

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tomaž REMŽGAR

**INTERAKCIJE EGEROLIZINSKEGA PROTEINA
A145 IZ PLESNI *Aspergillus niger* Z MEMBRANSKIMI
LIPIDI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tomaž REMŽGAR

**INTERAKCIJE EGEROLIZINSKEGA PROTEINA A145 IZ PLESNI
Aspergillus niger Z MEMBRANSKIMI LIPIDI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INTERACTION OF AEGEROLYSIN A145 FROM THE MOLD
Aspergillus niger WITH MEMBRANE LIPIDS**

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Poskuse sem opravil v laboratoriju Katedre za biokemijo, na oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je na seji 21. 9. 2015 odobrila predlagano temo in za mentorico imenovala prof. dr. Kristino Sepčič ter za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: Doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: Prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 28. 9. 2016

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

Tomaž Remžgar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579(043.2)
KG	egerolizini/membranski lipidi/žuželke
AV	REMŽGAR, Tomaž
SA	SEPČIČ, Kristina (mentorica)/MAČEK, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2016
IN	INTERAKCIJE EGEROLIZINSKEGA PROTEINA A145 IZ PLESNI <i>Aspergillus niger</i> Z MEMBRANSKIMI LIPIDI
TD	Diplomska naloga (Univerzitetni študij)
OP	X, 38 str., 1 pregl., 23 sl., 29 vir.
IJ	sl
JI	sl / en
AI	Egerolizini so nova skupina proteinov, katerih skupna značilnost je vezava in interakcija z membranskimi lipidi. Proučevali smo interakcijo proteina A145 iz plesni <i>Aspergillus niger</i> z membranskimi lipidi žuželk. Želeli smo dognati, katera skupina lipidov je odgovorna za vezavo proteina in ovrednotiti njegovo interakcijo z glikosfingolipidi. Preverili smo vezavo proteina na liposome, sestavljene iz različnih mešanic lipidov, vezavo s protitelesi označenega proteina na različne lipidne vzorce ter permeabilizacijsko sposobnost proteina proti veziklom, sestavljenim iz različnih lipidnih mešanic. Kot kontrolo smo uporabili protein OlyA iz bukovega ostrigarja (<i>Pleurotus ostreatus</i>) z že znanim in opisanim mehanizmom delovanja. Ugotovili smo, da A145 ne reagira s polarnimi lipidi in glikosfingolipidi. Prišlo pa je do specifične reakcije s ceramid fosfoetanolaminom (CPE) in nekaterimi nepolarnimi žuželčjimi lipidi. Kljub vezavi na lipidne vezikle, sestavljene iz nepolarnih lipidov, A145 ni permeabiliziral teh veziklov niti sam, niti v povezavi z domnevnim MACPF proteinskim partnerjem.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579(043.2)
CX aegerolysins/membrane lipids/insects
AU REMŽGAR, Tomaž
AA SEPČIČ, Kristina (mentor)/MAČEK, Peter (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2016
TI INTERACTION OF AEGEROLYSIN A145 FROM THE MOLD *Aspergillus niger* WITH MEMBRANE LIPIDS
DT Graduation Thesis (University Studies)
NO X, 38 p., 1 tab., 23 fig., 29 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Aegerolysins are a newly defined group of proteins whose common property is interaction and binding with membrane lipids. We have studied the interaction of protein A145 from mold *Aspergillus niger* with insect membrane lipids. We wanted to find out which lipids are responsible for protein binding and evaluate their interaction with glycosphingolipids. We checked the binding of the protein to liposomes made from different lipid mixtures, the binding of the protein marked with antibodies to different lipid samples and its ability to permeabilize vesicles made from different lipid mixtures. We used protein OlyA from the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) as a control protein, since its functions and binding mechanism are already known. We found out that A145 does not react with polar lipids and glycosphingolipids. A specific interaction occurred with ceramide phosphoethanolamine (CPE) and some non polar insect lipids. Despite its binding to vesicles made from non polar lipids the A145 failed to permeabilize these vesicles either alone or in combination with its putative MACPF protein partner.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 EGEROLIZINI.....	2
2.1.1 Razširjenost egerolizinov	2
2.1.2 Zgradba egerolizinov	2
2.1.3 Aktivnost egerolizinov.....	2
2.1.4 Uporabnost egerolizinov	3
2.2 ZGRADBA CELIČNE MEMBRANE ŽUŽELK	6
3 MATERIAL IN METODE.....	7
3.1 KEMIKALIJE IN POTREBŠČINE	7
3.2 RAZTOPINE.....	8
3.3 LABORATORIJSKA OPREMA	9
3.4 EKSTRAKCIJA ŽUŽELČJIH LIPIDOV	10
3.5 DOLOČANJE KOLIČINE LIPIDOV IN OGLJIKOVIH HIDRATOV V IZOLIRANIH FRAKCIJAH.....	10
3.5.1 Določanje količine lipidov.....	10
3.5.2 Določanje količine ogljikovih hidratov.....	10
3.6 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	11
3.6.1 Lokalizacija in identifikacija lipidov s tankoplastno kromatografijo	12
3.7 TEST VEZAVE EGEROLIZINA NA MULTILAMELARNE VEZIKLE.....	12
3.7.1 Priprava multilamelarnih lipidnih veziklov z vključenimi žuželčji lipidi	12

3.7.2	Test vezave proteinov na multilamelarne vezikle.....	13
3.8	DOKAZOVANJE EGEROLIZINOV S PROTITELESI.....	14
3.8.1	Tankoplastna kromatografija	14
3.8.2	Prenos lipidov na PVDF membrano (TLC blotting).....	14
3.8.3	Imuno barvanje s protitelesi.....	14
3.8.4	Razvijanje v peroksidaznem substratu	15
3.9	PREVERJANJE LITIČNE AKTIVNOSTI EGEROLIZINOV A145 IN OlyA ...	15
3.9.1	Priprava malih unilamelarnih veziklov (SUV) s kalceinom.....	15
3.9.2	Test litične aktivnosti proteina.....	15
4	REZULTATI	17
4.1	EKSTRAKCIJA ŽUŽELČJIH LIPIDOV	17
4.2	DOLOČANJE KOLIČINE LIPIDOV IN OGLJIKOVIH HIDRATOV V IZOLIRANIH FRAKCIJAH.....	17
4.2.1	Določanje količine lipidov.....	17
4.2.2	Določanje količine ogljikovih hidratov.....	17
4.3	TANKOPLASTNA KROMATOLOGRAFIJA	18
4.4	VEZAVA EGEROLIZINA NA MULTILAMELARNE VEZIKLE	20
4.5	DOKAZOVANJE EGEROLIZINOV S PROTITELESI.....	22
4.6	TEST LITIČNE AKTIVNOSTI PROTEINA.....	23
5	RAZPRAVA.....	31
6	POVZETEK.....	34
7	SUMMARY.....	35
8	VIRI.....	36
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Koncentracije lipidov in ogljikovih hidratov (OH) po posameznih fazah ter utežni delež OH glede na celokupno maso lipidov.....	18
--	----

KAZALO SLIK

Sl. 1. Graf umeritvene krivulje za glukozo in enačba premice pri uporabi spektrofotometra Shimadzu UV 2101 PC.	17
Sl. 2. Graf umeritvene krivulje za glukozo in enačba premice pri uporabi spektrofotometra JENWAY.	18
Sl.3. Tankoplastna kromatografija v zmesi topil kloroform : metanol : amonijak = 40 : 10 : 10 (v/v/v).....	19
Sl. 4. Tankoplastna kromatografija v zmesi topil kloroform : metanol : amonijak = 20 : 20 : 1 (v/v/v).....	20
Sl. 5. Vezava proteina A145 na MLV različnih sestav.	21
Sl. 6. Vezava proteina OlyA na MLV različnih sestav	21
Sl. 7. TLC za A145.....	22
Sl. 8. PVDF membrana po razvijanju v peroksidaznem substratu	22
Sl. 9. TLC za OlyA.....	23
Sl. 10. PVDF membrana po razvijanju v peroksidaznem substratu.	23
Sl. 11. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov (spodnja faza; nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina A145.	24
Sl. 12. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov (spodnja faza; nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473	24
Sl. 13. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov (spodnja faza; nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B.....	25
Sl. 14. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov (spodnja in zgornja faza v razmerju 1:1; polarni in nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina A145	25
Sl. 15. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov (spodnja in zgornja faza v razmerju 1:1; polarni in nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473.	26
Sl. 16. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov (spodnja in zgornja faza v razmerju 1:1; polarni in nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B.....	26
Sl. 17. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:Hol ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473.....	27
Sl. 18. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:Hol ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B	27

Sl. 19. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:POPC ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473.....	28
Sl. 20. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:POPC ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B	28
Sl. 21. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov SM:Hol ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473.....	29
Sl. 22. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov SM:Hol ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B	29
Sl. 23. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov POPC:Hol ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B	30

SEZNAM OKRAJŠAV

BSA	Goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
CPE	N-acil-sfingozilfosforiletanolamin (=ceramid fosfoetanolamin)
DOPC	1,2-diroleil-sn-glicero-3-fosfoholin
Hol	Holesterol
MACPF	kompleks membranskega napada/perforin (ang. membrane attack complex/perforine)
MLV	multilamelarni vezikli
OlyA	Ostreolizin A
PlyB	Pleurotolizin B
POPC	1-palmitol-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoholin
rpm	število obratov/min
SM	sfingomielin
SUV	mali enolamelarni vezikli (ang. small unilamellar vesicles)

1 UVOD

Egerolizini so relativno nova skupina β -strukturiranih proteinov. Zanje je značilna nizka molekulska masa (~13-20 kDa), nizka izoelektrična točka in stabilnost v širokem pH območju. Čeprav jih izločajo različne skupine bakterij, gliv in rastlin njihova natančna biološka vloga v organizmih še ni znana. Skupna lastnost egerolizinov je njihova interakcija s specifičnimi lipidi, ki so sestavni deli bioloških membran. Nekateri egerolizini lahko delujejo hemolitično, bodisi samostojno, bodisi se na membranske lipide vežejo v kombinaciji z dodatnimi proteini, ki velikokrat vsebujejo MACPF domeno ter na ta način tvorijo transmembransko poro. Kljub njihovi še neznani vlogi v naravi, kažejo egerolizini velik potencial v klinični diagnostiki, kot označevalci membranskih raftov, ter v komercialne namene pri gojenju gliv in izdelavi bioloških insekticidov.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE

V tej nalogi smo preučevali egerolizin A145, ki ga izloča plesen *Aspergillus niger*. Zanj so nedavno pokazali, da se veže na ceramid fosfoetanolamin (CPE), ki je značilen sfingolipid celičnih membran členonožcev in nekaterih drugih vretenčarjev. Cilji naloge so bili ovrednotiti interakcijo rekombinantnega egerolizinskega proteina A145 z membranskimi lipidi in lipidnimi mešanici, izoliranimi iz celične linije Sf9 metulja vrste *Spodoptera frugiperda*. Predvsem smo se posvetili interakciji A145 z glikosfingolipidi iz omenjene celične linije. Poskusili smo tudi pokazati katera skupina membranskih lipidov je odgovorna za vezavo proteina. Za kontrolni protein smo uporabili ostreolizin A iz bukovega ostrigarja (*P. ostreatus*), katerega interakcije z lipidi in mehanizem vezave so že znani in opisani.

Pri našem delu smo se osredotočili na preverjanje naslednjih delovnih hipotez:

- egerolizin A145 se bo vezal na CPE
- egerolizin A145 se bo vezal na lipide v glikosfingolipidni frakciji

2 PREGLED OBJAV

2.1 EGEROLIZINI

2.1.1 Razširjenost egerolizinov

Egerolizin je protein, ki so ga leta 2002 prvič izolirali iz glive *Agrocybe aegerita*. Kmalu po tem so pri različnih skupinah bakterij, gliv, rastlin in živali odkrili še več homolognih proteinov, ki so jih združili v skupino egerolizinskih proteinov (Pfam 06355, InterPro IPR009413) in danes vsebuje čez 350 predstavnikov (Novak in sod., 2014). Čeprav so razširjeni med različnimi skupinami organizmov so najbolj raziskani egerolizini, ki jih izločajo glive (Novak in sod., 2014; Berne in sod., 2009). Vse vrste gliv, ki vsebujejo egerolizinske gene spadajo v skupini Ascomycota in Basidiomycota, največ predstavnikov najdemo pri rodu *Aspergillus*. Pri evkariontih so genske zapise za egerolizine odkrili še pri treh vrstah rastlin. Pri prokariontih se egerolizinom sorodni proteini pojavljajo pri skupini *Firmicutes* in gama proteobakterijah, odkrili pa so jih tudi pri virusu *Trichoplusia ni ascovirus* (Berne in sod., 2009). Domnevajo, da so se egerolizini evolucijsko prvič pojavili pri glivah, saj so tam prisotni pri velikemu številu vrst. To teorijo podpirajo tudi vloga egerolizinov pri tvorbi trosnjakov in medsebojni signalizaciji ter njihova domnevna vloga kot virulentni faktorji pri patogenih vrstah (Novak in sod., 2014; Berne in sod., 2009). Pojavljanje egerolizinov pri rastlinah je težko pojasniti, saj le redko pride do horizontalnega genskega prenosa med glivami ali bakterijami in rastlinami, obstaja pa tudi možnost, da so pri raziskavah uporabili s plesnimi okužen rastlinski material (Berne in sod., 2009).

2.1.2 Zgradba egerolizinov

Kljub njihovi razširjenosti med različnimi skupinami organizmov, imajo vsi egerolizini zelo podobne karakteristike: nizko molekulsko maso (~13-20 kDa), nizko izoelektrično točko in stabilnost v širokem pH območju (Berne in sod., 2009). S pomočjo računalniške analize so ugotovili, da egerolizini spadajo med β -strukturirane proteine, kar sta potrdili prvi znani kristalografski strukturi egerolizina Cry34Ab1 iz *Bacillus thuringiensis* (Berne in sod., 2009) in pleurotolizina A (PlyA) iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) (Lukoyanova in sod., 2015).

2.1.3 Aktivnost egerolizinov

Pri proučevanju aktivnosti prvega izoliranega egerolizinskega proteina, Asp-hemolizina iz filamentozne glive *A. fumigatus*, so ugotovili da deluje hemolitično. S pomočjo elektronske mikroskopije so ugotovili, da se molekule egerolizina na membrano eritrocita vežejo v urejenih skupkih v obliki obroča ter nato tvorijo poro v membrani. Hemolitično delovanje in podoben vzorec vezave so kasneje potrdili tudi pri ostreolizinu, pleurotolizinu in eringeolizinu (Novak in sod., 2014; Berne in sod., 2009). Večina egerolizinov ne delujejo

hemolitično samostojno, temveč šele v povezavi z drugimi proteini ki vsebujejo MACPF (ang. membrane attack complex/perforin) domeno. Primera takih egerolizinov sta ostreolizin A (Oly A) in pleurotolizin A (Ply A), izolirana iz gliv rodu *Pleurotus* spp.. Proteina se vežeta na membrano eritrocitov, nanju pa se veže komponenta Ply B, ki v membrani tvori poro (Novak in sod., 2014; Berne in sod., 2009; Ota in sod., 2013). Čeprav so omenjeni egerolizini delovali hemolitično proti širokemu spektru eritrocitov (človeški, kunčji, ovčji, konjski, kravji, prašičji, ..), se je med njimi afiniteta vezave na eritrocite posameznih vrst močno razlikovala (Berne in sod., 2009).

