

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja GRUNDNER

**VPLIV LIZOFOSFOLIPIDOV, MAŠČOBNIH KISLIN
IN SLADKORJEV NA MEMBRANSKO AKTIVNOST
CITOLITIČNEGA PROTEINA OSTREOLIZINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja GRUNDNER

**VPLIV LIZOFOSFOLIPIDOV, MAŠČOBNIH KISLIN IN
SLADKORJEV NA MEMBRANSKO AKTIVNOST CITOLITIČNEGA
PROTEINA OSTREOLIZINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF LYSOPHOSPHOLIPIDS, FATTY ACIDS AND SUGARS ON THE
MEMBRANE ACTIVITY OF THE CYTOLYTIC PROTEIN OSTREOLYSIN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za Biokemijo Oddelka za Biologijo Biotehniške Fakultete.

Študijska komisija univerzitetnega študija biologije je dne 16.2.2007 za mentorico naloge imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, univ. dipl. biol. in za recenzenta prof. dr. Petra Mačka, univ. dipl. biol.

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčič, univ. dipl. biol.

Recenzent: prof. dr. Peter Maček, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom Turk, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina Sepčič, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter Maček, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tisku na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 22.05.2009

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

MAJA GRUNDNER

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn
- DK 577.1: 579.23: 582.28 (043.2)= 163.6
- KG ostreolizin / *Pleurotus ostreatus* / sladkorji / lizofosfatidilholin / maščobne kisline / soli kovin / test hemolize eritrocitov / test permeabilizacije veziklov
- AV GRUNDNER, Maja
- SA SEPČIĆ, Kristina (mentorica) / MAČEK, Peter (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2009
- IN VPLIV LIZOFOSFOLIPIDOV, MAŠČOBNIH KISLIN IN SLADKORJEV NA MEMBRANSKO AKTIVNOST CITOLITIČNEGA PROTEINA OSTREOLIZINA
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XII, 66 str., 7 pregl., 24 sl., 4 pril., 7 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI Ostreolizin (Oly) je 15 kDa velik protein iz užitne gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). V membranah evkariontskih celic in lipidnih veziklih, narejenih iz celokupnih membranskih lipidov, tvori 4 nm velike pore. V gobi ima najverjetneje vlogo v regulaciji razvoja, za mnoge organizme pa je lahko ob prekomernem zaužitju toksičen. Do sedaj je znanih že nekaj primerov zastupitve pri ljudeh z bukovimi ostrigarji. Oly se specifično veže na membranske domene v tekoči urejeni fazi, ki so bogate s holesterolom. Znano je, da nekateri lizofosfolipidi, maščobne kisline in HgCl₂ inhibirajo hemolitično in permeabilizacijsko aktivnost Oly. V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv nekaterih lizofosfolipidov, maščobnih kislin, sladkorjev in soli kovin na citolitično aktivnost Oly. Ugotovili smo, da lizofosfatidilholin, stearinska in oleinska kislina, vsi testirani sladkorji (glukoza, manoza, arabinoza, manitol, saharoza, laktoza, sorboza, riboza, *N*-acetilneuraminska kislina, *N*-glikolilneuraminska kislina) razen fruktoze in galaktoze in vse soli kovin (CaCl₂, CoCl₂, HgCl₂, NiCl₂, ZnCl₂, LaCl₃) zavirajo delovanje Oly. Poleg tega smo ugotovili, da je inhibitorni vpliv dodanih snovi odvisen od temperature, pri kateri smo izvajali poskus.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- ND Dn
- DC 577.1: 579.23: 582.28 (043.2)= 163.6
- CX ostreolysin / *Pleurotus ostreatus* / sugars / lysophosphatidylcholine / fatty acids / metal salts / hemolytic assay / vesicle permeabilization assay
- AU GRUNDNER, Maja
- AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor) / MAČEK, Peter (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI EFFECT OF LYSOPHOSPHOLIPIDS, FATTY ACIDS AND SUGARS ON THE MEMBRANE ACTIVITY OF THE CYTOLYTIC PROTEIN OSTREOLYSIN
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 66 p., 7 tab., 24 fig., 4 ann., 7 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB Ostreolysin (Oly) is a 15 kDa cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. It forms 4 nm pores in eukaryotic cell membranes and lipid vesicles, reconstituted from total membrane lipids. Oly can be toxic after ingestion of large quantities of fresh mushrooms and some adverse effects have been recorded even in humans. It is suggested to have a role in the developmental cycle of the mushroom. Oly interacts specifically with cholesterol-enriched membrane domains, characterized by the liquid-ordered state, and forms pores inducing lysis of the cell. It has been reported that some lysophospholipids, fatty acids and HgCl₂ inhibit its hemolytic activity. In this thesis, we assessed the effects of some lysophospholipids, fatty acids, sugars and metal salts on the cytolytic activity of Oly. We observed that lysophosphatidylcholine, stearic and oleic acid, all tested sugars (glucose, manose, arabinose, manitol, sucrose, lactose, sorbose, ribose, *N*-acetylneuraminic acid, *N*-glycolylneuraminic acid) except fructose and galactose, and all tested metal salts (CaCl₂, CoCl₂, HgCl₂, NiCl₂, ZnCl₂) exert an inhibitory effect on Oly activity. Our results have also shown that inhibitory effects of tested chemicals depend on the temperature.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BUKOV OSTRIGAR	2
2.2 BIOLOŠKE MEMBRANE	2
2.2.1 Splošno	2
2.2.2 Lipidni rafti	3
2.2.2.1 Holesterol in lipidni rafti	4
2.2.2.2 Sfingolipidi v lipidnih raftih	5
2.2.2.3 Vloga raftov	5
2.3 OSTREOLIZIN	5
2.3.1 Splošno	5
2.3.2 Vloga ostreolizina v bukovem ostrigarju	6
2.3.3 Strukturne, molekularne in biokemijske značilnosti ostreolizina	7
2.3.4 Izolacija ostreolizina iz bukovega ostrigarja	7
2.3.5 Ostreolizin kot citolizin	8
2.3.6 Interakcija ostreolizina z lipidnimi membranami	9
2.3.6.1 Vezava ostreolizina na membrane	9
2.3.6.2 Tvorba pore	9
2.3.6.3 Pomen holesterola za vezavo ostreolizina in tvorbo pore	10
2.3.6.4 Procesi, vključeni v vezavo ostreolizina na membrano in v tvorbo pore	10
2.3.6.5 Vpliv pH na delovanje ostreolizina	11
2.3.7 Delovanje ostreolizina na različne celice	12
2.3.8 Inhibicija hemolitične aktivnosti ostreolizina	12
2.3.9 Toksični in letalni vplivi ostreolizina na organizme	13
2.3.10 Potencialna uporaba ostreolizina v medicini in biotehnologiji	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Kemikalije	15
3.1.2 Raztopine	16
3.1.3 Laboratorijska oprema	16

3.2 METODE	17
3.2.1 Izolacija lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov	17
3.2.2 Izolacija lipidnega ekstrakta eritrocitov različnih živalskih vrst	17
3.2.3 Določitev količine holesterola in sfingomielina v multilamelarnih veziklih iz eritrocitnih lipidov različnih živalskih vrst	18
3.2.4 Tvorba liposomov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov	19
3.2.5 Tvorba liposomov iz lipidnega ekstrakta eritrocitov različnih živalskih vrst	19
3.2.6 Tvorba liposomov iz čistega holesterola in sfingomielina	19
3.2.7 Tvorba majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola	20
3.2.8 Merjenje inhibicije hemolize	20
3.2.9 Vpliv sladkorjev na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	20
3.2.10 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	21
3.2.11 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	22
3.2.12 Medsebojni vpliv lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	22
3.2.13 Vpliv soli različnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	23
3.2.14 Vpliv EDTA in soli različnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	23
3.2.15 Merjenje fluorescence	23
3.2.16 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom	24
3.2.17 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom	25
3.2.18 Protibakterijski test	25

4 REZULTATI	26
4.1 DOLOČITEV KOLIČINE HOLESTEROLA IN SFINGOMIELINA V MULTILAMELARNIH VEZIKLIH IZ ERITROCITNIH LIPIDOV RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST	26
4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST OSTREOLIZINA NA ERITROCITE RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST	26
4.3 VPLIV SLADKORJEV NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV	27
4.3 VPLIV LIZOFOSFATIDILHOLINA NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV	29
4.4 VPLIV MAŠČOBNIH KISLIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV	31
4.5 MEDSEBOJNI VPLIV LIZOFOSFATIDILHOLINA IN MAŠČOBNIH KISLIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV	36
4.6 VPLIV SOLI RAZLIČNIH KOVIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV	37
4.7 VPLIV EDTA IN SOLI DVOVALENTNIH KOVIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV	39
4.8 VPLIV LIZOFOSFATIDILHOLINA NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO PERMEABILIZACIJO MAJHNIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV (IZ SFINGOMIELINA IN HOLESTEROLA TER IZ LIPIDNEGA EKSTRAKTA GOVEJIH ERITROCITOV) S KALCEINOM	41
4.9 VPLIV MAŠČOBNIH KISLIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO PERMEABILIZACIJO MAJHNIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV (IZ SFINGOMIELINA IN HOLESTEROLA TER IZ LIPIDNEGA EKSTRAKTA GOVEJIH ERITROCITOV) S KALCEINOM	44
4.10 PROTIBAKTERIJSKI TEST	48
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1 UVOD	49
5.2 ANALIZA REZULTATOV	49
5.2.1 Hemolitična aktivnost ostreolizina na eritrocite različnih živalskih vrst	49

5.2.2 Vpliv sladkorjev na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	50
5.2.3 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	51
5.2.4 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	52
5.2.5 Medsebojni vpliv lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	53
5.2.6 Vpliv soli različnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	54
5.2.7 Vpliv EDTA in soli dvovalentnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov	55
5.2.8 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom	55
5.2.9 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom	55
5.2.10 Primerjava rezultatov vplivov lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom	56
5.2.11 Primerjava rezultatov testov inhibicije hemolize in testov permeabilizacije majhnih unilamelarnih veziklov ob prisotnosti lizofosfatidilholina in maščobnih kislin	56
5.2.12 Protibakterijski test	57
5.3 SKLEPI	57
6 POVZETEK	59
7 VIRI	60
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1.	Molarno in masno razmerje med holesterolom in holinom (sfingomielin in fosfatidilholin) v eritrocitnih membranah različnih živali.	26
Preglednica 2.	Končne koncentracije sladkorjev, ki povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina.....	28
Preglednica 3.	Inhibicija hemolitične aktivnosti ostreolizina ob dodatku različnih sladkorjev s končno koncentracijo 100 mM	29
Preglednica 4.	Prikaz koncentracij različnih snovi, ki povzročijo 50% zmanjšanje delovanja ostreolizina.....	37
Preglednica 5.	Končne koncentracije soli kovin, ki povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina.	39
Preglednica 6.	Primerjava inhibitornih koncentracij HgCl ₂ in ZnCl ₂ ob in brez dodanega EDTA.....	41
Preglednica 7.	Aktivnost ostreolizina ob in brez dodatka lizofosfatidilholina in maščobnih kislin pri različnih temperaturah, izražena v odstotkih.....	47

KAZALO SLIK

Slika 1.	Vpliv različnih koncentracij ostreolizina na hemolizo eritrocitov iz različnih živalskih vrst	27
Slika 2.	Vpliv različnih sladkorjev na hemolitično aktivnost ostreolizina.....	28
Slika 3.	Vpliv različnih koncentracij lizofosfatidilholina na hemolitično aktivnost ostreolizina pri 4°C, 25°C in 37°C.....	30
Slika 4.	Koncentracije lizofosfatidilholina, ki pri različnih temperaturah povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina.....	30
Slika 5.	Primerjava hemolitične aktivnosti lizofosfatidilholina in ostreolizina ob prisotnosti lizofosfatidilholina pri 25°C.....	31
Slika 6.	Vpliv različnih koncentracij oleinske kisline na hemolitično aktivnost ostreolizina pri različnih temperaturah.....	32
Slika 7.	Koncentracije oleinske kisline, ki pri različnih temperaturah povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina	32
Slika 8.	Primerjava hemolitične aktivnosti oleinske kisline in ostreolizina ob prisotnosti oleinske kisline pri 4°C..	33
Slika 9.	Primerjava hemolitične aktivnosti oleinske kisline in ostreolizina ob prisotnosti oleinske kisline pri 37°C..	34
Slika 10.	Vpliv različnih koncentracij stearinske kisline na hemolitično aktivnost ostreolizina pri različnih temperaturah.....	35
Slika 11.	Koncentracije stearinske kisline, ki pri različnih temperaturah povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina.....	36
Slika 12.	Medsebojni vpliv lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina pri 25°C.....	37
Slika 13.	Vpliv različnih soli kovin na hemolizo, povzročeno z ostreolizinom... ..	38
Slika 14.	Vpliv HgCl ₂ in HgCl ₂ v kombinaciji z EDTA na hemolizo, povzročeno z ostreolizinom.	40
Slika 15.	Vpliv ZnCl ₂ in ZnCl ₂ v kombinaciji z EDTA na hemolizo, povzročeno z ostreolizinom.	40

Slika 16.	Vpliv temperature na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol).....	42
Slika 17.	Vpliv temperature na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov.	43
Slika 18.	Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol) pri različnih temperaturah.	43
Slika 19.	Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov pri različnih temperaturah.....	44
Slika 20.	Vpliv oleinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol) pri različnih temperaturah.	45
Slika 21.	Vpliv oleinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov pri različnih temperaturah.....	45
Slika 22.	Vpliv stearinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol) pri različnih temperaturah.	46
Slika 23.	Vpliv stearinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov pri različnih temperaturah.....	46
Slika 24.	Protibakterijska aktivnost ostreolizina in ampicilina	48

SEZNAM OKRAJŠAV

BHT	butiliran hidroksitoluen
Hol	holesterol
DPPC	dipalmitoil-fosfatidilholin
DRM	na detergent odporna membrana (ang. detergent-resistant membrane)
DSM	v detergentu topna membrana (ang. detergent-soluble membrane)
FTIR	po Fourieru transformirana infrardeča spektroskopija
LD	letalna doza
L _d	tekoča neurejena faza (ang. liquid disordered state)
L _o	tekoča urejena faza (ang. liquid ordered state)
LP	lizofosfolipidi
LPC	lizofosfatidilholin
LPI	lizofosfatidilinozitol
LPPC	1-palmitoil-2-hidroksil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
LUV	veliki unilamelarni vezikli (ang. large unilamellar vesicles)
MLV	multilamelarni vezikli (ang. multilamellar vesicles)
OA	oleinska kislina
Oly	ostreolizin
S _o	gel faza (ang. solid ordered state)
SA	stearinska kislina
SM	sfingomielin
SUV	majhni unilamelarni vezikli (ang. small unilamellar vesicles)
T _m	temperatura prehoda

1 UVOD

Ostreolizin (Oly) je citolitični protein gobe bukov ostrigar, *Pleurotus ostreatus*, ki nastaja v fazi razvoja primordijev in plodišč. V gobi nima vloge toksina, ampak je najverjetneje pomemben kot celični signalizator. Za organizme, ki pa pojedjo preveč termično neobdelane gobe, je lahko Oly strupen.

Izolirali so ga leta 2002 iz vodnega ekstrakta bukovega ostrigarja in mu opredelili osnovne fizikalne in biokemijske lastnosti. Oly je 15 kDa velik protein, ki vsebuje 50% β -strukture, 20% α -heliksov in 30% naključne strukture. Poznano je aminokislinsko zaporedje Oly, ki kaže podobnost s primarnim zaporedjem Asp-hemolizina iz plesni *Aspergillus fumigatus*, proteinov iz bakterije *Clostridium bifermentans*, egerolizina iz gobe *Agrocybe aegerita* in zaporedji približno trideset ostalih proteinov, ki so bodisi izolirani ali napovedani iz cDNA sekvenc različnih gob, bakterij in rastlin. Podobnosti Oly z naštetimi proteini se kažejo v podobnih fizikalnih in biokemijskih lastnostih in v podobnih bioloških učinkih.

Oly se veže na biološke membrane in sicer na lipidne domene, ki so bogate s sfingomielinom (SM) in holesterolom (Hol), in tvori 4 nm velike transmembranske pore. Take lipidne domene imenujemo lipidni rafti in v zadnjih letih so zelo pomemben objekt raziskav, ker so pomembni pri signalizaciji, transportu različnih ligandov ter kot vezavna mesta za različne ligande. Oly se veže tudi na vezikle iz SM in Hol, pri čemer je nujnih vsaj 30 molarnih % Hol, ter na vezikle iz celokupnega ekstrakta lipidov iz eritrocitov.

Delovanje Oly je odvisno od temperature in pH, poleg tega pa nekatere snovi tudi zavirajo njegovo aktivnost. Do sedaj so jih odkrili že nekaj, in to so lizofosfolipidi (LP), $ZnCl_2$ in nekatere maščobne kisline. Delovanje sorodnega proteina eringolizina iz gobe *Pleurotus eryngii* je inhibirano z nekaterimi sladkorji.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti inhibitorni vpliv nekaterih sladkorjev, lizofosfatidilholina (LPC), stearinske (SA) in oleinske kisline (OA) in nekaterih soli kovin na citolitično aktivnost Oly.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BUKOV OSTRIGAR

Bukov ostrigar, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.Ex.Fr.) Kumm., spada v rod ostrigarjev (*Pleurotus*), družino Lentinaceae, red lističarji (Agaricales), razred prostotrosnice (Basidiomycetes), deblo Basidiomycota in kraljestvo gliv (Fungi) (Božac, 1995). Samo ime izvira iz grške besede »pleuro«, kar pomeni nastajati lateralno, ter iz besede »ostreatus«, kar pomeni po obliki in barvi podoben lupini školjke ostrige (Berne, 2004).

Bukov ostrigar je pomemben v prehrabeni industriji, saj je za šampinjoni in šitaki na tretjem mestu po količini vzgojenih gob (Kües in Liu, 2000). Pomemben je predvsem zato, ker vsebuje veliko proteinov, vlaknin, mineralov, vitaminov ter malo maščob, ogljikovih hidratov in natrija (Hammond, 1980). Zaželen je tudi zaradi prijetnega, janežu podobnega vonja, sladkega okusa in nezahtevne vzgoje (Wainwright, 1992). Gobe iz rodu ostrigarjev so znane po velikem številu ligninolitičnih encimov (Giardina in sod., 2000), zato so zelo pomembne v lesni in papirni industriji pri razgradnji lesa (Berne, 2004).

V zadnjem času so v različnih delih sveta zasledili že nekaj zastrupitev zaradi zaužitja prevelike količine bukovih ostrigarjev. Izkazalo se je, da je pri tem ključen citolitični protein ostreolizin. To je spodbudilo številne raziskave tega proteina, predvsem na področju biokemije, medicine in biotehnologije (Rebolj, 2009).

2.2 BIOLOŠKE MEMBRANE

2.2.1 Splošno

Biološke membrane, med katere štejemo plazmalemo in membrane notranjih celičnih struktur, so vključene v številne življenjsko pomembne procese. Kljub temu da opravljajo tako različne funkcije, imajo biološke membrane enako osnovno strukturo. Sestavljene so iz dvojnega sloja lipidnih molekul, v katerem se prosto gibljejo proteinske molekule. Prevladujoči lipidi bioloških membran so glicerofosfolipidi, sfingolipidi in steroli. Na

zunanji strani plazmaleme so na lipide in proteine vezani še sladkorji, ki tvorijo t.i. celični glikokaliks (Rebolj, 2009).

Značilnost plazemske membrane živalskih celic je, da se lipidna sestava v zunanjem in notranjem monosloju razlikuje. Zunanji monosloj je bogat s fosfatidilholinom (PC) in SM, notranji pa z glicerofosfolipidoma fosfatidiletanolaminom in fosfatidilserinom (Op den Kamp, 1979).

Leta 1972 sta Singer in Nicolson opisala membrano kot tekoči mozaik, po katerem se lipidi in proteini prosto gibljejo v različnih smereh. Kmalu za tem so opazili, da tekoči mozaik ni homogeno zgrajen, temveč da v njem obstajajo domene z različno zgradbo in lastnostmi. To je bil temelj za razvoj hipoteze o membranskih domenah, posebno hipoteze o lipidnih raftih (Pike, 2004).

2.2.2 Lipidni rafti

Membranske domene, ki vsebujejo tako Hol kot sfingolipide se imenujejo lipidni rafti oziroma kaveole v primeru, ko so povezane z integralnim membranskim proteinom kaveolinom (Simons in Ikonen, 1997). Majhni rafti se lahko na osnovi interakcij protein-protein ali protein-lipid združijo v večje, stabilne domene (Pike, 2004).

Membranske domene so sprva opazovali le na zunanji strani plazmaleme, potem pa so jih odkrili tudi v membranah znotraj celičnih organelov ter na citoplazemski strani plazmaleme (Pike, 2004).

Odgovor na vprašanje: »Zakaj se sfingolipidi in Hol medsebojno povezujejo in urejajo v specifične membranske domene?« nam lahko nudi biokemijska struktura membranskih lipidov (Brown in London, 1998). Hol v membrani zapolni prostor okoli acilnih verig in jih uredi. Povezava med Hol in SM je prednostna, ker popolnoma nasičena veriga SM s celotno dolžino interagira s sterolnimi obroči, poleg tega pa se verjetno tvori vodikova vez med 3 β -hidroksilno skupino Hol in ceramidom SM (Ohvo-Rekila in sod., 2002). Maščobno-kislinske verige sfingolipidov (SM in glikosfingolipidi) so v bioloških

membranah različno dolge in v primerjavi z glicerofosfolipidi (PC, fosfatidilserinom in fosfatidiletanolaminom) v večini veliko bolj nasičene. Glicerofosfolipidi, kot je PC, so bogati z nenasičenimi maščobnimi kislinami s C-C dvojnimi vezmi v *cis* konformaciji. Dvojne C-C vezi v *cis* konformaciji povzročijo prelom verige, kar oslabi tesno povezavo med lipidnimi verigami. Glicerofosfolipidi imajo tako bolj mobilne hidrofobne verige kot sfingolipidi. Ker mobilnost hidrofobnega lipidnega sidra v apolarnem delu membrane spreminja sposobnost urejanja lipidnih molekul je energija, potrebna za ločitev dveh sosednjih sfingolipidnih molekul, značilno večja kot za ločitev glicerofosfolipidov (Fantini in sod., 2002). Zaradi njihove višje temperature prehoda (T_m), ima Hol višjo afiniteto do sfingolipidov kot do glicerofosfolipidov (Rietveld in Simons, 1998).

V membrani se lipidi urejajo v različne faze z naraščajočo urejenostjo: tekočo kristalino ali tekočo neurejeno fazo (ang. liquid disordered- L_d), tekočo urejeno (ang. liquid ordered- L_o) in trdno urejeno ali gel fazo (ang. solid ordered- S_o). Domene v S_o fazi imajo več lipidov z visoko T_m . Pod T_m je difuzija lipidnih molekul počasna. Matriks membrane predstavlja L_d fazo, rafti pa L_o fazo, kjer so lipidi tesno pakirani med seboj v urejena področja, hkrati pa imajo hitro lateralno difuzijo, sicer značilno za tekočo neurejeno fazo (London, 2002). L_o domene so odporne na vpliv detergentov in netopne v mrzlem detergentu Triton X-100, zato jim pravimo tudi na detergent odporne membrane (ang. detergent resistant membrane - DRM). Nasprotje le-teh so v detergentu topne membrane (ang. detergent soluble membrane - DSM) (Gandhavadi in sod., 2002). Zadnje raziskave kažejo, da velikosti, strukture, sestave ali samega obstoja raftov ne moremo pripisati samo DRM-jem, ker lahko nastanek urejenih domen sprožijo tudi sami detergenti (Lichtenberg in sod., 2005).

