

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca SUŠNIK

**LASTNOSTI HISTIDINSKIH MUTANT
LISTERIOLIZINA O**

diplomsko delo
univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca SUŠNIK

LASTNOSTI HISTIDINSKIH MUTANT LISTERIOLIZINA O

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

PROPERTIES OF HISTIDINE MUTANTS OF LISTERIOLYSIN O

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Gregorju Anderluhu za mentorstvo in strokovno pomoč pri izvedbi diplomske naloge in prof. dr. Kristini Sepčič za recenzijo. Za vso pomoč in nasvete pri praktičnem delu diplomske naloge se zahvaljujem Andreju Bavdku. Hvala pa tudi vsem, ki ste kakorkoli pomagali pri izvedbi naloge in mi stali ob strani, še posebej družini in prijateljem.

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

Po sklepu Komisije za dodiplomski študij oddelka za biologijo z dne 10.4.2009 je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gregor Anderluh.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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.

Mojca Sušnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK 577.2:579.24(043.2)=163.6
KG listeriolizin O/histidinske mutante/pH odvisnost/temperaturna odvisnost/stabilnost
AV SUŠNIK, Mojca
SA Anderluh, Gregor (mentor)
KZ Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN LASTNOSTI HISTIDINSKIH MUTANT LISTERIOLIZINA O
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VII, 47 str., 2 pregl., 22 sl., 117 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Listeriolizin O (LLO) je najpomembnejši virulenčni dejavnik znotrajcelične in po Gramu pozitivne bakterije *Listeria monocytogenes*. Njegova funkcija je bakteriji omogočiti pobeg iz kislega gostiteljevega fagosoma v citosol. V citosolu se začne listerija razmnoževati. Temu sledi okužba sosednjih celic, ne da bi pri tem bakterija prišla v stik z imunsko obrambo gostitelja. LLO spada v družino od holesterola odvisnih citolizinov (ang. cholesterol dependent cytolysins, CDC), podskupino velike skupine toksinov, ki tvorijo pore (ang. pore forming toxins, PFT). Med njimi LLO izstopa zaradi od pH-odvisne aktivnosti. Z merjenjem hemolitične aktivnosti in lastne triptofanske fluorescence proteinov smo želeli opredeliti vpliv mutacije histidinov v alanine na mestih 57, 79, 311, 423, 450, 463 toksina LLO na njegovo aktivnost in stabilnost. Naš cilj je bil opredeliti stabilnost in pH ter temperaturno odvisnost hemolize človeških eritrocitov za histidinske mutante LLO. Ugotovili smo, da je hemolitična aktivnost histidinskih mutant LLO največja pri temperaturi 37 °C in kislem pH, ki ustreza lumnu fagolizosoma. Pri pogojih, ki ustrezajo citosolu celice, so vse mutante skorajda neaktivne. Večji vpliv pH na hemolitično aktivnost kot pri divjem tipu LLO se kaže pri mutantih H57A, H311A, H423A in H463A, pri mutantih H79A in H450A pa je vpliv primerljiv z vplivom pH na aktivnost divjega tipa LLO. Med mutantami LLO izstopa mutanta H311A, pri kateri ima temperatura bistveno manjši vpliv na njeno hemolitično aktivnost kot na ostale mutante in divji tip LLO. Bolj kot temperatura pa na njeno hemolitično aktivnost vpliva pH. To veliko občutljivost na spremembo pH pripišemo mutaciji na mestu 311 v domeni 3, kjer se tudi nahaja pH tipalo. Sklepamo, da mutanta H311A pri poviševanju temperature ne tvori agregatov in je bolj stabilna od ostalih histidinskih mutant ter divjega tipa LLO.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Dn
DK 577.2:579.24(043.2)=163.6
KG listeriolysin O/histidine mutants/pH- dependancy/temperature dependancy/stability
AU SUŠNIK, Mojca
AA Anderluh, Gregor
KZ Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenija (SLO)
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme of Biology
LI 2010
IN PROPERTIES OF HISTIDINE MUTANTS OF LISTERIOLYSIN O
TD Graduation thesis (university studies)
OP VII, 47 p., 2 tab., 22 fig., 117 ref.
IJ sl
JI sl/en

AI Listeriolysin O (LLO) is the most important virulence factor for intracellular, Gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes*. Its function is to enable the escape of bacteria from the acid phagolysosome in the cytosol of host cells. In the cytosol listeria replicates. This leads to infection of surrounding cells. LLO is a member of cholesterol-dependent cytolysins (CDC), subgroup of a large group of pore forming toxins (PFT). LLO is unique among CDCs because of its pH-dependent activity. By measuring hemolytic activity and tryptophan fluorescence, we wanted to identify the impact of substitution of histidine to alanine at locations 57, 79, 311, 423, 450, 463 of LLO on its activity and stability. Our goal was to define the stability and pH and temperature dependence of hemolysis of human erythrocytes for LLO histidine mutants. We have found that LLO histidine mutants are most hemolytic active at temperature 37 °C and acidic pH, which corresponds to the acid environment of the phagosome. At neutral pH environment at 37 °C (as in the eukaryotic cytosol) all mutants are almost inactive. The bigger influence of pH to the hemolytic activity is shown by the mutants H57A, H311A, H423A and H463A than by the wild type LLO. On mutants H79A and H450A the influence of pH to the activity is comparable to one of the wild type LLO. Among the mutants mutant H311A stands out. The temperature has much smaller effect on its hemolytic activity than to the other mutants' and wild type LLO hemolytic activity. But even bigger effect than the temperature on its activity has pH. It is likely that high pH sensitivity is caused due to the mutation at position 311 in domain 3, where the pH sensor is located. We suggest that mutant H311A does not form aggregates while raising the temperature and is more stable than the other histidine mutant and wild type LLO.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO TABEL.....	V
KAZALO SLIK.....	VI
KRATICE IN OKRAJŠAVE	VII
1 UVOD	1
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	2
2.2 LISTERIOZA	3
2.2.1 Okužba in širjenje.....	4
2.3 TOKSINI, KI TVORIJO PORE.....	6
2.3.1 Od holesterola odvisni citolizini	6
2.3.2 Razširjenost od holesterola odvisnih citolizinov	7
2.3.3 Zgradba in delovanje od holesterola odvisnih citolizinov	8
2.3.4 Listeriolizin O	12
2.3.5 Vpliv pH na delovanje toksinov	13
2.3.6 Vpliv temperature na delovanje LLO.....	15
2.4 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Kemikalije	16
3.1.2 Raztopine.....	16
3.1.3 Eritrociti	16
3.1.4 Toksini.....	16
3.1.5 Laboratorijska oprema.....	17
3.2 METODE	17
3.2.1 Hemolitična aktivnost	17
3.2.2 Fluorescenca.....	18
4 REZULTATI.....	20
4.1 HEMOLITIČNA AKTIVNOST	20
4.1.1 Časovni potek hemolize	20
4.2 VPLIV TEMPERATURE IN pH NA TERCIARNO ZGRADBO TOKSINOV	24
4.2.1 Emisijski spektri triptofanske fluorescence toksinov	24
4.2.2 Vpliv temperature na intenziteto triptofanske fluorescence toksinov	29
4.2.3 Prikaz valovne dolžine z najvišjo intenziteto fluorescence v odvisnosti od temperature	32
5 RAZPRAVA	35
5.1 HEMOLITIČNA AKTIVNOST	35
5.2 VPLIV TEMPERATURE IN pH NA STABILNOST TOKSINOV	36
6 SKLEPI	38
7 VIRI.....	39

KAZALO TABEL

Tabela 1. Predstavniki Gram-pozitivnih bakterij, ki proizvajajo od holesterola odvisne citolizine.....	7
Tabela 2. Sprememba triptofanske fluorescence v odvisnosti od temperature in pH.....	32

KAZALO SLIK

Slika 1. <i>Listeria monocytogenes</i>	2
Slika 2. Shematični prikaz patofiziologije bakterije <i>L. monocytogenes</i>	4
Slika 3. Morfološke stopnje vstopa, rasti, premikanja in širjenja <i>L. monocytogenes</i> iz enega makrofaga v drugega.....	5
Slika 4. Poravnava zaporedij od holesterola odvisnih citolizinov	9
Slika 5. Struktura perfringolizina O	10
Slika 6. Tridimenzionalni model LLO.	13
Slika 7. Časovni potek hemolize divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri pH 5,5 in temperaturah 26°C in 37°C.	21
Slika 8. Časovni potek hemolize divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri pH 7,5 in temperaturah 26°C in 37°C.	21
Slika 9. Hemolitična aktivnost divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant izražena kot $1/t_{75}$	22
Slika 10. Vpliv pH na hemolitično aktivnost divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant. ...	23
Slika 11. Vpliv temperature na hemolitično aktivnost divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant.....	24
Slika 12. Trp spektri divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri temperaturi 15 °C.....	25
Slika 13. Trp spektri divjega tipa listeriolizina O v temperaturnem območju 15 – 70 °C.....	26
Slika 14. Trp spektri mutante H57A v temperaturnem območju 15 – 70 °C.....	27
Slika 15. Trp spektri mutante H79A v temperaturnem območju 15 – 70 °C.....	27
Slika 16. Trp spektri mutante H311A v temperaturnem območju 15 – 70 °C.....	28
Slika 17. Trp spektri mutante H423A v temperaturnem območju 15 – 70 °C.....	28
Slika 18. Trp spektri mutante H450A v temperaturnem območju 15 – 70 °C.....	29
Slika 19. Trp spektri mutante H463A v temperaturnem območju 15 – 70 °C.....	29
Slika 20. Vpliv temperature na intenziteto triptofanske fluorescence divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant.....	31
Slika 21. Primerjava vpliva temperature na intenziteto triptofanske fluorescence divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri pH 5,5 in 7,5.	32
Slika 22. Primerjava valovnih dolžin z najvišjo intenziteto fluorescence divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant v odvisnosti od temperature pri pH 5,5 in 7,5.....	34

KRATICE IN OKRAJŠAVE

Ala	alanin
ALO	antrolizin O
Asp	asparaginska kislina
CDC	od holesterola odvisni citolizini (ang. cholesterol dependent cytolysins)
Cys	cistein
D1	domena 1
D2	domena 2
D3	domena 3
D4	domena 4
DEPC	dietil pirokarbonat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sulfonska kislina
His	histidin
Glu	glutaminska kislina
ILO	ivanolizin
ILY	intermedilizin
LLO	listeriolizin O
LSO	seligerolizin
MACPF	ang. membrane attack complex (MAC) in perforin (PF)
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)etan sulfonska kislina
PFO	perfringolizin O
PFT	toksini, ki tvorijo pore (ang. pore forming toxins)
PLY	pnevmolizin
Ser	serin
SLO	streptolizin O
THM	transmembranski β -lasnici (ang. transmembrane β -helix)
Trp	triptofan
wt	divji tip (ang. wild type)

1 UVOD

Mnogo organizmov v naravi si v svojem boju za obstanek pomaga s toksini. Velika skupina takih organizmov so bakterije. Te lahko v interakcijah z višjimi organizmi s toksini povzročijo bolezni ali pa celo smrt organizma. V diplomskem delu smo se osredotočili na bakterijo *Listeria monocytogenes* in njen toksin listeriolizin O (LLO).

LLO spada v družino od holesterola odvisnih citolizinov (ang. cholesterol dependent cytolysins, CDC), podskupino velike skupine toksinov, ki tvorijo pore (ang. pore forming toxins, PFT). CDC lizirajo evkariontske celice, vključno z eritrociti, zato so poimenovani tudi hemolizini. Monomeri toksina oligomerizirajo in se vgradijo v membrano ter tvorijo največje znane pore med PFT. Pore so v obliki lokov ali obročev. LLO kaže od pH odvisno aktivnost in zato izstopa med vsemi CDC.

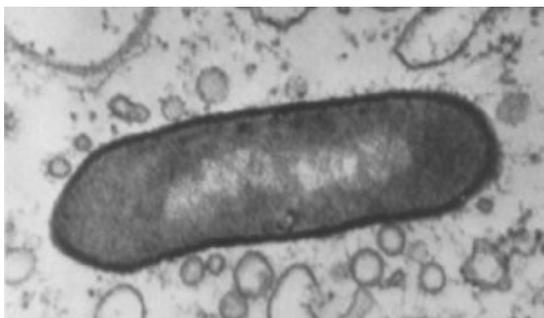
L. monocytogenes je patogena bakterija tako za ljudi kot za živali. Ob vstopu v celico se bakterija znajde v fagolizosomu polnem hidrolitičnih encimov in v kislem pH. Preživetje v takšnem okolju ji omogoča LLO. Ta ustvari pore v membrani fagolizosoma in tako omogoči bakteriji prehod v citosol. V citosolu se začne listerija razmnoževati. Temu sledi okužba sosednjih celic, ne da bi pri tem bakterija prišla v stik z imunsko obrambo gostitelja.

