

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Živa RAMŠAK

**LASTNOSTI MUTIRANIH RAZLIČIC
LISTERIOLIZINA O**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Živa RAMŠAK

LASTNOSTI MUTIRANIH RAZLIČIC LISTERIOLIZINA O

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

PROPERTIES OF LISTERIOLYSIN O MUTANTS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za dodiplomski študij oddelka za biotehnologijo z dne 12. 9. 2008 je bil za mentorja diplomskega dela imenovan izr. prof. dr. Gregor Anderluh.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Gregor Anderluh

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 8. 7. 2009

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. 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.

Ramšak Živa

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 577:561.23(043.2)=163.6
KG listeriolizin O/*Listeria monocytogenes*/*Escherichia coli*/lastna triptofanska fluorescenca/homologno modeliranje/pH-odvisnost/izolacija proteina
AV RAMŠAK, Živa
SA ANDERLUH, Gregor (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Medoddelčni študij biotehnologije
LI 2009
IN LASTNOSTI MUTIRANIH RAZLIČIC LISTERIOLIZINA O
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 45 [1] str., 5 pregl., 27 sl., 84 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Več vrst patogenih in nepatogenih po gramu pozitivnih bakterij iz rodov *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* in *Listeria* izloča citolitične proteine, ki jih uvrščamo v veliko družino homolognih proteinov. Več od njih je pokazateljev bakterijske patogenosti, a kljub temu se njihove biološke vloge razlikujejo, tako kot se razlikujejo življenjski stili bakterij, ki jih izločajo. Edinstveno vlogo igra listeriolizin O, ki omogoči znotrajceličnemu patogenu *Listeria monocytogenes* pobeg iz fagolizosoma in razsiritev v sosednje gostiteljske celice. V rodu *Listeria* od holesterola odvisen citolizin proizvajata še *L. seeligeri* in *L. ivanovii*. Citolizini teh treh vrst se razlikujejo od drugih predstavnikov družine s svojim nizkim pH-optimumom delovanja in prisotnosti aminokisline histidin na mestu 311. Da bi preverili hipotezo, da je pH-optimum listeriolizina O odvisen od (de)protoniranosti histidina na tem mestu, smo v *E. coli* izrazili in očistili šest različic toksina, jim izmerili spekter lastne fluorescence in kinetske parametre vezave na velike unilamelarne liposome v kislem in nevtralnem pH. Iz znane kristalografske zgradbe perfringolizina O smo pripravili homologni model listeriolizina O.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577:561.23(043.2)=163.6
CX listeriolysin O/*Listeria monocytogenes*/*Escherichia coli*/tryptophan fluorescence/
homology modelling/pH-dependance/protein isolation
AU RAMŠAK, Živa
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme Biotechnology
PY 2009
TI PROPERTIES OF LISTERIOLYSIN O MUTANTS
DT Graduation thesis (university studies)
NO VIII, 45 [1] p., 5 tab., 27 fig., 85 ref.
IJ sl
JI sl/en
AI Several species of both pathogenic and non-pathogenic grampositive bacteria
within the genera *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, and *Listeria* secrete
cytolytic proteins that belong to a single, highly homologous family. While several
of these cytolsins have been shown to be determinants of bacterial pathogenicity,
their biological roles may vary, as do the lifestyles of the bacteria secreting them. A
unique function is fulfilled by listeriolysin O, which helps the intracellular pathogen
Listeria monocytogenes escape from phagolysosomes and then spread to adjacent
host cells. In the genus *Listeria* *L. seeligeri* and *L. ivanovii* also produce a
cholesterol dependent cytolysin. The difference between *Listeria* cytolysins and
other members of the cholesterol dependent toxin family is in the low pH-optimum
of the three of *Listeria* and presence of an unique histidine residue on position 311
of listeriolysin O sequence. To test the hypothesis, that (de)protonation of that
histidine is responsible of the pH-optimum of the toxin, we expressed 6 mutants in
E. coli expression system and studied kinetics of binding and tryptophan spectres of
the 6 variations. From the known crystallographic structure of perfringolysin O we
also constructed a model of listeriolysin O.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 Listeria monocytogenes IN LISTERIOZA	2
2.1.1 Okužba in širjenje	3
2.2 OD HOLESTEROLA ODVISNI CITOZINI	4
2.2.1 Razširjenost od holesterola odvisnih citozinov	4
2.2.2 Zgradba in delovanje od holesterola odvisnih citozinov	7
2.2.3 Listeriolizin O	8
2.2.4 pH odvisnost listeriolizina O	10
2.3 FLUORESCENCA	11
2.4 HOMOLOGNO MODELIRANJE IN ELEKTROSTATSKI POTENCIJAL	11
2.5 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	13
3.1.2 Raztopine	13
3.1.3 Encimi	15
3.1.4 Bakterijski sev	15
3.1.5 Plazmidi z genom za ustrezno različico LLO	15
3.1.6 Kompleta za določanje vsebnosti lipidov	15
3.1.7 Laboratorijska oprema	15
3.2 METODE	16
3.2.1 Izražanje rekombinantnega LLO	16
3.2.2 Čiščenje rekombinantnih proteinov	16
3.2.3 Določanje vsebnosti proteinov	17
3.2.4 Priprava unilamelarnih lipidnih veziklov	17

3.2.5	Merjenje fluorescence	18
3.2.6	Modeliranje	20
4	REZULTATI	21
4.1	Lastnosti aminokislinskih zaporedij izražanih konstruktov	21
4.2	Izolacija mutant listeriolizina O	21
4.2.1	Posebnost izolacije mutante H423A	24
4.2.2	Posebnost izolacije mutante H311A	24
4.3	Merjenje fluorescence	26
4.4	Homologno modeliranje	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	RAZPRAVA	35
5.1.1	Izolacija rekombinantnega proteina	35
5.1.2	Merjenje fluorescence	36
5.1.3	Homologno modeliranje in elektrostatski privlak	37
5.2	SKLEPI	38
6	POVZETEK	39
7	VIRI	40
7.1	Citirani viri	40
7.2	Drugi viri	45
8	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1:	13
Družina tiolno-aktiviranih od holesterola odvisnih citolizinov (Palmer, 2001).	
Preglednica 2:	29
Osnovne lastnosti rekombinantnih proteinov izoliranih v diplomskem delu.	
Preglednica 3:	34
Količina izoliranih rekombinantnih proteinov.	
Preglednica 4:	38
Povprečja in standardni odkloni vrednosti fluorescence pri 346 nm za raztopino (LLO v pufru) in LUV (LLO in LUV v pufru) ter razmerja med povprečji.	
Preglednica 5:	38
Povprečne vrednosti in standardni odklon parametrov izračunanih enačb eksponentne rasti za vsak protein in pH.	

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Morfološke stopnje vstopa, rasti, premika in širjenja <i>L. monocytogenes</i> med dvema celicama.	11
Slika 2: Poravnavo nekaterih CDC s ClustalW in prikaz ohranjenih zaporedij z BoxShade.	14
Slika 3: Levo kristalni strukturi PFO in ILY. Desno vloge štirih domen iz podatkov o PFO, SLO, pnevmolizinu in LLO (prirejeno po Bayley, 1997).	16
Slika 4: Dva modela LLO na osnovi 3D-strukture (Dubail in sod., 2001; Schuerch in sod., 2005).	17
Slika 5: Optimizacija razmerja med LLO in LUV za merjenje fluorescence.	27
Slika 6: Obdelava podatkov meritev kinetike.	27
Slika 7: Konstrukt LLO uporabljen v diplomski nalogi.	29
Slika 8: Rastna krivulja kulture <i>E. coli</i> v tekočem LB gojišču z ampicilinom. Rdeča prekinjena črta nakazuje dodatek IPTG v pozni log fazi in začetek eksponentne rasti kulture.	30
Slika 9: NaDS-PAGE gel izolacije LLO iz <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.	31
Slika 10: Levo kromatogram čiščenja LLO z ionsko izmenjevalno kromatografijo, desno NaDS-PAGE gel nekaterih frakcij ionske izmenjevalne kromatografije.	31
Slika 11: Absorpcijski spekter očiščene LLO-His450Ala mutante.	32
Slika 12: NaDS-PAGE gel vzorcev Ni-NTA kromatografije mutante LLO-His423Ala pri temperaturi gojenja 28 °C (levo) in 22 °C (desno).	32
Slika 13: NaDS-PAGE gel izolacije LLO-His311Ala (homogenizacija in Ni-NTA).	33
Slika 14: Spekter LLO-His311Ala po ionsko izmenjevalni kromatografiji.	33
Slika 15: Levo vzorci ionske izmenjevalne kromatografije, desno absorpcijski spekter očiščene LLO-His311Ala mutante.	33
Slika 16: NaDS-PAGE gel 1 µg čistih rekombinantnih proteinov oz. divjega tipa.	34
Slika 17: Rezultati meritev fluorescence za divji tip.	34
Slika 18: Rezultati meritev fluorescence za mutantno LLO-H57A.	35
Slika 19: Rezultati meritev fluorescence za mutantno LLO-H79A.	35
Slika 20: Rezultati meritev fluorescence za mutantno LLO-H311A.	36
Slika 21: Rezultati meritev fluorescence za mutantno LLO-H423A.	36
Slika 22: Rezultati meritev fluorescence za mutantno LLO-H450A.	37
Slika 23: Rezultati meritev fluorescence za mutantno LLO-H463A.	37
Slika 24: Levo kristalografska struktura PFO, desno pridobljen model LLO.	39
Slika 25: Zgoraj elektrostatski potencial PFO in LLO pri pH 7,0 od vrha molekule, spodaj v sprednjem delu molekule.	40
Slika 26: Zgoraj elektrostatski potencial PFO in LLO pri pH 7,0 v zadnjem delu molekule, spodaj elektrostatska potenciala v spodnjem delu molekule.	41
Slika 27: Črno označeni razlici med LLO-His311 in LLO-Ala311.	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

3D-struktura	tridimenzionalna struktura
Ala	aminokislina alanin
Asp	aspartatna kislina
CDC	od holesterola odvisni citolizin (ang. "cholesterol dependent cytolsin")
Da	dalton
Glu	glutaminska kislina
His	aminokislina histidin
FPLC	hitra proteinska tekočinska kromatografija
ILY	intermedilizin
IPTG	izopropil β -d-1 tiogalaktopiranozid
LB	gojišče Luria-Bertani
LLO	listeriolizin O
LUV	veliki unilamelarni vezikel (ang. "large unilamellar vesicle")
MAPK	mitogen-aktivirana protein kinaza
NaCl	natrijev klorid
NaDS	natrijev dodecilsulfat (ang. "sodium dodecyl sulfate")
Ni-NTA	nikljeva afinitetna kromatografija
PEST-zaporedje	P(prolin), E(glutaminska kislina), S(serin), T(treonin)
PFO	perfringolizin O
PFT	toksin, ki tvori pore (ang. "pore-forming toxin")
pKa	konstanta disociacije
SLO	streptolizin O
TMH	transmembranska lasnica (ang. "transmembrane helix")

1 UVOD

Mnogi organizmi si preživetje zagotavljajo z izločanjem toksinov. Gram pozitivna bakterija *Listeria monocytogenes* je eden izmed takih organizmov, ki izloča listeriolizin O (v nadaljevanju LLO), od holesterola odvisen citolitični toksin (ang. "cholesterol dependent cytolysin", CDC). Ta protein ji omogoča pobeg iz fagosoma in nadaljnje širjenje.

Poleg *L. monocytogenes* v rodu *Listeria* od CDC proizvajata še *L. seeligeri* in *L. ivanovii*. Citolizini teh treh vrst se razlikujejo od drugih predstavnikov družine s svojim nizkim pH-optimumom delovanja. Glede na aminokislinsko poravnavo zaporedij predstavnikov družine CDC, imajo samo listerijini trije na mestu 311 histidin (številčenje glede na aminokislinsko zaporedje LLO). Spremembe v protoniranosti oz. deprotoniranosti histidina v odvisnosti od disociacijske konstante (pK_a) bi lahko vplivale na konformacijo proteina in s tem bile vzrok nizkemu pH-optimumu LLO.

V diplomskem delu smo želeli preveriti hipotezo, da je His311 v molekuli LLO pomemben za učinkovito vezavo na lipidne membrane. Zato smo v *E. coli* izrazili in očistili šest izogenih mutiranih različic LLO s posamično zamenjavo histidina v alanin (aminokisline 57, 79, 311, 423, 450 in 463). Z izoliranimi proteini smo proučili vezavo na lipidne membrane pri kislem in nevtralnem pH. Iz znane kristalografske zgradbe perfringolizina O (v nadaljevanju PFO) smo tudi pripravili homologni model LLO.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Listeria monocytogenes* IN LISTERIOZA

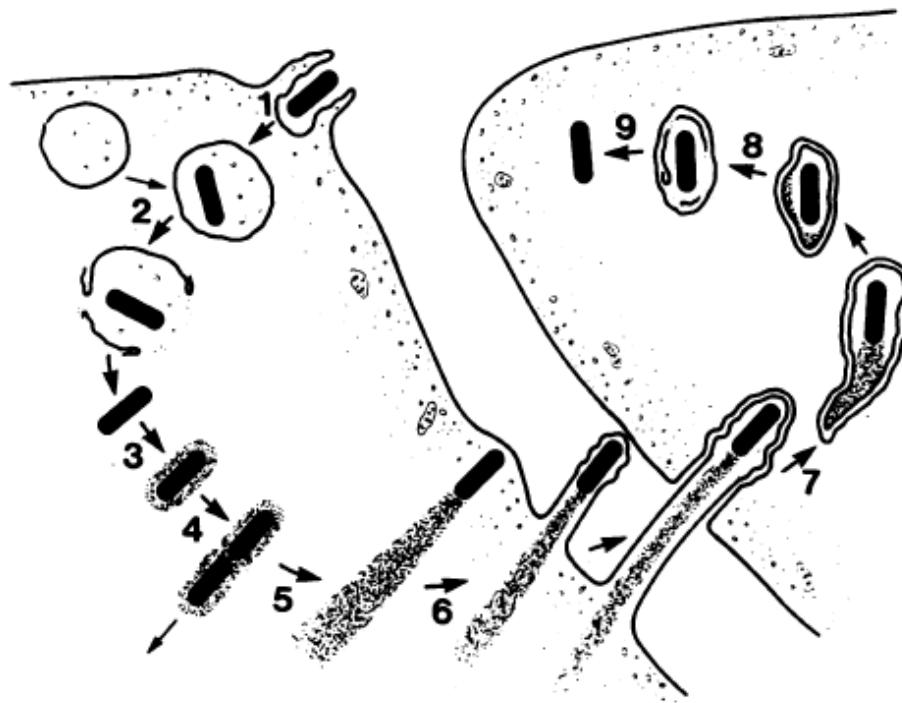
Številni znotrajcelični patogeni bivajo v specifičnih celičnih predelkih, kot na primer fagosomu (*Mycobacterium tuberculosis*, (Clemens in Horwitz, 1995)), Golgijevem aparatu (*Chlamydia trachomatis*, (Seeliger in Jones, 1986)) ali citosolu (*L. monocytogenes*, (Vasquez-Boland in sod., 2001)). Za patogenezo je vzpostavitev in ohranjanje znotrajcelične niše bistveno. Skupna strategija med mikrobnimi patogeni je izkoriščanje gostiteljevih celičnih mehanizmov, na primer zakisanje endosoma oz. fagosoma (Glomski in sod., 2002). Veliko virusov z ovojnico potrebuje zakisanje okolja, kateremu nato sledi zlitje virusne ovojnice z endosomalno membrano (Hernandez in sod., 1996). Podobno potrebuje veliko bakterijskih AB-toksinov zakisanje endosoma, kar povzroči nastanek pore s podenoto B, ter posledično prenestitev encimske podenote A v gostiteljev citosol (Falnes in Sandvig, 2000). Nekateri intracelularni patogeni kot *Trypanosoma cruzi* ali *L. monocytogenes* pa izkoriščajo s kislem okolju deluječe proteine, ki tvorijo pore in posredujejo pri pobegu mikroorganizma v celični citosol (Geoffroy in sod., 1987; Tilney in Portnoy, 1989; Ley in sod., 1990).

L. monocytogenes je hitro rastoča fakultativno anaerobna znotrajcelična po Gramu pozitivna bakterija. Zaradi sposobnosti preživetja v različnih okoljih (nizek pH, visoke koncentracije NaCl, nizke temperature) je prisotna tako v surovi kot v predelani hrani. Zaradi fakultativnosti njena rast ni pomembno odvisna od vakuumskega pakiranja (Giammarini in sod., 2004). Virulenta *L. monocytogenes* je pripisana njeni sposobnosti preživetja v makrofagih (Mackaness, 1962) in neprofesionalnih fagocitih (Vasquez-Boland in sod., 2001), tudi epitelnih celicah (Sun in sod., 1990). V celico vstopi s procesom inducirane fagocitoze, ki jo lahko inducira tudi pri celicah, ki same normalno ne fagocitirajo (Mengaud in sod., 1988). Bakterija povzroča listeriozo, pomembno bakterijsko zoonozo, ki se pojavi pri raznolikih živalih in človeku in se prenaša z mlečnimi izdelki, mesom, perutnino, ribami in zelenjavjo (Gellin in Broome, 1989; Jacquet in sod., 2002). Pogosta je pri prežvekovalcih, ki se hranijo s hrano iz silosa (Low in Donachie, 1997). Najbolj dovetni za okužbo so pacienti z oslabljenim imunskim sistemom, nosečnice in novorojenci (Mengaud in sod., 1988), klinični znaki bolezni so lahko meningitis ali meningoencefalitis, zastrupitev krvi (Rocourt in Cossart, 1997), splav ali mrtvorodenost kot posledica maternične infekcije zarodka (Michel in sod., 1990). Bolezen ima visok nivo smrtnosti (20-30 %), in zato predstavlja resen javno zdravstveni problem. Vsak sev *L. monocytogenes* je lahko potencialno patogen za ljudi, a številna opažanja kažejo na homogenost virulence – večina izbruhov listerioze in osamljenih primerov okužbe je bilo namreč povezanih s serovarjem 4b. Navkljub temu je le majhen delež hrane okužen s tem serovarjem (Jacquet in sod., 2002).

Vsak korak znotrajceličnega parazitizma je odvisen od proizvodnje virulentnih dejavnikov (Goebel in Khun, 2000). Za *L. monocytogenes* je najpomembnejši CDC LLO, ki ga izločajo vsi patogeni sevi (Portnoy in Jones, 1994; Rocourt in Cossart, 1997).

2.1.1 Okužba in širjenje

Morfološke stopnje, opažene med širjenjem *L. monocytogenes* med dvema celicama, so povzete na Sliki 1 (Tilney in Portnoy, 1989; Mounier in sod., 1990). Bakterija vstopi v fagosom s procesom podobnim makropinocitozi, kar je podobno načinu vstopa patogena *Salmonella typhimurium* v makrofage (Beauregard in sod., 1997). Eden zgodnejših procesov potrebnih za rast in širjenje bakterije v gostitelju, je liza vakuole in pobeg iz nje. Za to je potreben LLO (Gaillard in sod., 1987). Sledi hitra celična delitev in ovitje bakterij s kratkimi aktinskimi filamenti in proteini, ki vežejo aktin. Ta aktinska struktura se preoblikuje v dolg rep, ki bakterijo premakne do celične membrane sosednje celice (Dabiri in sod., 1990). Ta bakterijo v tej psevdopodu-podobni strukturi prepozna in sprejme. Tako se v citoplazmi druge celice najde bakterije, obkrožene z dvojno membrano. Obe membrani razpadeta in cikel se ponovi (Sun in sod., 1990).



Slika 1: Morfološke stopnje vstopa, rasti, premika in širjenja *L. monocytogenes* med dvema celicama. 1. Vstop v celico; 2. liza vakuole; 3. aktinski filamenti se uredijo okoli celice; 4. rast; 5. reorganizacija aktina iz oblaka v rep; 6. premik v citoplazmi in vezava z celično membrano; 7. sosednja celica prepozna psevdopod z bakterijo, sledi ponoven vstop v celico; 8. razpad notranje membrane; 9. razpad zunanje membrane. (Sun, Camilli in Portnoy, 1990).

Največji skupek genov, ki kodirajo virulentne dejavnike v *L. monocytogenes* je *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*, od tega gen *hly* kodira 58-60 kDa velik protein LLO (Chakraborty in sod., 2000), nujen za pobeg bakterije iz fagosoma v citoplazmo gostiteljeve celice. Mutante brez LLO so ujete v vakuoli, ne rastejo znotraj celice in so nevirulentne v mišjem modelu infekcije (Portnoy in sod., 1988).

Za patogenezo listerioze je potrebna tudi interakcija *L. monocytogenes* z gostiteljsko celico. Pri tem procesu sodelujejo nekateri površinski proteini – InlA (internalin), InlB, ActA in p104 ter Ami. InlA je 800 aminokislin velik protein potreben za vstop v celice, ki izražajo E-kadherin (Mengaud in sod., 1996). InlB, je 67 kDa (630 aminokislin) velik protein, ki se izloča na površino celice in sodeluje pri vstopu v hepatocite in fibroblaste (Braun in sod., 1999). ActA je 90 kDa protein, ki preko proteoglikanov prav tako omogoča vezavo na celično membrano ter z aktinsko polimerizacijo omogoča premikanje bakterije v citoplazmi gostitelja (Alvarez-Dominguez in sod., 1997). Ami je bakteriolizin, ki sodeluje pri vezavi bakterije na površino celic (Milohanic in sod., 2001). Zadnji v tej skupini proteinov, ki sodelujejo pri vezavi *L. monocytogenes* na površino celic, je bil odkrit površinski protein p104 (Pandiripally in sod., 1999).

