

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Saša KOŽELJ

**IZOLACIJA HEMOLITIČNO AKTIVNIH SNOVI IZ  
PEDICELARIJEV PEGASTEGA MORSKEGA JEŽKA *Sphaerechinus  
granularis* (Lamarck).**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ISOLATION OF HAEMOLYTIC SUBSTANCES FROM  
PEDICELLARIAE OF SEA URCHIN *Sphaerechinus granularis*  
(Lamarck).**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Z diplomskim delom, ki je bilo opravljeno na katedri za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani, zaključujem univerzitetni študij biologije na Oddelku za biologijo, Biotehniške Fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: 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

Član: Prof. dr. Tom TURK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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.

Datum zagovora: 22. 6. 2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Saša Koželj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 577.1: 593.5 (043.2) = 863  
KG *Sphaerechinus granularis*/hemolizin/morski ježki/iglokožci/pedicelariji  
AV KOŽELJ, Saša  
SA TURK, Tom  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2007  
IN IZOLACIJA HEMOLITIČNO AKTIVNIH SNOVI IZ PEDICELARIJEV  
PEGASTEGA MORSKEGA JEŽKA *Sphaerechinus granularis* (Lamarck)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 31 str., 12 pregl., 15 sl, 40 vir.  
IJ sl  
JI sl  
AI Iglokožci so izključno morske živali, ki izločajo kemično raznolike obrambne snovi skozi kožo, Cuvierjeve cevke, bodice in pedicelarije. Vsako skupino iglokožcev lahko razlikujemo po določenih kemičnih značilnostih: ekstrakti kačjerepov vsebujejo sulfatirane steroide, saponini morskih zvezd so steroidni oligoglikozidi, medtem ko so saponini morskih kumar triterpenoidni glikozidi; iz morskih ježkov so bili izolirani nekateri lektini. Podatki o hemolitičnih snoveh izoliranih iz iglokožcev so zaenkrat precej skopi. Zanimivo pa je, da so hemolitični lektini in saponini, ki jih najdemo pri iglokožcih, široko zastopani v rastlinskem kraljestvu.

Toksičnost pedicelarnega ekstrakta *Sphaerechinus granularis* je bila zaenkrat označena kot paralitična, rezultati diplomske naloge pa kažejo na prisotnost tudi hemolitično aktivnih snovi. Med izolacijskim procesom smo dobljenim frakcijam testirali hemolitično in aglutinacijsko aktivnost za goveje eritrocite. Izolacijo smo izvedli z uporabo gelske in ionskoizmenjevalne kromatografije, HPLC kot tudi reverznofazne kromatografije. Vsebnost proteina smo določili z BCA reagentom (Pierce), velikosti proteinov smo opredelili z uporabo SDS elektroforeze, izoelektrične točke proteinov pa smo določili z izoelektričnim fokusiranjem.

Rezultati gelske kromatografije kažejo dva razločna vrhova, ki vsebujeta proteine tako kationskega kot anionskega značaja. Prvi vrh je vseboval proteine manjše od 14,4 kDa in večje od 94 kDa, medtem ko je drugi vrh vseboval proteine manjše od 30 kDa. Uspeli smo delno izolirati dva hemolitična proteina približnih velikosti 30 kDa in 100 kDa, prvi z določeno izoelektrično točko med 6,55 in 6,85, izoelektrična točka drugega proteina pa je verjetno pod to vrednostjo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 577.1: 593.5 (043.2) = 863  
CX *Sphaerechinus granularis*/haemolysin/sea urchins/echinoderms/pedicellariae  
AU KOŽELJ, Saša  
AA TURK, Tom  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2007  
TI ISOLATION OF HAEMOLYTIC SUBSTANCES FROM PEDICELLARIAE  
OF SEA URCHIN *Sphaerechinus granularis* (Lamarck)  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 31 p., 12 tab., 15 fig, 40 ref.  
LA sl  
AL sl  
AB Echinoderms are exclusively marine animals that excrete chemically diverse defence substances through skin, Cuvier tubes, spines and pedicellariae. Each group of echinoderms is distinguished by certain chemical characteristic: brittle stars extracts possess sulphated steroids, sea star saponins are steroid oligoglycosides, whereas sea cucumber saponins are triterpenoid glycosides; within the sea urchins several lectins have been isolated. Data about haemolytic substances isolated from echinoderms have so far been very poor. It is interesting though, that haemolytic saponins and lectins, which are found among echinoderm species, are also widely distributed throughout the plant kingdom.

Toxicity of *Sphaerechinus granularis* pedicellarial extract has, till now, only been known to be paralytic. In this investigation, we have also demonstrated the presence of haemolytic substances. Fractions obtained during the isolation process were tested for possible haemolytic and agglutinating activity towards bovine erythrocytes. Isolation was performed with the use of gel and ion exchange chromatography, HPLC as well as reverse phase chromatography. Protein content has been evaluated by BCA reagent (Pierce), protein sizes have been characterised using SDS electrophoresis and protein isoelectric points have been determined by isoelectric focusing.

Gel chromatography showed two distinguishable peaks that contained proteins with cationic as well as anionic character. The first peak contained proteins between the ranges of less than 14.4 kDa to more than 94 kDa, whereas the second peak contained proteins smaller than 30 kDa. We have managed to partially isolate two haemolytic proteins of approximate sizes 30 kDa and 100 kDa, the first with determined isoelectric point between 6.55 and 6.85, the second with the proposed isoelectric point under this value.

## KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VI
	Kazalo slik	VII
	Okrajšave in simboli	IX
1.	UVOD	1
2.	MATERIALI IN METODE	6
2. 2.	HOMOGENIZACIJA	6
2. 3.	GELSKA KROMATOGRFIJA	6
2. 4.	IONSKOIZMENJEVALNA KROMATOGRFIJA	6
2. 5.	VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRFIJA (HPLC) IN REVERZNOFAZNA KROMATOGRFIJA	7
2. 6.	LIOFILIZACIJA	7
2. 7.	MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINA	8
2. 8.	SDS ELEKTROFOREZA	8
2. 9.	ULTRAFILTRACIJA	8
2. 10.	IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE	8
2. 11.	MERJENJE HEMOLITIČNOSTI	9
2. 12.	AGLUTINACIJSKI TEST	10
3.	REZULTATI	11
3. 1.	UVODNI POSKUSI	11
3. 2.	IZOLACIJA PROTEINOV	14
3. 2. 1.	Homogenizacija	14
3. 2. 2.	Gelska kromatografija	15
3. 2. 3.	Izolacija proteinov prvega vrha (F1) gelske kromatografije	17
3. 2. 4.	Izolacija proteinov drugega vrha (F2) gelske kromatografije	21
4.	RAZPRAVA IN SKLEPI	24
4. 1.	RAZPRAVA	24
4. 2.	SKLEPI	27
5.	VIRI	28
	ZAHVALA	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Gradient ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska Econo Pac, High Q Cartridge kolona)	7
Preglednica 2:	LMW standardi (z nizko molekulsko maso) uporabljeni pri SDS elektroforezi	8
Preglednica 3:	Standardi IEF (3-10) uporabljeni pri izoelektričnem fokusiranju (Phast System)	9
Preglednica 4:	Koncentracije proteinov v raztopinah liofiliziranih frakcij druge in tretje meritve hemolitičnosti (uvodni poskusi, točka 2.11.)	13
Preglednica 5:	Velikostni razredi proteinov prisotnih v vzorcih pripravljenih za tretjo meritev hemolitičnosti (uvodni poskusi)	14
Preglednica 6:	Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po gelski kromatografiji v 50 mM tris puftru s pH 7,5	15
Preglednica 7:	Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po gelski kromatografiji v 10 mM amonacetatnem puftru s pH 5,3	16
Preglednica 8:	Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po ionskoizmenjevalni kromatografiji s 50 mM tris pufrom pri pH 7,5 (Slika 9)	17
Preglednica 9:	Velikostni razredi proteinov frakcije F1 po ionskoizmenjevalni kromatografiji v 50 mM tris puftru s pH 7,5 (SDS elektroforeza; Slika 9)	18
Preglednica 10:	Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po ionskoizmenjevalni kromatografiji z 10 mM amonacetatnim pufrom s pH 5,3 (Slika 12)	20
Preglednica 11:	Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po ionskoizmenjevalni kromatografiji s 50 mM tris pufrom s pH 7,5 (Slika 13)	21
Preglednica 12:	Koncentracija proteina in hemolitičnost združenih frakcij pri podobnih retencijskih časih po HPLC s kationsko kolono (TSK-gel-SP-5PW) v petih paralelkah (Slika 14)	23

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Pegasti ali belobodičasti morski jež <i>Sphaerechinus granularis</i> Lamarck. (Foto: T. Turk)	4
Slika 2:	Skica globularnega pedicelarija <i>Sphaerechinus granularis</i> Lamarck (slikovni vir Tortonese E., 1965)	5
Slika 3:	Elucijski diagram gelske kromatografije (1,5 × 75 cm kolona, Sephadex G-50, mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos 7,5 ml homogenata pedicelarijev <i>S. granularis</i> . (uvodni poskusi)	11
Slika 4:	Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska High Q Econo Pac Cartridge kolona; mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos prvega hemolitičnega vrha (F1) po gelski kromatografiji v tris pufru pri pretoku 1 ml/min (uvodni poskusi)	12
Slika 5:	Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska High Q Econo Pac Cartridge kolona; mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos drugega hemolitičnega vrha (F2) po gelski kromatografiji v tris pufru pri pretoku 1 ml/min (uvodni poskusi)	12
Slika 6:	SDS elektroforeza s Coomassie modrim vzorcev pripravljenih za tretjo meritev hemolitičnosti (uvodni poskusi)	13
Slika 7:	Elucijski diagram gelske kromatografije (1,5 × 75 cm kolona, Sephadex G-50, mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos 3,5 ml homogenata pedicelarijev <i>S. granularis</i> .	15
Slika 8:	Elucijski diagram gelske kromatografije (1,5 × 75 cm kolona, Sephadex G-50, mobilna faza 10 mM amonacetatni pufer s pH 5,3, nanos 4,5 ml homogenata pedicelarijev <i>S. granularis</i> ) in SDS elektroforeza s Coomassie modrim obeh vrhov (F1, F2) po gelski kromatografiji	16
Slika 9:	Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska kolona Econo Pac, High Q Cartridge, 5 ml, BioRad). Nanos frakcije F1 po gelski kromatografiji v 50 mM tris pufru s pH 7,5 in pri pretoku 1 ml/min ter SDS elektroforeza, barvanje s srebrom	17
Slika 10:	Gel izoelektričnega fokusiranja (Phast System; IEF standardi pH 3-10, Coomassie modro) za frakcijo 1F/1.	19
Slika 11:	Elucijska diagrama reverznofazne kromatografije (HPLC, reverznofazna VYDAC kolona, gradient od 0-70 % v 50 min). Nanos 50 µl frakcije 1F/1 na 50 µl zanko pri pretoku 1 ml/min.	19
Slika 12:	Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska kolona Econo Pac, High Q Cartridge, 5 ml, BioRad; 10 mM amonacetatni pufer s pH 5,3). Nanos frakcije F1 po gelski kromatografiji v amonacetatnem pufru pri pretoku 1 ml/min.	20
Slika 13:	Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska kolona EconoPac, High Q Cartridge, 5 ml, BioRad; 50 mM tris	

- pufer s pH 7,5). Nanos frakcije F2 po gelski kromatografiji v tris pufru pri pretoku 1 ml/min. 21
- Slika 14: Elucijski diagrami ionskoizmenjevalne kromatografije s HPLC (kationska kolona TSK-gel-SP-5PW). Nanos 50 µl frakcije F2 po gelski kromatografiji v 10 mM amonacetatnem pufru s pH 5,3. Primer paralelke 3 (modro - absorbanca pri 280 nm in zeleno - 215 nm) ter paralek 1 (levo) in 4 (desno) pri 215 nm (črno). V nadaljevanju Preglednica 12. 22
- Slika 15: Elucijska diagrama reverznofazne kromatografije (HPLC, reverznofazna VYDAC kolona, gradient od 0-70 % v 50 min). Nanos 50 µl vzorca F4 [z največjo koncentracijo proteina (Preglednica 12) pri 280 nm (levo) in 215 nm (desno)] na 50 µl zanko pri pretoku 1 ml/min. 23



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>c</b>	koncentracija
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	kalcijev diklorid
<b>DNAze II</b>	deoksiribonukleaza tipa II
<b>F</b>	združena frakcija (skupek posameznih frakcij FR)
<b>FR</b>	posamezna frakcija
<b>HCl</b>	vodikov klorid
<b>High Q</b>	visok Q faktor. Snov ima visoko stopnjo reaktivnosti do določene snovi
<b>HPLC</b>	visokotlačna tekočinska kromatografija
<b>HSV-2</b>	herpes simplex virus tip 2
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	magnezijev diklorid
<b>NaCl</b>	natrijev klorid
<b>PLA<sub>2</sub></b>	fosfolipaza tipa A <sub>2</sub>
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate (natrijev dodecil sulfat)
<b>t<sub>r</sub></b>	retencijski čas
<b>tris</b>	trihidroksimetilaminometan ali 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
<b>UV</b>	ultravijoličen spekter
<b>UV/VIS</b>	ultravijoličen/vidni spekter

## 1. UVOD

Iglokožci (Echinodermata), deblo izključno morskih živali, v katerega uvrščamo morske lilije (Crinoidea), morske ježke (Echinoidea), morske kumare (Holothuroidea), morske zvezde (Asteroidea) in kačjerepe (Ophiuroidea), so se razvijali od defenzivnih, plazečih oblik k agresivnejšim, aktivnim oblikam. Glede na biokemijske in embriološke raziskave sta nedavno nastala razreda morskih kumar in morskih zvezd tesno sorodna, njima sledijo kačjerepi; morski ježki pa predstavljajo razred filogenetsko starejših predniških oblik iglokožcev (Matsuoka, 1993). Znotraj debela, še posebej pa znotraj nižjih taksonomskih kategorij, obstaja določena mera sorodnosti, kljub na splošno variabilni kemijski zgradbi toksičnih snovi morskih organizmov (Russel, 1971). Znotraj debela iglokožcev najdemo visokosulfatirane kisle mukopolisaharide, spojine kvartarnih amonijevih baz (homarin), fosfagene (fosfoarginin, fosfokreatin), sterole, saponine in drugo (Russel, 1996). Steroli morskih zvezd in morskih kumar so  $\Delta^7$ -steroli, medtem ko so steroli morskih ježkov, kačjerepov in morskih lilij  $\Delta^5$ -steroli (Gupta, 1968). Saponini morskih kumar so triterpenoidni glikozidi, večinoma temelječi na holotanskem skeletu, saponini morskih zvezd pa so steroidni oligoglikozidi (Iorizzi, 2001).