Proces lize membrane se pri mnogih proteinih, ki tvorijo pore, prične s prepoznavo določene membranske komponente. Pri egerolizinih so ugotovili, da razmerje med membranskimi lipidi pomembno vpliva na afiniteto vezave egerolizina na membrano (Berne in sod., 2009). Pri proučevanju ostreolizina so ugotovili, da kaže specifično interakcijo z liposomi sestavljenimi iz mešanice sfingomieline (SM) in holesterola ter posledično njegovo specifično vezavo na membranske rafte, t.j. s holesterolom bogate membranske domene (Berne in sod., 2009; Ota in sod., 2013; Skočaj in sod., 2014). Prav tako več egerolizinov izoliranih iz gliv rodu *Pleurotus* spp. kaže visoko afiniteto za vezavo na ceramid fosfoetanolamin, ki je glavni sfingolipid v membrani nevretenčarjev ter ga pri višje razvitih organizmih najdemo samo v sledovih (Bhat in sod., 2015).

Litična aktivnost nekaterih egerolizinov je verjetno vzrok za njihovo citotoksično delovanje. Citotoksičnost so proučevali pri Asp-hemolizinu, ostreolizinu in eringeolizinu in ugotovili, da delujejo citotoksično na različne celične linije, vključno s tumorskimi celicami (Berne in sod., 2009). Pri celicah, ki so jih izpostavili delovanju ostreolizina so ugotovili, da kažejo tipične znake perforacije membrane: nabrekanje celice, porušeno strukturo membrane in degranulacijo. Pri eringeolizinu so ugotovili tudi, da deluje litično proti bakterijam *Bacillus subtilis* in *Bacillus megaterium* (Berne in sod., 2009).

2.1.4 Uporabnost egerolizinov

Vezava na specifične membranske domene je značilnost egerolizinskih proteinov, ki je najboljše preučena. Ostreolizin in drugi egerolizini iz rodu *Pleurotus* kažejo visoko afiniteto za vezavo na membranske rafte, bogate z SM in holesterolom in so zato zanimivi kot orodja za proučevanje teh struktur (Berne in sod., 2009). Znano je, da membranski rafti sodelujejo pri mnogih bioloških funkcijah v celici, kot npr. eksocitoza, endocitoza, medcelična komunikacija, vstop patogenov in vezava različnih ligandov. Prav tako imajo vlogo pri prenašanju signalov, ki so pomembni pri določenih bolezenskih stanjih, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen. Zaradi majhne velikosti in nestabilnosti je membranske rafte težko proučevati, zato je pomembno razviti nove tehnike in sonde, ki bi omogočile 'vizualizacijo' teh membranskih domen (Skočaj in sod., 2014).

Zanimiv je tudi predlog uporabe fluorescentnega egerolizina erilizina A (EryA-EGFP) za specifično dokazovanje prisotnosti parazita *Trypanosoma brucei* v krvi pacientov ter

dokazovanje zgodnjih stadijev spalne bolezni, ki jo ta parazit povzroča. EryA-EGFP je bil za ta namen izbran zaradi lastnosti, da se veže na liposome iz CPE/Hol (molsko razmerje 1:1), ne veže pa se na liposome s PC ali SM. Na ta način bi se izognili vezavi egerolizina na membrane človeških celic ter omejili vezavo le na stadij *T. brucei*, ki se nahaja v krvnem obtoku (Bhat in sod., 2015).

Dejstvo, da lahko pri različnih vrstah gliv znotraj istega rodu najdemo več različnih homologov egerolizinov, nam omogoča proučevanje več različnih vrstno specifičnih procesov pri glivah (Novak in sod., 2014). Egerolizini tako kažejo velik potencial v klinični diagnostiki kot biomarkerji za detekcijo glivičnih okužb, še posebno v primerih okužb z oportunističnimi glivami (Novak in sod., 2014; Berne in sod., 2009). Odkrili so, da so egerolizini v primeru glivičnih okužb, kot je invazivna aspergiloza, ena od glavnih sestavin toksinov, ki jih gliva izloča med infekcijo (Berne in sod., 2009). Invazivno aspergilozo največkrat povzroča plesen *Aspergillus fumigatus*, lahko pa jo povzročijo tudi druge vrste rodu *Aspergillus* (Novak in sod., 2014). Za diagnostificiranje okužbe in določanje vrste patogena sta na voljo dva testa, a noben od njiju ni dovolj natančen. Galaktomananski test je opravljen hitro, vendar z njim ne moremo natančno določiti vrste, ki povzroča infekcijo, kaže pa tudi odstopanja pri občutljivosti. Večinoma se danes za določanje okužbe uporablja metoda kvantitativne PCR za zaznavanje 18S in 28S rDNA sekvenc, vendar tudi tukaj ni mogoče določiti vrste patogena. Obstaja možnost, da bi za zgodnje odkrivanje bolezni in določanje vrste patogena pri aspergilozi uporabili egerolizinske gene. Produkt gena aspHS je egerolizin, katerega produkcija se ob okužbi močno poveča. Tako bi z uporabo kvantitativne PCR metode v kombinaciji z DNA ekstraktom lahko z visoko zanesljivostjo določali okužbo z *A. fumigatus* ter tudi stopnjo infekcije. S to metodo bi lahko v klinikah hitro določili vrsto in stopnjo okužbe ter omogočili zdravnikom izbirati ustrezne protiukrepe (Novak in sod., 2014).

Za detekcijo glivnih egerolizinov je predlagana tudi izdelava monoklonskih protiteles, specifičnih za egerolizine, ki se izražajo v zgodnjih stadijih infekcije (Novak in sod., 2014). Na ta način so v glivnih kulturah uspešno zaznali egerolizine plesni *A. terreus* in *A. fumigatus*. Dodatno je potrebno raziskati še vezavo protiteles na egerolizine v serumu pacientov (Novak in sod., 2014).

Za nekatere egerolizine so odkrili, da delujejo kot močni promotorji sekrecije heterolognih proteinov pri glivah. Egerolizinske promotorje bi tako lahko uporabili pri produkciji kojične kisline, ki se uporablja v prehranski, farmacevtski in kozmetični industriji. Kojično kislino danes pridelujejo z uporabo glukoze, predlagan pa je cenejši način, pri katerem bi kot substrat uporabljali celulozo in gensko spremenjeno *Aspergillus oryzae* (Novak in sod., 2014).

Ena od komercialno zanimivejših vlog egerolizinov je njihova vloga pri tvorbi trosnjakov. Tvorbo trosnjakov pri glivah lahko sproži vrsta okoljskih ali biokemičnih dražljajev, ki vključujejo snovi naravnega ali sintetičnega izvora (Novak in sod., 2014). Z uporabo

imunocitokemičnih metod so ugotovili prisotnost OlyA v hitro rastočih primordijih ter v bazidijih in bazidiosporah mladih trosnjakov, kar kaže na njihovo vlogo pri tvorbi trosnjakov in sporulaciji (Novak in sod., 2014; Berne in sod., 2009). Podoben vzorec se je pokazal tudi pri egerolizinu, izoliranem iz glive *A. aegerita* (Novak in sod., 2014). V podporo tej teoriji govori tudi dejstvo, da OlyA znatno poveča sporulacijo *P. ostreatus*, tudi če ga aplicirajo le na zunanost micelija (Berne in sod., 2009). Ta spoznanja in nadaljnje raziskave na področju celičnih procesov pri tvorbi trosnjakov bi lahko pomembno vplivali na gojenje in produkcijo gliv.

2.1.4.1 Uporaba egerolizinov za zatiranje žuželk

Sodobno kmetijstvo se mora danes spopadati s problemom hkratnega povečanja proizvodnje in kvalitete hrane ter zmanjševanja vnosa škodljivih kemikalij v okolje. Toksini, ki se vežejo na specifične membranske molekule lahko tako predstavljajo odlično orodje za zatiranje različnih vrst škodljivcev. Za egerolizine izolirane iz nekaterih gliv (*Aspergillus niger*, *Pleurotus* spp.) in bakterij (*Pseudomonas aeruginosa*) so nedavno dokazali, da se vežejo na ceramid fosfoetanolamin, ki je najbolj zastopan sfingolipid v celičnih membranah nevretenčarjev in se pri višjih organizmih nahaja le v sledovih (Rajnović, 2015). Tudi lastnost nekaterih egerolizinov, da lahko v kombinaciji s proteini z MCAPF-domeno tvorijo binarne citolitične komplekse, ki ustvarijo transmembransko poro, omogoča njihovo uporabo za zatiranje insektov.

Trenutno več vrst insektov povzroča škodo v kmetijstvu. V Evropi je največji škodljivec za sadno drevje *Drosophila suzuki*, ki v nasprotju z ostalimi vrstami tega rodu napada še nedozorelo sadje (Rota-Stabelli in sod., 2013; Cini in sod., 2014). Koruzni hrošč *Diabrotica virgifera*, ki izvira iz centralne Amerike, je iz ekonomskega vidika največji škodljivec na koruzi (Gassmann, 2012). Podobno na žitih, predvsem pšenici, povzroča največjo škodo žitna uš *Sitobion avenae* (Blackman in Eastop, 1994). Kot poglavitne škodljivce v kmetijstvu, od zmernih pasov do tropov, pa se danes opredeljuje parazitske rastlinske ogorčice. Med njimi ima največji vpliv na gospodarsko izgubo v kmetijstvu rod *Meloidogyne* spp., še posebej zaradi njihove lastnosti hitrega razširjanja in zajedanja različnih vrst poljščin (Sasser in Freckman, 1987). Za vse naštete skupine škodljivcev je standarden protiukrep uporaba kemičnih insekticidov s katerimi škropijo poljščine med rastjo ali pa z njimi tretirajo že semena (Van Timmeren in Isaacs, 2013; Ward in sod., 2004; Devine in sod., 2007; Fuller in sod., 2008). Pretirana uporaba insekticidov, s katerimi je večinoma potrebno škropiti večkrat v sezoni, ima negativen vpliv na stanje okolja, direktno lahko vpliva na zdravje ljudi, večkrat paraziti tudi razvijejo odpornost na insekticid. Izdelava bioinsekticida, ki bi deloval le na tarčne vrste žuželk in ne bi imel škodljivih vplivov na okolje, predstavlja tako zelo uporaben in perspektiven projekt (Devine in sod., 2007).

Prvi poskusi uporabe egerolizinov za zatiranje škodljivcev so se izkazali pozitivno. Najodmevnejši je primer uporabe egerolizina Cry34Ab1. Ta protein spada v večjo skupino toksinov Cry, ki jih sintetizirajo različni sevi bakterije *Bacillus thuringiensis* (Kelker in sod., 2014). Izkazali so se za selektivno toksične proti ličinkam številnih žuželk, kot tudi proti nežuželčjim vrstam, npr. ogorčicam (Bravo in sod., 2011; Vacaru in sod., 2013). Edini Cry proteini, ki so strukturno sorodni egerolizinom je vrsta proteinov iz skupin Cry34A in Cry34B. Ob interakciji Cry34Ab1 s proteinom Cry35Ab1, ki ne spada med egerolizine, nastane kompleks, ki uspešno tvori transmembranske pore (Masson in sod., 2004). Ta kompleks se uspešno uporablja za zatiranje ličink koruznega hrošča (*D. virgifera*). V uporabi je tudi transgena koruza, ki sintetizira par Cry34Ab1/Cry35Ab1 ter tako njene korenine niso dovzetne za koruznega hrošča (Kelker in sod., 2014).

2.2 ZGRADBA CELIČNE MEMBRANE ŽUŽELK

Celična membrana žuželk se v zgradbi in razmerju lipidov razlikuje od zgradbe membrane sesalcev (Yamaji-Hasegawa in sod., 2015; Berne in sod., 2009). Glavna razlika se kaže v vsebnosti sfingolipidov. Ceramid fosfoetanolamin velja kot značilen sfingolipid membran žuželk in je v celicah sesalcev prisoten le v sledovih. Nasprotno je sfingomielin prisoten tako v membranah sesalcev kot členonožcev, glist in celo protozojev (Berne in sod., 2009).

Pri raziskavi lipidne zgradbe celične membrane celic Sf9 izoliranih iz večše *Spodoptera frugiperda*, so ugotovili, da se v več faktorjih razlikuje od lipidne zgradbe membrane izolirane iz sesalčjih celic. Z uporabo metode HPLC so preiskali fosfolipidno sestavo membrane in ugotovili, da sta glavna fosfolipida, zastopana v membrani celic Sf9 fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin. Oba fosfolipida sta vsebovala približno 50% nižjo koncentracijo manj nasičenih maščobnih kislin, kot je ugotovljeno pri celicah sesalcev. Po separaciji kislih in nevtralnih fosfolipidov niso zaznali prisotnosti glikolipidov ter fosfatidilserina, ki je pogost element v celični membrani sesalcev. Ugotovili so tudi, da je nivo holesterola v membrani celic Sf9 do 10 krat nižji od nivoja, prisotnega v celicah sesalcev.

Sestavo maščobnih kislin so določili z uporabo plinske kromatografije. Glavna nasičena maščobna kislina prisotna v membrani celic Sf9 je stearična kislina, glavni nenasičeni maščobni kislini pa oleična in palmitoleična kislina.

Ker so razmerje med fosfatidilholinom in sfingomielinom, razmerje med holesterolom in fosfolipidi ter nasičenost in dolžina verig maščobnih kislin pomembni faktorji fluidnosti celične membrane, se pojavlja vprašanje, kako žuželke vzdržujejo fluidnost celične membrane. Domnevajo, da žuželke nadomestijo manjšo vsebnost holesterola v membrani z večjo vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin ter vsebujejo fosfolipide z daljšimi verigami maščobnih kislin (Marheineke in sod., 1998).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN POTREBŠČINE

4-Cl-1-naftol	Sigma, ZDA
aceton	Merck, Nemčija
akrilamid	Serva, Nemčija
amoniak	Merck, Nemčija
antikunčja HRP protitelesa	Santa Cruz, ZDA
antimišja HRP protitelesa	Santa Cruz, ZDA
BSA Bovine Serum Albumine	Sigma, ZDA
CaCl ₂	Merck, Nemčija
ceramid fosfoetanolamin	Matreya LLC, ZDA
Coomasie B.B.	Merck, Nemčija
DOPC (1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	APL #850375P
EDTA	Merck, Nemčija
etanol	Merck, Nemčija
FeCl ₃	Merck, Nemčija
fenol	Sigma, ZDA
Whatman Glass Filter (1820 866)	Sigma, ZDA
glicin	Merck, Nemčija
glukoza	Roche, Nemčija
HCl	Merck, Nemčija
H ₂ O ₂	Sigma, ZDA
H ₂ SO ₄	Merck, Nemčija
holesterol	Sigma, ZDA
kalcein	Sigma, ZDA
KCl	Kemika, Hrvaška
kloroform	Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
kunčja poliklonska protitelesa	Santa Cruz, ZDA
metanol	Merck, Nemčija
mišja poliklonska protitelesa	Imgenex, ZDA
NaCl	Merck, Nemčija
Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
ocetna kislina	Merck, Nemčija
POPC (1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin)	APL #850457P
primulin	Aldrich, ZDA
propanol	Merck, Nemčija
Immobilon PVDF membrana (IPVH 15150)	Sigma, ZDA
Sephadex G-50	Sigma, ZDA

SDS	Merck, Nemčija
sfingomielin	Sigma, ZDA
Temed	Sigma, ZDA
TLC plošče (HX 53162331)	Merck, Nemčija
triklor očetna kislina	
Tris	Merck, Nemčija
Triton X-100	Sigma, ZDA

