

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Sara PODRŽAJ

**INTERAKCIJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA  
ERILIZINA A Z LIPIDI IN LIPIDNIMI  
MEMBRANAMI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Sara PODRŽAJ

**INTERAKCIJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA ERILIZINA A Z LIPIDI  
IN LIPIDNIMI MEMBRANAMI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij –2. stopnja

**INTERACTION OF THE RECOMBINANT PROTEIN ERYLYSIN A WITH  
LIPIDS AND LIPID MEMBRANES**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Univerzitetnega študija II. bolonjske stopnje Molekulska in funkcionalna biologija. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biokemijo, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorja asist. dr. Mateja Skočaja, za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: asist. dr. Matej SKOČAJ  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

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

Datum zagovora: 23.9.2016

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

Sara Podržaj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577(043.2)
KG	egerolizini/erilizin                      A/porotvorni                      kompleks/ceramid fosfoetanolamin/membranski označevalec
AV	PODRŽAJ, Sara, dipl. biol. (UN)
SA	SEPČIČ, Kristina (mentorica)/SKOČAJ, Matej (somentor)/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 ERILIZINA A Z LIPIDI IN LIPIDNIMI MEMBRANAMI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	X, 58 str., 16 pregl., 17 sl., 78 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Proteini iz družine egerolizinov so zaradi sposobnosti specifične vezave na lipide zanimivi, ker jih lahko uporabimo za označevanje ali tarčno uničevanje celic. Nedavno odkriti protein erilizin A (EryA) izoliran iz gobe <i>Pleurotus eryngii</i> , ki se specifično veže na lipid ceramid fosfoetanolamin (CPE) bi lahko uporabili kot bioinsekticid, saj CPE najdemo v večjih količinah v membranah celic insektov, mehkužcev in nekaterih protistov, v membranah vretenčarjev pa se pojavlja le v sledovih. V okviru magistrske naloge smo konstruirali plazmidni vektor za izražanje EryA, ki smo ga izolirali in preverili njegovo permeabilizacijsko aktivnost v kombinaciji s proteinom pleurotolizinom B (PlyB). Sposobnost vezave EryA na lipidne membrane z različno sestavo smo preverjali s testom hemolize, sedimentacijskim testom z uporabo multilamelarnih liposomov, sproščanjem kalceina iz liposomov napoljenih s kalceinom in površinsko plazmonsko resonanco. Ugotovili smo, da EryA v kombinaciji s PlyB ni hemolitičen za goveje ali piščančje eritrocite, za katere je znano, da v svojih membranah ne vsebujejo CPE. Pripravili smo liposome z različnimi razmerji CPE-ja, holesterola in 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholina, s katerimi smo preverili permeabilizacijsko aktivnost EryA v kombinaciji s PlyB v testu sproščanja kalceina. Ugotovili smo, da EryA in PlyB tvorita bi-komponentni citolitični kompleks in da EryA za uspešno vezavo potrebuje vsaj 5 molskih% CPE-ja in holesterol. Pripravili smo tudi sintetične liposome iz lipidov, ki posnemajo membrano praživali <i>Toxoplasma gondii</i> , na katere se EryA ni vezal v nobenem od preizkušenih testov. Cilj v nadaljnjih študijah je pripraviti fluorescenčno označeni rekombinantni EryA in ovrednotiti njegovo vezavo na membrane parazitov in škodljivcev.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
 DC UDC 577(043.2)  
 CX aegerolysin/erylysinA/pore-forming complex/ceramide  
 phosphoethanolamine/biomarker  
 AU PODRŽAJ, Sara  
 AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor)/SKOČAJ, Matej (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  
 TI INTERACTION OF THE RECOMBINANT PROTEIN ERYLYSIN A WITH LIPIDS AND LIPID MEMBRANES  
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
 NO X, 58 p., 16 tab., 17 fig., 78 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Proteins from the aegerolysin family are unique in their lipid-binding specificity. They can be used as specific membrane markers, or as means for targeted cell destruction. Recently discovered erylysin A (EryA) from the mushroom *Pleurotus eryngii* specifically binds to ceramide phosphoethanolamine (CPE). This protein could become a useful bioinsecticide, since CPE is found in higher quantities in cell membranes of insects, molluscs and some protists, but is only found in trace amounts among vertebrates. Within this thesis, we constructed a plasmid vector for EryA, isolated a recombinant EryA and tested its permeabilization activity in combination with pleurotolysin B (PlyB). We tested the membrane activity of EryA using hemolysis, sedimentation test with multilamellar liposomes, calcein release from calcein-loaded liposomes, and surface plasmon resonance. We found that the EryA/PlyB combination is not hemolytic for bovine or chicken erythrocytes which do not contain CPE in their cell membranes. We prepared liposomes with different molar ratios of CPE, cholesterol and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, and used them to test the permeabilization activity of EryA and PlyB in a calcein release assay. We found that EryA and PlyB form a bi-component cytolytic complex and that EryA requires cholesterol and at least 5 mol% of CPE for significant binding. As a model for testing, we prepared synthetic liposomes composed of lipids that mimic the cell membrane of a protozoan *Toxoplasma gondii*. We found that EryA does not bind to these liposomes in any of the tests. Future goal in EryA research will be preparation of a fluorescent recombinant EryA and evaluation of its binding to cell membranes of parasites and pests.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI IN HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV .....	3
2.1.1 <b>Struktura in lastnosti egerolizinov .....</b>	<b>3</b>
2.1.2 <b>Interakcije egerolizinov z lipidnimi membranami .....</b>	<b>4</b>
2.1.3 <b>Vloga egerolizinov pri razvoju organizma .....</b>	<b>5</b>
2.1.4 <b>Uporabnost egerolizinov.....</b>	<b>5</b>
2.2 OSTREOLIZIN A.....	5
2.3 ERILIZIN A.....	7
2.3.1 <b>Stabilnost in hemolitična aktivnost v surovem ekstraktu</b> <i>Pleurotus eryngii</i> .....	<b>7</b>
2.3.2 <b>Biokemijska karakterizacija erilizina A .....</b>	<b>7</b>
2.4 BIOLOŠKE MEMBRANE IN NJIHOVA SESTAVA .....	8
2.4.1 <b>Glavne skupine lipidov v bioloških membranah.....</b>	<b>8</b>
2.4.2 <b>Znotrajcelične membrane .....</b>	<b>9</b>
2.4.3 <b>Teorija membranskih raftov.....</b>	<b>9</b>
2.4.4 <b>Holesterol.....</b>	<b>10</b>
2.4.5 <b>Ceramid fosfoetanolamin in sfingomielin.....</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1 MATERIAL.....	13
3.1.1 <b>Kemikalije.....</b>	<b>13</b>
3.1.2 <b>Komplet za transformacijo bakterijskih celic.....</b>	<b>14</b>
3.1.3 <b>Raztopine za NaDS-PAGE elektroforezo .....</b>	<b>15</b>
3.1.4 <b>Raztopine za izolacijo in ekstrakcijo proteina erilizina A .....</b>	<b>16</b>
3.1.5 <b>Ostale raztopine .....</b>	<b>16</b>
3.1.6 <b>Gojišča za bakterije .....</b>	<b>17</b>
3.1.7 <b>Bakterijski sev .....</b>	<b>17</b>
3.1.8 <b>Proteini.....</b>	<b>17</b>
3.1.9 <b>Plazmid .....</b>	<b>17</b>

<b>3.1.10</b>	<b>Lipidi</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1.11</b>	<b>Liposomi</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1.12</b>	<b>Površinska plazmonska resonanca</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1.13</b>	<b>Laboratorijska oprema</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1.14</b>	<b>Drobna oprema</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>METODE</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Transformacija kompetentnih celic E. coli BL21(DE3) PlyS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Priprava gojišč in celic za produkcijo erilizina A</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Homogenizacija bakterijske usedline</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Ekstrakcija in čiščenje rekombinantnega proteina erilizina A z nikelj-afinitetno kromatografijo</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Menjava imidazolnega pufra</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Ionsko izmenjevalna kromatografija</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Multilamelarni liposomi (MLV)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Veliki unilamerlarni liposomi (LUV)</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Sedimentacijski test za določanje interakcij med proteini in liposomi</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.10</b>	<b>Priprava vzorcev s sedimentacijskega testa za NaDS-PAGE elektroforezo</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.11</b>	<b>Površinska plazmonska resonanca</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.12</b>	<b>Poskusi s površinsko plazmonsko resonanco</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.13</b>	<b>Test sproščanja kalceina iz liposomov</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.14</b>	<b>Test hemolitične aktivnosti erilizina A</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.15</b>	<b>Določanje velikosti in stabilnosti liposomov z metodo dinamičnega sipanja svetlobe</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>IZRAŽANJE IN IZOLACIJA ERILIZINA A</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>DOLOČANJE VELIKOSTI IN LIPIDNE SESTAVE LIPOSOMOV</b> .....	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>DOLOČANJE MOLSKEGA DELEŽA LIPIDOV V MEMBRANAH LIPOSOMOV</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>SEDIMENTACIJSKI TEST</b> .....	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>POSKUSI S POVRŠINSKO PLAZMONSKO RESONANCO</b> .....	<b>35</b>
<b>4.6</b>	<b>SPROŠČANJE KALCEINA IZ LIPOSOMOV</b> .....	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>TEST HEMOLIZE</b> .....	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>52</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Toksinski označevalci lipidnih tarč, ki so obogatene v membranskih raftih .....	10
Preglednica 2:	Komplet za transformacijo bakterijskih celic .....	14
Preglednica 3:	Raztopine in pufri za NaDS-PAGE elektroforezo.....	15
Preglednica 4:	Pufri za izolacijo in ekstrakcijo proteina .....	16
Preglednica 5:	Sestava eritrocitnega pufra in pufra za liposome.....	16
Preglednica 6:	Sestava tekočih in trdnih gojišč LBAp .....	17
Preglednica 7:	Bakterijski sev .....	17
Preglednica 8:	Egerolizini .....	17
Preglednica 9:	Plazmid z zapisom za protein erilizin A.....	17
Preglednica 10:	Lipidi .....	18
Preglednica 11:	Sestava liposomov, molska razmerja, (molski%), binarni in tri-lipidni liposomi .....	19
Preglednica 12:	Pufri in raztopine za površinsko plazmonsko resonanco .....	19
Preglednica 13:	Večja laboratorijska oprema in proizvajalci .....	20
Preglednica 14:	Drobna laboratorijska oprema in proizvajalci .....	21
Preglednica 15:	Izmerjeni povprečni hidrodinamski radiji velikih unilamelarnih liposomov. ....	32
Preglednica 16:	Molska razmerja lipidov v posameznih testiranih liposomih.....	33



## KAZALO SLIK

Slika 1:	Strukturne razlike sfingolipidov; sfingomielin in ceramid fosfoetanolamin	12
Slika 2:	Bakterijski plazmidni vektor pET-21a(+), ki smo ga vstavili v <i>E.coli</i> za izražanje proteina erilizina A.....	22
Slika 3:	NaDS-PAGE gel po čiščenju rekombinantnega erilizina A z Ni-NTA afinitetno kromatografijo in barvanju z barvilom SimplyBlue SafeStain .....	30
Slika 4:	NaDS-PAGE gel po čiščenju rekombinantnega erilizina A z ionsko-izmenjevalno kromatografijo.....	31
Slika 5:	Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na binarne multilamelarne liposome .....	34
Slika 6:	Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na multilamelarne liposome s trojno lipidno sestavo in z različnimi molskimi deleži ceramid fosfoetanolamina.....	34
Slika 7:	Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na multilamelarne liposome s trojno lipidno sestavo in z različnimi molskimi deleži holesterola .....	34
Slika 8:	Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na multilamelarne liposome pripravljene iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita <i>Toxoplasma gondii</i> .....	35
Slika 9:	Analiza vezave EryA in PlyB na binarne velike unilamelarne liposome s pomočjo površinske plazmonske resonance.....	36
Slika 10:	Analiza vezave EryA in PlyB na tri-lipidne velike unilamelarne liposome z različnimi molskimi deleži ceramid fosfoetanolamina s pomočjo površinske plazmonske resonance .....	37
Slika 11:	Analiza vezave EryA in PlyB na tri-lipidne velike unilamelarne liposome z različnimi molskimi deleži holesterola s pomočjo površinske plazmonske resonance...	38
Slika 12:	Analiza vezave EryA in PlyB na velike unilamelarne liposome, pripravljene iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita <i>Toxoplasma gondii</i> , s pomočjo površinske plazmonske resonance .....	39
Slika 13:	Kinetika sproščanja kalceina iz binarnih malih unilamelarnih liposomov... 40	
Slika 14:	Kinetika sproščanja kalceina iz tri-lipidnih malih unilamelarnih liposomov z različnimi molskimi deleži ceramid fosfoetanolamina.....	41

- Slika 15: Kinetika sproščanja kalceina iz tri-lipidnih malih unilamelarnih liposomov z različnimi molskimi deleži holesterola..... 42
- Slika 16: Kinetika sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih liposomov, iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita *Toxoplasma gondii*. ..... 43
- Slika 17: Grafični prikaz deleža sproščenega kalceina v odvisnosti od koncentracije c EryA/PlyB iz malih unilamelarnih liposomov s kalceinom. .... 44

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
Asp-hemolizin	hemolizini iz organizma <i>Aspergillus fumigatus</i>
c	koncentracija
CDC	od holesterola odvisni citolizini
CPE	ceramid fosfoetanolamin
DAG	diacilglicerol
EryA	erilizin A
EryB	erilizin B
Hol	holesterol
LUV	veliki unilamerlarni liposomi
MACPF	kompleks, ki napade membrano/perforin
MLV	multilamelarni liposomi
Ni-NTA	nikelj nitriltriocetna kislina
OD <sub>600</sub>	absorbanca (optična gostota pri valovni dolžini 600 nm)
Oly	ostreolizin
PlyB	pleurotolizin B
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
RU	resonančna enota
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata
SM	sfingomielin
SPR	površinska plazmonska resonanca
TCA	triklorocetna kislina

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Leta 2002 so Berne in sod. (2002) iz užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) izolirali domnevno hemolitičen protein ostreolizin (Oly), ki spada v družino egerolizinov. Shibata in sod. (2010) so v nadaljevanju iz možininega ostrigarja (*Pleurotus eryngii*) (Poler in sod., 1998) prvič izolirali nov bi-komponentni hemolizin, ki ga sestavljata proteina erilizin A (EryA) in erilizin B (EryB). EryA spada v isto družino proteinov kot Oly. Egerolizini so veliki med ~13 in 20 kDa, so kisli in razširjeni med različnimi taksoni. Najdemo jih med glivami, bakterijami, rastlinami in celo pri virusih. Nekateri egerolizini so hemolitični za sesalčje eritrocite, v tej družini pa so tudi taki (npr. pleurotolizin A (PlyA), OlyA in EryA), ki tvorijo bi-komponentne litične komplekse s proteinskim partnerjem, ki ima domeno MACPF/CDC (ang. Membrane Attack Complex/Perforin/Cholesterol Dependant Cytolysins) (Ota in sod., 2014; Lukyanova in sod., 2015; Novak in sod., 2015). V takšnih kompleksih se egerolizinski partner najprej veže na specifične membranske lipide, čemur sledi vezava proteina z domeno MACPF, kar posledično vodi v tvorbo transmembranske pore (Ota in sod., 2013; Lukyanova in sod., 2015).

Bhat in sod. (2015) so raziskali vezavo rekombinantnih egerolizinskih proteinov iz rodu ostrigarjev, to so OlyA, PlyA in EryA, na liposome sestavljene iz ceramid fosfoetanolamina (CPE), sfingomielina (SM) in različnih sterolov. V svoji raziskavi so se med steroli osredotočili predvsem na holesterol in uporabili liposome z ekvimolarno sestavo CPE : sterol ter našli protein, ki se je specifično vezal izključno na kombinacijo CPE : Hol (1 : 1), EryA. Ključna lastnost egerolizinov je vezava na določene lipidne domene. Egerolizini so posledično primerne molekule za označevanje in raziskovanje membranskih lipidnih domen, tarčni vnos molekul v notranjost celic, njihova sposobnost tvorbe por lahko služi za uničevanje specifičnih tipov celic, v namene imunoloških diagnostičnih orodij pa lahko uporabimo protitelesa proti egerolizinom.

### 1.2 CILJI IN HIPOTEZE

Cilj naloge je bil pridobiti rekombinantni protein EryA in podrobneje raziskati, kako koncentraciji CPE in Hol vplivata na interakcijo EryA z liposomi različnih sestav. Hkrati smo želeli preveriti interakcijo EryA z liposomi v kombinaciji s proteinom pleurotolizinom B (PlyB). V magistrskem delu smo uporabili molekularne metode za izražanje rekombinantnega EryA, za raziskave interakcije EryA z lipidnimi membranami pa smo uporabili test hemolize, sedimentacijski test, test sproščanja kalceina in površinsko plazmonsko resonanco. Kot proteinski partner EryA smo

uporabili PlyB, ki je 97 % identičen EryB, slednji je del bi-komponentnega citolizina v kombinaciji z EryA v produkcijskem organizmu. Del naloge je bil tudi preveriti, ali bo kombinacija EryA in PlyB permeabilizirala liposome.

Hipoteze:

- Predvidevamo, da bo kombinacija EryA in PlyB tvorila pore.
- Predvidevamo, da bo kombinacija EryA in PlyB permeabilizirala liposome, kjer sta prisotna CPE in Hol, tvorbe por pa ne bo v liposomih s SM.
- Predvidevamo, da EryA in PlyB ne bosta permeabilizirala eritrocitnih membran, saj te ne vsebujejo CPE.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV

Glive so med raziskovalci pridobile veliko pozornosti, saj so ekonomsko zelo pomembne (Ngai in Ng, 2006). Zanimivi pa so tudi njihovi proteini. Med primere biološko aktivnih proteinov izoliranih iz gob spadajo lektini (Wang in sod., 1996), lakaze (Giardina in sod., 1999), protiglivni proteini (Lam in Ng, 2001) in hemolizini (Berne in sod., 2002). Hemolizini v vodnih raztopinah nastopajo kot monomeri ali oligomeri, ob prisotnosti membran pa se nanje vežejo v obliki citolitičnega porotvornega kompleksa. V splošnem citolitične proteinske toksine klasificiramo kot porotvorne toksine, citotoksine ali hemolizine (Shibata in sod., 2010).

Prvi egerolizinski protein je bil izoliran leta 1975 iz patogene glive *Aspergillus fumigatus*, in poimenovan Asp-hemolizin (Sakaguchi in sod., 1975). Družina egerolizinov (Pfam 06355; IPR 009413) je poimenovana po egerolizinu izoliranem iz užitne gobe topolovke (*Agrocybe aegerita*), ki ga kodira gen *Aa-PriA1* (Fernandez Espinar in Labarere 1997). V družino egerolizinov (UniProt podatkovna baza) je do sedaj uvrščenih preko 350 proteinov (Novak in sod., 2015). Egerolizine najdemo pri glivah, nekaterih patogenih bakterijah, rastlinah in celo pri virusih (Berne in sod., 2009). Večino genov, ki kodirajo egerolizine najdemo med debli Ascomycota in Basidiomycota, ki sta sestrski skupini v kraljestvu gliv (Vidic in sod., 2005). Največje število vrst z egerolizinskimi geni pripada rodu *Aspergillus* (Galagan in sod., 2003).

#### 2.1.1 Stuktura in lastnosti egerolizinov

Vsi do danes izolirani egerolizini in njihove rekombinantne oblike imajo molekulska teža med ~13 in 20 kDa, nizko izoelektrično točko, za njih je značilno tudi, da postanejo nestabilni pri višjih temperaturah in ostanejo membransko aktivni v širokem pH območju (Berne in sod., 2009; Novak in sod., 2015). Z uporabo bioinformatičnih orodij Jpred3 (Cole in sod., 2008), HYPROSPII (Lin in sod., 2005) in PredictProtein (Rost in sod., 2004), ki nam omogočajo napoved sekundarne strukture proteina z vnosom enega samega aminokislinskega zaporedja ali pa poravnave več zaporedij, je bila napovedana večinska  $\beta$ -struktura ( $\beta$ -list) egerolizinov (Berne in sod., 2009). Berne in sod. (2005) so na primeru ostreolizina te napovedi eksperimentalno preverili. Analize sekundarne in terciarne strukture s cirkularnim dikroizmom (CD) in infrardečo spektroskopijo s transformacijo po Fourier-u (FTIR) so pokazale, da ima ostreolizin pri vrednosti pH 7,8 prisotne 66 %  $\beta$ -strukture (Sepčić in sod., 2003; Berne in sod., 2005). Na primerih ostreolizina (Berne in sod., 2005) in terelizina (ang. terrelysin) (Nayak in sod., 2011) so ugotovili, da se  $\beta$ -list ohranja vse do pH 3, kar je tudi minimalna

vrednost, pri kateri so proteini še aktivni. Pod to vrednostjo pH se sekundarna struktura egerolizinov spremeni v večinsko  $\alpha$ -vijačno sekundarno strukturo. To kaže na velik pomen  $\beta$ -strukture pri aktivnosti egerolizinov.

