

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ines KAVČIČ

**HEMOLITIČNE UČINKOVINE V VODNEM EKSTRAKTU
BUKOVEGA OSTRIGARJA (*Pleurotus ostreatus*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**HEMOLYTIC COMPOUNDS IN THE WATER EXTRACT OF
OYSTER MUSHROOM (*Pleurotus ostreatus*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo, Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija biologije je za mentorja imenovala prof. dr. Kristino Sepčič in za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčič

Recenzent: prof. dr. Peter Maček

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Predsednik: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Datum zagovora: 25. 3. 2009

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ines Kavčič

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

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	577.2 (043.2) = 163.6
KG	ostreolizin/ <i>Pleurotus ostreatus</i> /bukov ostrigar/hemolitičen protein
AV	KAVČIČ, Ines
SA	SEPČIČ, Kristina (mentor)/MAČEK, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2009
IN	HEMOLITIČNE UČINKOVINE V VODNEM EKSTRAKTU BUKOVEGA OSTRIGARJA (<i>Pleurotus ostreatus</i>)
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 89 str., 5 pregl., 52 sl., 60 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Iz vodnega ekstrakta bukovega ostrigarja (<i>Pleurotus ostreatus</i>) smo izolirali 15 kDa velik citolitičen protein, ostreolizin (Oly), ki je član egerolizinske proteinske družine. Naš namen je bil ugotoviti ali je hemolitična aktivnost Oly posledica delovanja le njega samega ali pa delovanja dveh proteinov v kombinaciji, kot je značilno za sorodni pleurotolizin. Z gelsko kromatografijo na nosilcu Sephadex G-50 smo ločili vodni ekstrakt gob, preverili čistost hemolitično aktivnih vzorcev s pomočjo NaDS-elektroforeze ter s kombiniranjem različnih frakcij preverjali ali se bo hemolitična aktivnost dvignila (v primeru izolacije iz svežih gob) ali pojavila (pri izolaciji iz zmrznjenih gob). Zanimal nas je tudi vpliv dodatkov oksidanta fenantrolina, EDTA in proteaznih inhibitorjev med izolacijo (ki jih pri svoji izolaciji pleurotolizina uporabljajo Tomita in sod. 2004) in na stabilnost Oly shranjenega pri različnih temperaturah. Ugotovili smo, da Oly deluje kot monomer, in da zamrzovanje bukovih ostrigarjev pred izolacijo negativno vpliva na aktivnost proteina, vendar se ta ne izgubi. Prav tako dodatki v svežem supernatantu pri 4°C, predvsem fenantrolin in EDTA, negativno vplivajo na hemolitično aktivnost Oly, zato ga pri tej temperaturi shranjujemo brez vsakršnih dodatkov. Hemolitična aktivnost Oly se pri vseh stopnjah izolacije, ne glede na dodatke, najbolj ohrani z zamrzovanjem.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.2 (043.2) = 163.6
CX ostreolysin/*Pleurotus ostreatus*/oyster mushroom/hemolytic protein
AU KAVČIČ, Ines
AA SEPČIČ, Kristina (supervisor)/MAČEK, Peter (reviewer)
PPP SI-1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2009
TI HEMOLYTIC COMPOUNDS IN THE WATER EXTRACT OF OYSTER MUSHROOM (*Pleurotus ostreatus*)
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 89 p., 10 tab., 52 fig., 60 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Ostreolysin (Oly), a 15 kDa cytolytic protein from the aegerolysin protein family, was isolated from the water extract of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). The aim of this thesis was to find out whether Oly exerts its lytic activity as a monomer, or it consists of two different components, as it was shown for a related protein pleurotolysin. Water extract of oyster mushrooms was fractionated by a gel chromatography using Sephadex G-50, and samples were checked for their hemolytic activity and analysed by NaDS-electrophoresis. By combining different fractions, we wanted to see if the hemolytic activity will increase (in the case of isolation from fresh mushroom) or appear (in the case of frozen mushroom). We also analysed the influence of oxidants (phenanthroline), EDTA and protease inhibitors (that were used in pleurotolysin isolation, Tomita et. al., 2004), on Oly lytic activity during the isolation, and after incubation at two different temperatures. We found that Oly interacts with erythrocyte membranes as monomer. We also found that freezing the mushrooms before the isolation decreases the hemolytic activity, although it does not completely disappear. Furthermore, EDTA and phenanthroline have a deleterious influence on Oly activity at 4°C. The hemolytic activity is mostly preserved when different purifications steps are frozen at -20°C (with or without additions).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV.....	3
2.1.1 Struktura egerolizinskih proteinov	4
2.1.2 Izolacija nativnih in rekombinantnih egerolizinov.....	6
2.1.3 Fizikalna in kemijska karakterizacija egerolizinskih proteinov.....	8
2.1.4 Biološka aktivnost egerolizinskih proteinov.....	9
2.1.4.1 Interakcija z lipidnimi membranami.....	9
2.1.4.1.1 Hemolitična aktivnost (HA)	9
2.1.4.1.2 Permeabilizacija lipidnih veziklov.....	10
2.1.4.1.3 Vezava s serumskimi lipoproteini.....	12
2.1.4.1.4 Citotoksična aktivnost.....	12
2.1.4.2 Toksičnost za eksperimentalne živali	14
2.1.4.3 Vključitev v razvojni cikel proizvajajočega organizma	15
2.1.4.4 Možna uporaba egerolizinskih proteinov.....	15
2.2 IZOLACIJA OSTREOLIZINA (OLY) IN PLEUROTOLIZINA (PLY).....	17
2.2.1 Izolacija ostreolizina (Oly)	17
2.2.2 Izolacija pleurotolizina (Ply).....	17
3 MATERIALI IN METODE	21

3.1 MATERIAL	21
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema.....	21
3.1.2 Raztopine	22
3.1.3 Laboratorijska oprema.....	23
3.2 IZOLACIJA OSTREOLIZINA (OLY).....	24
3.3 VPLIV OKSIDANTA, EDTA IN PROTEAZNIH INHIBITORJEV NA UČINKOVITOST IZOLACIJE OSTREOLIZINA	27
3.4 MERJENJE HEMOLITIČNE AKTIVNOSTI (HA).....	29
3.4.1 Določanje hemolitične aktivnosti na spektrofotometru.....	29
3.4.2 Določanje hemolitične aktivnosti na čitalcu mikrotitrnih plošč	30
3.4.3 Hemolitična enota, totalna in specifična aktivnost, stopnja očiščenja in določanje koncentracije proteina	31
3.5 NaDS-ELEKTROFOREZA.....	32
4 REZULTATI.....	34
4.1 VPLIV ZMRZOVANJA NA UČINKOVITOST IZOLACIJE OSTREOLIZINA	34
4.2 VPLIV OKSIDANTA, EDTA IN PROTEAZNIH INHIBITORJEV NA UČINKOVITOST IZOLACIJE OSTREOLIZINA	38
4.3 PREVERJANJE PRISOTNOSTI DODATNE HEMOLITIČNE KOMPONENTE V VODNEM EKSTRAKTU BUKOVEGA OSTRIGARJA	66
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	71
5.1 RAZPRAVA	71
5.2 SKLEPI	77
6. POVZETEK	79
7. VIRI.....	81

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Slika 1: Izolacija ostreolizina iz svežih bukovih ostrigarjev s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram..	34
Slika 2: Izolacija ostreolizina iz 6 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram.....	35
Slika 3: Izolacija ostreolizina iz 20 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram.....	35
Slika 4 a: Totalna aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa zamrzovanja..	37
Slika 4 b: Specifična hemolitična aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa zamrzovanja.....	37
Slika 4 c: Stopnja očiščenja na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa zamrzovanja.....	38
Slika 5a: Totalna aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa (30 dni) zamrzovanja in dodatkov oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev.....	40
Slika 5 b: Specifična aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa (30 dni) zamrzovanja in dodatkov oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev.....	40
Slika 5 c: Stopnja očiščenja na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa (30 dni) zamrzovanja in dodatkov oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev.....	41
Slika 6: Izolacija ostreolizina iz 30 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev (z dodatkom oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev) s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram.....	42
Slika 7: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri 4°C.....	43
Slika 8: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA v času pri 4°C.....	43
Slika 9: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri 4°C.....	44
Slika 10: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri 4°C.....	44
Slika 11: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri 4°C.....	45
Slika 12: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri 4°C.....	45
Slika 13: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantrolina (FL) v času pri 4°C.....	46
Slika 14: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri 4°C.....	47
Slika 15: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA v času pri 4°C.....	47
Slika 16: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri 4°C.....	48
Slika 17: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri 4°C.....	48

Slika 18: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri 4°C.	49
Slika 19: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri 4°C.	49
Slika 20: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantrolina (FL) v času pri 4°C.	50
Slika 21: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri -20°C.	51
Slika 22: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA v času pri -20°C.	51
Slika 23: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	52
Slika 24: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri -20°C.	52
Slika 25: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	53
Slika 26: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	53
Slika 27: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	54
Slika 28: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri -20°C.	55
Slika 29: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA v času pri -20°C.	55
Slika 30: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	56
Slika 31: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri -20°C.	56
Slika 32: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	57
Slika 33: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	57
Slika 34: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantrolina (FL) v času pri -20°C.	58
Slika 35: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) pri 4°C in -20°C.	59
Slika 36: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim EDTA pri 4°C in -20°C.	60
Slika 37: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	60
Slika 38: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in EDTA pri 4°C in -20°C.	61
Slika 39: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	61
Slika 40: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	62
Slika 41: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI), EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	62

Slika 42: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) pri 4°C in -20°C.	63
Slika 43: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim EDTA pri 4°C in -20°C.	63
Slika 44: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	64
Slika 45: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in EDTA pri 4°C in -20°C.	64
Slika 46: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	65
Slika 47: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	65
Slika 48: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI), EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C.	66
Slika 49: Hitrost hemolize pri frakcijah po gelski kromatografiji (Sephadex G-50) z dodatkom hemolitično najaktivnejše frakcije po tej kromatografiji.	67
Slika 50: Variiranje hitrosti hemolize s konstantnim volumnom ostreolizina in naraščajočo količino vzorca V.	68
Slika 51: Spremembe v hemolitični aktivnosti vzorcev 1 svežih (SVG) in 20 dni zamrznjenih (ZMG) bukovih ostrigarjev ob dodatku čistega ostreolizina (6 µl).	69
Slika 52: NaDS elektroforeza vzorcev 2.	70

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Egerolizinska družina proteinov (Pfam; PF06355, oziroma InterPro: IPR009413) ter klonu Oly podobna zaporedja iz EMBL baze klonov EST in iz genomov nekaterih organizmov.....	5
Preglednica 2: Glavne fizikalne in kemijske značilnosti egerolizinskih proteinov.....	8
Preglednica 3: Citotoksične lastnosti egerolizinskih proteinov za različne celične linije	13
Preglednica 4: Podatki o aktivnosti ostreolizina iz svežih in zamrznjenih bukovich ostrigarjev na posamezni stopnji izolacije.....	36
Preglednica 5: Primerjava hemolitične aktivnosti na posameznih stopnjah izolacije brez dodatkov in z dodatkom oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev.. ..	39

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorpcija
Aa-Pri1	domneven protein iz gobe <i>Agrocybe aegerita</i>
AEBSF	aminoetil benzensulfonil fluorid hidroklorid
APS	amonijev persulfat
AS	amonijev sulfat
Asp-HS	Asp-hemolizin
BCA	bicinhoninsko-kislinski reagent
BL21(DE3)	sev bakterije <i>E. coli</i>
BSA	goveji serumski albumin
Cbm17.1	domnevni protein iz bakterije <i>Clostridium bifermentans</i>
Cbm17.2	domnevni protein iz bakterije <i>Clostridium bifermentans</i>
CDC	od holesterola odvisni citolizini (cholesterol-dependent cytolysins, CDCs)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (<u>c</u> omplementary DNA)
CH	holesterol
Cys	cistein
DEAE	dietilaminoetil
DEAE A-500	kolona z dietilaminoetilom
DEAE-5PW	kolona z dietilaminoetilom
DE-52	kolona z dietilom
dH ₂ O	destilirana voda
DH5 α	sev bakterije <i>E. coli</i>
DRM	membrane odporne na detergente (<u>D</u> etergent <u>R</u> esistant <u>M</u> embranes)
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina
ED ₅₀	efektivna doza, ki povzroči željeni vpliv pri 50-odstotkih preučevane populacije
EMBL	nukleotidna zbirka podatkov
EST	oznake izraženih zaporedij (<u>E</u> xpressed <u>S</u> equences <u>T</u> ags)
fenilToyopearl 650M	kolona z metakrilnim polimerom
FL	1,10-fenantrolin
HA	hemolitična aktivnost
HE	hemolitična enota
High Q	kolona s kvartarnim amoniakom kot nosilcem
HUVEC	endotelijske celice umbilikalne vene pri človeku
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (<u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
HT1080	celice fibrosarkoma pri človeku
IPR 009413	oznaka egerolizinske proteinske družine

It	izoelektrična točka
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev fosfat
LD ₅₀	letalna doza, ki povzroči smrt pri 50-odstotkih testirane populacije
L1210	levkemija pri človeku
MCF7	celice sesalčjega tumorja pri človeku
mRNA	informacijska RNA (<u>m</u> essenger RNA)
MT	molekulska masa
m/v	razmerje masa/volumen
NaCl	natrijev klorid
NaDS	natrijev dodecil sulfat
Oly	ostreolizin
OX	oksidant
ox-LDL	oksidirana oblika plazemskega lipoproteina nizke gostote
PA0122	domnevni protein iz bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pEX-A	plazmid EX-A
pEX-B	plazmid EX-B
PF06355	oznaka egerolizinske proteinske družine
PI	proteazni inhibitor
Ply	pleurotolizin
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
Resource TM Q	kolona s kvartarnim amoniakom kot funkcionalno skupino
rPly	rekombinantni pleurotolizin
SM	sfingomielin
TEMED	tetrametilen diamin
TFA	trifluoroacetna kislina
TNF- α	tumor nekrotični faktor-alfa
TRIS-HCl	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol-hidroklorid
Toyopearl HW50S	kolona z metakrilnim polimerom kot nosilcem
Triton X-100	neionski detergent
t ₅₀	čas potreben za 50-odstotno hemolizo
V _e	elucijski volumen
V _t	totalni volumen
Vt ₅₀	volumen vzorca, ki povzroči 50-odstotno hemolizo
V-79-379A	fibroblasti iz pljuč kitajskega hrčka
Vydac C-18 HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija s hidrofobnim nosilcem (alifatska skupina C ₁₈)
YT	medij iz 1.6% triptona, 1% kvasnega ekstrakta in 0.5% NaCl
1/t ₅₀	recipročna vrednost polovičnega časa hemolize

1 UVOD

Leta 2002 so Berne in sod. iz vodnega ekstrakta svežih bukovih ostrigarjev (*Pleurotus ostreatus*) izolirali aktivno hemolitično snov, ostreolizin (Oly). Oly je eden od predstavnikov egerolizinske proteinske družine, skupine majhnih kislih proteinov, do sedaj najdenih v bakterijah, plesnih, gobah in rastlinah. Sintetizira se v fazi razvoja primordijev in plodišč (Berne in sod., 2002), kjer domnevajo, da sodeluje kot celični signalizator, kakor tudi pri agregaciji hif ter apoptozi (Vidic in sod., 2005). Njegove pomembne biološke lastnosti so vezava na lipidne membrane in tvorba por.

V nanomolarnih koncentracijah Oly tvori pore v človeških, govejih in ovčjih eritrocitnih membranah, in sproži hemolizo s koloidno-osmotskim mehanizmom. Premer por ocenjujejo na 4 nm. Citotoksičen je tudi za sesalske celične linije (Sepčić in sod., 2003, 2004).

Ima nizko izoelektrično točko (5.0), molekulsko maso okrog 15 kDa, stabilen je v širokem pH območju in je termolabilen. Inhibirajo ga mikromolarne koncentracije Hg^{2+} in Fe^{2+} ionov (Berne in sod., 2002), ter prisotnost nenasičenih glicerofosfatidov, lizofosfolipidov in maščobnih kislin pod njihovo kritično micelarno koncentracijo (Sepčić in sod., 2003, 2004). Če gobe pred izolacijo zmrznemo, hemolitična aktivnost (HA) močno upade.

Kot kaže, Oly specifično prepoznava s holesterolom bogate membranske lipidne domene, najverjetneje tekočo urejeno fazo (Lo), saj je za vezavo in nastanek por nujno potrebna kombinacija sfingomielina (SM) in holesterola (CH).

Leta 2004 pa so Tomita in sod. iz zmrznjenih bazidiokarpov bukovih ostrigarjev izolirali dvokomponentni citolizin, ki so ga zaradi specifičnosti za SM poimenovali pleurotolizin (Ply). Njegova manjša, 17-kDa komponenta (PlyA) ima 93% identičnost z N-terminalno aminokislinsko sekvenco Oly (Tomita in sod., 2004), medtem ko večja 59-kDa komponenta (PlyB) ni podobna zaporedju nobenega do sedaj znanega proteina (Tomita in sod., 2004). Za HA je potrebna najprej vezava PlyA in nato PlyB komponente na membrane bogate s SM.

Najbolj učinkovita sta, ko se vežeta v molarnem razmerju 3:1. Oblikuje se v obroč oblikovan transmembranski kompleks velikosti 700-kDa, ki tvori pore s premerom 4-5 nm (Tomita in sod., 2004).

Kljub veliki podobnosti PlyA in Oly sta to različna proteina, ki se najverjetneje razlikujeta v C-terminalnem delu na osnovi naslednjih dejstev: (i) PlyA ne kaže HA brez PlyB, (ii) s Ply inducirana liza človeških eritrocitov je specifično inhibirana s SM, medtem ko je Oly inhibiran le s serijo lizofosfolipidov in ne s SM (Sepčić in sod., 2003, 2004). Tomita in sod. (2004) so tudi opazili izgubo HA v predhodno zamrznjenem homogenatu gob po gelski filtraciji z uporabo gela Sephadex G-75. Po združenju vseh posameznih frakcij pa se ta ponovno pojavi. Pojavi se vprašanje ali je tudi naš Oly bikomponenten. Pri izolaciji Oly se aktivnost sprti izgublja (Berne in sod., 2002), torej bi lahko izgubili drugo komponento.

Cilji naloge:

Cilj naloge je bil razrešiti vprašanje ali je HA v ekstraktu bukovega ostrigarja posledica delovanja enega samega proteina (Oly, oz. njegovega analoga PlyA) ali pa delovanja dveh proteinov v kombinaciji, kot je opisal Tomita s sod. (2004). S kromatografsko tehniko smo ločili vodni ekstrakt bukovih ostrigarjev ter s kombiniranjem različnih frakcij poskušali ugotoviti ali se bo HA povečala (v primeru izolacije iz svežih gob) ali pojavila (izolacija iz zmrznjenih gob). Morebitno dodatno aktivno učinkovino smo nameravali dodatno očistiti in določiti njene osnovne fizikalne in biokemijske lastnosti, ter jo primerjati s PlyB (Tomita in sod., 2004). Zanimal nas je tudi vpliv dodatkov oksidanta, kelatorja dvovalentnih kationov in proteaznega inhibitorja (ki jih v izolaciji Ply uporabi Tomita s sod. 2004) na HA Oly iz zamrznjenih gob.

Delovne hipoteze:

Če je HA v ekstraktu bukovega ostrigarja res posledica delovanja bikomponentnega citolizina, bi pri testiranju biološke aktivnosti združenih frakcij morali opaziti dvig aktivnosti (če so frakcije izolirane iz svežih gob). Domnevamo, da podenota B, ki so jo izolirali Tomita in sod., povečuje aktivnost podenote A (Oly), katere aktivnost se pri zmrznjenih gobah izgubi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV

Leta 2002 so definirali novo, egerolizinsko proteinsko družino (PF06355; IPR 009413). Ta vključuje nekaj izoliranih in sekvenciranih proteinov, ter številne genomske prepise in zaporedja, napovedana iz oznak izraženih zaporedij. Družina obsega dobro znan Asp-hemolizin iz patogene plesni *Aspergillus fumigatus* (Sakaguchi in sod., 1975) in druge pred kratkim izolirane visoko identične proteine: ostreolizin (Berne in sod., 2002) in pleurotolizin A (Tomita in sod., 2004) iz užitne gobe *Pleurotus ostreatus*, eringolizin iz vrste *Pleurotus eryngii* (Ngai in Ng, 2006), egerolizin iz gobe *Agrocybe aegerita* (Fernandez-Espinar in Labarère, 1997, Berne in sod., 2002), dva domnevna proteina iz bakterije *Clostridium bifermentans* (Cbm17.1 in Cbm17.2) (Barloy in sod., 1998), domneven protein PA0122 iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (Stover in sod., 2000), domneven protein iz plesni *Neurospora crassa* (Galagan in sod., 2003) in proteine napovedane iz oznak izraženih zaporedij ter genomskih nukleotidnih zaporedij.

Prvi izoliran (Sakaguchi in sod., 1975) in sekvenciran (Ebina in sod., 1994) egerolizinski protein je bil Asp-hemolizin (Asp-HS), letalna in kardiotoksična komponenta patogene plesni *Aspergillus fumigatus*. Ta oportunistični patogen povzroča širok spekter resnih bolezni, vključno z invazivno aspergilozo. Patogenost *A. fumigatus* je posledica številnih toksičnih substanc (komponent celične stene, alergenov, pigmentov, adhezinov, encimov in toksinov), ki delujejo na aditiven in/ali sinergističen način (Rementeria in sod., 2005). Asp-hemolizin, ki je bil odkrit *in vivo* med eksperimentalno infekcijo miši s sporami *A. fumigatus* (Ebina in sod., 1982), ima verjetno pomembno vlogo ojačanja drugih virulenčnih mehanizmov (Rementeria, 2005). Z razvojem genomike so nato odkrili številne druge podobne proteine. Prvi protein, ki je kazal precejšnjo identičnost v aminokislinski sekvenci z Asp-hemolizinom, je bil prepis *Aa-Pr1* gena iz gobe *Agrocybe aegerita* (Fernandez-Espinar in Labarère, 1997). Temu sta kmalu

sledila dva domnevna proteina iz bakterije *Clostridium bifermentans* (Barloy in sod., 1998). V zadnjih nekaj letih so bili odkriti še številni drugi proteini ali prepisi na podlagi komplementarne deoksiribonukleinske kisline (cDNA) z visoko identično aminokislinsko sekvenco (Stover in sod., 2000, Berne in sod., 2002, Galagan in sod., 2003, Tomita in sod., 2004, Ngai in Ng, 2006), ki so pripisani egerolizinom. Izkazalo se je, da so vsi izolirani proteini kisli, imajo molekulsko maso od 15 do 17 kDa in si delijo nekatere pomembne biološke lastnosti, kot je membranska aktivnost ter sodelovanje v razvoju organizma, ki jih proizvaja.

2.1.1 Struktura egerolizinskih proteinov

Določena cDNA ostreolizina kodira 137 aminokislinskih proteinov, ki pripada egerolizinski družini. Vsebuje 13 pozitivno (arginin, lizin, histidin) in 16 negativno (aspartat, glutamat) nabitih ostankov, relativno visoko vsebnost aromatskih ostankov (šest triptofanskih, štiri tirozinske in dva fenilalanilna ostanka) in dva cisteinska (Cys) ostanka. Cys 61 in 93 v Oly in triptofanski ostanki (5, 27, 91, 95, 102, 111) so ohranjeni, ter imajo možne strukturne ali/in funkcionalne vloge (Berne in sod., 2005). Intaktni Cys ostanki so, kot poročajo, nujno potrebni za HA Oly in Asp-hemolizina (Berne in sod., 2002). Regija ostankov 91-102 vsebuje tri triptofane in Cys 93. S triptofanom bogate regije pa so opazili v nekaterih drugih proteinih, ki tvorijo pore, in so odgovorne za začetek pripenjanja na membrano (Hong in sod., 2002, Ramachandran in sod., 2002). Triptofan je lahko zaradi sposobnosti tvorbe vodikovih vezi in hidrofobnih interakcij pomemben tudi pri vzdrževanju strukture in stabilnosti proteinov. Kombinirani aromatski in cisteinski ostanki pa so pri od holesterola odvisnih bakterijskih toksinih, ki tvorijo pore, vključeni v vezavo sterolov (Palmer in sod., 2004).

Iz cDNA dobljena primarna struktura ostreolizina je 79% identična z ostreolizinsko izoformo PlyA (Sakurai in sod., 2004) in 62% identična z egerolizinsko sekvenco izpeljano iz Aa-Pril1 gena (Fernandez-Espinar in Labarère, 1997). Najmanj podoben član (protein iz *N. crassa*) je 27% identičen in 40% podoben ostreolizinu (Berne in sod., 2005) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Egerolizinska proteinska družina (Pfam; PF06355, oziroma InterPro: IPR 009413) ter klonu Oly podobna zaporedja iz EMBL baze klonov EST in iz genomov nekaterih organizmov. (Berne S. 2004: 52)

Ime (oznaka v bazi podatkov)	Ident.	Organizem	Referenca
Ostreolizin – protein (50 ak) (P83467)	80%	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Berne in sod., 2002
PriA – mRNA (AAL57035)	79%	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ma in Kwan, 2000 (neobjavljeno)
PlyA – mRNA (AB177869)	79%	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Sakurai in sod., 2004
13 klonov cDNA iz EMBL EST	79%	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lee in sod., 2002
Prekurzor aegerolizina Aa-Pri1 – mRNA (O42717)	62%	<i>Agrocybe aegerita</i>	Fernandez-Espinar in Labarère, 1997
Prekurzor Asp-hemolizina Asp-HS – mRNA (Q00050)	44%	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ebina in sod., 1994
Klon cDNA iz EMBL EST (BQ583143)	38%	<i>Beta vulgaris</i>	Herwig in sod., 2002
Klon cDNA iz EMBL EST (AU250367)	38%	<i>Lolium multiflorum</i>	Ikeda S., 2004 (neobjavljeno)
Hemolizinu podoben protein – gen <i>cbm17.1</i> (CAA71483)	32%	<i>Clostridium bifermentans</i>	Barloy in sod., 1998
Hipotetičen protein v genomu <i>P. aeruginosa</i> , sev UCBPP-PA14 (ZP_00140537)	32%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Montgomery in sod., 2002, 2003 (neobjavljeno)
Hipotetičen protein v genomu <i>P. aeruginosa</i> , sev PA01 (NP_248812)	31%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Stover in sod., 2000
Sintetičen konstrukt PA0122 (AAT49644)	31%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Qiu in sod., 2004 (neobjavljeno)
Klon cDNA iz EMBL EST (CN242319)	31%	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Felipe in sod., 2003
Hemolizinu podoben protein – gen <i>cbm17.2</i> (CAA71484)	30%	<i>Clostridium bifermentans</i>	Barloy in sod., 1998
Hipotetičen protein v genomu <i>N. crassa</i> (XP-322733)	27%	<i>Neurospora crassa</i>	Galagan in sod., 2003

Ostreolizin pri sobni temperaturi obstaja v monomernem nativnem stanju z rigidno terciarno strukturo in s prevladujočo β -ravninsko sekundarno strukturo (Berne in sod., 2005). Večina znanih egerolizinov obstaja v monomernih oblikah (Sakaguchi in sod., 1975, Bernheimer in Avigad, 1979, Berne in sod., 2002, Ng in Ngai, 2006), kar potrjuje njihova molekulska masa. Več kot 80% proteinov z manj kot 220 aminokislinskimi ostanki ima namreč eno domeno.

PlyA izoliran iz gobe *P. ostreatus* pa deluje kot bi-komponenten citolizin v sodelovanju s 59-kDa PlyB (Tomita in sod., 2004).

Oly in najverjetneje tudi drugi proteini iz egerolizinske družine se vežejo z lipidno membransko površino v kompaktni, nativni konformaciji. Nadaljni konformacijski prehodi so nujni za translokacijo posameznega dela polipeptidne verige (Berne in sod., 2005). Pri inserciji proteina v lipidni dvosloj pride do 10% povišanja v α -heliksu, na račun zmanjšanja deleža β -strukture (Sepčić in sod., 2003). Mehanizem insercije je podoben mehanizmu druge družine majhnih proteinov z eno domeno, ki tvorijo pore, in sicer mehanizmu aktinoporinov iz morskih vetrnic. Podobnosti so še v pojavu stanja razrahljane kroglice pri nizkem pH in optimumu tvorbe por pri pH~8 (Berne in sod., 2005).

2.1.2 Izolacija nativnih in rekombinantnih egerolizinov

Prvi izolirani egerolizinski protein, Asp-hemolizin, je ena izmed toksičnih komponent plesni *A. fumigatus*. Kot je že bilo omenjeno, ta patogena gliva proizvaja različne domnevne virulene faktorje. Tako je bilo čiščenje opravljeno s sledenjem HA med izolacijskim postopkom in ločevanjem hemolitične sestavine od drugih toksičnih snovi (naprimer dermonekrotičnih, neurotoksičnih in nefrotoksičnih). Navedbo proteinske narave hemolitične komponente v plesni *A. fumigatus* najdemo že v zelo zgodnjih poročilih (Bodin in Gautier, 1906), ki opisujejo izgubo polovice njene toksičnosti po segrevanju, in je bila kasneje podprta še s strani drugih avtorjev, ki so poskušali očistiti hemolitične sestavine iz centrifugiranega homogenata micelija (Henrici in sod., 1938, Tilden in sod., 1961). Postopek čiščenja je bil dalje izboljšan s precipitacijo hemolitične sestavine z acetonom in amonijevim sulfatom (AS)

(Tilden in sod., 1961, 1963) ter kolonsko elektroforezo in ionsko-izmenjevalno kromatografijo na dietilaminoetilni (DEAE) celulozni koloni (Rau in sod., 1961). Protein je bil končno očiščen do homogenosti iz seva *A. fumigatus* Fresenius-Muramatsu, izoliranega iz pljuč okuženega pingvina (Sakaguchi in sod., 1975). Čiščenje je vključevalo precipitacijo z AS, anionsko kolonsko kromatografijo in dodatne gelske filtracije, in ta osnovna shema je bila kasneje uporabljena za vse ostale egerolizine (Bernheimer in Avigad, 1979, Berne in sod., 2002, Tomita in sod., 2004). Pojavljajo se tudi nekatere posebnosti v izolaciji egerolizinskih proteinov iz gob. Oly in PlyA sta, na primer, lahko izolirana v desetkrat višjem donosu iz sveže nabranih gob kot iz zmrznjenih (Tomita in sod., 2004, S. Berne, osebno sporočilo). Optimalna izolacija je dosežena iz primordijev in mladih plodišč *P. ostreatus*, kar sovpada z dejstvom, da med to razvojno stopnjo goba vsebuje najvišjo opaženo koncentracijo hemolizina (Berne in sod., 2002, Vidic in sod., 2005).

Sakurai in sod. pa so leta 2004 klonirali in izrazili cDNA molekule, ki kodirajo PlyA in PlyB podenoti, v bakteriji *Escherichia coli*. Tako so lahko okarakterizirali zrelo in prekursorško obliko rekombinantnih proteinov, rPlyA in rPlyB. Rekombinantni PlyA je bil topen, na sfingomielin vezavni protein, z identično N-terminalno aminokislinsko sekvenco kot naravni PlyA, z izjemo prvega metionina, za katerega predvidevajo, da se iz rekombinantnega proteina odstrani v bakteriji (prav tako pri rPlyB). V nasprotju s funkcionalnim 59-kDa rekombinantnim PlyB, se je značilen del naravnega PlyB razcepil in tvoril nekovalentno povezana fragmenta (na N-koncu 18-kDa in na C-koncu 41-kDa fragment) tudi ob dodatku proteaznih inhibitorjev. Rekombinantna PlyA in PlyB se kooperativno sestavita v 700-kDa kompleks, ki tvori poro v človeškem eritrocitu, in povzročita rahlo bolj učinkovito hemolizo kot naravna PlyA in PlyB. Domnevajo, da je višja specifična aktivnost rekombinantnega pleurotolizina povezana z intaktno PlyB molekulo. Za razliko od rPly, pri ostalih rekombinantnih proteinih (rekombinantni Cbm17.1, Cmb17.2, PA0122, ostreolizin in Asp-hemolizin) niso zasledili hemolitične aktivnosti.

