

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tomaž ŠVIGELJ

**VPLIV OD HOLESTEROLA ODVISNIH  
CITOLIZINOV NA ARHEOSOME**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tomaž ŠVIGELJ

**VPLIV OD HOLESTEROLA ODVISNIH CITOLIZINOV NA  
ARHEOSOME**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

**THE INFLUENCE OF CHOLESTEROL DEPENDENT CYTOLYSINS  
ON ARCHAEOSOMES**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Odseku za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Gojenje arhej in izolacija arhejskih lipidov je potekalo na Katedri za biokemijo in kemijo živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Analize s površinsko plazmonske resonanco so bile narejene v Infrastrukturnem centru za raziskave molekulskih interakcij (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani).

Študijska komisija je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha, za somentorico prof. dr. Natašo Poklar Ulrich in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčić.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH  
Kemijski inštitut, Odsek za molekularno biologijo in  
nanobiotehnologijo

Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRICH  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum zagovora: 24.6.2016

Podpisani 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.

Tomaž Švigelj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 606: 61: 577..2 (043.2)  
KG od holesterola odvisni citolizini/CDC/listeriolizin O/LLO/perfringolizin O/PFO/arheosomi/*Aeropyrum pernix* K1  
AV ŠVIGELJ, Tomaž, dipl. bioteh. (UN)  
SA ANDERLUH, Gregor (mentor) / POKLAR ULRIH, Nataša (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, magistrski študijski program 2. stopnje biotehnologija  
LI 2016  
IN VPLIV OD HOLESTEROLA ODVISNIH CITOLIZINOV NA ARHEOSOME  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)  
OP XIII, 59, [5] str., 6 pregl., 32sl., 3 pril., 40 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Arheosomi so vezikli sestavljeni iz arhejskih lipidov. Arheje pogosto živijo v ekstremnih okoljskih razmerah, zato imajo tudi lipide prilagojene na različne stresne dejavnike. Arhejski lipidi lahko, zaradi njihovih lastnosti, tvorijo zelo stabilne vezikle, kar lahko s pridom izkoristimo v biotehnologiji. V magistrskem delu smo uporabili lipide izolirane iz arheje *Aeropyrum pernix* K1. V arheosome smo uspešno vgradili holesterol, ki je potreben za vezavo na membrane in tvorbo por od holesterola odvisnih citolizinov. Za od holesterola odvisen citolizin-listeriolizin O smo pokazali, da vezava na membrano iz arhejskih lipidov in sproščanje kalceina iz arheosomov poteče neodvisno od prisotnosti holesterola. Holesterol v arheosomih pozitivno vpliva na hitrost nastanka in število por po dodatku listeriolizina O. Z encimskoimunskim testom smo ugotovili, da se listeriolozin O, na arhejske lipide, veže le, ko so le-ti urejeni v membranski dvosloj.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDC 606: 61: 577..2 (043.2)  
CX cholesterol dependent cytolsins/CDC/listeriolysin O/LLO/perfringolysin O/PFO /archaeosome/*Aeropyrum pernix* K1  
AU ŠVIGELJ, Tomaž, dipl. bioteh. (UN)  
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor) / POKLAR ULRIH, Nataša (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology  
PY 2016  
TI THE INFLUENCE OF CHOLESTEROL DEPENDENT CYTOLYSINS ON ARCHAEOSOMES  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO XIII, 59, [5] p., 6 tab., 32 fig., 3 ann., 40 ref.  
LA sl  
AI sl/en  
AB Archaeosomes are vesicles formed from archeal lipids. Archaea often live in extreme environmental conditions, so they utilise structures (like lipids) adapted to different stress factors. Archeal lipids can form very stable vesicles which could be advantageously used in biotechnology. We extracted lipids from archaeal *Aeropyrum pernix* K1 and we prepared archaeosomes. We also managed to incorporate cholesterol in archaeosomes. Cholesterol is necessary for the membrane binding and pore-forming activity of cholesterol dependent cytolsins. We showed that a cholesterol dependent cytolsin, listeriolysin O, can bind to archaeal lipid membranes independently from the presence of cholesterol. On the other hand, cholesterol in archaeosomes has a positive impact on pore forming ability of listeriolysin O. Using the enzyme-linked immunoassay, we further showed that archaeal lipids need to form bilayer structures in order to bind listeriolysin O.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	III
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	IV
<b>KAZALO VSEBINE</b>	V
<b>KAZALO SLIK</b>	IX
<b>KAZALO PRILOG</b>	XI
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	XII
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	3
2.1 OD HOLESTEROLA ODVISNI CITOLIZINI	3
<b>2.1.1 Zgradba</b>	3
<b>2.1.2 Mehanizem tvorbe por od holesterola odvisnih citolizinov</b>	4
<b>2.1.3 Listeriolizin O</b>	5
2.2 ARHEJE	6
<b>2.2.1 Arheje kot samostojna domena</b>	6
<b>2.2.3 Arhejski membranski lipidi</b>	9
<b>2.2.4 <i>Aeropyrum pernix</i> K1</b>	9
2.3 LIPOSOMI	10
<b>2.3.1 Arheosomi</b>	11
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	12
3.1 MATERIALI IN OPREMA	12
<b>3.1.1 Kemikalije</b>	12
3.2 METODE	16
<b>3.2.1 Gojenje arheje <i>Aeropyrum pernix</i> K1</b>	16
<b>3.2.2 Izolacija in čiščenje lipidov</b>	17
<b>3.2.3 Priprava multilamelarnih in velikih unilamelarnih veziklov za preverjanje sproščanja kalceina</b>	17
3.2.3.1 Merjenje velikosti veziklov in nanodiskov z metodo dinamičnega sipanja svetlobe	18
3.2.3.2 Analiza sproščanje kalceina iz veziklov	19

3.2.3.3 Analiza inhibicije sproščanja kalceina s sladkorji	20
<b>3.2.4 Priprava multilamelarnih in velikih unilamelarnih veziklov za preverjanje vezav listeriolizin O / perfringolizin O</b>	21
3.2.4.1 Določanje vezave proteinov na multilamelarne vezikle z poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata	21
3.2.4.2 Analiza vezave listeriolizina O in perfringolizina O na lipidne membrane s površinsko plazmonske resonanco	22
<b>3.2.5 Priprava nanodiskov</b>	23
3.2.5.1 Inhibicija hemolize z velikimi unilamelarnimi vezikli in nanodiski	25
3.2.5.2 Triptofanska fluorescencija	25
<b>3.2.6 Analiza vezave listeriolizina O na lipide z encimskoimunskim testom</b>	26
<b>3.2.7 Vpliv listeriolizina O na rast <i>Aeropyrum pernix K1</i></b>	28
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	29
4.1 IZOLACIJA ARHEJSKIH LIPIDOV	29
4.2 VELIKOSTI MULTILAMELARNIH IN VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV, IZMERJENE Z METODO DINAMIČNEGA SIPANJA SVETLOBE	29
4.3 SPROŠČANJE KALCEINA IZ MULTILAMELARNIH VEZIKLOV Z LISTERIOLIZINOM O	30
4.4 SPROŠČANJE KALCEINA IZ VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV Z LISTERIOLIZINOM O in PERFRINGOLIZINOM O	31
4.5 INHIBICIJA SPROŠČANJA KALCEINA IZ 100 % ARHEJSKIH VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV S SLADKORJI	34
4.6 PREVERJANJE VEZAVE LISTERIOLIZINA O / PERFRINGOLIZINA O NA ARHEOSOME S TRIPTOFANSKO FLUORESCENCO	35
4.7 PREVERJANJE VEZAVE LISTERIOLIZINA O IN PERFRINGOLIZINA O NA ARHEOSOME Z POLIAKRILAMIDNO ELEKTROFOREZO V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA	39
4.8 INHIBICIJA HEMOLIZE Z LISTERIOLIZINOM O Z VELIKIMI ARHEJSKIMI UNILAMELARNIMI VEZIKLI	41
4.9 ANALIZA INTERAKCIJ LISTERIOLIZINA O/PERFRINGOLIZINA O Z VELIKIMI UNILAMELARNIMI VEZIKLI S POVRŠINSKO PLAZMONSKO RESONANCO	42
4.10 PRIPRAVA NANODISKOV	45
<b>4.10.1 Merjenje velikosti nanodiskov z metodo dinamičnega sisanja svetlobe</b>	46
4.11 INHIBICIJA HEMOLIZE LISTERIOLIZINA O Z ARHEJSKIMI NANODISKI Z IN BREZ HOLESTEROLA	47
4.12 MERJENJE TRIPTOFANSKE FLUORESCENCE LISTERIOLIZINA O PO INKUBACIJI S 100 % ARHEJSKIMI NANODISKI	48

4.13 ENCIMSKOIMUNOLOŠKI TEST VEZAVE LISTERIOLIZINA O NA RAZLIČNE LIPIDE	49
4.14 VPLIV LISTERIOLIZINA O NA RAST <i>Aeropyrum pernix</i> K1	52
<b>5 SKLEPI</b>	53
<b>6 POVZETEK</b>	55
<b>7 VIRI</b>	56
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih lipidov v poskusih.....	13
Preglednica 2: Sestava uporabljenih pufrov .....	15
Preglednica 3: Potek ciklov na površinski plazmonske resonanci za vsake vezikle pri določenem pH.....	22
Preglednica 4: Izmerjene velikosti pripravljenih multilamelarnih veziklov z metodo dinamičnega sisanja svetlobe. ....	28
Preglednica 5:Izmerjene velikosti pripravljenih velikih unilamelarnih veziklov z metodo dinamičnega sisanja svetlobe .....	28
Preglednica 6: Izmerjene velikosti pripravljenih nanodiskov z metodo dinamičnega sisanja svetlobe.....	44

## KAZALO SLIK

Slika 1: Poravnava zaporedij nekaterih od holesterola odvisnih citolizinov (Koster in sod., 2014) .....	4
Slika 2: Shematski prikaz tvorbe por z od holesterola odvisnimi citolizini (Marchioretti in sod., 2013).....	5
Slika 3: Kristalna zgradba listeriolizina O (Köster in sod., 2014).....	6
Slika 4: Filogenetsko drevo (Allers in Mevarech, 2005).....	7
Slika 5: Zgradba (a) glicerolnega dietra(ftalin), (b) diglicerolnega tetraetra (bifftalin) in (c) bifftalin diola s štirimi ciklopentanskimi obroči (Bullock, 2000).....	9
Slika 6: Skeletni formuli 2,3-di-O-sesterterpanil- <i>sn</i> -glicero-1-fosfo-1'-2'-O- $\alpha$ -D-glukozil-mio-inozitola in 2,3-di-O-sesterterpanil- <i>sn</i> -glicero-1-fosfo-mio-inozitola (Gmajner in sod., 2011). .....	10
Slika 7: Emisijski spekter kalceina ob vzbujanju z valovno dolžino 485 nm, pH 7,4. ....	18
Slika 8: Razporeditev vzorcev, za testiranje inhibicije sproščanja kalceina iz velikih arhejskih unilamelarnih veziklovs sladkorji, po plošči. ....	20
Slika 9: Shema senzograma (Besenicar in sod., 2006).....	21
Slika 10: Zgoraj: Nanodisk sestavljen iz MSP1D1 in fosfolipidov prikazan iz strani ter od zgoraj. MSP-ja sta pobrvana oranžno in modro. Spodaj: Nanodisk sestavljen iz MSP1E3D1, fosfolipida in z vstavljenim bR trimerom (21 transmembranskih helikaz). bR trimer jeobarvan vijolično, MSP1E3D1 modro (Bayburt in Sligar, 2010).....	23
Slika 11: Tankoplastna kromatografija izoliranih lipidov iz arheje <i>Aeropyrum pernix</i> <td>27</td>	27
Slika 12: Prikaz sproščanja kalceina iz multilamelarnih veziklov z listeriolizinom O pri pH 5,7..	29
Slika 13: Sproščanje kalceina iz različnih unilamelarnih veziklov z listeriolizinom O pri pH 5,7 (A) in pH 7,4 (B)..	30
Slika 14: Sproščanje kalceina iz različnih unilamelarnih veziklov s perfringolizinom O pri pH 5,7 (A) in pH 7,4 (B)..	31
Slika 15: Sproščanje kalceina iz arheosomov, z vgrajenimi različnimi deleži holesterola, z listeriolizinom O (A) in s perfringolzinom O (B) pri pH 5,7. ....	32

Slika 16: Graf sproščanja kalceina iz arheosomov z listeriolizinom O, po inkubaciji s sladkorji.....	33
Slika 17: Normalizirani spektri triptofanske fluorescence po inkubaciji listeriolizina O z velikimi unilamelarnimi vezikli pri pH 5,7 .....	35
Slika 18: Normalizirani spektri triptofanske fluorescence po inkubaciji perfringolizina O z velikimi unilamelarnimi vezikli pri pH 5,7.....	36
Slika 19: Valovne dolžine maksimumov spektrov triptofanske fluorescence po inkubaciji perfringolizina O z velikimi unilamelarnimi vezikli pri pH 5,7.....	37
Slika 20: Elektroforezna gelčka po barvanju z barvilom Simply blue. ....	38
Slika 21: Delež vezanih in nevezanih proteinov na multilamelarne vezikle, določenih z metodo s NaDS-PAGE in obdelanih rezultatov s programom ImageJ.....	39
Slika 22: Stopnja hemolize ( $V_{max}$ ), s pred tem različno tretiranim listeriolizinom O. ....	40
Slika 23: Senzogram imobilizacije velikih unilamelarnih veziklov na čip L1 pri pH 5,7 in 7,4..	41
Slika 24: Senzogram vezave od holesterola odvisnih citolizinov na velike unilamelarne vezikle z metodo površinske plazmonske resonance.....	42
Slika 25: Senzogram vezave listeriolizina O na velike arhejske unilamelarne vezikle z metodo površinske plazmonske resonance..	43
Slika 26: Izolacija arhejskih nanodiskov s holesterolom (MSP1D1) na gelski kromatografiji (Superdex 200) z različnimi razmerji lipidi/MSP.....	44
Slika 27: Izolacija arhejskih nanodiskov (MSP1E3_D37) na gelski kromatografiji (Superdex 200). ....	44
Slika 28: Razporeditev delcev po izolaciji arhejskih nanodiskov z MSP1E3 in arhejskih nanodiskov s holesterolom ter MSP1D1 (v razmerju lipidi/MSP = 32) po velikosti (glede na število). ....	45
Slika 29: Stopnja hemolize ( $V_{max}$ ), s pred tem različno tretiranim listeriolizinom O. ....	46
Slika 30: Normalizirani spektri triptofanske fluorescence po inkubaciji listeriolizinom O z arhejskimi nanodiski pri pH 5,7. ....	47
Slika 31: Test vezave listeriolizina O na različne lipide z imunoencimskim testom. ....	49
Slika 32: Rastne krivulje <i>Aeropyrum pernix</i> K1 z dodanimi petimi različnimi koncentracijami listeriolizina O v gojišče med eksponentno fazo rasti in kontrolo (brez dodatka listeriolizina O). ....	50

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Sistem za anaerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem (Milek in sod., 2005).

**Priloga B:** Skeletne formule lipidov, ki vežejo listeriolizin O glede na imunoencimske teste. Lipidi so v tabeli razporejeni po moči vezave listeriolizin O- lipid.

**Priloga C:** Skeletne formule lipidov, ki z imunoencimskim testom ne vežejo listeriolizina O.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Å	Ångstrem, enota za merjenje dolžine
AGI	2,3-di-O-sesterterpanil- <i>sn</i> -glicero-1-fosfo-1'-2'-O- $\alpha$ -D-glukozil-mio-inozitol
AI	2,3-di-O-sesterterpanil- <i>sn</i> -glicero-1-fosfo-mio-inozitol
BSA	goveji serumski albumin (angl. »bovine serum albumin«)
CDC	od holesterola odvisni citolizini (angl. »Cholesterol Dependent Cytolysins«)
DLS	dinamično sipanje svetlobe (angl. »Dynamic Light Scattering«)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EDTA	eten diamin tetraocentna kislina
ELISA	encimsko imunološki test (angl. »Enzyme-Linked Immunosorbent Assay«)
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (angl. »Fast Protein Liquid Chromatography«)
GUV	unilamelarni vezikli celične velikosti (angl. »Giant Unilamellar Vesicles«)
HEPES	N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[2-etan-sulfonska kislina]
kDa	kilo Dalton
LDS	litijev dodecil sulfat
LLO	listeriolizin O
LUV	veliki unilamelarni vezikli (angl. »Large Unilamellar Vesicles«)
MES	2-morfolinoetansulfonska kislina
MLV	multilamelarni vezikli (angl. »Multilamellar Vesicles«)
MQ	mili-Q, ultra čista voda
MSP1D1	različica membranskega ovojnega proteina za tvorbo nanodiskov (angl. »Membrane Scaffold Protein 1D1«)
MSP1E3	daljša različica membranskega ovojnega proteina za tvorbo nanodiskov (angl. »Membrane Scaffold Protein 1E3«)
MWCO	velikosti delcev, ki ne pridejo več skozi membrano (angl. »Molecular Weight Cut Off«)
NaCl	natrijev klorid
NaDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
NaOH	natrijev hidroksid
OG	oktil glikozid
OD	optična gostota (angl. »Optical Density«)
PEST	aminokislinsko zaporedje bogato s prolini, glutaminsko kislino, serini in treoninom, značilno za evkariontske proteine s kratko razpolovno dobo, ko preidejo v celico (P (prolin), E (glutaminska kislina), S (serin), T (treonin))
PFO	perfringolizin O
POPC	1-palmitol-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin
Rcf	relativna centrifugalna sila (angl. »Relative Centrifugal Force«)

RNA	ribonukleinska kislina
Rpm	obrati na minuto (angl. »Rotary Per Minute«)
RU	odzivne enote (angl. »Response Units«)
SDS	natrijev dodecilsulfat
SPR	površinska plazmonska resonanca (angl. »SurfacePlasmon Resonance«)
TBS	Tris pufer s soljo
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin, substrat za peroksidazo v imunoloških testih
Tris	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol
UV	ultravijolično
WT	divji tip (angl. »wildtype«)

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Liposomi ali lipidni vezikli so okrogli sferični delci, sestavljeni iz lipidnega dvosloja. Lahko so sestavljeni iz enega ali več lipidnih dvoslojev. Veliki so od nekaj deset nanometrov do nekaj mikrometrov. V njihovo notranjost lahko zapakiramo določene snovi, ki same po sebi ne morejo prehajati skozi dvosloj (Kelly in Sandoz, 1981). To lastnost lahko uporabimo za aplikacije v biotehnologiji, saj jih, na primer, lahko uporabimo kot dostavni sistem.

Od holesterola odvisni citolizini (angl. »Cholesterol-dependent cytolysins«, CDC-ji) so toksini, ki tvorijo pore v membranah, ki vsebujejo holesterol. CDC-ji tvorijo zelo velike pore, skozi katere lahko prehajajo snovi velike do 30 nm (Tweten, 2005). Liposomi morajo za uporabno biotehnološko aplikacijo kapsulirano snov sprostiti iz vezikla, pri čemer bi jim lahko pomagali prav CDC-ji. Biokemijske in biofizikalne lastnosti liposomov so odvisne predvsem od njihove lipidne sestave. Če želimo pripraviti čim bolj stabilne in odporne liposome na zunanje dejavnike, vendar takšne, da lahko še vedno vplivamo na sproščanje kapsulirane snovi, potrebujemo tudi čim bolj stabilne in odporne lipide. Lipidi termofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1 so zelo odporni na ekstremne, za večino organizmov neugodne, razmere v okolju. Za arhejske lipide je značilna etrska vez med glicerolom in ostalim delom lipida, ki je precej močnejša od estrske, ki jo najdemo pri evkariontskih in bakterijskih lipidih. Glicerol lahko nastopa v levosučnih in desnosučnih oblikah, zaradi česar so potrebeni različni encimi za njihovo razgradnjo. Arhejski lipidni repi so iz izoprenoidnih verig s številnimi stranskimi verigami, kar omogoči večjo stabilnost membrane pri višjih temperaturah. Membrana arheje *Aeropyrum pernix* K1 je sestavljena iz dveh lipidov, C<sub>25,25</sub>-arhatidilglukozilinozitola in C<sub>25,25</sub>-arhatidilinozitola (AGI+AI). Stabilnost veziklov, sestavljenih iz teh lipidov, so že testirali in med drugim določili veliko odpornost na strižne sile, stabilnost v pH območju med 4 do 12 in v temperaturnem območju med 0 in 100 °C (Gmajner in sod., 2011). Liposome iz arhejskih lipidov imenujemo arheosome. Da lahko vplivamo na sproščanje iz arheosomov s CDC-ji, moramo v membrano vgraditi tudi holesterol.

V magistrskem delu smo raziskovali vezavo in tvorbo por CDC-jev na arheosomih z različnim deležem holesterola.

### 1.2 CILJI NALOGE

Pripravili smo multilamelarne (MLV) in velike unilamelarne vezikle (LUV) iz arhejskih lipidov z vgrajenim holesterolom in brez holesterola. Želeli smo opredeliti vezavo in tvorbo por na veziklih s CDC-ji. Preverjali smo sproščanje kalceina iz veziklov s CDC-ji listeriolizinom O (LLO) in perfringolizinom O (PFO), ter primerjali aktivnost z uporabo liposomov iz fosfolipidov. Sproščanje kalceina smo spremljali z merjenjem fluorescence. Uporabili smo arheosome z različnimi deleži holesterola v membranah. Preverjali smo vezavo LLO in PFO na pripravljene liposome s površinsko plazmonsko resonanco (SPR),

z merjenjem triptofanske fluorescence CDC-jev, z inhibicijo hemolize in še nekaterimi drugimi pristopi.

Med nalogo smo opazili, da se LLO veže tudi na arheosome brez holesterola, zato smo si določili nove cilje. Poskušali smo opredeliti vezavo LLO-ja na arheosome brez holesterola. Z ELISA testi smo preverjali vezavo na vrsto različnih lipidov, ki so imeli nekatere skupne lastnosti arhejskim lipidom ali holesterolu, ali pa tudi nobenemu od teh. Pripravili smo arhejske nanodiske in z njimi okarakterizirali vezavo LLO-ja na arhejske membrane z merjenjem triptofanske fluorescence in testom inhibicije hemolize.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Holesterol se bo vgrajeval v membrane arheosomov. Holesterol se v večino lipidnih veziklov uspešno vgrajuje, medtem ko sam ne more tvoriti tipičnih lamelarnih membran. Pričakujemo, da se bo holesterol učinkovito vgradil v membrane sestavljene iz arhejskih lipidov in bo lahko predstavljal do 50 odstotni molski delež lipidov v membrani.
- CDC-ji se bodo vezali na arheosome s holesterolom ter tvorili pore. CDC-ji tvorijo pore v membranah s holesterolom. Pričakujemo, da lipidi, kot so AGI in AI ne bodo ovirali vezave in tvorbe por s CDC-ji.

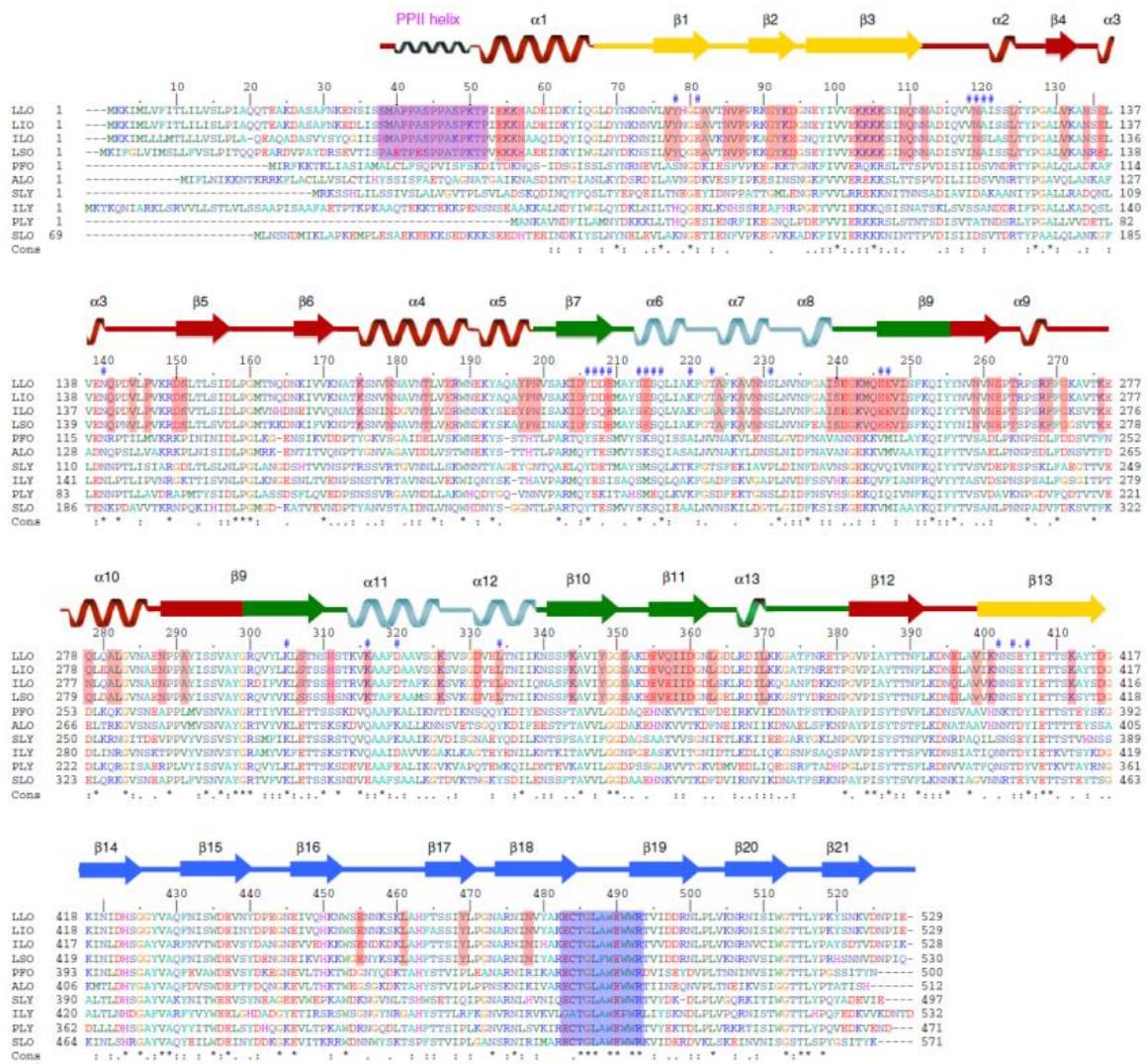
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OD HOLESTEROLA ODVISNI CITOLIZINI

Od holesterola odvisni citolizini (angl. »cholesterol dependent cytolysins«, CDCs) so velika družina toksinov, ki tvorijo pore v celičnih membranah. Do sedaj je odkritih skoraj 50 vrst mikroorganizmov, ki proizvajajo CDC-je, večinoma grampozitivnih bakterij, iz rodu *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Arcanobacterium*, *Gardnerella*, itd. Skoraj vsi CDC-ji imajo signalni peptid tipa II za izločanje iz celice. Primer CDC-ja ki nima signalnega peptida je pneumolizin, ki ga izloča bakterija *Streptococcus pneumoniae*. V tem primeru gre verjetno za še neodkrito pot izločanja proteina iz celice, saj je znano, da deluje izvencelično (Tweten in sod., 2015). Glavna lastnost CDC-jev so zelo velike pore (sestavljeni iz do 50 monomerov), ki nastajajo na membranah evkarionskih celic, ki vsebujejo holesterol (Shepard in sod., 2000; Tweten, 2005; Tweten in sod., 2015).

