

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Nina VIDMAR

**IZOLACIJA IN NEKATERE LASTNOSTI  
CITOLITIČNEGA PROTEINA IZ MORSKE  
VETRNICE *METRIDIUM SENILE***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Nina VIDMAR

**IZOLACIJA IN NEKATERE LASTNOSTI CITOLITIČNEGA  
PROTEINA IZ MORSKE VETRNICE *METRIDIUM SENILE***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE  
CYTOLYTIC PROTEIN FROM THE SEA ANEMONE *METRIDIUM  
SENILE***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomska naloga je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljena je bila na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so bili opravljeni tudi vsi poskusi.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Primož Zidar

Član: prof. dr. Tom Turk

Član: prof. dr. Peter Maček

Datum zagovora: 8. 7. 2011

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji

Nina VIDMAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK 577.1: 612.017: 593.5 (043.2)= 163.6  
KG *Metridium senile* / morska vetrnica / hemolizin / metridiolizin  
AV VIDMAR, Nina  
SA TURK, Tom (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2011  
IN IZOLACIJA IN NEKATERE LASTNOSTI CITOLITIČNEGA PROTEINA IZ  
MORSKE VETRNIC *METRIDIUM SENILE*  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP VII, 36 str., 20 sl., 61 vir.  
IJ sl  
JI sl / en  
AI Morske vetrnice so pogost vir raznolikih citolitičnih proteinov, ki v membranah tvorijo pore. Glede na dve objavi starejšega datuma, naj bi vrsta severnomorske vetrnice *Metridium senile* vsebovala citolizin, ki je kar štirikrat večji od aktinoporinov. Namen raziskave je bil potrditi obstoj takega toksina v morski vetrnici *Metridium senile*, ga izolirati in opredeliti nekatere njegove lastnosti. Uporabili smo standardne postopke za izolacijo proteinov. Liofiliziran material morskih vetrnic smo suspendirali v destilirani vodi in izvedli postopno frakcionirano obarjanje proteinov z acetonom. Aktivno frakcijo smo nanесли na gelsko kromatografijo (kolona Sephadex G-100), nato pa nadaljnje postopke čiščenja izvedli z ionsko izmenjevalno kromatografijo (kolona Econo pac, High Q Cartidge). Čistost smo nato preverjali z ionsko izmenjevalno kromatografijo (HPLC), gelsko kromatografijo (HPLC) in SDS elektroforezo. Aktivnost smo merili s testom hemolize na eritrocitih različnih živali (konj, ovca, govedo). Najhitreje je hemoliza potekala na konjskih eritrocitih in sicer pri pH vrednosti medija 6. Konjskim eritrocitom po občutljivosti za lizo sledijo ovčji, najmanj pa so občutljivi goveji eritrociti.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 577.1: 612.017: 593.5 (043.2)= 163.6

CX *Metridium senile* / sea anemone / hemolysin / metridiolysin

AU VIDMAR, Nina

AA TURK, Tom (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana,

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2011

TI ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE CYTOLYTIC  
PROTEIN FROM THE SEA ANEMONE *METRIDIUM SENILE*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO VII, 36 p., 20 fig., 61 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Sea anemones are a common source of cytolytic proteins that form pores in cell membranes. According to some previous researches, sea anemone *Metridium senile* contains a cytolytic protein, which is four times larger than actinoporins. The purpose of this study was to confirm the existence of such a protein in the sea anemone *Metridium senile* and to reveal some of its characteristics. We used standard procedures for protein isolation. Liophilized sea anemones were suspended in distilled water. Then a fractional precipitation of proteins by acetone was done. After that we purified the active fraction with gel chromatography (Sephadex G-100) and ion exchange chromatography (Econo pac, High Q Cartidge). Protein purity was tested with HPLC and electrophoresis. The activity of cytolysin was tested on erythrocytes of different origin (bovine, sheep, horse). Haemolysis was the fastest at a media pH value of 6, and on horse erythrocytes. Haemolysis was slower when we used sheep erythrocytes and even slower in the case of bovine erythrocytes.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
1 UVOD .....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 NAMEN IN HIPOTEZE .....	2
2 PREGLED OBJAV .....	3
2.1 BIOLOŠKI POMEN CITOLITIČNIH TOKSINOV MORSKIH VETRNIC .....	3
2.2 IZOLACIJA CITOLITIČNIH PROTEINOV MORSKIH VETRNIC .....	4
2.3 CITOLIZINI IN NJIHOV MEHANIZEM DELOVANJA .....	5
2.4 METRIDIOLIZIN .....	6
3 MATERIALI IN METODE .....	8
3.1 MATERIAL .....	8
3.2 METODE DELA.....	8
3.2.1 SUSPENZIJA LIOFILIZIRANEGA MATERIALA.....	8
3.2.2 POSTOPNO FRAKCIONIRANO OBARJANJE PROTEINOV .....	8
3.2.3 GELSKA KROMATOGRAFIJA .....	9
3.2.4 IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA .....	9
3.2.5 IONSKO-IZMENJEVALNA VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (HPLC) IN GELSKA HPLC KROMATOGRAFIJA .....	10
3.2.6 SDS ELEKTROFOREZA.....	10
3.2.7 ULTRAFILTRACIJA .....	10
3.2.8 MERJENJE HEMOLITIČNE AKTIVNOSTI.....	11
3.2.9 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV .....	11
4 REZULTATI.....	12
4.1 GELSKA KROMATOGRAFIJA .....	12
4.2 IONSKOIZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA .....	13
4.3 VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (HPLC) IN GELSKA HPLC KROMATOGRAFIJA .....	14

4.4	PREVERJANJE HEMOLITIČNOSTI PO GELSKI HPLC KROMATOGRAFIJI	16
4.5	HEMOLIZA .....	20
4.5.1	ČASOVNI POTEK HEMOLIZE KONJSKIH ERITROCITOV.....	20
4.5.2	ČASOVNI POTEK HEMOLIZE KONJSKIH, OVČJIH IN GOVEJIH ERITROCITOV OB RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH TOKSINA.....	20
4.5.3	pH OPTIMUM HEMOLIZE KONJSKIH ERITROCITOV .....	23
5	DISKUSIJA.....	25
6	SKLEPI .....	29
7	POVZETEK .....	30
8	VIRI.....	31

## KAZALO SLIK

Slika 1: Elucijski diagram gelske kromatografije .....	12
Slika 2: Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije .....	13
Slika 3: Elucijski diagram visokotlačne tekočinske kromatografije (280 nm) .....	14
Slika 4 : Elucijski diagram visokotlačne tekočinske kromatografije (254 nm) .....	15
Slika 5: Elucijski diagram gelske HPLC kromatografije .....	16
Slika 6: Hemolitičnost prvega vrha razvidnega iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije .....	16
Slika 7: Hemolitičnost drugega vrha razvidnega iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije .....	17
Slika 8: Hemolitičnost tretjega vrha razvidnega iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije .....	17
Slika 9: Hemolitičnost četrtega vrha razvidnega iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije .....	18
Slika 10: Hemolitičnost petega vrha razvidnega iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije .....	18
Slika 11: Elektroforeza.....	19
Slika 12: Časovni potek hemolize konjskih eritrocitov .....	20
Slika 13: Časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov (1 $\mu$ l) .....	21
Slika 14: Časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov (2,5 $\mu$ l) .....	21
Slika 15: Časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov (10 $\mu$ l) .....	22
Slika 16: Časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov (20 $\mu$ l) .....	22
Slika 17: Časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih (1 $\mu$ l).....	23
Slika 18: Časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih (2,5 $\mu$ l).....	23
Slika 19: Časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih (5 $\mu$ l).....	24
Slika 20: Časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih (10 $\mu$ l).....	24



# 1 UVOD

## 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Morske vetrnice so solitarni organizmi brez skeleta. Uvrščamo jih v razred Anthozoa, red Actiniaria (Prevorčnik, 2003). Morske vetrnice nikoli ne gradijo kolonij. Nimajo ogrodja, usta so podobna špranji, število žlebov in pregrad v gastrovaskularni votlini je zelo različno, vendar vedno mnogokratnik števila šest. Pri nekaterih vrstah so pri dnu pregrad nameščene posebne niti (akonciji), ki jih žival lahko sproži skozi usta ali neposredno skozi telesno steno. Na akoncijih so nameščene ožigalke, ki ubijejo ali omamijo plen (Turk, 1996 in 2007). Zaradi njihovega posebnega načina življenja so se različne vrste morskih vetrnic zelo dolgo razvijale samostojno. Njihova oblika je posledica prilagoditve na zelo specifično okolje. Morske vetrnice so živali, ki se zelo omejeno gibajo, so pa porazdeljene praktično po vseh morjih sveta, od pasu bibavice pa do največjih globin. Na videz so zelo ranljive živali, ki bi z lahkoto postale plen. Vendar so dobro zavarovane, saj vsebujejo številne biološko aktivne snovi, ki se lahko nahajajo v celem telesu ali pa samo v posebnih organelih, ožigalkah. Te snovi so za morsko vetrnico izrednega pomena, saj so lahko zelo toksične in imajo vlogo pri obrambi in prehranjevanju. Ožigalke so v največjem številu zbrane na mestu uporabe, to je v lovkah in akoncijalnih elementih, sicer pa so porazdeljene po vsem organizmu, a se lahko strukturno razlikujejo in imajo različne vloge (Sedmak, 1993).

Znano je, da več kot 32 vrst morskih vetrnic proizvaja letalne citolitične peptide in proteine (Anderluh in Maček, 2002). Citolizini so proteini ali peptidi, ki lahko lizirajo celice s formiranjem por v tarčnih membranah in s povečevanjem membranske prepustnosti (Anderluh in sod., 2003). Razlikujejo se po jakosti in usmerjenosti delovanja (Sedmak, 1993). Ena izmed morskih vetrnic, ki proizvajajo citolizine, je tudi morski nagelj (*Metridium senile* (Linne, 1761)).

*Metridium senile* je morska vetrnica, ki je razširjena ob britanskih obalah in severozahodnem Atlantiku, zelo redko pa jo najdemo tudi v zahodnem Mediteranu. Najpogosteje je pritrjena na skale. Najdemo jo do globine 100 metrov. Tipična je tam, kjer je močan vodni tok. Večji primerki so številčni v sublitoralu, medtem ko so majhni osebki pogosti v brakičnih vodah.

Lahko je prevladujoča vrsta na kamnitem dnu in je sposobna agresivnega izrivanja preostalih vrst z določenega območja (Picton in Morrow, 2010). *Metridium senile* zraste le do višine približno desetih centimetrov. Lahko je zelo raznolikih barv, od bele, kremne, rjavkaste do svetlo oranžne barve z majhnimi in tankimi lovkami, ki so ponavadi sive ali bele barve (Boyd, 2011).

## 1.2 NAMEN IN HIPOTEZE

V diplomskem delu smo želeli iz liofiliziranega pripravka celih teles morskih vetrnic vrste *Metridium senile* izolirati citolizin, ki se bistveno razlikuje od aktinoporinov, opredeliti nekatere njegove lastnosti in potrditi domnevo o obstoju takega proteina v omenjeni vrsti morske vetrnice, ki temelji predvsem na objavi manjšega števila člankov iz zadnje petine prejšnjega stoletja. Pri tem smo postavili delovne hipoteze, da morska vetrnica *Metridium senile* vsebuje nov tip citolizina, ki je večji od znanih aktinoporinov morskih vetrnic. Ena od hipotez je bila tudi, da metridiolizin lizira eritrocite mnogih živali, a ne z enako učinkovitostjo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIOLOŠKI POMEN CITOLITIČNIH TOKSINOV MORSKIH VETRNIC

Ožigalkarji so največje deblo splošno toksičnih živali, a kljub temu njihovi toksini in strupi niso bili deležni tolikšne pozornosti kot strupi nekaterih kopenskih živali (Turk in Kem, 2009). Sesilni morski organizmi kot so alge, spužve, ožigalkarji, mahovnjaki in plaščarji, nimajo lokomotorne aparata, ki bi jim omogočil beg pred plenilci in lovljenje plena. Razvili so drugo strategijo in sicer proizvodnjo širokega spektra strukturno zanimivih kemičnih snovi z raznolikimi biološkimi učinki. S temi učinkovinami dodatno preprečujejo naseljevanje drugih organizmov na svojo površino in bolj ali manj uspešno tekmujejo za prostor (Turk, 2008).