2.1.3 Fizikalna in kemijska karakterizacija egerolizinskih proteinov

Proteini, ki pripadajo egerolizinski družini si delijo številne skupne značilnosti. Vsi imajo zelo nizko izoelektrično točko (It), podobno molekulsko maso (MT) in so termolabilni (Preglednica 2). So tudi stabilni v širokem pH območju, v glavnem od 4 do 10 (Sakaguchi in sod., 1975, Berne in sod., 2005).

Preglednica 2: Glavne fizikalne in kemijske značilnosti egerolizinskih proteinov. *možna agregacija; ** nižja MT, verjetno posledica proteolitične degradacije proteina; *** predvidene vrednosti na podlagi cDNA

Protein	Organizem	MT (Da)	It	Reference
Asp-hemolizin	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresenius-Muramatsu linija)	30000*	4.0	Sakaguchi in sod., 1975
		14275	5.24	Ebina in sod., 1994
Pleurotolizin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	12600**	6.4	Bernheimer in Avigad, 1979
Pleurotolizin A	<i>Pleurotus ostreatus</i>	17000		Tomita in sod., 2004
		15136***	5.87	Sakurai in sod., 2004
Egerolizin	<i>Agrocybe aegerita</i>	16093***	5.7***	Fernandez-Espinar in Labarère, 1997
Cbm17.1	<i>Clostridium bifermentans</i>	17200***	5.41	Barloy in sod., 1998
Cbm17.2	<i>Clostridium bifermentans</i>	17463***	5.82	Barloy in sod., 1998
Ostreolizin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	17000	5.0	Berne in sod., 2002
		14975***		Sepčič in sod., 2004
		14855***	4.82	Berne in sod., 2005
Eringolizin	<i>Pleurotus eryngii</i>	17000		Ngai in Ng, 2006

2.1.4 Biološka aktivnost egerolizinskih proteinov

2.1.4.1 Interakcija z lipidnimi membranami

2.1.4.1.1 Hemolitična aktivnost (HA)

Asp-hemolizin v eritrocitni membrani oblikuje značilne pore in sproži hemolizo s koloidno-osmotskim mehanizmom. Raziskave z uporabo vrstične elektronske mikroskopije so pokazale, da ta hemolizin oblikuje obroče in zaplate na površini eritrocitne membrane (Ebina in sod., 1984). Agregacija na površini eritrocitnih membran in inhibicija hemolize z uporabo osmotskih protektantov različnih molekulskih mas je bila kasneje dokazana tudi za pleurotolizin (Bernheimer in Avigad, 1979, Tomita in sod., 2004), ostreolizin (Sepčič in sod., 2003) in eringolizin (Ng in Ngai, 2006). Hidrodinamični radij dobljenih por je bil ocenjen na okrog 2 nm (Sepčič in sod., 2003, Tomita in sod., 2004). Vsi ti egerolizini so hemolitični v sub-mikromolarnem območju. Rekombinantna egerolizina bakterijskega izvora, Cbm17.1 in Cbm17.2, nimata hemolitične aktivnosti (Barloy in sod., 1998), kar so razložili z njuno agregacijo. Z izjemo bi-komponentnega pleurotolizina (Sakurai in sod., 2004), je pomanjkanje permeabilizacijskih lastnosti opaženo tudi pri drugih rekombinantnih egerolizinih (Kumagai in sod., 2002, Juarez-Perez in Delecluse, 2001, K. Sepčič, osebno sporočilo). Čeprav nima litičnih lastnosti, se rekombinantni Asp-hemolizin veže na oksidirano obliko lipoproteinov nizke gostote (ang. *low-density lipoproteins*, ox-LDL) z enako afiniteto kot v njegovi nativni obliki (Kumagai in sod., 2002).

pH-optimuma za vezavo egerolizinov na eritrocitno membrano in njeno permeabilizacijo se ne prekrivata. Optimalna vezava je običajno dosežena pri pH 5-7, kot je prikazano za Asp-hemolizin (Ebina in sod., 1984) in ostreolizin (Berne in sod., 2005). Nasprotno se maksimalna hemoliza pojavi pri pH 7-8 (Bernheimer in Avigad, 1979, Berne in sod., 2005). Kakorkoli, egerolizini obdržijo svojo membransko aktivnost v širokem rangu pH, od 3.5 do 10.5 (Sakaguchi in sod., 1975, Ebina in sod., 1984, Berne in sod., 2005). Meritve triptofanske

fluorescence razkrijejo, da lipidno vezan Oly spremeni svojo konformacijo, kar napeljuje na to, da vezava na dvosloj priključuje nadaljnne konformacijske prehode, nujne za vstavljanje in oblikovanje por (Berne in sod., 2005). Z egerolizini povzročeno lizo lahko preprečimo z uporabo dvovalentnih ionov, kot so Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} in Pb^{2+} , in kasneje obnovimo z uporabo β -merkaptoetanol ali cisteina (Sakaguchi in sod., 1975, Berne in sod., 2002, Ng in Ngai, 2006). Zgodnje raziskave, ki obsegajo kemične modifikacije Asp-hemolizina predvidevajo, da histidinski ostanki niso nujni za HA, medtem ko kaže, da imajo v njej vlogo cisteini in arginini (Kamaguchi in sod., 1979, Yokota in sod., 1984a, Yokota in sod., 1984b, 1985). Udeležba intaktnih cisteinskih ostankov v hemolitičnih procesih je bila kasneje dokazana tudi za Oly (Berne in sod., 2002, 2005).

Različna občutljivost eritrocitov iz različnih vrst je druga zanimiva značilnost, ki je bila dokazana za različne egerolizine. Na primer; Asp-hemolizin je bolj litičen za kokošje in človeške eritrocite, kot za tiste pridobljene iz miši in podgan (Sakaguchi in sod., 1975). Njegova aktivnost za žabje eritrocite je 833-krat nižja v primerjavi z eritrociti iz kokoši (Sakaguchi in sod., 1977). Rahlo različen vzorec kaže eringeolizin, ki je bolj dovzeten za sesalčje eritrocite kot za tiste iz ptic (Ng in Ngai, 2006). Membranska aktivnost Ply korelira z vsebnostjo SM v eritrocitih (Bernheimer in Avigad, 1979, Tomita in sod., 2004). V nasprotju s tem, Oly ne kaže razlik v lizi ovčjih, govejih in človeških eritrocitov (Sepčić in sod., 2003), vendar je veliko manj učinkovit za glodalske eritrocite (Žužek in sod., 2006).

2.1.4.1.2 Permeabilizacija lipidnih veziklov

Litična aktivnost številnih proteinov, ki tvorijo pore, se začne z njihovo prepoznavo značilnih membranskih komponent, npr. membranskih lipidov. Egerolizinski proteini v tem smislu kažejo veliko heterogenost. Liposomi sestavljeni iz jajčnega fosfatidilholina v kombinaciji z različnimi drugimi lipidi ne inhibirajo z Oly povzročene hemolize (Sepčić in sod., 2003). V nasprotju s tem, liposomi sestavljeni iz ovčjega eritrocitnega SM in CH v 1:1 molarnem razmerju, uspešno inhibirajo vezavo in litično aktivnost pleurotolizina (Bernheimer in Avigad,

1979, Tomita in sod., 2004) in ostreolizina (Sepčič in sod., 2004). Ti vplivi so odsotni, če so liposomi sestavljeni iz holesterola v kombinaciji z drugimi lipidi, zato so predlagali, da je Ply specifični vezavni protein za SM (Bernheimer in Avigad, 1979, Tomita in sod., 2004). Raziskave izvedene na Oly pa predvidevajo, da je specifična interakcija proteina s SM:CH liposomi mogoča zaradi specifične interakcije proteina z membranskimi mikrodomenami obogatenimi s CH (lipidnimi rafti). Te izjemno pomembne membranske mikrodomene so vpletene v številne pomembne biološke funkcije, kot so eksocitoza in endocitoza, signalna transdukcija, vstop patogenov in pritrnitev različnih ligandov (Simons in Ikonen, 1997, London, 2002, Edidin, 2003), in se nahajajo v tako imenovani tekoči urejeni lipidni fazi. Domene v tekoči urejeni lipidni fazi so bolj odporne na raztapljanje z detergenti kot domene v tekoči neurejeni fazi (Lichtenberg in sod., 2005), in zato so lipidni rafti pogosto imenovani za detergent odporne membrane (ang. *detergent-resistant membranes*, DRM) (Simons in Ikonen, 1997). Številni rezultati dobljeni z Oly jasno kažejo na interakcijo ostreolizina z opisanimi membranskimi domenami. Oly se veže na DRM izolirane iz SM:CH (1:1) veziklov in celic ovarijev kitajskega hrčka (Sepčič in sod., 2004). Razen tega se permeabilizacija SM:CH (1:1) veziklov z Oly pojavi le, če vezikli vsebujejo 30 mol% ali več holesterola, t.j. pri koncentracijah, pri katerih steroli sprožijo oblikovanje tekoče urejene faze (de Almeida in sod., 2003). Interakcijo ostreolizina z domenami, bogatimi s CH, lahko zmanjšamo ali prekinemo (i) z dodatkom mono- in di-nenasičenega fosfatidilholina (Sepčič in sod., 2004), (ii) z zamenjavo holesterola z drugimi naravnimi steroli ali holesterolnimi derivati (Rebolj in sod., 2006), (iii) z dodatkom mikromolarnih koncentracij maščobnih kislin in lizofosfolipidov (Sepčič in sod., 2003, Chowdhury et al. 2008) in (iv) predtretiranjem membran z metil- β -ciklodekstrinom, ki veže holesterol (Chowdhury et al. 2008). Kot kaže, Oly (in verjetno tudi ostali egerolizini) ne prepozna sfingomielina, ampak prepozna in se veže na specifične vzorce, ki se oblikujejo iz holesterolnih molekul na površini bioloških membran. Prav tako se Oly ne veže s čistim CH (Sepčič et al. 2003), vendar je ta sterol ključen za njegovo membransko aktivnost, ki je močno odvisna od membranske koncentracije holesterola (Sepčič et al. 2004, Rebolj et al. 2006). Ta CH odvisnost Oly je podobna bakterijskim tiolno-aktiviranim

citolizinom (cholesterol-dependent cytolysins, CDC), zato lahko ostreolizin in verjetno tudi druge egerolizine po funkciji smatramo kot CDC (Rebolj et al. 2006).

Razkritje, da se Asp-hemolizin veže specifično in z visoko afiniteto na ox-LDL (Kudo in sod., 2001), je vodilo v natančnejše raziskave interakcije med dvema molekulama. Predlagali so, da se lahko protein direktno veže z lizofosfatidilholinom, ki je prisoten na površini LDL-delca, in ta direktna vezava je bila dokazana s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije (Kudo in sod., 2002). Kakorkoli, takšne specifične vezave niso mogli dokazati za Oly, čeprav je njegova membranska aktivnost močno inhibirana z lizofosfolipidi in maščobnimi kislinami (Sepčić in sod., 2003). Bolj je verjetno, da lizofosfolipidi vplivajo na membransko aktivnost ostreolizina s spremembo fizičnih lastnosti membrane, npr. s porazdelitvijo v tekoče urejene membranske domene (Chowdhury in sod., 2008).

2.1.4.1.3 Vezava s serumskimi lipoproteini

Številne skupine so poročale, da je membranska aktivnost egerolizinskih proteinov lahko inhibirana z dodatkom seruma (Sakaguchi in sod., 1977, Sepčić in sod., 2003, 2004). Vsekakor je vezava z ox-LDL še ena značilna posebnost najbolj preučenega egerolizinskega proteina; Asp-hemolizina (Fukuchi, 2001). Ta protein kaže lokalne podobnosti (26.5% identičnost in 68.8% podobnost prekrivanj čez 34 aminokislin) s človeškimi LDL receptorskimi prekurzorji (Ebina in sod., 1994) in se veže na številne lipoproteinske komplekse človeške plazme, posebno na ox-LDL (Fukuchi in sod., 1996a, 1996b, Fukuchi in sod., 1998). Poskusi s površinsko plazmonsko resonanco so potrdili, da je vezava Asp-hemolizina z ox-LDL vsekakor zelo specifična (K_d 0.63 $\mu\text{g/ml}$) (Kudo in sod., 2001).

2.1.4.1.4 Citotoksična aktivnost

Toksičnost egerolizinov za številne celične linije (Preglednica 3) je najbolj verjetno tudi posledica njihovih citolitičnih vplivov. Direktna opazovanja nekaterih tumorskih celičnih linij

izpostavljenih Oly, kažejo tipična znamenja koloidno-osmotske hemolize, kot so napihovanje, mehurjenje in degranulacija celic (Sepčič in sod., 2003, Maličev in sod., 2007). Litični vpliv na različne celice lahko povzroči hiperkalemijo, kar se kaže v kardiotoksičnosti in letalnih učinkih (Žužek in sod., 2006). Razen tega, makrofagi tretirani z Asp-hemolizinom izražajo informacijsko RNA (messenger RNA, mRNA) za številne citokine, kot so tumor nekrotični faktor-alfa (TNF- α), interleukin-1a in 1b (Kumagai in sod., 1999).

Preglednica 3: Citotoksične lastnosti egerolizinskih proteinov za različne celične linije. ED₅₀ – efektivna doza, je količina snovi, ki povzroči željeni vpliv pri 50-odstotkih preučevane populacije.

Protein	Celična linija	ED ₅₀ (mg/ml)	Čas izpostavitve (h)	Reference
Asp-hemolizin	Leukociti (človeški)	500	/	Ebina in sod., 1983
	Alveolarni makrofagi (morski prašiček)	60	/	Ebina in sod., 1983
	Peritonejni makrofagi (mišji)	25	1	Kumagai in sod., 1999
	Umbilikalne venske endotelijske celice (človeške)	100	1	Kumagai in sod., 2001
Ostreolizin	HT 1080 (fibrosarkom, človeški)	10	2	Sepčič in sod., 2003
	MCF 7 (sesalčji tumor, človeški)	10	2	Sepčič in sod., 2003
	Kitajski hrček (ovarijske celice)	1	0.25	Sepčič in sod., 2004
	Sklepni hondrociti (človeški)	1	1	Maličev in sod., 2007
	Fibroblasti (pljuča kitajskega hrčka, V-79-379A)	1.3	1	Rebolj in sod., 2007
	Endotelijske celice (človeška umbilikalna vena, HUVEC)	2.2	1	Rebolj in sod., 2007
Eringolizin	L1210 levkemija (človeški)	/	10	Ngai in Ng, 2006

2.1.4.2 Toksičnost za eksperimentalne živali

Toksični in letalni vplivi egerolizinskih proteinov so najbolj obsežno raziskani pri Asp-hemolizinu, ki je potencialni virulenčni dejavnik patogene plesni *Aspergillus fumigatus*. Ta oportunistični patogen je že dolgo časa znan po tem, da povzroča neurotoksične (Bodin in Gauthier, 1906, Henrici, 1938), dermatoksične (Tilden, 1961, Sakaguchi in Yokota, 1972), nefrotoksične (Tilden, 1961, 1963), komplement-inhibitorne (Budzko in Negroni, 1976) in hemolitične učinke (Henrici, 1983, Tilden, 1961). Asp-hemolizin ima polovično letalno dozo (LD₅₀) pri 750 in 350 µg/kg za miši in kokoši (Sakaguchi in sod., 1975). Asp-hemolizin je sekretorni protein (Ebina in sod., 1982, 1994) in je bil tudi zaznan med *in vivo* (*i.v.*) eksperimentalno infekcijo miši s sporami *A. fumigatus* (Ebina in sod., 1982). Histopatološka odkritja v miših po *i.v.* administraciji Asp-hemolizina vključujejo perivaskularne lezije različnih stopenj v ledvicah, srcu, jetrih in možganih, zvišanje kapilarne prepustnosti, krčenje črevesa in citotoksičnost (Ebina in sod., 1983, 1984). Protitelesa proti Asp-hemolizinu lahko uspešno zaščitijo miši pred infekcijo, ki se prenaša s sporami (Ebina in sod., 1982).

Čeprav je bukov ostrigar komercialno pomembna in tržno zelo cenjena užitna goba, so v preteklosti opazili tudi sporadične lokalne intoksikacije pri človeku in živalih, po zaužitju velikega števila svežih gob. Toksičnost je, kot kaže, posledica delovanja termolabilnih proteinskih molekul (Al-Deen in sod., 1987). Nedavne raziskave Oly so razkrile, da je ta protein odgovoren za kardiorespiratorne in toksične vplive pri glodalcih in za njihovo smrt po intravenski administraciji (LD₅₀ 1175 µg/kg). Kardiotoksični vplivi sproženi z Oly povzročijo povečanje tenzije aorte in lizo endotelijskih celic, kar se kaže kot hiperkalemija (Rebolj in sod., 2007). Histopatološki vplivi Oly na miši niso preučeni; kakorkoli, vodni ekstrakt *P. ostreatus* povzroči krvavitve v črevesju, jetrih, pljučih in ledvicah, ter degenerativne spremembe v jetrih, z LD₅₀ višjo kot 3000 µg/kg (Al-Deen in sod., 1987).

2.1.4.3 Vključitev v razvojni cikel proizvajajočega organizma

Številni rezultati nakazujejo, da egerolizini igrajo pomembno vlogo v razvojnem ciklu organizma, ki jih proizvaja. Fernandez-Espinar in Labarère (1997) sta odkrila, da je sinteza mRNA, ki kodira *Aa-Pril* gen v gobi *Agrocybe aegerita*, specifično povečana na razvojni stopnji primordija. Produkt tega gena je bil kasneje očiščen in imenovan egerolizin (Berne in sod., 2002). Natančno spremljanje pojavljanja ostreolizina in egerolizina v tkivih, in njegova soodvisnost s stadiji razvoja gob, je bilo narejeno z uporabo imunocitokemijskih metod. Oba proteina so preferenčno našli v hitro rastočih primordijih, v bazidijih in bazidiosporah dozorevajočih plodišč, kar kaže, da imajo lahko vlogo v začetku fruktifikacije in/ali pri sporulaciji (Vidic in sod., 2005). Njuno prednostno pojavljanje v perifernih delih plodišč in lamel kaže, da lahko sodelujeta v diferenciaciji hif in oblikovanju bazidija in bazidiospor. Poznejša hipoteza je okrepljena z odkritjem, da so nekateri bakterijski egerolizinski proteini, kot kaže, povezani z njihovo sporulacijo (Barloy in sod., 1998). Berne in sod., 2007 domnevajo, da je Oly udeležen v procesu fruktifikacije gobe *P. ostreatus*, saj jo sproži tudi, če je nanešen zunanje na micelij in, da njegovo aktivnost modulirajo lizofosfolipidi in maščobne kisline, kar bi lahko pomenilo, da je njegova aktivnost povezana s celičnim signaliziranjem. Njegova vpletenost v sporulacijo pa se jim zdi manj verjetna. Kakorkoli, funkcija proteinov egerolizinske družine zaenkrat še ostaja nepojasnjena. Poleg zgoraj opisanega, pred kratkim odkrit zanimiv biološki vpliv egerolizinov predstavlja antibakterijsko delovanje proti bakterijam *Bacillus subtilis* in *Bacillus megatorium* (Ng in Ngai, 2006).

2.1.4.4 Možna uporaba egerolizinskih proteinov

Biološke značilnosti egerolizinskih proteinov naredijo njihove člane zanimive iz številnih vidikov. Asp-hemolizin, naprimer, je smrtonosen toksin, ki predstavlja zelo pomemben del toksične baterije plesni *A. fumigatus* med infekcijo. Ta saprofitska gliva povzroča širok rang resnih bolezni, posebno pa visoko smrtonosno invazivno aspergilozo, ki se pogosto pojavlja pri imunsko ogroženih osebah, kot so bolniki z levkemijo, rakom ali AIDS-em, ali po

presaditvi organov in kostnega mozga (Latge in sod., 1999). Živalski modeli kažejo, da protitelesa proti Asp-hemolizinu lahko uspešno zaščitijo miši pred infekcijo, ki se prenaša s sporami (Ebina in sod., 1982), in nakazujejo, da bi poleg klasičnega tretiranja z amfotericinom, uporaba protiteles lahko bila ena od strategij v zaščiti imunsko oslabljenih pacientov pred infekcijami povzročenimi s sporami *A. fumigatus*. Nadalje, specifična vezava Asp-hemolizina na ox-LDL naredi ta protein, njegove nehemolitične rekombinantne mutante ali sintetične oblike (Kumagai in sod., 2005) možna orodja za preiskovanje patofiziološke pomembnosti ox-LDL (Kudo in sod., 2001).

Specifična vezava na značilne membranske domene je nadaljnja značilnost egerolizinskih proteinov, in je bila najbolj obsežno raziskana pri Oly (Sepčić in sod., 2004, Rebolj in sod., 2006). Oly in verjetno tudi drugi egerolizini se specifično vežejo na s CH bogate rafte in so zato predlagani kot novo orodje za raziskovanje teh pomembnih membranskih celičnih domen. Fluorescentno ali spinsko označene mutante Oly brez litične aktivnosti so lahko uporabne kot markerji lipidnih raftov v strukturnih in funkcijskih študijah, ki vključujejo biološke membrane in njihove mikrodomene. Do danes je najbolj znan in edini komercialno dostopen označevalec lipidnih raftov B podenota koleratoksina, ki se specifično veže na gangliozide (Bacia in sod., 2004).

Za egerolizine (posebno tiste iz gob) je značilno, da se specifično izražajo med zgodnjo fazo fruktifikacije. Stimulacijo fruktifikacije pri gobah lahko dosežemo tudi s številnimi zunanjimi stimulusi (s spojinami naravnega in sintetičnega izvora, z znižanjem temperature, svetlobe in pomanjkanjem nutrientov), kot so dokazali Berne in sod. 2007. Izboljšanje znanja o genih in procesih soudeleženi v procesu razvoja plodišč je zelo dobrodošlo iz biotehnološkega stališča, saj nas lahko vodi do boljšega razumevanja in izboljšanja procesa gojitve gob.

2.2 IZOLACIJA OSTREOLIZINA (OLY) IN PLEUROTOLIZINA (PLY)

2.2.1 Izolazija ostreolizina (Oly)

Berne in sod. so leta 2002 opisali izolacijo ostreolizina iz 300 g svežih bukovih ostrigarjev, ki so jih homogenizirali s 300 ml 50 mM 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol-hidrokloridom (Tris-HCl) pufrom, pH 8.5. Optimalno izolacijo so dosegli iz primordijev in mladih plodišč *P. ostreatus*. Nastali homogenat so centrifugirali dvakrat pri 15,000 obratih/min za 30 min. Dobljeni supernatant so obarjali s trdnim AS. HA frakcija se je oborila med 35% in 65% AS. Dobljeni precipitat so raztopili v 50 mM TRIS-HCl pufru s pH 8.5 in Oly ločili od ostalih sestavin vzorca z gelsko filtracijo na gelu Sephadex G-50. Kolona s totalnim volumnom 343.3 ml je bila spirana z istim pufrom s pretokom 0.4 ml/min. Drugi vrh v dobljenem kromatogramu je bil hemolitičen. Njegov pH so pred ločitvijo z ionsko izmenjevalno kromatografijo na High Q anionski koloni (BioRad, USA) prilagodili na 8.8. Proteine so sprali s padajočim gradientom pH od 8.8 do 7.0. Hemolitični vrh, izpran med 7.4 in 7.2, so nanесли na Resource™ Q kolono (Pharmacia, Švedska) in spirali z linearnim gradientom natrijevega klorida (NaCl) (0-1 M) v 50 mM TRIS-HCl pufru, pH 8.8. Pred nanosom na kolono so pH hemolitične frakcije ponovno uravnali na 8.8. Dobljenemu čistemu hemolizinu so nato določili HA. Pred določitvijo aminokislinske sekvence so hemolizin razsolili z Vydac C-18 HPLC kolono (The separations group, USA). Čistost so spremljali s spiranjem z linearnim gradientom acetonitrila v vodi (0-100%) z 0.1% trifluorocetne kisline (TFA). Razen visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC) so bili vsi postopki izpeljani pri 4°C.

2.2.2 Izolacija pleurotolizina (Ply)

Prav tako, leta 2004 Tomita s sodelavci izpelje vse izolacijske postopke Ply, razen HPLC pri 0-4°C. V vsakem koraku so dodali tudi proteazne inhibitorje (PI). Njihov namen je bil izolirati PlyA in PlyB komponenti iz gob vrste *P. ostreatus*, pred tem shranjenih na -40°C. V

nadaljevanju so 1 kg bazidiokarpa omenjene gobe homogenizirali v 1 l 50 mM Tris-HCl pufru (pH 8.3), ki so mu dodali 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF), 2 mM 1,10- fenantrolina (FL) in 10 mM etilendiamin tetraacetata (EDTA). Homogenat so nato centrifugirali pri 13,000 obratih/min za 1h, nastali supernatant pa so obarjali z AS do 60% nasičenja. Dobljeni precipitat so raztopili v 10 mM Tris-HCl pufru (pH 8.3) in ga naložili na DEAE A-500 celulozno kolono (5×30 cm; Seikagaku, Tokio, Japonska). Po spiranju z linearnim gradientom kalijevega klorida (KCl) (0-400 mM) so dobljene HA frakcije raztopili v 10 mM kalijevem fosfatu (KH₂PO₄) (pH 7.3) in jih adsorbirali na hidroksilapatitno kolono (2.5×20 cm; Seikagaku). Aktivne frakcije sprane z linearnim gradientom KH₂PO₄ (10 do 100 mM, pH 7.3) so združili in raztopili v 10 mM Tris-HCl pufru (pH 8.0). Nato so dodali AS do 25% nasičenja. Kolonska kromatografija z uporabo fenil Toyopearl 650M kolone (2×20 cm; Tosoh, Tokio, Japonska), ločuje HA hidroksilapatitno frakcijo v neadsorbirane PlyA in adsorbirane PlyB frakcije. Adsorbirani proteini so bili sprani s padajočim linearnim gradientom AS (25-0% nasičenja) in so predstavljali PlyB frakcijo v 10 mM Tris-HCl pufru (pH 8.0). Neadsorbirane frakcije pa so bile zbrane v PlyA frakcijo, ki je bila v nadaljevanju očiščena s pretakanjem skozi Toyopearl HW50S kolono (3×150 cm; Tosoh). Tako dobljena A frakcija da enojno liso, ki odgovarja 17-kDa lisi po NaDS (natrijev dodecil sulfat)-elektroforezi. Frakcija B dobljena iz fenil Toyopearl 650M kolonske kromatografije pa da šest glavnih proteinskih lis, ki odgovarjajo velikostim 64, 59, 43, 41, 23 in 18 kDa. Za identifikacijo PlyB je bila B frakcija iz fenil Toyopearl 650M kolonske kromatografije elektrofokusirana v dve frakciji z uporabo Immobiline gelov (pH 6-8; Amersham Biosciences). Frakcija I je vsebovala več 59- kDa in manj 41 in 18 kDa proteinov, frakcija II pa v glavnem proteine 41 in 18 kDa in manj 59-kDa. Frakcijo I so nato adsorbirali na DEAE-5PW kolono (0.75×20 cm; Tosoh), ter dva PlyB vrhova spirali z linearnim gradientom NaCl. 59-kDa protein, ki je bil spran kot večinski protein v prvem vrhu, je bil očiščen do homogenosti z drugo DEAE-5PW kolonsko kromatografijo. 41 in 18 kDa proteina sta bila očiščena iz frakcije II z uporabo dvostopenjske DEAE-5PW kolonske kromatografije. Analize N- in C-terminalnih aminokislinskih zaporedij 59, 41 in 18 kDa proteinov, uporaba antiserumov proti 59, 41, 18 kDa proteinom, proteaznih inhibitorjev, in analize hemolitične

aktivnosti v kombinaciji s PlyA pokažejo, da gre v primeru 59-kDa proteina za PlyB komponento dvokomponentnega citolizina, medtem ko sta manjša dva fragmenta produkta njegove omejene proteolize.

Sakurai in sod. so leta 2004 klonirali in ekspresirali cDNA molekule, ki kodirajo PlyA in PlyB podenoti, v bakterijo *E. coli*. Ekspresirana rekombinantna proteina PlyA in PlyB izolirajo ločeno. Prvo komponento pleurotolizina iz *E. coli* DH5 α s plazmidom *pEX-A*, drugo rekombinantno komponento tega bikomponentnega citolizina pa iz *E. coli* BL21(DE3), ki nosi plazmid *pEX-B*.

E. coli DH5 α s plazmidom *pEX-A*, ki je vseboval cDNA za PlyA, je rasla v 2x YT mediju z ampicilinom (200 μ g/ml) in 1 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidom (IPTG) pri 37°C 20 h. Po namnožitvi bakterijskih celic so jih s pomočjo centrifugiranja zbrali in raztopili v 10 mM Tris-HCl pufru s pH 8.4, ki je vseboval 10 mM EDTA. Pri potovanju celic skozi Francosko prešo (SLM Instruments Inc., Rochester, NY) s pritiskom 1000 kg/cm² so se celice raztrgale. Celični lizat so nato centrifugirali pri 145,000 obratih/min pri 4°C za 30 min.

Pri izolaciji PlyA komponente so nato supernatantu dodali AS do 60% nasičenja. Nastali precipitat so raztopili in dializirali s pomočjo 10 mM Tris-HCl pufra (pH 8.4), ter dializat naložili na DE-52 kolono (premer 3 cm; višina 7.5 cm). Aktivne frakcije so nato spirali z 10 mM Tris-HCl pufrom (pH 8.4), ki je vseboval 200 mM KCl. Tej aktivni frakciji so dodali še amonijev sulfat do 50% nasičenja in jo absorbirali na fenil Toyopearl 650M kolono (premer 2.5 cm; višina 7 cm). PlyA frakcije so bile nato sprane še s padajočim gradientom AS (od 50 do 0% nasičenja) in dializirane proti 10 mM Tris-HCl pufru s pH 8.0.