V diplomskem delu smo s pomočjo merjenja hemolitične aktivnosti in lastne triptofanske fluorescence LLO opredelili vpliv mutacije histidinov v alanine na od pH in temperature odvisno delovanje listeriolizina O ter njegovo stabilnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* je soroden rodovom *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* in *Staphylococcus*. V rod *Listeria* uvrščamo šest vrst: *Listeria monocytogenes* (Slika 1), *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* in *L. grayi* (Rocourt in Catimel, 1985; Rocourt, 1989; Conlan in North, 1991). *L. ivanovii* in *L. monocytogenes* sta patogeni za miši, vendar pa za človeku nevarno velja le *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* je hitro rastoča, fakultativno anaerobna, znotrajcelična in po Gramu pozitivna bakterija, ki je po obliki palčka dolžine 1–1,5 µm (Mengaud, in drugi, 1988; Tilney in Portnoy, 1989; Conte in sod., 1996). Je nesporogena bakterija brez kapsule in je mobilna pri temperaturi 10–25 °C, vendar pa peritrihij bičkov pri temperaturi 37 °C ne sintetizira več (Weis in Seeliger, 1975; Pearson in Marth, 1990; Todar, K. 2008). Prisotna je v zemlji, vodi, človeških in živalskih iztrebkih, krmi za živino in različnih vrstah hrane (Donald in sod., 1995; Rørvik, 2000). Najpogosteje se okužba z *Listerio* pogojuje z mehкими siri in drugimi mlečnimi proizvodi, paštetami, klobasami, dimljenimi ribami, solatami in industrijsko predelanimi že pripravljenimi obroki (Farber in Peterkin, 1991; McLauchlin, 1991; McLauchlin in sod., 1990; McLauchlin in sod., 1991; Rocourt, 1996; Ryser, 1999).



Slika 1. *Listeria monocytogenes* (Tilney in Portnoy, 1989)

Vstop v večino celic - epitelne (Gaillard in sod., 1987), hepatocite (Dramsic in sod., 1995; Gaillard in sod., 1996), fibroblaste (Kuhn in Goebel, 1989), endotelijske (Drevets in sod., 1995) in makrofage (Mackaness, 1962) ji omogoča mehanizem inducirane fagocitoze (Mengaud in sod., 1988). Po vstopu v celico se bakterija znajde v fagosomu, kjer je lahko tarča hidrolitičnih encimov (približno 30 minut), dokler ne začne lizirati membrane in pobegne v citosol (Duclos in

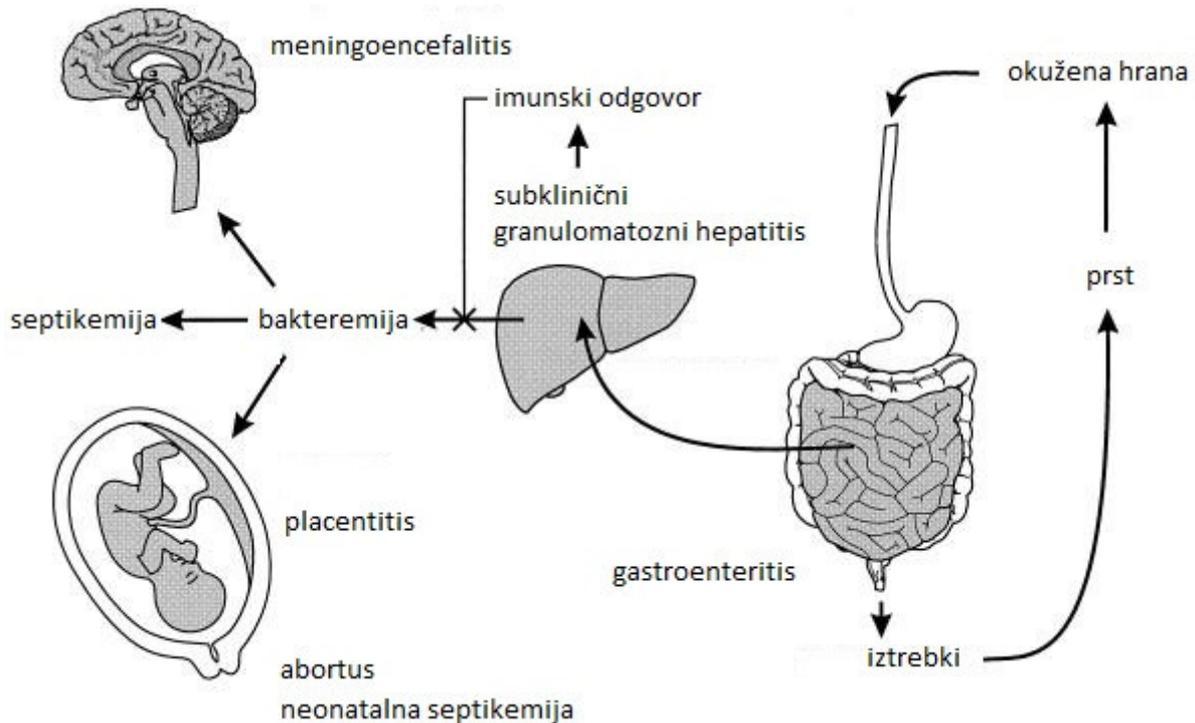
Desjardins, 2000; Tilney in Portnoy, 1989). Ključni dejavnik pri pobegu je protein listeriolizin O (LLO), ki je hkrati primarni virulenčni dejavnik *L. monocytogenes* (Bayley, 1997; Tilney in Portnoy, 1989). LLO ustvari pore v membrani skozi katere izhajajo ioni (Portnoy in sod., 2002), kar posledično zviša pH v lumnu fagosoma in prepreči njegovo nadaljnje zorenje (Marquis in Hager, 2000). Dodatna pomoč pri razgradnji membranskih lipidov sta poleg LLO še dva virulentna dejavnika, ki ju izloča bakterija. To sta nespecifična fosfolipaza C in fosfatidilinozitol-specifična fosfolipaza C (Portnoy in sod., 2002). V citosolu *L. monocytogenes* inducira polimerizacijo α -aktina, kar povzroči izvihavanje celične membrane evkariontske celice (Goldberg, 2001). Z gostiteljevo membrano ovita listerija se vrine v sosednje celice in jih tako okuži.

2.2 LISTERIOZA

Listerija povzroča listeriozo, pomembno bakterijsko zoonozo, ki se pojavi pri živalih in človeku (Barbuddhe in sod., 2000). Infekcija je lahko usodna in se prenaša s hrano. Najbolj dovzetni za okužbo so nosečnice, novorojenčki, starostniki in oslabljeni ali imunokompromitirani pacienti, čeprav se bolezen lahko razvije tudi pri zdravih posameznikih (Vázquez-Boland in sod., 2001). Klinični znaki okužbe z *L. monocytogenes* so zelo podobni pri vseh okuženih bolnikih. Razločimo dva osnovna tipa poteka bolezni: perinatalna listerioza in listerioza pri odraslih pacientih. Pri obeh primerih se lahko bolezen izraža sistemsko ali lokalno kot infekcija centralnega živčnega sistema. Prvi klinični znaki okužbe se začno kazati 20 ur po zaužitju okužene hrane kot gastroenteritis (Dalton in sod., 1997). Nadaljuje se s septokemijo, okužbo ledvic in jeter ter krvnih celic, kot so makrofagi, ki so najučinkovitejši odstranjevalci bakterij iz krvnega obtoka. Znaki invazivne listerioze so večinoma hudi in se kažejo kot splav ali mrtvorojenost kot posledica maternične infekcije zarodka, sepsa, meningitis ali meningoencefalitis, zastrupitev krvi in celo kot vročinski gastroenteritis (Vázquez-Boland in sod., 2001; Rocourt in Cossart, 1997; Michel in sod., 1990). Listerioza je zelo resna bolezen, kajti okužba z *L. monocytogenes* se konča z visoko smrtnostjo. Navkljub zgodnji diagnostiki in zdravljenju z antibiotiki umre 20-30 % pacientov (McLauchlin, 1990; McLauchlin, 1990; Rocourt in Brosch, 1990; Schuchat in sod., 1991).

2.2.1 Okužba in širjenje

L. monocytogenes je odporna na različne postopke konzerviranja hrane. Preživi celo v visokih koncentracijah soli in relativno nizkih pH vrednostih okolja. Razmnožuje se lahko tudi pri nizkih temperaturah, med -18 in 10 °C. Zaradi zmožnosti razmnoževanja v zamrznjeni hrani, velja za enega izmed patogenih mikroorganizmov, ki povzročajo največ skrbi v prehrabeni industriji (Vazquez-Boland in sod., 2001; Ramaswamy in sod., 2007).

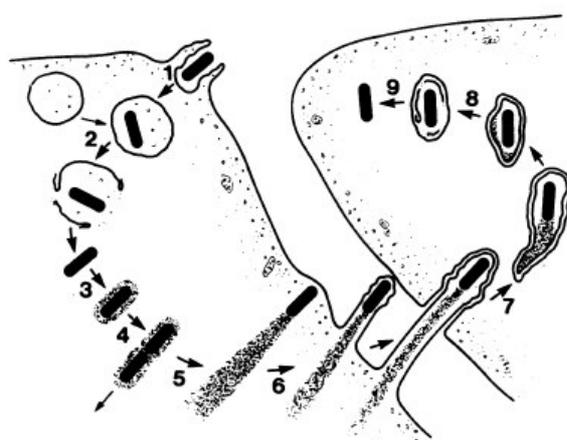


Slika 2. Shematični prikaz patofiziologije bakterije *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland in sod., 2001).

Primarno mesto vstopa listerije v organizem je prebavni trakt. Po prehodu intestinalne bariere bakterije potujejo po limfi ali krvi do mezenteričnih limfnih nodulov, vranice in jeter (Slika 2) (Marco in sod., 1992; Pron in sod., 1998). Začetni korak kolonizacije gostiteljevega tkiva poteka hitro. Nenavadno dolga inkubacijska doba, ki jo *L. monocytogenes* potrebuje za razvoj simptomatske sistemske okužbe, je še uganka. Nakazuje pa, da bakterijska kolonizacija gostiteljevega tkiva vsebuje tiho subklinično fazo, ki jo spremlja več še neznanih dogodkov in mehanizmov (Vazquez-Boland in sod., 2001). Bakterija se najprej pritrdi na površje evkariontske celice, nato sledi proces vstopanja v celico. Po vstopu postane *L. monocytogenes* ujeta v vakuolo, kjer se pH hitro spremeni v kislega (Gaillard in sod., 1987; Beauregard in sod., 1997). Pol ure po vstopu bakterije se začno kazati poškodbe na membrani fagosoma (Gaillard in sod., 1987).

Poškodovanje fagosomalne membrane je proces pri katerem ima primarno vlogo hemolizin v sodelovanju s fosfolipazo in je ključnega pomena za intracelularno preživetje in razmnoževanje listerije (Alvarez-Dominguez in sod.,1997; Goebel in Kreft,1997). V dveh urah se v citosol uspešno prebije približno polovica bakterijske populacije (Tilney in Portnoy,1989), tam se pričnejo takoj razmnoževati in v eni uri se njihovo število podvoji (Gaillard in sod.,1987; Portnoy in sod.,1988).

Morfološke stopnje širjenja okužbe v celicah gostitelja so prikazane na Sliki 3 (Sun in sod., 1990). Takoj po vstopu bakterije v citosol, jo obda oblak aktinskih filamentov, ki se kasneje (približno dve uri po okužbi) prerezporedijo v aktinski rep (dolg do 40 μm) na enem izmed polov bakterije (Tilney in Portnoy, 1989). Aktinski rep sestavljata dve vrsti zamreženih aktinskih filamentov. Prvi so relativno dolgi vzporedno urejeni snopi, drugi pa krajši naključno orientirani aktinski filamentov. Ti potiskajo bakterijsko celico skozi citoplazmo gostiteljske celice s povprečno hitrostjo 0,3 $\mu\text{m/s}$ (Dabiri in sod., 1990; McGrath in sod., 2003). Gibanje po citoplazmi je naključno, vendarle pa bakterija sčasoma doseže membrano gostiteljeve celice. Zaradi nadaljnega gibanja bakterije v isti smeri, se na membrani oblikuje prstast izrastek (Robbins in sod., 1999). Ti psevdopodiji sprva prodirajo v okoliške še neokužene celice, dokončen vstop v gostiteljevo celico pa jim omogoči fagocitoza. Tako postane bakterija obdana z dvojno membrano ujeta v novi gostiteljevi celici. Bakterija pobegne iz vakuole z dvojno membrano zelo hitro, približno pet minut po vstopu, in začne z novim znotrajceličnim razmnoževanjem (Tilney in Portnoy, 1989).