Rafti so večinoma majhni (15 do 30 molekul SM in Hol) in nestabilni; življenjski čas je krajši od 1 ms, a predstavljajo veliko površino membrane. So zelo dinamične strukture, ki se neprestano spreminjajo, zlivajo in premikajo po membrani (Fantini in sod., 2002).

2.2.2.1 Holesterol in lipidni rafti

Holesterol je za tvorbo domen nujen, vendar konfiguracija sterolne molekule za zmožnost tvorbe rafta ni pomembna. Pomembna je le njegova generalna struktura (Pike, 2004).

Študije so pokazale, da pomanjkanje vsebnosti Hol v celicah poruši lipidne rafte in povzroči izpust sestavin rafta v plazemsko membrano (Pike in Miller, 1998). Niso pa vsi rafti enako občutljivi na pomanjkanje oziroma zmanjšanje vsebnosti Hol (Hansen in sod., 2001). To kaže, da potrebujejo nekateri rafti za vzdrževanje integritete manjšo količino Hol kot drugi, ali da nekateri ob globalnem upadanju količine Hol zadržujejo Hol bolj učinkovito. Heterogenost raftov je tako posledica njihove odvisnosti od ali interakcije s Hol (Pike, 2004).

2.2.2.2 Sfingolipidi v lipidnih raftih

Sfingolipidi so za razliko od Hol, ki je prisoten enakomerno na obeh straneh membrane, razporejeni preferenčno na njeni zunanji strani v razmerju 6:1 (Edidin, 2003). Posledično so sfingolipidi pomembni za določanje lastnosti raftov na zunanji strani membrane. Čeprav so rafti dvoslojne strukture, zagotavlja asimetrična porazdelitev sfingolipidov različno kompozicijo rafta na obeh straneh. Te razlike verjetno vplivajo na različne interakcije s proteini na obeh straneh (Pike, 2004).

2.2.2.3 Vloga raftov

Lipidni rafti so vključeni v signalizacijske dogodke, intracelularni transport proteinov (vključno z bakterijskimi toksini) in lipidov. Predstavljajo preferenčna mesta za interakcije med gostiteljem in patogenom/toksinom, poleg tega pa so kot kaže vključeni v tvorbo patoloških oblik proteinov, povezanih z Alzheimerjevo boleznijo in boleznimi prionov (Fantini in sod., 2002).

2.3 OSTREOLIZIN

2.3.1 Splošno

Leta 2002 je bil iz plodnih teles užitne gobe bukov ostrigar, *Pleurotus ostreatus*, izoliran citolitičen protein ostreolizin (Berne in sod., 2002). Kasneje so raziskovalci izboljšali postopek izolacije proteina in opredelili njegove biokemijske, molekularne ter fizikalno-

kemijske lastnosti. Preučili so mehanizem, s katerim protein tvori pore v membranah in njegovo fiziološko vlogo v bukovem ostrigarju (Berne, 2004).

Sledila so leta raziskav, v katerih so ugotavljali specifičnost vezave Oly na membrane, njegove citolitične in hemolitične učinke ter različne biološke vplive (Berne in sod., 2005; Berne in sod., 2007; Chowdhury in sod., 2008; Maličev in sod., 2007; Rebolj in Sepčič, 2008; Rebolj in sod., 2007; Sepčič in sod., 2003; Sepčič in sod., 2004; Vidic in sod., 2005; Žužek in sod., 2006).

2.3.2 Vloga ostreolizina v bukovem ostrigarju

Užitna goba *Pleurotus ostreatus* ni strupena vrsta in tako se ne zdi verjetno, da bi bili Oly in podobni proteini toksini. Specifična ekspresija Oly in egerolizina v času tvorbe plodišča gobe *Pleurotus ostreatus* (Berne in sod., 2002; Fernandez Espinar in Labarere, 1997; Vidic in sod., 2005), ter ekspresija hemolizinu podobnega proteina iz *Clostridium bifermentans* v stanju sporulacije (Barloy in sod., 1998) nakazujejo, da so ti proteini vključeni v regulacijo razvoja organizma, ki jih proizvaja.

Produkcije Oly v času rasti micelija ne zaznamo, saj se le-ta pojavi v času tvorbe primordija (Berne in sod., 2002). Imunolokalizacija je pokazala, da so proteini skoncentrirani v rastnih regijah bazidiokarpa, posebno v bazidijih in sporah. Ob zorenju plodnih teles pa aktivnost Oly pade - morda zaradi zmanjšane hitrosti transkripcije (Vidic in sod., 2005).

Nedavne raziskave so pokazale, da dodatek Oly na micelij gobe inducira plodenje bukovega ostrigarja in morda tudi drugih gob. Oly z optimalno koncentracijo 10 ng/mm^2 povzroči tvorbo primordija na plošči z micelijem *Pleurotus ostreatus* 10 dni prej kot pa na kontrolni plošči. Še več, Oly je stimuliral pretvorbo micelija v plodna telesca in s tem nastanek večjega števila mladih gob. Zgleda, da je izboljšanje oziroma zvišanje iniciacije plodenja specifično, saj istega učinka ne opazimo s kontrolnim proteinom (goveji serumski albumin) (Berne in sod., 2007).

2.3.3 Strukturne, molekularne in biokemijske značilnosti ostreolizina

Oly je predstavnik egerolizinske družine proteinov. Znano je aminokislinsko zaporedje Oly, ki kaže podobnost s primarno zgradbo Asp-hemolizina iz plesni *Aspergillus fumigatus*, proteinov iz bakterije *Clostridium bifermentans*, egerolizina iz glive *Agrocybe aegerita* in zaporedji približno trideset ostalih proteinov, ki so bodisi izolirani ali napovedani iz cDNA različnih gob, bakterij in rastlin (Berne in sod., 2009). Vseh pet proteinov lahko uvrstimo v isto družino, ki jo opredeljuje podobna primarna struktura, molekulska masa okoli 15 kDa, nizka izoelektrična točka ter verjetno podobna vloga na ravni celice. Molekulska masa Oly je 14957 g/mol (Berne, 2004).

Po Fourieru transformirana infrardeča spektroskopija (FTIR) kaže na to, da je Oly sestavljen iz okoli 50% β -strukture, 20% α -heliksa in 30% naključnih zvitkov (Sepčič in sod., 2003).

Sekvenirana kromosomska DNA je pokazala, da je Oly sestavljen iz 137 aminokislin, med katerimi je 13 pozitivno nabitih (Arg, Lys, HIs), 16 negativno nabitih ostankov (Asp, Glu), visok delež aromatskih ostankov (6 Trp, 4 Tyr, 2 Phe) in 2 cisteinska ostanka (Berne in sod., 2005). 61. in 93. cistein ter triptofanski ostanki (5,27,91,95,102,111) se evolucijsko niso spreminjali, kar kaže na njihove možne strukturne in/ali funkcionalne vloge. Regija ostankov 91-102 vsebuje 3 triptofane in cistein 93. Triptofansko bogate regije so v nekaterih porinih pomembne za začetno pritrditev na membrano. Predvideva se tudi, da so aromatski ostanki skupaj s cisteinskimi vključeni v vezavo sterola na membrano pri od Hol-odvisnih bakterijskih citolizinih (Hong in sod., 2002; Ramachandran in sod., 2002).

2.3.4 Izolacija ostreolizina iz bukovega ostrigarja

Prvi korak pri izolaciji Oly je homogenizacija mladih gob in nato centrifugiranje v 50 mM Tris-HCl pufri, pH 8.6. Nastali supernatant se frakcionirano obarja z amonijevim sulfatom do 65% nasičenja. Precipitat raztopljen v Tris-HCl pufri se nato loči pri 4°C z gelsko filtracijo na gelu Sephadex G-50 medium. Sledita dve ionsko izmenjevalni kromatografiji na anionski Econo High Q koloni (Bio-Rad, ZDA) ter anionski HPLC Resource Q koloni

(Pharmacia, Švedska). Na vseh stopnjah se zbira le frakcije, ki so hemolitično aktivne. Raztopino proteina se nato razsoli in skoncentrira s centrifugiranjem pri 5000 g preko ultrafiltru YM3 (Amicon, ZDA) ter shrani pri -20°C (Berne in sod., 2002).

2.3.5 Ostreolizin kot citolizin

Toksini so strupene snovi naravnega izvora, ki jih lahko delimo glede na izvor na mikrobne toksine (strupi bakterij, gliv, alg), fitotoksine (alkaloidi, glikozidi,...) in na zootoksine (kriptotoksini, krinotoksini, fanerotoksini). Bolj ustrežna pa je delitev toksinov glede na učinke in mehanizme delovanja, in sicer na: citolizine, toksične fosfolipaze, toksične proteine, ki inhibirajo proteinsko sintezo, genotoksine, nevrotoksine, toksine, ki vplivajo na strjevanje krvi in delujejo lokalno in hemoragično, bakterijske enterotoksine, bakterijske endotoksine, toksine, ki delujejo na citoskelet in na toksine, ki imajo drugačno biološko aktivnost od prej omenjenih (Toksinologija...).

Citolizini se med seboj po strukturi in mehanizmu delovanja močno razlikujejo, vsem pa je skupno to, da poškodujejo celično membrano, porušijo nadzor nad prehajanjem snovi in povzročijo smrt celice. Njihov mehanizem delovanja je različen prav zaradi različnih razmerij in porazdelitev gradbenih elementov membran pri različnih celicah, na katere vplivajo. V grobem jih delimo na: citolizine, ki tvorijo pore (porini), citolizine z encimskim delovanjem (fosfolipaze), citolizine z detergentnim delovanjem (saponini) in citolizine z nepojasnenim mehanizmom delovanja (kardiotoksini iz strupa kobre) (Toksinologija...).

V skupino porinov spada Oly iz bukovega ostrigarja. To so toksini, ki tvorijo transmembranske pore, premera od 2 nm (toksini morskih vetrnic) do 15 nm (bakterijski toksini). Tvorba pore poruši normalno propustnost celične membrane; poruši se elektrolitsko ravnotežje in Na^+ ioni vdrejo v celico. Posledično vdre v celico tudi voda, volumen celice se poveča in v membranskem lipidnem dvosloju se pojavijo pore. Liza celice je tako posledica koloidno-osmotskega tipa citolize (Toksinologija...).

2.3.6 Interakcija ostreolizina z lipidnimi membranami

Oly interagira z membranskimi lipidi in tvori 4 nm velike transmembranske pore v membranah evkariontskih celic ter v lipidnih veziklih, pripravljenih iz membranskih lipidov (Sepčič in sod., 2003). Aktiven je že v nanomolarnih koncentracijah (Berne in sod., 2002). Krivulja hemolitične reakcije je sigmoidna z začetno lag fazo, kateri sledi hiter padec absorpcije in nato ustalitev krivulje na vrednosti 0 (Sepčič in sod., 2003).

2.3.6.1 Vezava ostreolizina na membrane

Oly prepozna točno določena membranska območja na površini celic in se selektivno veže na mikrodomene, ki se vsebujejo Hol (Chowdhury in sod., 2008). Za vezavo je nujna prisotnost proste skupine 3β -OH sterola. Vezava in permeabilizacijska aktivnost je modulirana s številom dvojnih vezi, metilacijo steroidnega skeleta in strukturo sterol alkilne verige. Vezava in permeabilizacija sta največji pri veziklih, ki vsebujejo Hol (Rebolj in sod., 2006).

Eksperimenti so pokazali, da:

1. se Oly ne veže na čisti SM ali Hol in se veže samo na SM:Hol membrane, ki vsebujejo več kot 30 mol % Hol (to je koncentracija, nad katero sterol inducira tvorbo L_0 faze).
2. se teoretično maksimalno število lipidnih vezavnih mest veča na zelo medsebojno organiziran način
3. je koncentracijsko odvisen odnos za vezavo Oly na SM/Hol (1/1) monosloj linearen (Rebolj in sod., 2006).

2.3.6.2 Tvorba pore

Maksimalna hitrost permeabilizacije veziklov zelo dobro korelira z maksimalno vezavo Oly na lipidne monosloje. To pomeni, da je za interakcijo z Oly najbolj ugodna površinska organizacija SM in Hol in da so steroidi bolj pomembni pri vezavi kot pa v tvorbi pore (Rebolj in sod., 2006).

Oly permeabilizira tudi vezikle iz eritrocitnih nevtralnih lipidov in fosfolipidov (večinoma Hol in SM). To kaže na pomen specifične s Hol bogate lipidne mikrodomene kot je L_o faza, ki je možno vezavno mesto za Oly, vendar pa to do sedaj še ni bilo potrjeno (Rebolj in Sepčić, 2008).

2.3.6.3 Pomen holesterola za vezavo ostreolizina in tvorbo pore

Preferenčna permeabilizacija in vezava Oly na Hol-vsebujoče membrane sta močno kooperativni v odnosu do koncentracije Hol v membrani. To kaže na pomembnost lateralne distribucije in dostopnosti Hol molekul za vezavo proteina. Pomen Hol za vezavo in permeabilizacijo SM/Hol veziklov je pokazal poskus, pri katerem so ugotovili, da se vezava Oly in njegova permeabilizacijska aktivnost ob 30 in 40 mol % Hol ostro povečata od 0 % na 22 % (vezava) in od 0 % na 90 % (permeabilizacija) (Sepčić in sod., 2004; Rebolj in sod., 2006).

2.3.6.4 Procesi, vključeni v vezavo ostreolizina na membrano in v tvorbo pore

Nekateri celični proteini se morajo razviti iz njihove nativne konformacije, da se lahko prenesejo čez membrano (Prakash in Matouschek, 2004). Njihovo nasprotje pa so proteini, ki tvorijo pore. Ti pod vplivom okoljskega dražljaja spremenijo nativno konformacijo, da lahko tvorijo transmembransko poro iz več proteinskih monomerov (Gouaux, 1997). Poskusi s fluorescenco in FTIR spektroskopijo so pokazali, da se Oly pri vezavi na vezikle iz lipidov iz ovčjih eritrocitnih lipidov strukturno spremeni. Vezava in tvorba pore inducirata spremembe v konformaciji Oly s hkratnim prenosom določenih triptofanskih ostankov v bolj hidrofobno okolje. Take spremembe lahko ustrezajo premiku triptofanskih ostankov v lipidno fazo ali v hidrofobni žep, ki nastane z agregacijo proteinskih molekul. Prenese se proteinski del, najverjetneje α -heliks, vključen skoraj pravokotno v ravnino membrane. Povečanje deleža α -heliksa ob vključitvi v membrano poteka na račun zmanjšanja deleža β -strukture. Pri Oly se torej predlaga, da spada v novo skupino porinov, katerih značilnost je dominantno ogrodje β -strukture, ki ohranja konstantno domeno terciarne strukture, medtem ko polipeptidni elementi, potrebni za penetracijo v membrano, nastanejo z majhnimi lokalnimi konformacijskimi spremembami (Berne in sod., 2005).

Za tvorbo pore je potrebna združitev več proteinskih molekul; pri permeabilizaciji veziklov se poveže 4 ali 6 monomernih enot (Sepčič in sod., 2003). Tudi razmeroma dolga lag faza, kateri sledi hitra hemoliza, nakazuje, da je za tvorbo funkcionalne pore potrebna rast Oly-agregatov na ali v eritrocitni membrani. Tudi pri podobnemu proteinu Asp-hemolizinu so pokazali, da tvori velike agregate na eritrocitih (Ebina in sod., 1985).

2.3.6.5 Vpliv pH na delovanje ostreolizina

Pri 25°C lahko Oly zaradi deprotonacijskega ravnotežja stranskih verig aminokislin zavzame 4 termodinamsko stabilna konformacijska stanja:

- i) denaturirano stanje ob prisotnosti kisline
- ii) stanje razrahljane kroglice
- iii) nativno stanje
- iv) denaturirano stanje ob prisotnosti baze

(Berne in sod., 2005).

Kislo inducirano stanje razrahljane kroglice Oly je karakterizirano s popolno odsotnostjo terciarne strukture in dobro izraženo nativno sekundarno strukturo. Podatki meritev pH in termične denaturacije so pokazali, da je Oly v najbolj termodinamsko stabilni nativni konformaciji v območju pH okoli 8. Pri pH >12 je v denaturiranem stanju, za katerega je značilna izguba terciarne strukture in ostankov sekundarne strukture, kar odgovarja popolni izgubi funkcije proteina (Berne in sod., 2005).

pH vpliva tudi na topnost proteina. V pH območju od 3.6 do 6.5 se pojavi obarjanje proteina, kar je najverjetneje posledica izoelektrične precipitacije (Berne in sod., 2005).

Vezava Oly na membrano multilamelarnih veziklov (ang. multilamellar vesicles- MLV) iz Hol/SM (1:1) je maksimalna pri pH 6-7. Večanje pH inducira tvorbo Oly-dimera, ki ni zmožen vezave na vezikle (Berne in sod., 2005).

Permeabilizacija lipidnih veziklov z Oly pa je največja pri pH okoli 8 (Sepčič in sod., 2003).

2.3.7 Delovanje ostreolizina na različne celice

Oly učinkovito permeabilizira membrane različnih celic. Enako litičen je za človeške, goveje in ovčje eritrocite in rahlo manj za človeške tumorske celične linije (Sepčić in sod., 2003). Pri vseh celicah se pojavi citotoksičnost, sprememba oblike celice in liza. Enake spremembe se pojavijo tudi pri transformiranih celicah, čeprav so le-te 10-krat manj dovzetne za delovanje Oly. To pa zato, ker je v transformiranih celicah količina Hol manjša, posledično je fluidnost membrane večja (Koklič in sod., 2005), kar kaže, da je nižji nivo Hol odgovoren za manjšo aktivnost Oly. Aktivnost Oly regulira tudi koncentracija SM v celični membrani. Tako zasledimo šibko občutljivost za hemolizo z Oly pri eritrocitih podgane in psa z nižjimi koncentracijami SM in hitro lizo pri ovčjih, govejih in prašičjih eritrocitih (Rebolj in Sepčić, 2008).

Sepčić in sod. (2003) so ugotovili, da lahko Oly povzroči lizo hondrocit in osteoblastov. Kostne in hrustančne celice so močno dovzetne za z Oly povzročeno lizo. Izkazalo se je, da je koncentracija Oly, ki po enourni inkubaciji proteina s celicami uniči polovico hondrocit, približno 1 $\mu\text{g/mL}$; ta pa je primerljiva z učinkovitostjo proti eritrocitom.

2.3.8 Inhibicija hemolitične aktivnosti ostreolizina

Interakcija Oly s Hol-bogatimi domenami se lahko zmanjša ali poruši z dodatkom mono- in di-nenasičenega fosfatidilholina (Sepčić in sod., 2004) ali z nadomestitvijo Hol z drugimi naravnimi steroli ali Hol-derivati (Rebolj in sod., 2006).

Inhibicijo membranske aktivnosti povzročijo tudi lizofosfolipidi v koncentracijah, pri katerih sami po sebi niso litični (Sepčić in sod., 2003).

Hemolizo z Oly inhibirajo tudi miristinska, palmitinska in stearinska kislina, ampak le pri okoli 10-krat nižji molarni koncentraciji kot LP. Pri tem dolžina verige maščobne kisline ni pomembna (Sepčić in sod., 2003).

Hemolitično aktivnost inhibira tudi njegova predinkubacija s spranimi eritrocitnimi membranami ali vezikli iz lipidov ovčjih eritrocitov, bukovega ostrigarja ali ovčjih možgan, pri čemer je pomembna prisotnost oz. odsotnost antioksidanta butiliran hidroksitoluen (BHT). Pri ekstraktih, shranjenih z BHT, se opazi podobna inhibicija le pri 50-krat višjih koncentracijah lipidov (Sepčić in sod., 2003).

Hemolizo inhibira tudi 10 μM HgCl_2 , medtem ko jo dodatek 100 μM cisteina obnovi. To kaže na pomen cisteinskih ostankov tako v hemolitični aktivnosti kot v strukturi proteina (Berne in sod., 2002).

2.3.9 Toksični in letalni vplivi ostreolizina na organizme

Gobe rodu *Pleurotus* so zelo pomemben vir hrane v nekaterih delih sveta. Vseeno pa je že bilo opisanih nekaj zastrupitev ob zaužitju prevelikih količin gob tega rodu (Al-Deen in sod., 1987). Sum, da je za to kriv Oly, so potrdili s poskusi na glodalcih. Ugotovili so, da je bil Oly letalen za miši s polovično letalno dozo (LD_{50}) 1170 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ob intravenoznem dodatku Oly v glodalce, je prišlo do začasnega povišanja arterijskega krvnega pritiska, kateremu so sledili strm padec krvnega pritiska, bradikardija in miokardijska ishemija (Žužek in sod., 2006). Hiperkalemija, ki je verjetno posledica z Oly povzročene lize, se je pokazala v obliki ventrikularnih ekstrasistol in je verjetno pomemben faktor pri kardiotoksičnosti proteina. Še več, submikromolarne koncentracije Oly inducirajo koncentracijsko odvisno povečanje pritiska v aorti. To pomeni, da bi ishemija in poškodbe srca zaradi pomanjkanja kisika lahko izvirali iz krčenja žil, povzročene z Oly (Rebolj in sod., 2007). Za ljudi pa gobe iz rodu *Pleurotus* niso nevarne, če so primerno termično obdelane, saj se aktivnost Oly ob visokih temperaturah inaktivira (Berne in sod., 2002).

2.3.10 Potencialna uporaba ostreolizina v medicini in biotehnologiji

Oly ima veliko funkcij, ki bi jih lahko izkoriščali na uporaben način. Sposobnost Oly za stimulacijo začetka plodenja in zvišanja količine mladih gob rodu *Pleurotus* ob dodatku na micelij (Berne in sod., 2007) nakazuje, da bi Oly in njegove genetsko pridobljene

rekombinantne oblike lahko bile pomembne s komercialnega in biotehnološkega vidika gojenja gob (Rebolj in Sepčič, 2008).