Strupene snovi posameznih razredov iglokožcev izvirajo iz različnih organov. Morske zvezde v svojem integumentu vsebujejo periferno razporejene acidofilne celice, kačjerepi (vrsta *Ophiocomina nigra*) pa masivne večcelične kožne žleze, ki izločajo strupeno sluz ali tekočino. Morski ježki imajo različne strupne aparate: primarne (kot npr. vrsta *Phormosoma bursarium*) in sekundarne (kot npr. vrsta *Araesoma thetidis*) bodice s strupno vrečko na koncu ter pedicelarije različnih tipov (ofiocefalni, dentatni, globularni, foliatni). Izvorni organ toksinov morskih kumar so Cuvierjeve cevke (del dihalnega aparata), ki jih žival ob dražljaju izloči skozi anus. Izloček je lahko močno lepljiv ali toksičen. Morske kumare, ki Cuvierjevih cevk nimajo (kot npr. vrsta *Holothuria atra*), izločajo toksin skozi telesno steno (Russel, 1996).

Morske lilije so najbolj primitiven in star razred iglokožcev, ki je doživel višek razvoja med paleozoikom. Današnje vrste pecljatih sesilnih morskih lilij živijo v globinah 100 in več metrov (Rupert in Barnes, 1994). Nekatere med njimi, kot npr. vrsti *Endoxocrinus parrae* in *Neocrinus decorus*, so popolnoma brez kemične obrambe, kar je verjetno razlog za njihov umik v globine. Reichensperger (1908) je objavil, da nekatere izločajo strupeno sluz iz žlez na čutilnih izrastkih (Russel, 1971). Zanimive za izolacijo pa niso le strupene snovi. Iz morske lilije *Antedon mediterranea* (Lavado s sod., 2006) so na primer izolirali spolne hormone steroidnega tipa (testosteron, estradiol), ki jih najdemo pri vretenčarjih.

Kačjerepi, najgibljujejši in vrstno najštevilčnejši med iglokožci, se branijo z mukoznim izločkom. Izloček vrste *Ophiomastix annulosa* povzroča paralizo in smrt malih živali (Ludwig, 1889-1907 po Russel, 1971), mukozni izloček vrste *Ophiocomina nigra* iz večceličnih kožnih žlez vsebuje mucine, ki so aminosladkorji,

sulfatni estri in druge snovi vezane v proteinske komplekse. Visoko sulfatirani kisli mukopolisaharidi vrste kačjerepa *Ophiocomina nigra* so repelenti rib in morskih sesalcev, imajo antikoagulacijski učinek na mišjo kri, ne pa na človeško. Ti glikoproteini od doze odvisno inhibirajo *in vitro* pritrjanje bakterij ter pritrjanje človeških neutrofilcev v kulturi človeških žilnih endotelijskih celic, kar ima potencialno terapevtsko vrednost pri regulaciji adhezije (pritrjanja) človeških neutrofilcev in bakterij (Fontaine, 1964; Bavington s sod., 2004). Sulfatirani steroidi so za kačjerepe značilni sekundarni metaboliti in jih najdemo le še pri nekaterih morskih zvezdah kot je *Pteraster tesselatus* (Levina s sod., 1996). Kačjerep *Astrotoma agassizii* vsebuje sulfatirane polihidroksisteroide z antivirusnim delovanjem na viruse tipa HSV-2, PV-3 in JV (Comin s sod., 1999).

Toksini morskih zvezd in morskih kumar so večinoma saponini. To so spojine sestavljene iz vodotopne sladkorne in v lipidih topne steroidne ali terpenoidne komponente. Taka kemijska zgradba ob prisotnosti vode in stresanju povzroča penjenje, kar je lastnost detergentov. Ti glikozidi so tipični rastlinski metaboliti, vendar popolnoma neznačilni produkti živalskega sekundarnega metabolizma. V živalskem kraljestvu jih najdemo izključno pri iglokožcih. Toksičnost saponinov pripisujejo njihovi sposobnosti tvorjenja sterolnih kompleksov, s čimer lahko motijo absorpcijo sterolov v prebavnem sistemu ali nadalje spreminjajo lastnosti membran, na katere naletijo v krvnem obtoku ter so potencialno hemolitični. Interakcija med saponini in steroli eritrocitne membrane ireverzibilno poškoduje lipidni dvosloj, sproži napihovanje membrane, povečanje njene prepustnosti in izgubo hemoglobina (Sparg s sod., 2004).

Steroidne glikozide, značilne za morske zvezde, so razvrstili v tri skupine: asterosaponini, citolitični steroidni glikozidi in glikozidi polihidroksisteroidov (Iorizzi, 2001). Biološka aktivnost saponinov morskih zvezd ni le hemolitična, kot pri vrstah *Patiriella calcar*, *Pisaster brevispinus*, *Pisaster ochraceous*, *Pycnopodia helianthoides*, *Patiria miniata*, *Asterias vulgaris*, *Asterias forbesi* in *Marthasterias glacialis*; temveč tudi citolitična za limfocite (npr. vrsta *Asterias vulgaris*) in razvijajoča jajčeca morskih ježkov (npr. vrste *Pycnopodia helianthoides*, *Asterias forbesi*, *Pisaster brevispinus*, *Pisaster ochraceous*). Saponini delujejo tudi antivirusno, protivnetno in hipotenzično. Znano je, da odganjajo polže in kačjerepe (kot npr. ekstrakti vrst *Marthasterias glacialis* in *Asterias rubens*), povzročajo kontrakcijo gladkih mišic (npr. ekstrakt vrste *Marthasterias glacialis*) in zlepljanje amebocitov (npr. vrsta *Asterias forbesi*), blokirajo živčnomišični prenos pri sesalcih, so toksični za deževnike, ličinke muh (npr. vrsta *Asterias amurensis*), ribe in drugo (Hashimoto in Yasumoto, 1960; Rio, 1965; Ruggieri, 1964, 1965; Macke, 1968; Croft in Howden, 1974; Macke in Turner, 1970; Owellen, 1973).

Poleg saponinov so med toksini morskih zvezd še kvartarne amonijeve baze, kot je homarin, kemijsko N-metil pilolična kislina, in fosfageni (najdemo ju še pri nekaterih morskih ježkih in morskih kumarah), sulfatirani kisli mukopolisaharidi (npr. pri vrstah *Asterias rubens* in *Astropecten irregularis*) in steroidi. Surov ekstrakt iz ene same morske zvezde je zmes različnih organskih molekul in je različno biološko aktiven. Ekstrakt vrste *Acanthaster planci* vsebuje tako hemolitične, hemoragične, antikoagulacijske komponente kot komponente, ki povzročajo izločanje histamina iz

mastocitov, fosfolipazno aktivne (PLA<sub>2</sub>) komponente, komponente, ki povečujejo prepustnost kapilar ali pa so toksične DNAze II (plancitoksin I) [Shiomi s sod., 2004].

Saponini morskih kumar so triterpenoidni glikozidi imenovani holoturini (holoturini A, B, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> in drugi) [Alender in Russel, 1966 po Russell, 1996; Silchenko, 2005]. Triterpenoidni rastlinski saponini so sekundarni metaboliti z antimikrobnimi lastnostmi, ki z vezavo na sterole spremenijo membrano gliv. Saponini morskih kumar so hemolitični, citolitični, nevrotoksični in imajo podobno kot saponini morskih zvezd širok spekter delovanja: med drugim sprožajo krčenje sesalčjih mišic, motijo razvoj embrijev morskih ježkov, protozojev in planarijev, so letalni za nekatere nižje nevretenčarje ter so toksični za ribe (odganjajo morske pse) [Russel, 1996].

Poleg saponinov pri morskih kumarah najdemo tudi lektine. Iz morske kumare *Cucumaria echinata* so na primer izolirali hemolitično aktiven lektin CEL-III, katerega delovanje je odvisno od kalcija. Hemolizo povzroči s tvorbo ionsko-permeabilnih por s polmerom manjšim od 18 Å, ki poškodujejo eritrocitno membrano (Fujisawa, 1997). Večinoma so lektini zastopani pri rastlinah, najdemo pa jih tudi pri nekaterih živalih in bakterijah. So proteini, ki se vežejo na sladkorne komponente celičnih membran (ogljikove hidrate ali glikoproteine). Specifična vezava na določene ogljikove hidrate poteka po mehanizmu ključ-ključavnica s hidrofobnimi interakcijami, pri čemer nastane tudi kompleksna mreža vodikovih vezi. Ob nastalem proteinsko-ogljikovohidratnem kompleksu se molekule vode ob polarnih skupinah proteina prerazporedijo okrog najbolj polarnih skupin, kar ustvari nove vodikove vezi, ki skupaj z Van der Waalsovimi tvorijo glavne povezovalne sile in omogočajo stabilno vezavo. Na tak način lektini aglutinirajo (zlepljajo) različne tipe celic, tiste, ki povzročijo zlepljanje eritrocitov (hemaglutinacijo) imenujemo hemaglutinini (Kennedy s sod., 1994). Rastlinski lektini so obrambni proteini, ki se vežejo na celice prebavnega epitela in preprečujejo absorbcijo hranil. Pri iglokožcih so jih izolirali še iz morskih zvezd (celomska tekočina vrste *Oreaster reticulatus*) [Snowden s sod., 1994] in morskih ježkov (globularni pedicelariji vrst *Toxopneustes pileolus*, *Tripneustes gratilla*, *Diadema setosum*, *Asthenosoma* sp.).

Podatki o hemolitično aktivnih snoveh, izoliranih iz iglokožcev, so v literaturi zaenkrat precej skopi.

O hemolitični aktivnosti pedicelarnih ekstraktov morskih ježkov *Echinus esculentus* (Linnaeus), *Paracentrotus lividus* (Lamarck), *Psammechinus miliaris* (Müller) je poročal Lévy (1935, po Russell 1996).

Analize pedicelarnega ekstrakta morskega ježka vrste *Tripneustes gratilla* so pokazale hemolitičnost za človeške (tip A in B), goveje, ovčje, zajčje, ribje eritrocite in eritrocite gvinejskih prašičkov (Allender in Russel, 1967 po Russel, 1996). Ekstrakt naj bi vseboval nedializirajoč, termolabilen, pH stabilen, v destilirani vodi topen protein (Alender, 1965). Fleming in Howden (1974) sta iz *Tripneustes gratilla* izolirala kisel približno 78 kDa velik protein z izoelektrično točko 5.0 – 5.1, Nakagawa (1999) pa 23 kDa velik od kalcija odvisen lektin (TGL-I), ki veže heparin. Iz celomske tekočine *Tripneustes gratilla* je Satoh (2002) izoliral hemolitičen od kalcija odvisen lektin z molekulsko maso 29 kDa, Kuwamura (1998) pa 90 kDa velik

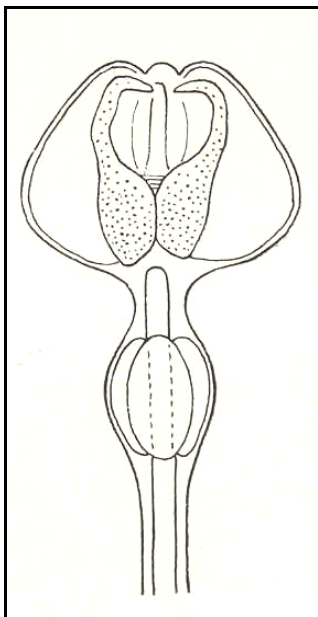
homodimerni hemolizin iz celomske tekočine vrste *Strongylocentrotus nudus*, s podenoto veliko 48 kDa.