E. coli BL21(DE3), ki je nosila *pEX-B* (cDNA za PlyB) je rasla na 37°C v 2 x YT mediju z ampicilinom (200 μ g/ml). 1 mM IPTG je bil dodan v gojišče, ko je optična gostota kulture pri 660 nm dosegla 0.4-0.5. Gojenje se je nadaljevalo še 4h. Pri izolaciji PlyB komponente po centrifugiranju celičnega lizata, obdržijo precipitat in ga tretirajo z 10 mM Tris-HCl pufrom (pH 8.4), ki vsebuje 4% (m/v) neionskega detergenta Triton X-100. Beli precipitat so nato spirali z destilirano vodo in ga raztopili v 50 mM Tris-HCl pufru (pH 8.5) z 8 M ureo in 10

mM ditioneitolom (DTT). Proteini so se ponovno zvali v 100-kratni razredčitvi v ledeno mrzlem 10 mM Tris-HCl pufri (pH 8.5) z 1 mM EDTA. V raztopino so dodali AS do 25% nasičenja in jo naložili na fenil Toyopearl 650M kolono (premer 2.5 cm; višina 7 cm). Aktivne frakcije so bile sprane s padajočim gradientom AS (od 25 do 0% nasičenja) in dializirane proti 10 mM Tris-HCl pufri s pH 8.4. Dializirano raztopino so naložili na DE-52 kolono (premer 3 cm; višina 7.5 cm), adsorbirane proteine pa nato sprali z 10 mM Tris-HCl pufrom (pH 8.4), ki je vseboval 400 mM KCl.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

AEBSF	Sigma, ZDA
AS	Merck, Nemčija
APS	Bio Rad, ZDA
avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
BCA Protein Assay Reagent A/B	Pierce, ZDA
Bromfenol modro	Sigma, ZDA
Coomassie Blue	Merck, Nemčija
DTT	Sigma, ZDA
EDTA	Kemika, Hrvaška
etanol	Merck, Nemčija
epruvete	Eppendorf, Nemčija
1, 10-fenantrolin	Sigma, ZDA
glicerol	Kemika, Hrvaška
HCl	Merck, Nemčija
LWM markerji	Pharmacia
metanol	Merck, Nemčija
mikrotitrne plošče	TPP, Švica
Multikanalna pipeta	Eppendorf, Nemčija
NaCl	Merck, Nemčija
NaDS	Merck, Nemčija
NaOH	Kemika, Hrvaška
(NH) ₂ SO ₄	Merck, Nemčija
ocetna kislina	Merck, Nemčija

PMSF	Sigma, ZDA
poliakrilamid	BioRad, ZDA
Sephadex G-50 medium	Sigma, ZDA
TEMED	Sigma, ZDA
Tris-HCl	Merck, Nemčija

3.1.2 Raztopine

pufer za eritrocite

0,02 M Tris-HCl (pH 7,4)

0,13 M NaCl

fiziološka raztopina

0,9% NaCl

NaDS elektroforezni gel 12%

1,8 ml akrilamid

3,104 ml dH₂O

0,75 ml 3M Tris pufer

40 µl 10% NaDS

300 µl 1,5% APS

6 µl TEMED

NaDS (2×) nanašalni gel

0,5 ml akrilamid

2,945 ml dH₂O

1,25 ml 0,5 M Tris pufer

50 µl 10% NaDS

250 μ l 1,5% APS

5 μ l TEMED

raztopine za NaDS elektroforezo

Barvanje: 50 ml 20% očetne kisline

50 ml Coomassie

Razbarvanje: 150 ml metanola

50 ml očetne kisline

30 ml H₂O

Stabilizacija gela:

10 ml glicerola

10 ml očetne kisline

80 μ l H₂O

3.1.3 Laboratorijska oprema

aparatura za elektroforezo

Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad, ZDA

centrifuge

Sigma 3 K30, ZDA

Centric 322A, Tehtnica, Slovenija

čitalec mikrotitrnih plošč

MRX, Dynex technologies, Nemčija

Elvehjem-Potterjev homogenizer

Tehtnica, Slovenija

hladilnik 4°C

Gorenje, Slovenija

kromatografski sistem

Pharmacia Biotech GNA 100, Švedska

magnetno mešalo

Tehtnica MM540, Slovenija

multiplikator

Iskra, Slovenija

pH meter

Mettler Toledo, Nemčija

spektrofotometer

UV-2101 PC, Shimadzu, Japonska

tehtnice

Sartorius MC 210P, Nemčija

vorteks	Sartorius Laboratory, Nemčija
zmrzovalnik -20°C	Vibromix 10, Tehnica, Slovenija
	Gorenje, Slovenija

3.2 IZOLACIJA OSTREOLIZINA (OLY)

Predhodno so ugotovili, da je količina izoliranega Oly večja, če štartamo iz mladih, svežih gob, saj so pri izolaciji iz starih ali zamrznjenih gob dobili manjšo HA vzorca.

Zato smo Oly izolirali ločeno iz svežega in iz zamrznjenega materiala (po različnih časih od dneva zamrzovanja; 6 in 20 dni).

Postopek izolacije je ustaljen (Berne in sod., 2002). Vsi postopki so bili izpeljani pri 4°C, centrifugiranje je potekalo 30 min pri 15,500 obratih/min. 100 g gobe in 100 ml 50 mM Tris-HCl pufru pH 8.5 smo homogenizirali v multipraktiku ter z Elvehjem-Potterjevimi homogenizerjem. Po centrifugiranju smo sediment zavrgli, supernatant pa precedili in mu odčitali volumen. 1 ml supernatanta (**vzorec 1**) smo shranili v hladilniku (pri 4°C), preostanek pa obarjali z AS do 35% nasičenja. Po drugem centrifugiranju smo ponovno precejenemu supernatantu odčitali volumen ter ga obarjali z AS, tokrat do 65% nasičenja. Po tretjem centrifugiranju smo z odcejanjem obdržali le sediment in ga raztopili v minimalni količini 50 mM Tris-HCl pH 8.5 (1 ml na centrifugirko). Po centrifugiranju smo 0.5 ml supernatanta odpipetirali v epico za **vzorec 2** in ga zamrznili. Ostali supernatant smo uporabili za nanos na kolono ($V = 961.6$ ml), napolnjeno z gelom Sephadex G-50 in predhodno sprano s 50 mM Tris-HCl pH 8.5. Na gelsko kolono smo nanašali največ 10 ml supernatanta in 120 mg totalnega proteina. Zato smo pri tej in vseh ostalih izolacijah na kolono vedno nanесли le 4.3 ml nanosa. Gelska kromatografija je potekala čez noč v hladni sobi pri naslednjih pogojih: kolektor 12.5 min, črpalka 7×1, frakcije 7.6 ml in mobilna faza 50 mM Tris-HCl pH 8.5.

Po kromatografiji smo izmerili absorpcijo (A) vseh ločenih frakcij pri 280 nm na spektrofotometru ter HA na čitalcu mikrotitrnih plošč (uporabili smo 20 µl posamezne

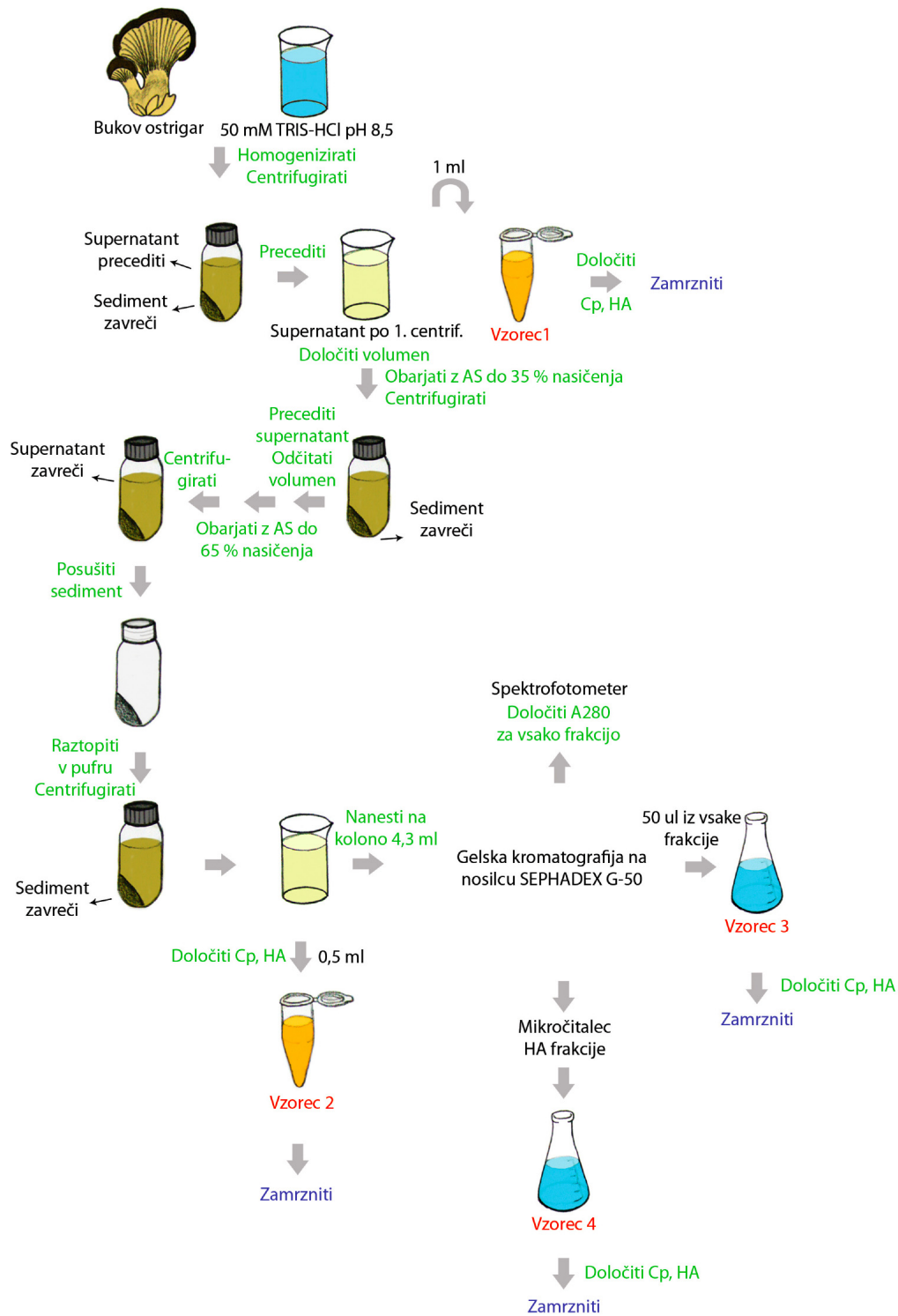
frakcije). **Vzorec 3** smo dobili z združevanjem 50 μ l iz vsake ločene frakcije, hemolitično aktivne frakcije po gelski kromatografiji pa smo združili v **vzorec 4**.

Vzorcem 1, 2, 3 in 4 smo poleg volumna določili še koncentracijo proteinov (c_p), hemolitično enoto (HE), ter izračunali totalno količino proteinov, totalno in specifično hemolitično aktivnost ter stopnjo očiščenja. Preostanke vzorcev smo shranili v zmrzovalniku pri -20°C .

Tako smo izolirali Oly iz svežih gob ter iz 6 in 20 dni zmrznjenih gob. Edina izjema so bile 20 dni zmrznjene gobe, pri katerih smo zaradi nadaljnjih preverjanj bikomponentnosti ostreolizina, vzeli v vzorec 4 le 1 ml iz vsake hemolitično aktivne frakcije po kromatografiji.

Shema izolacije ostreolizina

Vsi postopki z izjemo zmrzovanja (-20°C), so potekali pri 4°C .



3.3 VPLIV OKSIDANTA, EDTA IN PROTEAZNIH INHIBITORJEV NA UČINKOVITOST IZOLACIJE OSTREOLIZINA

Pri zamrznjenih gobah Tomita in sod. (2004) opažajo izgubo aktivnosti po gelski kromatografiji na gelu Sephadex G-50, in predvidevajo, da gre verjetno za redukcijo, proteolitično razgradnjo ali vpliv dvovalentnih kationov. Med delom so tudi ugotovili, da je HA posledica delovanja dveh proteinov (Ply A in Ply B), ki delujeta hemolitično samo, če sta združena v bikomponentni citolizin z imenom pleurotolizin. Ker je tudi pri ostreolizinu opazen upad v HA po gelski kromatografiji (Berne in sod., 2002), domnevamo, da bi se pri tem lahko izgubila druga komponenta, ki je poleg Oly potrebna za hemolitično aktivnost, ali da je prišlo do enega od zgoraj opisanih procesov. Po vzoru Tomite in sodelavcev smo izolirali ostreolizin z dodatki oksidanta fenantrolina (FL), ketalorja dvovalentnih kationov (EDTA) in proteaznih inhibitorjev: aminoetil benzensulfonil fluorid hidroklorida (AEBSF) in fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF).

Naša prva izolacija z dodatki je potekala na enak način kot prej opisana izolacija ostreolizina iz svežih in zamrznjenih gob, s to razliko, da smo na začetku v 100 ml 50 mM Tris-HCl pufra (pH 8.5) za homogenizacijo s 100 g zamrznjenih gob dodali 0.23 mM PMSF, 2 mM 1, 10-fenantrolina in 10 mM EDTA. Rezultati so pokazali, da mešanica uporabljenih dodatkov močno zmanjša upad HA med izolacijo. Zato smo se odločili časovno spremljati morebitni padec aktivnosti in preveriti, kateri dodatek ali kombinacija dodatkov to preprečuje.

Pri tem poskusu smo homogenizirali 200 g gobe in 300 ml 50 mM Tris-HCl pufra s pH 8.5. Po centrifugiranju smo določili volumen supernatanta ter ga nato razdelili v 8 čaš po 30 ml. V vsako od čaš smo čimhitreje dodali ustrezne količine dodatkov:

1. ne dodamo ničesar (kontrola),
2. dodamo proteazni inhibitor (PI),
3. dodamo EDTA,
4. dodamo fenantrolin (FL),

5. dodamo PI+EDTA,
6. dodamo PI+FL,
7. dodamo EDTA+FL, in
8. dodamo PI+EDTA+FL.

Vse te snovi smo zatehtati že dan pred homogenizacijo in jih shranili v epicah. Tako smo jih lahko dodali čimprej po centrifugiranju in naenkrat. Končne koncentracije dodatkov so bile takšne kot pri prejšnjem poskusu z vsemi dodatki. Zaradi pomanjkanja proteaznega inhibitorja PMSF, ki smo ga uporabili pri prvi izolaciji z dodatki, smo ga zamenjali z inhibitorjem AEBSF. Na čitalcu mikrotitrnih plošč smo izmerili HA vsem osmim vzorcem, ki so predstavljali vzorec »**supernatant po prvem centrifugiranju**«. V nadaljevanju smo iz vsake čaše odpipetirali 6×0.5 ml v posamezne epice, jih označili s številkami od 1 do 6 in zamrznili. Tako smo naslednjih 6 tednov enkrat na teden odmrznili eno serijo epic, prekontrolirali HA za vsak dodatek ter zavrgli testne epice.

Preostanek supernatanta v čašah smo postopno obarjali do 35% in do 65% nasičenja z AS, da smo pridobili vzorec »**nanos na kolono**«. Ko smo zadnjič raztapljali sediment, smo v vsako centrifugirko dodali točno po 1 ml pufra za raztapljanje. Tudi tem osmim vzorcem smo takoj izmerili HA. Prav tako smo jih odpipetirali v 6 epic, tokrat po 100 μ l, in jih zamrznili. Naslednjih 6 tednov smo enkrat na teden izvajali meritve hemolitične aktivnosti.

Po šestih tednih smo za vseh 16 vzorcev z različnimi dodatki določili koncentracijo proteina, zadnjo serijo pa razdelili v dva dela (osmim vzorcem supernatanta smo razpolovili vsebino tako, da smo dobili še 8 vzorcev). Eno serijo smo nato shranili kot vedno, v zmrzovalnik, drugo pa pri 4°C, saj nas je zanimalo, če ima temperatura shranjevanja vpliv na HA vzorcev. Enako smo storili z vzorci »nanos na kolono«. Naslednjih 6 meritev je ponovno potekalo enkrat na teden. Vsi postopki, razen zmrzovanja (-20°C), so bili izpeljani pri 4°C. Pred zadnjim merjenjem aktivnosti vzorcev supernatanta in nanosa na kolono so bili ti vzorci namesto pri 4°C, pomotoma shranjeni pri sobni temperaturi.

3.4 MERJENJE HEMOLITIČNE AKTIVNOSTI (HA)

Hemolitično aktivnost smo merili na govejih eritrocitih pri 25°C s turbidimetrično metodo (Maček in Lebez, 1981) na dva načina:

- a) s spektrofotometrom, kjer smo določali število hemolitičnih enot (HE) v vzorcu na posamezni stopnji čiščenja proteina, ter merili hitrost hemolize čistega Oly z združenimi frakcijami pri preverjanju prisotnosti druge hemolitične komponente.
- b) s čitalcem mikrotitrnih plošč, kjer smo določali HA frakcij po gelski kromatografiji, ter aktivnost teh frakcij v kombinaciji z najbolj aktivno frakcijo za preverjanje dvokomponentnosti Oly, in pri vplivu dodatkov na HA Oly med shranjevanjem.

3.4.1 Določanje hemolitične aktivnosti na spektrofotometru

Pripravili smo suspenzijo govejih eritrocitov z absorpcijo 0.500 pri 700 nm ter umerili spektrofotometer z dvema kivetama napolnjenima z eritrocitnim pufrom. Nato smo eritrocitni pufer v prvi slepi kiveti zamenjali z določenim volumnom testnega vzorčka in 1 ml eritrocitne suspenzije. Časovni potek spremembe absorpcije zaradi hemolize smo merili 2 minuti pri 700 nm. Volumen testnega vzorčka smo spreminjali toliko časa, da je navidezna absorbcija iz 0.500 padla na polovico v 1 minuti. Tako smo za testni vzoreček na določeni stopnji izolacije dobili volumen, ki povzroči 50% hemolizo v 1 min ($V_{t_{50}}$), ter izračunali HE.

Ker se pri gelski kromatografiji na gelu Sephadex G-50 molekule ločijo zaradi razlik v velikosti, velja načelo, da se večje molekule spirajo prej, saj manjša kot je molekula, laže in globlje prodre v notranjost gelskih kroglic, zato je za elucijo manjših molekul potreben večji elucijski volumen. Tako smo pričakovali, da se bo druga 59-kDa komponenta bikomponentnega citolizina (če je prisotna v izolatu) sprala prej kot pa 15-kDa Oly. Celotno serijo frakcij 20 dni zamrznjenih gob smo tako na čitalcu mikrotitrnih plošč po dodatku hemolitično najaktivnejše frakcije te izolacije preverili za morebitne spremembe v aktivnosti. Ob dodatku hemolitično najbolj aktivne frakcije (ostreolizina) k frakciji, ki bi vsebovala drugo komponento, bi prišlo do tvorbe bikomponentnega citolizina in posledično do dviga v

hemolitični aktivnosti. Prav tako pa pričakujemo dvig v vseh frakcijah, v katerih je po izolaciji prisoten ostreolizin (Oly + Oly). V rezultatih sta bila razvidna dva vrha. Drugi vrh v območju, kjer je razmerje med elucijskim in totalnim volumnom (V_e/V_t) od 0.29 do 0.34, ustreza 15-kDa ostreolizinu, prvi v območju V_e/V_t od 0.10 do 0.12 pa ustreza mestu, kjer bi se lahko spirala 59-kDa domnevni protein. Z združevanjem teh frakcij (12, 13, 14 in 15; $V_e/V_t = 0.095, 0.103, 0.111$ in 0.119) po gelski kromatografiji izolata iz 20 dni zmrznjenih gob, na gelu Sephadex G-50, smo tako dobili **vzorec V**. Na enak način kot zgoraj smo na spektrofotometru določili tudi V_{t50} za čisti Oly (7 μ l), ki smo ga potem kombinirali z 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ l vzorca V. Po dobljenem času potrebnem za 50-odstotno hemolizo (t_{50}) smo lahko izračunali hitrost hemolize ($1/t_{50}$). Naraščajoči dvig aktivnosti z večanjem volumna vzorca V s čistim ostreolizinom bi bil dokaz bikomponentnega citolizina.

Ker bi na tej stopnji izolacije že lahko prišlo do izgube dodatne komponente, smo preverili še supernatant po prvem centrifugiranju (vzorec 1) svežih in 20 dni zmrznjenih gob. Zanimale so nas morebitne spremembe v HA teh dveh vzorčkov po dodatku čistega Oly. Tudi tokrat smo najprej izmerili V_{t50} za čisti Oly. Merili smo še t_{50} za 5, 10, 25 in 50 μ l vzorca 1 svežih gob, ter nato za iste količine vzorca z dodatkom 6 μ l čistega Oly. Dobljene t_{50} smo preračunali v $1/t_{50}$ in opazovali morebitne spremembe v aktivnosti. Enak postopek smo ponovili še pri 20 dni zmrznjenih gobah. Tako smo za sveže in zmrznjene gobe preverili, če je v prvem supernatantu prisotna še kakšna komponenta, ki bi lahko delovala sinergistično z ostreolizinom, in ki bi jo potem skozi izolacijo izgubili.

3.4.2 Določanje hemolitične aktivnosti na čitalcu mikrotitrnih plošč

Pripravili smo suspenzijo govejih eritrocitov za katero je veljalo, da 100 μ l eritrocitnega pufra in 100 μ l goveje eritrocitne suspenzije, da navidezno absorpcijo 0.500 pri 630 nm. Na mikrotitrne plošče smo z multikanalno pipeto nanесли v vsako luknjico po 100 μ l eritrocitnega pufra, 20 μ l posamezne frakcije po gelski kromatografiji in 100 μ l goveje eritrocitne suspenzije. S čitalcem mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA) smo pri določitvi časa

potrebna za 50% hemolizo, t_{50} , spremljali časovni potek upada navidezne absorpcije na polovico pri 630 nm. Hitrost hemolize smo izrazili z recipročno vrednostjo časa polovične hemolize ($1/t_{50}$).

Pri preverjanju bikomponentnosti citolizina smo pri izolaciji iz 20 dni zmrznjenih gob kombinirali frakcije. Tako smo namesto 20 μ l odpipetirali le 5 μ l iz posamezne frakcije ter 5 μ l najbolj aktivnega vrha iz hemolitično aktivnih frakcij po kromatografiji na gelu Sephadex G-50. Ostali postopki so bili enaki. Na podlagi teh rezultatov smo združili že prej omenjene frakcije 12, 13, 14, 15 in preverili HA ob dodatku čistega Oly (glej poglavje merjenje hemolitičnih enot na spektrofotometru).

Vpliv posameznih dodatkov smo ravno tako ugotavljali z merjenjem hemolitične aktivnosti na čitalcu mikrotitrnih plošč. Testirali smo le 5 μ l vzorca pri vzorcih dobljenih iz prvega supernatanta, in 2 μ l za vzorce nanos na kolono.

3.4.3 Hemolitična enota, totalna in specifična aktivnost, stopnja očiščenja in določanje koncentracije proteina

Hemolitična enota (HE) je definirana kot količina proteinskega vzorca, ki ga dodamo k 1 ml suspenzije govejih eritrocitov, in z njo izzovemo 50% hemolizo v 1 minuti pri 25°C. Je tudi referenčna vrednost, s pomočjo katere primerjamo totalno in specifično aktivnost vzorcev. Totalna hemolitična aktivnost je definirana kot število HE v celotnem volumnu vzorca, specifična aktivnost pa kot število hemolitičnih enot na miligram proteina v vzorcu. Koncentracijo proteinov smo določali s pomočjo bicinoninsko-kislinskega (BCA) proteinskega testa (Pierce, ZDA). V kiveto smo odpipetirali 50 μ l vzorca in 950 μ l mešanice reagentov A in B (v razmerju 50:1). Za vsak vzorec smo pripravili dve paralelki. Pri kontroli smo uporabili 50 μ l destilirane vode. Vzorce smo inkubirali 30 minut pri 37°C, potem pa odčitali vrednost absorpcije pri 562 nm za vsak vzorec posebej. Iz umeritvene krivulje za goveji serumski protein (BSA) smo nato s pomočjo A_{562} določili koncentracijo proteinov v naših vzorcih. Tako smo lahko izračunali:

Totalni protein:

$$\text{Tot. protein (mg)} = \text{konc. proteina (mg/ml)} \times \text{tot. volumen (ml)} \quad \dots(1)$$

Hemolitično enoto:

$$\text{HE (mg)} = [V_{t50} (\mu\text{l}) \times \text{konc. proteina (mg)}] / 1000 \mu\text{l} \quad \dots(2)$$

Totalno aktivnost:

$$\text{Tot. aktivnost (št. HE)} = \text{tot. volumen (ml)} / V_{t50} (\text{ml}) \quad \dots(3)$$

Specifično aktivnost:

$$\text{Specif. aktivnost (št. HE/mg)} = \text{tot. aktivnost} / \text{tot. protein} \quad \dots(4)$$

Stopnjo očiščenja:

$$\text{Stopnja očiščenja} = \text{specif. aktivnost vzorca} \times / \text{specif. aktivnost vzorca 1} \dots(5)$$

3.5 NaDS-ELEKTROFOREZA

Z NaDS-elektroforezo lahko določamo molekulsko maso proteina, preverjamo čistost med posameznimi stopnjami izolacije in analiziramo zgradbo proteinov. Vzorec zmešamo z NaDS, ki denaturira komponente in jih negativno nabije. Tako se ne ločijo več po naboju, ampak le še po molekulski masi. Dodamo še barvilo za lažje opazovanje potovanja proteinov. Vzorec nanese na katodno stran, in ves potuje na pozitivno nabito anodo. Manjši proteini pridejo bliže anodi, kar pričakujemo tudi za naš Oly. Molekulsko maso določimo tako, da istočasno ločimo še zmes standardov, primerjamo višino prepotovane poti vzorca in standarda, in določimo molekulsko maso.

Zaradi dodanega denaturanta in reducenta smo pričakovali eno liso okrog 15 kDa. Pozorni smo bili tudi na morebitno liso okrog 59 kDa, saj bi lahko šlo za drugo komponento v primeru bikomponentnosti citolizina (Tomita in sod., 2004), kar bi lahko potrdili z dodatnimi analizami.

Izbrali smo vzorce, ki so predstavljali:

1a = prvi supernatant pri izolaciji iz svežih gob

1b = prvi supernatant pri izolaciji iz 6 dni zmrznjenih gob

1c = prvi supernatant pri izolaciji iz 20 dni zmrznjenih gob

2a = nanos na kolono iz svežih gob

2b = nanos na kolono iz 6 dni zmrznjenih gob

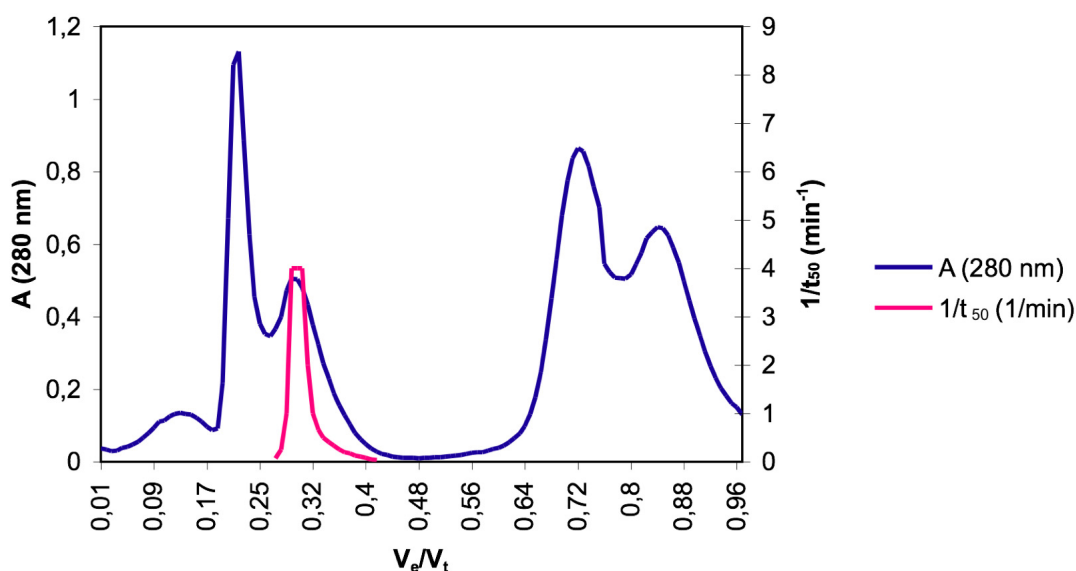
2c = nanos na kolono iz 20 dni zmrznjenih gob

Po 30 μ l vzorčkov 1a, 1b, 1c, 2a, 2b in 2c smo dali vsakega v svojo epico. Dodali smo še 30 μ l barvila, ki je raztopina Tris, EDTA in barvila bromfenol modro. Pripravili smo tudi zmes 30 μ l standarda (nizkomolekularnega markerja (LWM)) in 30 μ l barvila, nato pa vse epice kuhali 3 minute pri 100°C. Po pripravi 12% NaDS-elektroforeznega gela in 2 \times nanašalnega gela (glej poglavje 3.1.2) smo odpipetirali 10 μ l vzorca z barvilom iz nove epice, mu dodali 10 μ l 1 M DTT, ki reducira disulfidne (S-S) vezi, in 20 μ l 2 \times nanašalnega pufra. Vse skupaj smo premešali in 10 μ l zmesi s pipeto nanesli v jamico na NaDS-elektroforeznem gelu. Skozi NaDS-elektroforezni gel je tek el tok 24 mA. Po končani ločitvi je sledilo še barvanje preko noči v raztopini za barvanje, razbarvanje je trajalo 2 uri. Nato pa smo gel stabilizirali (glej poglavje 3.1.2) in slikali.

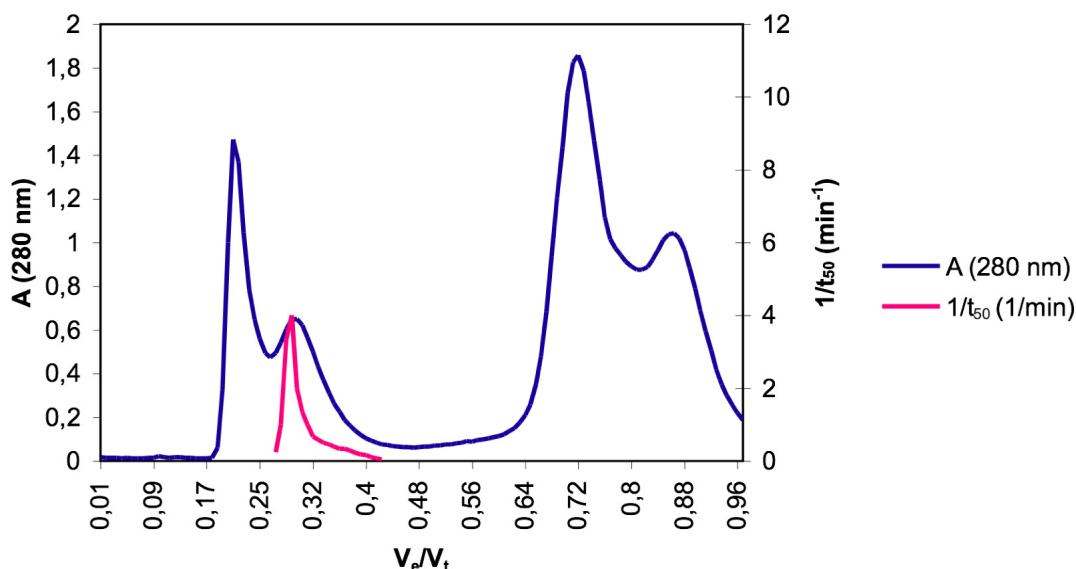
4 REZULTATI

4.1 VPLIV ZMRZOVANJA NA UČINKOVITOST IZOLACIJE OSTREOLIZINA

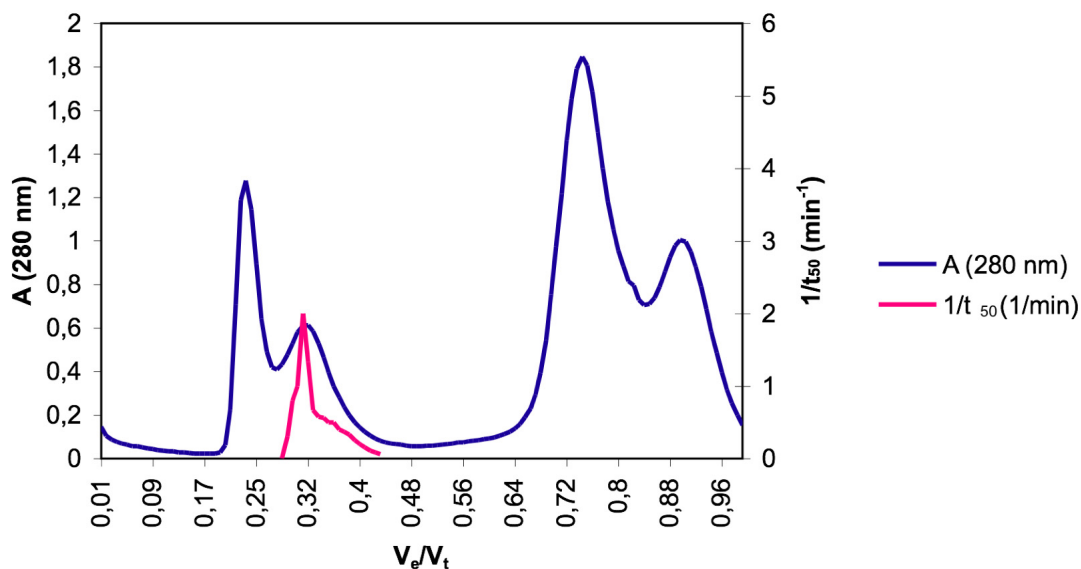
Na slikah 1-3 so prikazani reprezentativni kromatogrami izolacije Oly iz svežih (Slika 1), 6 dni zamrznjenih (Slika 2) in 20 dni zamrznjenih bukovich ostrigarjev (Slika 3). Hemolitično aktivne frakcije, ki ustrezajo Oly, so se vedno spirale pri istem elucijskem volumnu ($V_e/V_t = 0.27 - 0.4$), HA in višina aktivnega vrha se pri posameznih izolacijah nista bistveno spreminjali (Sliki 1 in 2), v primeru 20 dni zamrznjenih gob (Slika 3) pa upadeta na polovico.