Specifična interakcija z membranskimi mikrodomenami, bogatimi s Hol in SM, je tudi ena izmed lastnosti, ki bi jo lahko uporabili v celični biologiji. Veliko raziskav v zadnjih dveh desetletjih je bilo posvečenih lipidnim raftom, še vedno pa obstajajo številna vprašanja glede njihove heterogenosti in življenjske dobe. Trenutne raziskave membranske heterogenosti zahtevajo kombinacijo številnih tehnik za natančen rezultat. Poleg notranjih membranskih markerjev (označevalci), ki so večinoma lipidni analogi ali določene signalne molekule, je možen tudi pristop z uporabo zunanjih markerjev lipidnih raftov (Lagerholm in sod., 2005). V eni celici lahko obstaja več kot ena populacija raftov (Pike, 2004), zato je za dober pogled v funkcije različnih raftnih populacij nujna uporaba različnih markerjev. Markerji, ki poleg same membranske komponente zaznajo tudi membranske nano-skupke, so najbolj uporabni v ta namen. Kot markerji za raftom podobne domene membran se danes uporabljajo naslednji derivati citolizinov: netoksična mutanta lizenina iz črva *Eisenia foetida* (Hullin-Matsuda in Kobayashi, 2007), B podenota koleratoksina iz bakterije *Vibrio cholerae* in netoksični derivat perfringolizina O iz bakterije *Clostridium perfringens* (Chinnapen in sod., 2007). Kot lipidni marker Hol/SM raftov pa bi lahko uporabili tudi Oly, saj specifično prepozna Hol in SM. Poleg tega potrebuje večjo lokalno koncentracijo Hol kot perfringolizin O in višjo stopnjo organiziranosti membrane za učinkovito prepoznavo vezavnega mesta (Rebolj in Sepčič, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Saharoza	Kemika, Hrvaška
Glukoza	Merk, Nemčija
Galaktoza	Mek, Nemčija
Ksilozoza	Kemika, Hrvaška
Fruktoza	Kemika, Hrvaška
Riboza	Merk, Nemčija
Laktoza	Kemika, Hrvaška
Manitol	Kemika, Hrvaška
Sorboza	Kemika, Hrvaška
Rafinoza	Sigma, ZDA
Arabinoza	Kemika, Hrvaška
<i>N</i> -acetilneuraminska kislina	Merk, Nemčija
<i>N</i> -glikolilneuraminska kislina	Merk, Nemčija
CaCl ₂	Kemika, Hrvaška
HgCl ₂	Kemija, Hrvaška
LiCl ₂	Kemika, Hrvaška
CoCl ₂	Mek, Nemčija
ZnCl ₂	Merk, Nemčija
MnCl ₂	Kemika, Hrvaška
NiCl ₂	Kemika, Hrvaška
LaCl ₃	Darilo prof.dr.Roberta Frangeža iz Veterinarske fakultete v Ljubljani
EDTA	Kemika, Hrvaška
Etanol	Merck, Nemčija
Kloroform	Merck, Nemčija
HCl	Merck, Nemčija

Holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
Sfingomielin (iz svinjskih možgan)	Avanti Polar Lipids, ZDA
Lizofosfatidilholin	Avanti Polar Lipids, ZDA
Kalcein	Sigma, ZDA
Mikrotitrne plošče	TPP, Švica
NaCl	Merck, Nemčija
Sephadex G-50 medium	Sigma, ZDA
Tris-HCl	Merck, Nemčija
Triton X-100	Sigma, ZDA
Kemikalije za encimski test	Wako Chemicals GmbH, Nemčija

3.1.2 Rastopine

Eritrocitni pufer	0,13 M NaCl; 0,02 M Tris; pH 7,4
Rastopina kalceina	80 mM; pH 8,0
Tris pufer za vezikle	140 mM NaCl; 20 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0

3.1.3 Laboratorijska oprema

Čitalec mikrotitrskih plošč	MRX, Dynex Technologies, Denkendorf, Nemčija
Sonikator	SONICS Vibra cell ^{T.M.} , Švica
Spektrofluorimeter	Jasco FP-750, ZDA
Centrifuge	Centric 322A, Tehtnica, Slovenija Sigma 3K-30, Nemčija Eppendorf Centrifuge 5415 D, Nemčija
Rotavapor	R-134, Büchi, Švica
Tehtnica	Sartorius laboratory MC 210 P, Nemčija
Vibracijski stresalnik	Vibromix 114 EV, Tehtnica, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov

Štiri srednje velike centrifugirke smo napolnili z govejo eritrocitno usedlino, v vsako po 4 mL, ter s 5-krat razredčenim eritrocitnim pufrom (pH 7.4), v vsako po 10 mL. Centrifugirke smo zamašili in z obračanjem premešali vsebino, da so eritrociti lizirali. Vsebinsko smo centrifugirali 10 minut pri 15000 g ter 4°C in nato s kapalko previdno odstranili supernatant. V centrifugirke smo dodali 10 mL nerazredčenega eritrocitnega pufru in premešali s kapalko. Sediment se je pri tem resuspendiral, tako da smo vsebino ponovno centrifugirali pod istimi pogoji. Postopek smo ponavljali tolikokrat, dokler sediment (eritrocitne membrane) ni postal bele barve. Tako smo odstranili ves hemoglobin. Sedimente smo prenesli v stekleni epruveti, v vsako dodali 10 mL kloroforma in 20 mL metanola ter vsebino 30 sekund mešali na vibracijskem stresalniku. Nato smo dodali še 10 mL kloroforma in ponovno mešali 30 sekund na vibracijskem stresalniku. Na koncu smo dodali še 10 mL deionizirane vode, rotacijsko mešali 30 sekund in zmes centrifugirali 5 minut pri 2500 g in 25 °C. Po končanem centrifugiranju smo iz epruvete s Pasteurjevo pipeto v malo stekleno čašo prenesli spodnjo kloroformno fazo, ki je vsebovala lipide (vodno fazo, ki je vsebovala proteine, ogljikove hidrate, nukleinske kisline in ostale polarne snovi smo zavrgli). Predhodno smo prazno čašo stehali. Čašo s kloroformovo fazo smo posušili z dušikom in stehali količino dobljenih lipidov.

3.2.2 Izolacija lipidnega ekstrakta eritrocitov različnih živalskih vrst

Postopek je enak kot pri 3.2.1, z razliko, da smo lipide izolirali iz eritrocitov žabe, psa, petelina, konja, nekturja in prašiča.

3.2.3 Določitev količine holesterola in sfingomielina v multilamelarnih veziklih iz eritrocitnih lipidov različnih živalskih vrst

Za določitev vsebnosti Hol in SM v veziklih smo naredili encimski test Phospholipids B in Free Cholesterol C v skladu z navodili proizvajalca. Pred samo izvedbo testa smo vzorce (suspencijo veziklov; priprava je opisana v točki 3.2.5.) 5-10 min sonicirali na ledu z 10 s pulzi, jih dali na vodno kopel (30 min, 45°C) in jih nato centrifugirali še 5 min, 3000 g, 25°C. V primeru encimskega testa Phospholipids B smo zmešali 10 µL vzorca ali pufru za vezikle (slepi poskus) ali standarda (3 mg/mL holin klorid) in 300 µL pripravljene encimske raztopine s koncentracijo 1 mg/mL in inkubirali 30 min pri 37°C. Pripravljena encimska raztopina vsebuje fosfolipazo D, holin-oksidozo, peroksidazo v Tris-pufri, fenol in 4-aminoantipirin. Tekom inkubacije fosfolipaza D hidrolizira fosfolipide do prostega holina. Sproščeni holin se potem s holin oksidazo oksidira v betain in pri tem nastane vodikov peroksid. Le-ta oksidativno združi 4-aminoantipirin in fenol, kar se kaže v razvoju rdeče barve. Po inkubaciji smo izmerili absorbcijo (A) rdeče barve pri valovni dolžini 550 nm in izračunali koncentracijo lipidov po formuli 1:

$$[\text{konc. holina}] = (3 \text{ mg/mL}) * (A_{\text{vzorca}} - A_{\text{slepa}}) / (A_{\text{stand.}} - A_{\text{slepa}}) \quad \dots(1)$$

A_{vzorec} pomeni absorbcijo vzorca, A_{standard} absorbcijo standarda in A_{slepa} absorbcijo pufru za vezikle (slepi poskus).

Princip testa Free Cholesterol C je enak kot za test Phospholipids B. Razlika je le v standardu (1 mg/mL Hol) in v sestavi pripravljene encimske raztopine (vsebuje holesterol-oksidozo, peroksidazo v Tris pufri, fenol in 4-aminoantipirin). Med inkubacijo se prosti Hol s holesterol oksidazo oksidira do holestenona. Pri tem se sprosti vodikov peroksid, ki povzroči oksidativno kondenzacijo fenola in 4-aminopirina ob prisotnosti peroksidaze. Razvije se rdeča barva in po inkubaciji smo izmerili absorbcijo le-te pri 550 nm in izračunali koncentracijo lipidov po formuli 2:

$$[\text{konc. holesterola}] = (1 \text{ mg/mL}) * (A_{\text{vzorca}} - A_{\text{slepa}}) / (A_{\text{stand.}} - A_{\text{slepa}}) \quad \dots(2)$$

Preostali del vzorcev smo prepihali z dušikom, oblepili s parafilmom in jih shranili pri 4°C.

3.2.4 Tvorba liposomov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov

Dobljene lipide smo raztopili v 2 mL kloroforma, vsebino prenesli v stekleni bučki ter obe bučki sušili na rotavaporju 3 ure. V tem času je kloroform izparel, ostal je le še lipidni film na steni bučke. V eno bučko smo nato dodali 80 mM raztopino kalceina in nekaj steklenih kroglic in vse skupaj premešali na vibracijskem stresalniku. Dobljene MLV (v končni koncentraciji 5 mg/mL) smo shranili v 1 mL-plastične epruvetke ter jih prepihali z dušikom. V drugo bučko pa smo dodali pufer za vezikle (20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 8) ter nekaj steklenih kroglic in postopek ponovili. Na koncu smo dobljene MLV shranili v 1 mL-plastične epruvetke ter prepihali z dušikom.

3.2.5 Tvorba liposomov iz lipidnega ekstrakta eritrocitov različnih živalskih vrst

Tudi te lipide, dobljene iz postopka opisanega v točki 3.2.2, smo raztopili v 1 mL kloroforma, jih prenesli v steklene bučke in le-te postavili na rotavapor za 3 ure. K posušenem lipidnem filmu smo dodali ustrezno količino pufra za vezikle, steklene kroglice in premešali na vibracijskem stresalniku. Liposome smo prenesli v 1 mL-plastične epruvetke in jih prepihali z dušikom. Tako smo dobili MLV s koncentracijo 5 mg/mL. Postopek smo ponovili iz lipidov vsake živalske vrste.

3.2.6 Tvorba liposomov iz čistega holesterola in sfingomielina

V malo stekleno bučko smo zatehtali 12.9 mg SM in 7.08 mg Hol ter vsebino raztopili v 2 mL kloroforma. Vsebino smo razdelili v 2 stekleni bučki in sušili 3 ure na rotavaporju. Nato smo v eno bučko dodali 1 mL pufra za vezikle (20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 8), steklene kroglice in premešali na vibracijskem stresalniku. Dobili smo MLV iz Hol in SM v molarnem razmerju 1:1, s koncentracijo 10 mg/mL, jih shranili v 1 mL-plastične epruvetke, prepihali z dušikom ter zamrznili pri temperaturi -20°C. V drugo bučko pa smo dodali 1 mL raztopine kalceina, steklene kroglice in premešali na vibracijskem stresalniku.

Dobili smo MLV s kalceinom iz Hol in SM, v molarnem razmerju 1:1, s koncentracijo 10 mg/mL, jih shranili v 1 mL-plastične epruvetke ter prepihali z dušikom.

3.2.7 Tvorba majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola

Dobljene MLV smo sonicirali na sonikatorju. Postopek je trajal 30 minut, z 10 sekundnimi pulzi, epica z vezikli pa je zaradi segrevanja pri postopku inkubirana na ledeni kopeli. Tako dobljene majhne unilamelarne vezikle (ang. small unilamellar vesicles- SUV) smo nekaj minut centrifugirali, da smo oborili delce titana, ki so se med soniciranjem odkrušili iz konice sonikatorja.

3.2.8 Merjenje inhibicije hemolize

Hemolizo smo merili s turbidimetrično metodo (Maček in Lebez, 1981) pri 25°C na mikrotitrskih ploščah z mikročitalcem. Za meritve smo uporabili suspenzijo govejih eritrocitov v eritrocitnem pufri, ki je imela pri 650 nm navidezno absorbcijo 0.5.

Na mikrotitrski ploščici smo k razredčinam sladkorjev, LPC, maščobnih kislin in soli kovin v pufri za vezikle dodali 100 µL eritrocitne suspenzije in na koncu še Oly (v istem pufri). Natančnejši postopki so opisani v sledečih poglavjih. Časovni potek hemolize smo spremljali 20 minut pri 650 nm in ob koncu meritve odčitali čas, potreben za 50% hemolizo (t_{50}). Hitrost hemolize smo izrazili z recipročno vrednostjo časa polovične hemolize ($1/t_{50}$).

3.2.9 Vpliv sladkorjev na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

S pomočjo mikročitalca smo preverili vpliv različnih sladkorjev (glukoza, arabinoza, galaktoza, fruktoza, laktoza, riboza, manitol- alkohol sladkorja, sorboza, ksiloza, ramnoza, rafinoza, saharoza, *N*-acetilneuraminska kislina, *N*-glikolilneuraminska kislina) na delovanje Oly. Za vsak sladkor smo v stekleno čašo zatehtali tolikšno količino sladkorja in toliko eritrocitnega pufra, da smo dobili začetno koncentracijo sladkorja 0,25 mol/L. Nato

smo si pripravili mikrotitrsko ploščico ter naredili dvakratne razredčine sladkorja v eritrocitnem pufru. Volumen raztopine, ki smo ga dodali v vsako luknjico, je bil 80 μL . Za vsak sladkor smo naredili 3 ponovitve (razen pri *N*-glikolilneuraminski kislini, kjer smo naredili dve ponovitvi). V vsako luknjico smo nato dodali 20 μL Oly s končno koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ter mikrotitrsko ploščico pol ure inkubirali pri 25⁰C. V vse luknjice smo dodali 100 μL govejih eritrocitov v eritrocitnem pufru in takoj začeli z meritvijo. Tako smo dobili naslednje končne koncentracije sladkorjev: 100 mM, 50 mM, 25 mM, 12.5 mM, 6.25 mM, 3.125 mM, 1.56 mM, 0.78 mM, 0.39 mM, 0.195 mM, 0.097 mM in 0 mM. Izjemoma smo pri *N*-glikolilneuraminski kislini dobili končne koncentracije: 50 mM, 12.5 mM, 6.25 mM, 3.125 mM, 1.56 mM, 0.78 mM, 0.39 mM, 0.195 mM, 0.097 mM in 0 mM. Po 20-minutni meritvi smo odčitali čas, pri katerem je potekla 50% hemoliza. Kontrolni poskus s sladkorji smo naredili na sledeč način: dvakratnim razredčinam sladkorjev v eritrocitnem pufru smo dodali 20 μL eritrocitnega pufra (namesto Oly) ter postopek ponovili trikrat. Nato smo v vsako luknjico dodali 100 μL eritrocitov v eritrocitnem pufru in začeli z meritvijo. Pri *N*-glikolilneuraminski kislini nismo poznali začetne koncentracije, saj se je ostanek kisline osušil na stenah steklene čaše. Da bi kljub temu lahko opravili poskus, smo v čašo dodali 80 μL eritrocitnega pufra. Tako se je sladkor ponovno raztopil. Nato smo postopek ponovili kot pri *N*-acetilneuraminski kislini. Po 20-minutni meritvi smo odčitali čas, pri katerem je v obeh primerih potekla 50% liza.

3.2.10 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Pripravili smo založno koncentracijo LPC (2 mM) v eritrocitnem pufru. Dvakratne razredčine LPC v eritrocitnem pufru (po 50 μL) smo razporedili v jamice mikrotitrsko plošče. Pred vsakim poskusom smo raztopino LPC še enkrat 5 minut sonicirali. V vsako luknjico smo nato dodali 50 μL Oly s končno koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 100 μL eritrocitov. Celoten poskus smo delali v sobi s temperaturo 25⁰C. Končne koncentracije LPC so bile: 500 μM , 250 μM , 125 μM , 62.5 μM , 31.25 μM , 15.63 μM , 7.81 μM , 3.9 μM , 1.95 μM , 0.98 μM , 0.49 μM in 0 μM . Po 20-minutni meritvi smo odčitali čas, pri katerem je potekla 50% liza. Postopek smo ponovili še pri 4⁰C in 37⁰C. Vsak poskus smo naredili v 3

ponovitvah ter pri vsakem hkrati ugotavljali še vpliv LPC na eritrocite brez Oly, pri čemer smo namesto Oly dodali eritrocitni pufer.

3.2.11 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Pripravili smo založno koncentracijo oleinske (2 mM) (OA) in stearinske kisline (2 mM) v eritrocitnem pufru in nadaljnji postopek ponovili kot pri točki 3.2.10.

3.2.12 Medsebojni vpliv lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Založno koncentracijo LPC (2 mM), OA (2 mM) in SA (2 mM) smo pripravili kot pri poskusih, opisanih v točkah 3.2.10 in 3.2.11. Poskus je podoben kot pri točkah 3.2.10 in 3.2.11, le da nas je zanimal vpliv LPC + SA (molarno razmerje 1:1), vpliv LPC + OA (molarno razmerje 1:1), vpliv OA + SA (molarno razmerje 1:1) ter vpliv LPC + OA + SA (molarno razmerje 1:1:1). Sprva smo vse snovi sonicirali 5 minut z 10-sekundnimi intervali pri 40% amplitudi in sobni temperaturi. Nato smo naredili dvakratne razredčine vseh omenjenih kombinacij v eritrocitnem pufru (po 25 μ L vsake snovi, če smo merili vpliv dveh snovi, in 16.7 μ L vsake, v primeru treh snovi). Nato smo v vsako luknjico smo dodali 100 μ L govejih eritrocitov v eritrocitnem pufru, 50 μ L ostreolizina s končno koncentracijo 1 μ g/mL ter takoj začeli z meritvijo. Tako smo dobili končne koncentracije LPC/SA/OA: 0.25 mM, 0.125 mM, 0.0625 mM, 0.03215 mM, 0.015625 mM, 0.007813 mM, 0.0039063 mM, 0.0019531 mM, 0.0009766 mM, 0.0004883 mM, 0.0002441 mM in 0 mM, če smo ugotavljali vpliv 2 snovi. Če pa smo ugotavljali vpliv vseh treh, pa smo dobili sledeče končne koncentracije: 0.166 mM, 0.083 mM, 0.0415 mM, 0.02075 mM, 0.02075 mM, 0.010375 mM, 0.005188 mM, 0.0025938 mM, 0.0012969 mM, 0.0006484 mM, 0.0003242 mM, 0.0001621 mM in 0 mM. Poskus smo opravljali pri 25°C v treh ponovitvah ter pri vsakem hkrati ugotavljali še vpliv kombinacij snovi na eritrocite brez Oly, pri čemer smo namesto Oly dodali eritrocitni pufer.

3.2.13 Vpliv soli različnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Založno koncentracijo CaCl_2 , CoCl_2 , HgCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 (200 mM) in LaCl_3 (20 mM) smo pripravili v eritrocitnem pufru kot pri točki 3.2.10. Poskus je potekal enako kot pri točki 3.2.10. Tako smo dobili končne koncentracije soli različnih kovin: 50 mM, 25 mM, 12.5 mM, 6.25 mM, 3.125 mM, 1.5625 mM, 0.78125 mM, 0.390625 mM, 0.195313 mM, 0.09765625 mM, 0.048828125 mM in 0 mM. Končne koncentracije so bile drugačne le pri HgCl_2 in LaCl_3 . Pri HgCl_2 so bile: 0.048828 mM, 0.024414 mM, 0.012207 mM, 0.006104 mM, 0.003052 mM, 0.001526 mM, 0.000763 mM, 0.000381 mM, 0.000191 mM, 0.000095367 mM, 0.000047683 mM in 0 mM, pri LaCl_3 pa: 5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM, 0.63 mM, 0.31 mM, 0.16 mM, 0.08 mM, 0.04 mM, 0.02 mM, 0.01 mM in 0 mM. Končna koncentracija Oly je bila pri vseh poskusih 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, razen pri LaCl_3 , kjer je bila 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pri vsakem poskusu smo hkrati ugotavljali še vpliv soli kovin na eritrocite brez Oly, pri čemer smo namesto Oly dodali eritrocitni pufer.

3.2.14 Vpliv EDTA in soli različnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Založno koncentracijo HgCl_2 in ZnCl_2 (200 mM) smo pripravili kot pri točki 3.2.13. Nato smo v vsako luknjico nato dodali 100 μL govejih eritrocitov v eritrocitnem pufru, 10 μL EDTA (s končno koncentracijo 5 mM) in 50 μL Oly s končno koncentracijo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ter takoj začeli z meritvijo. Tako smo dobili končne koncentracije soli dvovalentnih kovin: 48 mM, 24 mM, 12 mM, 6 mM, 3 mM, 1.5 mM, 0.75 mM, 0.375 mM, 0.1875 mM, 0.09375 mM, 0.046875 mM in 0 mM. Po 20-minutni meritvi smo odčitali čas, pri katerem je potekla 50% liza. Poskus smo opravljali pri 25°C in v treh ponovitvah. Poleg tega smo opravili tudi poskus vpliva EDTA na eritrocite.

3.2.15 Merjenje fluorescence

Meritve fluorescence smo opravili na spektrofluorimetru v celici, termostairani na določeno temperaturo, z magnetnim mešalom. Uporabili smo kvarčno kiveto širine 1 cm,

širini rež za ekscitacijo in emisijo pa sta bili 5 nm. Valovna dolžina ekscitacije je bila 485 nm, valovna dolžina emisije pa 535 nm. Aktivnost Oly smo izrazili z odstotkom sproščenega kalceina.

3.2.16 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom

Za ugotavljanje količine sproščenega kalceina iz SUV smo poskuse opravljali na spektrofluorimetru. Za meritev sproščanja kalceina iz SUV smo morali dobljene SUV s kalceinom ločiti od preostale raztopine in sicer s filtracijo na gelu Sephadex G-50. V kiveto z magnetom smo dali 1 mL pufru za vezikle, 3 μ L SUV s kalceinom in pričeli z meritvijo. Po približno 250 sekundah, ko se je krivulja umirila, smo dodali 2 μ L LPC ter čez par sekund še 60 μ L ostreolizina. Ko se je naraščanje krivulje ustavilo, smo dodali detergent Triton X-100, ki je razgradil še ne razgrajene vezikle. Iz krivulje smo odčitali minimalno, maksimalno fluorescence in fluorescence Tritona X-100, ter s pomočjo formule 3 izračunali odstotek sproščenega kalceina. Vsak poskus smo ponovili trikrat pri treh različnih temperaturah: 25°C, 37°C in 4°C.

$$\% \text{ sproščanja} = (F_{max} - F_{min}) / (F_t - F_{min}) * 100 \quad \dots(3)$$

F_{min} predstavlja najnižjo izmerjeno vrednost fluorescence pred dodatkom Oly, F_{max} najvišjo izmerjeno vrednost fluorescence po dodatku Oly, F_t pa najvišjo izmerjeno vrednost fluorescence po dodatku detergenta Triton X-100.

Koncentracija uporabljenih SUV iz SM in Hol (1:1) je bila 10 mg/mL, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 5 mg/mL.

Končna koncentracija Oly pri SUV iz SM in Hol je bila 55,8 μ g/mL, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 2,49 μ g/mL.

Končna koncentracija LPC pri SUV iz SM in Hol je bila 4×10^{-7} M, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 4×10^{-8} M. Končne koncentracije LPC so bile pri vseh treh temperaturah enake.

Pri vsaki temperaturi smo naredili tudi poskus aktivnosti Oly brez dodatka LPC. Tudi v tem primeru smo naredili 3 ponovitve.

3.2.17 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom

Postopek smo ponovili kot pri točki 3.2.16, le da smo namesto LPC dodali OA oz. SA. Koncentracija uporabljenih SUV iz SM in Hol (1:1) je bila 10 mg/mL, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 5 mg/mL. Končna koncentracija Oly pri SUV iz SM in Hol je bila 55,8 µg/mL, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 2,49 µg/mL.

Končna koncentracija SA pri SUV iz SM in Hol je bila 4×10^{-7} M, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 4×10^{-8} M. Končne koncentracije SA so bile pri vseh treh temperaturah enake.

Končna koncentracija OA pri 4°C pri SUV iz SM in Hol je bila $9,6 \times 10^{-6}$ M, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 2×10^{-8} M. Pri 37°C je bila končna koncentracija OA pri SUV iz SM in Hol $6,8 \times 10^{-6}$ M, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa $7,5 \times 10^{-7}$ M. Pri 25°C pa je bila končna koncentracija OA pri SUV iz SM in Hol $6,8 \times 10^{-6}$ M, pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pa 4×10^{-7} M. Koncentracije OA se pri različnih temperaturah razlikujejo. Le-te smo morali prilagoditi temperaturi, saj je litični vpliv OA odvisen od temperature.

Pri vsaki temperaturi smo naredili tudi poskus aktivnosti Oly brez dodatka maščobne kisline. Tudi v tem primeru smo naredili 3 ponovitve.