2.2 OD HOLESTEROLA ODVISNI CITOLOZINI

Od holesterola odvisne citolizine uvrščamo v naddružino toksinov, ki tvorijo pore (ang. "pore-forming protein toxins", v nadaljevanju PFT) in predstavljajo eno najmočnejših bioloških orožij. Pomembna lastnost PFT-jev je obstoj tako v topni obliki kot v transmembranski pori. Za prehod iz vodotopnega v membransko stanje se morajo zgoditi konformacijske spremembe. Četudi se razlikujejo v primarnih, sekundarnih, terciarnih in kvartarnih strukturah, lahko skoraj vse razvrstimo v dva razreda glede na tip pore – α -PFT so zgrajeni pretežno iz α -vijačnic, β -PFT iz β -struktur (Parker in Feil, 2005; Anderluh in Lakey, 2008).

2.2.1 Razširjenost od holesterola odvisnih citolizinov

Do danes je bilo odkritih več kot 20 CDC-jev (našteti v Preglednici 1, prikaz ohranjenosti zaporedij na Sliki 2), ki jih proizvajajo predstavniki petih rodov po gramu pozitivnih bakterij, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria* (Smyth in Duncan, 1978) ter *Arcanobacterium*. Nekatere od vrst (predvsem listerije, pnevmo- in streptokoki) povzročajo nevarne bolezni in njihovi toksini so pomembni virulentni dejavniki, ki preko lize membran pogosto povzročijo propad gostiteljskih celic. Druge vrste, kot npr. *B. alvei*, *B. cereus* ali *C. sordellii*, ne povzročajo bolezni. Pri teh so citolizini v pomoč pri ohranjanju saprofitskega življenskega sloga. V rodu *Listeria* je poznanih šest vrst: dve patogeni (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) in štiri nepatogene (*L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* in *L. grayi*), od teh CDC-je proizvajata obe patogeni vrsti in *L. seeligeri*.

CDC-ji niso encimsko aktivni, tako patogene kot nepatogene vrste pa pogosto poleg toksinov izločajo depolimerizacijske encime (proteaze, nukleaze). Nastale pore v fagosomu so tako velike (notranjega premera od 25-30 nm (tudi večje od 150 Å), da lahko tako encimi kot celice vstopijo v gostiteljevo celico in sodelujejo pri nadajnjem medceličnem širjenju patogena s polimerizacijo aktinskih filamentov (Palmer, 2001). Poro tvori med 40-80 monomerov CDC-jev (Bhakdi in sod., 1993).

Prosti holesterol in strukturno podobni steroli dodani v raztopini inhibirajo njihovo aktivnost, membransko vezani holesterol pa predstavlja vezno mesto na površini evkarijntske celice (Michel in sod., 1990). Toksini se na membrane, ki ne vsebujejo holesterola ali njemu strukturno podobnega sterola, ne vežejo. Afiniteta toksina do membrane je močno odvisna od vsebnosti holesterola, pri fosfatidilholinskih-holesterolnih modelnih membranah je potreben vsaj 40% molarni delež sterola (Ohno-Iwashita in sod., 1992; Bavdek in sod., 2007; Flanagan in sod., 2009). Strukturne lastnosti holesterolne molekule potrebne za vzajemno delovanje s toksinom so 3β -hidroksi skupina, sterolni obroč in izooktilna stranska veriga (Palmer, 2001; Bavdek in sod., 2007). Holesterol ni le vezavno mesto, ampak tudi sodeluje pri oligomerizaciji, verjetno kot alosterični efektor (Harris in sod., 1998).

Največ izdatnih in izčrpnih študij vloge teh toksinov v patogenosti je bilo opravljenih na LLO znotrajcelične bakterije *L. monocytogenes* (Geoffroy in sod., 1987).

Preglednica 1: Družina tiolno-aktiviranih od holesterola odvisnih citolizinov (Palmer, 2001).

Bakterijski rod	Vrsta	Ime toksina
<i>Arcanobacterium</i>	<i>A. pyogenes</i>	piolizin
<i>Bacillus</i>	<i>B. alvei</i>	alveolizin
	<i>B. anthracis</i>	antrolizin
	<i>B. cereus</i>	cereolizin O
	<i>B. laterosporus</i>	laterosporolizin
	<i>B. thuringiensis</i>	thuringolizin O
<i>Clostridium</i>	<i>C. bifermentans</i>	bifermolizin
	<i>C. botulinum</i>	botulinolizin
	<i>C. chauvoei</i>	chauveolizin
	<i>C. histolyticum</i>	histoliticolizin O
	<i>C. novyi</i>	novilizin
	<i>C. perfringens</i>	perfringolizin O
	<i>C. septicum</i>	septicolizin
	<i>C. sordellii</i>	sordelilizin
	<i>C. tetani</i>	tetanolizin
<i>Listeria</i>	<i>L. ivanovii</i>	ivanolizin
	<i>L. monocytogenes</i>	listeriolizin O
	<i>L. seeligeri</i>	seeligerilizin
<i>Streptococcus</i>	<i>S. canis</i>	streptolizin O
	<i>S. equisimilis</i>	streptolizin O
	<i>S. intermedius</i>	intermedilizin
	<i>S. pneumoniae</i>	pnevмолizin
	<i>S. pyogenes</i>	streptolizin O
	<i>S. suis</i>	suilizin

Listeriolizino	1	-MKKIMLLVFTILILVSLPPIAQOOTEAKDASAFNK - ENSISSIONPAPSPAS -
Ivanolizino	1	-MKKIMLLM1TLLVSLPPIAQOADEAQADGCVSYTG - IISHMAPASPPAK -
Seeligerolizino	1	-MEIFOLVIMSLLFVSLPITQPEARDVPAYDKSEVTISPAETESPAT -
Streptolizino	1	-MNPSSHLILSLSISSLALING -
Perfringolizino	1	-MRFPTKTLIASAVALCFLSQVVISPSKD -
Pnevmonolizino	1	--
Intermedilizin	1	--
Piolizin	1	--METEQNIAARHLSRVVLLSTLIVMSAAPISAFAAEPTPKPKAAQTEKKPEKK -
Alveolizin	1	-MKRKAFAASUVAASVAAATVTMTPASFAAGLGNSSGLTDGSLAPRASISPDKV -
Antrolizino	1	--MKKSNHLLGKRVVLVSLLSLSQVFAFASISSAA -
Cereolizino	1	-MIFLNKINTNTRFLACLLVSLCTHYSSISPAET -
Botulinolizin	1	1 MNFIKEKNYKSVIGLIISMAIVGTSVLELHKSTVSTWCONNIEENGENVTKKPDQKVINDKCSNDNVNTNGIKESKNLDDDTKIIAKVDETIINLQQES
Novyilizin	1	-NAVLELDNKTLESKNNNAIVKESTVNKLNEPEKLNKAFSIEPN -
Tetanolizino	1	-MNENLVLFVRSRSLLFSMTGLISNYNSNVLAKGNGVVEBSLNN -
Suulizin	1	--MSNKETPKYSRVAAGLTTAALIIGNLVTANAESNKQNTASTET -
Listeriolizino	49	--PKTPIEKKAHDIEDKYIQGLDWKNNNVIVYHG
Ivanolizino	48	--PKTPVEKKAACIDQYIQGLDWKNNNVIVYHG
Seeligerolizino	50	--PKTPVEKKAHEEINXYIYQGLDWKNNNVIVYHG
Streptolizino	21	-PLPSVLADSKQELQYFQSLIYEPCEIITPNB
Perfringolizino	31	-ITDKN -
Pnevmonolizino	1	--QSLSGSISLSSLMNRNEVLSASG
Intermedilizin	52	--PENSNEAAKKALNDYIWGLCQDKEKLNTIOTHG
Piolizin	54	--DLSAQETDETGVWDYIICRLKLYDPSGVLAVG
Alveolizin	35	-TEP -
Antrolizino	37	--NPDGIACLNNMRNEVLAICG
Cereolizino	34	--QAGNTAGAIKNAASPNTGIANLMDSRDILAVNG
Botulinolizin	101	--QASNATDVTKNASCHDTGIANLMDRNNEVLAICG
Novyilizin	71	1 KADTIVKVNENIAKTVKPKASNKEDILNNKSS - YFNMDMSNMMYNNNGYKSYSDLDMKFVNPMLATSGQPFYGENQNSNEIDDINGLWMDPRKILAFNG
Tetanolizino	45	-
Suulizin	44	--EIMPTSVALEDENPNNGNEIDAIYDLYDPRKILAFNG
--GQVVTSTKCNLAKDNSSPIDKNIQGLSVDPRKILISYNG		
Listeriolizino	81	--TTTNEQPKPESELTTEKAGQKTDMLNSNDMNIK LAPKEMPLESAEKEKKSDEDKKKSEEDHTEINDKLYSLNNNELEVLAICG
Ivanolizino	80	--
Seeligerolizino	82	--SAVINVPDKACYKEGNOXIVVEKKKISINONNAADIOQVNAELVENOEDVLPVIRDRSLTISIDLPGMTNODNIVVVKNATKSNVNN
Streptolizino	53	--CAVINVPDKACYKEGNOXIVVEKKKISINONNAADIOQVNAELVENOEDVLPVIRDRSLTISIDLPGMVHNDEIVVVKNATKSNVNN
Perfringolizino	58	--CAVINVPDKACYKEGNOXIVVEKKKISINONNAADIOQVNAELVENOEDVLPVIRDRSLTISIDLPGMTNODNIVVVKNATKSNVNN
Pnevmonolizino	26	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Intermedilizin	84	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Piolizin	86	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Alveolizin	60	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Antrolizino	71	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Cereolizino	68	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Botulinolizin	199	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Novyilizin	158	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Tetanolizino	84	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Suulizin	129	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Listeriolizino	181	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Ivanolizino	180	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Seeligerolizino	182	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Streptolizino	153	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Perfringolizino	156	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Pnevmonolizino	126	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Intermedilizin	184	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Piolizin	186	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Alveolizin	159	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Antrolizino	170	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Cereolizino	167	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Botulinolizin	298	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Novyilizin	257	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Tetanolizino	183	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Suulizin	228	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Listeriolizino	281	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Ivanolizino	280	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Seeligerolizino	282	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Streptolizino	253	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Perfringolizino	255	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Pnevmonolizino	225	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Intermedilizin	283	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Piolizin	285	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Alveolizin	258	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Antrolizino	269	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Cereolizino	266	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Botulinolizin	397	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Novyilizin	356	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Tetanolizino	282	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Suulizin	327	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Listeriolizino	377	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Ivanolizino	376	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Seeligerolizino	378	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Streptolizino	349	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Perfringolizino	351	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Pnevmonolizino	321	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Intermedilizin	379	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Piolizin	385	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Alveolizin	354	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Antrolizino	365	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Cereolizino	362	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Botulinolizin	493	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Novyilizin	452	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Tetanolizino	378	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Suulizin	423	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Listeriolizino	477	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Ivanolizino	476	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Seeligerolizino	478	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Streptolizino	449	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Perfringolizino	451	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Pnevmonolizino	421	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Intermedilizin	479	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Piolizin	485	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Alveolizin	454	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Antrolizino	465	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Cereolizino	462	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Botulinolizin	503	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Novyilizin	552	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Tetanolizino	478	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT
Suulizin	523	--CINIIPATTGMLENGDFVWVHREKKNITNNASADIWVPAKANLNTPLISLNGDLTISIDLPGCJANGDSTVWVSETPTSTVRT

Slika 2: Poravnavo nekaterih CDC na ClustalW serverju (EMBnet, 2009) in prikaz njihovih ohranjenih zaporedij z BoxShade (EMBnet, 2009).

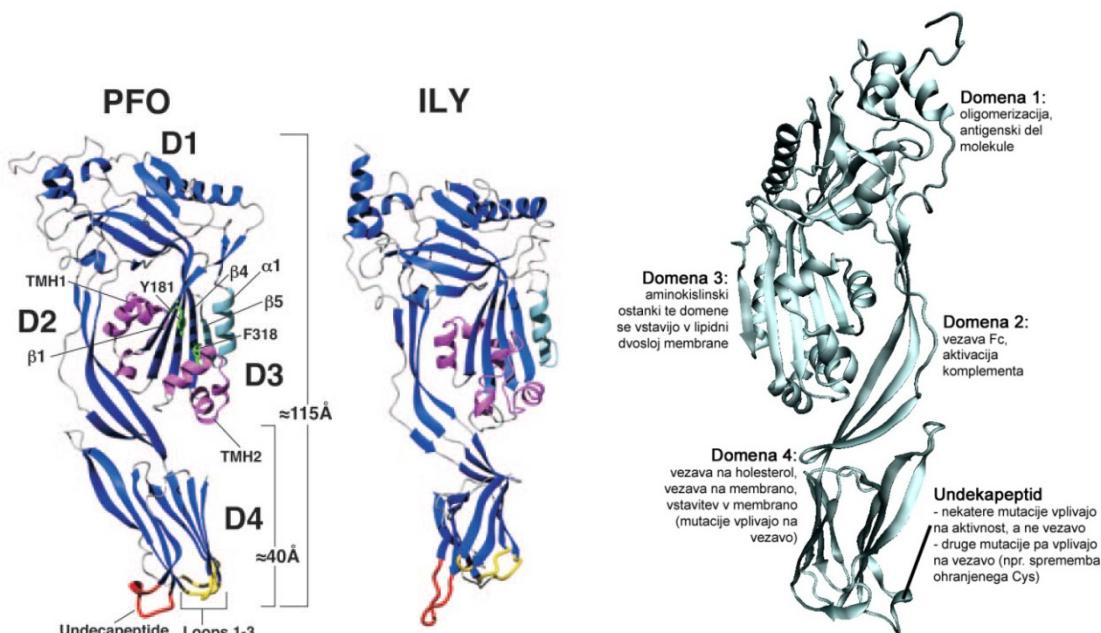
2.2.2 Zgradba in delovanje od holesterola odvisnih citolizinov

Vsi toksini družine so sestavljeni iz ene polipeptidne verige, dolge od 471 aminokislinskih ostankov v primeru pnevmolizina (Walker in sod., 1987) do 571 aminokislin v primeru streptolizina O (v nadaljevanju SLO; Kehoe in sod., 1987). Nukleotidno zaporedje LLO so leta 1988 določili Mengaud in sodelavci. Ohranjeno jedro družine je istočasno zaporedje najmanjšega člana družine pnevmolizina, ki se od ostalih razlikuje le v odsotnosti sekretornega signalnega peptida in se temu primerno izloči le z lizo pnevmokokne bakterijske celice. Razlika v dolžini pripadnikov družine je večinoma zaradi različno dolgih zaporedij na N-terminalnem delu peptidne verige (Palmer, 2001).

Najdaljše zaporedje, skoraj popolne homologije med vsemi predstavniki, je dolgo 11 aminokislin, bogato s triptofani in z izjemo dveh toksinov vsebuje edini cisteinski ostanek. Undekapeptid imenovan triptofanska zanka z zaporedjem ECTGLAWEWWR, se nahaja na C-terminalnem koncu proteina (Michel in sod., 1990). Od te tiolne skupine (-SH) je družina tudi dobila zastarelno ime tiolno-aktivirani citolizini. V primeru pnevmolizina (Pinkney in sod., 1989) in SLO (Saunders in sod., 1989) je bilo dokazano, da cistein sicer nima vpliva na funkcijo teh dveh citolizinov, so pa Michel in sod. (1990) pokazali, da je undekapeptid sam nujen za lizo membrane. Dejansko tudi dva novejša člana družine (piolizin in intermedilizin) naravno vsebujeta namesto cisteina v undekapeptidu alanin (Nagamume in sod., 2000; Billington in sod., 2002).

Do danes sta znani 3D-strukturi PFO (na Sliki 3, levo; Rossjohn in sod., 1997) in intermedilizina (na sliki 3, desno; v nadaljevanju ILY; Polekhina in sod., 2005). Vsi CDC so sestavljeni iz enojne polipeptidne verige z molekulskimi masami od 50-80 kDa, med katerimi je podobnost zaporedja 40-70%, zato imajo zelo verjetno podobno strurno zgradbo kot PFO in ILY (Tweten, 2005).

Vsi CDC so sestavljeni iz β -struktur (Parker in Feil, 2005). Kar 40% PFO je zgrajenega iz do 25 β -trakov (na Sliki 3, desno). Poleg β -struktur PFO gradi 11 α -vijačnic ter 2 3_{10} vijačnici (Rossjohn in sod., 1997), od tega sta dve α -vijačnici nujno pomembni za vstavitev toksina v membrano in se ob tem konformacijsko pretvorita v transmembranski β -lasnici (ang. "transmembrane helix", v nadaljevanju TMH). Molekula je podaljšane strukture iz štirih posamičnih domen, domene 1, 2 in 4 so naravnane podolžno, domena 3 je bočno zložena ob domeni 2. Polipeptidna veriga teče v obe smeri preko domen 1-3, medtem ko je domena 4 zgibana v β -sendvič na C-terminalnem delu molekule (Rossjohn in sod., 1997). Vmesni ploskvi sta med domenama 2 in 3 (domena 3 je ukrivljena glede na obliko domene 2, interakcije večinoma polarne) ter domenama 2 in 4 (veliko vodikovih vezi, v središču stika veliko aromatskih skupin). Triptofanska zanka (ali undekapeptid) je v domeni 4, njena interakcija z membrano je predpogoj za vstavitev TMH-1 in TMH-2 v membrano (Shatursky in sod., 1999).



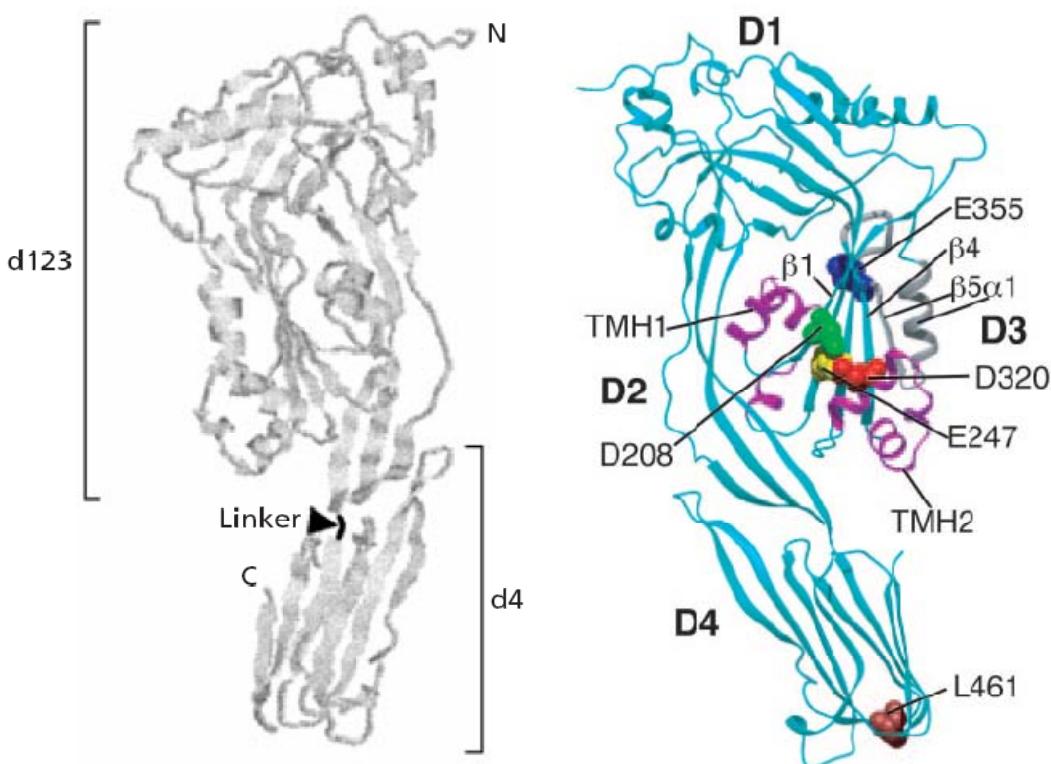
Slika 3: Levo kristalni strukturi PFO in ILY. Označene so domene 1-4 (D1-D4), položaj TMH1 in TMH2 (vijolične barve), tri zanke domene 4 (rumene barve), undekapeptid (rdeče barve), ostanka Y181 in F318 (zelen barve), β 5- α 1 zanka (svetlo modra) in β -verigi β 1 in β 2 jedrne β -strukture v domeni 3. Večina ujemajočih se regij je enako obarvana na molekuli ILY (Tweten, 2005). Desno vloge štirih domen iz podatkov o PFO, SLO, pnevmolizinu in LLO (prijejeno po Bayley, 1997).

Vsem CDC je skupen mehanizem vezave na membrane, kateremu sledi oligomerizacija in nastanek pore v obliki β -sodčka (Soltani in sod., 2007; Anderluh in Lakey, 2008). Najprej se ena monomerna enota toksina z domeno 4 specifično veže na membrano, ki vsebuje cholesterol (Ohno-Iwashita, 1992), vanjo se vstavijo undekapeptid in tri kratke hidrofobne zanke, ki toksin zasidrajo v navpični smeri (Ramachandran, 2005). To povzroči konformacijsko spremembo toksina (Palmer in sod., 1998), kar vodi v oligomerizacijo, nastanek prepornega kompleksa in nato pore (Tweten, 2005). Domena 4 nato v že nastalem oligomeru pripomore k vzpostavitvi dodatnih medmolekulskih stikov (Palmer, 2001). Domeni 1 in 3 prav tako sodelujeta pri oligomerizaciji (Darji in sod., 1996), domena 3 je poleg tega ključna za nastanek transmembranskega dela pore (Shatursky in sod., 1999).