Slika 1: Izolacija ostreolizina iz svežih bukovich ostrigarjev s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram. Z rožnato barvo so prikazane hemolitično aktivne frakcije. A - absorpcija pri 280 nm; V_e - elucijski volumen; V_t - celotni volumen; $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize.



Slika 2: Izolacija ostreolizina iz 6 dni zamrznjenih bukovi ostrigarjev s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram. Z rožnato barvo so prikazane hemolitično aktivne frakcije. A - absorpcija pri 280 nm; V_e - elucijski volumen; V_t - celotni volumen; $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize.

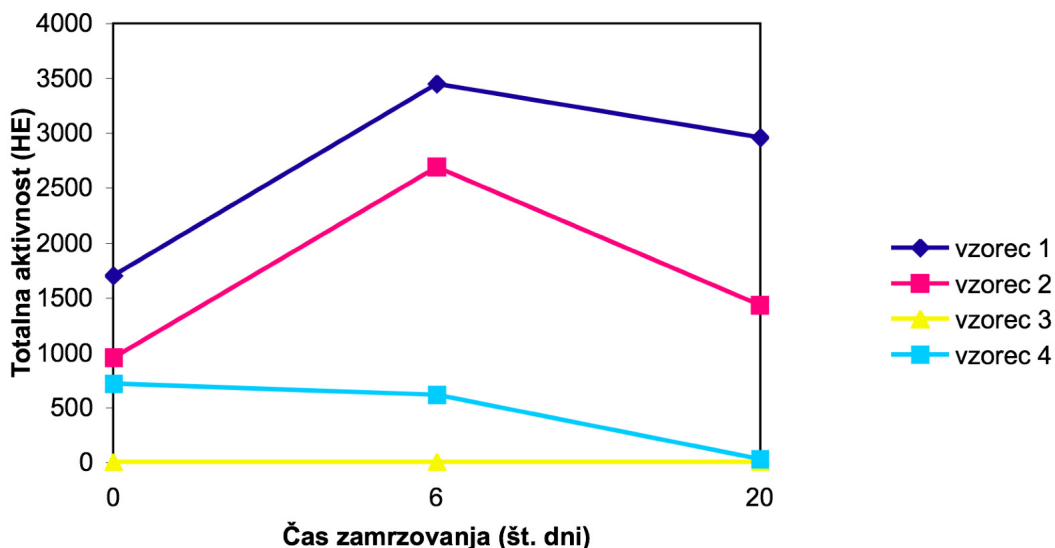


Slika 3: Izolacija ostreolizina iz 20 dni zamrznjenih bukovi ostrigarjev s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram. Z rožnato barvo so prikazane hemolitično aktivne frakcije. A - absorpcija pri 280 nm; V_e - elucijski volumen; V_t - celotni volumen; $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize.

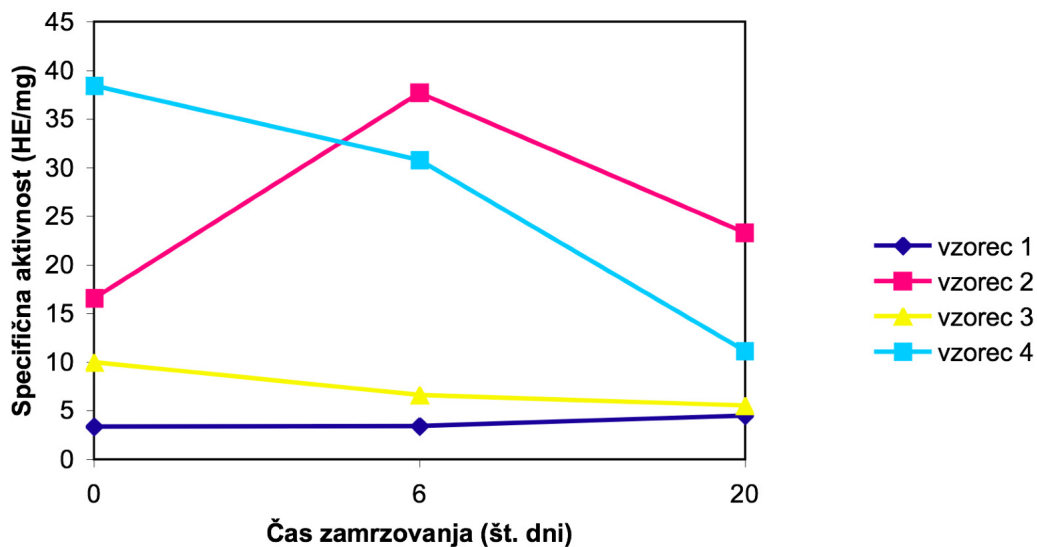
Preglednica 1 in slike 4 (a, b, c) prikazujejo aktivnost vzorcev skozi čas zamrzovanja. Spremljali smo spreminjanje totalne aktivnosti (Slika 4a), specifične aktivnosti (Slika 4b) in stopnje očiščenja (Slika 4c) v času po zamrzovanju. Ugotovili smo, da zamrzovanje najbolj izrazito zmanjša stopnjo očiščenja, opazen je tudi upad specifične aktivnosti, kar pa ne moremo trditi za totalno aktivnost vseh vzorcev.

Preglednica 4: Podatki o aktivnosti ostreolizina iz svežih in zamrznjenih bukovih ostrigarjev na posamezni stopnji izolacije. 1 – homogenat bukovih ostrigarjev v 50 mM Tris pufru (pH 8,5) = supernatant po prvem centrifugiranju, 2 – precipitat po 65-odstotnem nasičenju z amonijevim sulfatom = nanos na kolono, 3 – združene frakcije (50 μ l iz vsake frakcije) po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, 4 – Sephadex G-50 (hemolitično aktivni vrh).

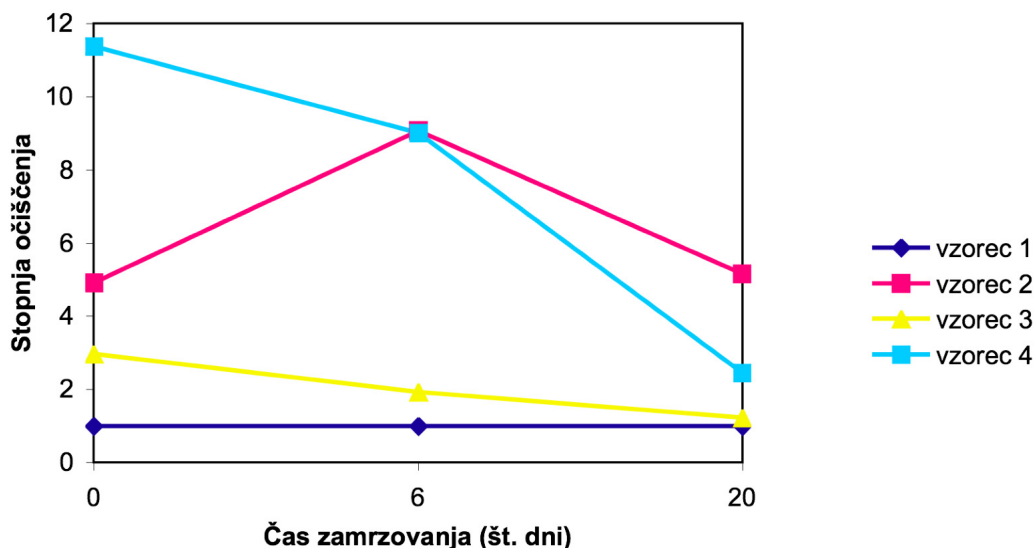
Vzorec	Totalni volumen (ml)	Volumen testnega vzorca (ml)	Konc. Proteinov (mg/ml)	Totalna količina proteinov (mg)	IHE (mg)	Totalna aktivnost (HE)	Specif. aktivnost (HE/mg)	Stopnja očiščenja
<i>Sveže gobe</i>								
1	136	0,005	3,7	503,2	0,296	1700,0	3,4	1
2	4,3	0,005	13,4	57,6	0,060	955,6	16,6	4,9
3	6,1	0,05	0,05	0,3	0,100	3,1	10,0	3,0
4	144	0,05	0,13	18,7	0,026	720,0	38,5	11,4
<i>Zmrznjene gobe (6 dni)</i>								
1	138	0,005	7,3	1007,4	0,292	3450,0	3,4	1
2	4,3	0,005	16,6	71,3	0,027	2688,0	37,7	9,1
3	6,0	0,05	0,08	0,5	0,151	3,3	6,6	1,9
4	154	0,05	0,13	20,0	0,032	616,0	30,8	9,0
<i>Zmrznjene gobe (20 dni)</i>								
1	142	0,005	4,6	653,2	0,221	2958,3	4,5	1
2	4,3	0,005	14,3	61,5	0,043	1433,0	23,3	5,1
3	5,8	0,05	0,09	0,5	0,180	2,9	5,6	1,2
4	18	0,05	0,15	2,7	0,090	30,0	11,1	2,5



Slika 4 a: Totalna aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa zamrzovanja. Vzorec 1 – supernatant po prvem centrifugiranju, vzorec 2 – nanos na kolono, vzorec 3 – združene frakcije po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, vzorec 4 – Sephadex G-50 hemolitično aktivni vrh.



Slika 4 b: Specifična hemolitična aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa zamrzovanja. Vzorec 1 - supernatant po prvem centrifugiranju, vzorec 2 – nanos na kolono, vzorec 3 – združene frakcije po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, vzorec 4 – Sephadex G-50 hemolitično aktivni vrh.



Slika 4 c: Stopnja očiščenja na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa zamrzovanja. Vzorec 1 - supernatant po prvem centrifugiranju, vzorec 2 – nanos na kolono, vzorec 3 – združene frakcije po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, vzorec 4 – Sephadex G-50 hemolitično aktivni vrh.

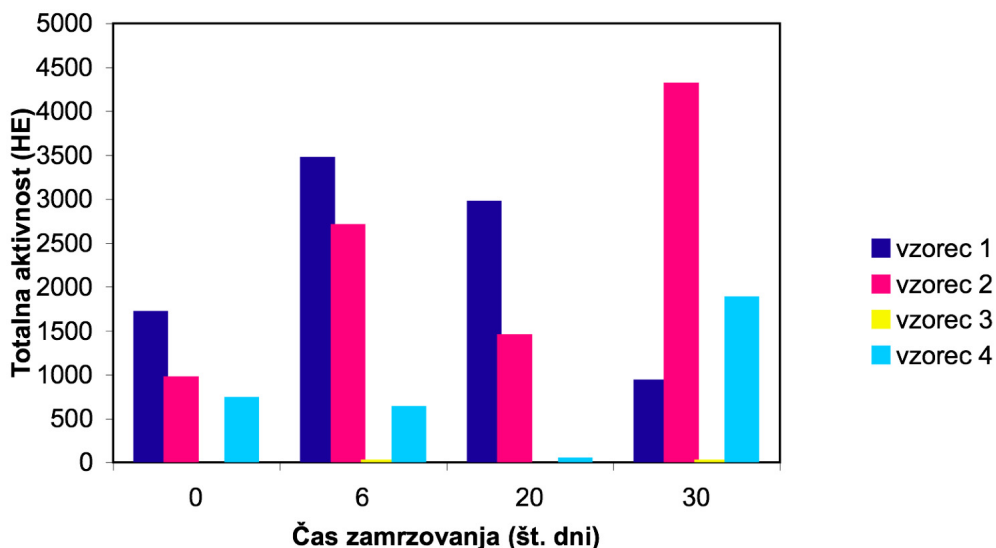
4.2 VPLIV OKSIDANTA, EDTA IN PROTEAZNIH INHIBITORJEV NA UČINKOVITOST IZOLACIJE OSTREOLIZINA

V preglednici 2 in slikah 5 (a, b, c) so prikazani rezultati primerjave totalne (Slika 5a) in specifične (Slika 5b) aktivnosti ter stopnje očiščenja (Slika 5c), svežih, 6 dni zamrznjenih, 20 dni zamrznjenih in 30 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev. Izolacija iz 30 dni zmrznjenih gob je potekala z dodatkom oksidanta fenantrolina, kelatorja dvovalentnih kationov EDTA in s PMSF kot proteaznim inhibitorjem. Kljub predhodni ugotovitvi, da totalna in specifična aktivnost ter stopnja očiščenja s časom zmrzovanja upadajo, smo pri 30 dni zmrznjenih gobah pri izolaciji z dodatki dobili veliko višje vrednosti za omenjene parametre kot pa v primeru svežih gob. Le v primeru totalne aktivnosti (Slika 5a) vzorca 1 dobimo padec na skoraj polovično vrednost vzorca 1 pri svežih gobah, prav tako pri specifični aktivnosti (Slika 5b) vzorcev 1 in 3, kjer se ohrani le 35% in 76% specifične aktivnosti. V ostalih primerih totalne (Slika 5a) in specifične aktivnosti (Slika 5b) vzorcev pride do dvigov (od 1,5 do 4,5-krat).

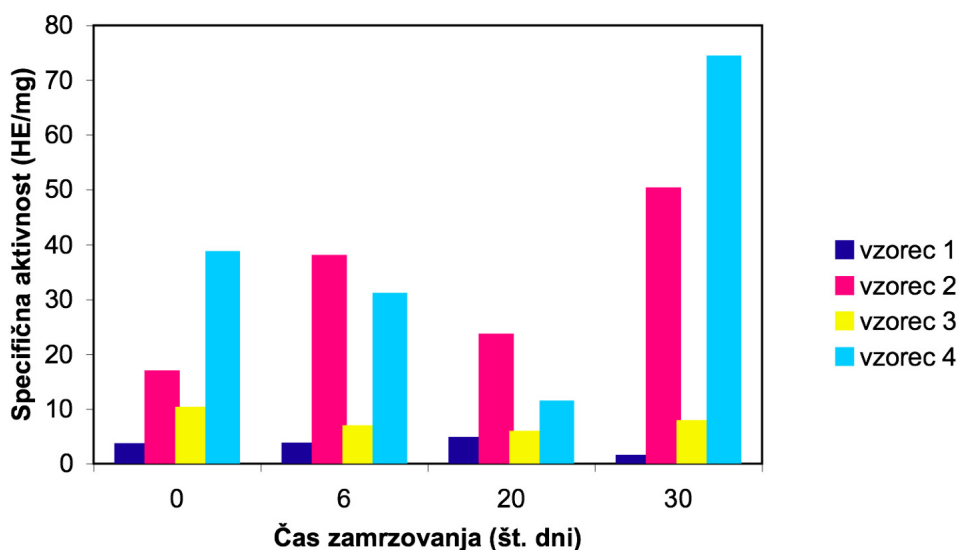
Najvišje vrednosti dosežejo vzorci z dodatki pri stopnji očiščenja (Slika 5c), kjer se očiščenje vzorca 2 poveča kar za 8,2-krat (pri vzorcih 3 in 4 pa za 2 in 5,2-krat).

Preglednica 5: Primerjava hemolitične aktivnosti na posameznih stopnjah izolacije brez dodatkov in z dodatkom oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev. 1 – homogenat bukovih ostrigarjev v 50 mM Tris pufru (pH 8,5) = supernatant po prvem centrifugiranju, 2 – precipitat po 65-odstotnem nasičenju z amonijevim sulfatom = nanos na kolono, 3 – združene frakcije (50 µl iz vsake frakcije) po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, 4 – Sephadex G-50 (hemolitično aktivni vrh).

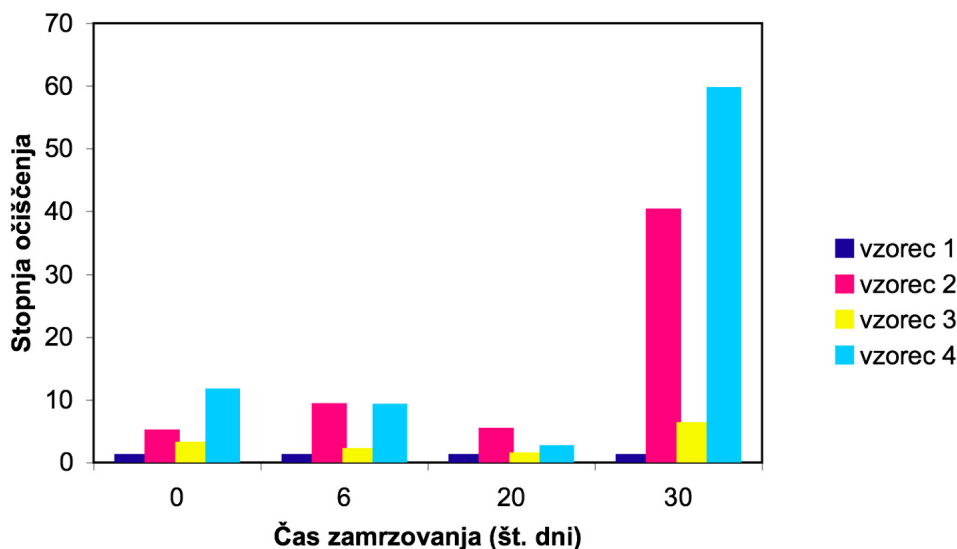
Vzorec	Totalni volumen (ml)	Volume testnega vzorca (ml)	Konc. Proteinov (mg/ml)	Totalna količina proteinov (mg)	IHE (mg)	Totalna aktivnost (HE)	Specif. aktivnost (HE/mg)	Stopnja očiščenja
<i>Sveže gobe</i>								
1	136	0,005	3,7	503,2	0,296	1700,0	3,4	1
2	4,3	0,005	13,4	57,6	0,060	955,6	16,6	4,9
3	6,1	0,05	0,05	0,3	0,100	3,1	10,0	3,0
4	144	0,05	0,13	18,7	0,026	720,0	38,5	11,4
<i>Zmrznjene gobe (6 dni)</i>								
1	138	0,005	7,3	1007,4	0,292	3450,0	3,4	1
2	4,3	0,005	16,6	71,4	0,027	2688,0	37,7	9,1
3	6	0,05	0,08	0,5	0,151	3,3	6,6	1,9
4	154	0,05	0,13	20,0	0,032	616,0	30,8	9,0
<i>Zmrznjene gobe (20 dni)</i>								
1	142	0,005	4,6	653,2	0,221	2958,3	4,5	1
2	4,3	0,005	14,3	61,5	0,043	1433,0	23,3	5,1
3	5,8	0,05	0,09	0,5	0,180	2,9	5,6	1,2
4	18	0,05	0,15	2,7	0,090	30,0	11,1	2,5
<i>Zmrznjene gobe (30 dni) z dodatkom oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev</i>								
1	138	0,005	5,4	738,3	0,803	920,0	1,2	1
2	4,3	0,005	20,0	86,0	0,020	4300,0	50,0	40,1
3	6,8	0,05	0,09	0,6	0,132	4,5	7,6	6,1
4	168	0,05	0,15	25,2	0,014	1866,7	74,1	59,4



Slika 5a: Totalna aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa (30 dni) zamrzovanja in dodatkov oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev. Vzorec 1 - supernatant po prvem centrifugiranju, vzorec 2 – nanos na kolono, vzorec 3 – združene frakcije po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, vzorec 4 – Sephadex G-50 hemolitično aktivni vrh.

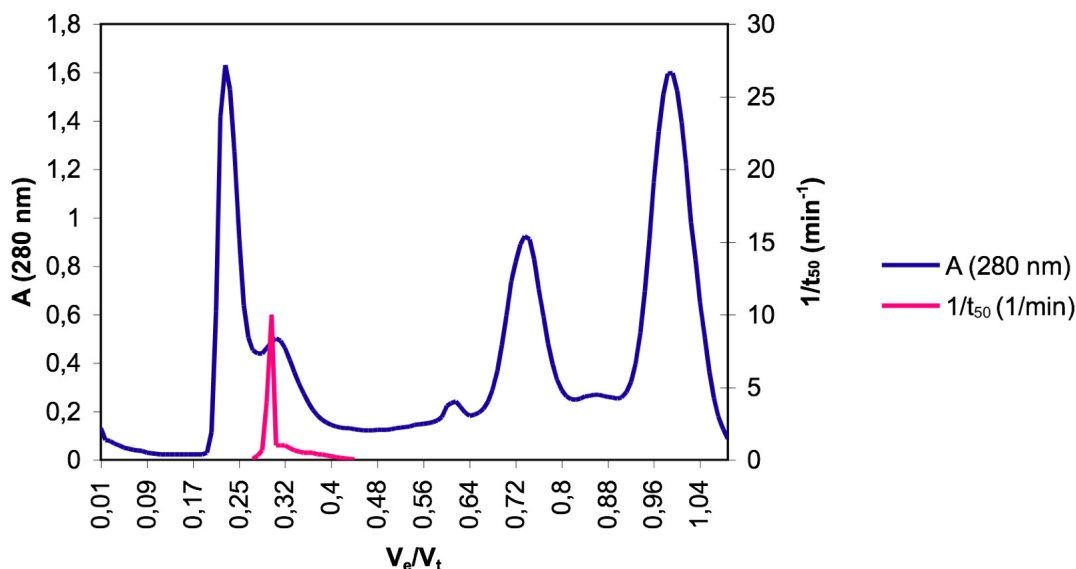


Slika 5 b: Specifična aktivnost na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa (30 dni) zamrzovanja in dodatkov oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev. Vzorec 1 - supernatant po prvem centrifugiranju, vzorec 2 – nanos na kolono, vzorec 3 – združene frakcije po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, vzorec 4 – Sephadex G-50 hemolitično aktivni vrh.



Slika 5 c: Stopnja očiščenja na posamezni stopnji izolacije v odvisnosti od časa (30 dni) zamrzovanja in dodatkov oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev. Vzorec 1 - supernatant po prvem centrifugiranju, vzorec 2 – nanos na kolono, vzorec 3 – združene frakcije po gelski kromatografiji na nosilcu Sephadex G-50, vzorec 4 – Sephadex G-50 hemolitično aktivni vrh.

Na Sliki 6 je prikazan reprezentativen kromatogram izolacije ostreolizina z dodatki oksidanta fenantrolina, kelatorja dvovalentnih kationov EDTA in s PMSF kot proteaznim inhibitorjem iz 30 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev. Hemolitično aktivne frakcije, ki ustrezajo ostreolizinu, so se tudi tukaj spirale pri elucijskem volumnu ($V_e/V_t = 0.27 - 0.4$), hemolitična aktivnost in višina aktivnega vrha pa sta se povečali. Višina aktivnega vrha te izolacije je kar 2,5-krat višja od tistega pri izolaciji iz svežih bukovih ostrigarjev brez dodatkov.



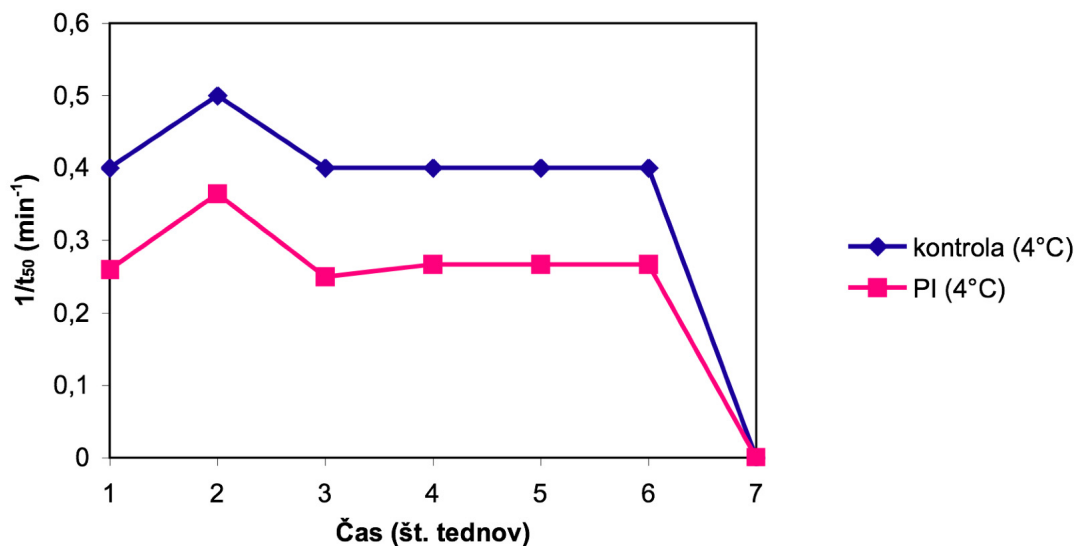
Slika 6: Izolacija ostreolizina iz 30 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev (z dodatkom oksidanta, EDTA in proteaznih inhibitorjev) s kromatografijo na gelu Sephadex G-50 – elucijski diagram. Z rožnato barvo so prikazane hemolitično aktivne frakcije. A - absorpcija pri 280 nm; V_e - elucijski volumen; V_t - celotni volumen; 1/t₅₀ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize.

V nadaljevanju smo ugotavljali, kateri od testiranih parametrov vpliva na stabilnost proteina pri izolaciji (spremljanje hemolitične aktivnosti vzorca v času z dodatkom različnih kombinacij kemikalij). Vzorce smo med meritvami shranjevali pri 4°C ali pri -20°C.

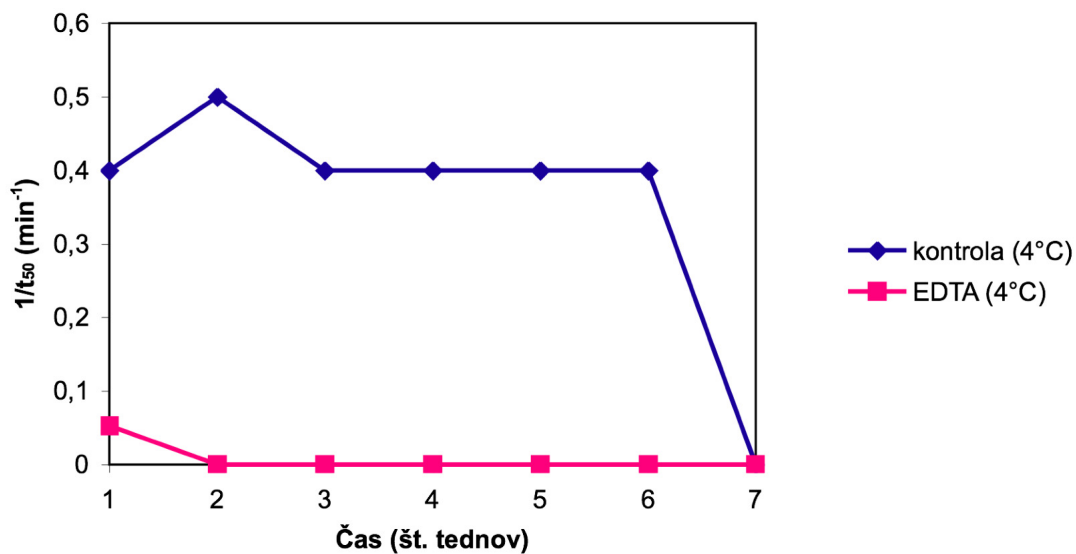
Slike 7-13 prikazujejo časovni vzorec spreminjanja hemolitične aktivnosti vzorca 1 (supernatant po prvem centrifugiranju) shranjenega pri 4°C.

Pri vseh slikah je vidno, da je kontrolni vzorec, shranjen pri 4°C, hemolitično aktiven 6 tednov, v 7. tednu pa se pojavi nenaden padec v aktivnosti, ki je posledica napake pri shranjevanju, saj je bil vzorec pomotoma prenešen na 25°C. Enako se je zgodilo tudi pri vzorcu 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja pri 4°C.

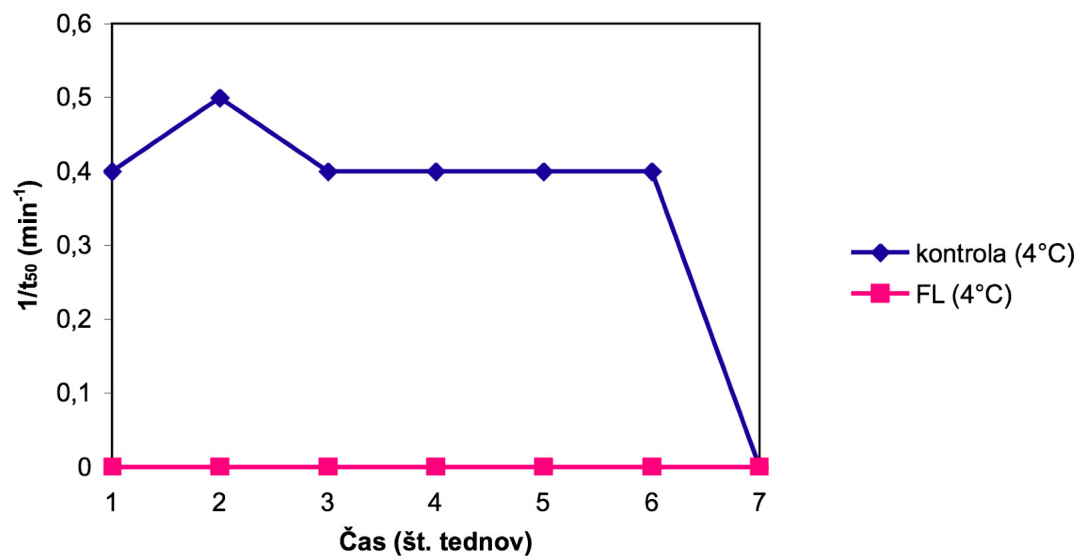
Splošno pa iz slik vidimo, da je kontrolni vzorec vseskozi bolj aktiven od tistega z dodatki. Najbolj kvaren vpliv imata EDTA in fenantrolin, medtem ko proteazni inhibitorji ne zmanjšajo hemolitične aktivnosti v tolikšni meri.