Slika 3. Morfološke stopnje vstopa, rasti, premikanja in širjenja *L. monocytogenes* iz enega makrofaga v drugega. 1. vstop v celico, 2. liza vakuole, 3. tvorjenje aktinskih filamentov, 4. rast, 5. prerazporeditev aktinskih filamentov, 6. premik v citoplazmi in združenje s celično membrano, 7. prepoznanje (sosednje celice) psevdopoda z bakterijo, sledi ponovni vstop v celico, 8. razgradnja notranje membrane, 9. razgradnja zunanje membrane (prirejeno po Sun in sod., 1990).

2.3 TOKSINI, KI TVORIJO PORE

Eno od večjih skupin citolitičnih toksinov predstavljajo toksini, ki tvorijo pore (ang. pore-forming toxins, v nadaljevanju PFT). Proizvajajo jih številni nesporodni organizmi, med njimi bakterije, rastline, glive in živali (Bernheimer in Rudy, 1986). V zadnjih letih so odkrili, da se več evkariontskih proteinov veže in vgrezne v membrano na enak način kot bakterijski PTF. Predvsem s primerjavo 3D zgradbe so ugotovili mehanske in strukturne homologije, četudi je posredi velika evlucijska razdalja (Anderluh in Lakey, 2008; Bernheimer in Rudy, 1986). Vsem je skupna tvorba eksogenih por v membranah gostitelja (Bernheimer in Rudy, 1986). Ti potentni virulentni dejavniki omogočajo patogenim organizmom poškodovanje gostiteljevih celic, vstop vanje in/ali njihovo uničenje. PFT imajo podobno funkcijo kot antibiotiki (Woolley in Wallace, 1992), komponente imunskega sistema (Bhakdi in Trantum-Jensen, 1985) in fuzijski proteini iz virusov (Pletnev in sod., 2001; Lescar in sod., 2001). PFT so vodotopni proteini, ki lahko s pomočjo konformacijske spremembe (brez šaperonov) preidejo v membransko vezano obliko, ki postane del pore (Parker in Feil, 2005; Lesieur in sod., 1997). Nekateri toksini potrebujejo za vezavo na membrano specifične receptorje. To so največkrat lipidi (npr. holesterol pri od holesterola odvisnih citolizinih) in proteini (npr. glikoprotein za aerolizin bakterije *Aeromonas hydrophila*). Receptorji omogočajo koncentriranje toksinov na površini membrane ter njihovo hitrejšo oligomerizacijo in vgreznitev v membrano. Glede na način vgreznitve delimo toksine v dve skupini. V prvo spadajo toksini zgrajeni pretežno iz α -vijačnic, toksine v drugi pa večinoma gradijo β -strukture, ki navadno predstavljajo več kot 40 % zgradbe celotnega proteina (Gouaux, 1997; Parker in Fiel, 2005).

2.3.1 Od holesterola odvisni citolizini

Od holesterola odvisni citolizini (ang. cholesterol-dependent cytolysins, CDC) so ena izmed najbolj razširjenih skupin toksinov, ki tvorijo pore. Njihova vezava na membrano, oligomerizacija in tvorba pore je popolnoma odvisna od vsebnosti holesterola v membrani (Shepard in sod., 2000). Specifični mehanizem nastanka por še ni popolnoma raziskan. Znano je, da oligomerizaciji monomerov v obliki obroča sledijo velike konformacijske spremembe vsakega monomera in proces se zaključi z ugreznjenjem β -sodčka v celično membrano (Tweten, 2005).

2.3.2 Razširjenost od holesterola odvisnih citolizinov

Od holesterola odvisne citolizine proizvaja več kot 20 vrst iz osmih rodov Gram-pozitivnih bakterij: *Arcanobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Gardnerella*, *Listeria*, *Paenibacillus* in *Streptococcus* (Tabela 1). Najbolj raziskani med njimi so listeriolizin, perfringolizin, streptolizin in pneumolizin (Gilbert, 2010). Obstajajo tudi homologi CDC izven prokariontskih vrst kot je toksin metridiolizin morske vetrnice *Metridium senile* (Tweten, 2005; Gilbert, 2010).

Tabela 1. Predstavniki Gram-pozitivnih bakterij, ki proizvajajo od holesterola odvisne citolizine (Palmer, 2001; Rosado in sod., 2008; Gilbert, 2010).

ROD	VRSTA	TOKSIN
<i>Arcanobacterium</i>	<i>A. pyogenes</i>	piolizin
<i>Bacillus</i>	<i>B. anthracis</i>	antrolizin O
	<i>B. alvei</i>	alveolizin
	<i>B. cereus</i>	cereolizin O
	<i>B. laterosporus</i>	laterosporolizin
	<i>B. sphaericus</i>	sfaericolizin
	<i>B. thuringiensis</i>	turingiolizin O
<i>Brevibacillus</i>	<i>B. laterosporus</i>	laterosporolizin
<i>Clostridium</i>	<i>C. bifermentans</i>	bifermentolizin
	<i>C. botulinum</i>	botulinolizin
	<i>C. chavuoiei</i>	ševeolizin
	<i>C. histolyticum</i>	histoliticolizin
	<i>C. novyi</i>	novilizin
	<i>C. perfringens</i>	perfringolizin O
	<i>C. septicum</i>	septikolizin
	<i>C. sordellii</i>	sordelilizin
<i>C. tetani</i>	tetanolizin	
<i>Gardnerella</i>	<i>G. vaginalis</i>	vaginolizin
<i>Listeria</i>	<i>L. ivanovii</i>	ivanolizin
	<i>L. monocytogenes</i>	listeriolizin O
	<i>L. seeligeri</i>	seligerolizin
<i>Paenibacillus</i>	<i>P. alvei</i>	alveolizin
<i>Streptococcus</i>	<i>S. canis</i>	streptolizin O
	<i>S. equisimilis</i>	streptolizin O
	<i>S. intermedius</i>	intermedilizin
	<i>S. pneumoniae</i>	pneumolizin
	<i>S. pyogenes</i>	streptolizin O
	<i>S. suis</i>	suilizin

2.3.3 Zgradba in delovanje od holesterola odvisnih citolizinov

Od holesterola odvisni citolizini se izločajo kot enoverižni, vodotopni proteini z molekulskimi masami med 50-80 kDa (Tweten, 2005; Rossjohn in sod., 1997). Polipeptidne verige CDC so sestavljene iz 471 aminokislinskih ostankov pnevmolizina do 571 aminokislinskih ostankov streptolizina O (Slika 4) (Walker in sod., 1987; Kehoe in sod., 1987). Vzrok za razliko v dolžini polipeptidnih verig CDC so večinoma različna zaporedja na N-terminalnem delu verige, njihova funkcija pa je v večini primerov neznana (Palmer, 2001).

V skoraj popolni homologiji zaporedja med vsemi predstavniki je najdaljše ujema se zaporedje dolgo 11 aminokislinskih ostankov in leži na C-terminalnem delu. Imenovano je undekapeptid ali triptofanska zanka z zaporedjem ECTGLAWEWWR in je, z izjemo toksinov piolizin in intermedilizin, bogata s cisteinom in triptofani (Michel in sod., 1990; Billington in sod., 2002; Nagamune in sod., 2000; Rossjohn in sod., 1997). Domneva se, da edino cistein v primarnem zaporedju CDC ni ključen za njihovo aktivnost, vsekakor pa je za njihovo delovanje pomemben undekapeptid (Haas in sod., 1992; Nagamune in sod., 1996; Rudnick in sod., 2003).

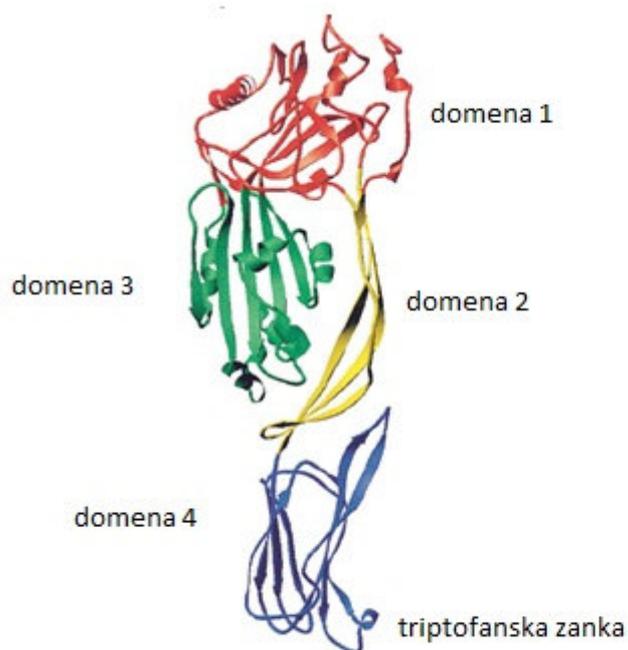
Primarno zaporedje verige LLO so leta 1988 razrešili Mengaud in sodelavci. Identičnost primarnega zaporedja družine CDC znaša med 40-80% (Slika 4), zato lahko sklepamo, da imajo podobno zgradbo kot do danes poznane 3D-strukture perfringolizina O (PFO), intermedilizin (ILY), antrolizin O (ALO) in LLO (Tweten in sod., 1991; Rossjohn in sod., 1997; Polekhina in sod., 2005; Bourdeau in sod., 2009; Bavdek, 2010).

PFO je podolgovrat paličast protein, dolg 115 Å in sestavljen pretežno iz β -strukture (Slika 5) (Rossjohn in sod., 1997). Molekulo sestavljajo štiri domene (Holm in Sander, 1994):

- domeno 1 (D1) predstavlja N-terminalni konec in α - β topologiji z dolgo α -vijačnico, orientirano vzporedno ob antiparalelni β -strukturi (aminokislinski ostanki 37–53, 90–178, 229–274, 350–373),
- domeno 2 (D2) predstavlja podolgovata antiparalelna β -struktura (aminokislinski ostanki 54–89, 374–390),
- domeno 3 (D3) predstavlja α - β topologija, pri čemer jedro domene predstavlja antiparalelna β -struktura, obdana s šestimi α -vijačnicami (aminokislinski ostanki 179–228, 275–349)
- domena 4 (D4) na C-terminalnem delu zaporedja po zgradbi ustreza β -sendviču (aminokislinski ostanki 391–500) (Rossjohn in sod., 1997).