2.2.3 Listeriolizin O

Listeriolizin O je eksotoksin, najpomemnejši virulentni dejavnik bakterije *L. monocytogenes*, katerega funkcija je bakteriji omogočiti pobeg iz kislega gostiteljevega fagosoma v citosol (Portnoy in sod., 1992). Bakterija proizvaja LLO v vakuoli in tudi kasneje v citosolu, a delovanje toksina je omejeno le na fagosom. Ker ne lizira gostiteljske celice, je LLO edinstven predstavnik družine CDC (Decatur in Portnoy, 2000). Skupno z družino ima inhibicijo z že zelo nizkimi količinami prostega cholesterolja, aktivacijo z reducirajočimi sredstvi, inaktivacijo z oksidacijo ter križno reaktivnost s SLO (Mengaud in sod., 1988).

Zgrajen je iz 529 aminokislin in ima molekulsko maso 58,6 kDa. Prvih 25 aminokislin je signalni peptid, tako ima zrel protein 504 aminokislinskih ostankov in molekulsko maso 55,8 kDa (Mengaud in sod., 1988). Kot vsi CDC ima tudi LLO triptofansko zanko na C-terminalnem koncu peptida v domeni 4 (Michel in sod., 1990). Kristalografska struktura LLO še ni določena, a zaradi visoke podobnosti med njim in PFO (43% enakost ter 70% podobnost zaporedja; Decatur in Portnoy, 2000) pričakujemo ohranjenost strukture (Slika 4).



Slika 4: Dva modela LLO na osnovi 3D strukture. Levo teoretični 3D model LLO strukture narejen z uporabo SwissModel in RasMac (Dubail in sod., 2001), desno model narejen z uporabo SwissModel in MolMol (Schuerch in sod., 2005).

LLO je edini CDC, ki vsebuje 19 aminokislin dolgo zaporedje PEST na N-terminalnem delu molekule v prvi domeni toksina (Rogers in sod., 1986). To zaporedje je bogato s prolinom (P), glutaminsko kislino (E), serinom (S) in treoninom (T) in je prepoznavno zaporedje za gostiteljske proteolitične encime, ki nato hitro razgradijo protein v citosolu gostitelja (Decatur in Portnoy, 2000). V PEST-zaporedju so tri prepoznavna mesta za mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK; Gonzalez in sod., 1991). Delecija tega zaporedja poveča toksičnost mutantnega LLO in s tem zmanjša virulenco *L. monocytogenes*, saj se bakterija zanaša na celične funkcije gostitelja za razširjanje v sosednje celice (Lety in sod., 2003). To PEST-zaporedje je torej nujno za ohranjanje znotrajcelične niše bakterije in njeno virulenco (Decatur in Portnoy, 2000).

2.2.4 pH odvisnost listeriolizina O

Odvisnost LLO od pH je rezultat temperaturne in od pH odvisne denaturacije. Za LLO je optimalen pH delovanja 5,5 (Geoffroy in sod., 1987), pri pH 7,0 pa je skoraj popolnoma neaktivnen (Portnoy in sod., 1992; Beauregard in sod., 1997; Giammarini in sod., 2003). Izločanje LLO v kislem fagosomu je pomemben korak v izhodu *L. monocytogenes* iz fagosoma, saj inhibitorji fagosomskega zakisanja preprečijo pobeg bakterije v citoplazmo (Beauregard in sod., 1997). V sami citoplazmi se izogne poškodbam celice gostitelja z inaktivacijo pri nevtralnem pH (Giammarini in sod., 2003). *L. monocytogenes*, ki izražajo od kislega pH-neodvisen CDC PFO, so nesposobne delitve znotraj celice in nevirulentne (Jones in Portnoy, 1994), ker PFO lizira plazemsko membrano gostitelja po pobegu iz fagosoma. Natančen molekularni mehanizem osnove pH odvisnosti LLO potrebuje nadaljnje raziskave in analizo dejanske konformacijske spremembe. Pri dveh AB-toksinih s kislo pH-odvisnostjo (toksin diphterije in antraks toksin), kisel pH endosoma sproži spremembo konformacije v 'B' translokacijski domeni, hkrati pa se 'A' encimski del premakne v citosol evkariontske celice (Esbensen in sod., 1993; Abrami in sod., 2003).

Kritični korak inaktivacije LLO je predčasno razvitje dveh TMH domene 3, ki se sicer normalno vstavita v membrano celice tako, da tvorita transmembransko poro v obliki β -sodčka (Shatursky in sod., 1999; Schuerch in sod., 2005). Razvitje je pod regulacijo aminokislinskega trojčka (aminokisline Glu-247, Asp-320, Glu-208) v domeni 3, ki deluje kot pH senzor in ob nevtralnem ali bazičnem pH destabilizira α -vijačnici zaradi odbijanja nabojev. Struktura domene 3 se v odvisnosti od pH okolja izrazito spremeni (Rossjohn in sod., 1997). Večino časa je domena 3 v metastabilnem stanju, a se lahko zavihti stran od domene 2 in s tem razvije TMH 1 in 2. Tako metastabilno stanje obstaja pri nizkem pH, saj so karboksilne skupine aminokislinskega trojčka večinoma protonirane in helikalne lasnice se pretvorijo v β -transmembranske le po vezavi monomera na membrano. Pri nevtralnem ali višjem pH pa so karboksilne skupine večinoma deprotozionirane (največjo moč ima interakcija med glutaminskima kislinama). Odboj med naboji poruši strukturo domene 3, kar povzroči predčasen razvoj helikalnih lasnic. Protein posledično tako ni sposoben oligomerizacije z drugimi toksini na membrani. Visoka koncentracija soli prepreči denaturacijo z nevtralizacijo naboja med Glu ostankoma. Ker pa do denaturacije pride le pri temperaturi višji od 31 °C, proces ni voden le z elektrostatskim potencialom, ampak tudi drugimi temperaturno-občutljivimi odnosi med molekulami (van der Waalsove vezi, ionske vezi, dipoli, vodikova vez; Schuerch in sod., 2005).

Vsi člani družine imajo na mestu 485 *Priloge 1* treonin, z izjemo listerijinih CDC, ki vsebujejo levcin. Zamenjava tega levcina v treonin na tem mestu povzroči izgubo pH-odvisnosti LLO (Glomski in sod., 2002). Irreverzibilna inaktivacija citolitične aktivnosti LLO v nevtralnem ali bazičnem okolju je zaradi sprememb v domeni 4: pride do nastanka disulfidne vezi in nastanka dimera in posledično do velikih sprememb v hidrofobnosti toksina (Nomura in sod., 2007).

2.3 FLUORESCENCA (Pain, 1996)

Merjenje fluorescenčnih spektrov je način opredelitve zgradbe proteinov in njihove konformacije. Največja vrednost fluorescence kot tehnike za raziskovanje konformacije proteinov je v njeni visoki občutljivosti in nizki ceni raziskav. Zaradi visoke občutljivosti pa je potrebno paziti, da v raztopini ali na merilni celici ni nečistoč, saj to lahko vodi do napačne interpretacije dobljenih podatkov. Spekter je določen predvsem s polarnostjo okolja triptofanskih in tirozinskih ostankov in njihovih specifičnih interakcij. Manjša intenziteta fluorescence ob dodatku dušiteljev fluorescence nam nakaže delež teh ostankov, ki so v proteinski strukturi ali izpostavljeni raztopini in s tem poda informacijo o strukturi njihovega okolja.

Dielektrične lastnosti okolja lahko vplivajo na lastnosti spektrov molekul, kot na primer jakost intenzitete in položaj maksimumov absorpcije ali emisijskih spektrov in na trajanje fluorescence. Lastnosti molekule v lipidnem dvosloju (v našem primeru LLO) so torej različne od lastnosti, kadar je ta molekula v vodnem okolju.

2.4 HOMOLOGNO MODELIRANJE IN ELEKTROSTATSKI POTENCIAL

Področje strukture proteinov in homolognega modeliranja je znatno napredovalo z uporabo algoritmov, ki sočasno preračunajo ustreznost večih aminokislin in stranskih verig na vsakem položaju v proteinski strukturi. V večini primerov se elektrostatske energije ali ne upoštevajo ali pa približno izračunajo s Coulombovim potencialom in empiričnimi podatki, sorazmernimi z izpostavljeno površino topljenca. En razlog za izpuščanje elektrostatskih energij je pomanjkanje metod za njihovo oceno. Hitri analitični izračuni elektrostatskega potenciala na osnovi približka Coulombovega polja in splošne Bornove enačbe so natančni za energije majhnih topnih molekul, a so lahko manj zanesljivi pri obsežnih molekulah, kot so proteini (Havranek in Harbury, 1999).

Kljub temu je najlažje izračunati povprečni elektrostatski potencial iz enodimensijske Poisson-Boltzmannove enačbe z Gouy-Chapman teorijo povprečnega polja, če se ob interpretaciji zavedamo, da izračun vsebuje poenostavitev. Kljub temu nekatere elektrostatske pojave prikaže v skladu z eksperimenti. Za izračun realnih odnosov med lipidi in proteini pa Poisson-Boltzmann ni primeren zaradi predpostavk, da so peptidi in lipidi brezdimensijske točke, da se lahko zanemari diskretne parne elektrostatske privlake med posameznimi bazičnimi ostanki in kislimi lipidi, ter da so naboji enakomerno razporejeni po površini lipida (Peitzsch in sod., 1995).

2.5 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Od holesterola odvisni citolizini iz rodu *Listeria* se razlikujejo od drugih predstavnikov družine v svojem nizkem pH-optimumu delovanja. LLO deluje na membrano fagosoma, a pri tem ne lizira celice. Poseben je tudi zaradi PEST-zaporedja v peptidni molekuli, ki ga v citosolu naredi za tarčo proteolitičnih encimov gostitelja. Za svoje delovanje potrebuje visoko vsebnost holesterola v membrani. Kljub temu več raziskav poteka na SLO in PFO, na LLO in njegovi pH odvisnosti pa so raziskave večinoma osnovane na merjenju hemolitične aktivnosti toksina (Geoffroy in sod., 1987; Glomski in sod., 2002; Giammarini in sod., 2003; Nomura in sod., 2007). Kinetiko vezave LLO na lipidne membrane so s tehniko površinske plazmonske resonance preučili Bavdek in sodelavci (2007).

Na mestu 311 v molekuli LLO imajo samo trije CDC-ji listerij histidin in so tudi edini z odvisnostjo od nizkega pH. Nakamura in sodelavci (1999) so na PFO pokazali, da imajo tudi histidinski ostanki vlogo v citolizi, predvsem oligomerizaciji in nastanku pore z analizo fluorescenčnih spektrov. Znižanje pH iz 7,0 na 6,0 je na PFO spremenilo profil triptofanske fluorescence, kar kaže na konformacijsko spremembo v tem območju pH. Ker imajo imidazolni obroči histidinskih ostankov pK_a vrednost v tem območju, je možno, da histidinski ostanki pripomorejo k pH-odvisni konformacijski spremembi PFO (Nakamura in sod., 1999). Preveriti smo žeeli hipotezo, da je His311 pomemben za učinkovito vezavo LLO na lipidne membrane.

Za to sem v diplomskem delu v *E. coli* izrazila in očistila šest izogenih mutiranih različic LLO, kjer je imela vsaka eno zamenjavo histidina v alanin (na mestih 57, 79, 311, 423, 450 in 463). Z izoliranimi proteini sem nato preverila kinetiko ter sposobnost vezave na lipidne membrane pri kislem (5,5) in rahlo bazičnem pH (7,5). Iz znane kristalografske zgradbe PFO (Rossjohn in sod., 1997) in ILY (Polekhina in sod., 2005) sem s programom Modeller 9v6 naredila model LLO, kateremu sem s programom Deep View v4.0 dodala prikaz površinskega elektrostatskega privlaka vseh šestih mutant. Poznavanje molekularnega mehanizma vezave na lipidne membrane bo pomembno prispevalo k razumevanju patogeneze bakterije *L. monocytogenes*.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

agar	Merck, Nemčija
akrilamid/bis raztopina (30%)	Biorad, ZDA
amonijev persulfat (APS)	Serva, Nemčija
ampicilin	Sigma, ZDA
barvilo Coomassie Brilliant Blue	Biorad, ZDA
benzamidin HCl	Sigma, ZDA
beta-merkaptoetanol (β -MEtOH)	Sigma, ZDA
dializna vrečka (M_w 12-14.000 Da)	Spectrapor, ZDA
dioleoil fosfatidilholin (DOPC)	Avanti Polar Lipids, ZDA
etanol (EtOH), 96%, 100%	Merck, Nemčija
etilendiamin tetraacetat (EDTA)	Merck, Nemčija
filtri 0.2 μ m	Sartorius, Švedska
filtri za ekstrudor 100 nm	Avestin, Kanada
Hellmanex čistilno sredstvo	Hellma, Nemčija
holesterol	Avanti Polar Lipids, ZDA
imidazol	Sigma, ZDA
IPTG (izopropil β -d-1 tiogalaktopiranozid)	Sigma, ZDA
Luria broth medij	Sigma, ZDA
metanol (MeOH)	Merck, Nemčija
mikrotiterske plošče	Nunc, Danska
natrijev dihidrogen fosfat monohidrat ($NaH_2PO_4 \times 1H_2O$)	Merck, Nemčija
natrijev dodecilsulfat (NaDS)	Merck, Nemčija
natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, Nemčija
natrijev klorid (NaCl)	Merck, Nemčija
PMSF (AEBSF)	Sigma, ZDA
proteinski standard (PageRuler Prestained Prot.Ladder)	Fermentas, Kanada
steklene kroglice	Sigma, Nemčija
TEMED	Sigma, ZDA
tris(hidroksimetil)aminometan (Tris)	Merck, Nemčija

3.1.2 Raztopine

Vse raztopine so bile pripravljene v destilirani vodi (dH_2O). Gojišča so bila avtoklavirana. Raztopine za nikljevo afinitetno kromatografijo (Ni-NTA), hitro proteinsko tekočinsko kromatografijo (FPLC) in za merjenje fluorescence so bile prefiltrirane in odzračene.

Gojišča

LB tekoče gojišče z ampicilinom	25 g/L Luria broth medij 100 μ g/ml ampicilin
LB agarozno gojišče z ampicilinom	25 g/L Luria broth medij 20 g/L agar 100 μ g/ml ampicilin

Raztopine za NaDS-PAGE

Pufer za NaDS-PAGE (10x)

25 mM Tris
 1,92 M glicin
 35 mM NaDS
 60 mM Tris-HCl
 2 % NaDS
 5 % glicerol
 0,1 % Coomassie Brilliant Blue (m/v)
 pH 8,8

Raztopina za barvanje

10 % ocetna kislina (v/v)
 40 % metanol (v/v)
 0,5 % Coomassie Brilliant Blue (m/v)

12% ločitveni gel

0,9 mL akrilamid
 1,552 mL dH₂O
 0,375 mL 3M Tris (pH 8) pufra
 20 µL 10% SDS
 150 µL 1,5% APS
 6 µL TEMED
 0,25 mL akrilamid
 1,4725 mL dH₂O
 0,625 mL 0,5M Tris (pH 7,6) pufra
 25 µL 10% SDS
 125 µL 1,5% APS
 2,5 µL TEMED

Raztopina za dializo

Dializni pufer

10 mM NaH₂PO₄
 10 mM NaCl
 1 mM EDTA
 pH 5,7

Raztopine za Ni-NTA kromatografijo

Pufer za lizo

50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 10 mM imidazol
 pH 7

Pufer za spiranje

50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 25 mM imidazol
 pH 7

Elucijski pufer

50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 300 mM imidazol
 pH 7,5

Raztopini za hitro proteinsko tekočinsko kromatografijo (FPLC)

Pufer A

10 mM NaH₂PO₄
 pH 5,7

Pufer B

10 mM NaH₂PO₄
 1 M NaCl

ph 5,7

Raztopini za merjenje fluorescence

Pufer za fluorescenco 1	20 mM NaH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 1 mM EDTA pH 5,5
Pufer za fluorescenco 2	20 mM NaH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 1 mM EDTA pH 7,5

3.1.3 Encimi

Lizocim	Sigma, ZDA
DNAza B	Sigma, ZDA
RNAza A	Sigma, ZDA

3.1.4 Bakterijski sev

E. coli BL21(DE3)pLysS	Novagen, Nemčija
------------------------	------------------

3.1.5 Plazmidi z genom za ustrezeno različico LLO

pET-8c	Novagen, Nemčija
--------	------------------

3.1.6 Kompleta za določanje vsebnosti lipidov

Free Cholesterol C	Wako Chemicals, Nemčija
Phospholipids B	Wako Chemicals, Nemčija

3.1.7 Laboratorijska oprema

centrifugi	Hettich Rotanta 460R, Sigma, Nemčija
čitalca mikrotitrnih plošč	SIGMA 3K30, Sigma, Nemčija
ekstrudor	MRX, Dynex technologies, Nemčija
elektroforezni sistem	Zenith 3100, Anthos Labtec
kromatografska kolona za FPLC	Avestin Lipid Extrudor, Kanada
kromatografski polnilec za Ni-NTA	elektroforezna celica Mini Protean® II, BioRad, ZDA
magnetno mešalo	napajalna enota PowerPac HC, Bio-Rad, ZDA
pH meter	Mono S HR 5/5 kation exchange, Amersham
rotavapor	Pharmacia Biotech, Švedska
sonikator	Ni-NTA agarosa, QUIAGEN, ZDA
spektrofluorimeter	MM540, Tehnica, Slovenija
tehtnica	Mettler Toledo, Nemčija
vibracijski stresalnik	B480, Büchi, Švica
	Ultrasonic Disintegrator Mk2, MSE Scientific Instruments, Velika Britanija
	Jasco FP-750, Jasco Corporation, Japonska
	Sartorius, Švedska
	Vibromix 301EVT, Tehnica, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Izražanje rekombinantnega LLO

Genski zapisi LLO so bili predhodno vstavljeni v plazmid pET-8c. Vsaki od šestih različic genskega zapisu LLO smo izrezali zaporedje signalnega peptida (MKKIMLVLITLILSLPIAQQTTEAK) in na začetek vstavili histidinski repek (HHHHHHSSLVPRGSK) ter aminokislinsko zamenjavo histidina v alanin na mestih 57, 79, 311, 423, 450 ali 463 v odvisnosti od mutante. Plazmide pET-8c-LLO smo uporabili za transformacijo v *E. coli* BL21(DE3)pLysS kompetentne celice s topotnim šokom. Odmrznjenim kompetentnim bakterijskim celicam (iz zamrzovalnika na -80 °C) smo dodali 1,7 µl plazmidne DNA in inkubirali 30 minut. Po tem času je sledil topotni šok 75 sekund na 42 °C. Transformacijski raztopini smo dodali 300 µl tekočega LB gojišča brez ampicilina in nato eno uro inkubirali na 37 °C pri 220 obratih na minuto, preden smo vsebino mikrocentrifugirke razmazali na trdno LB gojišče z ampicilinom. To gojišče smo postavili v inkubator na 37 °C za 12 ur. Zrasle kolonije bakterij smo uporabili kot inokulum za LB tekoče gojišče z ampicilinom na stresalniku pri temperaturi 30 °C. Ko je rast dosegla pozno log fazo ($OD_{600} = 0,8$), smo dodali z IPTG do končne koncentracije 0,5 mM za indukcijo T7 RNA polimeraznega gena. Po tem je sledila 5 urna kultivacija na 28 °C (oz. dokler bakterijska kultura ni dosegla največ $OD_{600} = 3,0$). Celice iz treh litrov tekoče kulture po indukciji z IPTG smo po končanem gojenju centrifugirali 30 minut pri 4400 obratih na minuto in 4 °C. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa zamrznili na -20 °C.

3.2.2 Čiščenje rekombinantnih proteinov

Dobljeno usedlino smo resuspendirali v pufru za lizo pri pH 7,0 in temperaturi 4 °C (in sicer 2 ml pufra na 1 g usedline), ki je vseboval 20 mM β-merkaptoetanol, 1mM benzamidin, 0,5 mM PMSF (AEBSF), 0,5 mg/ml lizocim, 10 µg/mg DNazo in 20 µg/ml RNazo in nato podvržene razbijanju z ultrazvokom pri temperaturi 4 °C. Celice so bile 30 minut sonicirane v razmerju 30s/5min sonikacije in premora pred novim razbijanjem pri 40% amplitudi. Dobljeni grobi proteinski lizat smo centrifugirali 60 minut pri 14.000 obratih na minuto in 4 °C. Topni LLO, ki je ostal v supernatantu smo nato čistili z nikljevo afinitetno kromatografijo (QiaGen, ZDA). Supernatant smo nanesli na kolono v celotnem volumnu (med 12-20 ml). Nato smo z višanjem koncentracije imidazola v pufrih za lizo, spiranje in elucijo proteine vezane na Ni-NTA kroglicah sprali. Najprej smo dodali 4 ml pufra za lizo in zbrali 4 frakcije z volumnom 1 ml po izstopu iz QiaGen kolone, nato 8 ml pufra za spiranje in 12 ml elucijskega pufra. Z NaDS-eleketroforezo (12% gel) smo preverili vsebnost LLO v 24-frakcijah po 1 ml in nato združili frakcije, ki so ga vsebovale, v dializno vrečko (velikost por 12–14.000 kDa) ter dvakrat dializirali (najprej čez noč, nato še tri ure; oboje pri 4 °C) v 3 litrih dializnega pufra ob srednje hitrem mešanju. Dializirano raztopino proteinov smo centrifugirali 1 uro pri 10.000 obratih na minuto in 4 °C in supernatant nanesli na kationsko kolono (Mono S HR 5/5) v sistemu FPLC, ki je bila predhodno ekvilibrirana v raztopini A za tekočinsko kromatografijo. Kolono smo nato sprali z volumnom pufra kolone in z raztopino B izvedli desorpcijo proteina s kontinuirnim gradientom soli (0–1 M NaCl; LLO se je začel spirati pri 60% gradientu).