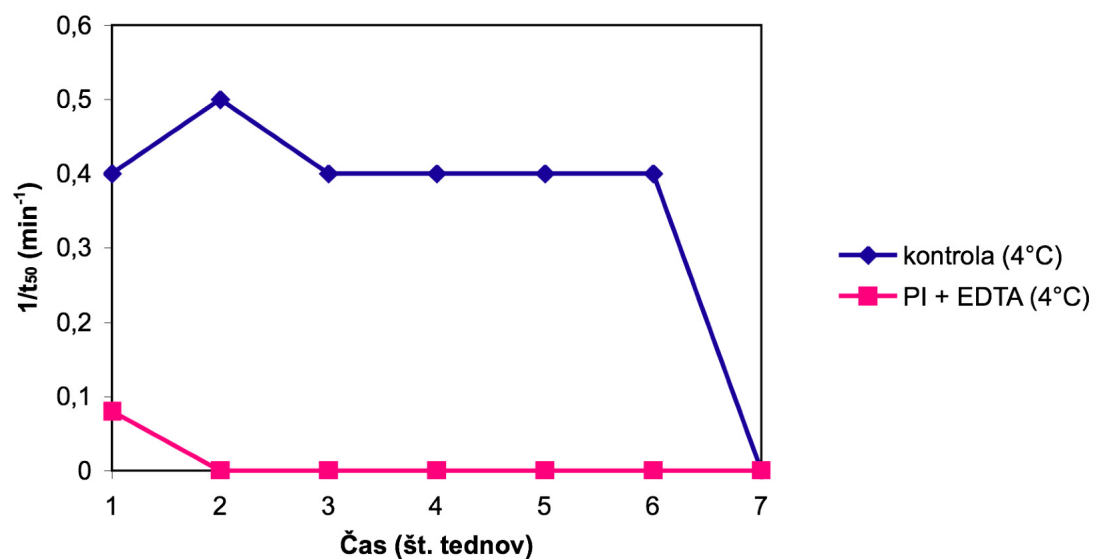
Slika 7: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM



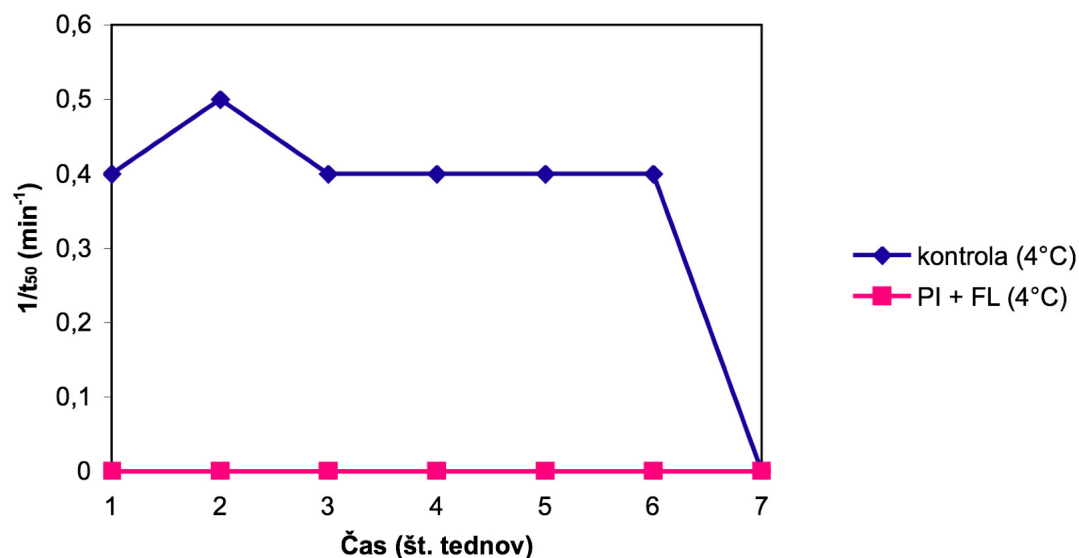
Slika 8: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM



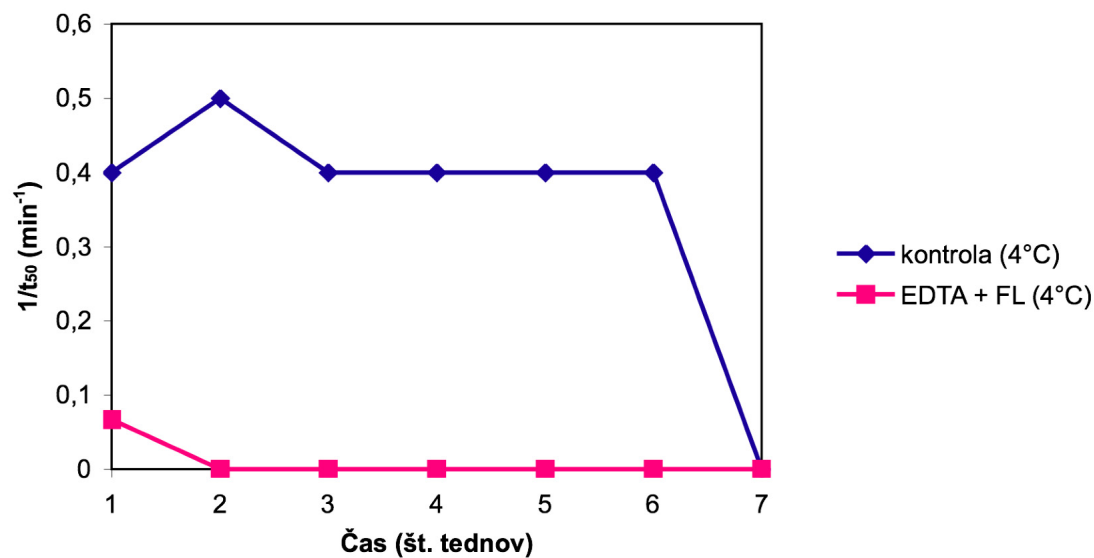
Slika 9: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. FL: 2 mM



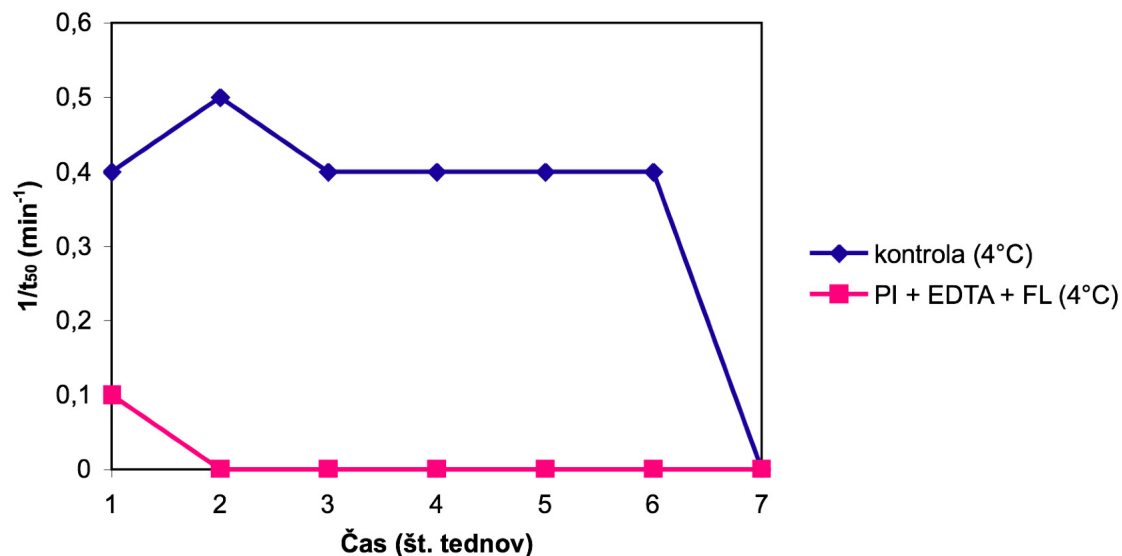
Slika 10: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM, PI: 0.23 mM



Slika 11: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri 4°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, FL: 2 mM



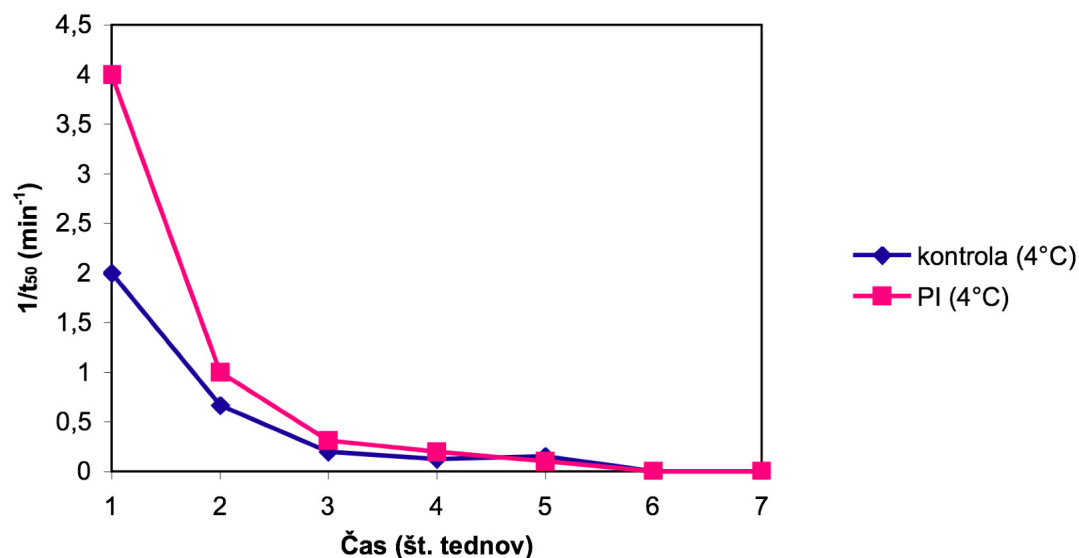
Slika 12: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri 4°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM, FL: 2 mM



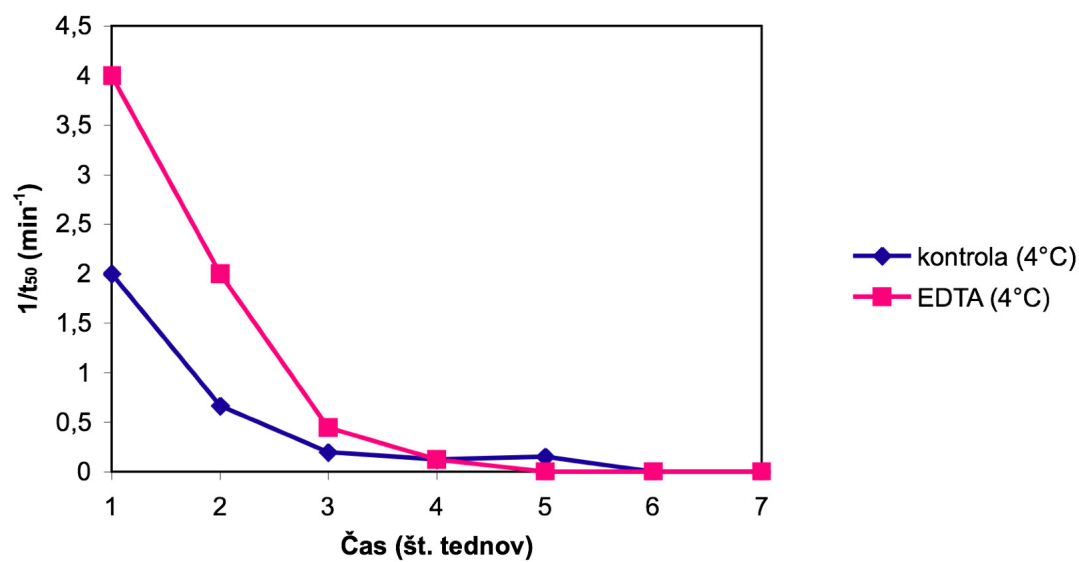
Slika 13: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantroline (FL) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM, FL: 2 mM

Slike 14-20 prikazujejo časovni vzorec spreminjanja hemolitične aktivnosti vzorca 2 (kontrola in vzorec z dodatki) shranjenega pri 4°C.

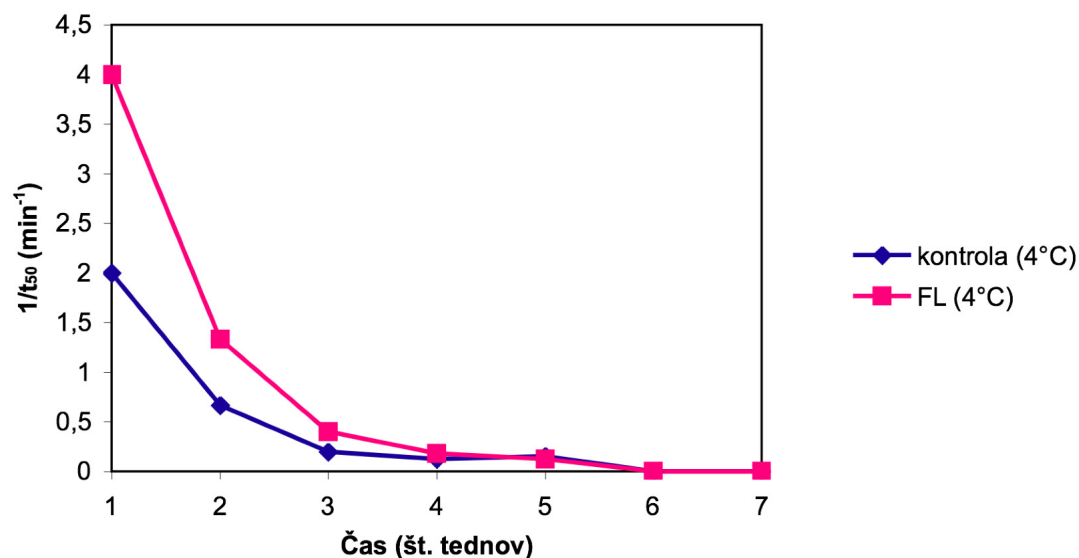
V vseh primerih se je izkazalo, da je vzorec 2 (nanos na kolono) manj stabilen od vzorca 1, saj aktivnost že po 1 tednu pade na cca 25% začetne aktivnosti, po 2 tednih pa se že popolnoma izgubi. Dodatki tukaj niso igrali nobene vloge. Vzorec z dodatki je bil v začetku rahlo bolj aktiven od kontrol.



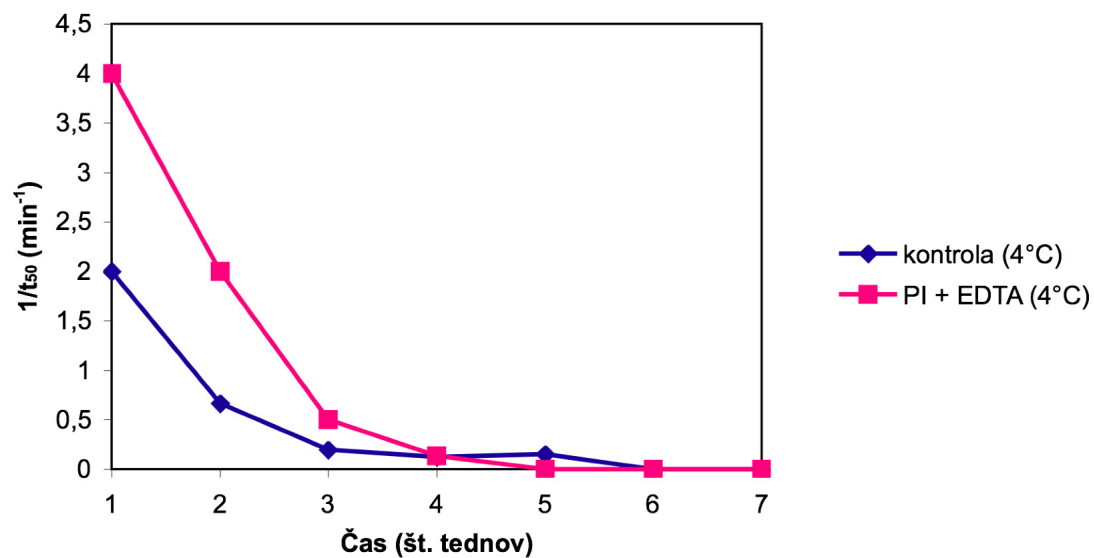
Slika 14: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM



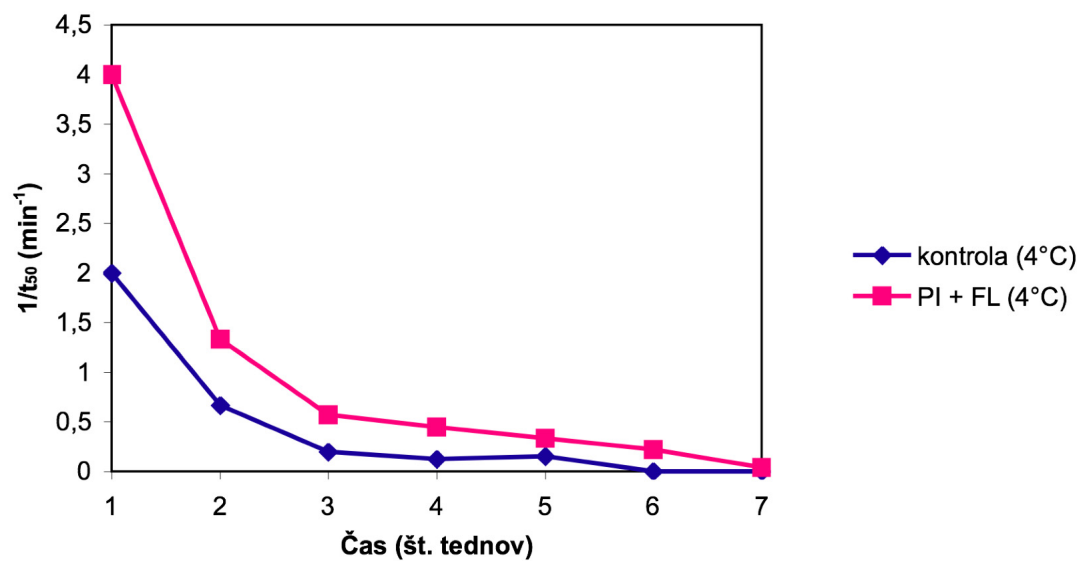
Slika 15: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM



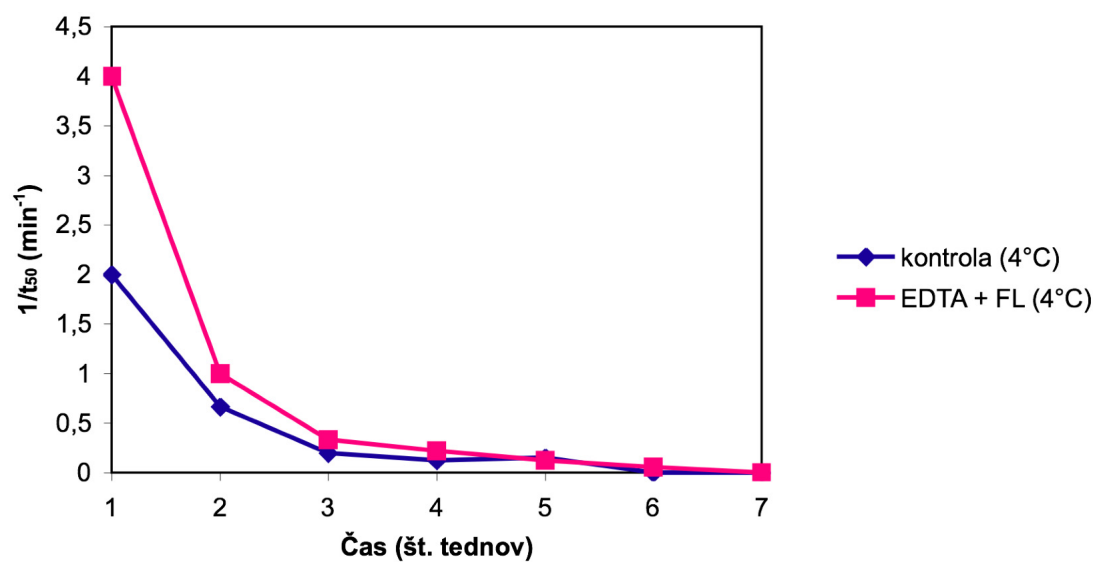
Slika 16: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. FL: 2 mM



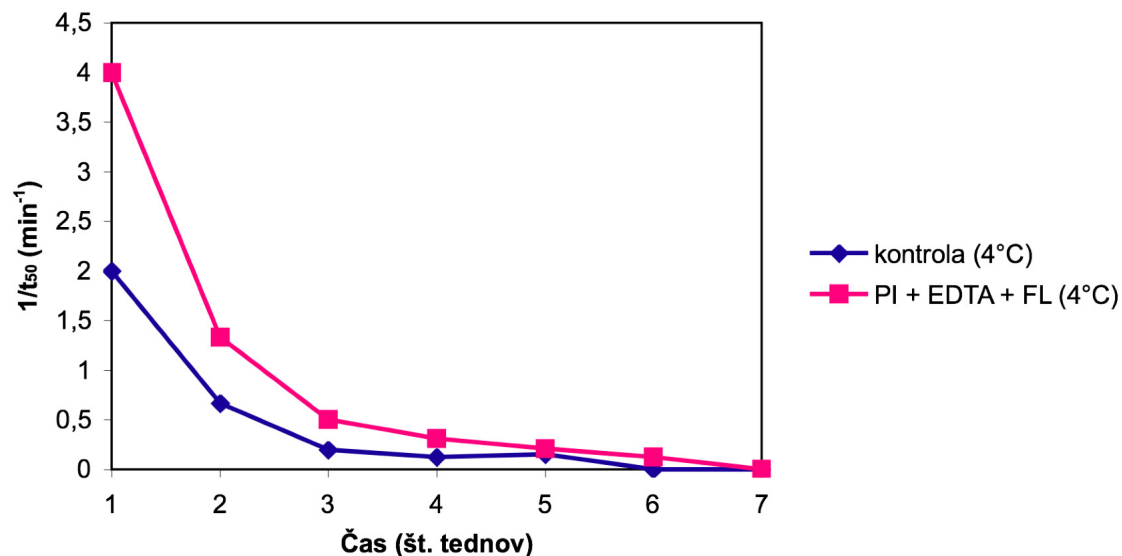
Slika 17: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM



Slika 18: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, FL: 2 mM



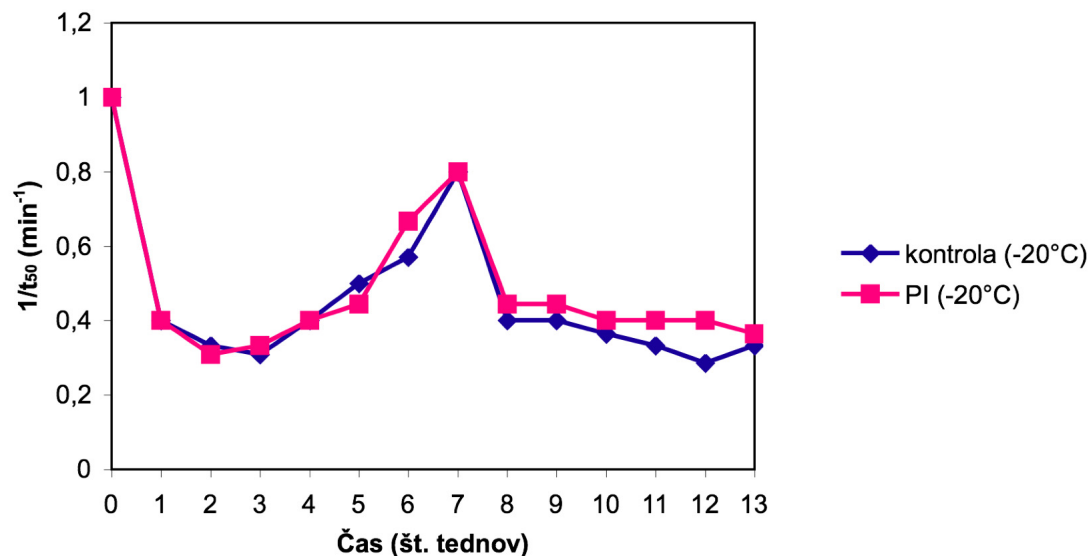
Slika 19: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM, FL: 2 mM



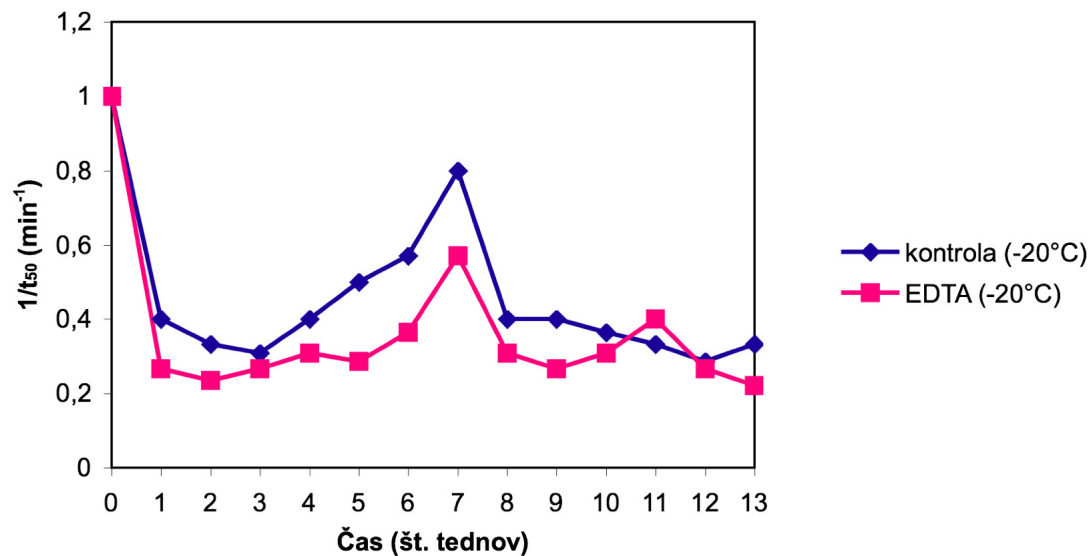
Slika 20: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantroline (FL) v času pri 4°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM, FL: 2 mM

Slike 21-27 predstavljajo časovni potek spreminjanja hemolitične aktivnosti vzorca 1 (supernatant po prvem centrifugiranju) shranjenega pri -20°C.

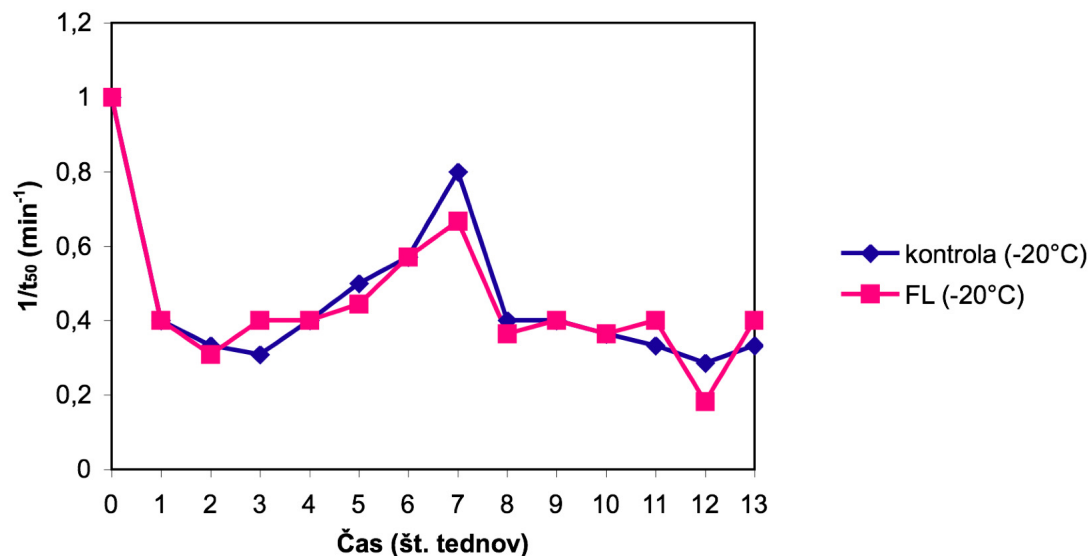
Iz slik je vidno, da zamrznjeni vzorec 1 obdrži aktivnost tudi več tednov. Vpliv dodatkov ni razviden, torej je za to da obdržimo aktivnost, bolj ključna temperatura – vzorce je bolje zamrzovati. V vseh primerih aktivnost po 1 tednu nekoliko pade, vendar se potem obdrži. Rahel dvig aktivnosti, ki ga opazimo od 4. do 7. tedna, povzročijo verjetno eritrociti sami, saj smo do 7. tedna za meritve hemolitične aktivnosti spirali in uporabljali isti vzorec eritrocitov, ki so s časom postali bolj občutljivi. V 8. tednu smo uporabili sveže eritrocite in se je aktivnost spet znižala.



