

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Blaž TOMC ZIDAR

**IZOLACIJA IN LASTNOSTI CITOLITIČNEGA  
PROTEINA PARBORLIZINA IZ ANTARKTIČNEGA  
NITKARJA *Parborlasia corrugatus***

DIPLOMSKO DELO

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Blaž TOMC ZIDAR

**IZOLACIJA IN LASTNOSTI CITOLITIČNEGA PROTEINA  
PARBORLIZINA IZ ANTARKTIČNEGA NITKARJA *Parborlasia  
corrugatus***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CYTOLYTIC  
PROTEIN PARBORLYSIN FROM AN ANTARCTIC  
HETERONEMERTINE *Parborlasia corrugatus***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije, na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja imenovala doc. dr. Mateja Butala.

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Predsednica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matej BUTALA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je elektronska oblika naloge identična tiskani verziji.

Blaž Tomc Zidar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK UDK 577:547.96(043.2)=163.6

KG protein/hemoliza/nitkar/plazmid/izooblika

AV TOMC ZIDAR, Blaž

SA BUTALA, Matej (mentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2013

IN IZOLACIJA IN LASTNOSTI CITOLITIČNEGA PROTEINA PARBORLIZINA IZ  
ANTARKTIČNEGA NITKARJA *Parborlasia corrugatus*

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP VIII, 30 str., 5 pregl., 11 sl., 14 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Iz antarktičnega morskega nitkarja *Parborlasia corrugatus* smo želeli pridobiti kodirajoče nukleotidno zaporedje za citolitičen toksin paraborlizin. Iz vzorca tkiva, ki je bil hemolitičen, smo izolirali celokupno RNA in pripravili molekule cDNA. Izdelali smo degenerirani začetni oligonukleotid glede na znano N-terminalno aminokislinsko zaporedje paraborlizina ter pomnožili gen za paraborlizin od N-terminalnega konca do poli-A-repa. Izdelali smo knjižnico plazmidov z vključki kodirajoče regije paraborlizina in jim določili zaporedje. Identificirali smo sedem izooblik paraborlizina, med katerimi ima večina po šest ostankov cisteina, le ena izooblika pet cisteinov. Prevedena zaporedja smo poravnali in primerjali s homolognim citotoksinom A-III. Po *de novo* metodi smo izdelali 3-D model proteina paraborlizina, ki je predvidoma zgrajen iz alfa heliksov. Identificirana zaporedja omogočijo pripravo rekombinantnega proteina za študije lastnosti, aktivnosti ter možnosti biotehnoške uporabe proteina.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

DC UDK 577:547.96(043.2)=163.6

CX protein/hemolysis/nemertine/plasmid/isoform

AU TOMC ZIDAR, Blaž

AA BUTALA, Matej (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2013

TI ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A CYTOLYTIC PROTEIN  
PARBORLYSIN FROM AN ANTARCTIC HETERONEMERTINE *Parborlasia  
corrugatus*

DT Graduation thesis (University studies)

NO VIII, 30 p., 5 tab., 11 fig., 14 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The goal of this study was to obtain the coding DNA sequence for parborlysin from the aquatic nemertine *Parborlasia corrugatus*. We isolated the complete RNA sequence from the nemertine tissue sample, which proved to be hemolytic and subsequently cDNA was prepared. We designed the degenerate oligonucleotide primer with respect to the known N-terminal amino acid sequence of parborlysin and multiplied the gene for parborlysin from the N-terminal end to the poly- A tail. We constructed a plasmid library with inserts from the parborlysin coding region and analysed the sequence. Seven isoforms of parborlysin were identified, the majority of which have six cysteine residues, with one exception that has five. We aligned the translated sequences and compared them with the homologous cytotoxin A-III. We used the *de novo* method to construct a 3-D model of the protein parborlysin, which seems to be composed mostly of alpha helices. The identified sequences enable the synthesis of a recombinant protein in order to study its characteristics and activity, a protein with potential for biotechnological use.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPIS ORGANIZMA .....	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>1</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>7</b>
3.1 MATERIALI .....	7
<b>3.1.1 Kemikalije in laboratorijska oprema .....</b>	<b>7</b>
3.2 METODE .....	8
<b>3.2.1 Vir tkiva nitkarja <i>Parborlasia corrugatus</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.2 Homogenizacija nemertina .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.3 Test hemolitičnosti .....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.4 Izolacija RNA .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.5 Analiza koncentracije in čistosti RNA .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.6 Priprava cDNA .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.8 Agarozna gelska elektroforeza .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.9 Priprava cDNA knjižnice .....</b>	<b>12</b>
3.2.9.1 Ligacija vključka v vektor .....	12
3.2.9.2 Priprava kompetentnih celic .....	12
3.2.9.3 Transformacija .....	12
3.2.9.4 Izolacija plazmidne DNA .....	13
3.3. BIOINFORMATSKA ORODJA .....	13
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>14</b>
4.1 TKIVO NITKARJA <i>P. corrugatus</i> JE HEMOLITIČNO ZA GOVEJE ERITROCITE	14
4.2 KAKOVOST IZOLIRANE RNA IZ NEMERTINA <i>P. corrugatus</i> .....	15
4.3 SINTEZA ODSEKA DNA S STRUKTURNIM GENOM ZA PARBORLIZIN .....	16
4.4 NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE PARBORLIZINA .....	18
4.5 IZDELAVA 3-D MODELA PROTEINA PARBORLIZINA .....	22
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	<b>24</b>
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>27</b>
<b>6 SUMMARY .....</b>	<b>28</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>29</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Zastopanost aminokislin v molekuli toksina A-III, iz nitkarja <i>Cerebratulus lacteus</i> (prirejeno po: Kem in Blumenthal, 1978 ).....	2
Preglednica 2: Lastnosti izoliranih molekul RNA iz tkiva predela glave <i>P. corrugatus</i> .....	15
Preglednica 3: Fizikalne lastnosti začetnikov ter njihova zaporedja. Nukleotidi označeni z Y se lahko pariyo z deoksiribonukleotidom, ki vsebuje bazo citozin ali timin, nukleotid N pa z nukleotidom, ki vsebuje bazo adenin, timin, citozin ali gvanin.....	16
Preglednica 4: Nukleotidna zaporedja sedmih izooblik paraborlizina (P1-P7).....	19
Preglednica 5: Prevedena nukleotidna zaporedja sedmih izooblik paraborlizina (P1-P7)..	21

## KAZALO SLIK

Slika 1: Terminalna zaporedja treh najpogostejših izoform toksinov A iz <i>Cerebratulus lacteus</i> .....	4
Slika 2: Čistost in okvirna molekulska masa izoliranega nativnega parborlizina. A) V NaDS-PAGE analizi protein potuje kot homogena lisa, velikosti okrog 10 kDa. B) Izoelektrično fokusiranje nakazuje, da ima protein izoelektrično točko pri vrednosti pH 9 ali višje .....	5
Slika 3: N-terminalno zaporedje kaže visoko stopnjo homologije s citolizinom A-III organizma <i>Cerebratulus lacteus</i> (Berne in sod., 2002) .....	5
Slika 4: Časovni potek hemolize govejih eritrocitov s parborlizinom v koncentraciji od 0.72, 1.44, 2.88, 5,75, do 11.5 µg/mL koncentraciji parborlizina (Berne in sod., 2002) .....	6
Slika 5: Odstotek hemolize govejih eritrocitov v odvisnosti od različnih koncentracij parborlizina (Berne in sod., 2002) .....	6
Slika 6: Sprememba optične gostote govejih eritrocitov pri 600 nm v odvisnosti od časa inkubacije s tkivno kašo pridobljeno iz tkiva v predelu glave. Padec optične gostote nakazuje na prisotnost paraborlizina v tkivu. Oblika krivulje kaže na detergentsko delovanje toksina. ....	14
Slika 7: Sintetizirana cDNA iz nitkarja <i>P. corrugatus</i> . Lestvica (L) v baznih parih (bp) označuje potovanje molekul DNA različnih velikosti v gelu. Linija 1. označuje vzorec cDNA 1; linija 2. pa vzorec cDNA 2, sintetiziranih iz vzorcev RNA 1 ali RNA 2. Lise cDNA .....	16
Slika 8: Pomnožek odseka gena za histon H3 iz pripravljene cDNA. Lestvica (L) označuje potovanje molekul DNA v velikosti 300 bp.....	17
Slika 9: Agarozni gel po izrezanju fragmentov, ki domnevno nosijo zapis za paraborlizin, v velikostih med 300-500 bp.....	18
Slika 10: Poravnava aminokislinskih zaporedij paraborlizina ter zaporedja citotoksina A-III. Ohranjeni aminokislinski ostanki so prikazani v črnem, fizikalno-kemijsko podobne aminokislilne so v sivem ozadju in aminokislilne z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi v belem. Vrzeli so prikazane s črto.....	22
Slika 11: 3-D model parborlizina v dveh orientacijah. Paraborlizin je predvidoma zgrajen iz α heliksov Ostanki cisteina so prikazani kot aminokislinski ostanki, ki pa so prikazani s skeletno strukturo vezi.....	23



## 1 UVOD

### 1.1 OPIS ORGANIZMA

*Parborlasia corrugatus* spada v deblo nitkarjev Nemertini. Obustni aparat je v obliki proboscisa in služi za prehranjevanje, kot tudi za tudi obrambne funkcije. Antarktična vrsta nitkarja *P. corrugatus* živi v globinah do 4000 metrov ter je široko razširjen mrhovinar ter plenilec. Odrasel osebek meri od enega do dveh metrov v dolžino ter okrog 2 centimetra v širino in je ena največjih vrst nitkarjev. Povprečna teža je okrog 100 gramov. Kisik absorbirajo skozi telesno površino, v razmerah, ko kisika ni dovolj, se splošči ter podaljša in tako izboljša razmerje med površino ter volumnom, kar omogoča boljšo preskrbo s kisikom. Čeprav je ta nitkar pogost v antarktičnem bentoškem okolju se z njim hranijo le redki plenilci, kar nakazuje na prisotnost obrambnih toksinov v organizmu (Berne, 2003). *P. corrugatus* izloča kisel mukus, ki ima vrednost pH ~3,5 (Heine in sod., 1991) in v njem za zaščito pred plenilci sintetizira nabor edinstvenih toksinov.