#### 2.1.1 Zgradba

Prvo aminokislinsko zaporedje predstavnika CDC-jev so objavili Walker in sod. leta 1987 za pneumolizin iz bakterije *Streptococcus pneumoniae*. Od takrat je bilo objavljenih preko 30 različnih aminokislinskih zaporedij CDC-jev. Ta zaporedja so razkrila, da večina CDC-jev vsebuje tipičen signalni peptid tipa II za izločanje proteinov iz bakterijske celice. CDC-ji se izločijo v izvencelično okolje kot topni monomeri. Po vezavi na tarčne membrane s holesterolem oligomerizirajo in po obsežnih strukturnih spremembah v molekuli tvorijo velike pore. Molekulska masa CDC-jev je med 50 in 80 kDa. Osrednja zgradba, odgovorna za tvorbo por je velika okoli 50 kDa. Poleg tega imajo številni CDC-ji peptidni podaljšek na N-terminalnem koncu. N-terminalni del proteinov ima pri različnih toksinih različno funkcijo, posledično je to zaporedje tudi najbolj heterogena regija CDC-jev (Hotze in Tweten, 2012). Primarne zgradbe CDC-jev imajo med 40 in 70 % ohranjenih zaporedij. Blizu C-terminalnega konca, v četrti domeni, CDC-ji vsebujejo visoko ohranjeno zaporedje (ECTGLAWWWWR). Ta zaporedje (motiv) se imenuje undekapeptid (UDP), saj ga tvori 11 aminokislín. Imenujemo ga tudi triptofanska zanka, saj je bogat s triptofani in ima vlogo pri vezavi monomera v membrano (Hotze in Tweten, 2012; Tweten in sod., 2015).



Slika 1: Poravnava zaporedij nekaterih od holesterola odvisnih citoлизinov (Köster in sod., 2014). Prve štiri vrstice prikazujejo zaporedje LLO iz rodu *Listeria*. Sledijo še PFO, antrolizin O (ALO), suilizin (SLY), intermediilizin (ILY), pneumolizin (PLY) in streptolizin (SLO). Vijačnica PPII pri LLO in udekapeptid sta označena vijolično in modro. Ohranjene aminokisline v rodu *Listeria* so označene rdeče.

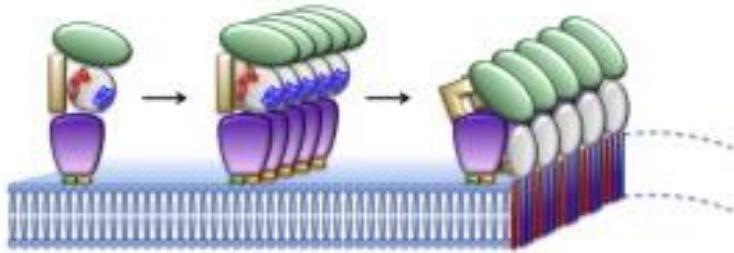
Prvo kristalno zgradbo CDC-ja so razrešili Rossjohn in sod. (1977) za perfringolizin O iz *Clostridium perfringens*. Do danes so kristalno zgradbo določili še listeriolizinu O iz *L. monocytogenes* (Köster in sod., 2014) in nekaterim drugim. Zgradba PFO, ki je sestavljena iz štirih domen, je postala osnovni model za biokemijsko in biofizikalno preučevanje tvorbe membranskih por (Hotze in Tweten, 2012).

### 2.1.2 Mehanizem tvorbe por od holesterola odvisnih citoлизinov

Monomeri CDC-jev se s četrto domeno vežejo na membrano preko dveh receptorjev. Za večino CDC-jev je receptor za vezavo holesterol, v nekaj primerih (npr. ILY iz

*Streptococcus intermedius*), pa membranski protein CD59 (Wickham in sod., 2011). Tudi, ko je receptor za vezavo CD59, CDC-ji za vgradnjo v membrano potrebujejo holesterol.

Dosedanje študije so pokazale, da so za vezavo na membrano odgovorne tri kratke hidrofobne zanke v četrti domeni (L1, L2 in L3), tako za CDC-je, ki uporabljajo za receptor holesterol, kot tudi za tiste, ki uporabljajo CD59. Zanka L1 vsebuje motiv Thr-Leu, ki je ohranjen v vseh do sedaj znanih CDC-jih, razen v primeru proteina, ki ga izloča *S. tigrinus*; ta ima par Thr-Ile (Tweeten in sod., 2015). Znano je, da se ta regija šibko veže na 3-β-hidroksilno skupino holesterola. Ko zanka L1 prepozna holesterol, se stranske verige aminokislin na L2 in L3 vsidrajo v membrano in tako stabilizirajo vezavo (Solatni in sod., 2007; Farrand in sod., 2010). V membrano se vgradi tudi UDP regija, ki ni odgovorna samo za dodatno stabilizacijo vezave proteina na membrano, ampak vpliva tudi na konformacijske spremembe, ki povzročijo združevanje vezanih monomerov v oligomere. V okroglo zgradbo (poro) s premerom do 300 Å oligomerizira tudi do 50 monomerov. Predstopnja pore je predpora. Predpora je zaključen krožni kompleks na membrani, ki v membrano še nima vstavljenih transmembranskih β-lasnic (TMH motiv). Med prehajanjem predpore v poro se snopi α-vijačnic v tretji domeni razvijejo in tvorijo po dve transmembranski β-lasnici, ki prispevata k tvorbi velike zgradbe β-sodčka. Med nastajanjem pore iz predpore, se prva in tretja domena premakneta do 40 Å bližje k membrani. Ta premik omogoči, da se β-sodček vstavi v lipidni dvosloj (slika 2) (Shepard in sod., 2000; Gilbert, 2010; Farrand in sod., 2010; Tweten in sod., 2015).



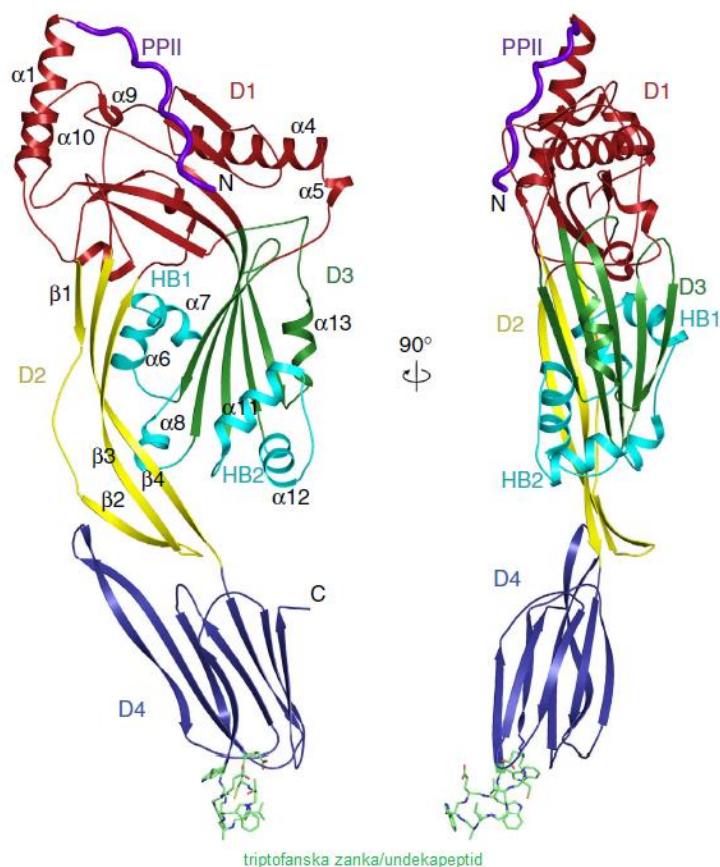
Slika 2: Shematski prikaz tvorbe por z od holesterola odvisnimi citolizini (Marchioreto in sod., 2013). Prva stopnja – vezava monomera na membrano; druga stopnja –oligomerizacija na membrani (tvorba predpore); tretja stopnja –vsidranje TMH motiva v membrano (tvorba pore).

### 2.1.3 Listeriolizin O

Listeriolizin O (LLO) je najpomembnejši virulenčni dejavnik bakterije *Listeria monocytogenes*. Njegova funkcija je bakteriji omogočiti prehod iz kislega fagosoma gostiteljske celice v pH nevtralen citosol, kjer se lahko razmnožuje. Bakterija proizvaja in izloča LLO v fagosomu in tudi kasneje v citosolu, a njegovo delovanje je omejeno večinoma le na fagosom. LLO je edinstven predstavnik CDC-jev, saj, zaradi od pH odvisnega delovanja, edini ne lizira gostiteljske celice. N-terminalni konec je bogat s prolini in serini in je podoben evkarionskemu PEST zaporedju, kateri služi kot signalni peptid za razgradnjo proteina. Za proteine s tem zaporedjem je značilna kratka razgradna

doba od trenutka, ko vstopi v gostiteljsko celic. Zaradi tega je LLO po sprostitvi bakterije iz fagosoma v citosol gostitelja, tarča za razgradnjo (Schnuppin Portnoy, 2007).

LLO je ob prevodu iz RNA zaporedja sestavljen 529 aminokislin, vendar prvih 25 aminokislin na N-terminalnem delu predstavlja signalni peptid, ki se po sprostitvi proteina iz bakterije odcepi. Tako ima zrel protein 504 aminokisline in molsko maso 55,8 kDa. Kristalna zgradba LLO je zelo podobna ostalim CDC-jem (Köster in sod., 2014).



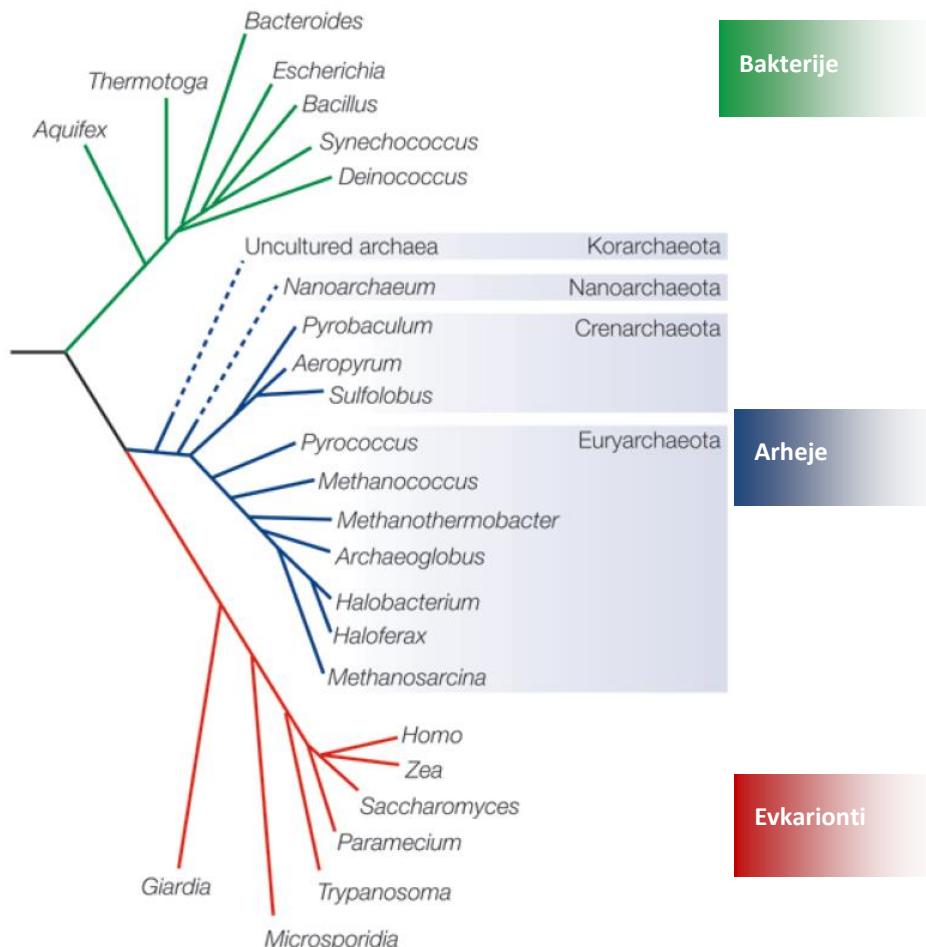
Slika 3: Kristalna zgradba listeriolizina O (Köster in sod., 2014).

## 2.2 ARHEJE

### 2.2.1 Arheje kot samostojna domena živega

V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so znanstveniki opozorili na preveč posplošeno delitev živih bitij le na evkarionte in prokarionte, ki je bila določena glede na prisotnost ali odsotnost celičnega jedra. Woese in Fox (1977) sta predlagala delitev na tri domene – evbakterije, arheobakterije in evkarionte. Z razvojem molekularnih tehnik za ugotavljanje filogenetske sorodnosti mikroorganizmov in posledičnim odkrivanjem organizmov, katere je bilo zaradi novih, neobičajnih lastnosti težko uvrstiti v dotedanje filogenetsko drevo, se

je uveljavila delitev na tri domene (slika 4): bakterije, arheje in evkarionti (Woese in Fox, 1977).



Slika 4: Filogenetsko drevo živega na podlagi ribosomalne RNA (Allers in Mevarech, 2005).

Za arheje in bakterije je značilno, da nimajo celičnega jedra ali drugih celičnih organelov. Njihove celice se močno razlikujejo od evkariontskih. Velikost arhejskih celic v premeru je 1 do 10 µm. Celice so obdane s celično membrano in togo celično steno. Zunanjo površino imajo prekrito z bički, katere potrebujejo za premikanje, in s piliji, kateri so potrebni za izmenjavo DNA med spolnim razmnoževanjem. S piliji se lahko prokarioti tudi pritrđijo na različne površine. Ctoplazma arhej je gelu podobna heterogena suspenzija bioloških molekul (encimov, ribosomov in v jedrni regiji zvite DNA) (Boyer, 2005). Genom arhej je velik od 840 kbp do 2300 kbp in je podoben evkariontskemu. Posebnost njihovega genoma so histonom podobni proteini, in zgradbe, ki spominjajo na nukleosome. Vse fenotipske skupine arhej imajo bakteriofagom ali virusom podobne plazmide in druge genomske elemente (Bult in sod., 1996).

Do zdaj odkriti predstavniki arhej imajo svoje naravne habitate večinoma v ekstremnih ekoloških nišah, kjer okoljske razmere večini znanih organizmov ne omogočajo življenja. Glede na nekatere skupne prilagoditve arhej so razdeljene na tri glavna kraljestva: Crenarchaeota, kjer najdemo termofilne arheje; Euryarchaeota, to so ekstremni halofili,

sulfatni reducenti, termofilni heterotrofi in metanogene bakterije; ter Korarchaeota, kamor zaenkrat spadata le dva predstavnika, identificirana na podlagi DNA analize vzorcev iz okolja (Milek in sod., 2005). Striktno anaerobne metanogene arheje so prisotne v različnih anaerobnih okoljih, kot so komposti, močvirja barje ipd.. Halofilne in Termofilne arheje najdemo v usedlinah slanih voda ter podmorskih vrelcih, medtem ko v tleh predstavnikov arhej še niso našli. Najbolj osnovna delitev arhej je, poleg že opisanih ekstremnih termofilov, halofilov in metanogenih arhej, še na: psihrofile, ki za optimalne pogoje potrebujejo temperaturo pod 15 °C, piezofile, kateri najbolje rastejo pri tlaku večjem od atmosferskega, alkalofile, ki imajo optimalne pogoje za rast pri pH nad 9 in acidofile, ki najbolje rastejo pri pH-ju pod 3. Da arheje lahko preživijo v okolju, kjer večina znanih mikroorganizmov nima možnosti za obstoj, je odvisno od številnih prilagoditev, ki so vezane na osnovnimi tipe makromolekul, kot so lipidi, proteini in DNA (Milek in sod., 2005).

### 2.2.2 Hipertermofilne arheje

Hipertermofilni organizmi so imajo optimalno temperaturo rasti nad 80 °C, medtem ko pod 60 °C niso sposobni rasti.. Hipertermofile so prvič opisali v 80-ih letih devetnajstega stoletja, do konca dvajsetega stoletja je bilo opisanih že več kot 70 vrst hipertermofilov, ki so razvrščenih v 10 rodov. Večina poznanih hipertermofilnih organizmov spada med arheje. Z novimi odkritji se najvišje temperature, kjer so mikroorganizmi sposobni življenja, se pomika tudi nad 121 °C, ki je temperatura avtoklaviranja. Vsi organizmi za življenje potrebujejo vodo, ki pa ima pri atmosferskem tlaku vrelišče pri 100 °C. Na zemlji najdemo temperature vode, višje od 100 °C, predvsem v globokomorskih vrelcih. Tam je voda pod tlakom, zato lahko dosega tako visoke temperature. Glede na to ni naključje, da so večino hipertermofilnih arhej izolirali iz geotermalno ogretih tal (Kashefi in Lovley, 2003; Milek in sod., 2005; Meglen, 2008).

Hipertermofili so večinoma heterotrofni organotrofi. To pomeni, da energijo pridobivajo s katabolizmom organskih substratov. Le nekateri so zmožni kot vir energije izkoriščati ogljikove hidrate, ostali za vir energije izrabljajo proteinske substrate, (Milek in sod., 2005).

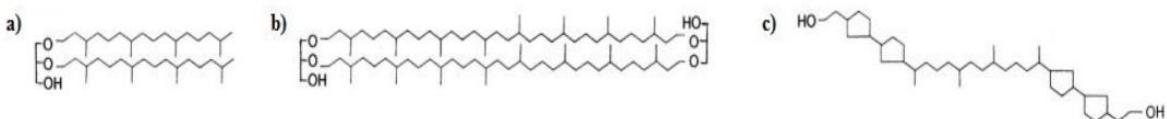
Mehanizem, ki omogoča termostabilnost, ni en sam, temveč se prepleta več možnosti. Lipidi, ki sestavljajo membrane, imajo, na primer, to posebnost, da je izoprenoidna veriga vezana z etersko vezjo na glicerol na mestih *sn*-2,3, medtem ko so pri bakterijah in evkariontih nerazvezjane maščobne kisline vezane na glicerol z estrsko vezjo na mestih *sn*-1,2 (Milek in sod., 2005).

Na visoke temperature so prilagojeni tudi proteini. Ti se po aminokislinskih zaporedjih zelo malo razlikujejo od aminokislinskih zaporedij njihovih mezofilnih homologov. To dokazuje, da na termostabilnost vplivajo že majhne spremembe. Stabilnost pri posameznih proteinih naj bi bila povezana s povečano hidrofobnostjo, z večjim številom vodikovih vezi, elektrostatskih interakcij med nabitimi in polarnimi aminokislinskimi ostanki znotraj encima, med njegovimi podenotami, ipd. (Vieille in Zeikus, 2001).

Temperatura vpliva tudi na stabilnost nukleinskih kislin, saj je od nje odvisna količina energije, ki je potrebna za taljenje dvojne vijačnice DNA. Pri neki določeni temperaturi pa je stabilnost dvojne vijačnice odvisna od deleža GC baznih parov in dodatne zvitosti vijačnice. Pri termofilnih arheah so našli zelo enostavne histone, sicer značilne za evkarionte, ki naj bi znatno povišali temperaturo taljenja DNA. Na slednje naj bi vplivala tudi koncentracija soli (Cavicchioli in sod., 2000; Meglen, 2008).

### 2.2.3 Arhejski membranski lipidi

Zgradba arhejskih membranskih lipidov temelji na izoprenoidnih verigah različnih dolžin z estrsko povezanim glicerolom. Glavni lipidi v membranah arhej so glicerolni dietri z dvema C<sub>20</sub> verigama ali diglycerolni tetraetri z dvema C<sub>40</sub> verigama. Lipidi v membranah termofilov v ogljikovodikovi verigi pogosto vsebujejo štiri ciklopentanske obroče. Glicerolni dietri v membranah tvorijo lipidni dvosloj, medtem ko glicerolni tetraetri tvorijo lipidni monosloj. Značilne membranske lastnosti arhejskih tetraetrov dajejo liposomom rigidnost. Bipolarni lipidi so pomembni za prilagajanje arhej na ekstremna okolja. Strukturne lastnosti bipolarnih lipidov, za katere je značilna prisotnost dveh polarnih glav in hidrofobne izoprenoidne molekule, ki je v primerjavi z navadnimi estrskimi lipidi dvakrat daljša, dajejo membranam dodatno stabilnost. Ta posebnost je pomembna predvsem za membrane termofilnih arhej (Jacquemet in sod., 2009; Ulrich in sod., 2009).



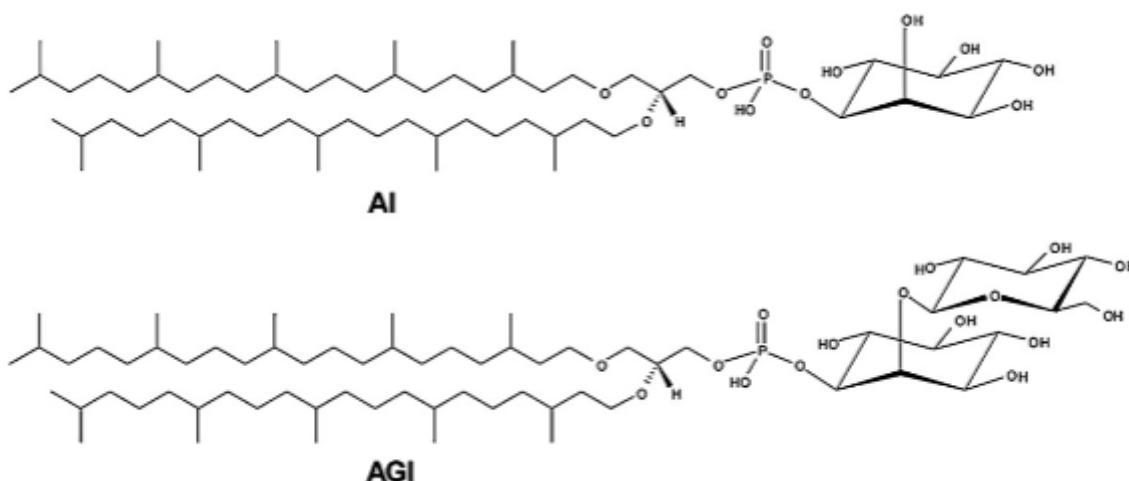
Slika 5: Zgradba (a) glicerolnega dietra(ftalin), (b) diglycerolnega tetraetra (bifatin) in (c) bifatin diola s štirimi ciklopentanskimi obroči (Bullock, 2000).

### 2.2.4 *Aeropyrum pernix* K1

*Aeropyrum pernix* je aerobna hipertermofilna vrsta arhej, ki spada v deblo Crenarchaeota. Celice so sferične oblike, velike med 0,8-1,0 µm. Zunanost membrane je prekrita s proteinsko (peptidoglikansko) ovojnico (S-sloj), ki membrano ščiti pred zunanjimi dejavniki. *A. pernix* optimalno raste pri temperaturi 92 °C, pH 7,0 in 3,5 % slanosti (Sako in sod., 1996). Njen generacijski čas je približno 200 minut. Kot substrate za rast izkorišča različne kompleksne proteinske spojine. Za kultivacijo *A. pernix* je pomembno, da je v prisotnosti reducirajočih ogljikovih hidratov in triptona rast *A. pernix* močno inhibirana. pride namreč do tvorbe produktov Millardove reakcije imenovane tudi neencimsko porjavenje, ki nastopi med karbonilno skupino reducirajočih ogljikovih hidratov in aminoskupinami aminokislin (Sako in sod., 1996; Kim in Lee, 2003).

Vrsta *Aeropyrum pernix* je prvi predstavnik debla Crenarchaeota in prvi aerobni predstavnik arhej, ki so mu znanstveniki določili celotno zaporedje genoma in kot tak je zanimiv za laboratorijske raziskave (Sako in sod., 1996).

Membrane arheje *A. pernix* sestavljajo disesterteranil ( $C_{25}, C_{25}$ ) glicerolni etrski lipidi. Polarne lipide sestavlja pet komponent, od teh pa prevladujeta samo 2,3-di-O-sesterterpanil-*sn*-glicero-1-fosfo-1'-2'-O- $\alpha$ -D-glukozil-*mio*-inozitol (AGI; 91 %), ki ima inozitol in glukozo, in 2,3-di-O-sesterterpanil-*sn*-glicero-1-fosfo-*mio*-inozitol (AI; 9 %), ki ima kot polarno komponento glave samo inozitol. Lipidi so urejeni v dvosloj (Sako in sod., 1996; Gmajner in sod., 2011).



Slika 6: Skeletni formuli 2,3-di-O-sesterterpanil-*sn*-glicero-1-fosfo-1'-2'-O- $\alpha$ -D-glukozil-*mio*-inozitola in 2,3-di-O-sesterterpanil-*sn*-glicero-1-fosfo-*mio*-inozitola (Gmajner in sod., 2011).

### 2.3 LIPOSOMI

Liposomi ali lipidni vezikli so sferični zaprti delci, sestavljeni iz ukrivljenih lipidnih dvoslojev, ki vase ujamejo delce topila, v katerem prosto plavajo. Lahko so sestavljeni iz ene ali več različnih koncentričnih membran. Njihova velikost se giblje med 20 nm do več deset mikrometrov, medtem ko debelina membrane znaša večinoma med 4 - 6 nm. Lipidi so običajno amfifilne molekule, kar pomeni, da imajo en konec polaren, drugi konec pa hidrofoben. Polaren konec vodo privlači, medtem ko jo hidrofobni odbija, zato se lipidi v vodnem okolju sestavijo v urejene zgradbe. Amfifilne molekule imajo lahko enega ali dva nepolarna repa. Tiste molekule z enim nepolarnim repom tvorijo micele, medtem ko tiste z dvema nepolarnima repoma tvorijo lipidni dvosloj. V takšni ureditvi je nepolarna sredica zaščitena oziroma skrita s polarno površino. Ker je nepolarna sredica na robovih dvosloja še vedno izpostavljena vodi, se take lamele zaprejo v zaključene strukture (Lasic, 1993).

Na podlagi velikosti in števila membran delimo liposome v več skupin. Glede na število membran jih delimo na enoslojne liposome (LUV) in večslojne liposome (MLV). Enoslojne liposome nadalje glede na velikost delimo na majhne enoslojne liposome (SUV), velike enoslojne liposome (LUV) in enoslojne liposome celičnih velikosti (GUV) (Douliez in sod., 2003).