3.2.18 Protibakterijski test

Iz površine trdega bakterijskega gojišča, v katerega je bila predhodno umešana suspenzija bakterij *Bacillus subtilis* v končni koncentraciji 5×10^5 , smo s plutovrtom izrezali dve luknji premera 1 cm. V eno smo dodali 100 µL Oly (s koncentracijo 0,8 mg/mL), v drugo pa 100 µL antibiotika ampilicina (s koncentracijo 1 mg/mL). Ploščo smo inkubirali 24 ur pri 37°C in nato preverili rast bakterije, oz. morebitno inhibicijo rasti.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČITEV KOLIČINE HOLESTEROLA IN SFINGOMIELINA V MULTILAMELARNIH VEZIKLIH IZ ERITROCITNIH LIPIDOV RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST

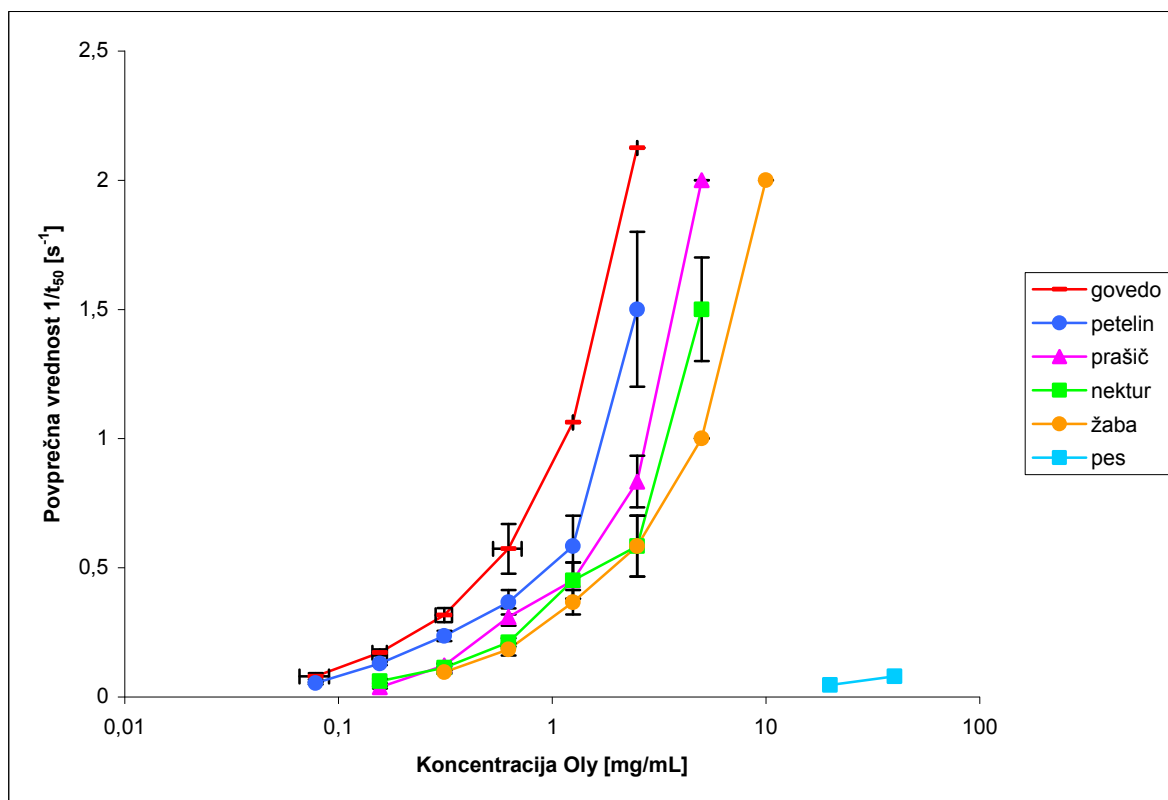
Pri izolaciji lipidov iz eritrocitov različnih živalskih vrst smo zelo velik del le-teh pri postopku sonikacije izgubili. Pri izolaciji lipidov iz eritrocitov prašiča in psa smo izgubili vse, zato razmerij med Hol in holinom (SM + PC) nismo mogli izračunati. Preglednica 1 prikazuje rezultate razmerij pri različnih živalih. Dokaj enakomerno masno razmerje med Hol in holinom smo dobili pri vseh organizmih, z izjemo petelina in nekturja, kjer pa je bilo razmerje zelo v prid holinu.

Preglednica 1. Molarno in masno razmerje med holesterolom in holinom (sfingomielin in fosfatidilholin) v eritrocitnih membranah različnih živali.

Vrsta organizma	Molarno razmerje Hol:holin [%]	Masno razmerje Hol:holin [%]
prašič	/	/
petelin	12.8 : 87.2	7.5 : 92.5
konj	49.5 : 50.5	35.0 : 65.0
pes	/	/
žaba	58.6 : 41.4	43.75 : 56.25
nektur	7.4 : 92.6	4.2 : 95.8
govedo	48.2 : 51.8	34.2 : 65.8

4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST OSTREOLIZINA NA ERITROCITE RAZLIČNIH ŽIVALSKIH VRST

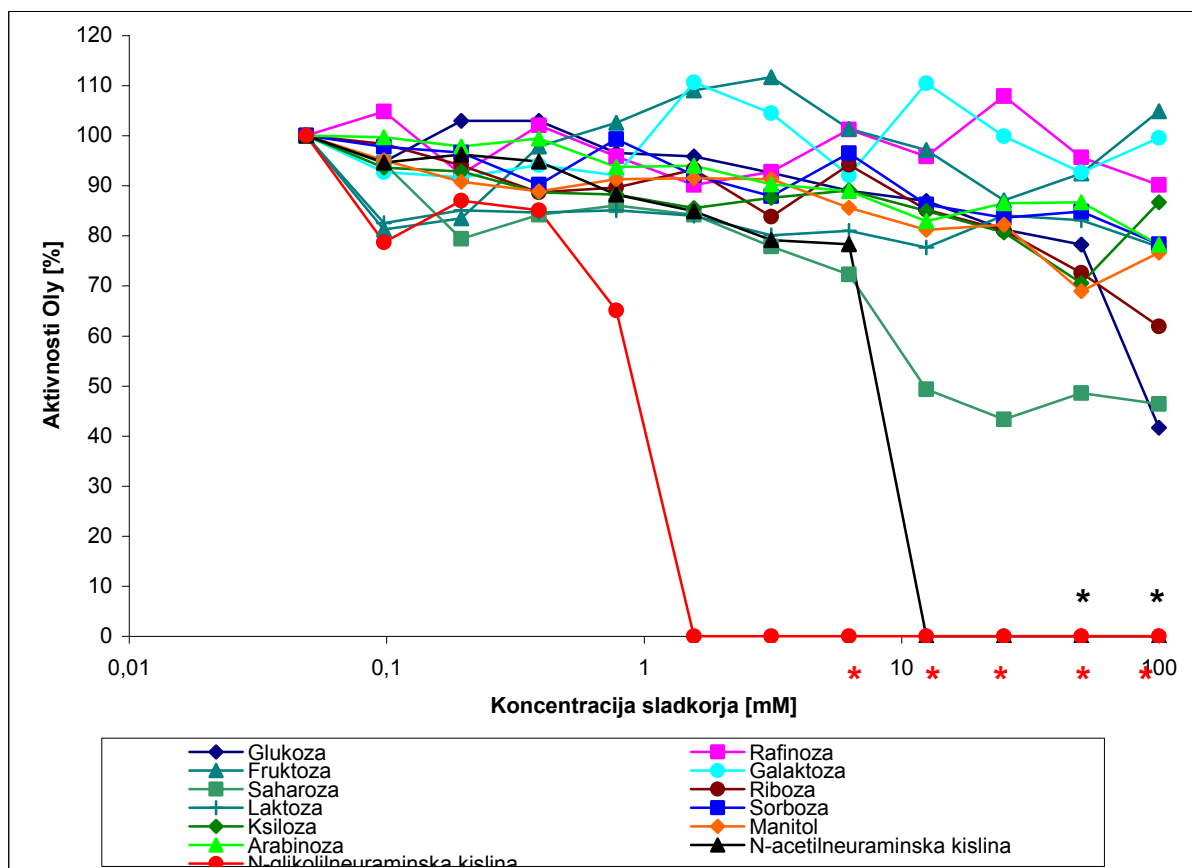
Poskusi so pokazali, da je hemolitična aktivnost Oly največja pri eritrocitih goveda in petelina, daleč najmanjša pa pri veziklih iz eritrocitov psa (slika 1).



Slika 1. Vpliv različnih koncentracij ostreolizina na hemolizo eritrocitov iz različnih živalskih vrst. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka v primerih, ko je bila manjša od 5% ni prikazana.

4.3 VPLIV SLADKORJEV NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV

Različni sladkorji različno vplivajo na aktivnost Oly. Daleč največjo inhibicijo Oly povzročata *N*-acetilneuraminska in *N*-glikolilneuraminska kislina, manj pa saharoza in glukoza. Ostali sladkorji večjega inhibitornega vpliva na aktivnost Oly nimajo, z izjemo fruktoze in galaktoze, ki pa sploh ne inhibirata Oly (slika 2) (preglednica 3).



Slika 2. Vpliv različnih sladkorjev na hemolitično aktivnost ostreolizina. Z zvezdico je označena koncentracija sladkorja, ki sama lizira eritrocite (črno obarvana označuje *N*-acetilneuraminsko kislino, rdeča pa *N*-glikolilneuraminsko kislino). Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

Različna je tudi koncentracija sladkorja, ki povzroči 50% inhibicijo aktivnosti Oly. Najbolj aktivna je *N*-glikolilneuraminska kislina, saj že pri končni koncentraciji 0.96 mM povzroči zmanjšanje aktivnosti Oly na 50% (preglednica 2).

Preglednica 2. Končne koncentracije sladkorjev, ki povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina.

Sladkorji	Končna koncentracija sladkorja, ki za 50% zmanjša aktivnost Oly [mM]
Glukoza	89.3
Saharoza	12.5
<i>N</i> -acetilneuraminska kislina	8.6
<i>N</i> -glikolilneuraminska kislina	0.96

N-acetilneuraminska kislina povzroči približno 100% zmanjšanje aktivnosti Oly pri koncentracijah 12,5 mM in 25 mM, *N*-glikolilneuraminska kislina pa pri 3,1 mM in 1,6 mM. Pri višjih koncentracijah sta oba sladkorja litična sama po sebi (slika 2).

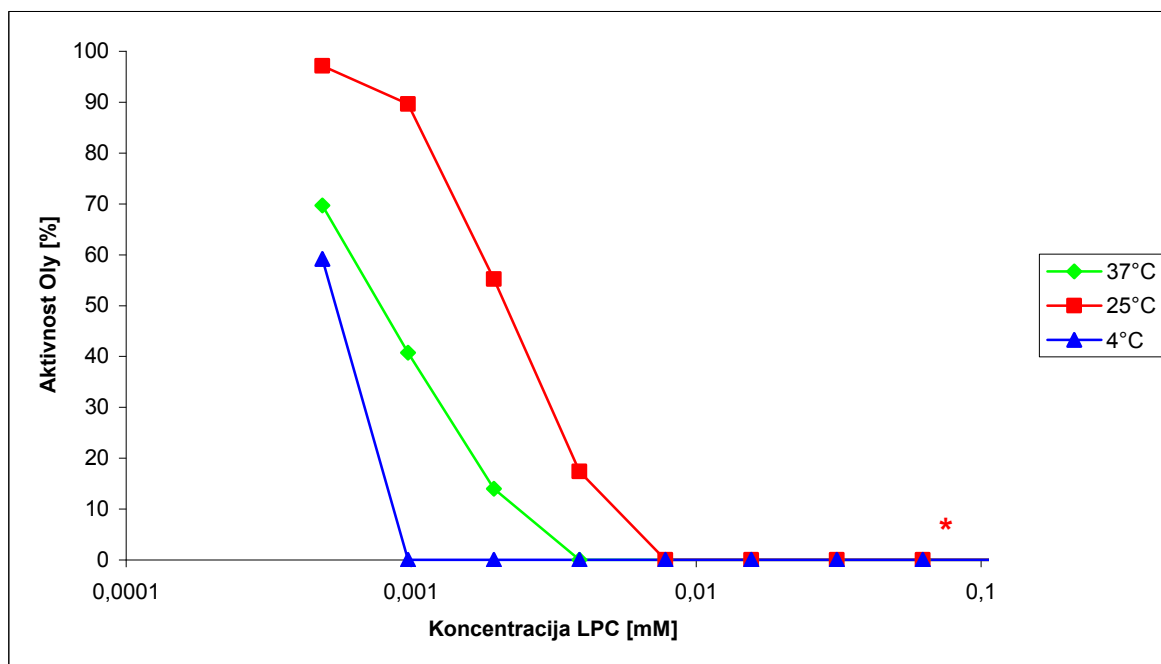
Odstotek zmanjšanja aktivnosti Oly po dodatku sladkorja s končno koncentracijo 100 mM je pri različnih sladkorjih različen. Najvišjo inhibicijo povzroči glukoza, ki za kar 58.4% zmanjša aktivnost Oly, sledi saharoza s 53.6%, in ostali sladkorji z manjšimi vplivi (preglednica 3).

Preglednica 3. Inhibicija hemolitične aktivnosti ostreolizina ob dodatku različnih sladkorjev s končno koncentracijo 100 mM. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

Sladkor	Odstotek zmanjšanja učinkovitosti Oly po dodatku sladkorja s končno koncentracijo 100 mM [%]
Glukoza	58.4
Rafinoza	9.9
Fruktoza	0
Galaktoza	0
Saharoza	53.6
Riboza	38.1
Laktoza	22.2
Sorboza	21.7
Ksiloza	13.3
Manoza	23.4
Arabinoza	21.8

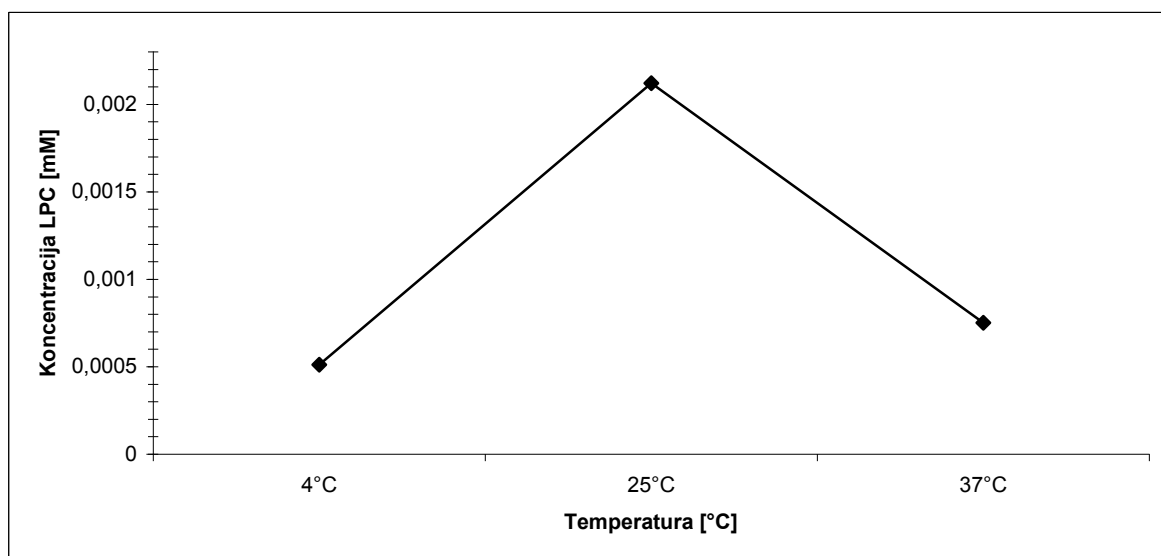
4.3 VPLIV LIZOFOSFATIDILHOLINA NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV

LPC inhibira aktivnost Oly pri lizi eritrocitov. Rezultati so pokazali, da je največja inhibicija dosežena pri 4°C, nato pri 37°C in najmanjša pri 25°C (slika 3).



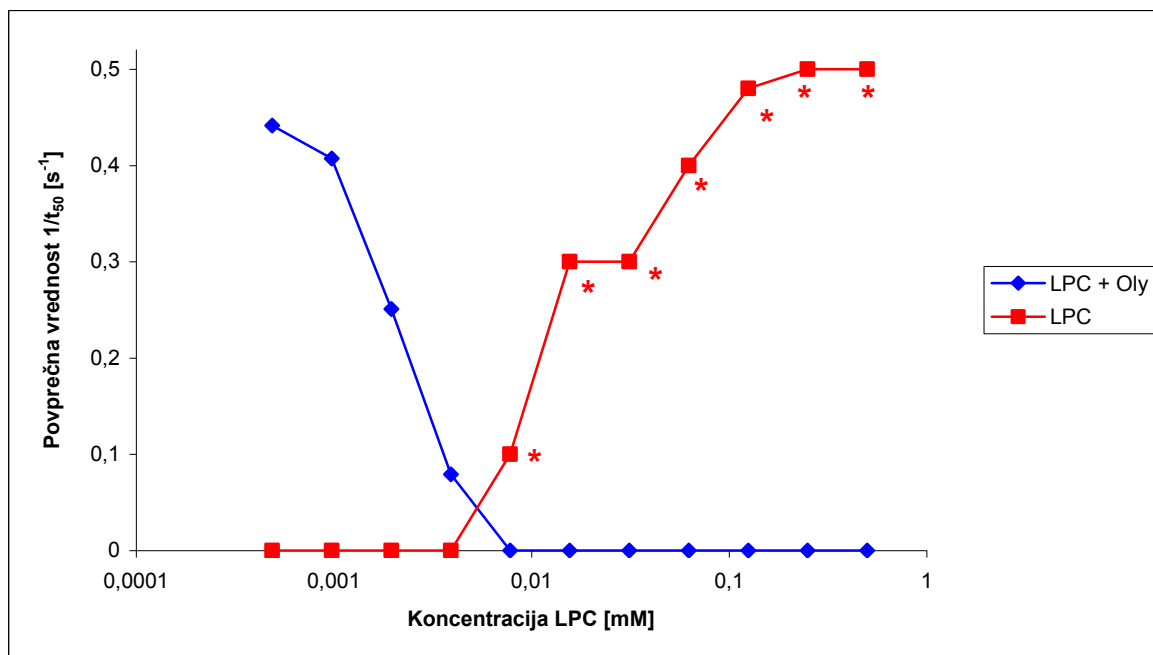
Slika 3. Vpliv različnih koncentracij lizofosfatidilholina na hemolitično aktivnost ostreolizina pri 4°C, 25°C in 37°C. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Zvezdica pomeni, da so nadaljnje vrednosti tudi 0. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

Koncentracija LPC, ki povzroči 50% zmanjšanje aktivnosti Oly, je odvisna od temperature raztopine. Največja koncentracija LPC, potrebna za 50% zmanjšanje aktivnosti Oly, je pri 25°C, manjša pri 37°C in najmanjša pri 4°C (slika 4).



Slika 4. Koncentracije lizofosfatidilholina, ki pri različnih temperaturah povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

LPC v koncentracijah nad 0,0039063 mM povzroča lizo eritrocitov pri 25°C (slika 5). Podoben vpliv ima tudi pri ostalih dveh temperaturah, le da pri 4°C in 37°C lizira tudi že pri koncentracijah nad 0,0019531 mM (ni prikazano).

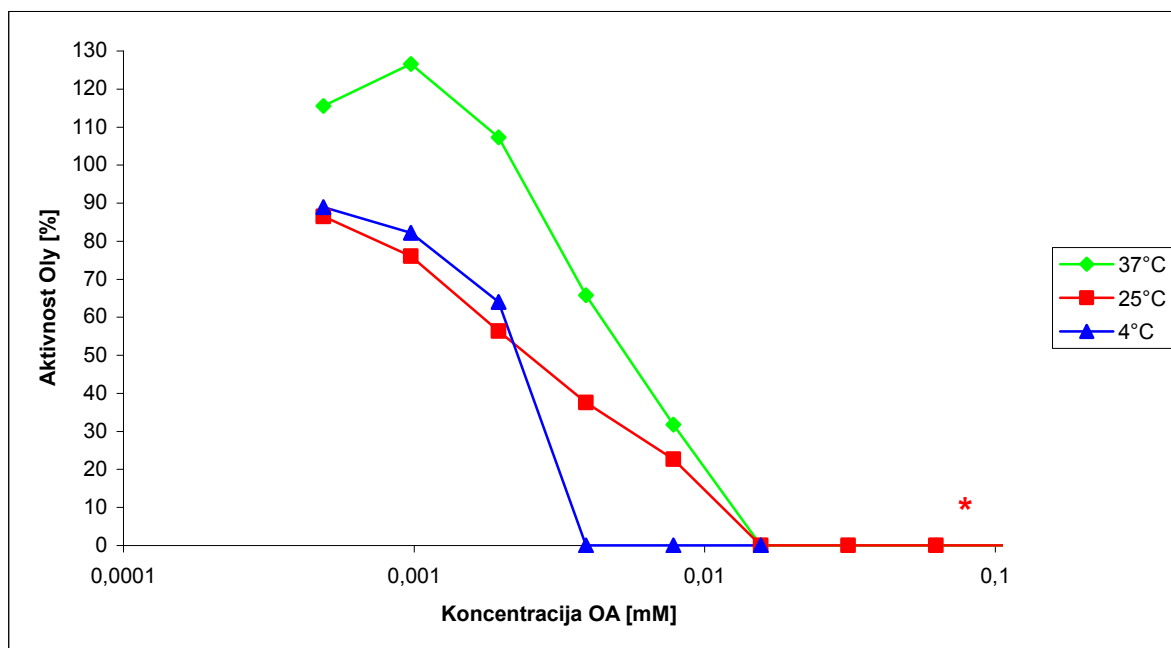


Slika 5. Primerjava hemolitične aktivnosti lizofosfatidilholina in ostreolizina ob prisotnosti lizofosfatidilholina pri 25°C. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Zvezdice označujejo logaritem koncentracij LPC, ki lizirajo eritrocite. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 $\mu\text{g/mL}$.

4.4 VPLIV MAŠČOBNIH KISLIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV

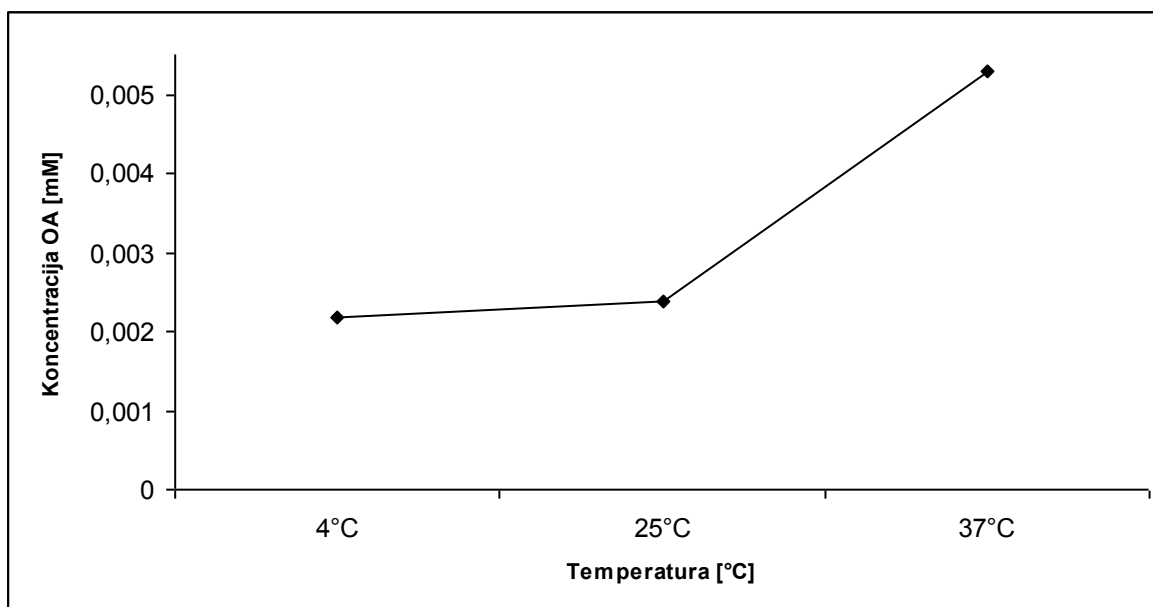
Oleinska in stearinska kislina zavirata hemolitično aktivnost Oly.