Egerolizinska proteinska domena je sestavljena iz približno 10 % aromatskih in 20-24 % nabitih aminokislinskih (AK) ostankov. Glivni egerolizini imajo v svojem AK zaporedju skupek negativno nabitih aminokislin. Ta negativni skupek je homologen vezavnemu mestu receptorja za lipoproteine majhne gostote (LDL) pri človeku (Berne in sod., 2009). Asp-hemolizin, ki ima te značilne negativno nabite skupke se veže z oksidiranimi lipoproteini majhne gostote (oksi-LDL) in lizofosfatidilholinom (lizo-PC), kar so pokazali Kudo in sod. (2002). Ti skupki bi lahko bili odgovorni tudi za prepoznavo holinskega dela sfingomielina, kakor predlagajo Sakurai in sod. (2004). Zelo verjetno strukturno in funkcionalno vlogo imajo značilno ohranjeni cisteinski in določeni triptofanski AK ostanki, ki so prav tako del egerolizinske proteinske domene. Za hemolitično aktivnost ostreolizina in Asp-hemolizina so nujno potrebni ohranjeni cisteinski ostanki (Berne in sod., 2002; Kudo in sod., 2002). S triptofani bogate regije so pri nekaterih porotvornih proteinih odgovorne za začetno vezavo proteina na membrano (Kamaguchi in sod., 1979; Hong in sod., 2002). Kombinacija aromatskih in cisteinskih ostankov pa naj bi bila vpletena pri vezavi od holesterola-odvisnih bakterijskih citolizinov (CDC; ang. cholesterol dependent cytolysins) na sterole (Ramachandra in sod., 2002).

### 2.1.2 Interakcije egerolizinov z lipidnimi membranami

Asp-hemolizin v membranah eritrocitov tvori značilne pore, kar privede do hemolize. Poleg tega je opisan kot eden izmed tistih egerolizinov, ki je litičen brez proteinskega partnerja B. OlyA, PlyA in EryA sami po sebi niso hemolitični. Za vse tri egerolizine je dokazano, da so hemolitično aktivni le v kombinaciji s proteinskim partnerjem B. Sestava kompleksa pri pleurotolizinu, izoliranem iz gobe *Pleurotus ostreatus*, poteka tako, da se 15 kDa egerolizinska komponenta PlyA veže na membrano, čemur se nato priključi PlyB (59 kDa), ta spada med proteine MACPF, skupaj oligomerizirajo in tvorijo 700 kDa velik 13-merni proteinski kompleks, v katerem sta PlyA in PlyB v molarnem razmerju 2 : 1 (Lukoyanova in sod., 2015). Najbolj učinkovita hemolitična aktivnost komponent PlyA in PlyB se kljub temu pokaže pri molarnem razmerju 3 : 1 (Tomita in sod., 2004; Sakurai in sod., 2004). Raziskave egerolizinov iz bukovega ostrigarja so pokazale, da ti za vezavo na membrano potrebujejo specifično kombinacijo SM in Hol (Sepčić in sod., 2004; Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013). Nedavno pa so Bhat in sod. (2015) ugotovili, da se nekateri egerolizini izolirani iz rodu *Pleurotus* specifično vežejo tudi na CPE in na kombinacijo CPE/holesterol.

### 2.1.3 Vloga egerolizinov pri razvoju organizma

Kljub številnim raziskavam biološka vloga egerolizinov še ni dokončno razjasnjena. Za OlyA, Aa-Pri1 in EryA so pokazali, da so prisotni oz. močno izraženi v primordijih in plodiščih gliv (Fernandez Espinar in Labarere 1997; Berne in sod., 2002; Lee in sod., 2002; Vidic in sod., 2005; Joh in sod., 2007; Kurahashi in sod., 2014). Podobno se je izkazalo tudi pri izražanju Asp-hemolizina in terelizina (Wartenberg in sod., 2011; Nayak in sod., 2012). Podatki kažejo na to, da imajo ti egerolizini pomembno vlogo pri razvoju, vendar pa so zaradi zmožnosti tvorbe tako dvo-komponentnih kot več-komponentnih kompleksov lahko opisani tudi kot pleiotropni proteini, saj so verjetno vpleteni v več različnih fizioloških procesih. Njihove raznolike biološke vloge so zanimive tudi za uporabo v biotehnologiji (Novak in sod., 2014).

### 2.1.4 Uporabnost egerolizinov

Egerolizini imajo proti-tumorske, proti-proliferacijske in antibakterijske sposobnosti (Berne in sod., 2009). Asp-hemolizin je smrtno nevaren toksin, ki pri osebah z oslABLJENIM imunskim sistemom lahko povzroči komplikacije pri aspergiliozi (Berne in sod., 2009). Na živalskih modelih so pokazali, da anti-Asp-hemolizin imunoglobulin G uspešno prepreči takšno infekcijo pri miših, kar bi lahko z nadaljnimi raziskavami uporabljali tudi pri imunsko oslABLJENIH pacientih (Ebina in sod., 1982). Zaradi selektivnosti egerolizinov za različne lipide in kombinacije lipidov, so pomembni kot membranski označevalci. Prav ta lastnost je bila podrobno raziskana na primeru OlyA, ki se specifično veže na membranske domene obogatene s holesterolom in sfingomielinom (lipidne rafte) (Sepčić in sod., 2004; Skočaj in sod., 2014).

## 2.2 OSTREOLIZIN A

Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) je nepatogena, užitna lesna goba, ki jo je lahko gojiti. Razširjena je po gozdovih Evrope, Severne Amerike in Azije (Cohen in sod., 2002). Po celem svetu jo množično gojijo za prehrano ljudi in živali, raziskuje pa se tudi njeno medicinsko biotehnološko uporabnost, saj ima ta goba tudi velik potencial razkrojevanja lignoceluloze (Cohen in sod., 2002). Iz bukovega ostrigarja sta Bernheimer in Avigad (1979) izolirala domnevno hemolitični protein Ply, Berne in sod. (2002) so v nadaljevanju iz iste vrste gobe izolirali domnevno hemolitični protein Oly. Tako Oly kot Ply spadata v egerolizinsko družino proteinov. Molekulska teža Oly je 15 kDa, njegova izoelektrična točka je 5,0, je termolabilen, okarakteriziran je bil kot domnevno hemolitičen za goveje eritrocite (Berne in sod., 2002). Hemolitično aktivnost in izražanje Oly so spremljali med različnimi stopnjami razvoja gobe in ugotovili, da se



je hemoliza in produkcija Oly pojavila šele z začetkom razvoja plodišč (Berne in sod., 2002).

Sepčić in sod. (2004) so ugotovili, da se Oly veže na membrane, ki vsebujejo Hol in SM. Vezava je bila mogoča na podprtih monoslojih, protein pa je uspešno permeabiliziral tudi sonicirane liposome, vendar le pri sestavi SM/Hol ali dipalmitoilfosfatidilholin/Hol. Tomita in sod. (2004) so nato ugotovili, da Oly ali nativni PlyA, ki sta si zelo podobna, sama po sebi nista hemolitična. V nadaljevanju se je izkazalo, da je bila v prvih nativnih izolatih poleg Oly prisotna tudi neznatna količina primesi PlyB, kar je dejansko povzročilo hemolizo govejih eritrocitov (Ota in sod., 2013). OlyA je homologen PlyA in EryA iz vrst *P. ostreatus* in *P. eryngii* (Tomita in sod., 2004; Shibata in sod., 2010). Ugotovljeno je bilo, da PlyA in PlyB vsak posebej nista hemolitična (Tomita in sod., 2004, Sakurai in sod., 2004). PlyB ima domeno MACPF, ki je značilna za proteine MACPF/CDC (Rosado in sod., 2008). Ravno podobnost 3D stuktur med PlyB in MACPF/CDC proteini je vzpodbudila ponovno raziskavo hemolitične aktivnosti Ply in Oly (Ota in sod., 2013). Oba proteina so zato ponovno izolirali in očistili. Pripravili so tudi rekombinanten ostreolizin poimenovan OlyA6, ki je 95 % identičen PlyA in  $\Delta 48$ PlyB, ki ustreza nativni obliki zrelega PlyB. V svoji raziskavi so Ota in sod. (2013) pokazali, da so bili prvi izolati ostreolizina nepopolno ločeni ter pokazali interakcijo med OlyA6 in membranami bogatimi s SM in Hol. Čeprav OlyA6 membran sam ne permeabilizira, pa so opazili, da inducira spremembe v obliki liposomov.  $\Delta 48$ PlyB sam prav tako ne kaže afinitete do liposomov bogatih s SM in Hol, niti se nanje učinkovito ne veže (Ota in sod., 2013). OlyA in PlyB skupaj pa sta permeabilizirala eritrocite in velike unilamelarnih liposome (LUV) iz SM in Hol. Z uporabo elektronskega mikroskopa so ugotovili, da  $\Delta 48$ PlyB in OlyA tvorita pretežno 13-merne oligomere. Porotvorni kompleks je rozetaste strukture, debel okoli 9 nm, z zunanjim premerom 19,7 nm in notranjim premerom 4,9 nm (Ota in sod., 2013).

Vse te ugotovitve so nakazovale na možnost uporabe OlyA kot netoksičnega označevalca s SM in Hol bogatih membranskih domen. Skočaj in sod. (2014) so raziskovali, ali je mogoče z uporabo fluorescenčno označenega rekombinantnega OlyA (OlyA-mCherry) označiti lipidne domene sestavljene iz SM/Hol na umetnih membranskih sistemih in membranah pasjih epitelnih ledvičnih celic (ang. MDCK; Madin-Darby canine kidney). Ugotovili so, da ima OlyA-mCherry podobne karakteristike vezave kot OlyA. Z OlyA-mCherry so uspešno označili s SM/Hol obogatene domene živih in fiksiranih MDCK celic. Pokazali pa so tudi, da se OlyA-mCherry v živih celicah MDCK internalizira preko kalveolina in v 90 min pride v bližino jedra. Ti podatki nakazujejo, da je uporaba tega rekombinantnega proteina zelo obetavno orodje za označevanje domen obogatenih s SM/Hol na živih in fiksiranih celicah, poleg tega pa bi ga lahko preiskusili kot dostavno sredstvo bioaktivnih molekul v notranjost celic (Skočaj in sod., 2014).

## 2.3 ERILIZIN A

Hemolizini so bili do pred kratkim izolirani le iz nekaj vrst gob, med njimi sta vrsti *Pleurotus ostreatus* in *Agrocybe cylindracea* (Berne in sod., 2002). Ngai in Ng (2006) sta uporabila drugo vrsto gobe, *Pleurotus eryngii*, z namenom izolacije hemolizina in raziskave njegovih bioloških aktivnosti.

Ngai in Ng (2006) sta domneven hemolizin, eringeolizin, izolirala iz svežih plodišč *P. eryngii*. Rezultati N-terminalnega sekvenciranja prvih 40 aminokislin so pokazali 80 % identičnost N-terminalnega zaporedja med eringeolizinom, osterolizinom ali egerolizinom. Hkrati pa so pokazali tudi, da je gradbena podobnost med eringeolizinom in bakterijskimi hemolizini majhna. Eringeolizin je stabilen med 0 in 30 °C in ni stabilen pri temperaturah nad 40 °C. Dovzeten je za inaktivacijo s tripsinom, tako da po zaužitju in prehodu skozi prebavni trakt ni več aktiven. Edini sladkor, ki je vplival na inhibicijo hemolitične aktivnosti je bil N-glikolneuraminska kislina pri večji koncentraciji (Ngai in Ng, 2006).

Shibata in sod. (2010) so pozneje iz *P. eryngii* izolirali nov bi-komponentni hemolizin, EryA in EryB. Hemolitična aktivnost je bila opažena samo, ko so uporabili zmes EryA in EryB.

### 2.3.1 Stabilnost in hemolitična aktivnost v surovem ekstraktu *Pleurotus eryngii*

Surov ekstrakt hemolizina je občutljiv na povišano temperaturo, njegova aktivnost se namreč po dveh urah pri temperaturi 37 °C zmanjša, po petih urah pa je protein postane neaktiven. Pri inkubaciji pri 25 °C protein ostane relativno stabilen 55 ur, če ga shranimo pri 4 °C pa se mu aktivnost v 15-ih dneh zmanjša za 40 %. Aktivnost hemolizina se v celoti ohrani 150 dni, če je shranjen pri –30 °C. Ko so erilizin ločili na EryA in EryB, ima EryB  $T_m$  pri 37 °C, EryA pa  $T_m$  pri 47 °C, kar kaže na to, da je EryB manj stabilen (Shibata in sod., 2010).

### 2.3.2 Biokemijska karakterizacija erilizina A

Pri vrednosti pH 7,2 je EryA v obliki 15 kDa velikega homodimera, EryB pa je sestavljen iz dveh komponent, EryB1 (15 kDa) in EryB2 (37 kDa), ki se ju ne da ločiti z ionsko izmenjevalno kromatografijo, gelsko filtracijo ali hidrofobno kromatografijo, zato verjamejo, da nastopa kot heterodimer. EryA in EryB sta zelo podobna PlyA in PlyB v molekularni masi, N-terminalnem koncu in notranjem AK zaporedju. S spektroskopijo CD so preverili sekundarni strukturi in glede na rezultate predvidevajo, da ima EryA pretežno  $\beta$ -strukturo, EryB pa  $\alpha$ -strukturo. Iz rezultatov, kjer so uporabili

gelsko filtracijo predvidevajo, da EryA pri fizioloških pogojih (pH 7,5) nastopa kot dimer (Shibata in sod., 2010).

Bhat in sod. (2015) so EryA pripravili kot rekombinantni fluorescenčni fuzijski EryA-EGFP in ga uspešno uporabili kot orodje za označevanje membran parazita *Trypanosoma brucei*, ki kroži po krvnem obtoku in za katerega je znano, da ima v celični membrani CPE ne pa tudi SM. EryA-EGFP se je vezal na zunanji del celične membrane krvne oblike tripanosome, ni pa se vezal na prociklično obliko, ki ima v svoji membrani SM.

## 2.4 BIOLOŠKE MEMBRANE IN NJIHOVA SESTAVA

Celične membrane so ključnega pomena za življenje celice. Plazemska membrana celico obdaja, definira njene meje in vzdržuje razlike med citosolom in zunanjim okoljem, ki so bistvene za normalno delovanje celice (Alberts in sod., 2002). Vse biološke membrane imajo v osnovi fosfolipidni dvosloj, razlikujejo pa se v sestavi lipidov in skupkih proteinov, ki so mednje usidrani (Lodish in sod., 2000). Po definiciji so lipidi v vodi netopne biološke molekule, dobro pa so topne v organskih topilih, kot je kloroform (Berg in sod., 2002). Lipidi imajo vrsto bioloških vlog, saj služijo kot gorivo, signalne molekule in komponente celičnih membran (Berg in sod., 2002). Individualne molekule znotraj posameznega monosloja se lahko hitro difuzijsko gibljejo, zato pravimo, da je lipidni dvosloj fluiden. Lipidne molekule v vodi spontano tvorijo lipidne dvosloje (Alberts in sod., 2002).

### 2.4.1 Glavne skupine lipidov v bioloških membranah

V človeških membranah najdemo med deset tisoč in sto tisoč različnih vrst lipidnih molekul (Sud in sod., 2007; Lingwood in Simons, 2010). V splošnem pa lahko lipide razdelimo v tri glavne skupine. Pri evkariontih največji delež lipidov predstavljajo glicerofosfolipidi, med katere spadajo: fosfatidilholin, fosfatidilinozitol, fosfatidilserin, fosfatidna kislina in drugi. Hidrofobni del glicerofosfolipidov je diacilglicerol (DAG), na katerega sta večinoma vezani dve acilni verigi s 14 do 24 ogljikovimi atomi in fosfatna skupina, ki je večinoma dodatno zaestrena. Več kot 50 % fosfolipidov v evkariontskih membranah predstavlja fosfatidilholin, ta se spontano samoorganizira kot planarni dvosloj in ima cilindrično obliko. Fosfatidilholin ima v svojo strukturo večinoma vključeno vsaj eno *cis*-nenasičeno acilno verigo, zato je pri sobni temperaturi v tekočem stanju (van Meer in sod., 2008). Naslednji pomemben razred lipidov so sfingolipidi, kamor prištevamo SM in glikosfingolipide. Hrbtenica sfingolipidov je sestavljena iz ceramida, repi pa so nasičeni ali *trans*-nenasičeni, kar omogoči tvorbo debelejših membran, kot jih tvorijo glicerofosfolipidi z isto dolžino acilnih verig.

Sfingolipidi se urejajo bližje skupaj in pri sobni temperaturi preidejo v gel-stanje, razen ob prisotnosti sterolov, ki so tretji pomembni lipidi evkariontskih membran (van Meer in sod., 2008).

#### **2.4.2 Znotrajcelične membrane**

Endoplazemski retikulum je glavni celični organel za sintezo lipidov, kjer se sintetizira glavno ogrodje glicerofosfolipidov in Hol (Bell in sod., 1981). V endoplazemskem retikulumu pa poteka tudi sinteza triacilglicerolov, holesterolnih estrov in ceramidno ogrodje tako sfingolipidov kot galaktozil ceramidov (Sprong in sod., 1998). Holesterol v endoplazemskem retikulumu najdemo v nizkih koncentracijah, čeprav je tam mesto njegove sinteze, celica ga večinoma namreč vgradi v membrane drugih organelov (van Meer in sod., 2008). V Golgijevem aparatu pride do glavnega sortiranja lipidnih molekul, kjer se razporejajo s proteinskimi receptorji in na podlagi afinitete do določenih lipidov. Golgijev aparat je tudi mesto modifikacij sfingolipidov v bolj kompleksne zvrsti, ki se transportirajo večinoma na celično membrano. Naslednji organel, v katerem se sintetizira veliko število lipidov je mitohondrij, katerega notranja membrana je po sestavi zelo podobna bakterijski, saj vsebuje do eno četrtno kardiolipina (Daum, 1985). Velik delež fosfatidiletanolamina v primerjavi s fosfatidilholinom naj bi bil v istih membranah pomemben zaradi procesa oksidativne fosforilacije. Delež Hol pa je v mitohondrijskih membranah načeloma zelo majhen, razen v celicah, ki so vpletene v sintezo steroidnih hormonov (Strauss in sod., 2003).

#### **2.4.3 Teorija membranskih raftov**

Membranski rafti so dinamične nano-domene plazemskih membran sesalskih celic, obogatene s sfingolipidi in Hol in so ene izmed najbolj preučevanih membranskih domen. Lipidi so v membranskih raftih tesno pakirani, kljub temu pa imajo veliko lateralno gibljivost (Simons in Ikonnen, 1997; Pike, 2004). Sestava membranskih raftov se stalno spreminja na časovni skali manjši od sekunde in ker so to majhne (nekaj 10 nm) in nestabilne domene jih je zelo težko preučevati (Kenworthy in sod., 2000; Subczynski in Kussami, 2003; Hancock, 2006).

Zanimanje za membranske rafte je veliko, ker so udeleženi v številnih ključnih bioloških procesih. Delujejo kot platforme za ustaljene signalizacijske poti, pri prenosu bioloških signalov, v procesih endocitoze in eksocitoze (membranski transport), pri vstopu patogenih organizmov v celico ter pri vezavi mnogih ligandov, hkrati pa njihova okvara privede do različnih patoloških stanj (Simons in Ikonnen, 1997; London, 2002; Edidin, 2003; Lingwood in Simons, 2010; Simons in Gerl, 2010; Simons in Sampaio, 2011). Ugotovili so, da membranski rafti igrajo pomembno vlogo pri nevroloških

boleznih, kardiovaskularnih boleznih, karcinogenezi in imunskih boleznih, kot sta sistemski lupus in okužbi z virusom HIV, zato so zanimivi tudi v luči farmakoloških pristopov zdravljenja in preprečevanja bolezni (Michel in Bakovic, 2007).

