

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maruša NOVAK

**HEMOLITIČNE UČINKOVINE V EKSTRAKTU PLESNI
*ASPERGILLUS FUMIGATUS***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**HEMOLYTIC COMPOUNDS IN THE EXTRACT OF THE MOULD
*ASPERGILLUS FUMIGATUS***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter v Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco. Del raziskav je bil opravljen tudi na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti Instituta Jožef Stefan ter na Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorja prof. dr. Roberta Frangeža in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

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. Robert Frangež
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Član: prof. dr. Tom Turk
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 11.06.2009

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.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maruša Novak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.1:582.282(043.2)=163.6
KG	<i>Aspergillus fumigatus</i> / Asp-hemolizin / izolacija / hemoliza / egerolizinski proteini / toksičnost
AV	NOVAK, Maruša
SA	SEPČIČ, Kristina (mentor) / FRANGEŽ, Robert (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2009
IN	HEMOLITIČNE UČINKOVINE V EKSTRAKTU PLESNI <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 52 str., 3 pregl., 19 sl., 0 pril., 59 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Gliva <i>Aspergillus fumigatus</i> je oportunistični patogen, ki pri živalih in ljudeh povzroča razna huda obolenja. Ključno vlogo pri nastanku in razvoju bolezni imajo različne biološko aktivne molekule. Ena izmed teh molekul je tudi Asp-hemolizin. Boljše poznavanje lastnosti tega toksina bi nam lahko ponudilo različne možnosti njegove uporabe: kot tarče za izdelavo novih zdravil in cepiv, kot specifičen označevalec za s holesterolom bogate membranske domene ali kot orodje za proučevanje strukturnih in funkcionalnih lastnosti bioloških membran. V tej nalogi smo skušali izolirati Asp-hemolizin, hemolitično učinkovino plesni <i>A. fumigatus</i> , v aktivni ali neaktivni obliki ter ovrednotiti vpliv povečane koncentracije soli v rastnem mediju na proizvodnjo same učinkovine in ostalih proteinov. Z meritvami hemolitične aktivnosti gojišča in ekstrakta micelija ter poskusi na poskusnih živalih smo preverjali prisotnost aktivne oblike hemolitične učinkovine v gojišču ali ekstraktu micelija. Z NaDS-elektroforezo, določitevijo aminokislinskega zaporedja po izolaciji proteina, navzkrižno reaktivnostjo učinkovin ekstrakta s protitelesi za ostreolizin in vezavo izoliranega proteina na lipidne vezikle iz palmitoiloleoilfosfatidilholina (POPC) ter sfingomielina in holesterola smo preverjali prisotnost neaktivne oblike proteina v ekstraktu glivnega micelija. Izolacija katerekoli izmed obeh oblik hemolitične učinkovine ni bila uspešna, saj gliva med gojenjem ni proizvajala iskane učinkovine. Gojenje glive v normalnih razmerah in v razmerah s povečano slanostjo je razkrilo, da povišana koncentracija soli zavira sintezo proteinov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 577.1:582.282(043.2)=163.6
- CX *Aspergillus fumigatus* / Asp-hemolysin / isolation / hemolysis / aegerolysin-like proteins / toxicity
- AU NOVAK, Maruša
- AA SEPČIČ, Kristina (supervisor) / FRANGEŽ, Robert (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI HEMOLYTIC COMPOUNDS IN THE EXTRACT OF THE MOULD
ASPERGILLUS FUMIGATUS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 52 p., 3 tab., 19 fig., 0 ann., 59 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic pathogenic fungus that causes severe infections in animals and humans. Crucial for the start and progress of the infection is the production of biologically active molecules. Asp-hemolysin is one of these molecules. Better knowledge of its characteristics would give us a chance to use this toxin as a target for production of new medicines and vaccines, as a specific marker for cholesterol-rich membrane domains or as a tool to study structural and functional characteristics of biological membranes. In this graduation thesis, we tried to isolate Asp-hemolysin, a hemolytic compound of the mould *Aspergillus fumigatus*, in its active or inactive form. We also tried to evaluate the effect of increased concentration of salt in the growth medium on the production of the hemolytic compound and other proteins. By measuring the hemolytic activity of the growth medium and the mycelial extract, and with the experiments *in vivo*, we searched for the presence of active form of the hemolytic compound in the growth medium or in the mycelial extract. By NaDS-electrophoresis, determination of amino acid sequence after isolation of the protein, cross-reactivity of the compounds in the mycelial extract with antibodies for ostreolysin and binding of isolated protein to lipid vesicles from palmitoylcholine (POPC) and sphingomyelin-cholesterol, we searched for the presence of inactive form of the hemolytic compound in the mycelial extract. We did not manage to isolate neither active nor inactive form of the hemolytic compound, because the fungus had not produced it during its growth. Growth of the mould in normal conditions and in conditions with increased salt concentration revealed that increased salt concentration had inhibitory effect on protein synthesis.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKEGA DELA IN HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIVE	3
2.1.1 Delitev gliv	4
2.1.2 Patogene glive	5
2.2 <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	5
2.2.1 Na splošno o glivi <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
2.2.2 Virulentni dejavniki glive <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
2.2.3 Bolezni, ki jih povzroča <i>Aspergillus fumigatus</i>	8
2.3 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV	10
2.3.1 Asp-hemolizin	11
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 MATERIAL	15
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	15
3.1.2 Rastopine	16
3.1.3 Laboratorijska oprema	16
3.1.4 Gojišča	17
3.1.5 Glivni sevi in izolati	17
3.2 METODE	18
3.2.1 Gojenje plesni <i>Aspergillus fumigatus</i> in ugotavljanje hemolitične aktivnosti	18
3.2.1.1 Gojenje	18
3.2.1.2 Odvzem vzorcev in časovno izražanje hemolitične učinkovine	18
3.2.1.3 Merjenje hemolitične aktivnosti	18
3.2.2 Poskus izolacije hemolitične učinkovine	19
3.2.2.1 Izolacija hemolitične učinkovine	19

3.2.2.2	NaDS elektroforeza	20
3.2.2.3	Določanje koncentracije proteinov	20
3.2.3	Določitev aminokislinskega zaporedja	20
3.2.3.1	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC)	20
3.2.3.2	Določitev aminokislinskega zaporedja	21
3.2.4	Prenos western	21
3.2.5	Ugotavljanje vezave hemolitične učinkovine na lipidne vezikle	22
3.2.5.1	Priprava lipidnih veziklov	22
3.2.5.2	Površinska plazmonska resonanca (SPR)	23
3.2.6	Poskusi <i>in vivo</i>	26
3.2.6.1	Priprava ekstrakta glivnega micelija	26
3.2.6.2	Anestezija poskusnih živali	26
3.2.6.3	Vnos ekstraktov in spremljanje arterijskega krvnega tlaka, delovanja srca in dihanja	26
3.2.6.4	Analiza krvi	27
4	REZULTATI	28
4.1	GOJENJE	28
4.1.1	Časovno izražanje hemolitične učinkovine	28
4.1.2	pH gojišča med gojenjem	29
4.2	VPLIV PH-VREDNOSTI VZORCEV NA HEMOLITIČNO AKTIVNOST IN DRUGI BIOKEMIJSKI TESTI	30
4.3	POSKUSI <i>IN VIVO</i>	32
4.3.1	Vpliv učinkovin glivnega ekstrakta na arterijski krvni tlak, EKG in dihanje	32
4.3.2	Analiza krvi	32
4.4	POSKUS IZOLACIJE HEMOLITIČNE UČINKOVINE	34
4.5	DOLOČITEV AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA	36
4.5.1	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC)	36
4.5.2	Določitev aminokislinskega zaporedja	37
4.6	PRENOS WESTERN	38
4.7	VEZAVA HEMOLITIČNE UČINKOVINE NA LIPIDNE VEZIKLE	38
4.7.1	Vezava na lipidne vezikle iz sfingomielina in holesterola (SM in Hol)	38
4.7.2	Vezava na lipidne vezikle iz POPC	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	41
6	POVZETEK (SUMMARY)	45
6.1	POVZETEK	45
6.2	SUMMARY	47

7	VIRI	49
7.1	CITIRANI VIRI	49
7.2	DRUGI VIRI	52

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Podobnost aminokislinskega zaporedja prekursorja Asp-hemolizina z zaporedji predstavnikov egerolizinske družine proteinov	12
Preglednica 2: Vpliv fiziološke raztopine ter ekstrakta micelija na nekatere elektrolite v krvi in hematokrit	32
Preglednica 3: Količina proteinov na različnih stopnjah izolacije	35

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Konidiofori glive <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
Slika 2: Virulentni dejavniki glive <i>A. fumigatus</i>	7
Slika 3: Podobnost aminokislinskega zaporedja Asp-hemolizina z aminokislinskimi zaporedji nekaterih predstavnikov egerolizinske družine proteinov	13
Slika 4: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje prekursorja Asp-hemolizina	14
Slika 5: Tehnologija Biacore: senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem	24
Slika 6: Potek poskusov ugotavljanja vezave hemolitične učinkovine na lipidne vezikle	25
Slika 7: Tekoče gojišče YNB z glivnim micelijem po petnajstih dnevih gojenja	28
Slika 8: Časovno izražanje hemolitične učinkovine	29
Slika 9: Spreminjanje pH gojišča med gojenjem	29
Slika 10: Vpliv pH-vrednosti vzorcev (gojišče brez dodane soli) na hemolizo	30
Slika 11: Časovno spreminjanje hemolize pri različnih vzorcih	31
Slika 12: Vpliv učinkovin ekstrakta glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo, na dihanje, arterijski krvni tlak in EKG anesteziranih podgan	33
Slika 13: Analiza ekstraktov micelija z NaDS elektroforezo	34
Slika 14: Elucijski diagram frakcij po gelski kromatografiji na gelu Sephadex G-50	35
Slika 15: RP-HPLC	36
Slika 16: Rezultati določanja aminokislinskega zaporedja	37
Slika 17: Prenos western	38
Slika 18: Vezava ostreolizina in učinkovine iz vzorca glive <i>Aspergillus fumigatus</i> na lipidne vezikle iz SM in Hol ter delež vezave	39
Slika 19: Vezava ostreolizina in učinkovine iz vzorca glive <i>Aspergillus fumigatus</i> na lipidne vezikle iz POPC ter delež vezave	40

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

aKT	arterijski krvni tlak
BSA	goveji serumski albumin
DV	dihalna aktivnost
EDTA	etilendiamintetraacetat
EKG	elektrokardiogram
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HA	hemolitična aktivnost
Hol	holesterol
HCl	klorovodikova kislina
IA	invazivna aspergiloza
IgG-HRP	imunoglobulin G označen s hrenovo peroksidazo
LUV	veliki unilamelarni vezikli
MLV	multilamelarni vezikli
NaCl	natrijev klorid
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaOH	natrijev hidroksid
Na ₂ HPO ₄	dinatrijev hidrogenfosfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	amonijev sulfat
Oly	ostreolizin
ox-LDL	oksidirani lipoproteini majhne gostote
POPC	palmitoiloleoilfosfatidilholin
PVDF	polivinildifluorid
RP-HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo
RU	resonančne enote
SM	sfingomielin
SPR	površinska plazmonska resonanca
SSS	raztopina za suspendiranje spor (ang. spore suspension solution)
TFA	trifluoroacetna kislina
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan-vodikovklorid
YNB	ang. Yeast Nitrogen Base (gojišče za kvasovke)

1 UVOD

Gliva *Aspergillus fumigatus* je oportunistično patogena plesen, ki pri ljudeh in živalih povzroča razna huda obolenja. Najtežja oblika obolenja je invazivna aspergiloza, ki je eden izmed glavnih vzrokov smrtnosti pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom (Latgé, 1999). Konidiji, ki jih proizvaja gliva in služijo nesplošnemu razmnoževanju, se sproščajo v zrak. Z vdihavanjem lahko zaradi svoje majhnosti zaidejo vse do pljučnih alveol. Bolezen se tako razvije v pljučih, pri najbolj dovzetnih pa se lahko okužba razširi tudi na druge organe, kot npr. ledvice, srce ali možgane. Ključno vlogo pri nastanku in razvoju bolezni imajo različne biološko aktivne molekule, katerih učinki na celice so lahko sinergistični in/ali aditivni (Rementeria in sod., 2005). Edini opisan membransko aktiven protein med njimi je Asp-hemolizin, ki spada v večjo egerolizinsko družino homolognih proteinov iz bakterij, gliv, rastlin in virusa (Berne in sod., 2005). Njegova vloga pri patogenezi glive je zaenkrat slabo znana, z boljšim poznavanjem pa bi nam toksin lahko služil kot tarča za izdelavo zdravil, cepiv in/ali specifičnih načinov zdravljenj okužb z glivo *A. fumigatus* (Rementeria in sod., 2005).

Nekateri predstavniki egerolizinov se specifično vežejo na s holesterolom bogate membranske domene (lipidne rafte) in so zato potencialno uporabni kot njihovi označevalci ali kot orodja pri proučevanju strukturnih in funkcionalnih lastnosti bioloških membran (Chowdhury in sod., 2008). Kot član egerolizinske družine proteinov bi za te namene lahko uporabili tudi Asp-hemolizin.

Predstavnike rodu *Aspergillus*, vključno z *A. fumigatus*, so izolirali iz ekstremno slanik okolij (soline), kakor tudi iz konzervirane (soljene) hrane, ki lahko vsebuje njihove toksične izločke. Preliminarni poskusi so pokazali, da se hemolitična aktivnost ekstraktov micelija glive *A. fumigatus* močno poveča, če ga gojimo v razmerah s povečano slanostjo. Z raziskovanjem v tej smeri bi lahko prišli do ugotovitev, ki bi nam pomagale oceniti stopnjo tveganja pri uživanju s soljo konzerviranih prehrabnih izdelkov.

1.1 CILJI DIPLOMSKEGA DELA IN HIPOTEZE

Glivo *Aspergillus fumigatus* smo gojili na tekočih gojiščih YNB brez dodane soli in z dodano soljo, da bi ovrednotili vpliv povečane koncentracije soli na izražanje hemolitične učinkovine. Iz ekstrakta plesni smo želeli izolirati hemolitično aktivno učinkovino (Asp-hemolizin) po ustaljeni proceduri (Sakaguchi in sod., 1975). Pripravili smo tudi lipidne vezikle, ki so bili po svoji zgradbi podobni s holesterolom bogatim membranam. S temi vezikli smo želeli preveriti ali se hemolitična učinkovina veže na s holesterolom bogate membrane ter kakšna sta jakost in delež vezave hemolitične učinkovine na te membrane. Za konec smo opravili še poskuse *in vivo*, da bi ovrednotili vpliv učinkovin iz ekstrakta na arterijski krvni tlak, EKG in dihanje poskusnih živali ter s tem toksičnost učinkovin zanje.

Predpostavili smo, da bomo uspešno izolirali hemolitičen protein Asp-hemolizin. Količina proteina pa bo večja v primeru ekstrakcije iz micelija, ki je rasel v pogojih s povečano slanostjo. Predvideli smo tudi, da se bo izolirana hemolitična učinkovina, tako kot nekateri drugi člani egerolizinske družine proteinov, vezala na s holesterolom bogate membranske domene, ter da bo vplivala na arterijski krvni tlak, EKG in dihanje poskusnih živali, s čimer bomo dokazali njeno toksičnost zanje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE

Glive so heterotrofni, evkariontski organizmi, ki spadajo v samostojno kraljestvo gliv (Fungi). Večina je pritrjenih (izjema je deblo Chytridiomycota). V naravi jih najpogosteje najdemo kot prostoživeče saprofite (njihova hrana so odmrle organske snovi), lahko pa so tudi zajedalci ali simbionti. Prisotne so v skoraj vseh ekoloških nišah. Najbolje uspevajo v vlažnih okoljih in pri temperaturah od 15-35°C. Telo glive je preprosto zgrajeno, ni diferencirano v tkiva in organe, ampak so si celice celotnega organizma med seboj zelo podobne. Telo takšne zgradbe imenujemo steljka (talus). Steljka je redko enocelična ali enojedrna. Pri večini vrst je mnogojedrna ali pa mnogocelična v obliki dolgih nitk – glivnih hif. Preplet hif tvori podgobje (micelij) [Podobnik in Devetak, 2000].

Celice obdaja celična stena iz hitina in β -glukanov. Prisotnost hitina v celični steni in shranjevanje glikogena kot zaloge energije, kaže na evlucijsko sorodnost z živalmi (Boedijn, 1978). Membrana glivnih celic vsebuje poseben sterol – ergosterol, ki ima podobno vlogo kot holesterol v živalskih celicah. V citoplazmi hif najdemo jedra, mitohondrije, ribosome, Golgijeve cisterne in vezikle, vse skupaj pa podpira omrežje mikrotubulov in endoplazemski retikel.

Življenjski cikel glive je sestavljen iz telomornega stadija (oblika glive s spolnim razmnoževanjem) in anamornega stadija (oblika glive z nespolnim razmnoževanjem). V skupino *Deuteromycetes* (Fungi imperfecti – nepopolne glive) pa uvršamo glive, pri katerih v njihovem življenjskem krogu ne poznamo spolne oblike.

Glive so pomembne kot razkrojevalci odmrlih organskih snovi, s čimer sodelujejo pri kroženju snovi v ekosistemih. Sposobne so razgraditi celulozo in lignin. Nekatere proizvajajo antibiotike, ki zavirajo ali preprečujejo rast nekaterih vrst bakterij, ali imunosupresive (ciklosporine). V živilski industriji se uporabljajo pri procesiranju hrane (v pekarnah, pivovarnah, pri pridelavi sirov), kot dodatek jedem ali kot samostojno živilo. Nekatere glive proizvajajo sekundarne metabolite, ki so lahko zelo strupeni in celo karcinogeni (aflatoksini), poleg tega pa lahko glive povzročajo tudi številna težko ozdravljiva obolenja (mikoze) pri rastlinah, živalih in ljudeh (Podobnik in Devetak, 2000). Nekatere vrste gliv izrabljamo kot modelne organizme za preučevanje osnovnih procesov v genetiki, fiziologiji, biokemiji in molekularni biologiji (Taylor in sod., 1993).

2.1.1 Delitev gliv

Glive razdelimo v tri glavne skupine: **plesni**, **kvasovke** in **prave glive**.

Plesni so filamentozne glive. V naravi so močno razširjene. Posamezen filament imenujemo hifa. Hife so lahko septirane ali neseptirane. So močno razvejane, preraščajo površje in se med seboj prepletajo ter oblikujejo kompaktne skupke, ki jim pravimo micelij. Iz micelija lahko v zrak izraščajo posamezne veje hif – zračne hife ali konidiofori, na katerih nastajajo spore ali konidiji. S konidiji (nespolne spore – za nastanek ni potrebna združitev gamet) poteka nespolno razmnoževanje. Pogosto so pigmentirani (črn, modrozelen, rdeč, rumen ali rjav pigment) in odporni na izsuševanje. Nekatere plesni se razmnožujejo tudi spolno. Spore tu nastanejo z zlitjem enoceličnih gamet ali z zlitjem posebnih hif – gametangijev. Spore lahko pri spolnem razmnoževanju nastanejo tudi po zlitju dveh haploidnih celic, ki tvorita diploidno celico, le-ta se nato mejotsko deli ter daje posamezne haploidne spore. Glede na skupino gliv, ločimo več tipov spolnih spor:

- **citridiospore** se razvijejo po združitvi dveh gibljivih, običkanih gamet (deblo Chytridiomycota)
- **zigospore** se razvijejo iz zigote, ki nastane z zlitjem haploidnih hif dveh različnih organizmov (deblo Zygomycota – glive jarmovke),
- **askospore** nastajajo endogeno, v zaprtih strukturah imenovanih aski (deblo Ascomycota - zaprtotrosnice) in
- **bazidiospore** nastajajo eksogeno, na koncu kijasto oblikovanih struktur imenovanih bazidiji (deblo Basidiomycota - prostotrosnice).

Spolne spore gliv so odporne na izsuševanje, segrevanje, zmrzovanje in nekatere kemijske snovi. Nespolna ali spolna spora glive lahko kali in se razvije v nove hife in nov micelij.

Prave glive oblikujejo plodišča (t.i. gobo). Večino časa gliva raste v obliki micelija, skrita pod površjem. Ko se pojavijo ugodne okoljske razmere (ponavadi po deževnem in hladnem vremenskem obdobju), se razvijejo nadzemna plodišča. Plodišča proizvajajo spolne spore.

Kvasovke so enocelične glive. Večina spada v deblo Ascomycota (zaprtotrosnice). Celice so okrogle, ovalne ali cilindrične. Razmnožujejo se nespolno s cepitvijo ali brstenjem. Čeprav se jih večina razmnožuje kot posamezne celice, lahko nekatere kvasovke tvorijo tudi filamente. Pri nekaterih poznamo spolno razmnoževanje: dve celici se zlijeta v zigoto, kjer nato nastajajo askospore. Najbolj poznane so kvasovke iz rodu *Saccharomyces* (Madigan in Martinko, 2006).

2.1.2 Patogene glive

Večina gliv je za zdravje človeka neškodljiva, kakšnih 300 vrst pa povzročajo okužbe pri ljudeh. Večino pravih patogenih in oportuno patogenih gliv uvrščamo v deblo Ascomycota, redke oportuno patogene glive pa uvrščamo v deblo Zygomycota. Glive povzročajo bolezni na tri načine:

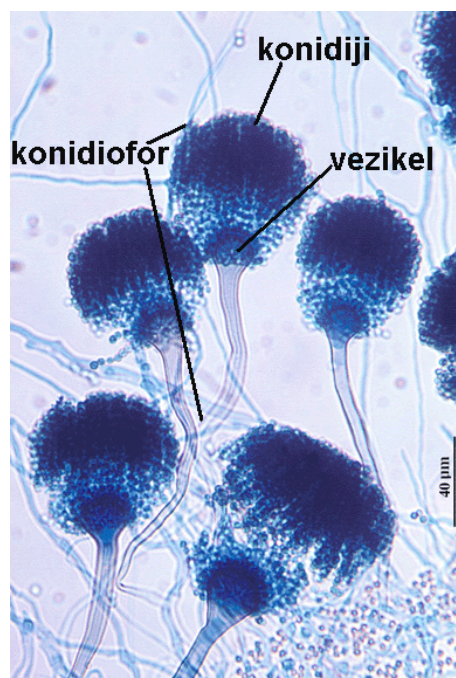
- proizvajajo alergene (specifične glivne antigene), ki ob ponovni izpostavitvi sprožijo alergično reakcijo (npr. *Aspergillus* spp.),
- proizvajajo mikotoksine, glivne eksotoksine (npr. *Aspergillus flavus*), ki povzročajo mikotoksikoze ali
- naselijo različne dele telesa in povzročajo okužbe ali mikoze (rod *Trichophyton*, rod *Microsporum*, *Sporotrix schenckii*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, ipd.).