3.2.3 Določanje vsebnosti proteinov

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

Vzorce za denaturajočo NaDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo se je vzelo po vsakem koraku čiščenja in s tem preverilo prisotnost proteina in ocenilo količino. V času gojenja sta bila odvzeta dva: en preden smo dodali IPTG in drug ob koncu gojenja. Dodana sta bila v takem volumnu, da je bila vrednost vzorca za NaDS-PAGE OD₆₀₀=0,4. Vzorec smo centrifugirali 90 sekund pri 13.000 obratih na minuto, odstranili tekoče gojišče in dodali 100 µl 1-kratnega nanašalnega pufra za NaDS-PAGE. Po homogenizaciji in centrifugiranju smo vzeli vzorca peleta (približno 1 mm² smo raztopili v 100 µl 1-kratnega nanašalnega pufra) in supernatanta (10 µl vzorca in 5 µl 2-kratnega nanašalnega pufra, vsi slediči odvzeti vzorci imajo temu enako razmerje vzorec : 2-kratni nanašalni pufer). Enako se je odvzelo vzorce po dializi in centrifugiranju. Med Ni-NTA kromatografijo so bili odvzeti štirje vzorci: supernatant po izstopu iz kolone (ang. "flowthrough", ki je vseboval nevezane proteine), pufra za lizo in spiranje ter elucijski pufer. Med tekočinsko kromatografijo (FPLC) se je odvzelo vzorce glede na zbrane frakcije, tudi v razmerju 2:1 vzorca in 2-kratnega nanašalnega pufra. Vsak vzorec smo 3 minute kuhalili v vreli vodi, preden je bil nanešen na poliakrilamidni gel z 12% zamreženostjo in debelino 1 mm. Elektroforeza je tekla 45 minut v elektroforeznem sistemu pri konstantni napetosti 200 V v 1-kratnem elektroforeznem pufru za NaDS-PAGE. Proteine v gelu smo barvali v raztopini za barvanje s Coomassie modrim barvilom in razbarvali v destilirani vodi.

Koncentracija proteina

Vsebnost rekombinantnega LLO je bila ocenjena preko debeline ustrezne lise na gelu in izmerjena spektrofotometrično (absorbanca pri 280 nm). Koncentracijo čistega LLO smo izračunali preko spektrofotometrično izmerjene absorbance in teoretičnega utežnostnega ekstinkcijskega faktorja pri koncentraciji 1 mg/ml ($\epsilon^{0,1\%}$) izračunanega iz aminokislinskega zaporedja na internetni strani ExPASy (ProtParam tool): $c = \frac{A_{280}}{\epsilon^{0,1\%}}$. Očiščeni LLO je bil alikvotiran in shranjen na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.2.4 Priprava unilamelarnih lipidnih veziklov

Pripravljeni unilamelarni lipidni vezikli (LUV) so bili pripravljeni iz mešanice DOPC s 40 molskimi odstotki holesterola. Topilo (kloroform v katerem sta bila raztopljena tako začetni holesterol kot DOPC) smo odstranjevali z rotacijskim vakuumskim evaporatorjem 3 ure. Film, ki je nastal na notranji površini bučke po izsušitvi topila, smo raztopili v 600 µl fosfatnega pufra, dodali steklene kroglice in mešali na vibracijskem stresalniku. Nastale velike multilamelarne vezikle smo 6-krat zapored zamrznili v tekočem dušiku in odmrznili v topli vodi. Nato smo vezikle 31-krat iztiskali skozi polikarbonatna filtra z velikostjo por 100 nm, končni rezultat so bili LUV premera približno 100 nm. Koncentracije lipidov smo določili s komercialnima kolorimetričnima testoma (Phospholipids B Kit za DOPC in Free Cholesterol C za holesterol) po navodilih proizvajalca. Vezikli so bili shranjeni na 4 °C do uporabe in največ en teden.

3.2.5 Merjenje fluorescence

Fluorescenco smo merili s spektrofluoreimetrom Jasco FP-750 v kvarčnih kivetah s končnim volumnom mešanice 1,2 ml (koncentracija LLO 100 nmol/l, koncentracija LUV 10 (40 % holesterol, 60 % DOPC) $\mu\text{mol/l}$ in pufer za fluorescenco (1 ali 2) do končnega volumna), temperaturi 25 °C in stalnem mešanju. Meritve spektrov emisije in kinetike vezave smo opravili pri ekscitacijski pasovni širini 5 nm, emisijski pasovni širini 5 nm, visoki občutljivosti, ekscitacijska valovna dolžina je bila 295 nm. Za spekture emisije smo podatke zajemali med 310-400 nm s koraki po 1 nm valovne dolžine, hitrostjo 60 nm/min in srednjim odzivom. Za kinetiko vezave smo podatke zajemali med 0-180 sekund pri emisijski valovni dolžini 346 nm, s koraki po 0,5 s in odzivom 2 s.

Potek meritve

Kiveta je bila pred vsako novo meritvijo temeljito očiščena z 1 % raztopino Hellmanex, nato etanolom in destilirano vodo. Meritve so potekale v dveh korakih.

1. a) *Spekter pufra:* V čisto kiveto smo dodali 1,2 ml pufra 1 ali 2 in po eni minutu pomerili emisijski spekter.
- b) *Dodatek LUV:* V kiveto s pufrom smo po 25 sekundah po začetku merjenja vbrizgali LUV do končne koncentracije 10 $\mu\text{mol/l}$.
- c) *Spekter pufra in LUV:* Kiveti s pufrom in LUV smo po koncu merjenja kinetike pomerili emisijski spekter.
2. a) *Spekter pufra in LLO:* V čisto kiveto smo dodali 1,2 ml pufra 1 ali 2 in LLO do končne koncentracije 10 nmol/l in po eni minutu pomerili emisijski spekter.
- b) *Pufer in LLO ob dodatku LUV:* V kiveto s pufrom in LLO smo po 25 sekundah po začetku vbrizgali LUV do končne koncentracije 10 $\mu\text{mol/l}$.
- c) *Spekter pufra, LLO in LUV:* Kiveti s pufrom, LLO in LUV smo po koncu merjenja kinetike pomerili emisijski spekter.

Pri vsaki mutantni, pH in ponovitvi meritve (5 ponovitev za divji tip LLO, 4 za ostale) smo:

- od spektra pufra z LLO in LUV (2.c) odšteli spekter pufra z LUV (1.c);
- od spektra pufra z LLO (2.a) odšteli spekter pufra (1.a);
- od vsake meritve kinetike rasti fluorescence po dodatku LUV v raztopino LLO in pufra (pri 25 sekundi) odšteli krivuljo rasti fluorescence po dodatku LUV v pufer (Slika 6).

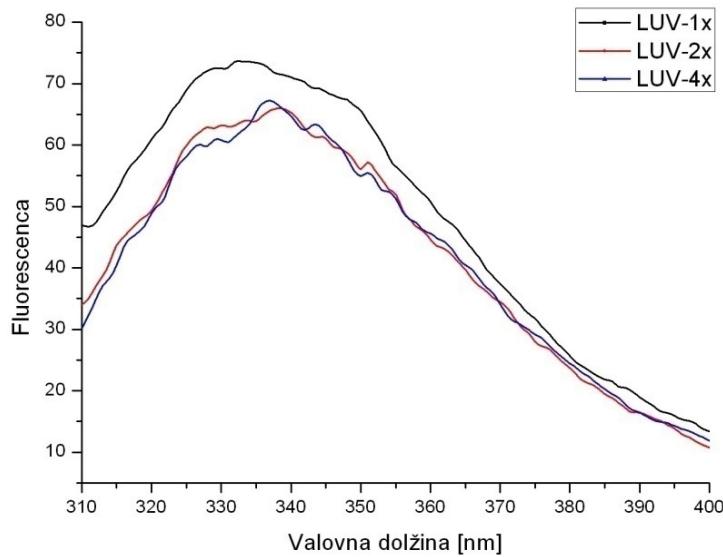
Dobljene krivulje spektrov smo pogladili z lokalno polinomsko regresijo z 20 točkami prostosti (Savitzky-Golay metoda v programu OriginPro v8.0). Vsaki poglajeni krivulji LUV ali spektra LLO pri pH 5,5 ali 7,5 smo poiskali valovno dolžino vrha krivulje.

Dobljenim eksperimentalnim podatkom kinetike smo prilegali krivuljo, ki jo opisuje naslednja enačba prvega reda eksponentne rasti

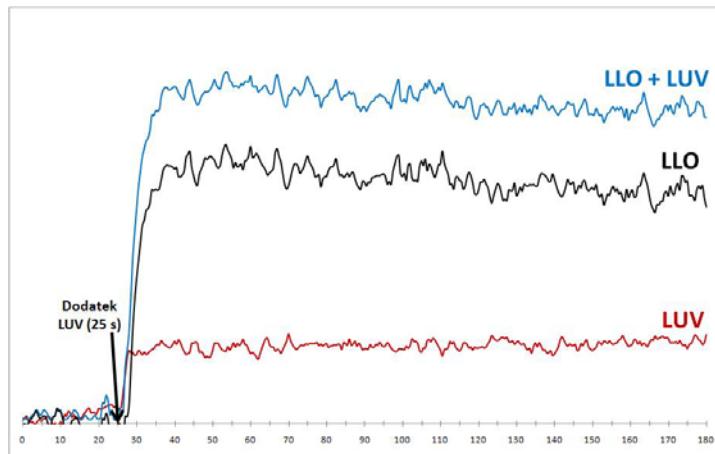
$$y = F_{\max}(1 - e^{(k/t)})$$

kjer je y fluorescenza, F_{\max} amplituda krivulje, k konstanta rasti krivulje in t čas.

Pri meritvah spektrov fluorescence smo se odločili za razmerje med LLO in LUV 1 : 100. Pri razmerjih 1 : 200 ter 1 : 400 je bil spekter po treh minutah nižji (Slika 5).



Slika 5: Optimizacija razmerja med LLO in LUV za merjenje fluorescence.



Slika 6: Obdelava podatkov meritev kinetike. Od porasta fluorescence po dodatku LUV v raztopino LLO (modro) smo odšteli porast fluorescence po dodatku LUV v pufer (rdeče). Realno vezavo toksina predstavlja krivulja LLO (črno).

3.2.6 Modeliranje

Modeller 9v5

Računalniški model LLO smo pripravili na osnovi 3D strukture PFO iz PDB datoteke (1pfo) s programom Modeller 9v5 (Sali in Blundell, 1993). Podrobnejši opis postopka s primeri zapisov je na osnovni strani programa (Sali, Tutorial - Basic Modelling, 2009). Model smo generirali s štirimi Python skriptami (*.py).

1. *Iskanje sorodnih struktur* (build_profile.py): zaporedje LLO (Mengaud in sod., 1988) smo zapisali v PIR formatu (LLO.pir), da ga je program preko te skripte primerjal z datoteko neponavlajočih se PDB zaporedij (pdb_95.pir), izpisal sorodna zaporedja (family.mat) ter slednje poravnal (build_profile.ali). Po pričakovanjih je program našel 3D strukturi PFO (1pfo.pdb) in ILY (1s3r.pdb).
2. *Izbor najbolj primerne sorodne strukture* (compare.py): primerjava s to skripto pokaže, da sta tako 1pfo kot 1s3r skoraj identična glede na zaporedje in strukturo (compare.log), vendar ima 1pfo boljšo kristalografsko resolucijo (2,2 Å proti 2,6 Å), zato je bila izbrana struktura PFO.
3. *Poravnava LLO z zaporedjem najbolj podobnega proteina* (align2d.py): ukaz poravna zaporedji z dinamičnim programskim algoritmom, ki upošteva strukturno informacijo najbolj podobnega proteina (PFO) kar zmanjša število napak poravnave v primerjavi z drugimi programi. V našem primeru je bila podobnost med LLO in PFO tako velika, da bi vsak drug program z razumnimi parametri dal enako poravnavo. Primerjava struktur PDB datotek se zapiše v align2d.log datoteko.
4. *Izračun modela LLO* (model_single.py): v odvisnosti od parametra za število modelov program izračuna podobne modele LLO (v našem primeru 5), jih poda v PDB formatu in izračuna DOPE vrednost (model_single.log). DOPE metoda (ang. "Discrete Optimized Protein Energy") oceni kvaliteto modela preko statističnih potencialov optimiziranih za oceno modela. Izbrali smo model z najvišjo DOPE vrednostjo.

Ocena modela: S programom Procheck (Laskowski, 1993) smo preverili ali je dobljeni model primeren, a je še vedno potrebno paziti, saj vrednosti niso absolutne in z njimi ne moremo delati direktne primerjave. Še vedno pa lahko dobimo neko idejo o kvaliteti naše poravnave s primerjavo grobe oblike profilov – če je en zamaknjen glede na drugega, je premaknjena tudi sama poravnava zaporedja.

Swiss PDB-Viewer – Deep View v4.0

V tem prosto dostopnem programu smo odprli dobljeno datoteko z modelom in izrisali elektrostatski potencial divjega tipa in mutante His311Ala LLO. Ukaz *Tools – Compute Energy (Force Field)* nam je izpisal številčne vrednosti elektrostatskega potenciala, ukaz *Tools – Compute Electrostatic Potential* pa po Poisson-Boltzmanovi enačbi (pri pH 7 in brez sprememb nastavitev v programu) elektrostatsko površino obeh proteinov.

4. REZULTATI

4.1 Lastnosti aminokislinskih zaporedij izražanih konstruktorov

V zaporedju LLO smo izrezali zaporedje signalnega peptida in na začetek vstavili histidinski repek. Vsaka od mutant je vsebovala eno zamenjavo histidina v alanin, kot prikazano na Sliki 7. V Preglednici 3 so prikazane osnovne lastnosti rekombinantnih proteinov, ki smo jih določili na internetni strani ExPASy (ProtParam tool, 2003).

10	20	30	40	50	60	70	80
HHHHHHSSLV PRGSKDASAF	NKENSISSMA PPASPPASP K TPIEKK H ADE IDKYIQGLDY NKNNVLVY H G DAVTNVPPRK						
90	100	110	120	130	140	150	160
GYKDGNEYIV VEKKKKSINQ NNADIQVVNA ISSLTYPGAL VKANSELVEN QPDVLPVKRD SLTLSIDLPG MTNQDNKIVV							
170	180	190	200	210	220	230	240
KNATKSNVNN AVNTLVERWN EKYAQAYPNV SAKIDYDDDEM AYSESQLIAK FGTAFKAVNN SLNVNFGAIS EGKMQEEVIS							
250	260	270	280	290	300	310	320
FKQIYYNVNV NEPTRPSRFF GKAVTKEQLQ ALGVNAENPP AYISSVAYGR QVYVLKLSTNS H ESTKVKAACFD AAVSGKSVSG							
330	340	350	360	370	380	390	400
DVELTNIIKKN SSFKAVIYGG SAKDEVQIID GNLGDLRDIL KKKGATFNRET PGVPIAYTTN FLKDNEELAVI KNNSEYIETT							
410	420	430	440	450	460	470	480
SKAYTDGKIN ID H SGGYVAQ FNISWDEVNY DPEGNEIVQ H KNWSENNKSK LA H FTSSIYL PGNARNINVY AKECTGLAWE							
490	500	510					
WWRTVIIDDRN LPLVKNRNIS IWGTTLYPKY SNKVDNPIE							

Slika 7: Konstrukt LLO uporabljen v diplomske nalogi. Sestavljen je iz histidinskega repka (aminokislina 1-15; modro) in aminokislina 26-529 divjega tipa LLO. Z zeleno so označeni histidini, ki so bili zamenjani za alanin pri šestih različnih mutantah (His57Ala, His79Ala, His311Ala, His423Ala, His450Ala ali His463Ala zaporedja divjega tipa LLO).

Preglednica 2: Osnovne lastnosti rekombinantnih proteinov izoliranih v diplomskem delu.

Konstrukt	M _w [kDa]	Teoretična pI	Ekstinkcijski koeficient ($\epsilon^{0,1\%}$)
LLO-wt*	57611.4	7.81	1.315
LLO-mutanta**	57545.3	7,81	1.316

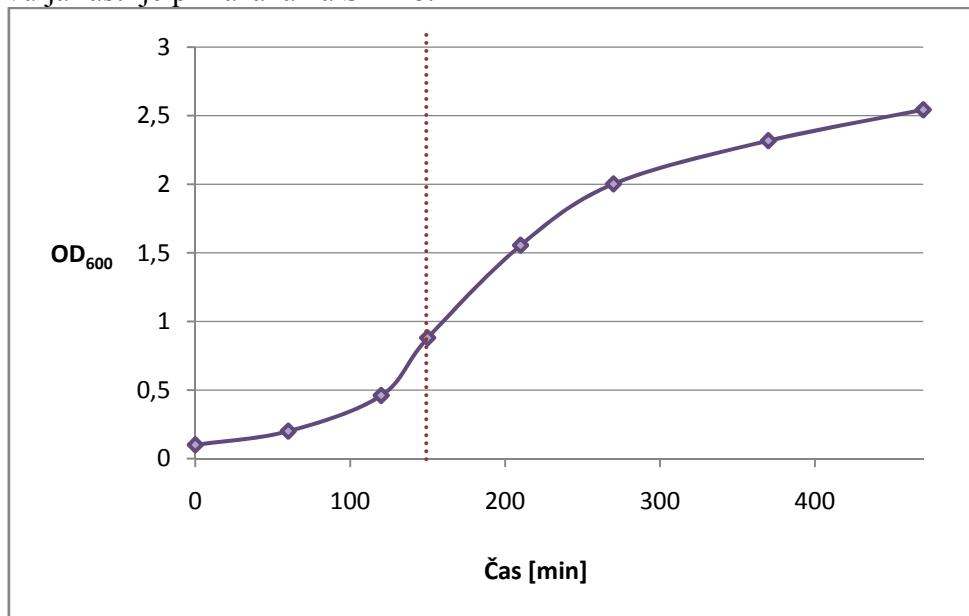
* Konstrukt identičen zapisu na Sliki 7.

** Rekombinantni proteini kot našteti na Sliki 7.

4.2 Izolacija mutant listeriolizina O

Vse konstrukte smo izrazili v *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Po transformaciji s topotnim šokom smo dobili 150-200 kolonij na trdnem LB gojišču z ampicilinom, ki smo jih nato prenesli v prekonočno kulturo. S to smo inokulirali 3 litre LB gojišča z ampicilinom in do indukcije gojili na 32 °C, po indukciji z IPTG (do končne koncentracije 0,5 mM) pa na 28 °C, pri 200 obratih na minuto. Inducirali smo, ko je bila optična gostota (OD₆₀₀) med 0,6–0,9 ter nato gojili še 4-5 ur do OD₆₀₀ med 3,0–3,6.

Pri prvih izolacijah smo z IPTG inducirali, ko je OD₆₀₀ kulture dosegla vrednost med 0,4 in 0,5. Kasnejša izolacija ob taki indukciji je dala manjše izplene (na starejših celicah), zato smo empirično določili optimalno vrednost optične gostote za indukcijo, in sicer med 0,8–0,9. Krivulja rasti je prikazana na Sliki 8.

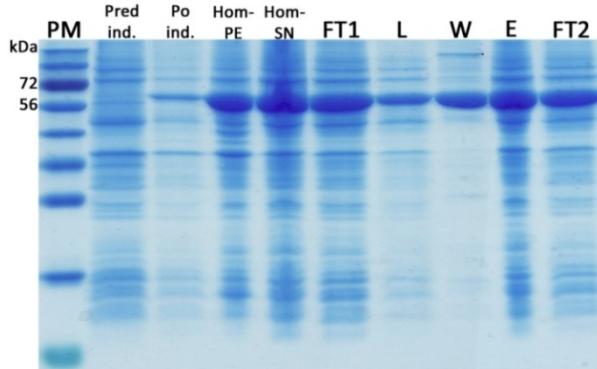


Slika 8: Rastna krivulja kulture *E. coli* v tekočem LB gojišču z ampicilinom. Rdeča prekinjena črta nakazuje dodatek IPTG (izopropil β-D-1 tiogalaktopiranozid) v pozni log fazi in začetek eksponentne rasti kulture.

Po koncu gojenja smo celice tekoče kulture centrifugirali in peletu dodali pufer za lizo, β-merkaptoetanol, benzamidin, AEBSF, lizocim, DNazo in RNazo. Homogenizirali smo z ultrazvokom, postopek ima velik vpliv na končni izkoristek. Slednji je direktno odvisen od nizke temperature suspenzije pufra za lizo s celicami in dodatki (idealno 4 °C, med razbijanjem se rahlo dvigne, zato med koraki soniciranja raztopini dovolimo, da se spet ohladi). Na samo segrevanje vplivata začetna homogenost suspenzije (manj kot je v pufru za lizo kosmov peleta, manjše je segrevanje) ter čas med razbijanjem (okoli 15 minut najbolj primerno). V primeru, da je v suspenziji več manjših delcev peleta, lahko pustimo suspenzijo na sonifikatorju za 20-30 minut na 5s/30s razmerju sonifikacije in premora pred novim razbijanjem in po tem nadaljujemo z 30s/5min razmerjem. Ko v suspenziji ni večjih delcev (ti so razbiti že po prvih nekaj 30 sekundah soniciranja), ko je vidno manj motna (v njej ni več veliko celih celic *E. coli*) ter običajno tudi svetlejše barve, jo centrifugiramo in ohranimo supernatant s topnim LLO (homogenat).