3.2 RAZTOPINE

Aktivacijska mešanica

CaCl₂ x 2H₂O
metanol
propanol

BIALS reagent (Orcinol Ferric Chloride)

orcinol
HCl
1% FeCl₃

Gel za elektroforezo

akrilamid
3M Tris
10% SDS
1.5% APS
Temed

Gel za nanašanje

akrilamid
0.5 M Tris
10% SDS
1.5% APS
Temed

PBS pufer

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1.8 mM KH₂PO₄

pH = 7.4

Pufer za razvijanje

20 mM Tris
150 mM NaCl
10 mM Na₂HPO₄
pH = 7.5

Pufer za vezikle

140 mM NaCl
20 mM Tris
1 mM EDTA
pH = 8.0

Raztopina za barvanje (Staining Solution)

Coomasie B.B.
metanol
ocetna kislina

SDS pufer

4% SDS
100 mM Tris
glicin

TBS pufer

20 mM Tris
150 mM NaCl
pH = 7.6

3.3 LABORATORIJSKA OPREMA

Centrifuga	Sigma 3 - 30 KS, Sigma Centrifuges, VB
Centrifuga	Centric 322 A, Domel holding d.d., Slovenija
Fluorimeter	Zenyth 3100, Anthos Labtec BV, Nizozemska
Rotavapor	R-134, Buchi Labortechnik AG, Švica
Sonikator	Sonics Vibra Cell, Sonics and Materials, ZDA
Spektrofotometer	Jenway 6300, Bibby Scientific Limited, VB
Spektrofotometer	UV-2101 PC, Shimadzu, Japonska
Vrtinčni mešalnik	Vibromix 10, Domel holding d.d., Slovenija

3.4 EKSTRAKCIJA ŽUŽELČJIH LIPIDOV

Za ekstrakcijo žuželčjih glikolipidov smo uporabili prirejeno metodo po Seppo in sod. (2000). Glikolipide smo izolirali iz celic Sf9 metulja *Spodoptera frugiperda* (Nacionalni inštitut za kemijo, Ljubljana). 7,714 g zamrznjenih celic smo odtalili, jim dodali 3-kratni volumen (3 ml na gram mokre teže) mrzle destilirane vode (23 ml) ter zmes nato 5 minut homogenizirali na vrtničnem mešalniku. V drugem koraku smo zmesi dodali 8-kratni volumen ledenomrzlega metanola (62 ml) in jo ponovno 5 minut homogenizirali na vrtničnem mešalniku. V tretjem koraku smo dodali 4-kratni volumen kloroforma (31 ml) ter zmes ponovno 5 minut homogenizirali na vrtničnem mešalniku. Homogenat smo nato pustili čez noč na stresalniku pri sobni temperaturi in ga nato centrifugirali (15 min, 2000 rpm, 25°C; Centric 322 A). Supernatant smo odpipetirali in shranili na hladnem, sediment pa stehali in ponovno ekstrahirali po isti metodi. Po ponovnem centrifugiranju smo supernatanta združili ter dodali tolikšen volumen destilirane vode (67,07 ml), da smo spremenili prvotno razmerje topil 8:4:3 v 8:4:5,6. S tem smo dosegli ločevanje lipidov v zmesi na polarne in nepolarne. Zmes smo centrifugirali (15 min, 2000 rpm, 25°C; Centric 322 A) in dobili 3 ločene faze, ki smo jih nato previdno odpipetirali v ločene epruvete.

3.5 DOLOČANJE KOLIČINE LIPIDOV IN OGLJIKOVIH HIDRATOV V IZOLIRANIH FRAKCIJAH

3.5.1 Določanje količine lipidov

Količino lipidov v posameznih fazah smo določili s tehtanjem. Bučke za rotavapor smo dobro sprali z zaporedjem topil kloroform-aceton-propanol-metanol-voda-metanol-propanol-aceton-kloroform in na ta način odstranili vse morebitne lipide. Predhodno smo bučke stehali, vanje ločeno dodali vse tri lipidne faze in iz njih na rotavaporju odstranili vsa topila. Po sušenju smo ponovno stehali bučke in iz razlike mas določili suho maso lipidov v posameznih fazah.

Po končanem tehtanju smo lipide vseh treh faz ločeno raztopili v končni koncentraciji 10 mg/ml. Zgornjo fazo, ki je vsebovala polarne lipide, med katerimi so tudi glikolipidi, smo raztopili v mešanici kloroform:metanol:voda = 4:8:3 (volumska razmerja). Za spodnjo fazo, ki je vsebovala nepolarne lipide (fosfolipide in sterole), smo uporabili mešanico kloroform:metanol = 1:1 (v/v). Pri srednji fazi smo najprej uporabili isto razmerje topil kot pri spodnji fazi, saj smo domnevali, da vsebuje več nepolarnih lipidov, a se v tej zmesi niso topili. Nazadnje smo lipide srednje faze raztopili v zmesi kloroform:metanol = 1:3 (v/v) in v končni koncentraciji 5 mg/ml.

3.5.2 Določanje količine ogljikovih hidratov

Za določanje količine ogljikovih hidratov v posameznih fazah smo uporabili fenolni test po metodi Albalasmeh in sod. (2013). Pri tej metodi se raztopini dodata žveplena kislina in

fenol. Ogljikovi hidrati v raztopini reagirajo s kislino ter tvorijo derivate furfurala, ti pa reagirajo s fenolom in se obarvajo, kar lahko nato izmerimo s spektrofotometrom. Zaradi premajhne količine vzorca srednje faze smo količino ogljikovih hidratov izmerili le pri zgornji in spodnji lipidni fazi.

Količino ogljikovih hidratov v lipidnih ekstraktih smo določili tako, da smo 1,5 ml vzorca posušili z rotavaporjem v manjši stekleni bučki. Nastalemu lipidnemu filmu smo dodali steklene kroglice in 1 ml deionizirane vode ter dobro premešali na vrtničnem mešalniku. Nastalo suspenzijo multilamelarnih veziklov smo ločili od kroglic ter jo sonicirali 15 minut z 10 sekundnimi pulzi. Med soniciranjem smo suspenzijo hladili z ledom. 300 ml dobljene suspenzije smo nato uporabili za testiranje.

V seriji 5 ml mikrocentrifugirk smo pripravili redčitve vodne raztopine glukoze za umeritveno krivuljo. V prvo mikrocentrifugirko smo odpipetirali 2 ml vodne raztopine glukoze s koncentracijo 2,56 mg/ml. Raztopino smo nato večkrat redčili z destilirano vodo v razmerju 1:1, dokler nismo dosegli koncentracije 0,1 mg/ml. Po 2 ml vsake redčitve smo proti odpipetirali v ločene mikrocentrifugirke. V zadnjo mikrocentrifugirko smo dodali 2 ml destilirane vode. Dodatno smo pripravili tudi dve mikrocentrifugirki s po 2 ml zgornje in spodnje lipidne faze. V vsako od mikrocentrifugirk smo dodali še 0,5 ml 5% (m/v) vodnega fenola in 2,5 ml koncentrirane žveplove (VI) kisline in jih za 30 sekund homogenizirali na vrtničnem mešalniku. Zaradi motnosti raztopine zgornje in spodnje lipidne faze smo oba vzorca centrifugirali (15min, 2000rpm). Mikrocentrifugirke smo za 20 minut postavili v vodno kopel na sobni temperaturi in nato na spektrofotometru izmerili absorbanco posameznih vzorcev. Zaradi motnosti vzorcev ter za zagotavljanje večje točnosti meritev smo izmerili absorbanco vzorcev na spektrofotometrih Jenway 6300 in UV 2101 Shimadzu. Iz vrednosti meritev absorbance posameznih redčitev smo nato narisali graf umeritvene krivulje in izračunali enačbo premice. Iz enačbe premice smo izračunali koncentracijo ogljikovih hidratov v zgornji in spodnji lipidni fazi.

3.6 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

Metoda tankoplastne kromatografije (TLC) se zaradi preprostosti in hitrosti pogosto uporablja za analizo lipidov. Z njo smo poskušali delno karakterizirati lipide v posameznih izoliranih frakcijah.

Kot mobilno fazo smo uporabili zmes kloroform : metanol : amonijak (25% vodna raztopina) v razmerjih 40:10:10 in 20:20:1. Pred razvijanjem plošč smo mobilno fazo vlili v kromatografsko komoro, jo dobro pretresli in pustili 30 min/25°C, da se je vzpostavil parni tlak topil. Na dno dveh steklenih TLC plošč prevlečenih s silikagelom, 1 cm od spodnjega roba, smo nanесли vzorce standardov in različne količine lipidov v posameznih fazah. Za standarde smo uporabili: holesterol (koncentracija 4 mg/ml), POPC (koncentracija 3 mg/ml), DOPC (koncentracija 3 mg/ml), CPE (koncentracija 5 mg/ml) in sfingomielin (koncentracija 4 mg/ml). Plošči smo nato postavili v komoro in počakali, da

je fronta mobilne faze prišla približno 1cm pod vrh. Zatem smo plošči vzeli iz komore, ju posušili in napršili z reagentom za detekcijo.

3.6.1 Lokalizacija in identifikacija lipidov s tankoplastno kromatografijo

Za identifikacijo in karakterizacijo lipidov na TLC ploščah poznamo več tehnik. Zaradi preprostosti in hitrosti delovanja smo uporabili tehniki barvanja s primulinom in BIALS reagentom.

3.6.1.1 Barvanje s primulinom

Za pripravo raztopine primulina smo 5mg primulina raztopili v 100 ml mešanice acetona in vode (8:2, v/v) in jo do uporabe shranili na temnem in hladnem.

Po razvijanju smo ploščo napršili z raztopino primulina, jo posušili in nato pogledali pod UV svetlobo ($\lambda = 340 \text{ nm}$). Kjer je prišlo do vezave primulina na lipide so se na plošči pojavile fluorescenčne lise

3.6.1.2 Barvanje z Bialovim reagentom

Za pripravo Bialovega reagenta smo uporabili 0,1g orcinola, 40,7 ml HCl in 1 ml 1% FeCl₃. Zmesi smo nato dodali destilirano vodo do skupnega volumna 100ml ter jo za 90 minut segreli na 80°C.

Po razvijanju smo ploščo napršili z reagentom in jo postavili v pečico za 90 minut na 180°C.

3.7 TEST VEZAVE EGEROLIZINA NA MULTILAMELARNE VEZIKLE

Za test vezave smo multilamelarne vezikle izdelali iz lipidov zgornje faze, lipidov spodnje faze in mešanice lipidov obeh faz v razmerju 1:1. Liposome smo pripravili v končni koncentraciji 10 mg/ml in končnem volumnu 1ml.

3.7.1 Priprava multilamelarnih lipidnih veziklov z vključenimi žučelčnimi lipidi

Raztopljene lipide smo v vnaprej izračunanih volumnih odpipetirali v tri steklene vakuumske 50 ml bučke. Bučke smo priključili na rotavapor in iz raztopin počasi odstranili vsa topila. V bučke z lipidnim filmom smo nato dodali 20-30 steklenih kroglic in 1ml pufra za vezikle ter jih 5 minut mešali na vrtničnem mešalniku. S tem smo dosegli, da se je lipidni film odlepil iz stene bučk in v polarni raztopini tvoril multilamelarne vezikle (MLV). Te smo odpipetirali v tri ločene mikrocentrifugirke.

3.7.2 Test vezave proteinov na multilamelarne vezikle

Ugotavljali smo vezavo egerolizinov A145 in OlyA na MLV. Za izvedbo testa smo po 25 μ l suspenzije MLV posameznih frakcij odpipetirali v tri mikrocentrifugirke. Dodali smo po 50 μ l proteinov ter postavili mikrocentrifugirke na stresalnik (30 min, 450 rpm, 25°C) in jih po stresanju centrifugirali (1h, 60000g, 4°C). Supernatant, ki je vseboval nevezane proteine, smo odpipetirali v vnaprej pripravljene ločene mikrocentrifugirke in za obarjanje proteinov v vsako dodali 100% trikloroacetno kislino v končni koncentraciji 20%. Mikrocentrifugirke smo postavili na led za 10 minut in jih nato centrifugirali (12 min, 13200 rpm, 4°C; Centric 322 A). Supernatant smo zavrgli in sediment, ki je vseboval liposome z vezanimi proteini, sprali s 300 μ l ledenomrzlega acetona ter ga ponovno centrifugirali (5min, 13200 rpm, 4°C; Centric 322 A). Ponovno smo zavrgli supernatant in sediment še enkrat sprali z 200 μ l ledenomrzlega acetona ter ga ponovno centrifugirali (5min, 13200 rpm, 4°C; Centric 322 A). Po končani sedimentaciji smo sediment 30 min sušili na zraku. Posušenim vzorcem sedimentov in supernatantov posameznih frakcij smo nato dodali po 250 μ l destilirane vode in 100 μ l SDS pufra (1g SDS, 3,03 g TRIS, 14,4 g glicina, 1 l destilirane vode) ter jih inkubirali 5 min pri 100°C. Molekule SDS se vežejo na proteine in celoten kompleks tako dobi negativen naboj. Po inkubaciji smo vzorce in kontrolni protein nanegli na gel za elektroforezo (Thermo scientific, Page Ruler Plus, Prestained Protein Ladder, #26619, lot: 02203900), v količinah po 5 μ l na vzorec in 3 μ l za kontrolni protein (A145 ali OlyA).

Pripravili smo tri 10 % SDS ločevalne gele debeline 1 mm. Za mešanico smo porabili 3 ml akrilamida, 6,808 ml destilirane vode, 1,5 ml 3M TRIS pufra, 80 μ l 10 % SDS, 600 μ l 1,5 % APS in 12 μ l TEMED. Mešanico smo nato vlili med obe plošči na stojalu za gel in na vrhu nanegli malo destilirane vode. Nato smo počakali 30 minut, da se je gel strdil. Pred nanosom nanašalnega gela smo vodo odlili.

Nanašalni gel smo pripravili iz 1 ml akrilamida, 5,89 ml destilirane vode, 2,5 ml TRIS pufra, 100 μ l 10 % SDS, 500 μ l 1,5 % APS in 10 μ l TEMED. Ko smo zmešali vse sestavine smo mešanico nanegli do vrha in vstavili glavniček.

Elektroforezo smo izvajali pri naslednjih pogojih: $U=160$ V, $P=300$ W, $I=3$ A in $t=50$ min. Po končani elektroforezi smo gel postavili v kadičko, ki je vsebovala raztopino za barvanje (2,5 g Coomassie B.B., 500 ml destilirane vode, 400 ml metanola, 100 ml očetne kisline) in ga čez noč pustili na stresalniku. Po končanem barvanju smo gel sprali z destilirano vodo in ga analizirali.

3.8 DOKAZOVANJE EGEROLIZINOV S PROTITELESI

3.8.1 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastno kromatografijo smo izvedli podobno kot v točki 3.4. Dve TLC plošči smo predhodno za 30 minut segreli na 130°C, ju ohladili in prekrili s stekleno ploščo (do cca. 1 cm na robom nanosa vzorcev). Nato smo nanесли vzorce lipidov zgornje in spodnje faze ter standardov (Hol, SM, POPC, DOPC, CPE) v koncentraciji 25 µg suhe snovi na vzorec. Plošči smo postavili v kromatografsko komoro z mešanico topil kloroform : metanol : amonijak (25% vodna raztopina) v prostorninskem razmerju 40:40:10. Ko je fronta mobilne faze prišla 1 cm pod zgornji rob, smo plošči vzeli iz komore in ju dobro osušili v digestoriju ter nato še v desikatorju (1 h), saj je pomembno da se pred prenosom lipidov na PVDF membrano iz TLC plošče odstranijo vsi sledovi topil.

