by the Perforin-Related Protein Pleurotolysin. *PLoS Biol*, 13, 2: e1002049
- Lukoyanova N., Saibil H. R. 2008. Friend or foe: the same fold for attack and defense. *Trends in Immunology*, 29, 2: 51–53
- Macek P., Lebez D. 1981. Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Effect of some ions and pH. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 19, 2: 233–240
- Mally M., Majhenc J., Svetina S., Zeks B. 2002. Mechanisms of equinatoxin II-induced transport through the membrane of a giant phospholipid vesicle. *Biophysical journal*, 83, 2: 944–953
- Marchioretto M., Podobnik M., Dalla Serra M., Anderluh G. 2013. What planar lipid membranes tell us about the pore-forming activity of cholesterol-dependent cytolysins. *Biophysical Chemistry*, 182: 64–70
- Marquis H., Doshi V., Portnoy D. A. 1995. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 63, 11: 4531–4534
- Mayer L. D., Hope M. J., Cullis P. R. 1986. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et biophysica acta*, 858, 1: 161–168
- Meyer-Morse N., Robbins J. R., Rae C. S., Mochegova S. N., Swanson M. S., Zhao Z., Virgin H. W., Portnoy D. 2010. Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. *PloS One*, 5, 1: e8610
- Mikelj M., Praper T., Demič R., Hodnik V., Turk T., Anderluh G. 2013. Electroformation of giant unilamellar vesicles from erythrocyte membranes under low-salt conditions. *Analytical biochemistry*, 435, 2: 174–180
- Montes L.-R., Alonso A., Goñi F. M., Bagatolli L. A. 2007. Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions. *Biophysical Journal*, 93, 10: 3548–3554
- Moretti S., Armougom F., Wallace I. M., Higgins D. G., Jongeneel C. V., Notredame C. 2007. The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Research*, 35, Web Server issue: W645–648
- Morita-Yamamuro C., Tsutsui T., Sato M., Yoshioka H., Tamaoki M., Ogawa D., Matsuura H., Yoshihara T., Ikeda A., Uyeda I., Yamaguchi J. 2005. The



- Arabidopsis gene CAD1 controls programmed cell death in the plant immune system and encodes a protein containing a MACPF domain. *Plant & Cell Physiology*, 46, 6: 902–912
- Moscho A., Orwar O., Chiu D. T., Modi B. P., Zare R. N. 1996. Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 21: 11443–11447
- Müller-Eberhard H. J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annual Review of Biochemistry*, 57: 321–347
- Nicholas K.B., Nicholas H.B., Deerfield D.W. II. 1997 *GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation*, Embnew News, 4: 14
- Nichols-Smith S., Teh S.-Y., Kuhl T. L. 2004. Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 1663, 1-2: 82–88
- Oshiro N., Kobayashi C., Iwanaga S., Nozaki M., Namikoshi M., Spring J., Nagai H. 2004. A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *ActinERIA villosa*. *Toxicon*, 43, 2: 225–228
- Ota K., Leonardi A., Mikelj M., Skočaj M., Wohlschlager T., Künzler M., Aebi M., Narat M., Križaj I., Anderluh G., Sepčič K., Maček P. 2013. Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B. *Biochimie*, 95, 10: 1855–1864
- Pantazatos D. P., MacDonald R. C. 1999. Directly observed membrane fusion between oppositely charged phospholipid bilayers. *The Journal of membrane biology*, 170, 1: 27–38
- Paschen A., Dittmar K. E., Grenningloh R., Rohde M., Schadendorf D., Domann E., Chakraborty T., Weiss S. 2000. Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity. *European Journal of Immunology*, 30, 12: 3447–3456
- Pautot S., Frisken B. J., Weitz D. A. 2003. Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion. *Langmuir*, 19, 7: 2870–2879
- Peterlin P., Arrigler V. 2008. Electroformation in a flow chamber with solution exchange as a means of preparation of flaccid giant vesicles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 64, 1: 77–87
- Petersen T. N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 10: 785–786

- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25, 13: 1605–1612
- Pipkin M. E., Lieberman J. 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology*, 19, 3: 301–308
- Polekhina G., Giddings K. S., Tweten R. K., Parker M. W. 2005. Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3: 600–605
- Ponting C. P. 1999. Chlamydial homologues of the MACPF (MAC/perforin) domain. *Current Biology*, 9, 24: R911–913
- Ponting C. P. 2000. Novel repeats in ryanodine and IP3 receptors and protein O-mannosyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 2: 48–50
- Portnoy D. A., Jacks P. S., Hinrichs D. J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine*, 167, 4: 1459–1471
- Pott T., Bouvrais H., Méléard P. 2008. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chemistry and physics of lipids*, 154, 2: 115–119
- Praper T., Sonnen A. F.-P., Kladnik A., Andrighetti A. O., Viero G., Morris K. J., Volpi E., Lunelli L., Dalla Serra M., Froelich C. J., Gilbert R. J. C., Anderluh G. 2011a. Perforin activity at membranes leads to invaginations and vesicle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 52: 21016–21021
- Praper T., Sonnen A., Viero G., Kladnik A., Froelich C. J., Anderluh G., Dalla Serra M., Gilbert R. J. C. 2011b. Human perforin employs different avenues to damage membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 4: 2946–2955
- Radtke A. L., Anderson K. L., Davis M. J., DiMagno M. J., Swanson J. A., O’Riordan M. X. 2011. *Listeria monocytogenes* exploits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) to escape the phagosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4: 1633–1638
- Ramachandran R., Tweten R. K., Johnson A. E. 2004. Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit  $\beta$ -strand alignment. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 8: 697–705
- Reboul C. F., Whisstock J. C., Dunstone M. A. 2014. A New Model for Pore Formation by Cholesterol-Dependent Cytolysins. *PLoS Comput Biol*, 10, 8: e1003791

- Reddy T. B. K., Thomas A. D., Stamatis D., Bertsch J., Isbandi M., Jansson J., Mallajosyula J., Pagani I., Lobos E. A., Kyrpides N. C. 2015. The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: a metadata management system based on a four level (meta)genome project classification. *Nucleic Acids Research*, 43 (D1): D1099-D1106
- Reeves J. P., Dowben R. M. 1969. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *Journal of Cellular Physiology*, 73, 1: 49–60
- Rewitz K. F., Yamanaka N., Gilbert L. I., O'Connor M. B. 2009. The insect neuropeptide PTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science (New York, N.Y.)*, 326, 5958: 1403–1405
- Ribet D., Hamon M., Gouin E., Nahori M.-A., Impens F., Neyret-Kahn H., Gevaert K., Vandekerckhove J., Dejean A., Cossart P. 2010. *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature*, 464, 7292: 1192–1195
- Riechmann V. 2007. Developmental Biology: Hippo Promotes Posterior Patterning by Preventing Proliferation. *Current Biology*, 17, 23: R1006–R1008
- Rietveld A., Neutz S., Simons K., Eaton S. 1999. Association of Sterol- and Glycosylphosphatidylinositol-linked Proteins with *Drosophila* Raft Lipid Microdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 17: 12049–12054
- Rodriguez N., Pincet F., Cribier S. 2005. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 42, 2: 125–130
- Roiko M. S., Carruthers V. B. 2013. Functional Dissection of *Toxoplasma gondii* Perforin-like Protein 1 Reveals a Dual Domain Mode of Membrane Binding for Cytolysis and Parasite Egress. *The Journal of biological chemistry*, 288, 12: 8712–8725
- Rosado C. J., Buckle A. M., Law R. H. P., Butcher R. E., Kan W.-T., Bird C. H., Ung K., Browne K. A., Baran K., Bashtannyk-Puhlovich T. A., Faux N. G., Wong W., Porter C. J., Pike R. N., Ellisdon A. M., Pearce M. C., Bottomley S. P., Emsley J., Smith A. I., Rossjohn J., Hartland E. L., Voskoboinik I., Trapani J. A., Bird P. I., Dunstone M. A., Whisstock J. C. 2007. A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science*, 317, 5844: 1548–1551
- Rosado C. J., Kondos S., Bull T. E., Kuiper M. J., Law R. H. P., Buckle A. M., Voskoboinik I., Bird P. I., Trapani J. A., Whisstock J. C., Dunstone M. A. 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology*, 10, 9: 1765–1774
- Rossjohn J., Feil S. C., McKinstry W. J., Tweten R. K., Parker M. W. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, 89, 5: 685–692