Mikoze so lahko kožne (kutane), podkožne (subkutane) ali sistemske. Sistemske mikoze so najbolj resna kategorija glivnih okužb. Pri teh okužbah gre za rast glive v notranjih telesnih organih. Okužba je lahko primarna (je posledica prisotnosti patogene glive v drugače zdravem posamezniku) ali sekundarna (gre za okužbe posameznikov z oslabljenim imunskim sistemom, ki je posledica bolezni – AIDS-a, rakastega obolenja, sladkorne bolezni; imunosupresijske terapije; podhranjenosti ali alkoholizma). Glive, ki povzročajo sekundarne okužbe, so znane kot oportunistični patogeni, saj povzročajo resne okužbe le pri posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom, zdravim posameznikom pa niso nevarne (Madigan in Martinko, 2006).

2.2 ASPERGILLUS FUMIGATUS

2.2.1 Na splošno o glivi *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus je saprofitna gliva. Njen naravni habitat so tla in razpadajoči organski ostanki, kjer igra pomembno vlogo pri kroženju ogljika in dušika (Raper in Fennell, 1965). Je zelo razširjena in je oportunističen patogen. Katerikoli sev glive *A. fumigatus*, ki je prisoten v okolju, je potencialen patogen, če naleti na ustreznega gostitelja (Debeauvais in sod., 1997). Gliva ni gostiteljsko specifična. Spada v deblo Ascomycota. Razmnožuje se nespolno s konidiji, leta 2008 pa so O'Gorman in sod. ugotovili, da ima razvit tudi spolni razmnoževalni cikel in se tako lahko razmnožuje tudi spolno. Kolonije so hitro rastoče. Konidiofori so pokončni (slika 1), v obliki nerazvejanega stebela, z apikalno zadebelitvijo (veziklom). Neposredno na veziklu so nameščene fialide (celice, ki proizvajajo spore). Konidiji so zeleno obarvani in imajo premer 2-3 μm . Nanizani so v verižice, ki so nameščene na veziklu. *A. fumigatus* je termofilna vrsta, ki uspeva vse do temperature 55°C, spore pa lahko preživijo tudi temperature do 70°C (Raper in Fennell, 1965). Gliva je morfološko variabilna, kar je vodilo v opis več različnih varietet (*Aspergillus fumigatus* var. *acolumnaris*, *phialiseptus*, ipd.). Morfološke razlike med temi varietetami so zelo majhne (Leslie in sod., 1988; Schmidt in Wolff, 1997).

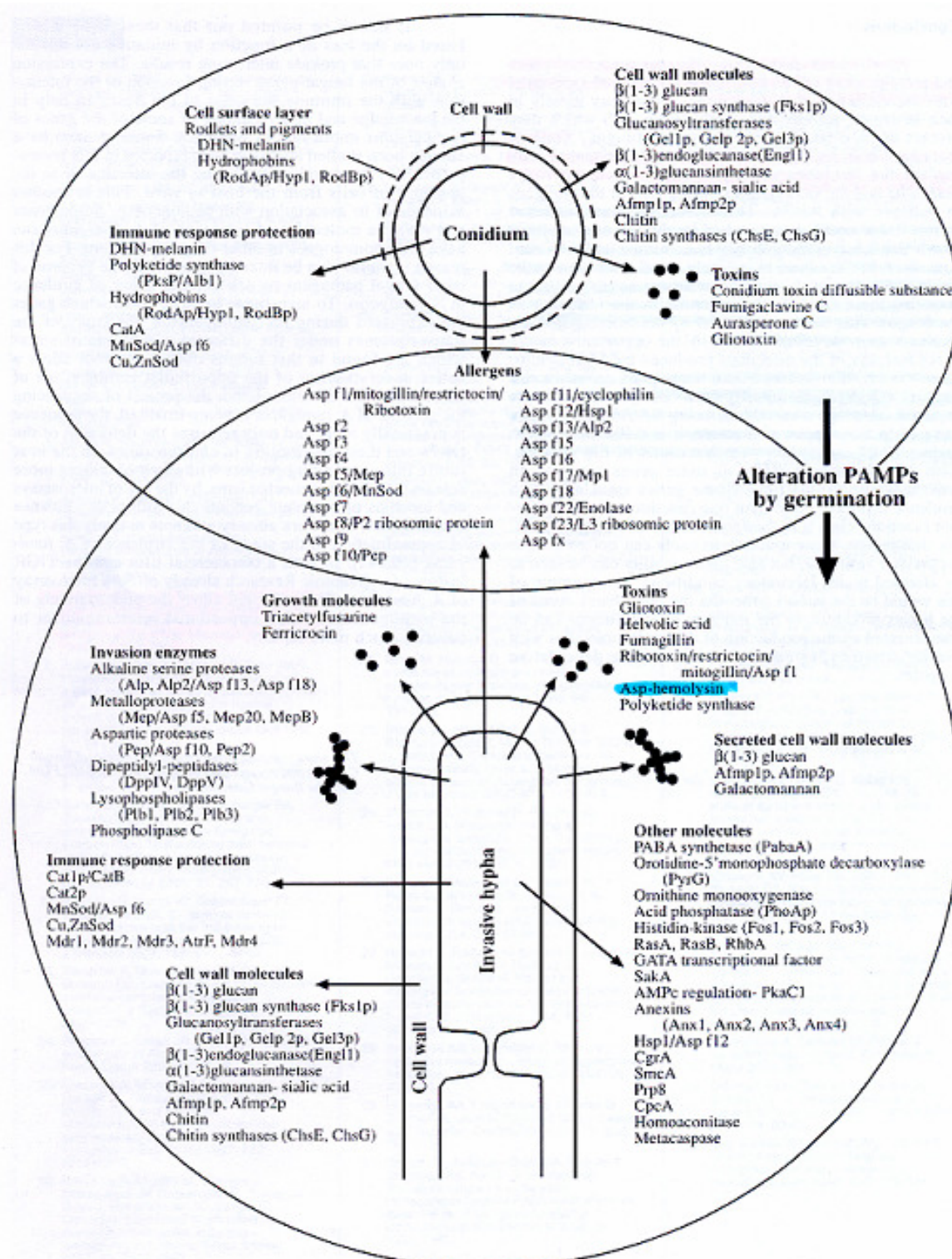


Slika 1: Konidiofori glive *Aspergillus fumigatus* (*Aspergillus fumigatus*, 2009).

2.2.2 Virulentni dejavniki glive *Aspergillus fumigatus*

Pojem virulentni dejavnik naj bi označeval molekule ali gene, katerih odsotnost v organizmu uniči njegovo virulenco, ne prekine pa normalne rasti ali *in vitro* morfogeneze (Latgé, 1999 in 2001). Obstaja veliko genov in proteinov, ki so bili proučeni in povezani z virulenco glive *Aspergillus fumigatus*, a do zdaj še ni bil odkrit tak virulentni dejavnik, katerega odsotnost bi popolnoma zavrla invazivnost in smrtnost te glive. Pomen posameznega virulentnega dejavnika za patogenost glive so ugotavljali s pomočjo mutant, v katerih so eliminirali gen za virulentni dejavnik ali sam virulentni dejavnik. Opazili so le zmanjšanje virulentnosti mutiranega seva ali pa so ugotovili, da proučevana molekula ni nujna za virulentnost glive. To lahko pojasnimo kot odvisnost virulentnosti od več dejavnikov in ne le enega samega, za njeno boljše proučitev pa bi tako rabili multiple mutante (Rementeria in sod., 2005).

Skupine molekul, ki so povezane z virulentnostjo glive *Aspergillus fumigatus* (slika 2), vključujejo različne **komponente celične stene** ($\beta(1-3)$ -glukan, galaktomanan, galaktomanoproteini, ipd.); **komponente, ki ščitijo glivo pred imunskim odzivom gostitelja** (hidrofobina RodAp in RodBp, DHN-melanin, katalaze, peroksidaze, superoksid dismutaze); **toksine** (gliotoksin, fumagilin, Asp-hemolizin, ribotoksin, helvolična kislina, ipd.); **encime** (alkalna serinska proteaza - Alp, metaloproteaza - Mep, fosfolipaza C, fosfolipaza B, ipd.) in **alergene** (Asp f1 do Asp f23). Toksične substance in encimi delujejo na celice aditivno in/ali sinergistično. Zaradi neposrednega učinka na njih, znižujejo možnost za preživetje okuženega organizma (Rementeria in sod., 2005).

Slika 2: Virulentni dejavniki glive *A. fumigatus* (Rementeria in sod., 2005: 17).

Nastanek virulentnih dejavnikov je močno spremenljiv, a ni odvisen od temperature (Latgé, 1995), temveč od drugih parametrov, kot so čas gojenja, razmere, v katerih gojimo kulturo, in od sestave medija. Inkubacijske periode se med različnimi objavami zelo razlikujejo, od enega dneva do petih tednov (Longbottom, 1983; Hearn, 1992), tako da neke standardne inkubacijske periode ni. Visoke koncentracije heksoz v gojišču pripeljejo do zakisanja medija med rastjo, kar tudi močno vpliva na spekter virulentnih dejavnikov. Najbolj kompleksno sestavo virulentnih dejavnikov dobimo, če gojimo glivo v gojišču, ki vsebuje proteinski hidrolizat ali en sam protein, ne vsebuje pa sladkorjev. Sestava takega medija je bližja okolju, ki ga gliva naseljuje v pljučih (Latgé in sod., 1994; Latgé, 1995). Sestava virulentnih dejavnikov, ki jih bomo izolirali iz glive, je odvisna še od tega, iz katerega seva izoliramo (za glivo je značilna velika biodiverziteteta [Debeaupuis in sod., 1997]), od kod izoliramo (iz micelija, spor ali gojišča) in načina izolacije (Latgé in sod., 1994; Latgé, 1995). Poleg tega obstajajo tudi dokazi, da je nastanek virulentnih dejavnikov *in vivo* med kolonizacijo gostiteljskega tkiva drugačen od teh, ki nastajajo v/na gojišču *in vitro* (Sarfati in sod., 1995).

2.2.3 Bolezni, ki jih povzroča *Aspergillus fumigatus*

Za večino bolnikov so mesto vstopa in okužbe z glivo *Aspergillus fumigatus* dihala (Latgé, 1999). Konidiji, ki se sproščajo z glive, gredo v zrak. Z vdihavanjem lahko zaradi svoje majhnosti zaidejo vse do pljučnih alveol. Za imunsko nekompromitirane ljudi inhalacija teh spor nima hujših učinkov, saj se spore slej kot prej odstranijo s pomočjo mehanizmov imunskega sistema, okužbe z glivo pa so pri takih osebah redke. Osebe z oslabljenim imunskim sistemom, kot so ljudje okuženi z virusom HIV, bolniki z levkemijo ali drugimi oblikami raka, ali bolniki, ki so jim presadili organ ali mostni mozeg, pa zaradi oslabiljenosti imunskih mehanizmov ne morajo odstraniti vseh spor. Bolezen se tako razvije v pljučih, pri najbolj dovzetnih pa se lahko razširi na katerikoli organ (Rementeria in sod., 2005). Opisane so bile že okužbe kože, potrebušnice, ledvic, oči, kosti in prebavil (Lortholary in sod., 1995).

Pljučne bolezni, ki jih povzroča *A. fumigatus*, lahko razdelimo glede na mesto razvoja bolezni v dihalih in obseg kolonizacije ali invazije glivnega micelija. Oboje je povezano z imunskim statusom prizadete osebe (Bodey in Vartivarian, 1989). Patogenost glive pa ni odvisna samo od imunskega statusa osebe, temveč tudi od glivnega izolata (Aufauvre-Brown in sod., 1998). Alergijske bolezni, kot so **astma**, **alergični sinusitis** in **alveolitis**, so posledica ponavljajočih izpostavitvev glivnim alergenom, do kolonizacije z glivnim micelijem pa ne pride. V večini primerov se težave prizadetih oseb zmanjšajo, ko niso več izpostavljeni okoljskim virom plesni. Drugače je pri **alergijski bronhopulmonarni aspergilozi**, **aspergilomih** in **invazivni aspergilozi (IA)**. Pri teh boleznih se gliva naseli v telesu, za ozdravitev pa je potrebna terapija z antimikotiki ali kirurška odstranitev micelija (Latgé, 1999).

Konidiji, ki zaidejo v pljučne alveole, se tam pritrdijo na proteine respiratornega epitelijskega tkiva, kar je ključni korak za začetek okužbe. Temu sledi kalitev in invazija hif. Le-te napadejo bronhialne stene, s krvjo pa se lahko gliva raznese tudi v druge telesne organe in jih kolonizira (Rementeria in sod., 2005). Ključno vlogo pri pritrditvi in invaziji glive *A. fumigatus* imajo adhezini (npr. hidrofobini), hidrolaze (npr. metaloproteaze) in toksične molekule (npr. gliotoksin, Asp-hemolizin) [Latgé, 1999].

Alergijska bronhopulmonarna aspergiloza je bolezen, ki jo sproži preobčutljivostna reakcija na alergene, ki jih sprošča *A. fumigatus* po kolonizaciji pljuč. Razvije se pri bolnikih z astmo ali cistično fibrozo (Basica in sod., 1981; Laufer in sod., 1984). Klinično se bolezen izraža kot bronhialna astma, ki lahko vodi do pljučne fibroze in odpovedi dihal, če se bolnika pravilno ne oskrbi (Greenberger in Paterson, 1987). Bolezen je zelo težko diagnosticirati, kar še posebej otežuje zdravljenje (Latgé, 1999).

Aspergilomi so kompaktne kroglice micelija. Na periferiji teh kroglic so sporulirajoče strukture. Do nastanka aspergilomov pride v že prej nastalih pljučnih vdolbinicah, ki so posledica prebolele tuberkuloze, sarkoidoze ali drugih pljučnih bolezni. Podobne okužbe lahko nastanejo tudi v sinusih (Kwon-Chung in Bennett, 1992). Bolezen je velikokrat asimptomatska in se odkrije zaradi kakšne druge pljučne bolezni ali alergije. Najbolj značilen znak take okužbe je prisotnost krvi v izpljunku (Latgé, 1999).

Invazivna aspergiloza (IA) je glavni vzrok smrti pri bolnikih z levkemijo, bolnikih, ki so jim presadili organ (predvsem kostni mozeg), njena številčnost pa narašča tudi pri bolnikih z AIDS-om. Opisane so štiri oblike IA: akutna ali kronična pljučna aspergiloza (najbolj značilna oblika IA), traheobronhitis ali bronhialna bolezen z različno stopnjo invazije sluznice in hrustanca, akutni invazivni rinosinusitis in oblika, kjer se bolezen razširi na druge organe (možgane, srce, kožo, ledvice in oči). Bolezen zelo hitro napreduje. Smrt lahko nastopi že po dveh tednih od začetka bolezni. Znaki in simptomi bolezni, kot so vročina, bolečina v prsih, kašelj, izguba teže in dispneja, so preveč nespecifični za ugotavljanje bolezni. Za diagnosticiranje se tako uporablja detekcija antigenov glive *A. fumigatus* v serumu, mikroskopski dokaz bolezni ali vzgojitev kulture ter pozitiven posnetek narejen z računalniško tomografijo. A kljub tem metodam je diagnosticiranje še vedno težavno in velikokrat prepočasno, število smrtnih primerov pa je veliko (več kot 50-odstotna smrtnost) [Latgé, 1999].

Do nedavnega je *A. fumigatus* veljal za nepomemben patogen, odgovoren predvsem za alergije pri ljudeh, ki so bili sporam v večjih količinah izpostavljeni vsakodnevno, in aspergilome, porast glive na površini pljuč pri osebah, ki so prebolele tuberkulozo (Pennington, 1988). Šele v zadnjih dvajsetih letih je ta gliva postala eden najpogostejših

povzročitelj oportunističnih glivnih okužb v razvitih državah, zlasti pri osebah z oslabljenim imunskim sistem (Dixon in sod., 1996). Okužba z glivo *A. fumigatus* je pereč problem predvsem v bolnišničnem okolju. Eden izmed glavnih razlogov za porast okužb z glivo *A. fumigatus* v razvitih državah sta vedno večje število imunsko oslabljenih bolnikov, za kar je delno kriva tudi pogostejša uporaba imunosupresivnih terapij v zdravstvu (Latgé, 1999).

2.3 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV

Proteine s podobno primarno zgradbo združujemo v družine, da lahko bolje razumemo njihovo delovanje, zgradbo in druge lastnosti, ki nam pomagajo načrtovati raziskave. Egerolizinsko družino proteinov (PF06355; IPR 009413) so opredelili leta 2002. Predstavlja skupino majhnih (15-17 kDa), membransko aktivnih in kislih proteinov, ki jih najdemo v bakterijah, glivah, rastlinah in virusu (Berne in sod., 2005). Gre za proteine s prevladujočo β -strukturo (Rost in sod., 2004), ki imajo nizko izoelektrično točko in so stabilni v širokem razponu pH (Sakaguchi in sod., 1975; Berne in sod., 2005).

Prvi izolirani in sekvenirani protein te družine je bil Asp-hemolizin. Poleg Asp-hemolizina, ki je najbolj proučevani član te družine in ga proizvaja gliva *Aspergillus fumigatus*, uvrščamo v to družino tudi egerolizin iz glive *Agrocybe aegerita*, ostreolizin in pleurotolizin A iz glive *Pleurotus ostreatus*, dva hemolizinu podobna proteina iz bakterije *Clostridium bifermentans* ter še druge proteine ali cDNA transkripte z zelo podobnimi aminokislinskimi zaporedji.

Egerolizine bi zaradi njihovih bioloških učinkov in lastnosti lahko uporabili :

a) kot zaviralce celičnih delitev,

b) za izdelavo cepiv,

Rekombinantne oblike proteinov te družine sicer izgubijo hemolitično aktivnost, še vedno pa ohranijo sposobnost vezave na protitelesa (Kumagai in sod., 2002). Poskusi na živalih so pokazali, da bi z uporabo protiteles za Asp-hemolizin tipa IgG skupaj s klasično terapijo z amfotericinom lahko zaščitili osebe z oslabljenim imunskim sistemom pred okužbo z glivo *A. fumigatus* (Ebina in sod., 1982).

c) za preprečitev nastanka in zdravljenje ateroskleroze,

Asp-hemolizin, njegova rekombinantna oblika ali sintetični peptid, ki izhaja iz njega, se vežejo na oksidirane lipoproteine majhne gostote (ox-LDL), ki imajo pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju ateroskleroze. Vezava teh molekul zavira delovanje ox-LDL (Kudo in sod., 2001).

d) kot specifične označevalce za lipidne rafte,

Raziskave so pokazale, da se proteini egerolizinske družine specifično vežejo na lipidne vezikle iz sfingomielina in holesterola (Sepčić in sod., 2004), zaradi česar bi jih lahko v celični in molekularni biologiji uporabili za študije membranskih domen, ki so bogate s holesterolom, njihove fluorescenčno ali spinsko označene hemolitično neaktivne mutante pa bi bile uporabne pri proučevanju strukturnih in funkcionalnih lastnosti bioloških membran.

e) za povečanje proizvodnje tržno zanimivih gob.

Poskusi z ostreolizinom so pokazali, da prisotnost tega proteina v gojišču močno pospeši nastanek primordijev in plodišč bukovega ostrigarja (Berne in sod., 2007).

2.3.1 Asp-hemolizin

Citolitični protein Asp-hemolizin je eden izmed toksinov, ki jih gliva *Aspergillus fumigatus* proizvaja med okužbo gostitelja (Sakaguchi in sod., 1975). Gre za sekretorni protein (Ebina in sod., 1994), ki spada v egerolizinsko družino proteinov (v preglednici 1 in na sliki 3 je prikazana podobnost aminokislinskega zaporedja Asp-hemolizina z aminokislinskimi zaporedji nekaterih predstavnikov te družine). Izolirali so ga v zgodnjih sedemdesetih letih iz homogenata glivnega micelija, seva Fresenius-Muramatsu (sev, izoliran iz pljuč okuženega pingvina). Postopek očiščenja proteina je potekal v več fazah: obarjanje z amonijevim sulfatom, anionska gelska kromatografija in dodatne gelske filtracije (Sakaguchi in sod., 1975). Kasneje so postopek očiščenja egerolizinskih proteinov poenostavili in ta obsega gelsko filtracijo neobdelanega glivnega ekstrakta na FPLC (tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov, ang. fast protein liquid chromatography), ki mu sledi ionsko izmenjevalna kromatografija in druga gelska filtracija (Ngai in Ng, 2006).

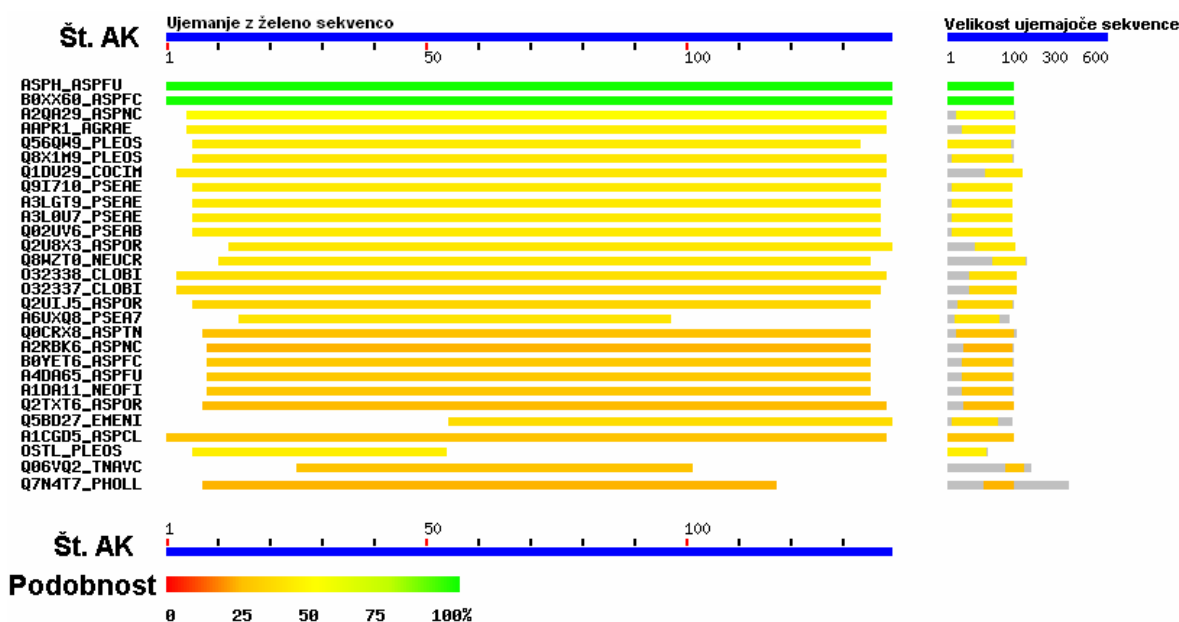
Asp-hemolizin je sestavljen iz 131 aminokislinskih ostankov (slika 4 prikazuje Asp-hemolizinski prekursor, ki ima 139 aminokislinskih ostankov), njegova molekulska masa pa je 14 kDa (Ebina in sod., 1994). Izoelektrična točka toksina je 4,0. Toksin je stabilen med pH 4-10, optimalna hemolitična aktivnost pa je pri pH 5-7. Segrevanje na 50°C za 40 minut ali na 45°C za 100 minut uniči hemolitično aktivnost (Sakaguchi in sod., 1975). Asp-hemolizin ima negativno nabito aminokislinsko regijo, s katero se lahko veže na ox-LDL, in sicer na lizofosfatidilholin (Fukuchi in sod., 1996 in 1998). Pri tej vezavi pride do inhibicije hemolitične aktivnosti. S pomočjo sintetičnih peptidov, ki izhajajo iz Asp-hemolizina, so kasneje odkrili YKDG (tirozin-lizin-aspartat-glicin) aminokislinsko sekvenco. To je sekvenca, s katero se hemolizin veže na lizofosfatidilholin v ox-LDL in tako zavre njegov vpliv na makrofage (Kumagai in sod., 2005). Ox-LDL ima pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju ateroskleroze.