3.8.2 Prenos lipidov na PVDF membrano (TLC blotting)

Za prenos lipidov smo najprej zložili skupaj membrane v vrstnem redu: Glass filter, ATTO, AC-5977 - PVDF membrana, ATTO AE-6665 - TLC plošča - Glass filter, ATTO, AC-5972. PVDF membrani smo predhodno za 30 s potopili v aktivacijsko mešanico (106 mg CaCl₂ x 2H₂O, 40 ml H₂O, 14 ml MeOH, 80ml propanola). Na zložene membrane smo nato za približno 10 s pritisnili segret likalnik, kar je povzročilo prenos lipidov iz TLC plošče na PVDF membrano. Preostale lipide na TLC ploščah smo barvali s primulinom.

3.8.3 Imuno barvanje s protitelesi

Po prenosu smo PVDF membrani shranili v kadičko s 5% BSA v PBS (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,42g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, dodamo destilirano vodo do 800 ml, s HCl umerimo pH do 7,4, dodamo destilirano vodo do 1l) ter ju čez noč pustili na stresalniku na 4°C. Po stresanju smo membrani ločeno prenesli v 4 ml 5% mešanice BSA v PBS. V eno od mešanic smo dodali egerolizin A145 v drugo pa OlyA v končni koncentraciji 2 µg/ml in ju ponovno za 2 uri postavili na stresalnik na sobni temperaturi. Po stresanju smo membrani 3 krat po 10 min spirali s TBS (24,2 g TRIS, 8,7 g NaCl, pH 7,6, dodamo destilirano vodo do 800 ml). Po spiranju smo membrani ločeno prenesli v 4 ml 5% mešanice BSA v PBS, ki smo ji dodali po 4 µl mišjih poliklonskih protiteles za A145 (razredčina 1,4 mg/ml) ter kunčjih poliklonskih protiteles za OlyA (razredčina 0,4 mg/ml) v koncentraciji 10 µg/ml in ju ponovno 1 h stresali na sobni temperaturi. Po stresanju smo obe membrani ponovno 3 krat po 10 min spirali s TBS in ju nato prenesli v 4 ml 5% mešanice BSA v TBS, ki smo ji dodali po 4 µl sekundarnih kozjih protiteles (razredčina 0,4 mg/ml), posebej za mišja in kunčja protitelesa, označenih s hrenovo peroksidazo, v koncentraciji 10 µg/ml. Obe membrani smo stresali 1 h na sobni temperaturi in ju nato ponovno 3 krat po 10 min spirali s TBS.

3.8.4 Razvijanje v peroksidaznem substratu

Po spiranju smo membrani prenesli v kadički, ki sta vsebovali peroksidazni substrat za razvijanje. Predhodno smo zmešali 15 mg 4-Cl-1-naftola in 5 ml metanola. Tik preden smo v mešanico dodali membrani, smo dodali še 25 ml pufru za razvijanje (3 g TRIS, 8 g NaCl, 0,1 g Na₂HPO₄, 1 l destilirane vode) in 50 µl H₂O₂. Membrani smo pustili v mešanici 2 minuti in ju nato slikali.

3.9 PREVERJANJE LITIČNE AKTIVNOSTI EGEROLIZINOV A145 IN OlyA

Za preverjanje litične aktivnosti obeh proteinov smo uporabili poskus sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov. Vezikle smo izdelali iz lipidov spodnje faze in mešanice lipidov zgornje in spodnje faze v razmerju 1:1, s končno koncentracijo 10 mg/ml. Poleg veziklov iz žuželčjih lipidov smo izdelali tudi vezikle iz mešanic sintetično pridobljenih lipidov (SM-Hol, CPE-Hol, CPE-POPC, POPC-Hol). Preverjali smo vezavo egerolizina A145 in njegovega MACPF partnerja B473 iz plesni *Aspergillus niger* ter vezavo ostreolizina A (Oly A) in njegovega domnevnega MACPF partnerja pleurotolizina B (Ply B) iz glive *Pleurotus ostreatus*. Preverili smo litično aktivnost tako posameznih proteinov, kot tudi združenih proteinskih kompleksov egerolizin - MACPF protein.

3.9.1 Priprava malih unilamelarnih veziklov (SUV) s kalceinom

Kalceinske vezikle smo izdelali po enakem postopku kot vezikle v točki 3.5.1, le da smo lipidnemu filmu v bučki namesto 1 ml pufru za vezikle dodali 0,5 ml raztopine kalceina (1,24 g kalceina smo raztopili v 20 ml vode, dodali 750 µl 10 M NaOH in dopolnili z vodo do 25 ml, pH = 7-8). Raztopino kalceina z vsebovanimi MLV smo nato na ledu sonicirali 30 minut z 10 sekundnimi pulzi. Pri soniciranju so MLV razpadli na manjše unilamelarne vezikle (ang. small unilamellar vesicles; SUV). Po končani sonikaciji smo dobljene SUV ločili od nevezanega kalceina z gelsko kromatografijo. Vzorce raztopin smo nanegli na kromatografske kolone z gelom Sephadex G-50 medium in jih dvakrat centrifugirali (2 min pri 1000 rpm). Sediment, ki je vseboval SUV, smo prenesli v čiste mikrocentrifugirke, jih prepihali z dušikom in shranili pri 4°C.

3.9.2 Test litične aktivnosti proteina

Če pri poskusu pride do sproščanja kalceina iz veziklov, pomeni da je prišlo do poškodbe membrane. Na ta način lahko z naraščanjem fluorescence kalceina spremljamo citolitično aktivnost proteinov. Pri poskusu smo fluorescenco merili s fluorimetrom Zenyth 3100. Sproščanje kalceina smo spremljali 55 minut pri ekscitacijski valovni dolžini 485 nm ter emisijski valovni dolžini 535 nm.

Mikrotitrno ploščo smo sprali z govejim serumskim albuminom (0,1%) in v vrsticah B do H nanegli po 100 µl pufru za vezikle. V vrstici A smo v posamezne jamice odpipetirali po 200 µl raztopine testnih proteinov v koncentraciji 50 µg/ml. Če smo pri testih uporabljali

še partnerske MACPF proteine, smo dodali 5 μ l PlyB (5,35 μ M) ali 20 μ l B473 (10 μ g/ml). Nato smo od zgoraj navzdol (A - G) redčili raztopine proteinov v razmerju 1:2, le v zadnji vrstici H smo pustili samo pufer za vezikle. V 8 ml pufera za vezikle smo dodali 64 μ l lipidnih veziklov s kalceinom in nato po 100 μ l raztopine odpipetirali v vse jamice na mikrotitrni plošči. Ploščo smo nato vstavili v fluorimeter in preverili sproščanje kalceina. Po končani meritvi smo v vrstico H dodali še po 20 μ l detergenta Triton X-100, ki je sprožil popolno lizo veziklov ter izmerili še maksimalno fluorescenco po popolni lizi veziklov. Procent sproščenega kalceina smo izračunali po formuli (Alvarez in sod., 2001).

$$\% \text{ sproščenega kalceina} = (F_{izm} - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}) \times 100$$

F_{min} najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina)

F_{max} najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100)

F_{izm} najvišja izmerjena vrednost fluorescence po dodatku proteina

Z obdelavo podatkov in risanje grafov smo uporabili računalniški program Origin.

4 REZULTATI

4.1 EKSTRAKCIJA ŽUŽELČJIH LIPIDOV

Iz 7,714 g žuželčjih celic smo izolirali 0,501 g lipidov gornje faze, 0,245 g lipidov srednje faze in 0,215 g lipidov spodnje faze.

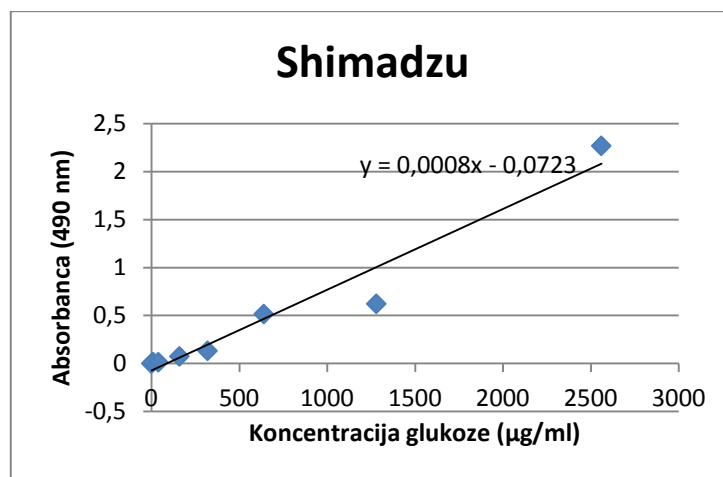
4.2 DOLOČANJE KOLIČINE LIPIDOV IN OGLJIKOVIH HIDRATOV V IZOLIRANIH FRAKCIJAH

4.2.1 Določanje količine lipidov

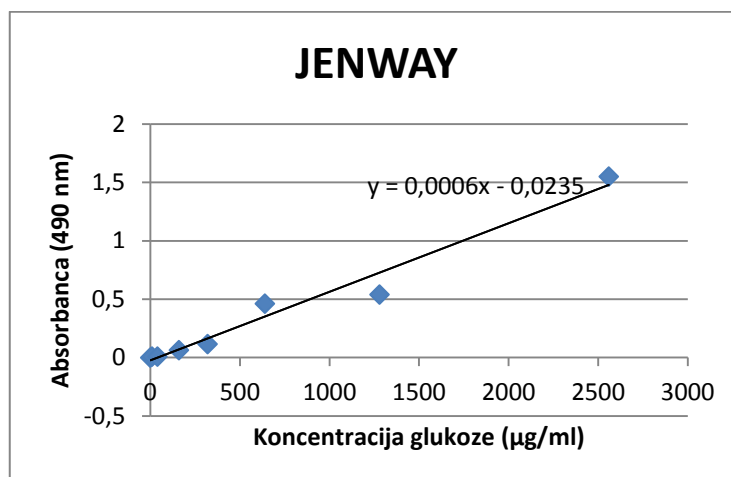
Po sušenju lipidnih faz smo natehtali 501 mg lipidov zgornje faze, 245 mg lipidov srednje faze in 215 mg lipidov spodnje faze.

4.2.2 Določanje količine ogljikovih hidratov

Po končani meritvi absorbance posameznih redčitev glukoze, smo podatke obdelali s programom Microsoft Excel in narisali grafe umeritvenih krivulj.



Slika 1. Graf umeritvene krivulje za glukozo in enačba premice pri uporabi spektrofotometra Shimadzu UV 2101 PC.



Slika 2. Graf umeritvene krivulje za glukozo in enačba premice pri uporabi spektrofotometra JENWAY.

Iz enačbe premice smo nato izračunali koncentracijo ogljikovih hidratov v obeh lipidnih fazah.

Preglednica 1. Koncentracije lipidov in ogljikovih hidratov (OH) po posameznih fazah ter utežni delež OH glede na celokupno maso lipidov. n.i. - ni izmerjeno.

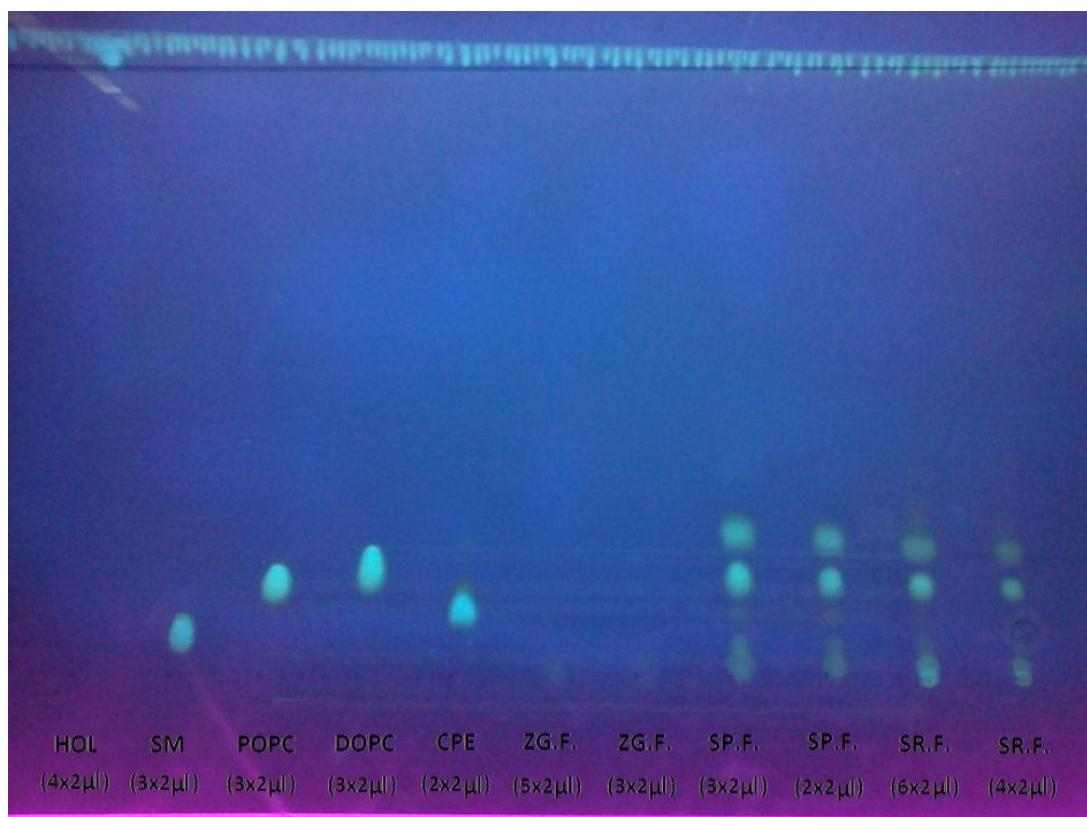
	Koncentracija lipidov	Koncentracija OH (Shimadzu)	Koncentracija OH (JENWAY)	Povprečna koncentracija OH	Utežni delež OH
Zgornja faza	3040 µg/ml	1211 µg/ml	1382 µg/ml	1296 µg/ml	42,6%
Srednja faza	1800 µg/ml	n. i.	n. i.	n. i.	n.i.
Spodnja faza	4320 µg/ml	641,2 µg/ml	591 µg/ml	616,1 µg/ml	14,3%