Za vizualizacijo membranskih raftov so razvili več metod. Poleg različnih mikroskopskih tehnik se vzporedno razvijajo tudi orodja za vizualizacijo membranskih lipidov ali lipidnih domen, kot so fluorescenčni lipidni analogi ali proteinske molekule in protitelesa, ki se vežejo na lipidne komponente v membranah (Ishitsuka in sod., 2005). Trenutno so najbolj obetavne molekule za označevanje raftov netoksične fluorescenčno označene rekombinantne različice naravnih toksinov, ki se specifično vežejo na komponente raftov (Skočaj, doktorska disertacija, 2014). V preglednici 1 je predstavljenih nekaj primerov takšnih molekul in njihove tarče.

Preglednica 1 : Toksinski označevalci lipidnih tarč, ki so obogatene v membranskih raftih  
M, molekulska masa; SM, sfingomielin; Hol, holesterol (Skočaj doktorska disertacija, 2014) .

Protein	Organizem	M (kDa)	Prepozna	Referenca
Ekvinatoksin II	<i>Actinia equina</i>	20	SM	Bakrač in sod., 2008
Lizenin	<i>Eisenia foetida</i>	33.4	SM	Ishitsuka in sod., 2004
Perfringolizin O	<i>Clostridium perfringens</i>	54	Hol	Ohna-Iwashita, 2004
Ostreolizin A	<i>Pleurotus ostreatus</i>	15	Hol/SM	Sepčič in sod., 2004
Pleurotolizin A2	<i>Pleurotus eryngii</i>	15	Hol/SM	Bhat in sod., 2013
Podenota B toksina kolere	<i>Vibrio cholerae</i>	11.5	GM1	Bacia in sod., 2004

#### 2.4.4 Holesterol

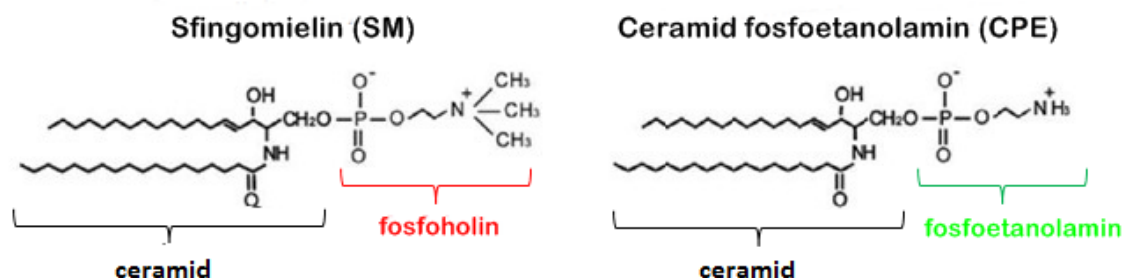
Pri sesalcih je izjemno pomemben lipid Hol, saj poveča urejenost membran in tako omogoča tvorbo urejene lipidne faze in s tem lateralnih lipidnih domen. Hol je ključen pri mnogih celičnih dogodkih, na pr. pri prenosu signalov ter pri endocitozi in eksocitozi (Wüstner, 2007). Poleg tega pa je tudi prekurzor za sintezo žolčnih kislin, oksisterolov, steroidnih hormonov in nevrosteroidov (Porter in Herman, 2011). Hol zaradi sodelovanja v vrsti celičnih dogodkov povezujejo s številnimi bolezenskimi stanji, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen (Liu in sod., 2010), aterosklerotični kardiovaskularni sindrom, z različnimi genetskimi boleznimi (Porter in

Herman, 2011), kot je na primer Niemann-Pickov sindrom (Schulze in Sandhoff, 2011). Dolgo je bila edina uporabna molekula za označevanje Hol polienski antibiotik filipin, ki pa je citotoksičen in zato uporaben le v primeru označevanja Hol pri fiksiranih celicah (Hassall in Graham 1995). Za označevanje celičnega Hol pa so razvili tudi vrsto neproteinskih molekul, fluorescenčnih derivatov Hol (Mukherjee, in sod., 1998; Hao in sod., 2002) in neionskih amfipatičnih analogov Hol. Najpogosteje so uporabljeni s fluoresceinom-označeni poli-(etilen glikol) holesteril estri (PEG-holesterol) (Sato in sod., 2004).

#### **2.4.5 Ceramid fosfoetanolamin in sfingomielin**

Ena od karakteristik sfingolipidov je njihova raznolikost med različnimi vrstami. Pri vretenčarjih je večinski sfingolipid SM, ki se večinoma nahaja v zunanji plasti plazemske membrane (Ohanian in Ohanian, 2001), kjer ima pomembno strukturno vlogo in vlogo v znotrajcelični komunikaciji. Ob hidrolizi SM namreč pride do nastanka ceramida, ki deluje kot sekundarni sporočevalec (Hannun, 1996). Kvasovke kot je *Saccharomyces cerevisiae* SM ne sintetizirajo, njihov glavni sfingolipid je inozitol fosforil ceramid (IPC) (Cowart in Obeid, 2007). CPE je analog SM in je eden pomembnejših lipidov pri nevretenčarjih in parazitih, v sesalčjih membranah pa ga najdemo samo v sledovih (Bhat in sod., 2015). Podobno je pri Gram-negativnih bakterijah, ki razen nekaj izjem ne sintetizirajo SM temveč IPC ali CPE (White in sod., 1969) ali njegovo različico dihidroCPE (LaBach in White, 1969). Muhe in mušice iz podredu Brachycera imajo CPE (Kraut, 2011), večina nevretenčarjev (Lepidoptera, Hymenoptera in Arachnida) pa sintetizirajo CPE in SM za vgradnjo v celično membrano (O'Connor in sod., 1970; Yang in sod., 1974; Abeytunga in sod., 2004). Mehkužci (školjke in hobotnice) in ožigalkarji imajo namesto CPE njegov analog ceramid aminoetilfosfonat, globokomorske školjke in polži pa imajo oba lipida (Kellermann in sod., 2012; Hori in sod., 1967). Parazit *Trypanosoma brucei*, ki povzroča afriško spalno bolezen pri ljudeh in bolezen nagana pri domačih živalih, (Sutterwala in sod., 2008) ima dva značilna proliferativna stadija: prociklično obliko, ki živi v črevesju muh cece in obliko, ki kroži po krvnem obtoku okuženih ljudi in živali. Prociklična oblika ima v celični membrani SM in IPC, krvna pa SM in CPE (Bhat in sod., 2015). Na Sliki 1 je prikazana struktura SM, ki ima kot polarno glavo fosfoholin, na istem mestu pri CPE pa je fosfoetanolamin, kar vodi v močnejše medmolekulske interakcije kot med molekulami SM. SM tvori značilne lipidne domene s Hol, CPE pa s Hol na modelnih membranah ne tvori takšnih domen (Térová in sod., 2005). CPE so odkrili tudi v membranah drugih parazitov, kot je npr. *Toxoplasma gondii* (Welti in sod., 2007).

Za produkcijo CPE v sesalčjih celicah sta odgovorna encima SMSr (ang. SM synthase-related), v endoplazemskem retikulumu in v manjši meri SM sintaza 2 (Vacaru in sod., 2009, Ternes in sod., 2009). SMSr, ki katalizira prenos polarne glave fosfatidiletanolamina (PE) do ceramida (Cer), producira CPE samo v sledovih kot negativni regulator količine Cer v endoplazemskem retikulumu (Bhat in sod., 2015). Pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*) pa je za večinsko produkcijo CPE v Golgijevem aparatu odgovorna CPE sintaza (CPES), ki uporabi citidin difosfat etanolamin kot donor glavine skupine (Vacaru in sod., 2013). Najvišje stopnje CPE pri vinski mušici so zasledili na začetku faze ličinke, kar kaže na pomembno vlogo tega lipida med zgodnjim razvojem. Če med razvojem perifernih živcev pri mušici pride do pomanjkanja CPE to vodi do nepopolnega ovijanja aksonov z membranami glia celic in razvije se fenotip z nevropatijo (Ghosh in sod., 2013).



Slika 1: Strukturne razlike sfingolipidov; sfingomielin in ceramid fosfoetanolamina

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Kemikalije

Aceton	MERCK, Nemčija
AEBSF	Sigma, ZDA
Akrilamid	BIO-RAD Laboratories, ZDA
Amonijev persulfat (APS)	BIO-RAD Laboratories, ZDA
Benzamid	Sigma, ZDA
BSA	Sigma, ZDA
DNAza	Sigma, ZDA
EDTA	Ambion, ZDA
Etanol	Carlo Erba Reagents, Italija
Glicin	Sigma, ZDA
HCl	MERCK, Nemčija
HIS-Select Nickel Affinity Gel	Sigma, ZDA
Imidazol	Sigma, ZDA
Izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid (IPTG)	Sigma, ZDA
Kalcein	Sigma, ZDA
Kloroform	MERCK, Nemčija
Lizocim	MERCK, Nemčija
Metanol	Avantor Performance Materials, ZDA
$\beta$ -Merkaptoetanol	MERCK, Nemčija
NaCl	MERCK, Nemčija
NaOH	MERCK, Nemčija
Ni-NTA Agaroz	Qiagen, Nemčija
OG (N-oktil- $\beta$ -glukopiranozid)	Biosynth, Švica



PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, ZDA
PMSF	Sigma, ZDA
2-propanol	MERCK, Nemčija
RNAza (R4875 Ribonukleaza A)	Sigma, ZDA
Sefadex G-50	GE Healthcare, Švedska
NaDS	Sigma, ZDA
TCA	Sigma, ZDA
TEMED	Sigma, USA
Tris	MERCK, Nemčija
Tris-HCl	MERCK, Nemčija
Triton X-100	Sigma, ZDA

### 3.1.2 Komplet za transformacijo bakterijskih celic

Preglednica 2: Komplet za transformacijo bakterijskih celic

---

TransformAid Bacterial Transformation Kit #K2710, #K2711	Thermo Scientific ZDA
---	-----------------------

---

### 3.1.3 Raztopine za NaDS-PAGE elektroforezo

Preglednica 3: Raztopine in pufri za NaDS-PAGE elektroforezo

Pufer za NaDS-PAGE (10x)	10 g NaDS 30,3 g Tris 144 g glicin dH <sub>2</sub> O do 1.000 ml
Nanašalni pufer za vzorce	NuPAGE LDS (Novex ZDA) Sample Buffer (4x)
Raztopina za barvanje gelov NaDS	SimplyBlue (Invotrogen ZDA) SafeStain
Tekočina za razbarvanje gelov NaDS	dH <sub>2</sub> O
Raztopina za ločevalni NaDS gel (12 %)	40 % akrilamid (1.200 µl) dH <sub>2</sub> O (2069,3 µl) 3M Tris pH 8,8 (500 µl) 10 % NaDS (26,7 µl) APS 1,5 % (166,6 µl)
Raztopina za nanašalni NaDS gel	40 % akrilamid (333,3 µl) dH <sub>2</sub> O (1963,3 µl) 0,5 M Tris pH 6,8 (833,3 µl) 10 % NaDS (33,3 µl) APS (166,7 µl) Temed (3,33 µl)

---

### 3.1.4 Raztopine za izolacijo in ekstrakcijo proteina erilizina A

Preglednica 4: Pufri za izolacijo in ekstrakcijo proteina

Pufer za homogenizacijo bakterijskih celic	10 mM imidazol, pH 8,0, 10 mg/ml DNAza B, 20 µg/ml RNAza, 100 mg/ml lizocim 20 mM β-merkaptoetanol, 1 M benzamid, 200 mM 4-(2-aminoetil)-benzensulfonil fluorid hidroklorid, 200 mM fenilmetilsulfonil fluorid
Pufri za Ni-NTA kromatografijo	za lizo: 10x fosfatni pufer, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol za spiranje: 10x fosfatni pufer, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol za elucijo: 10x fosfatni pufer, 300 mM NaCl 300 mM imidazol
Pufri za ionsko izmenjevalno kromatografijo	pufer A 20 mM Tris (pH 8,0) pufer B 20 mM Tris, 1 M NaCl (pH 8) etanol – denaturirani
Pufer za dializo	20 mM Tris (pH 8,0)

### 3.1.5 Ostale raztopine

Preglednica 5: Sestava eritrocitnega pufra in pufra za liposome

Eritrocitni pufer	130 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4 v dH <sub>2</sub> O
Pufer za liposome	20 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

### 3.1.6 Gojišča za bakterije

Preglednica 6: Sestava tekočih in trdnih gojišč LBAp

---

LBAp 25 g/l	Formedium, VB
dH <sub>2</sub> O	
Agar 15 g/l	MERCK, Nemčija
Ampicilin	Sigma, ZDA

---

Za trda gojišča je potrebno pred avtoklaviranjem dodati agar v končni koncentraciji 15 g/l. Ampicilin dodamo po avtoklaviranju v zmerno ohlajen medij (končna koncentracija 100 µg/ml).

### 3.1.7 Bakterijski sev

Preglednica 7: Bakterijski sev

---

*E. coli* BL21 (DE3)pLysS

---

### 3.1.8 Proteini

Preglednica 8: Egerolizini

---

PlyB	pripravila dr. Katja Ota (po postopku Ota in sod., 2013)
OlyA	pripravil dr. Matej Skočaj (po postopku Ota in sod., 2013)

---

### 3.1.9 Plazmid

Preglednica 9: Plazmid z zapisom za protein erilizin A

---

pET-21a(+) GenScript, ZDA

---

### 3.1.10 Lipidi

Preglednica 10: Lipidi

---

CPE- ceramid fosforiletanolamin	Matreya LCC, ZDA
Hol- holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
POPC- 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilholin	Avanti Polar Lipids, ZDA
SM- sfingomielin (iz prašičjih možganov)	Avanti Polar Lipids, ZDA
CER-ceramid (iz prašičjih možganov)	Avanti Polar Lipids, ZDA
PI- fosfatidil inozitol (iz jeter)	Avanti Polar Lipids, ZDA
16:0 lizo PC-1-palmitoil-2-hidroksi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin	Avanti Polar Lipids, ZDA
PE- L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamin	Sigma, ZDA
PS- L- $\alpha$ -fosfatidil-L-serin	Sigma, ZDA

---

### 3.1.11 Liposomi

Preglednica 11: Sestava liposomov, molska razmerja, (molski%), binarni in tri-lipidni liposomi

Binarni liposomi	Tri-lipidni in drugi liposomi
SM : Hol (1 : 1)	CPE : POPC : Hol (1 : 1 : 1)
CPE : Hol (1 : 1)	CPE : POPC : Hol (0,5 : 1 : 1)
CPE : POPC (1 : 1)	CPE : POPC : Hol (10 : 45 : 45)
CPE : POPC (5 : 95)	CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5)
POPC : Hol (1 : 1)	CPE : POPC : Hol (1 : 49,5 : 49,5)
	CPE : POPC : Hol (5 : 65 : 30)
	CPE : POPC : Hol (5 : 85 : 10)
	<i>Toxoplasma</i> (57 % POPC, 1,5 % SM, 19 % PE, 2,4 % CPE, 3,6 % PI, 5,1 % PS, 4,3 % CER, 0,2 % lizo PC, 8 % Hol)

### 3.1.12 Površinska plazmonska resonanca

Preglednica 12: Pufri in raztopine za površinsko plazmonske resonanco

Pufri in raztopine	puffer za liposome, NaOH (50 mM), BSA (0,1 mg/ml)
Raztopine za regeneracijo L1 čipa	OG (40 mM), NaDS (0,5 %), NaOH (200 mM), izopropanol NaOH

### 3.1.13 Laboratorijska oprema

Preglednica 13: Večja laboratorijska oprema in proizvajalci

Oprema	Proizvajalec
Vibracijski stresalnik Vibromix 114 EV	Tehtnica, Slovenija
Analitska tehtnica Sartorius MC P, Sartorius L420S	Sartorius, Nemčija
Rotavapor R-134, V-850	Büchi, Švica
Magnetno mešalo IKA RET basic	IKA, Nemčija
pH-meter Mettler Toledo	Mettler Toledo, Nemčija
Vibracijski stresalnik Vibromix 203 EVT	Tehtnica, Slovenija
Centrifuga Sigma 3-30 KS	Sigma Centrifuge, Nemčija
Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5418	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga Biofuge 13	Heraeus, Nemčija
Centrifuga CENTRIC 322A	Tehtnica, Slovenija
Centrifuga Sorvall LYNX 6000	Thermo Scientific, ZDA
Centrifuga Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen, Nemčija
Aparatura za NaDS-PAGE elektroforezo	BIO-RAD, ZDA
BIO-RAD PowerPac 1000	
Stresalnik The Belly Dancer	Stovall Life Science, ZDA
Skener CanonScan LiDE 70	Canon, Japonska
Sonikator Sonics Vibra-cell VCX 750	Sonics and Materials, ZDA
Fluorescenčni čitalec mikrotitrnih plošč Zenyth 3100	Anthos Labtec, Avstrija
Software for Anthos	
Električni kuhalnik za vodno kopel	Korona Electric, Nemčija
Ekstrudor Avestin Lipid Extrudor	Avestin, Kanada
membrane za ekstruzijo	
Refraktometer Biacore X, čip L1	GE Healthcare, Švedska
Biacore X Control Software	
BIA Evaluation 3.2 RC1	

---

Se nadaljuje

### Nadaljevanje preglednice 13

Preglednica 13: Večja laboratorijska oprema in proizvajalci

---

Spektrofotometer Nanodrop 1000	Thermo Scientific, ZDA
Termostatiran stresalnik Thermo Shaker TS100	GmbH, Nemčija
MRX Revelation Microplate Reader	Dynex, VB
Amersham Pharmacia Biotech P-920	GE (General Electric), ZDA

---

### 3.1.14 Drobna oprema

Preglednica 14: Drobna laboratorijska oprema in proizvajalci

---

Oprema	Proizvajalec
Dializne vrečke Spectra/Por size 6.000-8.000	Spectrum Labs.; ZDA
Ultrafiltratorji Amicon Ultra - 4	Merck Millipore, ZDA
Filter Millipore Express PES Membrane 0,22 µm	Merck Millipore, ZDA
Steklene kroglice	Sigma-Aldrich, ZDA

---

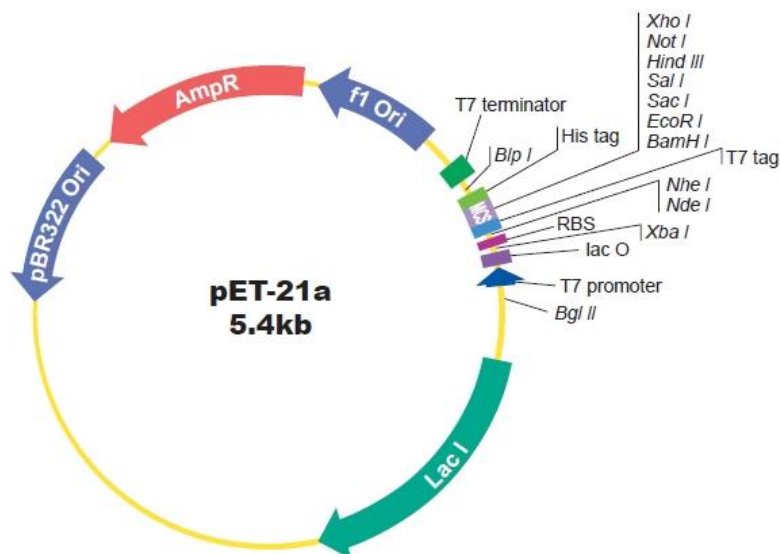
## 3.2 METODE

### 3.2.1 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* BL21(DE3) PlyS

Plazmid pET-21a(+) z zapisom za protein EryA (Slika 2) smo naročili pri podjetju GenScript (ZDA) in ga s postopkom transformacije vstavili v sev *E. coli* BD21(DE3) PlyS.