Novak M. Hemolitične učinkovine v ekstraktu plesni *Aspergillus fumigatus*.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2009

Preglednica 1: Podobnost aminokislinskega zaporedja prekursorja Asp-hemolizina z aminokislinskimi zaporedji nekaterih predstavnikov egerolizinske družine proteinov. I – delež aminokislin identičnih prekursorju Asp-hemolizina; P – delež aminokislin podobnih prekursorju Asp-hemolizina.

Protein	Koda proteina	Vrsta	I (%)	P (%)	E-vrednost
Asp-hemolizin prekursor	ASPH_ASPFU	<i>Aspergillus fumigatus</i> (sev Af293)	100	100	1e-79
Domnevni protein AFUB_047850	B0XX60_ASPFC	<i>Aspergillus fumigatus</i> (sev CEA10)	100	100	1e-79
Domnevni protein An01g09980	A2QA29_ASPNC	<i>Aspergillus niger</i> (sev CBS 513.88)	50	71	8e-38
Egerolizinski Aa-Pri1 prekursor	AAPR1_AGRAE	<i>Agrocybe aegerita</i>	44	59	5e-27
Ostreolizin (cDNA)	Q56QW9_PLEOS	<i>Pleurotus ostreatus</i>	43	61	7e-27
Pleurotolizin A	Q8X1M9_PLEOS	<i>Pleurotus ostreatus</i>	41	62	1e-26
Domnevni protein CIMG_06184	Q1DU29_COCIM	<i>Coccidioides immitis</i>	41	61	6e-26
Protein PA0122	Q9I710_PSEAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (sev PA01)	42	58	6e-23
Domnevni protein PA2G_04034	A3LGT9_PSEAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2192	42	58	6e-23
Domnevni protein PACG_03721	A3LOU7_PSEAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3719	42	58	6e-23
Domnevni hemolizin PA14_01490	Q02UV6_PSEAB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (sev UCBPP-PA14)	42	58	8e-23
Domnevni protein AO090701000257	Q2U8X3_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	41	58	2e-22
Domnevni protein NCU03475	Q8WZT0_NEUCR	<i>Neurospora crassa</i>	41	64	1e-21
Hemolizinu podoben protein cbm17.2	O32338_CLOBI	<i>Clostridium bif fermentans</i>	38	58	4e-16
Hemolizinu podoben protein cbm17.1	O32337_CLOBI	<i>Clostridium bif fermentans</i>	35	55	2e-15
Domnevni protein AO090023000032	Q2UIJ5_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	34	55	2e-12
Domnevni protein PSPA7_0197	A6UXQ8_PSEA7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (sev PA7)	40	59	5e-11
Domnevni protein ATEG_03556	Q0CRX8_ASPTN	<i>Aspergillus terreus</i> (sev NIH 2624)	26	51	3e-10
Domnevni protein An19g00210	A2RBK6_ASPNC	<i>Aspergillus niger</i> (sev CBS 513.88)	24	51	2e-09
Asp-hemolizin podoben protein AFUB_100320	B0YET6_ASPFC	<i>Aspergillus fumigatus</i> (sev CEA10)	29	54	4e-09
Asp-hemolizin podoben protein AFUA_4G02805	A4DA65_ASPFU	<i>Aspergillus fumigatus</i> (sev Af293)	29	54	4e-09
Asp-hemolizin podoben protein NFIA_030750	A1DA11_NEOFI	<i>Neosartorya fischeri</i> (sev NRRL 181)	28	53	3e-08
Domnevni protein AO090010000018	Q2TXT6_ASPOR	<i>Aspergillus oryzae</i>	25	49	8e-07
Domnevni protein AN1553.2	Q5BD27_EMENI	<i>Emericella nidulans</i>	37	51	2e-06
Domnevni protein ACLA_066510	A1CGD5_ASPCL	<i>Aspergillus clavatus</i>	27	50	7e-06
Ostreolizin (fragment)	OSTL_PLEOS	<i>Pleurotus ostreatus</i>	44	73	2e-05
Domnevni protein TnAV2c_gp029	Q06VQ2_TNAVC	<i>Trichoplusia ni ascovirus 2c</i>	27	46	0,22
Domnevni protein plu2230	Q7N4T7_PHOLL	<i>Photorhabdus luminescens subsp. laumondii</i>	24	43	1,4



Slika 3: Podobnost aminokislinskega zaporedja Asp-hemolizina z aminokislinskimi zaporedji nekaterih predstavnikov egerolizinske družine proteinov (ExPASy Proteomics..., 2009). **ASPH_ASPFU** – Asp-hemolizina prekursor; **B0XX60_ASPFC** – domnevni protein AFUB_047850; **A2QA29_ASPNC** - domnevni protein An01g09980; **AAPR1_AGRAE** - egerolizinski Aa-Pril prekursor; **Q56QW9_PLEOS** - ostreolizina; **Q8X1M9_PLEOS** - pleurotolizina A; **Q1DU29_COCIM** - domnevni protein CIMG_06184; **Q9I710_PSEAE** - protein PA0122; **A3LGT9_PSEAE** - domnevni protein PA2G_04034; **A3L0U7_PSEAE** - domnevni protein PACG_03721; **Q02UV6_PSEAB** - domnevni hemolizina PA14_01490; **Q2U8X3_ASPOR** - domnevni protein AO090701000257; **Q8WZT0_NEUCR** - domnevni protein NCU03475; **O32338_CLOBI** - hemolizinu podoben protein cbm17.2; **O32337_CLOBI** - hemolizinu podoben protein cbm17.1; **Q2UIJ5_ASPOR** - domnevni protein AO090023000032; **A6UXQ8_PSEA7** - domnevni protein PSPA7_0197; **Q0CRX8_ASPTN** - domnevni protein ATEG_03556; **A2RBK6_ASPNC** - domnevni protein An19g00210; **B0YET6_ASPFC** - Asp-hemolizinu podoben protein AFUB_100320; **A4DA65_ASPFU** - Asp-hemolizinu podoben protein AFUA_4G02805; **A1DA11_NEOFI** - Asp-hemolizinu podoben protein NFIA_030750; **Q2TXT6_ASPOR** - domnevni protein AO090010000018; **Q5BD27_EMENI** - domnevni protein AN1553.2; **A1CGD5_ASPCL** - domnevni protein ACLA_066510; **OSTL_PLEOS** - ostreolizina (fragment); **Q06VQ2_TNAVC** - domnevni protein TnAV2c_gp029 in **Q7N4T7_PHOLL** - domnevni protein plu2230.

Toksin je hemolitičen (v nanomolarnih koncentracijah) za eritrocite različnih sesalskih vrst, citotoksičen za makrofage, fibroblaste, levkocite in endotelijske celice *in vitro* ter smrten za poskusne živali (Ebina in sod., 1982 in 1985). Eritrociti različnih organizmov so različno občutljivi za Asp-hemolizina, npr. toksin je bolj litičen za piščančje in človeške eritrocite kot pa za eritrocite glodavcev. LD₅₀ za miši in piščance je 750 in 350 µg/kg (Sakaguchi in sod., 1975). Histopatološka slika po intravenoznem vnosu Asp-hemolizina v telo poskusne živali kaže na prizadetost različnih organov (ledvice, srce, jetra in možgani), povečanje kapilarne permeabilnosti, zakrčenje vitega črevesja (ileum) in spremenjene koncentracije ionov v serumu (Ebina in sod., 1982 in 1984).

Asp-hemolizina so uspeli izraziti tudi v rekombinantni obliki s pomočjo bakterije *Escherichia coli*. Po očiščenju proteina so ugotovili, da še vedno reagira s protitelesi za Asp-hemolizina in se lahko veže na ox-LDL, tako kot nativni Asp-hemolizina, ni pa

hemolitično aktiven (Kumagai in sod., 2002). Izgubo hemolitične aktivnosti so opazili tudi pri drugih rekombinantnih egerolizinih.



Slika 4: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje prekurzorja hemolitičnega toksina Asp-hemolizina (Atherton in sod., 2009).

Poskusi na živalih so pokazali, da lahko protitelesa za Asp-hemolizin tipa IgG zaščitijo miši pred okužbo s spori glive (Ebina in sod., 1982). To kaže na možnost uporabe teh protiteles, kot dodatek klasični terapiji z amfotericinom, za zaščito imunsko oslabljenih oseb pred okužbo z glivo *A. fumigatus*.

Vloga Asp-hemolizina kot virulentnega faktorja je zaenkrat slabo proučena. Z boljším poznavanjem njegove vloge pri patogenezi glive, bi nam toksin lahko služil kot tarča za izdelavo zdravil, cepiv in/ali specifičnih načinov zdravljenj okužb z glivo *A. fumigatus* (Rementeria in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

acetonitril	Merck, Nemčija
akrilamid	Bio-Rad, ZDA
amonijev persulfat	Serva, ZDA
amonijev sulfat [(NH ₄) ₂ SO ₄]	Merck, Nemčija
bromfenol modro	Merck, Nemčija
čip L1	Biacore AB, Švedska
DEAE-Sephadex	Pharmacia, Švedska
Dinatrijev hidrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Nemčija
etanol	Merck, Nemčija
etilendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Nemčija
glicerol	Kemika, Hrvaška
glicin	Merck, Nemčija
glukoza	Merck, Nemčija
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
Immobilion-P PVDF membrane	Sigma, ZDA
izopropanol	Merck, Nemčija
kloroform	Merck, Nemčija
klorovodikova kislina (HCl)	Merck, Nemčija
metanol	Merck, Nemčija
mikrotitrne plošče	Biokit, Finska
natrijev dodecilsulfat (NaDS)	Merck, ZDA
natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, Nemčija
natrijev klorid (NaCl)	Merck, Nemčija
palmitoiloleoilfosfatidilholin (POPC)	Avanti Polar Lipids, ZDA
Sephadex G-50	Sigma, ZDA
sfingomielin	Avanti Polar Lipids, ZDA
SP-Sephadex	Pharmacia, Švedska
Temed	Sigma, ZDA
trifluoroacetna kislina (TFA)	Merck, Nemčija
Tris	Merck, Nemčija
Tris-HCl	Merck, Nemčija
vodikov peroksid (H ₂ O ₂)	Merck, Nemčija
YNB	Q Bio gene, MP Biomedicals, ZDA

3.1.2 Raztopine

Fiziološka raztopina

0,9-odstotni NaCl

Raztopina za suspendiranje spor (SSS)

0,5 g Tween 80

0,5 g agar

destilirana voda (do 1000 ml)

Pufer za eritrocite (pH 7,4)

20 mM Tris-HCl

130 mM NaCl

50 mM Tris pufer (pH 8,5)

Pufer za vezikle (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl

140 mM NaCl

1 mM EDTA

NaDS elektroforezni pufer (10-kratni; pH 8,3)

30,3 g Tris

144 g glicin

10 g NaDS

destilirana voda (do 1000 ml)

3.1.3 Laboratorijska oprema

aparature za elektroforezo

aparatura za HPLC

centrifuge

čitalec mikrotitrnih plošč

ekstrudor in polikarbonatni membrani

inkubacijski stresalnik

kromatografski sistem

kuhalnik

NaDS nanašalni pufer za vzorce (1x; pH 8,8)

0,146 g Tris

1 ml glicerola

0,4 g NaDS

spatula bromfenol modrega

destilirana voda

WASH pufer (pH 7,4)

50 mM NaCl

1 mM EDTA

10 mM Tris-HCl

Peroksidazni substrat pri imunobarvanju

15 mg 4-kloro-1-naftol

5 ml metanola

25 ml raztopine za razbarvanje (3 g/l

Tris, 8 g/l NaCl, 0.1 g/l Na₂HPO₄)

30 µl H₂O₂

Phast System, Pharmacia, Švedska

Mini-Protean II, Bio-Rad, ZDA

WatersTM, ZDA

Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Nemčija

Centric 322A, Tehtnica, Slovenija

Centrifuge 5415D, Eppendorf, Nemčija

Sigma 3K-30, Nemčija

MRX, Dynex Technologies, Nemčija

Avestin, Kanada

New Brunswick Scientific, ZDA

Pharmacia, Švedska

Corona, Slovenija

hladilnik	Gorenje, Slovenija
magnetno mešalo	IKA, Nemčija
orbitalni stresalniki	Vibromix 10, Tehtnica, Slovenija Vibromix 301 EVT, Tehtnica, Slovenija
pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
refraktometer Biacore X	Biacore AB, Švedska
rotavapor in vodna kopel	R-134, Büchi, Švica B-480, Büchi, Švica
spektrofotometer	UV-2101 PC, Shimadzu, Japonska
tehtnica	Sartorius, Švedska
toplotni stresalnik za Eppendorfove epruvice	Biosan Ltd., Latvija
zamrzovalnik	Liebherr, Nemčija

3.1.4 Gojišča

Tekoče gojišče YNB (1 liter)

1,7 g YNB

5 g (NH₄)₂SO₄

20 g glukoza

Sestavine smo zatehtali v erlenmajerico, dodali ustrezno količino destilirane vode in avtoklavirali tri ure pri temperaturi 121°C.

Tekoče gojišče YNB s soljo (1 liter)

Enake sestavine in priprava kot za tekoče gojišče YNB, le da smo dodali še 100 g NaCl.

3.1.5 Glivni sevi in izolati

Delali smo z glivo *Aspergillus fumigatus*, sevom A249 (EXF 4194), ki je bil izoliran 01.01.1994, z vzorca dna aktivnega solinskega bazena v solinah Seča, Droga Portorož. Sev je del zbirke mikroorganizmov Infrastrukturnega centra Mycosomo Katedre za biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Priskrbela ga je prof. dr. Nina Gunde-Cimerman z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Za delo s sevom A249 smo se odločili na podlagi preliminarnih poskusov (Derlink, 2009), ki so pokazali, da je hemolitična aktivnost vodnih ekstraktov vseh razpoložljivih sevov glive *Aspergillus fumigatus*, zbirke mikroorganizmov Infrastrukturnega centra Mycosomo, največja ravno pri tem sevu. Sama hemolitična aktivnost se je še dodatno povečala, če je gliva rasla v razmerah s povečano slanostjo.

Pri delu smo uporabili tudi hemolitičen protein ostreolizin, izoliran iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) po postopku, ki so ga opisali Berne in sod., 2002. Protein so izolirali junija 2008 na Katedri za biokemijo Oddelka za Biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.2 METODE

3.2.1 Gojenje plesni *Aspergillus fumigatus* in ugotavljanje hemolitične aktivnosti

3.2.1.1 Gojenje

Glivo *Aspergillus fumigatus* smo gojili v tekočem gojišču YNB brez dodane soli in z dodano soljo (10-odstotni NaCl). Pripravili smo 0,5 litra vsakega gojišča. Gojišči smo nato razdelili v deset erlenmajeric, tako da je bilo v vsaki erlenmajerici 100 ml gojišča. Erlenmajerice z gojiščem smo sterilizirali v avtoklavu tri ure pri temperaturi 121°C in tlaku 150 kPa. Gojišča smo pustili, da se ohladijo (čez noč). Nato smo jih shranili pri 4°C do vcepljanja.

Glivo *Aspergillus fumigatus*, sev A249 (EXF 4194), smo najprej precepili na poševno gojišče YNB brez dodane soli in z dodano soljo. Po dobrem tednu, ko je gliva začela sporulirati, smo v laminariju pripravili suspenzijo spor, tako da smo poševno gojišče do vrha prelili z raztopino za suspendiranje spor (SSS, ang. spore suspension solution), nato pa z ezo postrgali kulturo z gojišča. S pomočjo pipete smo v vsako gojišče vcepili po 1 ml te suspenzije, pri čemer smo morali paziti, da smo suspenzijo spor, narejeno na poševnem gojišču YNB brez dodane soli, vcepili na tekoča gojišča YNB brez dodane soli ter suspenzijo spor, narejeno na poševnem gojišču YNB z dodano soljo, na tekoča gojišča YNB z dodano soljo.

Glivo smo nato gojili na stresalniku štiri tedne na temperaturi 25°C.

3.2.1.2 Odvzem vzorcev in časovno izražanje hemolitične učinkovine

Vsak teden, od drugega tedna gojenja dalje, smo odvzeli vzorec iz gojišča brez dodane soli in vzorec iz gojišča z dodano soljo ter testirali hemolitično aktivnost (HA, glej 3.2.1.3). S tem smo želeli ugotoviti časovno izražanje hemolitične učinkovine.

Odvzeta vzorca smo pripravili za biološki test na sledeč način: tekoče gojišče smo prelili v čašo in počakali, da se je micelij posedel na dno. Nato smo s kapalko odpipetirali gojišče v Falconovo epruveto. Micelij smo zamrznili v tekočem dušiku in ga zmečkali s stekleno palčko. Tako od gojišča kot od micelija smo odpipetirali 0,5 ml suspenzije v Eppendorfovo epruvetko. Epruvetke smo prenesli v centrifugo in vsebino centrifugirali (10 min, 13.000 vrt./min). Po končanem centrifugiranju smo preverili HA supernatanta (glej 3.2.1.3). Preostanek micelija in gojišča smo shranili v zamrzovalniku pri -24°C.

3.2.1.3 Merjenje hemolitične aktivnosti

HA vzorcev smo merili na govejih eritrocitih na sobni temperaturi s turbidimetrično metodo (Maček in Lebez, 1981) na dva načina:

- a) na čitalcu mikrotitrnih plošč,
- b) na dvožarkovnem spektrofotometru.

Meritve s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč smo izvedli podobno kot so opisali Mancini in sod. (2004). Najprej smo pripravili suspenzijo govejih eritrocitov z absorbcijo 1,0 pri valovni dolžini 630 nm. Nato smo k 100 µl eritrocitne suspenzije dodali 100 µl pufru za eritrocite in 50 µl vzorca. Spreminjanje absorbcije pri valovni dolžini 630 nm smo spremljali 20 minut. Iz dobljenih rezultatov smo določili t_{50} (čas potreben, da pride do 50-odstotne hemolize). S pomočjo teh meritev smo želeli zaslediti prisotnost hemolitične učinkovine v gojišču.

Na dvožarkovnem spektrofotometru smo meritve izvedli podobno kot je to opisala Sepčić (1998). Merili smo absorbcijo pri valovni dolžini 700 nm. S pomočjo pufru za eritrocite in eritrocitov smo pripravili suspenzijo z absorbcijo 0,8 pri omenjeni valovni dolžini. V plastično kiveto smo odpipetirali 100 µl vzorca in 1 ml eritrocitne suspenzije. Spreminjanje absorbcije smo spremljali 3 minute. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali delež hemolize za posamezno minuto po enačbi (1).

$$\text{Delež hemolize} = (A_{\text{erit. suspenzije}} - A_{700 \text{ po } x \text{ minuti}}) \times 100 / A_{\text{erit. suspenzije}} \quad \dots(1)$$

Z meritvami na spektrofotometru smo želeli biokemijsko opredeliti hemolitično učinkovino (pH stabilnost, polarnost, molekulska maso, naboj in temperaturno stabilnost).

3.2.2 Poskus izolacije hemolitične učinkovine

3.2.2.1 Izolacija hemolitične učinkovine

Pri izolaciji hemolitične učinkovine smo si pomagali z že opisanimi postopki za izolacijo hemolitičnega toksina iz glive *Aspergillus fumigatus* (Sakaguchi in sod., 1975) in njemu podobnemu postopku za izolacijo ostreolizina iz bukovega ostrigarja (Berne in sod., 2002). Na kratko: shranjen micelij smo odmrznili. S pipeto smo odstranili čim več gojišča in mu dolili dvakratni volumen 50 mM Tris pufru (pH 8,5). Vse skupaj smo prelili v terilnico. Po zamrznitvi micelija s tekočim dušikom smo micelij strli. Postopek zamrznitve in trenja smo večkrat ponovili. Dobljeni homogenat smo centrifugirali 30 minut pri 15.000 vrt./min in 4°C. Oborino smo shranili, supernatant pa smo obarjali z amonijevim sulfatom, najprej do 35-odstotnega, nato pa do 65-odstotnega nasičenja. Po obarjanju je vedno sledilo 30 minut centrifugiranja pri 15.000 vrt./min in 4°C. Nastalo oborino po obarjanju do 65-odstotnega nasičenja smo raztopili v 1 ml 50 mM Tris pufru (pH 8,5). Hemolitično učinkovino smo od drugih sestavin vzorca ločili z gelsko kromatografijo na gelu Sephadex G-50. Kromatografija je potekala 6,4 ure v hladni sobi pri 4°C. Prostornina kolone je bila 123,6 ml, mobilna faza pa je bil 50 mM Tris pufer (pH 8,5). Prostornina posamezne

frakcije je bila 2 ml. Pri določitvi frakcij, v katerih naj bi bila hemolitična učinkovina, smo si pomagali z rezultati gelske kromatografije ostreolizina, ki smo jo izvedli pri enakih pogojih kot kromatografijo za ločitev hemolitične učinkovine (glej zgoraj). Združenim frakcijam smo določili koncentracijo proteinov in jih uporabili pri nadaljnjem delu (določitev aminokislinskega zaporedja – glej 3.2.3, vezava na lipidne vezikle – glej 3.2.5).