4.3 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

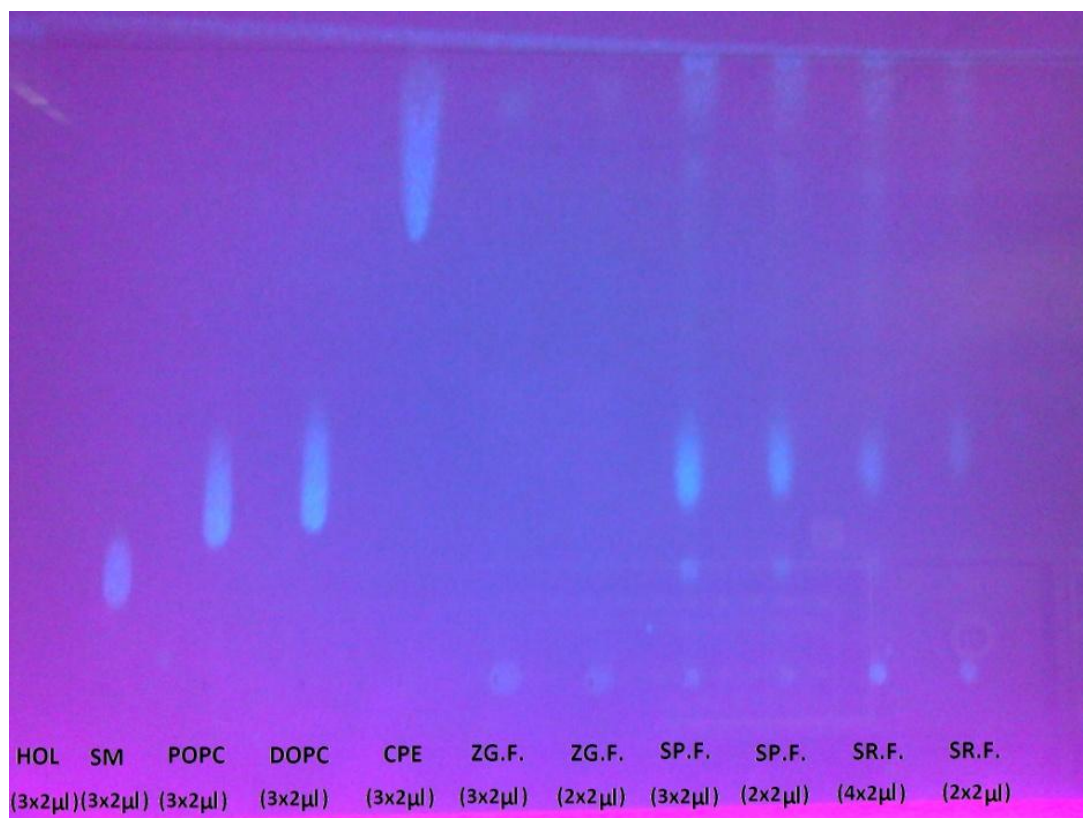
Pri tankoplastni kromatografiji smo za mobilno fazo uporabili mešanico kloroform:metanol:amonijak (25% vodna raztopina) v razmerjih 40:10:10 in 20:20:1. Kot boljša se je izkazala slednja mešanica topil. Za vizualno detekcijo lipidov smo plošče napršili s primulinom in jih ogledali pod UV svetlobo. Za detekcijo sladkorjev, glikozidov in sulfolipidov smo plošče tretirali z Bialovim reagentom, a najverjetneje zaradi nereaktivnosti reagenta reakcija ni potekla (slika ni prikazana).

Na slikah kromatografskih plošč so pri vzorcih zgornje faze (polarni lipidi) lipidne lise zelo slabo vidne. Vidi se signal zelo polarnih lipidov, ki ne potujejo z mobilno fazo, kar so najverjetneje glikolipidi. Opazimo tudi nekoliko manj polarnih nečistoč. Vzorci spodnje

faze (nepolarni lipidi) vsebujejo več lis, ki imajo močnejši signal in se razlikujejo po polarnosti. Predvsem je veliko takih lis, katerih retencijski faktorji so podobni lisam standardov CPE, POPC in DOPC. Kromatografska ločitev srednje faze je praktično enaka kot pri spodnji fazi, kar kaže na to, da srednja faza vsebuje nepolarne lipide, ki so se pri ekstrakciji oborili na meji med vodno in kloroformovo fazo.



Slika 3. Tankoplastna kromatografija v zmesi topil kloroform : metanol : amonijak = 40 : 10 : 10 (v/v/v). Naneseni vzorci lipidov: HOL holesterol, SM sfingomielin, POPC 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin, DOPC 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin, CPE ceramid fosfoetanolamin, ZG. F. zgornja faza, SP. F. spodnja faza, SR. F. srednja faza.

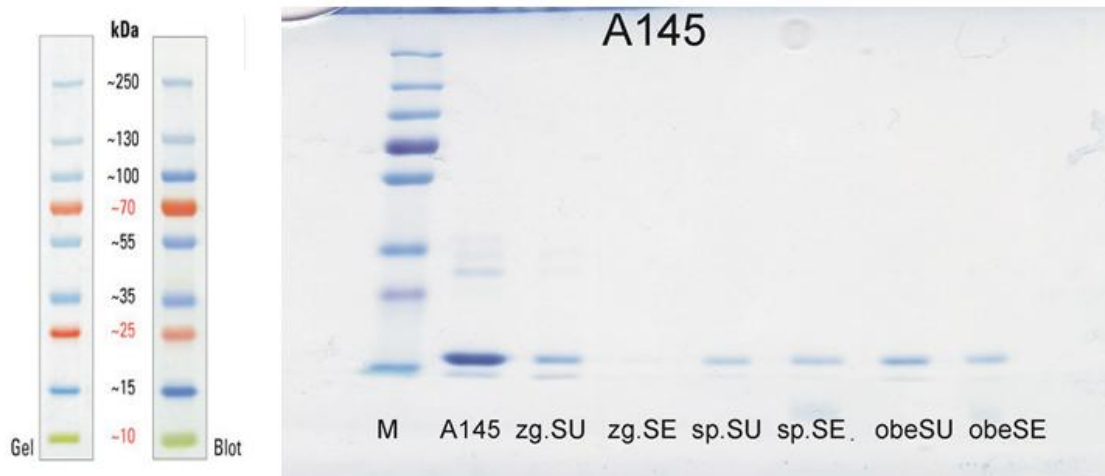


Slika 4. Tankoplastna kromatografija v zmesi topil kloroform : metanol : amonijak = 20 : 20 : 1. Naneseni vzorci lipidov: HOL holesterol, SM sfingomielin, POPC 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin, DOPC 1,2-dioloel-*sn*-glicero-3-fosfoholin, CPE ceramid fosfoetanolamin, ZG. F. zgornja faza, SP. F. spodnja faza, SR. F. srednja faza.

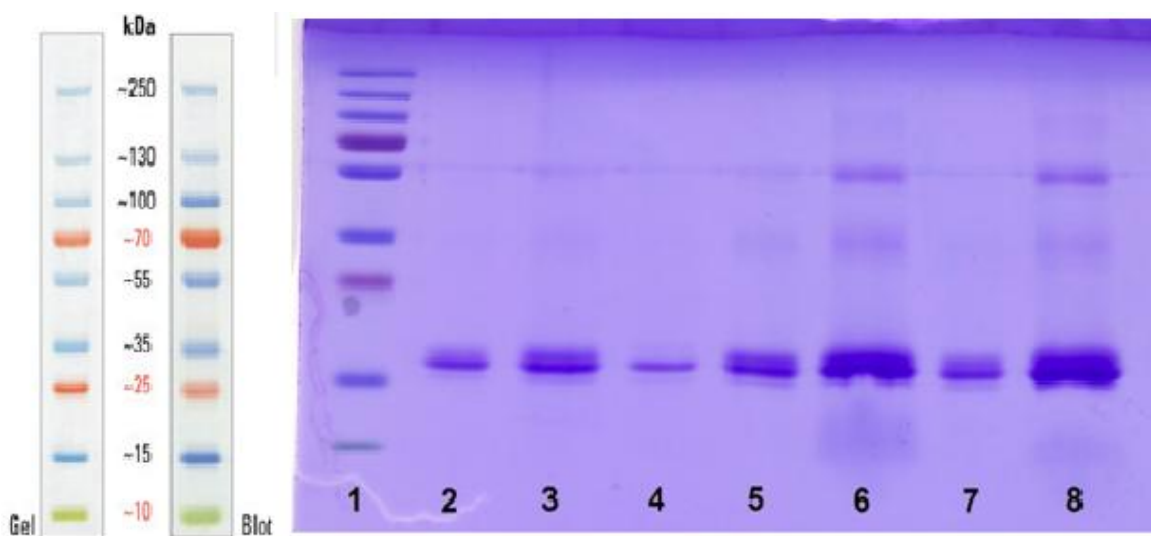
4.4 VEZAVA EGEROLIZINA NA MULTILAMELARNE VEZIKLE

Pri tem testu smo testirali vezavo proteinov A145 in OlyA na multilamelarne liposome. Po mešanju liposomov in proteinov smo vezavo zaznavali s pomočjo elektroforeze, s katero smo analizirali supernatante (nevezan protein) in sedimente (protein, vezan na liposome). Sposobnost vezave proteina smo merili s sedimentacijskim testom.

Po končanem testu se je izkazalo, da je vzorec vezave obeh proteinov skoraj enak. Za oba se je izkazalo, da se ne vežeta na liposome, sestavljene iz lipidov zgornje faze, zelo jasna pa je vezava na liposome, sestavljene iz lipidov spodnje faze in mešanice obeh faz.



Slika 5. Vezava proteina A145 na MLV različnih sestav in lestvica molekulskih mas standardov. Okrajšave: M - lestvica, SU - supernatant, SE - sediment, zg - zgornja faza, sp - spodnja faza, obe - zgornja in spodnja faza.



Slika 6. Vezava proteina OlyA na MLV različnih sestav in lestvica molekulskih mas standardov. Naneseni vzorci: 1 - lestvica, 2 - OlyA, 3 - zgornja faza SU, 4 - zgornja faza SE, 5 - spodnja faza SU, 6 - spodnja faza SE, 7 - zgornja + spodnja faza SU, 8 - zgornja + spodnja faza SE (SU - supernatant, SE - sediment).

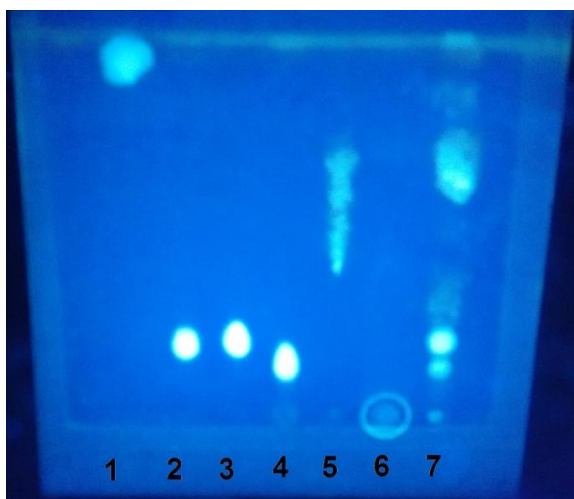
Test vezave proteina A145 so izvedli tudi z uporabo komercialnih lipidov [25]. Testirali so vezavo proteina na MLV sestavljene iz lipidnih mešanic CPE : Hol, CPE : POPC, SM : Hol in POPC : Hol. Pri tej raziskavi se je protein A145 jasno vezal le na CPE : Hol liposome.

4.5 DOKAZOVANJE EGEROLIZINOV S PROTITELESI

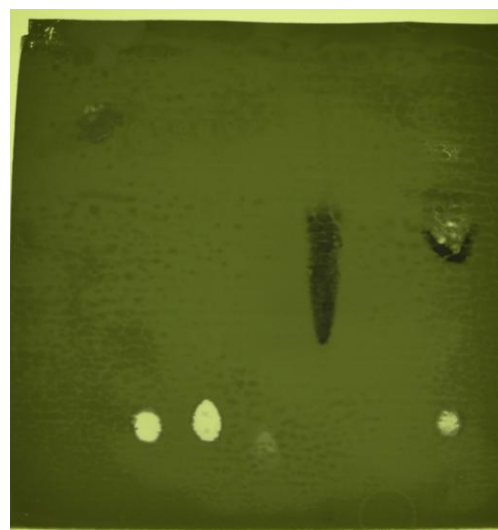
Po izvedbi tankoplastne kromatografije in prenosu lipidov na PVDF membrano smo TLC plošče napršili s primulinom in jih pregledali pod UV svetlobo. Kljub prenosu dela lipidov iz TLC plošče na PVDF membrano so bile lipidne lise jasno vidne.

Označevanje lipidov s protitelesi na PVDF membrani se je izkazalo za težavno nalogo, saj je večkrat prišlo do nespecifične vezave protiteles na več ali celo vse lipidne vzorce. Težavo smo poskusili rešiti z zmanjšanjem mase nanesenih lipidov na TLC plošči in spreminjanjem razmerja topil v mobilni fazi. Po večkratni ponovitvi poskusa so rezultati pokazali, da se je s protitelesi označen protein A145 jasno vezal na CPE in tudi na lipide spodnje (nepolarne) faze. Retencijski faktor proteina ustreza višini potovanja standardnega lipida CPE, s čimer smo potrdili rezultate vezave na multilamelarne vezikle.

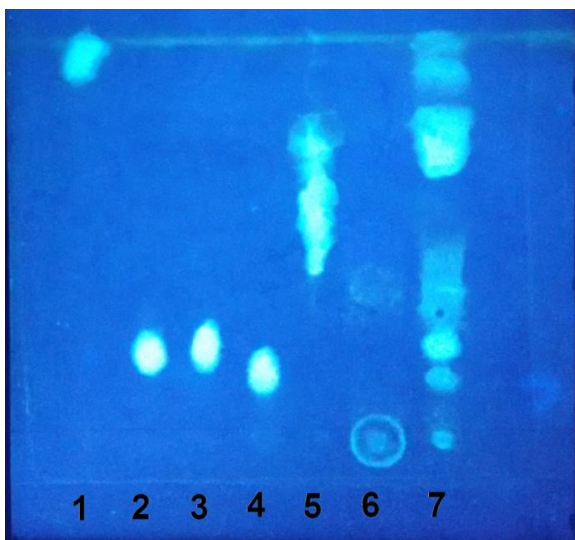
Zelo podobne rezultate smo dobili tudi pri poskusu vezave OlyA, kjer se je protein jasno vezal na CPE ter lipide spodnje faze



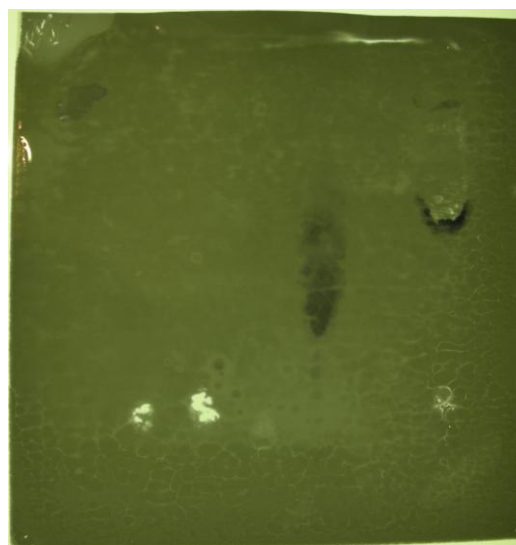
Slika 7. TLC za A145 v zmesi topil kloroform : metanol : amonijak (25% vodna raztopina) = 40:40:10. Naneseni vzorci lipidov v količinah 25 µg suhe mase: 1 - holesterol, 2 - POPC, 3 - DOPC, 4 - sfingomielin, 5 - ceramid fosfoetanolamin, 6 - zgornja faza, 7 - spodnja faza.



Slika 8. PVDF membrana po razvijanju v peroksidaznem substratu. Temne lise kažejo vzorce z vezanim proteinom A145, označenim s protitelesi.



Slika 9. TLC za OlyA v zmesi topil kloroform : metanol : amonijak (25% vodna raztopina) = 40:40:10. Naneseni vzorci lipidov v količinah 25 μ g suhe mase: 1 - holesterol, 2 - POPC, 3 - DOPC, 4 - sfingomielin, 5 - ceramid fosfoetanolamin, 6 - zgornja faza, 7 - spodnja faza.