V liposome lahko vgrajujemo hidrofilne, amfifilne ali lipofilne molekule. Hidrofilne se vgradijo v notranji, vodni prostor liposoma in tik ob njegovi membrani. Amfifilne so z

lipofilnimi deli vgrajeni v lipidni dvosloj, medtem ko je hidrofilni del usmerjen ven iz lipidnega dvosloja. Lipofilne molekule pa so v celoti vgrajene v membrane (Kočev var Glavač in Kristl, 2005)

### 2.3.1 Arheosomi

Arheosomi so liposomi, pripravljeni iz lipidov, izoliranih iz arhej, ali iz sintetično pridobljenih molekul, ki imajo podobne lastnosti arhejskim lipidom. Pogosto so arhejski vezikli bolj stabilni in manj prepustni od običajnih liposomov, kateri za izboljšanje stabilnosti potrebujejo tudi več kot 33 mol % holesterola v membranah. Dosedanje študije na arhejskih lipidih so pokazale njihovo visoko odpornost na oksidativni stres, alkalen pH, aktivnost fosfolipaz, žolčnih soli in serumski medij. Zaradi značilnih lastnosti arhejskih lipidov se lahko arheosomi formirajo pri različnih temperaturah. To omogoča kapsulacijo temperaturno občutljivih komponent. Pripravimo jih lahko v prisotnosti zraka (kisika), saj niso podvrženi oksidacijskim procesom. *In vitro* ter *in vivo* študije kažejo, da arheosomi niso citotoksični za več vrst miši (Jacquemet in sod., 2009).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI IN OPREMA

##### 3.1.1 Kemikalije

Za eksperimentalno delo smo uporabili naslednje kemikalije:

- Bacto tryptone (BD, ZDA),
- Barvilo SimplyBlue SafeStain (Life technologies, ZDA),
- BSA (Sigma, ZDA)
- DTT (Sigma, ZDA),
- EDTA (Sigma, ZDA)
- Elektroforezni pufer NuPAGE® MES SDS Running Buffer (Life technologies, ZDA),
- Etanol (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Glukoza (Sigma, ZDA),
- Goveja kri (Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija)
- HCl (Merck, Nemčija),
- Hepes (Sigma, ZDA),
- Holesterol (Avanti Polar Lipids, ZDA),
- Inozitol (Sigma, ZDA),
- Kalcein (Sigma, ZDA)
- Kloroform (Sigma, ZDA),
- Kvasni ekstrakt, Bacto Yeast Extract (BD, ZDA),
- Marine broth 2216 (BD, ZDA),
- MES (Sigma, ZDA),
- Mili-Q, ultračista voda,
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (Alkaloid, Makedonija),
- NaCl (Merck, ZDA)
- Na-holat (Serva, Nemčija)
- NaOH (Sigma, ZDA),
- Pepton (Oxoid, Velika Britanija),
- Proteinski standard Native Mark protein standard (Life technologies, ZDA),
- Proteinski standard Novex® Sharp Unstained std. (Invitrogen, ZDA),
- Pufer pri NativePAGE, Invitrogen NativePage Sample Buffer (4x) (Life technologies, ZDA),
- Pufer pri NuPAGE, LDS Sample Buffer (4x) (Life technologies, ZDA),
- β-merkaptetoetanol (Sigma, ZDA),
- TMB liquid substrate system za ELISA test (Sigma-Aldrich, ZDA),
- Tris baza (Sigma, ZDA),
- Triton X-100 (Sigma, ZDA)

### 3.1.2 Lipidi

Preglednica 1: Seznam uporabljenih lipidov v poskusih

Ime lipida	Okrajšava	Proizvajalec
1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicer-3-fosfat	DOPA	Avanti polar lipids, ZDA
15-ketoholesten		Avanti polar lipids, ZDA
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicer-3-fosfatidilholin	POPC	Avanti polar lipids, ZDA
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicer-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)	POPG	Avanti polar lipids, ZDA
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicer-3-fosfo-L-serine	POPS	Avanti polar lipids, ZDA
5-holesten-3-on		Aldrich, ZDA
7-dehidrosterol		Fluka Biochemika, ZDA
C <sub>25,25</sub> -arhetidil(glukozil)inozitol + C <sub>25,25</sub> -arhetidilinozitol	AGI + AI	Izolirana kot zmes (91 % AGI + 9 % AI) na Biotehniški fakulteti
Ceramid (iz svinjskih možganov)	BCER	Avanti polar lipids, ZDA
D-eritro-sfingozin (sintetičen)	SSPH	Avanti polar lipids, ZDA
D-eritro-sfingozin fosfoholin	SPHPC	Avanti polar lipids, ZDA
D-eritro-sfingozin-1-fosfat	SPH1PO4	Avanti polar lipids, ZDA
D-galaktozil-β1-1'-N-nervonoil- D-eritro-sfingozin	βGALC241CER	Avanti polar lipids, ZDA
D-glukozil-β1-1'-N-stearoil-D-eritro-sfingozin	βDGLUC18CER	Avanti polar lipids, ZDA
D-laktozil-β1-1'-palmitoil- D-eritro-sfingozin	βDLACC16CER	Avanti polar lipids, ZDA
D-ribo-fitosfingozin	Fito-sfzn	Avanti polar lipids, ZDA
Ergosterol		Sigma, ZDA
Holesterol	hol	Avanti polar lipids, ZDA
Lanosterol		Sigma, ZDA
L-α-fosfatidilinozitol (iz govejih jeter)	Jetrni PI	Avanti polar lipids, ZDA
N-acetyl-D-eritro-sfingozilfosfohorilholin	20SM	Avanti polar lipids, ZDA
Natrijev holesteril sulfat		Sigma, ZDA
β-sitosterol		Calbiochem, ZDA

### 3.1.3 Proteini

Za preverjanje vezave na lipide in tvorbe por ter pripravo nanodiskov smo uporabili naslednje proteine, ki so bili že predhodno izolirani na Kemijskem inštitutu na Odseku za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo ter alikvotirani in shranjeni na – 80 °C manj kot 2 leti:

- LLO
- PFO
- LLO Y406A
- membranski ovojni protein za tvorbo nanodiskov (angl. »Membrane Scaffold Protein 1E3\_D73C«) (MSP1E3\_D73C)
- membranski ovojni protein za tvorbo nanodiskov (angl. »Membrane Scaffold Protein 1D1«) (MSP1D1)

Protitelesa :

- Primarna protitelesa mišja monoklonska IgG proti-His-repk (Santa Cruz Biotechnology, ZDA)
- Sekundarna proti-mišja IgG protitelesa (Sigma, ZDA)

### 3.1.4 Laboratorijski pribor in oprema

Pri delu smo uporabljali naslednjo opremo:

- avtoklav (Sutjeska, Jugoslavija),
- avtomatske pipete (Sartorius Biohit, Nemčija),
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Nemčija),
- centrifuga Rotina 35 R in Rotina 38 R (Hettich, Nemčija),
- čitalec mikrotitrskih plošč SynergyMX (BioTek, ZDA),
- dializna kaseta Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, 0,1-0,5 mL, 10kDa cut off (Pierce, ZDA),
- ekstrudor LiposoFast (Avestin, Kanada),
- elektroforezni gel NativePAGE 3-12 % Bis-Tris Mini Gel (Life technologies, ZDA),
- elektroforezni gel NuPAGE Novex<sup>®</sup> Bis-Tris Mini Gel (Life technologies, ZDA),
- elektroforezni sistem XCell SureLockTM Mini-Cell Electrophoresis System (Life Technologies, ZDA),
- encimski test za določanje koncentracije holesterola in fosfolipidov (Wako, Japonska),
- fluorimeter (Photon Technology International, ZDA),
- kiveta 100 µL 105.256-QS (Hellma, Nemčija),
- kiveta 1500 µL 109.000-QS (Helma, Nemčija),
- kiveta plastična 3 mL (Helma, Nemčija),
- kiveta za merjenje DLS ZEN0040 (Malvern, Velika Britanija),
- kolona Tricorn 5/150 (GE Healthcare, Velika Britanija),
- kolona za gelsko kromatografijo Superdex 200pg 10/30, 24 mL (GE Healthcare, Velika Britanija),
- koncentrator AmiconUltra MWCO 10.000 (Millipore, ZDA),
- koncentrator Savant DNA SpeedVac<sup>®</sup> (Thermo Scientific, ZDA),
- kromatografski sistem Äkta Pürifier 10 (Amersham Biosciences, Velika Britanija),
- laminarij (Wesemann laboreinrichtungen, Nemčija),
- magneti za mešanje (različni proizvajalci),
- magnetno mešalo (Biosan, Latvija),
- membrana 100 nm Polycarbonate Membrane (Avestin, Kanada),
- mešalnik Vibromix 10 (Tehnica, Slovenija),
- mikrotitrne plošče Corning 3686, 96-well, Half area, Black (Corning Incorporated, ZDA),
- mikrotitrne plošče Costar 3596, 96-well (Corning Incorporated, ZDA),
- naprava za merjenje DLS Zetasizer NanoZS (Malvern, Velika Britanija),

- naprava za produkcijo destilirane vode RiOs16 (Merck Millipore, ZDA),
- naprava za produkcijo ultra čiste vode MilliQ RG (Merck Millipore, ZDA),
- pH meter Seven easy (Mettler Toledo, Švica),
- pipete (Corning lambda, ZDA),
- program BIAevaluation v3.2 (GE Healtcare, Velika Britanija),
- program FeliX v4.0.1 (Photon Technology International , ZDA),
- program Origin 8.1 (OriginLab, ZDA),
- program Zetasizer v7.03 (Malvern, Velika Britanija),
- refraktometer Biacore X (GE Healtcare, Velika Britanija),
- rotavapor R215 (Büchi, Švica),
- senzorski čip L1 (GE Healtcare, Velika Britanija),
- Sephadex G50 coarse (Pharmacia, Švedska),
- siringe 500 mL, 25 mL (Hamilton, Švica),
- sonikator Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, ZDA),
- spektrofotometer 8453 UV-Vis (Agilent Technologies, ZDA),
- spektrofotometer NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA),
- steklene kroglice (Scientific industries, ZDA),
- steklovina (različni proizvajalci),
- stresalna vodna kopel WB-30 STE (Kambič, Slovenija),
- tehtnica 0.01 mg - 220 g (Mettler Toledo, Švica),
- tehtnica 0.001 g – 420 g (KERN pej, Nemčija),
- termoblok CH-100 (Biosan, Latvija),
- ultrazvočna kopel Transsonic T460 (ELMA, Nemčija),
- vakuumska črpalka za filtracijo VacuumPump XFF54 23050 (Merck Millipore, ZDA),
- vodna kopel tip 1013 (GFL, Nemčija),
- zamrzovalnik (-20 °C) (Gorenje, Slovenija),
- zamrzovalnik (-80 °C) (Thermo scientific, ZDA)

### **3.1.5 Mikroorganizmi**

Za izolacijo lipidov smo uporabili hipertermofilno arhejo *Aeropyrum pernix* K1 – JCM 9820 (Japan Collection of microorganisms)

### **3.1.6 Gojišča**

Za rast arhej smo uporabili gojišče iz sledečih komponent (za liter gojišča): 34,0 g soli Marine broth, 1 g kvasnega ekstrakta, 5 g peptona, 1 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 20 mM HEPES, pH uravnan z dodatkom NaOH na 7,0

### 3.1.7 Pufri

Preglednica 2: Sestava uporabljenih pufrov

Pufer	Sestava
Pufer za tvorbo veziklov pH 7,4	10 mM HEPES, 150mM NaCl, 1mMEDTA, 50 mM kalcein
Pufer za čiščenje veziklov pH 5,7	10 mM MES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer za čiščenje veziklov pH 7,4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer za merjenje sproščanja kalceina iz veziklov pH 5,7	10 mM MES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer za merjenje sproščanja kalceina iz veziklov pH 7,4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer v veziklih, za merjenje sproščanja kalceina iz veziklov pH 7,4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM kalcein
Pufer za merjenje triptofanskega spektra pH 5,7	10 mM MES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer za merjenje triptofanskega spektra pH 7,4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer za preverjanje vezave proteini-MLV z NaDS-PAGE pH 5,7	10 mM MES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer za preverjanje vezave proteini-MLV z NaDS-PAGE pH 7,4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Citratni pufer pH 7,5	16 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 40 mM glukoza
Allseverjev konzervans pH 6,1	11,5 mM glukoza, 72 mM NaCl, 27 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,9 mM citronska kislina
Eritrocitni pufer pH 5,7	20 mM MES, 140 mM NaCl
Eritrocitni pufer pH 7,4	20 mM Tris, 140 mM NaCl
TBS pufer pH 7,4	50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl
Dializni pufer pri pripravi nanodiskov pH 7,4	20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA
Pufer za čiščenje nanodiskov z gelsko kromatografijo pH 5,7	20 mM MES, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA
Pufer za analizo vezave proteinov na LUV-e s površinsko plazmonske resonanco pH 5,7	10 mM MES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Pufer za analizo vezave proteinov na LUV-e s površinsko plazmonske resonanco pH 7,4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Gojenje arheje *Aeropyrum pernix K1*

Arheje smo gojili v 1-litrskih erlenmajericah s po 800 mL gojišča, umerjenega na pH 7,0. Gojenje je potekalo pri temperaturi 92 °C, z mešanjem z magnetnim mešalom (700 rpm) in prepohovanjem s sterilnim zrakom kot je že bilo optimizirano in opisano v članku (Milek in sod., 2005).

### 3.2.2 Izolacija in čiščenje lipidov

Po 40 h smo biomaso zbrali in centrifugirali 10 min na 15 540 rcf. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa liofilizirali in iz njega izolirali lipide po postopku, kot sta ga opisala Bligh in Dyer (1959). Liofilizirane celice smo resuspenzirali v metanolu v koncentraciji ~0,05 mg/mL ter jih 6 ur inkubirali z mešanjem 600 rpm. K 300 mL celic smo dodali 150 mL kloroform in pustili čez noč na sobni temperaturi (t.j. med 21 in 24 °C). Po inkubaciji smo dodali 120 mL nasičene raztopine NaCl v vodi. Vsebino smo filtrirali skozi 0,45 µm filter in razdelili v dva lij ločnika ter v vsakega dodali po 75 mL kloroform in 75 mL nasičene NaCl raztopine. Končno razmerje metanol/kloroform/solna raztopina je bilo 2/2/1,8. Mešanico smo pustili čez noč, da sta v liju ločniku nastali dve fazи, med seboj dobro ločeni. V spodnji (kloroformovi) fazi, ki je bila bolj bistra so bili raztopljeni lipidi, ostali celični produkti so bili raztopljeni v zgornji (metanolni) fazi. Spodnjo fazo smo previdno odlili iz lijločnika in jo nanesli na absorpcijsko kromatografijo. Uporabili smo kolono Sep-Pak Vac 20 cc s silika gelom. Kolono smo ekvilibrirali z kloroformom, nanesli vzorec in lipide spirali v zaporedju topil: kloroform (170 mL), aceton/metanol (9/1) (250 mL) in metanol (170 mL). AI in AGI lipidi so se s kolone sprali v zadnjem koraku z metanolom. Metanol smo odparili in lipide posušili na rotavaporju. Stehtali smo, najprej, prazno bučko in nato še bučko s posušenimi lipidi ter tako določili maso izoliranih lipidov. Lipide smo ponovno raztopili v kloroformu do koncentracije 10 mg/mL. Alikvote raztopljenih lipidov smo po 0,5 mL do uporabe hranili raztopljene v kloroformu v steklenih vijalah na -20 °C.

S tankoplastno kromatografijo smo preverili čistost izoliranih lipidov. 50ng lipidov smo raztopili v kloroformu in nanesli na ploščo. Topilo uporabljeno za mobilno fazo je bilo kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/30/15/5) (v volumskem razmerju). Ko je topilo prišlo do vrha plošče smo ploščo enakomerno poškropili z 20 % žveplovo (VI) kislino ( $H_2SO_4$ ) in ploščo dali v pečico, na 180 °C za 20 min. Na plošči smo lipide videli kot lise.

### 3.2.3 Priprava multilamelarnih in velikih unilamelarnih veziklov za preverjanje sproščanja kalceina

Različne količine lipidov (odvisno od posameznih metod opisanih v sledečih poglavjih) smo raztopili v kloroformu in prenesli v steklene bučke. Kloroform v bučki smo odparili na rotavaporju, da je nastal lipidni film na stenah bučke. Na rotavaporju smo nastavili vrtenje bučke na 215 obratov na minuto, vodna kopel je bila segreta na 40 °C, in postopno zniževali tlak, da je kloroform odparel. Ko je kloroform odparel do te mere, da se ga ni več dalo videti z očesom, smo še deset minut pustili pri nastavljenemu tlaku 0 bar (dejanska vrednost se je po desetih minutah približala 43 mbar). Po tem smo bučko z nastalim lipidnim filmom prenesli v SpeedVac koncentrator, kateremu smo prej odstranili rotor, in še 2 uri sušili na »low« (najnižji možni) temperaturi. V bučko s posušenim filmom smo natresli steklene kroglice, dodali HEPES pufer s 50 mM kalceinom (pH 7,4) in 10 minut močno vorteksirali. Ker kalcein na svetlobi razpada, smo imeli od vključno tega koraka naprej vzorec vedno zaščiten z alufolijo. Količina dodanega pufra in molarna koncentracija lipidov je bila odvisna od posameznih metod (glej poglavja spodaj). Raztopljene lipide (MLV-je) v pufru smo iz bučke s pipeto previdno prenesli v epico, pri tem smo pazili, da

nismo zajeli steklenih kroglic. Suspenzijo MLV-jev v epici smo hidrirali s 3x zamrzovanjem v tekočem dušiku in odtaljevanjem v termobloku na 37 °C.

Sledila je zamenjava kapsuliranega pufra s pufrom brez kalceina. Uporabili smo različna pufra za testiranje pri različnih pH (preglednica 2). Pufer smo zamenjali s centrifugiranjem. Vezikle s POPC-jem smo centrifugirali 8 min pri 800 rcf, vezikle z arhejskimi lipidi 8 min pri 1200 rcf, saj so se predvsem arhejski vezikli, ki so vsebovali holesterol, slabše posedali. Supernatant po centrifugirjanju smo odlili in ga zamenjali s pufrom brez kalceina. Postopek centrifugiranja in zamenjave supernatanta s pufrom brez kalceina smo ponavljali dokler supernatant ni postal prozoren.

Koncentracijo lipidov v vzorcih, ki so vsebovali POPC in holesterol, smo določili s komercialnima kitoma podjetja WAKO, ki sta namenjen določanju koncentracije fosfolipidov (Phospholipids C) in holesterola (Free Cholesterol E). Veziklom iz arhejskih lipidov nismo merili koncentracije, saj nismo imeli na voljo testa za določanje njihove koncentracije.

LUV-e smo do vključno stopnje zamrzovanja v tekočem dušiku in odtaljevanja pripravili na enak način kot MLV-je. Naslednja stopnja pri pripravi LUV-ov je bila ekstrudiranje skozi filter s 100 nm porami. Najmanj 31-krat smo raztopino veziklov potisnili skozi ekstrudor in jih nato prenesli v epico. LUV-e smo očistili na gelski kromatografiji z matriksom Sephadex G50. 3-mililitrsko kolono (5/160 = premer/dolžina v mm) smo sami napolnili. Kolono smo ekvilibrirali s prej omenjenima pufroma s pH 5,7 ali 7,4. Ločevanje je potekalo na osnovi gravitacije in različnega zadrževanja delcev v matriksu. Ročno smo zbirali frakcije po približno 0,5 mL. Da smo ugotovili, v katerih frakcijah z LUV-ije je najbolje odstranjen nevgrajen kalcein v liposome, smo v mikrotitrsko ploščo (namenjeno merjenju fluorescence – neprozorna) nanesli po 50 µL posamezne frakcije v posamezno luknjico, pomerili fluorescenco pri valovni dolžini 520 nm z vzbujanjem pri 485 nm, v vsako luknjico dodali 0,1 % (v/v) Triton X-100, pomešali s pipeto in ponovno pomerili pri enakih valovnih dolžinah. Frakcije, ki so imele največje razmerje med izmerjeno fluorescenco po dodatku Tritona X-100 in pred (razmerja do približno 4), so imele najbolje odstranjen nevgrajen kalcein v liposome in smo jih uporabili v nadaljnjih testih.

### 3.2.3.1 Merjenje velikosti veziklov in nanodiskov z metodo dinamičnega sisanja svetlobe

Dinamično sisanje svetlobe (DLS) je avtomatizirana metoda za določanje velikosti delcev v raztopini na osnovi njihovega Brownovega gibanja in sisanja svetlobe, ki jo usmerimo v vzorec. Velikost delcev vpliva na hitrost gibanja delcev, zato se intenziteta sipane svetlobe s časom hitreje spreminja pri manjših delcih. Z uporabo korelacijske funkcije je na osnovi teh podatkov možno izračunati razporeditev delcev po velikosti, ki so v osnovi podani glede na podatke o intenziteti nihanja svetlobe. Te podatke pa je nato možno pretvoriti na porazdelitev velikosti delcev po volumnu in številu. Največjo težo imajo rezultati prikazani glede na razporeditev po številu. Intenziteta sisanja velikih delcev je namreč večja kot intenziteta sisanja manjših delcev. Porazdelitev glede na volumen, po Mie-jevi teoriji, preračuna kolikšen volumen zavzamejo posamezne velikosti delcev v raztopini, medtem

ko razporeditev po številu prikaže, kateri velikostni razred delcev je v raztopini najštevilčnejši (Zetasizer ..., 2004).

80 µL 10-krat, z enakim pufom v kakršnem so že bili, redčenih veziklov smo dali v kiveto, vstavili v napravo Zetasizer Nano in pričeli z meritvami. Predhodno smo programu določili metodo, kamor smo vnesli refrakcijske indekse, viskoznost, temperaturo, vrsto kivete in absorbanco merjenih delcev in topila. Za merjenje velikosti veziklov smo vnesli karakteristike:

- refraktivni indeks delcev: 1,336
- absorbanca delcev: 0,001
- refraktivni indeks topila: 1,331
- viskoznost: 1,0135 cP
- temperatura: 20 °C

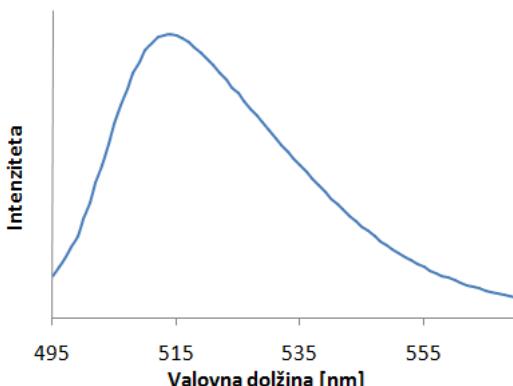
Vzorce z nanodiski smo merili na enak način, le da smo dali v kiveto neredčen vzorec in uporabili drugo metodo s sledečimi karakteristikami:

- refraktivni indeks delcev: 1,590
- absorbanca delcev: 0,010
- refraktivni indeks topila: 1,333
- viskoznost: 1,0270 cP
- temperatura: 20 °C

Za obdelavo podatkov smo uporabili program Zetasizer v7.03.

### 3.2.3.2 Analiza sproščanje kalceina iz veziklov

Kalcein je fluorescentna molekula, ki ob vzbujanju s svetlobo valovne dolžine 495 nm, močno oddaja svetlobo valovne dolžine 515 nm. Pri visokih koncentracijah kalceina (nad 70 mM) pride do samogašenja (angl. »self quenching«) lastne fluorescence. To lastnost izrabljamo za merjenje sproščanja kalceina iz veziklov. Ko se kalcein iz koncentriranega okolja v veziklu sprosti v okolje, njegova koncentracija pada in posledično fluorescensa naraste (Patel in sod., 2009). Direkten vpliv ekscitacijske svetlobe na emisijski detektor smo znižali tako, da smo znižali valovno dolžino vzbujanja fotonov na 485 nm in merili emisijo sproščene svetlobe pri valovni dolžini 520 nm. Za dovolj veliko koncentracijo kapsuliranega kalceina v veziklih se je izkazala že koncentracija 50 mM, zato smo v poskusih uporabljali to koncentracijo.



Slika 7: Emisijski spekter kalceina ob vzbujanju z valovno dolžino 485 nm, pH 7,4.

V 3-mL plastični kiveti smo pripravili 20 µM vezikle v pufru z želenim pH (5,7 oz. 7,4). V kivetu smo položili magnetno mešalo in začeli meriti kinetiko fluorescence z  $\lambda_{eks} = 485$  nm in  $\lambda_{em} = 520$  nm. Mešanje je bilo nastavljeni na najintenzivnejše in temperatura na 20 °C. Ko je intenziteta fluorescence postala konstantna (po približno 200 s) smo dodali protein (LLO, PFO ali LLO Y406A) do končne koncentracije 100 nM, oziroma, da je bilo razmerje lipidi/protein 200. Ko se je intenziteta po dodatku proteina ustalila, smo dodali Triton X-100 do končne koncentracije 1 mM. Triton je popolnoma razgradil vezikle in sprostil ves kalcein. Vezikle s POPC-jem smo uporabili kot že okarakterizirano kontrolo (Knap, 2013; Rezelj, 2014). Dobljene grafe smo izvozili v Microsoft Excel 2007 in jih normalizirali po formuli (1). Za vsak poskus smo naredili dve ponovitvi.

$$R = \frac{F_t - F_z}{F_k - F_z} \quad \dots (1)$$

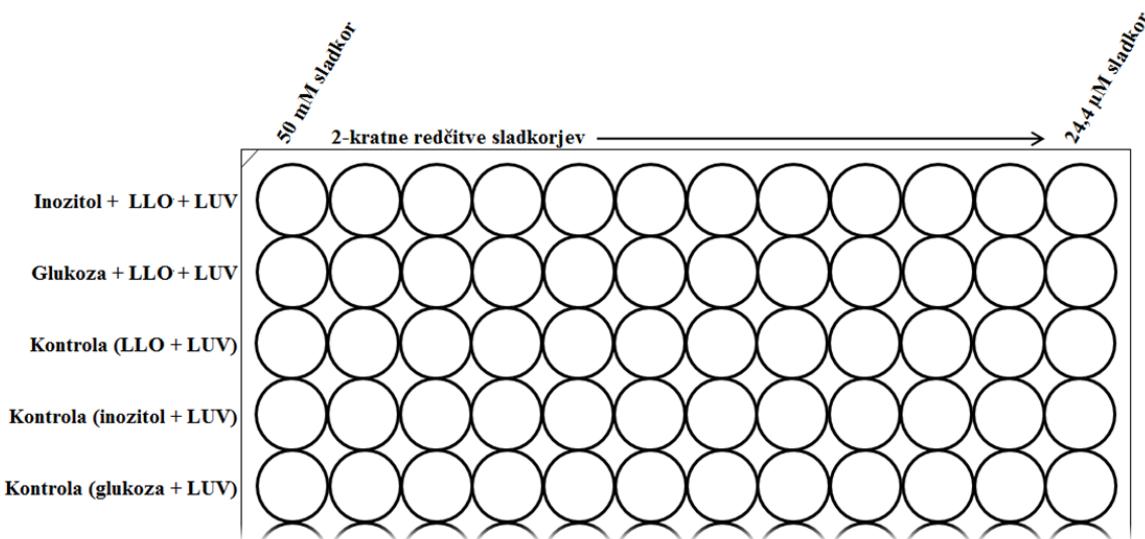
Kjer je R – delež sproščenega kalceina, Ft – izmerjena točka (fluorescencija), ki jo normaliziramo, Fz – izmerjena začetna fluorescencija na x osi, Fk – izmerjena končna fluorescencija na x osi.

### 3.2.3.3 Analiza inhibicije sproščanja kalceina s sladkorji

Preverili smo, če inkubacija LLO z glukozo ali inozitolom vpliva na sproščanje kalceina iz arhejskih LUV-ov. Uporabili smo pufer za merjenje sproščanja kalceina iz veziklov pH 5,7 (preglednica 2).

V prvi stolpec črne mikrotitrsko plošče s 96 luknjicami smo nanesli po 100 µL 100 mM sladkorja (končna koncentracija je bila 50 mM) oziroma MES pufer v primeru kontrole (slika 8). V ostale luknjice smo nanesli 50 µL MES pufra in naredili 2-kratne redčitve sladkorjev vzdolž plošče. V prve tri vrstice smo dodali LLO (volumen in s tem koncentracija sladkorja se ni bistveno spremenila zaradi volumsko majhnega dodatka LLO (~2 µL)). Ko smo v vse luknjice dodali še 50 µL LUV-ov, je bila koncentracija LLO-ja 100 nM. Količino dodanih LUV-ov smo določili eksperimentalno, tako da je bil dobro viden odziv sproščanja kalceina (začetna koncentracija lipidov raztopljenih v pufru je bila 20 mM, koliko se jih je med pripravo LUV-ov in čiščenjem izgubilo ne vemo). Takoj po dodatku LUV-ov smo začeli z merjenjem fluorescence na mikročitalcu BioTEK. Valovna

dolžina vzbujanja je bila 485 nm in emisija 520 nm. Po 25 min kinetiki smo izbrali ukaz »plate out« in »delay«. Plošča je za minuto prišla iz čitalca, da smo lahko v vsako luknjico dodali po 1  $\mu\text{L}$  Tritona X-100 (končna koncentracija 1 mM). Po tem smo kinetiko fluorescence merili še 4 min.