Iz pedicelarnega ekstrakta vrste morskega ježka vrste *Toxopneustes pileolus*, ki naj bi bil zmes več bazičnih proteinov velikosti 30-40 kDa in 70-80 kDa (Kimura s sod., 1975; Feigen s sod., 1974 po Russel, 1996) so izolirali 17,7 kDa velik protein kontraktin A (Nakagawa, 1991) ter dva lektina (Nakagawa, 1996, 1999), ki vežeta D-galaktozo, velikosti 32 kDa (SUL-I) in 23 kDa (SUL-II).



Slika 1: Pegasti ali belobodičasti morski jež *Sphaerechinus granularis* Lamarck. (Foto: T. Turk)

O toksičnosti pegastega morskega ježka *Sphaerechinus granularis* (Lamarck), edinega mediteranskega predstavnika družine Toxopneustidae, kamor spadajo strupeni predstavniki *Lytechinus variegatus* (Lamarck), *Toxopneustes elegans* Doderlein, *Toxopneustes pileolus* (Lamarck), *Tripneustes gratilla* (Linnaeus) in *Tripneustes ventricosus* (Lamarck), so poročali von Uexküll (1899), Henri in Kayalof (1906) ter Pérès (1950). Pedicelarni ekstrakt je vplival na prevodnost ishiadičnega živca in bitje srca žab, zajci pa so nanj razvili imunost (Russel, 1971). Pérès (1950) je opazil paralitično aktivnost ekstraktov različnih tkiv (trjave žleze, ambulakralne tekočine, celomske tekočine, pedicelarijev), ki so bili letalni za rake (*Pachygrapsus marmoratus* Stemp., *Eupagurus prideauxi* Leach, izopodnega raka *Idotea baltica* Pallas, kopepodnega raka *Harpacticus fulvus*). Med vsemi analiziranimi tkivi je bil najbolj strupen pedicelarni ekstrakt in je vseboval termostabilno aktivno snov, ki je bila stabilna tudi v mineralnih kisinah. Paralitično aktivnost so opazili tudi pri ekstraktih morskih ježkov *Paracentrotus lividus* in *Toxopneustes pileolus* (Baslow, 1969), nekaterih ježkih iz rodov *Diadema* in *Echinotrix* ter nekaterih drugih iglokožcih (morski zvezdi *Achantaster planci*, kačjerepu *Ophiomastix annulosa*).



Glavni strupni aparat morskih ježev so pedicelariji (kleščice, ščipci) in bodice. Za obrambo so specializirani globularni pedicelariji, ki so sestavljeni iz peclja z glavo, v kateri so tri debele premične čeljusti z brazdastim zobom. Vsaka od čeljusti vsebuje strupno žlezo epidermalnega izvora, obdano z mišičastim ovojem, ki jo popolnoma zapolnjujejo neaktivne visokodiferencirane celice dveh tipov, ki se pojavljata na različnih mestih in se med sabo razlikujeta po morfoloških in kemijskih lastnostih. Strup je shranjen v intracelularnih vakuolah žleznih celic (Dubois in Ameye, 2001). Izločki vakuol morskega ježka *Strongylocentrotus purpuratus*, iz družine Strongylocentrotidae, ki je po sorodnosti zelo blizu družini Toxopneustidae (Matsuoka, 1985), vsebujejo bazofilne, na fuksin pozitivne ter kisle mucine (O'Connell, 1971 povzeto po Russell, 1996).

**Slika 2: Skica globularnega pedicelarija *Sphaerechinus granularis* Lamarck (slikovni vir Tortonese E., 1965)**

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti ali je pedicelarni ekstrakt morskega ježka *Sphaerechinus granularis* hemolitično ali aglutinacijsko aktiven za goveje eritrocite ter izolirati aktivno snov. Predvidevali smo, da so potencialno prisotne hemolitično aktivne snovi v ekstraktu pedicelarijev (Slika 1) verjetno enakih velikostnih razredov kot že izolirane hemolitične snovi morskih ježkov družine Toxopneustidae.

## 2. MATERIALI IN METODE

### 2. 1. SVEŽ BIOLOŠKI MATERIAL

Pedicelarije 96 primerkov pegastih morskih ježkov *Sphaerechinus granularis*, smo nabrali v Piranski punti Piranskega zaliva septembra 2005. Nabrane morske ježke smo položili v kopel 7 % MgCl<sub>2</sub>, pri čemer so razprli bodice in odvrgli pedicelarije. Morske ježke smo vrnili nazaj v naravo, zbrane pedicelarije pa smo zamrznili pri -20°C do nadaljnega dela.

### 2. 2. HOMOGENIZACIJA

Zamrznjene pedicelarije smo odtalili in jih homogenizirali z Elvejham-Potterjevim homogenizerjem v prisotnosti delovnega pufru (50 mM tris pufer pH 7,5 ali 10 mM amonacetaten pufer pH 5,3). Homogenizacija je potekala na ledu, 15 pasaž. Homogenat smo centrifugirali (centrifuga Sigma 3K30, srednji rotor), 15.000 obratov/min, 20 minut. Supernatant smo shranili v hladilniku, usedlino pa zavrgli. Preostanek smo ponovno centrifugirali 15 minut.

### 2. 3. GELSKA KROMATOGRAFIJA

Gel Sephadex G-50 medium (Pharmacia, Švica) smo v čaši z destilirano vodo kuhali na vodni kopeli 1 uro. Nabrekli Sephadex gel smo prenučirali s presesalno bučo in črpalko. Stakleno kolono 1,5×75 cm (volumen kolone 132,53 ml) smo napolnili s Sephadexom G-50 in tako pripravljeno kolono shranili v hladni sobi pri 4°C.

Na kolono smo nanесли homogenat pedicelarijev v delovnem pufru. Kolono smo spirali s pufrom pri pretoku 0,5 ml/min. Zbrali smo 95 frakcij z volumnom 3 ml. Absorbanco frakcij pri 280 nm smo izmerili spektrofotometrično (Perkin Elmer UV/VIS Spektrofotometer, Lambda Bio). Po umerjanju v obeh kivetah z delovnim pufrom (Auto zero) smo pričeli z meritvijo.

### 2. 4. IONSKOIZMENJEVALNA KROMATOGRAFIJA

Anionsko kolono (Econo Pac, High Q Cartridge, 5 ml, BioRad) za ionskoizmenjevalno kromatografijo smo namestili na BioRad aparat (Econo Pump, Econo UV monitor, Econo System Controller, Model 2110 Fraction Collector). Pripravili smo raztopino A (delovni pufer) in B (delovni pufer + 1 M NaCl). Cevki (A in B) smo spirali 15 min z raztopino A pri pretoku 6 ml/min, cevko B smo nato spirali z raztopino B 10 minut in z raztopino A 10 minut. Vzorec smo nanašali na kolono pri pretoku 1 ml/min. Med spiranjem kolone z raztopino A (1 ml/min) smo v čašo 5 minut lovili nevezane komponente, nato smo vklopili gradient pri pretoku 0,2 ml/min,

pri čemer smo skupno zbrali 80 frakcij z volumnom 2 ml. V uvodnih poskusih smo s kolektorjem lovili frakcije od samega začetka spiranja kolone.

Na koncu smo kolono sprali z raztopino B. Po končani kromatografiji smo spektrofotometrično izmerili absorbanco vseh 80 frakcij pri valovni dolžini 280 nm.

Kolono smo regenerali tako, da smo jo 20 min spirali z delovnim pufrom. Cevko A smo spirali 30 min pri pretoku 1 ml/min z 1 M NaOH in 40 min pri pretoku 1 ml/min z raztopino A. Cevko B smo spirali z raztopino B 40 min pri pretoku 1 ml/min. Cevko A smo spirali še enkrat 40 min pri pretoku 1 ml/min z raztopino A.

**Preglednica 1: Gradient ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska Econo Pac, High Q Cartridge kolona)**

t [min]	B [%]
0	0
5	0
740	100
760	100
780	100
800	100

## 2. 5. VISOKOTLAČNA TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA (HPLC) IN REVERZNOFAZNA KROMATOGRAFIJA

Visokotlačno tekočinsko kromatografijo smo izvedli s kationsko kolono (Tosohaas, TSK-gel-SP-5PW s predkolono), reverznofazno kromatografijo pa s kolono VYDAC<sup>TM</sup>. Iglo (100 µl, Microtiter<sup>TM</sup>, Hamilton Bonaduz, Švica) smo sprali z bidestilirano vodo. Na injektor smo prtdili 50 µl zanko, ki smo jo pred uporabo sprali z bidestilirano vodo.

Nastavili smo parametre:

- raztopina A (bidestilirana voda + 0,1 % trifluorocetna kislina),
- raztopina B (acetonitril + 0,1 % trifluorocetna kislina),
- mobilna faza (acetonitril),
- pretok (1 ml/min),
- detekcija UV (254 nm),
- gradient od 0-70 % v 50 min.

Volumen nanešene frakcije je bil 50 µl.

Frakcije smo lovili pri različnih retencijskih časih.

## 2. 6. LIOFILIZACIJA

Frakcije biološkega materiala dobljenega v uvodnih poskusih izolacije smo globoko zamrznili s pomočjo tekočega dušika in jih čez noč liofilizirali s Christ liofilizerjem



Alpha 2-4 ter tako posušene vzorce shranili pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do nadaljnje uporabe.

## 2. 7. MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Koncentracijo proteina v frakcijah smo določili z BCA reagentom po navodilih proizvajalca (BCA Protein Assay Kit, Pierce, ZDA).

Reagent smo pripravili tako, da smo raztopini A in B zmešali v razmerju 1:50 (1 ml B in 49 ml A). Uporabili smo dva načina meritve:

- V paralelni kiveti smo odpipetirali  $50\ \mu\text{l}$  vzorca in  $950\ \mu\text{l}$  reagenta, inkubirali 30 min pri temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in izmerili absorbanco s spektrofotometrom pri  $562\ \text{nm}$ .
- V paralelni epici smo odpipetirali  $100\ \mu\text{l}$  vzorca in 2 ml reagenta, inkubirali 30 min v vodni kopeli pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter izmerili absorbanco s spektrofotometrom pri  $562\ \text{nm}$ .

## 2. 8. SDS ELEKTROFOREZA

SDS elektroforezo smo izvedli po navodilih proizvajalca na Phast System Separation and Control Unit. Barvali smo s srebrom in Coomassie modrim. Uporabili smo Phast Gel gradient 8-25, Amersham Biosciences in Phast Gel, SDS Buffer Strips, Amersham Pharmacia Biotech AB).

**Preglednica 2: LMW standardi (z nizko molekulsko maso) uporabljeni pri SDS elektroforezi**

STANDARD	Molekulska teža [Da]
Fosforilaza B	94.000
Albumin	67.000
Ovalbumin	43.000
Karboanhidraza	30.000
Tripsinski inhibitor	20.100
Alfa-laktalbumin	14.400

## 2. 9. ULTRAFILTRACIJA

Ultrafiltracijo smo izvedli z različnimi tipi koncentradorjev (Centricon, Centriprep YM-10 in Microcon YM-10, Amicon Bioseparations) glede na velikosti proteinov prisotnih v vzorcih.

## 2. 10. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

Izoelektrično fokusiranje vzorca smo izvedli po navodilih proizvajalca na Phast Systemu z uporabo Silver Kit-a (barvanje s srebrom) in s Coomassie modrim ter IEF standardov (pH 3-10).

**Preglednica 3: Standardi IEF (3-10) uporabljeni pri izoelektričnem fokusiranju (Phast System)**

STANDARD	Izoelektrična točka [pH]
Lentil lektin (bazičen)	8,65
Lentil lektin (srednji)	8,45
Lentil lektin (kisel)	8,15
Konjski mioglobin (bazičen)	7,35
Konjski mioglobin (kisel)	6,85
Človeška karboanhidraza B	6,55
Goveja karboanhidraza B	5,85
Beta-laktoglobulin A	5,2
Sojin tripsinski inhibitor	4,55
amiloglukozidaza	3,5

## 2. 11. MERJENJE HEMOLITIČNOSTI

Pri testiranju hemolitičnosti smo uporabili goveje eritrocite, ki so bili shranjeni v konzervansu za eritrocite (Alseverjev reagent) pri 4°C. Goveje eritrocite smo pripravili tako, da smo jih centrifugirali v centrifugi (Centric 322A, Tehtnica) pri 2500 obratih na minuto, 5 minut. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa trikrat sprali s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl). Po spiranju s fiziološko raztopino smo usedlino sprali še v pufri za eritrocite. Puffer za eritrocite smo pripravili v 1000 ml bučki, v kateri smo raztopili 7,597 g NaCl in 2,423 g tris-a z deionizirano vodo in umerili pH na 7,4 z 1 M HCl s pH metrom SvenMulti, Mettler Toledo, S40-K.

Za merjenje hemolitičnosti smo uporabili dve metodi:

- Pri turbidometrični metodi smo spektrofotometer (Perkin Elmer UV/VIS) za merjenje hemolitičnosti nastavili tako, da smo ga nastavili za merjenje pri 700 nm 180 sekund ter ga umerili z eritrocitnim pufrom (AutoZero). Za merjenje hemolitičnosti frakcij smo v kiveto odpipetirali 3 ml eritrocitne suspenzije (umerjene na asorbanco 0,500) in različne količine (20 µl, 100 µl) vzorca ter merili  $t_{50}$  (čas, v katerem hemoliza iz absorbance 0,500 pade na absorbance 0,250).
- Z mikročitalcem (MRX, Dynex Technologies) smo izmerili hemolitičnost na mikrotitrni plošči. Eritrocitno suspenzijo smo umerili na absorbance 0,500 s programom hemoliza.2. Hemolitičnost smo merili 20 min s programom petra.asy, kjer smo v jamico zaporedno odpipetirali 100 µl eritrocitne suspenzije, 100 µl eritrocitnega pufra in 100 µl vzorca.