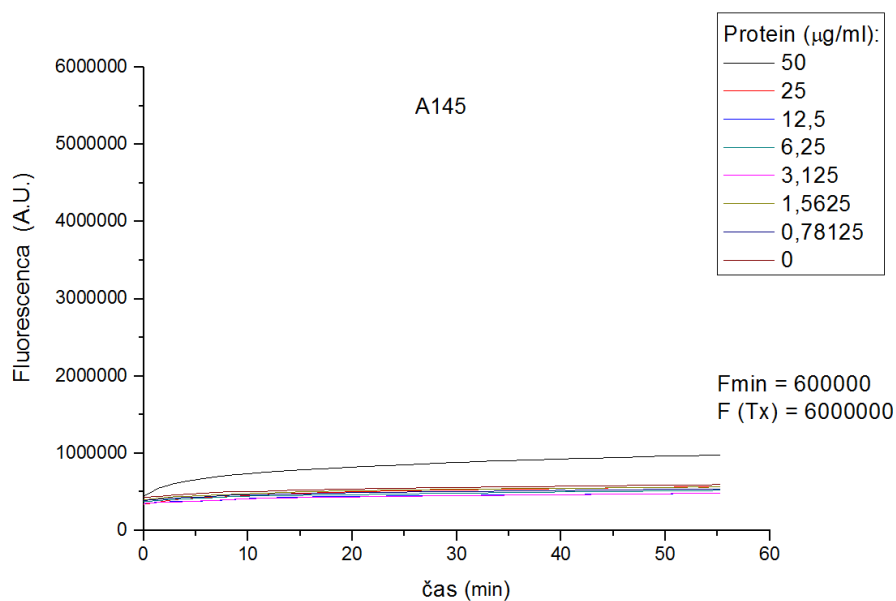


Slika 10. PVDF membrana po razvijanju v peroksidaznem substratu. Temne lise kažejo vzorce z vezanim proteinom OlyA, označenim s protitelesi.

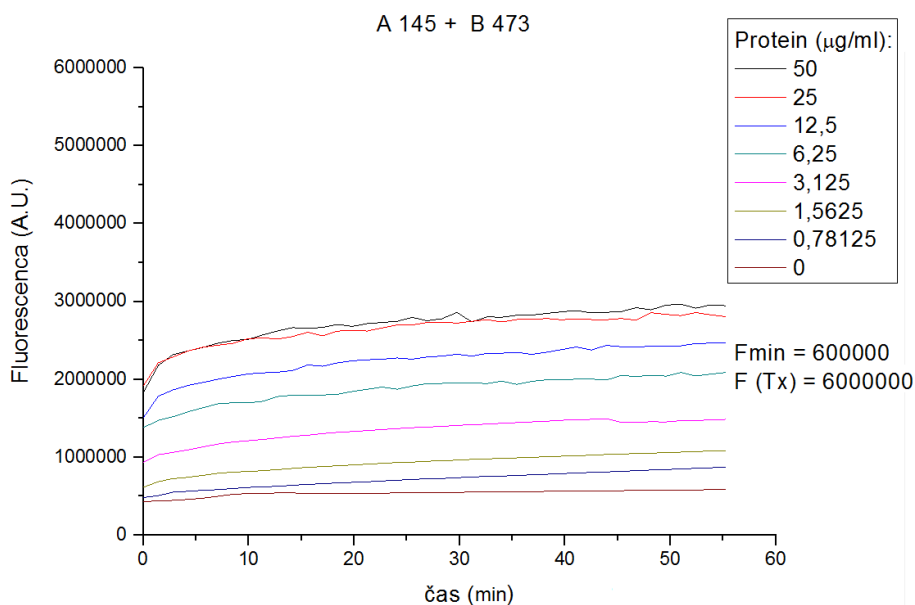
4.6 TEST LITIČNE AKTIVNOSTI PROTEINA

Pri merjenju sproščanja kalceina ob tvorbi membranskih por smo uporabili SUV izdelane iz lipidov spodnje faze in lipidov spodnje in zgornje faze v mešanici 1:1. Poleg naravnih lipidov smo uporabili tudi SUV izdelane iz mešanice komercialnih lipidov: SM-Hol, CPE-Hol, CPE-POPC in POPC-Hol.

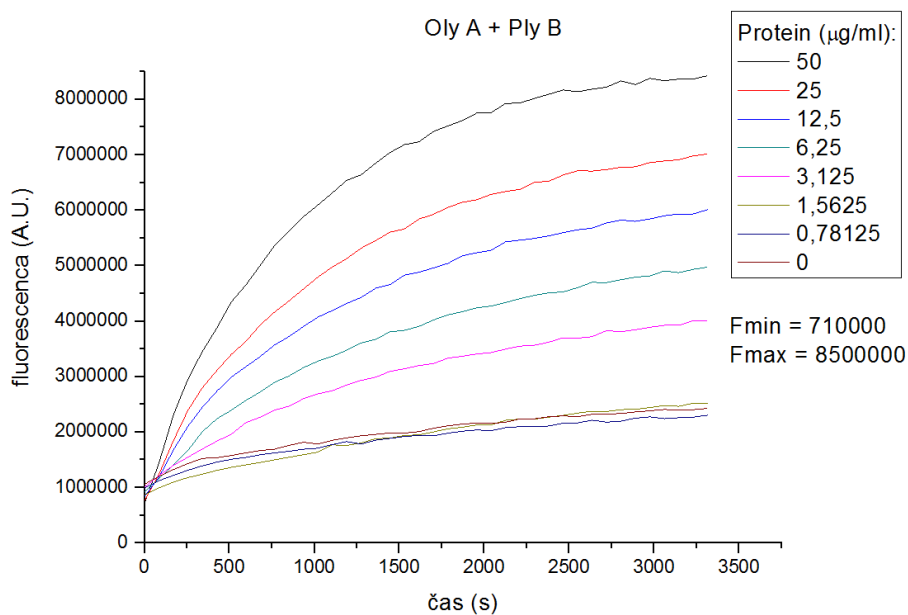
Ne A145, ne OlyA, niti njuna MACPF-proteinska partnerja, niso samostojno permeabilizirali veziklov. Kombinacija egerolizina A145 + B473 je povzročila delno lizo, vendar je bilo kasneje ugotovljeno, da je le-ta nespecifična in je posledica delovanja surfaktantov v reakcijski mešanici, v kateri je bil raztopljen B473 (le-ta je bil pridobljen s postopkom *in vitro* transkripcije-translacije) (Haris Munjaković, osebno sporočilo). Kombinacija OlyA + Ply B je lizirala vezikle izdelane iz lipidov spodnje faze, mešanice obeh faz ter vezikle SM : Hol, CPE : Hol in CPE : POPC. Opazili smo tudi, da so vezikli CPE : POPC slabo stabilni, saj je do izhajanja kalceina (vrednost F_{min}) prihajalo tudi ob odsotnosti proteinov.



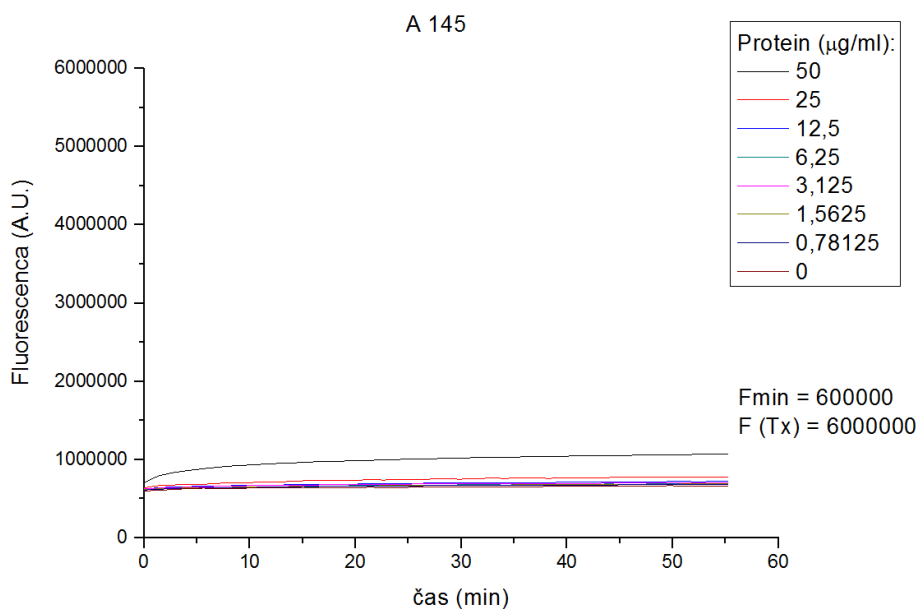
Slika 11. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz ekstrahiranih žuželčjih lipidov (spodnja faza; nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina A145 v različnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). F_{\min} najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(T_x)}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



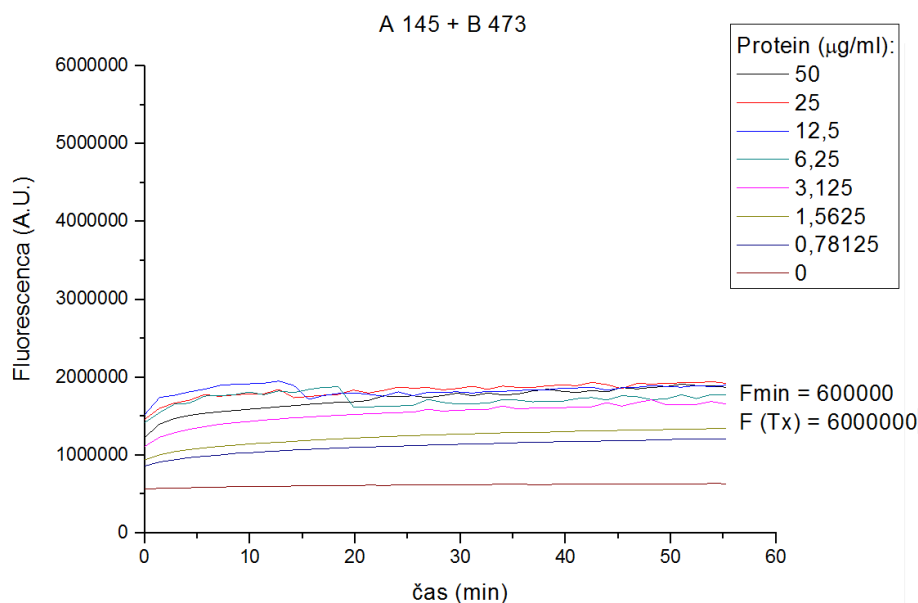
Slika 12. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz ekstrahiranih žuželčjih lipidov (spodnja faza; nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473 v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). F_{\min} najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(T_x)}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



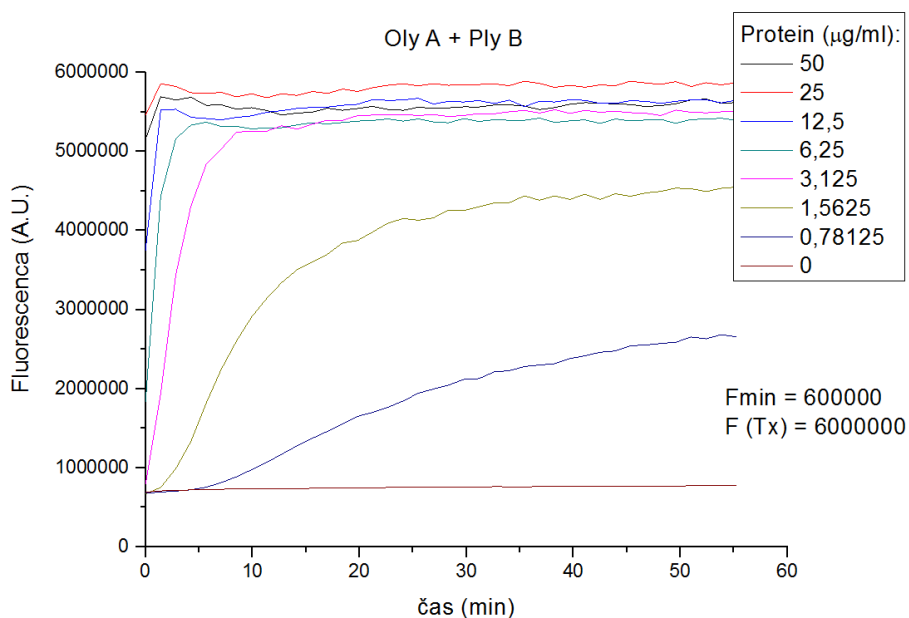
Slika 13. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz ekstrahiranih žuželčjih lipidov (spodnja faza; nepolarni lipidi) ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). F_{\min} najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), F_{\max} najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



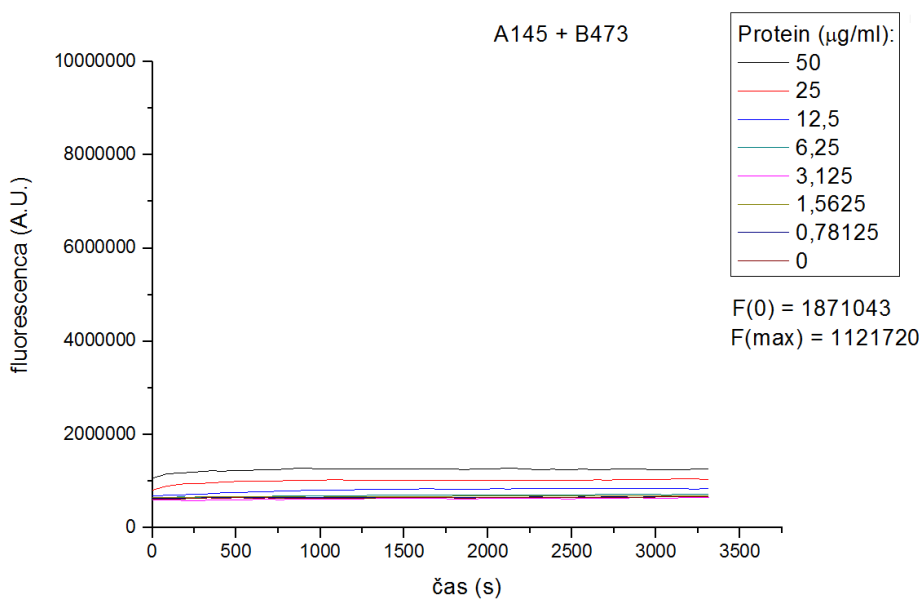
Slika 14. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz ekstrahiranih žuželčjih lipidov (spodnja in zgornja faza; polarni in nepolarni lipidi) v razmerju 1:1 ob dodatku egerolizina A145 v različnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). F_{\min} najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(T_x)}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