3.2.2.2 NaDS elektroforeza

Izvedli smo jo na dva načina:

- a) na Mini-Protean II elektroforeznem sistemu, tako da smo 15 ali 30 μ l vzorca ali ostreolizina (kontrola) zmešali s 15 μ l NaDS nanašalnega pufra za vzorce. Vzorce in ostreolizin smo segrevali 3 minute pri 100°C. 12-odstotni poliakrilamidni gel smo namestili v posebno plastično posodo, v katero smo nalili ustrezno količino 1-kratnega NaDS elektroforeznega pufra. Vzorce in ostreolizin smo nanесли na gel. Elektroforeza je tekla 40 minut pri 200 voltih. Po končani elektroforezi smo gel sprali v destilirani vodi, proteine na gelu pa smo obarvali s Coomassie Brilliant modrim barvilom. Ugotavljali smo ali je v ekstraktih glivnega micelija prisoten protein velikosti 15 kDa in kakšna je količina proteinov v njih.
- b) na avtomatizirani napravi PhastSystem na 8-25% poliakrilamidnem gelu po navodilih proizvajalca (Pharmacia PhastSystem Users Manual, 1987). 15 μ l ekstrakta glivnega micelija ali ostreolizina (kontrola) smo pred nanosom zmešali z 2-kratnim nanašalnim pufrom (15 μ l) in 3 minute segrevali na 100°C. Po končani elektroforezi smo proteine iz gela prenesli na polivinildifluoridno (PVDF) membrano (glej 3.2.4).

3.2.2.3 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo določali spektrofotometrično s pomočjo BCA proteinskega testa (Pierce, ZDA). Pripravili smo serijo redčitev (0,1–10 mg/ml) govejega serumskega albumina (BSA). V vdolbinico mikrotitrne plošče smo odpipetirali 10 μ l vzorca (v nekaterih primerih 2 μ l vzorca in 8 μ l destilirane vode) in dodali 200 μ l mešanice reagentov A in B (razmerje 50:1). Za negativno kontrolo smo uporabili destilirano vodo. Vzorce smo inkubirali 30 min pri 37°C, nato pa smo na čitalcu mikrotitrnih plošč izmerili absorbcijo vzorcev pri valovni dolžini 550 nm. S pomočjo absorbcije vzorcev BSA, ki so imeli znane koncentracije, smo izdelali umeritveno krivuljo (A_{550} v odvisnosti od koncentracije BSA). Iz nje smo nato določili koncentracije proteinov v ostalih vzorcih.

3.2.3 Določitev aminokislinskega zaporedja

3.2.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC)

Z RP-HPLC (ang. reverse phase high performance liquid chromatography) smo preverjali čistost vzorca (združene frakcije 20-27), hkrati pa smo ga želeli po gelski kromatografiji

tudi bolj koncentrirati in tako pripraviti za nadaljnje delo (določitev aminokislinskega zaporedja, glej 3.2.3.2).

RP-HPLC smo izvedli na koloni za ločevanje peptidov in proteinov (Vydac C18 CAT 218TP104, The Separations Group, ZDA). Nanjo smo nanegli 500 µl vzorca frakcij po gelski kromatografiji, ki so številčno ustrezale hemolitično aktivnim frakcijam ostreolizina po gelski kromatografiji. Kolono smo najprej spirali 5 minut z 0,1-odstotno trifluoroacetno kislino (TFA) v bidestilirani vodi, nato pa smo vezane proteine sprali z linearnim gradientom acetonitrila v vodi z 0,1-odstotno TFA (10 minut od 0-50% acetonitrila in 25 minut od 50-100% acetonitrila). Hitrost pretoka je bila 0,1 ml/min. Absorbencijo smo spremljali pri 215 in 280 nm. Poskus smo ponovili še trikrat.

3.2.3.2 Določitev aminokislinskega zaporedja

Poskuse smo izvedli na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti Instituta Jožef Stefan. Želeli smo določiti N-terminalno aminokislinsko zaporedje učinkovine iz glivnega ekstrakta, za kar smo uporabili avtomatski sekvenator Procise 492A (PE Applied Biosystems, ZDA), ki temelji na reakcijah Edmanove degradacije proteina in identifikaciji produktov razgradnje s pomočjo HPLC.

S pomočjo programske opreme BLAST in FASTA 3 smo preiskali bazo proteinov, da bi našli proteine s podobnim zaporedjem aminokislin kot je bilo dobljeno zaporedje.

3.2.4 Prenos western

Že Vidic in sod. (2005) so ugotovili, da lahko protitelesa za ostreolizin navzkrižno reagirajo tudi z drugimi, ostreolizinu sorodnimi proteini, kot je npr. egerolizin. S to metodo smo skušali ugotoviti, če je v ekstraktu plesni *Aspergillus fumigatus* prisotna taka učinkovina.

V velikosti Phast gela smo izrezali polivinildifluoridno (PVDF) membrano (ImmobilionTM-P, Millipore, ZDA) in jo za 10 minut namočili v metanolu. Nato smo sestavili prenosni sistem tako, da smo na plastično vrečko položili papirnato brisačko in filter papir, ki smo ju dobro navlažili z destilirano vodo. Na filter papir smo položili gel, čez njega pa PVDF membrano, tako da vmes ni bilo zračnih mehurčkov. Sledila sta dva filter papirja in dve papirnati brisački, ki smo jih le rahlo navlažili. Na vrh smo položili plastično vrečko in vse skupaj obtežili s knjigami. Prenos proteinov na membrano je potekal dve uri pri sobni temperaturi.

PVDF membrano, na katero smo prenesli proteinske vzorce, smo čez noč stresali v 2-odstotni raztopini BSA v WASH pufu. Nato smo membrano prenesli v 4-odstotno raztopino BSA v WASH pufu (20 ml), ki smo mu dodali primarna protitelesa za detekcijo ostreolizina (200 µl) in jo dve uri nežno stresali. Po spiranju z WASH pufrom smo

membrano inkubirali še nadaljnji dve uri s kozjimi-protizajčjimi sekundarnimi protitelesi (10 μ l), označenimi s hrenovo peroksidazo (IgG-HRP, Southern Biotechnology Associates Inc., ZDA), razredčenimi v 20 ml WASH pufra s 4-odstotno raztopino BSA. Nevezana sekundarna protitelesa smo sprali z WASH pufrom. Specifične lise za ostreolizin smo zasledili tako, da smo membrano za nekaj sekund namočili v peroksidazni substrat. Reakcijo smo prekinili s tem, da smo membrano dobro sprali z vodo.

3.2.5 Ugotavljanje vezave hemolitične učinkovine na lipidne vezikle

S pomočjo površinske plazmonske resonance smo želeli preveriti ali se hemolitična učinkovina veže na lipidne vezikle iz POPC ali sfingomielina in holesterola ter kakšna sta jakost in delež vezave učinkovine na te vezikle. Za kontrolo smo uporabili ostreolizin. Ta se na vezikle iz POPC, ki so v tekoči, neurejeni fazi, ne veže (negativna kontrola), veže pa se na vezikle iz sfingomielina in holesterola, ki so v tekoči, urejeni fazi in jo ostreolizin prepozna (pozitivna kontrola) [Sepčić in sod., 2003 in 2004; Rebolj in sod., 2006]. Predvidevali smo, da bodo tudi drugi proteini egerolizinske družine imeli enak vzorec vezave.

3.2.5.1 Priprava lipidnih veziklov

Lipidne vezikle smo pripravili iz holesterola (Hol) in sfingomielina (SM), v razmerju 1:1, ter iz 100-odstotnega palmitoiloleoilfosfatidilholina (POPC).

Najprej smo zatehtali ustrezno količino lipidov (želena končna koncentracija veziklov je bila 10 mg/ml), ki smo jih nato raztopili v kloroformu. K SM in Hol smo dodali še 2-3 μ l etanola. Topilo smo odstranili z rotacijsko vodno vakuumsko črpalko. Pri tem je na steni steklene bučke nastal tanek lipidni film. Posušene lipide smo raztopili v pufru za vezikle. Temu smo dodali steklene kroglice in vsebino dobro premešali na orbitalnem stresalniku. Tako smo pripravili multilamelarne vezikle (MLV).

Velike unilamelarne vezikle (LUV) smo pripravili iz MLV. Slednje smo najprej osemkrat zamrznili v tekočem dušiku in jih odtalili. Nato smo s pomočjo ekstrudorja iztisnili suspenzijo veziklov preko dveh polikarbonatnih membran. MLV smo filtrirali vsaj 30-krat. Velikost premera por v membranah je bila 100 nm. Temu ustreza tudi velikost veziklov, ki smo jih dobili po ekstruziji.

Kvaliteto veziklov smo po končani pripravi vrednotili z meritvami koncentracije posameznih lipidov v veziklih. Koncentracijo lipidov smo določili z encimskima kolorimetričnima testoma Free Cholesterol C in LabAssayTM Phospholipid po navodilih proizvajalca (Waco Chemicals GmbH, Nemčija). S prvim testom smo določali količino holesterola v veziklih. Test temelji na nastanku produkta, ki je obarvan rdeče, sama intenziteta obarvanosti pa je sorazmerna s količino holesterola. V jamico na mikrotitri

plošči smo odpipetirali 10 μ l lipidnih veziklov (SM:Hol in POPC), 10 μ l standarda (koncentracija 1 mg/ml) in 10 μ l destilirane vode (kontrola), ki smo jim dodali 300 μ l encimske raztopine. To raztopino smo pripravili tako, da smo 1,5 mg reagenta R1a (vsebuje holesterol oksidazo, peroksidazo in 4-aminoantipirin) raztopili v 1,5 ml reagenta R1 (vsebuje fenol, fosfatni pufer in površinsko aktivne snovi). Ploščo smo inkubirali 30 minut pri 37°C. Nato smo pomerili absorbcijo (A) pri valovni dolžini 550 nm. Količino holesterola (c) v veziklih smo izračunali po enačbi (2).

$$c(\text{holesterol}) = c_{\text{standard}} \times (A_{\text{holesterol}} - A_{\text{kontrola}}) / (A_{\text{standard}} - A_{\text{kontrola}}) \quad \dots(2)$$

Z drugim testom smo določali količino fosfolipidov v veziklih. Princip je podoben kakor pri testu za holesterol, le da tu nastane produkt, ki je obarvan modro, sama intenziteta obarvanosti pa je sorazmerna s količino fosfolipidov. V jamice na mikrotitrni plošči smo odpipetirali 10 μ l lipidnih veziklov (SM:Hol in POPC), 10 μ l standarda (koncentracija 3 mg/ml) in 10 μ l destilirane vode (kontrola), ki smo jim dodali 300 μ l encimske raztopine. Pripravili smo jo tako, da smo 1,5 mg kromogenega substrata (vsebuje fosfolipazo L, holin oksidazo, peroksidazo, N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilin natrijevo sol - DAOS, 4-aminoantipiridin in askorbat oksidazo) raztopili v 1,5 ml pufra. Po 5-minutni inkubaciji smo pomerili absorbcijo (A) pri valovni dolžini 570 nm. Količino fosfolipidov (c) v veziklih smo izračunali po enačbi (3).

$$c(\text{fosfolipidi}) = c_{\text{standard}} \times (A_{\text{fosfolipidi}} - A_{\text{kontrola}}) / (A_{\text{standard}} - A_{\text{kontrola}}) \quad \dots(3)$$

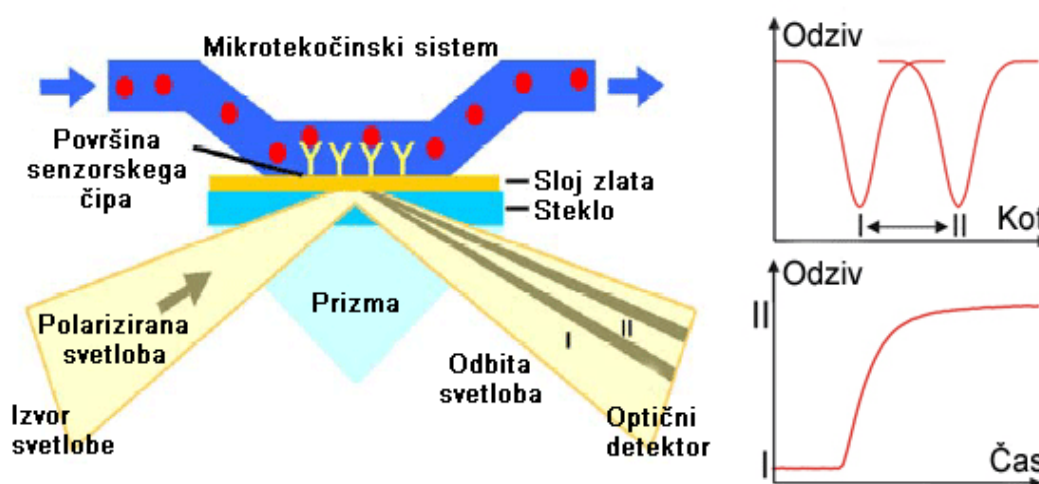
3.2.5.2 Površinska plazmonska resonanca (SPR)

SPR omogoča meritve vezave med različnimi molekulami v realnem času. Predvsem se uporablja za študije interakcij protein-protein, protein-ligand, protein-nukleinska kislina, protein-membrana in celica ali virus-protein (Površinska plazmonska..., 2008). SPR je fizikalen pojav, ki nastane kot posledica svetlobne ekscitacije površinskih plazmonov (Schasfoort in Tudos, 2008).

Vezavo hemolitične učinkovine na različne lipidne vezikle smo merili na refraktometru Biacore-X (Biacore AB, Švedska) v Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco. Uporabljali smo senzorski čip L1 (Biacore AB, Švedska).

Tehnologijo Biacore gradijo senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem (slika 5). Mikrotekočinski sistem sestavljajo drobne cevke, ki do površine senzorskega čipa privedejo s tekočino molekule, ki jih želimo analizirati. Senzorski čip gradi plastičen nosilec, na katerem je steklena ploščica prekrita s tankim slojem zlata. Na senzorski čip pripeto molekulo imenujemo ligand, vezavni partner, ki ga s pomočjo mikrotekočinskega

sistema spuščamo preko površine, pa analit. Detektorski sistem uporablja optični senzor, ki izmeri intenziteto odbite svetlobe na meji med dvema medijema (prizma-senzorski čip) z različnima lomnima količnikoma. Na meji med obema medijema je tanek sloj zlata, ki lahko pod določenimi pogoji privzame del energije vpadne svetlobe. To zaznamo kot močan upad intenzitete odbite svetlobe pri točno določenem vpadnem kotu in ta pojav imenujemo površinska plazmonska resonanca (SPR). Ko se neka molekula veže na površino čipa, pride do spremembe lomnega količnika in s tem do premika kota, kjer se pojavi SPR. Aparat izmeri intenziteto svetlobe pri fiksnem kotu vpadne svetlobe. Na ekranu monitorja nam izriše senzorgram, krivuljo, ki prikazuje spremembo intenzitete svetlobe v času (Površinska plazmonska..., 2008).

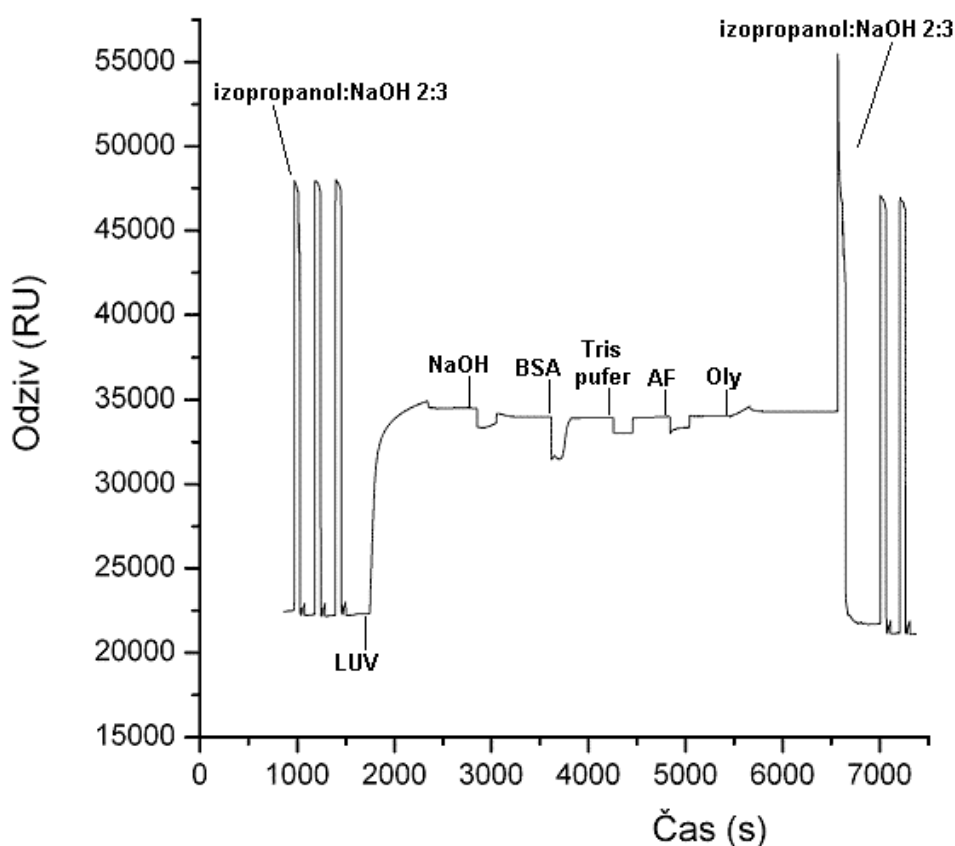


Slika 5: Tehnologija Biacore: senzorski čip, detektor in mikrotekočinski sistem. Ko se neka molekula veže na površino čipa, pride do spremembe lomnega količnika in s tem do premika kota (iz stanja I v stanje II), kjer se pojavi SPR. Spremembo kota (iz stanja I v stanje II) lahko izmeri optični detektor in ga prevede v spremembo odziva. Krivuljo, ki nam podaja spremembo odziva v času (desno spodaj), imenujemo senzorgram (Površinska plazmonska..., 2008).

Senzorski čip L1 sestavlja tanek sloj zlata in dekstran, na katerega so vezane lipofilne skupine. Imobilizirani lipidni vezikli na čipu ostanejo v obliki liposomov, ki se ne zlijejo v ravnini senzorskega čipa (Anderluh in sod., 2005).

Potek poskusov na senzorskem čipu L1 je prikazan na sliki 6. Površino čipa smo najprej večkrat sprali s 30 μ l raztopine izopropanol: NaOH 2:3 (v/v), pri pretoku 30 μ l/min. Nato smo pri pretoku 1 μ l/min nanegli 10 μ l suspenzije LUV iz sfingomielina (SM) in holesterola (Hol) (v razmerju 1:1 mol/mol, koncentracija suspenzije je bila 0,33 mg/ml), tako da se je odziv povečal za 11.000-11.500 resonančnih enot (RU). Sledil je nanos 100 μ l 100 mM raztopine NaOH, pri pretoku 30 μ l/min, s katero smo s površine čipa sprali vse šibko vezane snovi. Z govejim serumskim albuminom (100 μ l, pretok 30 μ l/min) smo zapolnili vse prazne prostore na čipu med vezikli, da bi preprečili nespecifično vezavo snovi. Pri nespremenjenem pretoku smo nato nanegli najprej 100 μ l 50 mM Tris pufr (pH

8,5), sledil je nanos 100 μ l vzorca (združene frakcije od 20 do 27 po gelski kromatografiji) in na koncu 100 μ l ostreolizina (pripravili smo tako koncentracijo, da je ustrezala koncentraciji učinkovine iz združenih frakcij 20-27), ki je služil kot pozitivna kontrola. Čip smo na koncu poskusa regenerirali z raztopino izopropanol:NaOH 2:3. Celoten poskus smo ponovili še z lipidnimi vezikli iz POPC (koncentracija suspenzije LUV je bila 2,36 mg/ml), le da smo po pufru najprej nanесли ostreolizin, nato pa vzorec plesni *Aspergillus fumigatus*. Ostreolizin je tu služil kot negativna kontrola.



Slika 6: Potek poskusov ugotavljanja vezave hemolitične učinkovine na lipidne vezikle z SPR. S črticami je označen nanos raztopine izopropanol:NaOH 2:3, velikih unilamelarnih veziklov – LUV, NaOH, govejega serumskega albumina – BSA, 50 mM Tris pufera, vzorca glive *Aspergillus fumigatus* - AF in ostreolizina - Oly.

Rezultate smo analizirali s programom BIAevaluation Version 3.2 (Biacore AB, Švedska). Od primarnih senzorgramov vezave ostreolizina in hemolitične učinkovine iz plesni *Aspergillus fumigatus* na lipidne vezikle smo odšteli senzorgram Tris-pufera in tako dobili sekundarne senzorgrame.

3.2.6 Poskusi *in vivo*

Poskusi so bili opravljeni na Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani v sodelovanju s prof. dr. Robertom Frangežem, ki je tudi v celoti izvedel *in vivo* meritve. Ugotavljali smo toksičnost učinkovin ekstrakta glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in z dodano soljo, tako da smo merili vpliv učinkovin na arterijski krvni tlak, EKG in dihanje podgan v splošni anesteziji. Zanimalo nas je, če vplivi na prej omenjene parametre so in če obstaja kakšna razlika med vplivi učinkovin ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in vplivi učinkovin ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo.

3.2.6.1 Priprava ekstrakta glivnega micelija

Ekstrakt glivnega micelija smo pripravili tako kot je opisano v točki 3.2.2.1 (izolacija hemolitične učinkovine), le da smo namesto 50 mM Tris pufra uporabili fiziološko raztopino, postopek priprave pa smo zaključili na stopnji pred obarjanjem. Pripravili smo ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli, kot tudi ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo. Ker je bil pH supernatantov po centrifugiranju kisel, smo ju nevtralizirali z 1M NaOH do pH 7,4. V obeh ekstraktih smo na koncu izmerili tudi količino suhe snovi, tako da smo odvzeli 200 μ l ekstrakta, ga dali na prej stehtano folijo, nato pa posušili v sterilizatorju pri 100°C. Ko je vsa tekočina izhlapela, smo ponovno stehtali folijo s suho snovjo in nato izračunali maso suhe snovi na ml ekstrakta po enačbi (4).

$$m(\text{suhe snovi})/\text{ml ekstrakta (mg/ml)} = [m(\text{folija+suha snov}) - m(\text{folija})] \times 5 \dots (4)$$

3.2.6.2 Anestezija poskusnih živali

Za anestezijo živali smo uporabili anestetika Chanazina[®] (CHANELLE Ltd Loughrea Co. Galway, Irska) in Bioketan[®] (Vetoquinol Biowet, Gorzów, Poljska), ki smo ju skupaj injicirali intraperitonealno. Količino posameznega anestetika smo preračunali glede na telesno maso živali: 15 mg/kg telesne mase Chanazina in 100 mg/kg telesne mase Bioketan-a. Splošno anestezijo smo podaljševali z večkratnim injiciranjem polovične doze Bioketan-a, in sicer po 40 minutah po začetku splošne anestezije, nato pa do konca poskusa še vsakih 20 minut.