	signalno zaporedje	PEST-zaporedje	
Listeriolizinin O	1	--MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNK--ENLISSMAPPASPPASPKTPIEKKHAEIDKYYIQG	67
Seeligerilizinin	1	--MKIFGLVIMSLLFVSLPITQQPEARDVPPAYDRSEVTISPAETPESPPATPKTPVEKKHAEIEINKYIWG	68
Ivanolizinin	1	--MKKIMLLMLTLLVSLPLAQEAQA--DASVYSY--QGIISHMAPPASPPAKPKTPVEKKNAAQIDQYYIQG	66
Perfringolizinin O	1	-----MIFLNIKKNGKRRKFLTCVLVS--LCTLNYSSTSFQAGHATDITKNASSIDTGIIGN	57
Intermedilizinin	1	MKTQNIARKLSRVVLLSTLVLSAAPISAFAAEPTPKPKAAQTEKKTEKKPENSNSEAAKALNDYIWG	70
Antrolizinin O	1	-----MIFLNIKKNTKRRKFLACLVLVS--LCTIHYSSISFAETQAGNATGAIKNASDINTGIAN	57
epitop M344			
Listeriolizinin O	138	VENQPDVLPVKRDSLTLSIDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNNAVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYD	207
Seeligerilizinin	139	VENQPNVLPVKRDSLTLSVDLPGMTKKNKIFVKNPTKSNVNNNAVNTLVERWNDKYSKAYPNINAKIDYS	208
Ivanolizinin	137	VENQPDVLPVKRDSVTLSDIDLPGMVNHDNEIVVQNTATKSNINDGVNLTVDWRNNKYSEEYPNISAKIDYD	206
Perfringolizinin O	128	ADNQPSLLVAKRKLPLNISIDLPGMR--KENTITVQNPTYGNVAGAVDDLVTWNEKYSETH--LPARMQYT	195
Intermedilizinin	141	LENLPTLIPVNRGKTTISVNLPLGKNGESNLTVENPNSNSTRVAVNNLVEKWIQYNSKTHA--VPARMQYE	209
Antrolizinin O	128	ADNQPSLLVAKRKLPLNISIDLPGMR--KENTITVQNPTYGNVAGAVDDLVTWNEKYSTHT--LPARMQYT	195
TMH1			
Listeriolizinin O	208	DEMAYESQLIAKFGTAFKAVNNSLVNFGAISEGKMQEEVVISFKQIYYNVNVEPTRSRFFGKAVTKE	277
Seeligerilizinin	209	DEMAYESQLIAKFGTAFKAVNNSLVNFEAISDGKQVEEVISFKQIYYNVNVEPTSPSKFFGGSVTKE	278
Ivanolizinin	207	QEMAYESQLVAKFGAAFKAVNNSLVNFGAISEGKQVEEVINFKQIYYTVNVEPTSPSRFFGKSVTKE	276
Perfringolizinin O	196	ESMVYSKSQIASALNVNAKYLDNSLNDIFNAVANGKVKVMVAAKQIFYTVSAELPNNSDLFDNSVTFD	265
Intermedilizinin	210	SISAQMSQLQAKFGADFSKVGAPLNVDFSSVHGKQVFIANFRQVYVYASVDSFNSPSPALFGSGITPT	279
Antrolizinin O	196	ESMVYSKSQIASALNVNAKYLDNSLNDIFNAVANGKVKVMVAAKQIFYTVSAELPNNSDLFDNSVTFD	265
TMH2			
Listeriolizinin O	278	QLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYVYKLSSTNSHSTKVKAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVI	347
Seeligerilizinin	279	QLDALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYVYKLSSTSSHSNKVKTAFAAMS GKSVKGDVELTNIKNSSFKAVI	348
Ivanolizinin	277	NLQALGVNAENPPAYISSVAYGRDIFVKLSTSSHSTRVKAAPDTAFKGSVKGDTELENI IQNASFKAVI	346
Perfringolizinin O	266	ELTRKGVNSAPPVMSVNAVYGRVYVYKLETTSKSKDVQAAF KALLKNNSVETSQYKDFEESTFTAVV	335
Intermedilizinin	280	DLINRGVNSKTPPVYVNSVYGRAMYVVFETTSKSTKVQAAIDAVVKGAKLKAGTEYENILKNKTI TAVV	349
Antrolizinin O	266	ELTRKGVNSAPPVMSVNAVYGRVYVYKLETTSKSKDVQAAF KALLKNNSVETSQYKDFEESTFTAVV	335
Listeriolizinin O	348	YGGSAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKDNELAVIKNNSEYIETT SKAYTDG	417
Seeligerilizinin	349	YGGSAKEVEIIDGNLGLDRDILKKGSTYDRENPVPISYTTNFLKDNLDLAVVKNSEYIETT SKSYTDG	418
Ivanolizinin	347	YGGSAKDEVIIDGDLKSLRDLKQGANFDKKNPGVPIAYTTNFLKDNQLAVVKNSEYIETT SKAYS DG	416
Perfringolizinin O	336	LGGDAKEHNKVVTKDFNEIRNIIKDNAELSFKNPAPYISYTSFCLKDNATAAVHNNDYIETT TTEYSSA	405
Intermedilizinin	350	LGGNPGEASKVITGNIDTLKDLIQKGSNFSAQSPAVPISYTSFVKDNSIATIQNNTDYIETKVT SYKDG	419
Antrolizinin O	336	LGGDAKEHNKVVTKDFNEIRNIIKDNAELSFKNPAPYISYTSFCLKDNATAAVHNNDYIETT TTEYSSA	405
Listeriolizinin O	418	KINIDHSGGYVAQFNISWDEINYPENIEIVQHKNWSENNKSLAHFTSSIIYLPGNARNINVIYAKECTGL	487
Seeligerilizinin	419	KINIDHSGGYVAQFNISWDEVSYDENGEIKVHKWGENYKSKLAHF TSSIIYLPGNARNINIYARECTGL	488
Ivanolizinin	417	KINLDHSGAYVARFNVTVDEVSYDANGNEVVEHKKWSENDKDLAHFTTSSIIYLPGNARNINI HAKECTGL	486
Perfringolizinin O	406	KMTLDHYGAYVAQFDVSWDEFDFDQNGKEVLTHKTWEGSGKDKTAHYSTVIPLPNSKNIKIVARECTGL	475
Intermedilizinin	420	ALTLNHGAFVARYFYVWEELGHADADGETIRSRWSWNGYNRGAHYSTTLRFKGNVRNIRVKVLGATGL	489
Antrolizinin O	406	KMTLDHYGAYVAQFDVSWDEFDFDQNGKEVLTHKTWEGSGKDKTAHYSTVIPLPNSKNIKIVARECTGL	475
undekapeptid			
Listeriolizinin O	488	AWEWWRTVIDDRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNSVDNPIE- 529	
Seeligerilizinin	489	FEWWRRTVIDDRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNSVDNPIQ- 530	
Ivanolizinin	487	AWEWWRTVIDDRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNSVDNPIK- 528	
Perfringolizinin O	476	AWEWWRTIINEQNVLPTNEIKVSIIGGTTLYPTASISH----- 512	
Intermedilizinin	490	AWEPWRLIYSKNDLPLVPQRNISTWGTTLHPQFEDKVVKDNTD 532	
Antrolizinin O	476	AWEWWRTIINEQNVLPTNEIKVSIIGGTTLYPTATISH----- 512	

Slika 4. Poravnava zaporedij od holesterola odvisnih citolizinov. Negativno nabite aminokisljine (D, E) so prikazane z rdečo barvo, bazične (K, R) z modro in z roza (H), polarne nenabite z vijolično (S, Q, N, T), hidrofobne aminokisljine z zeleno (A, I, L, M, F, P, V, W, Y), C in G pa z rumeno. Ob poravnavi zaporedij je posebno označeno signalno zaporedje, PEST-zaporedje, epitop protitelesa M344, zaporedje, ki se razvije v transmembranski β -lasnici (TMH 1 in 2), undekapeptid (Trp-zanka) ter Cys486 (zvezdica) (iz Bavdek, 2010).



Slika 5. Struktura perfringolizina O (Rossjohn in sod., 1997).

Domena 1 (D1) rdeče, domena 2 (D2) rumene, domena 3 (D3) zelene in domena 4 (D4) s triptofansko zanko modre barve.

Terciarna struktura CDC je zgrajena večinoma iz β -struktur, PFO jih vsebuje skoraj 40%, 11 α -vijačnic in dve 3_{10} -vijačnici (Parker in Feil, 2005; Rossjohn, 1997), od teh sta dve pomembni za vstavitev toksina v membrano, in sicer se zaradi konformacijske spremembe pretvorita v transmembranski β -lasnici (ang. transmembrane helix, v nadaljevanju TMH) domene 3. D1, D2 in D4 ležijo podolžno, D3 pa je bočno zložena ob D2. Polipeptidna veriga teče v obe smeri po molekuli preko D1-3, medtem ko je D4 zgibana v gost sendvič β -struktur na C-terminalnem koncu molekule (Rossjohn, 1997). Vmesni ploskvi sta med D2 in D3 (D3 ukrivljena glede na obliko D2 in interakcije med njima so večinoma polarne) ter D2 in D4 (veliko vodikovih vezi, v središču se stika veliko aromatskih skupin).

Triptofanska zanka se nahaja v D4, ki je odgovorna za prepoznavanje holesterola v membrani (Weis in Palmer, 2001). Pomembnost cisteinskega in triptofanskih ostankov v triptofanski zanki za delovanje toksina so pokazali z zamenjavo posameznih aminokislinskih ostankov (Michel in sod., 1990). Z zamenjavo cisteina na mestu 484 v alanin oz. serin in triptofana v alanin na mestih 491 in 492, so opazili znižanje hemolitične aktivnosti za 25, 80, 95 in 99,9% (Heuck in sod., 2000; Ramachandran in sod., 2002; Nagamune in sod., 2004). Vezava triptofanske zanke na holesterol je predpogoj za vstavitev transmembranskih β -lasnic v membrano in nadaljne

konformacijske spremembe (Polekhina in sod., 2005; Shatursky in sod., 1999). Vezava zank tako omogoči pravokotno orientacijo PFO na membrano, D4 ostane obdana z vodnem okoljem tudi v oligomernem kompleksu in tako ni odgovorna za oligomerizacijo enot na membrani (Ramachandran in sod., 2002; Iwamoto in sod., 1990; Tweten in sod., 1991). Stik D4 s holesterolom le sproži konformacijske spremembe v D3 (prehod α -vijačnic v v transmembranske β -lasnice), ki vodijo do oligomerizacije toksinskih monomerov (Soltani in sod., 2007; Heuck in sod., 2000).

Pri PFO, ILY in ALO je D3 zgrajena iz štirih antiparalelnih β -struktur, imenovanih β 1-4, in manjše β -zanke (β 5) (Ramachandran in sod., 2004). Povezavo med β 5-strukturo in β 4-strukturo tvorijo vodikove vezi, α -vijačnica pa prekriva hidrofobni del β 4-strukture. Na ta način se prepreči spontana oligomerizacija monomerov v raztopini. Pri PFO so z uporabo dvojnih cisteinskih mutant (Cys484Ala, Cys484Ser) in fluorescenčnih označevalcev pokazali, da pride ob vezavi D4 in holesterola v membrani do odmika α -vijačnice od β -antiparalelne strukture, kar omogoči razvitje šestih α -vijačnic v dve transmembranski β -lasnici (THM1 in THM2) (Shepard in sod., 1998; Shatursky in sod., 1999; Hotze in sod., 2001). Oligomerizacija monomerov poteče s povezavo β 1-strukture prvega in β 4-strukture sosednjega monomera (Ramachandran in sod., 2004). Vsak monomer torej prispeva dve transmembranski β -lasnici iz D3 k formaciji pore (transmembranskemu β -sodčku). Z monoklonskimi telesi M344, ki specifično prepoznajo določeno zaporedje v D1 pri LLO, so pokazali, da vezava protiteles prepreči oligomerizacijo monomerov LLO (Bavdek in sod., 2007). Do vstavitve oligomernega kompleksa pride šele, ko ta vsebuje končnih 35–50 monomerov (Olofsson in sod., 1993).

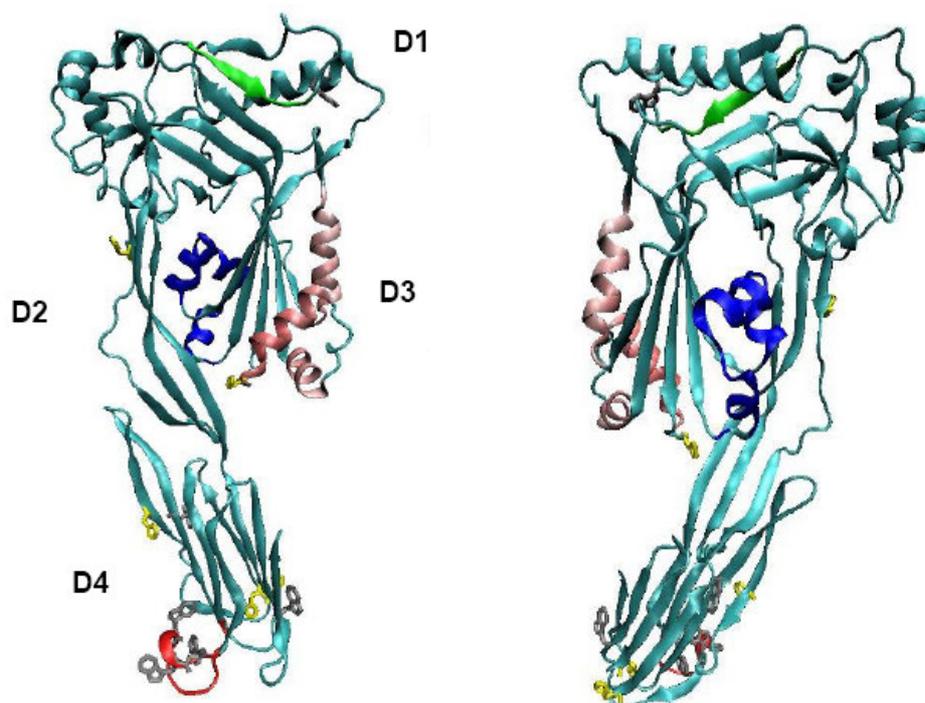
Nedavno so pri raziskovanju proteinov vretenčarjev odkrili, da imajo CDC in naddružina MACPF proteinov (ang. membrane attack complex (MAC) - del komplekta in perforin (PF)) strukturne podobnosti, kar nakazuje, da vretenčarji v boju proti okužbi uporabljajo podoben mehanizem tvorbe por kot CDC (Rosado in sod., 2007; Rosado in sod., 2008). CDC tvorijo največje od sedaj znanih por med toksini, ki tvorijo pore (Tweten in sod., 2001). Notranji premer pore, ki ima lahko obliko loka ali prstana, meri med 20 in 40 nm (Mitsui in sod., 1979; Duncan in Schlegel, 1975; Bhakdi in sod., 1985; Sekiya in sod., 1993; Morgan in sod., 1994; Palmer in sod., 1998). Toksini ob tvorjenju pore brez pomoči šaperonov spremenijo konformacijo (Lesieur in sod., 1997).