Plazmid pET-21a(+) nosi N-terminalno T7-Tag zaporedje in C-terminalno His-Tag zaporedje. Ima selekcijski marker za rezistenco proti ampicilinu, kot je to prikazano na Sliki 2.





Slika 2: Bakterijski plazmidni vektor pET-21a(+), ki smo ga vstavili v *E.coli* za pridobitev proteina erilizina A

Kompetentne celice BD21(DE3)Plys, shranjene pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  smo sterilno z ezo razmazali na trdno gojišče s kanamicinom do posamezne kolonije. Bakterijske celice smo čez noč gojili pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Naslednji dan smo izvedli transformacijo s kompletom po navodilih proizvajalca. Transformirane celice smo ob gorilniku prelili na trdno gojišče z ampicilinom (LBAp) in jih preko noči gojili pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Priprava gojišč in celic za produkcijo erilizina A

Pripravili smo si tekoče gojišče LBAp: 2x po 100 ml in 6x 500 ml. Ampicilin smo dodali po avtoklaviranju gojišč, v končni koncentraciji  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ , tik pred dodatkom bakterijskih celic.

V 100 ml LBAp-gojišča, ki smo ga predhodno segreli na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  smo prenesli eno kolonijo transformiranih celic, ki so zrastle na LBAp-plošči. Gojišče z bakterijskimi celicami smo stresali čez noč pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vsa gojišča s 500 ml LB smo do naslednjega dne pustili na sobni temperaturi.

V vsako 500 ml LBAp-gojišče smo prenesli po 10 ml prekonočne kulture transformiranih bakterijskih celic in jih stresali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  do ustrezne optične gostote ( $\text{OD}_{600}$ ). Pri  $\text{OD}_{600} = 0,49$  smo prenehali s stresanjem in gojišča prenesli na sobno temperaturo. Vsem 500 ml gojiščem smo dodali po  $50\text{ }\mu\text{l}$  1M IPTG, ki je potreben za indukcijo sinteze proteina, saj sproži prepisovanje *lac* operona. Transformirane celice z dodatkom IPTG smo nato preko noči stresali pri  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po končanem stresanju smo

zopet pomerili OD<sub>600</sub> tako, da smo odvzeli 200 µl prekončne kulture in 800 µl svežega tekočega LB gojišča. Dobljen OD<sub>600</sub> smo pomnožili s 5, da smo dobili dejansko optično gostoto. Bakterijske kulture smo prelili v 1 l centrifugirke, in jih centrifugirali 10 min pri 4 °C in 2.769 x g. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in bakterijske usedline resuspendirali, da smo lahko vsebino prenesli v eno 50 ml centrifugirko. Bakterijsko kulturo smo zopet centrifugirali pri 4 °C, 8.000 obr./min (Lynx 6000) 10 min, da smo odstranili ves supernatant. Usedlino smo zamrznili pri -20 °C. Maso bakterij smo dobili tako, da smo stehali prazno, nato pa še polno centrifugirko in dobili razliko, ki je predstavljala maso bakterij.

Pred in po indukciji smo vzeli 1 ml bakterijskih celic, kulturi smo ustrezno redčili na OD<sub>600</sub> = 0,6 in centrifugirali pri sobni T, 10.000 rpm (Eppendorf 5418), 2 min. Odstranili smo supernatant in usedline zamrznili pri -20 °C. Kasneje smo vzorce uporabili za preverjanje indukcije z NaDS-PAGE elektroforezo.

### **3.2.3 Homogenizacija bakterijske usedline**

Zamrznjene bakterije smo naslednji dan odtalili in jim dodali ustrezen volumen 10 mM imidazolnega pufra (20 ml 10 mM imidazolnega pufra na 10 g bakterij). Nato smo dodali 20 µl DNaze (10 mg/ml), 20 µl PMSF (200 mM), 20 µl AEBSF (20 mM), 20 µl benzamida (1 M), 40 µl RNaze (20 µg/ml), 100 µl lizocima (100 mg/ml) in 28 µl merkaptotetanol. Zmes smo krožno premešali, nato pa smo centrifugirko na vertikalnem stresalniku stresali 30 min pri 4 °C. Po stresanju smo vsebino centrifugirke sonicirali. Soniciranje je potekalo v intervalih 10 s prižgano, 10 s ugasnjeno toliko časa, dokler nismo dobili homogene zmesi. Zmes smo prelili v centrifugirko in 30 min centrifugirali pri 12.159 × g in 4 °C. Supernatant smo odpipetirali v čisto centrifugirko. Usedlini smo dodali polovičen volumen vseh raztopin za homogenizacijo bakterijskih celic in celoten postopek ponovili. Drugi supernatant smo dodali k prvemu supernatantu.

### **3.2.4 Ekstrakcija in čiščenje rekombinantnega proteina erilizina A z nikelj-afinitetno kromatografijo**

Čiščenje proteina smo pričeli z nanosom 1 ml suspenzije Ni-NTA agaroze na kolono. Nato smo na kolono nalili 10 ml dH<sub>2</sub>O, ko je vsa stekla skozi smo kolono ekvilibrirali z 10 ml 10 mM imidazolnega pufra (pufer za vezavo), čemur je sledil nanos vzorca. Ker smo EryA pridobili in izolirali kot protein z repkom His<sub>6</sub>, je prišlo do nastanka koordinacijskega kompleksa med His<sub>6</sub> in Ni<sup>2+</sup>. Po nanosu vzorca smo kolono sprali s pufrom za vezavo (8 ml) ter tako odstranili vse nevezane proteine, nato pa še z 20 mM imidazolnim pufrom (6 ml) za spiranje. Vežan rekombinantni protein pa smo eluirali s

6 ml 300 mM imidazolnega pufru za elucijo. Vse frakcije smo lovili v 2 ml plastične mikrocentrifugirke.

Vse vzorce z Ni-NTA smo nanegli na poliakrilakrilamidni gel in proteine v frakcijah analizirali z NaDS-PAGE elektroforezo.

### **3.2.5 Menjava imidazolnega pufru**

Frakcije, za katere smo ugotovili, da vsebujejo rekombinantni protein smo združili in jim zamenjali pufer. Vzorec smo odpipetirali v 50 ml centrifugator Amicon z 10 kDa velikimi porami. Vzorec smo večkrat centrifugirali 10-20 min pri sobni T na 3.000 x g, in mu po vsakem centrifugiranju dodali 20 mM Tris pufer, dokler nismo iz proteinskega vzorca odstranili imidazol. Koncentracijo imidazolnega pufru smo dodatno znižali s prekonočno dializo. Uporabili smo dializno vrečko, katero smo predhodno sprali v dH<sub>2</sub>O in in jo nato preko noči inkubirali v 2 l 20 mM Tris pufru, z vrednostjo pH 8,0. S pomočjo centrifugirke Amicon smo po končani dializi proteinske vzorce skoncentrirali in jih shranili pri -20 °C.

### **3.2.6 Ionsko izmenjevalna kromatografija**

Ionsko izmenjevalna kromatografija temelji na različnih nabojih, ki jih imajo biomolekule na svojem površju. Molekule se reverzibilno vežejo na nasprotno nabito stacionarno fazo. Molekule z močnejšim nabojem se močneje vežejo na stacionarno fazo. Vezani vzorec lahko selektivno spiramo s stacionarne faze s spremembo pH, ali pa spremembo koncentracije soli mobilne faze. Večji kot je naboj vezane molekule, večja je potrebna koncentracija soli.

Ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo izvajali na sistemu Amersham Pharmacia Biotech P-920 in uporabili Mono Q (10/100 ID 0020) kolono. Kolono smo sprali in ekvilibrirali s pufrom A, ki je imel nizko ionsko jakost, nato pa nanegli vzorec. Po nanosu vzorca smo s pufrom A sprali nevezane molekule. Pufer B je imel visoko ionsko jakost. Linearno smo poviševali koncentracijo soli do 100 % pufru B. Vzorce smo zbirali v mikrocentrifugirkah in z NaDS-PAGE elektroforezo preverili, v katerih frakcijah se nahaja rekombinantni protein.

### **3.2.7 Multilamelarni liposomi (MLV)**

Multilamelarne liposome (ang. Multilamellar Vesicles; MLV) smo pripravili v skupni koncentraciji lipidov 5 mg/ml in v končnem volumnu 0,5 ml. Lipidi so bili v obliki prahu shranjeni pri -80 °C, zato smo jih raztopili v mešanici kloroforma in metanola

2 : 1 (V/V). Koncentracija raztopljenega CPE je bila 5 mg/ml, POPC 50 mg/ml in Hol 50 mg/ml. Ustrezno izračunane volumne raztopljenih lipidov smo odpipetirali v bučke (10 ml), nato pa odparili topila z rotavaporjem pri počasnem vrtenju (do 4h, 45 mbar) (Büchi Switzerland Rotavapor R-134). Tanke lipidne filme smo resuspendirali v puftru za liposome ( $V = 500 \mu\text{l}$ ,  $T = 56 \text{ }^\circ\text{C}$ ) tako, da smo v bučko dodali steklene kroglice (Sigma) in vsebino bučk 2 min krožno mešali (Vortex IKA). Suspenzijo MLV smo odpipetirali v mikrocentrifugirke, jih prepihali z dušikom in shranili pri  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.2.8 Veliki unilamerlarni liposomi (LUV)**

MLV smo odmrznili in jih redčili do 1 mg/ml tako, da smo k  $100 \mu\text{l}$  MLV (5 mg/ml) dodali  $400 \mu\text{l}$  puftra za liposome. Redčene MLV smo potopili v tekoči dušik, nato pa v toplo vodo ( $45\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$ ), ter cikel še 5x ponovili, da smo dobili velike unilamelarne liposome (ang. Large Unilamellar Vesicles) LUV. Potrebovali smo LUV v velikosti 100 nm, kar smo dosegli z uporabo mini ekstrudorja (Avestin Lipid Extrudor) in membranami s porami v velikosti 100 nm. Dobljene LUV (100 nm) smo prepihali z dušikom in shranili pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.2.9 Sedimentacijski test za določanje interakcij med proteini in liposomi**

V mikrocentrifugirke smo prenesli  $20 \mu\text{l}$  EryA ( $30 \mu\text{M} = 0,5 \text{ mg/ml}$ ) in  $20 \mu\text{l}$  MLV (5 mg/ml), vsebino smo stresali 30 min pri 600 obr./min in sobni temperaturi. Po stresanju smo protein z MLV centrifugirali (Eppendorf Centrifuge 5418) 1h pri  $60.000 \times g$  in  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant smo previdno odpipetirali v čisto mikrocentrifugirko in mu dodali  $12,5 \mu\text{l}$  100 % TCA ter ga 10 min inkubirali na ledu. Po inkubaciji smo supernatant centrifugirali (Eppendorf 5415 R) 12 min pri  $13.200 \text{ obr./min}$  in  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . TCA smo previdno odpipetirali in zavrgli, v mikrocentrifugirko pa dodali  $300 \mu\text{l}$  hladnega acetona. Centrifugirali smo 5 min pri enakih pogojih aceton previdno odpipetirali in zavrgli. Usedlini smo dodali  $200 \mu\text{l}$  ledeno hladnega acetona in centrifugirali pri enakih pogojih. Aceton smo zavrgli, sedimente pa posušili v digestoriju.

### **3.2.10 Priprava vzorcev s sedimentacijskega testa za NaDS-PAGE elektroforezo**

Pripravili smo si 1x nanašalni pufer tako, da smo založni pufer (4x) redčili z destilirano vodo. Vsem vzorcem, tistim označenim kot sediment in supernatant, smo dodali po  $20 \mu\text{l}$  nanašalnega puftra in jih 3 min inkubirali pri  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorce smo nato nanegli na NaDS-PAGE gel in zagnali elektroforezo. Gel smo barvali s SimplyBlue SafeStain po navodilih proizvajalca.

### 3.2.11 Površinska plazmonska resonanca

Površinska plazmonska resonanca (ang. Surface Plasmon Resonance; SPR) je ena najpomembnejših metod proučevanja interakcij med makromolekulami (Beseničar in sod., 2006). SPR nam omogoča opazovanje molekulskih interakcij v realnem času in brez predhodnega označevanja molekul (Surface Plasmon Resonance, 2016). Pomembna prednost uporabe SPR pa je tudi majhna količina vzorca, ki ga potrebujemo (Beseničar in sod., 2006).

V našem poskusu smo uporabljali biosenzor Biacore X, katerega glavne komponente so senzorski čip, optični detektor in mikrotekočinski sistem (ang. IFC).

Za interakcije med različnimi molekulami se uporabljajo različni senzorski čipi z dvema merilnima celicama. Osnovna sestava so tri komponente: debelejša steklena plast, tanka plast zlata, ki je pomembna za generiranje SPR signala in plast dekstranskega matriksa. Dekstranski matriks vsebuje funkcionalne skupine na katere se vežejo molekule kot so proteini, lipidi, ogljikovi hidrati in nukleinske kisline, vezava je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. Molekule, katere imobiliziramo na površino senzorskega čipa imenujemo ligandi, molekule, ki so prosto v raztopini pa analiti (Surface Plasmon Resonance, 2016). Nastanek in razpad kompleksa sta kontrolirana s konstanto asociacije in disociacije. Krivuljo, ki se nam izriše pri vsakem SPR poskusu imenujemo sensorgram. Biacore sistem za opis spremembe signala uporablja 'resonančne enote' (RU), ki ustrezajo spremembi kritičnega kota za  $10^{-4}$  stopinje. Pri proteinih 1 RU ustreza okoli  $1 \text{ pg/mm}^2$  vezane snovi (Stenberg in sod., 1991).

### 3.2.12 Poskusi s površinsko plazmonsko resonanco

Uporabili smo senzorski čip L1. Držali smo se navodil za pripravo sistema Biacore X, pri katerem je potrebno ročno vbrizgavanje raztopin. Kot pufer za spiranje smo uporabili pufer za liposome, vse poskuse smo opravili pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pred vsakim novim nanosom LUV smo skozi mikrotekočinski sistem vbrizgali N-oktil- $\beta$ -glukopiranozid (OG), da smo sprali morebitne nečistoče s čipa. LUV smo nanašali v  $0,5 \text{ mM}$  ali  $1 \text{ mM}$  koncentraciji, samo preko merilne celice Fc2, s pretokom  $2 \text{ } \mu\text{l/min}$  in asociaciji  $600 \text{ s}$ . Nanosu LUV je sledil nanos  $50 \text{ mM}$  NaOH, s katerim smo sprali šibko vezane liposome, in nanos  $0,1 \text{ mg/ml}$  BSA, ki je zasedel prazna mesta na čipu in preprečil nespecifično vezavo proteina. Obe raztopini smo injicirali preko obeh pretočnih celic (Fc1 – referenčna celica. Fc2 – merilna celica) s pretokom  $10 \text{ } \mu\text{l/min}$  in pri asociaciji  $60 \text{ s}$ . Začeli smo z nanosom analitov, katere smo vbrizgali skozi obe celici pri pretoku  $10 \text{ } \mu\text{l/min}$ , asociaciji  $60 \text{ s}$  in disociaciji  $120 \text{ s}$ .

Analiti:

- Pufer za liposome (50  $\mu$ l)
- 40 nM PlyB (50  $\mu$ l)
- 1  $\mu$ M EryA (50  $\mu$ l)
- 5  $\mu$ M EryA (50  $\mu$ l)
- 1  $\mu$ M EryA + 40 nM PlyB (50  $\mu$ l)
- 5  $\mu$ M EryA + 120 nM PlyB (50  $\mu$ l)

Čip L1 smo med posameznimi poskusi regenerirali tako, da smo skozi obe pretočni celici vbrizgali različne kombinacije raztopin za regeneracijo čipa, dokler nismo dobili signal pod 50 RU.

### 3.2.13 Test sproščanja kalceina iz liposomov

Male unilamelarne liposome s kalceinom je pripravila kolegica Ivana Pavlic v okviru svoje magistrske naloge.

Pred začetkom poskusa je bilo potrebno odstraniti prosti kalcein, kar smo storili s prilagojeno gelsko kromatografijo. Uporabili smo kolone z volumnom 3 ml, na dnu katerih je bil filter. Na kolono smo skoraj do vrha nanesti Sephadex G-50, ki je bil prej suspendiran v pufru za liposome. Kolone smo centrifugirali (CENTRIC 322A) v 2 min intervalih pri nizkih obratih (1.000 obr./min, sobna T), dokler nismo dosegli ustrezne prožnosti gela. Na sredino kolone smo nanesti 50  $\mu$ l liposomov s kalceinom in jih centrifugirali pri nizkih obratih še 1-2 min. Po vsakem centrifugiranju smo dobljene frakcije prenesli v mikrocentrifugirke. Ko smo zbrali vse frakcije, smo jih pregledali in glede na barvo ločili uporabne od neuporabnih (prisoten kalcein). Fluorescenco liposomov smo pomerili s fluorescenčnim čitalcem mikrotitrskih plošč (Anthos Zeynth 3100) pred in po dodatku Tritona ter izračunali koliko  $\mu$ l liposomov moramo redčiti v pufru za liposome, da bomo pri vseh poskusih uporabljali enako koncentracijo liposomov.

Uporabili smo črne mikrotitrsko plošče z ravnim dnom in 96 jamicami. Plošče smo pripravili tako, da smo v jamice nanesti po 200  $\mu$ l BSA najmanj 30 min pred uporabo, nato pa vso odvečno tekočino odstranili. V vse jamice smo najprej dodali po 100  $\mu$ l pufru za liposome, nato pa samo v prvo jamico 2  $\mu$ l PlyB (1,475 mg/ml), 16  $\mu$ l EryA (0,5 mg/ml) in 82  $\mu$ l pufru za liposome, tako, da je bil končni volumen v prvi jamici 200  $\mu$ l. Zmes smo redčili tako, da smo iz prve jamice prenesli 100  $\mu$ l v drugo jamico, premešali in nadaljevali z redčenjem 1 : 2 do jamice 11. (Koncentracija EryA v 1. jamici je bila 20  $\mu$ g/ml, koncentracija PlyB pa 7,285  $\mu$ g/ml). Zadnjih 100  $\mu$ l smo zavrgli, tako nam je v 12. jamici ostalo samo 100  $\mu$ l pufru za liposome. Pripravili smo 6 ml pufru za liposome, ki smo mu dodali ustrezen volumen liposomov s kalceinom. V

vseh 12 jamic smo nato dodali po 100  $\mu$ l razredčenih liposomov, mikrotitersko ploščo vstavili v nosilec in zagnali program (Software for Anthos, protokol-kalcein kinetika triton). Po končanih meritvah smo v 12. jamico vnesli 2  $\mu$ l detergenta Triton X-100 (0,1%) ter ploščo vstavili nazaj v nosilec in zagnali program.

Delež sproščenega kalceina smo izračunali po enačbi:

$$\% \text{ sproščenega kalceina} = \left( \frac{F_{\max} - F_{\min}}{F_{\text{triton}} - F_{\min}} \right) \times 100 \quad \dots (1)$$

Kjer je  $F_{\max}$ , vrednost vsake posamezne redčitve proteinov v jamicah 1-11 v 45. (zadnjem) ciklu meritev,  $F_{\min}$  vrednost iz 12. jamice v 45. ciklu meritev za posamezne liposome pred dodatkom Triton X-100 in  $F_{\text{triton}}$  vrednost iz 12. jamice prvega cikla meritev po dodatku detergenta Triton X-100 za posamezne liposome.

### 3.2.14 Test hemolitične aktivnosti erilizina A

Uporabili smo goveje in piščančje eritrocite, katerim smo odstranili konzervans in jih 2x sprali z 0,9 % NaCl. Po zadnjem spiranju smo eritrocitom dodali eritrocitni pufer.

Hemolitično aktivnost smo merili s turbidimetrično metodo (Maček in Lebez, 1981) na mikrotitrskih ploščah z mikročitalcem Dynex MRX. Navidezno absorbanco suspenzije eritrocitov smo pri valovni dolžini 630 nm umerili na vrednost 0,5 z dodatkom eritrocitnega pufra, pH 7,4 (Skočaj, 2014). V jamice smo dali po 200  $\mu$ l eritrocitov, nato pa v različne jamice sledeče kombinacije vzorcev:

- OlyA, V = 1  $\mu$ l (0,44 mg/ml)
- EryA, V = 2  $\mu$ l (0,5 mg/ml)
- OlyA, V = 1  $\mu$ l + PlyB V=1  $\mu$ l
- EryA, V = 5  $\mu$ l + PlyB, V=2  $\mu$ l
- PlyB, V = 1  $\mu$ l (0, 295 mg/ml)
- Kontrola - samo eritrociti

Merili smo 45 min.