Slika 8: Razporeditev vzorcev za testiranje inhibicije sproščanja kalceina iz arhejskih LUV-ov s sladkorji na mikrotitritni plošči.

### 3.2.4 Priprava multilamelarnih in velikih unilamelarnih veziklov za preverjanje vezav listeriolizin O/perfringolizin O

MLV-je in LUV-e za preverjanje vezave proteinov s triptofansko fluorescenco in s pomočjo NaDS-PAGE-a smo naredili po enakem postopku kot opisane v odstavku 3.2.3, s to razliko, da smo tokrat dodali pufer brez kalceina in že pred vorteksiranjem dodali tistega z želenim pH-jem (MES pufer za pH 5,7 in HEPES pufer za pH 7,4). S tem, ko nismo dodali kalceina, tudi ni bil potreben korak čiščenja. Ker smo izpustili korak čiščenja, smo za MLV-je predvideli, da je koncentracija enaka zatehtani količini lipidov na volumen dodanega končnega pufra, saj smo res poskrbeli, da se je ves lipidni film med vorteksiranjem odlepil z bučke. To smo tudi potrdili z WAKO testom na MLV-jih s POPC-jem. LUV-ov s POPC-jem se je glede na rezultate WAKO testa med pripravo izgubilo približno 50 %. Ker so bili rezultati WAKO testov z POPC – LUV-i ponovljivi, smo poskuse z arhejskimi LUV-i načrtovali, kot da se njihova koncentracija med pripravo prav tako zmanjša za ~50 %.

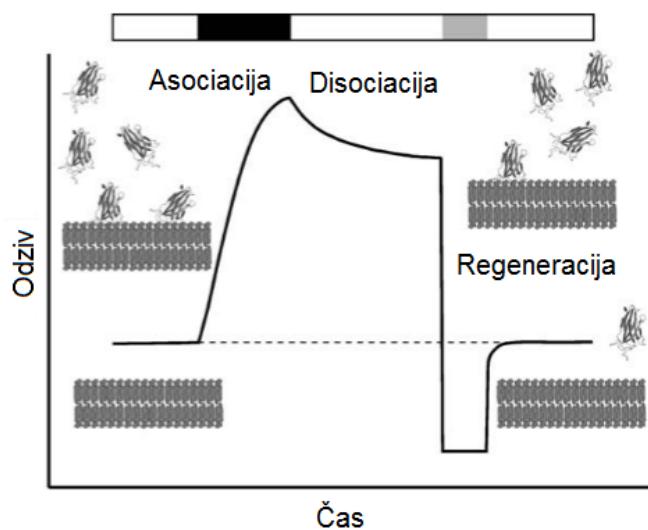
#### 3.2.4.1 Določanje vezave proteinov na multilamellarne vezikle s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

3 mM MLV-jev in 2,5  $\mu\text{M}$  proteina (razmerje lipidi/protein ~1200) smo zmešali in inkubirali pol ure na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 15 min pri

20 °C in 16000 rcf. Ves supernatant smo denaturirali v termobloku (95 °C, 5 min) in nanesli na 3-14 % poliakrilamidni gel. Usedlino smo resuspendirali v pufru, ponovno centrifugirali (pod enakimi pogoji kot prej), supernatant zavrgli, dodali 10 µL pufra, denaturirali (95 °C, 5 min) in vse nanesli na gel. Za kontrolo smo na gel nanesli še po 1 µg čistega, netretiranega proteina (LLO oz. PFO). NaDS-PAGE (natrijev dodecil sulfat poliakrilamidna gelska elektroforeza) je potekala 40 min pri konstantni napetosti 200 V in nastavljenem električnem toku 125 mA. Gele smo sprali v MQ vodi in barvali z barvilkom SimplyBlue. Gele z obarvanimi proteini smo skenirali in jih obdelali s programom ImageJ 1.48v. Če je protein po prvem centrifugiranju ostal v usedlini, smo predvidevali, da se je vezal na MLV-je (MLV-ji so težji od proteina, zato se po centrifugiranju posedejo, medtem ko se protein sam po sebi ne. Če je protein vezan na MLV-je se posede skupaj z njimi).

### 3.2.4.2 Analiza vezave listeriolizina O in perfringolizina O na lipidne membrane s površinsko plazmonske resonanco

Površinska plazmonska resonanca (SPR) je ena najpomembnejših biokemijskih tehnik za študije medmolekulskih interakcij. Interakcije potekajo na senzorskem čipu. To je steklena ploščica z nanešeno tanko plastjo zlata. Polarizirana laserska svetloba je usmerjena skozi prizmo na tanko plast zlata pod takšnim kotom, da pride do popolnega odboja svetlobe. Ko na senzorski čip vežemo molekule, se na površini spremeni refrakcijski indeks in s tem kot popolnega odboja svetlobe. Naprava meri spremembe v kotu in intenziteti odbite svetlobe in nam jih poda v obliki senzograma. Odziv na senzogramu je podan v enotah RU (response units) (Besenicar in sod., 2006)



Slika 9: Shema senzograma (Beseničar in sod., 2006). Senzogram prikazuje časovni odziv, ki je linearno odvisen od mase vezanih snovi na površino čipa. Čip je pred vezavnim eksperimentom ekvilibriran s pufrom, ki tudi spira čip, ko ničesar ne injiciramo (bela odebeljena črta na vrhu). Ko injiciramo analit (črna odebeljena črta), odziv naraste zaradi vezave analita na čip. Zaradi pretoka pufra skozi celico nato analit disociira s površine, kar se kaže kot padec odziva. Vezavno površino je potrebno nato regenerirati (siva

odebeljena črta). Za to se večinoma uporablja visoke koncentracije soli ali nizek oziroma visok pH. Ko se ves vezan analit sprosti s čipa, lahko ponovimo vezavni eksperiment.

Poskuse smo opravljali na napravi Biacore X. Za senzorski čip smo uporabili čip L1, ki ima na površini lipofilne dekstrane, zato lahko veže liposome. Vezavo proteinov smo analizirali pri dveh pH-jih: 5,7 in 7,4 (pufra za posamezen pH sta opisana v preglednici2). Na čip smo nanesli LUV-e z naslednjimi sestavami: 100 % POPC, POPC:holesterol (1:1), 100 % arhejski lipidi in arhejski lipidi:holesterol (1:1). Vbrizgali smo LUV-e s koncentracijo 2 mM. Koncentracijo smo jim določili kot je že opisano v točki 3.2.3, upoštevali smo torej, da se med pripravo LUV-ov izgubi polovica lipidov. Na vseh veziklih smo poskusili dve koncentraciji proteina (LLO/PFO), 50 nM in 10 nM. Vezavo LLO na 100% arhejske vezikle pa smo, poleg že prej omenjenih, analizirali še s koncentracijami proteina 30 nM, 20 nM, 15 nM, in 5 nM pri pH 5,7 ter 30 nM in 20 nM pri pH 7,4. Čip je imel dve celici, kjer je ena referenčna in na to nismo vezali LUV-ov.

Za regeneracijo čipa smo uporabili 40 mM oktilglukopiranozid (OG) in 0,5 % NaDS (natrijev dodecil sulfat). Temperaturo smo nastavili na 25 °C. Za meritve veziklov vsake vrste pri posameznem pH smo naredili cikel kot je prikazano v preglednici 3.

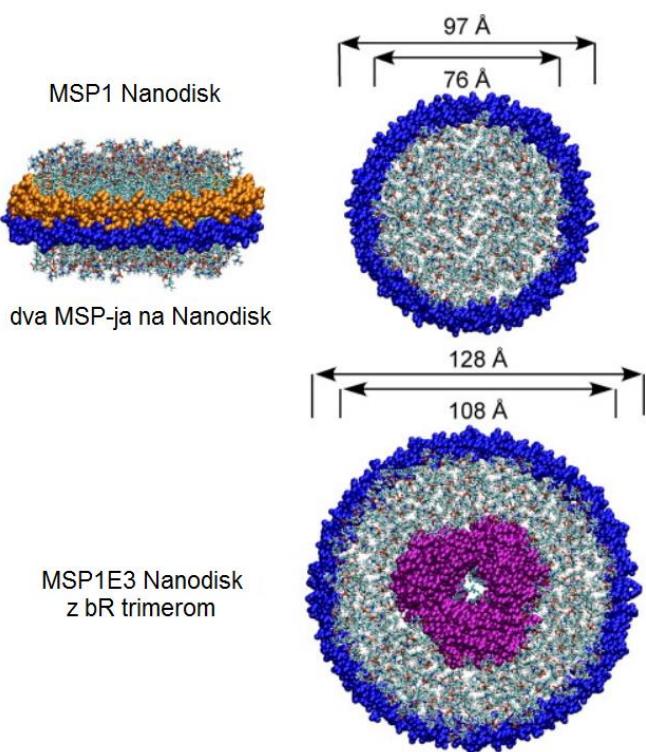
Preglednica 3: Potek ciklov na površinski plazmonski resonanci za vsake vezikle pri določenem pH. Zadnja dva koraka smo lahko večkrat ponovili. Vzorec (protein) dodan, ko RU ne narašča več kot 1 RU/min.

Korak	Pretok [µL/min]	Asociacija [s]	Disociacija [s]
Regeneracija čipa z 40 mM OG	10	60	/
Regeneracija čipa z 0,5 % SDS	10	60	/
Nanos LUV-ov	2	600	/
Spiranje šibko vezanih LUV-ov s 100 mM NaOH	30	60	/
Blokiranje prostih vezavnih mest na čipu z 0,1 mg/mL BSA	30	120	/
Nanos proteina (LLO oz. PFO) v 10 nM ali 50 nM koncentracijah (ozioroma še druge koncentracije pri preverjanju vezave 100% arhejski vezikli – LLO)	30	90	180
Spiranje proteina s 100 mM NaOH	30	60	/
Nanos proteina (LLO oz. PFO) v 10 nM ali 50 nM koncentracijah (ozioroma še druge koncentracije pri preverjanju vezave 100 % arhejskih veziklov – LLO)	30	90	180

### 3.2.5 Priprava nanodiskov

Nanodiski so 9 – 14 nm veliki modelni diskasti sistemi lipidnega dvosloja, po velikosti omejeni s po dvema molekulama MSP proteina (angl. Membrane Scaffold Protein,membranski ogrodni protein) (slika 10). MSP je protein, skonstruiran na podlagi apolipoproteina A1. Obstaja več vrst MSP proteinov, ki se med sabo razlikujejo po številu

$\alpha$ -vijačnic in s tem po velikosti molekule. Z uporabo različnih MSP proteinov lahko pripravimo različne nanodiske natančno določenih velikosti. Nanodiski so primerni za študije interakcij proteinov z lipidnimi membranami in ostale biofizikalne ter strukturne raziskave predvsem membranskih proteinov. Njihova prednost pred liposomi je v majhni velikosti, neukriviljeni površini in večji stabilnosti v primerjavi z drugimi membranskimi sistemmi, kot so npr. biceli (Bayburt in Sligar, 2010).



Slika 10: Shema nanodiska z in brez vstavljenega proteina. Zgoraj: nanodisk, sestavljen iz MSP1D1 in fosfolipidov, prikazan iz strani ter od zgoraj. Molekuli MSP-ja sta pobarvana oranžno in modro. Spodaj: nanodisk, sestavljen iz MSP1E3D1, fosfolipidov in z vstavljenim bR trimerom (21 transmembranskih alfa vijačnic). bR trimer je obarvan vijolično, MSP1E3D1 modro (Bayburt in Sligar, 2010).

Nanodiske smo pripravili iz arhejskih lipidov, arhejskih lipidov s 35 % holesterolom (mol/mol) in iz POPC-ja s 35 % holesterola (mol/mol) pri pH 5,7. Za nanodiske iz arhejskih lipidov smo uporabili daljši MSP1E3\_D73Cprotein, medtem ko za arhejske nanodiske s holesterolom in za nanodiske s POPC-jem in holesterolom nekoliko krajši MSP1D1.

V bučko smo dali zatehtano količino lipidov, raztopljenih v kloroformu. Kloroform smo odparili na rotavaporju, da je na bučki nastal lipidni film, in nato še sušili v SpeedVac koncentratorju približno 4 h. Po sušenju filma smo v bučko dodali 50  $\mu$ L 200mM natrijevega holata in 50  $\mu$ L dializnega pufra. Bučko smo močno vorteksirali, dokler se niso vsi lipidi odlepili s stene bučke (ocenjeno na oko). Bučko smo postavili v ultrazvočno kopel in sonicirali 30 min. Dodali smo MSP in dializni pufer, da smo dobili želeno razmerje lipidi/protein. Za nanodiske s POPC-jem in MSP1D1 je bilo že prej določeno optimalno razmerje 65:1. Pri arhejskih nanodiskih z MSP1E3\_D73C smo uporabili

razmerje 100:1. Pri arhejskih nanodiskih s holesterolom smo poskusili razmerje lipidi/MSP1D1 optimizirati in smo uporabili še razmerja 80:1, 42:1 ter 32:1. Po dodatku MSP-ja smo inkubirali 30 min na 37 °C. Po inkubaciji smo vse prenesli v dializno kaseto, ki zadrži delce, večje od 10 kDa, in jo dializirali proti 2 L dializnega pufra čez noč, z rahlim mešanjem pri sobni temperaturi. Zjutraj smo za približno 3 h kaseto prenesli v 1 L novega dializnega pufra. Vzorec smo vzeli iz kasete z iglo in ga filtrirali s 5 min centrifugiranjem pri 4000 rcf skozi 0,22 µm filter. Filtriran vzorec smo nanesli na gelsko kolono velikosti 10/300 z nosilcem Superdex 200. Pretok smo nastavili na 0,5 mL/min. Kolona je bila ekvilibrirana v MES pufru pH 5,7. Zbirali smo frakcije po 0,5 mL. Tekom ločbe smo spremljali absorbanco pri 280 nm za določitev, v kateri frakciji so nanodiski, saj MSP (in ostali) proteini absorbirajo pri tej valovni dolžini. V posameznih frakcijah nanodiskov smo tudi določili njihovo velikost z metodo DLS in pomerili koncentracije lipidov (PC in holesterola) s testoma proizvajalca Wako.

### 3.2.5.1 Inhibicija hemolize z velikimi unilamelarnimi vezikli in nanodiski

CDC-ji lizirajo eritrocite, saj le-ti vsebujejo veliko holesterola. Lizo eritrocitov lahko merimo z spremeljanjem absorbance pri 630 nm. Ko eritrociti po dodatku CDC proteinov lizirajo, se absorbanca pri tej valovni dolžini zniža. Spremljali smo, če predinkubacija LLO-ja ali PFO-ja z vezikli ali nanodiski inhibira lizo eritrocitov (hemolizo) po dodatku teh dveh proteinov.

Govejo kri, razredčeno v citratnem pufru (preglednica 2) smo centrifugirali na sobni temperaturi pri 800 rcf 5 min in tako ločili eritrocite od krvne plazme in drugih majhnih sestavin, ki so prisotne v krvi. Postopek smo ponovili 4-5 krat in vsakič odstranili supernatant in dodali svežo fiziološko raztopino (0,9 % raztopina NaCl). Ko je bil supernatant po centrifugiraju bister, smo ga odstranili in dodali Alseverjev konzervans v razmerju 2:1 k posedenim eritrocitom. Eritrocite smo shranili na 4 °C do 6 mesecov. Konzervirane eritrocite smo sprali z eritrocitnim pufrom (preglednica 2) s centrifugiranjem pri 800 rcf. V želenem pufru smo pripravili raztopino eritrocitov z OD<sub>630</sub> 0,5 ( $\pm 0,03$ ). Protein smo v razmerju lipidi/proteini = 3000 inkubirali z LUV-i pol ure na sobni temperaturi. Med inkubacijo smo dodali BSA v koncentraciji 0,1 mg/mL, da smo preprečili nespecifične interakcije. Nato smo vzdolž mikrotitrsko plošče naredili 2-kratne redčitve vzorca, po 100 µL, da je bila v prvem stolpcu koncentracija proteina 1 µg/mL (po dodatku eritrocitov 0,5 µg/mL). K 100 µL vzorca smo dodali po 100 µL pripravljenih eritrocitov in takoj začeli z merjenjem 20 minutne kinetike absorbance pri 630 nm. Določili smo maksimalno hitrost hemolize pri posamezni koncentraciji proteinov (V<sub>max</sub>) ter primerjali vpliv predinkubacije LLO in PFO proteinov z lipidnimi sistemi na njuno hemolitsko aktivnost.

### 3.2.5.2 Triptofanska fluorescenza

Z merjenjem triptofanske fluorescence smo preverili, če se po vezavi LLO-ja oz. PFO-ja na membrano arheosomov spremeni okolje triptofanov. Triptofanska zanka v četrtni domeni

CDC-jev namreč sodeluje pri vezavi v membrano. Za triptofane je znano, da ob obsevanju s svetlobo valovne dolžine 295 nm oddajajo svetlobo z valovno dolžino med 300 nm in 400 nm. Ko triptofani preidejo iz polarnega okolja v nepolarno, se maksimum oddane svetlobe pomakne v levo, k nižjim valovnim dolžinam. V nepolarno okolje lahko preidejo triptofani iz polarnega z vsidranjem v lipidno membrano (Weichel in sod., 2008; Moon in Fleming, 2011). Tako lahko predvidevamo, da se z zamikom vrha triptofanske fluorescence del proteina, kjer so prisotni triptofani, veže na membrano.

S fluorimetrom smo merili emisijski spekter med 310 in 400nm z vzbujanjem fluorescence pri 295 nm, pri temperaturi 20 °C in s stalnim mešanjem. Za pozitivno in negativno kontrolo smo uporabljali LUV-e iz POPC-ja in 1:1 POPC:holesterol. Za liposome iz POPC-ja je bilo že pokazano, da ne vežejo LLO ali PFO, liposomi s POPC:holesterol (1:1) pa zagotovo jih (Rezelj, 2014).

Analiza je na fluorimetru potekala pri temperaturi 20 °C na naslednji način:

- V 1500 µL kvarčno kiveto smo dali pufer (pH 5,7) in pomerili spekter.
- Dodali smo protein (LLO ali PFO), v koncentraciji 60 µg/mL, in pomerili spekter.
- Dodali smo LUV-e (100 % arhejske, 1:1 arhejski:holesterol, 100 % POPC ali 1:1 POPC:holesterol), da je bilo razmerje lipidi/CDC = 50, in pomerili spekter.
- Dodali več LUV-ov, do razmerja lipidi/CDC = 100, in pomerili spekter.
- Spet dodali LUV-e (razmerje lipidi/CDC = 200) in pomerili spekter.
- Zadnje korake ponovili še z razmerji lipidi/protein = 400 in 1000.

Naredili smo še kontrolo, kjer je bilo vse enako, kot je opisano po alinejah zgoraj, le da smo namesto proteina v drugem koraku dodali tolikšen volumen pufra, kot smo prej dodali proteina. Koncentracijo proteina, ki smo jo uporabljali v poskusu, smo predhodno določili s fluorimetrom tako, da smo s preizkušanjem različnih koncentracij proteina določili najmanjšo možno koncentracijo proteina, kjer je bilo še možno zanesljivo določiti valovno dolžino maksima fluorescenčne intenzitete. Kontrolne spektre smo odsteli od spektrov s proteinom. Upoštevali smo tudi redčenje z dodajanjem liposomov.

Ker je mnoge majhne tehnične napake bilo težko izničiti, te pa lahko zelo vplivajo na intenziteto oddane svetlobe (npr. vedno enako ogreta žarnica, natančnost pipetiranja itd.), smo spekture normalizirali po formuli (2).

$$X = \frac{X_t}{X_{max}} \quad \dots (2)$$

Kjer je X intenziteta normalizirane točke na spektru, Xt izmerjena intenziteta točke, ki jo normaliziramo, Xmax maksimalna izmerjena intenziteta.

### **3.2.6 Analiza vezave listeriolizina O na lipide z encimskoimunskim testom**

ELISA (angl. »enzyme-linked immunosorbent assay«) je imunološko-encimski test. Test deluje na osnovi označenih monoklonskih protiteles s substratom ali encimom. Protitelesa se specifično vežejo na določen antigen, ki ga želimo prepoznati. Z dodanimi encimi

ozioroma substrati za encime (odvisno, kaj je vezano na protitelo) se nato sproži reakcija, katere produkt je običajno obarvana raztopina in to lahko merimo z absorbanco. S substratom so lahko označena že primarna protitelesa, torej tista, ki se direktno vežejo na antigen, lahko pa imamo označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna. Prednost označenih sekundarnih protiteles je, da nam ni potrebno za vsak posamezen antigen označevati novih protiteles. Označena tako potrebujemo le sekundarna protitelesa proti vsem mišjim ali kunčnjim IgG-jem. Proteine, ki jih želimo s testom detektirati, lahko vežemo direktno na površino mikrotitrne plošče, lahko pa jih vežemo prek ligandov (Voller in sod., 1976). V našem primeru smo za ligande LLO-ja uporabili 23 različnih lipidov (preglednica 1).

Z ELISA testom smo torej preverjali vezavo LLO na različne lipide. Lipidi v tem primeru niso bili urejeni v dvosloj, kot je značilno za membrane. ELISA "sendvič" je bil tako sestavljen iz lipidnega monosloja, vezanega LLO proteina s histidinsko značko, mišjih primarnih protiteles proti 6 histidinskim ostankom, sekundarnih protiteles proti mišjim IgG-jem z vezanim encimom hrenovo peroksidazo in substrata TMB.

Postopek izvedbe opisanega ELISA testa je bil sledeč: iz založnih raztopin lipidov smo pripravili 25 µM raztopine lipidov v 1,5 mL etanola. V posamezne vrstice v prvi koloni mikrotitrne plošče smo odpipetirali po 100 µL tako pripravljenih 25 µM lipidov v etanolu in naredili 2-kratne redčitve lipidov v etanolu vzdolž posamezne vrstice. V zadnjo vrstico smo nanesli samo po 50 µL etanola, ta vrstica je služila kot negativna kontrola. Pustili smo čez noč, da je etanol odhlapel in je v luknjicah nastal lipidni film. V vsako luknjico smo dodali po 200 µL blokirnega pufra (3 % (w/v) BSA) v TBS pufru pH 7,4 (ko smo preverjali vezavo pri pH 5,7, smo uporabili 3 % BSA v MES pufru, pH 5,7). Inkubacija je potekala 2 h pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo odstranili blokirni pufer in v vse luknjice, razen v tiste, ki so služile negativni kontroli, dodali po 100 µL 90 nM LLO, označenega s histidinsko značko in raztopljenega v 1 % BSA v TBS-u (oz. v MES-u za pH 5,7). Inkubacija je potekala 2 h pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Po inkubaciji smo 6-krat spirali z TBS pufrom (ne glede na to, pri katerem pH-ju smo preverjali vezavo, od tega koraka naprej smo vedno uporabljali le še TBS pufer, saj je interakcija proteinov z lipidi že potekla). V vsako luknjico smo dodali po 100 µL primarnih protiteles (mišja monoklonska IgG protitelesa (200 µL/mL) proti-His), redčenih 1:500 v 1 % BSA v TBS in inkubirali 1,5 h pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Ponovno smo 6-krat spirali. V luknjice smo dodali po 100 µL sekundarnih protiteles (proti mišjim IgG), redčenih 1:2000 v 1 % (w/v) BSA v TBS in ponovno inkubirali 1 h pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. 6-krat smo sprali in na koncu dobro odstranili pufer. V vsako luknjico smo dodali po 100 µL TMB-ja (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin – komercialni kit za ELISA teste) in inkubirali 5-30 min v temi. Ko se je raztopina obarvala, smo dodali po 50 µL »stop solution« reagenta (iz istega kita kot prej) in v roku pol ure pomerili absorbanco pri 450 nm in 600nm. Izmerjeno absorbanco pri 600 nm smo odšteli od izmerjene absorbance pri 450 nm ter določili afiniteto vezave LLO-ja na različne lipide.

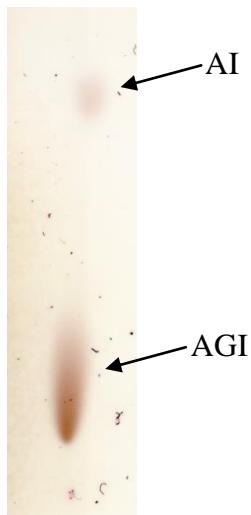
### 3.2.7 Vpliv listeriolizina O na rast *Aeropyrum pernix* K1

Arheje smo gojili po enakem postopku kot je opisano v točki 3.2.1, le da smo imeli manjše količine, nismo preprihovali z zrakom in gojili smo v vodni kopeli s stalnim mešanjem 140 rpm. Pripravili smo si šest 250 mL erlenmajeric in v vsako dali po 50 mL gojišča in 5 mL inokuluma. Spremljali smo prirast biomase z merjenjem OD pri 650 nm vsako uro. Po 20 h gojenja, ko so bile celice v eksponentni fazì rasti, smo kulture ohladili na 37 °C, dodali pet različnih koncentracijah LLO (0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,0125 mg/mL), šesta je bila kontrola brez dodatka LLO, in inkubirali pol ure na 37 °C. Po inkubaciji smo temperaturo spet nastavili na 92 °C in naprej spremljali OD kot prej. Ko so celice prišle v stacionarno fazò rasti, smo prenehali z gojenjem. Iz izmerjenih OD smo narisali šest rastnih krivulj *Aeropyrum pernix* K1.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 IZOLACIJA ARHEJSKIH LIPIDOV

Izolirane in liofilizirane lipide smo raztopili v kloroformu s končno koncentracijo 10 mg/mL ter jih razparcelirali po 0,5 mL v steklene viale s teflonskimi zamaški in shranili na -20 °C za nadaljnje analize. Čistost izoliranih lipidov smo preverili s tankoplastno kromatografijo (TLC). Na TLC smo dobili dve lis, ki sta ustrezali lipidom AGI in AI (Slika 11). Razmerje lipidov smo analizirali z denzitometrijo z uporabo programa ImageJ. Rezultati so pokazali 92,5 % ( $\pm 1\%$ ) AGI in 7,5 % ( $\pm 1\%$ ) AI (razmerje v literaturi - AGI:AI = 91:9 (Gmajner in sod., 2011)). Drugih lis nismo opazili, zato so lipidi po vsej verjetnosti dobro očiščeni.



**Slika 11: Tankoplastna kromatografija izoliranih lipidov iz arheje *Aeropyrum pernix* K1.** Lipide, ki jih prestavljalata lis na sliki, smo določili glede na predhodne objave (Ulrich in sod., 2009).

### 4.2 VELIKOSTIMULTILAMELARNIH IN VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV, IZMERJENE Z METODO DINAMIČNEGA SIPANJA SVETLOBE

Meritve velikosti z DLS so pokazale, da so MLV-ji v vseh primerih precej raznoliki. Za najbolj realne rezultate smo vzeli velikost glede na število delcev (veziklov). Arheosomi so, kot kaže tabela 1,5 -krat manjši od liposomov iz POPC-ja (in holesterola), arheosomi s holesterolom celo 3-krat (preglednica 3).

Preglednica 4: Izmerjene velikosti pripravljenih multilamelarnih z metodo dinamičnega sisanja svetlobe. Velikost je podana glede na število delcev. Narejene so po tri zaporedne ponovitve. Za vsak rezultat je podana standardna deviacija.