2.3.4 Listeriolizin O

Listeriolizin O je eksotoksin, najpomembnejši virulenčni dejavnik bakterije *L. monocytogenes*, njegova funkcija je bakteriji omogočiti pobeg iz kislega gostiteljevega fagosoma v citosol (Portnoy in sod., 1992). Je enoverižni protein iz 529 aminokislinskih ostankov z molekularno maso 58,6 kDa. Prvih 25 aminokislin predstavlja signalni peptid, tako da je izločen peptid dolg 502 aminokislinskih ostankov, velikosti 55,8 kDa (Palmer in sod., 1998). Kot vsi CDC ima tudi LLO triptofansko zanko na C-terminalnem koncu peptida v D4 (Michel in sod., 1990). Je edini med CDC, ki vsebuje 19 aminokislin dolgo zaporedje PEST na N-terminalnem delu molekule v D1 (Rogers in sod., 1986). To je prepoznavno zaporedje za gostiteljeve proteolitične encime, ki nato hitro ali fosforilirajo ali razgradijo protein v citosolu gostitelja. PEST zaporedje je bogato s prolinom (P), glutaminsko kislino (E), serinom (S) in treoninom (T) (Decatur in Portnoy, 2000). Odsotnost tega zaporedja poveča toksičnost listeriolizina, vendar zmanjša virulenco *L. monocytogenes* (Lety in sod., 2003). PEST sekvenca je torej nujna za ohranjanje znotrajcelične niše bakterije in njeno virulenco (Decatur in Portnoy, 2000). 3D struktura LLO je prikazana na sliki 6 (Bavdek, 2010).

LLO omogoča bakteriji prehod iz fagolizosoma v citosol ne da bi liziral gostiteljske celice, kar je značilnost ostalih CDC. Listerija, ki ni zmožna sinteze LLO, je nevirulentna (Glomski in sod., 2003). Mutanta *L. monocytogenes*, ki proizvaja PFO namesto LLO, je zmožna pobega iz fagolizosoma v citosol, vendarle PFO v citosolu lizira plazemsko membrano gostiteljske celice (Jones in Portnoy, 1994). Liza gostiteljske membrane zmanjša virulentnost *L. monocytogenes*, saj gostiteljska celica propade, še preden se bakterija uspe začeti razmnoževati. LLO je aktiven in se izraža le, kadar se bakterija nahaja v kislem okolju (Geoffroy in sod., 1987; Glomski in sod., 2002; Schuerch in sod., 2005). Prvič so pH-odvisno aktivnost zaznali z merjenjem hemolize in določili optimalno delovanje pri pH 5,5 (Geoffroy in sod., 1987; Giammarini in sod., 2003). CDC, ki jih proizvajajo predstavniki rodu *Listeria* (LLO, ILO (ivanolizin) in LSO (seligerolizin O)) so aktivni le v kislem pH. Tridesetminutna inkubacija teh toksinov v nevtralnem mediju pri temperaturi 37 °C ireverzibilno zavre sposobnost vezave na lipidne membrane ter hemolitično aktivnost (Schuerch in sod., 2005; Nomura in sod., 2007). Merjenje hemolize na človeških eritrocitih je pokazalo, da je agregiran LLO hemolitično neaktiven (Nomura in sod., 2007). Pri fiziološkem pH 5,5 in temperaturi 37 °C, ki vladata v fagolizosomu, ostane LLO v nativni obliki in je hemolitično aktiven.

LLO monomeri oligomerizirajo v večji kompleks, ki nato tvori poro. Ta je v obliki β -sodčka, ki se formira z iztegnjenjem dveh β -transmembranskih lasnic od vsakega izmed monomerov (Schuerch in sod., 2005).



Slika 6. Tridimenzionalni model LLO. Tridimenzionalni model LLO: (D1) domena 1; (D2) domena 2; (D3) domena 3); (D4) domena 4. Barvne oznake: (rumeno) histidinski ostanki; (sivo) triptofanski ostanki; (zeleno) epitop M344; (modro) TMH1; (roza) TMH2; (rdeče) Trp-zanka (iz Bavdek, 2010).

2.3.5 Vpliv pH na delovanje toksinov

LLO ima optimum delovanja pri pH 5,5 in je skoraj popolnoma neaktiven pri pH 7,0 (Geoffroy in sod., 1987; Portnoy in sod., 1992). LLO nesorodni pH-odvisni toksini, kot sta difterija toksin in antraks toksin, so aktivni samo pri nizkem pH endosoma. Tako difterija toksin kot antraks toksin sta neaktivna, a stabilna pri nevtralnem pH. Nizek pH povzroči konformacijsko spremembo in vgreznitev transmembranske domene v membrano (Blewitt in sod., 1985; Mindel in sod., 1992; Mindel in sod., 1994; Choe in sod., 1992; Collier in Young, 2003).

Delovanje LLO v kislem okolju je pomemben korak pri pobegu *L. monocytogenes* iz fagosoma, saj inhibitorji fagosomskega zakisanja preprečijo pobeg bakterije v citoplazmo, v samem citosolu

pa se izogne za bakterijo škodljivim poškodbam z inaktivacijo pri nevtralnem pH (Beauregard in sod., 1997; Giammarini in sod., 2003). To nakazuje kako pomembna je optimalna regulacija pH-odvisnosti za znotrajceličnega parazita *L. monocytogenes*.

Pri CDC, ki jih tvori rod *Listeria* (LLO, ILO, LSO), je na mestu 461 aminokislina levcin, pri ostalih predstavnikih družine CDC kot so PFO, sterptolizin O (SLO) in pnevmolizin (PLY) pa treonin. Pokazali so, da zamenjava levcina s treoninom na mestu 461 pri LLO povzroči izgubo pH odvisnosti (Glomski in sod., 2002).

Meritve triptofanske fluorescence PFO so pokazale, da se spektri premaknejo v rdeče območje, če se pH zniža z 7,0 na 6,0. Prav v tem pH območju pa imajo pK_a imidazolni obroči histidinskih ostankov, zaradi česar sklepajo, da so histidinski ostanki vpleteni v pH odvisno konformacijsko spremembo. Tudi rezultati meritev modifikacije histidinskih ostankov z DEPC kažejo na zmanjšano stopnjo vezave na lipidne membrane in oligomerizacije toksina PFO (Nakamura in sod., 1999).

Primerjava med primarno strukturo pH-odvisnih listerijskih CDC (LLO, LSO, ILO) in osmih pH- neodvisnih CDC nakazuje, da so 4 bazični in 12 kislil aminokislinskih ostankov značilni samo za listerijske CDC. Večina (9 od 12) jih je v delu zaporedja LLO, ki je primerljivo z D3 pri PFO (Schuerch in sod., 2005). To nakazuje na prisotnost pH senzorja v D3.

pH odvisnost LLO citolitične aktivnosti je rezultat temperature in pH odvisne denaturacije (Schuerch in sod., 2005). Ključna točka pri inaktivaciji monomera toksina LLO je predčasno razvitje dveh transmembranskih lasnic v D3, ki se sicer vstavi v membrano in tako prispevata k formaciji pore v obliki β -sodčka (Shepard in sod., 1998; Shatursky in sod., 1999). Razvitje lasnic regulira trojček aminokislinskih ostankov (Glu-247, Asp-320 in Glu-208) v D3 in delujejo kot pH tipalo. Ta domena je večino časa v metastabilnem stanju. Pri nizkem pH se ohranja metastabilno stanje zaradi protoniranih karboksilnih skupin aminokislinskega trojčka. Ob spremembi v nevtralen ali bazičen pH se karboksilne skupine trojčka deprotonirajo, odboj med naboji zasukajo β -strukture v D3 in s tem ploskev med domeno 2 in 3, kar povzroči predčasen razvoj α -vijačnic v lasnici in protein ne more več tvoriti medmolekularnih stikov z drugimi toksini na membrani (Shepard in sod., 1998; Shatursky in sod., 1999; Schuerch in sod., 2005). 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, vodikove vezi) (Schuerch in sod., 2005). pH odvisno delovanje listeriolizina O je torej pod velikim vplivom D4 in D3.

2.3.6 Vpliv temperature na delovanje LLO

Ugotovili so, da ob inkubaciji LLO pri 37 °C in pH 7,4 pride do hitre izgube v hemolitični aktivnosti, medtem ko ni bistvene spremembe v aktivnosti opazovane pri pH 5,5. Zdi se, da je izguba aktivnosti pri 37 °C in pH 7,4 posledica denaturacije. Zaradi tega pride do izpostavitve ključnih hidrofobnih zaporedij, kar vodi do agregacije. S pomočjo triptofanske fluorescence so ugotovili, da LLO agregira pri temperaturah višjih od 31 °C (Schuerch in sod., 2005). Citolitična aktivnost pa se ohrani tako pri kislem kot bazičnem pH, kadar je LLO inkubiran pri temperaturi nižji od 25 °C (Nomura in sod., 2007).

2.4 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

S tehnikama merjenja hemolitične aktivnosti in merjenja fluorescence smo želeli opredeliti vpliv mutacije histidinov v alanine na aktivnost listeriolizina O in njegovo stabilnost. Naš cilj je bil opredeliti stabilnost in pH ter temperaturno odvisnost hemolize človeških eritrocitov za histidinske mutante LLO. Naša izhodiščna hipoteza je bila, da so histidinski ostanki pomembni za delovanje LLO in njegovo stabilnost. Domnevamo še, da je eden ali več histidinov (na mestih 57, 79, 311, 423, 450, 463) prisotnih v delu proteina, ki je odgovoren za njegovo aktivnost.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

etanol (EtOH), 96 %, 100 %

Merck, Nemčija

Hellmanex II čistilno sredstvo

Hellma, Nemčija

3.1.2 Raztopine

Vse raztopine so bile pripravljene v deionizirani vodi, filtrirani preko 0,22 µm Millipore filtrov (milliQ H₂O).

3.1.2.1 Raztopine za spiranje eritrocitov in test hemolitične aktivnosti

HEPES-pufer

140 mM NaCl

20 mM HEPES

1 mM EDTA

pH 7,5

MES-pufer

140 mM NaCl

20 mM MES

1 mM EDTA

pH 5,5

3.1.3 Eritrociti

Pri delu smo uporabili človeške in goveje eritrocite.

3.1.4 Toksini

Divji tip listeriolizina O

Mutante listeriolizina O:

His57Ala

His423Ala

His79Ala

His450Ala

His311Ala

His463Ala

Mutante LLO so bile predhodno pripravljene in shranjene kot vodna raztopina pri -20 °C (Ramšak, 2009).

3.1.5 Laboratorijska oprema

centrifuge	Eppendorf 5415D, Nemčija Sigma, 3K-30, Nemčija Centric 322a
magnetno mešalo	MM540
pH-meter	Mettler Toledo, Nemčija
spektrofluorimeter	Jasco FP-750, Jasco Corporation, Japonska
spektrofotometer	UV-2101 PC, Shimadzu, Japonska
Tehtnica	Slovenija RC2-B Sorvall, Kendro lab products, Nemčija
vibracijski stresalnik	Vibromix 114EV, Tehtnica, Slovenija
zamrzovalniki, -20 °C	Gorenje, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Hemolitična aktivnost

Človeške eritrocite smo pridobili od zdravih prostovoljcev in jih uporabljali največ do 14 dni. Hranili smo jih v hladilniku. Za vsak dan meritve smo eritrocite sprali s svežim pufrom. Centrifugirali smo jih v pufru pH 5,5 (20 mM MES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA) in pH 7,5 (20 mM Hepes, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA) vsakič 5 min na 2500 obratih/min in pri sobni temperaturi. Pri vsakem spiranju smo eritrocitom 4 x zamenjali pufer.