Morske vetrnice živijo v obrežnem pasu, pritrjene na kamne. Toksine izločajo v okolje zato, da se z njimi branijo ali da plenijo manjše ribe in rake, s katerimi se hranijo. Zaradi njihovega sedentarnega načina življenja sta omejeni tako njihova obramba pred plenilci kakor tudi njihov način prehranjevanja, zato je prisotnost toksičnih snovi v morskih vetrnicah pričakovana. Toksini tako lahko služijo kot snovi, ki delujejo odbijajoče za plenilce, kot sredstvo za imobilizacijo in usmrnitev plena ter kot orodje za intraspecifično kompeticijo, lahko pa je to tudi način komunikacije z okoljem (Martin, 1968). V ta namen lahko služijo tako aktinoporini kot tudi nevrotoksini, ki so prisotni v morskih vetrnicah. Morske vetrnice imajo mikroskopske strukture, ki vsebujejo strup in se imenujejo nematociste. Najvišja koncentracija nematocist je na tentaklih (Cutress, 1955). Vsakič, ko se nematocista odpre, se iz nje sprosti ves strup, ki je v njej. Obseg zastrupitve je odvisen od števila nematocist, ki so se sprostile, količine strupa v njih, vrste morske vetrnice in individualne občutljivosti žrtve.

## 2.2 IZOLACIJA CITOLITIČNIH PROTEINOV MORSKIH VETRNIC

Eden od glavnih namenov za raziskovanje toksinov iz ožigalkarjev je bil boljše spoznati njihovo zgradbo in delovanje predvsem zato, da bi znali učinkoviteje oskrbeti žrtve ožigov z njihovimi strupi. Poleg tega pa se je izkazalo, da nam je zaradi raziskovanja delovanja njihovih toksinov, bolj razumljiv tudi mehanizem imunskega odziva in delovanje nekaterih ionskih kanalčkov (Turk in Kem, 2009).

Biološko aktivne snovi so shranjene v nematocistah, ki so v različnih stadijih razvoja razporejene po vsem telesu morskih vetrnic. Tako za izolacijo biološko aktivnih snovi lahko uporabimo kar cele primerke ali pa le njihove izolirane organele- nematociste. Iz morskih vetrnic so ekstrahirali mnogo citolitičnih in hemolitičnih biološko aktivnih snovi. Morda je ravno v tem razlog, da je Bernheimer predlagal poimenovanje citolitičnih polipeptidov, ki so jih izolirali iz morskih vetrnic in sicer da bi bilo ime sestavljeno iz imena vrste in končnice lizin (Bernheimer, 1986). Nekaj let kasneje pa je zaradi njihove značilne tvorbe membranskih por Kem za te toksine predlagal novo skupno ime aktinoporini, ki se je ohranilo do danes (Kem, 1988).

Prve toksine so iz morskih vetrnic izolirali že leta 1968 in sicer iz nematocist morske vetrnice *Aiptasia pallida* (Blanquet, 1968). Nekaj let kasneje so iz iste morske vetrnice ponovno izolirali in natančneje analizirali njen toksin (Hessinger in Lenhoff, 1973). Citolizine brez fosfolipazne aktivnosti so prvič delno očistili leta 1974 iz morske vetrnice *Actinia equina* (Ferlan in Lebez, 1974). Po prvih izolacijah se je zanimanje za citolitične toksine morskih vetrnic povečalo, zato so sledile še izolacije iz številnih drugih morskih vetrnic. Pri nekaterih morskih vetrnicah lahko dosežemo izolacijo toksinov s preprostim frakcioniranim obarjanjem z organskim topilom kot je aceton ali s povečevanjem koncentracije soli, kot je amonijev sulfat, temu pa sledi ločevanje na gelski kromatografiji. Pri večini drugih pa je potrebno iti korak dlje, da dobimo izoliran protein in v ta namen uporabiti tehnike kot so ionsko-izmenjevalna kromatografija, RP-HPLC in elektroforeza.

## 2.3 CITOLIZINI IN NJIHOV MEHANIZEM DELOVANJA

Celična membrana ločuje notranjost celice od zunanjih vplivov. Za normalno delovanje celice je ključnega pomena, da le ta ostane nepoškodovana in da vsi transportni procesi skozi membrano potekajo nemoteno in nadzorovano. Med evolucijo pa se je pri nekaterih skupinah razvila posebna skupina proteinov, ki se vpletajo v delovanje membrane. Imenujemo jih citolitični toksini (Anderluh in Lakey, 2010). Lahko so zelo različnega izvora in sicer od bakterijskih, rastlinskih pa do živalskih (Bernheimer in Rudy, 1986). So najbolj obsežna skupina toksinov v naravi. Kljub temu, da imajo zelo raznoliko kemijsko strukturo, vsi reagirajo s celično membrano (Maček in sod., 1995). Druži jih torej samo ista posledica njihovega delovanja, to je porušenje integritete celične membrane in liza celice. V večstopenjskem procesu se toksini, ki so sicer zelo dobro topni v vodi, pripnejo na celično membrano, več vezanih molekul se združi v večji skupek, potem pa v zadnji fazi nastane sprememba v strukturi tako, da se del molekule vrine v lipidno membrano. Tako nastane v membrani luknja, pora, ki je prepustna za manjše snovi. Zaradi tega kasneje pride do koloidno osmotske lize. Evolucijska zgodovina razvoja citolitičnih molekul je zelo dolga, saj najdemo citolizine že pri bakterijah (Scott in sod., 2005). Najbolj znani so bakterijski citolitični toksini streptokokov, stafilokokov in bacilusov (Giacomelli, 1997). Bakterije jih uporabljajo za zasedbo novih okolij in v patogenezi. Citolitične toksine zelo pogosto najdemo tudi v morskih vetrnicah. Njihovi citolizini so letalni polipeptidi, ki reagirajo direktno z membrano in imajo potencialno kardiotoksično aktivnost. Prav tako so opazili citotoksično, citocidno in citostatično aktivnost (Turk, 1991). Spadajo v skupino bazičnih polipeptidov z veliko afiniteto do sfingomielina. Vključijo se v lipidni dvosloj membrane in oblikujejo pore (Giacomelli, 1997). V splošnem so to proteini, ki v svoji zgradbi nimajo cisteina. Citolizini morskih vetrnic so v vodi topne molekule, ki pa se lahko vključijo v celično membrano in tako tvorijo poro (Turk, 1991).

Do danes poznamo okrog 32 vrst morskih vetrnic, ki proizvajajo letalne citolitične peptide in proteine. Delimo jih v štiri različne razrede. V prvo skupino spadajo peptidi z molekulsko maso od 5 do 8 kDa, izolirali so jih iz morskih vetrnic *Tealina (Urticina) felina*, *Radianthus macrodactylus* in *Condylactis aurantiaca*. Ti peptidi tvorijo pore v membranah, ki vsebujejo fosfatidilholin. Druga skupina je najštevilčnejša in tudi najbolj preučena. Citolizini druge

skupine so veliki 20 kDa, inhibira jih sfingomielin in ustvarjajo kationsko selektivne pore. Sem spadajo številni citolizini iz morskih vetrnic, ki jih uvrščamo v družini Actiniidae in Stichodactylidae. Predstavnika tretje skupine sta citolizina iz morskih vetrnic *Aiptasia pallida*, *Urticina piscivora* in *Urticina crassicornis* (Razpotnik in sod. 2009). Velika sta med 30 in 40 kilodaltonov. Četrta skupina citolizinov pa vsebuje le en citolizin in sicer metridiolizin, izoliran iz morske vetrnice *Metridium senile* (Anderluh in Maček, 2002).

## 2.4 METRIDIOLIZIN

Metridiolizin je kisel citolitični protein, ki ga najdemo le v morski vetrnici *Metridium senile* (Bernheimer, 1990). Je toksin z molekulsko maso 80 kilodaltonov (Anderluh in Maček, 2002; Krebs in Habermehl, 1987), ki je termolabilen in ima izoelektrično točko pri pH približno 5 (Bernheimer in Avigad, 1978). Inaktivirajo ga proteolitični encimi (Bernheimer, 1990). Njegovo toksično delovanje inhibira holesterol (Bernheimer in Avigad, 1978) prav tako tudi nekateri njemu sorodni steroli (Bernheimer, 1990), vendar ga, za razliko od mnogih drugih toksinov morskih vetrnic, ne inaktivira sfingomielin (Ratner in Pulmann, 1983). Metridiolizin naj bi bil homologen nekaterim citolizinom, ki so jih izolirali iz Gram pozitivnih bakterijskih rodov (Anderluh in Lakey, 2010). Očitne so podobnosti s streptolizinom O. Delovanje obeh namreč inhibira nizka koncentracija holesterola, oba toksina imata tudi podobne biološke učinke, vendar se tudi razlikujeta in sicer v molekulski masi in v sposobnosti disociacije v podenote (Bernheimer in sod., 1979).

Metridiolizin je, poleg tega da je citolitičen *in vitro*, tudi letalen, če ga vbrizgamo v miš (Bernheimer, 1990). Ko miški vbrizgamo 28 hemolitičnih enot oziroma 17  $\mu\text{g}$  proteina, bo to zanj usodno. Čas, ki je potreben, da miš pogine, je lahko od nekaj minut pa do nekaj dni, odvisno od števila hemolitičnih enot, ki jih vbrizgamo v miš. Ob dodatku izredno nizke količine holesterola (10  $\mu\text{g}$ ) k injiciranemu toksinu, pa miši preživijo (Bernheimer, 1978). Metridiolizin lahko poleg mišjih eritrocitov lizira tudi eritrocite drugih živali. Najbolj občutljivi so konjski in pasji eritrociti, sledijo jim ovčji, ki so od slednjih kar desetkrat manj občutljivi, mišji pa celo stokrat manj. Eritrociti prašičev, ljudi, podgan, zajcev in koz so glede občutljivosti nekje vmes (Bernheimer, 1978 in 1990).

Hemolitičnost metridiolizina lahko primerjamo s citolitično aktivnostjo hemolizinov iz morskih vetrnic *Stoichactis helianthus* (Bernheimer in Avigad, 1976), *Aiptasia pallida* (Hessinger in Lenhoff, 1973) in *Chironex fleckeri* (Winter in sod., 2010).

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 MATERIAL**

Objekt raziskav je bila morska vetrnica *Metridium senile*. Za našo delo smo uporabili liofilizirana in drobno zdrobljena cela telesa morskih vetrnic. Nabrane so bile v severnem Atlantiku in nato nekaj let shranjene v zamrzovalniku pri -20 stopinj Celzija. Dobili smo jih iz laboratorija prof. dr. Williama R. Kema (Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida, Gainesville, ZDA).

### **3.2 METODE DELA**

#### **3.2.1 SUSPENZIJA LIOFILIZIRANEGA MATERIALA**

Liofilizirane morske vetrnice smo najprej stehali, nato pa odmerili 50 gramov materiala in ga suspendirali v 350 mililitrov destilirane vode. Nato smo suspenzijo z magnetnim mešalom približno 3 ure mešali v hladni sobi. Pri tem smo pazili, da je bil vzorec stalno na ledu.

#### **3.2.2 POSTOPNO FRAKCIONIRANO OBARJANJE PROTEINOV**

Obarjalno sredstvo je bilo aceton. Obarjanje smo izvajali v hladni sobi, vzorec je bil na ledu. Homogenatu smo dodajali 33,3 ml acetona po kapljicah, nato smo vzorec centrifugirali 25 minut pri 15.000 obratih/min (centrifuga Sigma 3K30, velik rotor). Sediment smo suspendirali v hladni destilirani vodi, zmešali s krožnim mešalom in dali ponovno centrifugirati, supernatant pa uporabili za naslednje (50%) obarjanje. Supernatantu smo dodajali 127,5 ml acetona po kapljicah, nato je sledilo centrifugiranje za 25 minut pri 15.000 obratih/min. Sediment smo suspendirali v hladni destilirani vodi, zmešali s krožnim mešalom in ponovno centrifugirali, supernatant pa uporabili za končno obarjanje z 80% nasičenostjo z



acetonom. Po kapljicah smo mu dodajali 465 ml acetona nato pa je ponovno sledilo centrifugiranje za 25 minut na 15.000 obratih/min. Sediment smo suspendirali v hladni vodi, ga raztapljali z zmešanjem, dali ponovno centrifugirati in nato supernatant spravili v zamrzovalnik.