OA sprva najbolj inhibira Oly pri 25°C in rahlo manj pri 4°C, pri koncentracijah nad 0,0009766 mM pa se inhibicija najbolj pokaže pri 4°C (slika 6).



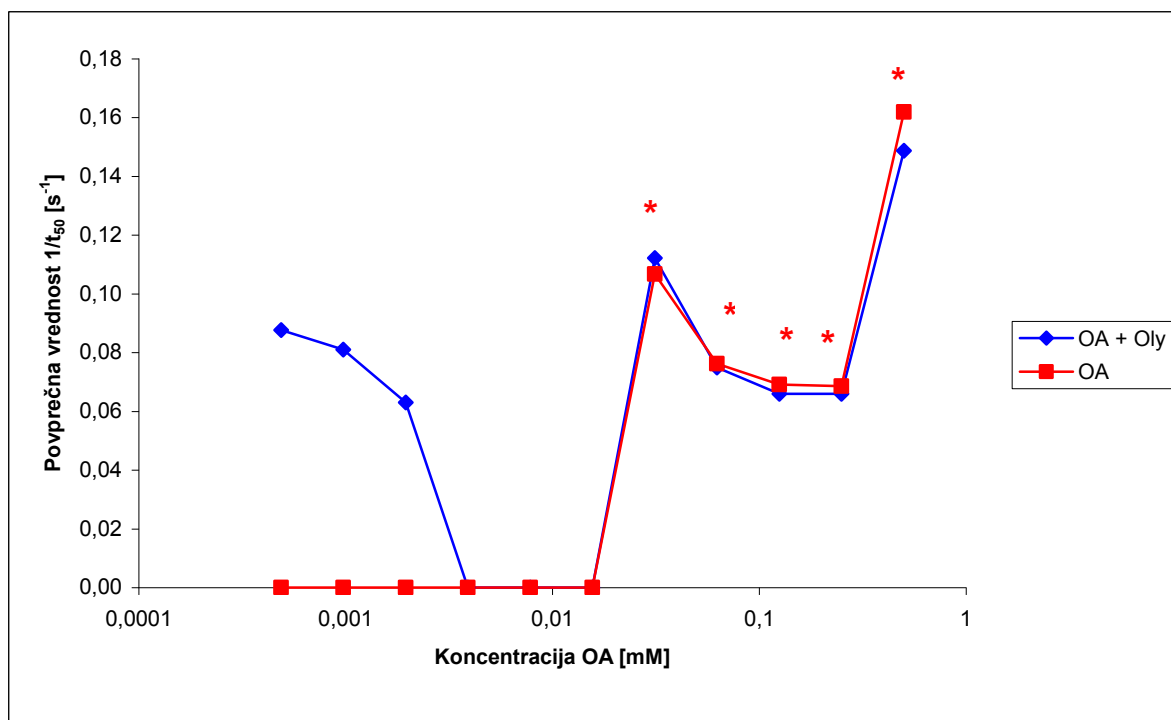
Slika 6. Vpliv različnih koncentracij oleinske kisline na hemolitično aktivnost ostreolizina pri različnih temperaturah. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Zvezdica pomeni, da so nadaljnje vrednosti tudi 0. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 $\mu\text{g/mL}$.

Največja koncentracija OA, potrebna za 50% zmanjšanje aktivnosti Oly je pri 37°C, manjša pri 25°C in najmanjša pri 4°C (slika 7).

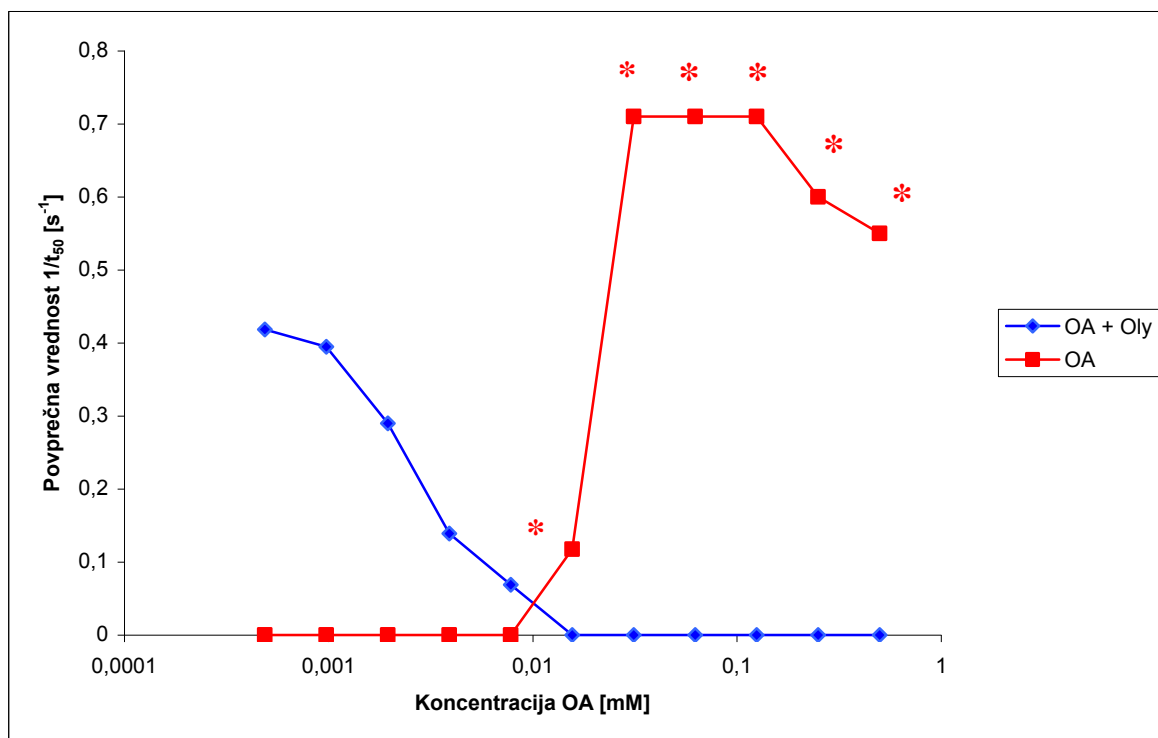


Slika 7. Koncentracije oleinske kisline, ki pri različnih temperaturah povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 $\mu\text{g/mL}$.

OA je tudi litična za eritrocite tako pri 25°C, 37°C kot pri 4°C, pri čemer ima najmanjši učinek pri 4°C (sliki 8 in 9). Litični vpliv pri 25°C je podoben vplivu pri 4°C, zato ni prikazan. Razlika je le v tem, da je pri 25°C OA litična pri koncentracijah nad 0,0078125 mM, pri 4°C pa pri koncentracijah nad 0,015625 mM.

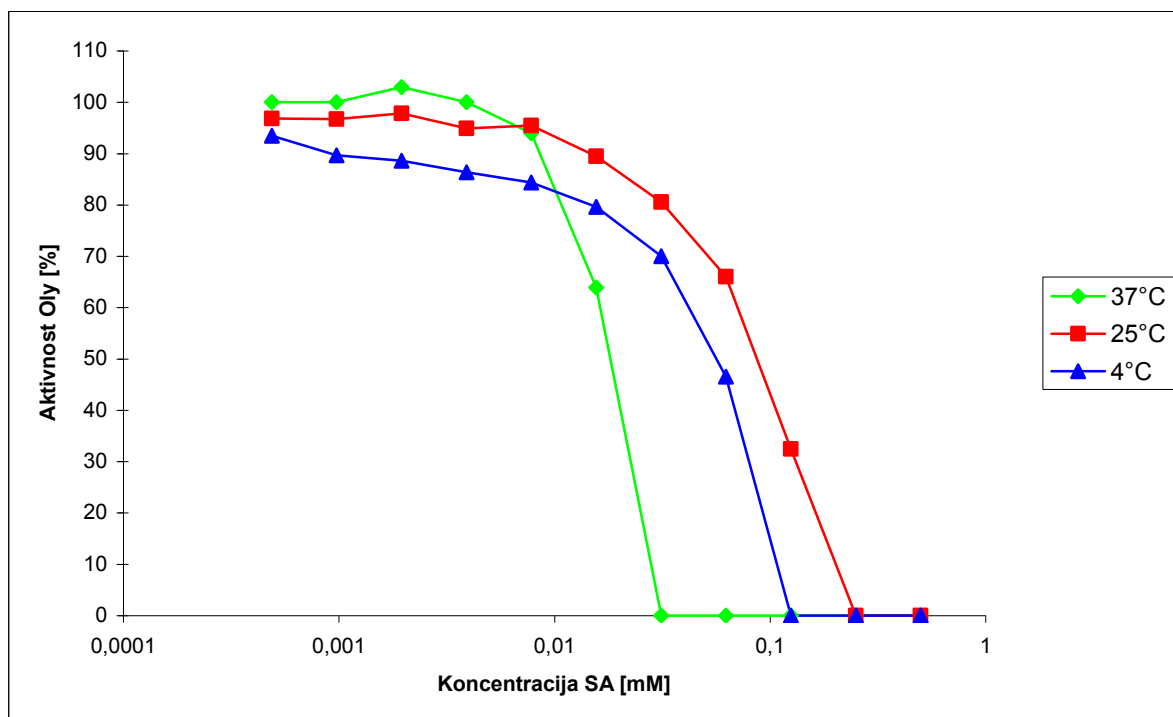


Slika 8. Primerjava hemolitične aktivnosti oleinske kisline in osteolizina ob prisotnosti oleinske kisline pri 4°C. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Zvezdice označujejo logaritem koncentracij OA, ki lizirajo eritrocite. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.



Slika 9. Primerjava hemolitične aktivnosti oleinske kisline in ostreolizina ob prisotnosti oleinske kisline pri 37°C. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Zvezdice označujejo logaritem koncentracij OA, ki lizirajo eritrocite. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

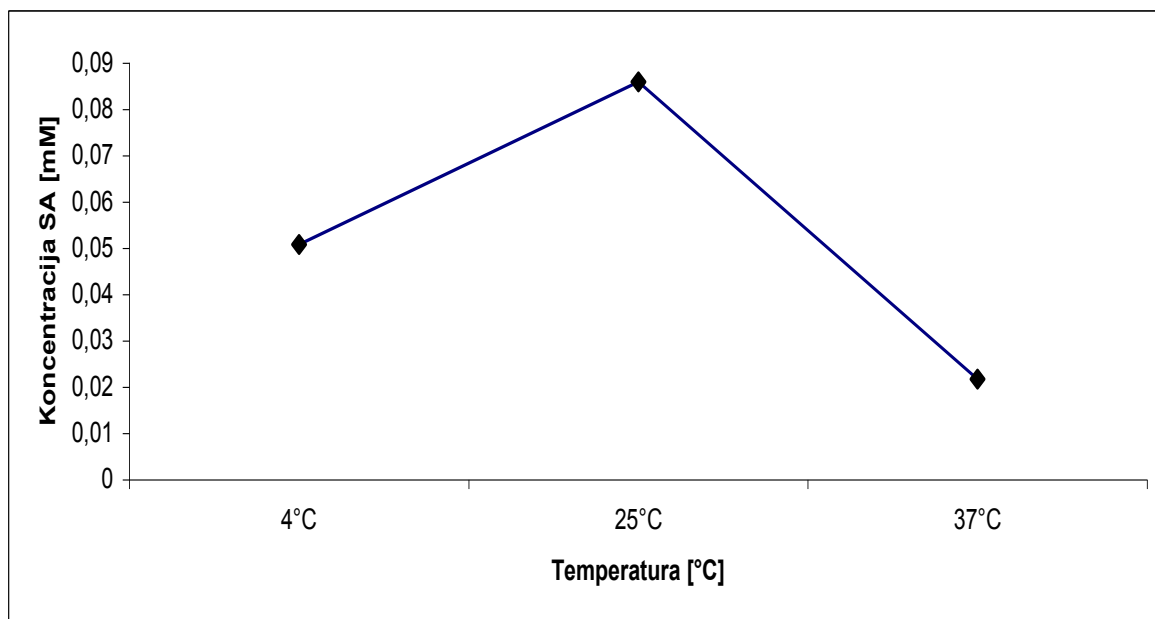
SA sprva najbolj inhibira Oly pri 4°C, pri višjih koncentracijah pa se inhibicija najbolj pokaže pri 37°C (slika 10).



Slika 10. Vpliv različnih koncentracij stearinske kisline na hemolitično aktivnost ostreolizina pri različnih temperaturah. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

Največja koncentracija SA za 50% zmanjšanje aktivnosti Oly je pri 25°C, manjša pri 4°C in najmanjša pri 37°C (slika 11).

SA za eritrocite pri nobeni od treh temperatur ni litična.



Slika 11. Koncentracije stearinske kisline, ki pri različnih temperaturah povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

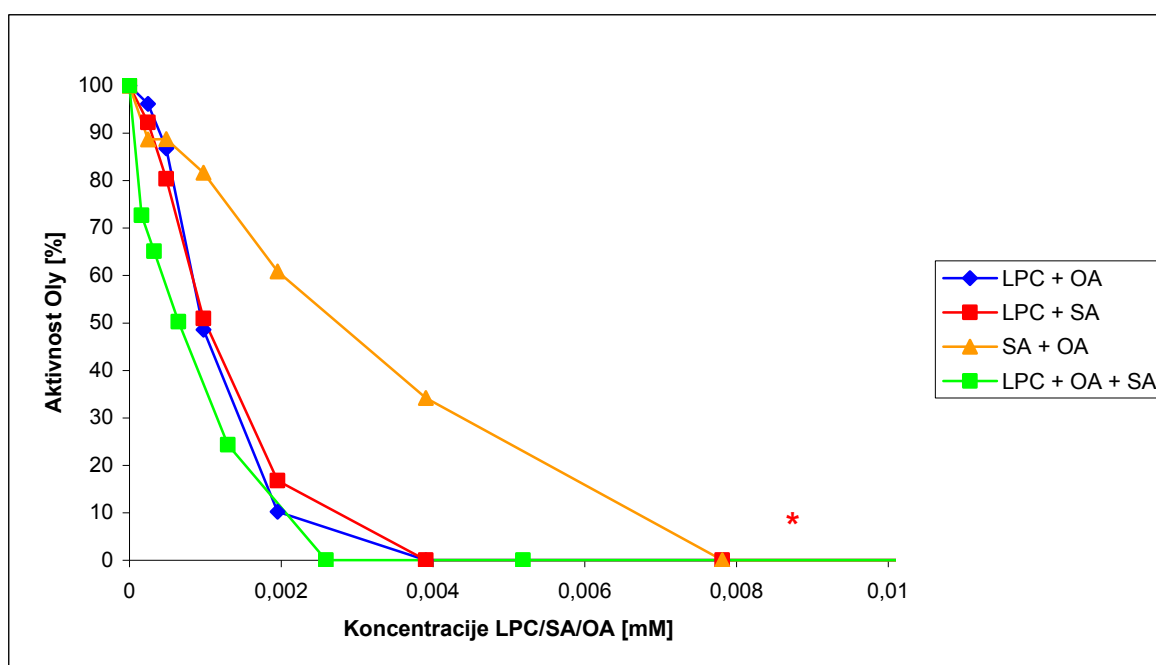
4.5 MEDSEBOJNI VPLIV LIZOFOSFATIDILHOLINA IN MAŠČOBNIH KISLIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV

Tudi kombinacije LPC + SA + OA/ LPC + OA/ LPC+ SA/ OA+ SA zavirajo delovanje Oly pri hemolizi. Največjo inhibicijo hemolize Oly povzročajo LPC, SA in OA skupaj, najmanj pa zavira kombinacija SA + OA (slika 12).

Tudi rezultat o koncentraciji dodane snovi, ki povzroči 50% inhibicijo Oly, priča o jakosti inhibicije. Najmočnejše delovanje Oly zavira kombinacija LPC, OA in SA, saj povzroči 50% manjšo aktivnost Oly pri najnižji koncentraciji (preglednica 4).

Preglednica 4. Prikaz koncentracij različnih snovi, ki povzročijo 50% zmanjšanje delovanja ostreolizina. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

Snov	Koncentracija snovi, ki povzroči 50% zmanjšanje aktivnosti Oly [mM]
LPC + OA	0.00097
LPC + SA	0.001
OA + SA	0.00273
LPC + OA + SA	0.000567



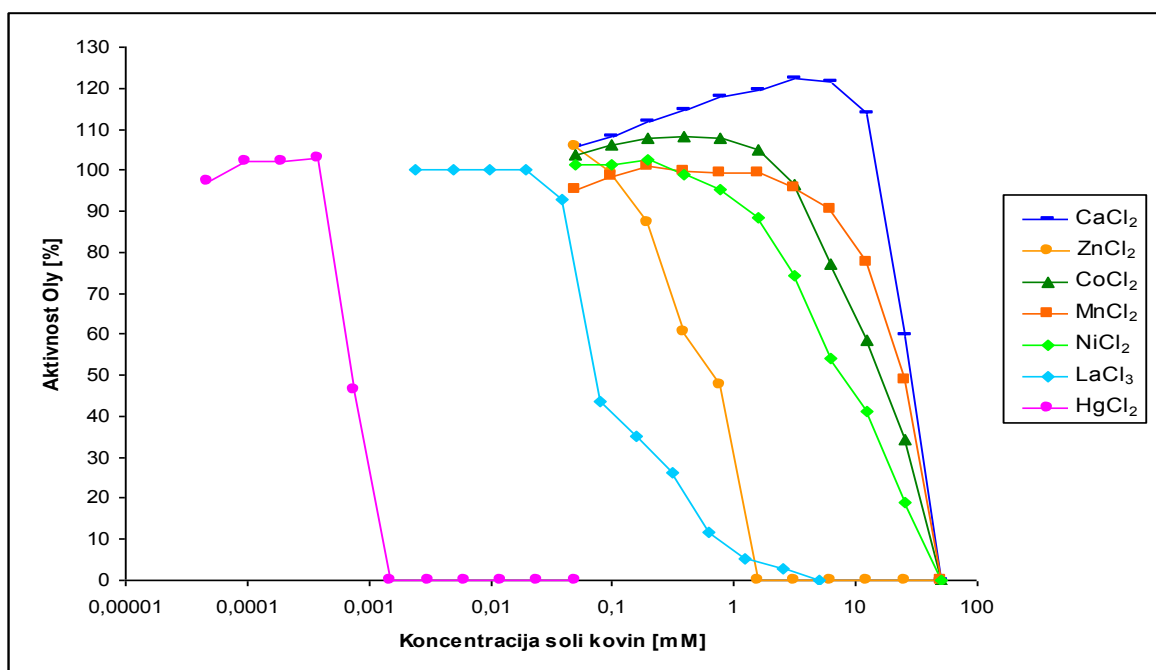
Slika 12. Medsebojni vpliv lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina pri 25°C. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Zvezdica pomeni, da so nadaljnje vrednosti tudi 0. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

4.6 VPLIV SOLI RAZLIČNIH KOVIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV

Preverili smo inhibitorni vpliv sledečih soli kovin: CoCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , ZnCl_2 , HgCl_2 , NiCl_2 in LaCl_3 . Največjo inhibicijo povzroči HgCl_2 , saj pri zelo nizki koncentraciji zavira hemolitično aktivnost Oly. Ostale soli kovin so manj inhibitorne. CaCl_2 pri nizkih

koncentracijah (do 6,25 mM) celo nekoliko aktivira aktivnost Oly, pri višjih koncentracijah pa inhibira (slika 13).

Tudi LaCl_3 ima zelo močan inhibični vpliv na delovanje Oly (slika 13).



Slika 13. Vpliv različnih soli kovin na hemolizo, povzročeno z ostreolizinom. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 $\mu\text{g/mL}$, razen pri poskusu z LaCl_3 , kjer je bila 10 $\mu\text{g/mL}$.

Tudi koncentracija dodane snovi, ki povzroči 50% inhibicijo Oly, je tako najnižja pri HgCl_2 (preglednica 5)

Preglednica 5. Končne koncentracije soli kovin, ki povzročijo 50% inhibicijo hemolitične aktivnosti ostreolizina. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 $\mu\text{g/mL}$, razen pri poskusu z LaCl_3 , kjer je bila 10 $\mu\text{g/mL}$.

Snov	Koncentracija snovi [mM]
HgCl_2	0,00074
CaCl_2	29,6
ZnCl_2	0,74
CoCl_2	17
MnCl_2	24,6
NiCl_2	8,6
LaCl_3	0,075

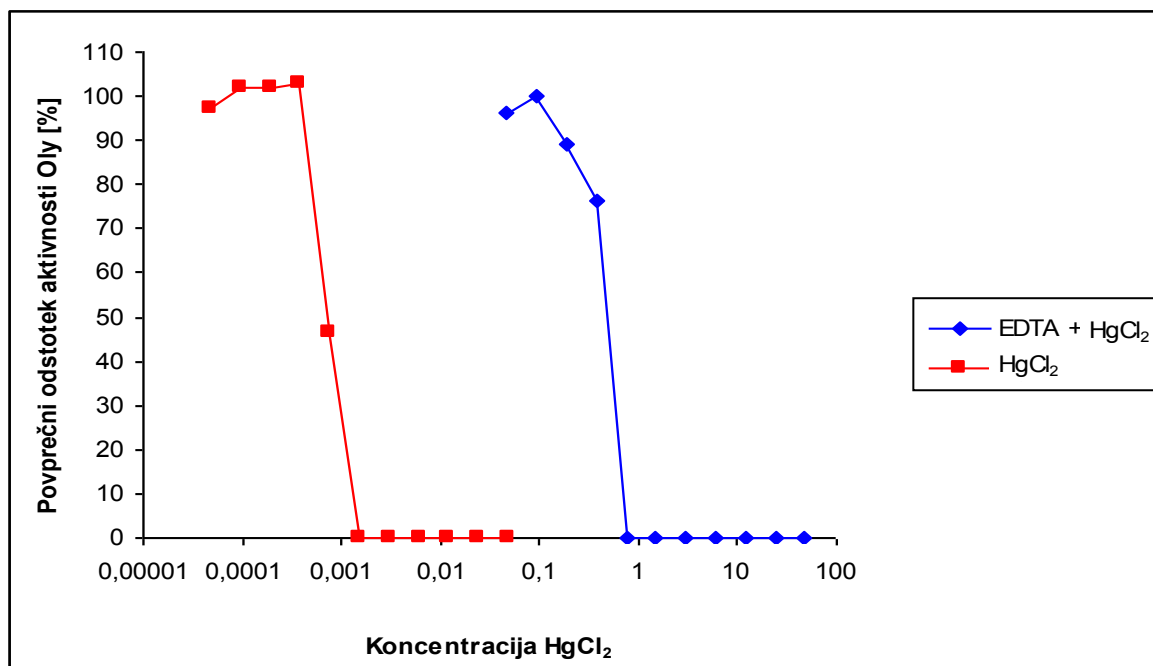
100% inhibicijo Oly povzroči 50 mM koncentracija snovi, razen pri HgCl_2 , kjer je ta koncentracija veliko nižja, saj se popolna inhibicija pojavi že pri 0.001526 mM.