Pri meritvi vpliva kalcija na hemolitičnost smo uporabili raztopino 1 mM CaCl<sub>2</sub> v eritrocitnem pufri. Meritev smo izvedli na mikročitalcu tako kot smo opisali zgoraj, le da je puffer vseboval tudi 1mM CaCl<sub>2</sub>.

V uvodnih poskusih smo z liofiliziranim materialom izvedli tri meritve hemolitičnosti:

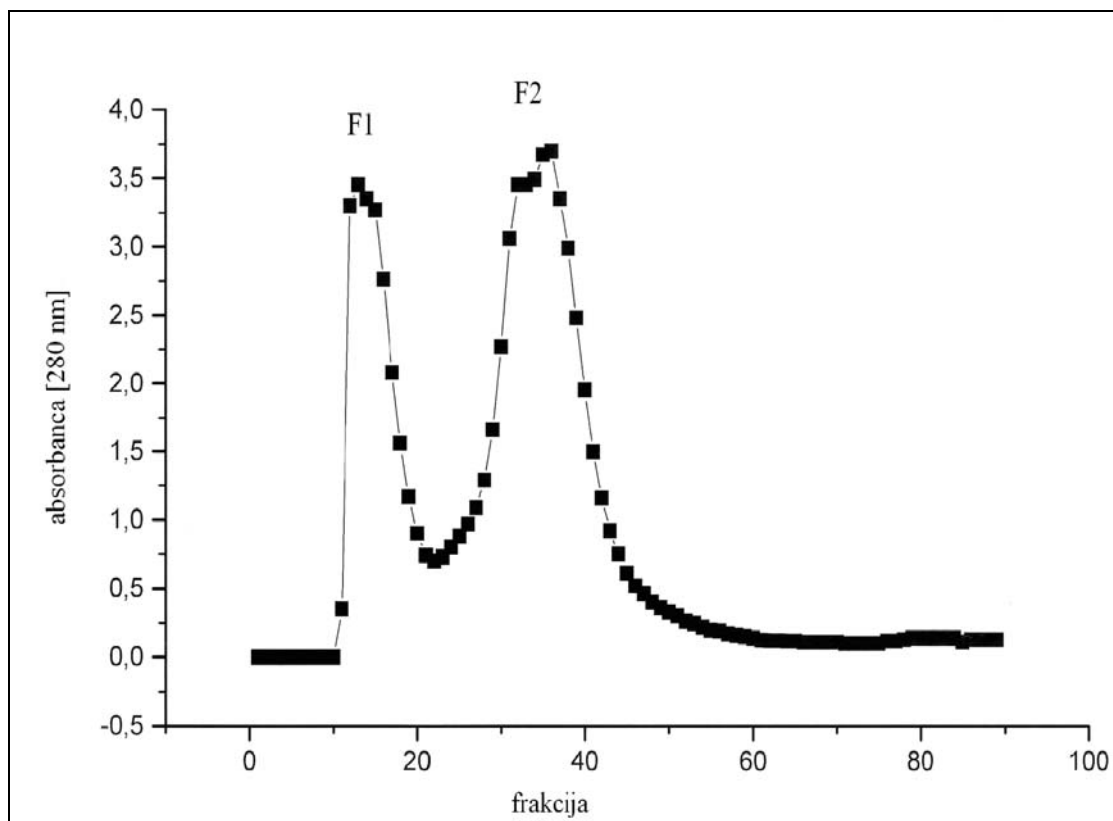
- Pri prvi in drugi meritvi smo raztapljali 10 mg liofiliziranega materiala v 1 ml destilirane vode na ledu. Pri merjenju hemolitičnosti s spektrofotometrom smo v prvem primeru v merilno kiveto dodali 20  $\mu$ l, v drugem pa 100  $\mu$ l vzorca.
- Pri tretji meritvi smo v hladni destilirani vodi raztopili ves preostanek liofiliziranega materiala. Pri merjenju hemolitičnosti s spektrofotometrom smo v merilno kiveto dodali 100  $\mu$ l vzorca.

## 2. 12. AGLUTINACIJSKI TEST

Aglutinacijsko aktivnost smo testirali tako, da smo na mikrotitrni plošči pripravili tri koncentracije raztopin vključno s kontrolo, ki je namesto vzorca vsebovala eritrocitni pufer. Pri totalnem volumnu 300  $\mu$ l smo v 2 % eritrocitno suspenzijo odpipetirali bodisi 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l ali 150  $\mu$ l vzorca. Mikrotitrno ploščo smo pokrili in inkubirali pri sobni temperaturi 1 uro.

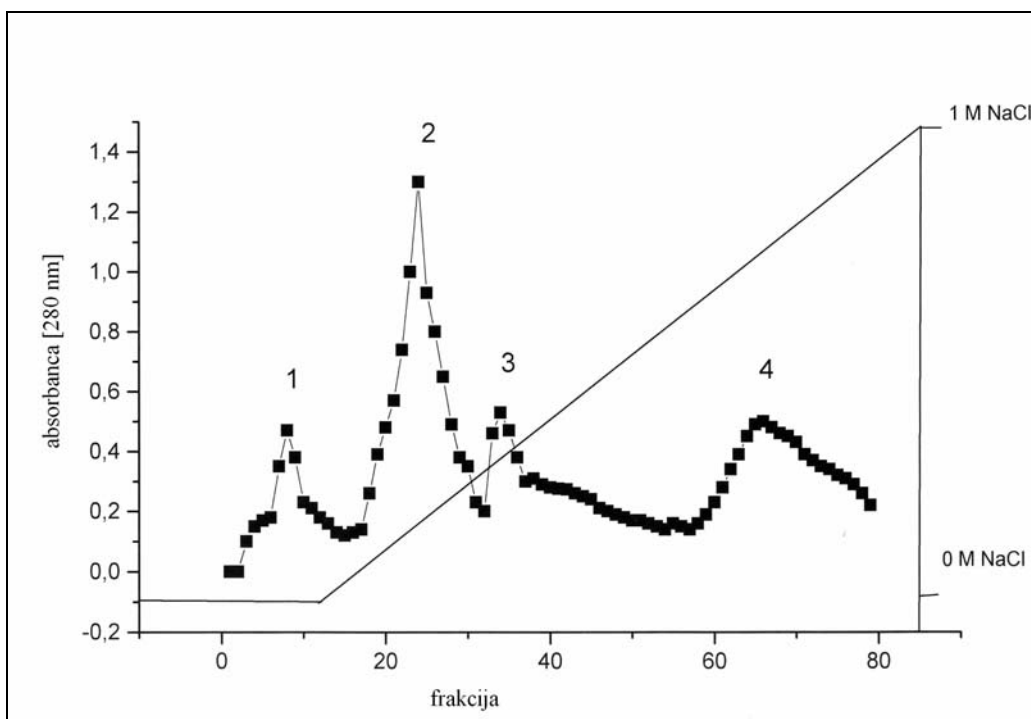
### 3. REZULTATI

#### 3.1. UVODNI POSKUSI

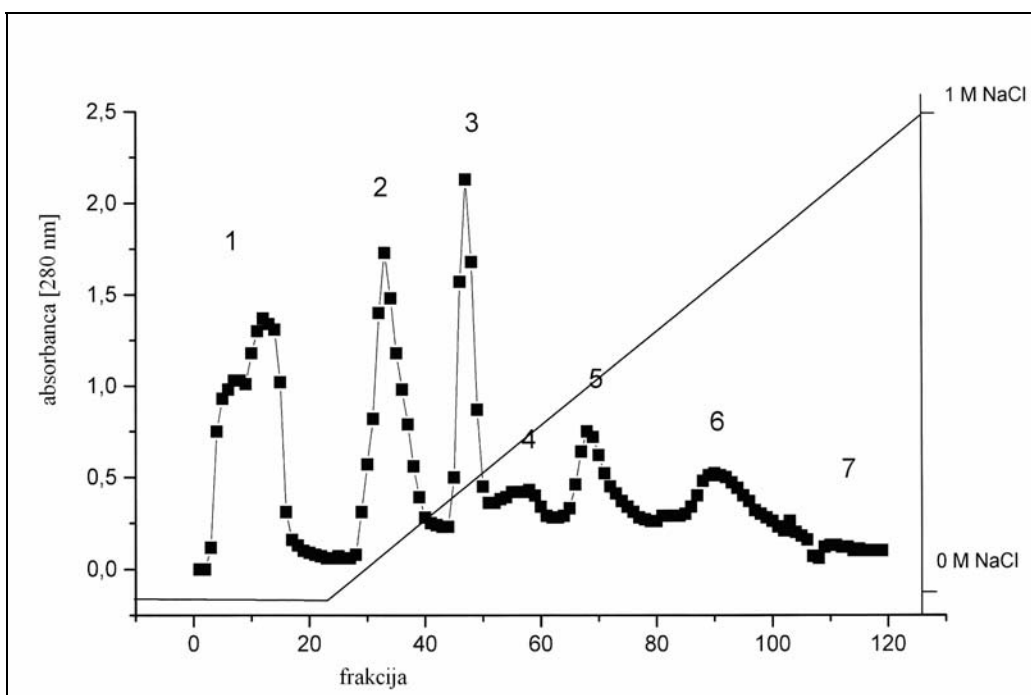


Slika 3: Elucijski diagram gelske kromatografije (1,5 × 75 cm kolona, Sephadex G-50, mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos 7,5 ml homogenata pedicelarijev *S. granularis*. (uvodni poskusi)

Homogenat se je ločil v dva hemolitična vrhova F1 in F2 (Slika 3), ki sta se ločila po ionskoizmenjevalni kromatografiji kot prikazujeta Sliki 4 in 5.



Slika 4: Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska High Q Econo Pac Cartridge kolona; mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos prvega hemolitičnega vrha (F1) po gelski kromatografiji v tris pufru pri pretoku 1 ml/min (uvodni poskusi)

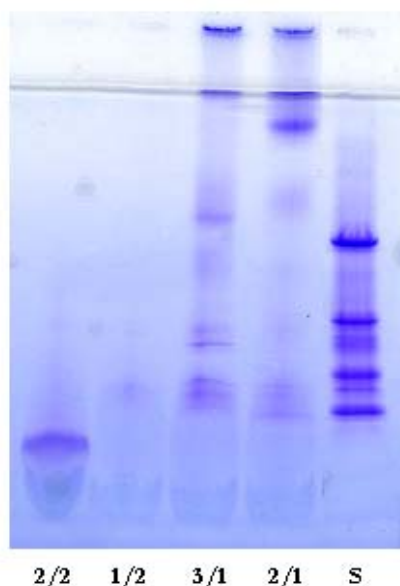


Slika 5: Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska High Q Econo Pac Cartridge kolona; mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos drugega hemolitičnega vrha (F2) po gelski kromatografiji v tris pufru pri pretoku 1 ml/min (uvodni poskusi)

**Preglednica 4: Koncentracije proteinov v raztopinah liofiliziranih frakcij druge in tretje meritve hemolitičnosti (uvodni poskusi, točka 2. 11.)**

	<b>2. meritev</b>	<b>3. meritev</b>
Frakcija	c [mg/ml] proteina	c [mg/ml] proteina
1/1	0,09	0,26
2/1	0,48	0,4
3/1	0,27	0,54
4/1	0	0,02
1/2	0,17	0,62
2/2	0,02	0,15
3/2	0	0,1
4/2	0	0,15
5/2	0	0,18
6/2	0	0,13
7/2	0	0,08

Meritve hemolitičnosti, izvedene po postopku opisanem v točki 2.11., so bile negativne; le pri meritvi hemolitičnosti frakcije 1/2 z najvišjo koncentracijo proteina (kot je razvidno iz Preglednice 4) je prišlo do hemolize šele, ko smo po meritvi v kiveto naknadno dodali še 200  $\mu$ l vzorca.