### **3.2.3 GELSKA KROMATOGRAFIJA**

Gel Sephadex G-100 smo suspendirali v čašo z destilirano vodo in pustili tri dni, da nabrekne. Nabrekel gel smo nato prenučirali s presesalno bučo in črpalko. Stekleno kolono 1,5 x 100 cm smo napolnili s tako pripravljenim nabrekli gelom in jo shranili v hladni sobi na štirih stopinjah Celzija. Na kolono smo nanесли homogenat morskih vetrnic. Kolono smo spirali s pufrom (10 mM amonacetatni pufer s pH 5,6) pri pretoku 0,5 ml/min. Zbrali smo 94 frakcij z volumnom 2 ml. Nato smo izmerili absorbanco frakcij pri 280 nm s spektrofotometrom (Perkin Elmer UV/VIS). Po umeritvi absorbcije v vzorčni in referenčni kivetih z delovnim pufrom smo pričeli z meritvijo. Merilo za nadaljnji postopek izolacije je bila litičnost frakcij. Tiste, ki so se izkazale za litične, smo združili in jih nanесли na ionsko-izmenjevalno kromatografijo.

### **3.2.4 IONSKO IZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA**

Kolono (Econo pac, High Q Cartidge, 5 ml, Biorad) za ionsko izmenjevalno kromatografijo smo namestili na Bioradov aparat (Econo Pump, Econo System Controller, Model 2110 Fraction Collector). Pripravili smo raztopino A (delovni pufer: 50 mM TRIS 121, pH 7,5) in raztopino B (delovni pufer z dodatkom 1 M NaCl). Kolono Econo High Q smo najprej dobro sprali z raztopinama A ter B in sicer z obema 20 minut s pretokom 2 ml/min. Vzorec smo nanašali na kolono pri pretoku 2 ml/min. Med spiranjem kolone z raztopino A (2ml/min), smo v čašo 10 minut lovili nevezane komponente, nato smo vklopili gradient pri pretoku 0,5 ml/min, pri čemer smo skupaj zbrali 77 frakcij z volumnom 2 ml. Na koncu smo kolono sprali z raztopino B. Po končani kromatografiji smo spektrofotometrično izmerili absorbanco vseh frakcij pri valovni dolžini 280nm.

Kolono smo regenerirali tako, da smo jo 20 minut spirali z delovnim pufrom. Cevko A smo spirali 30 minut pri pretoku 1ml/min z 1 M NaOH in 40 minut pri pretoku 1ml/min z raztopino A. Cevko B smo spirali z raztopino B 40 minut pri pretoku 1ml/min. Na koncu smo še enkrat sprali cevko z raztopino A in sicer pri pretoku 1ml/min.

### **3.2.5 IONSKO-IZMENJEVALNA VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (HPLC) IN GELSKA HPLC KROMATOGRAFIJA**

Ionsko-izmenjevalno visokotlačno tekočinsko kromatografijo smo izvedli s kolono RESOURCE™ Q (GE Healthcare), medtem ko smo gelsko kromatografijo izvedli s kolono PROGEL™ TSKS GMPW (Supelco). Napravi, ki smo ju pri tem uporabili, sta Waters™ 996 Photodiode Array Detector in 600 Controller. Iglo (100 µl, Microtiter™, Hamilton Bonaduz, Švica) smo sprali z bidestilirano vodo. Na injektor smo pritrdili 50 µl zanko, ki smo jo pred tem sprali z bidestilirano vodo. Nastavili smo ustrezne parametre in frakcije lovili pri različnih retencijskih časih.

### **3.2.6 SDS ELEKTROFOREZA**

SDS elektroforezo smo izvedli po navodilih proizvajalca (PhastSystem Users Manual, 1987, Pharmacia). Uporabili smo Phast gel (Phast gel gradient 8-25), agarozne vložke v pufru (SDS Buffer Strips) in LMW standard. Barvali smo s Coomassie modrim. Pri tem smo uporabili različne raztopine in sicer: osnovno raztopino (30% EtOH, 10% očetna kislina, 0,1% PhastGel BlueR), raztopino za razbarvanje gela (30% MeOH, 10% očetna kislina, 60% destilirana voda) in raztopino za stabilizacijo gela (10% glicerol, 10% očetna kislina, 80% destilirana voda).

### **3.2.7 ULTRAFILTRACIJA**

Ultrafiltracijo in koncentriranje vzorcev smo izvedli z različnimi tipi ustreznih koncentradorjev (Milipore YM-10, Centritrep YM-10).

### 3.2.8 MERJENJE HEMOLITIČNE AKTIVNOSTI

Pri testiranju hemolitičnosti smo uporabili goveje, ovčje in konjske eritrocite, ki so bili shranjeni na 4°C. Eritrocite smo pripravili tako, da smo jih centrifugirali v centrifugi pri 2500 obratih na minuto in sicer 5 minut. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa trikrat sprali s pufrom. Puffer za eritrocite smo pripravili v 1000 ml bučki, v kateri smo raztopili 7,597 gramov NaCl in 3,152 gramov Tris-a v destilirani vodi ter z 1M HCl umerili pH najprej na 7,4 in kasneje tudi na pH 6. Za merjenje hemolitičnosti smo uporabili turbidimetrični metodi in sicer smo enkrat meritev opravili z navadnim spektrofotometrom, drugič pa z mikročitalcem. Pri prvi metodi smo spektrofotometer (Perkin Elmer UV/VIS) za merjenje hemolitičnosti pripravili tako, da smo ga nastavili za merjenje pri valovni dolžini 500 nm 900 sekund ter ga umerili z eritrocitnim pufrom. Za merjenje hemolitičnosti smo v kiveto odpipetirali 3 ml eritrocitne suspenzije (umerjene na absorbanco 0,5) ter različne koncentracije grobega pripravka vzorca (1 µl, 2.5 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl in 100 µl), ki smo ga dobili po 50% obarjanju in sicer najprej v eritrocitnem pufri, ki je imel pH vrednost 7,4, nato pa smo isto ponovili tudi pri vrednosti 6.

Z mikročitalcem (MRX, Dynex Technologies) smo izmerili hemolitičnost na mikrotitni plošči. Eritrocitno suspenzijo smo umerili na absorbanco 0,5 s programom hemoliza 2. Hemolitičnost smo merili 20 minut s programom petra.asy, tako da smo v jamice zaporedno odpipetirali po 50 µl vzorca in 200 µl eritrocitne suspenzije.

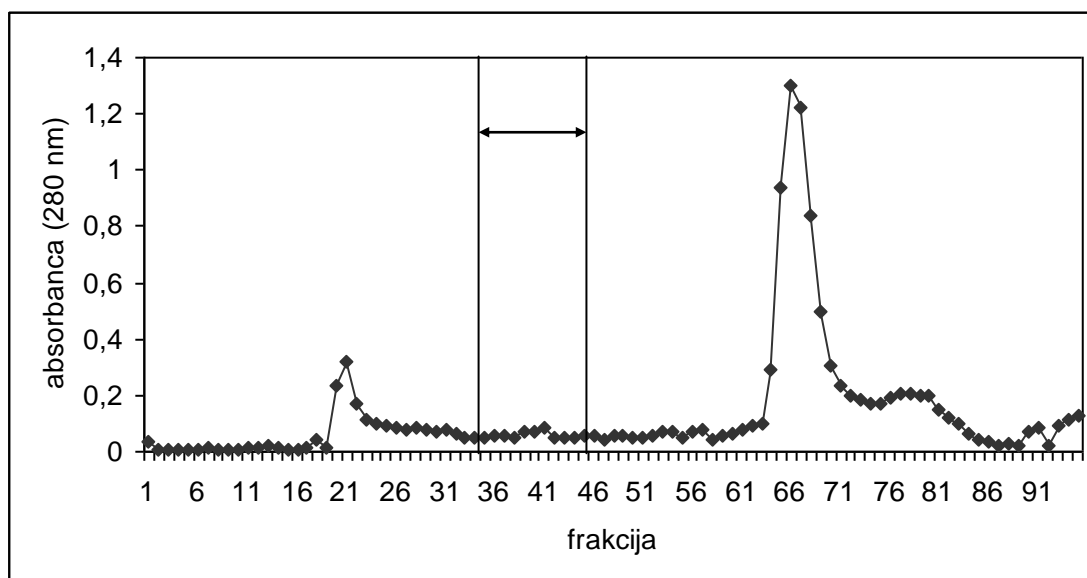
### 3.2.9 MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

Koncentracijo proteinov smo določili z BCA-reagentom po navodilih proizvajalca (BCA Protein Assay Kit, Pierce, ZDA). Reagent smo pripravili tako, da smo raztopini A in B zmešali v razmerju 1:50 (1 ml B in 49 ml A). Nato smo v paralelni kiveti odpipetirali 50 µl vzorca in 950 µl reagenta, inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 stopinjah Celzija in izmerili absorbanco s spektrofotometrom pri 562 nm. Koncentracijo proteinov smo določili s pomočjo umeritvene krivulje.

## 4 REZULTATI

### 4.1 GELSKA KROMATOGRAFIJA

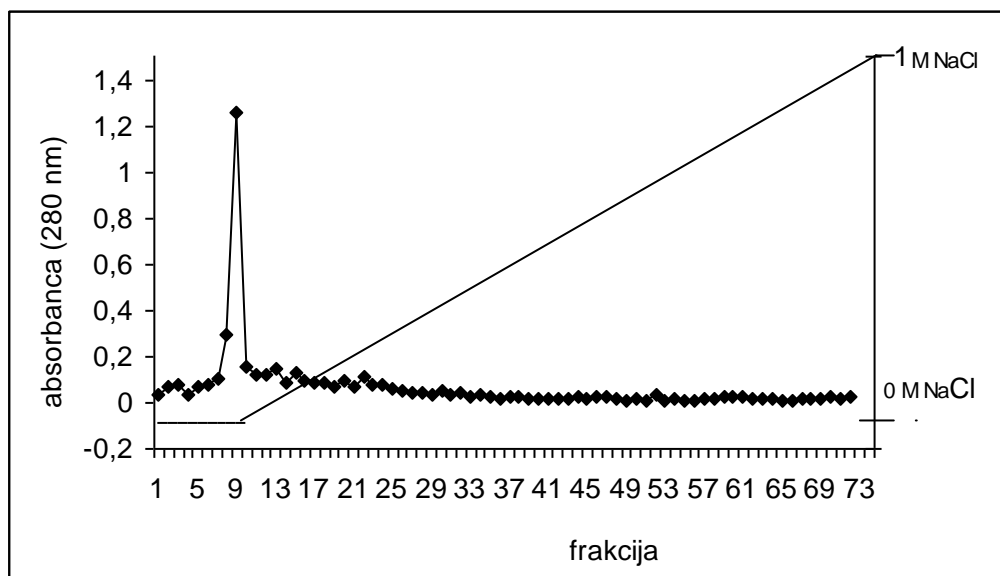
Po obarjanju smo vzorec nanegli na gelsko kromatografijo. Razvidnih je sicer več očitnih visokih vrhov (slika 1), a le ti ne predstavljajo citolitičnega metridiolizina, pač pa druge proteine v morski vetrnici, kar smo ugotovili s preverjanjem hemolitičnosti, saj so bile litično aktivne le frakcije od 34 do 45, pogojno litične pa so bile tudi frakcije od 92-94. Aktivne frakcije (od 34 do 45) smo kasneje združili in nadaljevali z delom s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije.



