

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Anastasija PANEVSKA

**INTERAKCIJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA
Cry34Ab1 Z UMETNIMI IN BIOLOŠKIMI
MEMBRANAMI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij-2. Stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Anastasija PANEVSKA

**INTERAKCIJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA Cry34Ab1 Z
UMETNIMI IN BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij-2. Stopnja

**INTERACTIONS OF THE RECOMBINANT PROTEIN Cry34Ab1 WITH
ARTIFICIAL AND BIOLOGICAL MEMBRANES**

M. Sc. THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Molekulske in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Odseku za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu, na Katedri za biokemijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete, na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti na Inštitutu Jožef Štefan in Oddelku za varstvo rastlin na Kmetijskem inštitutu.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila za mentorico magistrskega dela imenovana doc. dr. Marjetka Podobnik, za somentorico prof. dr. Kristina Sepčič in za recenzenta prof. dr. Peter Maček.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Matej BUTALA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Marjetka PODOBNIK

Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter MAČEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 8. september 2016

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

Anastasija PANEVSKA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577(043.2)
KG	egerolizini/Cry34Ab1/ceramid fosfoetanolamin/rastlinski škodljivci
AV	PANEVSKA, Anastasija, dipl. biol. (UN)
SA	PODOBNIK Marjetka (mentorica)/SEPČIĆ Kristina (somentorica), MAČEK Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	INTERAKCIJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA Cry34Ab1 Z UMETNIMI IN BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2.stopnja)
OP	XI, 64 str., 8 pregl., 20 sl., 89 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Protein Cry34Ab1 je predstavnik egerolizinske proteinske družine (Pfam 06355, InterPro IPR009413) v Cry skupini insekticidnih proteinov. Skupaj s proteinskim partnerjem Cry35Ab1 oblikuje dvokomponentni membranski kompleks, ki permeabilizira membrano epitelnih celic v črevesju ličinke koruznega hrošča (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>). Skupna lastnost do sedaj preverjenih egerolizinov nekaterih izbranih bakterij in gliv je vezava s ceramid fosfoetanolaminom, najbolj zastopanim sfingolipidom v membranah nevretenčarjev (predvsem žuželk), ki se v membranah taksonomsko višjih organizmov nahaja samo v sledovih. V magistrski nalogi smo uspešno pridobili rekombinantni protein Cry34Ab1 v bakteriji <i>Escherichia coli</i> ter določili njegovo vezavo na lipidne vezikle, ki v svoji sestavi vsebujejo ceramid fosfoetanolamin. V območju pH 3.5 – 6 je rekombinantni protein najbolj stabilen in njegova membranska aktivnost najboljša. Za razliko od drugih egerolizinov, se rekombinantni protein Cry34Ab1 veže nespecifično na ceramid fosfoetanolamin in tudi na druge membranske lipide. Cry34Ab1 se v črevesju ličinke koruznega hrošča specifično veže na še nedefiniran proteinski receptor in tudi brez Cry35Ab1 ima toksičen učinek na ličinke koruznega hrošča. Ugotovili smo, da je Cry34Ab1 toksičen tudi za ličinke koloradskega hrošča (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) in nima toksičnega učinka na molarje (<i>Tenebrio molitor</i>).

KEY WORD DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 577(043.2)
CX aegerolysins/Cry34Ab1/ceramid phosphoethanolamine/pests
AU PANEVSKA, Anastasija
AA PODOBNIK Marjetka (supervisor)/SEPČIČ Kristina (co-advisor), MAČEK Peter (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master study Programmes in Molecular and Functional Biology
PY 2016
TY INTERACTIONS OF THE RECOMBINANT PROTEIN Cry34Ab1 WITH ARTIFICIAL AND BIOLOGICAL MEMBRANES
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIV, 64 p., 8 tab., 20 fig., 89 ref.
LA sl
Al sl/en
AB Cry34Ab1 protein is a representative of the aegerolysin family (Pfam 06355, InterPro IPR009413) within the group of insect-specific Cry toxins. In concert with another protein partner, Cry35Ab1, it forms binary membrane complexes that permeabilize the cell membrane of the epithelial midgut cells from Western corn rootworm larvae (*Diabrotica virgifera virgifera*). So far tested aegerolysins from some fungi and bacteria have been shown to interact specifically with ceramide phosphoethanolamine. This membrane lipid is the major membrane sphingolipid of several invertebrate classes (arthropods mostly) while present only in trace amounts in higher taxa. We have successfully isolated the recombinant protein Cry34Ab1 from the bacterium *Escherichia coli* and determined its interaction with lipid vesicles containing ceramide phosphoethanolamine. We found the protein stable in pH range from 3.5 to 6, which is also the optimum for its membrane activity. However, in contrast to other aegerolysins, the recombinant protein Cry34Ab1 does not interact specifically with ceramide phosphoethanolamine and other membrane lipids. Cry34Ab1 specifically binds to undefined protein receptor in the midgut of Western corn rootworm larvae and has also toxic activity without Cry35Ab1. We discovered that Cry34Ab1 exerts toxic activity to Colorado potato beetle larvae (*Leptinotarsa decemlineata*) and is not toxic to Mealworm beetle (*Tenebrio molitor*).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1. UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2. PREGLED OBJAV	4
2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV	4
2.2 ZA INSEKTE-SPECIFIČNI PROTEINI CRY	8
2.2.1 Protein Cry34Ab1	9
2.3 RASTLINSKI ŠKODLJIVCI IN NJIHOV NADZOR Z UPORABO INSEKTICIDNIH PROTEINOV	12
3. MATERIAL IN METODE	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Kemikalije	14
3.1.2 Raztopine in pufri	15
3.1.3 Gojišča	17
3.1.4 Bakterijski sevi	17
3.1.5 Plazmid	17
3.1.6 Rastlinski škodljivci	18
3.1.7 Laboratorijska oprema	18
3.2 METODE	20

3.2.1 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1	20
3.2.1.1 Plazmid pET-21b(+)_Cry34Ab1	20
3.2.1.2 Transformacija plazmida <i>pET-21b(+)_Cry34Ab1</i> v kompetentne celice sevov <i>E. coli</i> BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS in DH5 α	20
3.2.1.3 Izolacija plazmida <i>pET-21b(+)_Cry34Ab1</i> iz celic seva <i>E. coli</i> DH5 α	21
3.2.1.4 Izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v celic <i>E. coli</i> sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS	21
3.2.1.5 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz celic <i>E. coli</i> sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS	22
3.2.1.5.1 Izolacija topnega rekombinantnega proteina Cry34Ab1 z nikelj-afinitetno kromatografijo	22
3.2.1.5.2 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz inkluzijskih telesc	23
3.2.1.6 Gelska kromatografija	23
3.2.1.7 Določanje koncentracije proteina Cry34Ab1 po izolaciji	24
3.2.2 Fizikalno-kemijska karakterizacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1	24
3.2.2.1 NaDS-PAGE elektroforeza	24
3.2.2.2 Prenos Western	25
3.2.2.3 Cirkularni dikroizem	26
3.2.2.4 Merjenje triptofanskega spektra	26
3.2.2.5 Diferenčna dinamična fluorimetrija	27
3.2.3 Strukturne analize Cry34Ab1 v primerjavi z znanimi kristalnimi strukturami egerolizinov	28
3.2.4 Priprava lipidnih veziklov	28
3.2.5 Sedimentacijski test za določanje vezave Cry34Ab1 na lipidne vezikle	28
3.2.6 Izolacija totalnih membranskih lipidov iz insektnih celic Sf9	29
3.2.7 Ločitev membranskih lipidov s tankoplastno kromatografijo in prenos lipidov na PVDF-membrane	29
3.2.8 Preliminarni testi toksičnosti na tarčnih rastlinskih škodljivcih	30

3.2.8.1 Mocar (<i>Tenebrio molitor</i>)	31
3.2.8.2 Koloradski hrošč (<i>Leptinotarsa decemlieata</i>)	31
4. REZULTATI	32
4.1 IZOLACIJA REKOMBINANTNEGA PROTEINA Cry34Ab1	32
4.1.1 Izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v celicah sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS	32
4.1.2 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz celic sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS	33
4.1.2.1 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1, izraženega v topni obliki, z nikelj-afinitetno kromatografijo	34
4.1.2.2 Gelska kromatografija	35
4.1.2.3 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1, izraženega v inkluzijskih telescih	37
4.2 FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA REKOMBINANTNEGA PROTEINA Cry34Ab1	38
4.2.1 Prenos Western	38
4.2.2 Cirkularni dikroizem	39
4.2.3 Merjenje triptofanskega spektra	40
4.2.4 Diferenčna dinamična fluorimetrija	41
4.3 STRUKTURNE ANALIZE Cry34Ab1 V PRIMERJAVI Z ZNANIMI KRISTALNIMI STRUKTURAMI EGEROLIZINOV	43
4.4 SEDIMENTACIJSKI TEST ZA DOLOČANJE VEZAVE Cry34Ab1 NA LIPIDNE VEZIKLE	44
4.5 LOČITEV MEMBRANSKIH LIPIDOV S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO IN PRENOS LIPIDOV NA PVDF MEMBRANO	45
4.6 PRELIMINARNI TESTI TOKSIČNOSTI NA TARČNIH RASTLINSKIH ŠKODLJIVCIH	46
4.6.1 Mocarji (<i>Tenebrio molitor</i>)	46
4.6.2 Koloradski hrošč (<i>Leptinotarsa decemlieata</i>)	47
5. RAZPRAVA	49
6. SKLEPI	53

7. POVZETEK	54
8. VIRI	56

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Kemikalije	14
Preglednica 2. Raztopine in pufri	15
Preglednica 3. Gojišča	17
Preglednica 4. Bakterijski sevi	17
Preglednica 5. Plazmid	17
Preglednica 6. Rastlinski škodljivci	18
Preglednica 7. Laboratorijska oprema	18

KAZALO SLIK

Slika 1. Mehanizem oblikovanja por kompleksa pleurotolizina A (PlyA) in pleurotolizina (PlyB) v lipidne membrane.....	6
Slika 2. Parazit <i>T. brucei</i> v krvnem obtoku sesalcev označen s EryA-EGFP in DAPI.....	7
Slika 3. Kristalna struktura Cry34Ab1 in Cry35Ab1 ter primerjava med Cry34Ab1 in strukturno podobnimi proteini	11
Slika 4. Izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v celicah sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS	32
Slika 5. Prisotnost rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v supernatantu razbitih celic v topni obliki in v sedimentu razbitih celic v netopni obliki	33
Slika 6. Kromatogram filtriranega supernatanta razbitih celic seva BL21(DE3)pLysS.	34
Slika 7. NaDS-PAGE frakcij pri izolaciji proteina z Ni-NTA afinitetno kromatografijo	35
Slika 8. Gelska kromatografija Cry34Ab1 na koloni Superdex 75 16/60	36
Slika 9. Preverjanje prisotnosti Cry34Ab1 v zbranih frakcijah po gelski kromatografiji na Supedexu 200.	36
Slika 10. Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz inkluzijskih telesc z metodo po Huang in sod. (2007).	37
Slika 11. Prenos Western.....	38
Slika 12. CD-spekter rekombinantnega proteina Cry34Ab1	39
Slika 13. Tryptofanski spekter Cry34Ab1 (0.01 mg/ml) pri različnih vrednostih pH.	40

Slika 14. Vpliv pufrov z različno sestavo na stabilnost rekombinantnega proteina Cry34Ab1.	42
Slika 15. Primerjava struktur proteina Cry34Ab1,4JOX in pleurotolizina A, 4OEBA.....	43
Slika 16. Sedimentacijski test za določanje vezave Cry34Ab1 na lipidne vezikle.	45
Slika 17. Ločitev membranskih lipidov s tankoplastno kromatografijo ter prenos lipidov na PVDF-membrane in specifična zaznava Cry34Ab1.....	46
Slika 18. Vpliv proteina Cry34Ab1 na smrtnost mokaerjev	47
Slika 19. Vpliv Cry34Ab1 na smrtnost ličink koloradskega hrošča.....	48
Slika 20. Ličinke koloradskega hrošča, tretirane s Cry34Ab1, v primerjavi z ličinkami koloradskega hrošča iz negativne kontrole	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ε	Ekstincijski koeficient
Θ	Eliptičnost
% (V/V)	Volumski odstotek
% (m/V)	Masni odstotek
Ap	Ampicilin
APS	Amonijev persulfat
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Cm	Kloramfenikol
CD	Cirkularni dikroizem
CPE	Ceramid fosfoetanolamin
DSF	Diferenčna dinamična fluorimetrija
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EryA	Erilizin A
FPLC	Hitra tekočinska kromatografija
Hol	Holesterol
IPTG	Izopropil β -D-tiogalaktozid
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertanijevo gojišče
MLV	Multilamelarni vezikli
NaDS	Natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
NaOH	Natrijev hidroksid
Ni-NTA	Nikelj-nitrilotriocetna kovinsko-afinitetna kolona
obr./min	Obrati na minuto
OD	Optična gostota
ox-LDL	Oksidirani lipoproteini z nizko gostoto
OlyA	Ostreolizin A
ORF	Odprti bralni okvir
PBS	Fosfatni pufer
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
pH	Negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
PlyA	Pleurotolizin A
PlyB	Pleurotolizin B
PVDF	Poliviniliden fluorid
TCA	Trikloroocetna kislina
T_m	Temperatura tališča
TLC	Tankoplastna kromatografija

1 UVOD

Egerolizinska družina proteinov (Pfam 06355, InterProIPR009413) danes šteje čez 350 predstavnikov (Novak in sod., 2015). Egerolizini so β -strukturirani proteini z molekulsko maso od ~13 do 20 kDa, nizko izoelektrično točko in temperaturno labilni (Berne in sod., 2009). Skupna lastnost do zdaj preučenih egerolizinov je specifična vezava na ceramid fosfoetanolamin (CPE). CPE je analog sfingomielina (SM) in je najbolj zastopan sfingolipid v celični membrani insektov (Kraut in sod., 2011). V celični membrani sesalcev je prisoten samo v sledovih. Lastnost egerolizinov, da skupaj z drugo ne-egerolizinsko proteinsko komponento oblikujejo dvokomponentne sisteme, ki permeabilizirajo membrano in se specifično vežejo na CPE, kaže na njihovo potencialno uporabo kot bioinsekticidov. Kot bioinsekticidi se danes uporabljajo za insekte-specifični proteini kristalni proteini (Cry), ki jih proizvaja *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Crickmore in sod., 1998). Eden od egerolizinov v raznoliki proteinski skupini Cry je protein Cry34Ab1. Znano je, da se Cry34Ab1 veže na specifični proteinski receptor v črevesju ličinke koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera*), vendar ni izključeno, da pri vezavi sodelujejo tudi membranski lipidi (Kaiser-Alexnat sod., 2009). Cry34Ab1 je za ličinke koruznega hrošča toksičen tudi sam po sebi, vendar se toksičnost močno ojača v kombinaciji proteinom Cry35Ab1Ta Cry protein, tudi iz *B. thuringiensis*, pa je večji in ima β -trilistno zvitje (Herman in sod., 2002). Skupaj Cry34Ab1 in Cry35Ab1 tvorita transmembranske pore, ki povzročijo lizo epitelnih celic v srednjem črevesju ličinke koruznega hrošča.

1.1 NAMEN DELA

Prvi cilj raziskovalnega dela je bil pridobiti rekombinantni protein Cry34Ab1. Kot ekspresijski sistem smo uporabili bakterijo *Escherichia coli*. Glede na lastnost egerolizinov, da se specifično vežejo na CPE, smo določili interakcijo Cry34Ab1 z lipidnimi vezikli, ki vsebujejo CPE. Do zdaj je znano, da je Cry34Ab1 specifično toksičen za ličinke koruznega hrošča. V

našem delu smo poskušali ovrednotiti njegovo toksičnost tudi za druge rastlinske škodljivce iz skupine hroščev, na primer za mokařja (*Tenebrio molitor*) in ličinke koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Glede na dejstvo, da se do zdaj preučevani egerolizinski proteini specifično vežejo na membranski CPE, predvidevamo, da se bo tudi Cry34Ab1 specifično vezal na lipidne vezikle, ki bodo vsebovali ta lipid.
- Predvidevamo, da bo Cry34AB1 toksičen tudi za druge hrošče in škodljive žuželke.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV

Na osnovi podobnih aminokislinskih zaporedij manjšega števila izoliranih proteinov so leta 2002 oblikovali novo družino proteinov (Pfam 06355, InterProIPR009413), ki so jo imenovali za egerolizine po egerolizinu Aa-Pri1 iz glive *Agrocybe aegerita* (Espinar in Labarère, 1997; Berne in sod., 2002). Danes egerolizinska družina šteje čez 300 predstavnikov (Berne in sod., 2009; Novak in sod., 2015). Egerolizine najdemo pri glivah, bakterijah, živalih, rastlinah in virusih (Berne in sod., 2009). Prisotnost egerolizinov pri rastlinah najverjetneje izhaja iz gliv ali bakterij kot posledica horizontalnih genskih prenosov ali simbioze. Proteini iz družine egerolizinov imajo molekulsko maso od 13 do 20 kDa, nizko izoelektrično točko in so temperaturno labilni (Berne in sod., 2009). Egerolizini so β -strukturirani proteini z dvema nasprotno nameščenima β -ploskvama. Bogati so z aromatičnimi in nabitimi aminokislinami.

Znano je, da egerolizini lahko interagirajo z drugimi proteinskimi komponentami ter oblikujejo dvokomponentni kompleks, ki permeabilizira membrane. Egerolizinska citolitična aktivnost je torej odvisna od proteinskega partnerja, ki je večinoma protein iz družine z domeno kompleksa, ki napade membrano/perforin (ang. Membrane Attack Complex/ Perforin; MACPF). Egerolizini so membransko aktivni v območju pH od 3.5 do 10.5 (Ngai in TB, 2006; Berne in sod., 2005). Opazna je ohranitev cisteinskih in triptofanskih ostankov, ki imajo strukturno in funkcionalno vlogo. Triptofanski ostanki so ključni za prvotno vezavo na celično membrano pri nekaterih proteinih, ki tvorijo pore (Kamaguchi in sod., 1979; Hong in sod., 2002), cisteinski ostanki pa imajo vlogo pri hemolitični aktivnosti nekaterih egerolizinov. Veliko opisanih egerolizinov ima lastnost, da se vežejo na specifične membranske lipide (Sepčić in sod., 2004; Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013; Bhat in sod., 2015).

Biološka vloga egerolizinov še vedno ni znana; domneva se, da sodelujejo v razvoju organizma, ki jih sintetizira (Berne in sod., 2009). Možno je tudi, da so njihove vloge

pleiotropne in da so vključeni tudi v druge fiziološke procese v organizmu. Imajo pa egerolizini tudi biomedicinski potencial. Nekateri egerolizini se namreč lahko uporabljajo kot markerji za detekcijo specifičnih membranskih lipidov, drugi pa kot biomarkerji za zaznavanje glivnih okužb (Skočaj in sod., 2014; Bhat in sod., 2015; Berne in sod., 2009).

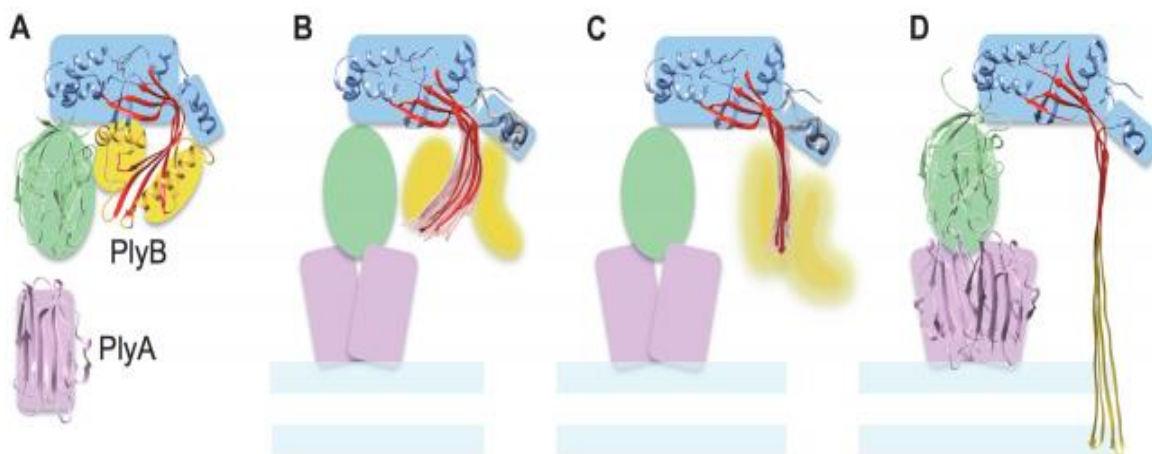
Prvi opisani egerolizin je Asp-hemolizin iz filamentozne glive *Aspergillus fumigatus*, ki ima hemolitično in toksično delovanje (Ebina in sod., 1985). Asp-hemolizin je produkt gena *aspHS*, se prekomerno izraža pri invazivni aspergilozi in je zato uporaben za specifično zaznavo okužb z *A. fumigatus* z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. V imunodiagnostiki se uporabljajo tudi monoklonalna protitelesa za zaznavanje egerolizina terelizina iz glive *Aspergillus terreus* v okoljskih vzorcih.