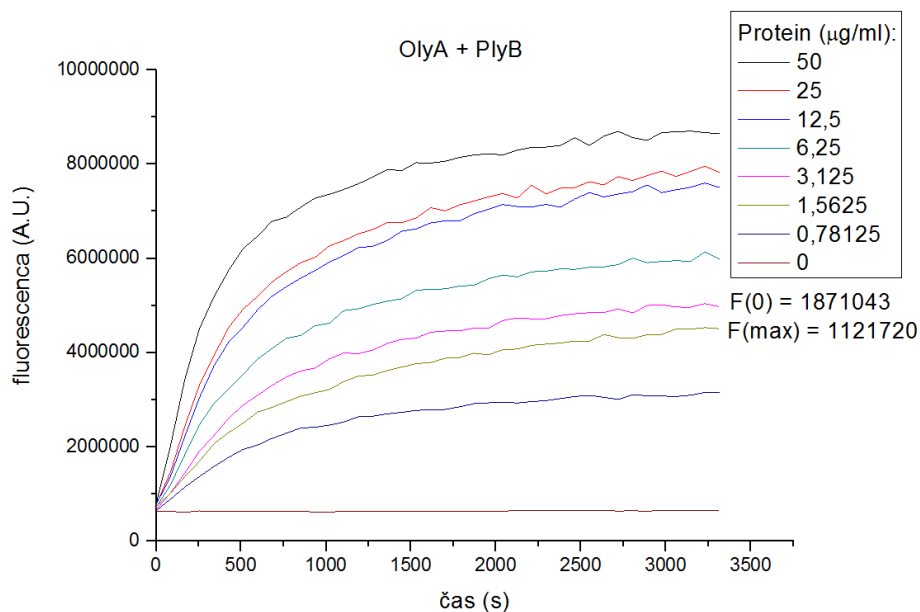
Slika 15. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz ekstrahiranih žuželčjih lipidov (spodnja in zgornja faza; polarni in nepolarni lipidi) v razmerju 1:1 ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473 v različnih skupnih koncentracijah (0-50 µg/ml). F_{\min} najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(Tx)}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



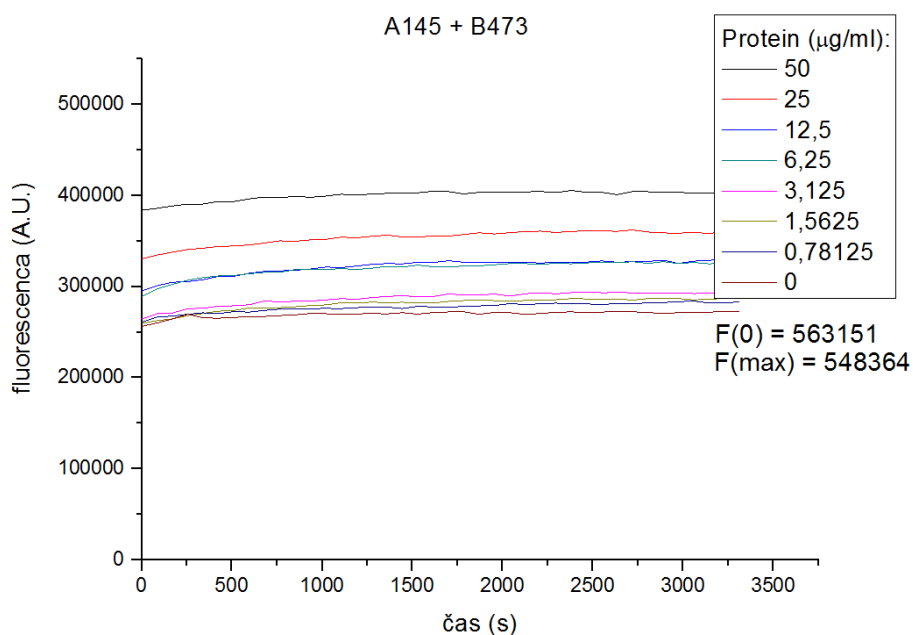
Slika 16. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz ekstrahiranih žuželčjih lipidov (spodnja in zgornja faza; polarni in nepolarni lipidi) v razmerju 1:1 ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B v različnih skupnih koncentracijah (0-50 µg/ml). F_{\min} najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(Tx)}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



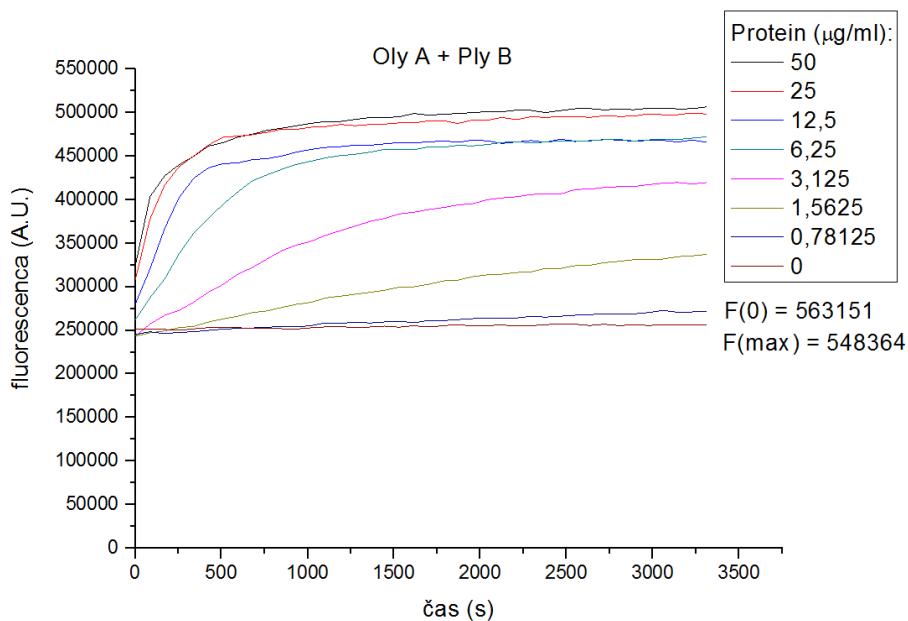
Slika 17. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:Hol ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473 v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). $F_{(0)}$ najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(\text{max})}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



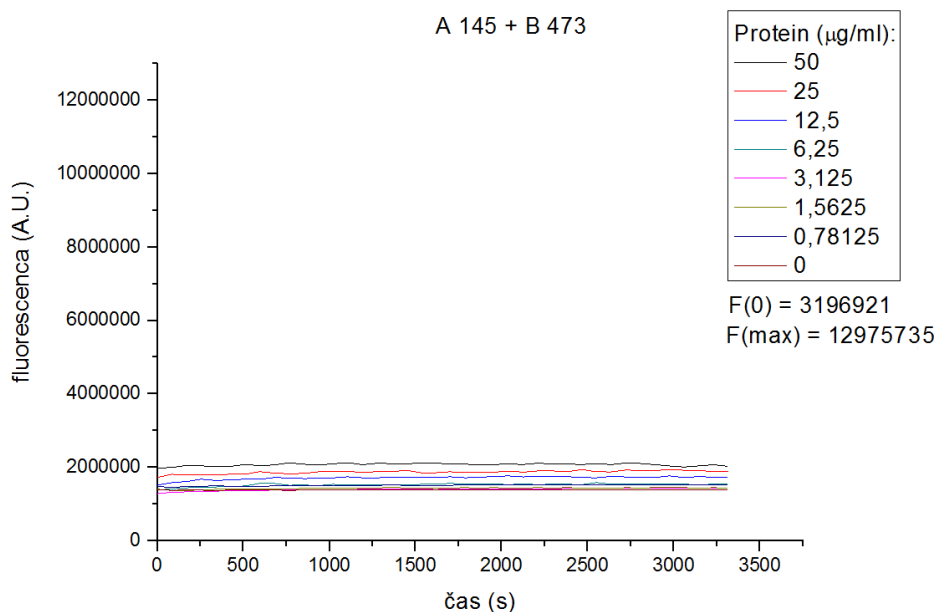
Slika 18. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:Hol ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). $F_{(0)}$ najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(\text{max})}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



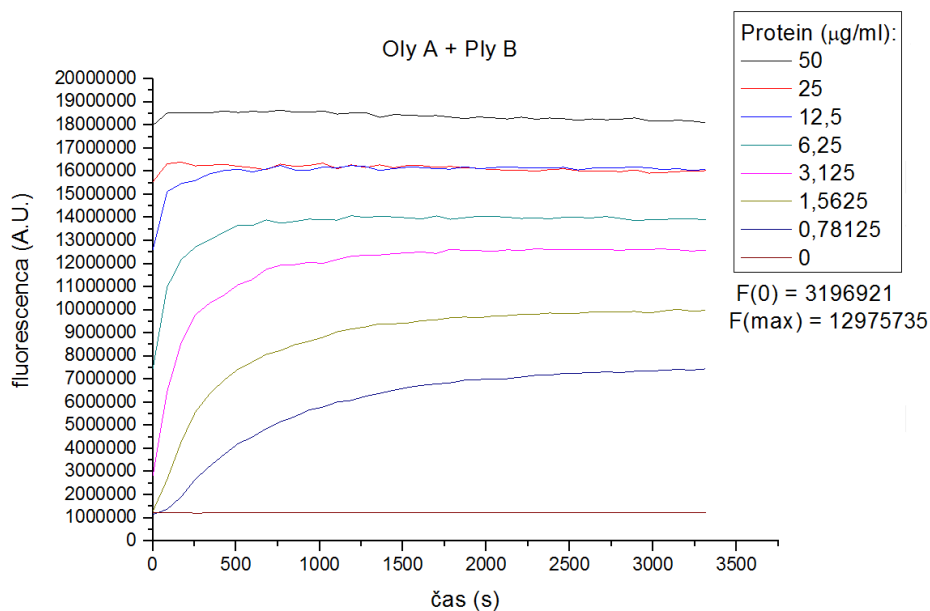
Slika 19. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:POPC ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473 v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). $F_{(0)}$ najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(\text{max})}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



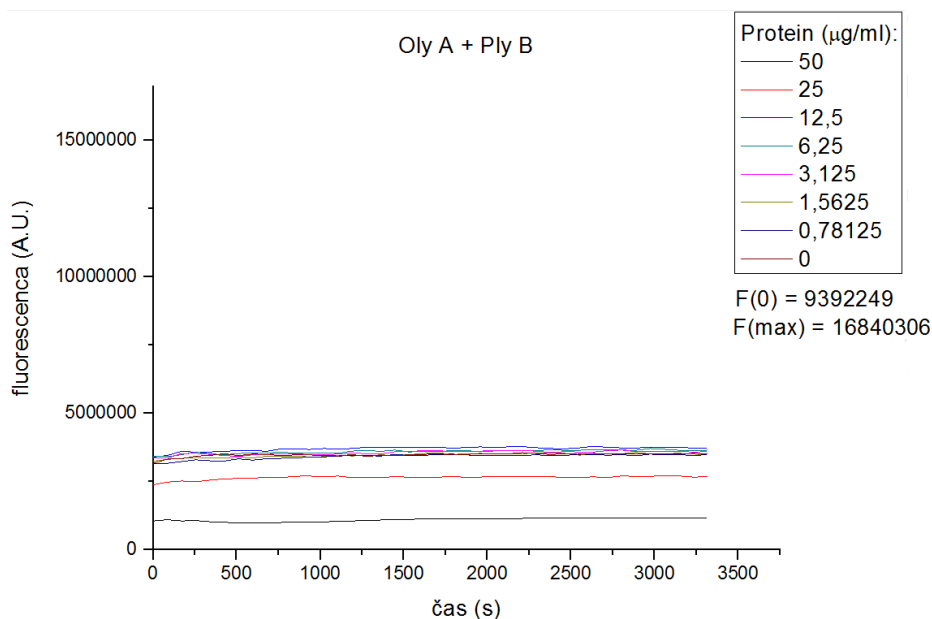
Slika 20. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov CPE:POPC ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). $F_{(0)}$ najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(\text{max})}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



Slika 21. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov SM:Hol ob dodatku egerolizina A145 in njegove MACPF komponente B473 v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). $F_{(0)}$ najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(\text{max})}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



Slika 22. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov SM:Hol ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). $F_{(0)}$ najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(\text{max})}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).



Slika 23. Časovni potek sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih veziklov narejenih iz mešanice komercialnih lipidov POPC:Hol ob dodatku egerolizina Oly A in njegove MACPF komponente Ply B v različnih skupnih koncentracijah (0-50 $\mu\text{g/ml}$). $F_{(0)}$ najnižja izmerjena vrednost fluorescence (pred dodatkom proteina), $F_{(\text{max})}$ najvišja izmerjena vrednost fluorescence (po dodatku detergenta Triton X-100).

5 RAZPRAVA

Glive so bogat vir biološko zanimivih molekul, med katere spadajo tudi proteini iz družine egerolizinov. Čeprav njihova natančna biološka vloga še ni znana, je njihova skupna lastnost vezava na specifične membranske lipide. Ta lastnost kaže na njihov potencial pri uporabi tako v klinične kot v komercialne namene. V komercialnem smislu je izredno zanimiva zamisel uporabe egerolizinov za namen zatiranja žuželk, saj bi zaradi vezave na specifične membranske lipide lahko aktivnost tovrstnih bioinsekticidov omejili na določen rod ali le vrsto žuželk.

V tej nalogi smo se osredotočili na egerolizinski protein A145, izoliran iz plesni *Aspergillus niger*. Iz predhodnih raziskav je znano, da se A145 označen s fluorescentnim proteinom m-Cherry veže na insektne lipide iz celične linije Sf9, izolirane iz celic metulja *Spodoptera frugiperda* (Novak, 2016). Želeli smo ovrednotiti interakcijo proteina z membranskimi lipidi, poseben poudarek smo namenili glikosfingolipidom kot možnim vezavnim partnerjem. Interakcija s temi molekulami bi lahko bila odgovorna tudi za vrstno specifične insekticidne učinke egerolizinskih kompleksov. Glikosfingolipidi, ki imajo veliko strukturno raznolikost in vrstno specifičnost, so bili nedavno potrjeni kot glavna vezavna mesta za pnevmolizin in streptolizin O. S tem se je nekoliko omajala paradigma, ki te medicinsko pomembne bakterijske proteine že vrsto desetletij uvršča v skupino toksinov, ki se vežejo na holesterol (Shewell in sod., 2014). Kot kontrolni protein smo uporabili Oly A izoliran iz bukovega ostrigarja, katerega vezava na lipidne mešanice CPE/Hol in SM/Hol je že znana in opisana (Bhat in sod., 2015; Ota in sod., 2013; Skočaj in sod., 2013).

Pri ekstrakciji lipidov iz homogeniziranih žuželčjih celicah smo uporabili modificirano metodo za izolacijo glikosfingolipidov (Seppo in sod., 2000). V dobljenem ekstraktu so se po centrifugiranju vzpostavile tri ločene faze, zgornja faza, ki je vsebovala polarne lipide, spodnja faza z nepolarnimi lipidi in tanka srednja faza. Zaradi majhne količine vzorca srednje faze nismo mogli uporabiti pri vseh poskusih, določili pa smo, da vsebuje večinoma nepolarne lipide ter precipitirane ostanke celic.

Koncentracijo ogljikovih hidratov v posameznih fazah smo določili z uporabo fenolnega testa. Absorbanco vzorcev smo merili z dvema spektrofotometroma ter nato izračunali povprečno absorbanco. Koncentracijo ogljikovih hidratov smo izmerili le v zgornji in spodnji fazi, ne pa v srednji zaradi premajhne količine in motnosti vzorca. Izkazalo se je, da je koncentracija ogljikovih hidratov v zgornji fazi približno dvakrat tolikšna kot v spodnji fazi, kar nakazuje, da se v njej nahaja večina glikosfingolipidov.

Delno karakterizacijo lipidov v izoliranih frakcijah smo izvedli tudi s pomočjo tankoplastne kromatografije. Kot mobilno fazo smo pri poskusu uporabili mešanico kloroforma, metanola in amonijaka v različnih razmerjih, saj smo želeli tem bolj natančno določiti sestavo posameznih faz. Za spodnjo fazo, ki je vsebovala nepolarne lipide, se je

izkazalo, da v njej prevladuje ceramid fosfoetanolamin, v zgornji fazi pa so lipidne lise bile komaj zaznavne in so pokazale prisotnost polarnih lipidov, ki niso potovali z nepolarno mobilno fazo. Srednja faza je pokazala skoraj identično lipidno sestavo kot spodnja faza.