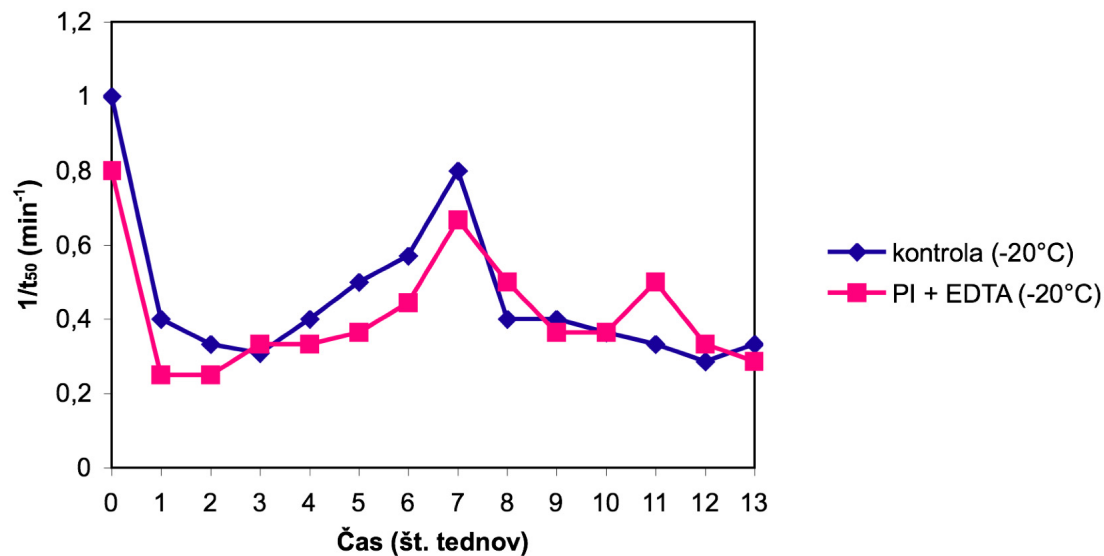
Slika 21: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM



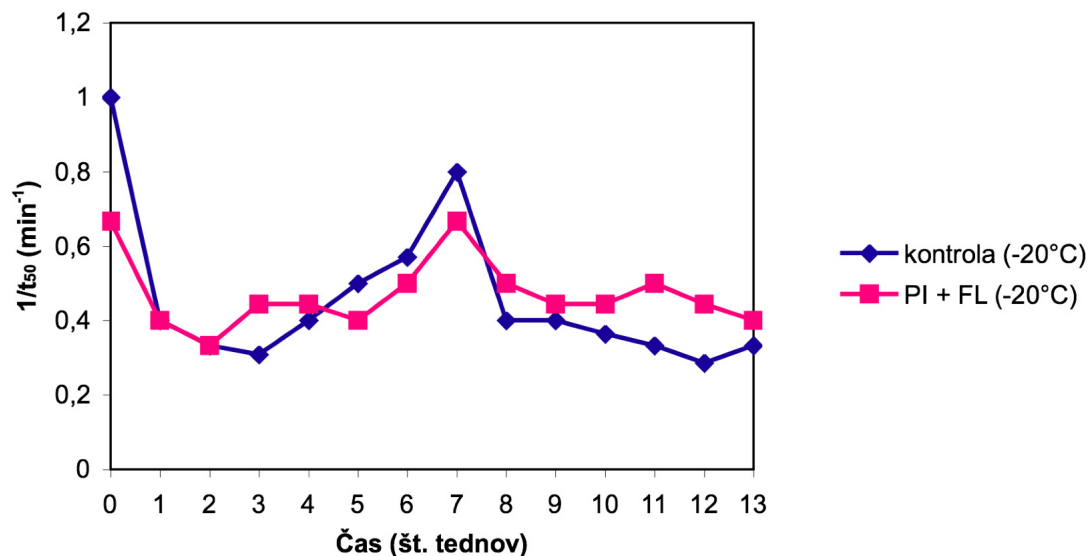
Slika 22: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM



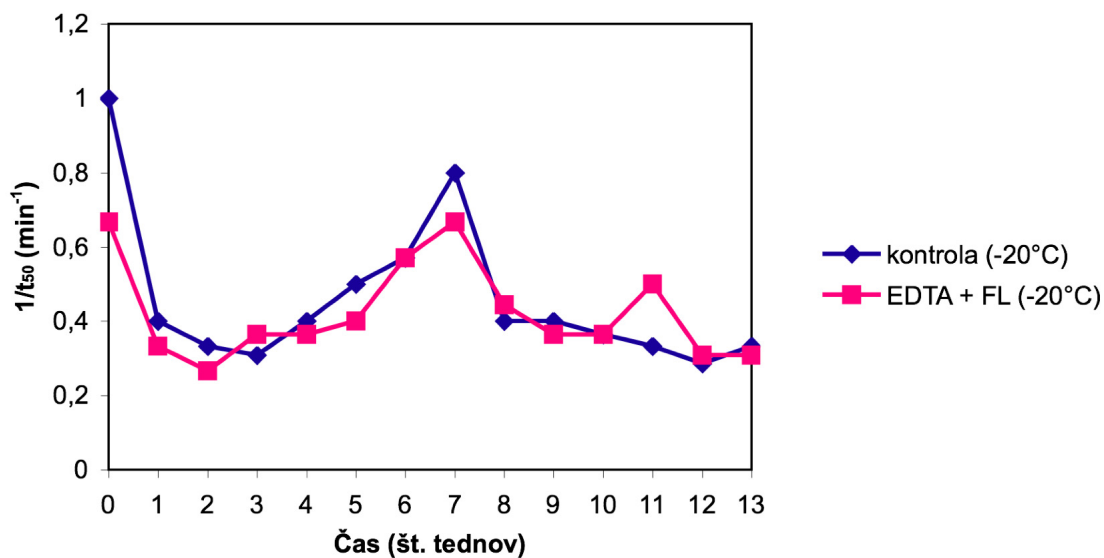
Slika 23: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. FL: 2 mM



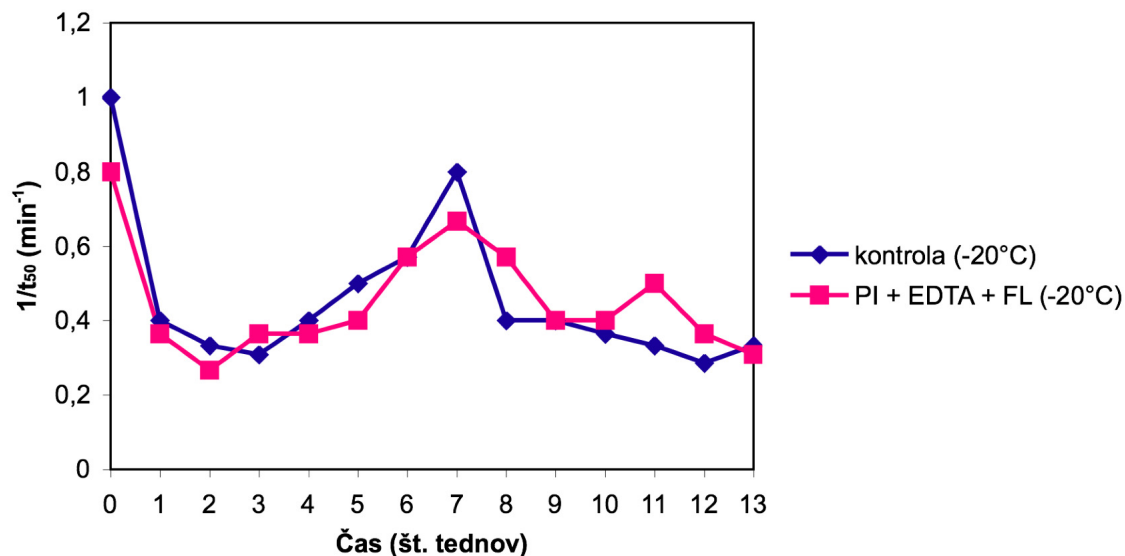
Slika 24: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM



Slika 25: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, FL: 2 mM



Slika 26: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM, FL: 2 mM

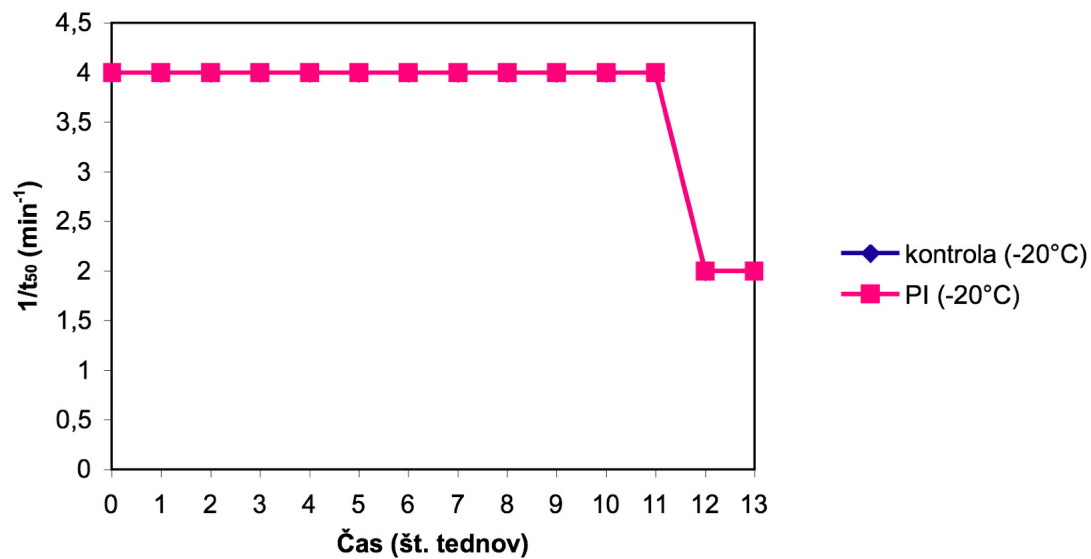


Slika 27: Spreminjanje aktivnosti vzorca 1 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantrolina (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM, FL: 2 mM

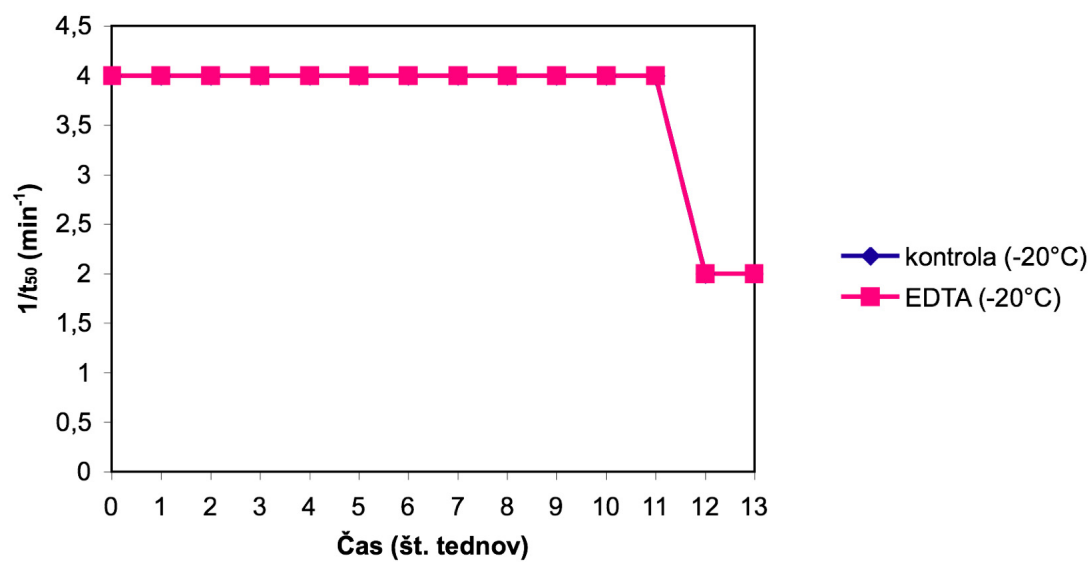
Slike 28-34 predstavljajo časovni potek spreminjanja hemolitične aktivnosti vzorca 2 (kontrola in vzorec z dodatki) pri -20°C .

Vzorec 2 (nanos na kolono) pri vseh testih delno izgubi aktivnost po 12. tednu, kar se sklada z rezultati pri shranjevanju pri 4°C (ta vzorec je očitno manj stabilen).

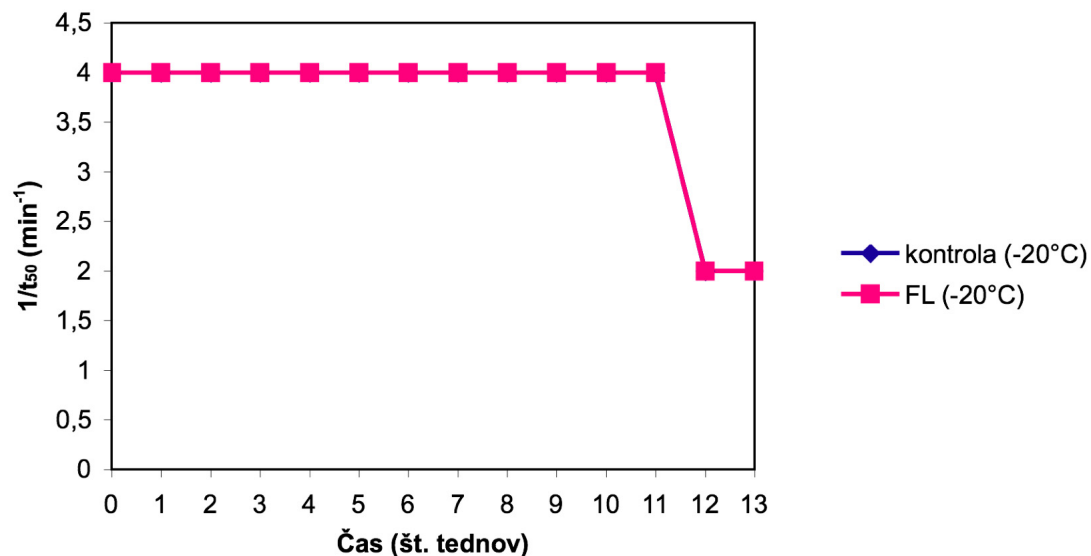
Tudi pri tem vzorcu dodatki nimajo vpliva na aktivnost, torej je temperatura tista, ki je pri obeh vzorcih (1 in 2) ključnega pomena za shranjevanje vzorca.



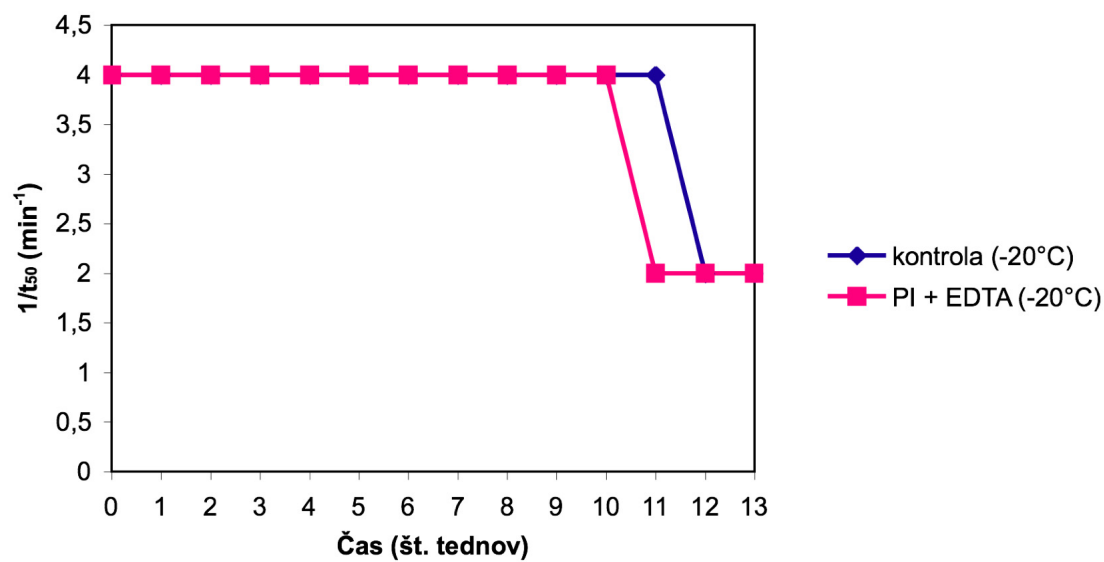
Slika 28: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM



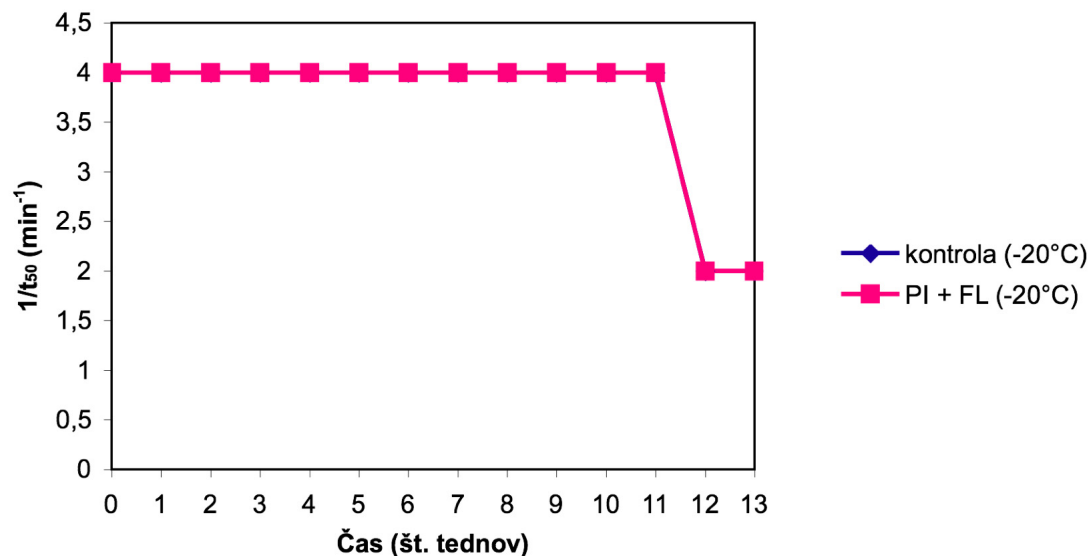
Slika 29: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM



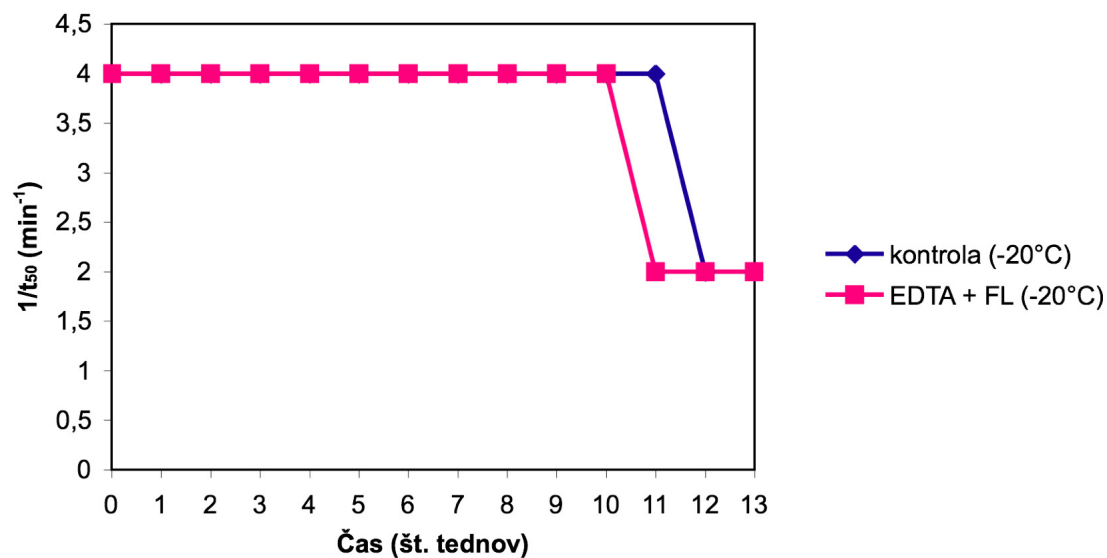
Slika 30: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom fenantrolina (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. FL: 2 mM



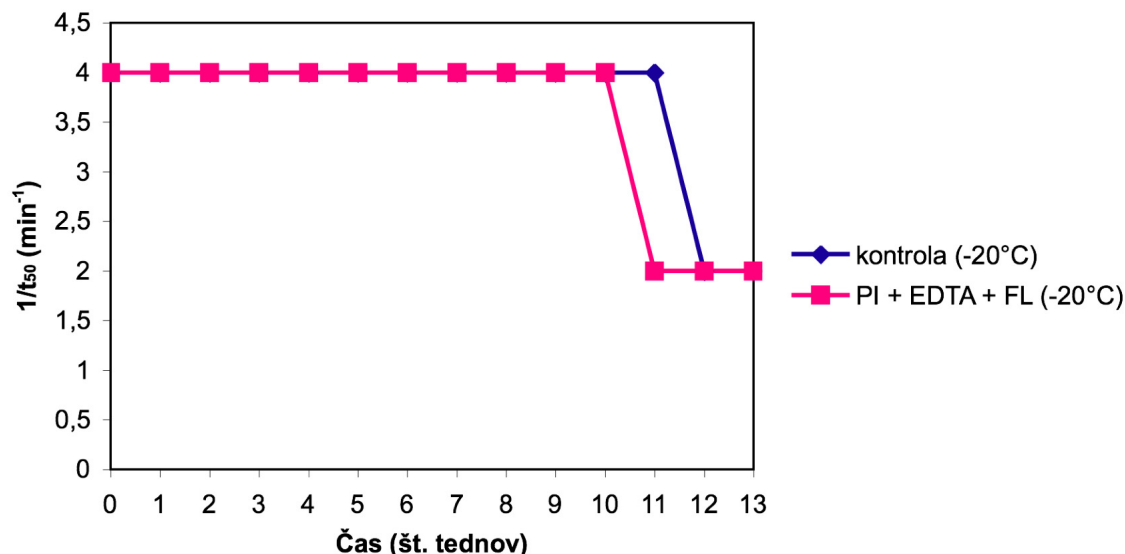
Slika 31: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in EDTA v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM



Slika 32: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI) in fenantrolina (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, FL: 2 mM



Slika 33: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom EDTA in fenantrolina (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM, FL: 2 mM



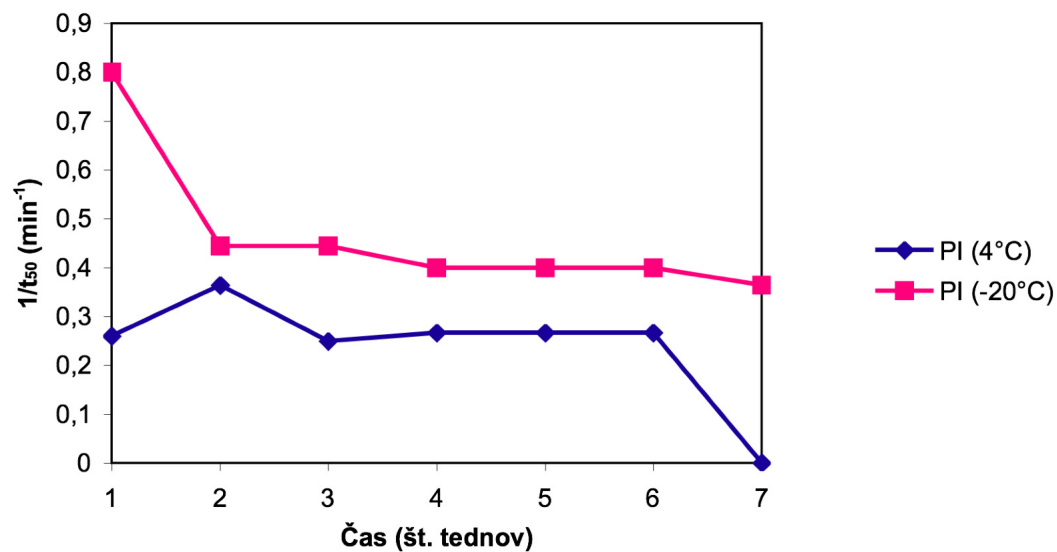
Slika 34: Spreminjanje aktivnosti vzorca 2 z dodatkom proteaznega inhibitorja (PI), EDTA in fenantroline (FL) v času pri -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM, FL: 2 mM

Slike 35-48 primerjalno prikazujejo spreminjanje hemolitične aktivnosti enako obdelanih vzorcev shranjenih pri 2 različnih temperaturah, in sicer pri 4°C in -20°C .

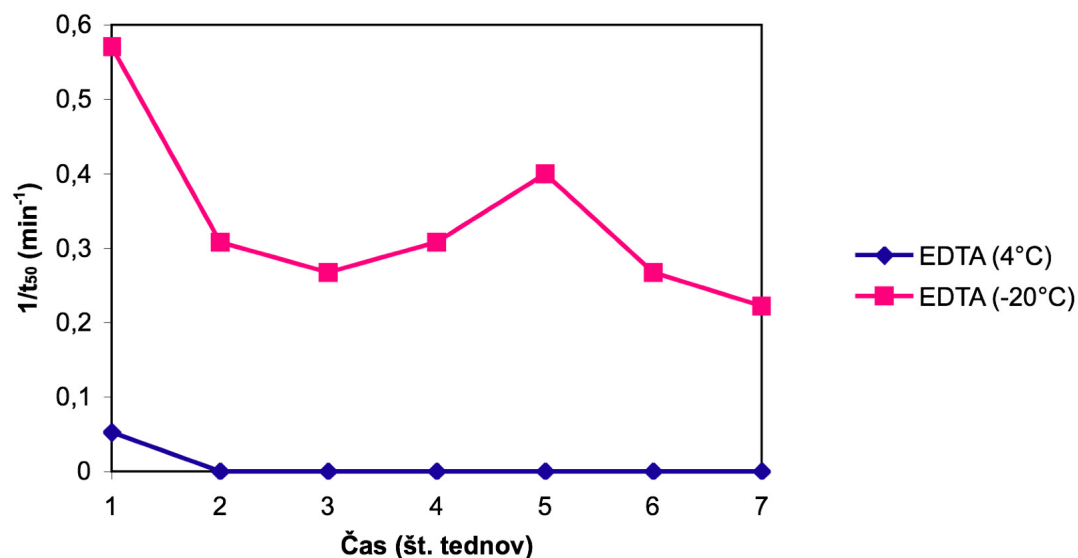
V primeru proteaznega inhibitorja v vzorcu 1 (Slika 35) je aktivnost ostreolizina skozi čas pri obeh temperaturah najbolj podobna in za kratek čas stabilna. Upad hemolitične aktivnosti v 7. tednu pri 4°C je rezultat napačnega shranjevanja pri 25°C . Pri ostalih slikah 36-41 vidimo, da so vzorci 1 z dodatki veliko aktivnejši pri -20°C v primerjavi z istim vzorcem shranjenim pri 4°C . Na začetku je aktivnost zamrznjenih vzorcev 1 z dodatki velika, nato pa v 2. tednu upade na cca 50% začetne hemolitične aktivnosti (tudi slika 35) in se nato ohrani, medtem ko se aktivnost ostreolizina v vzorcih 1 z dodatki pri 4°C že takoj na začetku izgubi.

Tudi vzorec 2 z dodatki je v vseh primerih bistveno aktivnejši, če ga shranjujemo pri -20°C kot pri 4°C (Slike 42-48). V začetnih tednih je aktivnost ostreolizina z dodatki stabilna, od 5. tedna naprej pa njegova hemolitična aktivnost upade za polovico začetne vrednosti, še vedno pa ne doseže padca vzorca 2 z dodatki pri 4°C , kjer po 1 tednu aktivnost pade že na cca 25% začetne vrednosti. Padec hemolitične aktivnosti ostreolizina je tudi tukaj nekoliko pogojen z novim vzorcem eritrocitov.

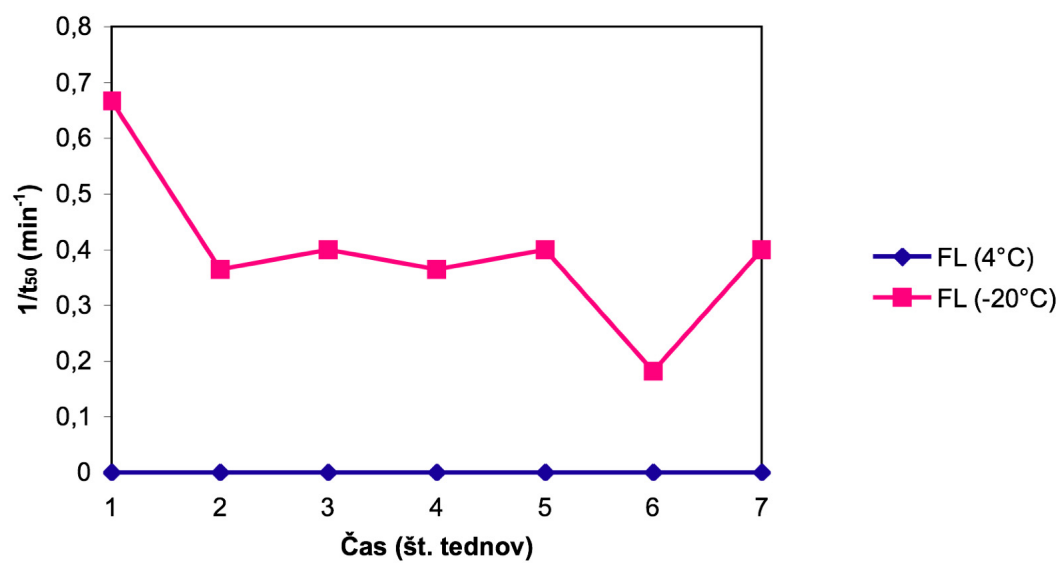
Slike 35-48 še enkrat dokazujejo ključen pomen temperature (in ne dodatkov) za shranjevanje vzorcev, ki vsebujejo ostreolizin na različnih stopnjah izolacije.