**Slika 6: SDS elektroforeza s Coomassie modrim vzorcev pripravljenih za tretjo meritve hemolitičnosti (uvodni poskusi)**

**Preglednica 5: Velikostni razredi proteinov prisotnih v vzorcih pripravljenih za tretjo meritev hemolitičnosti (uvodni poskusi)**

vzorec	velikostni razredi proteinov [kDa]					
	2/1		14,4	cca. 20	cca. 43	
3/1		3 linije med 14,4–30		cca. 43	cca. 60	2 liniji > 94
1/2		14,4– 30				
2/2	<14,4					

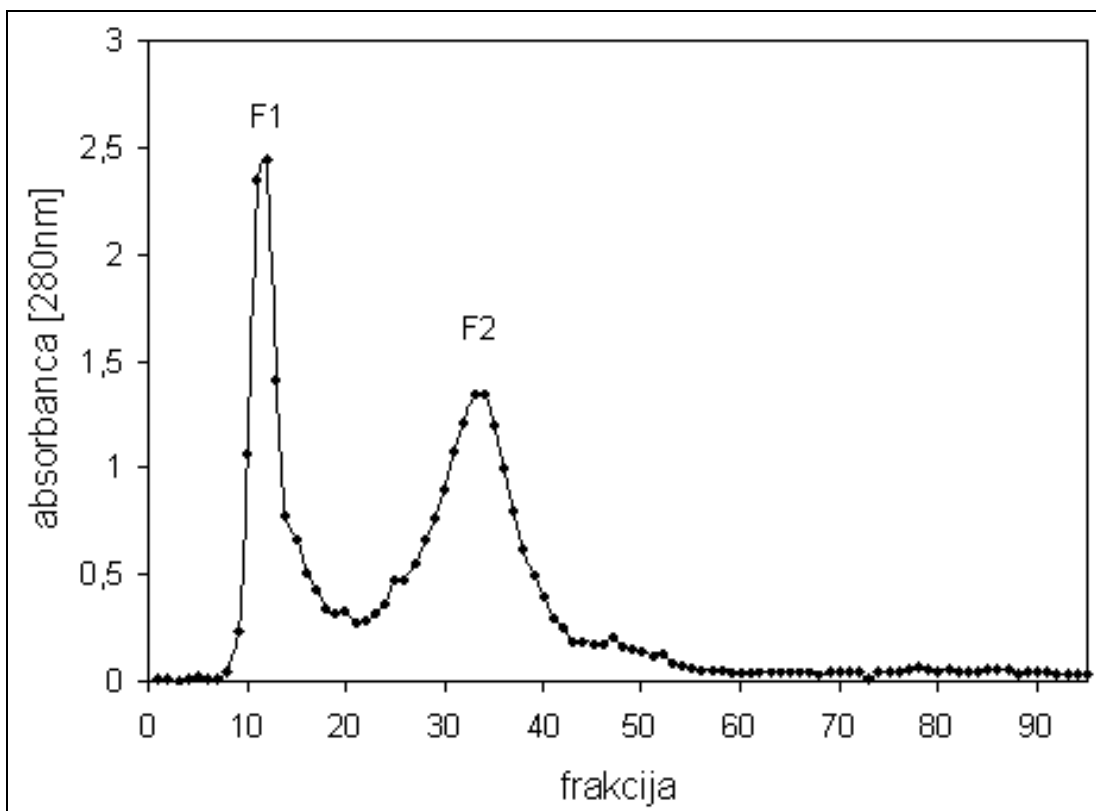
### 3. 2. IZOLACIJA PROTEINOV

#### 3. 2. 1. Homogenizacija

Homogenat pedicelarijev pegastega morskega ježka *Sphaerechinus granularis* v 50 mM tris pufri s pH 7,5 je vseboval 0,5 mg/ml proteina. Spektrofotometrično izmerjena hemolitičnost homogenata je bila negativna.

Homogenat pedicelarijev pegastega morskega ježka *Sphaerechinus granularis* v 10 mM amonacetatnem pufri s pH 5,3 (izhodnega materiala je bilo več kot pri predhodni homogenizaciji) je vseboval nad 1,8 mg/ml, kar je bilo nad mejo detekcije metode. Spektrofotometrično izmerjena hemolitičnost homogenata je bila negativna.

### 3. 2. 2. Gelska kromatografija

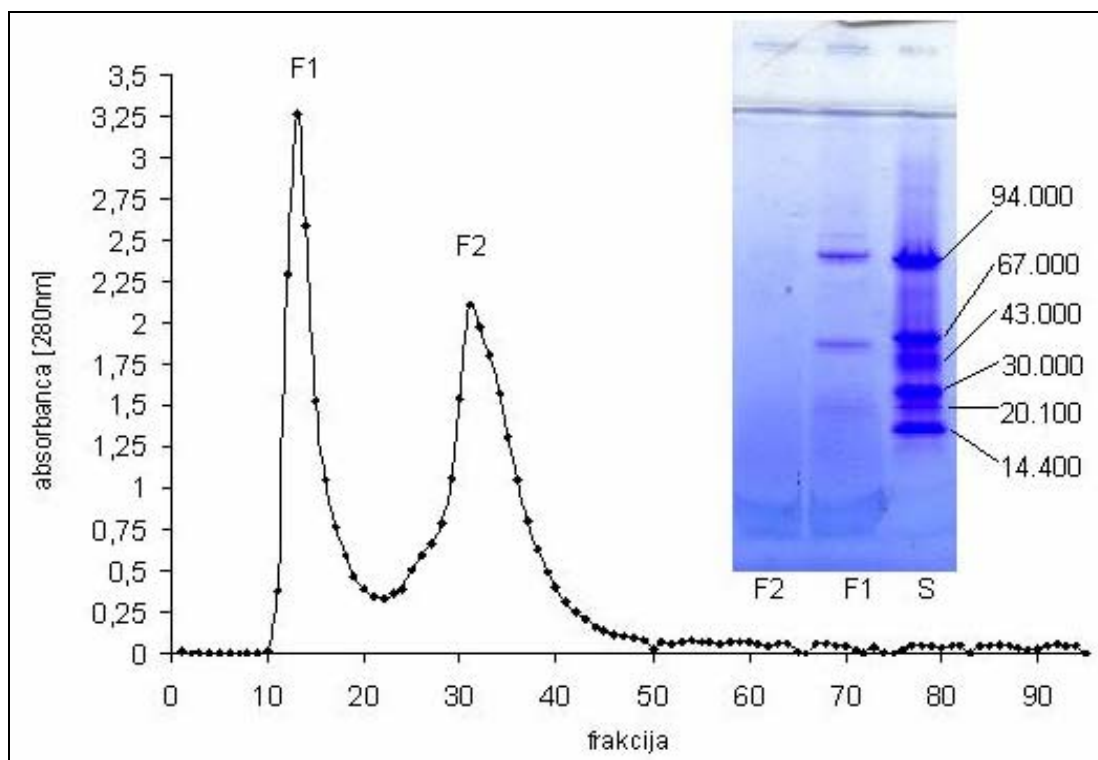


Slika 7: Elucijski diagram gelske kromatografije (1,5 × 75 cm kolona, Sephadex G-50, mobilna faza 50 mM tris pufer s pH 7,5). Nanos 3,5 ml homogenata pedicelarijev *S. granularis*.

Preglednica 6: Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po gelski kromatografiji v 50 mM tris pufru s pH 7,5

Frakcije	Združena frakcija	c [mg/ml]	Hemolitičnost [spektrofotometer]
FR9-20	F1	0,77	NE
FR22-42	F2	0,12	NE





Slika 8: Elucijski diagram gelske kromatografije (1,5 × 75 cm kolona, Sephadex G-50, mobilna faza 10 mM amonacetatni pufer s pH 5,3, nanos 4,5 ml homogenata pedicelarijev *S. granularis*) in SDS elektroforeza s Coomassie modrim obeh vrhov (F1, F2) po gelski kromatografiji

Preglednica 7: Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po gelski kromatografiji v 10 mM amonacetatnem pufru s pH 5,3

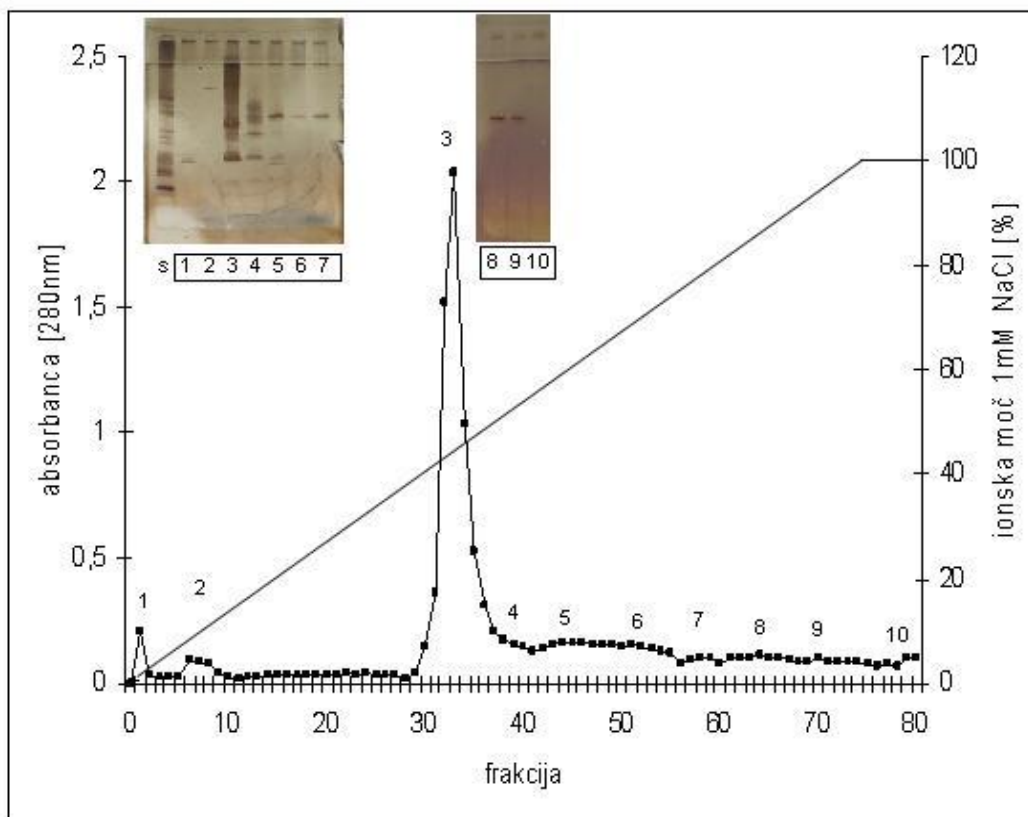
Frakcije	Združena frakcija	c [mg/ml]	Hemolitičnost [mikročitalce]
FR11-22	F1	0,59	DA
FR23-46	F2	0,17	DA

Hemolitičnost, vsake posamezno eluirane frakcije, izmerjena na mikročitalcu je bila negativna.

Hemolitičnost združenih frakcij (Preglednica 7) izmerjena s spektrofotometrom je bila negativna, pri meritvi z mikročitalcem pa smo dobili pozitivni obe frakciji F1 in F2.

Pri aglutinacijskem testu vzorcev (F1 in F2, Preglednica 7) aglutinacije nismo zasledili, prišlo pa je do razbistritve (hemolize). Test vpliva kalcija na hemolitičnost je pokazal pri obeh vzorcih od kalcija neodvisen hemolitičen rezultat.

### 3. 2. 3. Izolacija proteinov prvega vrha (F1) gelske kromatografije



Slika 9: Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska kolona Econo Pac, High Q Cartridge, 5 ml, BioRad). Nanos frakcije F1 po gelski kromatografiji v 50 mM tris pufuru s pH 7,5 in pri pretoku 1 ml/min ter SDS elektroforeza, barvanje s srebrom

Preglednica 8: Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po ionskoizmenjevalni kromatografiji s 50 mM tris pufrom pri pH 7,5 (Slika 9)

Frakcije	Združena frakcija	c [mg/ml]	Hemolitičnost
	Nevezane komponente vrha	0,06	DA
FR1-2	1 F/1	0,07	DA
FR5-10	2 F/1	0,07	DA
FR29-37	3 F/1	0,71	
FR38-41	4 F/1	0,12	
FR42-47	5 F/1	0,12	
FR48-55	6 F/1	0,1	
FR56-60	7 F/1	0,08	
FR61-68	8 F/1	0,08	
FR69-76	9 F/1	0,06	
FR79-80	10 F/1	0,06	

Hemolitičnost, vsake posamezno eluirane frakcije, izmerjena na mikročitalcu je bila pozitivna za vzorec z nevezanimi komponentami ter prvi dve eluirani frakciji (FR1 in FR2).

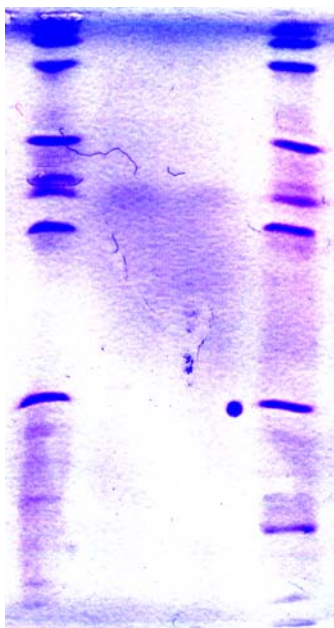
Spektrofotometrična meritev hemolitičnosti združenih frakcij (Preglednica 8) je bila negativna, meritev z mikročitalcem pa je bila pozitivna za združeni frakciji 1F/1 in 2F/1.

Pri aglutinacijskem testu je prišlo do razbistritve (hemolize) pri vzorcu z nevezanimi komponentami ter frakcijah 1F/1 in 2F/1, do aglutinacije pa ni prišlo pri nobenem od testiranih vzorcev. Pri testu vpliva kalcija na hemolitičnost smo dobili od kalcija neodvisen hemolitičen rezultat.