Slika 1: Elucijski diagram gelske kromatografije (1,5 x 100 cm kolona, Sephadex G-100, mobilna faza 10 mM amoniacetata s pH 5,6). Nanos 5 ml homogenata morske vetrnice *Metridium senile*

## 4.2 IONSKOIZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA

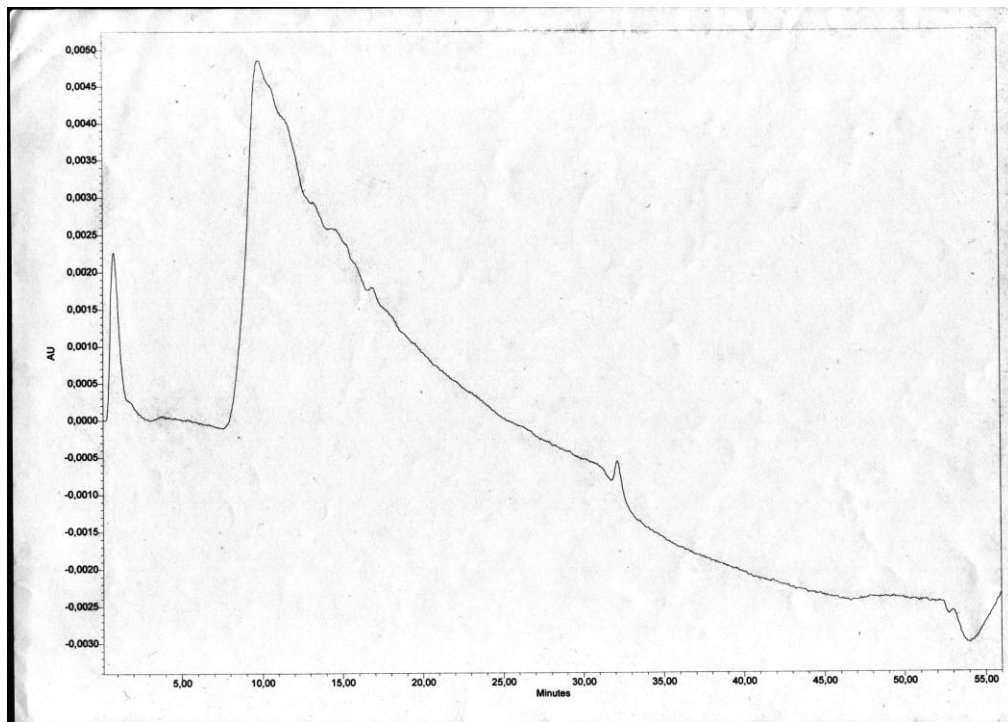
Pri ionsko-izmenjevalni kromatografiji je jasno razviden vrh (slika 2), ki se je izkazal za hemolitičnega.



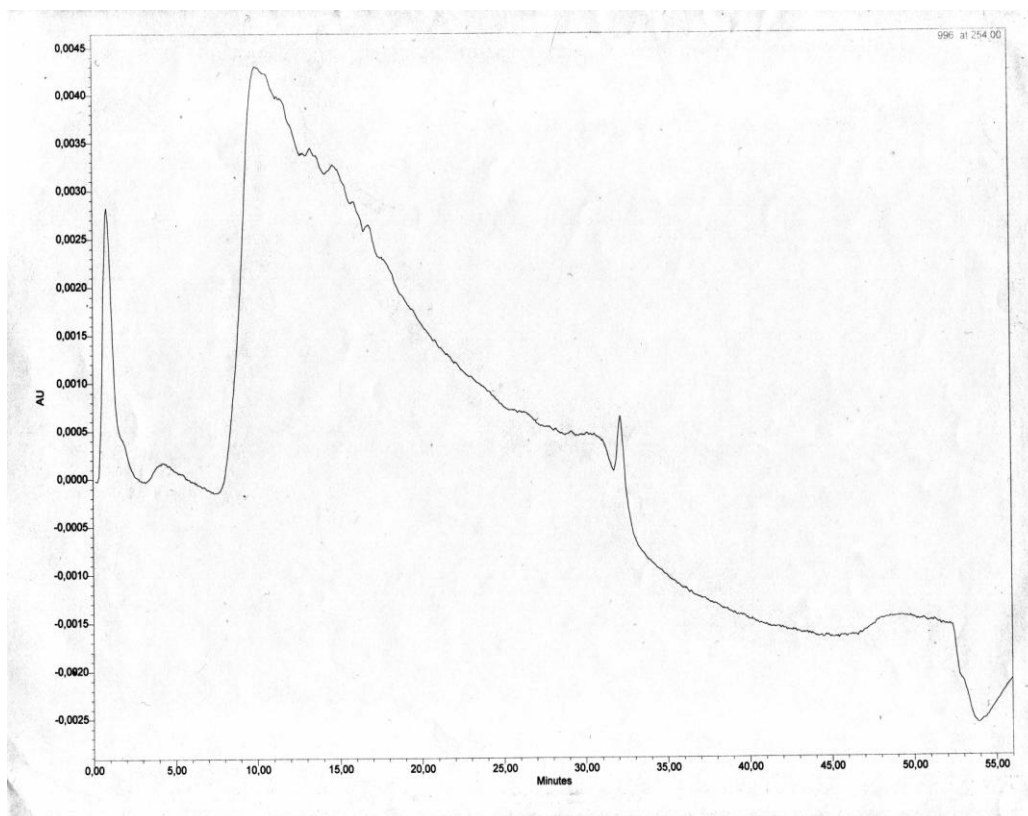
Slika 2: Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (High Q Econo Pac Cartridge kolona, mobilna faza 50mM tris pufer s Ph 7,5). Nanos hemolitičnih vrhov po gelski kromatografiji.

## 4.3 VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (HPLC) IN GELSKA HPLC KROMATOGRAFIJA

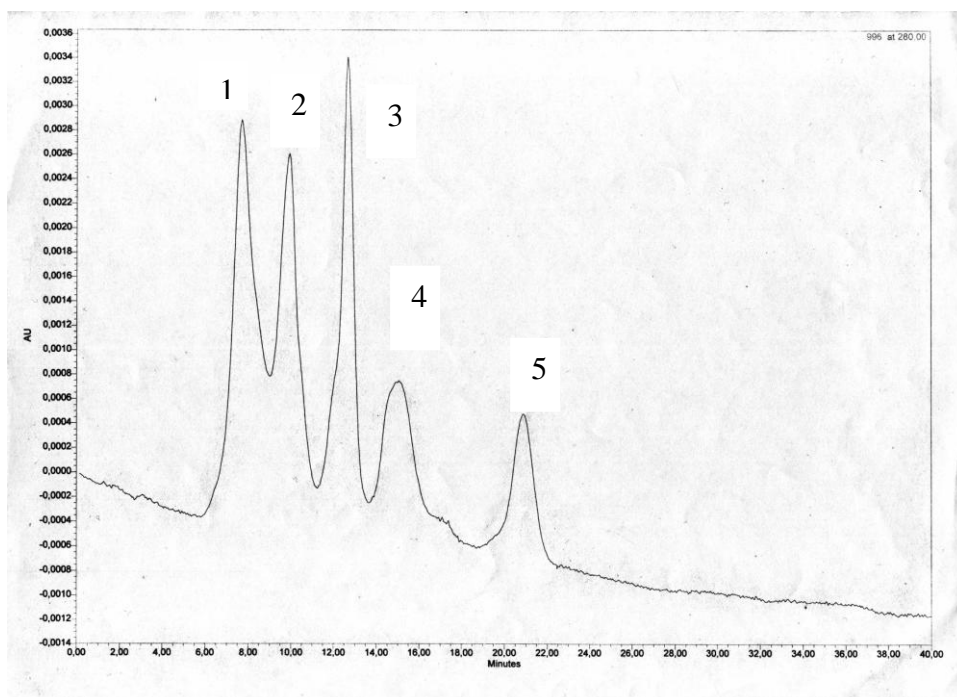
Kromatogram smo izrisali na osnovi meritev pri valovni dolžini 280 ali 254 nm.



Slika 3: Elucijski diagram visokotlačne tekočinske kromatografije (kolona RESOURCE™ Q).Nanos hemolitičnega vrha po ionskoizmenjevalni kromatografiji. Pri tem smo uporabili pufer 1 (50 mM TRIS 121) in pufer 2 (50 mM TRIS 121 in 1 M NaCl). Pretok 2 ml/min, 1 run, po metodi Biokemija in ostreolizin., pri valovni dolžini 280 nm.



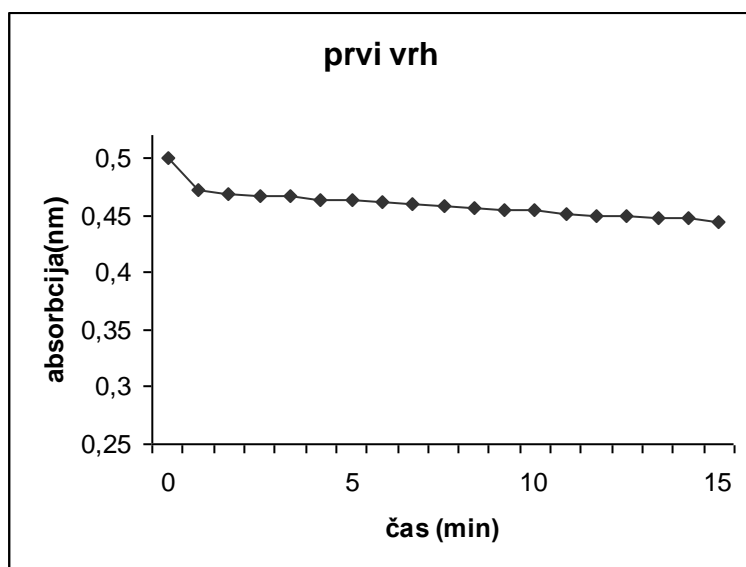
Slika 4: Elucijski diagram visokotlačne tekočinske kromatografije (kolona RESOURCE™ Q). Nanos hemolitičnega vrha po ionskoizmenjevalni kromatografiji. Pri tem smo uporabili pufer 1 (50 mM TRIS 121) in pufer 2 (50 mM TRIS 121 in 1 M NaCl). Pretok 2 ml/min, 1 run, po metodi Biokemija in ostreolizin., pri valovni dolžini 254 nm.



Slika 5: Elucijski diagram gelske HPLC kromatografije (kolona PROGEL™ TSKS GMPW). Nanos hemolitičnega vrha po ionskoizmenjevalni kromatografiji. Kot mobilno fazo smo uporabili amonacetat (pH 5.6), izokratsko. Pretok 1ml/min, po metodi linusitin, pri valovni dolžini 280nm.

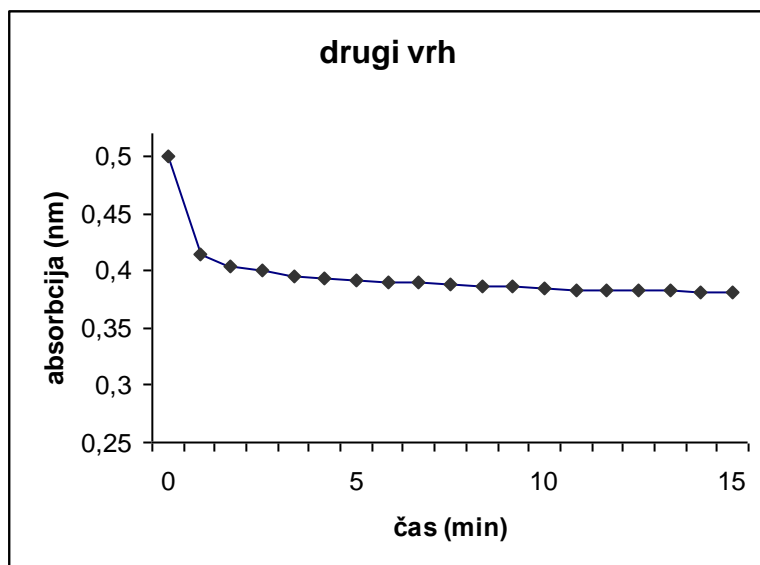
#### 4.4 PREVERJANJE HEMOLITIČNOSTI PO GELSKI HPLC KROMATOGRAFIJI

Ločitev vrha iz ionsko-izmenjevalne kolone (točka 4.2) na gelski HPLC-koloni je dala pet vrhov (slika 5). Vsakega od njih smo preizkusili ali ima hemolitično aktivnost (slike 6-10). Vidi se, da so vsi vrhovi, razen drugega, neaktivni. Hemolitičnost 2. vrha je povzročila približno 20 % hemolizo (padec absorbcije glede na začetno vrednost) v 50 s.

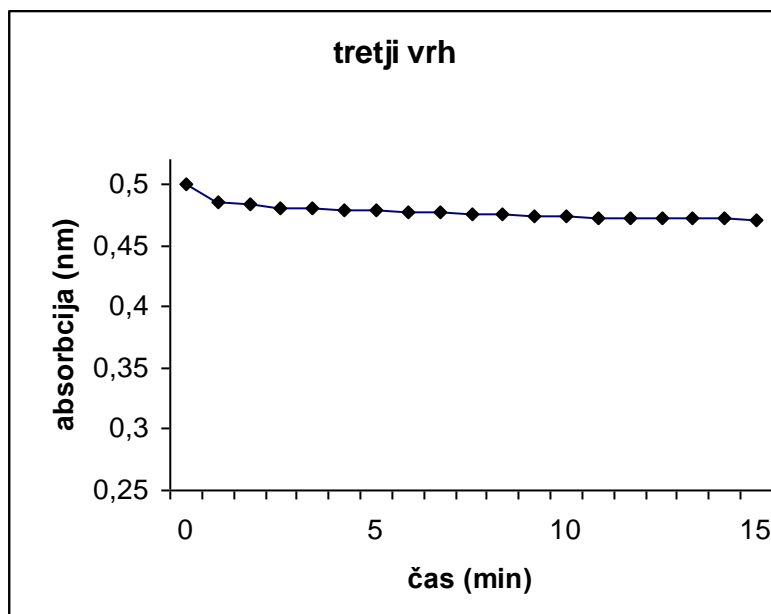


Slika 6: Prikazuje hemolitičnost prvega vrha ,ki je razviden iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije. Čas merjenja je bil 15 minut, začetna absorbanca pa 0,5. Koncentracija grobega pripravka vzorca: 20 µl.