- Roux A., Cuvelier D., Nassoy P., Prost J., Bassereau P., Goud B. 2005. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *The EMBO journal*, 24, 8: 1537–1545
- Roy A., Kucukural A., Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5, 4: 725–738
- Sankaranarayanan R., Sekar K., Banerjee R., Sharma V., Surolia A., Vijayan M. 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. *Nature Structural Biology*, 3, 7: 596–603
- Savant-Bhonsale S., Montell D. J. 1993. torso-like encodes the localized determinant of *Drosophila* terminal pattern formation. *Genes & Development*, 7, 12B: 2548–2555
- Schnupf P., Portnoy D. A. 2007. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 9, 10: 1176–1187
- Schön P., García-Sáez A. J., Malovrh P., Bacia K., Anderluh G., Schwille P. 2008. Equinatoxin II permeabilizing activity depends on the presence of sphingomyelin and lipid phase coexistence. *Biophysical journal*, 95, 2: 691–698
- Schoppmeier M., Schröder R. 2005. Maternal torso signaling controls body axis elongation in a short germ insect. *Current biology: CB*, 15, 23: 2131–2136
- Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C. P. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11: 5857–5864
- Shatursky O., Heuck A. P., Shepard L. A., Rossjohn J., Parker M. W., Johnson A. E., Tweten R. K. 1999. The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell*, 99, 3: 293–299
- Shepard L. A., Heuck A. P., Hamman B. D., Rossjohn J., Parker M. W., Ryan K. R., Johnson A. E., Tweten R. K. 1998. Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 37, 41: 14563–14574
- Shepard L. A., Shatursky O., Johnson A. E., Tweten R. K. 2000. The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane beta-hairpins. *Biochemistry*, 39, 33: 10284–10293
- Shibata T., Kudou M., Hoshi Y., Kudo A., Nanashima N., Miyairi K. 2010. Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylysin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Toxicon*, 56, 8: 1436–1442

- Silversmith R. E., Nelsestuen G. L. 1986. Interaction of complement proteins C5b-6 and C5b-7 with phospholipid vesicles: effects of phospholipid structural features. *Biochemistry*, 25, 23: 7717–7725
- Slade D. J., Lovelace L. L., Chruszcz M., Minor W., Lebioda L., Sodetz J. M. 2008. Crystal structure of the MACPF domain of human complement protein C8 alpha in complex with the C8 gamma subunit. *Journal of Molecular Biology*, 379, 2: 331–342
- Smialowski P., Doose G., Torkler P., Kaufmann S., Frishman D. 2012. PROSO II--a new method for protein solubility prediction. *The FEBS journal*, 279, 12: 2192–2200
- Smith G. A., Marquis H., Jones S., Johnston N. C., Portnoy D. A., Goldfine H. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infection and Immunity*, 63, 11: 4231–4237
- Snider C., Jayasinghe S., Hristova K., White S. H. 2009. MPEX: a tool for exploring membrane proteins. *Protein Science*, 18, 12: 2624–2628
- Soltani C. E., Hotze E. M., Johnson A. E., Tweten R. K. 2007. Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 51: 20226–20231
- Sonnen A. F.-P., Henneke P. 2014. Structural biology of the membrane attack complex. *Sub-Cellular Biochemistry*, 80: 83–116
- Sonnhammer E. L., von Heijne G., Krogh A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings of International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6: 175–182
- Sprenger F., Nüsslein-Volhard C. 1992. Torso receptor activity is regulated by a diffusible ligand produced at the extracellular terminal regions of the *Drosophila* egg. *Cell*, 71, 6: 987–1001
- Sprenger F., Stevens L. M., Nüsslein-Volhard C. 1989. The *Drosophila* gene torso encodes a putative receptor tyrosine kinase. *Nature*, 338, 6215: 478–483
- Stachowiak J. C., Richmond D. L., Li T. H., Liu A. P., Parekh S. H., Fletcher D. A. 2008. Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 12: 4697–4702
- Steckel E. W., Welbaum B. E., Sodetz J. M. 1983. Evidence of direct insertion of terminal complement proteins into cell membrane bilayers during cytolysis. Labeling by a photosensitive membrane probe reveals a major role for the eighth and ninth components. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 7: 4318–4324