Pri poskusu z LaCl_3 pa je koncentracija za 50% inhibicijo Oly 0.075 mM, za 100% pa 5 mM.

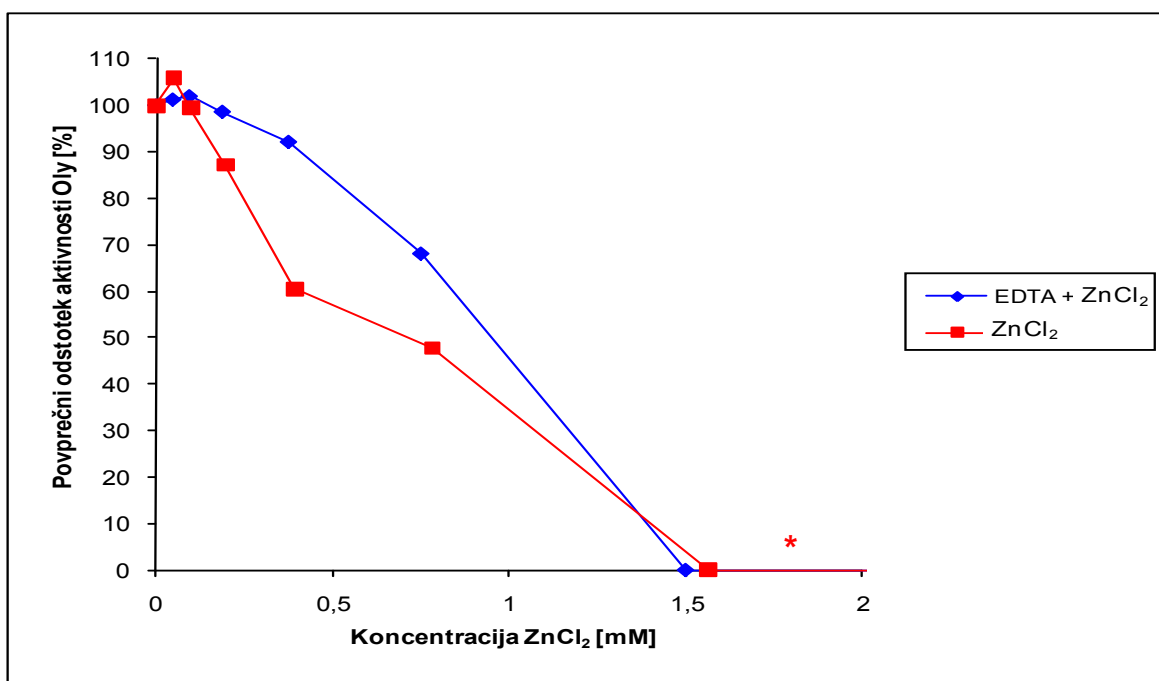
Nobena od uporabljenih soli kovin za eritrocite pri 25°C ni litična sama po sebi.

4.7 VPLIV EDTA IN SOLI DVOVALENTNIH KOVIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO HEMOLIZO GOVEJIH ERITROCITOV

HgCl_2 ob prisotnosti EDTA bistveno manj inhibira hemolitično aktivnost Oly (slika 14). Podobno je tudi pri ZnCl_2 (slika 15).



Slika 14. Vpliv HgCl₂ in HgCl₂ v kombinaciji z EDTA na hemolizo, povzročeno z ostreolizinom. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.



Slika 15. Vpliv ZnCl₂ in ZnCl₂ v kombinaciji z EDTA na hemolizo, povzročeno z ostreolizinom. Točke prikazujejo povprečno vrednost treh meritev, standardna napaka je bila v vseh primerih manjša od 5%. Zvezdica pomeni, da so nadaljnje vrednosti tudi 0. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

Koncentracije, ki so potrebne za 50% inhibicijo Oly, so ob prisotnosti EDTA večje (preglednica 6). V primeru HgCl₂ so kar 676-krat večje, v primeru ZnCl₂ pa 1.3-krat večje od koncentracij ob odsotnosti EDTA.

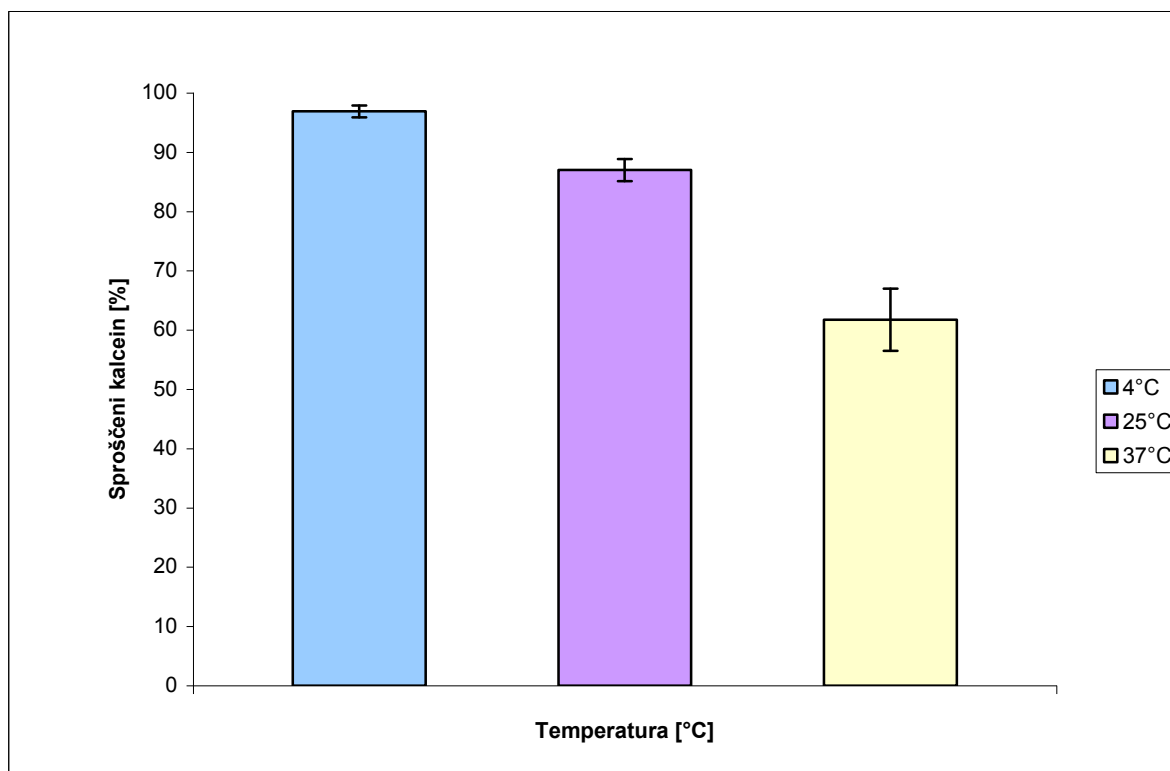
Preglednica 6. Primerjava inhibitornih koncentracij HgCl₂ in ZnCl₂ ob in brez dodanega EDTA. Končna koncentracija Oly v testu je bila 1 µg/mL.

Snov	Koncentracije snovi, ki ob	Koncentracije snovi, ki ob prisotnosti
	prisotnosti EDTA, povzročijo 50% inhibicijo Oly [mM]	EDTA, povzročijo 100% inhibicijo Oly [mM]
HgCl ₂	0,5	0.75, 1.5, 3, 6, 12
ZnCl ₂	0,95	1.5, 3, 6, 12

Sama EDTA za eritrocite ni litična (ni prikazano).

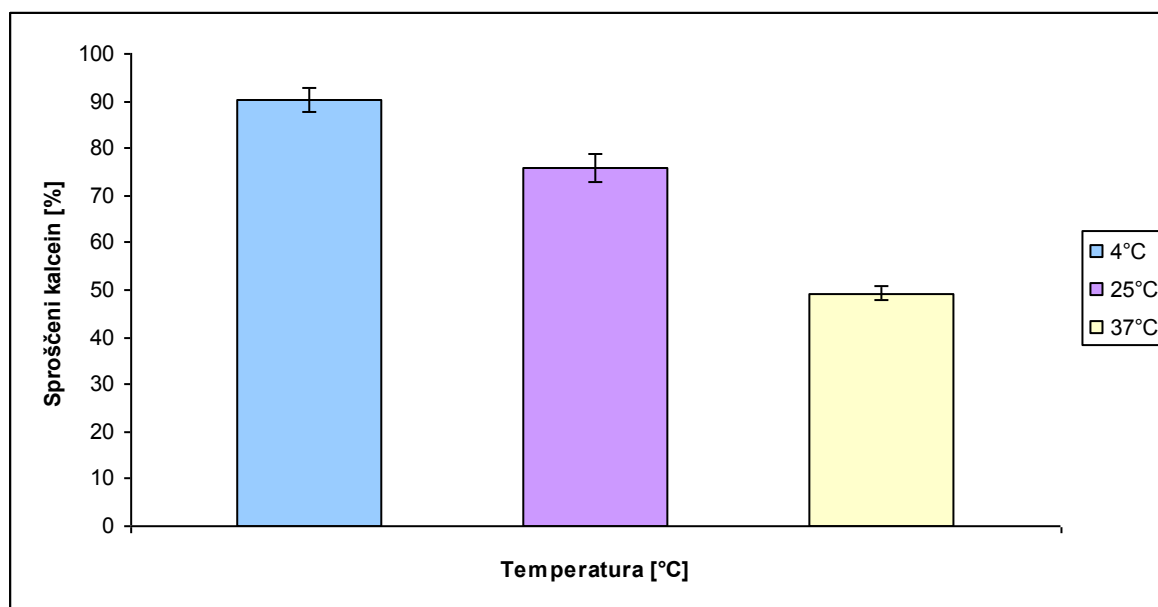
4.8 VPLIV LIZOFOSFATIDILHOLINA NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO PERMEABILIZACIJO MAJHNIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV (IZ SFINGOMIELINA IN HOLESTEROLA TER IZ LIPIDNEGA EKSTRAKTA GOVEJIH ERITROCITOV) S KALCEINOM

S spektrofotrometrom smo ugotavljali vpliv LPC na permeabilizacijo SUV iz SM in Hol ter SUV iz govejih eritrocitnih lipidov pri treh temperaturah: 4°C, 25°C in 37°C. Poskusi so pokazali, da že samo temperatura vpliva na aktivnost Oly. Pri SUV iz SM in Hol je Oly najbolj aktiven pri 4°C in najmanj pri 37°C (slika 16).



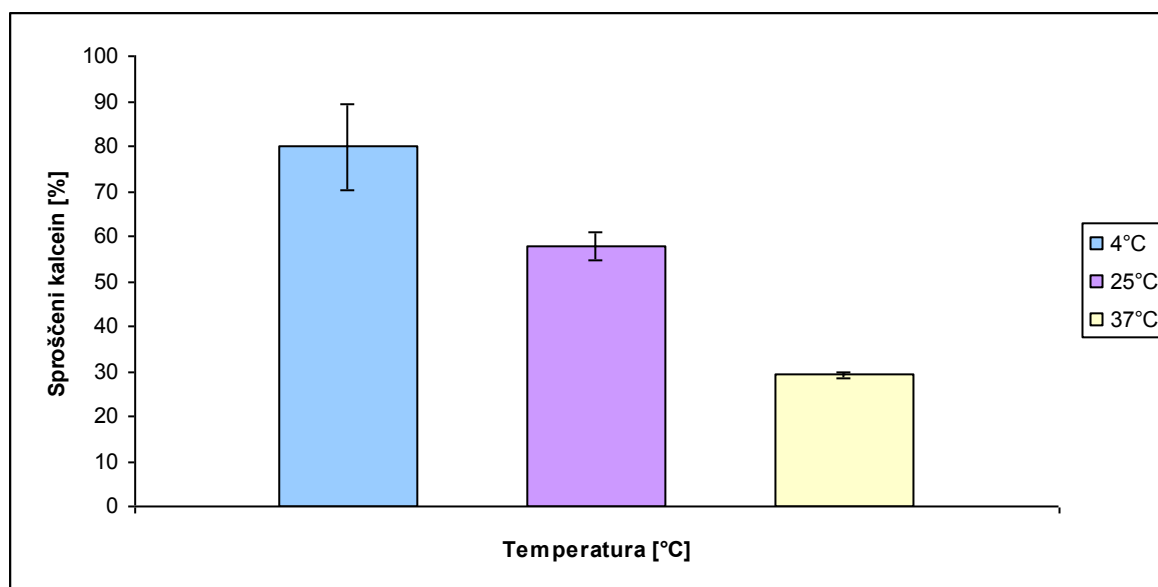
Slika 16. Vpliv temperature na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol). Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija Oly v testu je bila 55,8 $\mu\text{g/mL}$.

Tudi pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov je trend enak (slika 17), razlika je le v bistveno večji občutljivosti teh veziklov na delovanje Oly (končna koncentracija Oly pri permeabilizaciji SUV iz govejih eritrocitnih lipidov je bila 2,49 $\mu\text{g/mL}$, pri permeabilizaciji SUV iz SM in Hol pa 55,8 $\mu\text{g/mL}$). Torej smo morali pri permeabilizaciji SUV iz SM in Hol dati 22,2-krat večjo koncentracijo Oly.

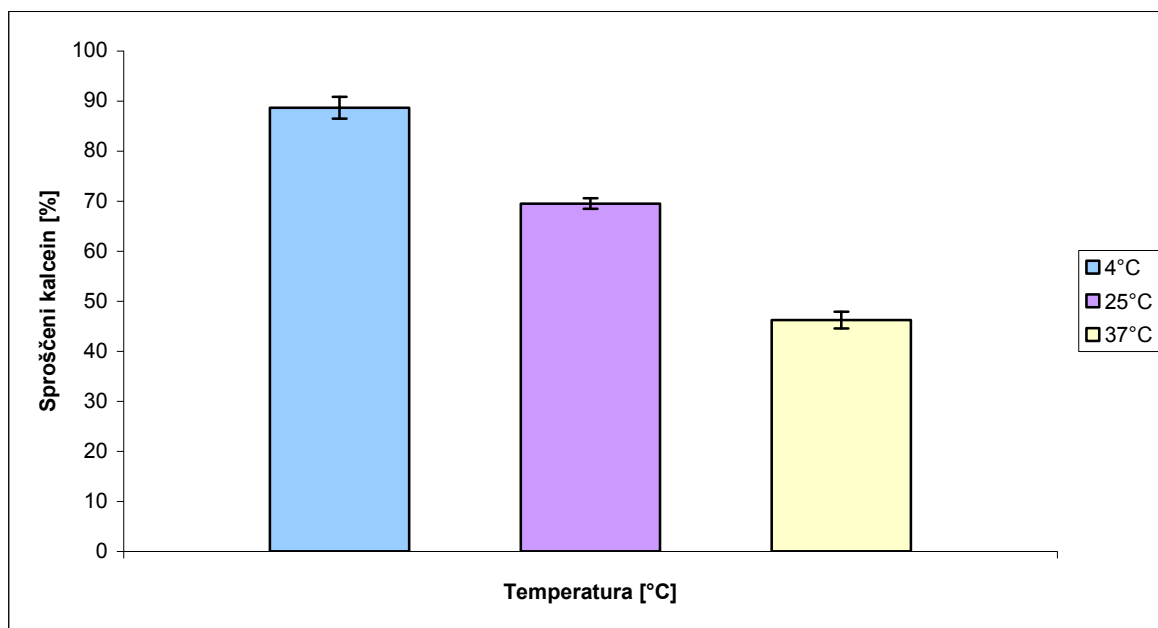


Slika 17. Vpliv temperature na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov. Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija Oly v testu je bila 2,49 $\mu\text{g/mL}$.

Dodatek LPC veziklom iz SM in Hol ter veziklom iz govejih eritrocitnih lipidov zmanjša aktivnost Oly (sliki 18 in 19). Trend vpliva temperature ostaja enak kot pri veziklih brez dodanega LPC.



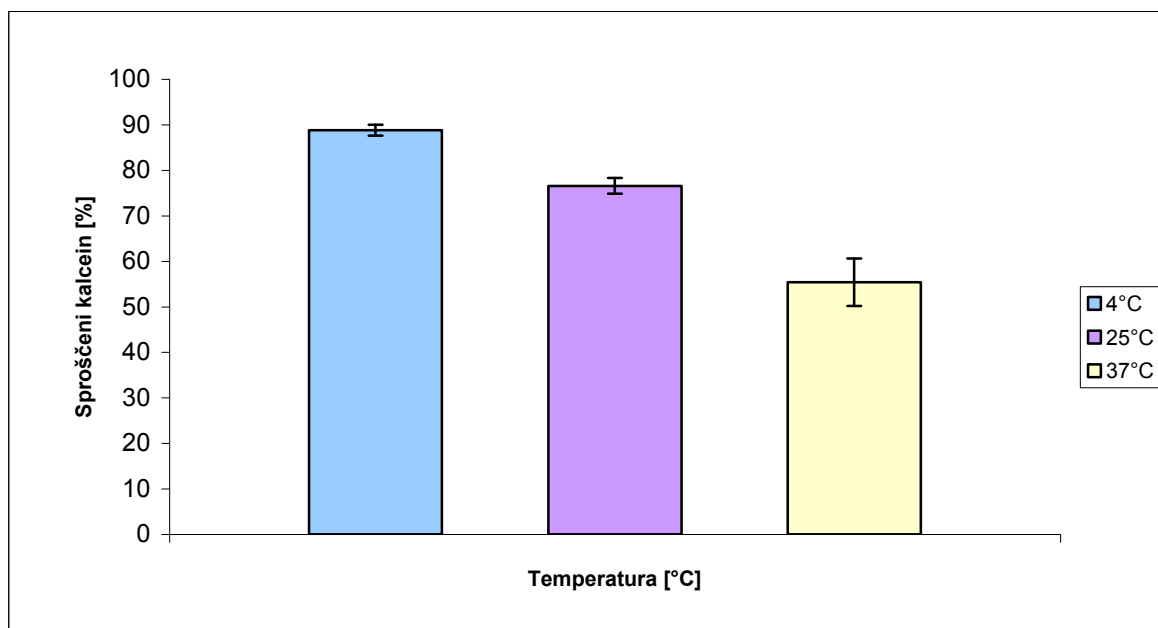
Slika 18. Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol) pri različnih temperaturah. Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija Oly v testu je bila 55,8 $\mu\text{g/mL}$. Končna koncentracija LPC je bila 4×10^{-7} M. Koncentracije Oly in LPC so bile pri vseh temperaturah enake.



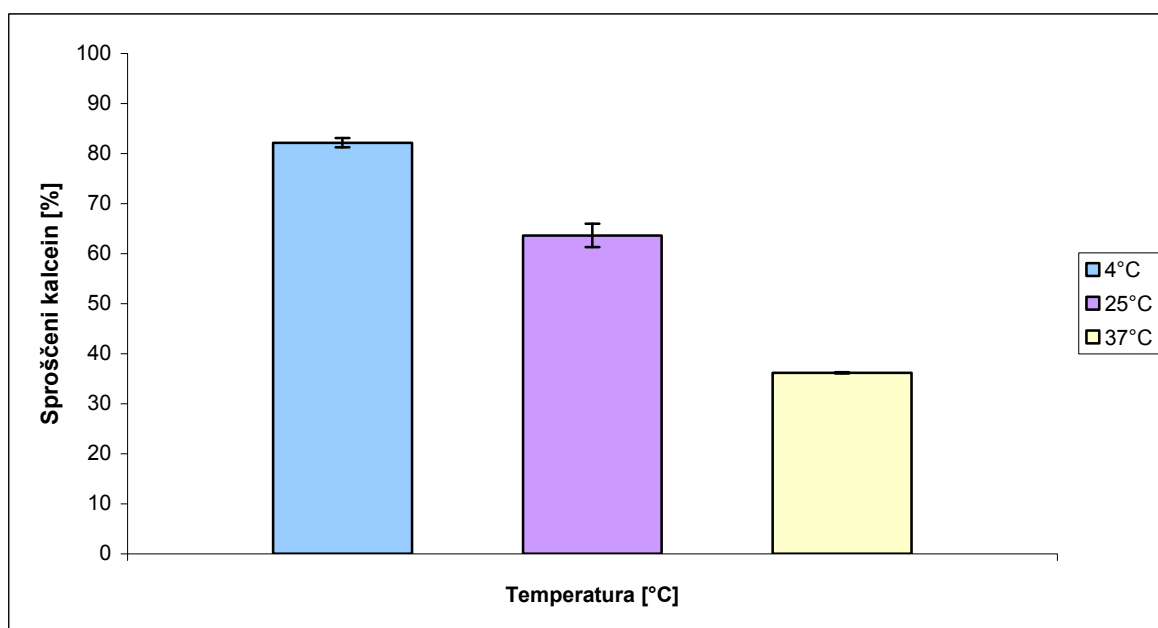
Slika 19. Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov pri različnih temperaturah. Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija Oly v testu je bila 2,49 µg/mL. Končna koncentracija LPC je bila 4×10^{-8} M. Koncentracije Oly in LPC so bile pri vseh temperaturah enake.

4.9 VPLIV MAŠČOBNIH KISLIN NA Z OSTREOLIZINOM INDUCIRANO PERMEABILIZACIJO MAJHNIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV (IZ SFINGOMIELINA IN HOLESTEROLA TER IZ LIPIDNEGA EKSTRAKTA GOVEJIH ERITROCITOV) S KALCEINOM

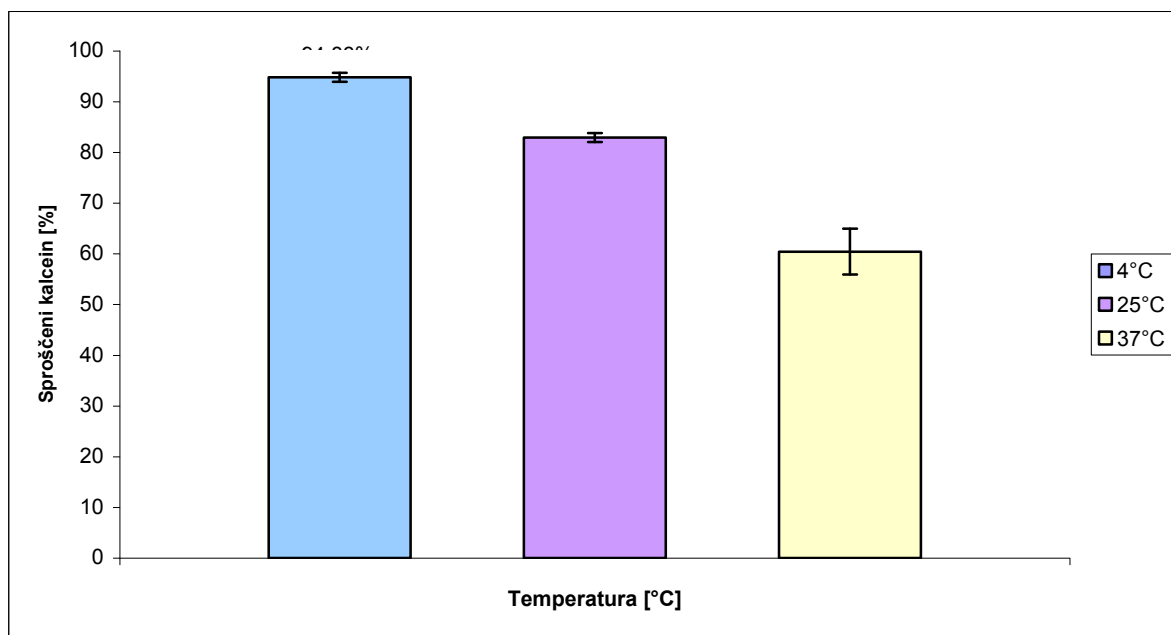
Tako kot dodatek LPC, tudi dodatek OA (sliki 20 in 21) ali SA (sliki 22 in 23) zmanjša permeabilizacijsko aktivnost Oly pri SUV iz SM in Hol ter iz govejih eritrocitnih lipidov. Trend vpliva temperature ostaja enak kot pri prejšnjih poskusih.