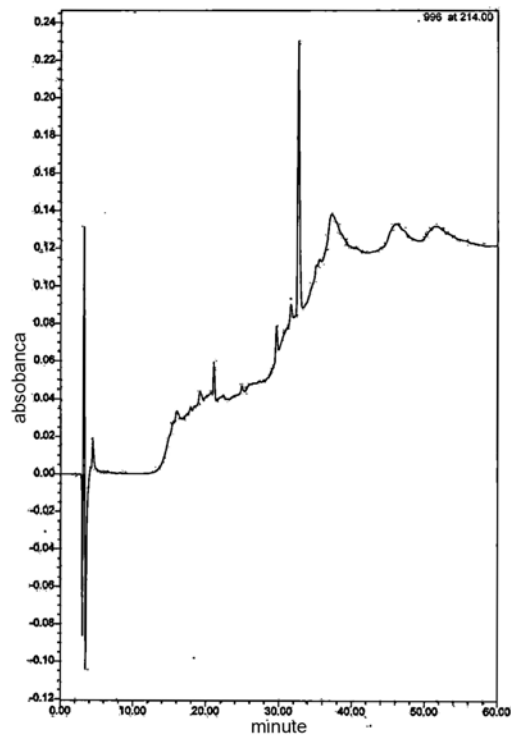
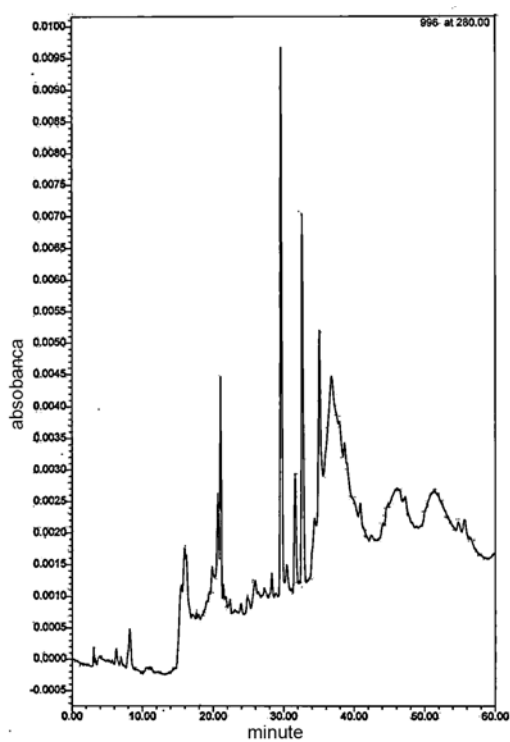
**Preglednica 9: Velikostni razredi proteinov frakcije F1 po ionskoizmenjevalni kromatografiji v 50 mM tris pufri s pH 7,5 (SDS elektroforeza; Slika 9)**

vzorec	velikostni razredi proteinov [kDa]					
1F/1		cca.30				
2F/1						cca.100
3F/1	cca. 15	cca.30	cca.40	cca.50		
4F/1	cca. 15	cca.30	cca.40		cca.67	
5F/1	cca. 15	cca.30	cca.40		cca.67	
6F/1		cca.30	cca.40		cca.67	
7F/1					cca.67	
8F/1					cca.67	
9F/1					cca.67	

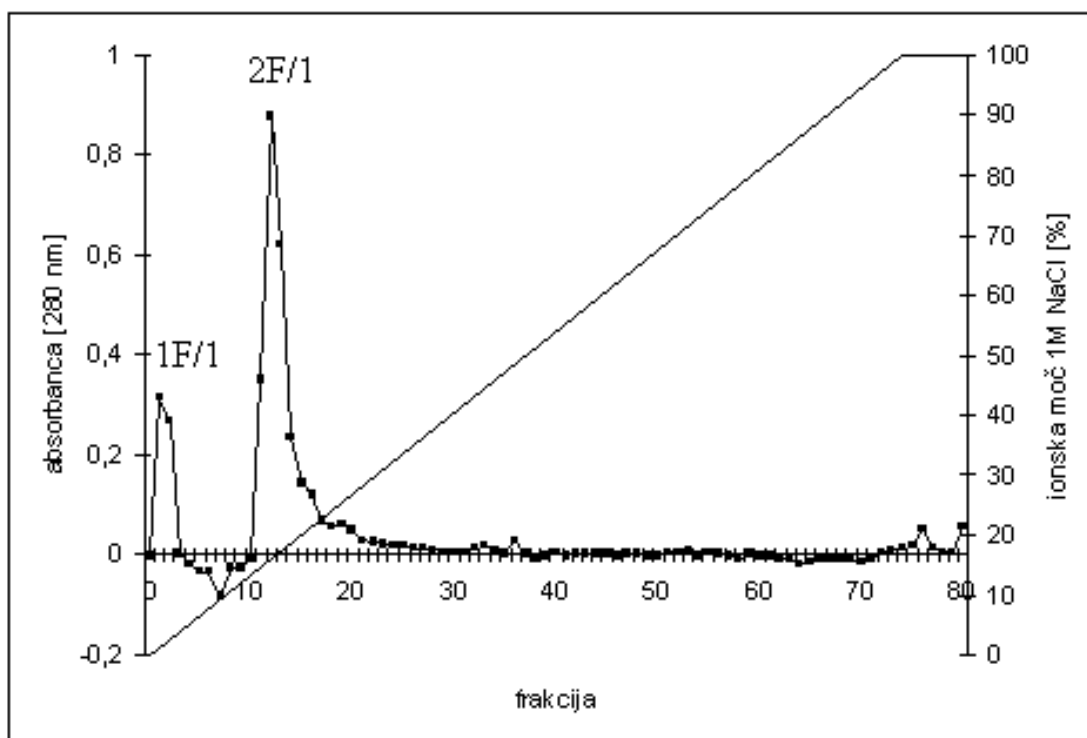
Izoelektrično fokusiranje frakcije 1F/1 je bilo negativno pri barvanju s srebrom in pozitivno pri barvanju s Coomassie modrim. Frakcija 1F/1 ima izoelektrično točko med 6,55 in 6,85 (Slika 10).



Slika 10: Gel izoelektričnega fokusiranja (Phast System; IEF standardi pH 3-10, Coomassie modro) za frakcijo 1F/1.



Slika 11: Elucijska diagrama reverznofazne kromatografije (HPLC, reverznofazna VYDAC kolona, gradient od 0-70 % v 50 min). Nanos 50  $\mu$ l frakcije 1F/1 na 50  $\mu$ l zanko pri pretoku 1 ml/min.

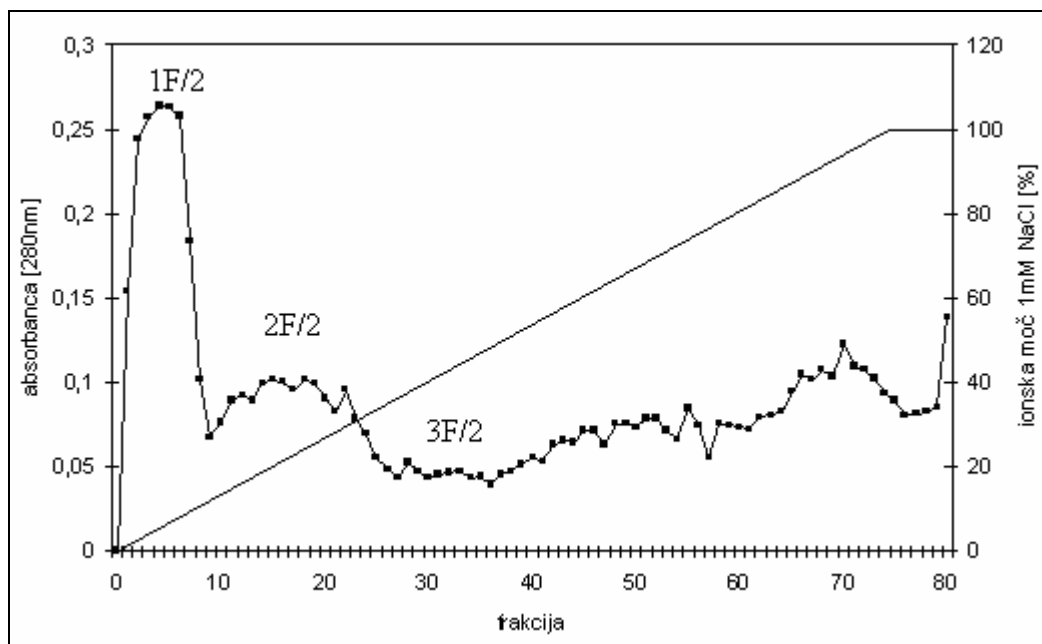


Slika 12: Elucijni diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska kolona Econo Pac, High Q Cartridge, 5 ml, BioRad; 10 mM amonacetatni pufer s pH 5,3). Nanos frakcije F1 po gelski kromatografiji v amonacetatnem pufu pri pretoku 1 ml/min.

Preglednica 10: Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po ionskoizmenjevalni kromatografiji z 10 mM amonacetatnim pufrom s pH 5,3 (Slika 12)

Frakcije	Združena frakcija	c [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Hemolitičnost [mikročitalec]
FR1-2	1F/1	pod 5	NE
FR11-16	2F/1	350	NE

### 3. 2. 4. Izolacija proteinov drugega vrha (F2) gelske kromatografije



Slika 13: Elucijski diagram ionskoizmenjevalne kromatografije (anionska kolona EconoPac, High Q Cartridge, 5 ml, BioRad; 50 mM tris puffer s pH 7,5). Nanos frakcije F2 po gelski kromatografiji v trisu pri pretoku 1 ml/min.

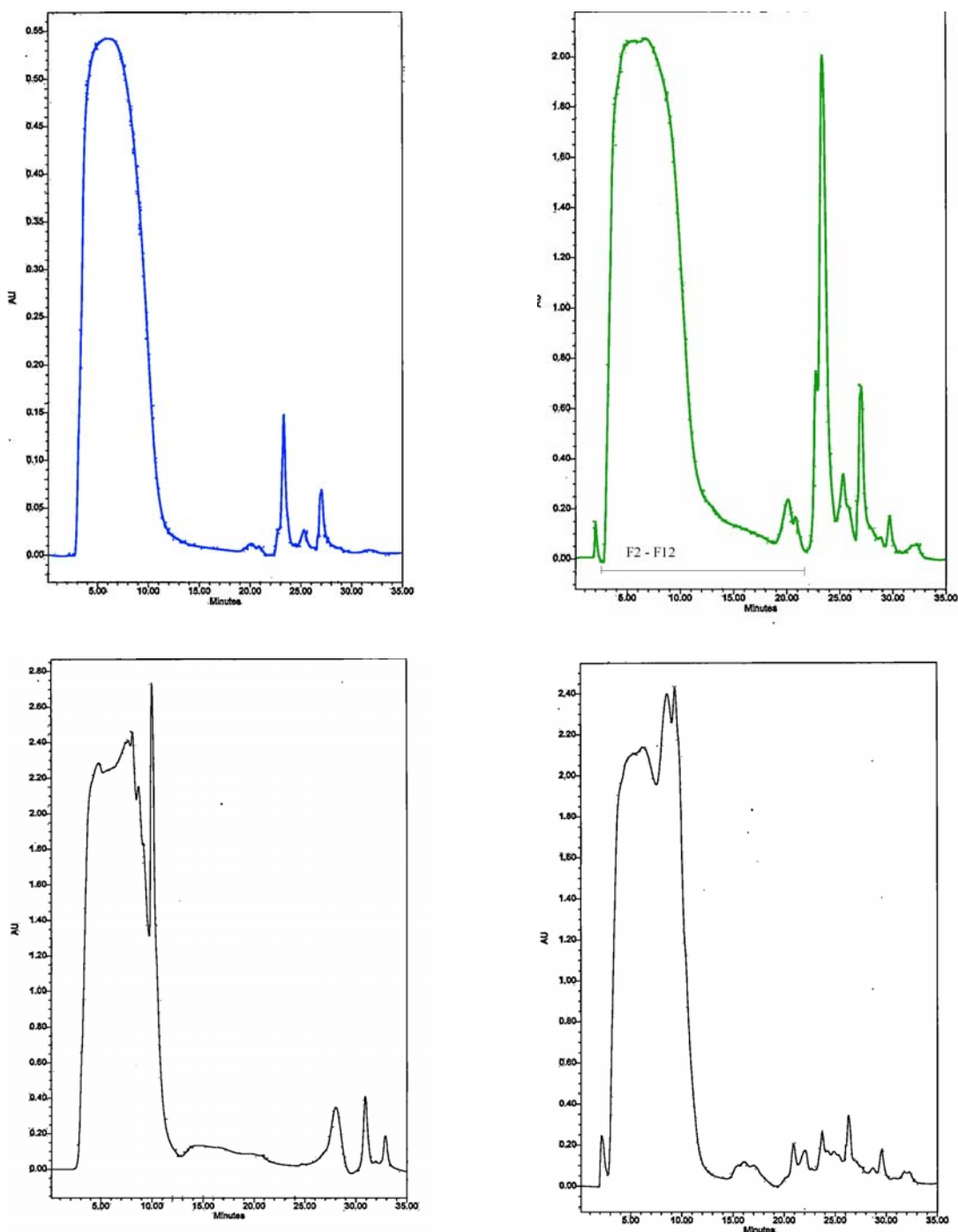
Preglednica 11: Hemolitičnost in koncentracija proteina v frakcijah po ionskoizmenjevalni kromatografiji s 50 mM tris pufrom s pH 7,5 (Slika 13)

Frakcije	Združena frakcija	c [mg/ml]	Hemolitičnost [mikročitalec]
	Nevezane komponente vrha	0,1	DA
FR2-9	1 F/2	0,08	DA
FR10-27	2 F/2	0,04	DA
FR28-37	3 F/2	0,04	DA
FR38-58	4 F/2	0,02	
FR59-76	5 F/2	0,04	
FR77-80	6 F/2	0,02	

Spektrofotometrična meritev hemolitičnosti združenih frakcij je bila negativna. Meritev z mikročitalcem je bila pozitivna za vzorec z nevezanimi komponentami ter frakcijo 1F/2, 2F/2 in 3F/2 (Preglednica 11). SDS elektroforeza s srebrom in Coomassie modrim je bila negativna. SDS elektroforeza vzorcev po ultrafiltraciji je bila prav tako negativna.