### 3.2.15 Določanje velikosti in stabilnosti liposomov z metodo dinamičnega sipanja svetlobe

Dinamično sipanje svetlobe (DLS; angl. dynamic light scattering) je metoda, ki se uporablja za določevanje velikosti delcev v raztopinah. Z DLS proučujemo dinamične lastnosti sipalnih delcev, preko katerih lahko sklepamo

na njihove strukturne lastnosti. Ta metoda je primerna za določevanje velikosti tistih delcev, ki so v raztopini podvrženi Brownovemu gibanju; to je naključno gibanje delcev zaradi trkov z molekulami topila in je odvisno od velikosti delcev (Dynamic Light Scattering: Measuring the Particle Size Distribution, 2016).

V stekleno cevko smo dali po 40  $\mu$ l vzorca LUV ter dodali 1 ml prefiltriranega pufra za liposome. Nato smo cevko vstavili v DLS aparat in pustili 10 min na 25 °C, da se je vzorec termostabiliziral. Za vsak vzorec smo naredili po 5 meritev pri kotu 90 stopinj ( $T = 25$  °C).

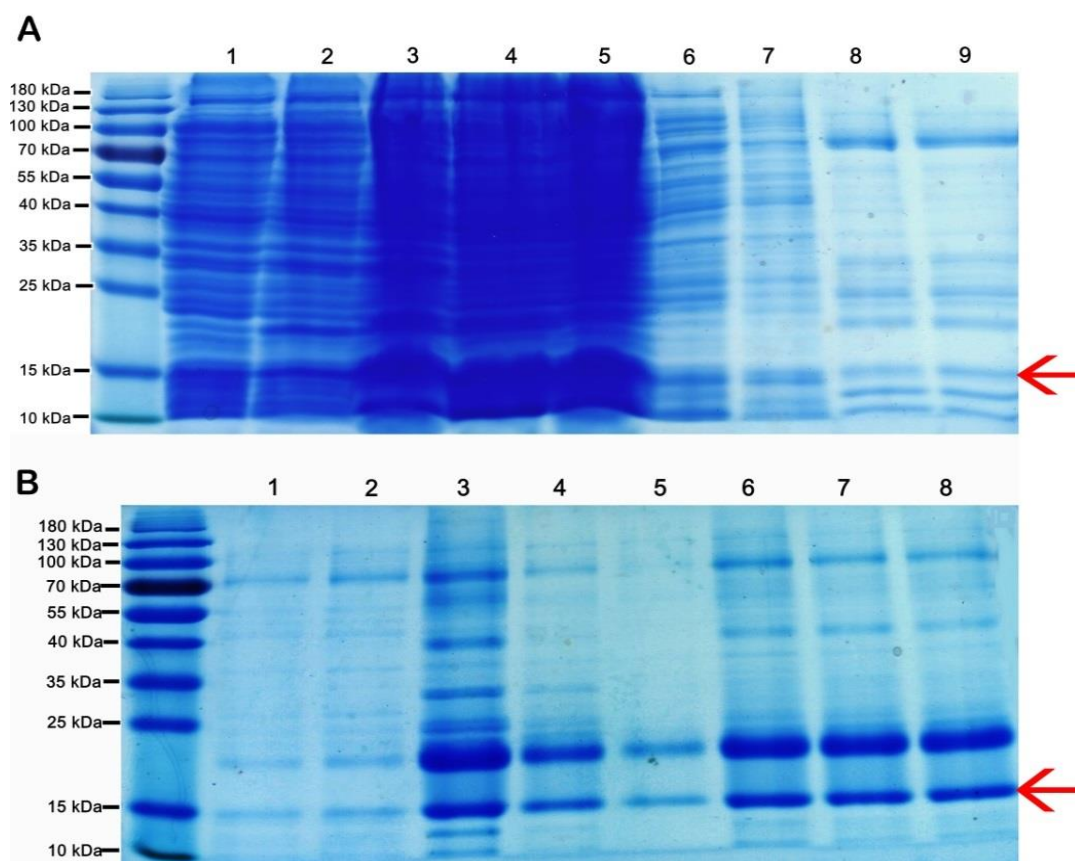
Vsako meritev posebej smo obdelali z računalniškim programom CONTIN. Na tak način smo določili hidrodinamske radije ( $R_h$ ) in iz teh 5 meritev izračunali povprečen hidrodinamski radij ter standardno deviacijo. Meritve, ki so preveč odstopale, smo pri izračunih zanemarili.



## 4 REZULTATI

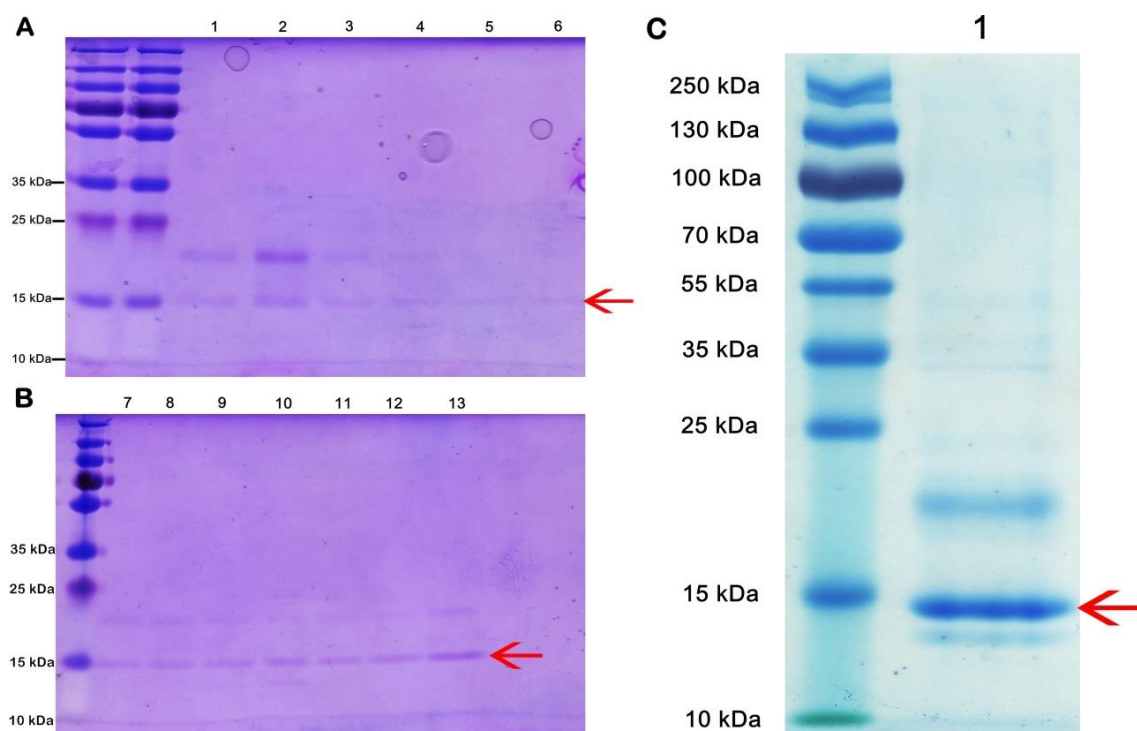
### 4.1 IZRAŽANJE IN IZOLACIJA ERILIZINA A

Protein EryA smo izražali kot protein s histidinskim repom ( $H_6$ ) v ekspresijskem sevju *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Izražanje proteina smo inducirali z IPTG in bakterijske celice gojili pri 21 °C, nato pa smo ga očistili z nikelj-afinitetno kromatografijo. Preostale proteinske nečistoče smo odstranili z ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Uspešnost sinteze EryA in čiščenje z Ni-NTA gelsko kromatografijo smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (Slika 3) in po barvanju s SimplyBlue SafeStain ugotovili, da je prišlo do prepisovanja zapisa za protein po dodatku IPTG, kar se vidi na močnejše izraženi lisi pri 15 kDa (velikost EryA). Opazimo tudi, da smo pri spiranju z 10 in 20 mM imidazolnim pufrom izgubili nekaj proteina, veliko večino pa smo uspešno eluirali po dodatku 300 mM imidazolnega pufra. Kljub vsemu je bilo še vedno prisotnih nekaj nečistoč.



Slika 3: NaDS-PAGE gel po čiščenju rekombinantnega erilizina A z Ni-NTA afinitetno kromatografijo in barvanju z barvilom SimplyBlue SafeStain; slika A prikazuje: 1-vzorec pred indukcijo, 2-vzorec po indukciji. 3-sediment po lizi bakterijskih celic, 4-supernatant (SN) po lizi, 5-SN po Ni-NTA, 6 in 7-spiranje z 10 mM imidazolnim pufrom, 8 in 9-spiranje z 20 mM imidazolnim pufrom. Slika B prikazuje: 1 in 2 spiranje z 20 mM imidazolnim pufrom, 3-8 elucija s 300 mM imidazolnim pufrom. Rdeča puščica označuje liso pri 15 kDa, ki predstavlja erilizin A.

Proteinske vzorce smo dodatno očistili z ionsko-izmenjevalno kromatografijo, s katero smo zaključili proces izolacije proteina. Čistost proteina smo preverili z NaDS-PAGE (Slika 4 A in B). Opazimo lahko, da je povsod prisotna lisa pri 15 kDa, ki predstavlja izoliran EryA v monomerni obliki. Nad to liso pa se pojavlja lisa v velikosti med 20 in 23 kDa. Skupno smo izolirali 1,7 ml EryA proteina v koncentraciji 0,72 mg/ml (48  $\mu$ M), katerega vzorec smo ponovno nanesti na NaDS-PAGE (Slika 4 C) in dobili močno liso v velikosti izoliranega EryA nad njo pa šibkejšo liso v velikosti med 20 in 23 kDa.



Slika 4: NaDS-PAGE gel po čiščenju rekombinantnega erilizina A z ionsko-izmenjevalno kromatografijo (A in B), vzorci po ionsko-izmenjevalni kromatografiji (1-13), C; EryA očiščen, in skoncentriran (0,72 mg/ml). Rdeča puščica označuje liso pri 15 kDa, ki predstavlja erilizin A.

## 4.2 DOLOČANJE VELIKOSTI IN LIPIDNE SESTAVE LIPOSOMOV

Vsi liposomi so bili ob meritvah stari 4 dni. Za pripravo LUV-ov smo uporabili membrane s porami v velikosti 100 nm, izmerjeni povprečni hidrodinamski radiji pa kažejo, da so liposomi nekoliko večji od pričakovanega, saj bi glede na način priprave morali imeti radije okoli 50 nm. Pri meritvah z DLS so težavni predvsem liposomi z višjim odstotkom CPE, saj radi agregirajo.

Preglednica 15: Izmerjeni povprečni hidrodinamski radiji velikih unilamelarnih liposomov

Sestava luv	Povprečen $r_h$ [nm]	SD
<b>CPE : POPC (1 : 1)</b>	67,71	1,68
<b>CPE : Hol (1 : 1)</b>	85,1	*
<b>SM : Hol (1 : 1)</b>	63,95	3,92
<b>POPC : Hol (1 : 1)</b>	70,92	1,65
<b>CPE : POPC (5 : 95)</b>	72	1,55
<b>CPE : POPC : Hol (1 : 1 : 1)</b>	59,71	1,52
<b>CPE : POPC : Hol (0,5 : 1 : 1)</b>	71,76	3,26
<b>CPE : POPC : Hol (5 : 65 : 30)</b>	64,75	1,33
<b>CPE : POPC : Hol (5 : 85 : 10)</b>	81,67	3,69
<b>CPE : POPC : Hol (10 : 45 : 45)</b>	72,75	4,5
<b>CPE : POPC: Hol (5 : 47,5 : 47,5)</b>	72,33	2,08
<b>CPE : POPC : Hol (1 : 49,5 : 49,5)</b>	70,1	7,06
<b>Toksoplazma</b>	73,52	3,23

### 4.3 DOLOČANJE MOLSKEGA DELEŽA LIPIDOV V MEMBRANAH LIPOSOMOV

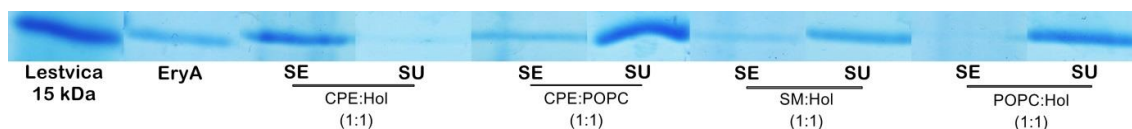
Rezultati kolorimetričnih testov za določanje količine CPE, Hol in POPC v membranah velikih unilamelarnih liposomov, ki jih je v okviru svoje diplomske naloge testirala Ivana Pavlic, so pokazali, da dejanska molska razmerja lipidov v nekaterih primerih nekoliko odstopajo od izračunanih vrednosti (Preglednica 14). Predvsem je opazen nekoliko višji delež CPE, ki se vgradi v liposome. Iste liposome smo uporabljali tudi pri tej nalogi (sedimentacijski test in SPR).

Preglednica 16: Molska razmerja lipidov v posameznih liposomih, testiranih v okviru naloge.

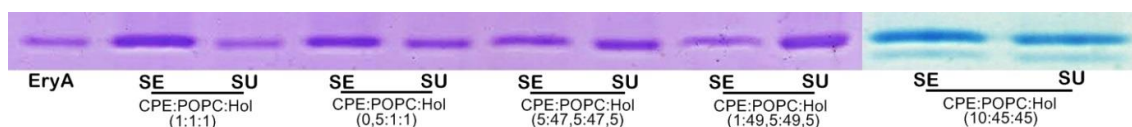
Liposomi (mol : mol)	CPE/SM (%)	POPC (%)	Hol (%)
<b>CPE : Hol (1 : 1)</b>	70	/	30
<b>CPE : POPC (1 : 1)</b>	84	16	/
<b>SM : Hol (1 : 1)</b>	44	/	56
<b>POPC : Hol (1 : 1)</b>	/	33	67
<b>CPE : POPC : Hol (1 : 1 : 1)</b>	31	34	36
<b>CPE : POPC : Hol (0,5 : 1 : 1)</b>	31	36	33
<b>CPE : POPC : Hol (10 : 45 : 45)</b>	14	44	42
<b>CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5)</b>	10	41	49
<b>CPE : POPC : Hol (1 : 49,5 : 49,5)</b>	3	41	56
<b>CPE : POPC : Hol (5 : 65 : 30)</b>	17	37	46
<b>CPE : POPC : Hol (5 : 85 : 10)</b>	15	40	45
<b>CPE : POPC : Hol (5 : 95 : 0)</b>	8	92	/

#### 4.4 SEDIMENTACIJSKI TEST

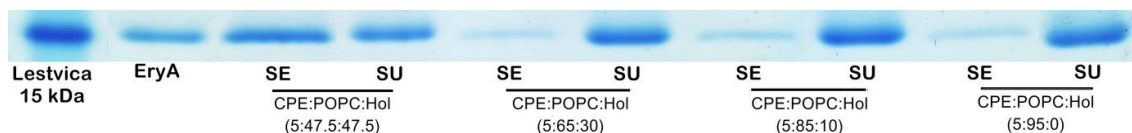
Slika 5 prikazuje rezultate sedimentacijskega testa binarnih multilamelarnih liposomov, kjer lahko opazimo, da je najmočnejša lisa, ki pomeni prisotnost proteina EryA v sedimentu CPE : Hol. Pri liposomih CPE : POPC vidimo šibkeje izraženo liso v sedimentu kot v supernatantu, pri SM : Hol je prav tako močnejše izražena lisa v sedimentu, opazimo pa jo tudi v supernatantu. Liposomi POPC : Hol imajo liso izraženo samo v supernatantu. Sedimentacijski test liposomov iz zmesi treh lipidov, kjer smo spreminjali molski delež CPE (Slika 6) prikazuje liso v sedimentu in supernatantu pri vseh liposomih, najbolj izražene pa so v sedimentu CPE : POPC : Hol (1 : 1 : 1) in CPE : POPC : Hol (0,5 : 1 : 1). Na sliki 7 sta proteinski lisi pri liposomih CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5) v sedimentu in supernatantu enako močno izraženi, pri ostalih liposomih v tej skupini (pri kateri smo spreminjali molske deleže Hol in POPC ob vzdrževanju 5 mol% CPE) pa je bolj izražena lisa supernatanta. Test, pri katerem smo uporabili sintetično pripravljene liposome, ki posnemajo membrano parazita *T. gondii*, prikazuje, da je ves protein ostal v supernatantu.



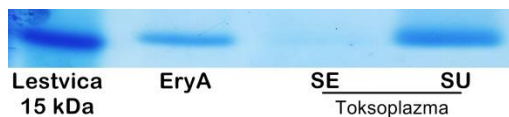
Slika 5: Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na binarne multilamelarne liposome. EryA-izoliran protein erilizin A kot kontrola velikosti, SE-sediment, SU-supernatant



Slika 6: Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na tri-lipidne multilamelarne liposome z različnimi molskimi deleži ceramid fosfoetanolamina. EryA-izoliran protein erilizin A kot kontrola velikosti, SE-sediment, SU-supernatant



Slika 7: Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na tri-lipidne multilamelarne liposome z različnimi molskimi deleži holesterola. EryA-izoliran protein erilizin A kot kontrola velikosti, SE-sediment, SU-supernatant

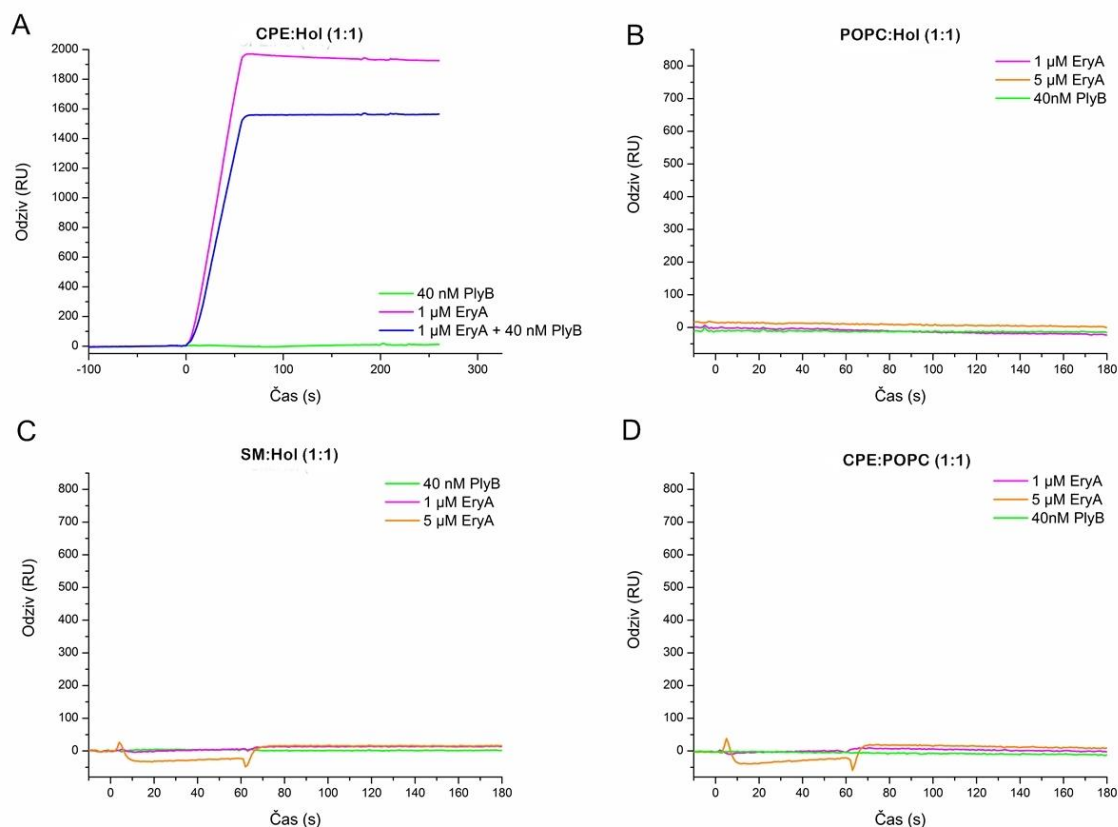


Slika 8: Rezultati sedimentacijskega testa vezave EryA na multilamelarne liposome pripravljene iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita *Toxoplasma gondii*. EryA-izoliran protein erilizin A kot kontrola velikosti, SE-sediment, SU-supernatant