Asp-hemolizin se veže na lizofosfolipide in oksidirane lipoproteine z nizko gostoto (ox-LDL) (Kudo in sod., 2001; Sakai in sod., 1994), njegova vezava je koncentracijsko odvisna. Specifična sekvenca YKDG v ox-LDL je ključna za vezavo pozitivno nabitih regij Asp-hemolizina in je hkrati odgovorna za proliferacijo makrofagov (Kumagai in sod., 2006). Makrofagi imajo pomembno vlogo pri razvoju ateroskleroze in z vezavo Asp-hemolizina se njihova proliferacija inhibira (Kudo in sod., 1999).

Ostreolizin A (OlyA) je še eden dobro opisan egerolizinski protein. Izoliran je bil iz glive *Pleurotus ostreatus* in ima molekulsko maso 15 kDa. Sintetizira se med oblikovanjem primordijev in plodnih teles (Fernandez-Espinar in Labarere, 1997; Berne in sod., 2002). Lokaliziran je v bazidijih in sporah (Vidic in sod., 2005). Na membranske lipide se veže v svoji nativni konformaciji pri pH ~ 7. OlyA se specifično veže na lipidne rafte, bogate s holesterolom (Hol) in SM. Za lipidne rafte je znano, da sodelujejo pri eksocitozi in endocitozi, signalni transdukciji, vstopu patogenov v celice in da so urejeni v tekočo urejeno fazo (Edidin in sod., 2003; Lingwood in Simons, 2010). Membransko aktivnost ostreolizina inhibirajo lizofosfolipidi ter maščobne kisline, ki spremenijo fizične lastnosti celične membrane (Sepčić in sod., 2003; Rebolj in sod., 2006). OlyA sam po sebi nima hemolitične aktivnosti in ne permeabilizira lipidnih veziklov. Za permeabilizacijo membrane potrebuje drugo proteinsko

komponento, to je protein z MAPCF-domeno, pleurotolizin B (PlyB). Skupaj s PlyB oblikuje transmembransko poro v veziklih, sestavljenih iz eritrocitnih lipidov ali iz sfingomielina in holesterola (Ota in sod., 2013; Sepčić in sod., 2004; Tomita in sod., 2004). Odprta transmembranska pora ni selektivna za ione in manjše nevtralne snovi. S tvorbo transmembranske pore OlyA skupaj s PlyB povzroči koloidno-osmotsko lizo celice (Schlumberger in sod., 2014). *Pleurotus ostreatus* sintetizira nekaj izoformov ostreolizina, kar pomeni, da imajo glive lahko številne mRNA, ki kodirajo izoformne oblike določenega egerolizina (Berne in sod., 2009; Ota in sod., 2013).

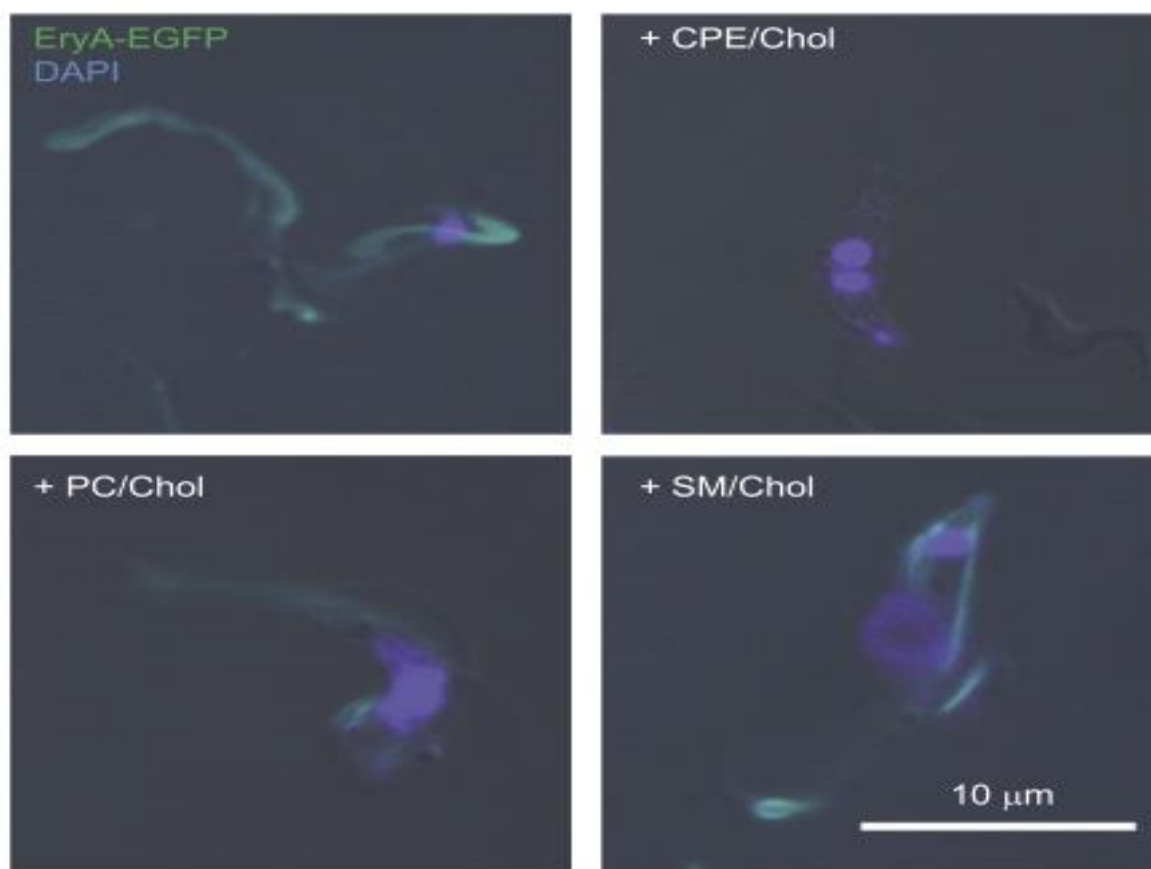
Skočaj in sod. (2014) so fluorescenčno označili C-terminalno regijo z mCherry tako, da je 42.5 kDa fuzijski protein, OlyA-mCherry, uporaben kot specifični označevalec lipidnih raftov, bogatih s Hol in SM .



Slika 1. Mehanizem oblikovanja por kompleksa pleurotolizina A (PlyA) in pleurotolizina (PlyB) v lipidne membrane (Lukyanova in sod., 2015) (A) Topna monomera PlyA in PlyB. (B) in (C) Oblikovanje »zgodnje« in »pozne« prepore na membrani, pri katerih je razvidno razvitje β -ploskev v PlyB. (D) Insercija v membrano, razvitje α -vijačnic v PlyB in oblikovanje transmembranske pore.

PlyA z mol. maso 17 kDa je egerolizin, ki se specifično veže na SM v celični membrani ali v lipidnih veziklih. Tudi PlyA je egerolizin iz glive *Pleurotus ostreatus* in je zelo podoben

ostreolizinu (95 % aminokislinska identičnost). Skupaj s proteinom PlyB gradi 700 kDa strukturo, ki permeabilizira celično membrano (Tomita in sod., 2004) in s tem tvori transmembransko poro s premerom 4–5 nm (Tomita in sod., 2004). Lukoyanova in sod. (2015) so s pomočjo krioelektronske mikroskopije kompleksa PlyA/PlyB ter kristalnimi strukturami topnih komponent PlyA in PlyB določili strukturo PlyA/PlyB transmembranske pore in predlagali mehanizem nastanka te pore (slika 1). Transmembranska pora je v obliki β -sodčka sestavljen iz 52 β -trakov.



Slika 2 Parazit *T. brucei* v krvnem obtoku sesalcev označen s EryA-EGFP in DAPI (Bhat in sod.,2015). *T.brucei* ima v celičnih membranah veliko količino sfingolipida CPE. Ery-EGFP ter Ery-EGFP predhodno inkubiran s fosfatidilholinom (PC)/holesterolom (Hol) (1:1) in SM/Hol (1:1) specifično označuje membranski lipid CPE. Ery-EGFP predhodno inkubiran s CPE/Hol (1:1) ne označuje celične membrane ter kaže na specifičnost EryA do membranske lipida CPE.

Značilnost egerolizinov je tudi specifična vezava na analog sfingomielina CPE, ki je glavni sfingolipid v celični membrani žuželk in nekaterih protozojskih parazitov, v sesalčjih celicah pa je prisoten v sledovih. Do zdaj raziskani egerolizini OlyA, PlyA ter erilizin A (EryA), se vežejo na lipidne vezikle iz zmesi CPE in holesterola (Hol) v razmerju 1:1 ter se tako lahko uporabljajo za detekcijo in vizualizacijo CPE (Bhat et al. 2015). Egerolizin EryA je lahko potencialen specifičen označevalec membranskih domen, ki vsebujejo CPE ter posledično celične membrane parazita *Trypanosoma brucei* (slika 2), kar je nova perspektiva v razvoju diagnostike afriške spalne bolezni (Bhat in sod., 2015).

Eden od predstavnikov insekticidnih proteinov Cry, ki jih proizvaja *Bacillus thuringiensis* in ki sodi v egerolizinsko družino proteinov, je Cry34Ab1, ki je opisan v nadaljevanju.

2.2 ZA INSEKTE SPECIFIČNI PROTEINI CRY

Bakterija *Bacillus thuringiensis* (Bt) se že od odkritja pred stotimi leti uporablja kot biopesticid v kmetijstvu. Bt je aerobna, sporulirajoča Gram-pozitivna bakterija, ki jo lahko najdemo na rastlinah, mrtvih insektih, v vodi in v zemlji. Ko zmanjka nekaterih pogojev za vegetativno rast, bakterija sporulira ter proizvaja spore in parasporalna telesca, sestavljena iz insekticidnih kristalnih proteinov. Bt-toksini so specifični za tarčne organizme (ličinke metuljev, dvokrilcev, hroščev in za nekatere ogorčice), ne vplivajo na druge organizme in so biorazgradljivi (Crickmore in sod., 1998). Produkcija proteinov Cry se začne z začetkom sporulacije (Xia in sod., 2005; Guidelli-Thuler in sod., 2009; Pérez-García in sod., 2010) in številni geni Cry imajo skupne promotorje s sigma faktorji, ključnimi za sporulacijo. Proteini Cry se aktivirajo v prebavilih občutljivih škodljivcev. So zelo specifični, varni za okolje in so tako pomembna alternativa za kemijske pesticide. Protein Cry je vsak parasporalen inkluzijski protein iz Bt, ki ima toksičen učinek na tarčni organizem, ali vsak protein, ki ima očitno sekvenčno podobnost z nekaterimi znanimi proteini Cry (Crickmore in sod., 1998). Danes je

znanih več kot 700 genskih zapisov *cry* ki so razvrščeni v 70 genskih podskupin *cry* glede na aminokislinsko zaporedje produkta.

Skupna značilnost za vse do zdaj raziskane toksine Cry je vezava na specifični receptor v aplikalni membrani epitelnih celic v črevesju ličink insektov ali ogorčic (Bravo in sod., 2013). Z N-terminalno regijo pride do insercije v membrano. Pogosto pride tudi do oligomerizacije in nato oblikovanja pore ali ionskega kanala. To povzroči neselektivni prehod ionov skozi membrano ter poruši membranski transport in lizo celic, kar privede do smrti žuželke.

2.2.1 Protein Cry34Ab1

Protein Cry34Ab1 z molekulsko maso 13.6 kDa je predstavnik toksinov Cry v egerolizinski družini proteinov. Genski zapis za Cry34Ab1 je na istem operonu kot genski zapis za neegerolizinski protein Cry35Ab1. Odprt bralni okvir (ORF) 13.6-kDa proteina Cry34Ab1 je navzgor od ORF-ja 44-kDa proteina Cry35Ab1. Intragenska regija je sestavljena iz obrnjenih ponovitev, ki imajo potencial, da oblikujejo sekundarno strukturo (Ellis in sod., 2002). Oba proteina sta bila odkrita pri sevu *B. thuringiensis* PS149B1 in se pojavljata skupaj v kristalih ter imata koordinirano vlogo. Cry34Ab1 in Cry35Ab1 delujeta kot dvokomponenten insekticiden kristalni kompleks proti ličinkam koruznega hrošča (Narva, 2000). Danes je v uporabi transgena koruza, v katero so vstavljeni geni, ki kodirajo proteina Cry34Ab1 in Cry35Ab1. Ekspresija proteinov v transgeni koruzi je nizka, zato je uporaba bakterijskih rekombinantnih sistemov za proizvodnjo proteinov veliko boljša (Huang in sod., 2007). Kot bakterijski rekombinantni sistem za pridobivanje Cry34Ab1 se uporabljata *Escherichia coli* in *Pseudomonas fluorescens* (Huang in sod., 2007). Protein se izraža v inkluzijskih telescih v obeh rekombinantnih sistemih. Kot ustrežnejši sistem za pridobivanje proteina Cry34Ab1 v visokih koncentracijah v bioreaktorjih se uporablja *Pseudomonas fluorescens* (Huang in sod., 2007).

Aminokislinsko zaporedje proteinov Cry34Ab1 in Cry35Ab1 ni homologno z nobenim drugim aminokislinskim zaporedjem iz Bt. Cry34Ab1 skupaj s Cry35Ab1 oblikuje dvokomponentni

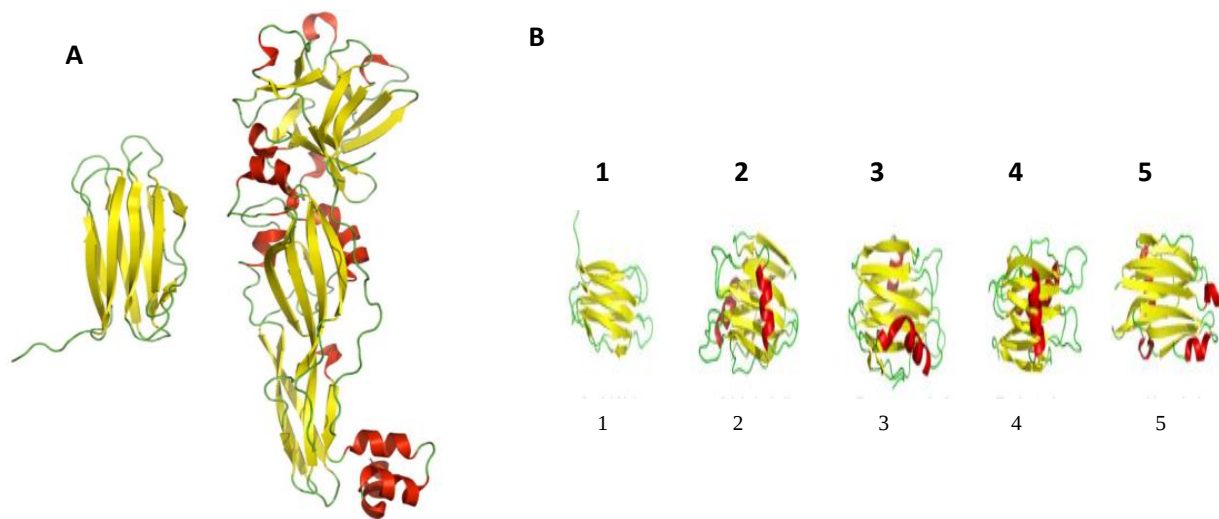
toksin (Ellis in sod., 2002). Protein Cry34Ab1 ima toksičen učinek na ličinke koruznega hrošča tudi sam, vendar šele skupaj z Cry35Ab1 v razmerju 9:1 doseže visoko smrtnost koruznega hrošča (Herman in sod., 2002). Najoptimalnejšega razmerja med proteinoma za doseganje močnejšega insekticidnega učinka še vedno niso odkrili (Ellis in sod., 2002, Herman in sod., 2002). Oba proteina sta klasificirana tudi kot Cry delta-endotoksina (Crickmore in sod., 2012). Znano je, da je biološka aktivnost dvokomponentne oblike toksina iz *Pseudomonas fluorescens* enaka aktivnosti proteinov iz transgene koruzne rastline (Gao in sod., 2004, Huang in sod., 2007; Moellenbeck in sod., 2001; USEPA, 2005a). Proteini, sintetizirani v *Pseudomonas fluorescens* ter v transgenih rastlinah, imajo isto molekulsko maso, imunsko prepoznavo in N-terminalne sekvence. Oba proteina imata N-glikozilacijska mesta, vendar nobeden od proteinov iz *Pseudomonas fluorescens* ter transgene koruzne rastline ni glikoziliran (Gao in sod., 2004). Ko je Cry35Ab1 enkrat v srednjem črevesju tarčnega organizma, pride do krajšanja C-terminalnega fragmenta tako, da ima končni produkt molekulsko maso 40 kDa. S tem se toksičen učinek dvokomponentnega toksina poveča, oziroma ima Cry35Ab1 ojača učinek Cry34Ab1 (Gao in sod., 2004). V srednjem črevesju ličink hroščev se aktivirajo serinske proteaze, kot sta kimotripsin in endoproteinaza Glu-C, ki najverjetneje pretvorita 44 kDa Cry35Ab1 v 40 kDa Cry35Ab1. Sprememba Cry35Ab1 v 40 kDa-obliko je verjetno potrebna za tvorbo pore, ker ima pretvarjanje oblike 44 kDa v obliko 40 kDa optimum pri pH 5.5–6.0, kar je podobno pH-ju v črevesju ličink hroščev.

Znano je, da so na dvokomponentni toksin najobčutljivejše ličinke koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Moellenbeck in sod., 2001).

Mehanizem delovanja Cry34Ab1 v membrani epitelnih celic še vedno ni popolnoma raziskan, vendar se verjetno razlikuje od do zdaj raziskanih mehanizmov, kot na primer v primeru Cry3Bb1, ki je drugi Bt-insekticidni protein aktiven proti koruznemu hrošču (Gassman in sod., 2011; Masson in sod., 2004). Eksperimentalni rezultati so pokazali, da se Cry34Ab1 veže na 110 kDa proteinski receptor ter Cry35Ab1 na 50 kDa proteinski receptor (Kaiser-Alexant in sod., 2009). Dvokomponentni kompleks oblikuje ionski kanal v celični membrani epitelnih celic in s tem povzroča membransko destabilizacijo. V planarnih lipidnih dvoslojih, sestavljenih iz fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina in Hol, pri pH 5.5 oblikuje aktiven ionski

kanal, ki je enkrat odprt 12.4 ms ter dvakrat zaprt s časom trajanja 1.3 ms in 3.3 ms. Ionski kanali toksina imajo prevodnost zelo podobno prevodnosti ionskega kanala, ki nastane samo iz komponente Cry34Ab1 (Masson in sod., 2004). Optimalen pH za delovanje dvokomponentnega toksina je pH 5.5, kar je v skladu s pH-vrednostjo srednjega črevesa ličinke koruznega hrošča. Kislo okolje je tudi ena od razlag za specifičnost delovanja dvokomponentnega toksina na hrošče. Bazično okolje je značilno za srednje črevo ličink metuljev, na katerega Cry34Ab1 skupaj s Cry35Ab1 nima toksičnega učinka. Pore v membrani epitelnih celic oblikuje protein Cry34Ab1 sam ali skupaj s Cry35Ab1. V prisotnosti druge proteinske komponente Cry35Ab1, so pore odprte dalj časa.

Struktura proteina Cry34Ab1 je sestavljena iz dveh antiparalelnih β -ploskev (slika 3). Podobna je strukturi nekaterih aktinoporinov, kot so ekvinatoksin, stiholizin II, fragecetatoksin C kot tudi hemolizin iz *Vibrio parahaemolyticus*. Za vezavo na membrano je ključen N-terminalni fragment proteina Cry34Ab1, ki se razlikuje od N-terminalnega fragmenta s helikalno strukturo pri aktinoporinu, kar kaže različno interakcijo z membrano (Kelker in sod., 2014).



Slika 3. Kristalna struktura Cry34Ab1 in Cry35Ab1(A) ter primerjava med Cry34Ab1 in strukturno podobnimi proteini (B). (Kelker in sod., 2014) A. Cry34Ab1 (4JOX) je β -strukturiran protein, Cry35A1(4JP0) je sestavljen iz dveh domen. V N-terminalni regiji je prisotna α -vijačnica in tri β -ploskve. V C-terminalni regiji so prisotne 3 α -vijačnice, ki niso potrebne za aktivnost proteina. B. Cry34Ab1, 4JOX (1) je strukturno podoben stiholizinu 1O72 (2), fragecetoksinu 3LIM (3), ekvinatoksinu 1IAZ (4), hemolizinu 3A57(5). Vsi proteini interagirajo z membrano.