Hemolitično aktivnost LLO in mutant smo spremljali spektrofotometrično. Merili smo pri temperaturah 26 °C in 37 °C v puferskih raztopinah pH 5,5 (20 mM MES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA) in pH 7,5 (20 mM Hepes, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA), v katerih smo predhodno sprali eritrocite. Za ugotavljanje hemolitične aktivnosti LLO smo merili absorbanco 10 min pri valovni dolžini 700 nm in širini rež 1,0 nm. Eritrocitom v kiveti s končnim volumom 3 ml smo umerili začetno absorbanco na 1,8. V kiveti je bilo ves čas prisotno magnetno mešalo. Suspenzijo smo ustalili na željeno temperaturo s 5 min inkubacijo in stalnim mešanjem. Nato smo začeli meritev in po 2 min suspenziji v kiveto dodali toksin do končne koncentracije 0,075 nM. Toksine smo predhodno inkubirali vsaj 10 min na ledu v prisotnosti 10 mM DTT. Vsako meritev smo neodvisno ponovili vsaj trikrat.

3.2.2 Fluorescenca

Fluorescenca je spektroskopska metoda, ki temelji na fokusiranem žarku svetlobe določene valovne dolžine, ki povzroči vzbujanje elektronov v molekulah. Pri prehajanju na nižja energijska stanja elektroni izsevajo svetlobo daljše valovne dolžine. Je zelo občutljiva in specifična metoda, na katero vpliva mnogo dejavnikov, kot so polarnost, koncentracija, prisotnost dušilcev, bližina ligandov, temperatura in pH (Lakowicz, 1999).

S pomočjo merjenja fluorescenčnih spektrov lahko opredelimo strukturo proteinov, njihovo konformacijo, pridobimo informacije o vezavnih mestih ligandov in interakcijah molekul s topilom. Prav tako lahko s fluorescenco spremljamo različne procese, kot so denaturacija proteinskih molekul in spreminjanje konformacije ob vezavi ligandov ali v odvisnosti od pH in temperature. Spekter določa predvsem polarnost okolja triptofanskih in tirozinskih ostankov in njihovih specifičnih interakcij (Pain, 1996).

3.2.2.1 Triptofanska fluorescenca

Večina intrinzične emisije fluorescence proteina gre na račun triptofanskih ostankov, nekaj pa je tudi zaradi ostankov tirozina in fenilalanina. Triptofan maksimalno absorbira svetlobo pri valovni dolžini 280 nm, vrh svojega emisijskega spektra pa doseže med 300 in 350 nm, odvisno od polarnosti okolja. Pri vzbujanju triptofana z valovno dolžino 295 nm, je njegov emisijski spekter fluorescence dominanten nad spektrom tirozina in fenilalanina. Triptofan je relativno redka aminokislina, saj mnogo proteinov vsebuje le enega ali nekaj triptofanskih ostankov, zato je triptofanska fluorescenca zelo občutljiva metoda konformacijskega stanja proteinov. Triptofanski spekter se premakne v krajše valovne dolžine, intenziteta fluorescence pa naraste, če postane okolje triptofana manj polarno (Vivian in Callis, 2001; Caputo, 2003).

Triptofansko fluorescenco (Trp-fluorescenco) toksinov v odvisnosti od pH in temperature smo merili s spektrofluorimetrom v kvarčni kivetih (1 cm) ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom. Kiveta je bila pred vsako novo meritvijo temeljito očiščena z 1 % raztopino Hellmanex, nato etanolom in destilirano vodo. Širini rež za ekscitacijo in emisijo sta bili 5 nm. Za vzbujanje triptofanov, prisotnih v toksinih, smo uporabili svetlobo valovne dolžine 295 nm, snemanje emisijskih spektrov pa je potekalo v območju 310–400 nm.

3.2.2.2 Trp-fluorescenca v temperaturnem območju 15–70 °C

Z merjenjem Trp-fluorescence v raztopinah MES-pufer (20 mM MES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 5,5) in HEPES-pufer (20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) smo opazovali sovpliv pH in temperature na spremembo polarnosti okolja Trp v molekuli LLO ter njenih mutantah. Meritve smo izvajali v temperaturnem intervalu 15–70 °C. Emisijske spektre smo snemali v intervalih po 5 °C ob hitrosti segrevanja 1 °C/min. Pri vsakem pH smo izvedli dve neodvisni meritvi.

Pri vsaki meritvi smo najprej izmerili emisijski spekter pufru. Nato smo iz kivete odvzeli določen volumen pufru in ga nadomestili z raztopino toksina ustrezne koncentracije. Koncentracija toksina v končnem volumnu 1,2 ml je bila 250 nM. Vsak emisijski spekter smo korigirali tako, da smo odšteli spekter samega topila, posnetega pri enakih pogojih (pH in temperaturi).

4 REZULTATI

4.1 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

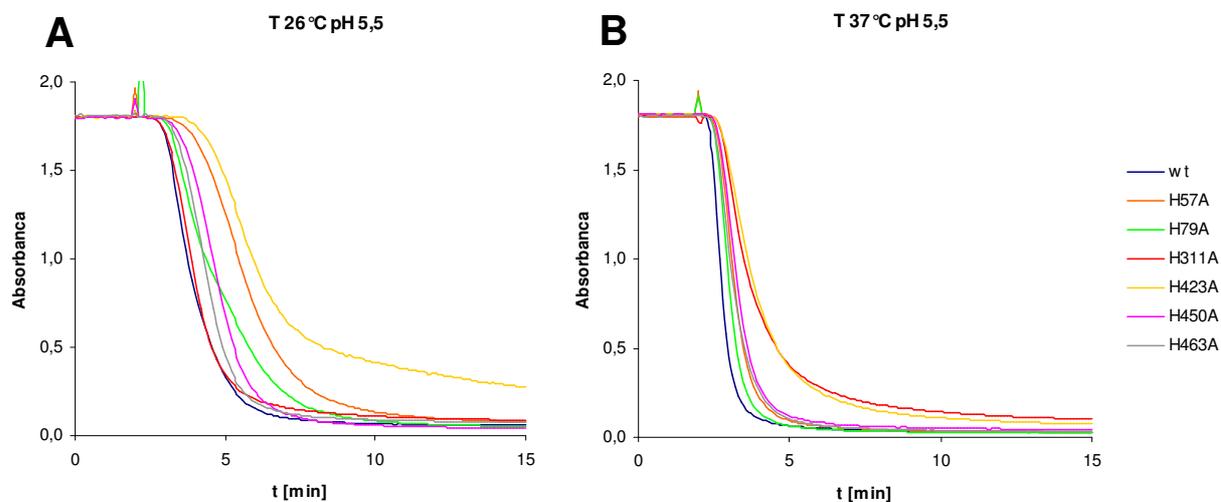
4.1.1 Časovni potek hemolize

Hemolitično aktivnost LLO divjega tipa in mutant smo merili pri pH vrednostih 5,5 in 7,5 ter temperaturah 26 °C in 37 °C.

Vsi testirani toksini imajo pri pH 5,5 večjo hemolitično aktivnost pri temperaturi 37 °C kot pri temperaturi 26 °C. Najbolj hemolitično aktiven je LLO divjega tipa pri obeh temperaturah. Pri temperaturi 26 °C podobno hemolitično aktivnost kot divji tip kažejo mutante H331A, H79A, H463A in H450A, nekoliko manjšo pa mutanti H57A in H423A (Slika 7A). Pri višji temperaturi imata manjšo aktivnost mutanti H331A in H423A, ostale pa so primerljive z aktivnostjo LLO divjega tipa (Slika 7B).

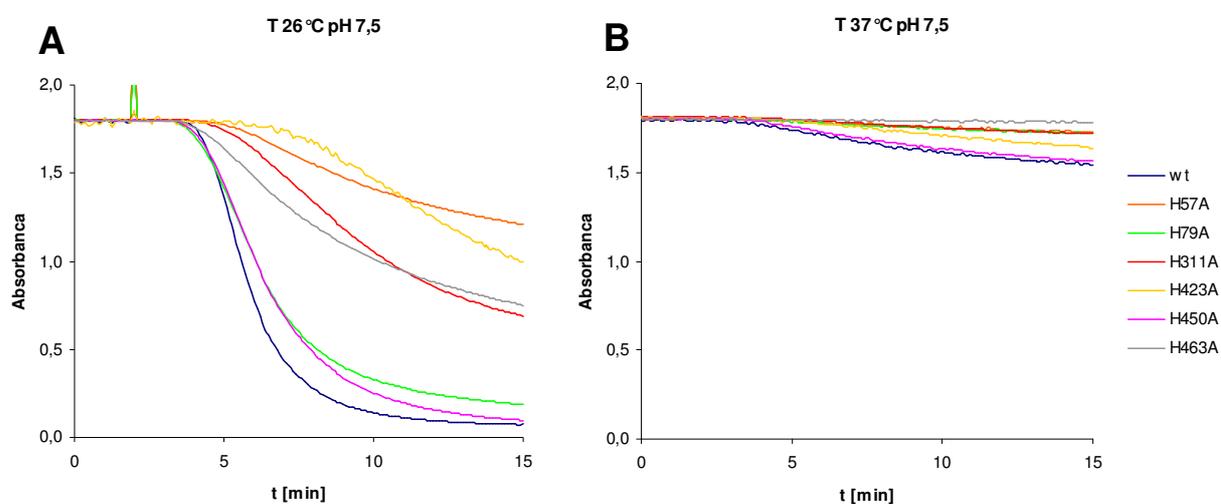
Pri pH 7,5 in temperaturi 26 °C sta podobno kot divji tip hemolitično aktivni mutanti H79A in H450A, nekoliko manjšo aktivnost kažeta mutanti H463A in H311A, najmanj aktivni pa sta mutanti H57A in H423A (Slika 8A). Pri temperaturi 37 °C so vsi toksini skoraj neaktivni (Slika 8B), zato teh rezultatov ni bilo mogoče dalje analizirati.

Pri pH 7,5 je v primerjavi s pH 5,5 pri vseh vzorcih opaziti manjšo hemolitično aktivnost, še posebno pri temperaturi 37 °C, kjer so pri pH 5,5 toksini najbolj aktivni, pri pH 7,5 pa pride do skorajšnje izgube hemolitične aktivnosti (Slika 7 in Slika 8).



Slika 7. Časovni potek hemolize divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri pH 5,5 in temperaturah 26°C in 37°C.

Hemolitično aktivnost divjega tipa LLO in njegovih mutant smo merili pri pH 5,5 in temperaturah 26°C (A) in 37°C (B). Grafi so povprečje najmanj treh meritev za vsak vzorec.