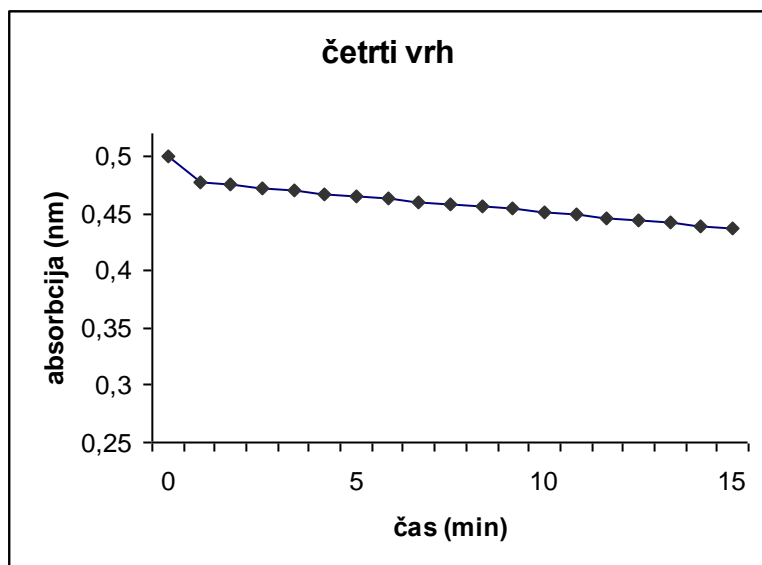




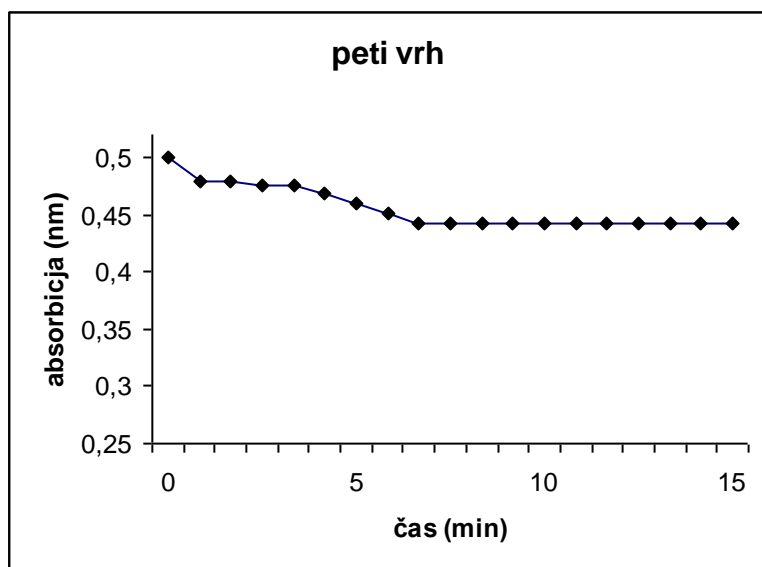
Slika 7: Prikazuje hemolitičnost drugega vrha, ki je razviden iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije. Čas merjenja je bil 15 minut, začetna absorbanca pa 0,5. Koncentracija grobega pripravka vzorca: 20  $\mu$ l.



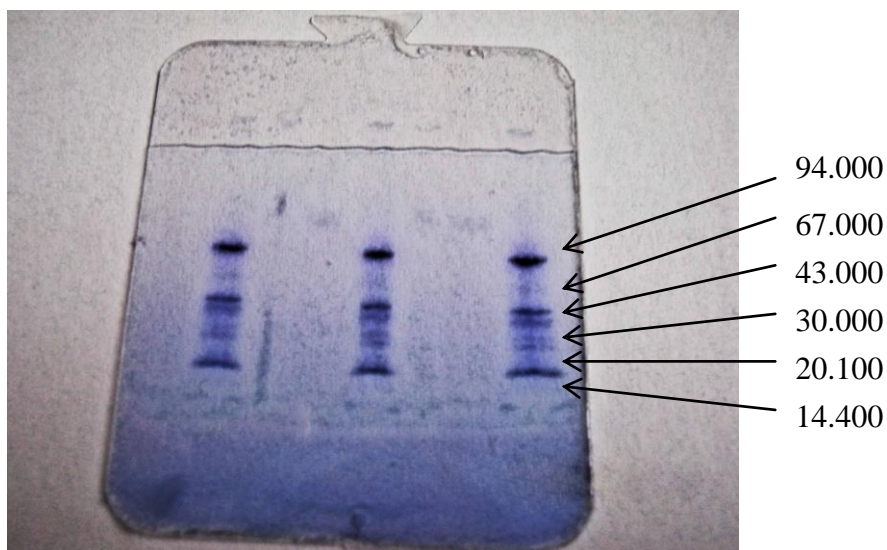
Slika 8: Prikazuje hemolitičnost tretjega vrha, ki je razviden iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije. Čas merjenja je bil 15 minut, začetna absorbanca pa 0,5. Koncentracija grobega pripravka vzorca: 20  $\mu$ l.



Slika 9: Prikazuje hemolitičnost četrtega vrha, ki je razviden iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije. Čas merjenja je bil 15 minut, začetna absorbanca pa 0,5. Koncentracija grobega pripravka vzorca: 20  $\mu$ l.



Slika 10: Prikazuje hemolitičnost petega vrha, ki je razviden iz elucijskega diagrama gelske HPLC kromatografije. Čas merjenja je bil 15 minut, začetna absorbanca pa 0,5. Koncentracija grobega pripravka vzorca: 20  $\mu$ l.

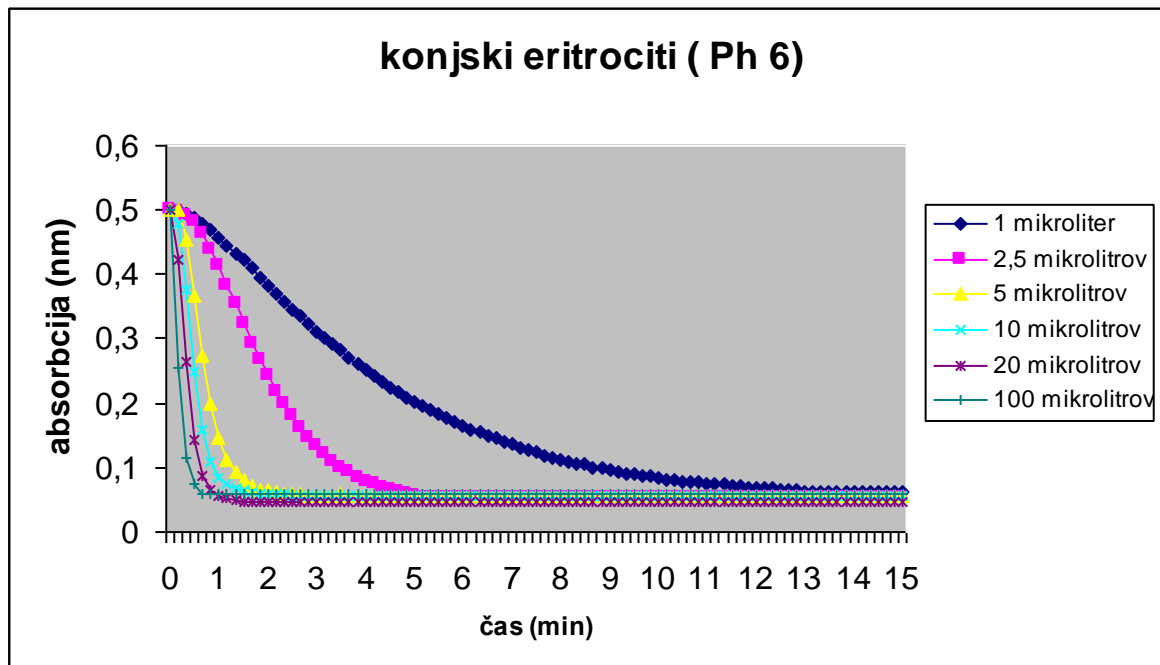


Slika 11: elektroforeza

Na oba robova in na sredino gela (Phast gel gradient 8-25) smo nanegli standardno mešanico proteinov z znanimi molekulskimi masami (LMW standardi). Med prvim in drugim standardom smo nanegli naš vzorec. Uporabili smo naslednje standarde: fosforilaza (94. 000 Da), Albumin (67.000 Da), Ovalbumin (43.000 Da), Karboanhidraza (30.000 Da), Tripsinski inhibitor ( 20.100 Da) in Alfa-laktalbumin (14.400 Da).

## 4.5 HEMOLIZA

### 4.5.1 ČASOVNI POTEK HEMOLIZE KONJSKIH ERITROCITOV

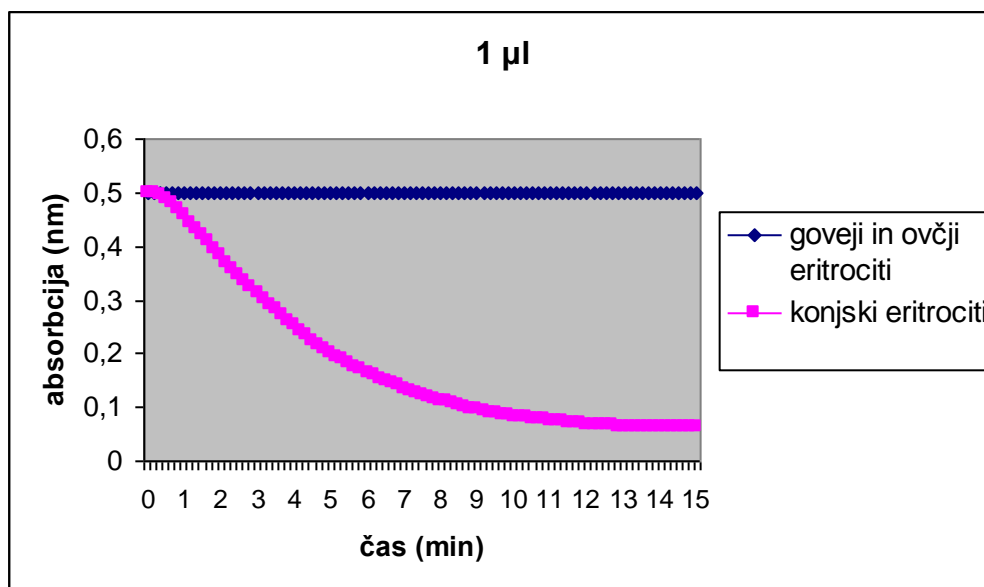


Slika 12: Časovni potek hemolize konjskih eritrocitov. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5, pH 6. Uporabili smo različne koncentracije grobega pripravka vzorca in sicer 1, 2,5, 5, 10, 20 in 100  $\mu\text{L}$ . Časovni potek hemolize smo zasledovali s turbometrično metodo.

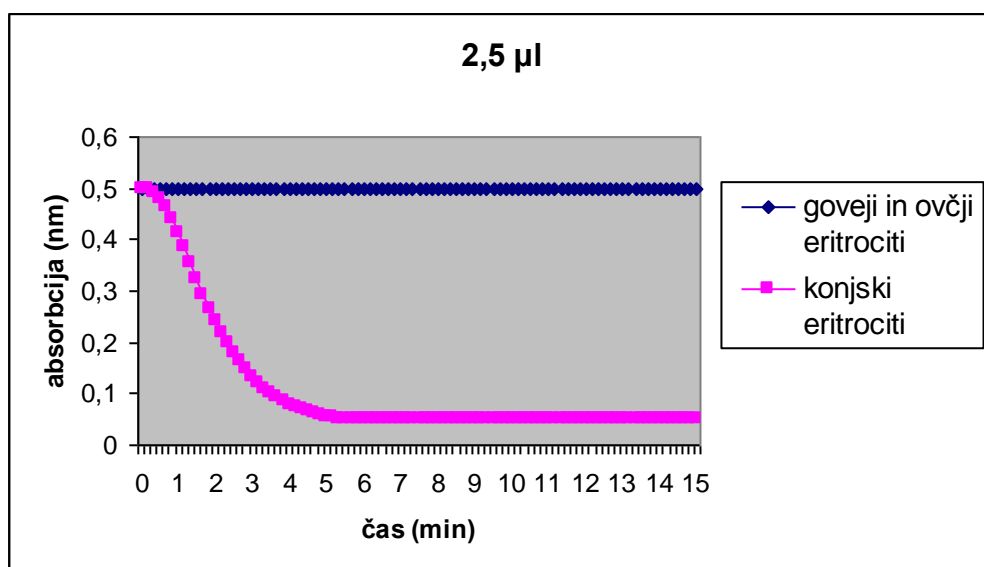
Hemoliza ne poteka linearno, pač pa sigmoidno. Dolžina prelitne faze in pa hitrost hemolize sta odvisni od količine hemolizina. Hitrost hemolize narašča z večanjem količine toksina, kar je razvidno iz slike 12.