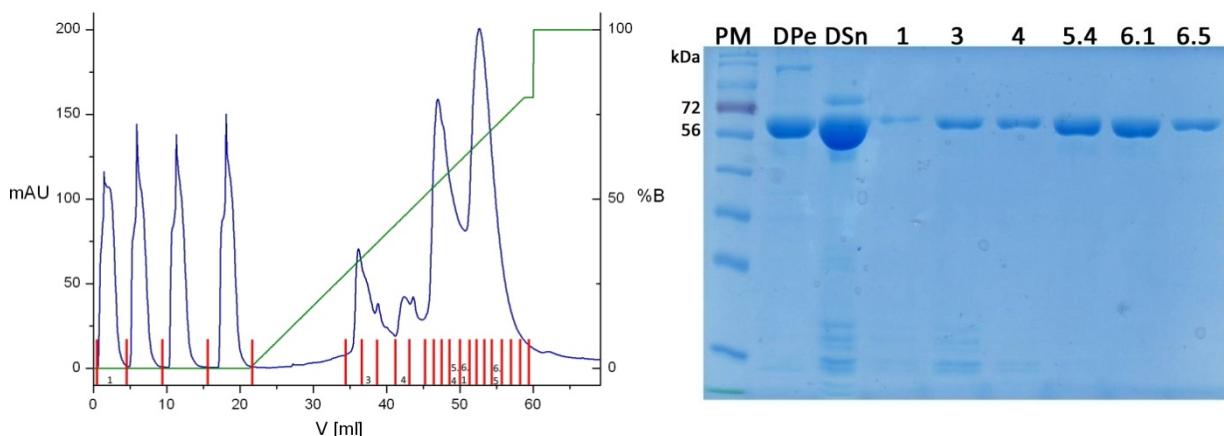
Homogenat smo prefiltirali (0,22 µm) in nadalje čistili protein z Ni-NTA. Zaradi histidinskega repka so imeli vsi naši konstrukti visoko potencialno vezavo na Ni-NTA kroglice. Sprva smo ga nanašali na kolono, a je bilo tako pridobljenega proteina malo. Dejanska vezava je odvisna od časa kontakta raztopine s kroglicami, zato smo kasneje to mešanico počasi stresali (60-80 obr/min) in za 2 minuti centrifugirali pri 2000 obr/min ter odpipetirali supernatant. Kroglice smo po tem zaporedno sprali z različnimi volumeni pufrov za lizo, spiranje in elucijo. Postopek stresanja mešanice kroglic in homogenata se je ponovilo 3-krat, kar nam je dalo dovoljšno količino končnega čistega proteina.

V korakih gojenja kulture v LB gojišču do dodatka IPTG, homogenizacije s sonikatorjem ter Ni-NTA smo odvzeli vzorce za NaDS-PAGE, kot prikazano na Sliki 9.



Slika 9: NaDS-PAGE gel izolacije LLO iz *E. coli* BL21(DE3)pLysS. PM, označevalec velikosti; vzorec pred in po indukciji; pelet in supernatant po homogenizaciji; FT1 in FT2; homogenat po izstopu iz kolone (ponovitev 1 in 2); L, frakcija po spiranju s pufrom za lizo; W, frakcija po spiranju s pufrom za spiranje; E, frakcija po spiranju z elucijskim pufrom.

Protein v elucijskem pufru smo združili in dializirali v dveh korakih. Preden smo začeli z ionsko izmenjevalno kromatografijo (FPLC), smo vsebino vrečke centrifugirali in ohranili supernatant (nujno ga je prefiltrirali preko 0,22 µm filtra, da ne zamaši Mono S kolone za FPLC). Od tega smo 2 ml nanesli na omenjeno kolono in pustili steči 4 ml pufra A (proteine, ki se niso vezali, smo popolnoma sprali pred ponovnim nanosom) ter ta dva koraka ponovili dokler ni bil nanešen ves volumen dializnega supernatanta. Nato smo večali gradient soli (pufra B za FPLC) in zbirali frakcije kot prikazano na Sliki 10.

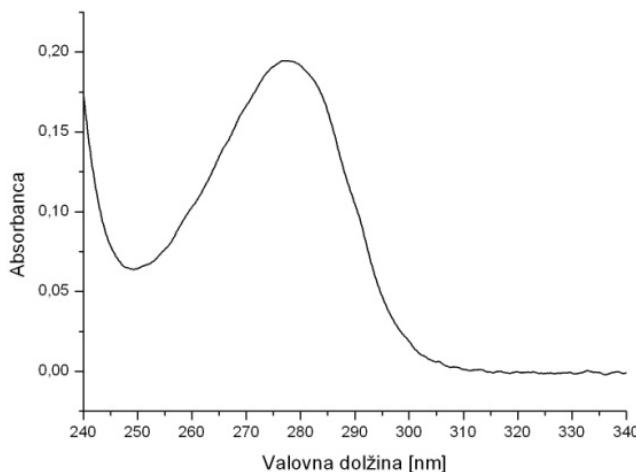


Slika 10: Levo kromatogram čiščenja LLO z ionsko izmenjevalni kromatografijo. Desno nekatere frakcije ionsko izmenjevalne kromatografije. PM, označevalec velikosti; pelet in supernatant po dializi; 1, 3, 4, 5, 6.1 in 6.5 vzorci odvzeti od pripadajočih odsekov na kromatogramu.

Manjše količine proteina se je zaznalo v nevezani frakciji (rdeč predel 1, Slika 7 levo). Frakciji 3 in 4 (prvi in drugi vrh) sta vsebovali protein, a z nečistočami (Slika 7 desno) in jih zato nismo združili v končno raztopino čistega proteina. Frakcija 5 je s kasnejšimi podfrakcijami (5.3 naprej) vsebovala čist protein, ki smo ga združili s celotnim šestim vrhom in pomerili absorbanco. Vse mutante so imele podoben spekter s štirimi vrhovi in vsebnostjo LLO.

Ker bi lahko dva vrhova (5 in 6 frakciji) pomenila nehomogenost, smo le-to preverili z gelsko kromatografijo, katere rezultat je bil spekter z enim samim vrhom (neobjavljeni podatki), torej v raztopini nismo imeli dveh različnih populacij proteina.

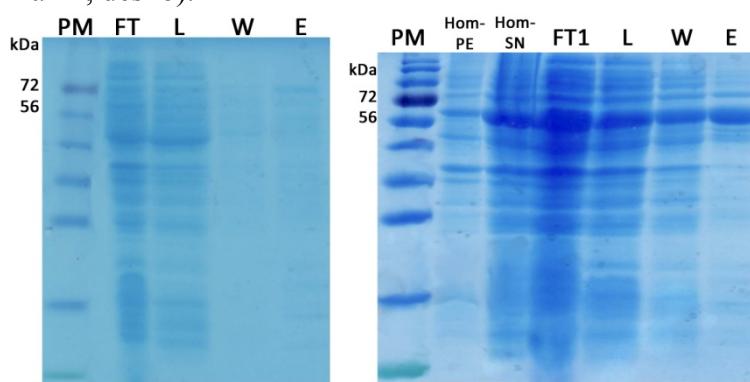
Končni čisti raztopini smo pomerili spekter absorbance med 240 in 340 nm za izračun koncentracije in končno oceno čistosti (Slika 11). Koncentracijo proteina smo določili po Lambert-Beerovem zakonu. Večji kot je padec absorbance med vrhom in 250 nm, bolj čist je protein. Raztopino smo alikvotirali (1 ml) in zamrznili na -20°C do kasnejše uporabe.



Slika 11: Absorbcijski spekter očiščene LLO-His450Ala mutante. Absorbanca na vrhu je 0,194. Izračunana koncentracija proteina je 2,56 $\mu\text{mol/l}$.

4.2.1 Posebnost izolacije mutante H423A

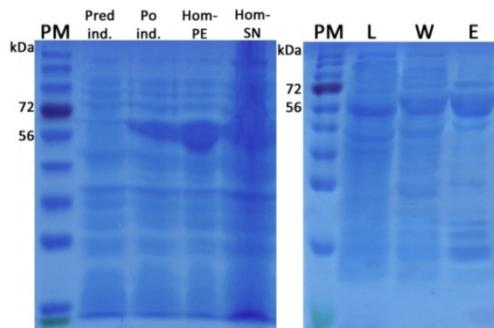
Kadar smo kulturo s tem konstruktom gojili na 28°C , se nam po nikljevi kromatografiji ta mutanta ni izločila v pufrih za spiranje in elucijo (Slika 12, levo). Zato smo temperaturo gojenja znižali na 22°C in gojili 16 ur ter s tem v teh pufrih dobili frakcije, ki so vsebovale LLO-H423A (Slika 12, desno).



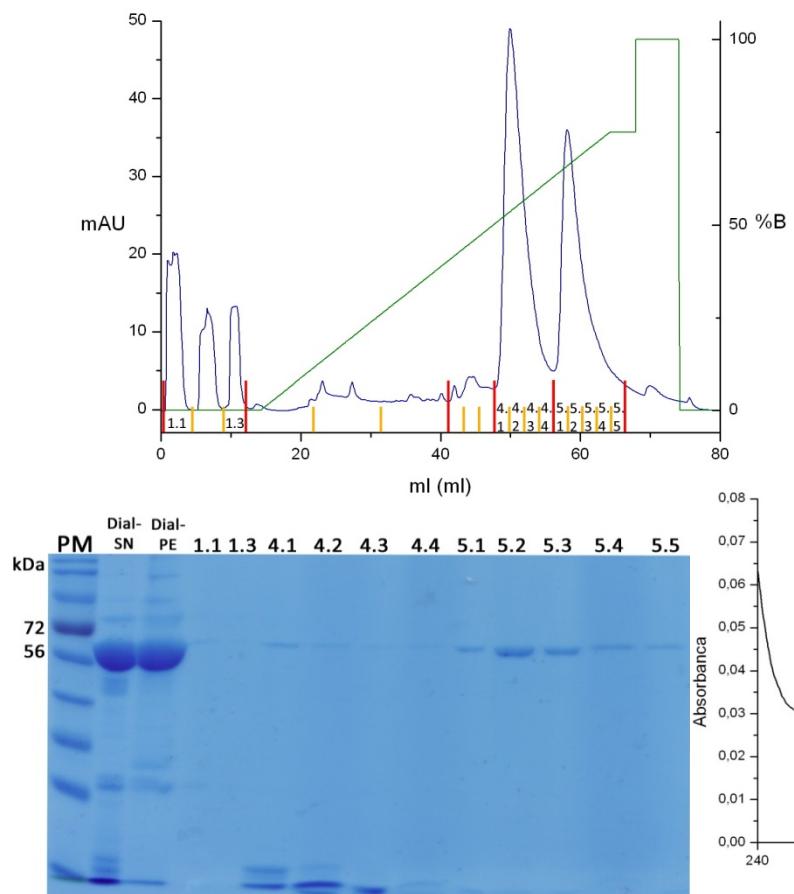
Slika 12: NaDS-PAGE gel vzorcev Ni-NTA kromatografije mutante LLO-His423Ala pri temperaturi gojenja 28°C (levo) in 22°C (desno). PM, označevalec velikosti; FT, homogenat po izstopu iz kolone; L, frakcija v pufru za lizo; W, frakcija v pufru za spiranje; E, frakcija v elucijskem pufru. Hom-PE, pelet po homogenizaciji; Hom-SN, supernatant po homogenizaciji.

4.2.2 Posebnost izolacije mutante H311A

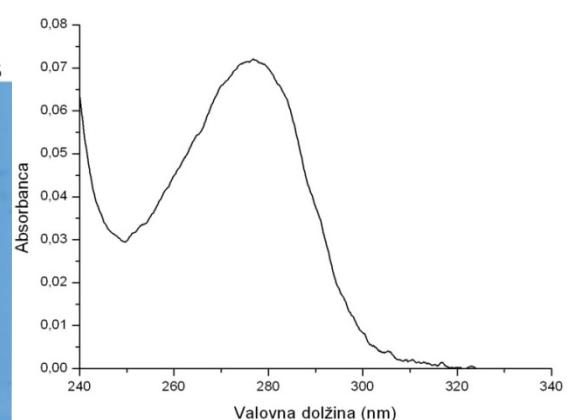
V večih ponovitvah celotne izolacije konstrukta LLO-H311A smo na NaDS-PAGE gelih dobili podobne rezultate kot na Sliki 13, in sicer veliko proteina v frakciji elucijskega pufra Ni-NTA. Po dializi ga je veliko postalega netopnega (Slika 15) in na našo kolono se ga je vezalo malo (Sliki 14 in 15), zato smo ga dobili malo na liter kulture.



Slika 13: NaDS-PAGE gel izolacije LLO-His311Ala (homogenizacija in afinitetna kromatografija). PM, označevalec velikosti; vzorca pred in po indukciji; pelet in supernatant po homogenizaciji; L, frakcija v pufru za lizo; W, frakcija v pufru za spiranje; E, frakcija v elucijskem pufru.



Slika 14: Spekter LLO-His311Ala po ionsko izmenjevalni kromatografiji. Številke 1.1, 1.3, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5 so vzorci na Sliki 15, levo.



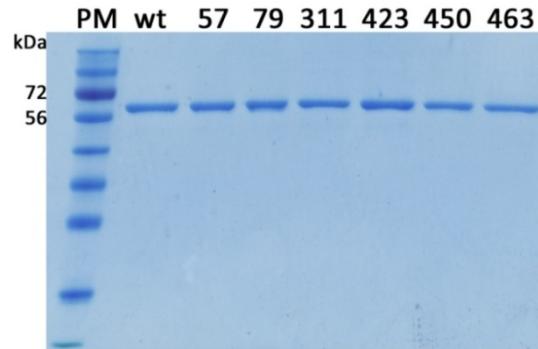
Slika 15: Levo vzorci ionske izmenjevalne kromatografije. PM, označevalec velikosti; supernatant in pelet po dializi; 1.1, 1.3 vzorec iz frakcije z nevezanimi proteini na kolono; 4.1-4.4 in 5.1-5.5 vzorci označenih delov v Sliki 13. Desno absorbcijski spekter očiščene mutante LLO-His311Ala, absorbanca na vrhu je 0,072. Izračunana koncentracija proteina je 0,95 µmol/l.

Pri mutantah H57A, H79A, H311A, H450A, H463A in divjem tipu smo pri temperaturi gojenja 28 °C dobili v tem vrstnem redu 5.1, 6.6, 1.3, 2.4, 0.77 in 7.12 mg proteina. Mutanto H423A smo gojili pri temperaturi 22 °C in izolirali 1.2 mg proteina (prikazano v Preglednici 4 in na Sliki 15).

Preglednica 3: Količina izoliranih rekombinantnih proteinov.

LLO	m/V _{kulture} [mg/L]
<i>divji tip</i>	2,39
<i>H57A</i>	1,70
<i>H79A</i>	2,21
<i>H311A</i>	0,44
<i>H423A</i>	0,40
<i>H450A</i>	0,79
<i>H463A</i>	0,26

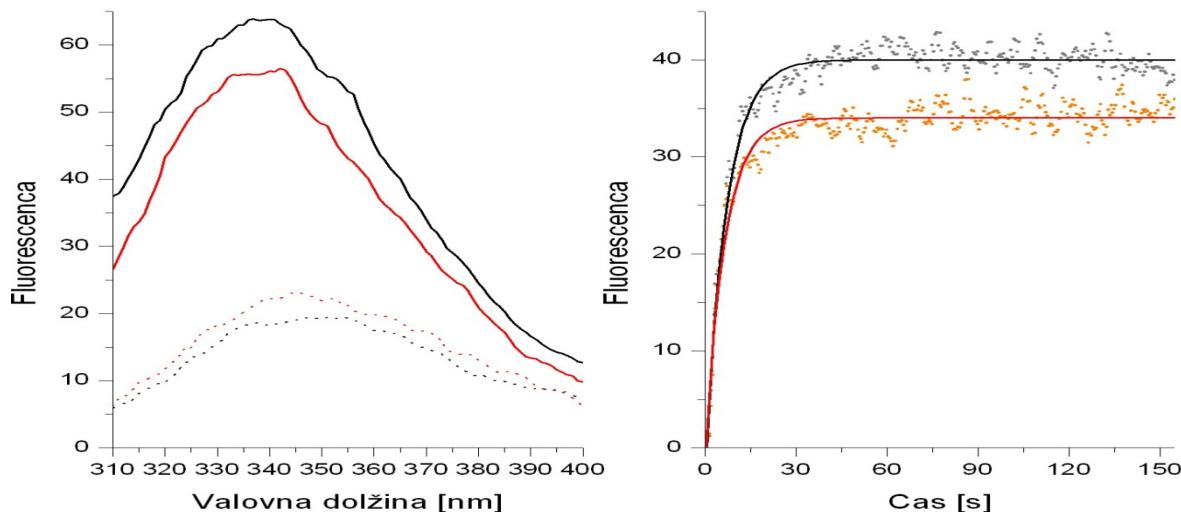
*Oznake glede na zaporedje LLO, v našem konstraktu so te AK zamaknjene za -10.



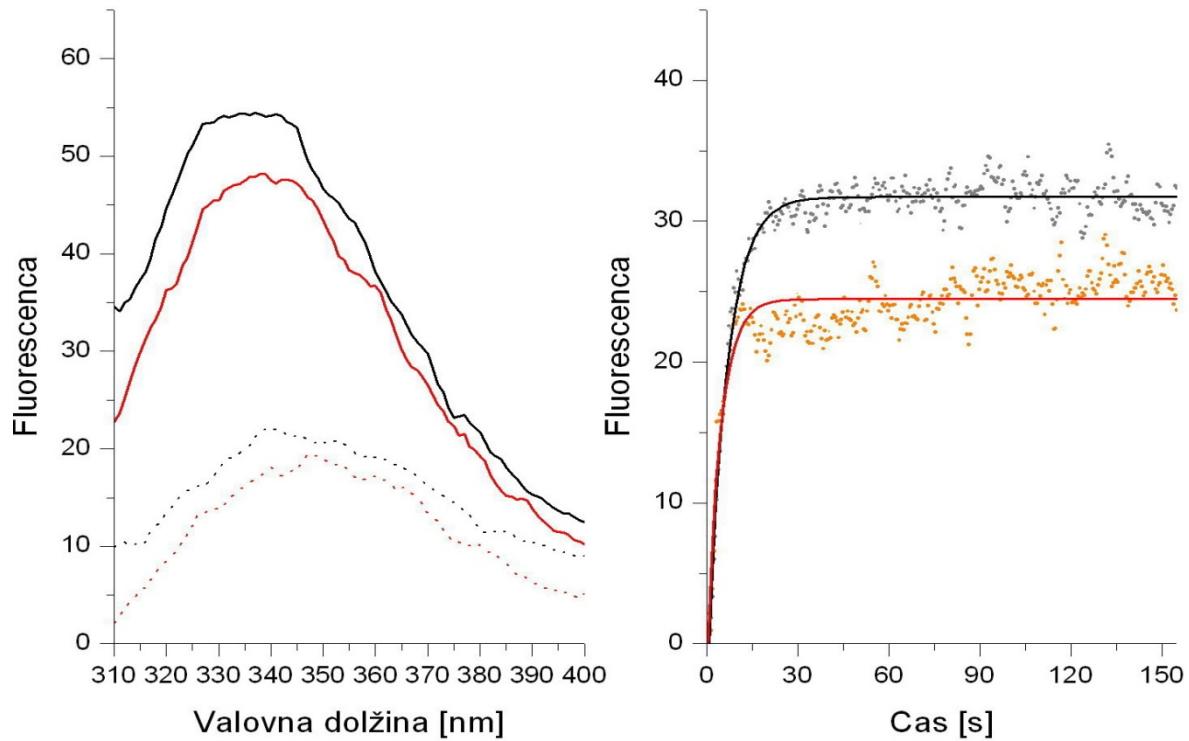
Slika 16: NaDS-PAGE gel 1 µg čistih rekombinantnih proteinov oz. divjega tipa. Številka predstavlja položaj histidina v zaporedju divjega tipa LLO (dolžine 529 aminokislín), ki smo jih spremenili v alanin.