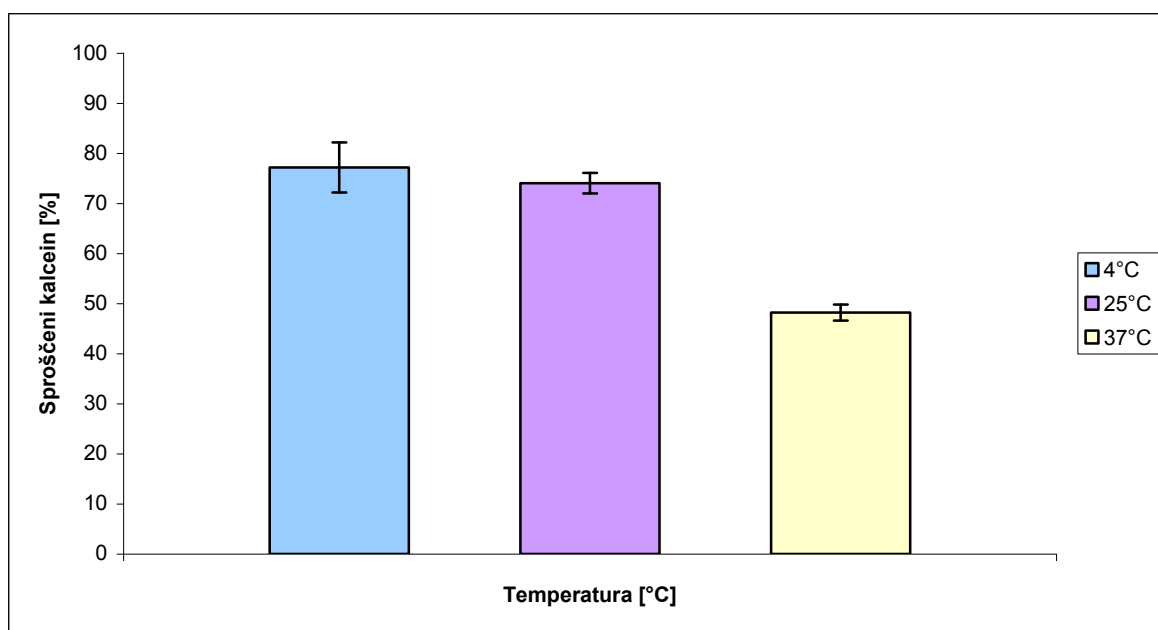
Slika 20. Vpliv oleinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol) pri različnih temperaturah. Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija Oly je bila pri vseh temperaturah 55,8 µg/mL. Končna koncentracija OA pri 4°C je bila $9,8 \times 10^{-6}$ M, pri 37°C in 25°C pa $6,8 \times 10^{-6}$ M.



Slika 21. Vpliv oleinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov pri različnih temperaturah. Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija je bila Oly pri vseh temperaturah 2,49 µg/mL. Končna koncentracija OA pri 4°C je bila 2×10^{-8} M, pri 25°C je 4×10^{-7} M in pri 37°C $7,5 \times 10^{-7}$ M.



Slika 22. Vpliv stearinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz sfingomielina in holesterola (1:1, mol:mol) pri različnih temperaturah. Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija Oly je bila 55,8 $\mu\text{g/mL}$, končna koncentracija SA pa 4×10^{-7} M. Koncentracije Oly in SA so bile pri vseh temperaturah enake.



Slika 23. Vpliv stearinske kisline na z ostreolizinom povzročeno permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov pri različnih temperaturah. Histogrami prikazujejo srednjo vrednost in standardno napako treh meritev. Končna koncentracija Oly je bila 2,49 $\mu\text{g/mL}$, končna koncentracija OA pa 4×10^{-8} M. Koncentracije Oly in SA so bile pri vseh temperaturah enake.

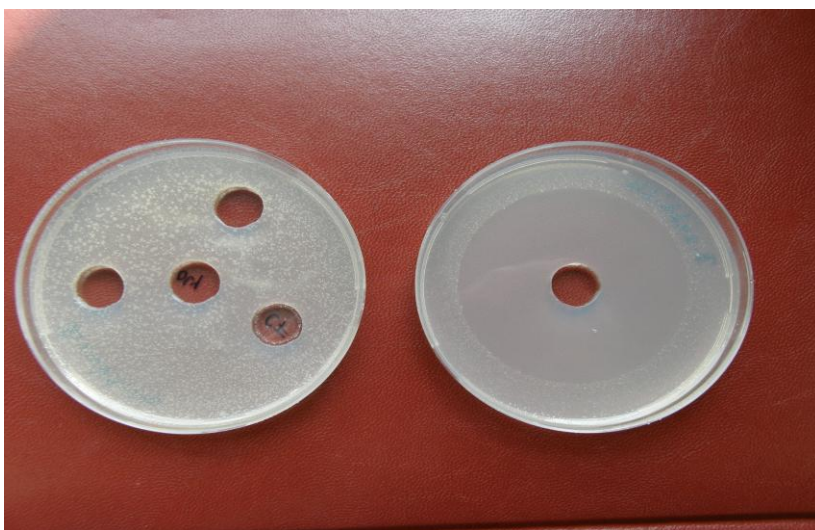
Dodatek LPC veziklom iz SM:Hol pri vseh treh temperaturah bolj zmanjša aktivnost Oly kot dodatek LPC veziklom iz lipidov iz govejih eritrocitov. Enak trend vidimo tudi pri dodatku SA pri 25°C in 37°C, v ostalih primerih pa je rezultat obraten (preglednica 7).

Preglednica 7. Aktivnost ostreolizina ob in brez dodatka lizofosfatidilholina in maščobnih kislin pri različnih temperaturah, izražena v odstotkih sproščenega kalceina.

Dodana snov		LPC		OA		SA	
Vezikli		SM:Hol	Goveji	SM:Hol	Goveji	SM:Hol	Goveji
4°C	brez	96,89	90,25	96,89	90,25	96,89	90,25
	z	79,93	88,66	88,81	82,14	94,83	77,18
	razlika	16,96	1,59	8,08	8,11	2,06	13,07
25°C	brez	86,99	75,71	86,99	75,71	86,99	75,71
	z	57,78	69,52	76,55	63,62	82,93	74,02
	razlika	29,21	6,20	10,44	12,10	4,06	1,69
37°C	brez	61,74	49,35	61,74	49,35	61,74	49,35
	z	29,11	46,21	55,39	36,15	60,43	48,18
	razlika	32,63	3,14	6,35	13,20	1,31	1,17

4.10 PROTIBAKTERIJSKI TEST

Po inkubacijskem času smo ob pregledu konfluentno inokulirane plošče videli enakomerno rast bakterije *Bacillus subtilis* po celotni površini. Ker ni prišlo do protibakterijskega delovanja ostreolizina, smo poskus ponovili še z ampicilinom. Ampicilin je po 24 urah učinkovito zavrl rast bakterije, kar smo videli kot veliko cono, kjer do rasti bakterije ni prišlo (slika 24).



Slika 24. Protibakterijska aktivnost ostreolizina (0.8 mg/ml, levo) in ampicilina (1 mg/ml, desno).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 UVOD

Ostreolizin iz gobe *Pleurotus ostreatus* je protein, ki lizira različne vrste celic, od katerih je bilo največ raziskav narejenih na eritrocitih. Do sedaj je bilo ugotovljeno, da nekatere snovi zavirajo aktivnost Oly tako pri hemolizi kot pri permeabilizaciji SUV s kalceinom.

Mi smo ugotavljali inhibitorni vpliv nekaterih sladkorjev, LPC, OA, SA in nekaterih soli kovin.

Poleg tega smo preverili, kako Oly vpliva na eritrocite iz različnih organizmov ter preverili ali Oly zavira rast bakterije *Bacillus subtilis*.

5.2 ANALIZA REZULTATOV

5.2.1 Hemolitična aktivnost ostreolizina na eritrocite različnih živalskih vrst

Pri določanju količine Hol in SM smo ugotovili, da je pri eritrocitih petelina in nekturja molarno razmerje, izraženo v odstotkih, v prid holinu (SM + PC). Pri eritrocitih žabe, goveda in konja je razmerje skoraj ekvimolarno. Če bi k SM in PC prišteli še ostale fosfolipide bi se razmerje zagotovo spremenilo v prid holinu. Do enakih podatkov so prišli že Rouser in sod. (1968). Iz teh podatkov, ter iz rezultatov testa hemolize lahko sklepamo, da je največja aktivnost Oly pri eritrocitih, ki vsebujejo večje količine SM oz. holina. Rouser in sod. (1968) so tudi ugotovili, da vsebujejo eritrociti podgane in psa majhne koncentracije SM, mi pa smo pokazali, da so eritrociti teh živali slabo občutljivi na hemolizo z Oly. Nasprotno pa eritrociti goveda, ovce ali prašiča, ki hitro lizirajo, vsebujejo višje koncentracije SM.

5.2.2 Vpliv sladkorjev na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Največji inhibitorni vpliv na delovanje Oly ima *N*-glikolilneuraminska kislina. Enak vpliv kisline sta ugotovila tudi Ngai in Ng (2006) pri proteinu eringolizinu iz sorodne gobe *Pleurotus eryngii*. Kislina je pri koncentraciji 7 mM inhibirala delovanje eringolizina za 50%. Iz poskusa sta ugotovila, da lahko *N*-glikolilneuraminska kislina, prisotna na eritrocitni membrani, preprečuje hemolitično aktivnost eringolizina, oz. bi lahko služila kot njegovo vezavno mesto.

Oly in eringolizin imata zelo podobno strukturo (Ngai in Ng, 2006); *N*-terminalni del sekvence eringolizina izkazuje visoko homologijo z Oly. Iz tega lahko sklepamo, da je vloga *N*-glikolilneuraminske kisline pri inhibiranju hemolize z Oly podobna kot pri eringolizinu, z razliko, da je imela *N*-glikolilneuraminska kislina v našem poskusu večji zaviralni učinek; koncentracija, potrebna za 50% lizo eritrocitov je bila mnogo manjša kot pri eringolizinu, in sicer 0.96 mM.

Visoko inhibitorno vlogo je pri našem poskusu imela tudi *N*-acetilneuraminska kislina, ki se prav tako nahaja tudi v membrani eritrocitov. Glede na to, da je njena struktura zelo podobna strukturi *N*-glikolilneuraminske kisline (priloga A) lahko sklepamo, da je tudi njena vloga pri zaviranju aktivnosti Oly podobna vlogi *N*-glikolilneuraminske kisline.

Pri poskusih z ostalimi sladkorji smo pričakovali, da bodo rezultati podobni kot pri Ngai in Ng (2006), kjer fruktoza, arabinoza, laktoza, galaktoza, manoza pri koncentraciji 50 mM nimajo vpliva. Vendar se to ni zgodilo v celoti. Razen fruktoze in galaktoze so imeli vsi ostali sladkorji inhibitorni vpliv. Tako morda del sekvence Oly, ki je homologen delu sekvence eringolizina, ni pomemben pri interakciji s temi sladkorji.

Interakcija Oly s sladkorji morda nakazuje, da bi bil Oly lahko lektin. Lektini so biološko aktivni proteini, izolirani iz ljudi, živali, rastlin, mikroorganizmov in tudi iz gliv. Trenutno poznamo 6 tipov lektinov, in sicer lektine tipa R, L, P, C, I in galektine. Predstavljajo raznoliko skupino proteinov, ki se specifično vežejo na različne tipe ogljikovih hidratov. Večina lektinov vsebuje več kot eno vezavno mesto za ogljikove hidrate in tako lahko

navzkrižno povežejo celice, ker imajo na površini različne ogljikove hidrate. Poleg tega, lahko z vezavo lektinov na glikanske enote receptorjev celic, ti izzovejo številne fiziološke učinke in imajo tako širok spekter funkcij. Njihova biološka aktivnost se kaže preko vezave in zamreženja glikoziliranih receptorjev na površini celic, kar vodi v prenos različnih signalov ali pa preko vezave glikokonjugatov ekstracelularnega matriksa, citoplazemskih ali jedrnih glikoproteinov. Na ta način so vpleteni v številne procese, kot na primer adhezijo, migracijo, proliferacijo, diferenciacijo celic in apoptozo ter kažejo imunomodulatorne lastnosti in sodelujejo pri raku (Pohleven in sod., 2009).

Slabše raziskani so lektini iz višjih gliv; identificiranih je bilo šest različnih struktur proteinov. V gobah imajo lektini različne biokemijske lastnosti in specifičnosti vezave ogljikovih hidratov. Imeli naj bi obrambno funkcijo pred fungivori, vlogo pri vzpostavljanju simbiotskega ali parazitskega razmerja z drugimi organizmi in vlogo pri povezovanju hif med razvojem plodišč. Za več lektinov iz gob so bili pokazani tudi protitumorski in imunomodulatorni učinki ter vpliv na adhezijo celic na podlago (Pohleven in sod., 2009).

5.2.3 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Ob dodatku LPC eritrocitni suspenziji, le-te najdemo v zunanjem monosloju celičnih membran. Inkorporacija LPC v membrano najverjetneje povzroči strukturne spremembe Hol-bogatih domen (Davidsen in sod., 2002). Tanaka in sod. (2004) so ugotovili, da LP (kamor uvrščamo LPC) vstopijo v L_o fazo celičnih raftov. Posledica je sprememba ukrivljenosti membrane in verjetno zmanjšanje povezanosti med L_o in L_d fazo (Chowdhury in sod., 2008).

Pri poskusih smo ugotovili, da LPC v visokih koncentracijah pri 25°C povzroča lizo eritrocitov. Še večji vpliv ima pri 4°C, kjer eritrocite lizira tudi ena nižja koncentracija kot pa pri 25°C. Rezultat lahko povežemo s poskusi Weltzien (1979). Ugotovil je, da se je efekt večje propustnosti eritrocitov ob dodatku LPC močno povečal, ko je celice ohladil na 0-5°C. Litični vpliv 1-palmitoil-2-hidroksil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (LPPC) na liposome iz

1,2-*O*-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (di-eter-1,2-SPC) so pokazali tudi Davidsen in sod. (2002). V začetni fazi se LPPC prenese v zunanji monosloj in se tam prerazporedi, kar lahko vodi v tvorbo neravnotežnih majhnih fazno ločenih struktur. Pri tem bi lahko nastali defekti nanometrskih velikosti, posledično pa bi lahko kalcein uhajal iz veziklov. V nadaljnji, počasnejši fazi pa se LPPC prenese v notranji monosloj. Pri tem se tesnost pakiranja zmanjša in membrana se ponovno »zapečati« (Davidsen in sod., 2002). Glede na podobnost strukture med LPC in LPPC lahko sklepamo na enak vpliv pri našem poskusu z LPC.

LPC inhibira aktivnost Oly pri vseh temperaturah, kar se ujema z do sedaj opravljenimi poskusi (Sepčić in sod., 2003). Ob dodatku LPC se razporeditev komponent celične membrane spremeni (Rebolj in Sepčić, 2008), posledica pa je lahko slabša vezava Oly na membrano. Večja kot je dodana koncentracija LP, manjša je vezava Oly na membrano. Da te ugotovitve držijo in da ne gre za vezavo Oly na LPC, se je potrdilo v številnih eksperimentih (Chowdhury in sod., 2008).

Pri poskusu smo tudi ugotovili, da je koncentracija, potrebna za 50% inhibicijo Oly, največja pri 25°C in najmanjša pri 4°C. Pri 4°C je že aktivnost Oly sama po sebi najmanjša, kar omogoči večji učinek LPC.

Aktivnost Oly brez dodatka LPC je največja pri 37°C in najmanjša pri 4°C. Membrane so pri 4°C bolj rigidne pri 37°C pa bolj fluidne kot pri 25°C.

5.2.4 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Pri poskusu smo ugotovili, da ima OA na eritrocite litični učinek pri vseh treh temperaturah. Veliko študij je že pokazalo, da maščobne kisline, vključene v eritrocite, povečajo membransko permeabilnost, predvsem pri nižjih temperaturah (Weltzien, 1979).

Tako OA kot SA inhibirata delovanje Oly, saj se tako kot LPC vgradita v membrano in verjetno povzročita strukturne spremembe domen. Maščobni kislini zavirata delovanje Oly

pri vseh treh temperaturah, a v višjih koncentracijah kot LPC. Zaviralni vpliv SA so dokazali že Sepčič in sod. (2003), ko so ugotovili, da ima SA inhibitorni vpliv, a le z molarno učinkovitostjo okoli 10-krat nižjo kot lizofosfolipidi. Pri tem dolžina verige maščobne kisline ni pomembna.

Vzrok zaviralnega vpliva OA iz našega poskusa je lahko podoben delovanju SA, saj imata podobni strukturi, le da je stearinska kislina nasičena (priloga C).

Če primerjamo aktivnost SA in OA pri vseh temperaturah ugotovimo, da ima SA manjši vpliv na zaviranje aktivnosti Oly. OA je nenasičena, kar pomeni, da ima dvojna vez slabše možnosti za rotacijo. Poleg tega pa je njena oblika zaradi dvojne vezi neravna oziroma prelomljena. Vse to lahko povzroči večjo neurejenost membrane po vgraditvi OA. To pa lahko povzroči slabšo vezavo Oly na domene in s tem manjšo hemolitično aktivnost. SA pa je nasičena, torej se lahko teoretično bolj vgrajuje v urejene membranske domene in manj moti njihovo fluidnost.

Pri poskusu z OA smo tudi ugotovili, da je koncentracija OA, potrebna za 50% inhibicijo Oly, največja pri 37°C in najmanjša pri 4°C. Pri 4°C je že aktivnost Oly sama po sebi najmanjša, kar omogoči večji učinek OA. Tudi pri poskusu s SA je njen učinek največji pri 37°C, ko je aktivnost Oly najmanjša.

Pri poskusih, kjer smo dodali OA oz. SA smo opazili različen trend aktivnosti Oly glede na koncentracijo dodane maščobne kisline. Pri poskusih s SA smo do koncentracije 0,0078125 mM opazili, da je aktivnost Oly največja pri 37°C in najmanjša pri 4°C, od koncentracije 0,015625 mM pa je bila aktivnost največja pri 25°C in najmanjša pri 37°C. Do podobne spremembe v trendu je prišlo tudi pri OA. V tem primeru pa je bila aktivnost Oly do koncentracije 0,0019531 mM največja pri 37°C in najmanjša pri 25°C, od koncentracije 0,0039063 mM pa prav tako največja pri 37°C a najmanjša pri 4°C.

Aktivnost Oly brez dodatka SA oz. OA je največja pri 37°C in najmanjša pri 4°C.

5.2.5 Medsebojni vpliv lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

Največjo inhibicijo hemolize Oly povzročajo LPC, SA in OA skupaj. Najmanj pa zavirata SA + OA. Rezultat lahko primerjamo z rezultati iz Davidsen in sod. (2002), kjer so ugotovili, da delujeta LPPC in palmitinska kislina pri zaviranju Oly za izpust kalceina iz liposomov sinergetsko. Maščobna kislina verjetno razrahlja strukturo hidrofilnih regij lipidov in tako naredi prostor, kamor se LPPC hitreje vgradi (Davidsen in sod., 2002).

Največji delež inhibicije LPC + OA + SA odpade na LPC, zato ni čudno, da je pri poskusih samo z OA ali SA ali kombinacijo obeh aktivnost le-teh manjša.

5.2.6 Vpliv soli različnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

V poskusu smo pokazali, da HgCl₂ inhibira hemolitično aktivnost Oly, kot poročajo že Berne in sod. (2002). V našem primeru je bila koncentracija HgCl₂, potrebna za 100% inhibicijo Oly, 1.5 μM, in je v primerjavi z Berne in sod. (2002) veliko nižja. Rezultat lahko razložimo z dejstvom, da smo v poskusu uporabili dva različno aktivna ostreolizinska izolata, ali različno staro raztopino eritrocitov.

Berne in sod. (2002) so dokazali, da Zn²⁺ ioni ne izboljšajo hemolitične aktivnosti. Naši poskusi pa so pokazali, da Zn²⁺ ioni celo inhibirajo hemolitično aktivnost Oly.

Poskusi z ostalimi solmi kovin (CoCl₂, MnCl₂, CaCl₂, NiCl₂, LiCl₃) so pokazali, da so inhibitorne vse, kar smo po našem vedenju dokazali prvi. Pri tem je potrebno omeniti, da CaCl₂ pri nizkih koncentracijah (do 6,25 mM) celo nekoliko poveča aktivnost Oly, pri višjih koncentracijah pa inhibira. Vpliv CaCl₂ pri pospeševanju hemolize je pokazala že Malovrh (1997) pri raziskavi vpliva omenjene soli kovine na aktivnost ekvinatoksina iz morske vetrnice *Actinia equina*; če je CaCl₂ dodala v koncentracijah nad 1 mM, je le-ta hemolizo pospešil. Enak vpliv je dobila tudi ob dodatku MnCl₂, česar pa v našem poskusu nismo opazili.

Rezultat pospešitve hemolize ob dodatku CaCl₂ lahko razložimo s tem, da lahko Ca²⁺ ioni pospešijo nastanek pore. Ca²⁺ je namreč v številnih celicah pomemben del signalnih poti in

je tako lahko vključen tudi v reakcijo povezovanja posameznih proteinskih molekul Oly za nastanek pore. Vlogo Ca^{2+} ionov pri povezovanju proteinskih molekul so pokazali pri ekvinatoksinu (Malovrh, 1997).

5.2.7 Vpliv EDTA in soli dvovalentnih kovin na z ostreolizinom inducirano hemolizo govejih eritrocitov

ZnCl_2 in HgCl_2 ob prisotnosti EDTA s koncentracijo 5 mM bistveno manj inhibirata Oly kot pa v odsotnosti EDTA. Rezultat lahko razložimo z dejstvom, da je EDTA kelator; pomeni, da veže dvovalentne ione.

5.2.8 Vpliv lizofosfatidilholina na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom

LPC zmanjša delovanje Oly pri permeabilizaciji SUV. Efekt smo opazili tako pri SUV iz SM in Hol, kot pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov. Z lizofosfolipidi povzročeno inhibicijo permeabilizacije SUV iz SM in Hol z Oly so pokazali že Chowdhury in sod. (2008), le da so uporabili lizofosfatidilinozitol (LPI). Glede na podobno strukturo LPC in LPI (priloga B) lahko sklepamo na podoben vpliv.

Najmanjši vpliv LPC smo pri obeh vrstah veziklov zaznali pri 4°C, kar se ujema s podatkom, da je bil Oly tudi brez dodatka LPC najbolj aktiven pri 4°C.

5.2.9 Vpliv maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom

OA in SA zmanjšata delovanje Oly pri permeabilizaciji SUV veziklov. Efekt smo opazili tako pri SUV iz SM in Hol, kot pri SUV iz govejih eritrocitnih lipidov. Zaviralni vpliv smo pokazali tudi pri poskusih inhibicije hemolize, povzročene z Oly.

Vpliv OA je pri 25°C večji od vpliva SA. Rezultat se ujema z rezultati poskusov hemolize eritrocitov. Ponovno lahko razložimo manjši vpliv SA zaradi nasičenosti.