#### 4.5 POSKUSI S POVRŠINSKO PLAZMONSKO RESONANCO

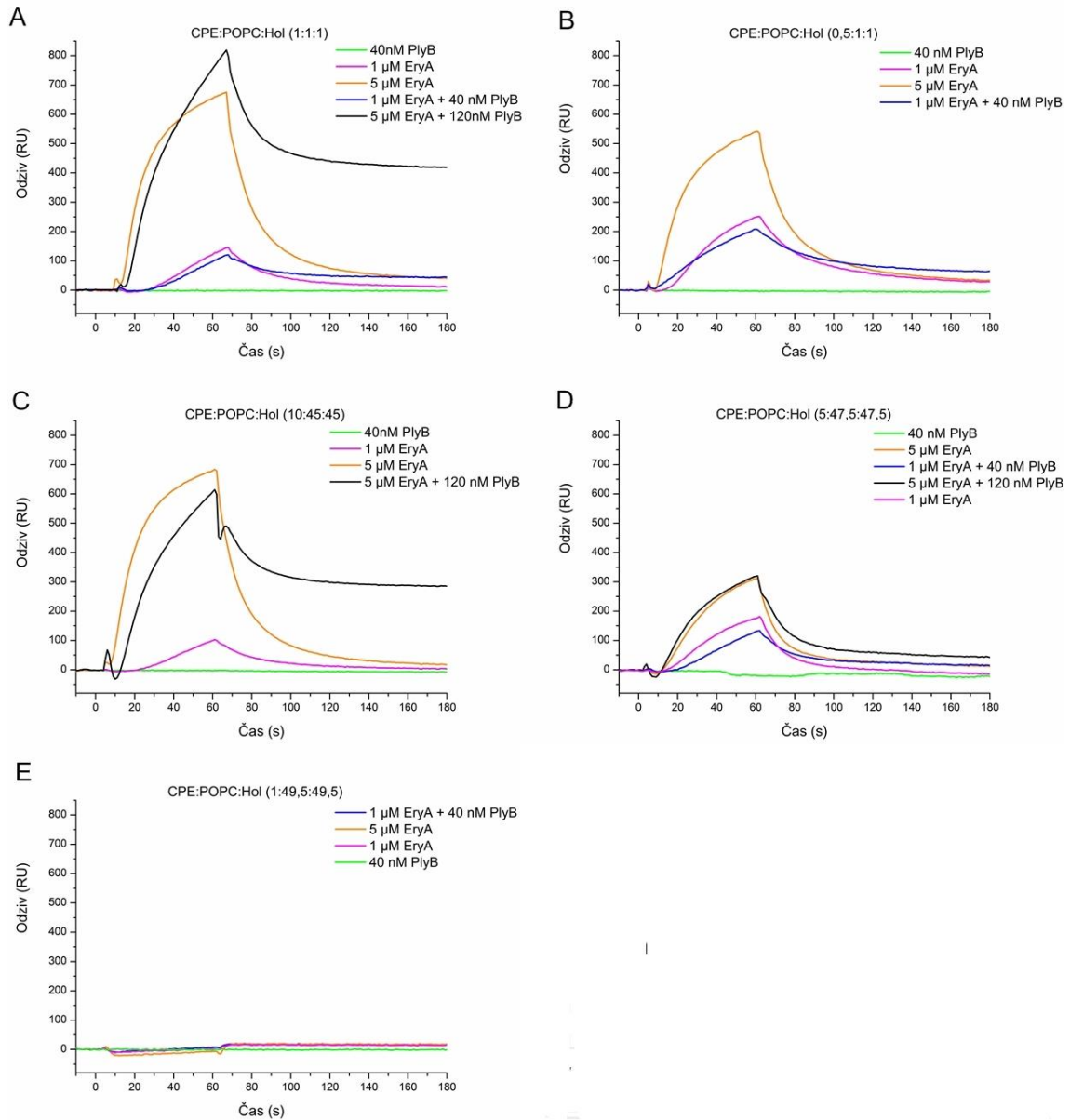
Meritve smo opravili na sistemu Biacore X in s programom OriginLab uredili sensorgrame. Ekstrudirane LUV smo nanegli na Fc-2. Prvotni cilj je bil, da nanesimo na celico enako količino liposomov vseh sestav (okoli 9.000 RU), kar pa se je tekom poskusa izkazalo za zelo težavno in pri nekaterih liposomih so bile RU precej nižje. Posebaj težavni so bili liposomi iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita *T. gondii*, kjer smo kljub uporabi višje koncentracije liposomov (1 mM) in večkratnem nanašanju na celico dosegli največ 2.590 RU. Pri liposomih CPE : POPC (5 : 95), CPE : POPC : Hol (5 : 85 : 10) in CPE : POPC : Hol (10 : 45 : 45) smo dosegli vrednosti RU med 5.000 in 6.700.

Slika 9 prikazuje rezultate prvega sklopa meritev, pri kateri smo EryA v dveh testiranih koncentracijah (1  $\mu$ M in 5  $\mu$ M) ter z ali brez PlyB vezali na binarne liposome, nam prikažejo zelo močno vezavo 1  $\mu$ M EryA na liposome CPE : Hol (1 : 1), nekoliko manj a vseeno močno se je nanje vezala kombinacija 1  $\mu$ M EryA + 40 nM PlyB (Slika 9 A). Pri teh liposomih nismo opazili disociacije proteinov. Na liposomih POPC : Hol (1 : 1) ni prišlo do vezave (Slika 9 B). Šibek in verjetno nerelevanten odziv zasledimo pri vezavi 5  $\mu$ M EryA na liposome s SM in CPE : POPC (1 : 1) (Slika 9 C in D).



Slika 9: Analiza vezave EryA in PlyB na binarne velike unilamelarne liposome s pomočjo površinske plazmonske resonance. CPE; ceramid fosfoetanolamin, Hol; holesterol, SM; sfingomielin, POPC; palmitoil-oleoil fosfatidilholin.

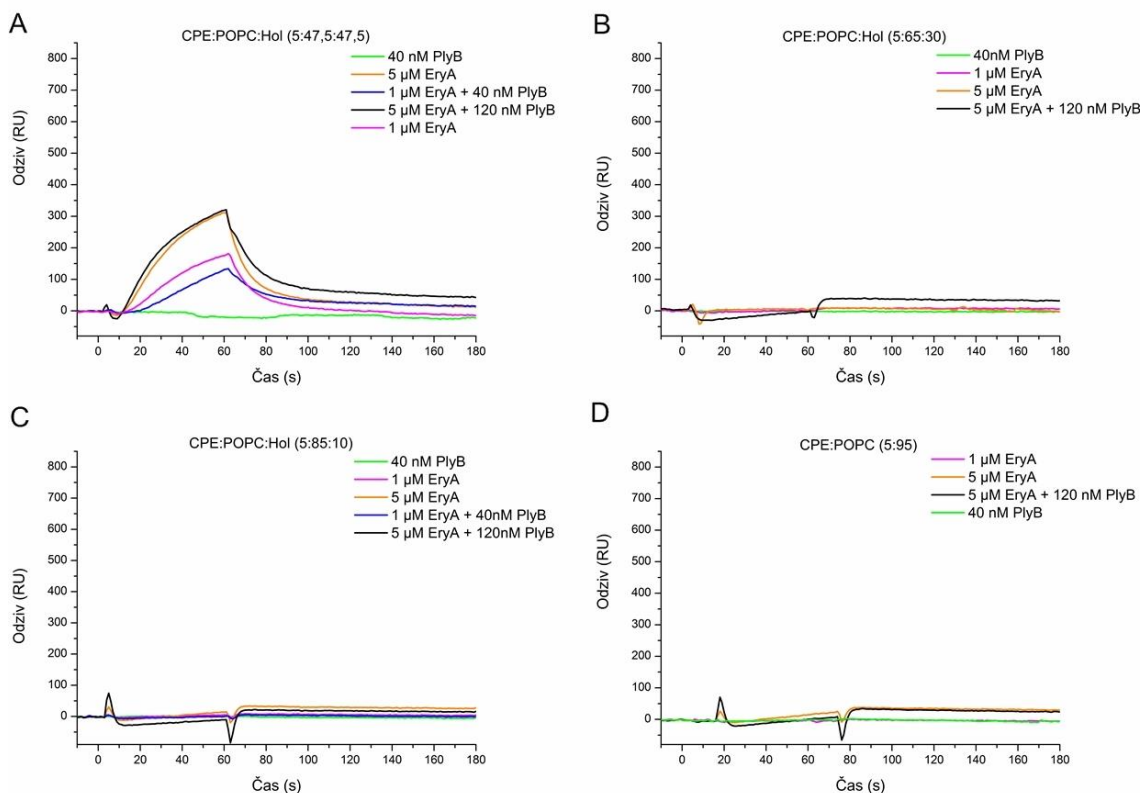
Vezava EryA na tri-lipidne liposome, pri katerih smo vzdrževali ekvimolarno razmerje Hol in POPC ter spreminjali molski delež CPE, je prikazana na Sliki 10. Analiti 1  $\mu\text{M}$  in 5  $\mu\text{M}$  EryA ter 5  $\mu\text{M}$  EryA/120 nM PlyB se močno vežejo na LUV sestave CPE : POPC : Hol (1 : 1 : 1), CPE : POPC : Hol (0,5 : 1 : 1), in CPE : POPC : Hol (10 : 45 : 45). Na LUV CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5) se EryA v kombinaciji s PlyB ali brez njega, veže šibkeje, še vedno pa je vezava prisotna že tudi pri nižji koncentraciji EryA (1  $\mu\text{M}$ ). Na liposome s sestavo CPE : POPC : Hol (1 : 49,5 : 49,5) LUV se proteini ne vežejo niti pri 5  $\mu\text{M}$  koncentraciji.



Slika 10: Analiza vezave EryA in PlyB na tri-lipidne velike unilamelarne liposome z različnimi molskimi deleži ceramid fosfoetanolamina s pomočjo površinske plazmonske resonançe. CPE; ceramid fosfoetanolamin, Hol; holesterol, SM; sfingomielin, POPC; palmitoil-oleoil-fosfatidilholin

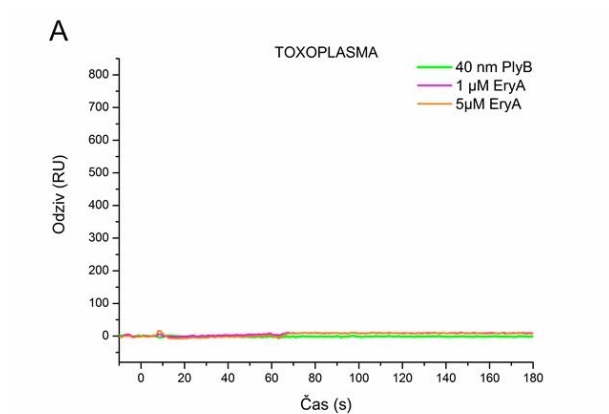


Vezava EryA na tri-lipidne liposome, pri katerih smo koncentracijo CPE vzdrževali na 5 molskih% ter spreminjali razmerje med Hol in POPC, je prikazana na Sliki 12. Vezava EryA je najmočnejša pri liposomih s sestavo CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5), kjer se 5  $\mu$ M EryA z ali brez dodatka PlyB enako močno veže. Na liposome s sestavo CPE : POPC : Hol (5 : 65 : 30), CPE : POPC : Hol (5 : 85 : 10), CPE : POPC (5 : 95) se EryA v testiranih koncentracijah ne veže.



Slika 11: Analiza vezave EryA in PlyB na tri-lipidne velike unilamelarne liposome z različnimi molskimi deleži holesterola s pomočjo površinske plazmonske resonance. CPE; ceramid fosfoetanolamin, Hol; holesterol, SM; sfingomielin, POPC; palmitoil-oleoil-fosfatidilholin

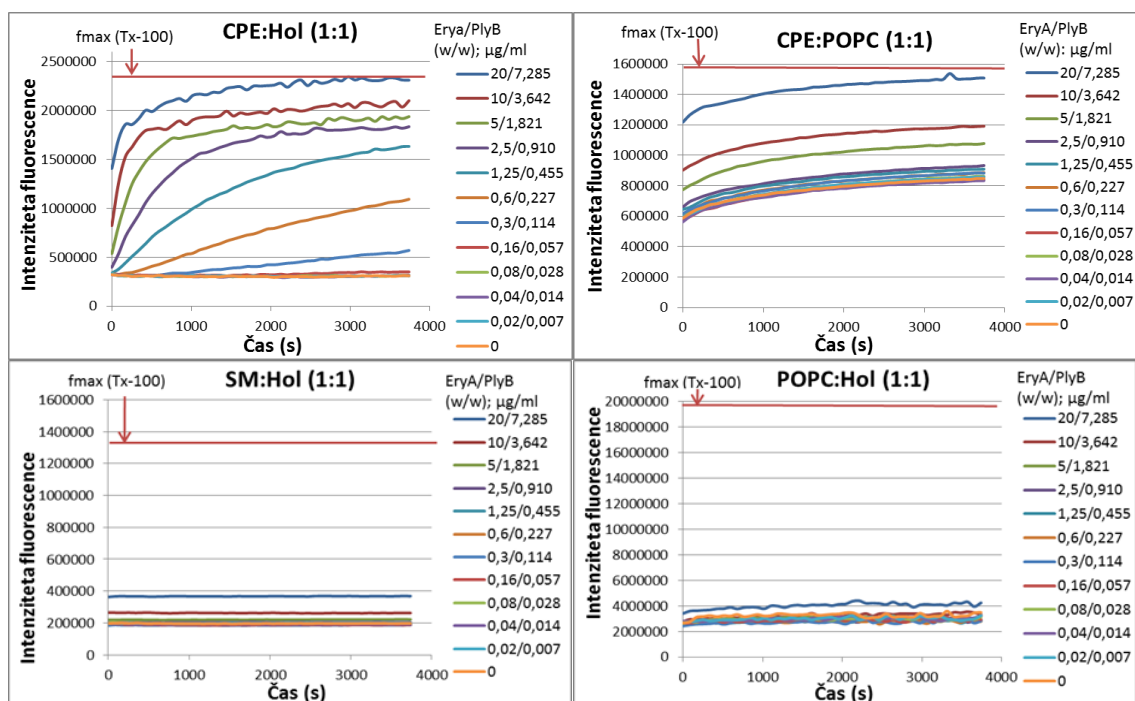
Do vezave na liposome, sestavljene iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita *T. gondi*, ni prišlo pri nobeni testirani koncentraciji proteinov EryA (samega ali v kombinaciji s PlyB) (Slika 12).



Slika 12: Analiza vezave EryA in PlyB na velike unilamelarne liposome, pripravljene iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita *Toxoplasma gondii*, s pomočjo površinske plazmonske resonance

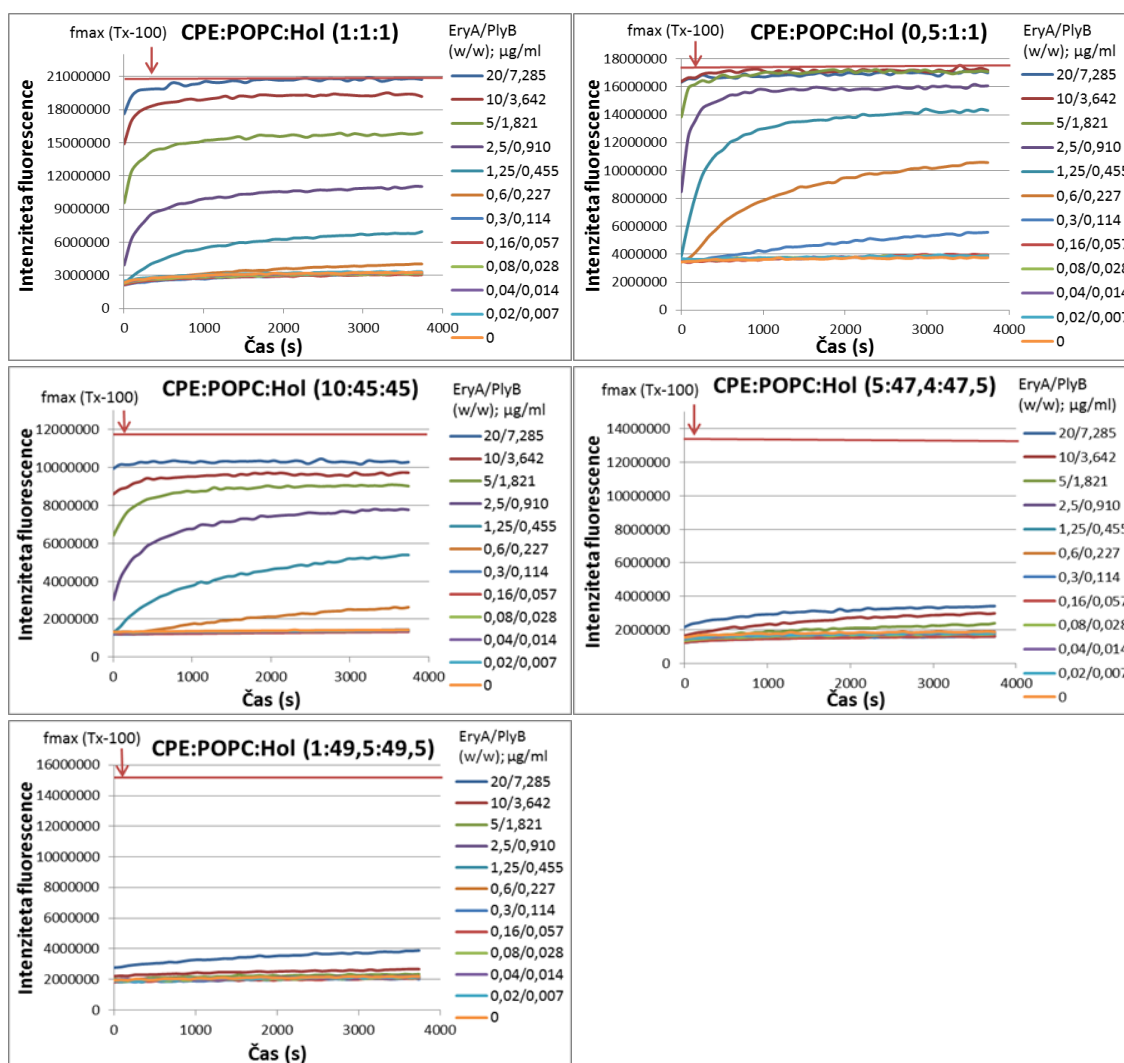
## 4.6 SPROŠČANJE KALCEINA IZ LIPOSOMOV

Grafični prikaz sproščanja kalceina pri različnih koncentracijah EryA/PlyB v času (Slika 13) nam pokaže, da se je največ kalceina sprostil iz liposomov s sestavo CPE : Hol (1 : 1). Relevantno sproščanje kalceina iz teh liposomov je opazno vse do razmerja koncentracij EryA/PlyB = 0,3/0,144  $\mu\text{g/ml}$ . Pri liposomih s sestavo CPE : POPC (1 : 1) se je prav tako sprostil veliko kalceina, vendar je to očitno samo do koncentracije 2,5  $\mu\text{g/ml}$  EryA, nižje koncentracije so bile manj učinkovite. Pri teh liposomih je mogoče opaziti, da so manj stabilni, saj tudi v odsotnosti proteinov prihaja do sproščanja kalceina. Pri liposomih, kjer smo namesto CPE uporabili SM, opazimo minimalno in zanemarljivo sproščanje kalceina, ki smo ga zaznali le pri najvišji koncentraciji EryA/PlyB, enako velja za liposome POPC : Hol (1 : 1).