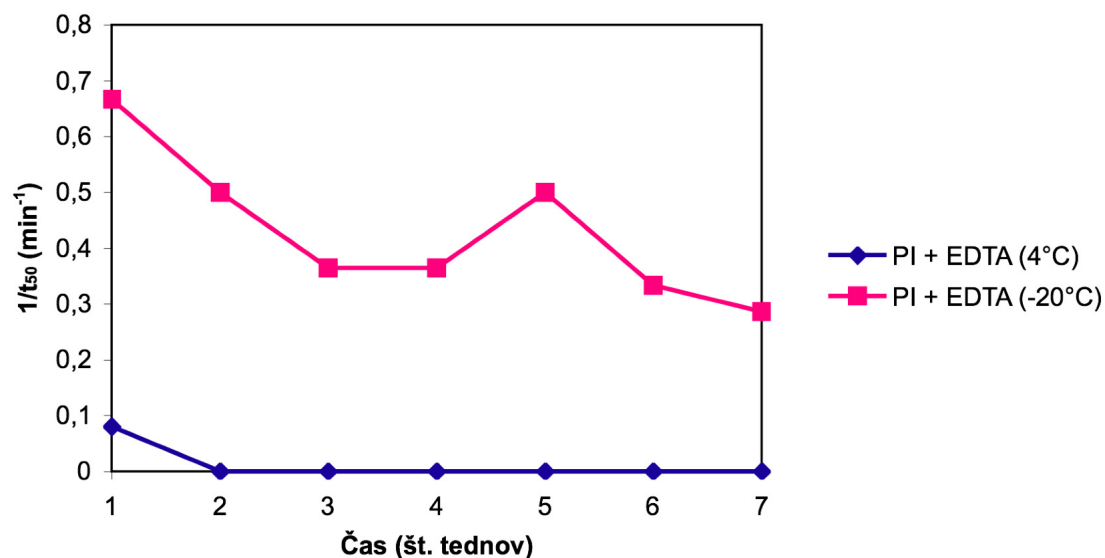
Slika 35: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM



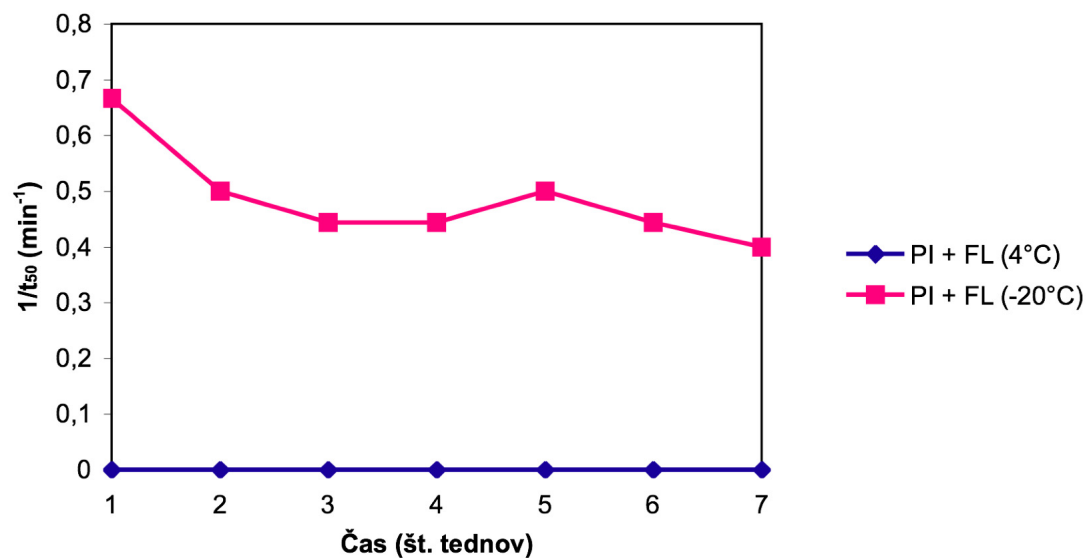
Slika 36: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim EDTA pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM



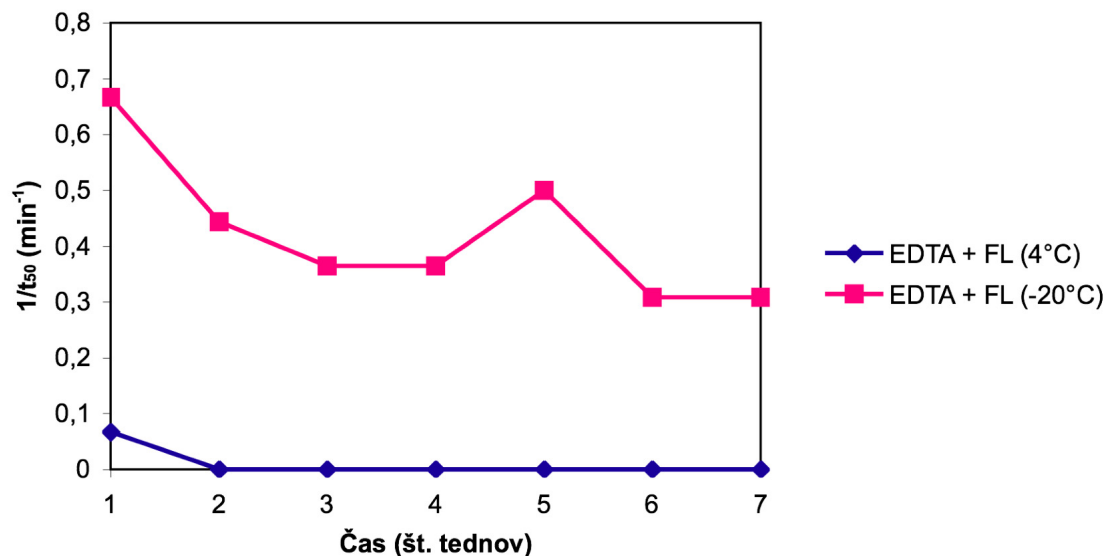
Slika 37: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. FL: 2 mM



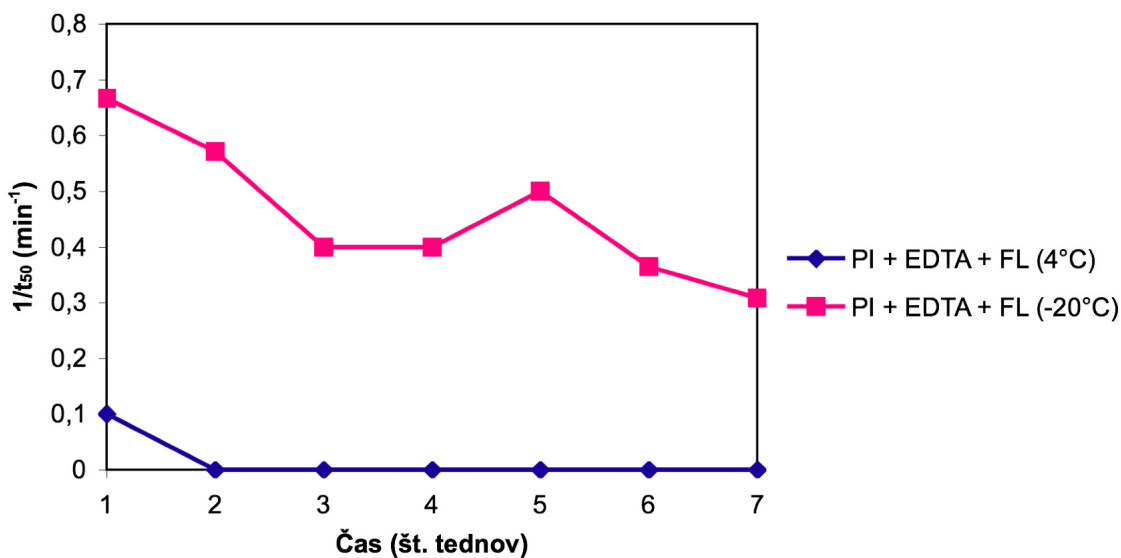
Slika 38: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in EDTA pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM



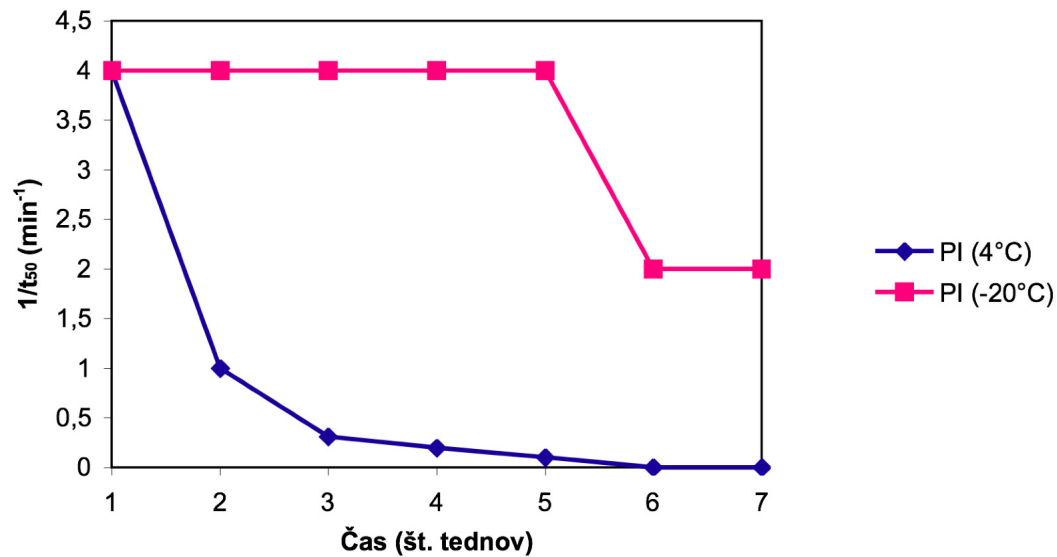
Slika 39: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, FL: 2 mM



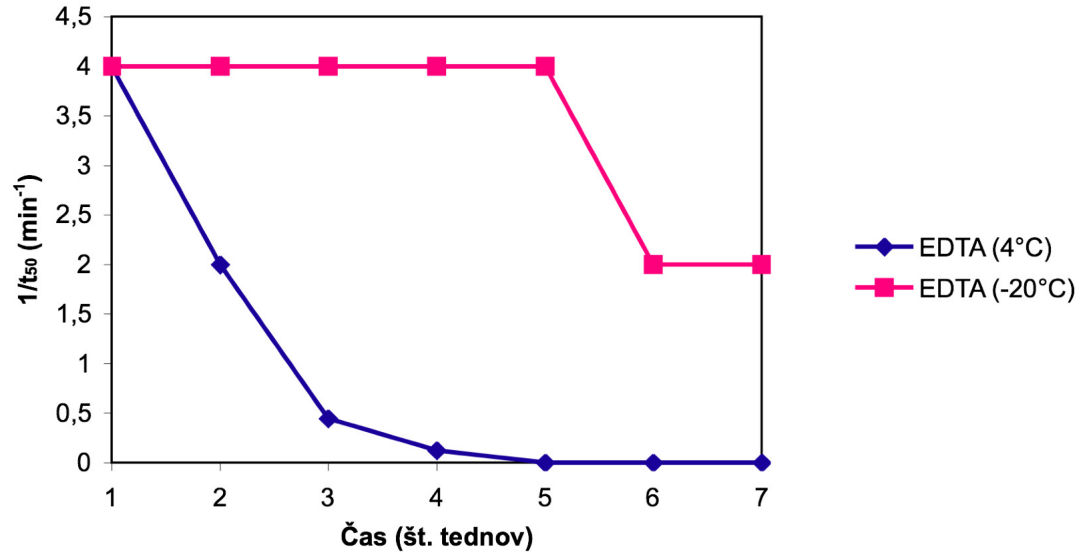
Slika 40: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM, FL: 2 mM



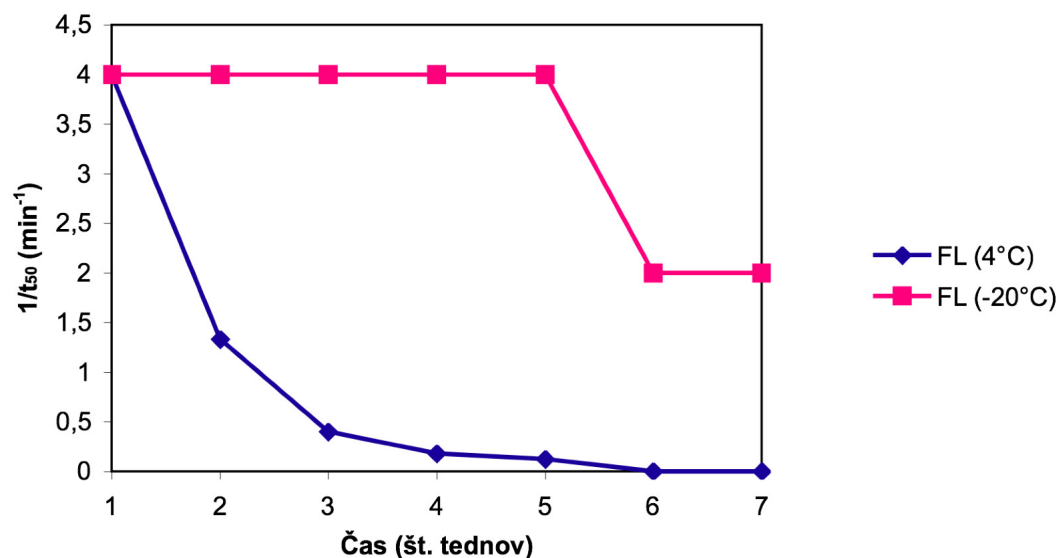
Slika 41: Primerjava aktivnosti vzorca 1 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI), EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM, FL: 2 mM



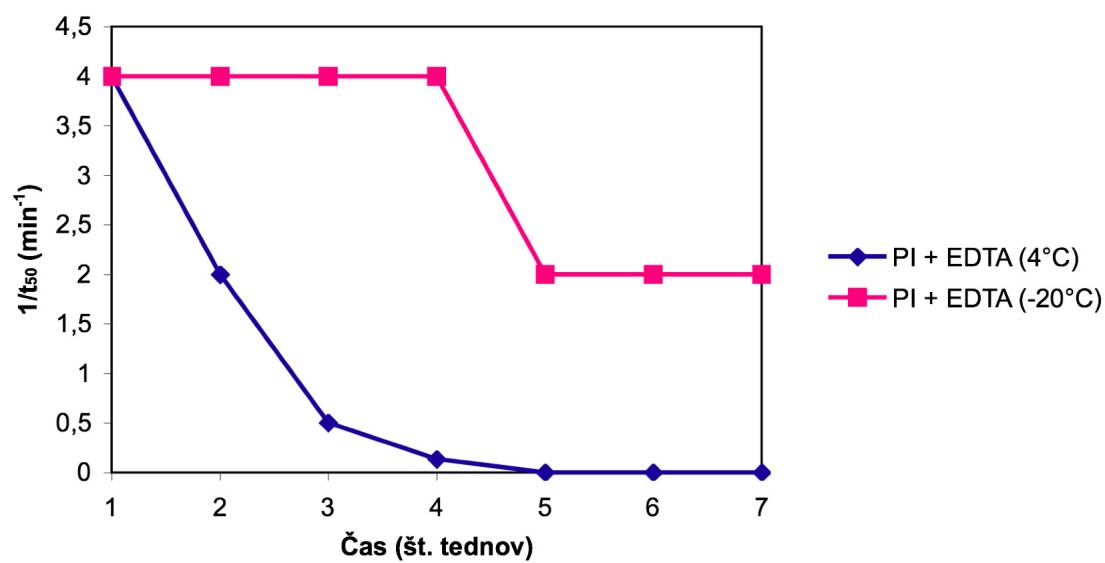
Slika 42: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) pri 4°C in -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM



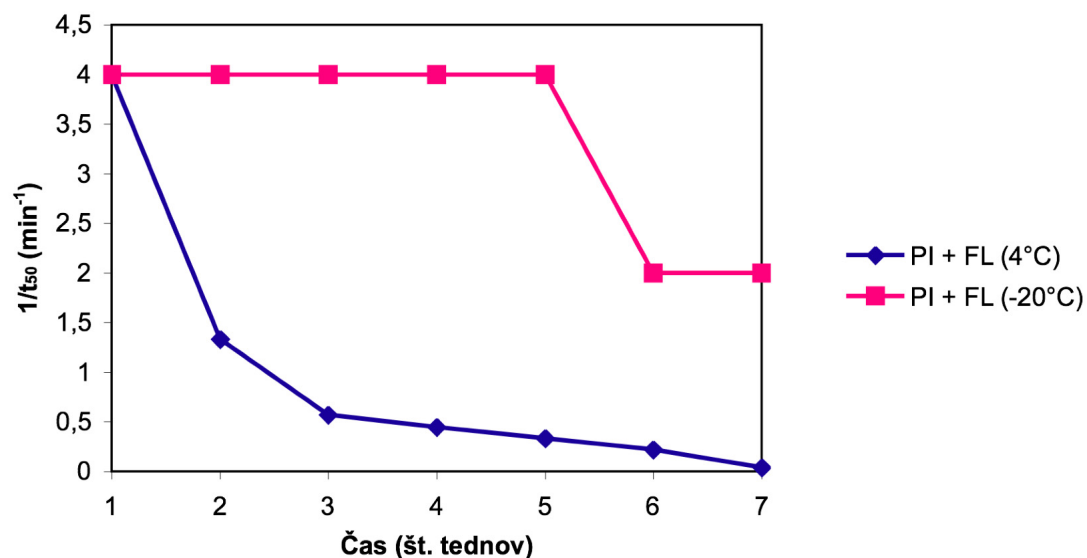
Slika 43: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim EDTA pri 4°C in -20°C . $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM



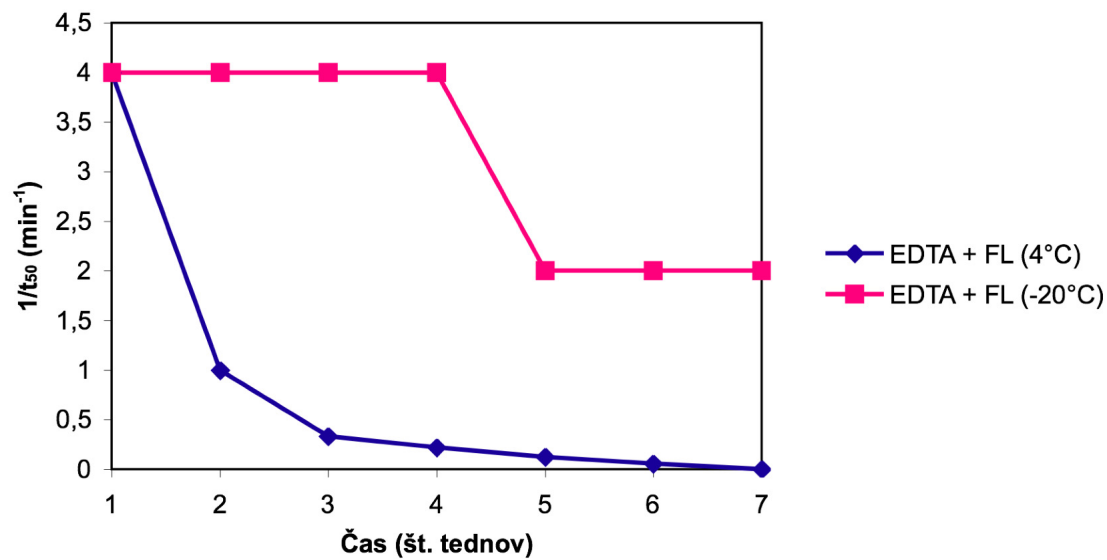
Slika 44: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. FL: 2 mM



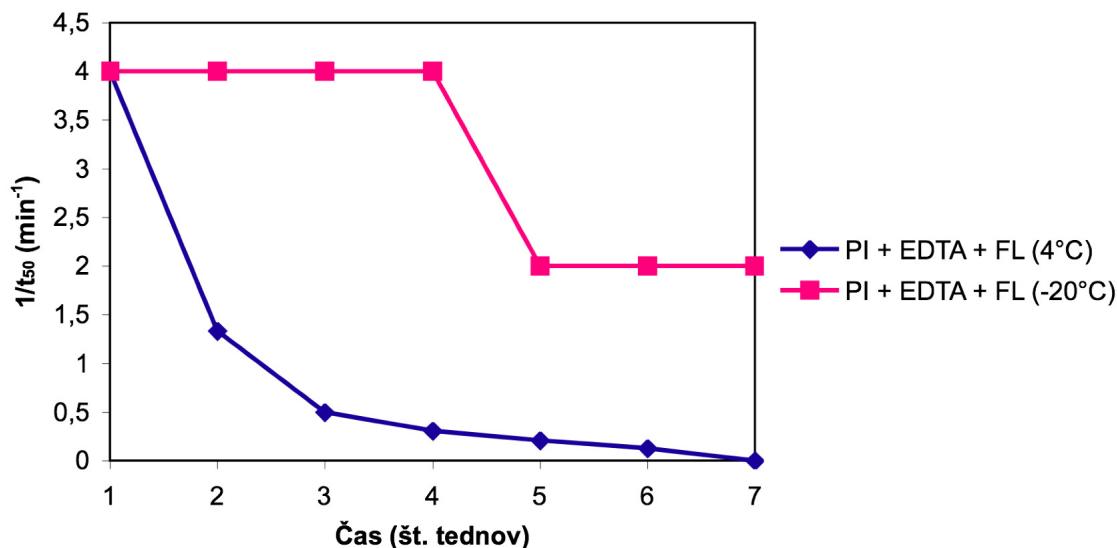
Slika 45: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in EDTA pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM



Slika 46: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI) in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, FL: 2 mM



Slika 47: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. EDTA: 10 mM, FL: 2 mM

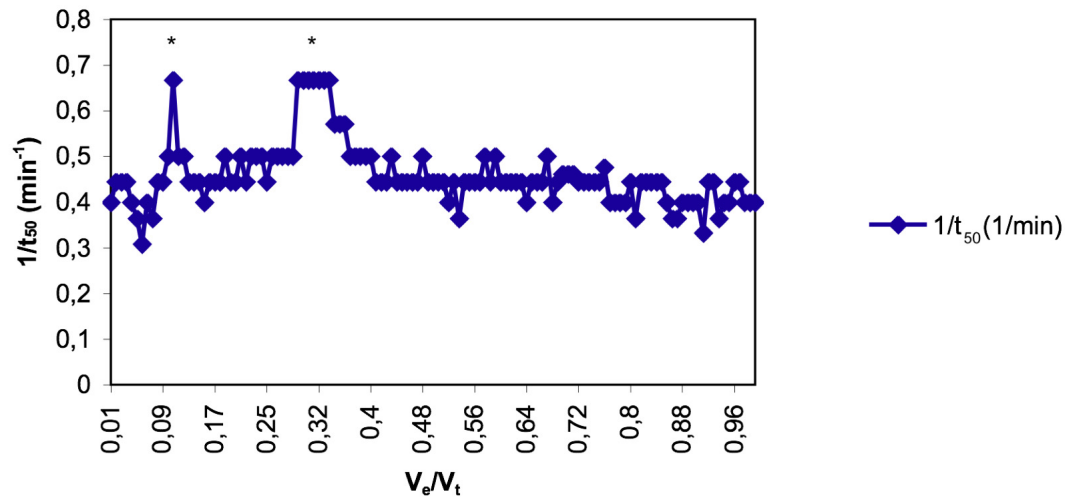


Slika 48: Primerjava aktivnosti vzorca 2 z dodanim proteaznim inhibitorjem (PI), EDTA in fenantrolinom (FL) pri 4°C in -20°C. $1/t_{50}$ - recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. PI: 0.23 mM, EDTA: 10 mM, FL: 2 mM

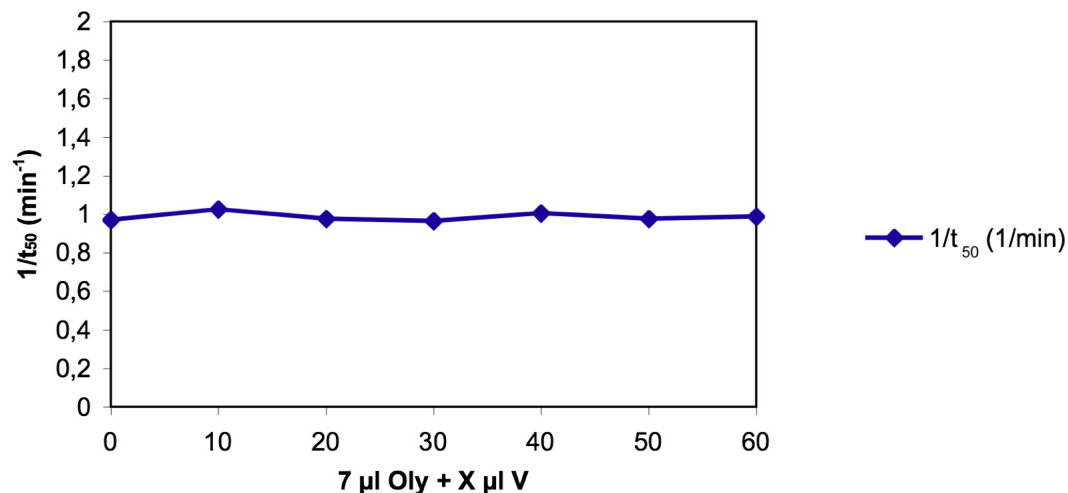
4.3 PREVERJANJE PRISOTNOSTI DODATNE HEMOLITIČNE KOMPONENTE V VODNEM EKSTRAKTU BUKOVEGA OSTRIGARJA

Pričakovali smo, da bo druga hemolitična komponenta, ki bi jo pri izolaciji lahko ločili od Oly, dvignila aktivnost ostreolizina, če mu je ponovno dodamo. Zato smo združevali frakcije. V prvem primeru smo kombinirali posamezne frakcije po gelski kromatografiji na gelu Sephadex G-50 (izolacije 20 dni zamrznjenih bukovich ostrigarjev) s hemolitično najaktivnejšo frakcijo (Oly) te izolacije po omenjeni kromatografiji. Rezultat kombiniranja frakcij predstavlja Slika 49, kjer smo opazovali spremembe v hemolitični aktivnosti (hitrost hemolize). Opazili smo dva vrhova. Frakcije z V_e/V_t od 0,29 do 0,34 so tiste, v katerih se pojavlja ostreolizin in je zaradi tega tukaj aktivnost povečana (Oly + Oly). Dvig hemolize smo opazili tudi v frakcijah 0,10-0,12, ki se izločajo na začetku (kjer bi se lahko pojavila tudi 59-kDa komponenta, ki bi skupaj z Oly tvorila bikomponentni citolizin in mu poveča aktivnost), zato smo le-te združili v vzorec V, ki smo ga v količinah 10, 20, 30, 40, 50 in 60 μ l dodajali k 7 μ l čistega ostreolizina in preverili spremembe v aktivnosti (Slika 50). Vzorcju V smo izmerili

tudi absorpcijo pri 280 nm ter določili koncentracijo proteina. Dobljena $c_p = 0,00$ mg/ml nam pove, da v frakcijah 0,10-0,12 verjetno ni prisotnih proteinov, torej tudi hemolize naj ne bi pospeševala proteinska komponenta.

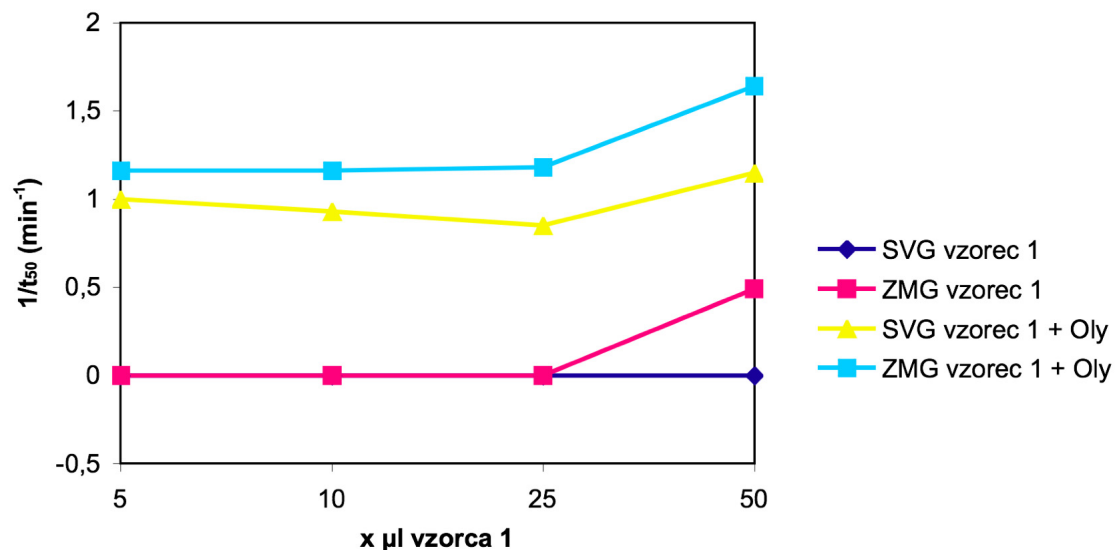


Slika 49: Hitrost hemolize pri frakcijah po gelski kromatografiji (Sephadex G-50) z dodatkom hemolitično najaktivnejše frakcije po tej kromatografiji. Z zvezdico je označeno območje frakcij pri katerem smo opazili dvig hemolitične aktivnosti. $1/t_{50}$ – recipročna vrednost polovičnega časa hemolize.



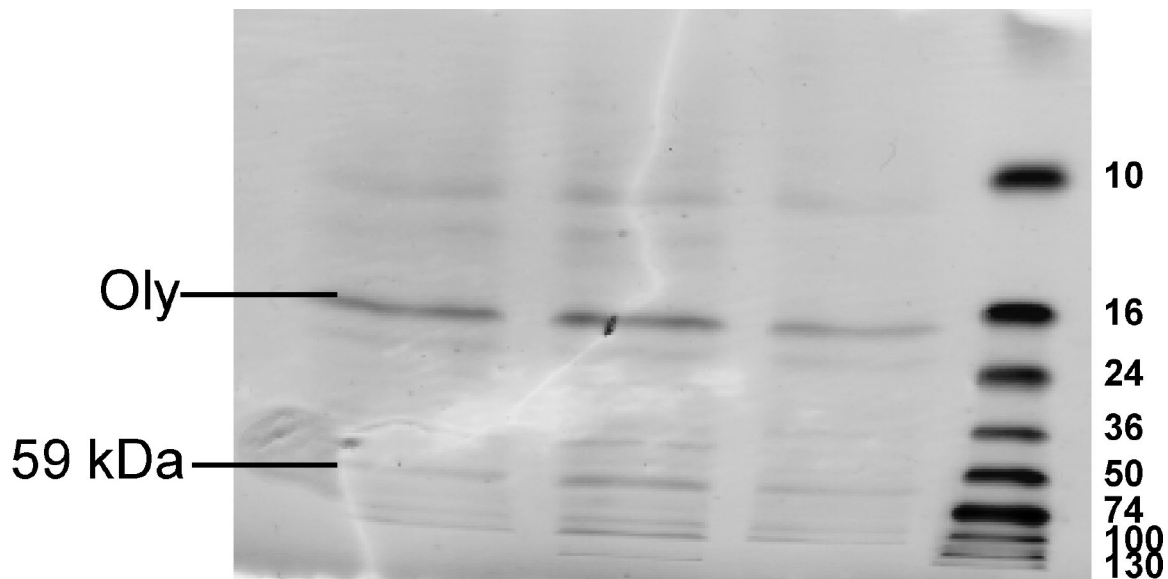
Slika 50: Variiranje hitrosti hemolize s konstantnim volumnom ostreolizina in naraščajočo količino vzorca V. $1/t_{50}$ – recipročna vrednost polovičnega časa hemolize. Oly = 0.1 mg/ml

Ker bi na tej stopnji izolacije že lahko prišlo do izgube dodatne komponente, smo preverili še vzorca 1 svežih in 20 dni zamrznjenih gob. Zanimale so nas morebitne spremembe v hemolitični aktivnosti teh dveh vzorčkov po dodatku čistega ostreolizina, kar nam prikazuje Slika 51. Iz slike je razvidno, da sam vzorec iz svežih gob pri 5, 10, 25 in 50 µl ni hemolitično aktiven, v kombinaciji s 6 µl čistega ostreolizina pa se aktivnost dvigne zaradi ostreolizina samega. Pri zamrznjenih gobah pa se pri 50 µl vzorca s čistim ostreolizinom pojavi dvig v aktivnosti (Oly + Oly) kot posledica aktivnejšega vzorca 1 samega. Tako smo za sveže in zamrznjene gobe dokazali, da tudi na začetni stopnji izolacije ni prisotne nobene komponente, ki bi delovala sinergistično z ostreolizinom, in ki bi jo potem skozi izolacijo izgubili.



Slika 51: Spremembe v hemolitični aktivnosti vzorcev 1 svežih (SVG) in 20 dni zamrznjenih (ZMG) bukovich ostrigarjev ob dodatku čistega ostreolizina (6 µl). Oly = 0.11 mg/ml.

Slika 52 predstavlja NaDS elektroforezno ločitev vzorcev 2; svežih, 6 ter 20 dni zamrznjenih bukovich ostrigarjev. Na sliki je opazna lisa pri cca 59 kDa, ki prikazuje domnevni 59-kDa protein, viden je tudi Oly (17 kDa) ter drugi proteini. Rezultati ločitve vzorcev 1 niso prikazani zaradi nizke koncentracije in slabe vidljivosti na gelu.



Slika 52: NaDS elektroforeza vzorcev 2. Prvi stolpec (iz leve proti desni) predstavlja izolacijo iz 20 dni zamrznjenih gob, drugi iz 6 dni zamrznjenih gob in tretji izolacijo iz svežih gob. Na desni strani so prikazane molekulske mase proteinskih markerjev, levo je označena lisa, ki prikazuje Oly, in lisa, ki prikazuje domnevni 59-kDa protein.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Opis izolacije ostreolizina (glej točko 2.2.1) po metodah Berne in sod., 2002, pleurotolizina A (glej 2.2.2) po Tomiti in sod., 2004 ter rekombinantnega Ply, ki ga izolirajo Sakurai in sod., 2004, nam poda temeljne razlike med izolacijami. Prva je že omenjena razlika v izolaciji iz svežih bukovih ostrigarjev pri Berne in sodelavcih, ter na drugi strani Tomite in sodelavcev, ki so uporabili zamrznjene gobe pri -40°C . Sakurai in sod., 2004 pa izolirajo izraženi rekombinantni pleurotolizin iz bakterije *E. coli*, v katere plazmid so pred tem vnesli gen za pleurotolizin. Za PlyA in PlyB so uporabili različna seva *E. coli*, ki so ju pred izolacijo namnožili v gojišču pri 37°C . Naslednja razlika je dodatek FL, EDTA in PI v 50 mM Tris-HCl pufer za homogenizacijo pri Tomiti, medtem ko Berne in sodelavci homogenizirajo v pufru brez dodatkov. Sakurai pa za izolacijo rekombinantne PlyA komponente, bakterijske celice po centrifugiranju raztopi v 10 mM Tris-HCl pufru s pH 8.4, kamor doda le 10 mM EDTA. Tretja je razlika v nasičenosti z amonijevim sulfatom. Berne in sodelavci uporabljajo precipitat od 35 do 65% nasičenja, medtem ko Tomita najprej obarja s 60% amonijevim sulfatom, kasneje pred nanosom na kolono še s 25% AS. Podobno izolacijo so opisali tudi Sakurai in sodelavci (2004) za PlyA. Majhne razlike so še v pH vrednostih osnovnega pufru (Berne pH 8.5, Tomita pH 8.3, Sakurai pH 8.4). Berne uporabi NaCl, Tomita KCl in KH_2PO_4 , Sakurai pa KCl za spiranje pri ionsko-izmenjevalni kromatografiji. Tudi eritrociti niso pri vseh izolacijah enaki. Berne uporablja goveje, Tomita in Sakurai pa človeške eritrocite. Za ostreolizin vemo, da ne kaže razlik v lizi ovčjih, govejih in človeških eritrocitov (Sepčić in sod., 2003), membranska aktivnost pleurotolizina pa korelira z vsebnostjo sfingomielina v eritrocitih (Bernheimer in Avigad, 1979, Tomita in sod., 2004). Vse našete razlike, vključno z uporabo različnih kromatografskih tehnik, so lahko razlog za nihanje aktivnosti ostreolizina in pleurotolizina med izolacijami.