2.3 RASTLINSKI ŠKODLJIVCI IN NJIHOV NADZOR Z UPORABO INSEKTICIDNIH PROTEINOV

V kmetijstvu so čedalje večje potrebe za uspešno zaščito rastlin pred rastlinskimi škodljivci in čim večjo proizvodnjo hrane. Za zatiranje rastlinskih škodljivcev se najpogosteje uporabljajo sintetični insekticidi. Glavni težavi zaradi pri uporabi kemičnih insekticidov sta pojav odpornosti ter negativen vpliv na človeško zdravje in okolico. Škodljivci, ki trenutno povzročajo največjo ekonomsko škodo na kulturnih rastlinah, so plodova vinska mušica (*Drosophila suzukii*), koruzni hrošč (*Diabrotica virgifera virgifera*), velika žitna uš (*Sitobion avenae*) ter parazitske ogorčice (*Meloidogyne* spp.). Potreba po novih alternativnih načinih za zatiranje škodljivcev je čedalje večja. Predstavniki egerolizinske družine proteinov bi lahko bili novi potencialni bioinsekticidi. Dva predstavnika egerolizinov z njihovimi proteinskimi partnerji iz bakterije *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* ter *Bacillus thuringiensis* se že uporabljata kot učinkovita insekticida (Quareshi in sod., 2014; Bravo in sod., 2011).

Bioinsekticidni potencial egerolizinov temelji na njihovi lastnosti, da se vežejo specifično na membranske lipide, ki so značilni za insekte. Do zdaj raziskani bakterijski in glivni egerolizini se namreč specifično vežejo na sfingolipid CPE.

CPE je membranski lipid, specifičen za celično membrano nevretenčarjev. Kot analog SM v membranah nevretenčarjev je prisoten v velikih količinah za razliko od celic vretenčarjev, kjer ga lahko najdemo samo v sledovih. Pri vretenčarjih je najpogostejši sfingolipid SM. Za razliko od vretenčarske celice imajo nekateri nevretenčarji, kot npr. prave muhe kratkorožke (*Brachycera*) v svojih celičnih membranah CPE namesto SM (Kraut in sod., 2011). Drugi nevretenčarji imajo v celičnih membranah tako CPE, kot tudi SM. CPE je prisoten tudi v celičnih membranah parazitov, kot na primer pri *Trypanosoma brucei*, ki povzroča afriško spalno bolezen (trypanosomioza) pri človeku ter živalsko tripanosomiozo (Bhat in sod., 2015). Za razliko od SM, CPE ne oblikuje lipidnih domen skupaj s holesterolom v modelnih membranah (Terova in sod., 2005). Znano je, da se egerolizini iz bukovega ostrigarja (OlyA, PlyA in EryA) specifično vežejo na CPE v lipidnih veziklih zmesi Hol in CPE v razmerju

1:1. PlyA se lahko veže tudi sam na CPE neodvisno od prisotnosti Hol (Bhat in sod., 2015). Zaradi toksičnega učinka bi lahko opisani egerolizini skupaj z drugo proteinsko komponento oblikovali transmembranske pore ter povzročili lizo celice in smrt organizma, ki v svojih membranah vsebuje CPE.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1. Kemikalije

Kemikalije	Proizvajalec
Holesterol, palmitoiloleoilfosfatidilholin, sfingomielin	Avanti Polar Lipids, ZDA
Metanol	Avantor performance materials, ZDA
Kvasni ekstrakt (Bacto™ Yeast Extract), tripton (Bacto™ Tryptone)	BD, ZDA
Standardi molekulskih mas Precision Plus Protein™ Unstained Standards, akrilamid	Bio-Rad, ZDA
Glicerol, kloroform	Carlo Erba Reagenti, Italija
Barvilo SimplyBlue™ SafeStain, Barvilo Sypro® Orange, Elektroforezni pufer NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Pufer pri NaDS-PAGE NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x), MagicMark™ XP Western ProteinnStandard, Amonium persulfat (APS), Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Life technologies, ZDA
Dikalijev hidrogen fosfat, natrijev klorid (NaCl), natrijev fosfat (NaH ₂ PO ₄), kalijev klorid (KCl), etanol, natrijev dodecilsulfat (NaDS), klorovodikova kislina (HCl), natrijev hidroksid (NaOH), vodikov peroksid (H ₂ O ₂), Tris-HCl, Tris, 2-propanol, aceton, dinatrijev hidrogen fosfat (NaH ₂ PO ₄), glicin	Merck, Nemčija
Imidazol, MES, Natrijev citrat, Kalcijski klorid (CaCl ₂), 4-kloro-1-naftol, Immobilion-P PVDF membrane, goveji serumski albumin (BSA), Tween-20	Sigma, ZDA
Actara®, Force®	Syngenta, ZDA

3.1.2 Raztopine in pufri

Preglednica 2. Raztopine in pufri

Pufer/raztopina	Sestavine
Ni-NTA pufer za nanos proteina in spiranje kolone	1.8 mM KH_2PO_4 , 10.1 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl in 10 % glicerol (V/V), pH 7.4
Ni-NTA pufer za elucijo proteina	1.8 mM KH_2PO_4 , 10.1 mM Na_2HPO_4 , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.5 M imidazol in 10 % glicerol (V/V) pH 7.4
Fosfatni pufer (PBS)	1.8 mM KH_2PO_4 , 10.1 mM Na_2HPO_4 , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4
Na-citrat	0.2 M Na-citrat, pH 3.5
TBS-T	199 mM Tris, 3M NaCl, 0.1 % (V/V) Tween-20 pH 7.4
Pufer za merjenje CD spektra	10 mM Na-citrat, pH 7
Pufri za merjenje triptofanskega spektra	0.2 M Na-citrat s pH 3.5, 3.75, 4.0, 4.25, 4.5, 4.75, 5.0, 5.25, 5.5
Pufri za merjenje DSF	-0.2 Na-citrat pH 3.5 -PBS -1.6 mM CaCl_2 , pH 6.5 -0.8 mM CaCl_2 pH 6.5 -0.16 mM CaCl_2 pH 6.5 -16.6 mM Tris pH 7.0, 3.32% glicerol, 1.66 mM EGTA, 8.3 mM ZnCl_2 -16.6 mM Tris pH 7.0, 3.32% glicerol, 1.66 mM EGTA, 8.3 mM Sr^{2+} -16.6 mM Tris pH 7.0, 3.32% glicerol, 1.66 mM EGTA, 8.3 mM MgCl_2 -320 mM KCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl_2 -240 mM KCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl_2 -160 mM KCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl_2 -80 mM KCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl_2 -320 mM Gly pH 6.5, 1.6 mM CaCl_2 -160 mM Gly pH 6.5, 1.6 mM CaCl_2 -16.6 mM Tris pH 7, 1.6 mM CaCl_2

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednica 2. Raztopine in pufri

	-16.6 mM Tris pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -16.6 mM Tris pH 6, 1.6 mM CaCl ₂ -16.6 mM Tris pH 5, 1.6 mM CaCl ₂ -16.6 mM Tris pH 7.0 , 3.32 mM CaCl ₂ , 3.32% glicerol, 830 mM imidazol -16.6 mM Tris pH 7.0 , 3.32 mM CaCl ₂ , 3.32% glicerol, 498 mM imidazol -16.6 mM Tris pH 7.0 , 3.32 mM CaCl ₂ , 3.32% glicerol, 166 mM imidazol -16.6 mM Tris pH 7.0 , 3.32 mM CaCl ₂ , 3.32% glicerol, 83 mM imidazol -16 % glicerol pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -8 % glicerol pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -3.1 % glicerol pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -1.67 % glicerol pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -320mM NaCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -240 mM NaCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -160 mM NaCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂ -80 mM NaCl pH 6.5, 1.6 mM CaCl ₂
Aktivacijska raztopina	7.9 % (m/V) CaCl ₂ x 2H ₂ O, 10. 4 % (V/V) metanol, 59.7% (V/V) 2-propanol
Pufer za razvijanje PVDF membrano	137 mM NaCl, 0,72 mM NaH ₂ PO ₄ , 25 mM Tris
Raztopina za razvijanje PVDF membrano	81.9 % (V/V) pufer za razvijanje, 0.49% (m/V) 4-kloro-1 naftol, 16% (V/V) ml metanol, 0.98%(V/V) H ₂ O ₂
NaDS elektroforezni pufer	3.03% (m/V) Tris, 14.4 % (m/V) glicin, 1 % (m/V) NaDS,
NaDS ločevalni gel, 7.5% (1mm)	0.562 ml akrilamid, 1.889 ml dH ₂ O, 0.375 ml 3 M Tris, 20 µL 10% NaDS, 150 µL 1.5% APS, 3 µL TEMED
NaDS nanašalni gel (1 mm)	0.25 ml akrilamid, 1.889 ml dH ₂ O, 0.375 ml 3 M Tris, 20 µL 10% NaDS, 150 µL 1.5% APS, 3 µL TEMED

3.1.3 Gojišča

Preglednica 3. Gojišča

Gojišče	Sestavine
Luria Bertanijevo gojišče (LB)	1 % (m/V) tripton 0.5 % (m/V) kvasni ekstrakt 1 % (m/V) NaCl 15 mg/ml agar
Bogato gojišče (TB)	1.2 % (m/V) tripton 2.4 % (m/V) kvasni ekstrakt 0.4 % (V/V) glicerol

3.1.4 Bakterijski sevi

Preglednica 4. Bakterijski sevi *E. coli*

Bakterijski sev	Genotip
BL21(DE3)	<i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i>⁺]_{K-12}(λ^S)</i>
BL21(DE3) pLysS	<i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i>⁺]_{K-12}(λ^S) pLysS[<i>T7p20 ori_{p15A}</i>](Cm^R)</i>
DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻</i>

3.1.5 Plazmid

Preglednica 5. Plazmid

Plazmid
pET-21b(+)

3.1.6 Rastlinski škodljivci

Preglednica 6. Rastlinski škodljivci

Rastlinski škodljivci	Vir
Mokar (<i>Tenebrio molitor</i>)	Kmetijski inštitut, Ljubljana
Ličinke koloradskega hrošča (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	Nabrane v vasi Šmartno pri Cerkljah

3.1.7 Laboratorijska oprema

Preglednica 7. Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Avtoklav	Kambič, Slovenija
aparatura za prenos Western iBLOT Gel Transfer Device	Life technologies, ZDA
centrifuga Avanti J-E Centrifuge	Beckman Coulter, ZDA,
centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Nemčija
centrifuga Rotina 35 R	Hettich, Nemčija
centrifuga Centric 322A	Tehtnica, Slovenija
centrifuga, 3K-30	Sigma, Nemčija
elektroforezni gel NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gel	Life technologies, ZDA
elektroforezna aparatura XCell SureLock™ Mini-Cell electrophoresis System	Life technologies, ZDA
elektroforezna aparatura Mini-Protean II	Bio-Rad, ZDA
Hladilnik	Gorenje, Slovenija
Inkubator	Kambič, Slovenija
kiveta za snemanje CD-spektra UV 110 QS	Hellma Analytics, Nemčija
komplett Qiaprep spin Miniprep	Qiagen, Nemčija
kolona NiNTA Superflow	Qiagen, Nemčija
kolona za gelsko kromatografijo Superdex 76 16/60 GL	GE Healthcare, Velika Britanija
koncentrator AmiconUltra MWCO 10.000	Millipore, ZDA
kromatografski sistem Äkta FPLC	GE Healthcare, Velika Britanija
magnetno mešalo	IKA, Nemčija
membrana za prenos Western iBlot® Transfer Stack	Life technologies, ZDA
pH-meter	Mettler Toledo, Nemčija

Se nadaljuje

Preglednica 7. Laboratorijska oprema	Nadaljevanje preglednice 7
plošče za merjenje fluorescence MicroAmp®	Life technologies, ZDA
rastna komora	Kambič, Slovenija
rotavapor R-134	Büchi, Švica
RT-PCR naprava StepOne™	Life technologies, ZDA
sonikator Ultrasonic Processor	Cole-Parmer, ZDA
spektrofotometer 8453 UV-Vis	Agilent Technologies, ZDA
spektrofluorometer FP-750	Jasco, ZDA
spektrofotometer Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Thermo Scientific, ZDA
Stresalnik	Kambič, Slovenija
Tehtnica	Sartorius, Švedske Se nadaljuje
toplotni stresalnik	Biosan Ltd., Latvija
vibracijski stresalnik Vibromix 10,	Tehtnica, Slovenija
vibracijski stresalnik Vibromix 301 EVT	Tehtnica, Slovenija
Zamrzovalnik	Liebherr, Nemčija

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1

3.2.1.1 Plazmid *pET-21b(+)*_Cry34Ab1

Vstavljanje genskega zapisa za Cry34Ab1 v plazmid pET-21c(+) med restrikcijska mesta *NdeI* in *XhoI* je izvedlo podjetje GenScript (ZDA). Plazmid pET-21c(+) smo izbrali zato, ker vsebuje T7 promotor, ki omogoča izražanje gena ob prisotnosti IPTG, ter heksahistidinski rep, s katerim bomo lahko izolirali protein z nikelj-afinitetno kromatografijo.

3.2.1.2 Transformacija plazmida *pET-21b(+)*_Cry34Ab1 v kompetentne celice *E. coli* s BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS in DH5 α

Genski zapis za rekombinantni protein Cry34Ab1 je bil predhodno vstavljen v plazmid *pET-21b(+)*. Uporabljali smo bakterijo *E. coli* kot ekspresijski sistem za izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1. Kompetentne celice sevov BL21(DE3), BL21(DE2)pLysS in DH5 α so bile že predhodno pripravljene na Odseku za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu. Transformacijo plazmidne DNA v celice seva DH5 α smo izvedli z namenom izolacije plazmida v večji količini.

Kompetentnim bakterijskim celicam smo dodali 1 μ l plazmidne DNA in inkubirali 15 minut na ledu. Mikrocentrifugirko s celicami in plazmidno DNA smo inkubirali 90 sekund pri 42 °C, da bi izvedli toplotni šok. Po eno- do dveminutnem hlajenju na ledu smo transformiranim celicam dodali 600 μ l gojišča LB ter inkubirali 60 minut s stresanjem pri 37 °C ter 180 obr./min. Po inkubaciji smo transformirane celice BL21(DE3) oziroma DH5 α v LB-gojišču razmazali na ploščo s selekcijskim gojiščem TB Ap (50 mg/ml založna koncentracija) ter

transformirane celice BL21(DE3)pLysS na ploščo s selekcijskim gojiščem TB Ap/Cm (34 mg/ml založna koncentracija Cm). Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.1.3 Izolacija plazmida *pET-21b(+)*_Cry34Ab1 iz celice seva *E. coli* DH5α

Kolonije *E. coli* DH5α smo prenesli v tekoče gojišče LB Ap in inkubirali s stresanjem preko noči pri 37 °C. Izolacijo plazmida smo izvedli s kompletom Qiaprep spin Miniprep po navodilih proizvajalca (Qiagen, Nemčija).

3.2.1.4 Izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v celice *E. coli* sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS

Bakterijske kolonije iz plošče s selekcijskim gojiščem smo prenesli v 20 ml tekočega selekcijskega gojišča LB Ap za kolonije iz seva BL21(DE3) ter LB Ap/Cm za kolonije iz seva BL21(DE3)pLysS. Bakterijsko predkulturo smo inkubirali 1 uro s stresanjem pri 37 °C ter 180 obr./min. Nato smo 20 ml ustrezne bakterijske predkulture prenesli v 4 l tekočega TB-gojišča s fosfati ter ustreznimi antibiotiki, v katerem smo inducirali izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1. Inkubirali smo pri 37 °C s stresanjem, dokler optična gostota (OD), merjena pri valovni dolžini 600 nm, ni dosegla vrednosti 0.6. Za indukcijo izražanja rekombinantnega proteina smo dodali 4 ml induktorja 0.5 mM IPTG v 4 l bakterijske kulture. Izražanje rekombinantnega proteina v celicah sevov BL21(DE3) ter BL21(DE3)pLysS je potekalo 6 ur pri 37 °C ter 24 ur pri 20 °C. Bakterijsko kulturo smo po 6-urni in 24-urni inkubaciji centrifugirali 5 minut pri 4000 *g* ter 4 °C. Odstranili smo supernatant in sediment s celicami shranili pri –20 °C. Pred indukcijo izražanja rekombinantnega proteina in na koncu gojenja bakterijskih kultur smo odpipetirali po 1 ml celične kulture, centrifugirali 5 minut pri 4 000 *g* in 4 °C, odstranili supernatant ter celice shranili pri –20 °C, da bi potrdili izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1. Izražanje proteina smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo.

3.2.1.5 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz celic *E. coli* sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS

Celice shranjene pri -20°C smo odtalili ter jih suspendirali v slanem fosfatnem (PBS) pufru. Bakterijske celice smo razbili z dvakratnim zaporednim soniciranjem 7 minut, z 1-sekundnim pulzom, 2-sekundnim premorom ter pri 38-odstotni amplitudi. Med soniciranjem smo bakterijske celice hranili na ledu, da bi obdržali stabilnost rekombinantnega proteina. Bakterijski lizat smo centrifugirali 40 minut pri 30 000 *g* in 4°C , da bi ločili topno frakcijo od netopne frakcije, v kateri so inkluzijska telesca. Netopno frakcijo smo suspendirali v PBS ter oba vzorca shranili pri -80°C . Prisotnost proteina v topni obliki ter v inkluzijskih telescih smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo.

Protein smo izolirali z nikelj-afinitetno kromatografijo in z metodo po Huangu (Huang in sod., 2007).

3.2.1.5.1 Izolacija topnega rekombinantnega proteina Cry34Ab1 z nikelj-afinitetno kromatografijo

Rekombinantni protein Cry34Ab1 smo izolirali z nikelj-afinitetno kromatografijo iz topne frakcije bakterijskih lizatov sevov BL21(DE3) ter BL21(DE3)pLySs. C-terminalni fragment proteina je vseboval His-repek iz šestih histidinov, ki se vežejo na imobilizirane nikljeve kelirane katione, vezane na nitrilotriocetno kislino (NTA). Kolona Ni-NTA in 50 ml-zanka, v katero smo nanесли prefiltriran vzorec, sta bili priključeni na kromatografski sistem ÄKTA FPLC. Vzorec smo nanесли na kolono iz zanke s pretokom 1 ml/min. Po vezavi proteina na kolono in po padcu absorbance smo pustili pufer za spiranje kolone z ohranjenim pretokom 1 ml/min. Nato smo zamenjali pufer za spiranje s pufrom za elucijo proteina, ki je vseboval 0.5 M imidazol, ki tekmuje s histidinskim repkom rekombinantnega proteina Cry34Ab1.

3.2.1.5.2 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz inkluzijskih telesc

Metoda izolacije proteina Cry34Ab1, privzeta po Huangu (Huang in sod., 2007), temelji na topnosti proteina pri pH 3.5 in obarjanju pri pH 7.5. Glede na to smo lahko protein izolirali direktno iz inkluzijskih telesc.

Inkluzijskim telescem z maso 15.76 g smo dodali 0.2 M Na-citrat pH 3.5, mešali na vibracijskem stresalniku in centrifugirali 10 minut pri 20 000 *g* ter 4 °C. Supernatant smo obdržali in zvišali pH do 7.5 z 1 M NaOH. Po 15-minutni inkubaciji s stresanjem pri 4 °C smo centrifugirali 20 minut pri 20 000 *g* ter 4 °C, da bi se netopen protein oboril. Supernatant smo odstranili, usedlino smo dvakrat sprali z PBS ter raztopili v 0.2 M Na-citratu pH 3.5. Netopne komponente smo odstranili s centrifugiranjem 10 minut pri 10 000 *g* in 4 °C. Supernatant, v katerem je rekombinantni protein, smo shranili pri –80 °C.

Po izolaciji smo protein koncentrirali v AmiconUltra koncentradorju z velikostjo pore 10 kDa, pri 4 000 *g* ter 4 °C.

3.2.1.6 Gelska kromatografija

Gelsko kromatografijo smo uporabili za dodatno čiščenje izoliranega rekombinantnega proteina Cry34Ab1 in zamenjavo pufra. Uporabili smo kolono Superdex 75 16/60, ki vsebuje kroglice s prečno povezanimi agarozno-dekstranskimi polimeri. Ta nosilec je optimalen za ločevanje molekul z 8 000 do 50 000 kDa. Zanko s 4 ml-vzorcem in kolono smo priključili na kromatografski sistem ÄKTA FPLC. Ločevanje molekul je potekalo v 0.2 M Na-citratu, pH 7.5, in s pretokom 0.5 ml/min.

3.2.1.7 Določanje koncentracije proteina Cry34Ab1 po izolaciji

Koncentracijo rekombinantnega proteina Cry34Ab1 smo določili na aparaturi NanoDrop z merjenjem absorpcije UV-svetlobe pri 280 nm. Teoretični ekstinkcijski koeficient smo določili z bioinformacijskim orodjem ProtParam na portalu ExPASy, ki je za rekombinantni protein Cry34Ab1 $\epsilon = 15930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

3.2.2 Fizikalno-kemijska karakterizacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1

3.2.2.1 NaDS-PAGE elektroforeza

Poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) je metoda, ki ločuje proteine na osnovi njihovih molekulskih mas in je zelo primerna pri sledenju izolacije in čiščenja proteinov. Anionski detergent natrijev dodecilsulfat (NaDS) se veže na hidrofobne dele denaturiranih proteinov in celotnim kompleksom daje negativni naboj, kar omogoča, da vsi proteini v električnem polju potujejo proti anodi sorazmerno z njihovo velikostjo.