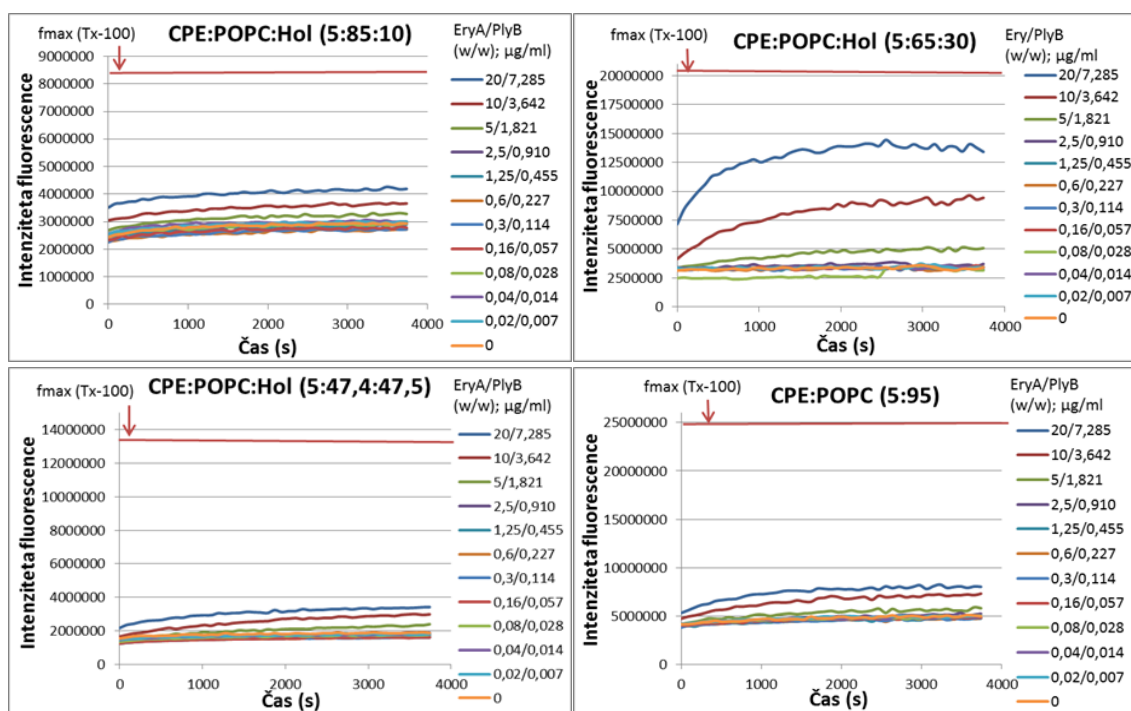
Slika 13: Kinetika sproščanja kalceina iz binarnih malih unilamelarnih liposomov.  $f_{\text{max}}$  (Tx-100) prikazuje 100 % fluorescenco ob prisotnosti detergenta Triton X-100.

Pri tri-lipidnih liposomih, v katerih smo vzdrževali ekvimolarno razmerje POPC : Hol in spreminjali molski delež CPE, se je največ kalceina sprostil iz liposomov sestave CPE : POPC : Hol (1 : 1 : 1) in CPE : POPC : Hol (0,5 : 1 : 1), kjer se je kalcein pričel sproščati že pri koncentracijah EryA/PlyB = 0,3/0,144  $\mu\text{g/ml}$ . Pri liposomih s sestavo CPE : POPC : Hol (10 : 45 : 45) se je ob najvišjih koncentracijah proteinov sprostil 80 % kalceina. Pri lipidnih mešanich z manjšim molskim deležem CPE, to je CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5) in CPE : POPC : Hol (1 : 49,5 : 49,5) je permeabilizacijska aktivnost komaj zaznavna, in to samo pri najvišji koncentraciji uporabljenih proteinov (Slika 14).



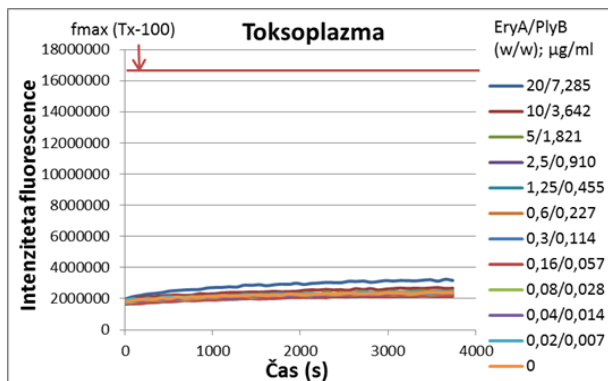
Slika 14: Kinetika sproščanja kalceina iz tri-lipidnih malih unilamelarnih liposomov z različnimi molskimi deleži ceramid fosfoetanolamina. Fmax (Tx-100) prikazuje 100 % fluorescenco ob prisotnosti detergenta Triton X-100.

Pri liposomih iz treh lipidov, v katerih smo molski delež CPE vzdrževali pri 5 mol% in spreminjali razmerje POPC : Hol opazimo, da se je največ kalceina sprostilo iz liposomov CPE : POPC : Hol (5 : 65 : 30). Pri najvišji koncentraciji proteinov (20 µg/ml EryA) se je v 60 minutah iz teh liposomov sprostilo približno 70 % kalceina. Pri liposomih s sestavo CPE : POPC : Hol (5 : 85 : 10) lahko opazimo, da se je sprostilo manj kalceina kot pri prej omenjenih liposomih, sledijo CPE : POPC (5 : 95) in CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5). Liposomi brez Hol so bili tudi v tem primeru zelo nestabilni in so sproščali kalcein tudi v odsotnosti proteina.



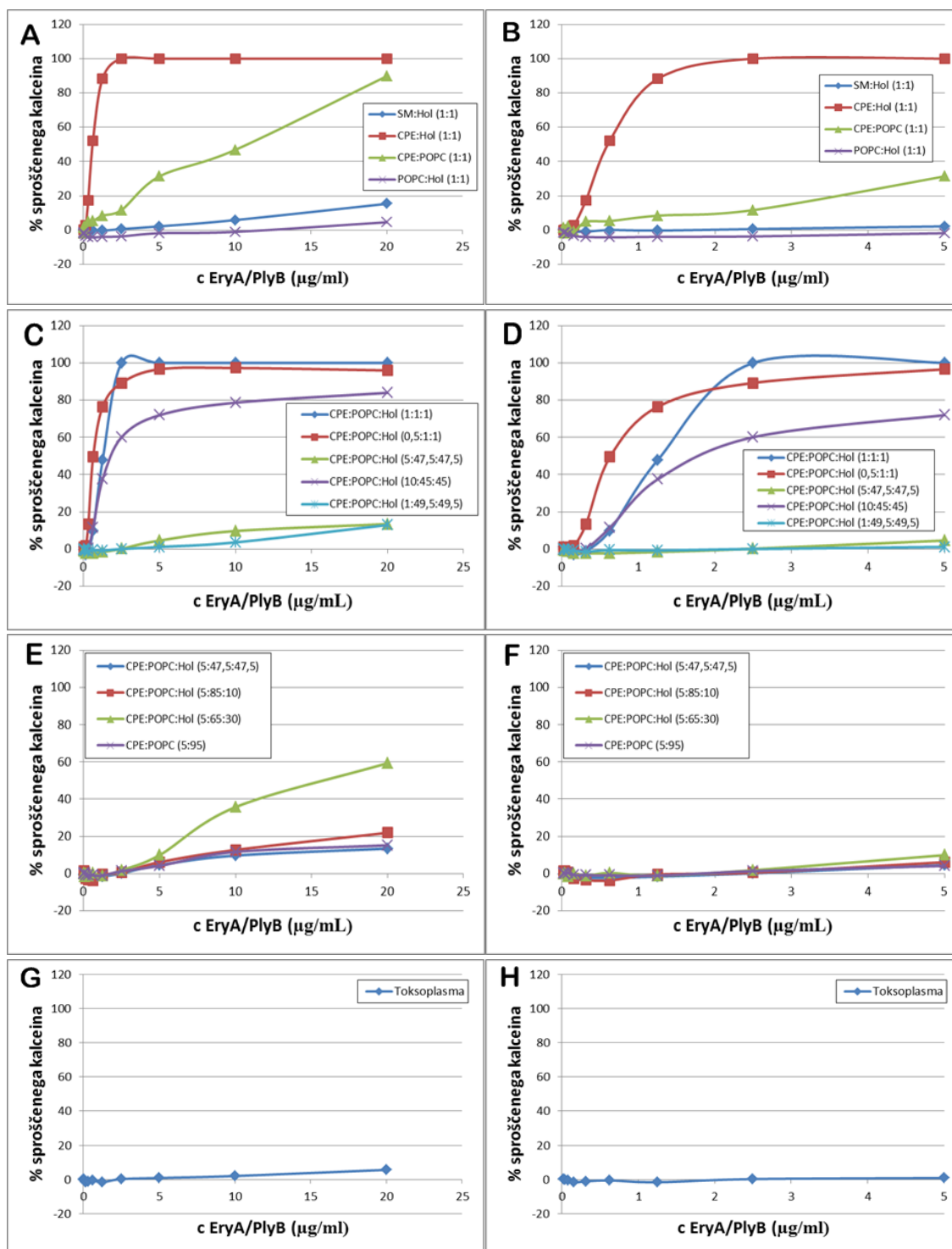
Slika 15: Kinetika sproščanja kalceina iz tri-lipidnih malih unilamelarnih liposomov z različnimi molskimi deleži holesterola. Fmax (Tx-100) prikazuje 100 % fluorescenco fluorescenco ob prisotnosti detergenta Triton X-100.

Pri liposomih iz lipidne mešanice, ki posnema membrano parazita *T. gondii* lahko opazimo, da je sproščanje kalceina komaj zaznavno, tudi pri najvišji koncentraciji proteinov po 60 min.



Slika 16: Kinetika sproščanja kalceina iz malih unilamelarnih liposomov iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita *Toxoplasma gondii*. Fmax (Tx-100) prikazuje 100 % fluorescenco fluorescenco ob prisotnosti detergenta Triton X-100.

Slika 17, narejena na osnovi zgoraj prikazanih kinetičnih grafov, prikazuje delež sproščenega kalceina v odvisnosti od skupne koncentracije EryA/PlyB po 60 minutah.



Slika 17: Grafični prikaz deleža sproščenega kalceina v odvisnosti od koncentracije c EryA/PlyB iz malih unilamelarnih liposomov s kalcinom. Slike 17 (A,C,E,G) prikazuje deleže sproščenega kalceina v celotnem testiranem koncentracijskem območju EryA/PlyB, slike 17 (B,D,F,H) pa delež sproščenega kalceina pri nižjih testiranih koncentracijah (do 5 µg/ml EryA / 1,821 µg/ml PlyB).

#### 4.7 TEST HEMOLIZE

Test hemolize je pokazal, da zmes proteinov EryA in PlyB ni hemolitična za goveje ali piščančje eritrocite, niti v primeru visokih koncentracijah proteinov (končna, najvišja koncentracija EryA = 5,36  $\mu\text{g/ml}$ , PlyB = 2,87  $\mu\text{g/ml}$ ) v časovnem obdobju 45 min. Vzporedno smo testirali hemolitično aktivnost zmesi OlyA in PlyB, kjer pa je do lize prišlo tako pri govejih kot pri piščančjih eritrocitih (rezultati niso prikazani).



## 5 RAZPRAVA

Bhat in sod. (2015), so nedavno odkrili, da se nekateri egerolizini iz gob rodu ostrigarjev (*Pleurotus* spp.), med katere prištevamo tudi EryA, specifično vežejo na liposome sestave CPE : Hol (1 : 1) oziroma na sam CPE. Za OlyA, ki je skoraj identičen proteinu EryA, je bilo že znano, da se veže na umetne lipidne sisteme, sestavljene iz SM/Hol (Sepčić in sod., 2004), a so v isti raziskavi pokazali, da se veže tudi na liposome s sestavo CPE : Hol (1 : 1) (Bhat in sod., 2015). Nedavno je bilo pokazano tudi, da gobe iz rodu *Pleurotus* (*P. ostreatus* in *P. eryngii*) vsebujejo več izooblik egerolizinskih proteinov (Kurahashi in sod., 2014), ki kljub visoki stopnji identičnosti v aminokislinskem zaporedju (Kurahashi in sod., 2014) kažejo različno vezavno specifičnost na membranske lipide (Bhat 2014).

V magistrski nalogi smo se osredotočili na EryA, protein iz gobe *P. eryngii*, za katerega so ugotovili, da se specifično veže na liposome s sestavo CPE : Hol (1 : 1) (Bhat in sod., 2015). Vzporedno je potekala magistrska naloga, v okviru katere je kolegica Ivana Pavlic z istimi testi raziskovala interakcijo OlyA z lipidi in lipidnimi membranami.

Specifičnost vezave na CPE je zanimiva, ker se ta lipid v vretenčarskih, sesalčjih celicah pojavlja le v sledovih, kot negativna kontrola sinteze ceramida (Bhat in sod., 2015), pri nevretenčarjih, predvsem žuželkah in mehkužcih pa je prisoten v mnogo večjih količinah. Sposobnost EryA, da se specifično veže ravno na ta lipid ponuja veliko možnost uporabe tega proteina za zatiranje škodljivcev. Kmetijske dejavnosti so namreč za proizvodnjo hrane izredno pomembne in potrebno je omogočiti uporabo varnih in okolju bolj prijaznih pesticidov. Nevretenčarji kot so plodova vinska mušica (*Drosophila suzukii*), korzuni hrošč (*Diabrotica virgifera virgifera*), velika žitna uš (*Sitobion avenae*) in rastlinsko-parazitska ogorčica (*Meloidogyne* spp.) so trenutno med največjimi škodljivci, ker povzročajo ogromno ekonomsko škodo (Sasser in Freckman 1987; Gassmann in sod., 2011; Gassman in sod., 2012). Vedno večji problem v sodobnem kmetijstvu pa postaja tudi odpornost škodljivcev na insekticide (Anstead in sod., 2005) in njihovo kopičenje v hrani in krmi, kar posledično vpliva na onesnaževanje okolja in zdravje ljudi (Devine in sod., 2007). Ključen je torej razvoj bioinsekticidov, ki bodo varni za okolje, kmetijske delavce in končne potrošnike. Toksini katerih tarče so molekule, ki so specifične za določene organizme, lahko tako predstavljajo tarčo za raziskovanje in uporabo pri zatiranju škodljivcev.

Prvi poskusi vezave EryA na CPE so pokazali vezavo na liposome s 50 molskih% CPE (Bhat in sod., 2015). Ker so ti odstotki v membranah nevretenčarjev nižji, smo pripravili liposome z nižjimi molskimi deleži CPE, da bi ugotovili najnižjo količino CPE, potrebno za uspešno vezavo EryA, kar nam pomaga predvideti uporabnost EryA kot

označevalca takih domen in morebitnega zatiralca škodljivcev v kombinaciji s partnerskima proteinoma iz družine MACPF, EryB ali PlyB.

Pri izolaciji rekombinantnega EryA smo na NaDS-PAGE gelu poleg pričakovane lise pri 15 kDa, dobili tudi liso velikosti med 20 in 23 kDa, ki lahko prikazuje drugo konformacijsko obliko proteina ali pa gre za drugi protein, kar bi morali dodatno preveriti.

Shibata in sod. (2010) so EryA izolirali iz svežih gob in ugotovili, da mešanica EryA in EryB deluje hemolitično na piščančje eritrocite. V magistrski nalogi smo zato test hemolize opravili takoj po izolaciji rekombinantnega EryA, kot proteinski partner pa smo uporabili PlyB, ki je 97 % identičen z EryB. Rezultati, ki smo jih dobili, so bili precej obetavni, saj do hemolize v primeru uporabe piščančjih ali govejih eritrocitov ni prišlo. Predvidevamo, da so bili v izolatih iz svežih gob (Shibata in sod. 2010) prisotni tudi drugi egerolizini, ki se pri ostrigarjih sicer pojavljajo v različnih izo-oblikah in so si med seboj zelo podobni v primarni strukturi (Kurahashi in sod., 2014). Ker pa smo v sklopu magistrske naloge uporabili rekombinantni, čisti EryA, ni bilo kontaminacije s kakšnim drugim biološko aktivnim proteinom. Takšna kontaminanta bi na pr. lahko bil PlyA2, ki se lahko povezuje tudi z lipidno kombinacijo SM : Hol (Bhat 2014). Kot kontrolo smo vzporedno naredili test hemolize s kombinacijo OlyA/PlyB, kjer je po pričakovanjih prišlo do hemolize tako piščančjih kot govejih eritrocitov.

Vezavo EryA na lipidne membrane različne sestave smo najprej preverili s sedimentacijskim testom, ki nam je dal grob vpogled v specifičnost vezave EryA z različnimi liposomi. Po pričakovanjih se je EryA vezal na binarne liposome z visokim molskim deležem CPE, na ostale pa se ni vezal. Rahla lisa, ki je prisotna v sedimentih teh liposomov je verjetno rezultat nepopolnega spiranja supernatanta. Če v liposomih iz treh lipidov ohranjamo ekvimolarno razmerje med Hol in POPC in spreminjamo samo koncentracijo CPE, opazimo, da količina nevezanega proteina narašča z upadanjem deleža CPE v liposomih. OlyA se veže na MLV tudi, če je v njih samo 1 molski% CPE, torej je vezava na ta lipid res specifična. Če pa smo v liposomih ohranjali 5 molskih% CPE in spreminjali samo razmerje POPC : Hol, se je EryA vezal samo pri 47,5 molskih% Hol. Za uspešno vezavo EryA je torej poleg CPE pomemben tudi Hol, kar so za EryA-EGFP pokazali že Bhat in sod. (2015). Prisotnost rahle lise v sedimentu liposomov CPE : POPC (1 : 1) je, kot že zgoraj omenjeno, najverjetneje posledica nepopolnega spiranja, na kar kažejo tudi rezultati SPR, kjer vezave na te liposome ni bilo. OlyA, ki ga je v okviru magistrske naloge vzporedno testirala Ivana Pavlic, pa se je poleg pričakovane vezave na binarne ekvimolarne SM : Hol liposome vezal tudi na liposome s 5 molskih% CPE, v katerih je bil delež Hol nižji (30 molskih%). Podoben odnos med proteinoma smo dobili tudi v testu vezave na liposome, pripravljenih iz lipidov, ki posnemajo membrano parazita *T. gondii*. EryA se za razliko od OlyA na te

liposome ni vezal. Rezultati SPR prikazujejo ireverzibilno vezavo EryA in EryA/PlyB z membranami, ki imajo vsaj 5 molskih% CPE. OlyA se na membrane SM : Hol veže reverzibilno, pri disociaciji se spere (Ota in sod., 2013; Skočaj in sod., 2014). Ivana Pavlic pa je v okviru svoje naloge pokazala da se OlyA na liposome, ki vsebujejo CPE veže ireverzibilno.

Jakost vezave EryA pri testu SPR pada s padcem molskega deleža CPE v liposomih, kar sovpadajo z rezultati sedimentacijskega testa. Rezultati SPR kažejo tudi na to, da ni vezave na liposome s SM in liposome brez CPE/Hol, kar zopet kaže na verjetnost nepopolnega spiranja supernatanta pri sedimentacijskih testih. Rezultati sedimentacijskih testov, kjer smo primerjali vezavo EryA na liposome s 47,5 molskimi% Hol, 30, 10 in 0 molskimi% holesterola, sovpadajo s SPR, saj smo pokazali, da se EryA veže samo na liposome z 47,5 molskimi% Hol.

Do vezave na sintetične liposome *T. gondii* ni prišlo pri nobeni koncentraciji proteinov EryA oz. OlyA, z ali brez dodatka PlyB, razlog je verjetno nizka količina CPE v teh liposomih.

Težave, ki smo jih imeli pri SPR z nanašanjem liposomov na L1 čip lahko pripišemo različnim nabojem in elektrostatskim odbojem molekul, kar vpliva tudi na vezavo proteinov na liposome.

S testom sproščanja kalceina smo ugotavljali permeabilizacijsko aktivnost kombinacije EryA in PlyB. Ugotovili smo, da EryA in PlyB zagotovo tvorita bi-komponentni porotvorni kompleks, kar smo glede na rezultate testa hemolize lahko le predvidevali.