MLV	velikost delcev [nm]
100 % arh.	1577 $\pm$ 21
1:1-arh.:hol	792 $\pm$ 203
100 % POPC	2464 $\pm$ 513
1:1-POPC:hol	2579 $\pm$ 184

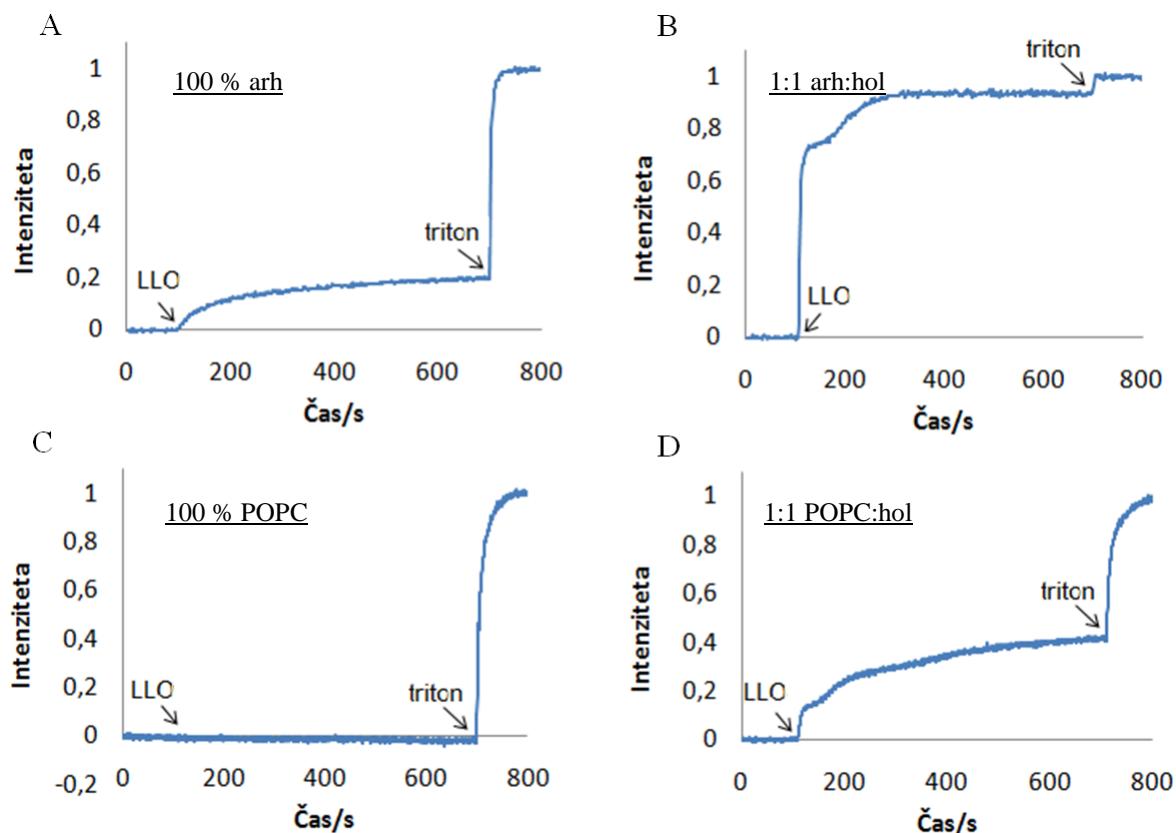
Velikost LUV-ov se dokaj dobro ujema z velikostjo por v membrani, ki smo jo uporabili za proces iztiskanja (100 nM). Izmerjena velikost odstopa od vrednosti 100 nm  $\pm 10$  nm. Arheosomi so za nekaj nm manjši od LUV-ov s POPC-jem. LUV-i so v primeru z obema lipidoma manjši, če ne vsebujejo holesterola (preglednica 4).

Preglednica 5: Izmerjene velikosti pripravljenih velikih unilamelarnih veziklov z metodo dinamičnega sipanja svetlobe. Velikost je podana glede na in število delcev. Za vsak rezultat je podana standardna deviacija.

UVL	velikost delcev [nm]
100 % arh	92 $\pm$ 3
1:1-arch.:hol	96 $\pm$ 3
100 % POPC	95 $\pm$ 3
1:1-POPC:hol	110 $\pm$ 5

#### 4.3 SPROŠČANJE KALCEINA IZ MULTILAMELARNIH VEZIKLOV Z LISTERIOLIZINOM O

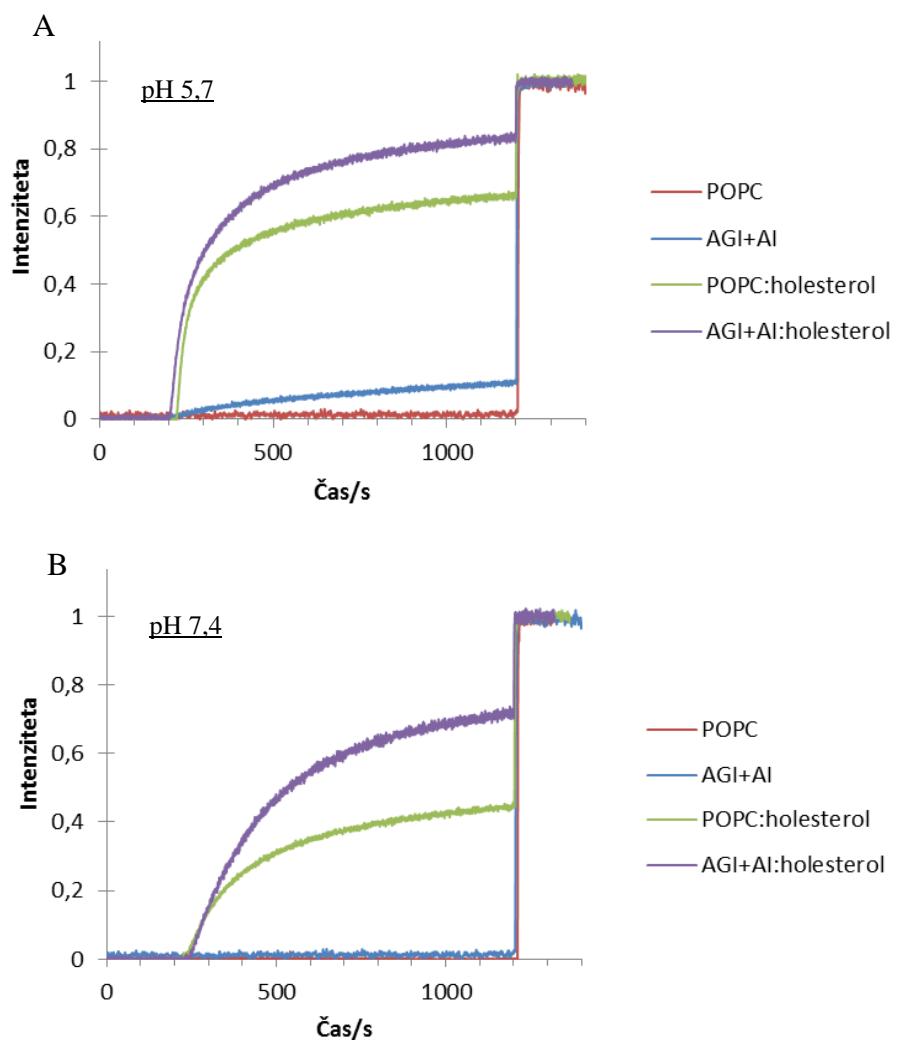
Meritve so pokazale, da v 600 sekundah 100nM LLO pri pH 5,7 sprosti približno 20 % vsega kalceina iz multilaminarnih veziklov, narejenih samo iz arhejskih lipidov (AGI+AI) in 97 % kalceina iz arhejskih MLV-jev s 50 % holesterola. Sproščanje kalceina bi iz 100 % arhejskih MLV-jev še nadaljevalo, medtem ko se, kot je razvidno iz grafa, sproščanje iz arhejskih MLV-jev s 50 % holesterola po približno 300 sekundah ustavi. Pri arheosomih s 50 % holesterola je viden stopničast graf, kar bi lahko pomenilo postopno luknjanje lamel pri MLV-jih(slika 12). Rezultati kažejo, da LLO ni ozko specifičen le za holesterol, saj se je tudi pri arheosomih brez holesterola sproščal kalcein. Za kontrolo smo imeli MLV-je iz 100 % POPC-ja, kjer sproščanja kalceina po 600 sekundah inkubacije LLO-ja z vezikli nismo zaznali. Prav tako se je sprostilo približno dvakrat več kalceina pri arheosomih s holesterolom, kot pri liposomih s POPC-jem in holesterolom.



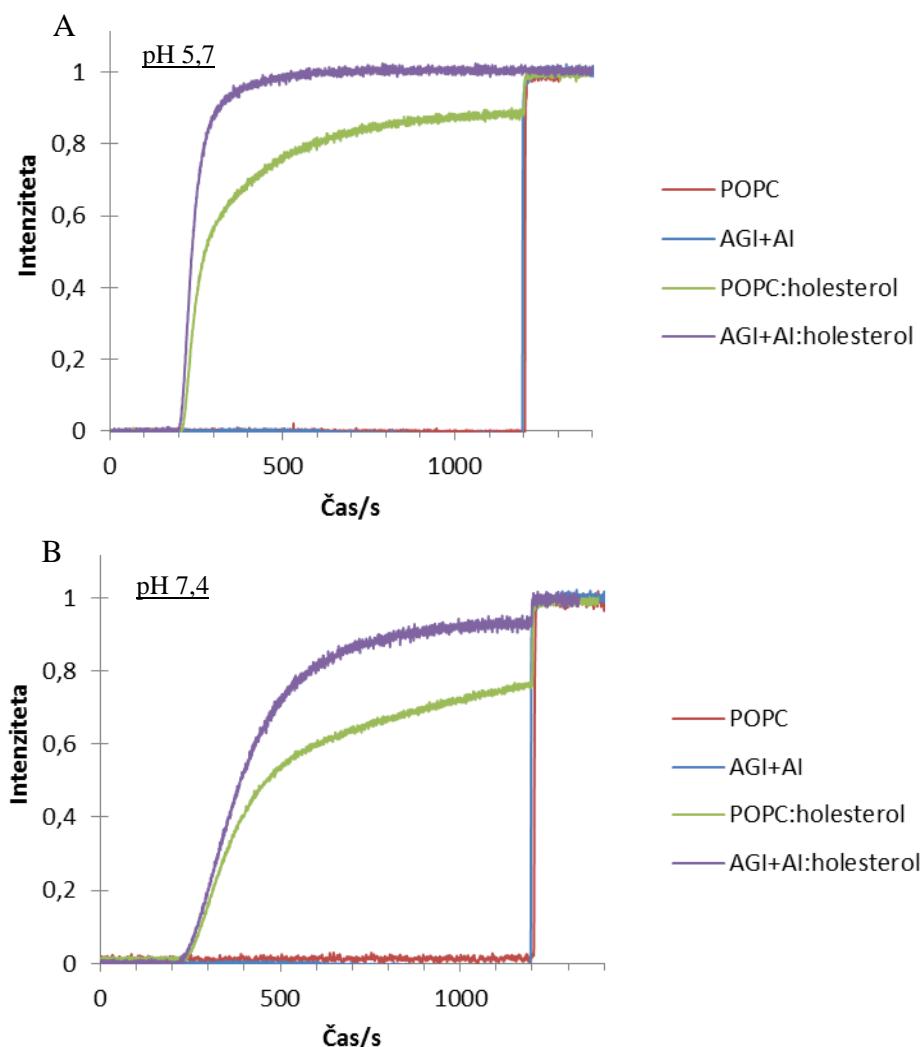
Slika 12: Prikaz sproščanja kalceina iz multilamelarnih veziklov z listeriolizinom O pri pH 5,7. Po 100 s smo vzorcem z MLV-ji dodali 900 nM LLO in po 700 s od začetka merjenja še Triton X-100. A - arhejski MLV-ji; B – arhejski MLV-ji s 50 % holesterola; C – POPC MLV-ji; D – POPC MLV-ji s 50% holesterola. Vsi grafi so normalizirani po formuli (1) (v poglavju 3.2.3.2).

#### 4.4 SPROŠČANJE KALCEINA IZ VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV Z LISTERIOLIZINOM O in PERFRINGOLIZINOM O

Enak poskus, kot z MLV-ji, smo naredili tudi z LUV-i. LUV-i so dosti bolj homogene zgradbe kot MLV-ji, zato so poskusi z njimi bolj ponovljivi in se jih posledično v poskusih pogosteje uporablja. Sproščanje kalceina iz LUV-ov smo preverjali pri pH 5,7 in 7,4 z LLO in PFO. Odstotki sproščenega kalceina so bili primerljivi z MLV-ji s podobno lipidno sestavo. V vseh poskusih (z vsemi štirimi vrstami LUV-ov) je tako LLO kot PFO bolje sproščal kalcein pri nižjem pH (slika 13 in 14). Liposomi iz 100 % POPC so bili negativna kontrola, pri njih ni nikoli prišlo do sproščanja kalceina iz veziklov. Kot prikazujeta sliki 13 in 14 se je v vseh primerih več kalceina sprostilo iz arheosomov kot iz liposomov iz fosfolipidov. Ne samo pri LLO, kjer pride do sproščanja kalceina pri arheosomih že brez vgrajenega holesterola, tudi pri PFO se več kalceina sprosti iz arheosomov s holesterolom kot iz liposomov iz fosfolipidov in holesterola.

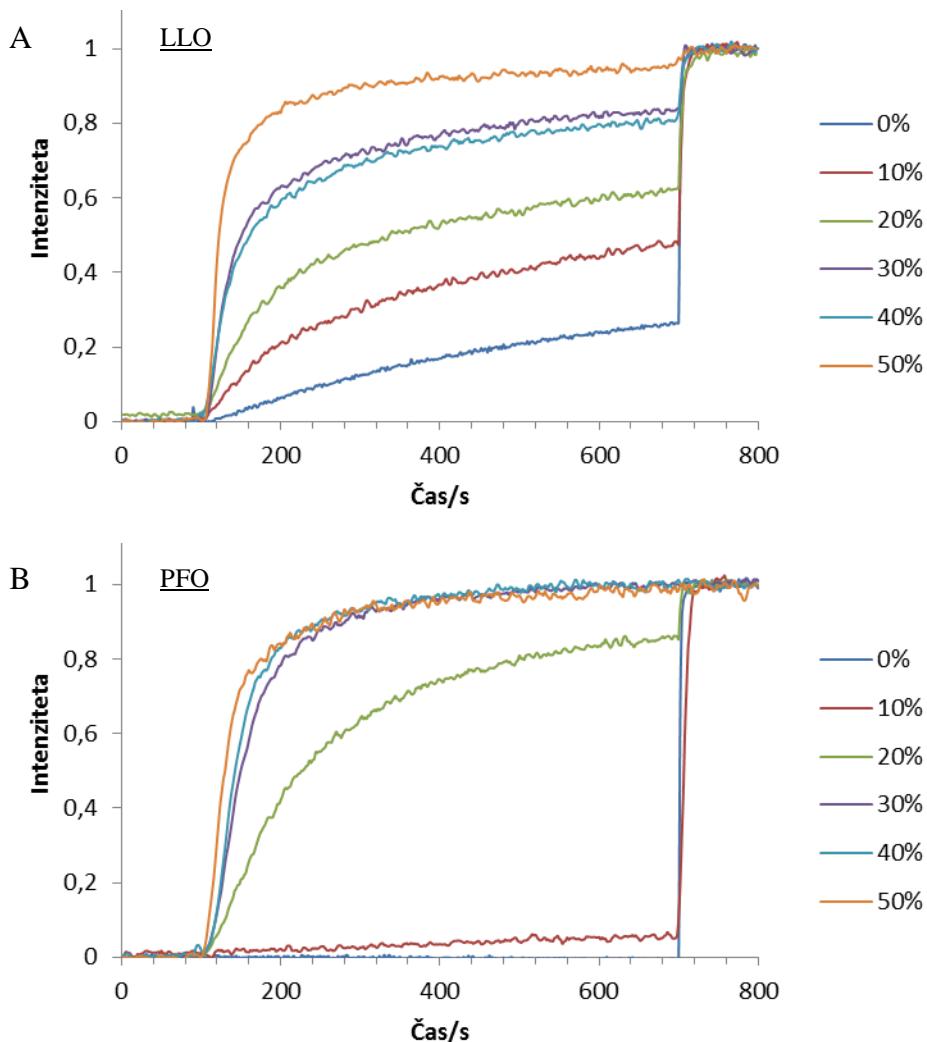


Slika 12: Sproščanje kalceina iz različnih velikih unilamelarnih veziklov z listeriolizinom O pri A - pH 5,7 in B - pH 7,4. Po 200 s smo dodali LLO, po 1200 s še Triton X-100. Podatki so normalizirani po formuli (1) (v poglavju 3.2.3.2).



Slika 13: Sproščanje kalceina iz različnih velikih unilamelarnih veziklov s perfringolizinom O pri A - pH 5,7 in B - pH 7,4. Po 200 s smo dodali LLO, po 1200 s Triton X-100. Podatki so normalizirani po formuli (1) (v poglavju 3.2.3.2).

Naredili smo tudi poskus sproščanja kalceina iz arheosomov z različnimi molskimi deleži holesterola (0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % in 50 % holesterola). Preverjali smo sproščanje po enakem postopku kot prej z LLO in PFO pri pH 5,7. Naredili smo po dve ponovitvi. Pri LLO se je pokazalo dokaj enakomerno povečanje sproščenega kalceina z večanjem deleža holesterola v veziklih, vendar tudi pri 50 % holesterola ni prišlo do sprostitev vsega kalceina po 600 s. Pri PFO je bilo potrebnega vsaj 20 % holesterola v veziklih, da je prišlo do sproščanja kalceina, medtem ko se je pri 30 % holesterola po 600 s sprostil že ves kalcein (slika 15).

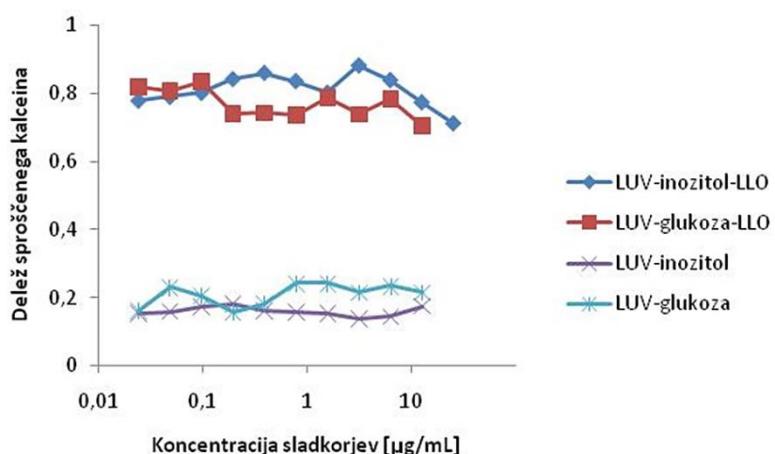


Slika 14: Sproščanje kalceina iz arheosomov z vgrajenimi različnimi deleži holesterola, z A –listeriolizinom O in B –perfringolizinom O pri pH 5,7. Po 100 s smo dodali LLO oz. PFO, po 700 s Triton X-100. Podatki so normalizirani po formuli (1) (v poglavju 3.2.3.2). Narejeni sta bili dve ponovitvi. Zaradi prevelikega števila točk za določanje napake, na sliki pokazani rezultati ene meritve. Rezultati so bili ponovljivi.

#### 4.5 INHIBICIJA SPROŠČANJA KALCEINA IZ 100 % ARHEJSKIH VELIKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV S SLADKORJI

S testom inhibicije sproščanja kalceina iz 100 % arhejskih LUV-ov s sladkorji smo preverjali, ali je za vezavo LLO-ja na arheosome odgovoren sladkor, ki je vezan na lipide AGI in AI. Za analizo smo uporabili sladkor mio-inozitol, ki je prisoten v arhejskih lipidih, in glukozo. Za negativno kontrolo pred merjenjem sproščanja kalceina nismo dodali LLO. Pri najvišji koncentraciji sladkorja je bil njegov prebitek vsaj 100-kraten v primerjavi s količino lipidov. Takšen bi namreč bil, če se med pripravo LUV-ov ne bi izgubilo nič lipidov, oziroma bi ostala enaka količina lipidov kot smo jih zatehtali. Pravo razmerje med lipidami in največjo koncentracijo sladkorjev je gotovo še nekajkrat višje. Točne koncentracije lipidov nismo mogli določiti, ker za to nismo imeli primerne metode.

Naredili smo samo eno ponovitev, iz katere ni mogoče trditi, da vsebnost sladkorjev v veziklih vpliva na sproščanje kalceina iz njih. Kot prikazuje spodnji graf (slika16), se začne krivulja po  $\sim 5 \mu\text{g/mL}$  sladkorja nekoliko spuščati, vendar bi to lahko bilo še vedno v okviru napake, saj je tudi pri nekaterih nižjih koncentracijah sladkorja podobno nizko sproščanje kot pri najvišji koncentraciji. Vseeno ne moremo trditi, da sladkor ne vpliva na vezavo LLO na arheosome, saj je morda potrebna pravilna prostorska postavitev. Sladkor, raztopljen v pufru, vsekakor ne predstavlja enake prostorske razporeditve kot v membrani. Za zanesljivo trditev, da se LLO ne veže na sladkorne skupine arhejskih lipidov, bi bilo potrebno poskus večkrat ponoviti in najti dodatne metode (npr.: SPR) za preverjanje vezave sladkor – LLO.



Slika 15: Graf sproščanja kalceina iz arheosomov z listeriolizino O, po inkubaciji s sladkorji. V negativno kontrolo po inkubaciji LUV-ov s sladkorji nismo dodali LLO-ja. Delež sproščenega kalceina predstavlja sproščen kalcein iz veziklov po 25 minutni inkubaciji veziklov z listeriolizinom O.

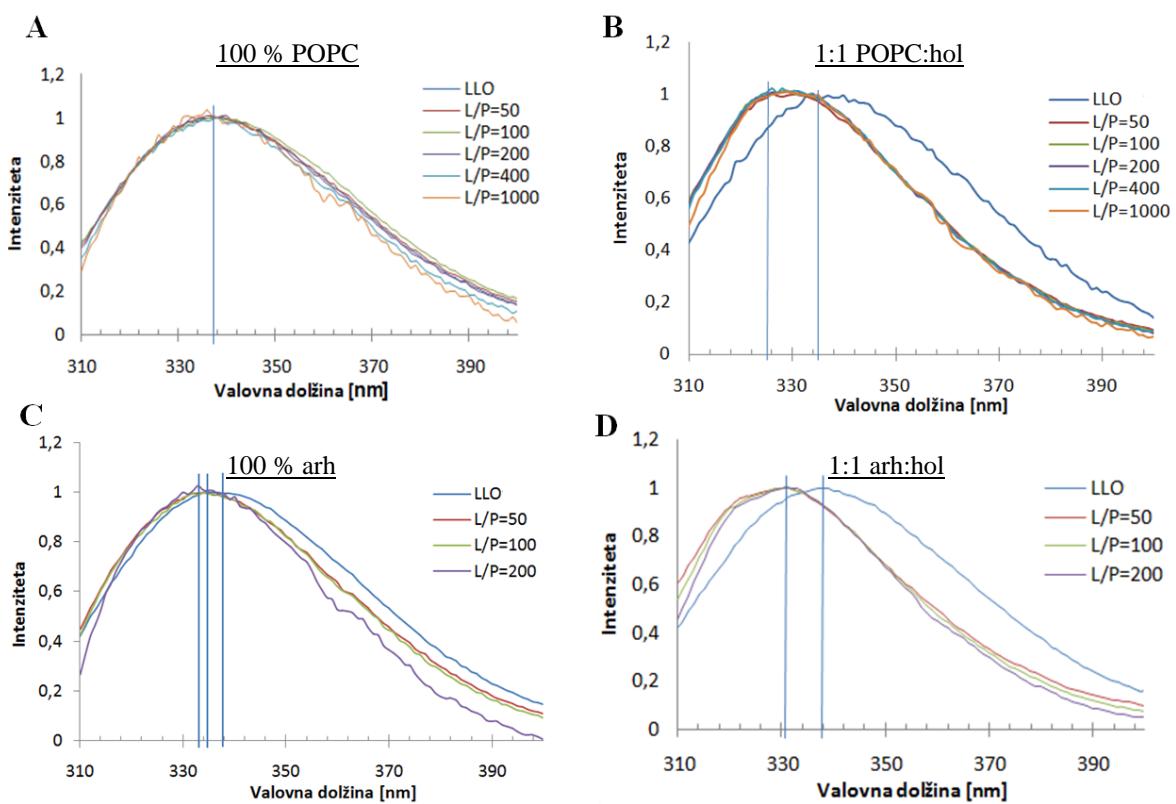
#### 4.6 PREVERJANJE VEZAVE LISTERIOLIZINA O /PERFRINGOLIZINA NA ARHEOSOME S TRIPTOFANSKO FLUORESCENCO

Z merjenjem triptofanske fluorescence smo preverjali, če se LLO oz. PFO s triptofani vsvidra v membrano arheosomov. Za pozitivno in negativno kontrolo smo uporabljali LUV-e iz POPC-ja in 1:1-POPC:holesterol. Iz rezultatov sproščanja kalceina smo predpostavljeni, kje bo viden zamik maksimalne fluorescence v levo. Pričakovali smo zamik vrhov pri veziklih z holesterolom, tako pri LLO kot pri PFO. Morda malo manjši zamik smo pričakovali tudi pri inkubaciji arhejskih veziklov brez holesterola z LLO. Višina vrhov je relativna in je odvisna od koncentracije proteina ter še nekaterih drugih parametrov fluorimetra. Med poskusom smo proteinu dodajali različne količine veziklov, zato že sama koncentracija proteina v vzorcu ni bila vedno enaka, kar pa ne bi smelo vplivati na zamik triptofanske fluorescence. Fluoresanca naj bi bila z majhnimi spremembami koncentracije proteina linearno odvisna. To odvisnost smo izrabili, da smo, ne glede na redčitve vzorca, podajali rezultate preračunane na vedno isto koncentracijo. Zaradi velikega sisanja svetlobe LUV-ov pri okrog 300 nm, smo morali

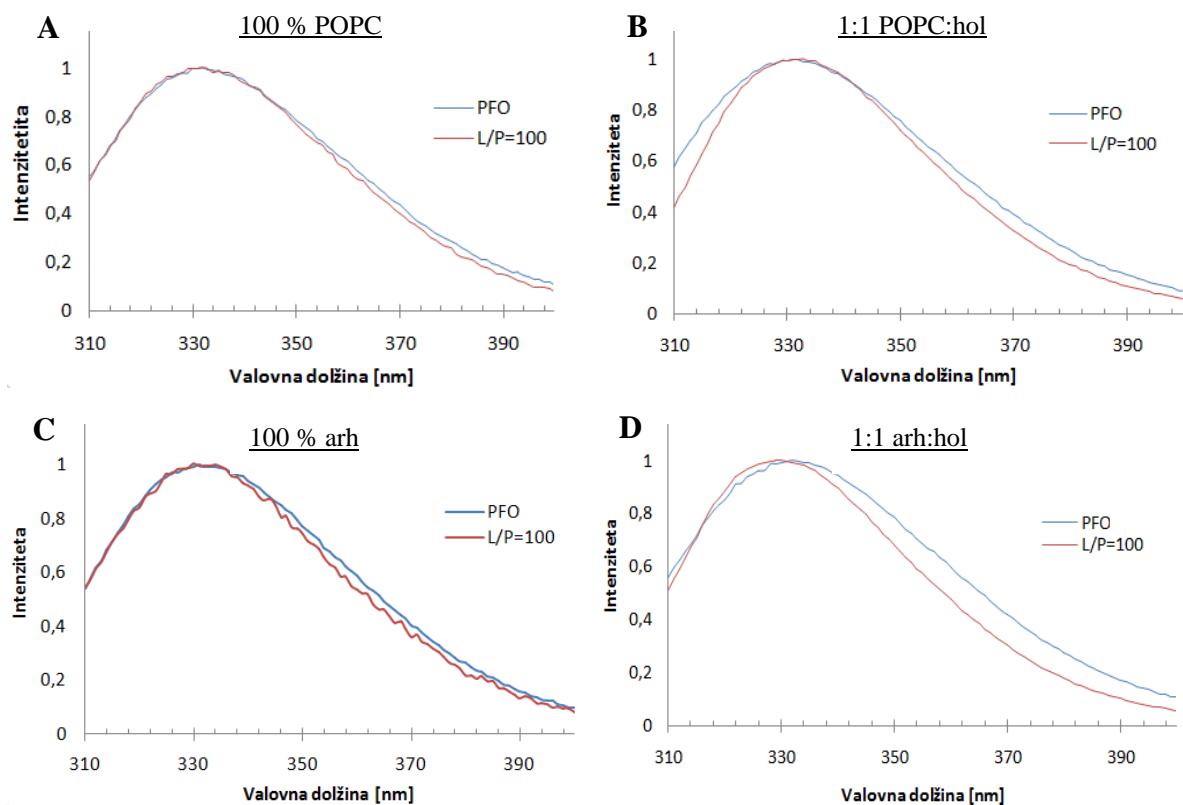
vedno odšteti ozadje (t.j. pufer + določena koncentracija LUV-ov). Na intenziteto fluorescence poleg že naštetih parametrov vplivajo še mnoge druge (npr. trenutna moč žarnice ipd.), zato smo končne rezultate še normalizirali po formuli (2).