### 1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj naloge je določiti kodirajoče nukleotidno zaporedje citolitičnega proteina, parborlizina iz vrste nitkarja *Parborlasia corrugatus*, nukleotidno zaporedje prevesti v aminokislinsko zaporedje proteina ter ga primerjati z drugimi znanimi proteini. Slednje bi omogočilo izdelavo rekombinantnega toksina in boljšo opredelitev njegovih lastnosti.

## 2 PREGLED OBJAV

Več kot 70 let je znano, da morski nemertini sintetizirajo vrsto toksinov (Bacq, 1936). Nekateri od teh toksinov so tudi izolirali, iz vrst kot so npr. *Paranemertes peregrina* (Kem in sod., 1971), *Amphiporus angulatus* (Kem in sod., 1976) ter heteronemertina *Cerebratulus lacteus* (Kem, 1976; Kem in Blumenthal, 1978). Iz slednjega so raziskovalci izolirali toksin A-III, ki je eden prvih pa tudi najboljše opisan toksin iz nitkarjev. Protein je zgrajen iz 95 aminokislin in se vrinja v membrane različnih celic ter tvori velike

membranske pore, ki povzročijo sprostitvev proteinov iz celic, ki je primerljivo sproščanju majhnih organskih molekulah ali neorganskih ionih (Kem, 1994). Protein je zgrajen pretežno iz alfa vijačnic, prostorsko zgradbo pa oblikujejo tri disulfidne vezi (Kem, 1994). Posledično je protein neobčutljiv na mnoge proteaze ter ima zelo stabilno strukturo, ki se ne poruši niti nad 90 °C, pri nizkem pH in/ali ob izpostavitvi ureii (Blumenthal, 1980). Postranslacijska modifikacija toksina A-III vključuje kovalentno vezavo dveh oleinskih kislin na protein, kar povzroči tetramerizacijo proteina in poveča hemolitično aktivnost v primerjavi z monomernim proteinom (Liu in Blumenthal, 1991). Na hemolitično aktivnost proteina vplivata tudi koncentraciji monovalentnih ter divalentnih kationov, nizka koncentracija ionov pa tudi poveča aktivnost proteina (Liu in Blumenthal, 1988). V mukusu nitkarja *Cerrebratulus lacteus* so zastopani predvsem trije toksini tipa A, katerih aminokislinska sestava (Preglednica 1, aminokislinska sestava citotoksina A-III) in N-terminalna zaporedja toksinov (Slika 1), se minimalno razlikujejo (Kem in Blumenthal, 1978).

Preglednica 1: Zastopanost aminokislin v molekuli toksina A-III, iz nitkarja *Cerebratulus lacteus* (prirejeno po: Kem in Blumenthal, 1978 )

Aminokislina	Zastopanost (%)	Število ostankov
Lizin	13,04	13
Histidin	1,00	1
Arginin	2,98	3
Cistein	5,92	6
Lizin	13,04	13
Histidin	1,00	1

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje.

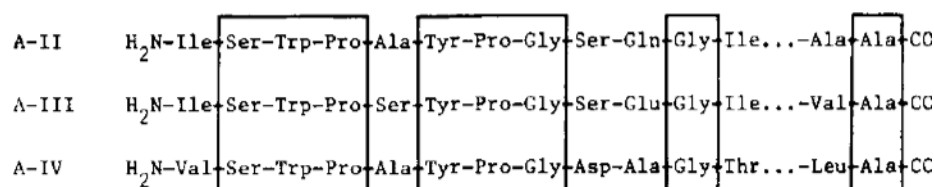
Preglednica 1: Zastopanost aminokislin v molekuli toksina A-III, iz nitkarja *Cerebratulus lacteus* (prirejeno po: Kem in Blumenthal, 1978 )

Aminokislina	Zastopanost (%)	Število ostankov
Aspartat	5,84	6
Histidin	1,00	1
Arginin	2,98	3
Cistein	5,92	6
Aspartat	5,84	6
Treonin	3,04	3
Serin	7,04	7
Glutamat	4,22	4
Prolin	2,19	2
Glicin	11,54	12
Alanin	12,58	13
Valin	6,92	7
Metionin	0,00	0
Izoleucin	5,81	6
Leucin	5,00	5
Tirozin	1,00	1

... nadaljevanje.

Preglednica 1: Zastopanost aminokislin v molekuli toksina A-III, iz nitkarja *Cerebratulus lacteus* (prirejeno po: Kem in Blumenthal, 1978 )

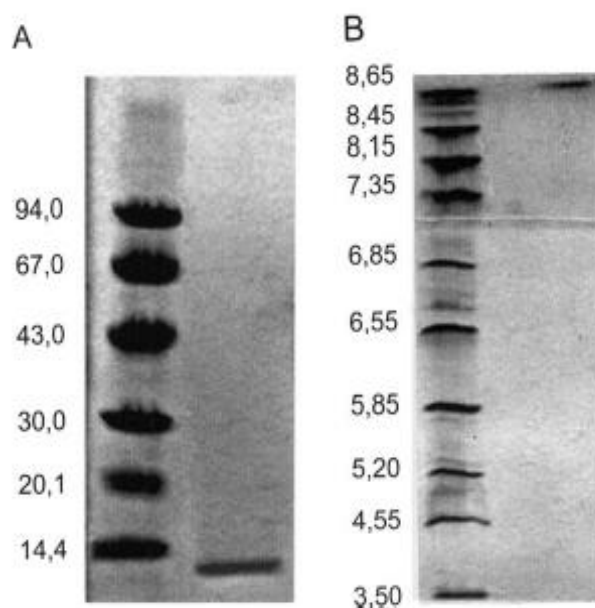
Aminokislina	Zastopanost (%)	Število ostankov
Fenilalanin	2,00	2
Triptofan	1,62	2



Slika 1: Terminalna zaporedja treh najpogostejših izoform toksinov A iz *Cerebratulus lacteus*

Protein s citolitičnimi lastnostmi izolirali tudi iz Antarktičnega nitkarja vrste *Parborlasia corrugatus* in ga poimenovali parborlizin (Berne in sod., 2002). Žival so predhodno izpostavili 1 % raztopini očetne kisline, ki stimulira izločanje mukusa obogatenga s toksini. Nativni protein parborlizin so očistili z različnimi kromatografskimi metodami, proteinu določili izoelektrično točko in N-terminalno zaporedje 24 aminokislin.

Nativni protein ima molekulsko maso 10,3 kDa, z izoelektrično točko v bazičnem pH (pI>9), (Slika 2). Čeprav je bil vzorec homogen, je HPLC kromatografija z reverzno fazo, v kombinaciji z drugimi elektroforetskimi tehnikami pokazala prisotnost izotoksinov.



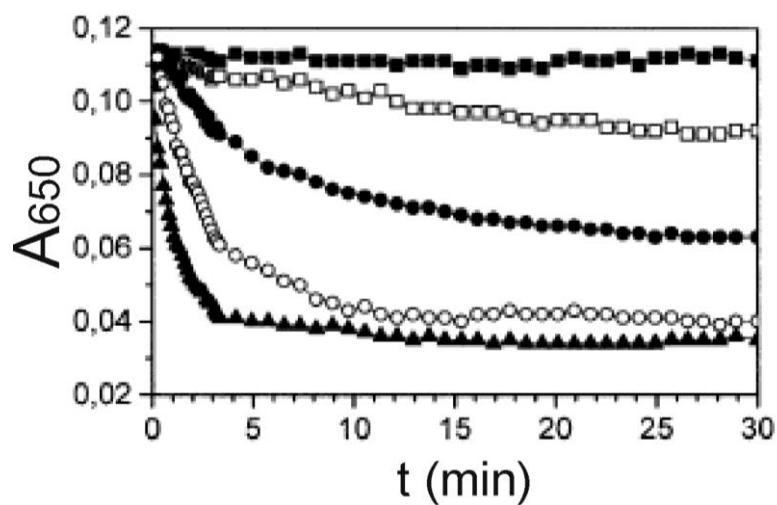
Slika 2: Čistost in okvirna molekulska masa izoliranega nativnega parborlizina. A) V NaDS-PAGE analizi protein potuje kot homogena lisa, velikosti okrog 10 kDa. B) Izoelektrično fokusiranje nakazuje, da ima protein izoelektrično točko pri vrednosti pH 9 ali višje

Z Edmanovo degradacijo so določili delno N-terminalno zaporedje proteina (Slika 3). Primerjava N-terminalnih zaporedij kaže, da sta si proteina parborlizin in toksin A-III homologna, kar nakazuje na podobno funkcijo obeh proteinov, ki sta se razvila iz skupnega prednika. Določitev N-terminalnega aminokislinskega zaporedja je tudi nakazala, da naj bi tako kot v vrsti *Cerebratulus lacteus* tudi v vrsti *Parborlasia corrugatus* najverjetneje obstajalo več izooblik tega proteina, saj je analiza na mestih 8 in 18 v proteinu pokazala prisotnost različnih aminokislin.