4.3 Merjenje fluorescence

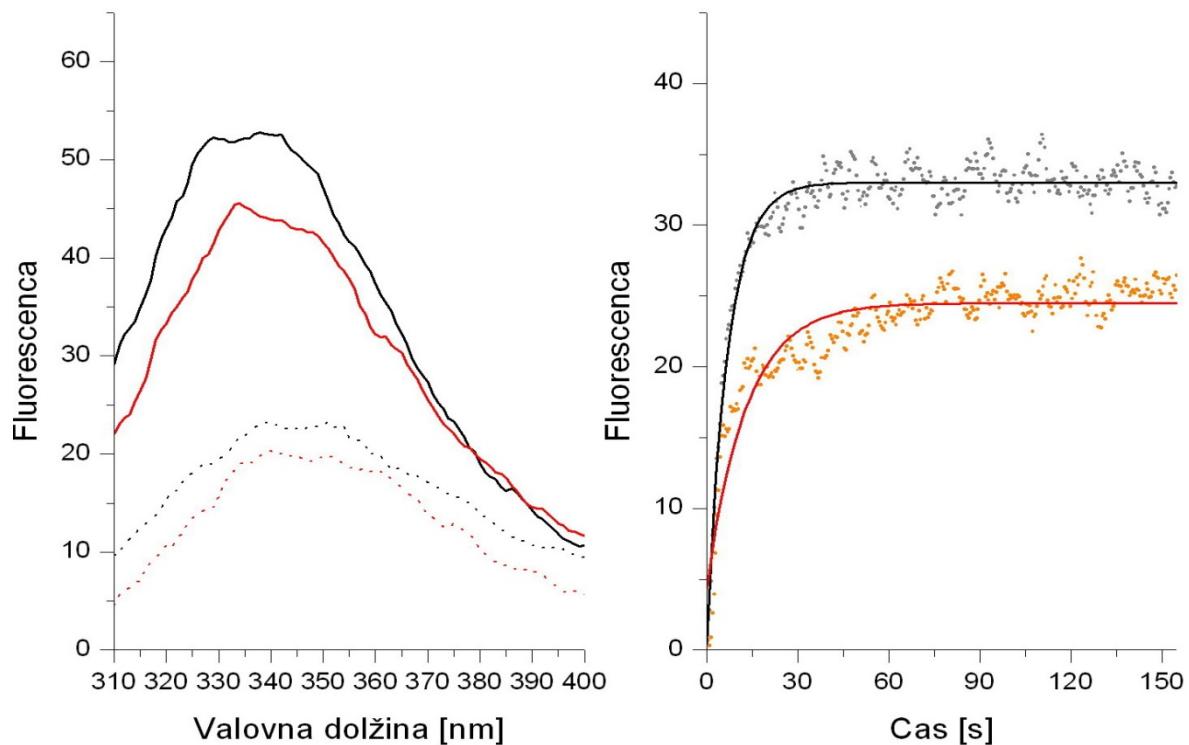
Fluorescenco sedmih proteinov smo merili pri kislem (5,5) in rahlo bazičnem (7,5) pH. Za vsak pH in protein smo samostojno meritev ponovili 4-krat, za divji tip 5-krat. Rezultati meritev so prikazani na Slikah 17–23.



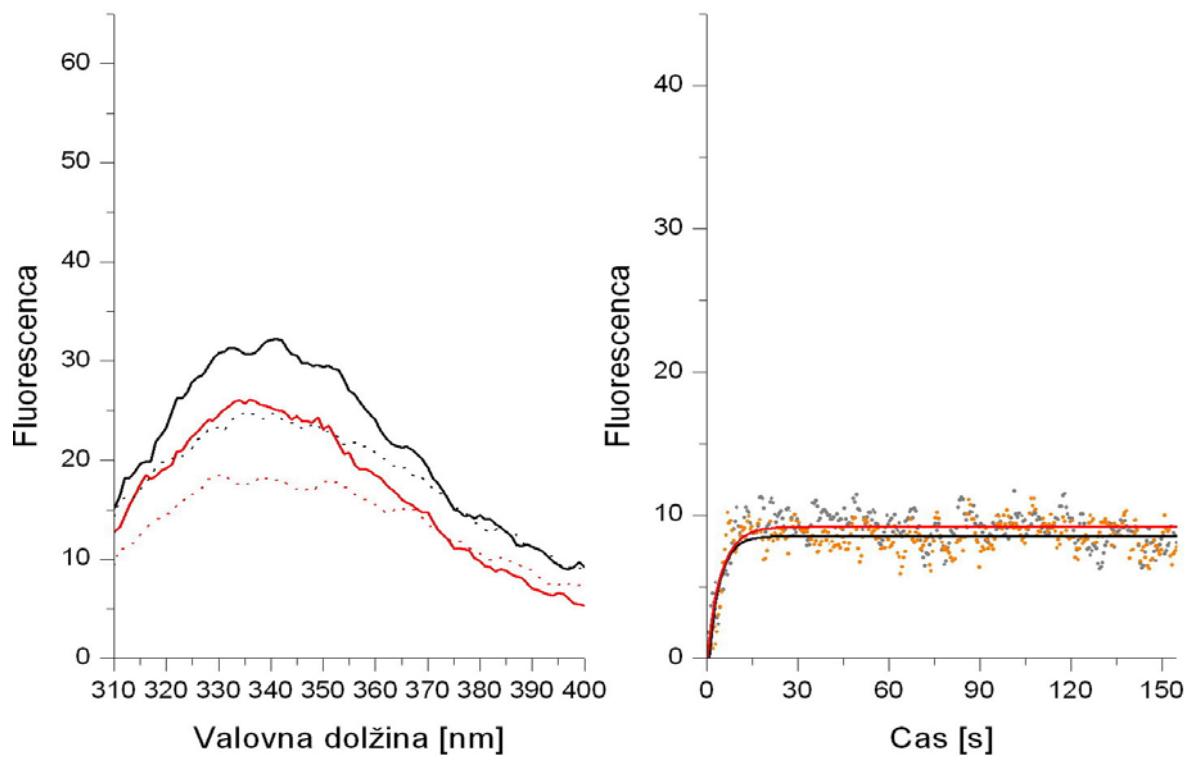
Slika 17: Rezultati meritev fluorescence za divji tip. Levo – Porast fluorescence po dodatku LUV pri pH 5,5 (črna) in pH 7,5 (rdeče), spekter fluorescence LLO v pufru pri pH 5,5 (črna prekinjena) in pH 7,5 (rdeča prekinjena). Desno – Polni črti predstavljata prileganje podatkov po modelu ekstrapolacije z eksponentno krivuljo prvega reda pri pH 5,5 (črna) in pH 7,5 (rdeča). Sive pike označujejo podatke za ekstrapolacijo pri pH 5,5, oranžne pri pH 7,5.



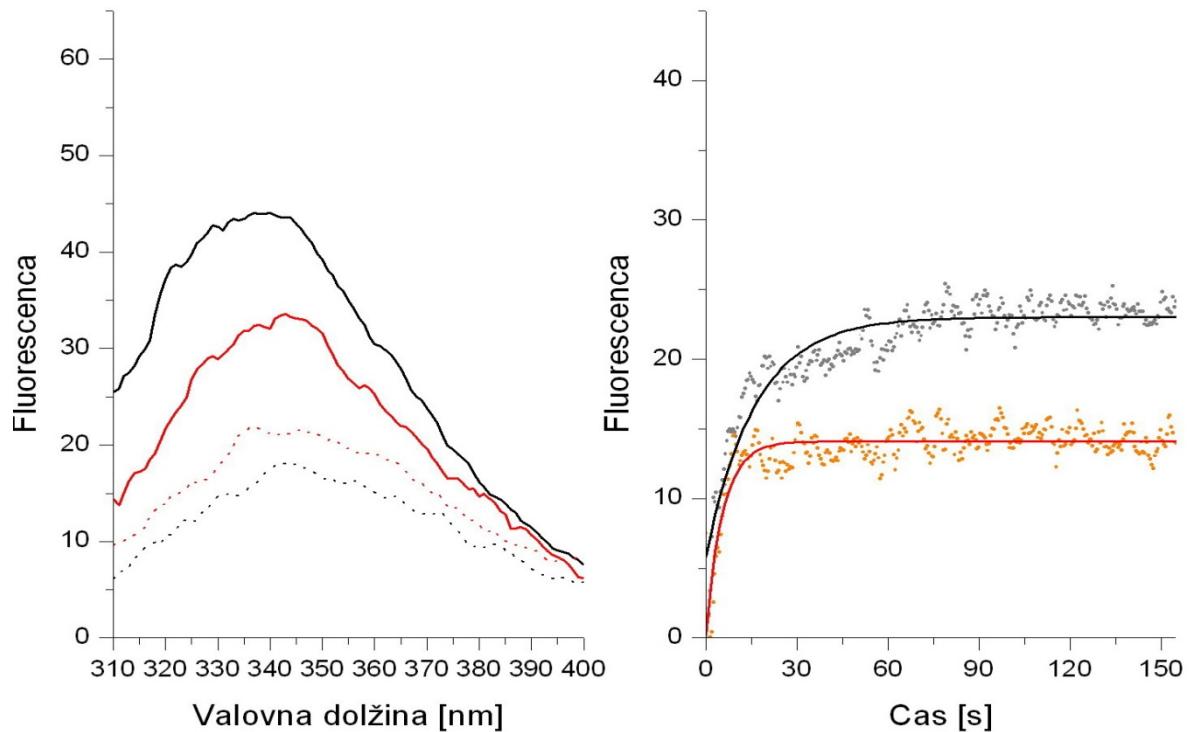
Slika 18: Rezultati meritev fluorescence za mutanto LLO-H57A. Barve krivulj in oznake so kot na sliki 17.



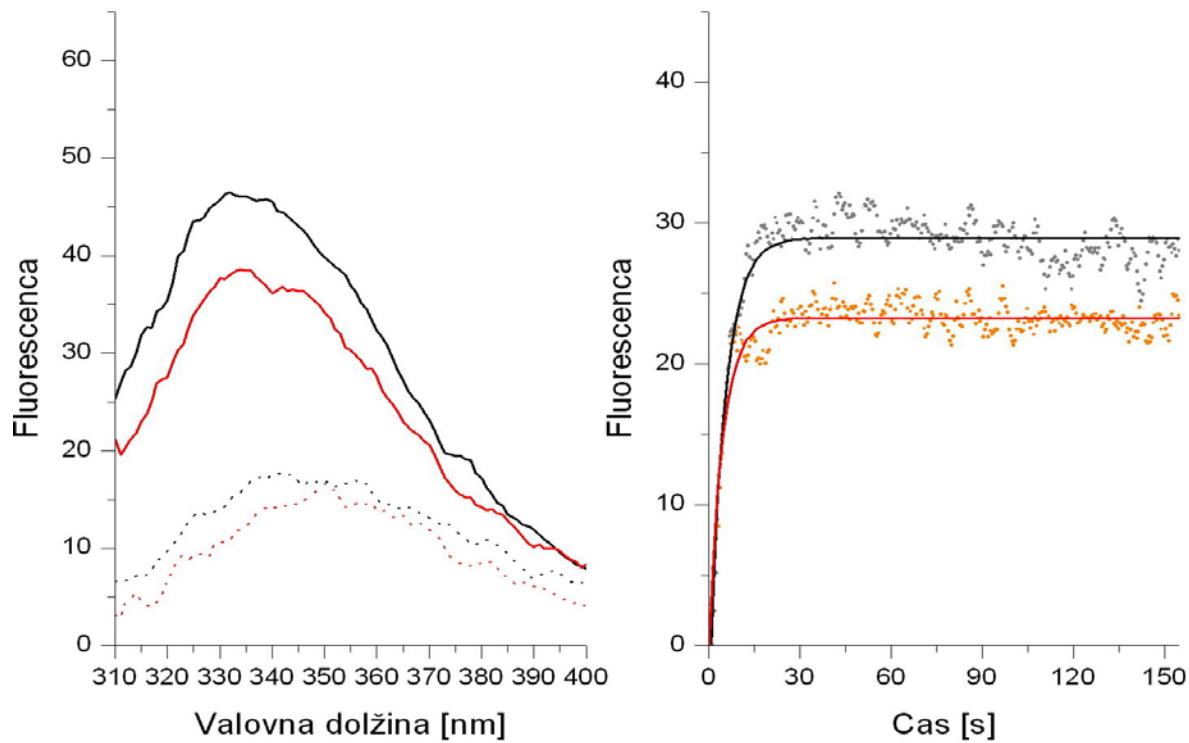
Slika 19: Rezultati meritev fluorescence za mutanto LLO-H79A. Barve krivulj in oznake so kot na sliki 17.



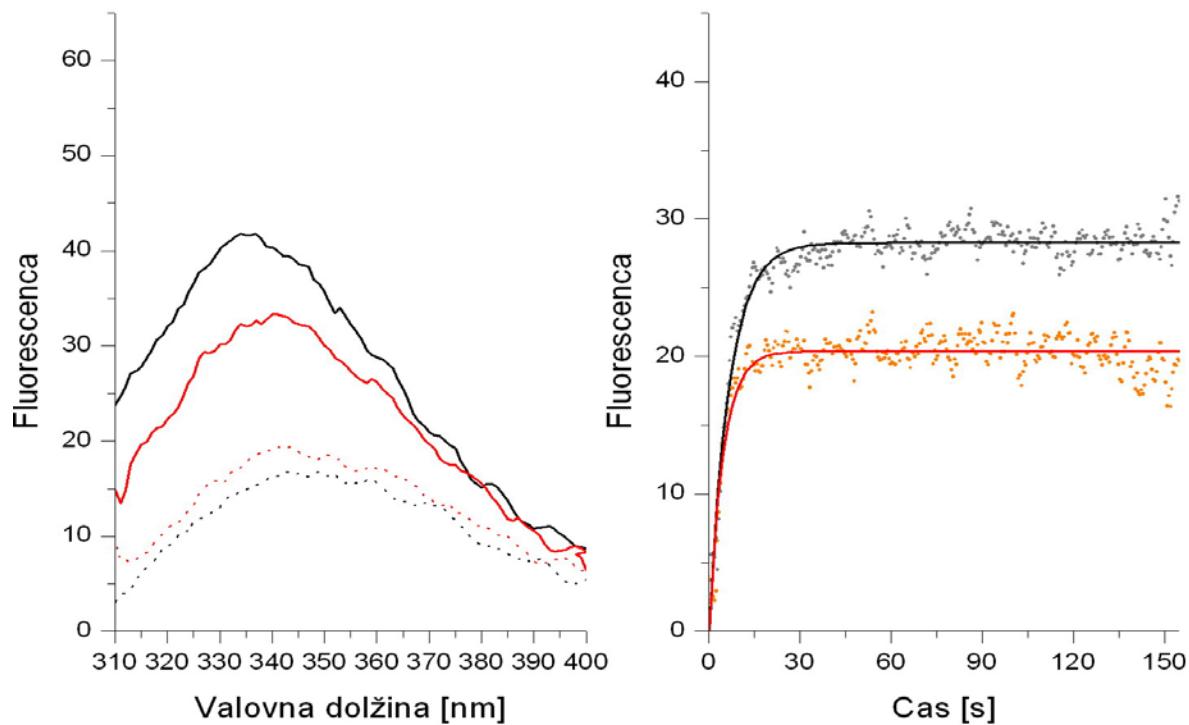
Slika 20: Rezultati meritev fluorescence za mutanto LLO-H311A. Barve krivulj in oznake so kot na sliki 17.



Slika 21: Rezultati meritev fluorescence za mutanto LLO-H423A. Barve krivulj in oznake so kot na sliki 17.



Slika 22: Rezultati meritev fluorescence za mutanto LLO-H450A. Barve krivulj in oznake so kot na sliki 17.



Slika 23: Rezultati meritev fluorescence za mutanto LLO-H463A. Barve krivulj in oznake so kot na sliki 17.

Iz podatkov meritev spektrov smo za vsak protein in vsako ponovitev izračunali valovno dolžino vrha spektra in povprečno vrednost fluorescence pri 346 nm, kot je opisano v Materialih ter prikazano v Preglednici 4.

Preglednica 4: Povprečja in standardni odkloni valovne dolžine vrha spektra in vrednosti fluorescence pri 346 nm za raztopino (LLO v pufru) in LUV (LLO in LUV v pufru) ter razmerja med povprečji.

Mutanta	pH	λ_{max} raztopina	$F_{346\text{max}}$ raztopina	λ LUV	F_{346} LUV	pH 5,5 $F_{\text{LUV}}/F_{\text{razt.}}$	pH 7,5 $F_{\text{LUV}}/F_{\text{razt.}}$	$F_{5,5}/F_{7,5}$ LUV	$F_{5,5}/F_{7,5}$ razt.
<i>Divjii tip</i>	5,5	346,00±2,83	19,09±1,39	335,8±1,64	57,64±3,94	3,02	2,22	1,09	0,80
	7,5	345,80±5,44	23,87±2,00	336,6±1,52	53,05±6,47				
<i>H57A</i>	5,5	345,25±3,77	21,66±1,00	339,33±1,53	45,85±7,57	2,12	2,20	1,13	1,17
	7,5	347,75±5,44	18,49±0,86	337,67±2,08	40,70±5,85				
<i>H79A</i>	5,5	345,25±3,77	21,37±2,56	331,75±3,86	53,30±3,14	2,49	2,18	1,31	1,15
	7,5	347,75±5,44	18,57±2,29	335,25±1,71	40,55±3,04				
<i>H311A</i>	5,5	341,67±6,66	23,24±0,49	341,00±3,56	26,63±3,09	1,15	1,41	1,08	1,32
	7,5	340,00±2,94	17,60±1,47	335,75±2,87	24,74±0,85				
<i>H423A</i>	5,5	346,5±1,73	19,04±1,72	336,25±2,99	44,00±3,09	2,31	1,43	1,46	0,90
	7,5	344,5±3,00	21,08±2,24	338,75±3,50	30,22±3,30				
<i>H450A</i>	5,5	346,00±3,56	16,32±1,13	333,75±2,22	42,25±2,59	2,59	2,23	1,23	1,06
	7,5	346,75±2,22	15,44±1,13	335,5±2,89	34,38±4,11				
<i>H463A</i>	5,5	345,5±1,91	18,35±3,62	335,25±1,26	39,90±2,74	2,17	1,89	1,14	0,99
	7,5	344±3,46	18,52±0,82	339,75±1,50	35,05±5,44				

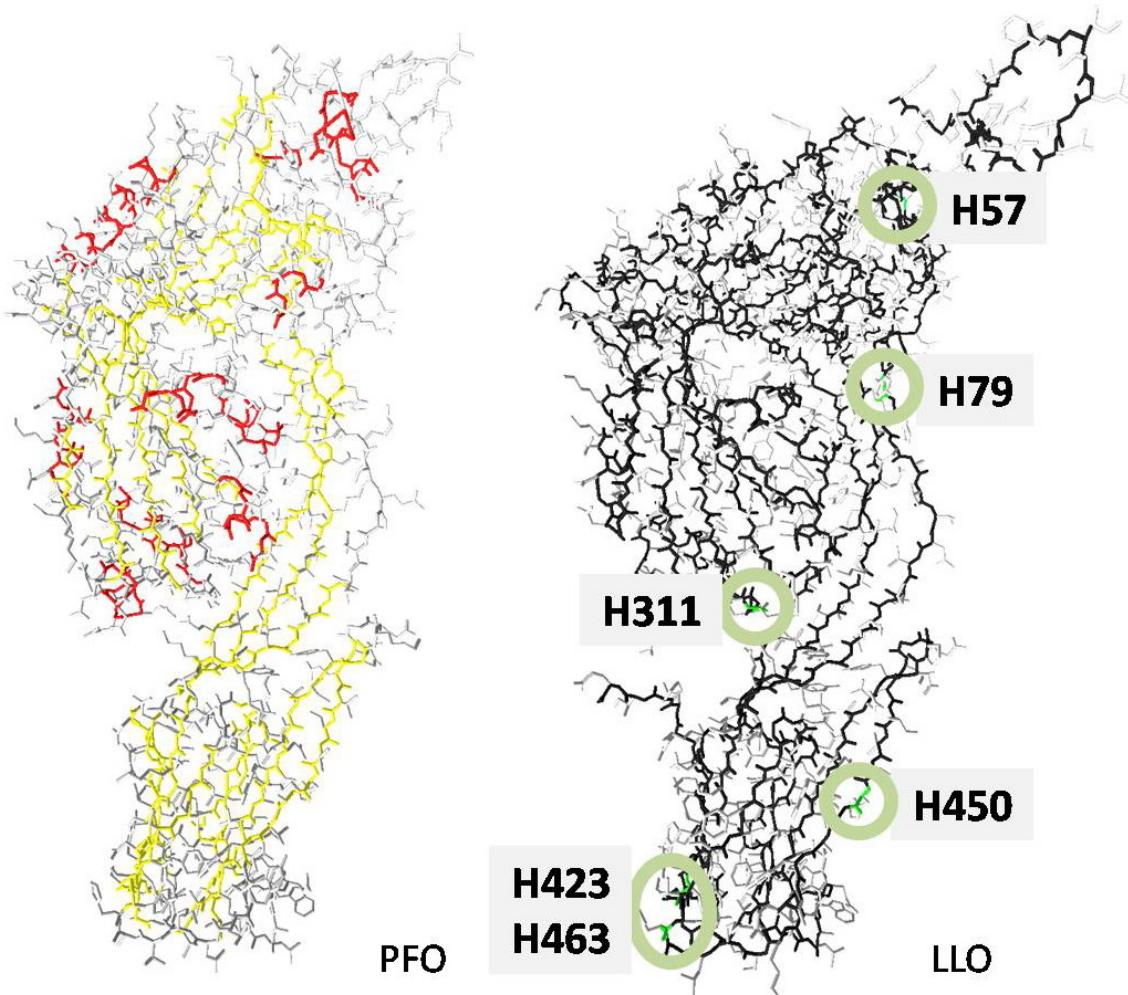
Dobljenim eksperimentalnim podatkom kinetike smo prilegali enačbo prvega reda eksponentne rasti z dvema parametroma, katerih povprečne izračunane vrednosti glede na pH in mutanto so prikazane v Preglednici 5.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti in standardni odklon parametrov izračunanih enačb eksponentne rasti za vsak protein in pH.