Preučevali smo različna razmerja med lipidi in proteini. Za viden zamik je bilo pri obeh tipih arheosomov dovolj že najmanjše razmerje – lipidi/protein = 50. Manjšega razmerja nismo mogli uporabiti zaradi prevelikega šuma ozadja v tem območju. Rezultati razmerja L/P=1000 in L/P = 400 pri arheosomih niso bili relevantni zaradi prevelikega sisanja svetlobe LUV-ov. Ti dve razmerji smo zato pri arheosomih z in brez holesterola odstranili z grafa. Kot prikazujejo grafi, se vsem vzorcem z LLO-jem po dodatku arheosomov (z in brez holesterola), zamakne vrh v levo, kakor tudi pri pozitivni kontroli s POPC:holesterol liposomi. Pri arheosomih brez holesterola se vrh zamakne manj kot pri arheosomih s holesterolom in pozitivni kontroli (slika 17A). To bi lahko razlagali s tem, da ima LLO manjšo afiniteto do arhejskih veziklov brez holesterola kot z njim, zato se ga manj vgradi v membrano. Glede na to, da je tudi maksimalni zamik fluorescence pri arheosomih brez holesterola manjši kot pri veziklih s holesterolom, se morda LLO v arhejske membrane veže drugače kot v membrane s holesterolom. To pomeni, da bi lahko bile tudi pore, ki (ozioroma če) nastajajo na arheosomih brez holesterola, drugačne od por na membranah s holesterolom. Za nadaljnje študije bi bilo zanimivo preveriti kakšne velikosti pore tvori LLO na arhejskih membranah.

Za preverjanje vezave PFO-ja se ta metoda ni izkazala za uporabno, ali pa se triptofani dejansko nikjer niso vgradili v membrano. Niti pri pozitivni kontroli (POPC:holesterol) ni bilo videti zamika vrha v levo ali desno smer, da bi lahko trdili, da gre za vsidranje triptofanov v membrano (slika 18).



Slika 16: Normalizirani spektri triptofanske fluorescence po inkubaciji listeriolizinom O z velikimi unilamelarnimi vezikli pri pH 5,7. A – 100 % POPC vezikli; B – 1:1 POPC:holesterol vezikli; C – 100 % arhejski vezikli; D – 1:1 arhejski:holesterol vezikli. Navpične modre črte označujejo vrhove spektrov. L/P na grafu predstavlja razmerje lipidi in proteini.



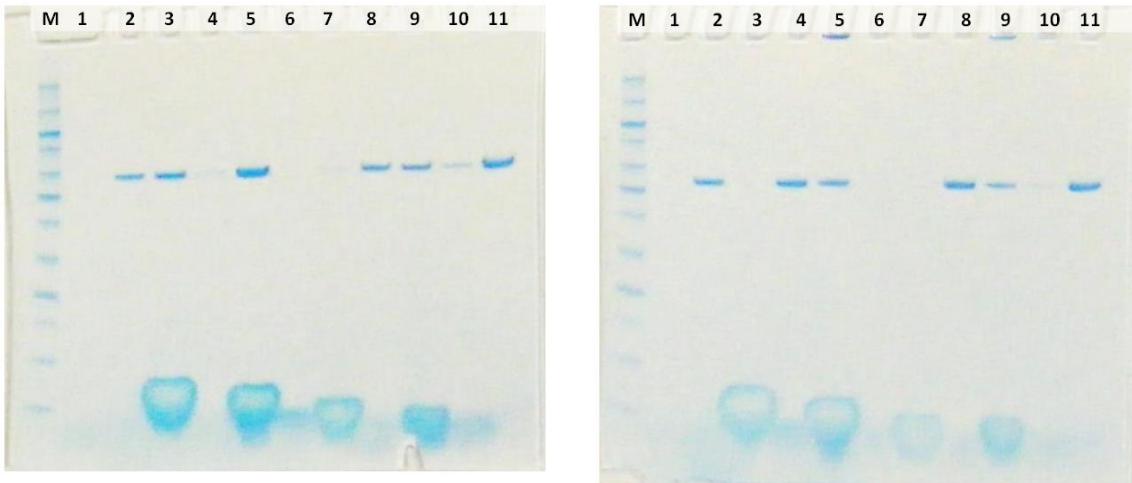
Slika 17: Normalizirani spektri triptofanske fluorescence po inkubaciji perfringolizinom O z velikimi unilamelarnimi vezikli pri pH 5,7. A – 100 % POPC vezikli; B – 1:1 POPC:holesterol vezikli; C – 100 % arhejski vezikli; D – 1:1 arhejski:holesterol vezikli. L/P na grafu predstavlja razmerje med lipidi in proteini.

		L/P	Valovna dolžina maksimalne fluorescence [nm]	
neodvisna ponovitev	LLO	50	334	
		100	334	
		200	333	
		400	333	
		1000	??	
		kontrola	337	
PFO	LLO	100	332	
		kontrola	337	
		100	331	
neodvisna ponovitev	PFO	kontrola	331	
		50	330	
		100	330	
		200	330	
		400	331	
		1000	333	
neodvisna ponovitev	LLO	kontrola	338	
		100	330	
		kontrola	338	
		100	330	
		kontrola	332	
		50	330	
neodvisna ponovitev	LLO	100	330	
		200	330	
		400	331	
		1000	333	
		kontrola	338	
		50	330	
neodvisna ponovitev	PFO	kontrola	332	
		100	330	
		kontrola	332	
		100	330	
		kontrola	332	
		50	330	
neodvisna ponovitev	LLO	100	330	
		200	330	
		400	328	
		1000	329	
		kontrola	337	
		50	329	
neodvisna ponovitev	LLO	100	330	
		200	329	
		400	328	
		1000	329	
		kontrola	337	
		100	330	
neodvisna ponovitev	PFO	kontrola	344	
		100	332	
		kontrola	331	
		100	332	
		kontrola	331	
		50	329	

Slika 18: Valovne dolžine maksimumov spektrov triptofanske fluorescence po inkubaciji perfringolizinom O z velikimi unilamelarnimi vezikli pri pH 5,7. A – 100 % arhejski vezikli; B – 1:1 arhejski:holesterol vezikli; C – 100 % POPC vezikli; D – 1:1 POPC:holesterol vezikli. L/P 1000 pri 100 % arhejskih LUV-ih ni bilo mogoče določiti, zaradi prevelikega sisanja svetlobe. Maksimumi emisije so ocenjeni vizuelno.

#### 4.7 PREVERJANJE VEZAVE LISTERIOLIZINA O IN PERFRINGOLIZINA O NA ARHEOSOME Z POLIAKRILAMIDNO ELEKTROFOREZO V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA

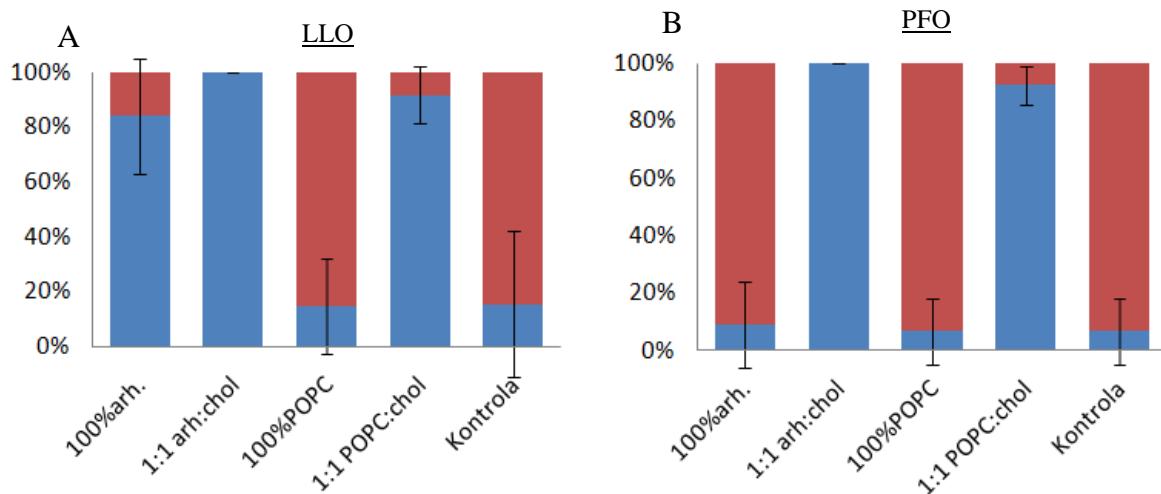
S pomočjo NaDS-PAGE elektroforeze smo preverjali vezavo LLO-ja in PFO-ja na multilaminarne vezikle s sestavo: 100 % POPC; POPC:hol (1:1); 100 % arhejski lipidi (AGI+AI); AGI+AI:hol (1:1) pri pH 5,7. Razmerje protein:MLV-ji v vzorcih je bilo 1:1200. Vzorce smo nanesli na gel, kot je prikazano na sliki 20. Kjer se je protein vezal na liposome, je ostal v usedlini, kjer se ni, pa v supernatantu. Po barvanju gelčka smo lahko s primerjanjem intenzitete in velikosti lis pri supernatantu in usedlini določenih MLV-jev, ocenili kakšen delež proteina se je v 30 minutah vezal na vezikle.



Slika 19: Elektroforezna gela po barvanju z barvilom Simply blue. Levo - vezava LLO na MLV-je; desno - vezava PFO na MLV-je. M – Novex sharp unstained standard; **1** – pelet po tretiranju LLO/PFO brez MLV-jev; **2** – supernatant po tretiranju LLO/PFO brez MLV-jev; **3** – pelet po tretiranju LLO/PFO s 100 % arhejskimi MLV-ji; **4** – supernatant po tretiranju LLO/PFO s 100 % arhejskimi MLV-ji; **5** – pelet po tretiranju LLO/PFO z arhejskimi:holesterol (1:1) MLV-ji; **6** – supernatant po tretiranju LLO/PFO z arhejskimi:holesterol (1:1) MLV-ji; **7** – pelet po tretiranju LLO/PFO s 100 % POPC MLV-ji; **8** – supernatant po tretiranju LLO/PFO s 100 % POPC MLV-ji; **9** – pelet po tretiranju LLO/PFO s POPC:holesterol (1:1) MLV-ji; **10** – supernatant po tretiranju LLO/PFO s POPC:holesterol (1:1) MLV-ji; **11** – netretiran LLO/PFO.

Lise na gelih smo kvantificirali s programom ImageJ in tako dobili delež vezanih proteinov na MLV-je. Vezava LLO in PFO na liposome s POPC-jem ter POPC:holesterol (1:1) je služila kot kontrola. Na MLV-je iz POPC-ja se ni vezalo nič proteina (če primerjamo z negativno kontrolo, kjer sploh nismo dodali MLV-jev, le proteine). Pri POPC:hol 1:1, se je obeh proteinov vezalo približno  $90\% \pm 10\%$ . Na MLV-je 1:1-arthol:hol se je obeh proteinov vezalo še več in to kar  $100\% \pm 0\%$ . Na arheosome brez holesterola pa se je vezalo približno  $80\% \pm 10\%$  LLO-ja in  $10\% \pm 10\%$  PFO-ja (slika 21). Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da je za »luknjanje« arheosomov z omenjenima dvema CDC-jema najprej potrebna uspešna vezava na membrano veziklov.

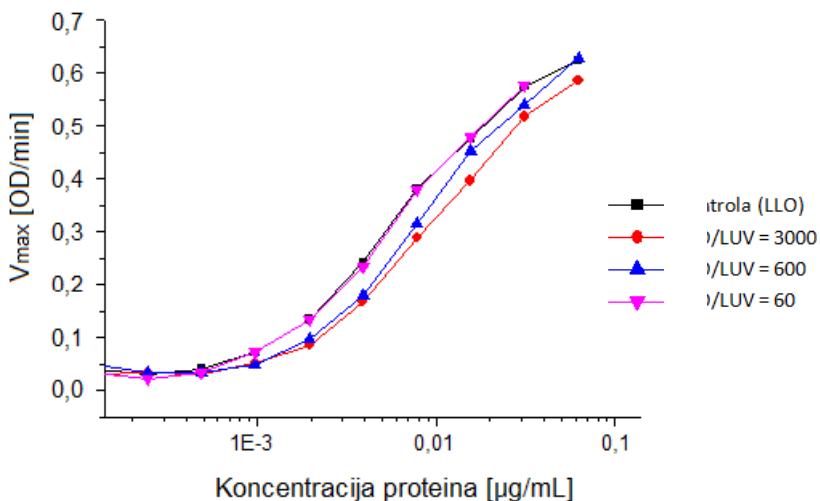
S to metodo smo lahko le na grobo določili delež vezave proteina na liposome. Za bolj natančne deleže bi morali uporabiti drugo metodo ali pa obstoječo optimizirati.



Slika 20: Delež vezanih in nevezanih proteinov na multilamelarne vezikle, določenih z metodo poliakrilamidne elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata in obdelanih rezultatov s programom ImageJ. Grafi predstavljajo povprečje treh meritev. Kontrola je vzorec, tretiran enako kot ostali, le da ni vseboval MLV-jev. **A** – vezava LLO na MLV-je; **B** – vezava PFO na MLV-je. Na obeh grafih rdeč del stolpcov predstavlja nevezane proteine (supernatant po inkubaciji MLV-jev s proteinom in centrifugirjanju), moder del stolpcov predstavlja vezan del proteinov (pelet po inkubaciji MLV-jev s proteinom in centrifugirjanju). Napake prikazujejo standardni odklon glede na tri neodvisne ponovitve.

#### 4.8 INHIBICIJA HEMOLIZE Z LISTERIOLIZINOM O Z VELIKIMI ARHEJSKIMI UNILAMEARNIMI VEZIKLI

LLO smo 30 minut inkubirali z arhejskimi LUV-i in nato preverjali inhibicijo hemolize pri pH 5,7. Preverjali smo inhibicijo lize eritrocitov z LLO po inkubiranju LLO s 100 % arhejskimi LUV-i. Pri inkubaciji LLO z arhejskimi LUV-i smo sicer zaznali rahlo inhibicijo pri razmerju lipidi/protein = 3000. Pri razmerju 600 je bilo še zaznati rahlo inhibicijo, medtem ko pri razmerju 60 ne več. Rezultate smo prikazali na grafu z maksimalno hitrostjo hemolize pri različnih koncentracijah proteina (slika 22). Dosežena maksimalna hitrost hemolize (to je ko se krivulja na grafu ustavi) pri nižjih koncentracijah proteina pomeni bolj učinkovito hemolizo. Prav tako je merilo za učinkovitejšo hemolizo višja maksimalna hitrost, kar pomeni, daje protein pri neki koncentraciji bolj aktivен.



Slika 21: Stopnja hemolize ( $V_{\max}$ ), z različno tretiranim listeriolizin O.  $V_{\max}$  predstavlja najvišjo hitrost hemolize, pri danih pogojih. Pred hemolizo smo LLO v različnih molskih razmerjih inkubirali s 100 % arhejskimi LUV-i. Za kontrolo smo imeli LLO, ki smo ga inkubirali brez LUV-ov.

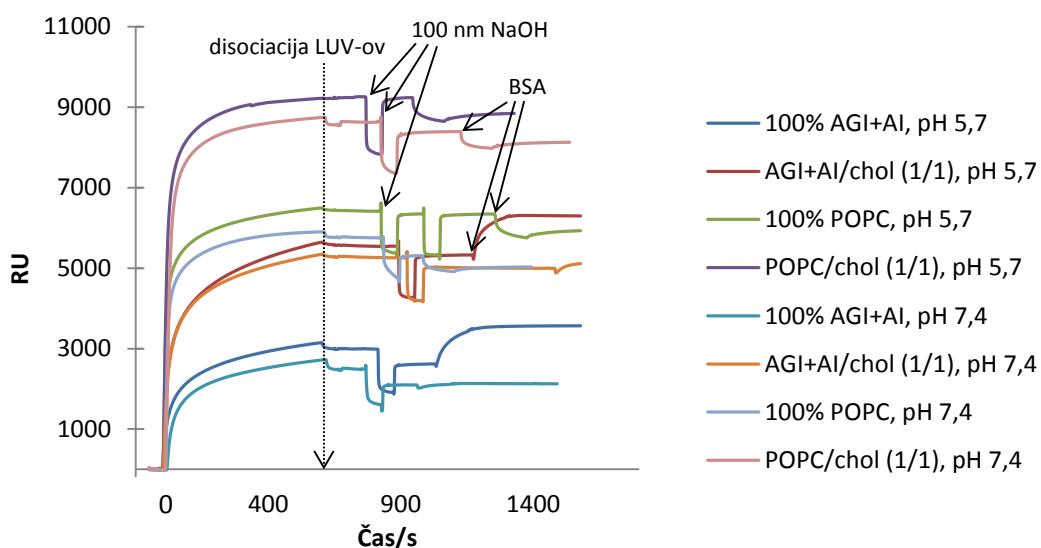
#### 4.9 ANALIZA INTERAKCIJ LISTERIOLIZINA O/PERFRINGOLIZINA O Z VELIKIMI UNILAMEARNIMI VEZIKLI S POVRŠINSKO PLAZMONSKO RESONANCO

Z metodo SPR smo merili vezavo LLO in PFO na LUV-e z različno lipidno sestavo: 100 % arhejski lipidi, 1:1 arhejski lipidi:holesterol, 100 % POPC in 1:1 POPC:holesterol. Vsak pogoj smo ponovili dvakrat. Vedno smo injicirali enako količino (2 mM) LUV-ov na čip L1, vendar smo dobili različne odzive. Najmanjši odziv smo dobili pri 100 % arhejskih LUV-ih, potem pri arhejskih s holesterolom, sledili so LUV-i s 100 % POPC, največji odziv pa je bil pri LUV-ih iz POPC in holesterola (slika 23). Iz tega sklepamo, da imajo arhejski vezikli slabšo afiniteto do čipa L1 kot POPC. Zelo dobro afiniteto do čipa L1 ima holesterol. V vseh primerih je bil tudi višji odziv pri nižjem pH-ju (5,7). To bi lahko bila tudi posledica različne sestave pufrov, ki imata zato lahko različna lomna količnika. Odzivi LUV-ov, kot so prikazani na sliki 23, so bili osnova za nadaljnje poskuse vezave proteinov na lipide.

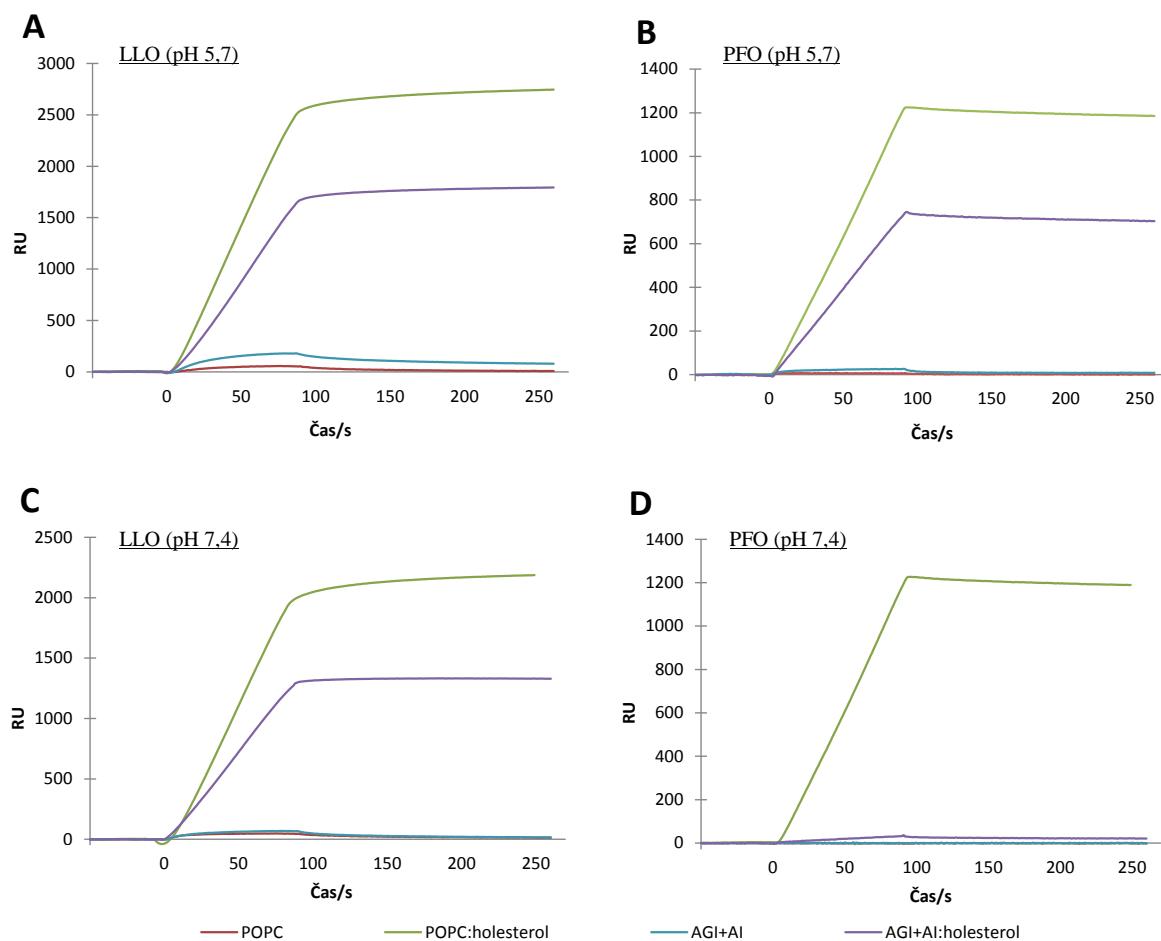
V vseh primerih preverjanja vezave proteina na vezikle, je imel LLO višji odziv kot PFO (ne glede na pH in vrsto LUV-ov). Višji odziv za molekule s podobno molsko maso pomeni boljšo vezavo. Najvišji odziv sta imela oba proteina pri vezavi na vezikle iz POPC-ja s holesterolom. 50 nM LLO pri pH 5,7 okrog 2500 RU in pri pH 7,4 okrog 2000 RU, medtem ko 50 nM PFO pri obeh pH-jih približno 1200 RU. Iz tega bi lahko sklepali, da je LLO pH-odvisen, PFO (v tem rangu) pa ne.

Pri pH 5,7 (pri 50 nM koncentraciji LLO) smo izmerili odziv do 1750 RU, pri pH 7,4 pa do okrog 1300 RU. Pri analizi vezave PFO na arhejske LUV-e s holesterolom so rezultati močno odstopali od pričakovanih. Odziv za 50 nM PFO je bil pri pH 5,7 ~750 RU, pri pH 7,4 pa odziva ni bilo več (slika 24). To se ni skladalo s prej opisanimi rezultati sproščanja

kalceina iz arheosomov s holesterolom s PFO, kjer je 100 nM kalcein sprostil iz LUV-ov ves kalcein (slika 14 v točki 4.4). V poskusih sproščanja kalceina smo uporabili drugo koncentracijo proteina, prav tako tudi razmerje med lipidi in proteini, vendar to ne bi smelo vplivati na drugačne rezultate. SPR poskus smo dvakrat ponovili, odgovor je bil obakrat enak. Da bi lahko z gotovostjo trdili o verodostojnosti rezultatov, bi morali morda poskus ponoviti s sveže pripravljenimi LUV-i. Odziva ni bilo niti pri 10 nM PFO, kar je bila še dodatna kontrola. Analiza arheosomov brez holesterola je pri pH 5,7 pokazala odziv 50 nM LLO do 200 RU in pri 50 nM PFO do ~25 RU. Pri pH 7,4 je bil viden odziv le pri LLO in sicer do ~70 RU (50 nM koncentracija proteina). To se sklada s prej opisanimi rezultati. Vezave proteinov na 100 % POPC vezikle brez holesterola praktično ni bilo zaznati v nobenem primeru (slika 24).



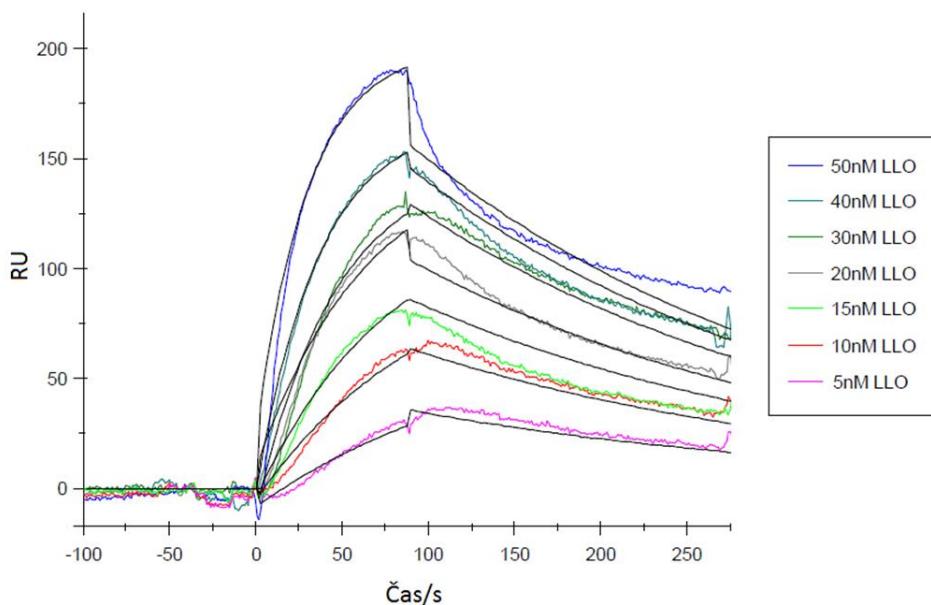
Slika 22: Senzogram immobilizacije velikih unilamelarnih veziklov na čip L1 pri pH 5,7 in 7,4. S puščicami so prikazani primeri injiciranja različnih raztopin po času.



Slika 23: Senzogram vezave od holesterola odvisnih citolizinov na velike unilamelarne vezikle z metodo površinske plazmonske resonanse. Uporabljen čip L1. A – vezava LLO na LUV-e pri pH 5,7; B – vezava PFO na LUV-e pri pH 5,7; C – vezava LLO na LUV-e pri pH 7,4; D – vezava PFO na LUV-e pri pH 7,4.