3.2.6.3 Vnos ekstraktov in spremljanje arterijskega krvnega tlaka, delovanja srca in dihanja

Zaradi določanja nekaterih biokemijskih parametrov v plazmi (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) in hematokrita smo na anestezirani živali najprej iz podjezične vene odvzeli vzorec krvi (0,8 ml). Nato smo izpreparirali desno jugularno veno in levo karotidno arterijo. Vanju smo vstavili heparinizirani kanili. Preko kanile, vstavljene v jugularno veno, smo vbrizgali 0,5

ml ekstrakta glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli ali 0,5 ml ekstrakta glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo. V kontrolno žival smo vbrizgali 0,5 ml fiziološke raztopine. Kanilo, vstavljeno v karotidno arterijo, smo priklopili na senzor za meritev tlaka (mehanoelektrični pretvornik), s pomočjo katerega smo merili arterijski krvni tlak. Pred poskusom smo ga umerili z živosrebrovim manometrom. Signal smo ojačali, ga digitalizirali z uporabo A/D pretvornika (Digidata 1440A, Molecular Devices, ZDA) in zapisali na računalnik z uporabo računalniškega programa AxoScope (Molecular Devices, ZDA).

Za zajemanje EKG smo uporabili podkožne igelne elektrode nameščene v skladu z II. odvodom po Einthovnu. EKG signal smo ojačali, s pomočjo A/D pretvornika digitalizirali in posneli na računalnik. Frekvenca vzorčenja je bila 1 kHz.

Dihanje smo spremljali z uporabo mehanoelektričnega pretvornika preko premikanja prsnega koša. Ročico mehanoelektričnega pretvornika smo prislonili na prsni koš. Z ojačitvijo signala in s pomočjo A/D pretvornika smo dihalno aktivnost sočasno z ostalima dvema parametroma zapisali na računalniku.

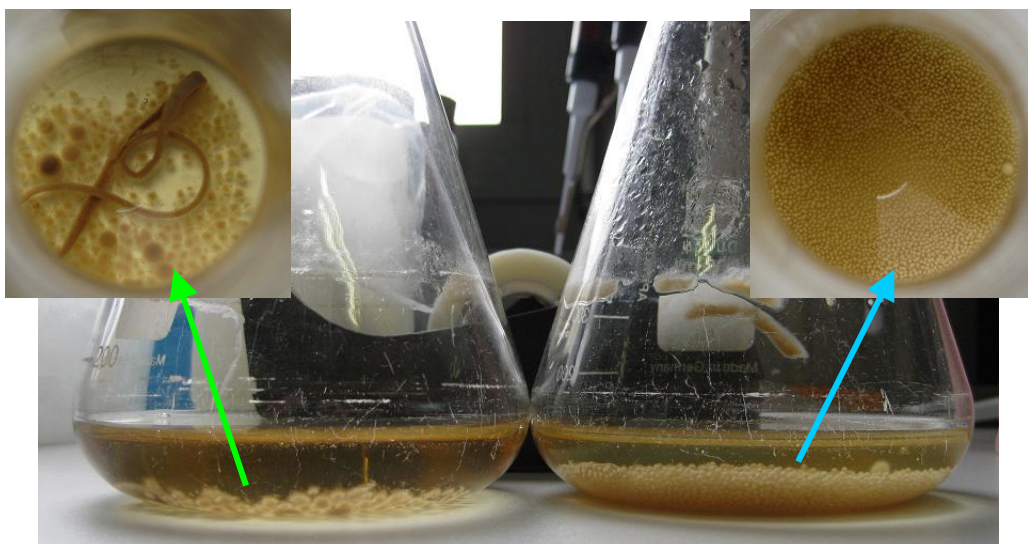
3.2.6.4 Analiza krvi

Preverjali smo sestavo elektrolitov (Na^+ , K^+ , Cl^- in Ca^{2+}) in hematokrit. Prvič smo poskusni živali odvzeli kri deset minut po aplikaciji anestetikov iz podjezične vene. Ta vzorec nam je služil kot pokazatelj začetnega stanja parametrov pri isti živali. Po končanem poskusu smo ponovno odvzeli kri neposredno iz levega prekata srca. Ta vzorec nam je služil kot pokazatelj končnega stanja parametrov pri isti živali. Kontrolno so nam predstavljali parametri, ki smo jih izmerili pri živali, ki je *i.v.* prejela 0,5 ml fiziološke raztopine.

4 REZULTATI

4.1 GOJENJE

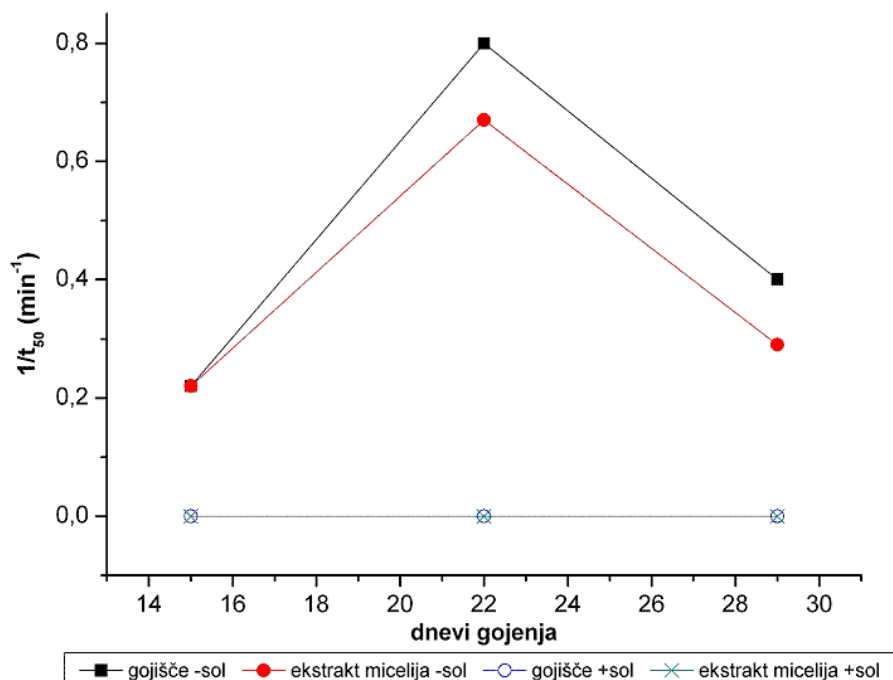
Glivo *Aspergillus fumigatus*, sev A 249 (EXF 4194), smo gojili v tekočem gojišču YNB brez dodane soli in z dodano soljo 4 tedne pri 25°C. Ves čas gojenja so se erlenmajerice (n=10) z vcepljenimi gojišči stresale na stresalniku. Od drugega tedna dalje smo vsak teden vzeli po dve erlenmajerici, eno z gojiščem brez dodane soli in eno z gojiščem z dodano soljo, dokumentirali rast glive (slika 7), izmerili pH gojišča ter preverili prisotnost hemolitične učinkovine s testom hemolitične aktivnosti (HA, glej 3.2.1.3), da bi ugotovili časovno izražanje hemolitične učinkovine. Ker so preliminarni poskusi pokazali, da je hemolitična učinkovina prisotna tako v ekstraktu micelija kakor tudi v gojišču (Sakaguchi in sod., 1975), smo preverjali HA obojega. Vzorce za testiranje smo pripravili tako kot je opisano v točki 3.2.1.2.



Slika 7: Tekoče gojišče YNB z glivnim micelijem po petnajstih dnevih gojenja, levo je gojišče z dodano soljo (zelena puščica), desno je gojišče brez dodane soli (modra puščica).

4.1.1 Časovno izražanje hemolitične učinkovine

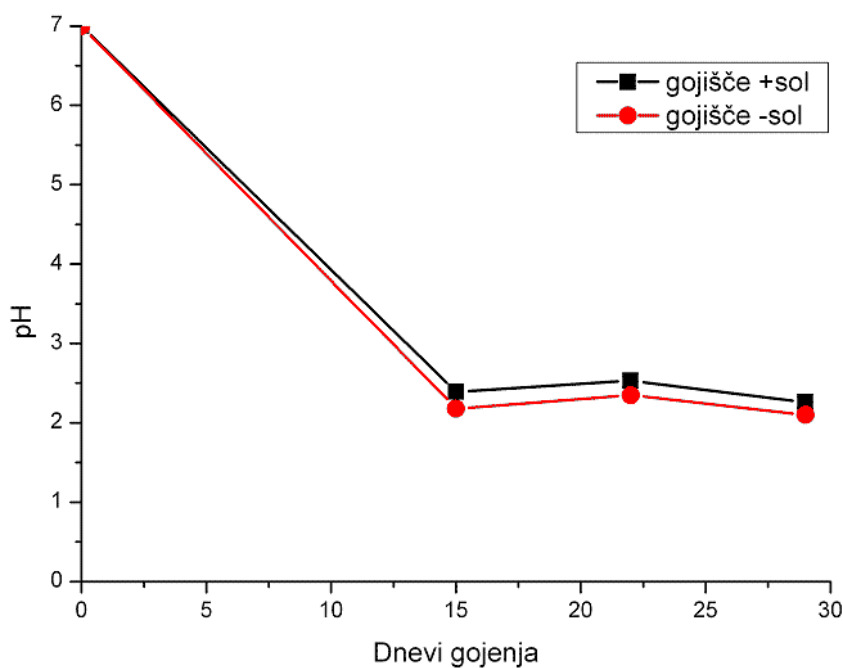
Časovno izražanje hemolitične učinkovine je prikazano na sliki 8. HA smo zaznali le v gojiščih brez dodane soli in ekstraktih micelijev, ki so zrasli v teh gojiščih. HA je bila največja po 22-ih dnevih gojenja. V ekstraktih micelijev zraslih v gojišču z dodano soljo in v gojiščih z dodano soljo HA nismo zasledili.



Slika 8: Časovno izražanje hemolitične učinkovine. t_{50} – čas potreben, da pride do 50-odstotne hemolize; -sol – gojišče/ekstrakt micelija brez dodane soli; +sol – gojišče/ekstrakt micelija z dodano soljo.

4.1.2 pH gojišča med gojenjem

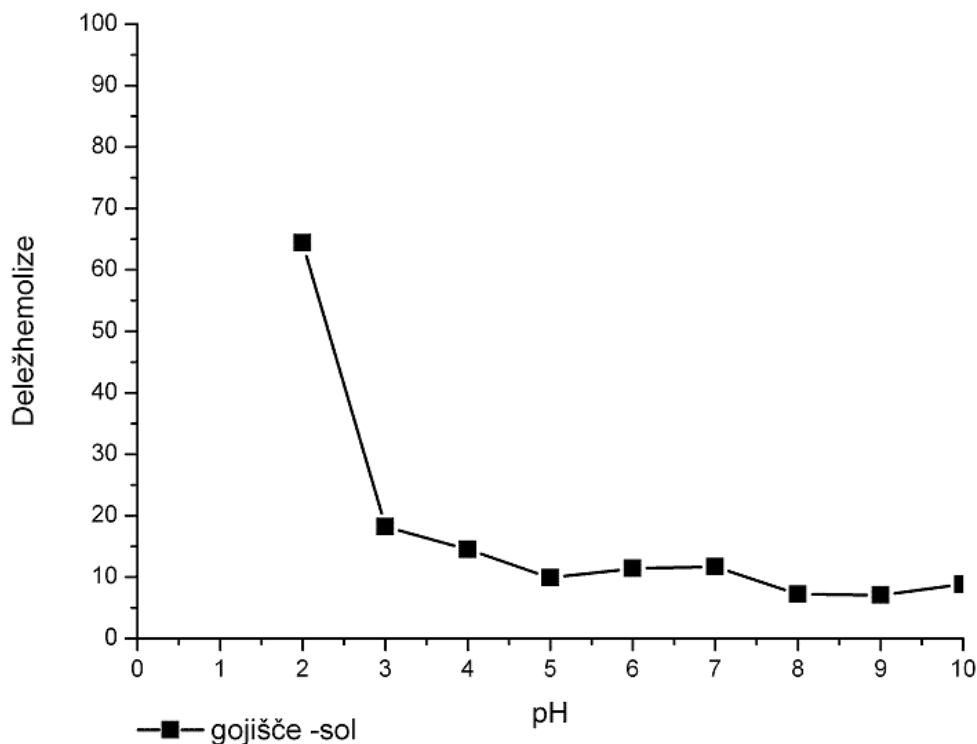
Ugotovili smo, da se je pH gojišča brez dodane soli in z dodano soljo, med gojenjem, močno znižal (slika 9).



Slika 9: Spreminjanje pH gojišča med gojenjem. +sol – z dodano soljo; -sol – brez dodane soli.

4.2 VPLIV PH-VREDNOSTI VZORCEV NA HEMOLITIČNO AKTIVNOST IN DRUGI BIOKEMIJSKI TESTI

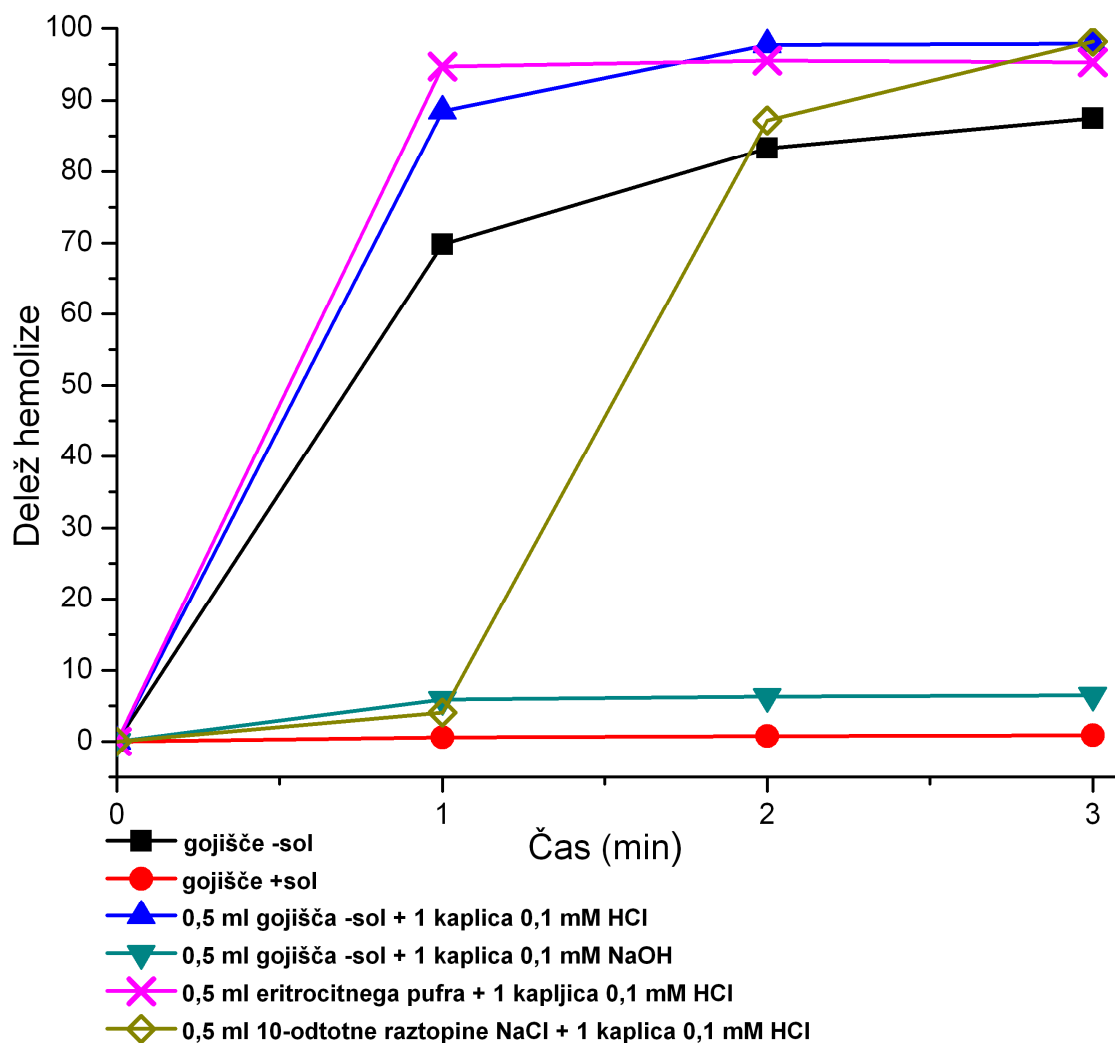
S temi testi smo želeli biokemijsko opredeliti hemolitično učinkovino. Preverjali smo pH stabilnost, polarnost, molekulska maso, naboj in temperaturno stabilnost. Rezultati so pokazali, da hemolitična učinkovina ni obstojna pri pH-vrednostih višjih od 2 (slika 10).



Slika 10: Vpliv pH-vrednosti vzorcev (gojišče brez dodane soli) na hemolizo. Pri računanju deleža hemolize smo uporabili A_{700} po 1 minuti.

Ugotovili smo tudi, da se HA z višanjem temperature ne izgubi, da je učinkovina pozitivno nabita in polarna (ni prikazano). Pri ugotavljanju molekulske mase učinkovine sta bila pri filtriranju preko membranskega filtra velikosti 10 kDa hemolitično aktivna tako filtrat kot retentat, medtem ko je bil pri filtriranju preko membranskega filtra 100 kDa hemolitično aktiven le filtrat (ni prikazano).

Zaradi nizkega pH gojišča in ugotovitve, da hemolitična učinkovina ni pH-stabilna, smo opravili še nekaj meritev HA pri različnih vzorcih (slika 11), da bi se prepričali ali je HA posledica nizkega pH ali prisotnosti hemolitične učinkovine iz glive *Aspergillus fumigatus*. Ugotovili smo, da je potek hemolize eritrocitov pri nizkem pH oziroma v 10-odstotni raztopini NaCl z nizkim pH zelo podoben poteku pri hemolitično aktivnem gojišču brez dodane soli in ekstraktu micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli.



Slika 11: Časovno spreminjanje hemolize pri različnih vzorcih (glej legendo). -sol – brez dodane soli; +sol – z dodano soljo.

Po analizi zgornjih grafov in na podlagi že znanih ugotovitev o lastnostih hemolitične učinkovine iz glive *Aspergillus fumigatus*, smo prišli do zaključka, da so rezultati merjenja HA lažno pozitivni in tako posledica nizkega pH gojišča in ne prisotnosti hemolitične učinkovine iz glive. Kljub temu smo nadaljevali z izolacijo hemolitične učinkovine (le iz ekstrakta micelija, ne pa tudi iz gojišča), saj smo sklepali, da se je zeleni protein sintetiziral v neaktivni obliki.

4.3 POSKUSI *IN VIVO*

4.3.1 Vpliv učinkovin glivnega ekstrakta na arterijski krvni tlak, EKG in dihanje

Zapis poskusa, v katerem smo merili vpliv učinkovin ekstrakta glivnega micelija na arterijski krvni tlak (aKT), EKG in dihanje anesteziranih podgan je prikazan na sliki 12. Prikazan je poskus opravljen z ekstraktom glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo.

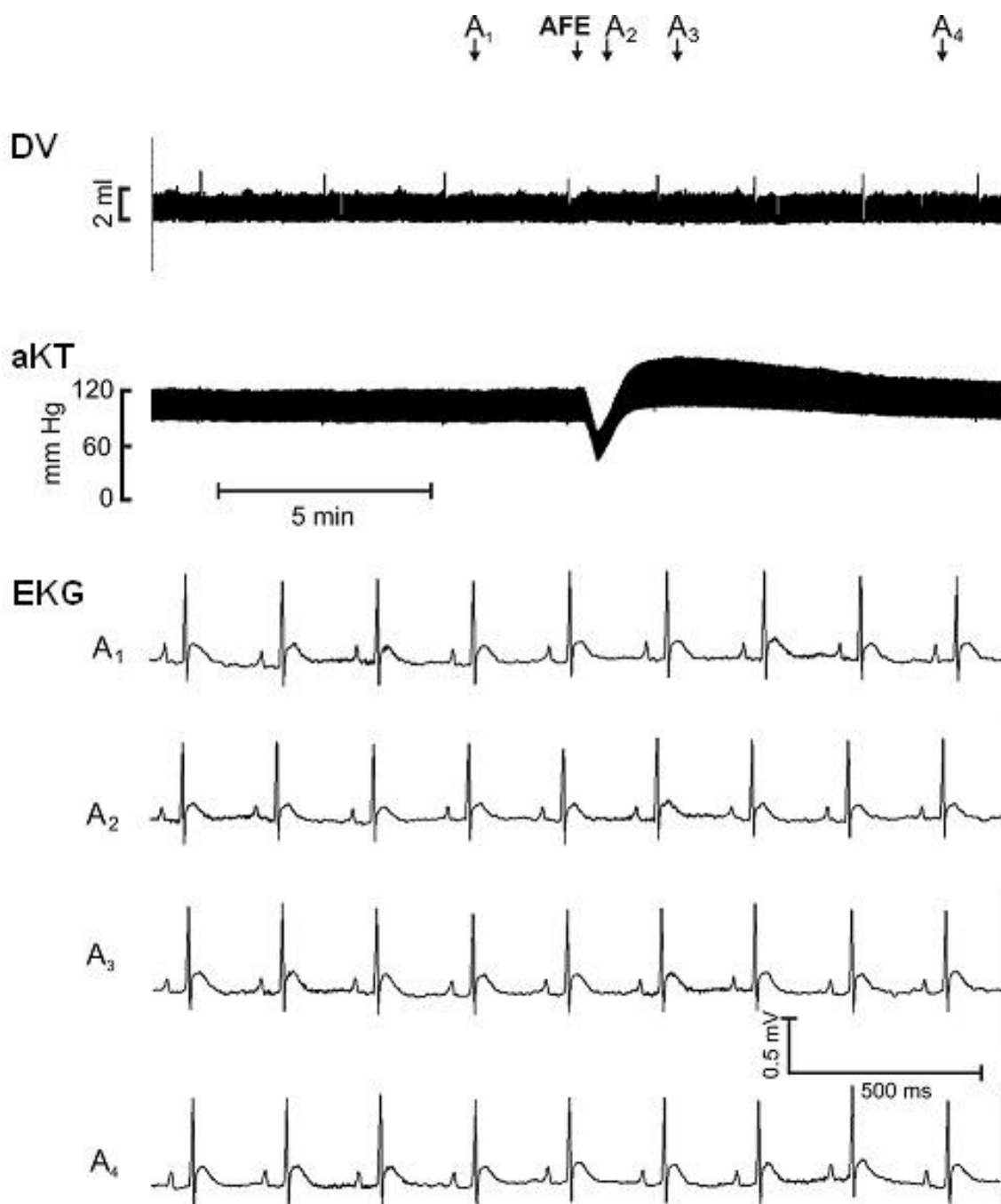
Ugotovili smo, da ekstrakt glivnega micelija, pridobljen iz gojišča brez dodane soli (izmerjena koncentracija suhe snovi v ekstraktu je bila $11 \text{ mg/ml} \pm 0,5 \text{ mg/ml}$), ne vpliva na aKT, EKG in dihanje (ni prikazano). Tudi v primeru merjenja vplivov učinkovin ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo (izmerjena koncentracija suhe snovi v ekstraktu je bila $52 \text{ mg/ml} \pm 3 \text{ mg/ml}$), nismo zaznali sprememb v dihalni aktivnosti in električni aktivnosti srca, se pa je pojavil prehodni vpliv na aKT. Takoj po vbrizganju 0,5 ml ekstrakta micelija je prišlo do pomembnega padca krvnega tlaka, ki mu je sledil porast, nato pa postopna vrnitev proti začetni vrednosti krvnega tlaka (slika 12). V kontrolnem poskusu, kjer smo poskusni živali injicirali 0,5 ml fiziološke raztopine, prehodnega padca aKT nismo izmerili. Opazen je bil samo kratkotrajen, majhen porast arterijskega tlaka (ni prikazano).