Pri različnih stopnjah izolacije rekombinantnega proteina smo uporabljali NaDS-PAGE elektroforezo, da bi preverili prisotnosti in čistosti proteina v različnih frakcijah. Ustrezno redčene vzorce smo obdelali tako, da smo jim dodali NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) nanašalni pufer, protein smo denaturirali s segrevanjem 5 minut pri 95 °C. Kot standard iz znanih molekulskih mas smo uporabljali Precision Plus Protein™ Unstained Standards. Pripravljene vzorce in standard smo nanесли na 4–12-odstotni gradientni gel NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gel, vpet v XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System. Elektroforezo smo izvajali 40 minut pri konstantni napetosti 200 V in z začetnim tokom 125 mA v 5-odstotni raztopini elektroforeznega pufra NuPAGE® MES SDS Running Buffer.

Za preverjanje vezave rekombinantnega proteina Cry34Ab1 na lipidne vezikle s sedimentacijskim testom smo prav tako uporabili NaDS-PAGE elektroforezo. V ta namen smo pripravili sistem za ločevanje proteinov z 12-odstotnim NaDS ločevalnim gelom ter NaDS nanašalnim gelom. Pripravljene gele smo vstavili v elektroforezno aparaturo Mini-Protean II. Elektroforeza je potekala 60 minut pri konstantni napetosti 200 V in z začetnim tokom 0.03 A v 1x NaDS elektroforeznega pufra.

Po končani elektroforezi smo gele trikrat sprali z MQ in nato 60 minut inkubirali s stresanjem v barvilu SimplyBlueTMSafeStain. Gele smo razbarvali v MQ.

3.2.2.2 Prenos Western

Za specifično določevanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v vzorcu smo uporabili prenos Western. Suhi prenos proteinov z gela na PVDF-membrano smo naredili z napravo iBlotTM po navodilih proizvajalca (Thermo Scientific, ZDA) in programu P3 s časom trajanja 6 minut.

Po prenosu smo prosta vezavna mesta na membrani blokirali s 60-minutno inkubacijo s stresanjem v 5 % BSA v pufru TBS-T. Po dvakratnem spiranju s TBS-T smo membrano prelili s 7 µl mišjih primarnih protiteles redčene v 35 µl 5 % BSA v TBS-T, specifičnih za rekombinantne proteine s His-repkom (Qiagen, Nemčija). Nato je sledila prekonočna inkubacija s stresanjem pri 4 °C. Membrano smo prelili s 7 µl kozjih-protimišjih sekundarnih protiteles, označenih s hrenovo peroksidazo (IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology ZDA) in redčenih v 7 ml 5 % BSA v TBS-T. Inkubirali smo s stresanjem 2 uri pri sobni temperaturi. Nevezana primarna in sekundarna protitelesa smo sprali s pufrom TBS-T po vsaki inkubaciji.

Za detekcijo specifične lise za rekombinantni protein Cry34Ab1 smo uporabili metodo s kemiluminiscenco s PierceTMECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, ZDA) po

navodilih proizvajalca. Membrano smo slikali z G:box aparaturo (Syngene) za slikanje kemiluminiscence.

3.2.2.3 Cirkularni dikroizem

Cirkularni dikroizem (CD) je tehnika, ki meri različno absorbcijo dveh cirkularnih polariziranih komponent svetlobe z enako jakostjo (levosučna in desnosučna) optično aktivnih molekul. Razliko v absorbciji merimo s spektropolarimetri, ki podajajo rezultate kot eliptičnost (θ) v kotnih stopinjah. Glede na CD-spekter, merjen kot funkcija valovne dolžine, lahko pridobimo informacije o strukturi proteinov. Merjenje cirkularnega dikroizma smo izvedli z namenom preverjanja sestave sekundarnih struktur rekombinantnega proteina Cry34Ab1. Posamezna sekundarna struktura ima karakterističen CD-spekter v daljnem UV-območju (178 do 250 nm), končni rezultat je seštevek spektrov posameznih strukturnih elementov proteina. Meritev CD-ja smo opravili s CD-spektrofotometrom Chirascan (Applied Photophysics) v daljnem UV-območju pri 20 °C in konstantnem toku dušika. Za meritev smo uporabili kivete z dolžino optične poti 1 mm s 400 μ l proteinskim vzorcem s koncentracijo 0,08 mg/ml. Od vsakega spektra smo odšteli slepi poskus (13 mM Na-citrat). Program K2D3 (Louis-Jeune in sod., 2011) primerja pridobljen CD-spekter s teoretičnim CD-spektrom ter poda delež α - in β -struktur v proteinu.

3.2.2.4 Merjenje triptofanskega spektra

Aromatične aminokisline so odgovorne za lastno fluorescenco proteinov. Fluorescenca triptofana je zelo občutljiva na okolico proteina. Spremembe v emisijskem spektru triptofana kažejo na spremembe v konformaciji proteinov v interakciji z drugimi molekulami. Merjenje triptofanskega spektra smo opravili z namenom določevanja spremembe v konformaciji

rekombinantnega proteina in vpliva na agregacijo v območju pH od 3.5 do 5.5. Tryptofansko fluorescenco smo izmerili na spektrofleurimetru (Jasco, ZDA) pri 25 °C v kvarčni kivetu z magnetnim mešalom, širine 1 cm s hitrostjo skeniranja 250 nm/min. Širini rež za ekscitacijo in emisijo sta bili 5 nm. Od vsakega spektra smo odšteli slepi poskus (pufer). Tryptofanske spektre smo merili z vzbujanjem pri 280 nm ter emisijo med 300 in 600 nm v 1 ml-vzorcu s koncentracijo rekombinantnega proteina 0.01 mg/ml.

3.2.2.5 Diferenčna dinamična fluorimetrija

Diferenčna dinamična fluorimetrija (DSF) je metoda za iskanje vpliva različnih pogojev proteinske okolice na njegovo strukturno stabilnost. Fluorescenca barvila SYPRO Orange se poveča pri interakciji z hidrofobnimi deli proteina, ki postanejo bolj izpostavljeni pri razvitju proteina zaradi dviga temperature. Prosta entalpija razvitja ΔG_u se zmanjšuje z dvigom temperature in s tem tudi spreminja stabilnost proteina. Z višanjem temperature pride do razvitja proteina. Temperatura, pri kateri je prosta entalpija razvitja ΔG_u enaka nič, je definirana kot temperatura tališča (T_m) proteina. Z napravo PCR v realnem času lahko analiziramo denaturacijo proteinov pri več kot 90 različnih pogojih. Pufri z različno vrednostjo pH, ionsko jakostjo in z različno vsebino snovi, ki lahko vplivajo na stabilnost proteinov, so že bili pripravljeni na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti na Institutu Jožef Stefan.

Vsak pogoj smo testirali v treh paralelkah z barvilom SYPRO Orange, redčenim v razmerju 2:5000. Končni volumen v jamici mikrotitrne plošče je znašal 50 μ l s koncentracijo proteina 0.1 mg/ml. Kot negativno kontrolo smo uporabili Na-citraten pufer 7.5, v katerem sta bila protein in barvilo, redčena v MQ. Vsako meritev smo izvedli v temperaturnem območju od 20 °C do 85 °C. Rezultate, podane kot sigmoidne krivulje v programu StepOne™, smo obdelali v programu Microsoft Excel 2013.

3.2.3 Strukturne analize Cry34Ab1 v primerjavi z znanimi kristalnimi strukturami egerolizinov

Do zdaj sta bili odkriti dve strukturi pripadnikov egerolizinov, in sicer PlyA ter proteina Cry34Ab1. Z namenom pridobivanja dodatnih informacij o interakciji rekombinantnega proteina Cry34Ab1 z lipidnimi membranami smo naredili primerjavo struktur v programu PyMOL v1.8.

3.2.4 Priprava lipidnih veziklov

Za preučevanje interakcij rekombinantnega proteina Cry34Ab1 z lipidi smo pripravili multilamelarne lipidne vezikle (MLV) z različno sestavo lipidov. Lipidne vezikle smo pripravili iz CPE in Hol (1:1), SM in Hol (1:1), 100-odstotnega palmitoiloleoilfosfatidilholina (POPC) in Hol (1:1) ter CPE in POPC(1:1).

Ustrezne količine posameznih lipidov smo raztopili v mešanici kloroforma in metanola (V/V, 2:1). Topilo smo odpareli z rotavaporjem, da bi dobili lipidni film posušenih lipidov. Filmu smo dodali 0,2 M Na-citrat s pH 5 ter ¼ žličke steklenih kroglic. Z močnim stresanjem na vibracijskem stresalniku pri sobni temperaturi smo dobili suspenzijo MLV-jev s koncentracijo 5 mg/ml.

3.2.5 Sedimentacijski test za določanje vezave Cry34Ab1 na lipidne vezikle

Pripravljenim MLV-jem (20 µl) smo dodali raztopino Cry34Ab1 (20 µl s koncentracijo 0.5 mg/ml) in mešanico inkubirali s stresanjem 30 minut pri 37 °C. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 60 minut pri 60 000 *g* ter 37 °C. Nato smo supernatant iz vzorcev prenesli v nove mikrocentrifugirke, sediment smo shranili za preverjanje prisotnosti proteina z NaDS-PAGE elektroforezo. Protein v supernatantu smo oborili s 100-odstotno triklorocetno kislino (TCA).

Vzorci smo 10 minut inkubirali na ledu in nato centrifugirali 12 minut pri 14000 *g* ter 4 °C. Supernatant smo odstranili in vzorcem dodali 300 µl ledeno mrzlega acetona in centrifugirali 5 minut pri 14 000 *g* ter 4 °C. Po centrifugiranju smo še enkrat odstranili supernatant ter vzorcem dodali 200 µl ledeno mrzlega acetona in centrifugirali 5 minut pri 14 000 *g* ter 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant previdno odstranili ter posušili oborino. Prisotnost vezanega Cry34Ab1 v oborini smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo.

3.2.6 Izolacija totalnih membranskih lipidov iz insektnih celic Sf9

Iz ovarijskih celic *Spodoptera frugiperda* (Sf9) smo ekstrahirali totalne membranske lipide, da bi preučili vezavo rekombinantnega proteina Cry34Ab1 z njimi. Celicam Sf9 smo dodali mešanico organskih topil kloroform: metanol (V/V, 1:2) in mešali 15 minut. Nato smo dodali kloroform in spet mešali 1 minuto. Zmesi smo dodali destilirano vodo in mešali 1 minuto. Nato smo zmes centrifugirali 10 minut pri 2 500 *g* ter spodnjo fazo previdno prenesli v vakuumsko bučko, da bi odpareli topila z rotavaporjem. Osušene totalne membranske lipide smo končno raztopili v 1 ml kloroforma.

3.2.7 Ločitev membranskih lipidov s tankoplastno kromatografijo in prenos lipidov na PVDF-membrane

Tankoplastna kromatografija (TLC) je pogosta metoda za ločevanje lipidov in njihovo kvalitativno analizo. S premikom mobilne faze se tudi lipidne komponente premikajo po stacionarni fazi z različno hitrostjo. To različno premikanje je rezultat različne afinitete lipidov do stacionarne in mobilne faze. TLC-metodo smo izvedli z namenom prenosa lipidov na PVDF-membrano ter določevanja vezave rekombinantnega proteina Cry34Ab1 na različne membranske lipide in glikolipide iz celic Sf9. Glikolipidi iz celic Sf9 so bili že prej izolirani na Katedri za biokemijo na Oddelku za biologijo (Tomaž Remžgar, diplomsko delo v

izdelavi). Izolirane membranske totalne lipide, glikolipide in komercialno dostopne lipide (Hol, CPE, POPC in SM) smo nanесли na segreto aluminijasto ploščo, prekrito s silikagelom (Merck, ZDA). Po nanosu vzorcev smo ploščo razvili v kromatografski komori z mobilno fazo kloroform:metanol:amonijak (V/V, 20:20:1). Po končani ločitvi smo ploščo posušili, da bi odstranili ostanek topil. Za prenos lipidov na PVDF-membrano smo sestavili prenosni sistem tako, da smo na filter papir položili kromatografsko ploščo, čez njo PVDF-membrano, aktivirano v aktivacijski mešanici, in še en filter papir na vrhu. Prenos lipidov na PVDF-membrani je potekal 30 sekund pri 180 °C. Po prenosu smo membrano inkubirali čez noč v 5 % BSA v Na-citratu s pH 4.0 pri sobni temperaturi. Nato smo dodali protein Cry34Ab1 s koncentracijo 2 µg/ml v 5 % BSA v Na-citratu pH 4.0 ter inkubirali s stresanjem 2 uri pri sobni temperaturi. Po trikratnem spiranjem s Tris pufrom s pH 4.5 smo dodali ustrezno količino mišjih primarnih protiteles (1000-krat redčena), specifičnih za rekombinantne proteine s His-repkom (Qiagen, Nemčija) in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo nevezana primarna telesa trikrat sprali s TBS-pufrom ter dodali ustrezno količino kozjih-protimišjih sekundarnih protiteles (1000-krat redčena), označenih s hrenovo peroksidazo (IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology ZDA). Po enourni inkubaciji pri sobni temperaturi smo nevezana sekundarna protitelesa trikrat sprali s TBS-pufrom.

Za detekcijo lise rekombinantnega proteina Cry34Ab1 na specifične lipide smo PVDF-membrano razvili 10 minut v mešanici za razvijanje, sestavljeni iz pufra za razvijanje, vodikovega peroksida in 4-kloro-1-naftola, raztopljenega v metanolu. Membrano smo slikali z G:box aparaturo (Syngene).

3.2.8 Preliminarni testi toksičnosti na tarčnih rastlinskih škodljivcih

Preliminarne teste toksičnosti rekombinantnega proteina Cry34Ab1 smo izvedli na mokaarih (*Tenebrio molitor*) in ličinkah koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*) na Oddelku za varstvo rastlin na Kmetijskem inštitutu.

3.2.8.1 Mocar (*Tenebrio molitor*)

Protein Cry34Ab1 s koncentracijo 0.7 mg/ml v pufru PBS (pH 7.5) smo centrifugirali 5 minut pri 14 000 *g*. Supernatant smo odstranili in kristale v sedimentu sprali z destilirano vodo. Kristalom smo dodali destilirano vodo in mešali na vibracijskem stresalniku.

V petrijevke smo prenesli sterilen filter papir, na katerega smo postavili ovsene kosmiče. Ustrezno količino proteina Cry34Ab1 smo odpipetirali na ovsene kosmiče. Pripravili smo pozitivne kontrole, tako da smo na ovsene kosmiče odpipetirali insekticid Actara (Tiametoxam) s koncentracijo 10 mg a.u. /ml, insekticid Force (Tefluthrin) s koncentracijo 10 mg a.u. /ml. Negativna kontrola so bili netretirani ovseni kosmiči. Ovsene kosmiče smo posušili v laminariju in jih postavili v mikrotitrsko ploščo s šestimi vdolbinicami. V vsako vdolbinico z enim tretiranim ali netretiranim kosmičem smo prenesli po enega mokaarja. Mikrotitrsko plošče smo prenesli v rastno komoro z razmerami 20 °C , 77-odstotno relativno zračno vlago in dolžino osvetlitve 14 ur.

3.2.8.2 Koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*)

Pet listov krompirja smo prenesli v falkonko s proteinom Cry34Ab1 s koncentracijo 0.1 mg/ml v 5 ml 0.2 M Na-citratnem pufru s pH 7.5. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5-ml raztopino insekticida Actara (Tiametoxam) s koncentracijo 1 mg a.u. /ml ter 5 ml destilirane vode kot negativno kontrolo. Namočene liste krompirja smo postavili v petrijevke in jih posušili. Na posamezni list krompirja, namočen v ustrezno raztopino pozitivne ali negativne kontrole, smo prenesli 5 ličink koloradskega hrošča. Zaradi omejenega števila osebkov smo na liste krompirja, namočene v raztopini proteina Cry34Ab1, prenesli 3 ličinke koloradskega hrošča.

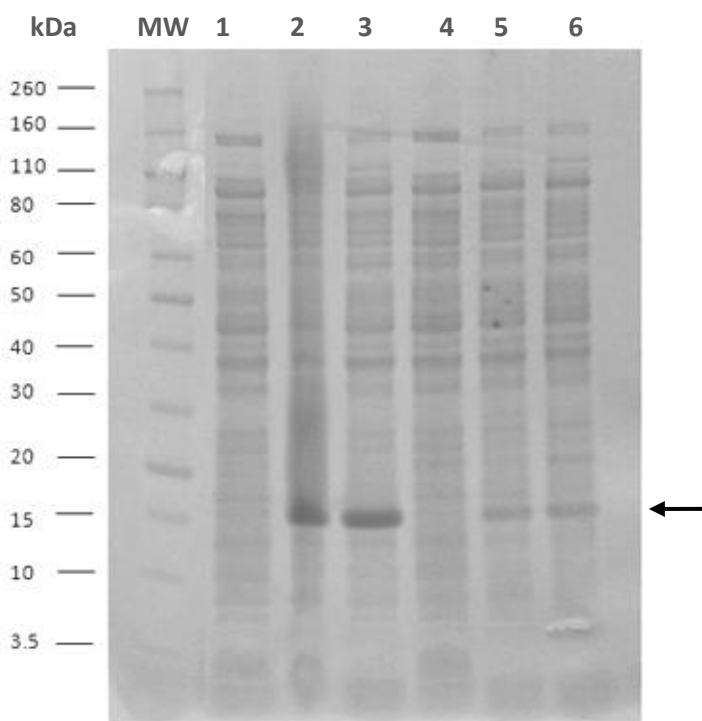
Petrijevke smo prenesli v rastno komoro z 20°C , 77-odstotno relativno zračno vlago in dolžino osvetlitve 14 ur.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA REKOMBINANTNEGA PROTEINA Cry34Ab1

4.1.1 Izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v celicah sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS

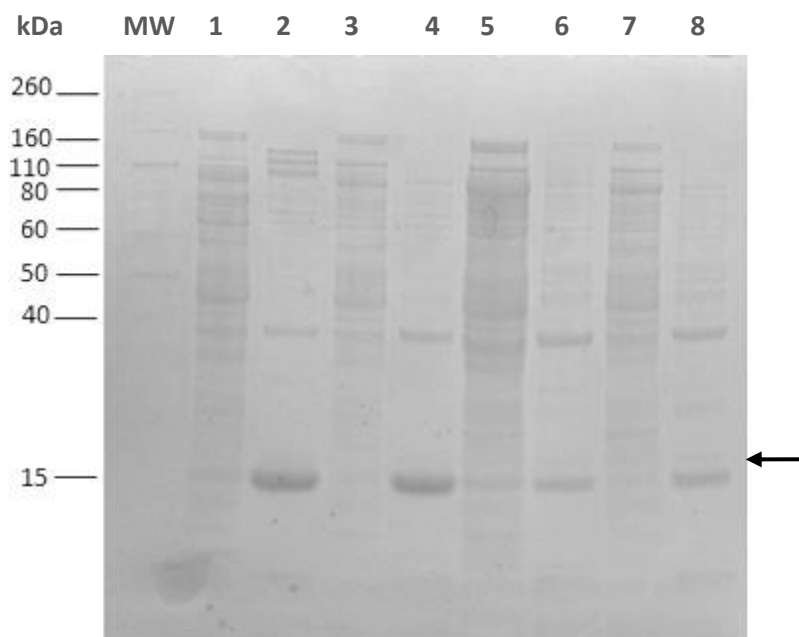
Inducirali smo izražanje proteina Cry34Ab1 v dveh sevih *E. coli*: seva BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS. Izražanje proteina je potekalo pri dveh temperaturah. Protein se je sintetiziral v obeh sevih *E. coli* pri 20 °C ter 37 °C (slika 4). Opazno je tudi, da se je rekombinantni protein Cry34Ab1 sintetiziral v večjih količinah v celicah BL21(DE3).