Test sproščanja kalceina iz binarnih liposomov je pokazal, da do permeabilizacije pride le v primeru liposomov, ki v svoji sestavi vsebujejo CPE in Hol. Liposomi CPE : POPC (1 : 1) kažejo nižjo permeabilizacijo, opazimo pa tudi, da so manj stabilni in spuščajo kalcein tudi ob odsotnosti proteinov. Rezultati iz poskusov z liposomi iz treh lipidov in z različnimi molskimi deleži CPE sovpadajo z rezultati ostalih dveh testov. Nepričakovano pa je, da se permeabilizacijska aktivnost ne povečuje s povečanjem molskega% Hol. Pričakovali bi namreč, da se bo več kalceina sprostilo iz LUV s 47,5 molskimi% Hol kot tistimi s 30 molskimi%. Pri sedimentacijskem testu in SPR je bila prisotna vezava na liposome s 47,5 molskimi% Hol, pri permeabilizacijskem testu pa je ni bilo. Ravno obratno je opaziti pri liposomih s 30 molskimi% Hol, kjer pride do permeabilizacije kalceinskih liposomov, test sedimentacije in SPR pa vezave nista pokazala. Razlog za opažene razlike je najverjetneje v dejstvu, da se molski deleži lipidov v veziklih, uporabljenih za teste vezave (sedimentacijski test in SPR) razlikujejo od molskih deležev lipidov v veziklih s kalceinom, ki smo jih pripravili neodvisno. V prid tej teoriji govori tudi dejstvo, da koncentracije lipidov v liposomih določene z encimskimi testi lahko precej odstopajo od izračunanih vrednosti.

Kombinacija proteinov EryA/PlyB ne permeabilizira liposomov, ki posnemajo membrano *T. gondii*, kar je v skladu z rezultati sedimentacijskega testa in SPR, saj je v teh liposomih prisotnih le 2,4 % CPE in 8 % Hol, iz rezultatov SPR in sproščanja kalceina pa vidimo, da EryA potrebuje za stabilno vezavo precej večje količine obeh lipidov. Presenetljivo glede na ostale teste, ki niso pokazali vezave, pa OlyA/PlyB v najvišji koncentraciji pri testu sproščanja kalceina iz teh liposomov sprostita 53 % kalceina (Ivana Pavlic, diplomsko delo v izdelavi).

Glede na rezultate vseh testov, ki smo jih uporabili v magistrskem delu lahko zaključimo, da EryA ni primerna molekula za zatiranje parazita *T. gondii*. Bolj primeren bi bil OlyA, vendar ga v ta namen ne moremo uporabljati, saj se veže tudi na SM, ki je sestavni del naše (vretenčarske) celične membrane. EryA bi bil uporaben za označevanje ali permeabilizacijo membran z večjo količino CPE.

Cilj prihodnjih raziskav je pripraviti fluorescenčni fuzijski EryA in ovrednotiti njegovo vezavo na celice patogenih mikroorganizmov in nevretenčarjev. Na ta način bi lahko prepoznali tiste organizme, ki vsebujejo dovolj veliko količino CPE v membranah celic brez finančno in časovno zahtevnih lipidomskih študij membran teh organizmov.

## 6 SKLEPI

- Uspešno smo izolirali rekombinantni erilizin A.
- Ugotovili smo, da kombinacija EryA in PlyB učinkovito tvori pore v liposomih s sestavami: CPE : Hol (1 : 1), CPE : POPC : Hol (1 : 1: 1), CPE : POPC : Hol (0,5 : 1:1), CPE : POPC : Hol (10 : 45 : 45) in CPE : POPC : Hol (5 : 47,5 : 47,5).
- Ugotovili smo, da EryA ni primeren za vezavo na liposome iz lipidne mešanice, ki posnema lipidno sestavo membrane parazita *T. gondii*.
- Ugotovili smo, da se EryA skupaj s PlyB ne veže na umetne liposome SM : Hol (1 : 1) in ne lizira piščančjih ali govejih eritrocitov.
- EryA za vezavo na umetne lipidne sisteme potrebuje Hol in vsaj 5 % CPE.

## 7 POVZETEK

Sposobnost vezave proteinov iz družine egerolizinov na določene specifične membranske lipide je lastnost, ki je ključna za različne raziskave, predvsem kot morebitne specifične membranske označevalce. Nekateri egerolizini tvorijo bi-komponentne litične komplekse z MACFP/CDC proteinskim partnerjem, sami po sebi pa niso toksični. Specifična prepoznavna membranske površine je lahko pomembna za tarčno uničevanje določenih tipov celic, v netoksični obliki pa jih lahko uporabljamo za študije bioloških membran. V magistrskem delu smo pripravili plazmidni vektor z zapisom za EryA, protein izrazili v *E. coli* in očistili. Preverili smo njegovo hemolitično aktivost ter sposobnost permeabilizacije liposomov v kombinaciji s proteinskim partnerjem PlyB. Naše ugotovitve kažejo, da EryA v kombinaciji s PlyB ni hemolitičen za goveje ali piščančje eritrocite. Potrdili pa smo permeabilizacijsko aktivnost EryA v kombinaciji s PlyB, ki je omogočila permeabiliziranje umetnih liposomov, ki so imeli vsaj 5 mol % CPE, ki pa je ključen sfingolipid v membranah številnih nevretenčarjev. Kot primer nevretenčarske plazemske membrane smo pripravili sintetične liposome z lipidno sestavo, podobno tisti pri parazitu *T. gondii*. Ti liposomi so imeli v svoji sestavi le 2,4 mol% CPE in 8 mol% Hol, za katerega smo ugotovili, da je prav tako potreben za uspešno vezavo EryA. Ugotovili smo, da pri liposomih s tako sestavo ni prišlo do permeabilizacije. Kljub vsemu so v prihodnosti potrebne nadaljnje raziskave EryA, saj bi lahko bil potencialno uporaben kot bioinsekticidno sredstvo. To smo v magistrskem delu tudi potrdili, ključno pa je tudi, da se za razliko od nekaterih drugih egerolizinov ne veže na membrane, ki namesto CPE vsebujejo glavni vretenčarski sfingolipid SM.

## 8 VIRI

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell: Membrane Structure*. 4<sup>th</sup> ed. New York, Garland Science: 1616 str.
- Bell R.M., Ballas L.M., and Coleman R.A. 1981. Lipid topogenesis. *Journal of Lipid Research*, 22, 3: 391–403
- Berg J.M., Tymoczko J.L., and Stryer L. 2002. *Biochemistry: There Are Three Common Types of Membrane Lipids*. 5<sup>th</sup> ed. New York, W. H. Freeman: 1100 str.
- Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., and Sepčić K. 2002. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570: 153–159
- Berne S., Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P., and Poklar Ulrich N. 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: 11137–11147
- Berne S., Pohleven J., Vidic I., Rebolj K., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sonnenberg A., and Sepčić K. 2007. Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 111: 1431–1436
- Bhat H.B., Ishitsuka R., Inaba T., Murate M., Abe M., Makino A., Kohyama-Koganeya A., Nagao K., Kurahashi A., Kishimoto T., et al. 2015. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *The FASEB Journal*, 29: 3920–3934
- Budzko D.B., and Negrone R. 1976. Depletion of complement in vivo and in vitro by extracts of *Aspergillus fumigatus*. *International Archives Allergy Appl. Immunology*, 51: 518–524
- Cole C., Barber J.D., and Barton G.J. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 36: W197-201
- Cowart L.A., and Obeid L.M. 2007. Yeast sphingolipids: recent developments in understanding biosynthesis, regulation, and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771: 421–431
- Daum G. 1985. Lipids of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 822: 1–42
- Dynamic Light Scattering: Measuring the Particle Size Distribution. LS Instruments. [http://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic\\_light\\_scattering\\_dls](http://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls) (18.7.2016)

- Ebina K., Ichinowatari S., and Yokota K. 1985. Studies on Toxin of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology and Immunology*, 29: 91–101
- Edidin M. 2003. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 414–418
- Galagan J.E., Calvo S.E., Borkovich K.A., Selker E.U., Read N.D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L.-J., Smirnov S., Purcell S., et al. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422: 859–868
- Gassmann A.J., Petzold-Maxwell J.L., Keweshan R.S., and Dunbar M.W. 2011. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. *PLOS ONE* 6: e22629, doi: 10.1371/journal.pone.0022629: 7 str.
- Ghosh A., Kling T., Snaidero N., Sampaio J.L., Shevchenko A., Gras H., Geurten B., Göpfert M.C., Schulz J.B., Voigt A., et al. 2013. A Global In Vivo *Drosophila* RNAi Screen Identifies a Key Role of Ceramide Phosphoethanolamine for Glial Ensheathment of Axons. *PLOS Genet* 9: e1003980, doi: 10.1371/journal.pgen.1003980: 14 str.
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., and Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*1. *The Biochemical journal*, 341: 655–663
- Hancock J.F. 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 456–462
- Hannun Y.A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 274: 1855–1859
- Hao M., Lin S.X., Karylowski O.J., Wüstner D., McGraw T.E., and Maxfield F.R. 2002. Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 609–617
- Hassall D.G., and Graham A. 1995. Changes in free cholesterol content, measured by filipin fluorescence and flow cytometry, correlate with changes in cholesterol biosynthesis in THP-1 macrophages. *Cytometry*, 21: 352–362
- Hong Q., Gutierrez-Aguirre I., Barlic A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Maček P., Turk D., Gonzalez-Manas J.M., Lakey J.H., et al. 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. *J. Biol. Chem.* 277, 41916–41924.
- Ishitsuka R., Sato S.B., and Kobayashi T. 2005. Imaging lipid rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 137: 249–254
- Kamaguchi A., Yokota K., and Sakaguchi O. 1979. Investigation of the hemolytic site of Asp-hemolysin. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 32: 118–121



- Kenworthy A.K., Petranova N., and Edidin M. 2000. High-Resolution FRET Microscopy of Cholera Toxin B-Subunit and GPI-anchored Proteins in Cell Plasma Membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 1645–1655
- Kudo Y., Ootani T., Kumagai T., Fukuchi Y., Ebina K., and Yokota K. 2002. A Novel Oxidized Low-Density Lipoprotein-Binding Protein, Asp-Hemolysin, Recognizes Lysophosphatidylcholine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25: 787–790
- Kurahashi A., Sato M., Kobayashi T., Nishibori K., and Fujimori F. 2014. Homologous genes, *Pe.pleurotolysin A* and *Pe.ostreolysin*, are both specifically and highly expressed in primordia and young fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*. *Mycoscience*, 55: 113–117
- LaBach J.P., and White D.C. 1969. Identification of ceramide phosphorylethanolamine and ceramide phosphorylglycerol in the lipids of an anaerobic bacterium. *Journal of Lipid Research*, 10: 528–534
- Lam S.K., and Ng T.B. 2001. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393: 271–280
- Lin H.-N., Chang J.-M., Wu K.-P., Sung T.-Y., and Hsu W.-L. 2005. HYPROSP II--a knowledge-based hybrid method for protein secondary structure prediction based on local prediction confidence. *Bioinformatics*, 21: 3227–3233
- Lingwood D., and Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327: 46–50
- Liu J.-P., Tang Y., Zhou S., Toh B.H., McLean C., and Li H. 2010. Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 43: 33–42
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., and Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4<sup>th</sup> ed. New York, W. H. Freeman: 1184 str.
- London E. 2002. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 480–486
- Lukoyanova N., Kondos S.C., Farabella I., Law R.H.P., Reboul C.F., Caradoc-Davies T.T., Spicer B.A., Kleifeld O., Traore D.A.K., Ekkel S.M., et al. 2015. Conformational changes during pore formation by the perforin-related protein pleurotolysin. *PLoS Biol.* 13: e1002049, doi: 10.1371/journal.pbio.1002049: 15 str.
- Maličev E., Chowdhury H.H., Maček P., and Sepčič K. 2007. Effect of ostreolysin, an Asp-hemolysin isoform, on human chondrocytes and osteoblasts, and possible role of Asp-hemolysin in pathogenesis. *Medical Mycology*, 45: 123–130
- van Meer G., Voelker D.R., and Feigenson G.W. 2008. Membrane lipids: where they

- are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 112–124
- Michel V., and Bakovic M. 2007. Lipid rafts in health and disease. *Biology of the Cell*, 99: 12-140
- Mukherjee S., Zha X., Tabas I., and Maxfield F.R. 1998. Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophysical Journal*, 75: 1915–1925
- Nayak A.P., Blachere F.M., Hettick J.M., Lukomski S., Schmechel D., and Beezhold D.H. 2010. Characterization of Recombinant Terrelysin, a Hemolysin of *Aspergillus terreus*. *Mycopathologia*, 171: 23–34
- Nayak A.P., Green B.J., and Beezhold D.H. 2013. Fungal hemolysins. *Medical Mycology*, 51: 1–16
- Ngai P.H.K., and Ng T.B. 2006. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 1185–1191
- Ohanian J., and Ohanian V. 2001. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 2053–2068
- Ota K., Leonardi A., Mikelj M., Skočaj M., Wohlschlager T., Künzler M., Aebi M., Narat M., Križaj I., Anderluh G., et al. 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: 1855–1864
- Ota K., Butala M., Viero G., Dalla Serra M., Sepčić K., and Maček P. 2014. Fungal MACPF-like proteins and aegerolysins: bi-component pore-forming proteins? *Subcellular Biochemistry*, 80: 271–291
- Peter Slotte J. 2013. Molecular properties of various structurally defined sphingomyelins – correlation of structure with function. *Progress in Lipid Research*, 52: 206–219
- Pike L.J. 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal*, 378: 281–292
- Poler A., Križaj I., Vrščaj D., Boh A., Boh B., and Stropnik Z. 1998. Seznam gliv Slovenije. Ljubljana, Zveza gobarskih društev Slovenije: 134 str.
- Porter F.D., and Herman G.E. 2011. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *Journal of Lipid Research*, 52: 6–34
- Ramachandran R., Heuck A.P., Tweten R.K., and Johnson A.E. 2002. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nature Structural Biology*, 9: 823–827
- Rosado C.J., Kondos S., Bull T.E., Kuiper M.J., Law R.H.P., Buckle A.M.,

- Voskoboinik I., Bird P.I., Trapani J.A., Whisstock J.C., et al. 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology*, 10: 1765–1774
- Rost B., Yachdav G., and Liu J. 2004. The PredictProtein server. *Nucleic Acids Research*, 32: W321–326
- Sakaguchi O., Shimada H., and Yokota K. 1975. Proceedings: Purification and characteristics of hemolytic toxin from *Aspergillus fumigatus*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 28: 328–331
- Sakurai N., Kaneko J., Kamio Y., and 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*, 1679: 65–73
- Sasser J.N., and Freckman D.W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. *The Journal of Nematology*, 43, 2: 63–68
- Sato S.B., Ishii K., Makino A., Iwabuchi K., Yamaji-Hasegawa A., Senoh Y., Nagaoka I., Sakuraba H., and Kobayashi T. 2004. Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 23790–23796
- Schachter E.N., Zuskin E., Goswami S., Castranova V., Arumugam U., Whitmer M., Siegel P., Chiarelli A., and Fainberg J. 2005. Pharmacological study of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) extract on isolated guinea pig trachea smooth muscle. *Lung*, 183: 63–71
- Schulze H., and Sandhoff K. 2011. Lysosomal lipid storage diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: e4804, doi: 10.1101/cshperspect.a004804: 20 str.
- Sepčić K., Berne S., Potrich C., Turk T., Maček P., and 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: 1199–1210
- Shibata T., Kudou M., Hoshi Y., Kudo A., Nanashima N., and Miyairi K. 2010. Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylysin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Toxicon*, 56: 1436–1442
- Simons K., and Gerl M.J. 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11: 688–699
- Simons K., and Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569–572
- Simons K., and van Meer G. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27: 6197–6202

- Simons K., and Sampaio J.L. 2011. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* 3: e4697, doi: 10.1101/cshperspect.a004697: 17 str.
- Skočaj M., Resnik N., Grundner M., Ota K., Rojko N., Hodnik V., Anderluh G., Sobota A., Maček P., Veranič P., et al. 2014. Tracking cholesterol/sphingomyelin-rich membrane domains with the ostreolysin A-mCherry protein. *PLoS ONE*, 9: e92783, doi: 10.1371/journal.pone.0092783: 12 str.
- Soberon M., Gao Y., and Bravo A. 2015. *Bt Resistance: Characterization and Strategies for GM Crops Producing Bacillus thuringiensis Toxins*. Wallingford, CABI: 226 str.
- Sprong H., Kruithof B., Leijendekker R., Slot J.W., van Meer G., and van der Sluijs P. 1998. UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 25880–25888
- Strauss J.F., Kishida T., Christenson L.K., Fujimoto T., and Hiroi H. 2003. START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202: 59–65
- Subczynski W.K., and Kusumi A. 2003. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610: 231–243
- Sud M., Fahy E., Cotter D., Dennis E.A., and Subramaniam S. 2012. LIPID MAPS-Nature Lipidomics Gateway: An Online Resource for Students and Educators Interested in Lipids. *Journal of Chemical Education*, 89: 291–292
- Surface plasmon resonance. University of Ljubljana Slovenia.  
<http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Technology.html> (16.7.2016)
- Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito K., Sugawara-Tomita N., and Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 26975–26982
- Vacaru A.M., van den Dikkenberg J., Ternes P., and Holthuis J.C.M. 2013. Ceramide Phosphoethanolamine Biosynthesis in *Drosophila* Is Mediated by a Unique Ethanolamine Phosphotransferase in the Golgi Lumen♦. *The Journal of Biological Chemistry*, 288: 11520–11530
- Vidic I., Berne S., Drobne D., Maček P., Frangež R., Turk T., Štrus J., and Sepčić K. 2005. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 109: 377–382
- Wang H.X., Ng T.B., Liu W.K., Ooi V.E., and Chang S.T. 1995. Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured

mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. International journal of peptide and protein research, 46: 508–513

Welti R., Mui E., Sparks A., Wernimont S., Isaac G., Kirisits M., Roth M., Roberts C.W., Botté C., Maréchal E., McLeod R. 2007. Lipidomic analysis of *Toxoplasma gondii* reveals unusual polar lipids. Biochemistry, 46: 13882–13890

White D.C., Tucker A.N., and Sweeley C.C. 1969. Characterization of the iso-branched sphinganines from the ceramide phospholipids of *Bacteroides melaninogenicus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 187: 527–532

Wüstner D. 2007. Plasma membrane sterol distribution resembles the surface topography of living cells. Molecular Biology of the Cell, 18: 211–228

## ZAHVALA

V prvi vrsti bi se zahvalila mentorici prof. dr. Kristini Sepčič, ki me je kljub ogromni gneči v laboratoriju sprejela pod svoje okrilje in mi bila tekom dela vedno na voljo za nasvete in spodbudne besede. Hvala ji tudi za vso pomoč pri samem pisanju magistrske naloge in ekstremno hitro popravilo moje prve verzije, ti popravki in nasveti so vsekakor dvignili nivo pisanja.

Zahvala gre tudi odličnemu somentorju asist. dr. Mateju Skočaju, ki mi je pomagal pri prvi izolaciji proteina in me naučil ogromno trikov, vedno je bil pripravljen pomagati z nasveti tudi, ko sem samostojno izolirala protein in kasneje tekom pisanja naloge, hvala pa mu tudi za odlično družbo!

Zahvalila bi se tudi recenzentu prof. dr. Petru Mačku in prof. dr. Petru Veraniču, ki sta s svojimi komentarji ob pregledu magistrske naloge pripomogla k izboljšavi končnega izdelka in spodbudila moje širše razmišljanje o temi.

Zahvalila bi se tudi Nini Orehar, zaradi predvajanja odlične glasbe in seveda tudi zaradi njene potrpežljivosti, ki jo ima z vsemi študenti, saj ji nikoli ni odveč pomagati in svetovati.

Hvala tudi Valeriji, ki si je vzela čas in izvedla enega od poskusov, ki je del moje naloge in Vesni Hodnik za pomoč pri učenju metode SPR in hvala ker si mi s posojjo svojega računalnika omogočila pripravo zglednih senzorgamov.

Hvala tudi vsem kolegom, ki so istočasno delali v laboratoriju in mi pomagali z različnimi malenkostmi (a lahko to namestno mene ker bi šla prej domov, kako se to izračuna, kako se uporablja to centrifugo?) in odlično družbo, hvala torej Ivani Pavlic, Evi Kočar, Anastasiji Panevski Blažu Vončini in Mihi.

Zahvalila pa bi se tudi celotni družini za podporo in fantu, ki me je znal odtrgati od računalnika ko sem to resnično potrebovala.