4.3.2 Analiza krvi

Podatki o količinah nekaterih elektrolitov (Na^+ , K^+ , Cl^- in Ca^{2+}) v krvi in hematokritu so podani v preglednici 2. Določili smo količino elektrolitov in hematokrit pred vbrizganjem 0,5 ml fiziološke raztopine ali 0,5 ml ekstrakta micelija ter po končanem poskusu. Količine merjenih parametrov pri živalih z vnešenimi 0,5 ml ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli ali z dodano soljo, se niso bistveno razlikovale od količin parametrov v kontrolni živali (vbrizg 0,5 ml fiziološke raztopine).

Preglednica 2: Vpliv 0,5 ml fiziološke raztopine (kontrola) ter 0,5 ml ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli ali z dodano soljo, na nekatere elektrolite v krvi (mmol/l) in hematokrit (Ht). * - vzorec odvzete krvi je bil premajhen, da bi lahko izmerili količino elektrolita.

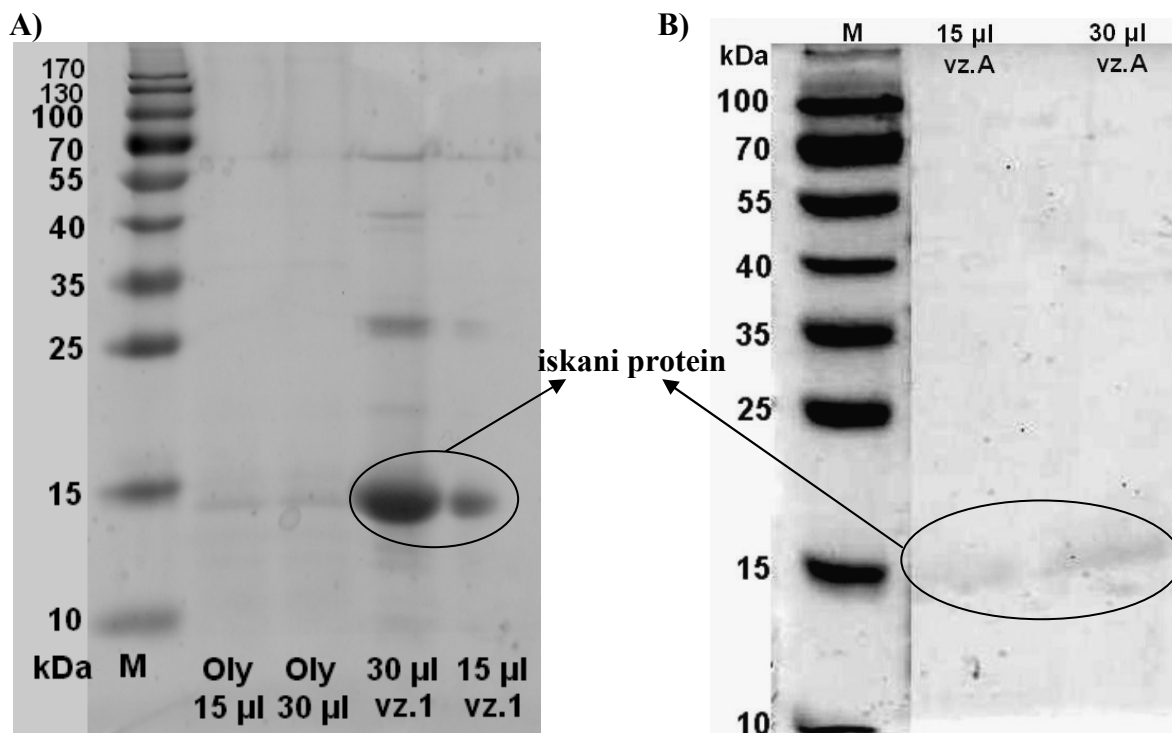
Vbrizg	0,5 ml fiziološke raztopine		0,5 ml ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli		0,5 ml ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo	
	pred vbrizgom	po poskusu	pred vbrizgom	po poskusu	pred vbrizgom	po poskusu
Na^+	147,9	137,0	126,8	*	143,2	142,5
K^+	5,3	5,26	5,9	*	5,52	5,57
Cl^-	101,6	98,0	78,2	*	100,1	106,9
Ca^{2+}	2,7	2,64	2,52	2,66	1,89	2,35
Ht (%)	54	50	48	42	48	44



Slika 12: Vpliv učinkovin ekstrakta glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo, na dihanje, arterijski krvni tlak in EKG anesteziranih podgan. Posnetki dihalne aktivnosti (DV) in arterijskega krvnega tlaka (aKT) prikazujejo časovni potek dihalne aktivnosti in arterijskega krvnega tlaka med celotnim poskusom. Posnetki EKG označeni z A₁-A₄ prikazujejo EKG v časovnih intervalih, ki ustrezajo intervalom, označenim na celotnem poskusu. AFE – vbrizg 0,5 ml ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo; A₁ – EKG aktivnost srca pred vbrizgom ekstrakta micelija; A₂-A₄ – EKG aktivnost srca po vbrizgu ekstrakta micelija.

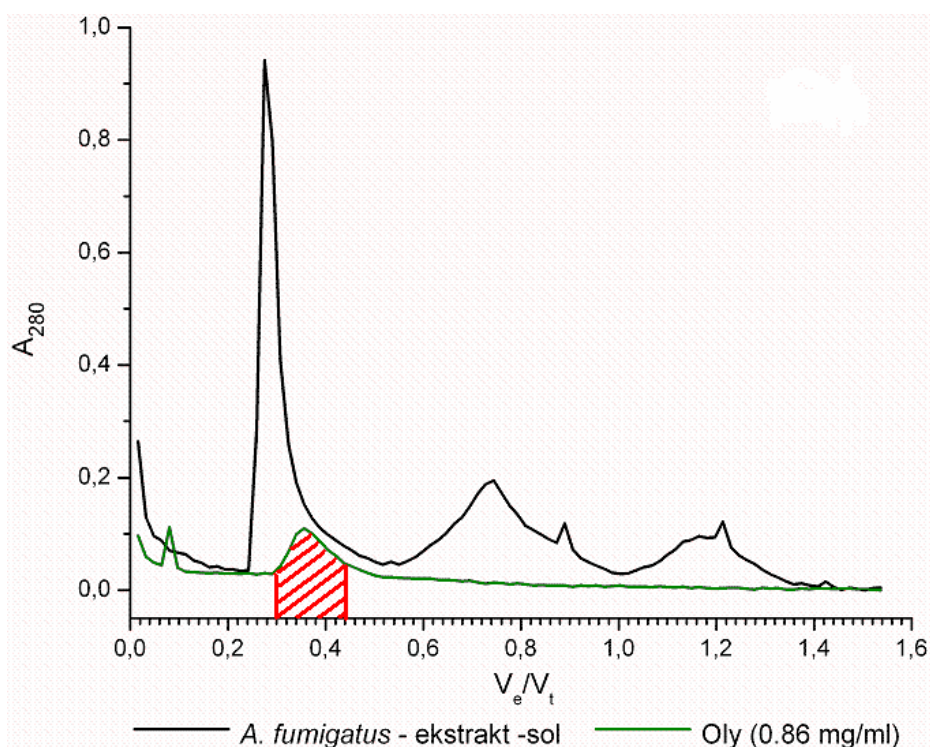
4.4 POSKUS IZOLACIJE HEMOLITIČNE UČINKOVINE

Izolacija je potekala v več stopnjah. Najprej smo pripravili ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in z dodano soljo. V obeh ekstraktih smo s pomočjo NaDS elektroforeze preverili prisotnost proteina velikosti približno 15 kDa (slika 13 A in B).



Slika 13: Analiza ekstraktov micelija z NaDS elektroforezo: A) ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in B) ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo. A) M – proteinski markerji; Oly – ostreolizin (koncentracija 1,5 mg/ml); vz.1 – ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli. B) M – proteinski markerji; vz.A – ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo.

Nato smo ekstrakta micelija frakcionirano obarjali z amonijevim sulfatom $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Hemolitično učinkovino smo od ostalih sestavin vzorca ločili z gelsko kromatografijo na gelu Sephadex G-50 (slika 14). Na kolono smo nanесли le izolat iz micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli. S pomočjo elucijskega diagrama za ostreolizin (slika 14), ki smo ga ločili pri enakih pogojih kot izolat micelija *A. fumigatus*, smo določili frakcije, v katerih se nahaja hemolitične učinkovina. To so frakcije od 20 do 27. Te frakcije smo združili in uporabili pri nadaljnjem delu (določitev aminokislinskega zaporedja – glej 3.2.3, vezava na lipidne vezikle – glej 3.2.5).



Slika 14: Elucijski diagram frakcij po gelski kromatografiji na gelu Sephadex G-50. A_{280} – absorpcija pri valovni dolžini 280 nm; V_e – elucijski volumen; V_t – totalni volumen; ekstrakt -sol – ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli; Oly – ostreolizin. Črtkano so označene hemolitično aktivne frakcije ostreolizina.

Na vsaki stopnji izolacije smo izmerili količino proteinov v vzorcu (preglednica 3) kot je opisano v točki 3.2.2.3. Ugotovili smo, da je bila skupna količina proteinov izolirana iz micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo, na različnih stopnjah izolacije za približno 50 - 75% manjša od količine proteinov izolirane iz micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli.

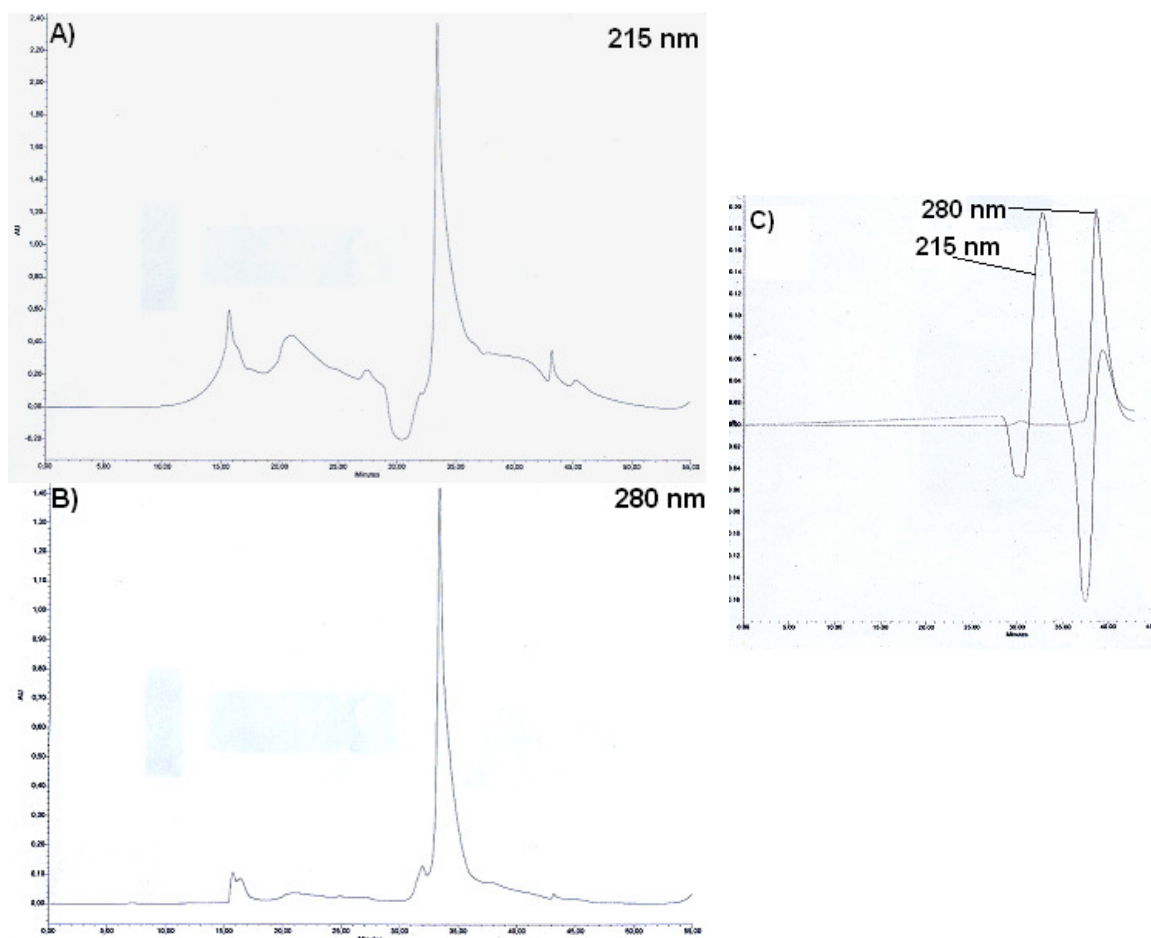
Preglednica 3: Količina proteinov na različnih stopnjah izolacije. Podatki v oklepajih se nanašajo na skupno količino proteinov (mg) na posamezni stopnji izolacije. Pri podatku označenem z * gre za napako v meritvi.

Stopnja izolacije	Micelij, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli – izolacija iz dveh gojišč (mg/ml)	Micelij, ki zrasel v gojišču z dodano soljo – izolacija iz enega gojišča (mg/ml)
ekstrakt micelija	4,67 (229)	1,5 (25,5)
obarjanje z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 35-odstotnega nasičenja (supernatant)	2,37 (120)	0,31* (4,9)
obarjanje z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 65-odstotnega nasičenja (supernatant)	1,98 (107)	0,7 (11,2)
oborina po obarjanju, raztopljena v 50 mM Tris pufru (pH 8,5)	2,24 (4,48)	1,0 (1)
gelska kromatografija (frakcija 20-27)	0,073 (1,2)	/

4.5 DOLOČITEV AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA

4.5.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC)

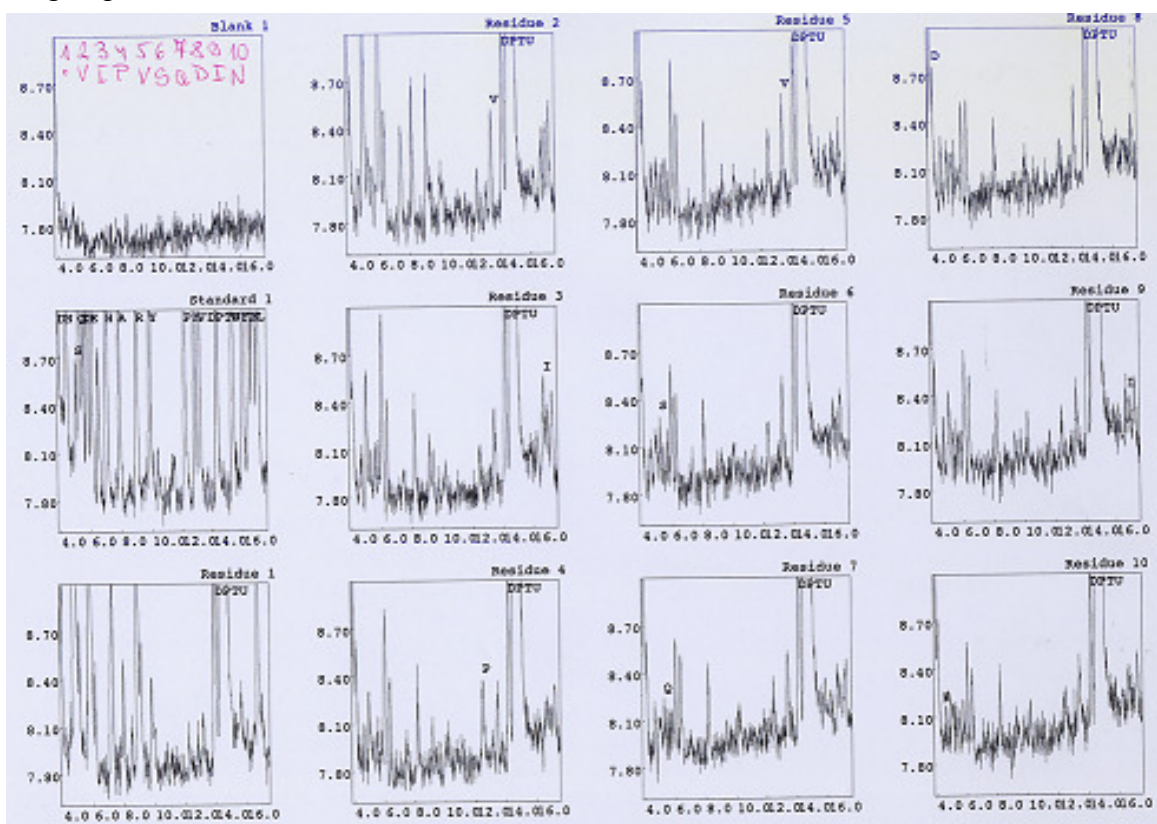
Z RP-HPLC smo preverili čistost združenih frakcij 20-27 po gelski kromatografiji, hkrati pa smo želeli vzorec tudi bolj koncentrirati in tako pripraviti za nadaljnje delo (določitev aminokislinskega zaporedja, glej 3.2.3.2). Poskus smo trikrat ponovili. Slika 15 prikazuje drugo ponovitev. Ugotovili smo, da je vzorec kljub manjšim nečistočam, ki smo jih zaznali pri valovnih dolžinah 280 in 215 nm, precej čist. Visoki vrh, ki ga vidimo na sliki 15 B, se je pojavil po 34-ih minutah. Ujeli smo ga v epruveto in uporabili za sekveniranje.



Slika 15: RP-HPLC: A) Vzorec (združene frakcije 20-27) po gelski kromatografiji (*A. fumigatus*), pri valovni dolžini 215 nm; B) Isti vzorec pri valovni dolžini 280 nm (visoki vrh pri 34 min); C) Ostreolizin (za primerjavo, 280 nm - visoki vrh pri 39 min). Valovna dolžina 215 nm – nečistoče; valovna dolžina 280 nm – protein/i.

4.5.2 Določitev aminokislinskega zaporedja

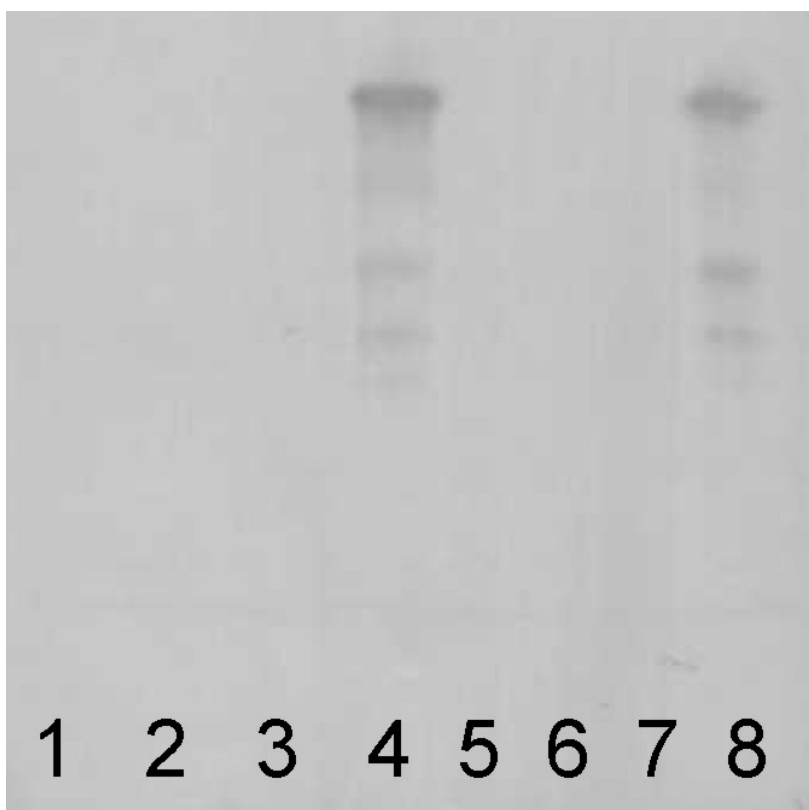
Aminokislinsko zaporedje potencialnega hemolizina smo določili z uporabo avtomatskega sekvenatorja Procise 492A (PE Applied Biosystems, ZDA). Kljub dovolj veliki koncentraciji proteina v vzorcu, ki smo ga sekvenirali, smo uspeli določiti le eno kratko zaporedje aminokislin: xVIPVSQDIN (valin-izolevcin-prolin-valin-serin-glutamin-aspartat-izolevcin-asparagin, slika 16). Razlog je bil najbrž v tem, da je bila večina materiala N-terminalno blokirana. Zaporedje aminokislin, ki smo ga dobili, smo primerjali z zaporedji aminokislin v bazah podatkov, da bi poiskali proteine s podobnim zaporedjem, a nismo dobili nobene posebno visoke homologije. Niti z Asp-hemolizinom niti s kakšnim drugim proteinom iz baze.