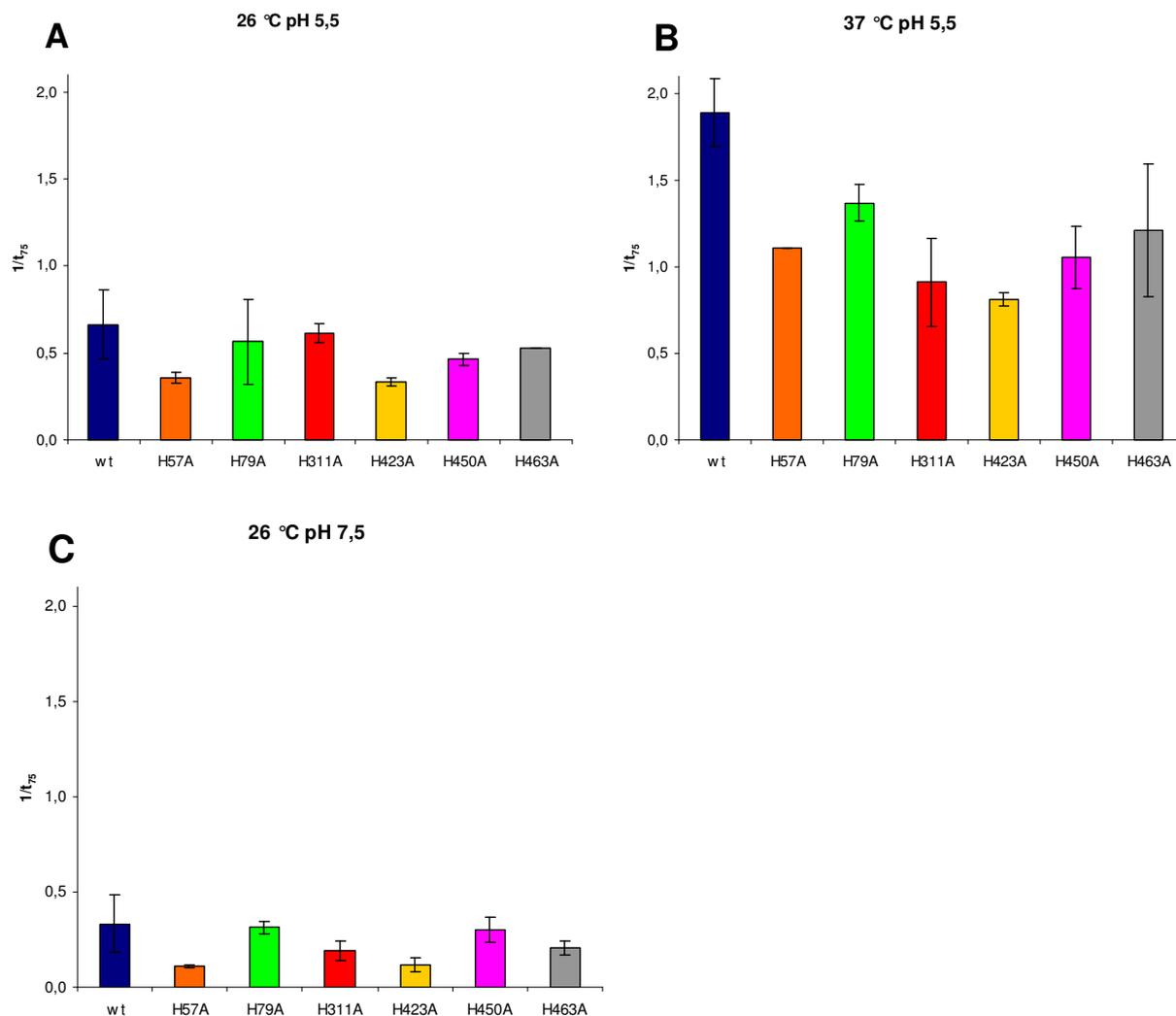


Slika 8. Časovni potek hemolize divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri pH 7,5 in temperaturah 26°C in 37°C.

Hemolitično aktivnost divjega tipa LLO in njegovih mutant smo merili pri pH 7,5 in temperaturah 26°C (A) in 37°C (B). Grafi so povprečje najmanj treh meritev za vsak vzorec.

4.1.1.1 Hemolitična aktivnost izražena kot $1/t_{75}$

Hemolitično aktivnost toksinov smo predstavili kot $1/t_{75}$, pri čemer je t_{75} čas, pri katerem je doseženih 75% začetne vrednosti absorbance. Večja vrednost kvocienta $1/t_{75}$ pomeni hitrejši potek hemolize v začetnem delu in s tem večjo hemolitično aktivnost toksina. Največja učinkovitost se pri vseh toksinih kaže pri temperaturi 37 °C in pH 5,5 (slika 9B), najmanjša pri temperaturi 26 °C in pH 7,5 (slika 9C).



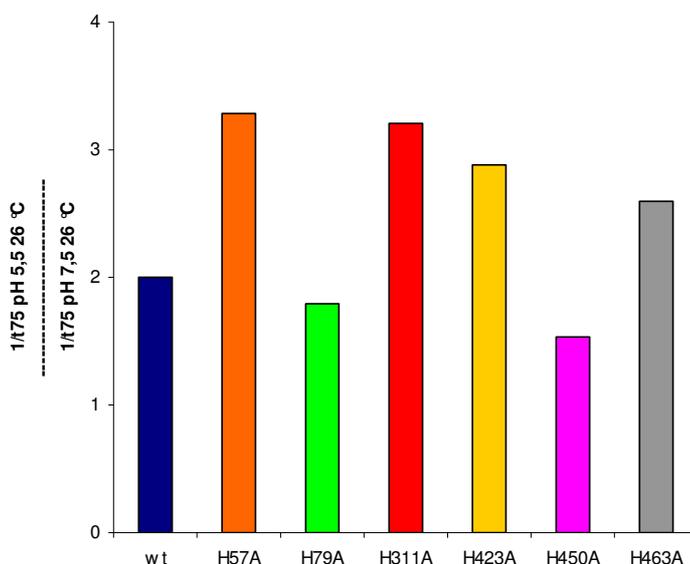
Slika 9. Hemolitična aktivnost divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant izražena kot $1/t_{75}$.

Hemolitična aktivnost toksinov je izražena kot $1/t_{75}$, pri čemer je t_{75} čas, v katerem je doseženih 75 % začetne vrednosti absorbance.

Za boljši vpogled v vpliv temperature in pH na hemolitično aktivnost proučevanih toksinov smo med seboj primerjali kvociente $1/t_{75}$ pri različnih pogojih.

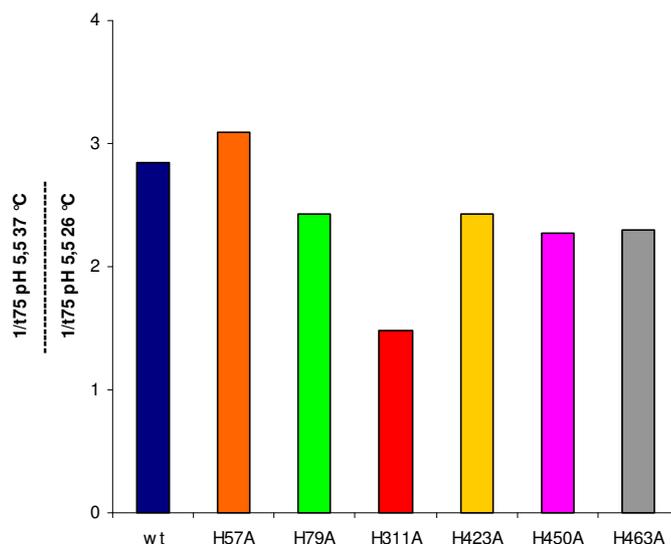
Pri primerjanju razmerij med $1/t_{75(\text{pH } 5,5)}$ in $1/t_{75(\text{pH } 7,5)}$ pri 26°C za posamezne toksine smo opazili razliko v vplivu pH na hemolitično aktivnost. Pri mutantih H57A, H311A in H423A smo v primerjavi z LLO divjega tipa zasledili bistveno večji vpliv pH na hemolitično aktivnost kot pri ostalih mutantih (Slika 10).

Ob primerjavi razmerij med $1/t_{75(37^{\circ}\text{C})}$ in $1/t_{75(26^{\circ}\text{C})}$ pri pH 5,5 za posamezne toksine je opaziti bistven vpliv temperature na hemolitično aktivnost pri vseh mutantih, razen H311A, in divjem tipu, vendar pa ni večjih razlik med njimi. Mutanta H311A kaže bistveno manjšo temperaturno odvisnost aktivnosti pri povišanju temperature glede na LLO divjega tipa (Slika 11).



Slika 10. Vpliv pH na hemolitično aktivnost divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant.

Vpliv pH na hemolitično aktivnost smo prikazali s pomočjo razmerij med $1/t_{75(\text{pH } 5,5)}$ in $1/t_{75(\text{pH } 7,5)}$ pri 26°C za posamezne toksine.

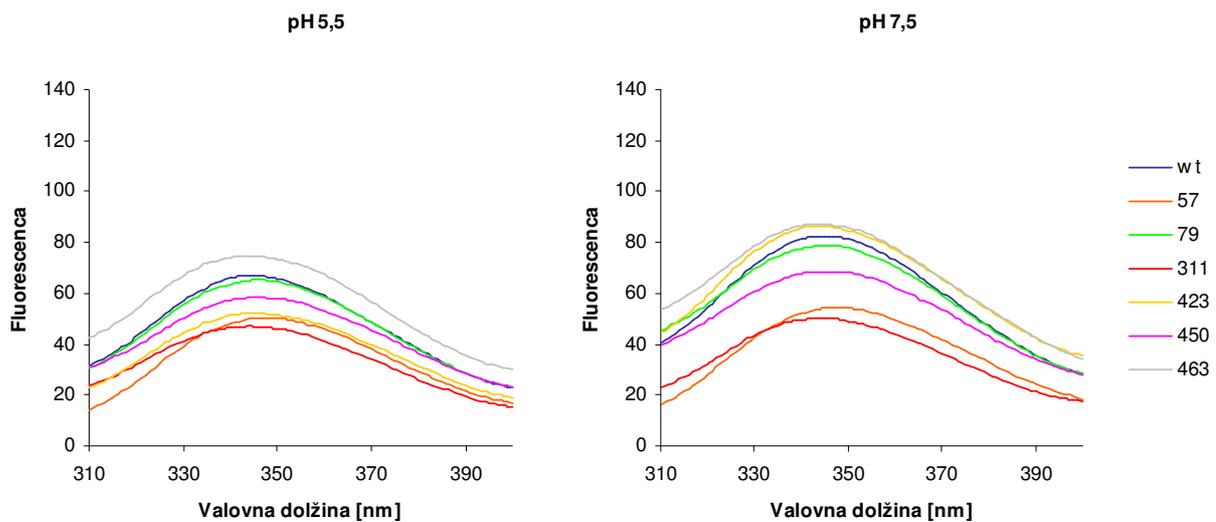


Slika 11. Vpliv temperature na hemolitično aktivnost divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant. Vpliv pH na hemolitično aktivnost smo prikazali s pomočjo razmerij med $1/t_{75(37^{\circ}\text{C})}$ in $1/t_{75(26^{\circ}\text{C})}$ pri pH 5,5 za posamezne toksine.

4.2 VPLIV TEMPERATURE IN pH NA TERCIARNO ZGRADBO TOKSINOV

4.2.1 Emisijski spektri triptofanske fluorescence toksinov

Vpliv pH na polarnost okolja Trp v molekuli LLO ob poviševanju temperature smo opazovali v temperaturnem območju med 15 in 70 °C pri vrednostih pH 5,5 in 7,5. Uporabili smo 250 nM koncentracijo LLO, kiveto z vzorcem pa segrevali s hitrostjo 1°C/min. Ob ekscitaciji s svetlobo valovne dolžine 295 nm smo posneli emisijske spektre (310–400 nm) na vsakih 5 min oz. 5 °C (Slika 13 – Slika 19).



Slika 12. Trp spektri divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri temperaturi 15 °C

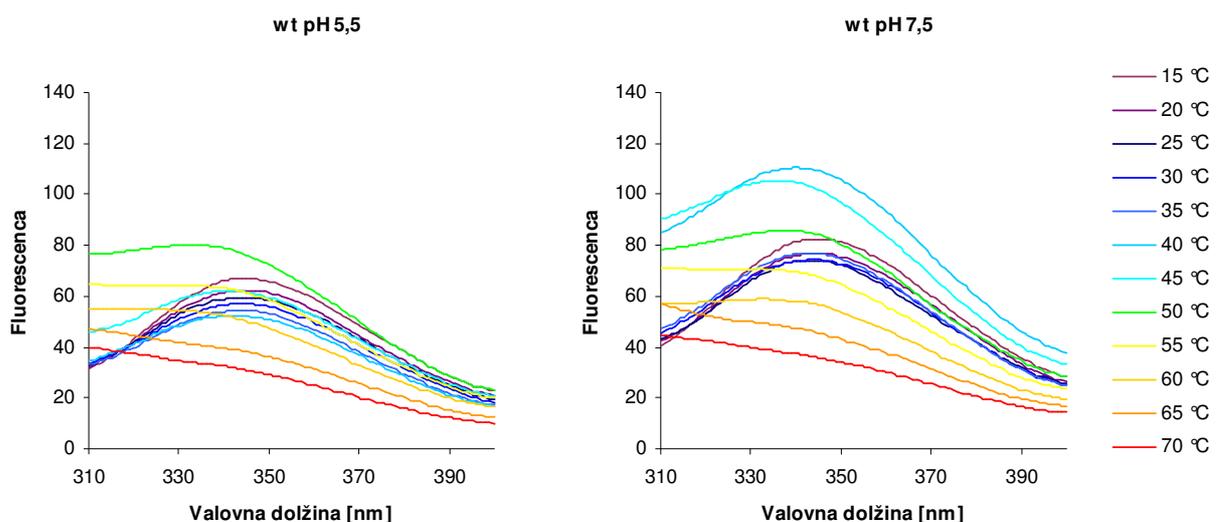
Triptofanski spektri divjega tipa LLO in mutant so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.