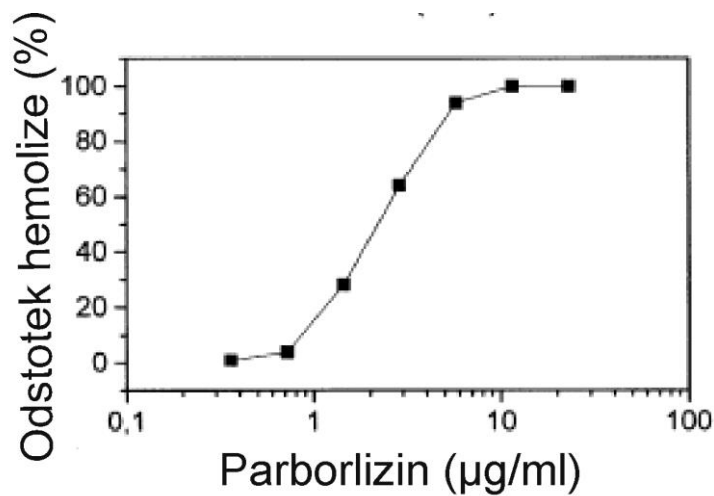
Slika 3: N-terminalno zaporedje kaže visoko stopnjo homologije s citolizinom A-III organizma *Cerebratulus lacteus* (Berne in sod., 2002)

Parborlizin je hemolitičen. Toksin že v mikromolarnih količinah lizira eritrocite sesalcev, a prve raziskave nakazujejo, da je mehanizem delovanja parborlizina drugačen kakor v primeru toksina A-III, saj lizo najverjetneje povzroči z detergentskim načinom delovanja (Berne in sod., 2002).



Slika 4: Časovni potek hemolize govejih eritrocitov s parborlizinom v koncentraciji od 0.72, 1.44, 2.88, 5,75, do 11.5 µg/mL koncentraciji parborlizina (Berne in sod., 2002)

Popolna hemoliza s parborlizinom poteče pri koncentracijah proteina okrog 10 µg/mL (Slika 5).



Slika 5: Odstotek hemolize govejih eritrocitov v odvisnosti od različnih koncentracij parborlizina (Berne in sod., 2002)

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije in laboratorijska oprema

avtomatske pipete - Eppendorf, Nemčija

etanol - Merck, Nemčija

epruvete - Eppendorf, Nemčija

glicerol - Kemika, Hrvaška

metanol - Merck, Nemčija

mikrotitrne plošče - TPP, Švica

Multikanalna pipeta - Eppendorf, Nemčija

96 % Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) - Merck, Nemčija

100 % Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) - Merck, Nemčija

NaCl - Merck, Nemčija

Tris-HCl - Merck, Nemčija

pufer TE - (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA)

pufer za eritrocite - 0,02 M Tris-HCl (pH 7,4) in 0,13 M NaCl

fiziološka raztopina - 0,9 % NaCl

Medij LB - (10 g/L kazeinski hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl)

Just cDNA Double-Stranded cDNA Synthesis Kit – (Agilent Technologies)

GeneJET Gel Extraction Kit - (Fermentas)

GeneJET Plasmid Miniprep Kit – (Fermentas)

GeneJET PCR Purification Kit - (Fermentas)

centrifuge - Sigma 3 K30, ZDA in Centric 322A, Tehtnica, Slovenija

čitalec mikrotitrnih plošč - MRX, Dynex technologies, Nemčija

Elvehjem-Potterjev homogenizer - Tehtnica, Slovenija

vorteks - Vibromix 10, Tehtnica, Slovenija

magnetno mešalo - IKA, Nemčija

rotavapor in vodna kopel - R-134, Buchi, Švica ter B-480, Buchi, Švica

tehtnica - Sartorius, Švedska

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Vir tkiva nitkarja *Parborlasia corrugatus*

Vzorci tkiva *Parborlasia corrugatus* so nabrali v potopih blizu britanske raziskovalne postaje Rothera na Antarktičnem polotoku. Nabral jih je prof. Frithjof Kuepper iz Univerze v Aberdeenu ter poslal na Biotehniško fakulteto. Iz osebka dolgega okrog 1m so v predelu glave odrezali 10 centimetrski vzorec, ki je vključeval tudi proboscis. Tkivo so nato fiksirali v 50 mL plastičnih epruveh z navojnim zamaškom in dodali sredstvo za stabilizacijo RNA (RNALater, Qiagen, ZDA).

### 3.2.2 Homogenizacija nemertina

Zamrznjeno tkivo glave nitkarja *Parborlasia corrugatus* shranjenega v RNALater (Qiagen, ZDA) smo odmrznili ter košek tkiva velikosti 1x1cm razrezali s sterilnim in z RNAzap očiščenim skalpelom. Tkivno kašo smo pridobili s homogeniziranjem v prisotnosti Lysis pufra (Promega) v desetih pasažah z Elvejham-Potterjevim homogenizerjem pri 4 °C, na ledu. Med celotnim postopkom homogenizacije smo uporabljali material ter opremo, ki ne vsebuje RNaz. Dobljeni homogenat smo dodatno dezintegrirali z ultra-zvokom pri 40 moči, v petih serijah po 30 sekund na napravi Sonics, VCX 750.

### 3.2.3 Test hemolitičnosti

Test hemolitičnosti tkivne kaše *Parborlasia corrugatus* smo opravili s turbidimetrično metodo, kot sta jo opisala Maček in Lebez (1981). Goveje eritrocite smo sprali 3-krat, in sicer z vmesnim centrifugiranjem, odstranili supernatant in jih resuspendirali v fiziološki raztopini (0.9 % NaCl). Po zadnjem centrifugiranju smo sprane eritrocite resuspendirali v pufru za eritrocite (0,13 M NaCl ter 0,02 M Tris, pH 7,4). Za spremljanje hemolize smo suspenzijo eritrocitov umerili z mikrotitrskim čitalcem pri 630 nm na absorbanco vrednosti 0,5. V jamice smo odpipetirali 100 µl eritrocitnega pufra, 100 µl eritrocitne suspenzije ter 20 µl tkivne kaše vzorca nitkarja *Parborlasia corrugatus*. Določili smo čas potreben za 50 % hemolizo ( $t_{50}$ ), tako da smo pri valovni dolžini 630 nm z mikrotitrskim čitalcem spremljali časovni potek upada absorpcije na polovico začetne vrednosti.



### 3.2.4 Izolacija RNA

Celokupno RNA *Parborlasia corrugatus* smo izolirali s kitom SV Total RNA Isolation System, Quick Protocol (Promega) po navodilih proizvajalca. Tkivo smo pripravili kot je opisano v postopku homogenizacije. Tkivni kaši smo dodali 175  $\mu$ L Lysis pufra. Po lizi celic smo dodali še 350  $\mu$ l pufra za redčenje ter nekajkrat premešali vzorec. Celični lizat smo odcentrifugirali v 10 minutah pri 12000-14000 obratih na minuto, da ločimo delce celic in tkiva. Supernatantu, ki vsebuje citoplazemsko vsebino celic smo nato dodali 200  $\mu$ L 95 % etanola ter ga odpipetirali v zbiralne epice z membrano iz silikagela. Po centrifugiranju pri 12000-14000 obratih na minuto se molekule nukleinskih kislin pričvrstijo na filter iz silikagela in z njih v naslednjem koraku speremo nečistoče s 600  $\mu$ l RNA Wash raztopine. Nukleinske kisline smo nato obdelali s sveže pripravljeno DNazno mešanico, s katero smo razgradili DNA v vzorcu, vendar se pri tem postopku molekule RNA ohranijo (40  $\mu$ L Yellow core Buffer, 5 $\mu$ l 0.09M MnCl<sub>2</sub> ter 5 $\mu$ l DNase I). Na membrano smo odpipetirali 50  $\mu$ l DNazne mešanice ter jo pri sobni temperaturi inkubirali 15 min, s čimer smo dosegli, da je raztopina temeljito pronicala v silikagel z nukleinskimi kislinami. Po 15 min smo dodali 200  $\mu$ l DNA-za Stop raztopine, ki blokira delovanje Dnaz. Molekule RNA smo sprali iz silikagela s 100  $\mu$ l de-ionizirane vode brez nukleaz ter jih odcentrifugirali pri 12000-14000 obratih 1 min, s čimer smo sprali RNA in jo nato shranili pri  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.5 Analiza koncentracije in čistosti RNA

Koncentracijo RNA smo določili spektrometrično s spektrofotometrom Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA) ter pripadajočo programsko opremo. Absorbanco vzorca smo izmerili v območju svetlobe UV pri 260 nm in 280 nm. Razmerje 260/280, razmerje med absorbancama pri teh valovnih dolžinah v nm, je merilo čistosti RNA. V kolikor je RNA čista je razmerje vrednosti 260/280 okrog 2,0. Čistost in velikost molekul smo preverili tudi z gelsko elektroforezo na 1 % agaroznem gelu.