Slika 16: Rezultati določanja aminokislinskega zaporedja s sekvenatorjem Procise 492A (PE Applied Biosystems, ZDA).

4.6 PRENOS WESTERN

S to metodo smo skušali ugotoviti, če je v kateremu od ekstraktov micelija plesni *Aspergillus fumigatus* prisoten protein, ki bi navzkrižno reagiral s protitelesi za ostreolizin. Za pozitivno kontrolo nam je služil ostreolizin. Ugotovili smo, da v pregledanih ekstraktih take učinkovine ni (slika 17).



Slika 17: Prenos western. 1 in 5 – ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo; 2 in 6 – ekstrakt dveh micelijev, ki sta zrasla v gojišču brez dodane soli; 3 in 7 – ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli; 4 in 8 – ostreolizin (pozitivna kontrola).

4.7 VEZAVA HEMOLITIČNE UČINKOVINE NA LIPIDNE VEZIKLE

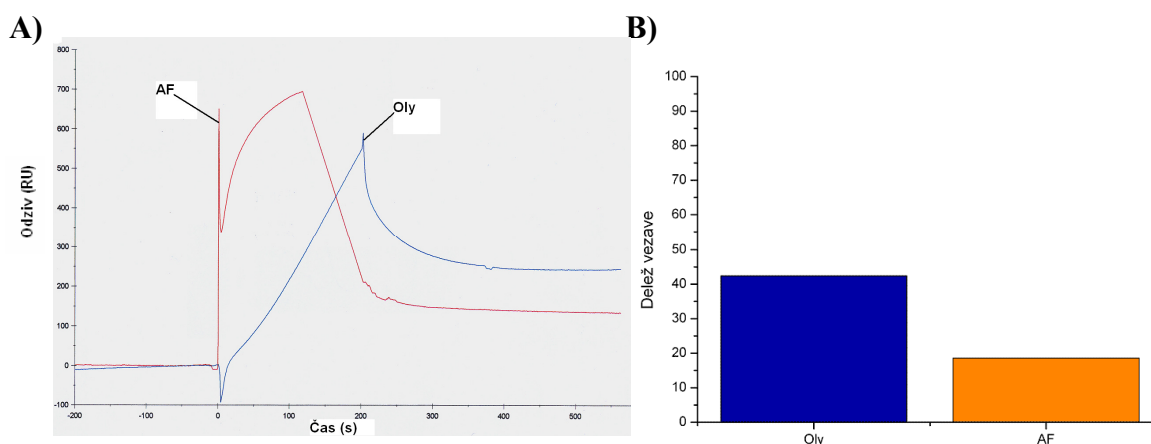
Vezavo učinkovine na lipidne vezikle iz POPC ter iz sfingomielina in holesterola (v razmerju 1:1 mol/mol) smo preverili s pomočjo površinske plazmonske resonance (SPR). Kot kontrolo smo uporabili ostreolizin, ki smo ga pred nanosom razredčili, tako da je bila njegova koncentracija enaka izmerjeni koncentraciji proteinov v združenih frakcijah 20-27.

4.7.1 Vezava na lipidne vezikle iz sfingomielina in holesterola (SM in Hol)

Slika 18 A prikazuje vezavo ostreolizina in učinkovine iz vzorca glive *Aspergillus fumigatus* na lipidne vezikle iz SM in Hol. Ostreolizin smo uporabili kot pozitivno kontrolo. Vidimo, da se je ostreolizin vezal, saj je prišlo do porasta odziva za 590

resonančnih enot (RU). Ko smo z vbrizgavanjem vzorca zaključili, je odziv padel, a le do 250 RU. To pomeni, da je približno 42% ostreolizina ostalo vezanega na lipidne vezikle (slika 18 B). Tudi ob nanosu učinkovine iz vzorca glive *A. fumigatus* je prišlo do porasta odziva in torej do vezave analita na ligand. Po koncu vbrizgavanja vzorca pa je odziv padel, a je tako kot pri ostreolizinu ostal nad nič, kar pomeni, da je nekaj analita ostalo trajno vezanega na ligand.

Ugotovili smo, da se učinkovina iz vzorca glive *A. fumigatus* veže na lipidne vezikle iz SM in Hol, trajno pa se na lipide veže le 19% učinkovine (slika 18 B).

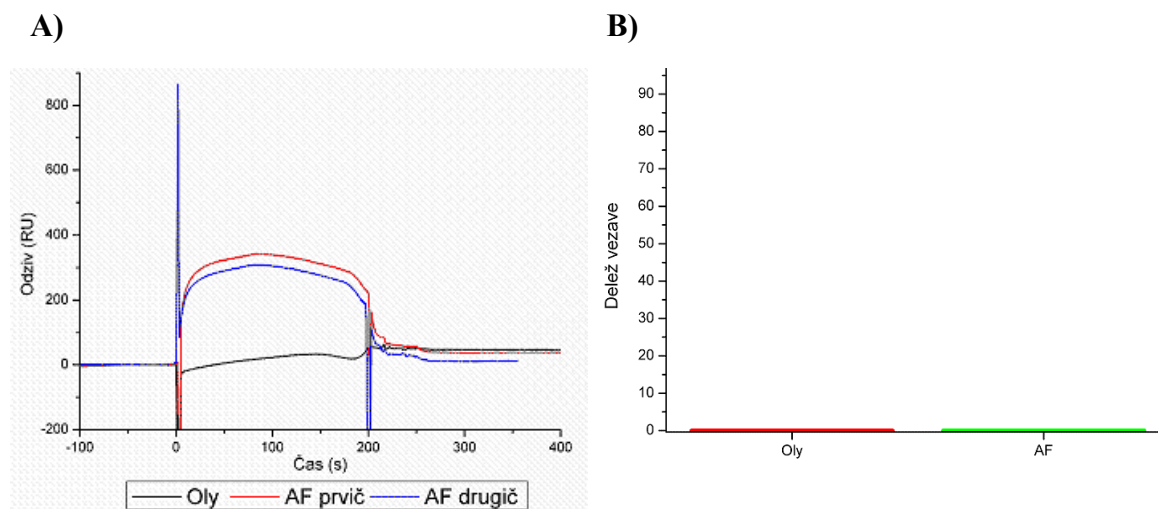


Slika 18: A) Vezava ostreolizina in učinkovine iz vzorca glive *Aspergillus fumigatus* na lipidne vezikle iz SM in Hol; B) Delež vezave ostreolizina in učinkovine iz vzorca glive *Aspergillus fumigatus* po prenehanju vbrizgavanja vzorca. AF – učinkovina iz vzorca glive *Aspergillus fumigatus*; Oly – ostreolizin.

4.7.2 Vezava na lipidne vezikle iz POPC

Na sliki 19 je prikazana vezava učinkovine iz vzorca glive *A. fumigatus* in ostreolizina na lipidne vezikle POPC. Ostreolizin nam je služil kot negativna kontrola. Vidimo, da pri njem do vezave ne pride, saj je odziv ves čas nič. Odziv učinkovine iz vzorca glive *A. fumigatus* se razlikuje od odziva ostreolizina. Vidimo, da je po vbrizgavanju vzorca prišlo do spremembe odziva za 300 RU, kar pomeni, da se je analit vezal na ligand. Po približno 200 sekundah, ko smo prenehali z vbrizgavanjem vzorca, je prišlo do disociacije analita z liganda in odziv se je ponovno vrnil na nič.

Ugotovili smo, da se učinkovina iz vzorca glive *A. fumigatus* sicer veže na lipidne vezikle iz POPC, vendar pa ta vezava ni trajna.



Slika 19: A) Vezava ostreolizina in učinkovine iz vzorca glive *Aspergillus fumigatus* na lipidne vezikle iz POPC; B) Delež vezave ostreolizina in učinkovine iz vzorca glive *Aspergillus fumigatus* po prenehanju vbрызganja vzorca. Oly – ostreolizin; AF - učinkovina iz vzorca glive *Aspergillus fumigatus*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Iz oportunistično patogene plesni *Aspergillus fumigatus* smo poskušali izolirati hemolitično učinkovino Asp-hemolizin. Gre za sekretorni protein (član egerolizinske družine proteinov), ki ga gliva izloča med okužbo gostitelja (Sakaguchi in sod., 1975). Toksin je hemolitičen za eritrocite različnih sesalskih vrst, citotoksičen za makrofage, fibroblaste, levkocite in endotelijske celice *in vitro* ter smrten za poskusne živali (Ebina in sod., 1982 in 1985). Izolirali smo ga iz seva A249 (EXF 4194), za katerega so preliminarni rezultati pokazali, da je hemolitična aktivnost vodnega ekstrakta, v primerjavi z drugimi testiranimi sevi vrste *A. fumigatus*, največja. Poleg tega, da gliva proizvaja Asp-hemolizin, ki bi lahko bil tarča za izdelavo novih zdravil, cepiv in specifičnih načinov zdravljenj okužb s to glivo, bi protein, zaradi podobnosti z drugimi egerolizini, lahko uporabili tudi kot označevalec za s holesterolom bogate membranske domene ter za proučevanje strukturnih in funkcionalnih lastnosti bioloških membran (Chowdhury in sod., 2008). Ker so preliminarni poskusi pokazali, da se hemolitična aktivnost močno poveča, če gojimo glivo v razmerah s povečano slanostjo, smo želeli ovrednotiti vpliv takega gojišča na proizvodnjo hemolitične učinkovine. Ugotovitve te raziskave bi nam lahko pomagale pri ocenjevanju stopnje tveganja uživanja s soljo konzerviranih prehrabnih izdelkov, na katerih je prišlo do rasti glive *A. fumigatus*.

Glivo smo gojili 29 dni. Med gojenjem smo od drugega tedna gojenja naprej, vsak teden, odvzeli en micelij, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli, in en micelij, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo ter ugotavljali hemolitično aktivnost gojišča in grobega ekstrakta micelija. Rezultati so pokazali, da sta hemolitično aktivna gojišča brez dodane soli in ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli. Ko smo izmerili pH gojišča po vsakem tednu gojenja, smo ugotovili, da se gojišča med gojenjem močno zakisa (pri gojiščih brez dodane soli malo bolj kot pri gojiščih z dodano soljo - slika 9). To zakisanje je po vsej verjetnosti posledica izločanja metabolitov, ki jih gliva proizvaja med rastjo (katera so to, pri glivi *A. fumigatus* še ni znano), ne pa tudi prisotnosti glukoze v gojišču, saj je bila njena koncentracija prenizka, da bi vplivala na metabolizem glive in posledično na znižanje pH-vrednosti gojišča. Zaradi nizkega pH smo opravili še nekaj poskusov, da bi preverili pH stabilnost hemolitične učinkovine, spreminjanje HA s pH gojišča (brez dodane soli), obnašanje samih eritrocitov pri nizkem pH oziroma v 10-odstotni raztopini NaCl z nizkim pH ter temperaturno stabilnost hemolitične učinkovine. Ugotovili smo:

- da učinkovina ni pH stabilna, saj smo hemolitično aktivnost zaznali le pri pH 2, medtem ko je pri višjih vrednostih pravzaprav ni bilo (slika 10),
- da delež hemolize močno pade med pH 2 in 3 (izmerjeni pH vseh gojišč je bil med 2 in 3, pH gojišča brez dodane soli pa je bil rahlo nižji kot pH gojišča z dodano soljo, tako da je to lahko razlog, da gojišča z dodano soljo in ekstrakt micelija, ki je zrasel v

gojišču z dodano soljo nista hemolitično aktivna, gojišče brez dodane soli in ekstrakt micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli pa sta),

- da je potek hemolize eritrocitov pri nizkem pH (slika 11) oziroma v 10-odstotni raztopini NaCl z nizkim pH (kontrolna poskusa brez ekstraktov glive) zelo podoben poteku pri hemolitično aktivnem gojišču brez dodane soli in ekstraktu micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli, in
- da se hemolitična aktivnost ohranja s segrevanjem na 100°C.

Po vseh teh analizah in na podlagi že znanih ugotovitev o lastnostih Asp-hemolizina (stabilen med pH 4-10, optimalna hemolitična aktivnost pri pH 5-7, izguba hemolitične aktivnosti s segrevanjem na 50°C za 40 minut ali 45°C za 100 minut [Sakaguchi in sod., 1975]) smo prišli do zaključka, da so rezultati merjenja HA lažno pozitivni in tako posledica nizkega pH gojišča in ne prisotnosti Asp-hemolizina iz glive. S poskusi *in vivo*, kjer smo spremljali vpliv učinkovin ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in z dodano soljo, na električno aktivnost srca, arterijski krvni tlak (aKT) in dihanje poskusnih živali smo se dodatno prepričali o tem, da gliva ni proizvajala aktivne oblike Asp-hemolizina. Učinkov na spremljane parametre namreč ni bilo, le po vbrizgu 0,5 ml ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo, je prišlo do pomembnega padca aKT, ki mu je sledil porast, nato pa postopna vrnitev proti začetni vrednosti. Tudi analiza nekaterih elektrolitov (Na^+ , K^+ , Cl^- in Ca^{2+}) in hematokrita v krvi poskusnih živali je pokazala, da se količine merjenih parametrov pri živalih, ki so prejele 0,5 ml ekstrakta micelija bodisi iz gojišča brez dodane soli bodisi z dodano soljo, ne razlikujejo bistveno od količin merjenih parametrov pri kontrolni živali (vbrizg 0,5 ml fiziološke raztopine). Podobne poskuse *in vivo* so opravili z ostreolizinom, citolitičnim proteinom iz glive *Pleurotus ostreatus*, ki tako kot Asp-hemolizin spada v egerolizinsko družino proteinov, za oba proteina pa je značilna 43-odstotna aminokislinska identičnost (preglednica 1). Rezultati poskusov so pokazali, da po vbrizgu LD₅₀ ostreolizina (1170 µg/kg) pride do prenehanja dihanja, srčne aritmije, porasta, nato pa progresivnega padca aKT, v krvi pa se po opravljenem poskusu poveča količina kalija in hematokrit (Žužek in sod., 2006). Ker naj bi imela oba toksina podobne toksične učinke na poskusnih živalih (Maličev in sod., 2007), v našem primeru pa toksičnih učinkov ekstrakta micelija na spremljane parametre skoraj ni bilo, smo s tem res dodatno potrdili, da gliva *A. fumigatus* med rastjo v tekočem gojišču YNB ni proizvajala hemolitično aktivne oblike Asp-hemolizina. Kljub temu smo nadaljevali z izolacijo hemolitične učinkovine (a le iz ekstrakta micelija, ne pa tudi iz gojišča), saj smo sklepali, da se je zeleni protein morda sintetiziral v neaktivni obliki.

Izolacije smo se lotili po že prej opisanem postopku (Sakaguchi in sod., 1975). Na prvi stopnji izolacije (priprava ekstraktov glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in z dodano soljo), smo z NaDS elektroforezo preverili prisotnost proteina velikosti približno 15 kDa, kar naj bi ustrezalo velikosti Asp-hemolizina (Ebina in sod., 1994). V

obeh vzorcih ekstrakta smo prisotnost te velikosti proteina potrdili (slika 13). V nadaljnjih stopnjah izolacije (frakcionirano obarjanje z amonijevim sulfatom in gelska kromatografija) proteina velikosti 15 kDa nismo več mogli zaslediti z NaDS elektroforezo, saj je bila njegova koncentracija prenizka, tako da smo si pomagali drugače. Frakcije po gelski kromatografiji, v katerih je po vsej verjetnosti iskana učinkovina, smo določili s pomočjo ostreolizina, ki ima poleg 43-odstotne identičnosti aminokislinskega zaporedja z Asp-hemolizinom tudi zelo podobno molekulsko maso (ostreolizin 15 kDa in Asp-hemolizin 14 kDa). Obe gelski kromatografiji smo izvedli v enakih razmerah (glej 3.2.2.1). V primeru ostreolizina smo nato določili hemolitično aktivne frakcije in te iste frakcije združili po gelski kromatografiji ekstrakta glive *A. fumigatus*. Na vsaki stopnji izolacije smo izmerili količino izoliranih proteinov in ugotovili, da se količine proteinov, izolirane iz micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in v gojišču z dodano soljo, med seboj razlikujejo. Skupna količina proteinov izolirana iz micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo, je bila na vsaki stopnji izolacije za približno 50 – 75% manjša od količine proteinov izolirane iz micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli. Na podlagi teh rezultatov smo prišli do sklepa, da povečana koncentracija soli v rastnem mediju inhibira tvorbo proteinov in ne stimulira, kot smo pričakovali.

Preden smo se lotili določanja aminokislinskega zaporedja izoliranega proteina, smo združene frakcije 20-27 koncentrirali z RP-HPLC ter zraven preverili še čistost vzorca. Ugotovili smo, da je vzorec kljub manjšim nečistočam precej čist. Aminokislinsko zaporedje, dolžine devet aminokislin, ki smo ga določili s pomočjo avtomatskega sekvenatorja, ni bilo dovolj veliko, da bi v bazi proteinov lahko našli proteine s podobnim zaporedjem. Razlog, da nam je uspelo določiti zgolj devet aminokislin, kljub dovolj veliki koncentraciji proteina, je najbrž N-terminalna blokiranost večine materiala. Če dobljeno zaporedje aminokislin izoliranega proteina primerjamo z zaporedjem aminokislin prekursorja Asp-hemolizina (slika 4), v slednjem ne najdemo nič podobnega.

Da bi se dodatno prepričali, ali nam je uspelo izolirati hemolitično neaktivno obliko Asp-hemolizina ali ne, smo preverili še navzkrižno reaktivnost ekstrahiranih snovi s protitelesi za ostreolizin in vezavo izoliranega proteina na lipidne vezikle iz POPC ter sfingomielina in holesterola, kjer smo si ponovno pomagali z ostreolizinom kot negativno oziroma pozitivno kontrolo.

Za preverjanje navzkrižne reaktivnosti ekstrahiranih snovi s protitelesi za ostreolizin, smo se odločili na podlagi dveh znanih dejstev:

- da Asp-hemolizin, izražen v rekombinantni obliki s pomočjo bakterije *Escherichia coli*, še vedno reagira s protitelesi za Asp-hemolizin, ni pa več hemolitično aktiven (Kumagai in sod., 2002) in

– da egerolizin, protein, izoliran iz glive *Agrocybe aegerita* in član egerolizinske družine proteinov, reagira navzkrižno s protitelesi za ostreolizin (Vidic in sod., 2005).

Kljub pričakovanjem, da bo med ekstrahiranimi snovmi prišlo do navzkrižne reaktivnosti s protitelesi za ostreolizin, se to ni zgodilo. V ekstraktu torej ni bilo snovi, ki bi navzkrižno reagirala s protitelesi za ostreolizin.

Zaradi dejstva, da rekombinantni Asp-hemolizin poleg reaktivnosti s protitelesi, ohrani tudi sposobnost vezave na ox-LDL (Kumagai in sod., 2002), smo se odločili za preverjanje vezave izoliranega proteina na lipidne vezikle iz POPC ter sfingomielina in holesterola (1:1) s pomočjo SPR, kar bi nam še dodatno pomagalo pri ugotavljanju prisotnosti neaktivne oblike hemolitične učinkovine. Kot že omenjeno, smo za kontrolo uporabili ostreolizin. Zaradi podobnosti aminokislinskega zaporedja med Asp-hemolizinom in ostreolizinom, podobnih citolitičnih učinkov na različne celice in podobnih toksičnih učinkov na eksperimentalne živali (Maličev in sod., 2007), smo sklepali, da se bosta v primeru vezave na lipidne vezikle iz POPC ter sfingomielina in holesterola obnašala podobno. Ugotovili smo, da temu ni tako. Izolirani protein se je na lipidne vezikle iz POPC vezal, za razliko od ostreolizina, ki se ni, a vezava ni bila trajna. V primeru lipidnih veziklov iz sfingomielina in holesterola pa je bila vezava sicer trajna pri obeh, razlikoval pa se je delež vezanega proteina na vezikle, ki je bil v primeru ostreolizina 42-odstoten, v primeru izoliranega proteina pa manjši, 19-odstoten. Zaradi očitnih odstopanj obnašanja izoliranega proteina pri vezavi na lipidne vezikle od obnašanja ostreolizina ter že prej omenjenih ugotovitev o neujemanju določenega zaporedja aminokislin izoliranega proteina z zaporedjem aminokislin prekurzorja Asp-hemolizina in odsotnosti snovi v ekstraktu micelija, ki bi navzkrižno reagirala s protitelesi za ostreolizin, smo prišli do zaključka, da nam tudi v neaktivni obliki hemolitične učinkovine ni uspelo izolirati.

Kljub našim prizadevanjem, da bi izolirali Asp-hemolizin, v aktivni ali neaktivni obliki, nam na koncu ni uspelo. Kaj natančno je vzrok, da gliva toksina ni proizvajala, ni znano, lahko pa na podlagi nekaterih dosedanjih ugotovitev sklepamo, da tiči razlog v glivnem sev, sestavi medija, času gojenja ali/in razmerah, v katerih smo gojili kulturo (Latgé, 1999).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Gliva *Aspergillus fumigatus* je oportunistični patogen, ki pri ljudeh in živalih povzroča razna huda obolenja. Medtem ko so okužbe pri zdravih osebah redke, se število okužb pri imunsko oslabljenih osebah v zadnjih dvajsetih letih povečuje (Latgé, 1999). Najbolj problematična je invazivna aspergiloza. Ta okužba se običajno začne v pljučih, pri pritrjevanju in invaziji glive na pljučni epitelij pa sodelujejo različne biološko aktivne molekule. Ena izmed njih je toksin Asp-hemolizin. Gre za sekretorni protein (Ebina in sod., 1994), ki spada v egerolizinsko družino proteinov, kamor uvrščamo tudi egerolizin iz glive *Agrocybe aegerita*, ostreolizin in pleurotolizin A iz glive *Pleurotus ostreatus*, dva hemolizinu podobna proteina iz bakterije *Clostridium bifermentas* ter še druge proteine ali cDNA transkripte iz gliv, bakterij in rastlin z zelo podobnimi sekvencami.