Slika 4. Izražanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v celicah sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS. NaDS PAGE elektroforeza vzorcev: MW – označevalec velikosti, 1 – celice BL21(DE3) pred indukcijo, 2 – celice BL21(DE3) po indukciji, izražanje proteina pri 20 °C, 3 – celice BL21(DE3) po indukciji, izražanje proteina pri 37 °C, 4 – celice BL21(DE3)pLysS pred indukcijo, 5 – celice BL21(DE3)pLysS po indukciji, izražanje proteina pri 20 °C, 6 – celice BL21(DE3)pLysS po indukciji, izražanje proteina pri 37°C, puščica- lisa rekombinantnega proteina Cry34Ab1

4.1.2 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz celic sevov BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS

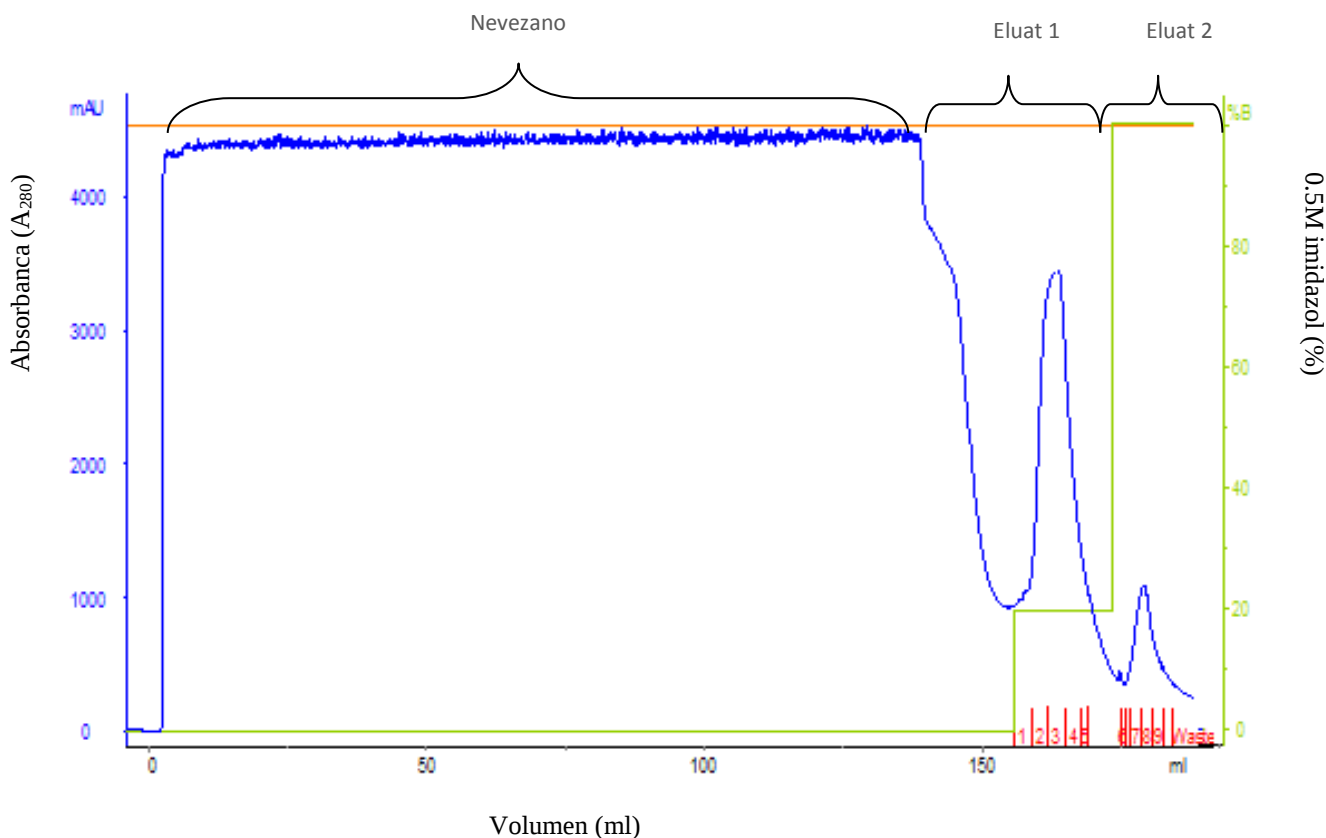
Po razbitju celic s soniciranjem, smo z NaDS-PAGE elektroforezo preverili prisotnost rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v supernatantu razbitih celic v topni obliki oziroma v sedimentu razbitih celic v netopni obliki. V celicah seva BL21(DE3) je bil rekombinantni protein prisoten v netopni obliki oziroma v inkluzijskih telescih. V celicah seva BL21(DE3)pLysS je bil Cry34Ab1 v večjih količinah prisoten v netopni obliki, vendar se je pri 20 °C sintetiziral tudi v topni obliki (slika 5). Topno obliko rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz celic seva BL21(DE3)pLysS, sintetiziranega pri 20 °C, smo izolirali z Ni-NTA afinitetno kromatografijo, protein iz inkluzijskih telesc iz celice seva BL21(DE3) pa z metodo po Huangu (2007).



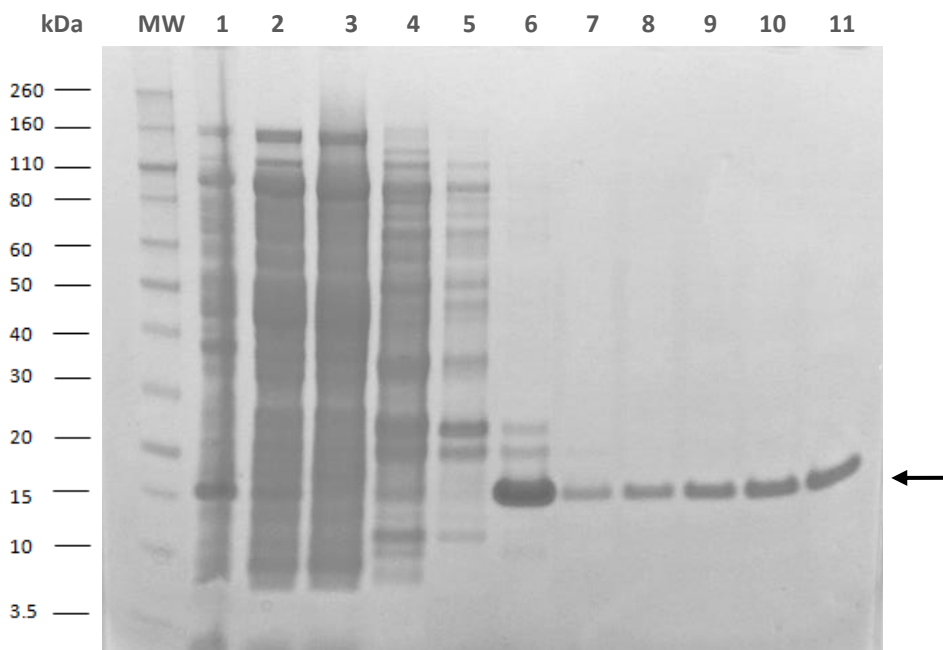
Slika 5. Prisotnost rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v supernatantu razbitih celic v topni obliki in v sedimentu razbitih celic v netopni obliki. NaDS PAGE vzorcev: MW – označevalec velikosti, 1 – supernatant razbitih celic seva BL21(DE3), pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 20 °C, 2 – sediment razbitih celic seva BL21(DE3), pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 20 °C, 3 – supernatant razbitih celic seva BL21(DE3), pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 37 °C, 4 – sediment razbitih celic seva BL21(DE3), pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 37 °C, 5 – supernatant razbitih celic seva BL21(DE3)pLysS, pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 20 °C, 6 – sediment razbitih celic seva BL21(DE3 pLysS), pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 20 °C, 7 – supernatant razbitih celic seva BL21(DE3) pLysS, pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 37 °C, 8 – sediment razbitih celic seva BL21(DE3) pLysS, pri katerem se je Cry34Ab1 sintetiziral pri 37 °C, puščica- lisa rekombinantnega proteina Cry34Ab1

4.1.2.1 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1, izraženega v topni obliki, z nikelj-afinitetno kromatografijo

S sledenjem absorbance preučevanega vzorca smo iz kolone z Ni-NTA pridobili 5 frakcij (7-11), v katerih je bil prisoten rekombinantni protein (slika 6). Prisotnosti rekombinantnega proteina smo preverili v frakcijah posameznih stopenj izolacije z NaDS-PAGE (slika 7).



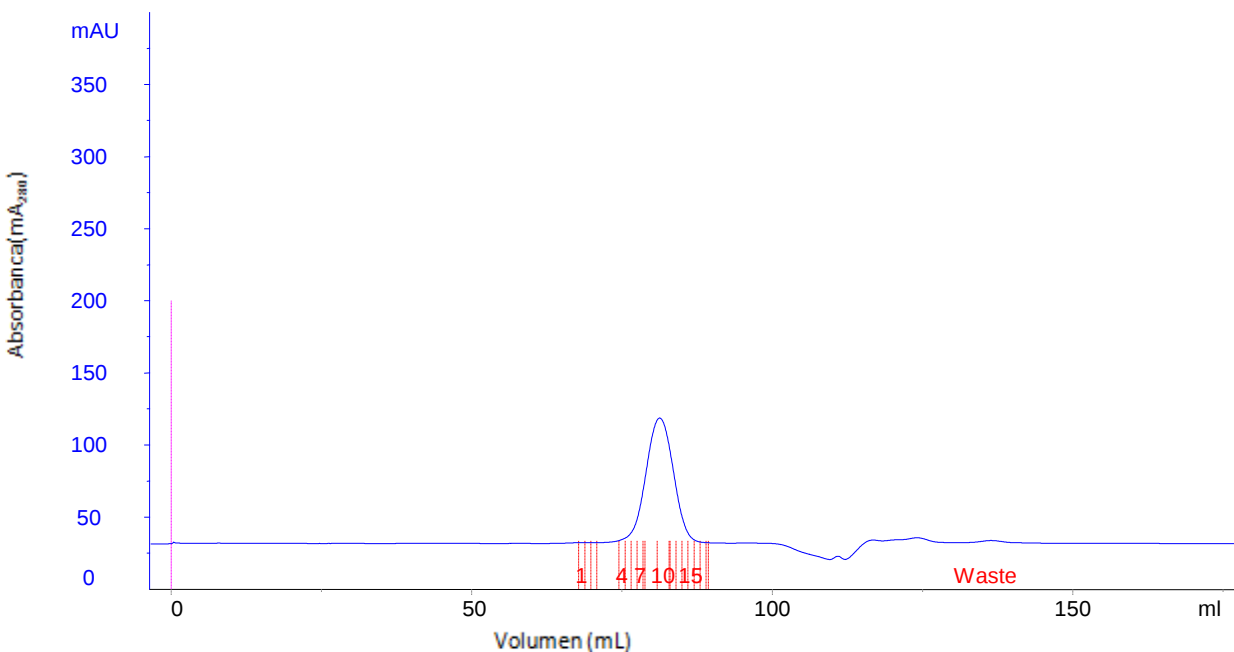
Slika 6. Kromatogram filtriranega supernatanta razbitih celic seva BL21(DE3)pLysS. Za izolacijo topnega proteina Cry34Ab1 iz 50 mL vzorca smo uporabili Ni-NTA kolono. Rdeče označene številke predstavljajo frakcije iz eluata 1 in 2. Frakcije (1-5) smo eluirali z 0.1 M imidazolom (eluat 1). Frakcije (7-11), v katerih se je nahajal topni rekombinantni protein Cry34Ab1, smo eluirali z 0.5M imidazolom (eluat 2).



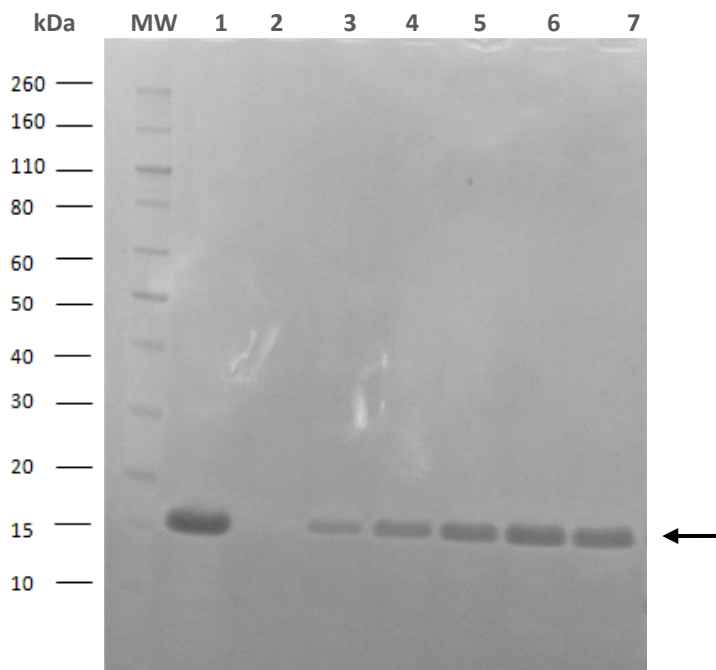
Slika 7. NaDS-PAGE frakcij pri izolaciji proteina z Ni-NTA afinitetno kromatografijo. MW – označevalec velikosti, 1 – sediment celic seva BL21(DE3 pLysS), 2 – sediment razbitih celic seva BL21(DE3 pLysS), 3 – nevezana frakcija od 10 do 150 ml, 4,5,6 – frakcije iz eluata 1 pri 0.1 M imidazolu, od 150 do 170 ml, 7,8,9,10,11 – frakcije iz eluata 2 pri 0.5 M imidazolu, od 170 do 180 ml, puščica- lisa rekombinantnega proteina Cry34Ab1

4.1.2.2 Gelska kromatografija

Združene frakcije (7-11) po Ni-NTA kromatografiji, v katerih smo preverili prisotnost proteina, smo dodatno očistili z gelsko kromatografijo. Hkrati smo zamenjali pufer z 0.2 M Na-citratom s pH 3.5. Iz slike 8 je razvidno, da je protein kromatografsko čist. Prisotnost in dejansko čistost proteina v frakcijah iz gelske kromatografije smo preverili z NaDS-PAGE (slika 9). Po gelski kromatografiji smo dobili približno 10 ml očiščenega rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v Na-citratu s pH 3.5, ki smo ga nato skoncentrirali do 2 ml in koncentracije 2.4 mg/ml.



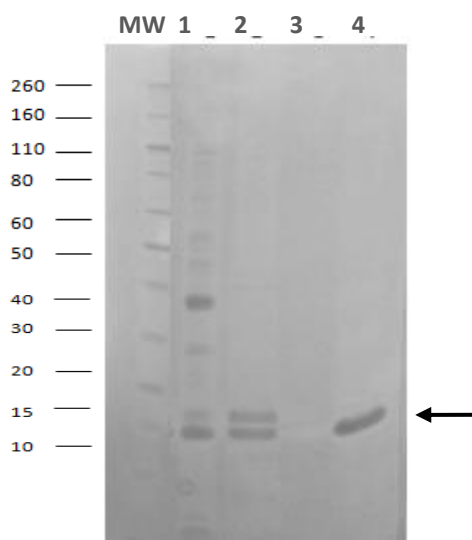
Slika 8. Gelska kromatografija Cry34Ab1 na koloni Superdex 75 16/60. Rdeče označene številke predstavljajo posamezne frakcije. Za nadaljne poskuse smo združili frakcije gelske kromatografije od 5 do 15 ter uporabili za nadaljne poskuse



Slika 9. Preverjanje prisotnosti Cry34Ab1 v zbranih frakcijah po gelski kromatografiji na Supedexu 200. MW – označevalec velikosti, 1 – izoliran rekombinantni protein Cry34Ab1 pred gelsko kromatografijo, 2– frakcije iz gelske kromatografije pred dvigom absorbance, 3,4,5,6,7 – frakcije gelske kromatografije, ki smo jih združili ter, puščica- lisa rekombinantnega proteina Cry34Ab1

4.1.2.3 Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1, izraženega v inkluzijskih telescih

Z metodo po Huang in sod (2007) smo izolirali protein iz inkluzijskih telesc iz seva BL21(DE3). Čistost in prisotnost proteina smo preverili z NaDS-PAGE. Iz slike 10 je razvidno, da je izoliran rekombinantni protein Cry34Ab1 zadostno čist in gelska kromatografija ni bila potrebna. Dobili smo 1 ml izoliranega proteina s koncentracijo 4 mg/ml.

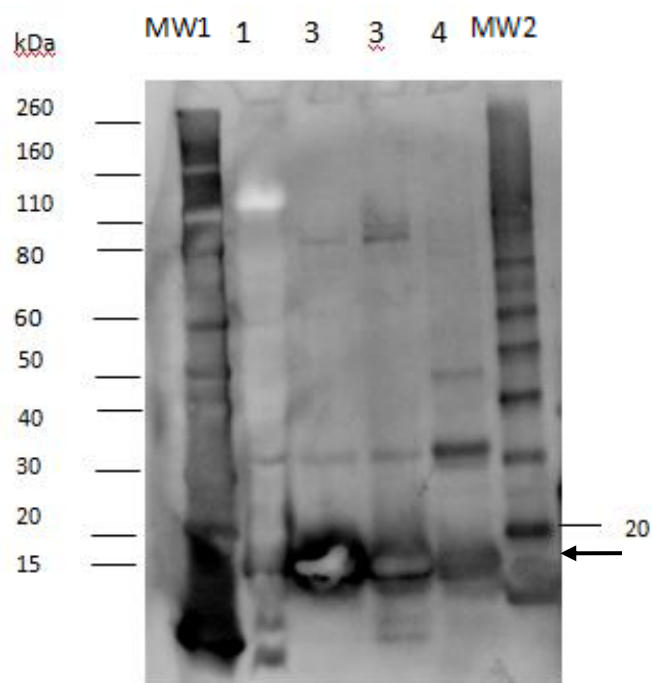


Slika 10. Izolacija rekombinantnega proteina Cry34Ab1 iz inkluzijskih telesc z metodo po Huang in sod. (2007). Vzorci NaDS-PAGE: MW – označevalec velikosti, 1 – supernatant po dodajanju Na-citrata pH 3.5, 2 – proteinska raztopina pred spiranjem z 1 x PBS, 3 – supernatant po drugem spiranju z 1 x PBS, 4 – izoliran protein v 0.2 M Na-citratu pH 3.5, puščica- lisa rekombinantnega proteina Cry34Ab1

4.2 FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA REKOMBINANTNEGA PROTEINA Cry34Ab1

4.2.1 Prenos Western

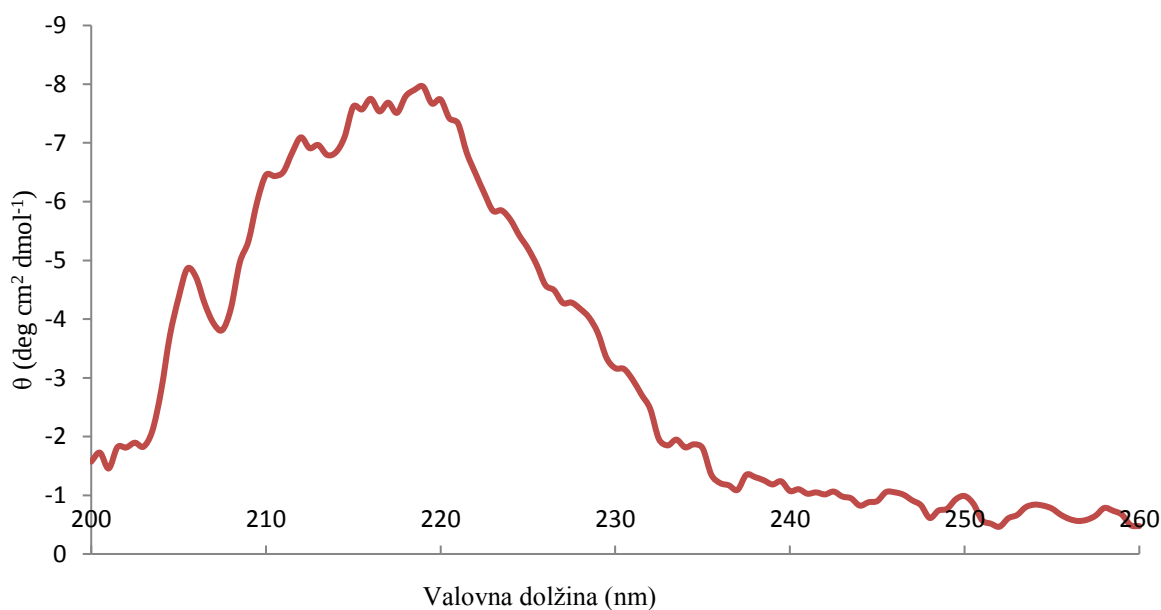
Z metodo prenosa Western smo potrdili prisotnost rekombinantnega proteina Cry34Ab1 s His-repkom v frakcijah po izolaciji z Ni-NTA afinitetno kromatografijo.