### 3.2.6 Priprava cDNA

Intaktne molekule izolirane RNA, primerno čiste in v primerni koncentraciji smo prevedli

z reverzno transkriptazo v cDNA. cDNA smo sintetizirali s kitom Just cDNA Double - Stranded cDNA Synthesis Kit (Stratagene), po navodilih proizvajalca. Ta kit omogoča sintezo dvoverižne komplementarne DNA oz. cDNA iz molekul mRNA.

V prvem koraku sintetiziramo vodilno verigo cDNA v reakcijski mešanici: 5 µl 10-kratnega reakcijskega pufra, 2 µl mešanice deoksiribonukleotidov (dNTP), 2 µl začetnika Oligo(dT) (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') (1,4 µg/µl), 1 µl Block Ribonukleaznega inhibitorja RNaz, 37 µl izolirane mRNA nitkarja *Parborlasia corrugatus* (4 µg) ter do 47 µl z DEPC obdelane vode brez RNaz.

Mešanico smo najprej inkubirali 10 min pri sobni temperaturi, da smo omogočili vezavo začetnika, nato smo dodali 3 µl reverzne transkriptaze AccuScript. Vse skupaj smo nato inkubirali v vodni kopeli pri 42 °C za eno uro. Pred sintezo druge verige cDNA smo mikrocentrifugirki iz vodne kopeli prestavili na led.

Za sintezo druge verige cDNA smo reakcijski mešanici dodali sledeče reagente:

20 µl 10-kratnega pufra za sintezo druge verige cDNA, 6 µl mešanice dNTP, 114 µl destilirane vode, 2 µl RNAze H (1,5 U/µl) in 11 µl DNA polimeraze (9.0 U/µL). Komponente v mikrocentrifugirki smo vorteksirali, centrifugirali ter dve uri in pol inkubirali reakcijsko zmes pri 16 °C ter po končani inkubaciji shranili na ledu.

### **3.2.7 Verižna reakcija s polimerazo**

Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo pomnožili kodirajoče zaporedje parborlizina. Uporabili smo metodo PCR s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov, ki minimizira sintezo naspecifičnih pomnožkov.

Za sintezo cDNA parborlizina smo glede na znano N-terminalno aminokislinsko zaporedje parborlizina (Slika 3) izdelali degenerirane začetne oligonukleotide za 5'- terminalni konec kodirajoče regije parborlizina. Za pomnožitev regije smo za prileganje na 3'- konec uporabili začetnik oligo (dt)<sub>20</sub>. PCR smo izvedli z DNA polimerazo Pfu (2,5 U/ µL) (Fermentas), ki naredi tope konce. V reakcijski zmesi smo imeli 2 µM začetnih

oligonukleotidov, 10  $\mu$ M dNTP ter 2 mM MgSO<sub>4</sub>. PCR reakcijo smo izvedli pri 72 °C s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. Uspešnost pomnoževanja vzorcev smo preverili na 1 % agaroznem gelu.

### 3.2.8 Agarozna gelska elektroforeza

Metodo smo uporabljali, za ločevanje nukleinskih kislin glede na velikost. Pripravili smo 1 % agarozni gel, 0,6 g agaroze raztopili v 40 ml 0,5- kratnega pufra TBE. Stopljenemu, a ohlajenemu gelu smo dodali 0,1 % etidijev bromid (Sigma). Molekule DNA smo ločevali v agaroznem gelu, v 0,5- kratnem pufru TBE pri napetosti 100 V.

#### 3.2.8.1 Čiščenje fragmentov DNA iz agaroznega gela (GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas)

Pričakovali smo produkt DNA z zapisom za paraborlizin velikosti ~400 bp. V agaroznem gelu smo lise velikosti 300 bp, 400 bp ter 500 bp izrezali s skalpelom iz agaroznega gela in fragmente DNA očistili s kitom GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas), po navodilih proizvajalca. Gel smo pregledali na transiluminatorju ter s skalpelom izrezali ozek pas gela, ki vsebuje želeno DNA. Fragmentu DNA v gelu smo dodali primerno količino komponent, glede na navodila proizvajalca: 0,150 g DNA v gelu dodamo 150  $\mu$ L vezavnega pufra. Reakcijske zmesi smo inkubirali pri 55 °C za 10 min ter mikrocentrifugirko vsakih nekaj minut malce obrnili dokler se ni gel do konca raztopil v pufru. Nato smo dodali vsem vzorcem še izopropanol in sicer v volumskem razmerju 1:1, glede na to koliko v prejšnjem koraku dodamo vezavnega pufra. Raztopino prestavimo v zbiralne oziroma spin kolone ter centrifugiramo 30-60s pri najvišji hitrosti ter zavržemo eluat. Nato smo uporabili 700  $\mu$ L pufra za spiranje ter centrifugirali še eno minuto ter zopet zavrgli eluat. Prazno mikrocentrifugirko centrifugiramo še dodatno minuto, da se znebimo etanola v pufru. V zadnjem koraku smo dodali 40  $\mu$ L elucijskega pufra, pustili stati eno minuto, da se pufer dobro vpije v silikagel potem pa smo ponovno centrifugirali eno minuto ter zbrali eluat, ki je tokrat vseboval želeno DNA. Vzorce smo shranili pri – 20 °C.

### 3.2.9 Priprava cDNA knjižnice

#### 3.2.9.1 Ligacija vključka v vektor

Potek ligacije je odvisen od polimeraze, ki pri PCR-u, pri DNA naredi bodisi „tope“ ali „lepljive“ konce. Za pomnožitev gena za parborlizin smo uporabili Pfu polimerazo, ki uvede minimalno število točkovnih mutacij in sintetizira tope konce. Za izdelavo knjižnice očiščenih odsekov DNA v vektor z razrezanimi topimi konci, pJET, smo uporabili protokol za ligacijo topih koncev (Fermentas). Pripravili smo reakcijsko zmes: 5  $\mu\text{L}$  2-kratnega reakcijskega pufra, 3,4  $\mu\text{L}$  PCR produkta, 1  $\mu\text{L}$  pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) ter 0,6  $\mu\text{L}$  T4 DNA ligaze. Mešanico smo nekaj sekund stresali z mešalom vortex preden smo jo inkubirali pri sobni temperaturi (22 °C) za 5 min. Ligacijsko mešanico smo nato transformirali v kompetentne celice bakterije *E.coli*.

#### 3.2.9.2 Priprava kompetentnih celic

Prekonočno kulturo bakterijskega seva DH5 $\alpha$  (genotip: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) zraslo na plošči Lauria-Bertani (LB) smo sterilno precepili v 100 ml LB gojišča ga ter inkubirali 3 ure na 37 °C pri stresanju 200 obratov/min. Pri optični gostoti pri 600nm, OD<sub>600</sub> = 0,35 smo odpipetirali 34 ml kulture v ohlajene 50 ml centrifugirke ter inkubirali 10 min na ledu, sledilo je centrifugiranje 10 min pri 4000 obratov/min pri 4 °C. Nato smo odstranili celoten supernatant ter centrifugirali še dodatno minuto preden smo pelet resuspendirali v 7 ml ledeno hladnega 0,1M CaCl<sub>2</sub> ter 8 ml MgCl<sub>2</sub>. Postopek spiranja smo ponovili in bakterijski pelet resuspendirali v končnem volumnu 1,4ml ledeno hladnega CaCl<sub>2</sub>. Suspenzijo smo nato razdelili v ependorfke, v vsako po 100  $\mu\text{L}$  ter dodali 23  $\mu\text{L}$  87 % glicerola. Celice smo zamrznili v tekočem dušiku in shranili do uporabe na -80 °C.

#### 3.2.9.3 Transformacija

Za transformacijo smo uporabili 100  $\mu\text{L}$  kompetentnih celic, ki smo jih v 5 minutah postopoma odtalili na ledu. Celicam smo primešali 10  $\mu\text{L}$  ligacijske mešanice ter inkubirali 30 minut na ledu ter nato 90 sekund pri 42 °C in nato ponovno 2-3 min na ledu.

Transformantam smo dodali 400  $\mu\text{L}$  LB gojišča ter stresali pri 200 obratih/min, eno uro pri 37 °C. Nato smo centrifugirali 3 minute pri 800 obratih na minuto. Na selektivno trdno gojišče LB z ampicilinom (LB Ap) (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) smo odpipetirali in razmazali 100  $\mu\text{L}$  bakterijske kulture. Vse bakterijske kulture smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

#### 3.2.9.4 Izolacija plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo izolirali iz 5 ml prekončne bakterijske kulture zrasle v tekočem gojišču LB Ap. Izolacijo plazmidne DNA smo izvedli po navodilih proizvajalca GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Pelet smo resuspendirali v 250  $\mu\text{L}$  raztopine za resuspendiranje, ki vsebuje RNA-zo ter kratko premešali na vrtinčniku. Nato smo dodali 250  $\mu\text{L}$  raztopine za razbitje celic in 4-6 krat obrnili mikrocentrifugirko in na koncu dolili še 350  $\mu\text{L}$  raztopine za nevtralizacijo. Vse skupaj smo ponovno rahlo zmešali ter cetrifugirali 5 min pri 12,000 obratih. Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v zbiralno kolono ter centrifugirali 1 minuto pri 12,000 obratih. Eluat smo odstranili in dodali 500  $\mu\text{L}$  raztopine za spiranje ter ponovno centrifugirali pri 12,000 obratih 1 minuto. Nato smo eluat popolnoma odstranili. Ta korak smo še enkrat ponovili, nato pa prazno kolono centrifugirali pri 12,000 obratih še dodatno minuto. Plazmidno DNA smo eluirali z 50  $\mu\text{L}$  pufru za elucijo (10mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA). Nukleotidno zaporedje vključka v vektor pJET je določilo podjetje Macrogen (Nizozemska) z začetnim oligonukleotidom T7 promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Plazmidno DNA smo shranili pri -20 °C.