Največji zaviralni učinek SA pri govejih eritrocitnih lipidih je bil pri 4°C in najmanjši pri 37°C, pri OA pa največji pri 37°C in najmanjši pri 4°C. Rezultate zaviralnega učinka OA pri permeabilizaciji lahko potrdimo, saj je bila aktivnost Oly največja pri 4°C in najmanjša pri 37°C.

Pri SM:Hol veziklih pa sta imeli SA in OA največji učinek pri 25°C in najmanjši pri 37°C.

5.2.10 Primerjava rezultatov vplivov lizofosfatidilholina in maščobnih kislin na z ostreolizinom inducirano permeabilizacijo majhnih unilamelarnih veziklov (iz lipidnega ekstrakta govejih eritrocitov ter iz sfingomielina in holesterola) s kalceinom

Če primerjamo trend zaviranja permeabilizacijske aktivnosti Oly pri veziklih iz SM in Hol ob dodatku LPC, OA oz. SA vidimo, da je trend pri vseh temperaturah enak. In sicer največji vpliv je pri vseh temperaturah imel LPC, nato OA in najmanjšega SA (preglednica 7).

Pri veziklih iz govejih eritrocitnih lipidov pa je trend zaviranja Oly v odvisnosti od temperature drugačen. Pri 4°C je imela največji vpliv SA in najmanjši LPC, pri 25°C in 37°C pa največji OA in najmanjši SA (preglednica 7). Razlike v rezultatih lahko pripišemo dejstvu, da se maščobni kislini in LPC različno učinkovito vgrajujejo v vezikle z različno sestavo (ta je pri veziklih iz govejih eritrocitnih lipidov bistveno bolj kompleksna). Poleg tega pa tudi v tem primeru nismo imeli istih založnih raztopin Oly.

5.2.11 Primerjava rezultatov testov inhibicije hemolize in testov permeabilizacije majhnih unilamelarnih veziklov ob prisotnosti lizofosfatidilholina in maščobnih kislin

Temperaturno odvisna aktivnost Oly je pri veziklih iz govejih eritrocitnih lipidov in veziklih iz SM in Hol enaka. Oly je najbolj aktiven pri 4°C, manj pri 25°C in najmanj pri 37°C. Enak trend dobimo tudi po dodatku LPC/OA/SA.

Če primerjamo te rezultate z rezultati hemolize vidimo, da se rezultati aktivnosti Oly brez in ob dodatku LPC/SA/OA ne ujemajo, saj pri hemolizi aktivnost Oly narašča z naraščajočo temperaturo, pri permeabilizaciji veziklov pa pada. Zavedati pa se moramo, da rezultatov merjenja hemolize in rezultatov permeabilizacijskih poskusov ne moremo tako enostavno primerjati, saj imamo pri hemolizi opravka s celicami, v permeabilizacijskih testih pa z umetno narejenimi vezikli. Poleg tega smo uporabljali različne izolate proteina ter različne založne raztopine Oly, ki niso bile enako krat zamrznjene in odtaljene. Pri tem je lahko prihajalo do lepljenja proteina na steno plastične posode in s tem do spremembe koncentracije Oly.

5.2.12 Protibakterijski test

Dodatek Oly (100 μ l, 0,8mg/mL) na ploščo z razrastjo bakterije *B. subtilis* njene rasti ne zavre. Protibakterijsko aktivnost proti omenjeni bakteriji so pokazali Ngai in Ng (2006) z eringeolizinom. Koncentracija, potrebna za 50% inhibicijo rasti bakterije je bila 25 ± 5 μ M.

5.3 SKLEPI

1. Z merjenjem vsebnosti holina in Hol v eritrocitih različnih živali smo ugotovili, da imajo največjo vsebnost holinskih fosfolipidov (PC in SM) eritrociti petelina in nekturja.
2. Največja hemolitična aktivnosti Oly je pri govejih eritrocitih, eritrocitih petelina, najmanjša pa pri eritrocitih psa, ki glede na podatke iz literature (Rouser in sod., 1968) vsebuje najmanj SM.
3. Pri merjenju inhibicije hemolize z Oly so bili inhibitorni vsi sladkorji, z izjemo fruktoze in galaktoze, pri čemer sta imeli največji vpliv *N*-acetilneuraminska in *N*-glikolilneuraminska kislina.

4. LPC zavira hemolitično aktivnost Oly, pri čemer je pomembna temperatura raztopine. LPC je najbolj inhibitoren pri 4°C, najmanj pa pri 25°C. Poskusi so tudi pokazali, da je LPC pri vseh treh temperaturah v ustreznih koncentracijah za eritrocite litičen.

5. OA in SA zavirata hemolitično aktivnost Oly pri vseh temperaturah, a manj kot jo zavira LPC. Pri tem ima SA pri vseh temperaturah manjši vpliv kot OA. Pokazali smo tudi, da SA pri nobeni od temperatur ni litična, medtem ko OA lizira eritrocite pri vseh temperaturah v ustreznih koncentracijah.

6. Pri poskusih z dodatkom kombinacije LPC + OA + SA/ LPC + OA/ LPC + SA/ SA + OA smo ugotovili, da povzročajo največjo inhibicijo hemolize LPC, OA in SA skupaj, najmanjšo pa SA + OA.

7. S poskusi inhibicije hemolize s solmi dvovalentnih kovin in LaCl₃ smo pokazali njihov inhibitorni vpliv na Oly, pri čemer soli same eritrocitov niso lizirale. Pokazali smo tudi, da ZnCl₂ in HgCl₂ ob prisotnosti EDTA bistveno manj inhibirata Oly kot pa v odsotnosti EDTA.

8. Poskusi permeabilizacije SM:Hol veziklov in veziklov iz govejih lipidov so dokazali inhibitorni vpliv LPC, SA in OA. Aktivnost Oly je bila v vseh primerih največja pri 4°C in najmanjša pri 37°C, medtem ko je bil inhibitorni vpliv LPC/OA/SA pri različnih veziklih pri treh temperaturah različen.

9. Test protimikrobne aktivnosti Oly proti bakteriji *Bacillus subtilis* je bil negativen.

6 POVZETEK

Ostreolizin je citolitični protein iz gobe bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). V membranah evkariontskih celic in veziklih iz membranskih lipidov tvori 4 nm velike pore in tako povzroči lizo celic. Oly se specifično veže na membranske domene, bogate s holesterolom, ki so v tekoči urejeni fazi. Namen naloge je bil ugotoviti vpliv nekaterih lizofosfolipidov, maščobnih kislin, sladkorjev in soli kovin na citolitično aktivnost Oly. Raziskave hemolize in testi permeabilizacije so pokazali, da so učinki snovi na aktivnost Oly različni. Največji zaviralni vpliv ima lizofosfatidilholin > oleinska kislina > stearinska kislina. Pri vplivu sladkorjev ima največji vpliv *N*-glikolilneuraminska kislina > *N*-acetilneuraminska kislina > glukoza > saharoza > riboza > manitol > laktoza > arabinoza > sorboza > ksiloza > rafinoza; fruktoza in galaktoza pa na delovanje Oly ne učinkujeta. Med kovinami soli, pa ima največji zaviralni vpliv HgCl_2 > ZnCl_2 > NiCl_2 > CoCl_2 > MnCl_2 > CaCl_2 . Poleg omenjenih ima velik zaviralni vpliv tudi LaCl_3 .

Dodatno smo preučili tudi vpliv temperature na aktivnost Oly ob prisotnosti lizofosfatidilholina in maščobnih kislin. Pri testih permeabilizacije veziklov smo ugotovili, da je Oly tako brez kot z dodatki snovi najbolj aktiven pri 4°C, najmanj pa pri 37°C. Ti rezultati se ne ujemajo z rezultati hemolize, vendar moramo pri tem upoštevati, da pri testu hemolize uporabljamo cele celice in ne zgolj veziklov kot v primeru testa permeabilizacije, kar je verjetno vzrok za razliko.

7 VIRI

Al-Deen I.H.S., Twaij H.A.A., Al-Badr A.A., Istarabad T.A.W. 1987. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. *Journal of Ethnopharmacy*, 21: 297-305

Barloy F., Lecadet M.M., Delecluse A. 1998. Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans*. *Gene*, 211: 293-299

Berne S. 2004. Biokemijske in citolitične lastnosti proteina iz bukovega ostrigarja *Pleurotus ostreatus* (Jacq.ex.Fr.) Kumm. Doktorska naloga. Biotehniška fakulteta. Oddelek za biologijo. Ljubljana.

Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčič K. 2002. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570: 153-159

Berne S., Pohleven J., Vidic I., Rebolj K., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sonnenberg A., Sepčič K. 2007. Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological research*, 111: 1431-1436

Berne S., Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P., Poklar Ulrih N. 2005. Effect of pH on the Pore Forming Activity and Conformational Stability of Ostreolysin, a Lipid Raft-Binding Protein from Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry*, 44: 11137-11147

Berne S., Lah. L., Sepčič K. 2009. Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, v tisku

Božac R. 1995. Gljive. IV izdaja. Zagreb, Školska knjiga d.d., str. 423

Brown D.A., London E. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14: 111-36

Chinnapen D.J., Chinnapen H., Sasloesky D., Lencer W.I. 2007. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiology Letters*, 2: 129-137

Chowdhury H.H., Rebolj K., Kreft M., Zorec R., Maček P., Sepčič K. 2008. Lysophospholipids prevent binding of a cytolytic protein ostreolysin to cholesterol-enriched membrane domains. *Toxicon*, 51: 1345-1356

Daidsen J., Mouritsen O.G., Jorgensen K. 2002. Synergetic permeability enhancing effect of lysophospholipids and fatty acids on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1564: 256-262

Ebina K., Ichinowatari S., Yokota K. 1985. Studies on toxin of *Aspergillus fumigatus*. XXII. Fashion of binding of Asp-hemolysin to human erythrocytes and Asp-hemolysin-binding proteins of erythrocyte membranes. *Microbiology and Immunology*, 29: 91-101

Edidin M. 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32: 257-83

Fantini J., Garmy N., Mahfoud R., Yahi N. 2002. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 27: 1-22

Fernandez Espinar M.T., Labarere J. 1997. Cloning and sequencing of the Aa-Pril gene specifically expressed during fruiting initiation in the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, and analysis of the predicted amino-acid sequence. *Current Genetics*, 32: 420-424

Gandhavadi M., Allende D., Vidal A., Simon S.A. in McIntosh S.A. 2002. Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophysical Journal*, 82: 1469-82

Giardina P., Palmeri G., Fontanella B., Riviuccio V., Sannia G. 2000. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376: 171-179

Gouaux E. 1997. Channel-forming toxins: Tales of transformations. *Current Opinion of Structural Biology*, 7: 566-573

Hammond J.B.W. 1980. The composition of fresh and stored oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *Phytochemistry*, 19: 2565-2568

Hansen G.H., Immerdal L., Thorsen E., Niels-Christiansen L.L., Nystrom B.T., Demant E.J.F., Danielsen E.M. 2001. Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 32338-32344

Hong Q., Gutierrez-Aguirre I., Barlie A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Maček P., Turk T., Gonzalez-Manas J.H., Lakey J.H., Anderluh G. 2002. Two-step membrane binding by equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *Journal of Biological Biochemistry*, 277: 41916-41924

Hullin-Matsuda F., Kobayashi T. 2007. Monitoring the distribution and dynamics of signaling microdomains in living cells with lipid-specific probes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 2492-2504

Koklič T., Pirš M., Zeisig R., Abramović Z., Šentjurc M. 2005. Membrane switch hypothesis. 1. Cell density influences lateral domain structure of tumor cell membranes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45: 1701-1707

Kües U., Liu Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 141-152

Lagerholm B.C., Weinreb G.E., Jacobson K., Thompson N.L. 2005. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annual Review of Physical Chemistry*, 56: 309-336

Lichtenberg D., Goni M.F., Heerklotz H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 430-436

London E. 2002. Insight into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 480-486

Maček P., Lebez D. 1981. Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Effects of some ions and pH. *Toxicon*, 19: 233-244

Maličev E., Chowdhury H.H., Maček P., Sepčič K. 2007. Effect of ostreolysin, an Asp-hemolysin isoform, on human chondrocytes and osteoblasts, and possible role of Asp-hemolysin in pathogenesis. *Medical Mycology*, 44: 1-8

Malovrh P. 1997. Vpliv dvovalentnih kovinskih kationov na koloidno-osmotsko hemolizo. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta. Oddelek za biologijo

Ngai P.H.K., Ng T.B. 2006. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. Biotechnologically relevant enzymes and proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6: 1185-1191

Ohvo-Rekila H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P. 2002. Cholesterol interaction with phospholipids in membranes. *Progress Lipid Research*, 41: 66-97

Op den Kamp J.A.F. 1979. Lipid asymmetry in membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 48: 47-71

Pike L.J. 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochemical Journal*, 378: 281-292

Pike, L.J., Miller, J.M. 1998. Cholesterol depletion de-localizes PIP2 and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 22298–22304

Pohleven J., Obermajer N., Sabotič J., Anžlovar S., Sepčič K., Kos J., Kralj B., Štrukelj B., Brzin J. 2009. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1790: 173-181

Prakash S., Matouschek A. 2004. Protein unfolding in the cell. *Trends in Biochemical Sciences*, 29: 593-600

Ramachandran R., Heuck A.P., Tweten R.K., Johnson A.E. 2002. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nature Structural and Molecular Biology*, 9: 823-827

Rebolj K. 2009. Interakcije citolitičnega proteina ostreolizina z lipidnimi membranami in membranskimi domenami. Doktorsko delo. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Rebolj K., Batista U., Sepčič K., Cestnik V., Maček P., Frangež R. 2007. Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability *in vitro*. *Toxicon*, 49: 1211-1213

Rebolj K., Poklar Ulrih N., Maček P., Sepčič K. 2006. Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1758: 1662-1670

Rebolj K., Sepčič K. Ostreolysin, a Cytolytic Protein from Culinary-Medicinal Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) P.Kumm. (*Agaricomycetidae*), and Its Potential Use in Medicine and Biotechnology. 2008. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4: 293-302

Rietveld A., Simons K. 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376: 467-479

Rouser G., Nelson G.J., Fleischer S., Simon G. 1968. Lipid composition of animal membranes, organelles and organs. In: *Biological membranes-Physical fact and function*. Chapman D. (Ed.). Academic Press, London, New York: 5-69 str.

Sepčič K., Berne S., Potrich C., Turk T., Maček P., Menestrina G. 2003. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 6: 1199-1210

Sepčič K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitaš A., Šentjurc M., Maček P. 2004. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 575: 81-85

Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387:569-572

Singer S.J., Nicolson G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-31

Tanaka T., Sano R., Yamashita Y., Yamazaki M. 2004. Shape changes and vesicle fission of giant unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membrane induced by lysophosphatidylcholine. *Langmuir*, 22: 9526-9534

Turk T. Toksinologija z osnovami toksikologije (05.12.2008)

<http://web.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/studenti/Teze/Toksinologija%20s%20toksikologijo.htm>

Vidic I., Berne S., Drobne D., Maček P., Frangež R., Turk T., Štrus J., Sepčič K. 2005. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), *Mycological Research*, 109: 377-382

Wainwright M. 1992. An introduction to fungal biotechnology. Chichester, Wiley & Sons Ltd.: 202 str.

Weltzien H.U. 1979. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochemica et Biophysica Acta*, 559: 259-287

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

ZAHVALA

Predvsem bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Kristini Sepčić, univ. dipl. biol. za vzpodbude in razumevanje ter ker mi je pokazala, da se z voljo zmore vse. Zelo sem vesela, da sem spoznala tako krasno osebo, ki me je še bolj navdušila za znanost.

Zahvala za prijetno vzdušje gre vsem mladim raziskovalcem ter tehnični sodelavki Ireni Pavešič, ki mi je poleg tega pomagala pri uporabi aparaturne ter izolirala Oly.

Rada bi se zahvalila vsem profesorjem in asistentom, ki so mi v vseh letih študija predali potrebno znanje.

Zahvalila bi se rada tudi vsem prijateljem, s katerimi sem delila veselje in žalost.

Hvala tudi družini za podporo in vzpodbude ter hišnemu ljubljencu Čiči, ki mi je polepšala naporne dni.

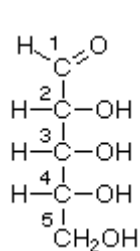
Predvsem pa se zahvaljujem dragemu Roku za potrpežljivost, pomoč pri računalniških obdelavah (brez katere bi računalnik že na začetku pisanja letel skozi okno) ter spodbudne besede.

Hvala vsem!

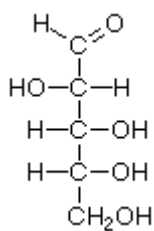
PRILOGE

Priloga A

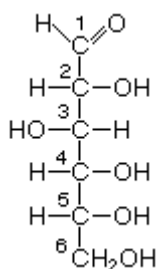
Sladkorji



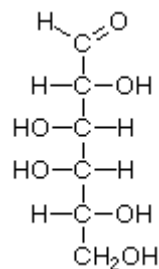
D-riboza



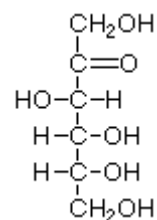
D-arabinoza



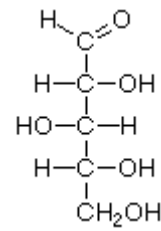
D-glukoza



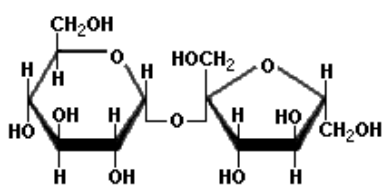
D-galaktoza



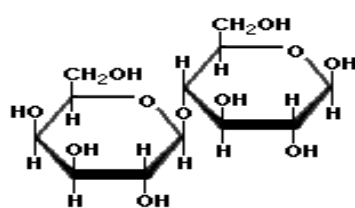
D-fruktoza



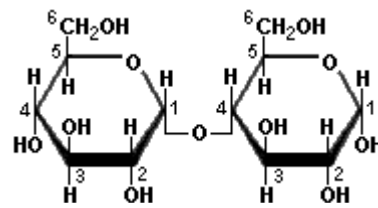
D-ksiloza



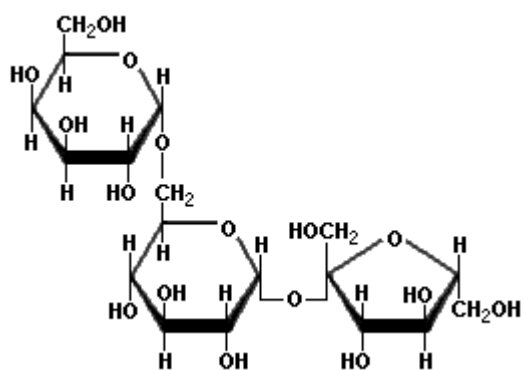
Saharoza



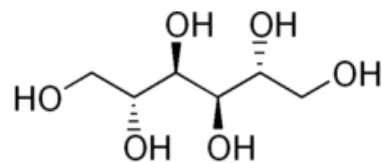
Laktoza



Maltoza

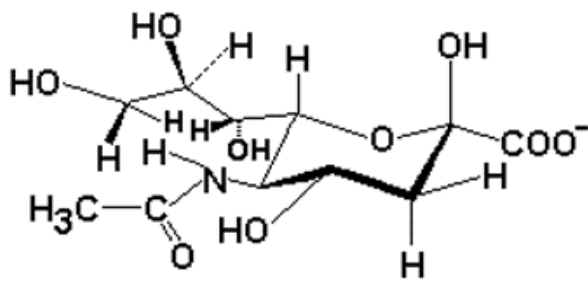


Rafinoza

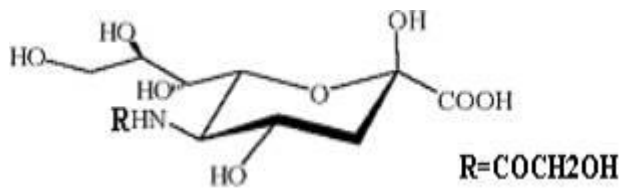


Manitol

Vse: (<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates.html>)



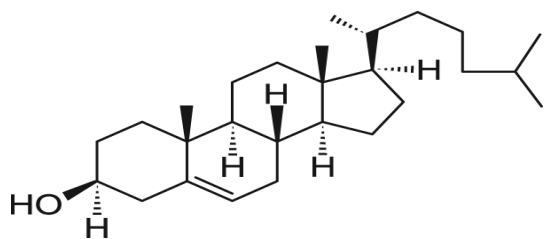
N-acetilneuraminska kislina (<http://www.glyconutrient.biz/N-acetylneuraminic-acid.htm>)



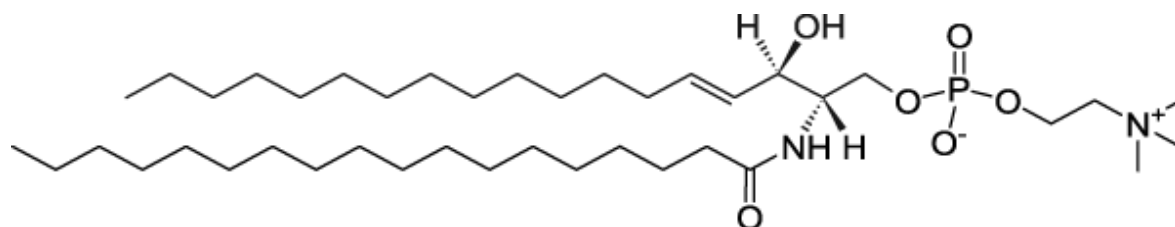
N-glikolilneuraminska kislina (<http://www.jkbio.com/PD2.htm>)

Priloga B

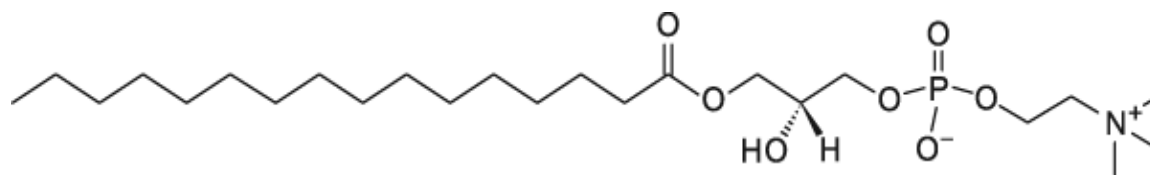
Lipidi



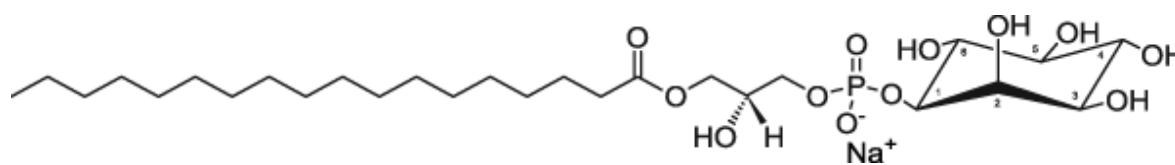
holesterol



sfingomielin iz svinjskih možgan



Lizofosfatidilholin

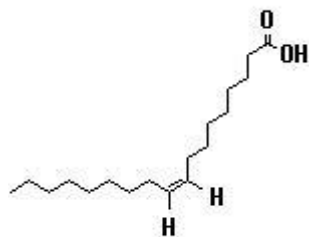


Lizofosfatidilinozitol

Vse: (<http://www.avantilipids.com/>)

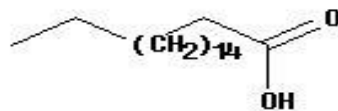
Priloga C

Maščobne kisline



Oleinska kislina

(<http://www.kii.ntf.uni-lj.si/etolja/oleinkis.htm>)



Stearinska kislina

(<http://www.kii.ntf.uni-lj.si/etolja/stearkis.htm>)