Slika 11. Prenos Western. Uporabili smo mišja primarna protitelesa ter kozja-protimišja sekundarna protitelesa označena s hrenovo peroksidazo (IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology ZDA). Za detekcijo specifične lise za rekombinantni protein Cry34Ab1 smo uporabili metodo s kemiluminiscenco s Pierce™ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, ZDA). MW1,MW2 – označevalci velikosti, 1 – nevezana frakcija po Ni-NTA afinitetni kromatografiji, 2,3,4 – frakcije z rekombinantnim proteinom Cry34Ab1 po izolaciji z Ni-NTA afinitetno kromatografijo, puščica- lisa rekombinatnega proteina Cry34Ab1

4.2.2 Cirkularni dikroizem

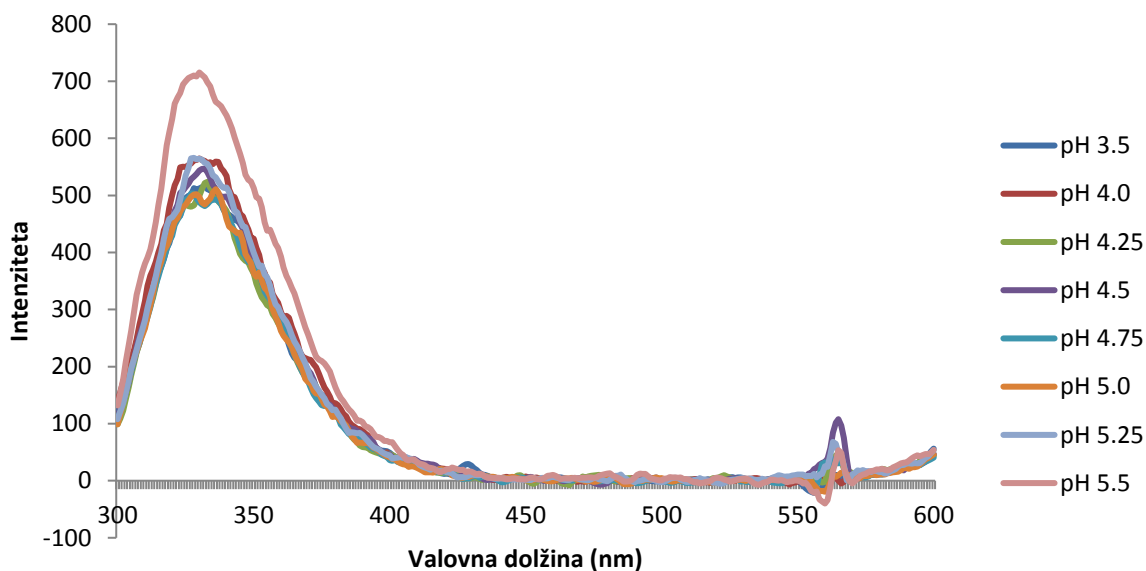
Izvedli smo tri zaporedne meritve CD-spektrov topnega Cry34Ab1 rekombinantnega proteina. Rezultat je prikazan kot povprečen CD-spekter treh meritev in je seštevek vseh struktur, prisotnih v proteinu Cry34Ab1. Iz povprečnega CD-spektra lahko sklepamo, da je rekombinantni protein Cry34Ab1 pretežno β -strukturiran. Program K2D3 nam je podal deleže α - in β -struktur: 2.69 % α -heliksov in 34.37 % β -struktur, kar je v skladu z znano kristalno strukturo Cry34Ab1 (4JOX).



Slika 12. CD-spekter rekombinantnega proteina Cry34Ab1 (0.08 mg/ml).

4.2.3 Merjenje triptofanskega spektra

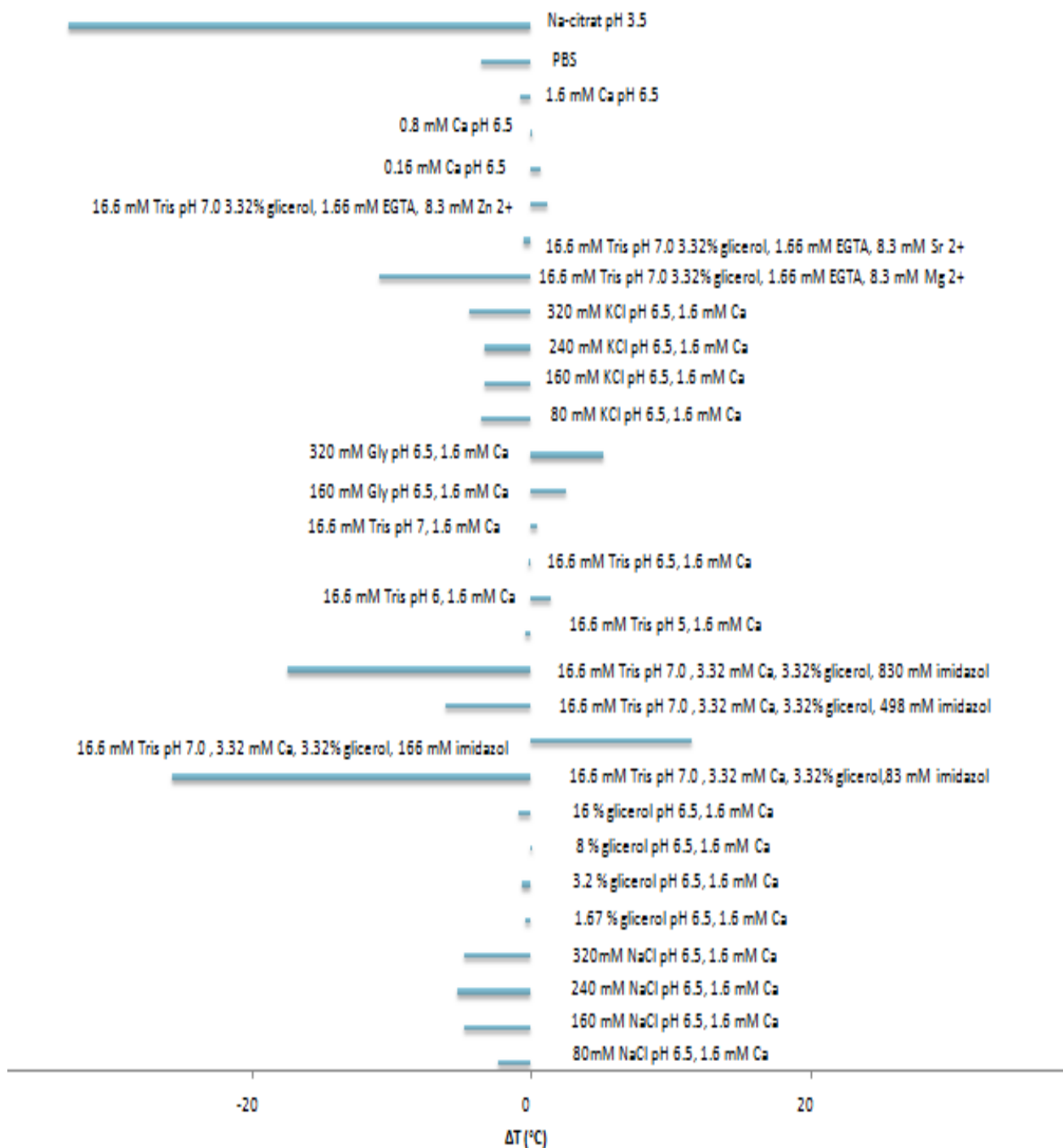
Triptofanski spekter proteina Cry34Ab1 smo merili, da bi ugotavili vpliv pH na stabilnost proteina. V primeru agregacije proteinov smo pričakovali zvišano intenziteto fluorescence pri 560 nm. Protein Cry34Ab1 vsebuje en triptofan, ne pa tirozina. Iz tega razloga smo vzbujali proteinski vzorec pri 280 nm. Na sliki 13 je prikazan triptofanski spekter Cry34Ab1, kjer je razvidno, da do agregacije zaradi spremembe pH ni prišlo. Večja intenziteta pri 560 nm je opazna pri pH 4.5, vendar glede na to, da pri višjih vrednostih pH ni opazna agregacija, gre verjetno za artefakt.



Slika 13. Triptofanski spekter Cry34Ab1 (0.01 mg/ml) pri različnih vrednostih pH. V območju pH 3.5– 5.5 je rekombinantni protein Cry34Ab1 stabilen in ne pride do agregacije, ki jo opazimo kot višanje intenzitete fluorescence pri 560 nm.

4.2.4 Diferenčna dinamična fluorimetrija

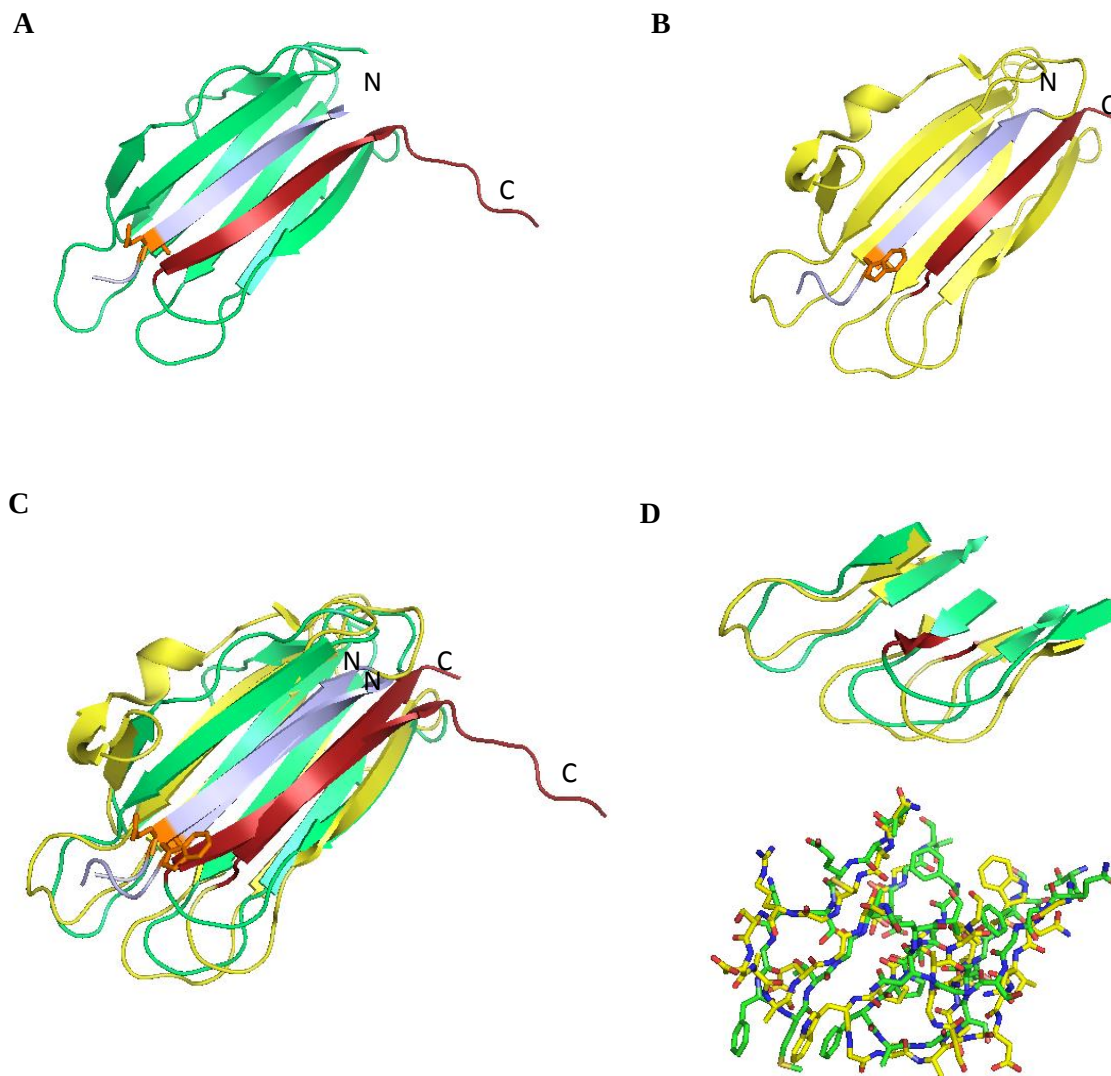
Z metodo DSF smo preverjali stabilnost topnega rekombinantnega proteina Cry34Ab1 v pufrih z različno sestavo. Na sliki 14 so prikazani učinki različnih pufrov na T_m proteina. Negativne vrednosti T_m kažejo na manjšo stabilnost proteina v primerjavi z njegovo stabilnostjo v čisti vodi, pozitivne vrednosti pa kažejo večjo stabilnost proteina pri določenih pogojih. Protein Cry34Ab1 je najstabilnejši v Na-citratu s pH 3.5 (do denaturacije proteina ni prišlo). Na večjo stabilnost Cry34Ab1 vpliva tudi prisotnost kalcija v nižjih koncentracijah, 160 mM cinka, ter 320 mM glicina in 166 mM imidazola. Rezultati iz DSF kažejo tudi na stabilnost proteina pri pH 6.



Slika 14. Vpliv pufrov z različno sestavo na stabilnost rekombinantnega proteina Cry34Ab1. Negativne vrednosti T_m kažejo na manjšo stabilnost proteinov pri določenih pogojih v primerjavi s stabilnostjo proteina v vodi. Pozitivne vrednosti kažejo na večjo stabilnost proteinov pri določenih pogojih. Pri Na-citratu pH 3.5 do denaturacije proteina ni prišlo

4.3 STRUKTURNE ANALIZE Cry34Ab1 V PRIMERJAVI Z ZNANIMI KRISTALNIMI STRUKTURAMI EGEROLIZINOV

V programu PyMOL v1.8 smo naredili primerjavo dveh znanih struktur egerolizinov, Cry34Ab1(4JOX) in PlyA(4OEBA) (RMSD= 1.942) .

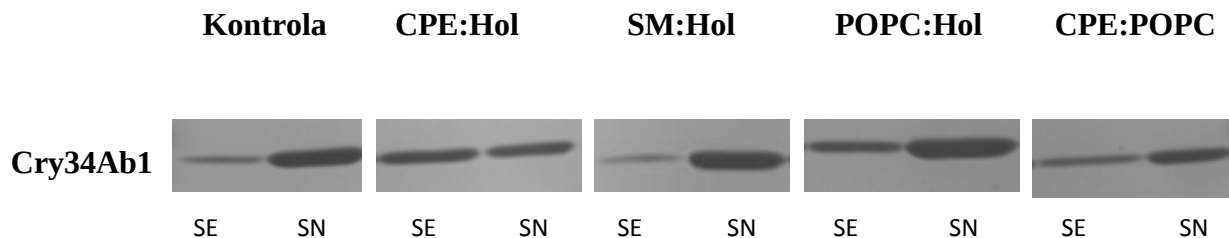


Slika 15. Primerjava struktur proteina Cry34Ab1(4JOX)(A) in pleurotolizina A 4OEBA(B). N-terminalna fragmenta sta obarvana modro, C-terminalna fragmenta sta obarvana rdeče. Trp6 v pleurotolizinu A in Glu5 v Cry34Ab1 sta obarvana oranžno. Iz poravnave struktur (C) proteina Cry34Ab1 v območju Ala3-Gly120 in pleurotolizina A v območju Ala2-Lys136 se vidi da sta strukturi zelo podobni, pleurotolizina A vsebuje tudi en zavoja α -vijačnice, Cry34Ab1 pa je v celoti strukturiran iz β -trakov. Iz poravnave treh zank (D) proteina PlyA, s katerim se usede na membrano in proteina Cry34Ab1 je razvidno da je oblika zank zelo podobna, sekvenca pa različna, kar kaže tudi različno specifičnost do lipidov.

Struktura proteina Cry34Ab1 je sestavljena iz dveh nasprotno nameščenih β -ploskev. β -ploskev I je sestavljena iz petih β -trakov, β -ploskev II pa je sestavljena iz štirih β -trakov. V β -ploski II so vsi trakovi antiparalelni, v β -ploskvi I pa sta osrednja trakova, N-terminalni in C-terminalni, vzporedna (slika 15A). Proteinska sredica je hidrofobna med dvema β -ploskvama. Trp31 je lociran v zanko med dvema β -trakovoma, njegova indolna skupina pa je vstavljena direktno v proteinsko sredico. Struktura PlyA je prav tako sestavljena iz dveh nasprotno nameščenih β -ploskev, vendar pa je zanka med obema trakovoma (aminokislina Ala33-Glu47) del strukture, ki ni prisoten v Cry34Ab1, in tudi ne vsebuje α -vijačnice. Tako kot Cry34Ab1, je tudi PlyA sestavljen iz ene ploskve s štirimi antiparalelnimi β -trakovi in ene iz petih β -trakov, kjer sta osrednja, N- in C-terminalni, paralelni, ostali pa antiparalelni (slika 15 B). β -ploskvi sta rahlo zaviti, sredica je sestavljena iz hidrofobnih stranskih skupin.

4.4 SEDIMENTACIJSKI TEST ZA DOLOČANJE VEZAVE Cry34Ab1 NA LIPIDNE VEZIKLE

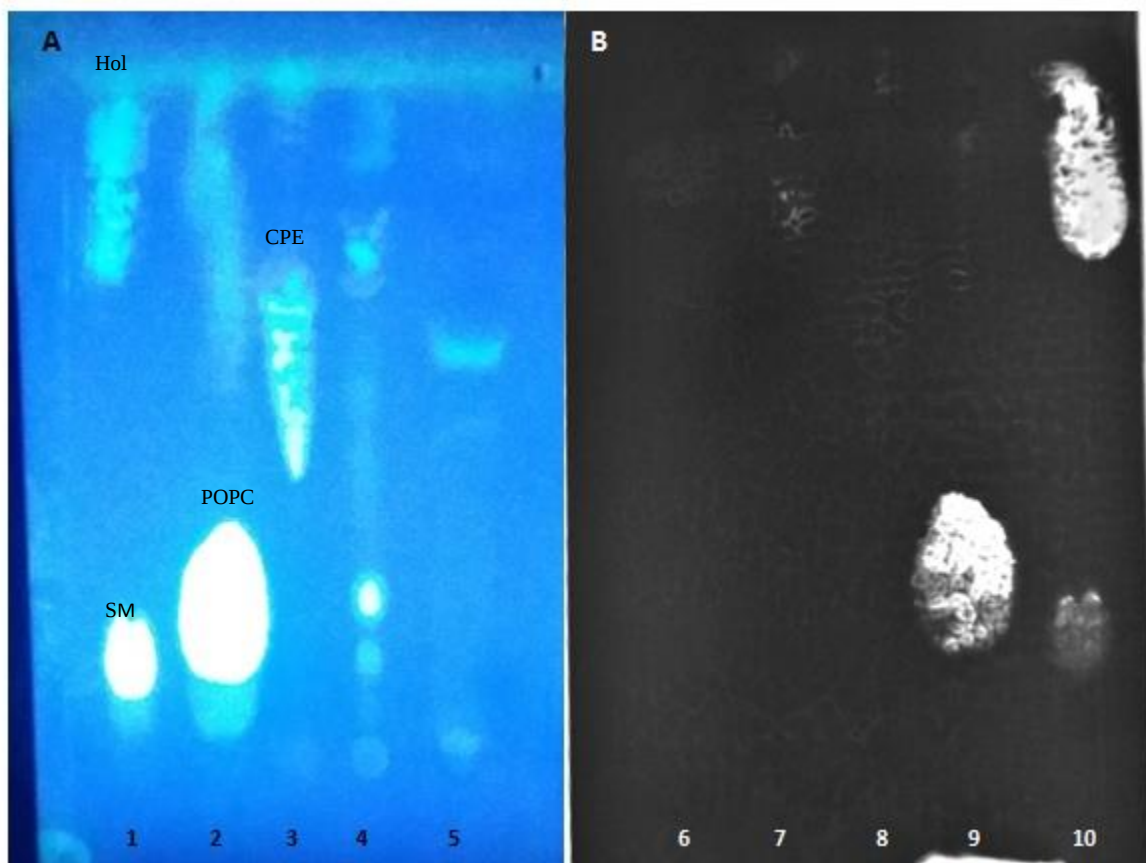
S sedimentacijskim testom smo določali vezavo topnega rekombinantnega proteina Cry34Ab1 na lipidne vezikle z različno sestavo. Vzorce iz supernatanta in sedimenta po inkubaciji Cry34Ab1 na lipidne vezikle smo nanegli na NaDS-PAGE elektroforezo, da bi določili vezavo proteina. Iz slike 13 je razvidna prisotnost proteina Cry34Ab1 v supernatantu in sedimentu vseh vzorcev po sedimentacijskem testu. Cry34Ab1 se je vezal na vse analizirane lipidne vezikle: CPE in Hol (1:1), SM in Hol (1:1), POPC in Hol (1:1) ter CPE in POPC (1:1). Prav tako je opazno, da je protein ostal v veliki količini tudi nevezan.



Slika 16. Sedimentacijski test za določanje vezave Cry34Ab1 na ekvimolarne lipidne vezikle. SE-sediment, SN-supernatant, CPE- ceramid fosfoetanolamin, Hol-holesterol, SM- sfingomielin, POPC- palmitoiloleoilfosfatidilholin

4.5 LOČITEV MEMBRANSKIH LIPIDOV S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO IN PRENOS LIPIDOV NA PVDF-MEMBRANO

Natančno določitev vezave topnega rekombinantnega proteina Cry34Ab1 na membranske lipide, vključno z glikolipidi, smo dosegli s prenosom membranskih lipidov na PVDF-membrano ter specifično detekcijo proteina. Potrdili smo tudi rezultate sedimentacijskega testa, da se Cry34Ab1 veže na vse testirane membranske lipide (slika 17). Vezave proteina na membranske glikolipide nismo opazili.