Berne in sodelavci so preizkusili več metod za izolacijo hemolitičnega proteina iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*). Pri tem so spreminjali odstotek nasičenja z amonijevim sulfatom v posameznih obarjalnih stopnjah ter količino nanosa, ionsko sestavo in pH pufrov, hitrost pretoka in volumen frakcij pri različnih kromatografijah. Najbolj ustaljeno izolacijo (Berne in sod., 2002) smo uporabili tudi mi, saj so pri vseh drugih metodah Berne in sodelavci dobili manj čist protein, večje izgube, agregacijo in obarjanje proteina ter s tem povezano izgubo aktivnosti.

Pri izolaciji je bilo pomembno, da so gobe sveže, saj so pri preliminarnih raziskavah ugotovili, da se pri izolaciji iz starih gob zmanjša hemolitična aktivnost vzorca, pri zamrznjenih gobah pa hemolitične aktivnosti včasih sploh niso zasledili.

Berne in sodelavci ugotovijo, da prihaja pri obarjanju ostreolizina z amonijevim sulfatom do izgube totalne hemolitične aktivnosti, najverjetneje zaradi nepopolnega raztapljanja precipitata. Pogosto je prišlo tudi do upada totalne hemolitične aktivnosti po gelski kromatografiji na gelu Sephadex G-50, kjer bi se lahko izgubila določena komponenta ostreolizina, potrebna za hemolitično aktivnost.

Tudi Tomita in sodelavci (leta 2004) ugotovijo, da se po gelski filtraciji homogenata bukovega ostrigarja na nosilcu Sephadex G-75 HA izgubi, po združevanju posameznih frakcij pa se ponovno pojavi. Odkrili so namreč, da je hemolitičen protein Ply, ki so ga izolirali iz iste glive (Tomita in sod., 2004), sestavljen iz dveh nepovezanih komponent PlyA (17 kDa) in PlyB (59 kDa). Za hemolitično delovanje Ply pa sta potrebni obe komponenti citolizina, ki največjo aktivnost dosežeta v molarnem razmerju 3:1. Posamezni komponenti Ply sami zase nista bili hemolitično aktivni, četudi je bila njuna koncentracija v testu 80 µg/ml.

Neaktivnost PlyA komponente, ki ima kar 93% identičnost z ostreolizinom, bi bila lahko povezana z zamrzovanjem gobe (-40°C) pred izolacijo, saj je znano, da pri zamrznjenih gobah hemolitična aktivnost ostreolizina močno upade (Berne in sod., 2002). Poleg tega naj bi bile manjše izgube ostreolizina posledica vezave proteina na nosilec pri ionsko izmenjevalni

kromatografiji ter adsorpcije proteina na membrano mikrokoncentratorja pri koncentriranju proteina. Razlike v posameznih izolatih ostreolizina zavisijo tudi od starosti gob, substrata, letnega časa rasti gobe, ter časa od nabiranja gob do izolacije ostreolizina.

Zaradi predhodnih ugotovitev Berne in sodelavcev 2002, 2005 ter Tomite in sodelavcev 2004, smo Oly izolirali (po ustaljeni metodi Berne in sod., 2002) ločeno iz svežega in iz zamrznjenega materiala, po različnih časih od dneva zamrzovanja; 6 in 20 dni.

Kromatogrami izolacije ostreolizina iz svežih (Slika 1), 6 dni zamrznjenih (Slika 2) in 20 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev (Slika 3) so zelo podobni. Ostreolizin se je spiral v drugem vrhu, pri elucijskem volumnu ($V_e/V_t = 0.27 - 0.4$), saj tam zasledimo hemolitično aktivne frakcije. Skozi izolacije se HA in višina aktivnega vrha pri svežih (Slika 1) in 6 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev (Slika 2) nista spreminjali, medtem ko pri izolaciji iz 20 dni zamrznjenih gob aktivnost upade na polovično vrednost svežih gob. Ugotovili smo, da zamrzovanje najbolj izrazito zmanjša stopnjo očiščenja (Slika 4c), opazen je tudi upad specifične aktivnosti (Slika 4b), kar pa ne moremo trditi za totalno aktivnost vseh vzorcev (Slika 4a).

Za uspešno izolacijo morata stopnja očiščenja in specifična aktivnost skozi stopnje čiščenja iste izolacije naraščati, totalna aktivnost pa rahlo upadati. Iz supernatanta (vzorec 1) do nanosa na kolono (vzorec 2) pride do 5-kratnega povečanja v stopnji očiščenja ostreolizina. Tudi pri zamrznjenih gobah pred izolacijo opazimo podobno povečanje vzorca 2. Vzorec 3 so združene frakcije po kromatografiji in bi se, v primeru prisotnosti druge komponente v kateri od frakcij, še dodatno povečala aktivnost Oly, če bi šlo za bikomponenten citolizin. Ker se to v nobeni izolaciji ne zgodi, med vzorcema 2 in 3 ne bi smelo priti do sprememb v specifični aktivnosti. Vzorec 3 je namreč vzorec 2 spuščen skozi kolono. V vseh primerih izolacije imamo pri vzorcu 3 padec tako specifične aktivnosti kot stopnje očiščenja. Razlogov za tak rezultat je več. V frakciji so lahko prisotne kakšne inhibitorne komponente, prav tako bi bil možen vpliv

temperature. Zaradi doslednega upoštevanja protokola izolacije, bi to možnost v našem primeru lahko izključili.

Kot smo že omenili, pri izolaciji iz svežih bukovih ostrigarjev trend padanja totalne aktivnosti in trend naraščanja specifične aktivnosti ter stopnje očiščenja moti le vzorec 3, kjer pride v vseh teh parametrih do izrazitega padca. Pri 6 in 20 dni zamrznjenih gobah pa trend padanja v izolaciji opazimo le pri totalni aktivnosti (ponovno jo moti vzorec 3), medtem ko o naraščanju specifične aktivnosti in stopnje očiščenja težko govorimo. Opazimo le dvig v aktivnosti vzorcev 2 in 4. Vse to nakazuje na dejstvo, da dodatne komponente, ki bi ojačala aktivnost Oly, v našem primeru ni.

Izolacija iz 30 dni zamrznjenih gob je potekala z dodatkom oksidanta fenantrolina, kelatorja dvovalentnih kationov EDTA in s PMSF kot proteaznim inhibitorjem. Ostreolizin se tudi tukaj spira pri elucijskem volumnu ($V_e/V_t = 0.27 - 0.4$) (Slika 6), višina hemolitično aktivnega vrha te izolacije pa je kar 2,5-krat višja od izolacije iz svežih bukovih ostrigarjev.

Kljub ugotovitvi, da totalna in specifična aktivnost ter stopnja očiščenja s časom zamrzovanja upadajo, so pri 30 dni zamrznjenih gobah izolacije z dodatki ti parametri veliko višji kot v primeru svežih gob (Slike 5a, b, c). V primerjavi s svežimi bukovimi ostrigarji se najmanj poveča specifična aktivnost (Slika 5b). Specifična aktivnost vzorcev 2 in 4 se poveča 3- oziroma 2-krat, vzorcev 1 in 3 pa upade. Močno povečanje zaradi dodatkov doseže totalna aktivnost (Slika 5a) vzorcev 2 in 4 (4.5- in 2.6-krat). Totalna aktivnost vzorca 3 se poveča 1.5-krat, vzorec 1 pa upade. Največji vpliv pa imajo dodatki na stopnjo očiščenja (Slika 5c). Tu sta najaktivnejša vzorca 2 in 4 povečana kar 8.2-krat (vzorec 2) in 5.2-krat (vzorec 4). Tudi vzorcu 3 se 2-krat zviša stopnja očiščenja.

Iz rezultatov (Preglednica 5 in slike 5 (a, b, c)) vidimo, da se dvig pri drugem vzorcu pri vseh izolacijah ponavlja. Pri 30 dni zamrznjenih gobah z dodatki pa pride do močnega povečanja v specifični aktivnosti in stopnji očiščenja vzorcev 2 in 4, ter zmerne povečanja vzorcev 1 in 3. Dodatki (EDTA, PI, OX), ki smo jih dodali pri izolaciji očitno vplivajo na to, da se aktivnost obdrži.

Slike 7-11, ki prikazujejo časovni vzorec spreminjanja hemolitične aktivnosti vzorca 1 (kontrola in vzorec z dodatki), shranjenega pri 4°C, nam dajo zanimive rezultate. Iz slik vidimo, da je kontrolni vzorec veskozi bolj aktiven od obdelanega. Padeč hemolitične aktivnosti (opažena pri kontroli in proteaznem inhibitorju) v 7. tednu je posledica napake pri shranjevanju. Opazen je tudi negativen vpliv dodatkov. Najbolj kvaren vpliv imata EDTA in fenantrolin, medtem ko proteazni inhibitorji ne zmanjšajo hemolitične aktivnosti v tolikšni meri. EDTA je kelator dvovalentnih kationov in lahko nase veže katione, ki bi lahko bili pomembni za delovanje Oly (nekateri proteini za delovanje rabijo prisotnost kovinskih ionov). Tudi oksidant fenantrolin lahko uniči hemolitično aktivnost čistega ostreolizina, kar je pokazala že Sabina Berne v svojem doktoratu. Zanimivo je, da isti oksidant (v isti, 2 mM koncentraciji) ne uniči delovanja pleurotolizina (Tomita in sod., 2004). Preliminarni rezultati so pokazali, da so za hemolitično aktivnost ostreolizina nujno potrebne proste tiolne skupine, ki jih v prisotnosti fenantrolina ni bilo. Nastale so namreč disulfidne vezi, zaradi česar je bil protein neaktiven. To je verjetno razlog za tako drastičen padeč aktivnosti vzorca 1 z dodatkom fenantrolina. Vse kombinacije z EDTA in fenantrolinom so neaktivne ravno zaradi kvarnega učinka ene od teh kemikalij.

V vseh primerih (slike 14-20) se je izkazalo, da je vzorec 2 (nanos na kolono) pri 4°C manj stabilen od vzorca 1, saj se po 2 tednih hemolitična aktivnost že popolnoma izgubi. Manjšo stabilnost vzorca 2 lahko razložimo tudi z izgubo komponente, ki stabilizira ostreolizin, med obarjanjem z AS. Dodatki tukaj niso igrali nobene vloge. Vzorec 2 je očitno manj stabilen tudi pri -20°C, saj v vseh testih delno izgubi aktivnost po 12. tednu (slike 28-34), kar se sklada z rezultati pri 4°C. Vzorcju 1 (kontrola in dodatki) pri -20°C (slike 21-27) aktivnost na začetku nekoliko upade, vendar se obdrži. Rahel dvig aktivnosti (med 4. in 7. tednom) razložimo z eritrociti. Za meritve hemolitične aktivnosti smo spirali in uporabljali isti vzorec eritrocitov, ki so s časom postali bolj občutljivi. V 8. tednu smo uporabili sveže eritrocite in se je aktivnost spet znižala. Tako pri vzorcju 1 kot 2 vpliv dodatkov ni razviden, torej je za to da obdržimo aktivnost bolj ključna temperatura, saj so bili zamrznjeni vzorci aktivni več tednov. Vzorce je torej boljše zamrzovati.

Pri primerjavah enakih vzorcev z dodatki pri 4 in -20°C (slike 35-41) vidimo, da so vzorci 1 z dodatki veliko aktivnejši pri -20°C v primerjavi z istim vzorcem na 4°C . Tudi vzorec 2 z dodatki je v vseh primerih bistveno aktivnejši pri -20°C kot pri 4°C (slike 42-48).

Slike 35-48 še enkrat dokazujejo ključen pomen temperature (in ne dodatkov) za shranjevanje vzorcev, ki vsebujejo Oly na različnih stopnjah izolacije.

Ker je bil eden od ciljev naloge razrešiti vprašanje ali je hemolitična aktivnost v ekstraktu bukovega ostrigarja posledica delovanja enega samega proteina ali pa dveh proteinov v kombinaciji, smo z združevanjem različnih frakcij poskušali ugotoviti ali se bo HA povečala (v primeru prisotnosti druge komponente). Morebitno dodatno aktivno učinkovino smo nameravali dodatno očistiti in določiti njene osnovne fizikalne in biokemijske lastnosti, ter jo primerjati s Ply B.

V primeru kombiniranja posameznih frakcij po gelski kromatografiji (izolacije iz 20 dni zamrznjenih bukovih ostrigarjev), s hemolitično najaktivnejšo frakcijo (Oly) te izolacije po omenjeni kromatografiji, smo opazili dva vrhova (povečanje hemolitične aktivnosti). Frakcije 0,29-0,34 so tiste, v katerih se pojavlja ostreolizin in je zaradi tega aktivnost povečana (Oly + Oly). Dvig hemolize smo opazili tudi v frakcijah 0,10-0,12, ki se izločajo na začetku (kjer bi se lahko pojavila tudi 59-kDa komponenta, ki bi skupaj z Oly tvorila bikomponentni citolizin in mu poveča aktivnost). Zato smo le-te združili v vzorec V, ki smo ga dodajali čistemu Oly in preverili spremembe v aktivnosti (Slika 49). Sprememb ni bilo. Iz tega smo sklepali, da komponente v tem vzorcu niso del bikomponentnega citolizina. Po določanju koncentracije proteina vzorca V, je bila dobljena $c_p = 0,00 \text{ mg/ml}$, kar nam pove, da v frakcijah 0,10-0,12 verjetno ni bilo prisotnih proteinov, torej tudi hemolize naj ne bi nič pospeševalo ali zaviralo, kar nam potrdijo rezultati na Sliki 50. Iz tega sklepamo, da pri prvi meritvi (Slika 49) ne gre za prisotnost proteina, ampak najbrž le za nihanje meritev samih.

Na tej stopnji izolacije bi že lahko prišlo do izgube dodatne komponente, zato smo preverili še vzorec 1 svežih in 20 dni zamrznjenih gob. Vzorec svežih gob ni bil hemolitično aktiven, v kombinaciji s čistim ostreolizinom pa se aktivnost dvigne zaradi ostreolizina samega. Pri

zamrznjenih gobah pa se pri 50 µl vzorca s čistim Oly pojavi dvig v aktivnosti (Oly + Oly) kot posledica aktivnejšega vzorca 1 samega. Tako tudi na začetni stopnji izolacije iz svežih, ter prav tako iz zamrznjenih bukovih ostrigarjev, ni prisotne nobene komponente, ki bi v kombinaciji z ostreolizinom tvorila bikomponentni citolizin. Našo začetno delovno hipotezo o morebitni prisotnosti bikomponentnega citolizina smo tako zavrnil. Vse kaže, da razlog za padec ali izgubo hemolitične aktivnosti ostreolizina po gelski kromatografiji, kot jo opisujejo Berne in sod., 2002, 2005, ni posledica izgube druge komponente (Tomita in sod., 2004), ampak drugih faktorjev.

Naredili smo tudi NaDS elektroforezo vzorcev 1 in 2; svežih, 6 ter 20 dni zmrznjenih bukovih ostrigarjev. Rezultati na Sliki 52 so prikazani le za vzorec 2 po različnih časih zamrzovanja. Vzorec 1 po NaDS-elektroforezi ni bil viden, zaradi premajhne koncentracije proteinov. Na sliki je opazna lisa pri cca 59 kDa, ki bi lahko prikazovala domnevni 59-kDa protein, viden je tudi Oly (17-kDa) ter drugi proteini.

Kljub prisotnosti 59-kDa lise po NaDS-elektroforezi, z ostalimi testi nismo uspeli dokazati, da je to res druga komponenta ostreolizina, saj bi le-ta prej ali slej dvignila aktivnost čistega proteina. Kombiniranje in združevanje frakcij ne poveča aktivnosti. Tudi vzorcju 3, ki je zmes vseh frakcij po gelski kromatografiji, se pri nobeni izolaciji ne poveča hemolitična aktivnost. Torej sklepamo, da Oly deluje kot monomer, in smo skozi nalogo zavrgli hipotezo o bikomponentnem citolizinu. Kljub veliki podobnosti ostreolizina in pleurotolizina A sta to očitno različna proteina. Glede na to, da sta bila oba citolizina izolirana iz iste vrste *Pleurotus ostreatus*, sklepamo na veliko heterogenost te vrste, tako na nivoju sevov gobe kot tudi na genetskem nivoju (prisotnost izooblik proteinov egerolizinske družine).

5.2 SKLEPI

1. Ostreolizin je monomer (ovrgli smo hipotezo o bikomponentnosti). V vodnem ekstraktu bukovega ostrigarja je le ena hemolitična učinkovina. Torej je goba

Pleurotus ostreatus iz katere smo jo izolirali zelo heterogena vrsta, saj so na Japonskem namesto ostreolizina iz nje izolirali bikomponenten citolitičen protein pleurotolizin.

2. Zamrzovanje bukovega ostrigarja pred izolacijo negativno vpliva na stopnjo očiščenja ter totalno in specifično aktivnost ostreolizina, vendar se njegova aktivnost ne izgubi. Vsi zamrznjeni vzorci so bili hemolitično aktivni, tudi tisti po gelski kromatografiji na gelu Sephadex G-50.
3. Sveži supernatant pri 4°C je najbolje shranjevati brez kakršnihkoli dodatkov.
4. Ostreolizin ostane najbolj stabilen, če je po izolaciji shranjen pri -20°C. Dodatki (oksidant, EDTA in/ali proteazni inhibitorji) pri tej temperaturi shranjevanja niso bistvenega pomena.

6. POVZETEK

Do sedaj so iz vodnega ekstrakta bukovih ostrigarjev (*Pleurotus ostreatus*) izolirali dva citolitična proteina, ostreolizin in bi-komponenten pleurotolizin. Oba proteina sta člana egerolizinske proteinske družine. 17-kDa komponenta pleurotolizina, PlyA ima kar 93% identičnost z N-terminalno aminokislinsko sekvenco Oly. Zaradi velike podobnosti Oly in PlyA, ki na eritrocite učinkuje hemolitično le v povezavi s svojo drugo komponento (59 kDa Ply B), nas je zanimalo ali je tudi Oly bikomponenten. Pri preliminarnih raziskavah so opazili izgubo hemolitične aktivnosti Ply v predhodno zamrznjenem homogenatu gob po gelski kromatografiji, ter njen ponovni pojav po združevanju vseh posameznih frakcij. Prav tako so že poročali o izgubljanju aktivnosti Oly med izolacijo iz svežih gob. Zato smo domnevali, da v enem od korakov izolacije lahko pride do izgube druge komponente. Ker so se v preteklosti pojavljale očitne razlike med izolacijama iz svežih in zamrznjenih bazidiokarpov *P. ostreatus*, smo Oly izolirali iz svežih, 6, 20 ter 30 dni zamrznjenih gob.

Vodne ekstrakte bukovega ostrigarja smo ločili z gelsko kromatografijo na nosilcu Sephadex G-50, čistost in molekulsko maso našega citolitičnega proteina smo preverili z elektroforezo na poliakrilamidnem gelu v prisotnosti NaDS, s kombiniranjem različnih frakcij pa smo opazovali spremembe v hemolitični aktivnosti. Po NaDS-elektroforezi smo dobili 17-kDa Oly in 59-kDa protein, ki pa v nobenem od primerov kombiniranja in združevanja frakcij ni dvignil aktivnosti Oly. Iz dobljenih rezultatov smo sklepali, da gre v primeru Oly za proteinski monomer in ovrgli začetno hipotezo o bi-komponentnem citolizinu. Glede na to, da sta bila tako Oly kot Ply izolirana iz iste vrste *Pleurotus ostreatus*, sklepamo na veliko heterogenost te vrste, tako na nivoju sevov gobe kot tudi na genetskem nivoju (prisotnost izooblik). Odkrili smo tudi, da zamrzovanje bukovih ostrigarjev pred izolacijo negativno vpliva na aktivnost proteina, vendar se ta ne izgubi. Vplivi oksidanta (fenantrolina), kelatorja dvovalentnih ionov (EDTA) in proteaznega inhibitorja (PMSF/AEBSF), ki smo jih dodali homogenatu 30 dni zamrznjenih gob na stabilnost Oly v prvem supernatantu, shranjenem pri 4°C, niso zanemarljivi. Najbolj negativen vpliv imata EDTA in FL, medtem ko PI ne zmanjšajo HA v

tolikšni meri. Pri -20°C pa Oly, ne glede na čas in prisotnost dodatkov, na obeh stopnjah izolacije ostaja stabilen.

7. VIRI

Al-Deen I.H.S., Twajj H.A.A., Al-Badr A.A. in Istarabad T.A.W. 1987. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostratus* mushroom in mice. J. Ethnopharm, 21: 297-305

Bacia K., Scherfeld D., Kahya N. in Schwille P. 2004. Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. Biophys. J., 87: 1034-1043

Barloy F., Lecadet M.M. in Delecluse A. 1998. Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans* CH18. Gene, 211: 293-299

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

Berne S. 2004. Biokemijske in citolitične lastnosti proteina iz bukovega ostrigarja *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr) Kumm. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Berne S., Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P. in Poklar U.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., Pohleven J., Vidic I., Rebolj K., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sonnenberg A. in Sepčič K. 2007. Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Mycol. Res., 3: 1431-1436

Bernheimer A.W. in Avigad L.S. 1979. Cytolytic protein from the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 585: 451-461

Bodin E., and Gautier L. 1906. Note sur une toxine produite par l'*Aspergillus fumigatus*. *Ann. Inst. Pasteur*, 20: 209-24

Budzko D.B., and Negroni R. 1976. Depletion of complemeni *in vivo* and *in vitro* by extracts of *Aspergillus fumigatus*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, 51: 518-524

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

De Almeida R.F.M., Fedorov A. in Prieto M. 2003. Sfingomyelin/phosphatidylcholine /cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J.*, 85: 2406-2416

Ebina K., Yokota K. in Sakaguchi O. 1982. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus* XVI. Relationship between Asp-hemolysin and experimental infection of mice. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 23: 246-252

Ebina K., Yokota K. in Sakaguchi O. 1983. Studies on toxin of *Aspergillus fumigatus* XVI. Biological properties of Asp-hemolysin as parasite factor. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 24: 245-252

Ebina K., Ichinowatari S., Yokota K. in Sakaguchi O. 1984. Studies on toxin of *Aspergillus fumigatus* XIX. Biochemical alteration of sera after Asp-hemolysin inoculation or *Aspergillus* infection in mice. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 25: 236-243

Ebina K., Sakagami H., Yokota K., in Kondo H. 1994. Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolizin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1219: 148-150

Edidin M. 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32: 257-283

Felipe M.S.S., Andrade R.V., Petrofeza S.S., Maranhão A.Q., Torres F.A.G., Albuquerque P., Arraes F.B.M., Arruda M., Azevedo M.O., Baptista A.J., Bataus L.A.M., C.L. Borges, E.G. Campos, M.R. Cruz, B.S. Daher, A. Dantas, M.A.S.V. Ferreira, G.V. Ghil, R.S.A. Jesuino, C.M. Kyaw, L. Leitão, C.R. Martins, L.M.P. Moraes, E.O. Neves, A.M. Nicola, E.S. Alves, J.A. Parente, M. Pereira, M.J. Poças-Fonseca, R. Resende, B.M. Ribeiro, R.R. Saldanha, S.C. Santos, I. Silva-Pereira, M.A.S. Silva, E. Silveira, I.C. Simões, R.B.A. Soares, D.P. Souza, M.T. De-Souza, E.V. Andrade, M.A.S. Xavier, H.P. Veiga, E.J. Venancio, M.J.A. Carvalho, A.G. Oliveira, M.K. Inoue, N.F. Almeida, M.E.M.T. Walter, C.M.A. Soares, M.M. Brígido 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*, 20: 263-271

Fernandez E.M.T. in Labarère J. 1997. Cloning and sequencing of the Aa-Rr1l gene specifically expressed during fruiting initiation in the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, and analysis of the predicted amino-acide sequence. *Curr. Genet.*, 32: 420-424

Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K. in Yokota K. 1996a. Apolipoprotein B inhibits the hemolytic activity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19: 547-550

Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K. in Yokota K. 1996b. Binding assay of low density lipoprotein to Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1568: 183-188

Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K. in Yokota, K. 1998. Oxidized low density lipoprotein inhibits the hemolytic activity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiol. Lett., 167: 275-280

Fukuchi, Y. 2001. Interactions between Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus* and blood plasma components. Yakugaku Zasshi, 121: 423-432

Galagan J. E., Calvo S. E., Borkovich K. A., Selker E. U., Read N. D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L. J., Smirnov S., Purcell S., Rehman B., Elkins T., Engels R., Wang S., Nielsen C. B., Butler J., Endrizzi M., Qui D., Ianakiev P., Bell-Pedersen D., Nelson M. A., Werner-Washburne M., Selitrennikoff C. P., Kinsley J. A., Braun E. L., Zelter A., Schulte U., Kothe G. O., Jedd G., Mewes W., Staben C., Marcotte E., Greenberg D., Roy A., Foley K., Naylor J., Stange-Thomann N., Barrett R., Gnerre S., Kamal M., Kamvysselis M., Mauceli E., Bielke C., Rudd S., Frishman D., Krystofova S., Rasmussen C., Metzenberg R.L., Perkins D.D., Kroken S., Cogoni C., Macino G., Catcheside D., Li W., Pratt R.J., Osmani S.A., DeSouza C.P., Glass L., Orbach M.J., Berglund J.A., Voelker R., Yarden O., Plamann M., Seiler S., Dunlap J., Radford A., Aramayo R., Natvig D.O., Alex L.A., Mannhaupt G., Ebbole D.J., Freitag M., Paulsen I., Sachs M.S., Lander E.S., Nusbaum C. in Birren, B. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature, 422: 859-868

Henrici A.T. 1938. An endotoxin from *Aspergillus fumigatus*. J. Immunol., 36: 319-338

Herwig R., Schulz B., Weisshaar B., Henning S., Steinfath M., Drungows M., Stahl D., Wruck W., Menze A., O'Brien J., Lehrach H. in Radelof U. 2002. Construction of a 'unigene' cDNA clone set by oligonucleotide fingerprinting allows access to 25 000 potential sugar beet gens. Plant J., 32: 845-857

Hong Q., Gutierrez-Aguirre I., Barlič A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Maček P., Turk D., Gonzalez-Manas J.M., Lakey J.H. in 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. *J. Biol. Chem.*, 277: 41916-41924

Juárez-Pérez V. in Delécluse A. 2001. The Cry toxins and the putative hemolysins of *Clostridium bifermentans* ser. *malaysia* are not involved in mosquitocidal activity. *J. Invertebr. Pathol.*, 78: 57-58

Kudo Y., Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K. in Yokota K. 2001. Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1568: 183-188

Kudo Y., Ootani T., Kumagai T., Fukuchi Y., in Ebina K. 2002. A novel oxidized low-density lipoprotein binding protein, Asp-hemolysin, recognizes lysophosphatidylcholine, *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 787-790

Kumagai T., Nagata T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K. in Yokota K. 1999. Cytotoxic activity and cytokine gene induction of Asp-hemolysin to murine macrophages. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 40: 217-222

Kumagai T., Nagata T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K. in Yokota K. 2001. Cytotoxic activity and cytokine induction of Asp-hemolysin to vascular endothelial cells. *Yakugaku. Zasshi.*, 121: 271-275

Kumagai T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K. in Yokota K. 2002. Expression of a synthetic gene encoding the Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus* in *Escherichia coli*. *Pharm. Bull.*, 25: 115-117

Kumagai T., Ogawa N., Tsutsumi H., Ebina K. in Yokota, K. 2005. A synthetic peptide (P-21) derived from Asp-hemolysin inhibits the induction of macrophage proliferation by oxidized low-density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.*, 28: 1381-1384

Latgé JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 310-350

Lee S.H., Kim B.G., Kim K.J., Lee J.S., Yun D.W., Hahn J.H., Kim G.H., Lee K.H., Suh D.S., Kwon S.T., Lee C.S. in Yoo Y.B. 2002. Comparative analysis of sequences expressed during the liquid-cultured mycelia and fruit body stages of *Pleurotus ostreatus*. *Fungal. Genet. Biol.*, 35: 115-134

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

London E. 2002. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12: 480-486

Maličev E., Chowdhury H., Maček P. in Sepčić K. 2007. Effect of ostreolysin, an Asp-hemolysin isoform, on human chondrocytes and osteoblasts, and possible role of Asp-hemolysin in pathogenesis. *Med. Mycol.*, 45: 123-30

Ngai P. H. K. in Ng T. B. 2006. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72: 1185-1191

Palmer M. 2004. Cholesterol and the activity of bacterial toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 238: 281-289

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 Struct. Biol.*, 9: 823-827

Rau E.M., Tilden E.B. in Koenig V.L. 1961. Partial purification and characterization of the endotoxin from *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia.*,14:347-358

Rebolj K., Poklar U. N., Maček P. in Sepčič K. 2006. Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers. *Biochem. Biophys. Acta, Biomembranes*, 1758: 1662-1670

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

Rementeria A., Lopez-Molina N., Ludwig A., N., Vivanco A.B., Bikandi J., Pontón in J. Garaizar J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev. Iberoam. Micol.*, 22: 1-23

Sakaguchi O., Shimada H. in Yokota K. 1975. Proceedings: Purification and characteristics of hemolytic toxin from *Aspergillus fumigatus*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 28: 328-331

Sakaguchi O., Yokota K. in Kamguchi A. 1977. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus*. VIII. Biological properties of Asp-hemolysin. *Jpn. J. Bacteriol.*, 32: 821-828

Sakurai N., Kaneko J., Kamio Y. in Tomita T. 2004. Cloning, expression, and pore-forming properties of mature and precursor forms of pleurotolysin, a sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1679: 65-73

Sepčič K., Berne S., Potrich C., Turk T., Maček P. in Menestrina G. 2003. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *Eur. J. Biochem.*, 270: 1199-121

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

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

Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S. in Olson M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964

Tilden E.B., Hatton E.H., Freeman S., Williamson W.M. in Koenig V.L. 1961. Preparation and properties of the endotoxins of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 14: 325-346

Tilden E.B., Freeman S. in Lombard L. 1963. Further studies of the *Aspergillus* endotoxins. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 20: 253-271

Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito K., Sugawara T. N. in Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *J. Biol. Chem.*, 279: 26975-26982

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

Yokota K., Kamaguchi A. in Sakaguchi O. 1984a. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus* XVIII. Photooxidation of asp-hemolysin in the presence of various dyes and its relation to the site of hemolytic activity. *Microbiol. Immunol.*, 28: 385-91

Yokota K., Ichinowatari S. in Ebina K. 1984b. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus* XX. Chemical modification of Asp-hemolysin. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 25: 332-339

Yokota K., Ichinowatari S., Ebina K. in Wakabayashi N. 1985. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus* XXI. Site of binding of Asp-hemolysin to erythrocytes and mechanism of inhibition of hemolysis. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 26: 332-339

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Kristini Sepčič za ves trud, pomoč in nasvete. Še posebej hvala za vse odgovore, dobro voljo in vzpodbudne besede.

Hvala tudi ing. Ireni Pavešič, dr. Katji Rebolj ter Andreju Bavdku za vso praktično pomoč.

Za podporo in vzpodbudo tekom celotnega študija se iskreno zahvaljujem svojim staršem.

Hvala tudi prijateljem in sošolcem za lepa študentska leta. Hvala Ireni, Katji, Borutu ter Andreju za vso pomoč in nasvete.

Zahvala tudi tebi, Matevž, za tvoje neskončno razumevanje.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Petru Mačku in predsednici komisije za zagovor prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za sodelovanje pri moji diplomii.