- Stevens L. M., Beuchle D., Jurcsak J., Tong X., Stein D. 2003. The *Drosophila* embryonic patterning determinant torsolike is a component of the eggshell. *Current Biology*, 13, 12: 1058–1063
- Stevens L. M., Frohnhöfer H. G., Klingler M., Nüsslein-Volhard C. 1990. Localized requirement for torso-like expression in follicle cells for development of terminal Anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature*, 346, 6285: 660–663
- Swaminathan B., Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 9, 10: 1236–1243
- Szoka F. Jr, Papahadjopoulos D. 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual review of biophysics and bioengineering*, 9: 467–508
- Tamba Y., Yamazaki M. 2005. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry*, 44, 48: 15823–15833
- Taylor L. D., Nelson D. E., Dorward D. W., Whitmire W. M., Caldwell H. D. 2010. Biological characterization of *Chlamydia trachomatis* plasticity zone MACPF domain family protein CT153. *Infection and Immunity*, 78, 6: 2691–2699
- Tilley S. J., Orlova E. V., Gilbert R. J. C., Andrew P. W., Saibil H. R. 2005. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*, 121, 2: 247–256
- Tilney L. G., Portnoy D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology*, 109, 4 Pt 1: 1597–1608
- Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito K., Sugawara-Tomita N., Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 26: 26975–26982
- Di Tommaso P., Moretti S., Xenarios I., Orobitz M., Montanyola A., Chang J.-M., Taly J.-F., Notredame C. 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39, (Web Server issue): W13–17
- Tschopp J., Masson D., Stanley K. K. 1986. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis. *Nature*, 322, 6082: 831–834
- Tweten R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infection and Immunity*, 73, 10: 6199–6209
- Urrea Moreno R., Gil J., Rodriguez-Sainz C., Cela E., LaFay V., Oloizia B., Herr A. B., Sumegi J., Jordan M. B., Risma K. A. 2009. Functional assessment of perforin C2

- domain mutations illustrates the critical role for calcium-dependent lipid binding in perforin cytotoxic function. *Blood*, 113, 2: 338–346
- Vadia S., Arnett E., Haghghat A.-C., Wilson-Kubalek E. M., Tweten R. K., Seveau S. 2011. The Pore-Forming Toxin Listeriolysin O Mediates a Novel Entry Pathway of *L. monocytogenes* into Human Hepatocytes. *PLoS Pathog*, 7, 11: e1002356, doi: 10.1371/journal.ppat.1002356: 19 str.
- Vailleau F., Sartorel E., Jardinaud M.-F., Chardon F., Genin S., Huguet T., Gentzbittel L., Petitprez M. 2007. Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 2: 159–167
- Ventura G., Furriols M., Martín N., Barbosa V., Casanova J. 2010. *cloaca*, a new gene required for both Torso RTK activation and vitelline membrane integrity. Germline proteins contribute to *Drosophila* eggshell composition. *Developmental Biology*, 344, 1: 224–232
- Vergne I., Constant P., Lanéelle G. 1998. Phagosomal pH Determination by Dual Fluorescence Flow Cytometry. *Analytical Biochemistry*, 255, 1: 127–132
- Virtanen J. A., Cheng K. H., Somerharju P. 1998. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9: 4964–4969
- Vitkova V., Mader M., Podgorski T. 2004. Deformation of vesicles flowing through capillaries. *Europhysics Letters*, 68, 3: 398–404
- Voskoboinik I., Smyth M. J., Trapani J. A. 2006. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*, 6, 12: 940–952
- Voskoboinik I., Thia M.-C., Fletcher J., Ciccone A., Browne K., Smyth M. J., Trapani J. A. 2005. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 9: 8426–8434
- Wadsworth S. J., Goldfine H. 2002. Mobilization of protein kinase C in macrophages induced by *Listeria monocytogenes* affects its internalization and escape from the phagosome. *Infection and Immunity*, 70, 8: 4650–4660
- Walde P., Cosentino K., Engel H., Stano P. 2010. Giant vesicles: preparations and applications. *Chembiochem*, 11, 7: 848–865
- Wallace I. M., O’Sullivan O., Higgins D. G., Notredame C. 2006. M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. *Nucleic Acids Research*, 34, 6: 1692–1699