LLO ima, glede na rezultate pridobljene s površinsko plazmonsko resonanco, višjo afiniteto do vseh testiranih veziklov kot PFO (slika 24). Glede na rezultate sproščanja kalceina, kjer je PFO iz vseh veziklov s holesterolom sprostil več holesterola kot LLO (slika 13, 14 v točki 4.4), smo pričakovali drugačne SPR rezultate. Iz tega sklepamo, da sama afiniteta proteina do vezikla očitno nima linearnega učinka na sproščanje kalceina ozziroma tvorbo por v membrani.

Z SPR tehniko smo poskusili določiti tudi  $K_d$  za vezavo LLO na arheosome brez holesterola pri pH 5,7. Na čip z LUV-i smo nanesli po več koncentracij LLO in merili različne odzive. Rezultate smo obdelali s programom BIAevaluation Ver 2.1. Glede na vnesene koncentracije proteina in na izrisane krivulje asociacije ter disociacije proteina, smo s programom izračunali  $K_d = 7,08 \text{ nM}$  ( $SD = 0,53 \text{ nM}$ ). Krivulje, na osnovi katerih smo s programom BIAevaluation določili  $K_d$ , so prikazane na sliki 25.

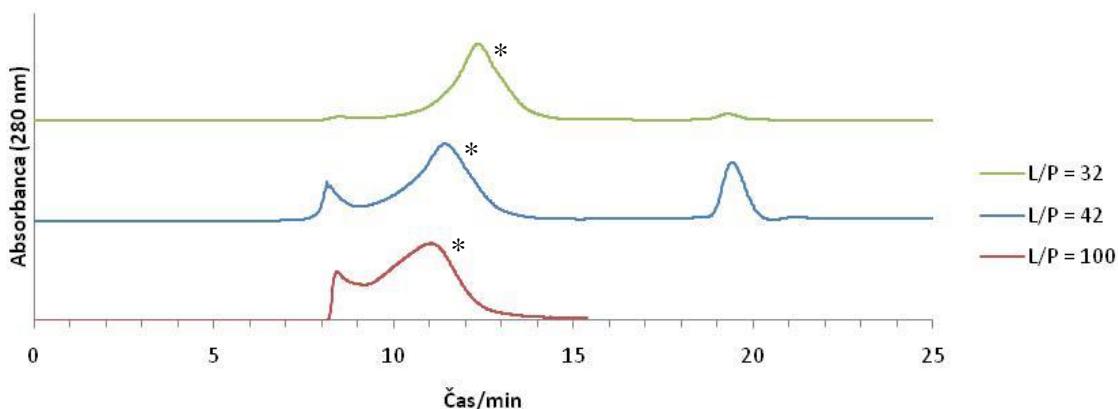


Slika 24: Senzogram vezave različnih koncentracij listeriolizina O na velike arhejske unilamelarne vezikle brez holesterola z metodo površinske plazmonske rezonančne spektroskopije pri pH 5,7. Uporabljen čip L1. Črne krivulje se prilegajo izmerjenim krivuljam in so računalniško določene, s programom BIAevaluation Ver 2.1, za izračun Kd.

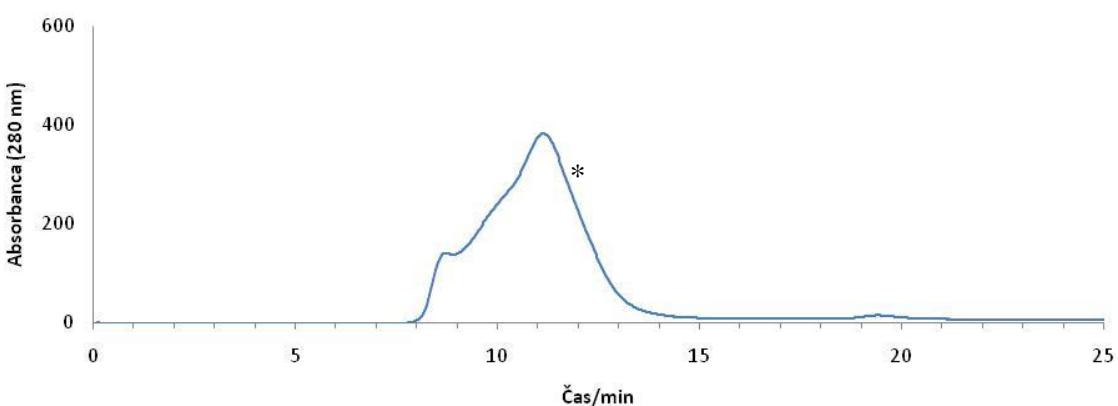
#### 4.10 PRIPRAVA NANODISKOV

O pripravi in uporabi nanodiskov iz arhejskih lipidov ne najdemo objav. Pri pripravi nanodiskov z različno lipidno sestavo je potrebno optimizirati razmerje med lipidi in MSP-jem. Za tvorbo nanodiskov iz nekaterih bolj uporabljenih lipidov je razmerje že optimizirano, npr. za nanodiske iz POPC. Nanodiske s 100 % arhejskimi lipidi smo pripravili samo enkrat in takrat uporabili razmerje lipidi/protein = 80. Te nanodiske smo pripravili s proteinom MSP1E3\_D73C, ki je daljši od MSP1D1. Za MSP1E3\_D73C je tudi značilno, da je optimalno razmerje lipidi/protein pri pripravi nanodiskov z njim približno dvakrat večje kot pri pripravi nanodiskov s proteinom MSP1D1. Nanodiske s 65 % arhejskih lipidov in 35 % holesterola smo pripravili s proteinom MSP1D1. V nanodiske smo poskušali vgradi 35 % holesterola, ker je znano, da se višje koncentracije holesterola v nanodiske načeloma teže vgrajujejo ali pa se sploh ne (Bayburt in Sligar, 2010). Pripravo arhejskih nanodiskov s holesterolom smo optimizirali s spremenjanjem razmerja lipidi/MSP. Začeli smo z razmerjem lipidi/MSP = 100. V tem primeru nismo dobili dobre ločbe po izolaciji na gelski kromatografiji, zato smo poskusili z nižjimi razmerji, 42 in 32. Medtem, ko pri razmerju 42 še vedno nismo dobili dobre ločbe vrhov na grafu po gelski kromatografiji, so se pri razmerju 32 vrhovi dobro ločili med seboj. Poleg tega je bil vrh, ki je predstavljal nanodiske, dosti večji od ostalih (slika 26). Vrh na grafu, ki se je eluiral po približno 8 – 8,5 min naj bi, že po prejšnjih raziskavah z drugimi lipidi, vseboval agregate MSP-ja (Bayburt in Sligar, 2010). Vrh, ki je sledil temu (označen z \*) je vseboval nanodiske (slika 26). To smo dokazali z inhibicijo hemolize in merjenjem velikosti na DLS-ju (v naslednjih odstavkih).

Priprave arhejskih nanodiskov brez holesterola nismo optimizirali. Kljub temu, da UV vrh, ki je predstavljal nanodiske, po gelski kromatografiji ni bil najbolje ločen od agregatov proteina (slika 27), smo pri testiranju inhibicije hemolize in na DLS-ju potrdili prisotnost nanodiskov pričakovanih velikosti.



Slika 25: Izolacija arhejskih nanodiskov s holesterolom (MSP1D1) na gelski kromatografiji (nosilec Superdex 200) z različnimi razmerji lipidi/MSP. Vrh označen z \* predstavlja sestavljene nanodiske. Te vrhove smo uporabljali v nadaljnji analizah. L/P pomeni razmerje med lipidi in proteini.



Slika 26: Izolacija arhejskih nanodiskov (MSP1E3\_D37) na gelski kromatografiji (nosilec Superdex 200). Vrh označen z \* predstavlja nanodiske, ki smo jih kasneje uporabljali v analizah.

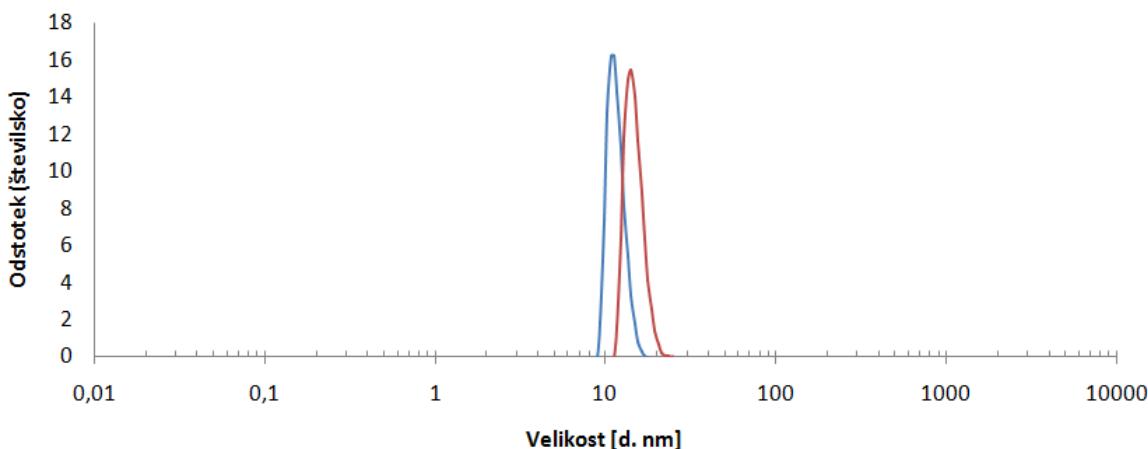
#### 4.10.1 Merjenje velikosti nanodiskov z metodo dinamičnega sisanja svetlobe

Z DLS metodo smo izmerili velikost izoliranih nanodiskov. Pričakovano so bili nanodiski z MSP1E3\_D73C večji, saj je tudi sam protein daljši od MSP1D1. Rezultati so ustrezali pričakovanim, kakršni so bili že objavljeni z drugimi lipidi. Glede na rezultate, podane z intenziteto sipane svetlobe, so 100 % arhejski nanodiski bolj homogeni kot arhejski nanodiski s holesterolom. Iz intenzitetu lahko opazimo dve populaciji delcev različnih velikosti v vzorcu arhejskih nanodiskov s holesterolom, medtem ko je v vzorcu nanodiskov brez holesterola prisotna le ena populacija delcev pravega velikostnega ranga (preglednica).

5). Glede na kromatograf po izolaciji na gelski kromatografiji bi pričakovali drugače, saj je bil pri arhejskih nanodiskih s holesterolom vrh z nanodiski precej bolje ločen od ostalih vrhov (slika 28).

Preglednica 6: Izmerjene velikosti pripravljenih multilamelarnih veziklov z metodo dinamičnega sisanja svetlobe. Velikost je podana glede na število delcev. Za vsak rezultat je podana standardna deviacija.

nanodiski	velikost delcev [nm]
arhejski - MSP1E3 (lipidi/MSP = 32)	14,7 ± 1,8
arhejski s holesterolom - MSP1D1 (lipidi/MSP = 32)	11,5 ± 1,3

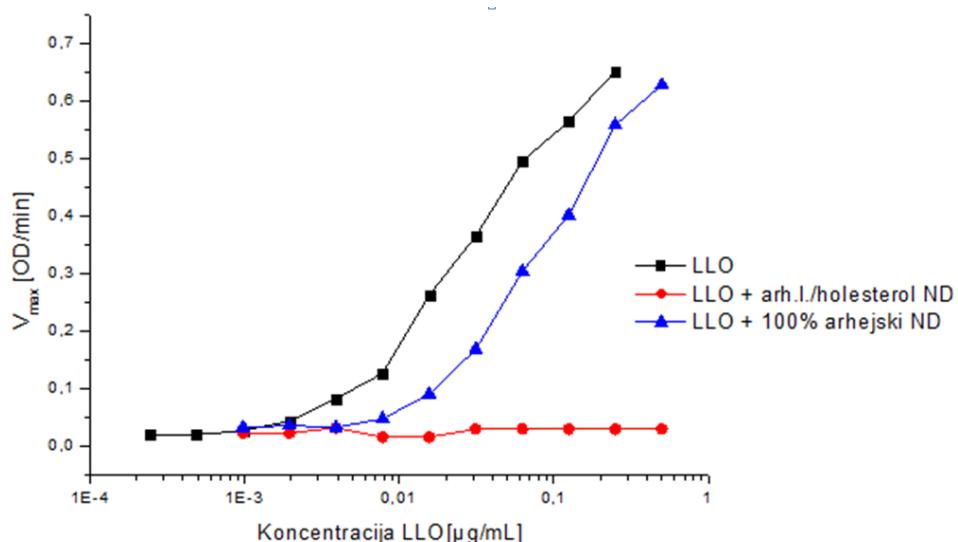


Slika 27: Razporeditev delcev po izolaciji arhejskih nanodiskov z MSP1E3 in arhejskih nanodiskov s holesterolom ter MSP1D1 (v razmerju lipidi/MSP = 32) po velikosti (glede na število). Izmerjeno z metodo dinamičnega sisanja svetlobe. Rdeč vzorec predstavlja arhejske nanodiske, moder arhejske nanodiske s holesterolom.

#### 4.11 INHIBICIJA HEMOLIZE LISTERIOLIZINA O Z ARHEJSKIMI NANODISKI Z IN BREZ HOLESTEROLA

Kot smo naredili poskus z arhejskimi LUV-i in inhibicijo hemolize LLO-ja pri pH 5,7, smo ponovili tudi z nanodiski. Uporabili smo nanodiske iz 100 % arhejskih lipidov in nanodiske iz 65 % arhejskih lipidov ter 35 % holesterola. Pri pripravi nanodiskov smo v obeh primerih v začetku zatehtali enako molarno količino lipidov. Koncentracije nanodiskov nismo mogli natančno določiti, ker za to nismo imeli primerne metode, zato tudi nismo vedeli kakšno razmerje med lipidmi in LLO smo v poskusih dejansko uporabili. Koncentracijo smo lahko le primerjali med različnimi nanodiski. Natančno smo vedeli le koncentracije MSP proteina. Nanodiskov po izolaciji nismo redčili ali koncentrirali. Arhejski nanodiski s holesterolom so, kot je prikazano na sliki 29, popolnoma inhibirali hemolizo LLO-ja, nanodiski brez holesterola pa so jo upočasnili. S tem smo spet potrdili, da se LLO veže na arhejske membrane, vezavo pa še izboljšamo z dodanim holesterolom. Inhibicije hemolize s 100 % arhejskimi nanodiski ne moremo neposredno primerjati z

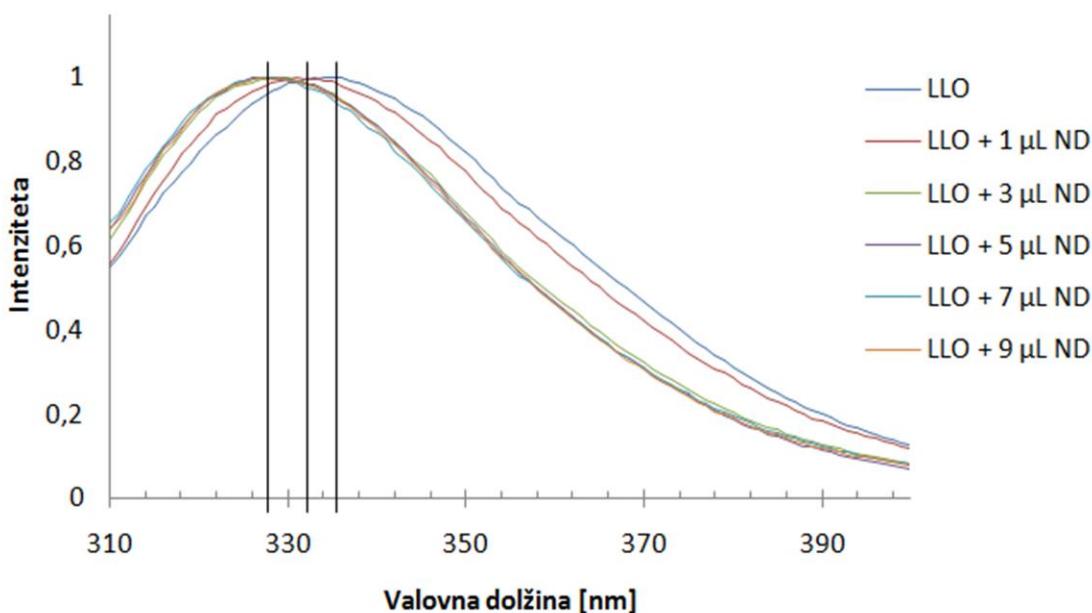
inhibicijo hemolize s 100 % arhejskimi LUV-i, ker ne poznamo natančnih koncentracij arhejskih lipidov.



Slika 28: Stopnja hemolize ( $V_{\max}$ ), z različno tretiranega proteina listeriolizin O.  $V_{\max}$  predstavlja najvišjo hitrost hemolize pri danih pogojih. Pred hemolizo smo LLO inkubirali s 100 % arhejskimi nanodiski (MSP1E3), oz. z arhejskimi nanodiski s holesterolom (z razmerjem lipidi/MSP1D1 = 32). Rezultate smo primerjali s hitrostjo hemolize proteina LLO, ki smo ga inkubirali brez nanodiskov.

#### 4.12 MERJENJE TRIPTOFANSKE FLUORESCENCE LISTERIOLIZINA O PO INKUBACIJI S 100 % ARHEJSKIMI NANODISKI

Podobno kot pri merjenju triptofanske fluorescence LLO po inkubaciji z LUV-i, smo poskusili še s 100 % arhejskimi nanodiski (MSP1E3), ki smo jih v tem primeru uporabili namesto LUV-ov. Uporabljenih razmerij lipidi/protein nismo mogli določiti, ker nismo imeli metode za merjenje koncentracij arhejskih lipidov, zato smo opazovali samo ali je prišlo do zamika triptofanske fluorescence. Že pri dodatku 1  $\mu$ L nanodiskov je prišlo do opaznega zamika v levo. Pri dodatku 3  $\mu$ L nanodiskov je bil zamik triptofanske fluorescence že maksimalen (slika 30). To kaže na to, da se je LLO uspešno vgradil v arhejske nanodiske. Vezan LLO na arhejske nanodiske lahko uporabljamo v različnih metodah za preverjanje interakcij med LLO-jem in arhejskimi membranami. Kot smo že omenili, je prednost nanodiskov predvsem v njihovi majhnosti v primerjavi z ostalimi modeli lipidnih membran. Arhejski nanodiski so se torej izkazali kot dober model za študije vezave LLO na membrane arhejskih lipidov.

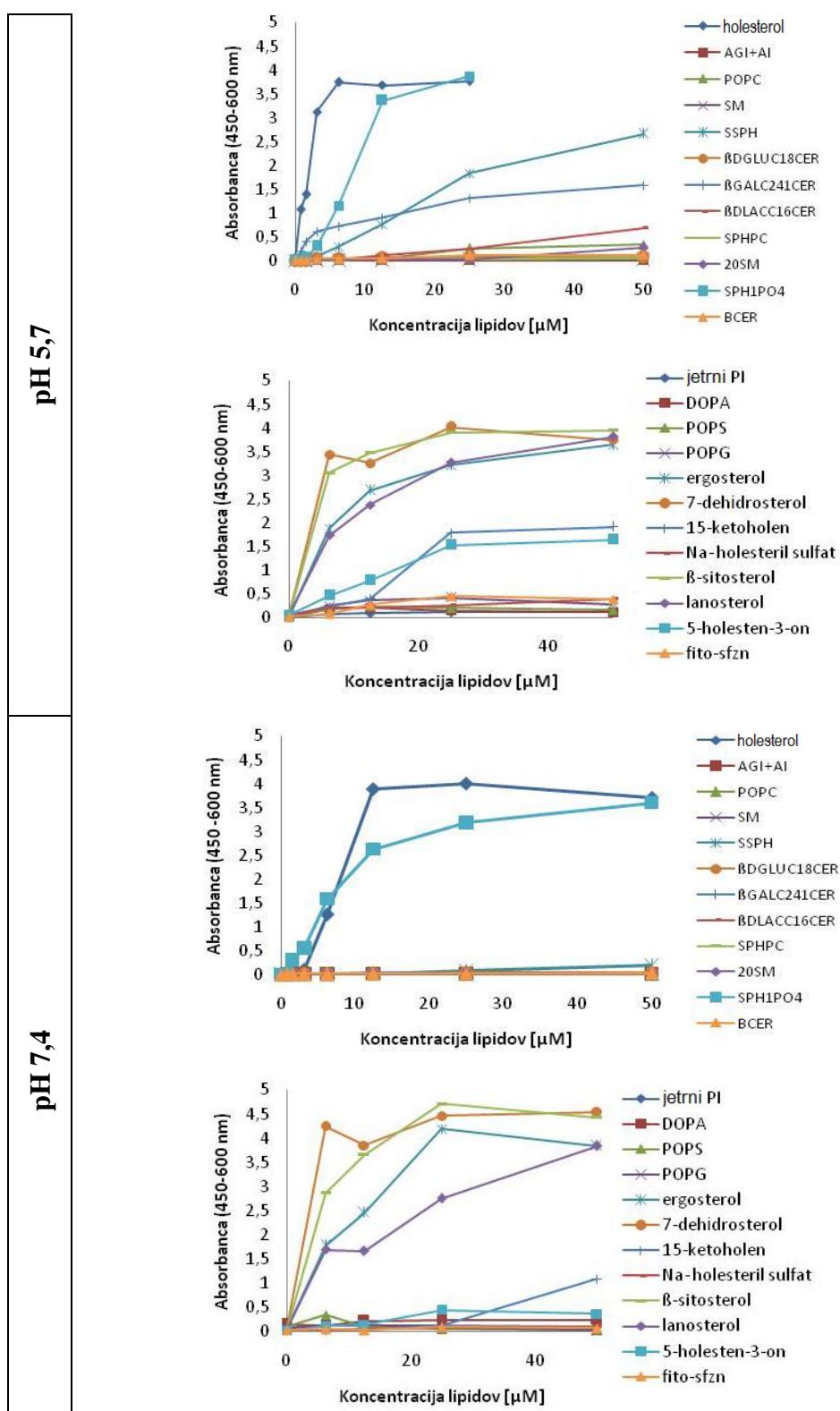


Slika 29: Normalizirani spektri triptofanske fluorescence po inkubaciji listeriolizinom O z arhejskimi nanodiski pri pH 5,7. Navpične črte označujejo maksimume fluorescence. ND = nanodisk. Koncentracija LLO v poskusu je bila 60 µg/mL.

#### 4.13 ENCIMSKOIMUNOLOŠKI TEST VEZAVE LISTERIOLIZINA O NA RAZLIČNE LIPIDE

ELISA test smo naredili pri dveh pH-jih (5,7 in 7,4). Prostorska postavitev lipidov je v tem primeru drugačna kot pri liposomih, zato nismo pričakovali popolnoma enakih rezultatov pri lipidih, ki smo jih testirali že v poskusih z vezikli. Poleg POPC-ja, holesterola in AGI+AI smo uporabili še lipide z vezanim sladkorjem (glikosfingolipidi), steroide, sfinglipide ipd. »Sladkorne lipide« smo uporabili, ker imajo tudi AGI in AI lipidi vezan sladkor (inozitol). Če bi se LLO vezal še na druge lipide, ki imajo vezan sladkor, bi to lahko pomenilo, da je za vezavo LLO-ja na arheosome odgovorna prisotnost sladkorja. Na večino lipidov se LLO dosti bolje veže pri nižjem pH-ju. V tem poskušu LLO pri nobenem od testiranih pH-jev ne veže arhejskih lipidov. To pomeni, da je za vezavo LLO-ja na AGI in AI verjetno potrebna prostorska postavitev v obliki membrane. AGI in AI imata precej razvejano obliko, zaradi česar bi lahko bili v membrani arheosomov majhni prostori, kamor bi se LLO lahko strukturno prilegal in tako sprožil vezavo. Od glikosfingolipidov sta D-galaktozil-β1-1'-N-nervonoil- D-eritro-sfingozin ( $\beta$ DGALC) in D-laktozil-β1-1'-palmitoil- D-eritro-sfingozin ( $\beta$ DLACC) pokazala šibko vezavo LLO-ja, D-glukozil-β1-1'-N-stearoil-D-eritro-sfingozin ( $\beta$ DGLUC) ni pokazal vezave. Iz tega lahko sklepamo, da sladkor ni vezavno mesto za LLO. Vseeno še vedno ne moremo povsem ovreči teze, da se LLO veže na sladkorje, saj, kot smo že omenili pri inhibiciji hemolize s sladkorji, je morda potrebna pravilna prostorska razporeditev sladkorjev. To se kaže tudi v primeru z AGI + AI lipid, ki pri ELISI ne kažejo vezave z LLO, pri tehnikah analize vezave LLO z LUV-i pa. Obstaja tudi možnost, da se LLO veže le na specifične sladkorje. LLO se je dobro vezal tudi na večino steroidov. Znano je, da je za vezavo LLO na holesterol odgovorna prosta –

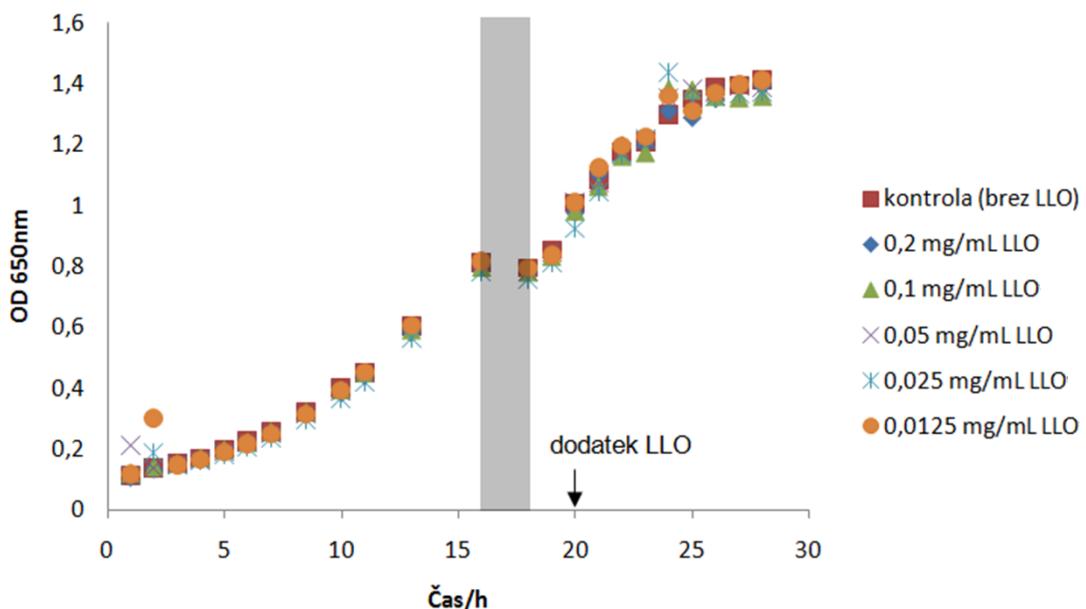
OH skupina, ki je v membranski razporeditvi lipidov orientirana proti hidrofilnemu delu membrane (je dostopna za vodotopne proteine). To se je potrdilo tudi v našem poskusu, saj se LLO od vseh testiranih sterolov ni vezal le na natrijev holesterol sulfat, ki ima namesto hidroksilne sulfatno skupino. Vsi ostali testirani steroli imajo na koncu -OH skupino in so vezali LLO (slika 31). Med ostalimi lipidi, ki so pokazali vezavo z LLO, nismo opazili podobnih posebnosti v njihovi skeletni formuli. Skeletne formule uporabljenih lipidov v ELISA testu so v prilogi.