### 4.5.2 ČASOVNI POTEK HEMOLIZE KONJSKIH, OVČJIH IN GOVEJIH ERITROCITOV OB RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH TOKSINA

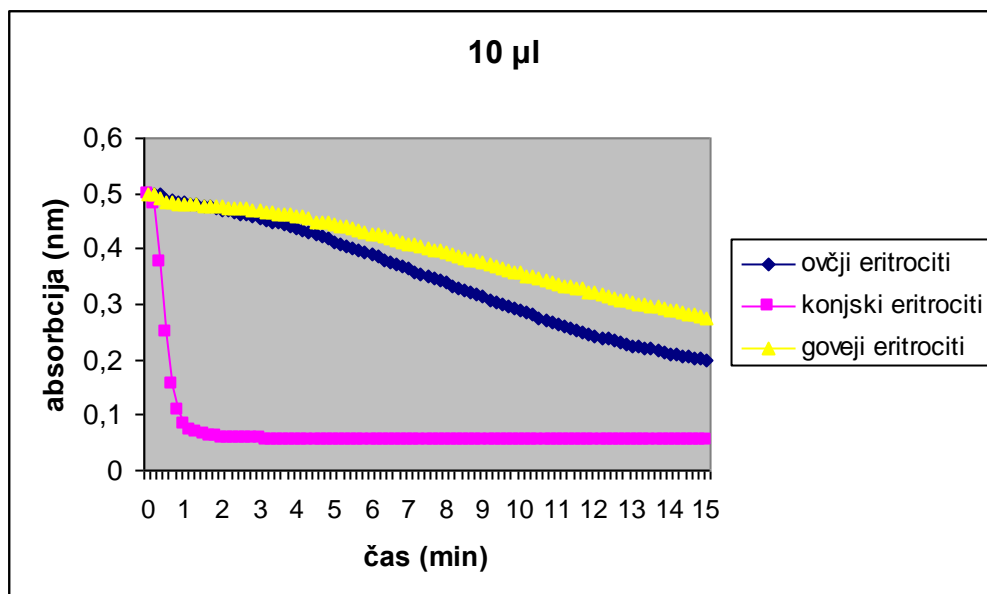
Iz časovnih potekov hemolize lahko ugotovimo, da je hitrost hemolize različnih eritrocitov iz različnih živali različna (slike 13-16). Potek hemolize je najhitrejši pri konjskih eritrocitih, sledijo ovčji, najpočasnejši pa je pri govejih eritrocitih. Ob večjih količinah toksina se pri vseh treh vrstah eritrocitov poveča tudi hitrost hemolize. Dolžina prelitne faze je odvisna tako od vrste živali kot tudi količine toksina. Lahko se zgodi, da je prelitna faza tako hitra, da se je na grafu ne zazna (slika 15 in 16, konjski eritrociti).



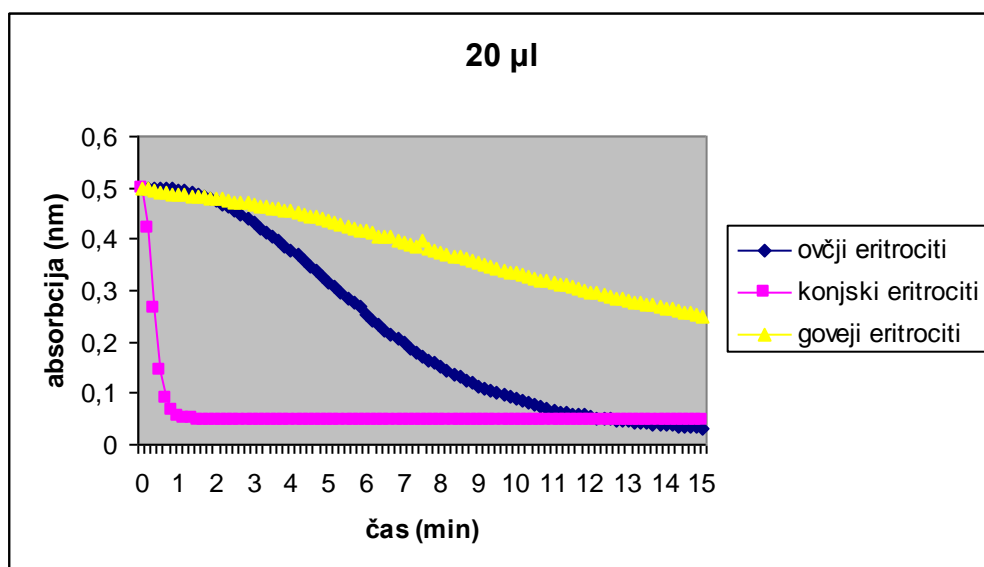
Slika 13: časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5, pH 6. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je bila 1 µl.



Slika 14: časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5, pH 6. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je bila 2,5 µl.



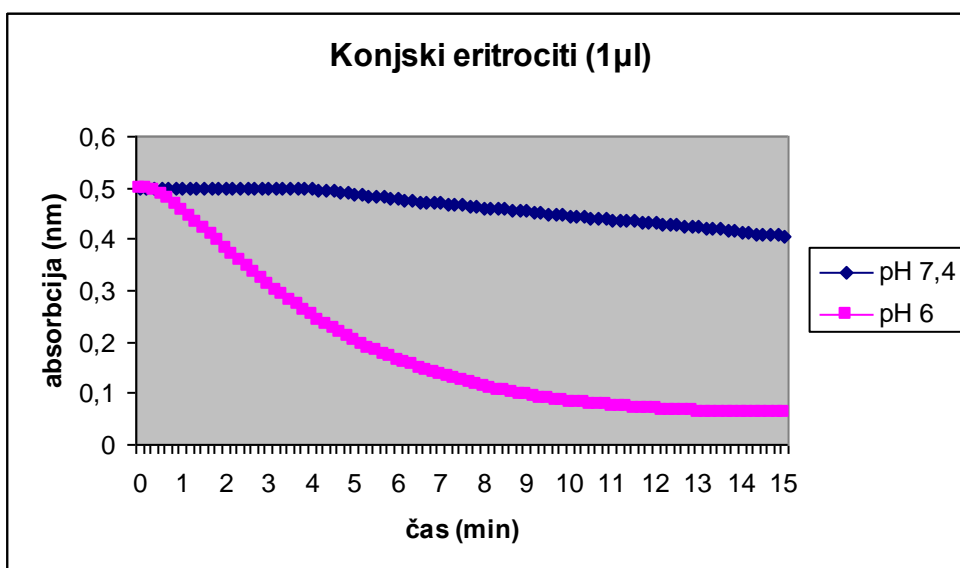
Slika 15: časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5, pH 6. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je bila 10 µl.



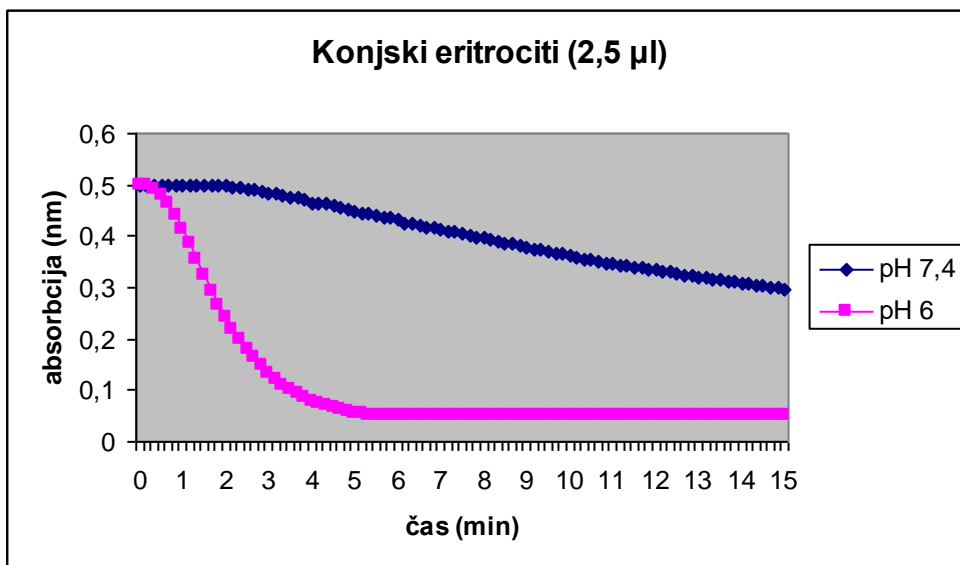
Slika 16: časovni potek hemolize govejih, konjskih in ovčjih eritrocitov. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5, pH 6. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je bila 20 µl.

### 4.5.3 pH OPTIMUM HEMOLIZE KONJSKIH ERITROCITOV

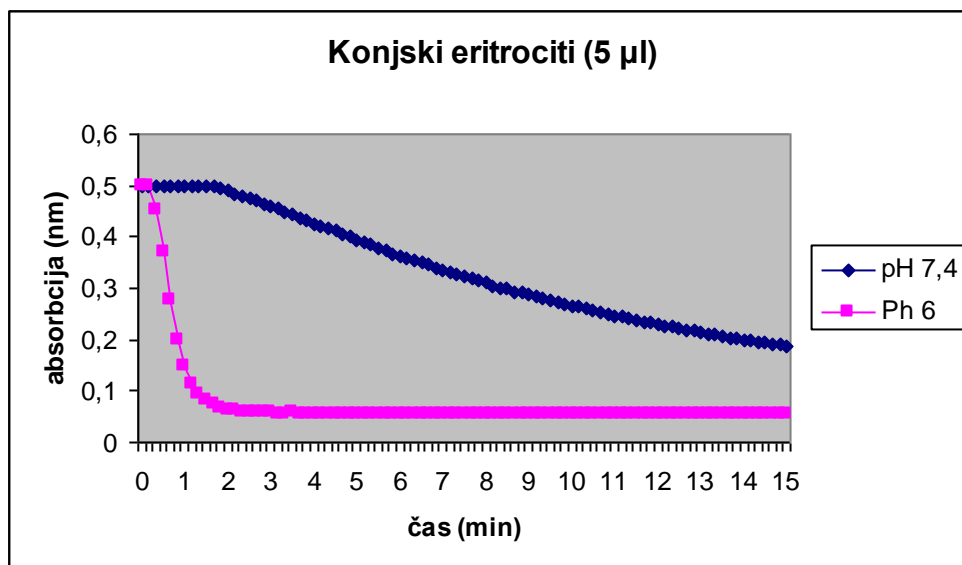
Eden od parametrov, ki vplivajo na hemolitično aktivnost citolizina, je tudi pH vrednost medija, v katerem so eritrociti. V našem delu smo preizkusili dva različna pH-ja in sicer pH 6 ter pH 7,4 (slike 17-20). Iz spodnjih grafov je opazno, da je hitrost hemolize večja, ko je pH vrednost medija eritrocitov 6. Pri nižjem pH-ju je tudi krajša prelitična faza kot pri višjem. Še vedno pa ostaja velik vpliv količine toksina na hitrost hemolize.