### 3.3. BIOINFORMATSKA ORODJA

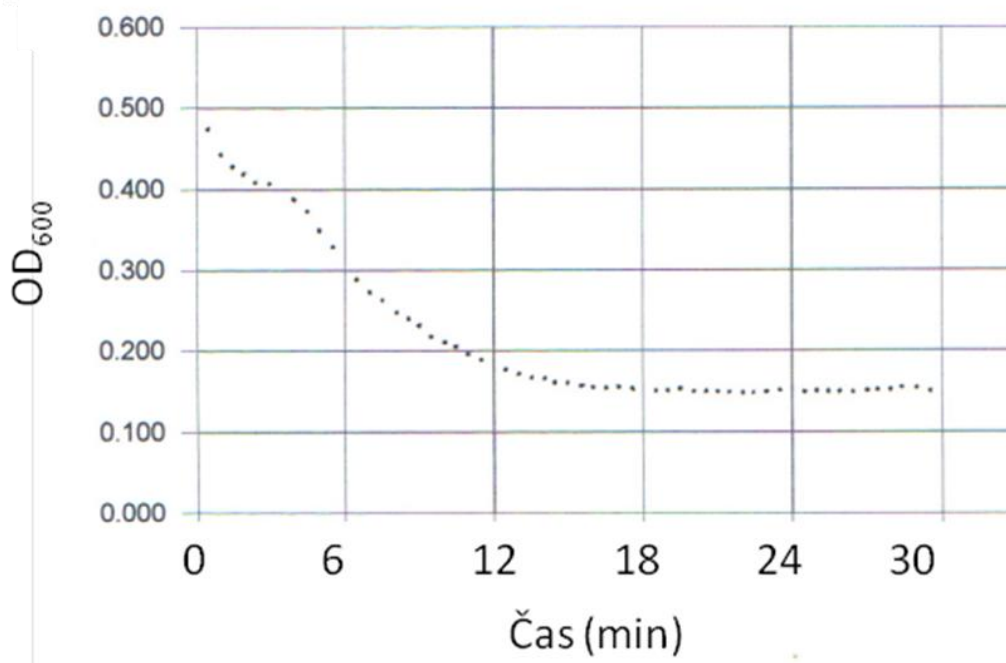
Za analizo in poravnavo zaporedij smo uporabili bioinformatška orodja, ki so prosto dostopna na strežnikih z bioinformatško vsebino. Na strežniku NCBI (National Centre for Biotechnology Information) smo pregledali strokovne članke v bibliografski podatkovni zbirki PubMed ter za iskanje podobnih oziroma sorodnih zaporedij s sondo uporabili BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool ) po podatkovni zbirki nukleotidnih zaporedij NCBI/gene. Na strežniku ExPASy smo uporabili orodje Translate za prevod nukleotidnega v aminokislinsko zaporedje ter podatkovno zbirko anotiranih aminokislinskih zaporedij UniProtKB/Swiss-Prot. Na strežniku EBI smo uporabili algoritem Clustal W za poravnavo aminokislinskih zaporedij ter predstavitev zaporedij

izdelali s strežnikom BoxShade. Na strežniku I-TASSER smo po *de novo* metodi na podlagi zaporedja izooblike Paraborlizin1 (P1, preglednica 5) izdelali model proteina parborlizina. Model proteina smo ogledali s programom VMD (Visual Molecular Dynamics).

## 4 REZULTATI

### 4.1 TKIVO NITKARJA *P. corrugatus* JE HEMOLITIČNO ZA GOVEJE ERITROCITE

Morski nitkarji za lastno zaščito sintetizirajo številne nizko molekularne in visokomolekularne toksine (Kem, 1976). Namen naloge je bil pridobiti nukleotidno zaporedje citolitičnega proteina parborlizina iz antarktičnega nitkarja *P. corrugatus*. Toksin parborlizin lizira eritrocite (Berne in sod., 2002), zato smo tkivno kašo predela glave črva testirali za hemolitično aktivnost. Del nitkarja, ki je meril 0,5 cm<sup>2</sup> smo homogenizirali na ledu ter kašo inkubirali s spranimi govejimi eritrociti ter spremljali hemolitičnost na čitalcu mikrotitrnih plošč (Dynex, ZDA). Tkivo nemertina *P. corrugatus* je bilo hemolitično (Slika 6), posledično smo sklepali, da tkivo vsebuje parborlizin.



Slika 6: Sprememba optične gostote govejih eritrocitov pri 600 nm v odvisnosti od časa inkubacije s tkivno kašo pridobljeno iz tkiva v predelu glave. Padec optične gostote nakazuje na prisotnost paraborlizina v tkivu. Oblika krivulje kaže na detergensko delovanje toksina.

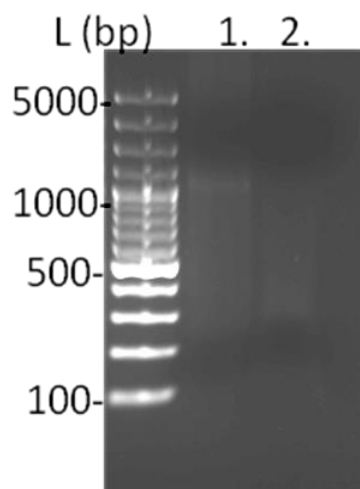
#### 4.2 KAKOVOST IZOLIRANE RNA IZ NEMERTINA *P. corrugatus*

Iz tkiva predela glave *P. corrugatus* smo izolirali celokupno RNA in s spektrofotometrom Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, ZDA) preverili koncentracijo in kakovost RNA. Spektrofotometer Nanodrop izmeri absorbanco do 1  $\mu$ L izolirane nukleinske kisline. Absorbanco merimo pri valovnih dolžinah 260 nm ter 280 nm. Iz razmerja vrednosti absorpcije pri 260 nm ter 280 nm lahko ocenimo čistost izolirane RNA, za čisto RNA se smatra razmerje  $A_{260}/A_{280}$  večje od 1,9. Manjše vrednosti razmerja  $A_{260}/A_{280}$ , oziroma tiste, ki imajo relativno večje vrednosti pri 280 nm so znak prisotnosti raznih nečistoč, ki pri 280 nm boljše absorbirajo, to pa so predvsem proteini. Analiza je pokazala, da smo izolirali RNA z minimalno prisotnostjo drugih makromolekul (Preglednica 2), saj sta bili v dveh izoliranih vzorcih, iz dveh predelov glave nemertina, vrednosti razmerij absorbanco vsaj 1,9.

Preglednica 2: Lastnosti izoliranih molekul RNA iz tkiva predela glave *P. corrugatus*

Vzorec	Koncentracija RNA (ng/ $\mu$ L)	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$
RNA 1	39,9	0,998	0,496	2,01
RNA 2	23,0	0,575	0,303	1,90

Menili smo, da smo izolirali intaktno RNA, zato smo iz izolirane RNA s kitom Just cDNA Double-Stranded cDNA Synthesis Kit pripravili cDNA po navodilih proizvajalca (Stratagene, ZDA). Uspešnost sinteze cDNA nitkarja *P. corrugatus* smo preverili z agarozno gelsko ekлектроforezo. Analiza je nakazala, da smo pripravili molekule cDNA v velikosti od 200-2000 baznih parov, kar ustreza velikosti molekulam mRNA (Slika 7).



Slika 7: Sintetizirana cDNA iz nitkarja *P. corrugatus*. Lestvica (L) v baznih parih (bp) označuje potovanje molekul DNA različnih velikosti v gelu. Linija 1. označuje vzorec cDNA 1; linija 2. pa vzorec cDNA 2, sintetiziranih iz vzorcev RNA 1 ali RNA 2. Lise cDNA

#### 4.3 SINTEZA ODSEKA DNA S STRUKTURNIM GENOM ZA PARBORLIZIN

Za pomnožitev specifičnega odseka, gena za parborlizin, smo glede na N- terminalno aminokislinsko zaporedje parborlizina (Berne in sod., 2003) (Slika 3) izdelali degeneriran začetni oligonukleotid in ga poimenovali Parabdeg (Preglednica 3). Začetnik Parabdeg smo uporabljali v kombinaciji z začetnikom oligo (dt)20, ki nalega na polyA konec molekul cDNA. Za kontrolo intaktnosti izoliranih molekul RNA in uspešnost sinteze molekul cDNA smo uporabili kombinacijo oligonukleotidnih začetnikov P1H3 in P2H3, katerima lahko pomnožimo del gena za histon H3 iz nitkarja *P. corrugatus*.

Preglednica 3: Fizikalne lastnosti začetnikov ter njihova zaporedja. Nukleotidi označeni z Y se lahko pariyo z deoksiribonukleotidom, ki vsebuje bazo citozin ali timin, nukleotid N pa z nukleotidom, ki vsebuje bazo adenin, timin, citozin ali gvanin.