Slika 17. Ločitev membranskih lipidov s tankoplastno kromatografijo(A) ter prenos lipidov na PVDF-membrane in specifično zaznavo Cry34Ab1(B). A – vzoci na tankoplastni kromatografiji: 1 – SM in Hol, 2 – POPC, 3 – CPE, 4 – totalni membranski lipidi, izolirani iz celic Sf9, 5 – membranski glikolipidi, izolirani iz celic Sf9. B – vzorci na PVDF-membrani, na kateri lahko zaznamo protein: 6 – membranski glikolipidi, izolirani iz celic Sf9, 7 – totalni membranski lipidi, izolirani iz celic Sf9, 8 – CPE, 9 – POPC, 10 – SM in Hol.

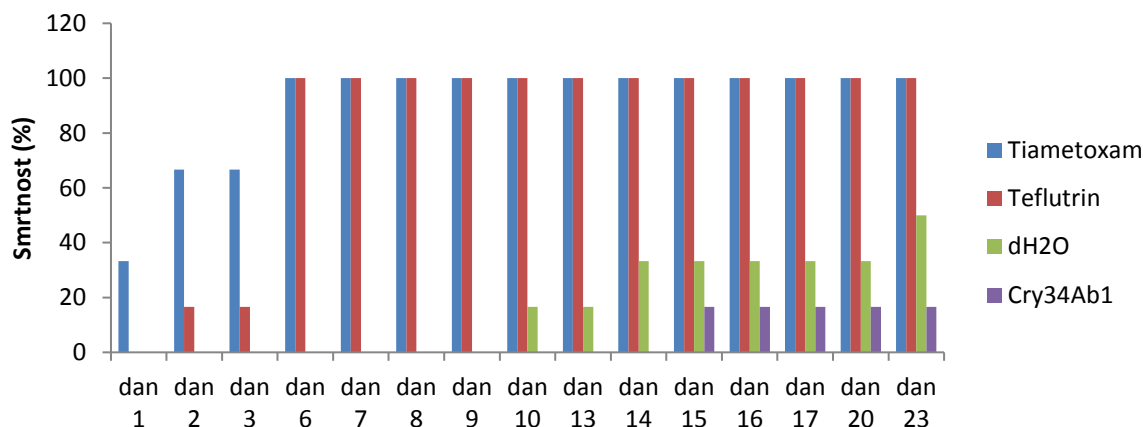
4.6 PRELIMINARNI TESTI TOKSIČNOSTI NA TARČNIH RASTLINSKIH ŠKODLJIVCIH

4.6.1 Mocarji (*Tenebrio molitor*)

Preliminarni poskus, v katerem smo testirali toksičen efekt rekombinantnega proteina iz inkluzijskih telesc Cry34Ab1 na mocarje ($n = 6$)^a, je trajal 23 dni. Pozitivni kontroli, to je

^a Število hroščev

insekticida Tiametoxam in Teflutrin, sta začeli delovati po 1 dnevu. Po 7 dneh so bili vsi hrošči, tretirani z insekticidi, mrtvi ($n = 12$). Po 10 dneh so se hrošči, tretirani s proteinom Cry34Ab1, gibali počasneje, vendar smrtnost ni bila opazna. Po 23 dneh je bil eden od šestih mokařev, tretiranih s Cry34Ab1, mrtev, vendar je bilo pri njemu opazno tudi slabo prehranjevanje. Za razliko od hroščev, tretiranih s proteinom, so bili pri negativni kontroli po 23 dneh trije od šestih hroščev mrtvi. Rekombinanten protein Cry34Ab1 ni imel toksičnega učinka na mokaře. Rezultati preliminarnega poskusa so prikazani na sliki 18.

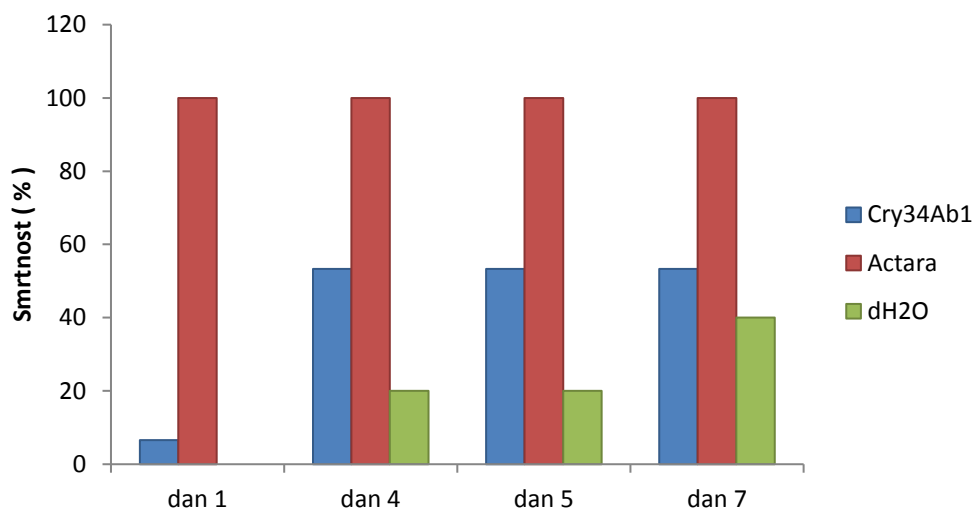


Slika 18. Vpliv proteina Cry34Ab1 na smrtnost mokařev

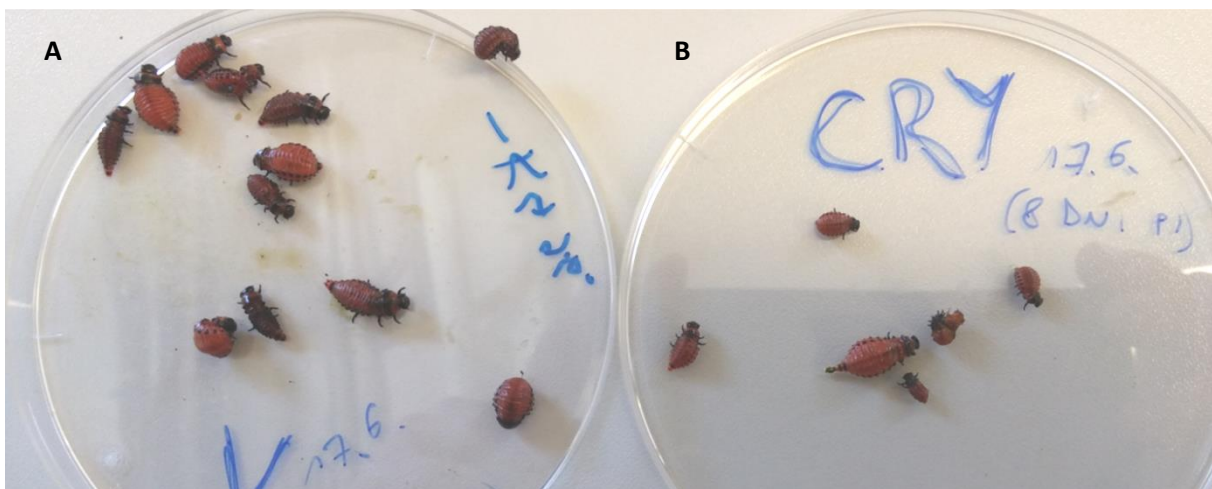
4.6.2 Koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*)

Testirali smo tudi možnost toksičnega učinka proteina Cry34Ab1 na ličinke koloradskega hrošča. Poskus je trajal 7 dni. Že po prvem dnevu so bile ličinke koloradskega hrošča, tretirane z insekticidom Actaro, mrtve ($n = 25$). Opazno je bilo tudi, da je bila po prvem dnevu pri ličinkah, tretiranih s Cry34Ab1, stopnja prehranjevanja manjša. Pri 4. dnevu smo opazili smrtnost pri 8 ličinkah koloradskega hrošča, tretiranih s proteinom Cry34Ab1. Po 7 dneh je

bila smrtnost pri ličinkah, tretiranih s Cry34Ab1, dvakrat večja od ličink pri negativni kontroli (slika 19). Ličinke koloradskega hrošča pri negativni kontroli so bile večje in gibljivejše za razliko od ličink, tretiranih s Cry34Ab1 (slika 20).



Slika 19. Vpliv Cry34Ab1 na smrtnost ličink koloradskega hrošča



Slika 20. Ličinke koloradskega hrošča, tretirane s Cry34Ab1 (B), v primerjavi z ličinkami koloradskega hrošča iz negativne kontrole (A). Ličinke, tretirane s Cry34Ab1, so bile manjše ter manj gibljive v primerjavi z ličinkami iz negativne kontrole.

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo se osredotočili na pridobivanje ter preučevanje rekombinantnega proteina Cry34Ab1, kot predstavnika egerolizinov iz Cry skupine insekticidnih proteinov.

Razumevanje delovanja proteina Cry34Ab1 je pomembno: (1) zaradi boljšega vpogleda v delovanje, lastnosti in vlogo egerolizinov ter (2) za razumevanje in razreševanje pojava odpornosti na toksin Cry34Ab1/Cry35Ab1 pri ličinkah koruznega hrošča.

Velika produkcija Cry34Ab1 v heterolognem ekspresijskem sistemu *E. coli* ter enostavna izolacija proteina sta ključnega pomena za izvedbo številnih laboratorijskih testov, kakor tudi za uporabo v kmetijstvu. Pri našem delu smo uspešno pridobili rekombinantni protein Cry34Ab1 s His repkom na C-terminalnem koncu v bakteriji *E. coli*. Znano je, da se Cry proteini v *E. coli* izražajo v obliki inkluzijskih telesc, vendar smo pri zmanjševanju stopnje izražanja proteina pri 20°C v celicah seva BL21(DE3)pLysS uspeli pridobiti tudi topno obliko rekombinantnega proteina, ki smo ga izolirali z Ni-NTA afinitetno kromatografijo in gelsko kromatografijo. pH je faktor, ki najbolj vpliva na stabilnost proteina Cry34Ab1. Huang in sod. (2007) so na osnovi lastnosti Cry34Ab1, da je topen pri pH 3.5 ter da agregira pri pH 7.5, uspešno izolirali velike količine proteina (4 g/l) direktno iz inkluzijskih telesc oblikovanih v *P. fluorescens*. Ugotovili smo, da tudi *E. coli*, ki je sicer opisana kot slabši rekombinanten sistem od *Pf* za heterologno izražanje proteinov (Squires in sod., 2004), lahko sintetizira velike količine Cry34Ab1. Z NaDS-PAGE elektroforezo ter gelsko kromatografijo smo ugotovili, da je protein po izolaciji z Ni-NTA afinitetno kromatografijo kot tudi z metodo po Huangu (2007) čist.

Rekombinantni protein Cry34Ab1 je β -strukturiran (Kelker in sod., 2014), kar smo potrdili tudi z analizo CD-spektra. β -strukturiranost je značilna za vse pripadnike egerolizinov. Strukturo Cry34Ab1 smo primerjali s strukturo pleurotolizina A (PlyA), da bi pridobili več informacij o interakciji z lipidi. Oba proteina imata zelo podobni strukturi, ki sta v veliki meri podobni strukturi proteinov iz aktinoporinske skupine (Mancheno in sod., 2003). Glede na strukturo PlyA v kompleksu s PlyB (Lukyanova in sod., 2015), se PlyA in s tem verjetno tudi

Cry34Ab1, veže na membrano z delom molekule, ki vsebuje tri zanke v oklici N-terminalnega dela proteina (slika 15D). Čeprav je primerjalno struktura teh treh zank podobna, pa je njihova sekvenca zelo različna, kar lahko vpliva na specifičnost in način vezave. Največja razlika med strukturama Cry34Ab1 in PlyA pa je v dodatni zanki v PlyA (aminokislina Asp34-Gly48), ki se nahaja med obema β -ploskvama, ki je ni v Cry34Ab1. Ta del sekvence v PlyA vsebuje veliko negativno nabitih stranskih skupin, ki so morda lahko vpletene v interakcijo s holinskim delom sfigomielina (Sakurai in sod., 2004). Odsotnost take zanke torej lahko vpliva na drugačno vezavo Cry34Ab1 na membrano. Ota in sod. (2014) in Lukyanova in sod. (2015) so tudi ugotovili, da je prisotnost His-repka na N-koncu pri rekombinantnem PlyA ovira vezavo na membrano, kar potrjuje predpostavljeno orientacijo treh zank na membrano ob vezavi. Poleg tega so ugotovili, da mutacija Trp6 v PlyA v Glu znatno zmanjša vezavo PlyA na membrano in povzroči 100-krat nižjo aktivnost tvorbe por. Trp6 leži v bližini, vendar ni del treh zank. Glede na model pore PlyA/PlyB (Lukyanova in sod., 2015) pa je verjetno pomemben za orientacijo PlyA molekul v pori glede na PlyB. Zanimivo je, da ima Cry34Ab1 na tem mestu Glu5. Ker se očitno vseeno veže na membrano, je možno torej, da je orientacija molekul Cry34Ab1 v pori skupaj s Cry35Ab1 drugačna kot v primeru PlyA/PlyB pore, morda je drugačna tudi stehiometrija. Pri tem je pomembno poudariti, da je tudi struktura Cry35Ab1, ki pripada aerolizinski družini proteinov, ki tvorijo pore (Kelker in sod. 2014), zelo drugačna od PlyB, ki spada med MACPF-proteine (Lukyanova in sod., 2015), zato je morda tudi oblika pore in s tem mehanizem nastanka pore nekoliko drugačen.

Vpliv različnih faktorjev na stabilnost rekombinantnega proteina Cry34Ab1 smo določili z merjenjem triptofanskega fluorescenčnega spektra ter diferenčno dinamično fluorimetrijo. Rezultati merjenja triptofanske fluorescence kažejo, da je Cry34Ab1 stabilen v območju pH od 3.5 do 5.5. Rezultati so v skladu z pričakovanji glede na dejstvo, da je največja membranska aktivnost Cry34Ab1 s planarnimi lipidnimi dvosloji opazna pri pH 5.5 (Masson in sod., 2004). DSF analize so potrdile, da je Cry34Ab1 najbolj stabilen v Na-citratnem pufru s pH 3.5. Znano je, da Bt izoča Cry34Ab1 protein v obliki kristalov, ki se raztopijo po vstopu v črevesje ličink koruznega hrošča (Masson in sod., 2004; Moellenbeck in sod., 2001). Kisli pogoji v črevesju ličink omogočajo raztapljanje proteina ter vezavo na celično membrano

(Moellenbeck in sod., 2001; Masson in sod., 2004). Glede na to smo pri določanju vezave Cry34Ab1 z lipidnimi vezikli poskuse izvajali pri nizkem pH. Pri optimizacije sedimentacijskega testa smo opazili, da tudi ionska jakost vpliva na stabilnost proteina ter da pride do njegove agregacije. Z DSF rezultati smo potrdili naša opažanja ter tudi, da prisotnost NaCl destabilizira protein. Glede na dejstvo, da se do sedaj vsi preiskani egerolizini specifično vežejo na lipidne vezikle, ki imajo v svoji sestavi CPE, smo pričakovali specifično interakcijo s CPE tudi pri Cry34Ab1. Vendar pa smo ugotovili, da se Cry34Ab1 nespecifično veže na lipidne vezikle z različno sestavo. Poleg tega ~ 25% proteina ostane nevezanega. Z ločitvijo membranskih lipidov s tankoplastno kromatografijo in prenosom lipidov na PDVF membrano smo potrdili nespecifično vezavo Cry34Ab1 na membranske lipide.

Mehanizem delovanja dvokomponentnega kompleksa Cry34Ab1/Cry35Ab1 še vedno ni znan vendar gre očitno za specifično vezavo Cry34Ab1 na en ali več membranskih proteinskih receptorjev (Kaiser-Alexnat in sod., 2009). Do sedaj je znan 110 kDa proteinski receptor, ki ima verjetno ključno vlogo pri specifičnosti delovanja Cry34Ab1 poleg faktorjev, ki vplivajo na stabilnost, npr. nizek pH (Kaiser-Alexnat in sod., 2009). V večini primerov se Cry proteini, ki so specifični za insekte, vežejo na kadherinske receptorje v celični membrani črevesa (Bravo in sod., 2007). Tan in sod. (2016) so z interferenčno RNA utišali izražanje kadherina, ki se izraža v srednjem črevesu ličink koruznega hrošča ter pokazali, da utišanje vendar ne vpliva na toksičnost kompleksa Cry34Ab1/Cry35Ab1.

Naši rezultati so pokazali, da se Cry34Ab1 ne veže na membranske glikolipide. Sklepamo, da gre verjetno za drugačen mehanizem delovanja Cry34Ab1 na celično membrano, saj smo pokazali, da se Cry34Ab1 razlikuje od ostalih egerolizinov glede na interakcijo z lipidnimi vezikli ter se nespecifično veže na CPE. Za širši vpogled v interakcijo egerolizinov z lipidnimi membranami, kot tudi za razumevanje mehanizma delovanja toksina Cry34Ab1/Cry35Ab1 je nujna identifikacija proteinskega receptorja v celični membrani črevesja ličink koruznega hrošča. To je pomembno tudi za razumevanje odpornosti pri ličinkah koruznega hrošča. Dobljeni rezultati so izhodišče za nadaljnje delo pri iskanju receptorja za Cry34Ab1 ter določanje mehanizma delovanja tega biotehnološko pomembnega egerolizina.

Protein Cry34Ab1 so izolirali iz Bt seva PS149B1, za katerega je bilo znano, da deluje toksično na ličinke koruznega hrošča (Mollenbeck in sod., 2002). Oppert in sod. (2010) so preverili tudi toksičnost za druge insekte in ugotovili, da toksin Cry34Ab1/Cry35Ab1 nima toksičnega učinka na: žitnika (*Crypolestes pusillus*), slokokega žitarja (*Oryzaephilus surinamensis*), žitnega kutarja (*Rhyzopertha dominica*), koruznega molja (*Sitotroga cerealella*), riževega žužka (*Sitophilus oryzae*), riževega mokaarja (*Tribolium castaneum*) ter mokaarja (*Tenebrio molitor*). Schlotter P. in Storer N. (Dow AgroSciences, 2009) sta predstavila toksičen učinek Cry34Ab1/Cry35Ab1 na koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*) z LD₅₀ 35 µg/cm², prav tako pa tudi na vrsti *Diabrotica barberi* z LD₅₀ 5.56 µg/cm² in *Diabrotica undecimpunctata* z LD₅₀ 11 µg/cm², to je škodljivcev, ki ju v Evropi še vedno niso našli.

Želeli smo preveriti toksični učinek Cry34Ab1 tudi brez proteinskega partnerja Cry35Ab1 (Herman in sod., 2002) na ličinke koloradskega hrošča ter na mokaarje. Naši preliminarni poskusi so tudi izhodišče za nadaljno testiranje proteina na insekte. Rezultati potrjujejo, da Cry34Ab1 nima toksičnega učinka na hrošče mokaarjev. V črevesu mokaarjev se nahaja kadherinski receptor, ki je zelo podoben kadherinskemu receptorju v črevesju ličink koruznega hrošča. Kadherinski receptor v črevesju mokaarjev je že opisan receptor za Cry3Aa, protein, ki je specifično toksičen za hrošče (Zuniga – Navarrete in sod., 2014). Glede na dejstvo, da Cry34Ab1 ni v interakciji z kadherinskim receptorjem v ličinkah koruznega hrošča (Tan in sod., 2016) ter mokaarjev, gre očitno za interakcijo s proteinskim receptorjem, ki ga ni v črevesju mokaarjev. Iz rezultatov preliminarne poskusa z ličinkami koloradskega hrošča lahko sklepamo, da je proteinski receptor za Cry34Ab1 najverjetneje prisoten v srednjem črevesu ličink. Protein Cry34Ab1 se je v 7 dneh izkazal toksičen za ličinke koloradskega hrošča.

Z magistrsko nalogo smo odprli možnosti za nadaljnje delo, ki bi vključevalo testiranje toksičnega učinka Cry34Ab1 na druge rastlinske škodljivce ter iskanje receptorja iz srednjega črevesja ličink koruznega ter koloradskega hrošča.

6 SKLEPI

- Rekombinantni protein Cry34Ab1 lahko pridobimo z izražanjem v *E. coli* v topni in v netopni obliki in ga izoliramo z Ni-NTA-afinitetno kromatografijo ali z metodo prirejeno po Huang in sod. (2007).
- Rekombinantni protein Cry34Ab1 je stabilen v območju pH 3.5–6. Prav tako je bolj stabilen v raztopini z glicinom. Cry34Ab1 je manj stabilen pri povečani ionski jakosti ter v prisotnosti glicerola.
- Vezava Cry34Ab1 na membranske lipide je nespecifična. Za razliko od drugih egerolizinov Cry34Ab1 nima lastnosti specifične vezave na CPE v lipidnih veziklih.
- Rekombinanten protein Cry34Ab1 je toksičen za ličinke koloradskega hrošča.

7 POVZETEK

Protein Cry34Ab1 je najbolj znani predstavnik egerolizinov v skupini Cry insekticidnih proteinov. Deluje toksično proti ličinkam koruznega hrošča. Skupaj z drugo proteinsko komponento Cry35Ab1, ki ni egerolizin, tvori dvokomponentne komplekse, ki permeabilizirajo membrano. Protein Cry35Ab1 ima ojačevalno vlogo pri delovanju z Cry34Ab1. Skupaj dosežeta večjo insekticidno delovanje proti ličinkam koruznega hrošča.