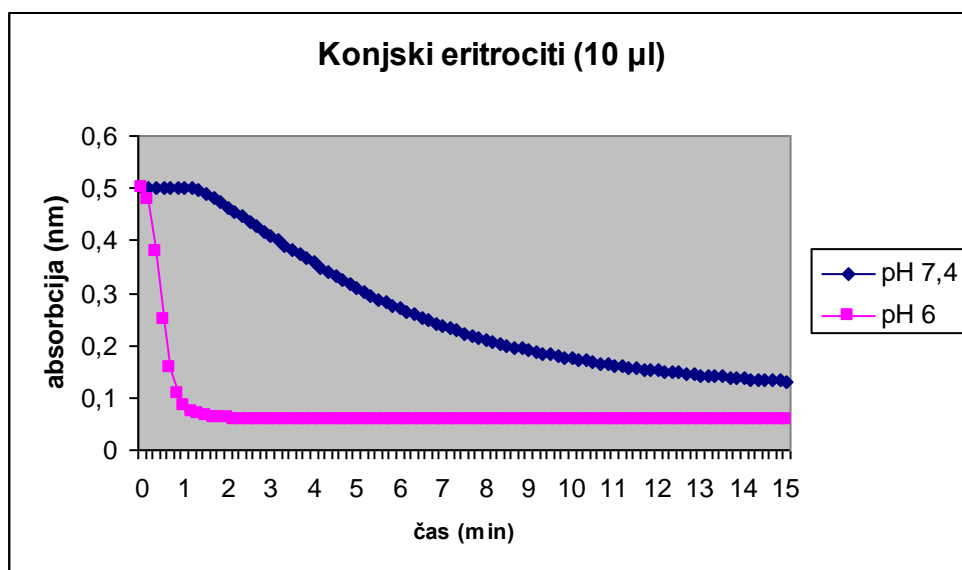
Slika 17: časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih in sicer pri pH 6 in pH 7,4. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je 1  $\mu$ l.



Slika 18: časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih in sicer pri pH 6 in pH 7,4. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je 2,5  $\mu$ l.



Slika 19: časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih in sicer pri pH 6 in pH 7,4. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je 5 µl.



Slika 20: časovni potek hemolize konjskih eritrocitov ob različnih pH-jih in sicer pri pH 6 in pH 7,4. Čas merjenja 15 minut, začetna absorbanca 0,5. Koncentracija uporabljenega grobega pripravka vzorca je 10 µl.



## 5 DISKUSIJA

Prve raziskave, ki so se ukvarjale s toksičnimi snovmi v morski vetrnici *Metridium senile* (Phillips in Abott, 1957; Goodwin in Telford, 1971), so potrdile, da vsebuje toksične snovi, vendar pa povezava s kasneje odkritim metridiolizinom ni znana oziroma jasna. Vsebnost citolitičnega proteina metridiolizina so nakazale šele kasnejše raziskave (Bernheimer in Avigad, 1977; Krebs in Habermehl, 1987).

Prvi korak pri izolaciji citolitičnega toksina je bila uporaba liofiliziranega materiala morske vetrnice, ki ni bil homogeniziran. Homogenizacija je namreč proces, s katerim razbijemo celične stene in membrane, kar pa zna biti neugodno za nadaljnjo izolacijo hemolizina, saj tako lahko hemolizin še dodatno pride v stik s snovmi (delci membrane, holesterol), ki inhibirajo njegovo delovanje. Homogenizacija pride v poštev pri izolaciji, kadar so osebki zamrznjeni, zelo majhni ali pa kadar želimo izolirati biološko aktivno snov samo iz določenega dela živali (Kem, 1988; Shiomi in sod., 1985). Homogeniziranje kot začetni korak pri izolaciji ni najbolj ugodno, saj lahko pride do kontaminacije biološko aktivne snovi z drugimi proteini, posledično pa tudi do encimske razgradnje iskane snovi ali njene inhibicije zaradi vezave na delce membran (Norton in sod, 1990; Sedmak, 1993). Glede na to, da smo vzorce morske vetrnice hranili dalj časa pred izolacijo proteinov, smo jih najprej liofilizirali. Sušenje z zamrzovanjem ali liofilizacija je namreč postopek, s katerim odstranimo vodo iz bioloških in organskih snovi, ki bi jih s segrevanjem poškodovali, hkrati pa ohranimo njihovo strukturo in sestavo. Primeren je tudi za termolabilne snovi, kar metridiolizin tudi je, saj izgubi kar 70% svoje aktivnosti, če ga segrejemo na 45°C za 20 minut (Bernheimer in Avigad, 1978).

Toksin morske vetrnice *Metridium senile* je protein (Krebs in Habermehl, 1987), zato pri izolaciji nismo uporabljali ekstremnih razmer, ki bi lahko vodili v delno razgradnjo iskane snovi. Ker pa je iskana snov tudi termolabilna (Bernheimer in Avigad, 1978), je izolacija potekala v hladnem okolju na temperaturi okrog 5°C. Hemolizin je topen in aktiven v destilirani vodi, kakor tudi v različnih puferskih raztopinah. Obarja se v organskih topilih, kot je aceton. Oborimo ga lahko tudi z amonsulfatom.

Po obarjanju smo proteinski vzorec s hemolitično aktivnostjo ločevali z gelsko kromatografijo (Sephadex G-100) z namenom, da bi protein očistili ostalih nečistoč. Hemolitično aktiven je bil tisti vzorec, ki smo ga dobili s 50% obarjanjem. Za mobilno fazo smo uporabili amonijev acetat s pH vrednostjo 5.6, saj je izoelektrična točka metridiolizina okrog 5 (Bernheimer in Avigad, 1978). Tako okolje je primerno, saj je v njem metridiolizin stabilen. Sledilo je nadaljnje čiščenje z ionskoizmenjevalno kromatografijo (High Q Econo Pac Cartidge kolona). Ker se nekateri proteini, čeprav nabiti, takoj sperejo iz kolone (Gorbunoff, 1984), smo to lastnost izkoristili pri izolaciji metridiolizina. Nečistoče se močno vežejo na kolono, medtem ko se hemolizin, kljub svoji kislosti, eluira z začetno mobilno fazo. Razlog za to nam ni poznan.

Elucijski kromatogram visokotlačne tekočinske kromatografije smo opazovali pri dveh različnih valovnih dolžinah in sicer pri 280 nm in 254 nm. Nižja valovna dolžina (254 nm) se uporablja za merjenje koncentracij nukleinskih kislin (DNA/RNA), višja (280 nm) pa se uporablja za merjenje koncentracije proteinov. Razmerje  $A_{260}/A_{280}$  nam pove, kakšna je čistost vzorca oziroma koliko je v vzorcu proteinov glede na RNA. Če je razmerje večje od 1.8, to pomeni, da je v vzorcu malo proteinov. Baze v DNA ali RNA absorbirajo UV svetlobo z maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. Večina proteinov ima maksimum absorpcije UV svetlobe pri valovni dolžini 280 nm, predvsem zaradi aromatskih aminokislin. Izračunali smo tudi koncentracijo proteinov v vzorcu po formuli  $c(\text{mg/ml}) = 1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$  in dobili rezultat 4.33  $\mu\text{g/ml}$ .

Nato smo naredili gelsko HPLC kromatografijo in kot rezultat dobili pet različnih vrhov, ki pa, razen pogojno rečeno enega, niso bili litični.

Molekulska masa in čistost metridiolizina smo poskušali določiti z SDS elektroforezo na poliakrilamidnem gelu. Postopek smo poskušali večkrat, vendar nam ni uspelo. Dobili smo precej nejasno in dokaj veliko liso, ki pa ni bila na območju, ker naj bi se nahajal metridiolizin. To kaže na to, da vzorec ni bil čist in da so bili v njem prisotni tudi drugi proteini.

Eritrociti so zelo specializirane krvne celice. Med drugim se od vseh drugih celic razlikujejo po tem, da nimajo jedra. Kljub temu so močno podvržene hemolizi. Pri večini drugih celic

propustnost membrane ne vodi v citolizo, saj imajo mehanizme za popravilo membrane (Bashford, 1988).

Znano je, da so eritrociti mnogih živali dovzetni za hemolizo, ki jo povzročijo citolitični toksini morskih vetrnic (Bernheimer, 1978 in 1990; Anderluh in Maček, 2002). Eden izmed takih citolitičnih proteinov je tudi metridiolizin (Bernheimer, 1978 in 1990). Potek hemolize je sigmoiden. Hemoliza je sestavljena iz treh faz. Te so prelitična, logaritemska in asimptotična faza. V prvi prelitični fazi poteka vezava hemolizina na membrano. Dolžina prelitične faze je odvisna od količine hemolizina in se manjša z večanjem dodanega hemolizina. Z večanjem količine hemolizina se krajša tudi čas do polovične hemolize. Hemoliza je odraz mnogih procesov, kot so vezava na membrano, vključitev vanjo, nastanek kanala in selektivna prepustnost ionov. Vsi ti bistveni dogodki so strnjeni v prelitični fazi (Dodge in sod., 1963). Druga faza je logaritemska faza obsežne lize eritrocitov, kjer hemoliza doseže najvišjo hitrost in sicer v trenutku, ko lizira polovico vseh razpoložljivih eritrocitov. Sledi ji asimptotična faza, v kateri lizirajo še preostale celice.

Aktivnost metridiolizina inhibira holesterol. Presenetljivo pa je, da steroli, ki imajo zelo podobno zgradbo holesterolu, nimajo prav nobenega vpliva na inaktivacijo metridiolizina (Bernheimer in Avigad, 1978).

Hitrost hemolize eritrocitov je zelo raznolika in je odvisna od vrste živali. Pri testiranju mnogih eritrocitov različnih živalskih vrst (Bernheimer in Avigad, 1978 in Bernheimer, 1990) se je izkazalo, da so za hemolizo najbolj dovzetni eritrociti konjev in psov, najmanj pa mišji in kozji, medtem ko so eritrociti ovc, ljudi in podgan po občutljivosti nekje vmes. Glede na te raziskave smo se odločili, da tudi sami testiramo hemolitičnost in sicer smo izbrali ovčje, konjske in goveje eritrocite. Ugotovili smo podobno kot avtorji pred nami. Konjski eritrociti so bili najbolj občutljivi, goveji najmanj, ovčji pa so bili po dovzetnosti za hemolizo nekje vmes. Razlog za tako raznoliko občutljivost eritrocitov posameznih vrst živali pa ostaja bolj ali manj neznan, saj bi pričakovali, da razlike v dovzetnosti za hemolizo izhajajo iz različnega deleža vsebnosti holesterola v membrani eritrocita, vendar ni tako. Eritrociti različnih živali so namreč podobno zgrajeni in so opazne le zelo majhne razlike v količini skupnih lipidov, fosfatidov in holesterola (De Gier in Van Deenen, 1961).

Poleg količine toksina in vrste živali pa na hitrost hemolize vpliva tudi pH vrednost medija, v katerem so eritrociti. Velikost por v membrani, njihova prepustnost za anione in katione ter tvorba agregatov citolizina v membrani je lahko odvisna od pH vrednosti okolja (Kem, 1988). Preizkusili smo dve pH vrednosti, to sta bili pH 6 in 7,4 (standardna vrednost pufru za eritrocite). Hemoliza je potekala občutno hitreje v mediju, ki je imel pH 6. Bolj kislega medija od slednjega nismo preizkušali, ker v zelo kislem mediju poteka spontana hemoliza eritrocitov. Za delovanje toksina bi bilo sicer kislo okolje bolj ugodno in sicer okolje s pH-jem 5.6, medtem ko pri pH 8 aktivnosti več ni (Bernheimer in Avigad, 1978).

Uporaba eritrocitov za merjenje hemolitičnosti sicer zagotavlja hitro in učinkovito metodo za merjenje, vendar pa metridiolizin, tako kakor aktinoporinski citolizin iz morske vetrnice *Stoichactis helianthus*, deluje destruktivno tudi na trombocite in fibroblaste (Bernheimer in Avigad, 1978), zato bi bile uporabe le teh pri nadaljnjih raziskavah priporočljive.

## 6 SKLEPI

Potrdili smo, da je v morski vetrnici *Metridium senile* prisoten citolitični protein metridiolizin, ki ima molekulsko maso 80 kDa.

Metridiolizin ima afiniteto za vezavo na različne snovi, zato se njegova koncentracija med postopki izolacije izgublja.

Ima tudi hemolitično aktivnost, saj lizira eritrocite mnogih različnih živali.

Hitrost hemolize eritrocitov je odvisna od vrste živali. Najbolj dovzetni so konjski eritrociti, manj ovčji, najmanj pa goveji.

pH vrednost medija eritrocitov vpliva na hemolizo in sicer je za njen potek bolj ugoden pH 6 kot pH 7.4

Hemoliza poteka sigmoidno. Večja kot je koncentracija toksina, hitrejši je njen potek. To pomeni, da hemoliza poteka na koloidno-osmotski način.