Mutanta	pH	Amplituda (A)	Konstanta rasti ekstrapolirane krivulje (k) [s]
<i>Divjii tip</i>	5,5	40,52±5,57	0,15±0,01
	7,5	34,56±4,82	0,13±0,04
<i>H57A</i>	5,5	32,67±2,19	6,17±0,04
	7,5	23,09±3,31	0,22±0,03
<i>H79A</i>	5,5	35,02±2,45	0,18±0,06
	7,5	22,68±1,30	0,11±0,01
<i>H311A</i>	5,5	9,01±1,31	0,22±0,09
	7,5	9,28±06,4	0,29±0,10
<i>H423A</i>	5,5	23,46±1,11	0,09±0,02
	7,5	13,41±0,66	0,19±0,07
<i>H450A</i>	5,5	28,48±0,70	0,16±0,03
	7,5	22,13±0,87	0,17±0,05
<i>H463A</i>	5,5	28,88±3,82	0,14±0,02
	7,5	17,75±4,34	0,21±0,02

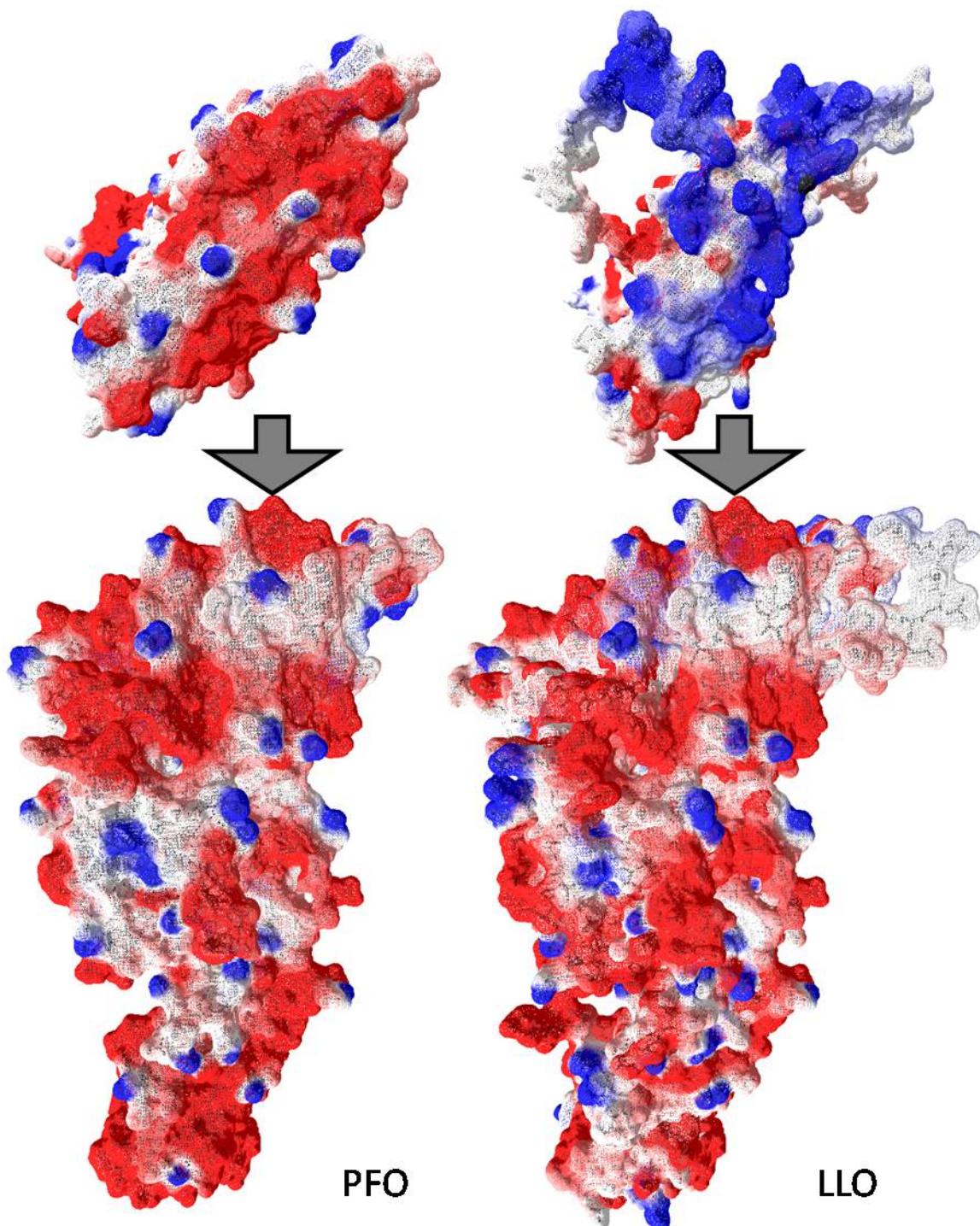
4.4 Homologno modeliranje

Kvaliteto zgrajenega modela LLO smo preverili s programom Procheck (2009), ki preveri stereokemijsko kvaliteto proteinske strukture preko analize geometrije med ostanki in celotne geometrije. Struktura domen je ohranjena (Slika 24), le zaporedje Met 1 do Leu 25 ima dodatno zanko, saj PFO nima tega dela zapisa (sekretorni peptid).

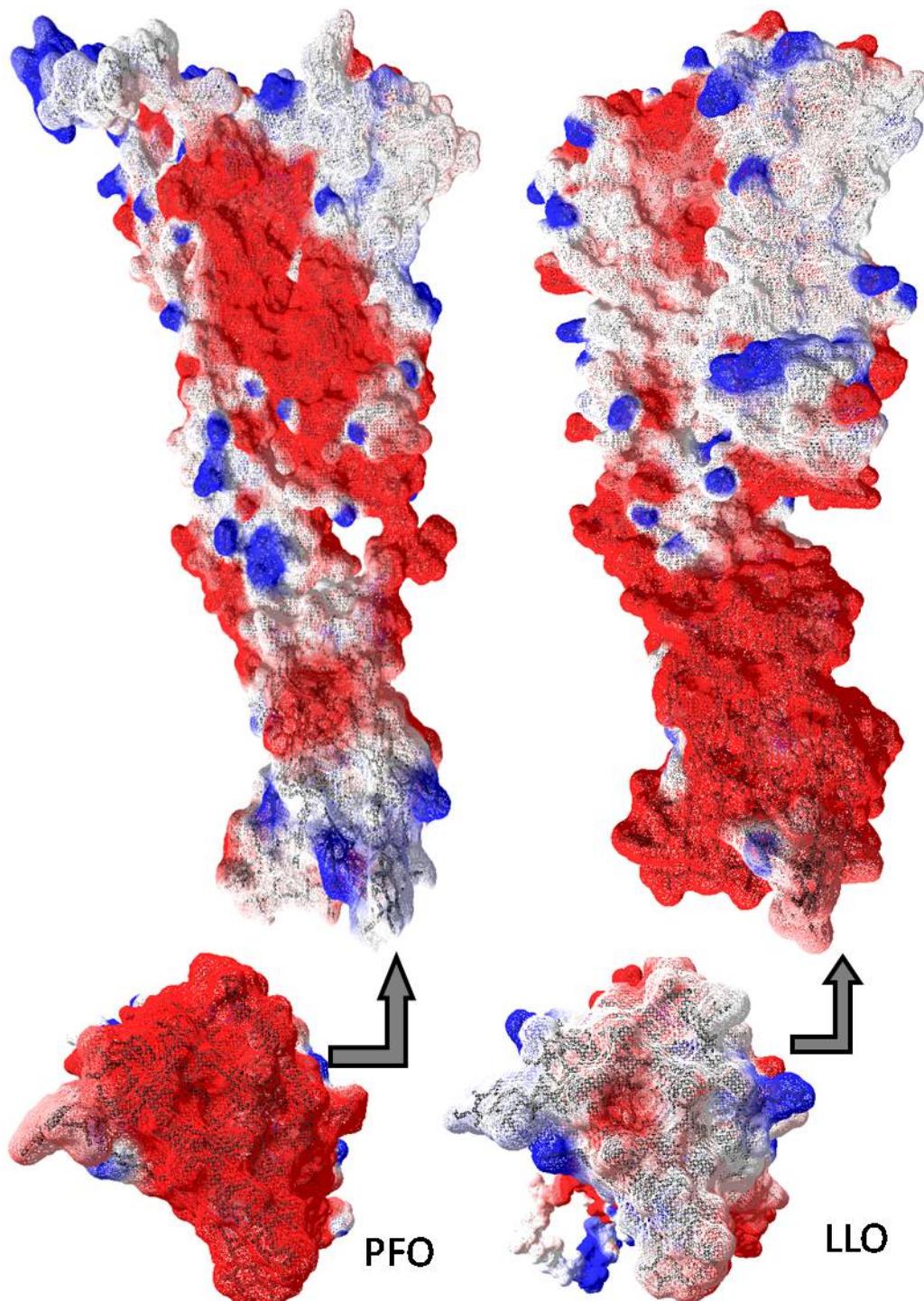


Slika 24: Levo kristalografska struktura PFO (iz datoteke 1pfo.pdb) z rdeče obarvanimi α -vijačnicami in rumeno obarvanimi β -strukturami. Desno pridobljen model LLO s črno hrbitenco C-atomov in zeleno obarvanimi histidini, ki smo jih v diplomi zamenjali v alanin. Histidini so obkroženi s svetlo zelenim krogom s pripisanim položajem v molekuli LLO.

Izris izopotencialnih površin je omogočil osnovno primerjavo lastnosti elektrostatskega potenciala med PFO in LLO na Slikah 25 in 26.



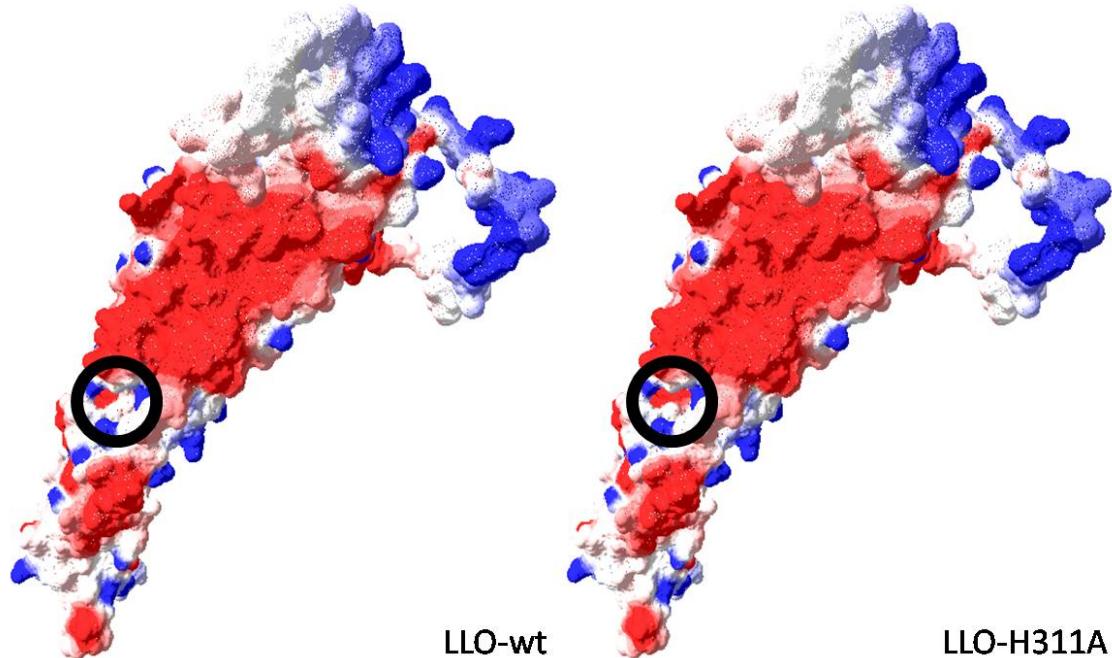
Slika 25: Zgoraj elektrostatski potencial pri pH 7,0 PFO in LLO od vrha molekule ($y = 180$). Spodaj elektrostatska potenciala (pH 7,0) v sprednjem delu molekule ($x = 0$).



Slika 26: Zgoraj elektrostatski potencial pri pH 7,0 PFO in LLO v zadnjem delu molekule ($x = 180$). Spodaj elektrostatska potenciala (pH 7,0) v spodnjem delu molekule ($y = -180$)

Primerjava elektrostatskega potenciala mutante H311A z divjim tipom LLO

Večjih razlik v celotni molekuli s prikazom v DeepView v4.0 ni zaznati, pride le do manjše spremembe iz nevtralnega (belo, levo na Sliki 27) v pozitivno nabito (rdeče, desno na Sliki 27) pri vrednosti pH 7,0 za oba izrisa elektronskega potenciala na Sliki 27.



Slika 27: Črno označeni razlike med LLO-His311 in LLO-Ala311.

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Izolacija rekombinantnega proteina

Glavni cilj diplomske naloge je bila izolacija nativnih mutant LLO, pri čemer smo vsakega od šestih histidinov izmenično zamenjali z aminokislino alanin. Edinstven mehanizem delovanja LLO v odvisnosti od pH še ni popolnoma razložen in proučevanje delovanja je težko, saj ima izolacija iz samih *L. monocytogenes* kultur nizke izkoristke. Da bi premostili ta problem, smo hemolizin izrazili v *E. coli* pET ekspresijskem sistemu in ga očistili ter s tem dobili relativno velike količine rekombinantnega LLO. Naš končni optimiziran postopek izolaciji je bil podoben postopku Giammarini in sod. (2003).

V plazmid pET smo vstavili nukleotidno zaporedje divjega tipa LLO (529 ak) brez nukleotidov za prvih 25 aminokislin, ki sicer kodirajo sekretorni peptid, in se tako izognili izločanju toksina v LB gojišče (s tem smo zmanjšali izgubie). Plazmid je imel tudi gen za negativno selekcijo, ki je kodiral odpornost na ampicilin v kompetentnih celicah z našim plazmidnim konstruktom, ostale niso preživele. Omenjen plazmid smo vstavili v kompetentne celice sev BL21(DE3)*pLysS* s topotnim šokom in jih razmazali na LB trdno gojišče z dodanim Ap ter po enem dnevu prenesli v 50 ml LB tekočega gojišča. Iz slednjega smo nato inokulirali 3 litre LB tekočega gojišča. Količina dodanega IPTG, kdaj ga dodati (v kater del log faze rasti) ter temperatura rasti pred in po dodatku so bili pomembni v tem koraku optimizacije. Z izjemo konstrukta H423A, je bila optimalna temperatura gojenja najprej 32 °C pred indukcijo in 28 °C 4-5 ur po indukciji. S takimi pogoji kultura seva H423A ni dala zadostne količine LLO po homogenizaciji, zato smo po indukciji temperaturo znižali na 22 °C in gojili 16 ur kot Giammarini in sod. (2003).

Za razliko od izolacije iz bakterije, se je protein v našem ekspresijskem sistemu izražal in akumuliral v celici, torej ga je bilo potrebno pred nadaljnimi koraki čiščenja sprostiti iz celic z ultrazvočnim razbitjem. Po centrifugiraju smo ohranili supernatant z vodotopnim deležem LLO. Pri vseh šestih mutantah nam je v supernatantu ostal velik delež proteina, a ga je vedno okoli 30-40 % postalo netopnega (denaturacija zaradi visoke temperature, nepravilno zvitje). Po spiranju s pufri nikljeve afinitetne kromatografije se ga je največji delež spral s pufroma za elucijo in spiranje, a smo s pufrom za elucijo dobili bolj čiste vrhove pri kasnejšem FPLC. Dializa ni delala težav, z izjemo H311A mutante, saj smo jo v večih ponovitvah celotne izolacije vedno izgubili v tem koraku (večina proteina je postalo netopnega). Pri ionski izmenjevalni kromatografiji smo dobili čiste in ozke štiri vrhove, naš protein se je začel izločati pri 0,5 M NaCl in bil v dveh vrhovih. Kasneje smo z gelsko kromatografijo preverili, ali so proteini združeni iz obeh vrhov homogeni in dobili spekter z enim samim vrhom (neobjavljeni podatki), torej v raztopini nismo imeli dveh različnih populacij proteina. Volumen pufra B s končno čisto raztopino toksina je bil med 10-15 ml z izjemo H311A, kjer je bil vrh ožji in se je spral iz FPLC kolone hitreje (4-5 ml). Največjo maso izoliranega proteina smo dobili pri časovno kasnejših izolacijah z optimiziranim postopkom (divji tip, 57 in 79).

5.1.2 Merjenje fluorescence

Preko meritev fluorescence smo proučevali razlike med mutantami in divjim tipom. Na PFO so Nakamura in sod. (1999) z merjenjem fluorescence ugotovili, da se ob znižanju pH iz 7,0 na 6,0 spekter triptofanske fluorescence pomakne navzdol, kar kaže na konformacijsko spremembo v tem pH razponu. Ker imajo imidazolni obroči pK_a v tem razponu pH, je bila dana hipoteza, da en tak histidinski ostanek vpliva na pH odvisnost LLO preko pH-odvisne spremembe konformacije toksina. Le trije toksini listerij imajo pH-optimum delovanja med 5,5 in 7,0 (pri drugih predstavnikih družine je pH optimum višji), za kar naj bi bil odgovoren His311 v zaporedju LLO. Vsem izoliranim mutantam smo pomerili spekter triptofanske fluorescence in kinetiko vezave na LUV. Iz vrednosti fluorescence pri 346 nm (F346) lahko sklepamo na okolje kromofora (triptofanov LLO). Nižja valovna vrha oz. premik maksimuma spektra v levo nakazuje stopnjo izpostavljenosti triptofanov raztopini (npr. za tumor nekrozni faktor 352 nm ko je popolnoma izpostavljen raztopini in 308 nm ko je v visoko nepolarnem okolju; Pain, 1996). Obenem višja vrednost fluorescence v tem maksimumu pomeni večjo količino triptofanov v nepolarnem okolju ali lipidnem dvosloju (po dodatku LUV v raztopino LLO).

Za ugotavljanje konformacije LLO uporabimo razmerje F346 5,5 raztopina : F346 7,5 raztopina (LLO v pufru). V primeru divjega tipa ter mutant H423A in H463A je to razmerje manjše od 1, torej je fluorescencija pri pH 7,5 višja. Triptofani so v teh treh primerih bolj v nepolarnem okolju (notranjost proteina) pri pH 7,5 (hidrofobno jedro proteina). Ostali širje proteini (H57A, H79A, H311A, H450A) imajo nižjo F346 pri pH 7,5. Njihovi triptofani bolj izpostavljeni polarnem okolju (pufru). S temi podatki je povezana povprečna vrednost valovne dolžine vrha spektra pri pH za mutantno (λ_{max}), ki tudi nakazuje spremembo v okolju proteina. V manj polarnem okolju se valovna dolžina vrha spektra pomakne proti nižji valovni dolžini, v našem primeru je imel LLO pri pH 5,5 vrh v povprečju pri približno 345 nm, pri pH 7,5 pa pri 336 nm. Vsem mutantam se je vrh spektra pomaknil proti nižji valovni dolžini pri pH 7,5 glede na pH 5,5. Posebna je mutanta H311A, katere povprečna vrednost valovne dolžine vrha je bila 341 nm pri pH 5,5 in 7,5. Možna razloga te posebnosti je denaturiranost te mutante, kar bi tudi lahko razložilo nizko sposobnost vezave na lipidne vezikle in izgubo pri sami izolaciji.

Vrstni red proteinov od najvišje do najnižje relativne spremembe F346 pri pH 5,5 pred in po dodatku LUV je sledeč: divji tip, H450A, H79A, H423A, H463A, H57A in H311A. Vseh sedem proteinov je imelo pri pH 7,5 nižjo relativno spremembo in tudi vrstni red je rahlo spremenjen: H450A, divji tip, H57A in H79A, nato sledi H463A ter H423A in H311A. Razmerje F346 5,5 LUV : F346 7,5 LUV nam poda informacijo o relativnem polarnem okolju proteina (ter s tem delež proteina vgrajenega v LUV in tako sposobnost vezave) pri pH 7,5. Najmanj okrnjeno relativno sposobnost vezave so imeli divji tip in mutante H311A, H57A, H463A (a še vedno nižjo pri pH 7,5) in nato H450A, H79A in H423A (slednja ima najbolj okrnjeno sposobnost vezave).

Ekstrapolirana eksponentna krivulja rasti prvega reda in njen parameter konstantne rasti (t) nam da informacijo o hitrosti vezave na LUV. Manjši kot je t , hitreje se toksin veže nanje. Čas do popolne vezave se zniža iz pH 5,5 na 7,5 pri divjem tipu, H79A in H463A in poveča pri vseh ostalih. Zaradi narave in načina naših meritev ni razvidno, ali počasna meritev pomeni nastanek oligomerne pore ali so mutante ujete v preporni strukturi, ki nastane pred vstavitvijo TMH domene 3, kot so opazili Soltani in sod. (2007).

Glede na položaj teh aminokislin v molekuli LLO dobimo štiri skupine. V prvo spada H57, ki je v domeni 1. Ta domena sodeluje pri oligomerizaciji proteina. V drugo skupino spada H79 iz domene 2, ki sodeluje pri vstavitvi dveh β -lasnic domene 3 v membrano ob prepoznavi holesterola. Zaradi položaja teh dveh aminokislin v proteinski molekuli (H79 je v oddaljenem delu molekule in nima bližnjega stika z domeno 2, ki se v nevtralnem pH razvije pred vstavitvijo v lipidni dvosloj in tako zmanjša sposobnost vezave), imata ti dve mutaciji najmanjši vpliv na sposobnost vezave v LUV. Drugo skupino tvorijo mutante H423A, H450A in H463A domene 4, ki je zaslužna za prepoznavo holesterolnih delov lipidnega dvosloja in vstavitev TMH domene 3 v membrano. Količina vezanega toksina in triptofanski spekter sta manjša kot pri divjem tipu in prvem skupku, kar spet kaže na zmanjšano sposobnost vezave na vezikle. Zadnja je mutanta H311A, ki je bila v hipotezi označena kot zaslužna za pH odvisnost. Njena sposobnost vezave pri obeh merjenih pH je najnižja, a enaka v obeh pH, kar hipoteze ne potrdi, saj bi za to morala imeti večjo F346 pri pH 7,5 ter večjo aktivnost od divjega tipa.