Slika 30: Test vezave listeriolizina O na različne lipide z encimsko-imunološkim testom. Zgornja grafa prikazujeta vezavo pri pH 5,7, spodnja dva pri pH 7,4. Zaradi velikega števila lipidov in večje preglednosti sta za vsak pH dva grafa, ki prikazujeta vezavo LLO-ja na različne lipide. Pri pH 5,7 sta bila odziva pri holesterolu in SPH1PO4 pri koncentracijah lipidov nad 25  $\mu\text{M}$  višja od meje detekcije, zato so točke na grafu v teh dveh primerih samo do koncentracije lipidov 25  $\mu\text{M}$ .

#### 4.14 VPLIV LISTERIOLIZINA O NA RAST *Aeropyrum pernix* K1

Da bi morda lahko razložili vlogo LLO in njegov evolucijski pomen tvorjenja por v arhejskih membranah brez holesterola, smo naredili poskus, v katerem smo opazovali vpliv dodatka LLO v gojišče med gojenjem arheje *Aeropyrum pernix* K1. Optimalna temperatura za rast *Aeropyrum pernix* K1 je 92 °C, pri tej temperaturi pa LLO denaturira. Poskus smo torej zastavili tako, da smo arheje gojili pri 92 °C, sredi eksponentne faze smo kulturo ohladili na 37 °C, dodali pet različnih koncentracij LLO-ja in inkubirali kulturo z LLO-jem na tej temperaturi pol ure, nato pa spet zvišali temperaturo na 92 °C ter gojili arheje do njihove stacionarne faze. Rast smo spremljali z merjenjem pri 600 nm. Padec OD-ja med 16. in 18. uro gojenja, ki je označena s sivim pravokotnikom, je posledica ustavljenega mešanja zaradi tehnične napake in s tem ne-optimalnih pogojev za rast arheje, ne pa vpliv dodanega LLO-ja (slika 32). Kot je opaziti iz rastnih krivulj dodatek LLO-ja med gojenjem ni imel vpliva na rast arhej.



Slika 31: Rastne krivulje *Aeropyrum pernix* K1 z dodanimi petimi različnimi koncentracijami listeriolizina O v gojišče med eksponentno fazo rasti in kontrolo (brez dodatka listeriolizina O). Po 20 h gojenja smo v ohlajeno gojišče na 37 °C dodali LLO (na grafu prikazano s črno puščico). Siv stolpec na grafu pomeni čas, ko ni bilo mešanja.

## 5 SKLEPI

Potrdili smo, da se holesterol lahko, vsaj do 50 % deleža, vgradi v arheosome iz lipidov *Aeropyrum pernix* K1.

Z merjenjem velikosti veziklov z metodo DLS smo potrdili, da lahko tako sami arhejski lipidi kot tudi mešanica arhejskih lipidov in holesterola tvorijo 100 nm LUV-e.

Visoko sproščanje kalceina iz arheosomov s holesterolom (nad 80 %) nakazuje, da se na membranah tvorijo pore tako z LLO kot s PFO. Iz arheosomov s holesterolom se sprošča celo do dvakrat več kalceina kot iz liposomov iz POPC in holesterola v razmerju 1:1. Na MLV-jih je vidno stopničasto sproščanje kalceina, kar razlagamo z postopnim luknanjem notranjih membran MLV-jev s LLO in PFO, od zunanje proti notranjim.

Poskus sproščanja kalceina iz arheosomov brez holesterola z LLO je pokazal, da LLO ni strogo specifičen le za holesterol. Sproščanje je bilo sicer šibko (do 15 % v 1000 s), kar nakazuje, da interakcija LLO z arhejskimi membranami ni tako močna kot s holesterolom. PFO ni povzročil sproščanja kalceina iz arheosomov.

Močno vezavo LLO in PFO na arheosome s holesterolom ter vezavo LLO na arheosome brez holesterola smo pokazali z več metodami:

- z nanosom usedline in supernatanta LUV-ov, inkubiranih s proteini, na NaDS-PAGE;
- z merjenje triptofanske fluorescence;
- s SPR ter
- z inhibicijo hemolitične aktivnosti LLO-ja po predinkubaciji z arheosomi .

Potrdili smo, da LLO ni strogo specifičen le za holesterol in pokazali razliko v vezavnih mestih med različnimi CDC-ji.

Z metodo inhibicije sproščanja kalceina s sladkorji nismo mogli dokazati, da LLO veže sladkorje. Pri koncentracijah sladkorjev do 25 µM, in 100 nM LLO-ja, vezave nismo opazili. Uporabili smo inozitol, ki je vezan na arhejske lipide, in glukozo. S tem poskusom nismo potrdili naše domneve, da se LLO veže na arhejske lipide prek inozitola.

Iz analize vezave LLO na lipide z ELISA testom smo ugotovili, da je za vezavo LLO-ja na arhejske lipide potrebna ureditev arhejskih lipidov v zgradbo membrane. Z ELISA testom smo potrdili vezavo LLO na številne druge sterole in nekatere fosfo- ter sfingolipide. To še enkrat dokazuje, da LLO ni strogo specifičen za vezavo na holesterol. Tudi nekateri sfingolipidi so pokazali povsem enakovredno vezavo LLO kot holesterol.

Uspeli smo pripraviti arhejske nanodiske in arhejske nanodiske s holesterolom. Tudi z njimi smo delno okarakterizirali vezavo LLO na arhejske membrane. Rezultati so se skladali z tistimi, ki smo jih opravili na veziklih. Takšni nanodiski bi lahko služili kot model za dodatne analize interakcij CDC-jev z arhejskimi membranami. Zaradi svoje majhnosti, pa kljub temu ne-ukriviljene membrane (kot je na primer pri SUV-ih) ima številne prednosti za analizo interakcij predvsem posameznih proteinских monomerov z membrano.

S spremeljanjem rastne krivulje *A. pernix* K1 ob dodajanju LLO med eksponentno fazo rasti smo ugotovili, da vezava LLO na arhejske lipide ni v povezavi s kompeticijo med *L. monocytogenes* (naravna producentka LLO) in arhejami za biološko nišo. Dodatek LLO v gojišče med rastjo *A. pernix* K1 ni vplival na njeno rastno krivuljo.

## 6 POVZETEK

Arhejski lipidi, izolirani iz arheje *Aeropyrum pernix* K1, so zaradi svojih fizikalnih in biokemijskih lastnosti uporabni v mnogih biotehnoloških aplikacijah. Lipidni vezikli so že bili razviti kot dostavni sistem zdravil na točno določeno mesto, kjer želimo, da ta zdravila delujejo. Vezikli iz AGI in AI lipidov so že pokazali večjo stabilnost in odpornost na zunanje fizikalne dejavnike v primerjavi z nekaterimi fosfolipidi. Arheosomi bi zaradi svoje stabilnosti lahko bili naslednji korak k izboljšavi dostavnega sistema z vezikli. Sprostitev vsebine iz veziklov lahko sprožijo CDC-ji. Ti so odvisni od holesterola, zato smo poskušali v arheosome vgraditi holesterol. Velik potencial med CDC-ji predstavlja listeriolizin O, katerega zmožnost tvorbe por je temperaturno in pH odvisna. Temperaturna in pH odvisnost predstavlja še dodatno zmožnost reguliranja sproščanja snovi iz veziklov.

Opisali smo tvorbo arheosomov, zmožnost vgradnje holesterola in tvorbo por s CDC-ji. Testirali smo CDC-ja listeriolizin O in perfringolizin O. Za primerjavo smo pripravili liposome iz POPC-ja z in brez holesterola. Pripravljeni LUV-i iz vseh lipidnih mešanic so bili zelo uniformni, kar smo potrdili z DLS-om. Velikosti LUV-ov, ki smo jih uporabljali v analizah, so bile 100 nm. Potrdili smo, da se tudi do 50 % holesterola lahko vgradi v arheosome. Arhejski lipidi v veziklih niso ovirali vezave na holesterol in tvorbe por s CDC-ji. Nasprotno, pri arheosomih s holesterolom je bilo celo boljše sproščanje kalceina s CDC-ji kot pri veziklih POPC:holesterol (1:1). PFO je sprostil do 100 % kalceina iz arheosomov s holesterolom (arhejski lipidi:holesterol 1:1), LLO do približno 95 %. Z različnimi metodami smo potrdili zelo dobro tvorbo por in vezavo CDC-jev na arheosome s holesterolom. Pokazali smo sproščanje kalceina iz veziklov z LLO (do 20 %) in njegovo vezavo na arheosome brez holesterola. Pri PFO sproščanja kalceina iz veziklov in vezave na arheosome brez holesterola ni bilo zaznati, kar kaže na rahle, vendar ključne strukturne razlike v vezavni domeni med LLO in PFO.

V nadalnjih poskusih smo žeeli okarakterizirati vezavo LLO na arheosome in poskusili določiti širšo specifičnost vezavne LLO na lipide. Z ELISA testom smo preverjali vezavo LLO na 25 različnih lipidov. Pri ELISA testu nismo zaznali vezave LLO na arhejske lipide, medtem ko smo pri vseh metodah, kjer smo imeli arhejske lipide v obliki lipidnega dvosloja, lahko zaznali vezavo LLO z arheosomi. Iz tega smo sklepali, da je za vezavo LLO na arhejske lipide potrebna pravilna prostorska postavitev (v obliki lipidnega dvosloja). Potrdili smo, da je za vezavo LLO na holesterol odgovorna –OH skupina, ki je pri holesterolu obrnjena ven iz membrane. Drugih podobnosti v zgradbi lipidov, ki vežejo LLO, nismo mogli določiti. Uspeli smo tudi pripraviti popolnoma nova membranska sistema - nanodiske iz arhejskih lipidov in arhejskih lipidov s holesterolom, kar je lahko dober modelni sistem za nadaljnje študije interakcij LLO z arhejskimi membranami. Iz spremeljanja rastne krivulje arheje *Aeropyrum pernix* K1 smo zaključili, da LLO ni toksičen za to arhejo, saj na njihovo rast nima vpliva.

## 7 VIRI

- Allers T., Mevarech M. 2005. Archaeal genetics—the third way. *Nature Reviews Genetics*, 6, 1: 58–73
- Bayburt T. H., Sligar S. G. 2010. Membrane protein assembly into nanodiscs. *FEBS Letters*, 584, 9: 1721–1727
- Beseničar M., Maček P., Lakey J. H., Anderluh G. 2006. Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 141, 1-2: 169–178
- Bligh E. G., Dyer W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 8: 911–917
- Boyer, R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Bullock C. 2000. The Archaea — a biochemical perspective. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 28, 4: 186–191
- Bult C. J., White O., Olsen G. J., Zhou L., Fleischmann R. D., Sutton G. G., Blake J. A., Fitz Gerald L. M., Clayton R. A., Gocayne J. D., Kerlavage A. R., Dougherty B. A., Tomb J.-F., Adams M. D., Reich C. I., Overbeek R., Kirkness E. F., Weinstock K. G., Merrick J. M., Glodek A., Scott J. L., Geoghagen N. S. M., Weidman J. F., Fuhrmann J. L., Nguyen D., Utterback T. R., Kelley J. M., Peterson J. D., Sadow P. W., Hanna M. C., Cotton M. D., Roberts K. M., Hurst M. A., Kaine B. P., Borodovsky M., Klenk H.P., Fraser C. M., Smith H. O., Woese C. R., Venter J. C. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273, 5278: 1058–1073
- Cavicchioli R., Thomas T., Curmi P. M. 2000. Coldstress response in archaea. *Extremophiles*, 4, 6: 321–331
- Doulié J.-P., Lavenant L., Renard D. 2003. Formation of tubules and giant vesicles from large multilamellar vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 266, 2: 477–480
- Farrand A. J., La Chapelle S., Hotze E. M., Johnson A. E., Tweten R. K. 2010. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 9: 4341–4346
- Gilbert R. J. C. 2010. Cholesterol-dependent cytolysins. V: Proteins membrane binding and pore formation. (Anderluh G., Lakey J, (ur.)), New York, Springer: 56–66
- Gmajner D., Ota A., Sentjurc M., Ulrich N. P. 2011. Stability of diether C(25,25) liposomes from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 3: 236–245

- Hotze E. M., Tweten R. K. 2012. Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1818, 4: 1028–1038
- Jacquemet A., Barbeau J., Lemiègre L., Benvegnu T. 2009. Archaeal tetraether bipolar lipids: Structures, functions and applications. *Biochimie*, 91, 6: 711–717
- Kashefi K., Lovley D. R. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301, 5635: 934–934
- Kelly L. A., Sandoz I. 1981. Liposome drug delivery systems. US Patent 4356167: 7 str.
- Kim K. W., Lee S. B. 2003. Growth of the hyperthermophilic marine archaeon *Aeropyrum pernix* in a defined medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 6: 618–622
- Knap P. 2013. Uporaba modelnih lipidnih sistemov za določanje velikosti por listeriolizina O: diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 71 str.
- Kočevar Glavač, N., Kristl, J. 2005. Ciljana dostava učinkovin v tumorske celice z liposomi. Farmacevtski vestnik: strokovno glasilo slovenske farmacije, 56, 3: 202–206
- Köster S., van Pee K., Hudel M., Leustik M., Rhinow D., Kühlbrandt W., Chakraborty T., Yıldız Ö. 2014. Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation. *Nature Communications*, 5: 3670, doi:10.1038/ncomms4690: 14 str.
- Lasic D. D. 1993. Liposomes: from physics to applications. 1st ed. Amsterdam, Elsevier: 575 str.
- Marchiorotto M., Podobnik M., DallaSerra M., Anderluh G. 2013. What planar lipid membranes tell us about the pore-forming activity of cholesterol-dependent cytolysins. *Biophysical Chemistry*, 182: 64–70
- Meglen M. 2008. Vpliv pH rastnega medija na vsebnost zunajceličnih proteinov termofilne arheje *Aeropyrum pernix*: diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 48 str.
- Milek I., Cigic B., Skrt M., Kaletunç G., Ulrich N. P. 2005. Optimization of growth for the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* on a small-batch scale. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 9: 805–809
- Moon C. P., Fleming K. G. 2011. Using tryptophan fluorescence to measure the stability of membrane proteins folded in liposomes. *Methods in Enzymology*, 492: 189–211
- Patel H., Tscheika C., Heerklotz H. 2009. Characterizing vesicle leakage by fluorescence life time measurements. *Soft Matter*, 5, 15: 2849–2851

- Rezelj S. 2014. Opredelitev zgradbe in delovanja mutanta listeriolizina O Y406A: magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 92 str.
- Sako Y., Nomura N., Uchida A., Ishida Y., Morii H., Koga Y., Hoaki T., Maruyama T. 1996. *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 4: 1070–1077
- Schnupf P., Portnoy D. A. 2007. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysisin. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 9, 10: 1176–1187
- Shepard L. A., Shatursky O., Johnson A. E., Tweten R. K. 2000. The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepor ecomplex precedes the insertion of the transmembrane beta-harpins. Biochemistry, 39, 33: 10284–10293
- Soltani C. E., Hotze E. M., Johnson A. E., Tweten R. K. 2007. Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 51: 20226–20231
- Tweten R. K., Hotze E. M., Wade K. R. 2015. The unique molecular choreography of giant pore formation by the cholesterol-dependent cytolysins of gram-positive bacteria. Annual Review of Microbiology, 69, : 323–340
- Tweten R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. Infection and Immunity, 73, 10: 6199–6209
- Ulrich N. P., Gmajner D., Raspor P. 2009. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. Applied Microbiology and Biotechnology, 84, 2: 249–260
- Vieille C., Zeikus G. J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65, 1: 1–43
- Voller A., Bidwell D. E., Buck A. A., Diesfeld H. J., Enders B., Haworth J., Huldt G., Kent N. H., Kristen C., Mattern P., Ruitenberg E. J. 1976. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bulletin of the World Health Organization, 54, 2: 129–139
- Weichel M., Bassarab S., Garidel P. 2008. Probing thermal stability of MAbs by intrinsic tryptophan fluorescence. Bio Process International, 6, 6: 42–52
- Wickham S. E., Hotze E. M., Farrand A. J., Polekhina G., Nero T. L., Tomlinson S., Parker M. W., Tweten R. 2011. Mapping the intermedilysin-human CD59 receptor interface reveals a deep correspondence with the binding site on CD59 for complement binding proteins C8 $\alpha$  and C9. Journal of Biological Chemistry, 286, 23: 20952–20962

Woese C. R., Fox G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 11: 5088–5090

Zetasizer Nano usermanual.2007. Worcestershire, Malvern Instruments: 292 str.

## ZAHVALA

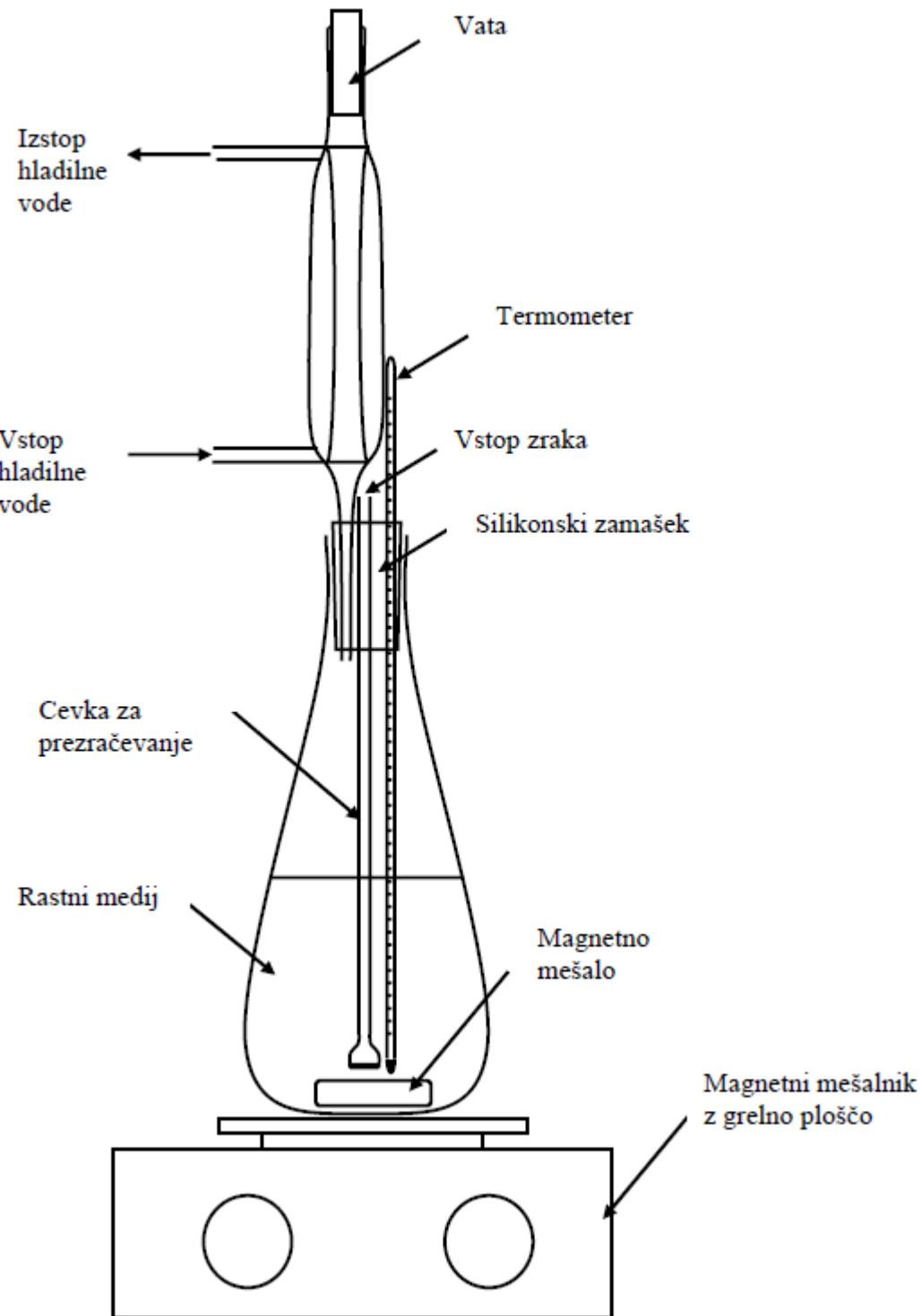
Rad bi se zahvalil mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu in somentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za strokovno podporo pri nastajanju magistrske naloge.

Hvala tudi prof. dr. Kristini Sepčić za pregled naloge.

Hvala vsem sodelavcem na Kemijskem inštitutu na oddelku D11 (Odsek za molekularno biotehnologijo in nanobiotehnologijo) za pomoč v laboratoriju, posebej še Mirijam in Maticu, ki sta si vzela čas za prvi pregled te naloge.

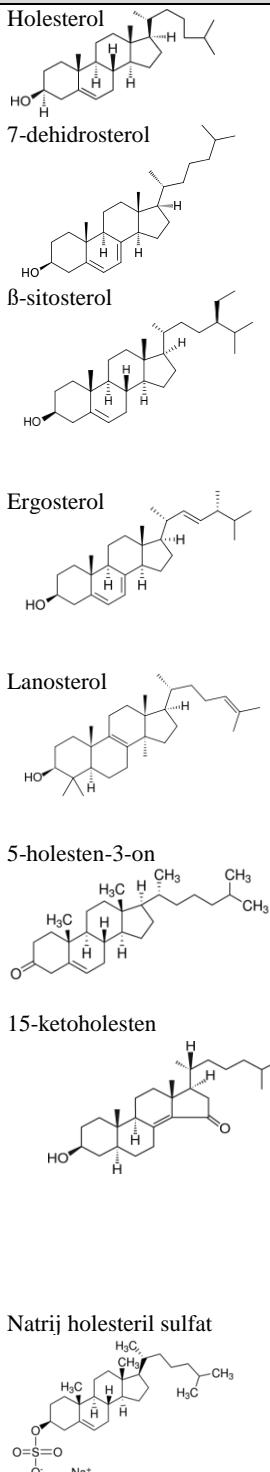
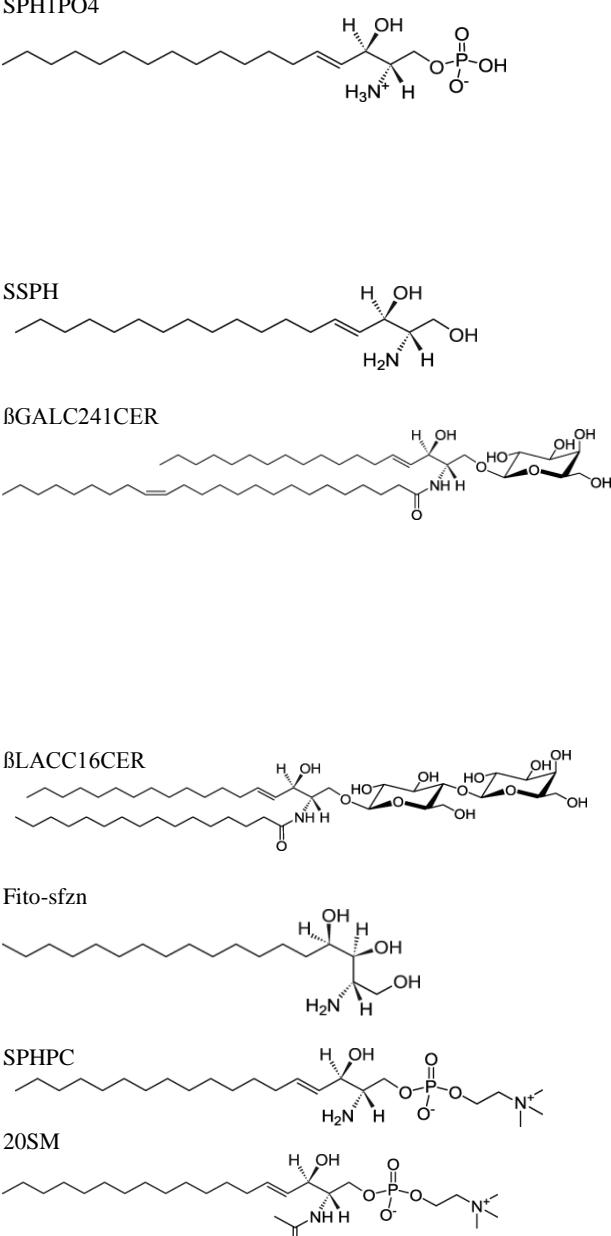
## PRILOGA A

Sistem za anaerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem (Milek in sod., 2005)



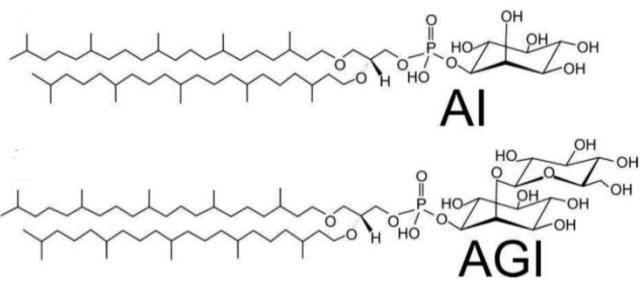
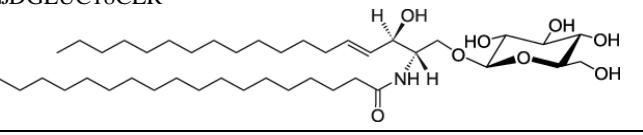
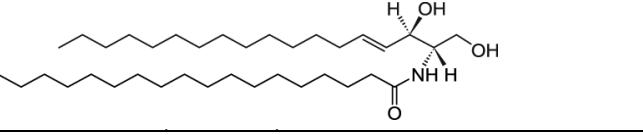
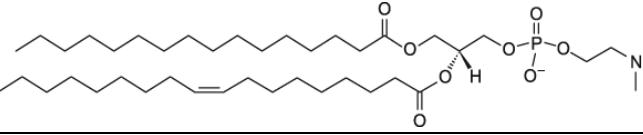
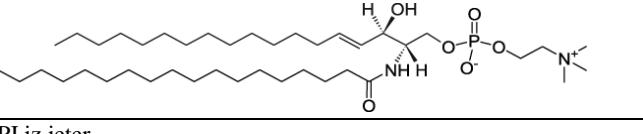
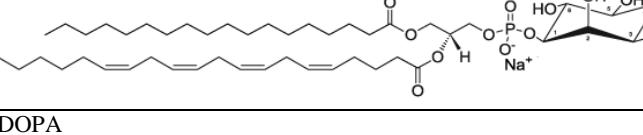
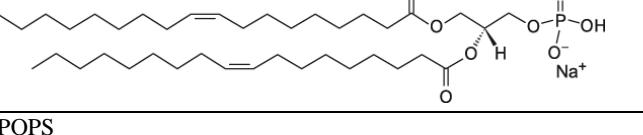
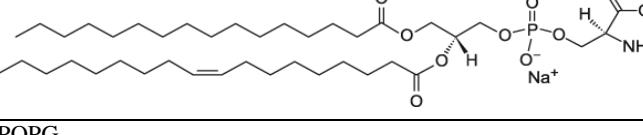
## PRILOGA B

**Strukturne formule lipidov, ki vežejo listeriolizin O glede na encimskoimunske teste.** Lipidi so v tabeli razporejeni po moči vezave LLO - lipid.

Moč vezave	Steroli	Ostali lipidi
močna	 <p>Cholestanol 7-dehydrocholesterol β-sitosterol Ergosterol Lanosterol 5-hosten-3-one 15-ketoholosten Natrij holesteril sulfat</p>	 <p>SPH1PO<sub>4</sub> SSPH βGALC241CER βLACC16CER Fito-sfzn SPHPC 20SM</p>
šibka		

## PRILGA C

### Strukturne formule lipidov, ki z encimskoimunskimtestom ne vežejo listeriolizin O

AGI + AI	
BDGLUC18CER	
BCER	
POPC	
SM	
PI iz jeter	
DOPA	
POPS	
POPG	