Dolžina prelitične faze hemolize je odvisna od mnogih dejavnikov, zelo pa nanjo vpliva koncentracija toksina in sicer se z večanjem le te zmanjšuje, včasih celo do te mere, da je ni zaznati na grafu, saj poteče izredno hitro.

## 7 POVZETEK

Morske vetrnice vsebujejo citolitične toksine, katerih vloga je zelo raznolika. Ker se vetrnica ne more prosto gibati in v primeru nevarnosti zbežati, ji v prvi vrsti služijo kot orodje za obrambo. Uporabni so tudi za lov plena, prav tako pa si z njimi pomaga pri komunikaciji z okoljem in kompeticiji.

Večina znanih citoličnih proteinov morskih vetrnic spada med aktinoporine, ki so veliki okrog 20 kDa, nimajo cisteinskih ostankov in jih inhibira sfigomielin. Iz morske vetrnice *Metridium senile* pa smo izolirali hemolizin, ki je drugačen od vseh ostalih poznanih toksinov morskih vetrnic, saj je večji od znanih aktinoporinov morskih vetrnic. Bolj kot toksinom morskih vetrnic pa je soroden citolizinom, ki jih najdemo v Gram pozitivnih bakterijah. Primer je streptolizin O, ki ga tako kot metridiolizin inhibira holesterol, imata pa tudi podobne biološke učinke. Topen je v vodi, netopen pa v acetonu, s katerim smo ga tudi oborili. Iz raztopine ga lahko oborimo tudi z amonsulfatom. Metridiolizin je kisel citolitičen toksin z molekulsko maso 80 kDa.

Poleg postopkov izolacije smo ugotavljali, kakšna je hemoličnost metridiolizina za eritrocite različnih vrst živali. Zanimal nas je predvsem vpliv pH-ja, vrste živali in različnih koncentracij citolizina na hitrost hemolize. Ugotovili smo, da imajo vsi trije parametri izjemen vpliv. Hitrost hemolize je večja v bolj kislem okolju, torej pri nižji pH vrednosti in ob večji koncentraciji toksina. Najhitrejša je če uporabimo konjske eritrocite, medtem ko so ovčji in zlasti goveji eritrociti manj občutljivi.

## 8 VIRI

Anderluh G. 2002. Več kot le luknje...Novice IJS, interno glasilo Inštituta »Jožef Štefan«. 95: 15-16.

Anderluh G., Bavdek A., Sepčič K. 2009. Praktikum iz biokemije : za študente prvostopenjskega bolonjskega programa Biologija. Ljubljana, Študentska založba: 75 str.

Anderluh G., Lakey J. 2010. Proteins-membrane binding and pore formation. New York, Springer: 172 str.

Anderluh G., Maček P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*. 40( 2): 111-124.

Anderluh G., Maček P., Sepčič K., Turk T. 2009. Eksperimentalne metode v biokemiji. Ljubljana, Študentska založba.

Anderluh G., Serra M.D., Viero G., Guella G., Maček P., Menestrina G. 2003. Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structure. *The Journal of Biological Chemistry*. 278( 46): 45216–45223.

Bashford C.L., Menestrina G., Henkart P.A., Pasternak C.A.1988. Cell damage by cytolysin. Spontaneous recovery and reversible inhibition by divalent cations. *The Journal of Immunology*. 141(11): 395-63974.

Batham E. J., Pantin C. F. A. 1950. Muscular and Hydrostatic Action in the Sea-Anemone *Metridium Senile* (L.). *Journal of Experimental Biology*. 27: 264-289

Bernheimer A.W. 1986. Proposed nomenclature for cytolytic toxins of sea anemones. *Toxicon*. 24(11-12): 1031-1032.

Bernheimer A.W.1990. Cytolytic Peptides of Sea Anemones. V: Marine Toxins- Origin, Structure and Molecular Pharmacology. Hall S., Strichartz G.(eds.). Washington. American Chemical Society: 304-311.

Bernheimer A.W., Avigad L.S. 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichacis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73: 467-471.

Bernheimer A.W., Avigad L.S.1978. A cholesterol- inhibitable cytolytic protein from the sea anemone *Metridium senile*. Biochimica et Biophysica Acta. 541: 96-106.

Bernheimer A.W., Avigad L. S., Kwang- Shin K.1979. Comparison of metridiolysin from sea anemone with thiol-activated cytolytins from bacteria. Toxicon. 17: 69-71, 73-75.

Bernheimer A.W., Rudy B. 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. Biochim. Biophys. Acta. 864 (1): 123-141.

Blanquet R. 1968. Properties and composition of the nematocyst toxin of the sea anemone, *Aiptasia pallida*. Comparative Biochemistry and Physiology. 25(3): 893-896.

Boyd S. Frilled Anemone. 2011. Emerald Sea Photography.  
<http://www.boydski.com/diving/photos/Anemomes/metridiumsenile.htm> (6.3.2011).

Cutress C.E.1955. An interpretation of the structure and distribution of cnidae in *Anthozoa*. Syst. Zoology 4: 120-137.

De Gier J., Van Deenen L.L.M. 1961. Some lipid characteristics of red cell membranes of various animal species. Biochim. Biophys. Acta. 49( 2): 286-296.

Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys.100: 119-128.



Ferlan I., Lebez D. 1974. Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*—I Purification and characterization. *Toxicon*. 12(1): 57-61.

Giacomelli V. O. 1997. In vivo učinki aktinoporinov, izoliranih iz *Actiniae equinae*. *Medicinski razgledi*. 36: 437-464.

Goodwin M.H., Telford M. 1971. The nematocyst toxin of *Metridium*. *Biological Bulletin*. 140: 389-399.

Gorbunoff M.J. 1984. The interaction of proteins with hydroxyapatite. I role of protein charge and structure. *Anal. Biochem*. 136: 425-432.

Hessinger D.A., Lenhoff H.M. 1973. Assay and properties of the hemolysis activity of pure venom from the nematocysts of the acontia of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Arch.Biochem.Biophys*. 159: 629-638.

Keen T.E.B., Crone H.D. 1969. The hemolytic properties of extracts of tentacles from the cnidarian *Chironex fleckeri*. *Toxicon*. 7(1): 55-63.

Kem W.R. 1988. Sea anemone toxins: structure and action. V: The biology of nematocysts. Hessinger D.A., Lenhoff M.H. (eds.) San Diego. Academic press: 375-405

Kim S. 2004. Jellyfish and Other Cnidaria. V: Poisoning and Drug Overdose. Kent O.R. (ed.). USA., McGraw-Hill companies: 236-237.

Krebs H.C., Habermehl G.G. 1987. Isolierung und Strukturaufklärung eines hämolytisch aktiven Peptids aus der Seeanemone *Metridium senile*. *Naturwissenschaften*. 74: 395-396.

Kuhelj R. 2009. Biokemija v praksi: načela in tehnike. Ljubljana, Tiskarna Univerze. 146 str.

Liofilizacija. 2010. Wikipedia, the free encyclopedia. (12.6.2010).

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Liofilizacija> ( 26.3.2011)

Maček P. 1992. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones ( *Actinaria*). FEMS Microbiology Letters. 105( 1-3): 121-129.

Maček P., Lebez D.1981. Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Effects of some ions in pH. Toxicon. 19: 233-240.

Maček P., Senčič L., Lebez D. 1982. Isolation and partial characterisation of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia cari*. Toxicon. 20 (1): 181-185.

Maček P., Zecchini M., Pederzoli C., Dalla Serra M., Menestrina G. 1995. Intrinsic tryptophan fluorescence of equinatoxin II, a pore forming polypeptide from the sea anemone *Actinia equina* L, monitors its interaction with lipid membranes. Eur.J. Biochem. 234: 329-35.

MarLIN- The Marine Life Information Network.2007.

<http://www.marlin.ac.uk/speciesfullreview.php?speciesID=3806> ( 10.2.2011)

Martin E.J. 1968. Specific antigens released into sea water by contracting sea anemones (Coelenterata). Comparative Biochemistry and Physiology. 25 (1): 169-176.

Menestrina G. 1991. Pore-forming cytolisins studied with planar lipid membranes. Period.Biol. 93: 201-206.

Mežnar M. 2001. Izolacija  $\alpha$  in  $\beta$  glukozidaz iz morske vetrnice *Actinia equina*. Dipl. Delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za biologijo.

Monastyrnaya M.M., Kozlowskaya E.P., Ivanov A.S., Khailov E.M., Elyakov G.B. 1988. The action of metridiolysin from the sea anemone *Metridium senile* on biological and model membranes. Biol. Membr. 5: 830-835.

Norton R.S., Bobek G., Ivanov J.O., Thomson M., Fiala-Beer E., Moritz R.L., Simpson R.J. 1990. Purification and characterisation of proteins with cardiac stimulatory and haemolytic activity from the anemone *Actinia tenebrosa*. Toxicon. 28 (1): 29-41.

Phillips J.H, Abbott D.P. 1957. Isolation and assay of the nematocyst toxin of *Metridium senile fimbriatum*. Biological Bulletin. 113(2): 296-301.

Picton B.E., Morrow C.C. Cnidaria: Actiniarica: Metridiidae. 2010.  
<http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=D12250> (6.3.2011)

Prevorčnik S. 2003. Navodila za vaje iz sistematske zoologije nevretenčarjev. Ljubljana, Študentska založba: 68 str.

Ratner S., Pulmann E.M. 1983. Era in New York Biochemistry: Festschrift for Sarah Ratner. USA, New York Academy of Sciences: 269 str.

Ravindran V. S., Kannan L., Venkateshvaran K. 2010. Biological activity of sea anemone proteins: II. cytolysis and cell line toxicity. Indian Journal of Experimental Biology. 48: 1233-1236.

Razpotnik A., Križaj I., Kem W.R., Maček P., Turk T. 2009. A new cytolytic protein from sea anemone *Urticina crassicornis* that binds to cholesterol- and sphingomyelin – rich membranes. Toxicon. 53: 762-769.

Sanamyan K., Sanamyan N., Schories D, Krumbeck H. *Metridium senile* ( Linnaeus, 1761). 2004-2010. [http://www.actinaria.com/metridium\\_senile.php](http://www.actinaria.com/metridium_senile.php) ( 23.2.2011)

Scott D.J., Harding S.E., Rowe A.J. 2005. Analytical ultracentrifugation: techniques and methods. UK, Royal Society of Chemistry: 580 str.

Sedmak B. 1993. Izolacija hemolizina iz morske vetrnice *Condylactis aurantiaca* in nekatere njegove biokemične in biološke lastnosti. Dok. Dis. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za biologijo.

Senčič L., Maček P. 1990. New method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins. Comp. Biochem. Physiol. 97( 4): 687- 693.

Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 1997. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska organizacija Univerze: 182 str.

Shiomi K., Takamya M., Yamanaka H., Kikuchi T. 1985. Isolation and characterization of lethal hemolysin in the sea anemone *Parascyonyx actinostoloides*. *Toxicon*. 23: 865-874.

Sket D., Drašlar K., Ferlan I., Lebez D. 1974. Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*—II. Pathophysiological action. *Toxicon*. 12 (1): 63-68.

Timbrell J. 2008. Paradoks strupa: kemikalije kot prijatelji in sovražniki. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 364 str.

Turk T. 1991. Cytolytic Toxins from Sea Anemones. *Toxin reviews*. 10 (3): 223-262.

Turk T. 1996. Živalski svet Jadranskega morja. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 456 str.

Turk T. 2007. Pod gladino Mediterana. 1. izdaja. Ljubljana, Modrijan: 590 str.

Turk T. 2008. Biokemija na Oddelku za biologijo- dobrodošli v svetu toksinov. *Acta Biologica Slovenica*. 51( 2): 35-43.

Turk T., Kem W.R. 2009. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*. 54 ( 8): 1031-1037.

Wahl M. 1985. *Metridium senile*: dispersion and small scale colonization by the combined strategy of locomotion and asexual reproduction (laceration). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26: 271-277.

Winter K.L., Isbister G.K., McGowan S., Konstantakopoulos N., Seymour J.E., Hodgson W.C. 2010. A pharmacological and biochemical examination of geographical variation of *Chironex fleckeri* venom. *Toxicology letters*. 192 (3): 419-424.

# **ZAHVALA**

Rada bi se iskreno zahvalila vsem prijateljem in tehnični sodelavki iz katedre za biokemijo za pomoč in spodbudo pri opravljanju diplomskega dela.

Posebna zahvala pa gre prof. dr. Tomu Turku, mojemu mentorju, za strokovno vodstvo pri diplomskem delu.