Rekombinantni protein Cry34Ab1 lahko uspešno pridobimo v bakteriji *E. coli*. Cry34Ab1 se v *E. coli* izraža v inkluzijskih telescih ter v manjših količinah v topni obliki. Protein Cry34Ab1 smo uspešno izolirali z Ni-NTA-afinitetno kromatografijo ter z metodo privzeto po Huang in sod. (2007). Dodatno smo ga očistili z gelsko kromatografijo. Prisotnost Cry34Ab1 v proteinski raztopini smo potrdili tudi s prenosom Western. β -strukturiranost rekombinantnega proteina smo potrdili z merjenjem CD spektra. Vpliv različnih faktorjev na stabilnost Cry34Ab1 smo preučevali z merjenjem triptofanskega fluorescenčnega spektra in DSF analize ter ugotovili, da je protein Cry34Ab1 najbolj stabilen v območju pH 3.5 - 6 ter v prisotnosti glicina.

Skupna lastnost nekaterih egerolizinov je specifična vezava na analog SM, CPE. CPE je glavna lipidna konstituenta v celičnih membranah insektov in ogorčic, v membranah sesalcev pa je prisoten v sledovih. Za razliko od preverjenih egerolizinov se Cry34Ab1 ne veže specifično na lipidne vezikle, ki imajo v svoji sestavi CPE. Njegova vezava na testirane membranske lipide je nespecifična. Znano je, da se Cry34Ab1 veže na specifičen, vendar neznan proteinski receptor v srednjem črevesu ličink koruznega hrošča.

Naredili smo preliminarne poskuse, v katerih smo preverili občutljivost drugih rastlinskih škodljivcev iz skupine hroščev na Cry34Ab1. Rekombinanten protein je imel toksičen učinek na ličinke koloradskega hrošča ne pa na mokače.

Z magistrsko nalogo smo podali osnovo za nadaljno delo, ki bi bilo osredotočeno na iskanje specifičnega receptorja za protein Cry34Ab1 v srednjem črevesu ličink koruznega in

koloradskega hrošča ter nadaljno analizo možnega toksičnega efekta proteina Cry34Ab1 na druge rastlinske škodljivce.

8 VIRI

- Anstead, J. A., Williamson, M. S., & Denholm, I. 2005. Evidence for multiple origins of identical insecticide resistance mutations in the aphid *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 3: 249–256
- Armitage, S. a O., & Siva-Jothy, M. T. 2005. Immune function responds to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, 94: 650–656
- Armitage, S. a O., Siva-Jothy, M. T., Asano, S. I., Yamashita, C., Iizuka, T., Takeuchi, K., Siegfried, B. D. 2013. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochemistry*, 9, 1: 1–16
- Asano, S. I., Yamashita, C., Iizuka, T., Takeuchi, K., Yamanaka, S., Cerf, D., & Yamamoto, T. 2003. A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel cry8 gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological Control*, 28, 2: 191-196
- Badran, A. H., Guzov, V. M., Huai, Q., Kemp, M. M., Vishwanath, P., Kain, W., Liu, D. R. 2016. Continuous evolution of *B. thuringiensis* toxins overcomes Bt resistance in insects. *Nature*, 533: 58-63
- Baum, J. A., Chu, C. R., Rupar, M., Brown, G. R., Donovan, W. P., Huesing, J. E., Vaughn, T. 2004. Binary toxins from *Bacillus thuringiensis* active against the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 8: 4889–4898
- Berne, S., Križaj, I., Pohleven, F., Turk, T., Maček, P., & Sepčič, K. 2002. Pleurotus and Agrocybe hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1570, 3: 153–159
- Berne, S., Lah, L., & Sepčič, K. 2009. Aegerolysins: Structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, 18, 4: 694–706
- Berne, S., Sepčič, K., Anderluh, G., Turk, T., Maček, P., & Ulrih, N. P. 2005. Effect of pH on the pore forming activity and conformational stability of ostreolysin, a lipid raft-binding protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry*, 44, 33: 11137–11147
- Bhat, H. B. Alakrishna, Ishitsuka, R., Inaba, T., Murate, M., Abe, M., Makino, A., Kobayashi, T. 2015. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB Journal* :

Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology,
29, 9: 3920–3934

- Bhat, H. B., Kishimoto, T., Abe, M., Makino, A., Inaba, T., Murate, M., Kobayashi, T. 2013. Binding of a pleurotolysin ortholog from *Pleurotus eryngii* to sphingomyelin and cholesterol-rich membrane domains. *Journal of Lipid Research*, 54, 10: 2933–2943
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Soberon, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1667, 1: 38–46
- Bravo, A. 1997. Minireview Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ - Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains, 179, 9: 2793–2801
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 4: 423–435
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, 6, 1: 17–26
- Carugo, O., & Pongor, S. 2001. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 10, 7: 1470–3
- Chen, Y., & Barkley, M. D. 1998. Toward understanding tryptophan fluorescence. *Biochemistry*, 37, 28: 9976–9982
- Choi, J. H., & Lee, S. Y. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 5: 625–635
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62, 3: 807–813
- Devine, G. J., & Furlong, M. J. 2007. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*, 24, 3: 281–306
- Ebina, K., Ichinowatari, S., & Yokota, K. 1985. Studies on Toxin of *Aspergillus fumigatus*. Fashion of binding of Asp-hemolysin do human erythrocythes and Asp-hemolysin binding proteins on erythroythe membranas, 29, 2: 91–101

- Edidin, M. 2003. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4, 5: 414–418
- Ellis, R. T., Stockhoff, B. A., Stamp, L., Ernest, H., Schwab, G. E., Knuth, M., Cardineau, G. A. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* Binary Insecticidal Crystal Proteins Active on Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, *Applied and environmental microbiology*, 68, 3: 1137–1145
- Espinar, M. T. F., & Labarère, J. 1997. Cloning and sequencing of the Aa-Pri1 gene specifically expressed during fruiting initiation in the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, and analysis of the predicted amino acid sequence. *Current Genetics*, 32, 6: 420–424
- Frankenhuyzen, K. van. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101, 1: 1–16
- Gao, Y., Schafer, B. W., Collins, R. A., Herman, R. A., Xu, X., Gilbert, J. R., Tagliani, L. A. 2004. Characterization of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 insecticidal crystal proteins expressed in transgenic corn plants and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 26: 8057–8065
- Gassmann, A. J. 2012. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm: Predictions from the laboratory and effects in the field. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 3: 287–293
- Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Keweshan, R. S., & Dunbar, M. W. 2011. Field-evolved resistance to Bt maize by Western corn rootworm. *PLoS ONE*, 6, 7:1-7
<http://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.006>
- Genta, F. A., Dillon, R. J., Terra, W. R., & Ferreira, C. 2006. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 52, 6: 593–601
- Ghosh, A., Kling, T., Snaidero, N., Sampaio, J. L., Shevchenko, A., Gras, H., Simons, M. 2013. A Global In Vivo *Drosophila* RNAi Screen Identifies a Key Role of Ceramide Phosphoethanolamine for Glial Ensheathment of Axons. *PLoS Genetics*, 9, 12:1-14
<http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003980>
- Guidelli-thuler, A. M., Abreu, I. L. De, Victor, M., & Lemos, F. 2009. Expression of the sigma 35 and Cry2Ab genes involved in *Bacillus thuringiensis* virulence, 66, 3: 403–409
- Guo, Z., Doll, K., Dastjerdi, R., Karlovsky, P., Dehne, H. W., & Altincicek, B. 2014. Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*). *PLoS ONE*, 9,6 : 1-9

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0100112>

- Henco, K. 1991. The QIA expressionist. Diisseldorf, Qiagen.
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en> (6. april, 2016)
- Henrici, A. T. 1939. An Endotoxin from *Aspergillus Fumigatus*. The Journal of Immunology, 36, 4: 319–338
- Herman, R. A., Scherer, P. N., Young, D. L., Mihaliak, C. A., Meade, T., Woodsworth, A. T., Narva, K. E. 2002. Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. Journal of Economic Entomology, 95,3: 635–639
- Hong, Q., Gutierrez-Aguirre, I., Barli, A., Malovrh, P., Kristan, K., Podlesek, Z., Maček P., Turk D., Anderluh, G. 2002. Two-step membrane binding by equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. Journal of Biological Chemistry, 277, 44: 41916–41924
- Huang, , K. xue, Badger, M., Haney, K., & Evans, S. L. 2007. Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. Protein Expression and Purification, 53, 2: 325–330
- ILSI Research Foundation. A review of the environmental safety of the Cry34Ab1 and Cry35Ab1 proteins: 1–16
- http://cera-gmc.org/files/cera/uploads/Cry3435_en_rev1.pdf (7. juni, 2016)
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., & Benjamin, S. 2013. An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. Advances in Microbiology, 03, 05: 462–472
- Kaiser-Alexnat, R., Büchs, W., & Huber, J. 2009. Studies on the proteolytic processing and binding of Bt toxins Cry3Bb1 and Cry34Ab1/Cry35Ab1 in the midgut of Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes Bulletin, 45: 235–238
- Kelker, M. S., Berry, C., Evans, S. L., Pai, R., McCaskill, D. G., Wang, N. X., Narva, K. E. 2014. Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. PLoS ONE, 9, 11: 1-15
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0112555>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1751, 2: 119–139

- Kluger, R., & Alagic, A. 2004. Chemical cross-linking and protein-protein interactions-a review with illustrative protocols. *Bioorganic Chemistry*, 32, 6: 451–472
- Kraut, R. 2011. Roles of sphingolipids in *Drosophila* development and disease. *Journal of Neurochemistry*, 116, 5: 764–778
- Kudo, Y., Fukuchi, Y., Kumagai, T., Ebina, K., & Yokota, K. 2001. Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1568, 3: 183–188
- Kumagai, T., Tsutsumi, H., Ogawa, N., Naito, S., Ebina, K., Yokota, K., & Nagata, K. 2006. Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of the Asp-hemolysin-related synthetic peptides from *Aspergillus fumigatus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 11: 2181–2186
- Lingwood, D., & Simons, K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 5961: 46–50
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A., & Perez-Iratxeta, C. 2012. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80, 2: 374–381
- Lukyanova, N., Kondos, S. C., Farabella, I., Law, R. H. P., Reboul, C. F., Caradoc-Davies, T. T., Dunstone, M. A. 2015. Conformational Changes during Pore Formation by the Perforin-Related Protein Pleurotolysin. *PLoS Biology*, 13, 2: 1–15
- Marrone, P. G.; Ferri, F. D.; Mosley, T. R.; Meinke, L. J. 1985. Improvements in Laboratory Rearing of the Southern Corn Rootworm, *Diabrotica undecimpuncta howardi* Barber (Coleoptera: Chrysomelidae), on an Artificial Diet and Corn. *Journal of Economic Entomology*, 78, 1: 290–293
- Masson, L., Schwab, G., Mazza, A., Brousseau, R., Potvin, L., & Schwartz, J. L. 2004. A novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1) containing a Cry34Ab1/Cry35Ab1 binary toxin specific for the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte forms ion channels in lipid membranes. *Biochemistry*, 43, 38: 12349–12357
- Mewis, I., & Ulrichs, C. 2001. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus granarius* and *Plodia interpunctella*. *Journal of Stored Products Research*, 37, 2: 153–164
- Moellenbeck, D. J., Peters, M. L., Bing, J. W., Rouse, J. R., Higgins, L. S., Sims, L., Duck, N. 2001. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. *Nature Biotechnology*, 19, 7: 668–672

- Ngai, P. H. K., & Ng, T. B. 2006. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 6: 1185–1191
- Novak, M., Kraševac, N., Skočaj, M., Maček, P., Anderluh, G., Sepčič, K. 2014. Fungal aegerolysin-like proteins: distribution, activities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2: 601–610
- Ota, K., Leonardi, A., Mikelj, M., Skočaj, M., Wohlschlager, T., Künzler, M., Aebi M., Narat M., Križaj Ig., Anderluh G., Sepčič K., Maček, P. 2013. Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B. *Biochimie*, 95, 10: 1855–1864
- Oppert, B., Ellis, R. T., & Babcock, J. 2010. Effects of Cry1F and Cry34Ab1/35Ab1 on storage pests. *Journal of Stored Products Research*, 46, 3: 143–148
- Perez-García, G., Basurto-Rios, R., & Ibarra, J. E. 2010. Potential effect of a putative pH-driven promoter on the over expression of the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104, 2: 140–146
- Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 1: 3–22
- Park, Y., Abdullah, M. A. F., Taylor, M. D., Rahman, K., & Adang, M. J. 2009. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa and Cry3Bb toxicities to coleopteran larvae by a toxin-binding fragment of an insect cadherin. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 10: 3086–3092
- Parker, M. W., & Feil, S. C. 2005. Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88, 1: 91–142
- Parrilli, E., Giuliani, M., Marino, G., & Tutino, M. L. 2010. Influence of production process design on inclusion bodies protein: the case of an Antarctic flavohemoglobin. *Microbial Cell Factories*, 10: 9-19
- Pathol, J. I. 2016. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in Intoxicated Insects. *Journal of Invertebrate Pathology*. 60: 237-246
- Prasifka, P. L., Rule, D. M., Storer, N. P., & Nolting, S. P. 2013. Evaluation of Corn Hybrids Expressing Cry34Ab1 / Cry35Ab1 and Cry3Bb1 Against the Western Corn Rootworm (Coleoptera : Chrysomelidae), 106, 2: 823–829

- Rebolj, K., Batista, U., Sepčič, K., Cestnik, V., Maček, P., Frangež, R. 2007. Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability in vitro. *Toxicon*, 49,8: 1211–1213
- Rebolj, K., Ulrih, N. P., Maček, P., Sepčič, K. 2006. Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758, 10: 1662–1670
- Rodrigues, J. V, Prosinecki, V., Marrucho, I., Rebelo, L. P. N., Gomes, C. M. 2011. Protein stability in an ionic liquid milieu: on the use of differential scanning fluorimetry. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 30: 13614–13616
- Sakai, M., Miyazaki, a, Hakamata, H., Sasaki, T., Yui, S., Yamazaki, M., Horiuchi, S. 1994. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 50: 31430–31435
- Sakurai, N., Kaneko, J., Kamio, Y., & Tomita, T. 2004. Cloning, expression, and pore-forming properties of mature and precursor forms of pleurotolysin, a sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1679, 1: 65–73
- Sanchis, V., & Bourguet, D. 2008. Review article *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy and Sustainable Development*, 28: 11–20
- Schwartz, J. L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J. F., Berry, C., Humphreys, M. J., Menestrina, G. 2001. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. *Journal of Membrane Biology*, 184, 2: 171–183
- Schlotter P., Storer N. 2009 Cry34/35Ab1 Mode of Action and Efficacy.(ppt prezentacija, 4. maj 2016)
- Schlumberger, S., Kristan Černigoj, K., Ota, K., Frangež, R., Molgó, J., Sepčič, K., Benoit, E., Maček P. 2014. Permeability characteristics of cell-membrane pores induced by ostreolysin A/ pleurotolysin B, binary pore-forming proteins from the oyster mushroom. *FEBS Letters*, 58: 35-40
- Sepčič, K., Berne, S., Potrich, C., Turk, T., Maček, P., Menestrina, G. 2003. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 270, 6: 1199–1210

- Sepčič, K., Berne, S., Rebolj, K., Batista, U., Plemenitaš, A., Šentjerc, M., Maček, P. 2004. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Letters*, 575, 1-3: 81–85
- Singh, A., Upadhyay, V., & Panda, A. K. 2014. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*, 99, 4: 283–291
- Skočaj, M., Resnik, N., Grundner, M., Ota, K., Rojko, N., Hodnik, V., Anderluh G., Sobota A., Maček P., Veranič P., Sepčič, K. 2014. Tracking cholesterol/sphingomyelin-rich membrane domains with the ostreolysin A-mCherry protein. *PLoS ONE*, 9, 3: 1–12
- Squires, C. H., Retallack, D. M., Chew, L. C., Ramseier, T. M., Schneider, J. C., & Talbot, H. W. 2004. Heterologous Protein Production in *P. fluorescens*. *BioProcess International*, 2:54–59
- Tan, S. Y., Rangasamy, M., Wang, H., Vélez, A. M., Hasler, J., McCaskill, D., Siegfried, B. D. 2016. RNAi induced knockdown of a cadherin-like protein (EF531715) does not affect toxicity of Cry34/35Ab1 or Cry3Aa to *Diabrotica virgifera virgifera* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 75: 117–124
- Térová, B., Heczko, R., & Slotte, J. P. 2005. On the importance of the phosphocholine methyl groups for sphingomyelin/cholesterol interactions in membranes: a study with ceramide phosphoethanolamine. *Biophysical Journal*, 88, 4: 2661–2669
- Tomita, T., Noguchi, K., Mimuro, H., Ukaji, F., Ito, K., Sugawara-Tomita, N., & Hashimoto, Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 26: 26975–26982
- States EPA. Biopesticides registration action documents *Bacillus thuringiensis* plant-incorporated protectants. 2001: 50 str.
- https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt_brad.htm (29.maj 2016)
- Vidic, I., Berne, S., Drobne, D., Maček, P., Frangež, R., Turk, T., Sepčič, K. 2005. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 109,3: 377–382
- Xia, L., Sun, Y., Ding, X., Fu, Z., Mo, X., Zhang, H., & Yuan, Z. 2005. Identification of cry-type genes on 20-kb DNA associated with Cry1 crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 51, 1: 53–58
- Zuniga-Navarrete, F., Gomez, I., Pena, G., Amaro, I., Ortiz, E., Becerril, B., Soberon, M. 2015. Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin domain II loop 1 as the

binding site of *Tenebrio molitor* cadherin repeat CR12. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 59: 50–57

Žužek, M. C., Maček, P., Sepčić, K., Cestnik, V., & Frangež, R. 2006. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. *Toxicon*, 48, 3: 264–271

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri realizaciji magistrske naloge.

Hvala mentorici doc. dr. Marjetki Podobnik za pomoč pri delu in izdelavi magistrske naloge, za potrpežljivost, strokovne nasvete in vse znanje, ki ste mi ga nesebično dali.

Posebna zahvala gre somentorici prof. dr. Kristini Sepčič. Z besedami ne morem povedati, koliko sem Vam hvaležna za vse, kar ste me naučili, za vso motivacijo in pomoč, za priložnost in strokovne nasvete, ki ste mi jih dali tekom celega študija. Hvala, da ste bili neizmerno potrpežljivi z mano in vedno imeli čas za moja vprašanja. Hvala, ker ste vedno zaupali vame.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Petru Mačku za usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge, za dolge in konstruktivne pogovore in nasvete glede raziskovalnega dela.

Iskreno se zahvaljujem tudi doc. dr. Mateju Butali. Hvala za pomoč, za vse praktične in koristne nasvete, potrpežljivost in razumevanje od mojega prvega vstopa v laboratorij, pa do konca študija.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Tomu Turku za podporo, zaupanje in pomoč tekom študija.

Hvala Nini Orehar za pomoč, nasvete, veliko potrpežljivost, spodbudo in znanje, ki ga je z mano delila v laboratoriju.

Zahvaljujem se dr. Mateju Skočaju za nesebično pomoč, motivacijo in konstruktivne nasvete. Hvala tudi Evi Kočar, Sari Podržaj, Ivani Pavlič, Blažu Vončini, Mihi Bahunu, Valeriji Vezočnik in dr. Maruši Novak za optimizem, pozitivno energijo in pomoč v laboratoriju.

Iskreno se zahvaljujem Tomažu Švigelju, Jelki Lenarčič in Aleksandri Šakanović za izjemno potrpežljivost, pomopodporo in srčne besede.

Zahvaljujem se dr. Jaki Razingerju in Špeli Modic iz Kmetijskega inštituta ter prof. dr. Igorju Križaju, dr. Jerneju Sribaru, dr. Adrijani Leonardi in Zorici Latinović iz Inštituta Jožef Štefan za izjemno pomoč.

Hvala tudi sošolcem in prijateljem, ki sem jih spoznala tekom študija; Behare Rexhepi, Adrijanu Ivanušcu, Anji Pavlin, Katji Fric, Benjaminu Bajželju, Gašperju Šolincu. Bili ste izredna podpora.

Posebna zahvala gre moji najboljši prijateljici Evi Kočar. Hvala za iskreno prijateljstvo, ki bo trajalo celo življenje.

Iskreno se zahvaljujem svoji družini za podporo. Hvala stricu, dr. Metodiju Dimkovskemu za nesebično pomoč tekom celotnega življenja, za dneve in mesece potrpežljivega dela in vse nasvete. Hvala, da si v meni zbudil ljubezen za knjigo in za to lepo vedo.

Posebna zahvala gre moji mami Gordani. Hvala za vso ljubezen in vsakdanjo podporo. Tvoja notranja moč in pozitivna energija me je motivirala tudi v najtežjih trenutkih.