Asp-hemolizin so prvič izolirali v zgodnjih sedemdesetih letih iz homogenata glivnega micelija. Sestavljen je iz 131 aminokislinskih ostankov, njegova molekulska masa pa je 14 kDa. Toksin je hemolitičen za eritrocite različnih sesalskih vrst, citotoksičen za makrofage, fibroblaste, levkocite in endotelijske celice *in vitro* ter smrten za poskusne živali (Ebina in sod., 1982 in 1985). Z boljšim poznavanjem njegovih lastnosti bi ga lahko uporabili: kot tarčo za izdelavo novih zdravil ali cepiv; kot specifični označevalec za lipidne rafte ter kot orodje pri proučevanju strukturnih in funkcionalnih lastnosti bioloških membran. Ker so preliminarni poskusi pokazali, da se hemolitična aktivnost ekstraktov micelija glive *A. fumigatus* močno poveča, če ga gojimo v razmerah s povečano slanostjo, bi z raziskovanjem v tej smeri lahko prišli do ugotovitev, ki bi nam pomagale oceniti stopnjo tveganja pri uživanju s soljo konzerviranih prehrabnenih izdelkov, na katerih je prišlo do rasti te glive.

V diplomskem delu smo se lotili izolacije Asp-hemolizina, hemolitične učinkovine iz plesni *Aspergillus fumigatus*, po že opisanem postopku (Sakaguchi in sod., 1975), želeli pa smo ovrednotiti tudi vpliv povečane koncentracije soli v rastnem mediju na nastanek same učinkovine in drugih proteinov. Glivo smo gojili v tekočih gojiščih YNB brez dodane soli in z dodano soljo (10- odstotni NaCl), 29 dni, na 25°C. Vsak teden, od drugega tedna gojenja dalje, smo odvzeli vzorec iz gojišča brez dodane soli in vzorec iz gojišča z dodano soljo ter preverjali hemolitično aktivnost vzorcev gojišča in grobega ekstrakta micelija. Kljub sprva pozitivnim rezultatom meritev hemolitične aktivnosti gojišča brez dodane soli in ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli, smo na koncu ugotovili, da gre za lažne pozitivne rezultate in da hemolitična aktivnost ni posledica prisotnosti Asp-hemolizina v gojišču ali ekstraktu plesni, temveč nizkega pH gojišča. Dodatno smo se o tem prepričali s poskusi *in vivo*, kjer smo spremljali vpliv učinkovin ekstrakta micelija, ki

je zrasel v gojišču brez dodane soli in tistega iz gojišča z dodano soljo, na električno aktivnost srca, arterijski krvni tlak in dihanje poskusnih živali. Kljub pomembnemu kratkotrajnemu padcu tlaka, do katerega je prišlo po vbrizgu 0,5 ml ekstrakta micelija, ki je zrasel v gojišču z dodano soljo, učinkov na druge parametre nismo zaznali. Tudi analiza nekaterih elektrolitov (Na^+ , K^+ , Cl^- in Ca^{2+}) in hematokrita v krvi poskusnih živali je pokazala, da se količine merjenih parametrov pri živalih tretiranih z 0,5 ml ekstraktov micelijev ne razlikujejo bistveno od količin merjenih parametrov v kontrolni živali (vbrizg 0,5 ml fiziološke raztopine). Podobne poskuse *in vivo* so opravili z ostreolizinom, Asp-hemolizinu sorodnim proteinom. Ker naj bi imela oba toksina podobne toksične učinke na poskusnih živalih, naši rezultati pa so odstopali od rezultatov, dobljenih za ostreolizin, je bil to dodaten dokaz, da gliva med gojenjem v tekočem gojišču YNB res ni proizvajala aktivne oblike Asp-hemolizina.

Čeprav nismo uspeli izolirati hemolitične učinkovine v aktivni obliki, smo z izolacijo (le iz ekstrakta micelija) nadaljevali, saj smo sklepali, da je učinkovina morda nastala v neaktivni obliki (iskali smo protein velikosti približno 15 kDa). Najprej smo pripravili ekstrakta micelija, ki sta zrasla ali v gojišču brez dodane soli ali v takem z dodano soljo. Temu je sledilo frakcionirano obarjanje z amonijevim sulfatom ter gelska kromatografija (ta korak smo izvedli le z ekstraktom micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli). Frakcije, kjer se je izločil zeleni protein (pri določitvi smo si pomagali z ostreolizinom), smo združili, koncentrirali z RP-HPLC ter določili aminokislinsko zaporedje. Na žalost je bilo le-to prekratko (devet aminokislin), da bi lahko v bazi proteinov poiskali proteine s podobnim zaporedjem aminokislin in prav nič podobno zaporedjem devetih aminokislin v prekursorju za Asp-hemolizina. Da nam res ni uspelo izolirati hemolitične učinkovine v neaktivni obliki, smo potrdili s preverjanjem navzkrižne reaktivnosti učinkovin ekstrakta glivnega micelija, ki je zrasel v gojišču brez dodane soli in z dodano soljo, s protitelesi za ostreolizin (navzkrižne reaktivnosti ni bilo, čeprav smo jo pričakovali) in vezave izoliranega proteina na lipidne vezikle iz palmitoiloleoilfosfatidilholina (POPC) ter sfingomielina in holesterola (izolirani protein se je pri vezavi na lipidne vezikle obnašal drugače kot ostreolizin, kar se ni skladalo z našimi pričakovanji). Dejstvo, da nam ni uspelo izolirati hemolitične učinkovine ne v aktivni, ne v neaktivni obliki, kaže na to, da gliva *A. fumigatus* med rastjo v tekočem YNB gojišču ni proizvajala iskane hemolitične učinkovine. Z merjenjem koncentracije proteinov na posamezni stopnji izolacije pa smo ugotovili, da sol zaviralno vpliva na sintezo proteinov.

6.2 SUMMARY

The fungus *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic pathogen that causes severe infections in animals and humans. While the infections in immunocompetent patients are rare, the number of infections in immunocompromised patients has been rising for the past 20 years (Latgé, 1999). Invasive aspergillosis is the most problematic of them all. This infection starts in lungs. For adhesion and invasion of lung epithelium, the fungus produces various biologically active molecules, such as the toxic protein Asp-hemolysin. This secretory protein (Ebina et al., 1994) belongs to aegerolysin protein family. Other members of this family include aegerolysin from fungus *Agrocybe aegerita*, ostreolysin and pleurotolysin A from fungus *Pleurotus ostreatus*, two hemolysin-like proteins from bacterium *Clostridium bifermentans* and other proteins as well as cDNA transcripts from fungi, plants and bacteria with similar sequences.

Asp-hemolysin was first isolated in the early seventies from mycelial homogenate. It consists of 131 amino acid residues and has a molecular mass of 14 kDa. The toxin is hemolytic for erythrocytes of various mammalian species, cytotoxic for macrophages, fibroblasts, leucocytes and endothelial cells *in vitro* and lethal for experimental animals (Ebina et al., 1982 and 1985). With better knowledge of its characteristics, we could use this toxin: as a target for the production of new medicines and vaccines, as specific marker for lipid rafts and as a tool for studying structural and functional properties of biological membranes. Preliminary results also showed the increase of hemolytic activity in mycelial extracts of the fungus *A. fumigatus* that grew in the medium with increased salt concentration. Results of this research could help us estimate the risks of consuming food preserved with salt that was contaminated with *A. fumigatus*.

In my graduation thesis, we tried to isolate Asp-hemolysin, a hemolytic compound from the mould *Aspergillus fumigatus*. We also tried to evaluate the effect of increased concentration of the salt in growth medium on the production of the hemolytic compound and other proteins. For isolation, we used the procedure already described by Sakaguchi et al. in 1975. The fungus was grown in liquid YNB medium without or with salt (10% NaCl) for 29 days, at a temperature of 25°C. Each week of the growth, from the second week on, we collected one medium without and one medium with salt to test the medium and rough mycelial extract for hemolytic activity. We found the medium without salt and the extract of mycelia, which grew in the medium without salt, to be hemolytically active. Nevertheless, later on we realised that hemolytic activity was positive due to low pH of growth medium and not due to the presence of Asp-hemolysin in the medium or extract of the mould. Additional proof for absence of active Asp-hemolysin was the *in vivo* experiment, by which we recorded the effect of the compounds in the extract of mycelia,

which grew in the medium without salt and with salt, on the electric activity of the heart (ECG), arterial blood pressure (aBP) and breathing of the experimental animals. Even though we detected a significant fall of the aBP after injection of the extract of mycelia that grew in the medium with salt, there were no effects detected on other recorded parameters. In addition, the analyses of some electrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^- and Ca^{2+}) and hematocyte in blood of the experimental animals showed that the quantities of measured parameters for animals treated with 0,5 ml of mycelial extracts did not differ significantly from the quantities of measured parameters for the control animal (injection of 0,5 ml of physiological saline). Similar experiments *in vivo* had been done with ostreolysin, an Asp-hemolysin isoform. It is known that both toxins have similar toxic effects in experimental animals. In our case, the results deviated from the results for ostreolysin. That confirmed us that the fungus had not produced active Asp-hemolysin during its growth in liquid YNB medium.

Even though we did not succeed to isolate a hemolytic compound in active form, we continued with the isolation (only from mycelial extract), because we presumed that the compound was perhaps formed in inactive form (we were looking for a protein with the approximate size of 15 kDa). We prepared the extracts of mycelia that grew in the medium without and with salt. Then we continued with precipitation of the extract with ammonium sulphate and gel chromatography (we performed this step only for the extract of mycelia that grew in the medium without salt). After chromatography, we joined fractions where the protein eluted (gel chromatography of ostreolysin helped us to determine the right fractions), concentrated them with RP-HPLC and determined the amino acid sequence. Unfortunately, the determined sequence (nine amino acids) was too short to find proteins with similar amino acid sequences in the base of proteins, and did not resemble any of the nine amino acid sequences in Asp-hemolysin precursor. Two more experiments confirmed that we failed to isolate the hemolytic compound in its inactive form. First, the compounds from the extract of mycelia, which grew in the medium without salt, did not cross-react with the antibodies for ostreolysin, even though we expected some cross-reactivity. Second, binding of the isolated protein to lipid vesicles from palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine (POPC) and sphingomyelin-cholesterol was different from those of ostreolysin, which was not in accordance with our expectations. The fact that we did not manage to isolate the hemolytic compound neither in active nor in inactive form indicates that the fungus *A. fumigatus* did not produce the hemolytic compound during its growth in liquid YNB medium. On each level of isolation process, we also measured the concentration of proteins in the samples. We realised that salt had inhibitory effect on the production of proteins.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

- Anderluh G., Beseničar M., Kladnik A., Lakey J. H. in Maček P.** 2005 *Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin*. Analytical Biochemistry, 344, 1: 43-52.
- Aspergillus fumigatus***. 2009. School of Molecular and Biomedical Sciences, The University of Adelaide (12.4.2009). <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/aspergillus10.html> (12.4.2009)
- Atherton G., Bartholomew J., Giles P.** *Aspergillus Genoms, Aspergillus fumigatus AF293 Genom*. 2009. The Aspergillus Website (25.2.2009). http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/sequence_info/index.php~main (12.4.2009).
- Aufauvre-Brown A., Brown JS. Holden DW.** 1998. *Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of Aspergillus fumigatus*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 17, 11: 778-780.
- Basica J. F., Graves T. S., Baz M. N.** 1981. *Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid dependent asthmatics*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 68, 2: 98-102.
- Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčič K.** 2002. *Pleurotus and Agrocybe hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting*. Biochimica et Biophysica Acta, 1570, 3: 153-159.
- Berne S., Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P., 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, 33: 11137-11147.
- Berne S., Pohleven J., Vidic I., Rebolj K., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sonnenberg A., Sepčič K.** 2007. *Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (Pleurotus ostreatus)*. Mycological Research, 111, 12: 1431-1436.
- Bodey G. P., Vartivarian S.** 1989. *Aspergillosis*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease, 8, 5: 413-437.
- Chowdhury H. H., Rebolj K., Kreft M., Zorec R., Maček P., Sepčič K.** 2008. *Lysophospholipids prevent binding of a cytolytic protein ostreolysin to cholesterol-enriched membrane domains*. Toxicon, 51: 1345-1356.
- Debeaupuis JP., Sarfati J., Chazalet V., Latgé JP.** 1997. *Genetic diversity among clinical and environmental isolates of Aspergillus fumigatus*. Infection and Immunology, 65, 8: 3080-3085.
- Derlink M.** 2009. *Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Dixon D. M., McNeil M. M., Cohen M. L., Gellin B. G., La Montagne J. R.** 1996. *Fungal infections: a growing threat*. Public Health Reports, 111,3: 226-236.
- Ebina K., Yokota K., Sakaguchi O.** 1982. *Studies on toxin of Aspergillus fumigatus. XIV. Relationship between Asp-hemolysin and experimental infection for mice*. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 23: 246-252.
- Ebina K., Ichinowatari S., Yokota K., Sakaguchi O.** 1984. *Studies on toxin of Aspergillus fumigatus. XIX. Biochemical alteration of sera after Asp-hemolysin inoculation or Aspergillus infection in mice*. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 25: 236-243.
- Ebina K., Ichinowatari S., Yokota K.** 1985. *Studies on toxin of Aspergillus fumigatus. XXII. Fashion of binding of Asp-hemolysin to human erythrocytes and Asp-hemolysin-binding proteins of erythrocyte membranes*. Microbiology and Immunology, 29: 91-101.

- Ebina K., Sakagami H., Yokota K., Kondo H.** 1994. *Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding Asp-hemolysin from Aspergillus fumigatus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1219: 148-150.
- ExPASy Proteomics Server**, Tools and software packages, Similarity searches for Asp-hemolysin with BLAST. 2009. Swiss Institute of Bioinformatics (25.3.2009). <http://us.expasy.org/tools/blast> (12.4.2009).
- Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K.** 1996. *Binding assay of low-density lipoprotein to Asp-hemolysin from Aspergillus fumigatus*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 19, 10: 1380-1381.
- Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K.** 1998. *Oxidized low-density lipoprotein inhibits the hemolytic activity of Asp-hemolysin from Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiology Letters, 167, 2: 275-280.
- Greenberg P. A., Paterson R.** 1987. *Allergic bronchopulmonary aspergillosis: model of bronchopulmonary disease with defined serological, radiological pathological and clinical findings from asthma to fatal destructive lung*. Chest, 91, 6: 165S-171S.
- Hearn V. M.** 1992. *Antigenicity of Aspergillus species*. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 30, 1: 11-25
- Kudo Y., Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K.** 2001. *Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of Asp-hemolysin from Aspergillus fumigatus*. Biochimica et Biophysica Acta, 1568: 183-188.
- Kumagai T., Kudo Y., Fukuchi Y., Ebina K., Yokota K.** 2002. *Expression of a synthetic gene encoding the Asp-hemolysin from Aspergillus fumigatus in Escherichia coli*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25, 1: 115-117.
- Kumagai T., Ogawa N., Tsutsumi H., Ebina K., Yokota K.** 2005. *A synthetic peptide (P-21) derived from Asp-hemolysin inhibits the induction of macrophage proliferation by oxidized low-density lipoprotein*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 28, 8: 1381-1384.
- Latgé JP., Paris S., Sarfati J., Debeaupuis JP., Monod M.** 1994. Exoantigens of *Aspergillus fumigatus*: serodiagnosis and virulence (str. 321-340). V: *The genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application* (FEMS Symposium No. 69). Powell, K. A., Renwick, A., Peberdy, J. F. (eds.). Plenum Press, London, UK.
- Latgé JP.** 1995. *Tools and trends in the detection of Aspergillus fumigatus*. Current Topics in Medical Mycology, 6: 245-281.
- Latgé JP.** 1999. *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis*. Clinical Microbiology Reviews, 12, 2: 310-350.
- Latgé JP.** 2001. *The pathobiology of Aspergillus fumigatus*. Trends in Microbiology, 9, 8: 382-389.
- Laufer P., Fink J. N., Bruns W. T., Unger G. F., Kalbfleish J. H., Greenberg P. A., Patterson R.** 1984. *Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 73: 44-48.
- Leslie C. E., Flannigan B., Milne L. J. R.** 1988. *Morphological studies on clinical isolates of Aspergillus fumigatus*. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 26, 6: 335-341.
- Longbottom J. L.** 1983. *Antigens/allergens of Aspergillus fumigatus. Identification of antigenic components reacting with both IgG and IgE antibodies of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis*. Clinical & Experimental Immunology, 53, 2: 354-362.
- Lortholary O., Guillemin L., Dupont B.** 1995. *Manifestations extrapulmonaires de l'aspergillose invasive*. Annales de médecine interne, 146, 2: 96-101.
- Maček P., Lebez D.** 1981. *Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone Actinia equina. Effect of some ions and pH*. Toxicon, 19, 2: 233-240.

- Maličev E., Chowdhury H. H., Maček P., Sepčič K.** 2007. *Effect of ostreolysin, an Asp-hemolysin isoform, on human chondrocytes and osteoblasts, and possible role of Asp-hemolysin in pathogenesis.* Medical Mycology, 45, 2: 123-130.
- Mancini I., Sicurelli A., Guella G., Turk T., Maček P., Sepčič K.** 2004. *Synthesis and bioactivity of linear oligomers related to polymeric alkylpyridinium metabolites from the Mediterranean sponge Reniera sarai.* Organic and Biomolecular Chemistry, 2, 9: 1368-1375.
- Ngai PHK., Ng TB.** 2006. *A hemolysin from the mushroom Pleurotus eryngii.* Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 6: 1185-1191.
- O'Gorman M. C., Fuller T. H., Dyer S. P.** 2008. *Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus.* Nature, 457, 7228: 471-474.
- Površinska plazmonska resonanca.** 2008. Infrastrukturni center za površinsko plazmonsko resonanco, Katedra za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani (16.5.2008).
<http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Tehnologija.html> (12.4.2009).
- Raper K. B. in Fennell I. D.** 1965. *Aspergillus fumigatus group (str. 238-268).* V: *The genus Aspergillus.* Raper K. B. in Fennell I. D. (eds.). The Williams & Wilkins Company, Baltimore, ZDA.
- Rebolj K., Ulrich N. P., Maček P., Sepčič K.** 2006. *Steroid structural requirements for interaction of ostreolysin, a lipid-raft binding cytolysin, with lipid monolayers and bilayers.* Biochimica et Biophysica Acta, 1758, 10:1662-1670.
- Rementeria A., López-Molina N., Ludwig A., Vivanco B. A., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J.** 2005. *Genes and molecules involved in Aspergillus fumigatus virulence.* Revista Iberoamericana de Micología, 22: 1-23.
- Rost B., Yachdav G., Liu J.** 2004. *The PredictProtein server.* Nucleic Acids Research, 32 (Web Server issue): W321-W326.
- Sakaguchi O., Shimada H., Yokota K.** 1975. *Purification and characteristics of hemolytic toxin from Aspergillus fumigatus.* Japanese Journal of Medical Science and Biology, 28, 5-6: 328-331.
- Sarfati J., Boucias D. G., Latgé JP.** 1995. *Antigens of Aspergillus fumigatus produced in vivo.* Journal of Medical and Veterinary Mycology, 33, 1: 9-14.
- Schmidt A., Wolff M. H.** 1997. *Morphological characteristics of Aspergillus fumigatus strains isolated from patients samples.* Mycoses, 40, 9-10: 347-351.
- Sepčič, K.** 1998. *3-alkilpiridinijeve soli iz morske spužve Reniera sarai (Pulitzer-Finali) in njihova biološka aktivnost.* Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
- Sepčič K., Berne S., Potrich C., Turk T., Maček P., Menestrina G.** 2003. *Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom Pleurotus ostreatus, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids.* European Journal of Biochemistry, 270, 6:1199-1210.
- Sepčič K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitaš A., Šentjurc M., Maček P.** 2004. *Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains.* FEBS Letters, 575, 1-3: 81-85.
- Taylor J. W., Bowman B., Berbee M. L., White T. J.** 1993. *Fungal model organisms: phylogenetics of Saccharomyces, Aspergillus and Neurospora.* Systematic Biology, 42: 440-457.
- Vidic I., Berne S., Drobne D., Maček P., Frangež R., Turk T., Štrus J., Sepčič K.** 2005. *Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (Pleurotus ostreatus).* Mycological Research, 109, 3: 377-382.
- Žužek C. M., Maček P., Sepčič K., Cestnik V., Frangež R.** 2006. *Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (Pleurotus ostreatus), in rodents.* Toxicon, 48, 3: 264-271.

7.2 DRUGI VIRI

- Alexopoulos C. J., Mims C. W., Blackwell M.** 1996. *Introductory Mycology. 4th Edition*. John Wiley and Sons, NY, ZDA.
- Boedijn K. B.** 1978. *Rastlinski svet 3. del*. Lazar, J., Gogala, N., Martinčič, A., Wraber, T., Batič, F. in Vrhovšek, D. (ur.). Mladinska knjiga, Ljubljana.
- Kwon-Chung K. J., Bennett J. E.** 1992. *Medical Mycology. 2nd Edition*. Lea & Febiger, Philadelphia, ZDA.
- Madigan T. M., Martinko M. J.** 2006. *Brock Biology of Microorganisms. Eleventh Edition*. Pearson Prentice Hall, NJ, ZDA.
- Pennington J. E.** 1988. *Respiratory infections: diagnosis and management. 3rd Edition*. Raven Press Ltd., New York, ZDA
- Podobnik A. in Devetak D.** 2000. *Biologija 4 in 5, Raznolikost živih bitij. 2. izdaja, 3. natis*, DZS, Ljubljana.
- Schasfoort R. B. M., Tudos A. J.** (eds.). 2008. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, UK.

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se zahvalila mentorici prof. dr. Kristini Sepčić, ki me je vodila in usmerjala pri delu, mi pomagala reševati probleme hitro in uspešno ter širila moje znanje in izkušnje.

Predsednici komisije prof. dr. Nini Gunde-Cimerman ter njenim sodelavcem, ki so mi priskrbeli glivni sev in mi pomagali pri pripravi gojišč, vcepljanju, gojenju glive ter reševanju problemov.

Somentorju prof. dr. Robertu Frangežu, ki je priskrbel poskusne živali in opravil poskuse *in vivo* ter za pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Dr. Igorju Križaju za analizo aminokislinske sekvence.

Recenzentu prof. dr. Tomu Turku za pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Karmen Selan, ki mi je pomagala in sodelovala z mano pri eksperimentalnemu delu diplome.

Tehnični sodelavki Ireni Pavšič za pomoč pri delu v laboratoriju.

Vesni Hodnik za pomoč pri delu v SPR centru.

Živi in Mateju za pomoč pri elektroforezi.

Vsem ostalim, ki so mi še pomagali pri izdelavi diplomskega dela ali me moralno in finančno podpirali tekom celotnega študija.

Hvala.