Ime začetnega oligonukleotida	Molekulska masa (Da)	T <sub>m</sub> (°C)	Zaporedje (5'-3')
Parabdeg	6145	82,1	GGNTGGCCNGCNTAYCCNGG

Se nadaljuje ...

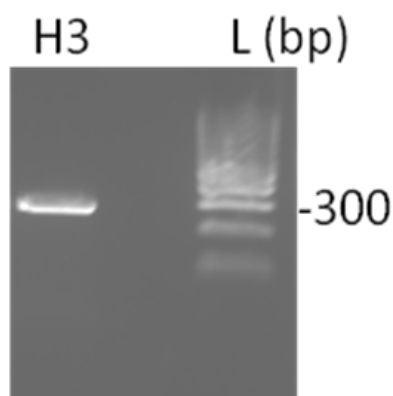


... nadaljevanje.

Preglednica 3: Fizikalne lastnosti začetnikov ter njihova zaporedja. Nukleotidi označeni z Y se lahko pariyo z deoksiribonukleotidom, ki vsebuje bazo citozin ali timin, nukleotid N pa z nukleotidom, ki vsebuje bazo adenin, timin, citozin ali gvanin.

Ime začetnega oligonukleotida	Molekulska masa (Da)	T <sub>m</sub> (°C)	Zaporedje (5'-3')
P1H3parab	6708	66,2	CTCCAAGGAAGCAGCTTGCTAC
P2H3parab	6505	70,0	GATGGCGCACAAAGTTGGTGTC

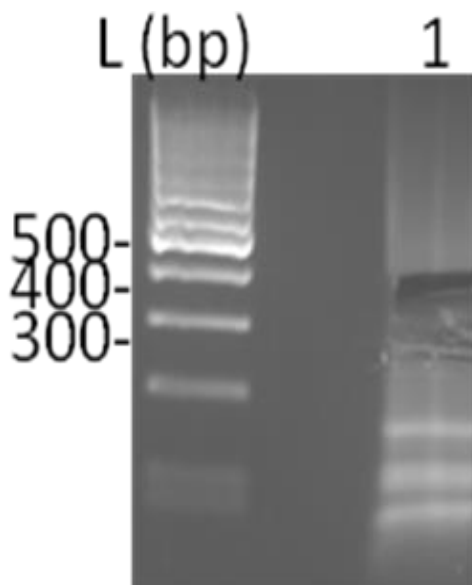
S kombinacijami začetnih oligonukleotidov P1H3parab ter P2H3parab ter polimerazo Pfu (Fermentas) smo na cDNA izvedli PCR s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. Polimeraza Pfu sintetizira odseke DNA s topimi konci. Pomnoške smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Slika 8 prikazuje, da smo uspešno pomnožili kontrolni gen za histon H3, kot pričakovano je pomnožek velikosti 300 bp, kar nakazuje, da smo izolirali intaktne molekule RNA.



Slika 8: Pomnožek odseka gena za histon H3 iz pripravljene cDNA. Lestvica (L) označuje potovanje molekul DNA v velikosti 300 bp.

Z degeneriranim in začetnikom oligo (dt)<sub>20</sub> smo iz cDNA v nadaljevanju pomnožili kodirajoči odsek DNA za paraborlizin. Pričakovali smo produkt velikosti okrog 400 bp. Slika 9 prikazuje pomnoške različnih velikosti a najintenzivnejše lise DNA so bile

velikosti okrog 300-400 bp. Te smo izrezali iz gela in jih uporabili v nadaljnjem postopku.



Slika 9: Agarozni gel po izrezanju fragmentov, ki domnevno nosijo zapis za paraborlizin, v velikostih med 300-500 bp.

#### 4.4 NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE PARBORLIZINA

Pomnožene odseke DNA s predvideno kodirajočo regijo za paraborlizin smo vključili v rezani vektor pJet s topimi konci (Thermo scientific, ZDA). V kolikor se pJet vektor ligira sam vase nastane za bakterijo toksičen protein, posledično smo po ligaciji vključka v vektor in transformaciji v bakterijo *E. coli* DH5 $\alpha$  dobili seve bakterij s posameznim vključkom. Iz desetih transformant zraslih na selektivnem gojišču z antibiotikom ampicilin, smo izolirali plazmidno DNA in s pomočjo storitve podjetja Macrogen (Nizozemska) določili nukleotidno zaporedje vključkov. Nukleotidna zaporedja dolžin okrog 1000 nukleotidov smo s programom Translate (stežnik ExPASy) prevedli in določili aminokislinska zaporedja kodirajočih delov zaporedja. Nukleotidna zaporedja identificiranih kodirajočih odsekov so prikazana v preglednici 4.

Preglednica 4: Nukleotidna zaporedja sedmih izooblik paraborlizina (P1-P7).

<p>&gt;P1</p> <p>GGGTGGCCGGCGTATCCGGGTCGAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAA AAAGTTGGGATGTGGATGGAGAAAACCTCGCGTCTTTACCTGTCTGCAAAGCTTT CTGCCTTGCAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT GGTAAGGGAAGCAAGATATGCAAATCTGTCATCGCCCACACTTTTGAGAAGGC CGGCAAAGGCTTGATCAAGCTCACTGACATGGCTGTCGCCACCATTATCAAATA CGCTGGCAAGAAGTAA</p>
<p>&gt;P2</p> <p>GGGTGGCCGGCGTATCCGGGTTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAAA AAGTTGGGATGTGGATCGAAAAACCTCGCGTCATTAGGTGTCTGCAAAGCGTT CTGCCTTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT GGTAAGGGAAGCAGGATAAGCAACCCTGTCCTCGCCCACGCTGTTGAGAAGGC CAGCAAAGGCTTAATCAAGGTCCTGACATGGCTGTTGCCGCCATTGTCAAATA CGCTGGCAAGAAGTAA</p>
<p>&gt;P3</p> <p>GGGTGGCCGGCGTACCCGGGTTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAA AAAGTTGGGATGTGGATCGAAAAACCTCGCGTCTTTAGGTGTCTGCAAAGCGT TCTGCCCTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAATGGCTCAAGT GGTAAGGGAAGCAGGATATGCAACCCTGTCCCCGCCACGCTGTTGAGAAGGC CGGCAAAGGCTTAATCAAGGTCCTGACATGGCTGTTGCCGCCATTGCCAAATA CGCTGGCAAGAAGTAA</p>
<p>&gt;P3</p> <p>GGGTGGCCGGCGTACCCGGGTTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAA AAAGTTGGGATGTGGATCGAAAAACCTCGCGTCTTTAGGTGTCTGCAAAGCGT TCTGCCCTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAATGGCTCAAGT GGTAAGGGAAGCAGGATATGCAACCCTGTCCCCGCCACGCTGTTGAGAAGGC CGGCAAAGGCTTAATCAAGGTCCTGACATGGCTGTTGCCGCCATTGCCAAATA CGCTGGCAAGAAGTAA</p>

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje.

Preglednica 4: Nukleotidna zaporedja sedmih izooblik paraborlizina (P1-P7).

<p>&gt;P4 GGGTGGCCGGCGTATCCGGGTCCAAATGGTATCAGATCAAGCGTCTGTCAGACA AAGTTGGGATGTGGCAAGAAAAACCTCGCCACTAAAGGTGTCTGCAAAGCTTT CTGCCTTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT GGTAAGGGAAGCAGGATATGCAACCCTGTCCCTCGCCCACGCTGTTGAGAAGGC CGGCAAAGGCTTAATCAAGGTCACTGACATGGCTGTTGCCGCCATTGTCAAATA CGCTGGCAAGAAGTAA</p>
<p>&gt;P5 GGGTGGCCGGCGTATCCGGGTTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAAA AAGTTGGGATGTGGATCGAAAAACCTCGCGTCTTTAGGTGTCTGCAAAGCGTT CTGCCTTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT GGTAAGGGAAGCAGGATATGCAACCCTGTCCCTCGCCCACGCTGTTGAGAAGGC CGGCAAAGGCTTAATCAAGGTCACTGACATGGCTGTTGCCGCCATTGTCAAATA CGCTGGCAAGAAGTAA</p>
<p>&gt;P6 GGGTGGCCGGCGTATCCGGGTTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAAA AAGTTGGGATGTGGATCGAAAAACCTCGCGTCTTTAGGTGTCTGCAAAGCGTT CTGCCTTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT GGTAAGGGAAGCAGGATATGCAACCCTGTCCCTCGCCCACGCTGTTGAGAAGGC CGGCAAAGGCTTAATCAAGGTCACTGACATGGCTGTCCGCCACCATTATCAAATT CGCTGGCTAG</p>
<p>&gt;P7 TGCCCGGCGTATCCGGGTCCAAATGGTATCAGATCAAGCGTCTGTCAGACAAAG TTGGGATGTGGCAAGAAAAACCTCGCCACTAAAGGTGTCTGCAAAGCTTTCTG CCTTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGTGGT AAGGGAAGCAAGATCTGCAACGCTGTCCCTCGCCCACGCTGTTGAGAAGGCCGG CAAAGGCTTGATCAAGGTCACTGACATGGCTGTTGCCGCCATTATCAAATACGC TGCAAGAAGTAA</p>

Kodirajoče dele zaporedja smo s programom Translate na strežniku ExPASy iskali od ostanka metionin do stop kodona, v dolžini okrog 100 aminokislin (Preglednica 5).