Pri preverjanju vezave proteina A145 na multilamelarne vezikle se je protein jasno vezal le na vezikle iz nepolarnih lipidov spodnje faze in mešanice lipidov obeh faz. Vezave na lipide zgornje faze ter posledično vezave na glikosfingolipide nismo potrdili, s čimer smo ovrgli drugo delovno hipotezo.

To dejstvo smo upoštevali pri merjenju sproščanja kalceina iz SUV, zato nismo izdelali veziklov iz lipidov zgornje faze. Do sproščanja kalceina iz veziklov pride ob vezavi proteina in nastanka pore v membrani vezikla. Ker smo želeli določiti katera lipidna komponenta je ključna za vezavo proteinov in tvorbo por, smo vezikle izdelali iz različnih lipidnih mešanic. Ugotovili smo, da noben od uporabljenih egerolizinov, niti njuna MACPF proteinska partnerja, niso samostojno permeabilizirali nobenih veziklov. Prav tako se kombinacija A145 in B473 ni izkazala litično za nobeno od lipidnih mešanic, česar nismo pričakovali, saj prejšnje raziskave kažejo, da se A145 veže na liposome sestavljene iz mešanice CPE : Hol (Rajnović, 2015). To je lahko bodisi posledica neaktivnosti ene od proteinskih komponent, bodisi dejstva, da pri glivi *A. niger* egerolizin in MACPF-protein tudi skupaj ne v tvorita litičnih kompleksov, kot je bilo pokazano v primeru podobnih proteinskih kompleksov pri glivah rodu *Pleurotus*. Iz virov je znano, da se mešanica OlyA in PlyB veže na lipidne mešanice CPE : Hol in SM : Hol (Bhat in sod., 2015; Ota in sod., 2013; Skočaj in sod., 2013), kar je potrdil tudi naš poskus, saj je prišlo do lize veziklov obeh lipidnih mešanic. Zmes se je prav tako izkazala litično za vezikle izdelane iz lipidov spodnje faze, mešanice zgornje in spodnje faze v razmerju 1:1 ter deloma tudi za vezikle CPE : POPC. Slednji vezikli so se pri poskusu izkazali za nestabilne. Sklepamo, da je do lize prišlo zaradi prisotnosti CPE v spodnji fazi, kar smo dokazali tudi s pomočjo imunodetekcije po prenosu lipidov na PVDF membrano. Opazili smo tudi, da je sproščanje kalceina iz veziklov, sestavljenih iz lipidov obeh faz, bistveno močnejše (Slika 16.) v primerjavi z vezikli, sestavljenimi le iz lipidov spodnje faze (Slika 13.). To nakazuje, da so morda polarni lipidi v zgornji fazi pomembni pri membranski aktivnosti in olajšajo premeabilizacijo veziklov, ko so kompleksi OlyA/PlyB že vezani na membrano na SM/Hol domenah.

Že znano vezavo egerolizina A145 na CPE smo potrdili pri označevanju proteinov s protitelesi. Poskus je pokazal jasno vezavo proteina A145 na CPE in na lipide spodnje faze ter s tem potrdil prvo delovno hipotezo. Lastnost vezave proteina na CPE odpira nove možnosti uporabe egerolizinov v klinične in komercialne namene. Ena izmed možnosti je uporaba egerolizinov za namen zatiranja žuželk. Z uporabo specifičnih bioloških insekticidov, bi lahko močno zmanjšali škodljiv vpliv na okolje, ki ga prinaša škropljenje poljščin s široko spektralnimi insekticidi (Masson in sod., 2004). Do sedaj so že v uporabi dvo-komponentni egerolizinski kompleksi s Cry35 proteini, ki se uporabljajo kot vrstno

specifični insekticidi in nematocidi (Kelker in sod., 2014). Zanimiva je tudi zamisel izdelave transgenih sort poljščin. V ta namen so že izdelali transgeno sorto koruze, v katero so z gensko transformacijo vstavili gen iz *Bacillus thuringiensis* za sintezo egerolizinov. Ta gensko spremenjena sorta koruze izloča proteinske komplekse, ki v stiku z ličinkami koruznega hrošča prične delovati citolitično (Cranshaw, 2012).

V klinične namene je vezavo egerolizina A145 mogoče izkoristiti tudi kot biomarker za označevanje in vizualizacijo CPE. To lastnost so uporabili Bhat in sod. (2015) za označevanje larv vinskih mušic (*Drosophila*). Predlagali so tudi uporabo egerolizinov za detekcijo parazita *Trypanosoma brucei*, ki ga prenaša muha ce-ce. Muha je prenašalec parazita, ki je v tej fazi neaktiven, njegova membrana pa vsebuje SM in Hol. Ob prenosu parazita v kri človeka se sestava membranskih sfingolipidov spremeni iz SM v CPE, kar označuje prehod parazita v aktivno fazo, ki povzroča spalno bolezen in je v končni fazi za gostitelja smrtna. V takem primeru bi se egerolizine lahko uporabilo kot sonde za vezavo zdravil, protiteles ali toksinov na membrano parazita ter posledično zdravljenje spalne bolezni (Bhat in sod., 2015).

Kljub velikemu potencialu v klinične in komercialne namene je protein A145 v veliki večini v še neizkoriščen ter še čaka na svojo vlogo v biotehnološki industriji.

Sklepi:

- Egerolizin A145 se ne veže na lipidne vezikle, narejene iz frakcije polarnih lipidov, izoliranih iz žuželčjih celic.
- Egerolizin A145 se veže na lipidne vezikle, narejene iz frakcij nepolarnih lipidov, izoliranih iz žuželčjih celic, vendar teh veziklov ne permeabilizira niti sam, niti v kombinaciji z domnevnim MACPF proteinskim partnerjem.
- Interakcija egerolizina A145 z lipidnimi vezikli, narejenimi iz frakcije nepolarnih lipidov, izoliranimi iz žuželčjih celic, je verjetno posledica interakcije s ceramid fosfoetanolaminom, saj se protein veže na vezikle, sestavljene iz ekvimolarnega razmerja CPE:Hol.

6 POVZETEK

Egerolizini so relativno nova skupina proteinov, ki jih večinoma izločajo glive. Kljub njihovi še neznani biološki vlogi je njihova skupna lastnost vezava na membranske lipide.

V tej nalogi smo preučevali interakcijo rekombinantnega egerolizinskega proteina A145, izoliranega iz plesni *Aspergillus niger*, z žuželčjimi membranskimi lipidi ter poskusili pokazati, katera skupina membranskih lipidov je odgovorna za vezavo proteina. Posebej smo se posvetili interakciji proteina z glikosfingolipidi.

Po izolaciji lipidov iz celične linije smo interakcije z membranskimi lipidi testirali na več načinov. Vezavo proteina na multilamelarne vezikle smo analizirali s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze. Vezavo proteina na unilamelarne vezikle in tvorbo por smo izmerili s sproščanjem kalceina iz veziklov. Preverili smo tudi vezavo proteina, označenega s protitelesi.

Dobljeni rezultati so pokazali, da se A145 ne veže na glikosfingolipide, izolirane iz celic Sf9. Izkazalo pa se je, da A145 specifično reagira s ceramid fosfoetanolaminom ter z nekaterimi nepolarnimi lipidi, izoliranimi iz celic Sf9, med katerimi je tudi CPE. Dobljeni rezultati nakazujejo potencial uporabe egerolizina A145 in sorodnih proteinov kot potencialni bioinsekticid.

7 SUMMARY

Aegerolysins are a relatively new group of proteins found mostly amongst fungal species. Even though their exact biological role is not yet known, they have a common property of binding to membrane lipids.

In this thesis we studied the interaction of recombinant aegerolysin protein A145 from *Aspergillus niger* with insect membrane lipids and tried to show to which lipid group the protein binds. We paid special attention to protein interaction with glycosphingolipids.

After the isolation of lipids we used different techniques to evaluate the protein interaction with membrane lipids. We analyzed the binding to multilamellar vesicles using the polyacrylamide gel electrophoresis. We measured the release of calcein to evaluate the binding of the protein to the unilamellar vesicles and pore formation. We also tested the binding of the protein marked with antibodies.

The results showed that the A145 doesn't bind to glycosphingolipids from the Sf9 cell line. A145 did bind to ceramide phosphoethanolamine and some non-polar lipids from Sf9 cells, most probably the CPE. These results show the potential use of aegerolysin A145 and similar proteins as a potential bioinsecticide.

8 VIRI

- Albalasmeh A. A., Berhe, A. A., Ghezzehei, T. A. 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97, 2: 253–261
- Berne, S., Lah, L., Sepčič, K. 2009. Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, 18: 694–706
- Bhat, H. B., Ishitsuka, R., Inaba, T., Murate, M., Abe, M., Makino, A., Kohyama-Koganeya, A., Nagao, K., Kurahashi, A., Kishimoto, T., Tahara, M., Yamano, A., Nagamune, K., Hirabayashi, Y., Juni, N., Umeda, M., Fujimori, F., Nishiori, K., Yamaji-Hasegawa, A., Greimel, P., Kobayashi, T. 2015. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *The FASEB Journal*, 29, 9: 3920-3934
- Blackman, R., Eastop, V. 1994. *Aphids on the world's trees: An identification and information guide*. CAB international, Wallingford, Oxon: 987 str.
- Bravo, A., Gomez, I., Porta, H., Garcia-Gomez, B. I., Rodriguez-Almazan, C., Pardo, L., Soberon, M. 2011. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, 6, 1: 17-26
- Cini, A., Anfora, G., Escudero-Colomar, L. A., Grassi, A., Santosuosso, U., Seljak, G., Papini, A. 2014. Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila suzukii* in Europe. *Journal of Pest Science*, 87, 4: 559-566
- Corfield, A., Berry, M. 2015. Glycan variation and evolution in the eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 40, 7: 351-359
- Cranshaw, W. S. *Bacillus thuringiensis* Fact Sheet. Colorado State University Extension Service.
<http://www.ext.colostate.edu/pubs/insect/05556.html> (2. november 2012)
- Devine, G. J., Furlong, M. J. 2007. Insecticide use: Contexts and ecological successions. *Agriculture and Human Values*, 24: 281-306, doi: 10.1007/s10460-007-9067-z: 26 str.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J., Urwin, P. E. 2008. Nematode resistance. *New Phytologist*, 180, 1: 27-44
- Gassmann, A. 2012. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm: Predictions from the laboratory and effects in the field. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 3: 287-293
- Kelker, M. S., Berry, C., Evans, S. L., Pai, R., McCaskill, D. G., Wang, N. X., Russell, J. C., Baker, M. D., Yang, C., Pflugrath, J. W., Wade, M., Wess, T. J., Narva, K. E.

2014. Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. *PLOS One*, 9, 11: e112555, doi: 10.1371/journal.pone.0112555: 15 str.
- Lukyanova, N., Kondos, S. C., Farabella, I., Law, R. H. P., Rebould, 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 Biology*, 13, 1: e1002049, doi: 10.1371/journal.pbio.1002049: 15 str.
- Marheineke, K., Grünwald, S., Christie, W., Reiländer, H. 1998. Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS letters*, 441: 49-52
- Masson, L., Schwab, G., Mazza, A., Brousseau, R., Potvin, L., Schwartz, J. L. 2004. A novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1) containing a Cry34Ab1/Cry35Ab1 binary toxin specific for the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte forms ion channels in lipid membranes. *Biochemistry*, 43, 38: 12349-12357
- Novak, M., Kraševc, N., Skočaj, M., Maček, P., Anderluh, G., Sepčič, K. 2015. Fungal aegerolysin-like proteins: distribution, activities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 601–610
- Novak, M. 2016. Biološka vloga ter lastnosti egerolizinov in proteinov z domeno MACPF v nitasti glivi *Aspergillus niger*. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 126 str.
- 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
- Rajnović, D. 2015. Interakcije egerolizinskih proteina iz plijesni roda *Aspergillus* s membranskima lipidima. Diplomsko delo, Rijeka, Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju: 44 str.
- Rota-Stabelli, O., Blaxter, M., Anfora, G. 2013. *Drosophila suzukii*. *Current Biology*, 23, 1: R8-R9, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.021>: 2 str.
- Sasser, J. N., Freckman, D. W. 1987. A world perspective on nematology: the role of society. V: *Vistas on Nematology: a commemoration of the twenty-fifth anniversary*

of the Society of Nematologists. Veech, J. A., Dickson, D. W. (eds.). Lakeland, Society of Nematologists: 7-14

Seppo, A., Moreland, M., Schweinguber, H., Tiemeyer, M. 2000. Zwitterionic and acidic glycosphingolipids of the *Drosophila melanogaster* embryo. *European Journal of Biochemistry*, 267, 12: 3549-3558

Shewell, L. K., Harvey, R. M., Higgins, M. A., Day, C. J., Hartley-Tassel, L. E., Chen, A. Y., Gillen, C. M., James, D. B. A., Alonzo, F., Torres, V. J., Walker, M. J., Paton, J. C., Jennings, M. P. 2014. The cholesterol-dependent cytolysins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proceedings of the National Academy of Science*, 111, 49: 5312-5320

Skočaj, M., Resnik, N., Grunder, M., Ota, K., Rojko, N., Hodnik, V., Anderluh, G., Sobota, A., Maček, P., Veranič, P., Sepčič, K. 2014. Tracking cholesterol/sphingomyelin-rich membrane domains with the ostreolysin A-mCherry protein. *PLOS One*, 9, 3, e92783, doi: 10.1371/journal.pone.0092783: 12 str.

Vacaru, A. M., Van den Dikkenberg, J. B., Ternes, P., Holthuis, J. C. 2013. Ceramide phosphoethanolamine biosynthesis in *Drosophila* is mediated by a unique ethanilamine phosphotransferase in the Golgi lumen. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 16: 11520-11530

Valcarel, C. A., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M. E., Menestrina, G., 2001. Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolysins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophysical Journal*, 80, 6: 2761-2774

Van Timmeren, S., Isaacs, R. 2013. Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. *Crop protection*, 54: 126-133

Ward, D. P., DeGooyer, T. A., Vaughn, T. T., Head, G. P., McKee, M. J., Astwood, J. D., Pershing, J. C. 2004. Genetically enhanced maize as potential management option for corn rootworm: YieldGard[®] rootworm maize case study. V: Western corn rootworm: ecology and management. Vidal, S., Kuhlmann, U., Edwards, C. R. (eds.). Wallingford, CABI Publishing: 239-262

Yamaji-Hasegawa, A., Hullin-Matsuda, F., Greimel, P., Kobayashi, T. 2015. Pore-forming toxins: Properties, diversity and uses as tools to image sphingomyelin and ceramide phosphoethanolamine. *Biochimica et Biophysica Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.012>: 16 str.

ZAHVALA

Iskreno bi se rad zahvalil mentorici prof. dr. Kristini Sepčič za njeno izjemno prijaznost, razumevanje, pomoč pri delu ter vse napotke in popravke pri pisanju diplomske naloge. Hvala tudi tehnični sodelavki Nini Orehar za njeno potrpežljivost in pomoč pri delu v laboratoriju.

Hvala predsednici komisije za zagovor doc. dr. Poloni Zalar ter recenzentu prof. dr. Petru Mačku za strokovno oceno in popravo diplomskega dela.

Hvala tudi mojima staršema za vztrajno spodbudo ter moralno in finančno podporo tekom mojega študija.