- Weigel D., Jürgens G., Klingler M., Jäckle H. 1990. Two gap genes mediate maternal terminal pattern information in *Drosophila*. *Science*, 248, 4954: 495–498
- Weiland M. H., Qian Y., Sodetz J. M. 2014. Membrane pore formation by human complement: Functional importance of the transmembrane  $\beta$ -hairpin (TMH) segments of C8 $\alpha$  and C9. *Molecular Immunology*, 57, 2: 310–316
- Weisbrod A., Cohen M., Chipman A. D. 2013. Evolution of the insect terminal patterning system--insights from the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Developmental Biology*, 380, 1: 125–131
- Wesołowska O., Michalak K., Maniewska J., Hendrich A. B. 2009. Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. *Acta biochimica Polonica*, 56, 1: 33–39
- Wolf Y. I., Aravind L., Koonin E. V. 1999. Rickettsiae and Chlamydiae: evidence of horizontal gene transfer and gene exchange. *Trends in Genetics*, 15, 5: 173–175
- Xu L., Huang B., Du H., Zhang X. C., Xu J., Li X., Rao Z. 2010a. Crystal structure of cytotoxin protein suilysin from *Streptococcus suis*. *Protein & Cell*, 1, 1: 96–105
- Xu Q., Abdubek P., Astakhova T., Axelrod H. L., Bakolitsa C., Cai X., Carlton D., Chen C., Chiu H. J., Clayton T., Das D., Deller M. C., Duan L., Ellrott K., Farr C. L., Feuerhelm J., Grant J. C., Grzechnik A., Han G. W., Jaroszewski L., Jin K. K., Klock H. E., Knuth M. W., Kozbial P., Krishna S. S., Kumar A., Lam W. W., Marciano D., Miller M. D., Morse A. T., Nigoghossian E., Nopakun A., Okach L., Puckett C., Reyes R., Tien H. J., Trame C. B., van den Bedem H., Weekes D., Wooten T., Yeh A., Zhou J., Hodgson K. O., Wooley J., Elsliger M. A., Deacon A. M., Godzik A., Lesley S. A., Wilson I. A. 2010b. Structure of a membrane-attack complex/perforin (MACPF) family protein from the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 66, Pt 10: 1297–1305
- Yang J., Roy A., Zhang Y. 2013. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics*, 29, 20: 2588–2595
- Zdobnov E. M., Apweiler R. 2001. InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17, 9: 847–848
- Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 9: 40
- Zheng C., Heintz N., Hatten M. E. 1996. CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science*, 272, 5260: 417–419



## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Tomu Turku za podporo in raziskovalno svobodo.

Iskreno se zahvaljujem somentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu za strokovno vodstvo in širjenje obzorja s številnimi nasveti in idejami, ki so mi pomagali pri znanstvenem razvoju.

Hvala prof. dr. Robertu Gilbertu, da me je sprejel pod svoje vodstvo in za vse nasvete glede izražanja proteinov.

Iskrena hvala prof. dr. Igorju Križaju, prof. dr. Nataši Poklar-Ulrih in prof. dr. Kristini Sepčič za skrben in hiter pregled doktorske naloge.

Doc. dr. Nadi Žnidaršič se zahvaljujem za izvedbo poskusov s presevno elektronsko mikroskopijo.

Viš. zn. sod. dr. Zdravku Podlesku hvala za listerije!

Jelki Lenarčič iskrena hvala za vse DNK konstrukte!

Za pomoč pri fluorescenčni mikroskopiji se zahvaljujem doc. dr. Alešu Kladniku.

Maticu Kisovcu hvala za pomoč pri bioinformatškem brskanju.

Omarju in Taotu hvala za ideje, tenis in pivo!

Nini, Vesni, Katji, Mateju in vsem ostalim sodelavcem hvala za nasvete in predvsem za enkratno vzdušje in nepozabne trenutke.

Saški hvala za vso ljubezen, podporo in potrpljenje.