Preglednica 5: Prevedena nukleotidna zaporedja sedmih izooblik paraborlizina (P1-P7).

>P1 GWPAYPGRNGIRSSVCQKKLGCGWRKSLASLPVCKAFCLARKRFWQKCGKNGSSG KGSKICKSVIAHTFEKAGKGLIKLTDMAVATIISKYAGKK
>P2 GWPAYPGSNGIRSSVCQKKLGCGSKNLASLGVCKAFCLGRKRFRWQKCGKNGSSG KGSRISNPVLAHAVEKASKGLIKVTDMAVAIAIVKYAGKK
>P3 GWPAYPGSNGIRSSVCQKKLGCGSKNLASLGVCKAFCPGRKRFRWQKCGKNGSSG KGSRICNPVPAHAVEKAGKGLIKVTDMAVAIAIAKYAGKK
>P4 GWPAYPGPNGIRSSVCQTKLGCGKKNLTKGVCKAFCLGRKRFRWQKCGKNGSSG KGSRICNPVLAHAVEKAGKGLIKVTDMAVAIAIVKYAGKK
>P5 GWPAYPGSNGIRSSVCQKKLGCGSKNLASLGVCKAFCLGRKRFRWQKCGKNGSSG KGSRICNPVLAHAVEKAGKGLIKVTDMAVAIAIVKYAGKK
>P6 GWPAYPGSNGIRSSVCQKKLGCGSKNLASLGVCKAFCLGRKRFRWQKCGKNGSSG KGSRICNPVLAHAVEKAGKGLIKVTDMAVATIISKFAG
>P7 WPAYPGPNGIRSSVCQTKLGCGKKNLTKGVCKAFCLGRKRFRWQKCGKNGSSGK GSKICNAVLAHAVEKAGKGLIKVTDMAVAIAISKYAGKK

Uporabili smo program BLAST in BLAST2 (stežnik NCBI), za primerjavo pridobljenih zaporedji po nepresežni podatkovni zbirki vseh aminokislinskih zaporedij ter primerjali zaporedja z aminokislinskim zaporedjem nitkarja *Cererebratulus lacteus*, citotoksinom A-III (ExPASy identifikacijska številka: P01527). Analiza nakazuje, da so prikazana zaporedja homologna s proteinom citotoksinom A-III, podobnost aminokislinskih zaporedij

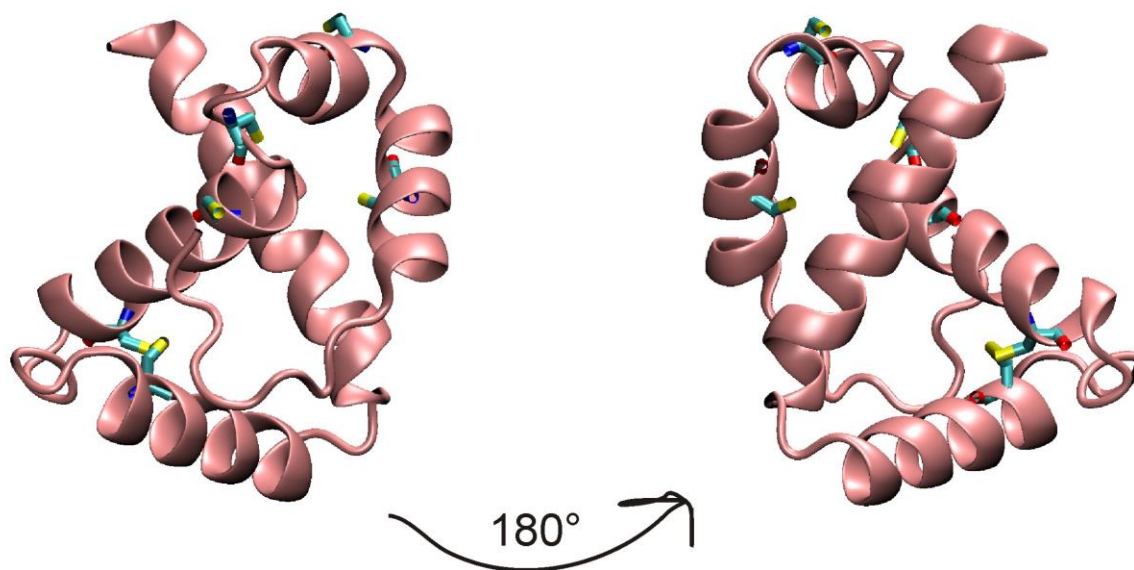
je večja od 25 % in vrednost E nižja od  $10^{-4}$ . Vrednost E statistično okarakterizira poravnavo in označi, da poravnava ni naključna, če je vrednost E nižja od  $10^{-4}$ . Za poravnavo aminokislinskih zaporedij smo uporabili program Clustal W (Slika 10).

P4	1	-GWPAYPCPN	GIRSSVCO	TKL	GCGKKNLA	TK	GVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI	
P7	1	--WPAYPCPN	GIRSSVCO	TKL	GCGKKNLA	TK	GVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI	
P2	1	-GWPAYPGSNG	GIRSSVCO	QK	KL	GCGSKNLASL	GVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI	
P5	1	-GWPAYPGSNG	GIRSSVCO	QK	KL	GCGSKNLASL	GVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI	
P3	1	-GWPAYPGSNG	GIRSSVCO	QK	KL	GCGSKNLASL	GVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI	
P6	1	-GWPAYPGSNG	GIRSSVCO	QK	KL	GCGSKNLASL	GVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI	
P1	1	-GWPAYPCPN	GIRSSVCO	QK	KL	GCGKKNLA	TKGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI	
Citotoksin A-III	1	ISWPSYPGSE	GIRSSN	CQ	KL	NCG	TKNLA	TKGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI
P4	60	CNPVLAHAVEKAGKGLIKV	TDM	AAIVKYAGKK-				
P7	59	CNAVLAHAVEKAGKGLIKV	TDM	AAIVKYAGKK-				
P2	60	SNPVLAHAVEKAGKGLIKV	TDM	AAIVKYAGKK-				
P5	60	CNPVLAHAVEKAGKGLIKV	TDM	AAIVKYAGKK-				
P3	60	CNPVLAHAVEKAGKGLIKV	TDM	AAIVKYAGKK-				
P6	60	CNPVLAHAVEKAGKGLIKV	TDM	AAIVKYAGKK-				
P1	60	CKSVLAHTEKAGKGLIKV	TDM	AAIVKYAGKK-				
Citotoksin A-III	61	CNAVLAHAVEKAGKGLIAV	TDM	AAIVKYAGKIAAGIA				

Slika 10: Poravnava aminokislinskih zaporedij paraborlizina ter zaporedja citotoksina A-III. Ohranjeni aminokislinski ostanki so prikazani v črnem, fizikalno-kemijsko podobne aminokisliline so v sivem ozadju in aminokisliline z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi v belem. Vrzeli so prikazane s črto.

#### 4.5 IZDELAVA 3-D MODELA PROTEINA PARBORLIZINA

Tridimenzionalna zgradba paraborlizina ali homolognih proteinov ni poznana. Za razumevanje funkcije proteina in aktivnih mest, je pomembno, da pridobimo strukturo proteinov. Na stežniku I-TASSER smo delali po *de novo* metodi, kar pomeni, da smo 3-D strukturo predvidevali iz primarnega aminokislinskega zaporedja, brez uporabe homologij. Tako smo ustvarili verjeten model paraborlizina in strukturo prikazali s programom VMD (Slika 11), ki omogoča pregled traktorij simulacij molekularnih dinamik ter prikaz 3-D struktur bioloških makromolekul. Dostopen je brezplačno, ureja ga skupina za biofiziko na Univerzi v Illinoisu. Model predvidi, da je paraborlizin zgrajen iz petih  $\alpha$ -heliksov, dva heliksa povezuje disulfidna vez. Prostorska razporeditev preostalih cisteinov nakazuje, da se lahko ustvarijo tri disulfidne vezi v proteinu.



Slika 11: 3-D model parborlizina v dveh orientacijah. Paraborlizn je predvidoma zgrajen iz  $\alpha$  heliksov. Ostanki cisteina so prikazani kot aminokislinski ostanki, ki pa so prikazani s skeletno strukturo vezi.

## 5 RAZPRAVA

Ciltolitični proteini iz morskih nitkarjev so zanimiva a slabo raziskana družina proteinov. Najbolje opisan je toksin A-III iz vrste *C. lacteus* (Kem, 1976; Kem in Blumenthal 1978). Protein gradi 95 aminokislin (Preglednica 1, 10,3 kDa, bazičen protein) in tvori velike pore v membranah različnih evkariontskih celic. Iz nitkarja *P. corrugatus* izolirali homologni protein paraborlizin in mu določili delno N-terminalno aminokislinsko zaporedje (Berne in sod., 2002). V tem diplomskem delu smo želeli pridobiti nukleotidno zaporedje za paraborlizin, kar bi bilo prvo nukleotidno zaporedje kakšnega od toksinov iz te družine. Pridobljeno zaporedje bi nam omogočilo sintezo rekombinantnega proteina in morda koristilo pri filogenetskih raziskavah udeleženih organizmov.