Iz podatkov o spektru fluorescence in kinetiki vezave ne moremo sklepati na sposobnost tvorbe popolne pore v LUV. Ob upoštevanju teh lastnosti pa lahko zaključimo, da so vse mutante manj sposobne vezave oz. tvorbe popolne pore v lipidne vezikle v primerjavi z divjim tipom.

5.1.3 Homologno modeliranje in elektrostatski privlak

Na osnovi tridimenzionalne strukture PFO (Rossjohn in sod., 1997) smo naredili model LLO iz njegovega aminokislinskega zaporedja. Krivulje primerjave v programu Verify 3D (neobjavljeni podatki) in analiza v programu Procheck so potrdile, da je izbran model LLO (z najvišjo DOPE vrednostjo) verjeten model. Vrednosti Verify 3D niso absolutne, zato ne moremo narediti direktne primerjave, lahko pa primerjamo grobi obliki obeh profilov – če je LLO-DOPE zamaknjen glede na drugo, obstaja velika verjetnost, da je tudi poravnava osnovnih zaporedij zamaknjena od PFO.

Pri pH 7 ima LLO na površini prebitek negativno nabitih, PFO pa več pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov (Slika 13 in 14). Iz primerjave v Sliki 15 je razvidno, da se elektrostatski potencial spremeni is svetlo rdeče, skoraj bele barve v rdečo – v negativen elektrostatski privlak. Za razlago vpliva pH na možne konformacijske spremembe bi potrebovali profile elektrostatskega privlaka še pri drugih pH.

5.2 SKLEPI

Spektri merjenja lastne triptofanske fluorescence kažejo na znižano sposobnost vezave mutant v primerjavi z izoliranim divjim tipom. Razmerje F346 5,5 raztopina : F346 7,5 raztopina pokaže razlike v okolju triptofanov teh sedmih proteinov.

- Divji tip in H423A imata pri pH 7,5 večjo količino triptofanov v polarnem okolju kot pri pH 5,5. Mutanta H463A ima pri pH 7,5 enako razmerje triptofanov v polarnem in nepolarnem okolju kot pri pH 5,5.
- Mutantam H450A, H79A, H57A in H311A se po tem vrstnem redu veča količina triptofanov v polarnem okolju (pufru) pri pH 7,5 glede na pH 5,5.

Razmerje F346 5,5 LUV : F346 7,5 LUV pokaže razlike v relativnem polarnem okolju proteina ter s tem delež proteina vgrajenega v LUV (sposobnost vezave).

- Najmanj zmanjšano lastno triptofansko fluorescenco pri pH 7,5 glede na pH 5,5 imata divji tip (-9%) in mutanta H311A (-8%).
- Sledijo H57A (-13%), H463A (-14%), H450A (-23%), H79A (-31%) in zadnja H423A (-46%)

Razmerje F346 5,5 LUV : 5,5 raztopina pri nekem pH nam prikaže količino vezanega LLO na LUV pri tem pH.

- Najvišje povečanje F346 pri pH 5,5 ima divji tip (~3×), manjše imajo H450A (~2,6×), H79A (~2,5×), H423A (~2,3×), H463A (~2,2×), H57A (~2,1×) in H311A (~1,15×).
- Najvišje povečanje F346 pri pH 7,5 imajo divji tip, H57A, H79A in H450A (~2,2×), manjše imajo H463A (~1,9×), H311A in H423A (~1,4×)

Meritve kinetike spremembe lastne triptofanske fluorescence, preračunane in obdelane so podale vrednosti povprečnega časa vezave na mutantu pri pH 5,5 in 7,5.

- Trem merjenim proteinom se je povprečni čas vezave pri prehodu iz pH 5,5 na 7,5 povečal: H450A (za 20 % vrednosti pri pH 5,5), divjem tipu (za 40 %) in H79A (za 80 %).
- Ostalim štirim se je povprečni čas vezave pri prehodu iz pH 5,5 na 7,5 zmanjšal in sicer: H423A (za 70 % vrednosti pri pH 5,5), H57A in H463A (za približno 30 % vrednosti pri pH 5,5) ter H311A (za 25% vrednosti pri pH 5,5).

Ob sočasnem upoštevanju tako povprečnega časa vezave pri kinetiki, razmerja F346 5,5 LUV : 7,5 LUV in absolutne vrednosti fluorescence (F346 LUV) nobena od mutant ni pokazala višje sposobnosti vezave na LUV od divjega tipa.

Primerjava elektrotranskih potencialov na površini PFO z našim dobljenim modelom LLO pokaže, da ima PFO v primerjavi z LLO pri pH 7,0 na površini prebitek pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov. Za razlago vpliva pH na možne konformacijske spremembe pa bi morali primerjati elektrostatski privlek še pri drugih pH.

6. POVZETEK

Toksini, ki tvorijo pore, so ena od večjih skupin citolitičnih toksinov, ki jih proizvajajo številni nesorodni organizmi in se izločajo kot vodotopni proteini. Skupna jim je tvorba eksogenih por v membranah gostitelja (Anderluh in Lakey, 2008) in v tem procesu prestopijo v membransko vezano obliko. Nekateri toksini potrebujejo za vezavo na membrano specifične receptorje. Skoraj vsi CDC potrebujejo za vezavo na membrane izključno holesterol.

Listeriolizin O je najpomembnejši virulentni dejavnik *L. monocytogenes* (Vazquez-Boland in sod., 2001). Njegova funkcija je omogočiti pobeg bakterije iz fagosoma v citosol, ne pa liza gostiteljske celice, kar je značilnost ostalih CDC. Od drugih predstavnikov te družine, ki imajo optimum delovanja pri nevtralnem pH, se razlikuje tudi po nizkem pH-optimumu delovanja (Geoffroy in sod., 1987). Optimalno aktivnost so določili z merjenjem hemolitične aktivnosti in je pri pH vrednosti 5,5 (Geoffroy in sod., 1987; Giammarini in sod., 2003), pri nevtralnem pH pa je njegova aktivnost močno znižana. Po predinkubaciji LLO s holesterolom kaže močno znižano hemolitično aktivnost, a ohrani sposobnost vezave na lipidne membrane (Palmer, 2001).

Na mestu 311 v peptidni molekuli LLO imajo samo trije CDC-ji listerij histidin in so tudi edini z odvisnostjo od nizkega pH. Nakamura in sod. (1999) so na PFO pokazali, da imajo tudi histidinski ostanki vlogo v citolizi, predvsem oligomerizaciji in nastanku pore. Vrednost disociacijske konstante (pK_a) imidazolnega obroča histidina ima vrednost 7,6. Znižanje pH iz 7,0 na 6,0 je pri PFO spremenilo profil triptofanske fluorescence, kar kaže na konformacijsko spremembo proteina v tem razponu pH (Nakamura in sod., 1999). Preveriti smo želeli hipotezo, da je His311 pomemben za učinkovito vezavo LLO na lipidne membrane.

Zato sem v diplomskem delu v *E. coli* izrazila in očistila šest izogenih mutiranih različic bakterijskega toksina, kjer je imela vsaka eno zamenjavo histidina v alanin (na mestih 57, 79, 311, 423, 450 ali 463 peptidnega zaporedja LLO). Z izoliranimi proteini sem nato preverila kinetiko ter sposobnost vezave na lipidne membrane pri kislem (5,5) in rahlo bazičnem (7,5) pH. Iz znane kristalografske zgradbe PFO (Rossjohn in sod., 1997) sem s programom Modeller 9v6 naredila model LLO, kateremu sem v Deep View v4.0 dodala prikaz površinskega elektrostatskega privlaka vseh šestih mutant.

Nobena od mutiranih različic ni pokazala višje aktivnosti od divjega tipa. Odkritje celotnega procesa molekularnega mehanizma pH odvisnosti LLO bo v prihodnosti pomembno prispevalo k razumevanju patogeneze bakterije *L. monocytogenes*.

7. VIRI

7.1 Citirani viri

Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S.H., van der Goot, G. 2003. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *The Journal of Cell Biology*, 160, 3: 321-328

Alvarez-Dominguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marin, E., Lopez-Mato, P., Leyva-Cobian, F. 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infection and Immunity*, 65, 1: 78-88

Anderluh G., Lakey J.H. 2008. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 10: 482-490

Barbuddhe, S.B., Malik, S.S., Bhilegaonkar, K.N., Kumar, P., Gupta, L.K. 2000. Isolation of *Listeria monocytogenes* and anti-listeriolysin O detection in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 38, 2: 151-155

Bavdek, A., Gekara, N.O., Priselac, D., Aguirre, I.G., Darji, A., Chakraborty, T., Maček, P., Hakey J.H., Weiss S., Anderluh G. 2007. Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of listeriolysin O. *Biochemistry*, 46(14), 4425-4437.

Bayley, H. 1997. Toxin structure: Part of a hole?. *Current Biology*, 7, 12: 763-767

Beauregard, K.E., Lee, K.D., Collier, R.J., Swanson, J.A. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine*, 186, 7: 1159-1163

Bhakdi, S., Weller, U., Walev, I., Martin, E., Jonas, D., Palmer, M. 1993. A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Medical Microbiology and Immunology*, 182: 167-175

Billington, S.J., Songer, J.G., Jost, B.H. 2002. The variant undecapeptide sequence of the *Arcanobacterium pyogenes* haemolysin, pyolysin, is required for full cytolytic activity. *Microbiology*, 148: 3947-3954

Braun, L., Nato, F., Payrastre, B., Mazie, J.C., Cossart, P. 1999. The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Molecular Microbiology*, 34, 1: 10-23

Chakraborty, T., Hain, T., Domann, E. 2000. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *International Journal of Medical Microbiology*, 290, 2: 167-174

Clemens, D.L., Horwitz, M.A. 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *The Journal of Experimental Medicine*, 181: 257-270

Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., Southwick, F.S. 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87: 6068-6072

- Darji, A., Niebuhr, K., Hense, M., Wehland, J., Chakraborty, T., Weiss, S. 1996. Neutralizing monoclonal antibodies against listeriolysin O: mapping of epitopes involved in pore formation. *Infection and Immunity*, 64: 2356-2358
- Decatur, A.L., Portnoy, D.A. 2000. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science*, 290: 992-995
- Dubail, I., Autret, N., Beretti, J.L., Kayal, S., Berche, P., Charbit, A. 2001. Functional assembly of two membrane-binding domains in listeriolysin O, the cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 147: 2679-2688
- Esbensen, Q.Y., Falnes, P.O., Olsnes, S., Madshus, I.H. 1993. Subcloning and characterization of the binding domain of fragment B of diphtheria toxin. *Journal of Biochemistry*, 294, 3: 663-666
- Falnes, P.O., Sandvig, K. 2000. Penetration of protein toxins into cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 4: 407-413
- Flanagan J.J., Tweten R.K., Johnson A.E., Heuck A.P. 2009. Cholesterol exposure at the membrane surface is necessary and sufficient to trigger perfringolysin O binding. *Biochemistry*, 48, 18: 3977-3987
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P. 1987. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and Immunity*, 55, 11: 2822-2829
- Gekara, N.O., Groebe, L., Viegas, N., Weiss, S. 2008. *Listeria monocytogenes* desensitizes immune cells to subsequent Ca^{2+} signaling via listeriolysin O-induced depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Infection and Immunity*, 76, 2: 857-862
- Gellin, B.G., Broome, C.V. 1989. Listeriosis. *The Journal of the American Medical Association*, 261, 9: 1313-1320
- Geoffroy, C.C., Gaillard, J.E., Alouf, J.E., Berche, P. 1987. Purification, characterization and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 55, 7: 1641-1646
- Giammarini, C., Andreoni, F., Amagliani, G., Cassiere, A., Barocci, S., Magnani, M. 2003. High-level expression of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in *Escherichia coli* and preliminary characterization of the purified protein. *Protein Expression and Purification*, 28, 1: 78-85
- Giammarini, C., Andreoni, F., Amagliani, G., Cassiere, A., Barocci, S., Magnani, M. 2004. Purification and characterization of a recombinant listeriolysin O expressed in *Escherichia coli* and possible diagnostic applications. *Journal of Biotechnology*, 109: 13-20.
- Glomski, I.J., Gedde, M.M., Tsang, A.W., Swanson, J.A., Portnoy, D.A. 2002. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *The Journal of Cell Biology*, 156, 6: 1029-1038
- Goebel, W., Khun, M. 2000. Bacterial replication in host cell cytosol. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 1: 49-53

- Gonzalez, F.A., Raden, D.L., Davis, R.J. 1991. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 33: 22159-22163
- Harris, J.R., Adrian, M., Bhakdi, S., Palmer, M. 1998. Cholesterol-Streptolysin O interaction: an EM study of wild-type and mutant streptolysin O. *Journal of Structural Biology*, 121, 3: 343-355
- Havranek, J.J., Harbury, P.B. 1999. Tanford-Kirwood electrostatics for protein modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 96: 11145-11150
- Hernandez, L.D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T.G., White, J.M. 1996. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annual Review of Cell And Developmental Biology*, 12: 627-661
- Jacquet, C., Gouin, E., Jeannel, D., Cossart, P., Rocourt, J. 2002. Expression of ActA, Ami, InlB and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2: 616-622
- Jones, S., Portnoy, D.A. 1994. Characterization of *Listeria monocytogenes* patogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infection and Immunity*, 62, 12: 5608-5613
- Kehoe, M.A., Miller, L., Walker, J.A., Boulnois, G.J. 1987. Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infection and Immunology*, 55: 3228-3232
- Lety, M.A., Frehel, C., Beretti, J.L., Berche, P., Charbit, A. 2003. Modification of the signal sequence cleavage site of listeriolysin O does not affect protein secretion but impairs the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 149: 1249-1255
- Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V., Andrews, N.W. 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *Journal of Experimental Medicine*, 171: 401-413
- Low, J.C., Donachie, W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153, 1: 9-29
- Mackaness, G.B. 1962. Cellular resistance to infection. *Journal of Experimental Medicine*, 116: 381-406
- Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero F., Perez-Diaz J.C., Cossart, P. 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 56, 4: 766-772
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., Cossart, P. 1996. E-Cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, 84, 6: 923-932
- Michel, E., Reich, K.A., Favier, R., Berche, P., Cossart, P. 1990. Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Molecular Microbiology*, 4, 12: 2167-2178

- Milohanic, E., Jonquieres, R., Cossart, P., Berche, P., Gaillard, J.L. 2001. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Molecular Microbiology*, 39, 5: 1212-1224
- Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M., Sansonetti, P. J. 1990. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infection and Immunity*, 58, 4: 1048-1058
- Nagamune, H., Whiley, R.A., Goto, T., Inai, Y., Maeda, T., Hardie, J.M., Kourai H. 2000. Distribution of the intermedilysin gene among the anginosus group streptococci and correlation between intermedilysin production and deep-seated infection with *Streptococcus intermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1: 220-226
- Nakamura, M., Sekino-Suzuki, N., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y. 1999. Contribution of histidine residues to oligomerization of Theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolysin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 9: 1640-1643
- Nomura, T., Kawamura, I., Kohda, C., Baba, H., Ito, Y., Kimoto, T., Watanabe I., Mitsuyama M. 2007. Irreversible loss of membrane-binding activity of *Listeria*-derived cytolysins in non-acidic conditions: a distinct difference from allied cytolysins produced by other Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 153: 2250-2258
- Ohno-Iwashita, Y., Iwamoto, M., Ando, S., & Iwashita, S. 1992. Effect of lipidic factors on membrane cholesterol topology: mode of binding of θ-toxin to cholesterol in liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1109, 1: 81-90
- Pain, R.H. 1996. Determining the fluorescence spectrum of a protein. V: Current Protocols in Protein Science. Taylor G., Coligan J.E., Dunn B.M., Speicher D.W., Wingfield P.T., Ploegh H.L. (eds.). New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Palmer, M. 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon*, 39, 11: 1681-1689
- Palmer, M., Vulicevic, I., Saweljew, P., Valeva, A., Kehoe, M., Bhakdi, S. 1998. Streptolysin O: a proposed model of allosteric interaction between a pore-forming protein and its target lipid bilayer. *Biochemistry*, 37: 2378-2383
- Pandiripally, V.K., Westbrook, D.G., Sunki, G.R., Bhunia, A.K. 1999. Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to human intestinal cell line, Caco-2. *Journal of Medical Microbiology*, 48: 117-124
- Parker, M.W., Feil, S.C. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88, 1: 91-142
- Peitzsch, R.M., Eisenberg, M., Sharp, K.A., McLaughlin, S. 1995. Calculations of the electrostatic potential adjacent to model phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*, 68: 729-738
- Pinkney, M., Beachey, E., Kehoe, M. 1989. The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. *Infection and Immunity*, 57: 2553-2558
- Polekhina, G., Giddings, K.S., Tweten, R.K., Parker, M.W. 2005. Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102, 3: 600-605

- Portnoy, D.A., Jones, S. 1994. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection (escape from a vacuole). Annals of The New York Academy of Sciences, 730: 15-25
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S., Hinrichs, D.J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Experimental Medicine, 167: 129-132
- Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W., & Cossart, P. 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infection and Immunity, 60, 4: 1263-1267
- Ramachandran, R., Tweten, R.K., Johnson, A.E. 2005. The domains of a cholesterol-dependent cytolysin undergo a major FRET-detected rearrangement during pore formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 102, 20: 7139-7144
- Rocourt, J., Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. V: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (eds.). Washington DC, Amer Society for Microbiology: 337-352
- Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science, 234, 4774: 364-368
- Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinstry, W.J., Tweten, R.K., & Parker, M.W. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. Cell, 89: 685-692
- Saunders, F.K., Mitchell, T.J., Walker, J.A., Andrew, P.W., Boulnois, G.J. 1989. Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for *in vitro* activity. Infection and Immunity, 57: 2547-2552
- Schuerch, D.W., Wilson-Kubalek, E.M., Tweten, R.K. 2005. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 102, 35: 12537-12542
- Seeliger, H.R., Jones, D. 1986. Genus *Listeria*. V: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. izdaja. Holt J.G., Sneath P.A., Mair N.S., Sharpe M.E. (eds.). Baltimore, Williams & Wilkins: 1235-1425
- Shatursky, O., Heuck, A.P., Shepard, L.A., Rossjohn, J., Parker, M.W., Johnson, A.E., Tweten R.K. 1999. The mechanism of membrane insertion of a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. Cell, 99: 293-299
- Smyth, C.J., & Duncan, J.L. 1978. Thiol-activated (oxygen labile) cytolysins. V: Bacterial toxins and cell membranes. Jeljaszewicz J., Wadström T.W. (eds.). New York, Academic Press: 129-183
- Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E., & Tweten, R.K. 2007. Specific protein-membrane contacts are required for prepore and pore assembly by a cholesterol-dependent cytolysin. Journal of Biological Chemistry, 282, 21: 15709-15716
- Sun, A.N., Camilli, A., Portnoy, D.A. 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. Infection and Immunity, 58, 11: 3770-3779

Tilney, N.G., Portnoy, D.A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. The Journal of Cell Biology, 109: 1597-1608

Tweten, R.K. 1988. Nucleotide sequence of the gene for perfringolysin O (theta toxin) from *Clostridium perfringens*: significant homology with the genes for streptolysin and pneumolysin. Infection and Immunity, 56: 3235-3240

Tweten, R.K. 1995. Pore-forming toxins in gram-positive bacteria. V: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion C., Wannemuehler M.J. (eds.). Washington DC, The American Society for microbiology: 207-229.

Tweten, R.K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. Infection and Immunity, 73, 10: 6199-6209

Tweten, R.K., Harris, R.W., Sims, P.J. 1991. Isolation of a tryptic fragment from *Clostridium perfringens* theta-toxin that contains sites for membrane binding and self-aggregation. Journal of Biological Chemistry, 266, 19: 12449-12454

Vasquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews, 14, 3: 584-640

Walker, J.A., Allen, R.L., Falmagne, P., Johnson, M.K., Boulnois, G.J. 1987. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulphydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and Immunity, 55, 5: 1184-1189.

7.2 Drugi viri

BoxShade server. EMBnet (4. mar. 2009).
http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html (16. junij 2009)

ClustalW server. EMBnet (4. mar. 2009).
<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html> (13. maj 2009)

Laskowski, R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography, 26: 283-291.

Modeller 9v5. Tutorial - Basic modelling. University of California San Francisco (1. jan. 2009). <http://www.salilab.org/modeller/tutorial/basic.html> (28. dec. 2008)

OriginPro 8. OriginLab Corporation (Copyright© 1991–2007).

ProtParam tool. Swiss Institute of Bioinformatics (22. jan. 2003).
<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html> (15. maj 2009)

Sali, A., Blundell, T.L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. Journal of Molecular Biology, 234: 779-815

Verify3D. NIH MBI Laboratory Servers (mar. 2009).
http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/ (15. maj 2009)

8. ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem svojemu mentorju izr. prof. dr. Gregorju Anderluhu, za posredovanoto znanje, nasvete in potrpljenje.

Za bliskovito hiter strokovni pregled naloge in vso prijaznost se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Darji Žgur Bertok.

Zahvala gre vsem zaposlenim na Katedri za biokemijo za sproščeno vzdušje ter vso pomoč pri delu in čudovit odnos. Posebej se zahvaljujem Bavdek Andreju.

Iskreno se zahvaljujem tudi Mateju S., Karmen S., Tini M., Heleni I., Mojci S. in Roku B.

Najlepša hvala tudi mojim staršem in bratu, ki so mi omogočili čas in mir ter pomagali na vsak možen način, da sem delo lahko pripeljala do konca.

Γιώργος, αρκούδα λύκος ἀνδρας ποοκεχ καθετί μου. Σ'αγαπώ.