Pri aglutinacijskem testu je do razbistritve (hemolize) prišlo pri vzorcu z nevezanimi komponentami ter frakcijah 1F/2, 2F/2 in 3F/2, do aglutinacije pa v nobenem od

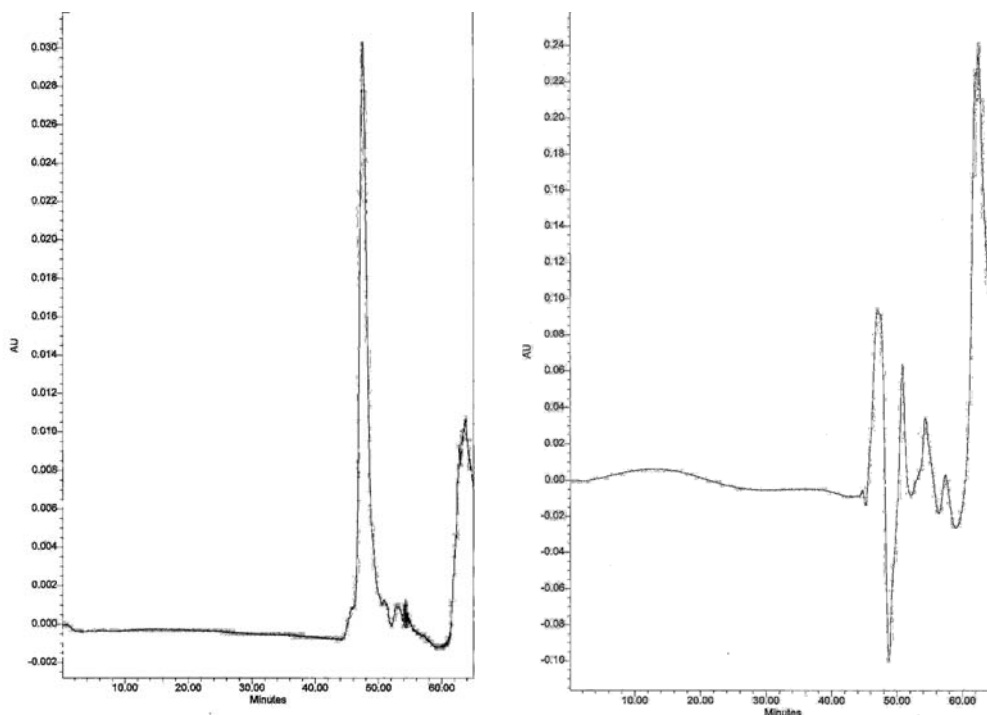
testiranih vzorcev. Pri testu vpliva kalcija na hemolitičnost smo dobili od kalcija neodvisen hemolitičen rezultat.



Slika 14: Elucijski diagrami ionskoizmenjevalne kromatografije s HPLC (kationska kolona TSK-gel-SP-5PW). Nanos 50  $\mu$ l frakcije F2 po gelski kromatografiji v 10 mM amonacetatnem pufru s pH 5,3. Primer paralelke 3 (modro - absorbanca pri 280 nm in zeleno - 215 nm) ter paralek 1 (levo) in 4 (desno) pri 215 nm (črno). V nadaljevanju Preglednica 12.

**Preglednica 12: Koncentracija proteina in hemolitičnost združenih frakcij pri podobnih retencijskih časih po HPLC s kationsko kolono (TSK-gel-SP-5PW) v petih paralelkah (Slika 14)**

vzorec	paralelke					c [mg/ml]	hemol
	1	2	3	4	5		
F1		1,9	1,8	1,93	1,72	0,002	
F2	2,5		2,7	2,83	2,8	0,07	DA
F3	5,28		6,55	6,12	6,08	0,053	DA
F4	8,75					0,116	DA
F5	9,52					0,053	DA
F6	9,97					0,1	DA
F7				14,89		0,009	DA
F8				15,95		0,01	DA
F9				17	17,32	0,005	DA
F10				19,72	19,53	0,007	DA
F11				20,48	20,75	0,015	manj
F12			21,97	21,67	21,75	0,024	DA



**Slika 15: Elucijska diagrama reverznofazne kromatografije (HPLC, reverznofazna VYDAC kolona, gradient od 0-70 % v 50 min). Nanos 50 µl vzorca F4 [z največjo koncentracijo proteina (Preglednica 12) pri 280 nm (levo) in 215 nm (desno)] na 50 µl zanko pri pretoku 1 ml/min.**



## 4. RAZPRAVA IN SKLEPI

### 4. 1. RAZPRAVA

Z uvodnimi poskusi smo pridobili okvir za nadaljni postopek izolacije. Kljub koncentriranju vzorcev s postopkom liofilizacije, so bili rezultati hemolitičnosti negativni. Meritve, ki smo jih opisali v točki 2.11., smo izvedli z namenom, da bi določili najprimernejši volumen vzorca, ki bi dal pozitivno hemolitičen rezultat. Iz edinega pozitivnega rezultata, po naknadnem dodatku 200  $\mu$ l vzorca, lahko sklepamo, da je bila količina vzorca 20  $\mu$ l ali 100  $\mu$ l premajhna za pozitivno hemolitičen rezultat pri izbranem načinu merjenja hemolitičnosti. Pri meritvi s spektrofotometrom, bi lahko meritev izboljšali, če bi dodali v kiveto večjo količino vzorca ali pa podaljšali čas merjenja. Porabi večje količine vzorca bi se lahko izognili tako, da bi namesto spektrofotometra uporabili mikročitalec.

Homogenizacija z Elvejham-Potterjevim homogenizerjem je primerna metoda za razbijanje celičnih membran mehkega tkiva pedicelarijev, pri čemer se je znotrajcelična vsebina strupnih žlez sprostila navzven. Homogenata s turbidometrično metodo nista pokazala hemolitičnosti in bi bilo v tem primeru primerno preizkusiti aktivnost tudi z mikročitalcem.

Gelska kromatografija s Sephadex G-50 je ne glede na izbran pufer ločila homogenat v dva različna vrhova, kar je razumljivo, saj metoda ločuje proteine glede na njihovo velikost in obliko.

Pri meritvi hemolitičnosti smo dobili pri meritvi s spektrofotometrom negativne, z mikročitalcem pa pozitivne rezultate, kar ponovno nakazuje na možnost preveč razredčenega vzorca in prekratkega časa meritve izvedene s spektrofotometrom.

Razlog za negativne rezultate SDS elektroforeze so verjetno prenizke koncentracije proteina v vzorcih.

Razlogi za negativno aglutinacijski rezultat so lahko v aglutinacijsko neaktivnih komponentah vzorca, v prevladujočem hemolitičnem učinku ali pa v vzorcu potencialno prisotnih aglutinacijskih zaviralcih.

Pri testu vpliva kalcija na hemolitičnost, pa lahko iščemo razloge za od kalcija neodvisen hemolitičen rezultat: v prenizki molarnosti raztopine kalcija, uporabljene v poskusu; v potencialni prisotnosti snovi v vzorcu, ki bi z večjo afiniteto vezale kalcij in s tem preprečile dostop kalcija hemolitičnim komponentam ali pa preprosto v od kalcija neodvisnih hemolitičnih komponentah.

*Izolacija proteinov prvega vrha (F1) gelske kromatografije.* Hemolitično aktivne komponente so tako bazičnega kot kislega značaja. Na prisotnost bazičnih hemolitičnih proteinov nakazuje hemolitično aktiven, iz anionske kolone spran, vzorec (Slika 4, Preglednica 8). Na prisotnost kislih komponent pa Slika 4 in 9 ter Preglednica 8.

Med proteini prvega vrha gelske kromatografije smo uspeli delno izolirati dva slabo kislila proteina velikostnega razreda 30 kDa in 100 kDa (Slika 9, Preglednica 9).

Hemolitičen protein, ki ga omenja Satoh (2002), izoliran iz celomske tekočine *Tripneustes gratilla*, je v podobnem velikostnem razredu (29 kDa), vendar pri proteinu *Sphaerechinus granularis* nismo zasledili od kalcija odvisne hemolitičnosti, kar nakazuje na protein drugačnega tipa; poleg tega pa sta proteina že v osnovi iz drugačnega izvornega materiala (pedicelariji in celomska tekočina).

O podobnosti s proteinom SUL-I, izoliranim iz *Toxopneustes pileolus* (Nakagawa, 1991) bi bilo možno govoriti na podlagi velikosti (32 kDa), vendar pa pri naših poskusih nismo ugotavljali možne specifičnosti za D-galaktozo; poleg tega pa je bil rezultat aglutinacijskega testa negativen, kar odvrta od sklepa, da je protein lektinskega značaja, vendar pa bi bilo za potrditev te domneve potrebnih več poskusov.

Pričakovali bi, da je izoelektrična točka hemolitičnega proteina *Sphaerechinus granularis*, velikostnega razreda 100 kDa, pod 6,55, glede na to, da se je na ionskoizmenjevalni kromatografiji z anionskim izmenjevalcem eluiral za proteinom 30 kDa (izoelektrične točke med 6,55 in 6,85; Slika 9). Po velikosti mu je najbližje 90 kDa velik hemolizin izoliran iz *Strongylocentrotus nudus* (Kuwamura, 1998), vendar je pri tem potrebno ponovno upoštevati, da je izvorni material drugačen (celomska tekočina).

Od proteina, ki ga omenjata Fleming in Howden (1974), izoliranega iz *Tripneustes gratilla* z izoelektrično točko med 5,0-5,1 in velikosti 78 kDa, je omenjeni hemolizin iz *Sphaerechinus granularis* precej večji.

SDS elektroforeza (Slika 9, Preglednica 9) kaže prisotnost proteina v velikostnem razredu okrog 67 kDa kislega značaja, saj se je vezal na anionsko kolono ter se iz nje začel spirati, ko je gradient 1M NaCl dosegel 50%. Ta 67 kDa velik protein *Sphaerechinus granularis* bi bil lahko tako po kislosti in velikosti blizu proteinu, ki ga sta ga dobila Fleming in Howden (1974).

Proteine *Sphaerechinus granularis*, velikostnega ranga 15 kDa, bi lahko primerjali s kontraktnom A, velikosti 17,7 kDa izoliranega iz *Toxopneustes pileolus* (Nakagawa, 1991), vendar pa testa vpliva na krčenje mišic nismo izvedli.

Ob primerjavi elucijskih diagramov ionskoizmenjevalnih kromatografij v različnih pufrih (Slika 9 in 12), lahko vidimo vpliv mobilne faze na prisotne proteine v vzorcu. Jasno je, da proteini v prisotnosti kislega pufru postanejo bolj bazični in se lažje vežejo na negativno nabit nosilec kationskega izmenjevalca; v prisotnosti bazičnega pufru, pa postanejo bolj kisli in se lažje vežejo na negativno nabite skupine anionskega izmenjevalca. Kljub zgoraj omenjenemu dejstvu, da bi se vzorec v amonacetatnem pufru (pH 5,3) lažje vezal na kationski izmenjevalec, le tega nismo mogli izvesti zaradi tehničnih omejitev v času izvajanja poskusa. Iz Slike 12 lahko vidimo, da so se proteini v prisotnosti kislega pufru (amonacetat, pH 5,3), bolj protonirali, zato so se slabše vezali na anionsko kolono in se iz nje tudi veliko hitreje spirali. Na to nakazujejo tudi nizke proteinske koncentracije frakcij (Preglednica 10), ki smo jih vendarle uspeli zbrati.

*Izolacija proteinov drugega (F2) vrha gelske kromatografije.* Proteini drugega vrha (Slika 6) so po velikosti precej manjši (pod 30 kDa) od proteinov prvega vrha, kar bi bilo, po ločitvi z gelsko kromatografijo, pričakovati.

Proteini so tako kislega kot bazičnega značaja. Na prisotnost bazičnih hemolitičnih proteinov nakazuje hemolitično aktivna frakcija, ki se je sprala iz anionske kolone (Preglednica 11) ter vrh, ki se je spral pred vklopom gradienta, razviden iz Slike 5. Bazični proteini so se vezali na kationski izmenjevalec (Slika 14), venar pa so se hemolitične frakcije sprale že do 22 minute. Prisotnost kislih proteinov vidimo iz Slike 5 in 13, vendar so se hemolitični proteini sprali iz kolone že do 37 frakcije (Slika 13, Preglednica 11). Iz vseh teh podatkov lahko sklepamo, da so hemolitično aktivni proteini ali slabo kislega ali slabo bazičnega značaja in se zato s težavo vežejo na izmenjevalce. Možna rešitev bi bila v izboru skrajnejših pH vrednosti pufrov, kar bi proteine močnejše nabilo in v uporabi izmenjevalcev z visoko afiniteto vezave ali za ločevanje nevtralnih proteinov.

Visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) s kationskim izmenjevalcem, smo izbrali zaradi precej nizkih vsebnosti proteinov v vzorcih, saj je metoda občutljivejša od navadne ionskoizmenjevalne kromatografije, poleg tega pa smo vzorec pred nanosom še ultrafiltrirali.

Ločba proteinov je bila boljša, dobili smo hemolitično aktivne frakcije pri različnih retencijskih časih, ki smo jih zbrali v petih paralelno izvedenih HPLC s kationsko kolono.

Hemolitično aktivne frakcije pri podobnih retencijskih časih smo združili (Preglednica 12), saj smo predvidevali, da vsebujejo podobne oziroma enake komponente ter izvedli reverznofazno kromatografijo združenih frakcij. Dobljeni rezultati reverznofazne kromatografije so bili za nadaljnje delo neuporabni zaradi prenizkih koncentracij proteina v vzorcih (Slika 15).

Ultrafiltracija vzorcev izvedena pred reverznofazno kromatografijo bi bila sicer smiselna, vendar pa smo imeli v našem primeru premalo razpoložljivega materiala, da bi se to izplačalo.

V nadaljevanju smo prav zaradi majhnih količin materiala združili po več združenih frakcij v še bolj grobo združene frakcije, jih ultrafiltrirali in izvedli SDS elektroforezo s srebrom in Coomassie modrim, vendar so bili rezultati ponovno negativni, verjetno zaradi prenizkih koncentracij proteina v vzorcih.

#### 4. 2. SKLEPI

Z diplomsko nalogo prvič omenjamo prisotnost hemolitično aktivnih snovi v pedicelarnem ekstraktu morskega ježka *Sphaerechinus granularis*. Pedicelarni ekstrakt vsebuje tako bazične kot kisle proteine velikostnih razredov od manj kot 14,4 kDa do več kot 94 kDa. Z gelsko kromatografijo s Sephadex G-50 se homogenat loči v dva različna vrhova.

Pri ionskoizmenjevalni kromatografiji z anionskim izmenjevalcem (Econo High Q) se hemolitično aktivne snovi prvega vrha F1 (po gelski kromatografiji) sperejo že, ko gradient doseže 20 % 1mM NaCl (Slika 9), drugega F2 pa, ko gradient doseže 50 % 1mM NaCl (Slika 13), kar nakazuje na njihov slabo anionski značaj.

Iz prvega vrha po gelski kromatografiji smo uspeli delno izolirati dva proteina; prvega, velikostnega ranga 30 kDa, ki se z reverznofazno kromatografijo spira okoli 30 minute, z izoelektrično točko 6,55-6,85 ter drugega v velikostnem razredu 100 kDa. Glede na rezultate SDS elektroforeze so v vzorcu prisotni še drugi proteini velikostnih razredov 15 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa in 67 kDa.

Izolacija proteinov drugega vrha (F2) po gelski kromatografiji je bila težavnejša, zaradi nizkih proteinskih koncentracij. Proteinski vrh je vseboval molekule precej manjše od 14,4 kDa in velike do 30 kDa, ki so verjetno tako kislega kot bazičnega značaja. Kljub nizkim koncentracijam proteina v frakcijah (0,002-0,116 mg/ml) po HPLC s kationsko kolono smo dobili hemolitično aktivne frakcije, eluirane pri retencijskih časih med 2,50 in 21,97 min, katerih velikosti nismo uspeli določiti.

V nadaljevanju izolacije hemolizinov iz pedicelarnega ekstrakta *Sphaerechinus granularis* na podoben način, bi bilo smiselno pri homogenizaciji uporabiti več izhodnega materiala; uporabljati pufre s skrajnejšimi pH vrednostmi in visoko afinitetne izmenjevalce; vzorce med izolacijo, kadar je le možno, utrafiltrirati; pri meritvah hemolitičnosti vzorce čim manj razredčiti (mikročitalec) in podaljšati čas meritve. Izolacijo pa bi bilo zanimivo izvesti tudi drugače, in sicer tako, da bi zasledovali prisotnost saponinov ali lektinov.

## 5. VIRI

1. BASLOW, M. H.: (1969) A Study of Toxins and Other Biologically Active Substances of Marine Origin. Ph.D. Marine Pharmacology, The Williams and Wilkins CO., Baltimore
2. BAVINGTON, C. D., s sod.: (2004) Anti-adhesive Glycoproteins in Echinoderm Mucus Secretions. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 139, 607-617
3. COMIN, M. J. s sod.: (1999) Evaluation of the Antiviral Activity of Natural Sulfated Polyhydroxysteroids and their Synthetic Derivates and Analogs. Steroids. Vol. 64, 5, 335-340
4. CROFT, J. A. and HOWDEN, M. E. H.: (1974) Isolation and Partial Characterization of Steroidal Saponin from the Starfish *Patriella calcar*. Comp.Biochem.Physiol. Vol. 48B, 535-543
5. DUBOIS, P. in AMEYE, L.: (2001) Regeneration of Spines and Pedicellariae in Echinoderms: A Review. Microscopy Research and Technique 55: 427-437
6. FONTAINE, A. R. (1964) The Integumentary Mucous Secretions of the Ophiuroid *Ophiocomina nigra*. J.mar.Biol.Assoc.U.K. 44, 145-162
7. FUJISAWA, T. s sod.: (1997) Small-angle X-ray Scattering Study on CEL-III, a Hemolytic Lectin from Holothuroidea *Cucumaria echinata*, and its Oligomer Induced by the Binding of Specific Carbohydrate. FEBS Letters 414, 79-83
8. GUPTA, K. C. in SCHEUER, P. J.: (1968) Echinoderm Sterols. Tetrahedron. Vol. 24, 17, 5831-5837
9. HASHIMOTO, Y. in YASUMOTO, T.: (1960) Confirmation of Saponin as a Toxic Principle of Starfish. Bull.Jpn.Soc.scient.Fish. Vol. 26, No. 11, 1132-1138
10. HENRI, V. in KAYALOF, E.: (1906) Etude des toxines contenues dans les pédicellaires chez les Oursins. C.R. Soc. Biol. 60, 884
11. IORIZZI, M. s sod.: (2001) Steroidal Oligoglycosides from the Asteroidea. Current Organic Chemistry. 5, 951-973,
12. KENNEDY, J. F. s sod.: (1995) Lectins, Versatile Proteins of Recognition: A Review. Carbohydrate Polymers 26, 219-230

13. KIMURA, A., s sod.: (1975) Studies of Urchin-toxins: Separation, Purification and Pharmacological Actions of Toxic Substances. *Jpn. J. Pharmacol.* 25, 109
14. KUWAMURA, J. s sod.: (1998) D1, Analysis of Hemolytic Function of Hemolysin by Monoclonal Antibody in the Sea Urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Developmental & Comparative Immunology*, Vol. 22, 1, 135
15. LAVADO, R. s sod.: (2006) Steroid Levels in Crinoid Echinoderms are Altered by Exposure to Model Endocrine Disruptors. *Steroids*. Vol. 71, 6, 489-497
16. LEVINA, E. V. s sod.: (1996) Ophiuroid-type Steroids in Starfish of the Genus *Pteraster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 114, 1, 49-52
17. MACKE, A. M.: (1968) Avoidance Reactions of the Mollusc *Buccinum undatum* to Saponin-like Surface-active Substances in Extracts of the Starfish *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 26, 415-428
18. MACKE, A. M. in TURNER, A. B.: (1970) Partial Characterization of a Biologically Active Steroid Glycoside Isolated from the Starfish *Marthasterias glacialis*. *Biochem. J.*, 117, 543-550
19. MATSUOKA, N.: (1993) Biochemical Systematics of Echinoderms. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 21, No. 1, 93-94
20. MATSUOKA, N.: (1985) Biochemical Phylogeny of the Sea-urchins of the Family Toxopneustidae. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 80B, No. 4, 767-771
21. NAKAGAWA, H.: (1991) Purification and Characterisation of Contractin A from the Pedicellarial Venom of Sea Urchin, *Toxopneustes pileolus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 284, 279-284
22. NAKAGAWA, H. s sod.: (1996) Isolation of a Novel Lectin from the Globiferous Pedicellariae of the Sea Urchin *Toxopneustes pileolus*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 391, 213-223
23. NAKAGAWA, H. s sod.: (1999) Biochemical and Physiological Properties of Pedicellarial Lectins from the Toxopneustid Sea Urchins. *J. Natural Toxins*, 8, 297-308
24. NAKAGAWA, H. s sod.: (2003) Recent Studies on the Pathological Effects of Purified Sea Urchin Toxins. *J. Toxicol.-Toxin Reviews* 22: 633-649,

25. O'CONNELL, M. G.: (1971) Fine Structure of Venom Gland Cells in Globiferous Pedicellariae from Sea Urchins. Thesis, Cal. State Coll., Long Beach
26. OWELLEN, R. J. s sod.: (1973) Cytolytic Saponin Fraction from *Asterias vulgaris*. *Toxicon*. Vol.11, 319-323
27. PERES, J. M.: (1950) Recherches sur les pedicellaires glandulaires de *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Arch. Zool. Exp. Gen.* 86: 118,
28. RIO, G. J. s sod.: (1965) Echinoderm Toxins I. Some Biochemical and Physiological Properties of Toxins from Several Species of Asteroidea. *Toxicon*, Vol. 3, 147-155
29. RUGGERI, G. D.: (1965) Echinoderm toxins II. Animalizing Action in Sea Urchin Development. *Toxicon*, Vol. 3, 157-162
30. RUGGERI, G. D. in NIGRELLI, R. F.: (1964) Effects of Extracts of the Red Web Starfish, *Patiria miniata*, on Sea Urchin Eggs. *Am.Zool.* 4, 431
31. RUPERT, E. E. in BARNES, R. D.: (1994) *Invertebrate Zoology*. 6<sup>th</sup> edition, Saunders College Publishing, 920-983
32. RUSSELL, F. E. and NAGABHUSHANAM R.: (1996) *The Venomous and Poisonous Marine Invertebrates of the Indian Ocean*. Oxford & IBH Publishing, New Dehli,
33. RUSSELL, F. E.: (1971) Pharmacology of Toxins of Marine Organisms. Part III. *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. Section 71, Vol. II. Pergamon Press, Great Britain,
34. SATOH, F. s sod.: (2002) Fishing for Bioactive Substances from Scorpionfish and Some Sea Urchins. *J.Nat.Toxins*, Vol. 11, No.4, 297-304
35. SHIOMI, K., s sod.: (2004) Plancitoxins, Lethal Factors from the Crown-of-thorns Starfish *Acanthaster planci*, are Deoxyribonucleases II. *Toxicon* 44, 499-506
36. SILCHENKO, A. S., s sod.: (2005) Holothurins B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> and B<sub>4</sub>. New Triterpene Glycosides from Mediterranean Sea Cucumbers of the Genus *Holothuria*. *J. Nat. Prod.*, 68 (4), 564-567
37. SNOWDEN, A. M., in VASTA, G. R. (1994) A Dimeric Lectin from Coelomic Fluid of the Starfish *Oreaster reticulatus* Cross-React with the Sea Urchin Embryonic Substrate Adhesion Protein, Echinonectin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 712 (1), 327-329

38. SPARG, S. G., s sod.: (2004) Biological Activities and Distribution of Plant Saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 219-243
39. TORTONESE, E.: (1965) *Fauna d'Italia ECHINODERMATA*. Edizioni Calderini, Bologna.
40. VOET, D. in VOET, J. (1995) *Biochemistry*. 2. izdaja. New York, John Wiley&Sons, Inc.



## ZAHVALA

Zahvaljujem se:

mentorju prof.dr.Tomu Turku, da mi je omogočil delo diplomske naloge in gospe Ireni Pavešić za vodstvo in pomoč pri laboratorijskem delu ter Katji, Mojci in Andreju za namige in usmerjanje po laboratorijih;

prof.dr. Tinetu Valentinčiču za izposojno knjige Fauna d'Italia ECHINODERMATA;

gospodu Dubois Philippe, da mi je prijazno posredoval svoj članek Regeneration of Spines and Pedicellariae in Echinoderms, objavljen 2001 v Microscopy Research and Technique 55: 427-437;

gospodu Dr. Matthias Stehr-u za zanimive proteinske razprave;

gospodu Dr. Kurt-u E.J. Dittmar-ju za spodbudo in odpiranje kritičnega očesa;

gospe Josefin Draheim in Danielu za izposojno knjig iz knjižnice v Braunschweigu;

staršem, Vesni, Majdi, Taquiju in ostalim prijateljem za podporo in nasmeh.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Saša KOŽELJ

**IZOLACIJA HEMOLITIČNO AKTIVNIH SNOVI IZ  
PEDICELARIJEV PEGASTEGA MORSKEGA JEŽKA  
*Sphaerechinus granularis* (Lamarck)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007