Iz tkiva *P. corrugatus* smo naredili homogenat in preverili, če je tkivna kaša hemolitična, kar bi bil dober znak za prisotnost toksina. Za paraborlizin so že dokazali hemolitično aktivnost (Berne in sod., 2002), vendar so za delo uporabili liofilizirane vzorce celotnega tkiva. V našem delu smo uporabili le konzervirano tkivo (v RNA later) iz predela glave nitkarja, saj smo pričakovali, da je v tem delu organizma najvišja koncentracija toksina. Meritve spreminjanja optične gostote po času kažejo zmanjšanje le-te, kar pomeni, da so eritrociti razpadali ter posledično prisotnost hemolitične snovi (Slika 6). S časovnim potekom hemolize lahko smo spremljali zniževanje optične gostote, kar nakazuje na detergentsko delovanje toksinov v tkivu. Oblika krivulje je bila podobna tisti, ki so jo opisali (Berne in sod., 2003). Posledično smo iz ~0,5 cm<sup>2</sup> tkiva predela glave nitkarja izolirali celokupno RNA.

Z algoritmom BLASTN na strežniku NCBI nismo uspeli dokazati podobnost pridobljenih zaporedij s kakšnim od zaporedjem v podatkovni zbirki nukleotidnih zaporedij (GeneBank). Nukleotidna zaporedja smo zato prevedli v aminokislinska s pomočjo ustreznih programske opreme, ki je na strežniku ExPASy. Z algoritmom BLAST2 smo dokazali, homolognosti sedmih prevedenih zaporedij s toksinom A-III nitkarja *Cerebratulus lacteus*. Zaporedja so navedena v preglednicah 4, 5. Zaporedja se razlikujejo v nekaj aminokislinah. Zanimivo vsa zaporedja vsebujejo 6 ostankov cisteina, razen zaporedja



paraborlizina P2, ki vsebuje 5 cisteinov. Slednje nakazuje na tvorbo treh disulfidnih vezi v molekuli paraborlizina, razen v molekuli proteina P2. Tvorba treh disulfidnih mostičkov je bila dokazana tudi za toksin A-III (Kem WR, 1994, Toxicology), kar naj bi omogočilo izjemno stabilnost proteina.

Tri-dimenzionalna (3-D) struktura toksina A-III ali paraborlizina še ni poznana. Poskusili smo izvesti homologno modeliranje, a nismo našli poznane strukture podobnega proteina v podatkovni zbirki 3-D struktur proteinov (Protein Data Bank, PDB), zato smo s programom I-TASSER izvedli modeliranje *ab initio*. Model 3-D strukture paraborlizina P1 nakazuje, da je toksin zgrajen iz petih alfa heliksov (Slika 11). Cisteini ležijo na mestih, ki jim omogoči prečno povezavo heliksov, kar bi lahko stabiliziralo protein in omogočilo unikatne lastnosti proteina. Sicer je model predstavljen le z enim disulfidnim mostičkom, saj program ni izdelav treh disulfidnih vezi.

Parborlizin ima glede na velikost proteina precej cisteinov in sicer 6, ki se povezujejo z disulfidnimi mostički. To so kovalentne vezi, ki nastanejo med tiolnimi skupinami cisteinskih ostankov. Disulfidni mostički ohranjajo strukturo proteina in pomagajo pri pravilnem zvijanju saj imajo visoko disociacijsko energijo vezi. Sorodni toksini parborlizinu, kot so *Cerebratulus* B toksin, ali toxin A-III so zelo odporni proti proteolizi in tudi proti denaturaciji s fizikalnimi dejavniki, na primer visoko temperaturo, nizek pH ali izpostavljenost urei (Blumenthal, 1980). Te lastnosti so lahko koristne pri izdelavi uporabnih molekul za biotehnoške namene, kot so naprimer dostavni vektorji.

Kljub razlikam v mehanizmu lize, verjetnega detergentskega načina delovanja paraborlizina in poro-tvornega delovanja toksina A-III (Slika 6; Kem, 1994; Berne in sod., 2003), pa lahko sklepamo, da imajo citolizini organizma *C. lacteus* (citolizini skupine A) veliko strukturnih ter bioloških lastnosti, ki so sorodne tistim iz organizma *P. corrugatus*, kar je razvidno tudi v podobnosti N- terminalne sekvence. Z algoritmom BLASTN nismo dokazali sorodnosti med to skupino proteinov z drugimi citolitičnimi ali necitolitičnimi proteini, kar nakazuje, da so citolizini heteronemertinov unikatna skupina proteinov, ki si zasluži nadaljno ter podrobnejšo obravnavo (Berne in sod., 2003). Rezultati diplomskega dela omogočijo izdelavo plazmidnih konstruktov za sintezo rekombinantnih proteinov

izooblik paraborlizina. Slednje bo omogočilo sintezo in očiščenje rekombinantnega proteina za nadaljnje analize strukture, stabilnosti proteina ter preučevanja mehanizmov toksičnosti.

## 6 POVZETEK

Iz antarktičnega morskega nitkarja *Parborlasia corrugatus* smo želeli pridobiti kodirajoče nukleotidno zaporedje za citolitičen toksin paraborlizin. Iz vzorca tkiva, ki je bil hemolitičen, smo izolirali celokupno RNA in pripravili molekule cDNA. Izdelali smo degenerirani začetni oligonukleotid glede na znano N-terminalno aminokislinsko zaporedje paraborlizina ter pomnožili gen za paraborlizin od N-terminalnega konca do poli-A-repa. Izdelali smo knjižnico plazmidov z vključki kodirajoče regije paraborlizina in jim določili zaporedje. Identificirali smo sedem izooblik paraborlizina, med katerimi ima večina po šest ostankov cisteina, le ena izooblika pet cisteinov. Prevedena zaporedja smo poravnali in primerjali s homolognim citotoksinom A-III. Po *de novo* metodi smo izdelali 3-D model proteina paraborlizina, ki je predvidoma zgrajen iz alfa heliksov. Identificirana zaporedja omogočijo pripravo rekombinantnega proteina za študije lastnosti, aktivnosti ter možnosti biotehnološke uporabe proteina.

## 6 SUMMARY

The goal of this study was to obtain the coding DNA sequence for parborlysin from the aquatic nemertine *Parborlasia corrugatus*. We isolated the complete RNA sequence from the nemertine tissue sample, which proved to be hemolytic and subsequently cDNA was prepared. We designed the degenerate oligonucleotide primer with respect to the known N-terminal amino acid sequence of parborlysin and multiplied the gene for parborlysin from the N-terminal end to the poly- A tail. We constructed a plasmid library with inserts from the parborlysin coding region and analysed the sequence. Seven isoforms of parborlysin were identified, the majority of which have six cysteine residues, with one exception that has five. We aligned the translated sequences and compared them with the homologous cytotoxin A-III. We used the *de novo* method to construct a 3-D model of the protein parborlysin, which seems to be composed mostly of alpha helices. The identified sequences enable the synthesis of a recombinant protein in order to study its characteristics and activity, a protein with potential for biotechnological use.

## 7 VIRI

- Bacq, Z.M. 1936. Les poisons des nemertiens, Bulletin De L Academie Royale De. Belgique Clinical Sciences 22: 1072–1079
- Blumenthal, K.M. 1980. Disulfide bonds of *Cerebratulus lacteus* toxin A-III, The Journal of Biological Chemistry 255: 8273–8274
- Berne S., Sepčič K., Križaj I., Kem W. R., McClintock J. B., Turk T. 2003. Isolation and characterisation of a cytolytic protein from mucus secretions of the Antarctic heteronemertine *Parborlasia corrugatus*, Toxicon 41: 483–491
- Heine J.N., McClintock J.B., Slattery M., Weston J. 1991. Energetic composition, biomass, and chemical defense in the common antarctic nemertean *Parborlasia corrugatus*, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 153: 15–25
- Kem, W.R. 1971. A study of the occurrence of anabaseine in *Paranemertes* and other nemertines, Toxicon 9: 23–32
- Kem, W.R. 1976. Purification and characterization of a new family of polypeptide neurotoxins from the heteronemertine *Cerebratulus lacteus* (Leidy). The Journal of Biological Chemistry 251, 4184–4192
- Kem, W.R., Scott, K.N., Duncan, J.H. 1976. Hoplonemertine worms — a new source of pyridine neurotoxins, Experientia 32: 684–686
- Kem William R., Blumenthal Kenneth M. 1977. Purification and Characterization of the Cytotoxic *Cerebratulus* A Toxins, The Journal of Biological Chemistry 253: 5752–5757
- Kem, W.R., Blumenthal K.M. 1978. Purification and characterization of the cytolytic *Cerebratulus* A toxins, The Journal of Biological Chemistry 253: 5752–5757

Kem, W.R. 1994. Structure and membrane actions of a marine worm cytolysin

*Cerebratulus* toxin A-III, *Toxicology* 87: 189–203

Kenneth M. Blumenthal. 1980. Structure and Action of Heteronemertine Polypeptide, *The*

*Journal of Biological Chemistry* 255: 8273–8274

Liu J., Blumenthal K.M. 1988. Membrane damage by *Cerebratulus lacteus* cytolysin A-III.

Effects of monovalent and divalent cations on A-III hemolytic activity, *Biochimica et Biophysica Acta* 937: 153-160

Liu, J., Blumenthal K. M. 1991. Identification of oleic acid binding sites in cytolysin A-III

from the heteronemertine *Cerebratulus lacteus*, *Toxicon*: 13-20

Maček, P., Lebez, D. 1981. Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin

from the sea anemone *Actinia equina* Effects of some ions and pH, *Toxicon* 19: 233–244