Primerjava emisijskih spektrov vseh toksinov pri temperaturi 15 °C ter pH vrednostih 5,5 in 7,5 pokaže, da je pri višjem pH intenziteta fluorescence pri vseh toksinih v splošnem višja (Slika 12). Pri pH 5,5 ima spekter najvišjih intenzitet mutanta H463A, sledita ji skoraj identična spektra divjega tipa in mutante H79A, nekoliko nižji je triptofanski spekter mutante H450A. Spektre z nižjo intenziteto triptofanske fluorescence smo izmerili pri mutantih H423A, H57A in H311A. Enak trend v intenzitetah med mutantami in divjim tipom LLO je opaziti tudi pri pH 7,5, izjemo mutante H423A, ki kaže velike podobnosti s spektrom mutante H463A. Lahko rečemo, da večjih razlik pri nižji temperaturi med obema pH vrednostima v stabilnosti za posamezno mutanto ni. Izjema je le mutanta H423A, ki se ji ob povišanju pH bistveno poveča intenziteta fluorescence.

Ob poviševanju temperature od 15 °C do 40 °C je pri pH 5,5 pri vseh toksinih opaziti trend nižanja intenzitete triptofanske fluorescence emisijskih spektrov. Med 40 in 45 °C se je pri vseh toksinih, razen pri mutanti H311A, zgodila sprememba v intenziteti triptofanske fluorescence, in sicer se je bistveno povečala. Intenziteta fluorescence je bila najvišja pri 45 °C pri mutanti H423A, H450A, H463A, pri LLO divjega tipa, H57A in H79A pa pri 50 °C. Za vse našete vzorce velja, da je bila najvišja izmerjena intenziteta fluorescence višja od intenzitete merjene pri temperaturi 15 °C. Pri nadaljnem segrevanju (nad 45 °C oz. 50 °C) je moč opaziti trend upadanja intenzitete fluorescence. Pri mutanti H311A je bila v splošnem najvišja intenziteta izmerjena pri začetni temperaturi 15 °C, pri vseh nadaljnjih spektrih pa intenziteta upada. Ob primerjavi jakosti

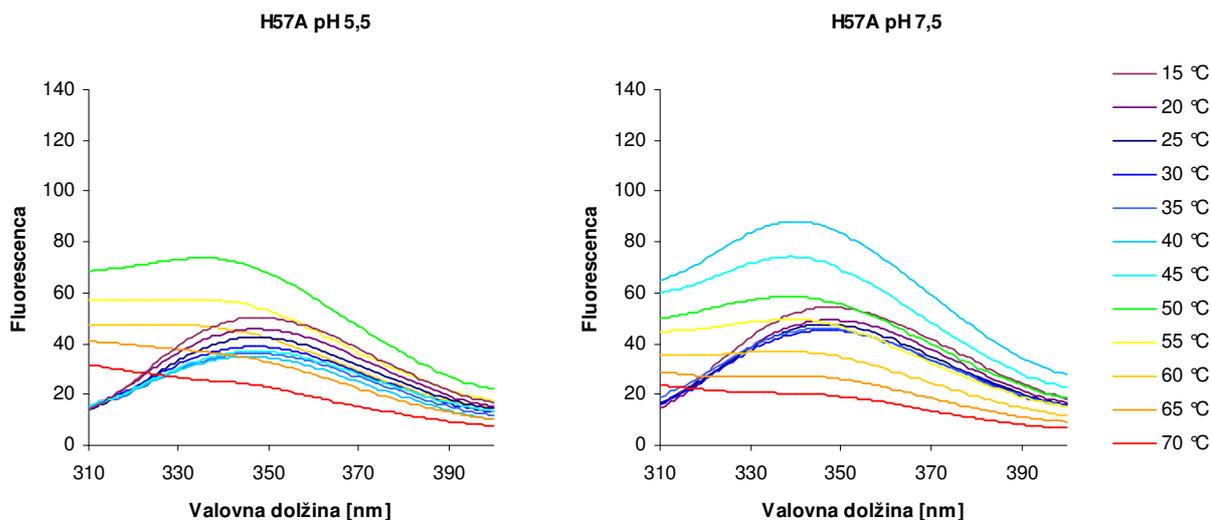
intenzitete fluorescence spektrov v izhodiščni vrednosti 310 nm je opaziti, da so pri toksinih divjega tipa in mutantih H57A, H79A, H423A, H450A in H463A jakosti fluorescence pri vseh temperaturah od 45 °C do 70 °C višje od jakosti fluorescence pri temperaturah nižjih od 40 °C (Slike 13, 14, 15, 17, 18 in 19). Pri mutanti H311A smo pri valovni dolžini 310 nm samo pri 50 °C izmerili večjo jakost fluorescence kot pri ostalih temperaturah (Slika 16).

Pri pH 7,5 je ob poviševanju temperature od 15 °C do 35 °C pri vseh toksinih opaziti trend nižanja intenzitete fluorescence. Med temperaturama 35 °C in 40 °C se je pri vseh toksinih, razen pri mutanti H311A, tudi pri pH 7,5 povečala intenziteta triptofanske fluorescence in dosegla najvišjo vrednost pri 40 °C, kjer je bila izmerjena intenziteta fluorescence višja od intenzitete merjene pri temperaturi 15 °C. Tako kot pri pH 5,5 smo tudi pri pH 7,5 pri nadaljnjem segrevanju (nad 40 °C) opazili trend upadanja intenzitete fluorescence. Prav tako je bila pri mutanti H311A najvišja intenziteta izmerjena pri začetni temperaturi 15 °C in je pri vseh nadaljnjih meritvah upadala. Tudi pri pH 7,5 pride do sprememb v jakosti intenzitete fluorescence spektrov pri najnižni merjeni valovni dolžini. Samo za mutanto H57A velja, da so jakosti fluorescence pri vseh temperaturah nad 35 °C višje od jakosti pri temperaturah med 15 °C in 35 °C. Pri mutantih H79A in H463A je opaziti višje jakosti fluorescence med 35 °C in 60 °C, pri divjem tipu in mutantih H423A ter H450A pa med 35 °C in 65 °C (Slike 13,14, 15, 17, 18 in 19). Pri mutanti H311A smo pri valovni dolžini 310 nm samo pri 45 °C izmerili večjo jakost fluorescence kot pri ostalih temperaturah (Slika 16).



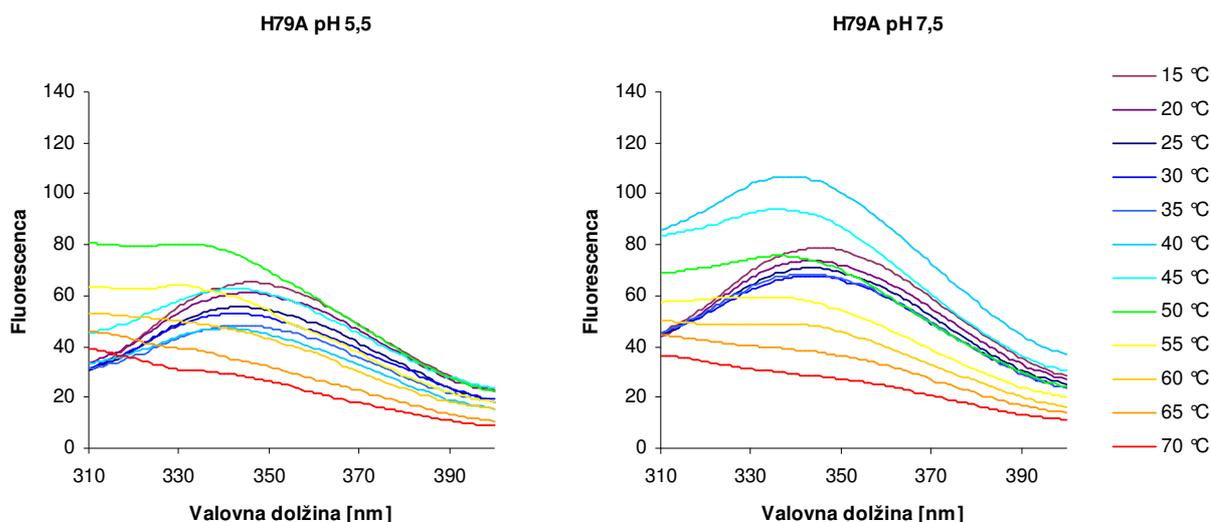
Slika 13. Trp spektri divjega tipa listeriolizina O v temperaturnem območju 15 – 70 °C

Triptofanski spektri divjega tipa LLO so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.



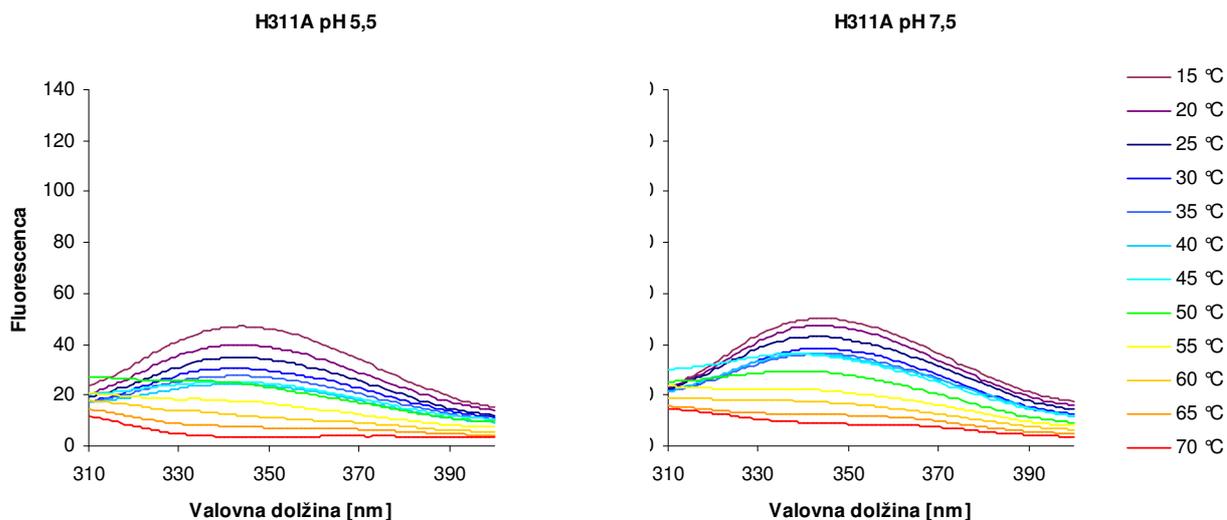
Slika 14. Trp spektri mutante H57A v temperaturnem območju 15 – 70 °C

Triptofanski spektri mutante H57A so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.



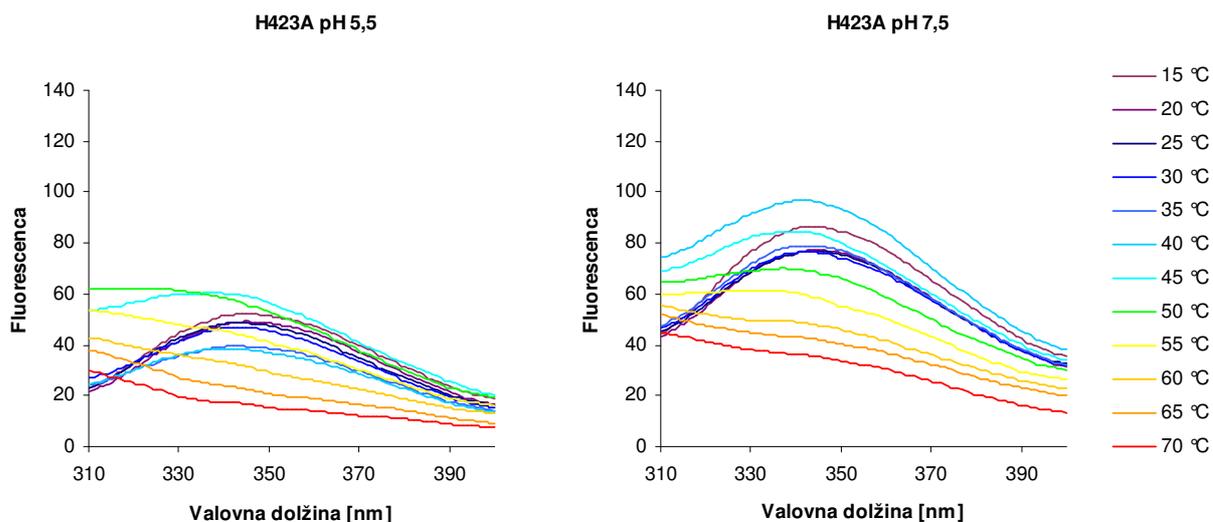
Slika 15. Trp spektri mutante H79A v temperaturnem območju 15 – 70 °C

Triptofanski spektri mutante H79A so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.



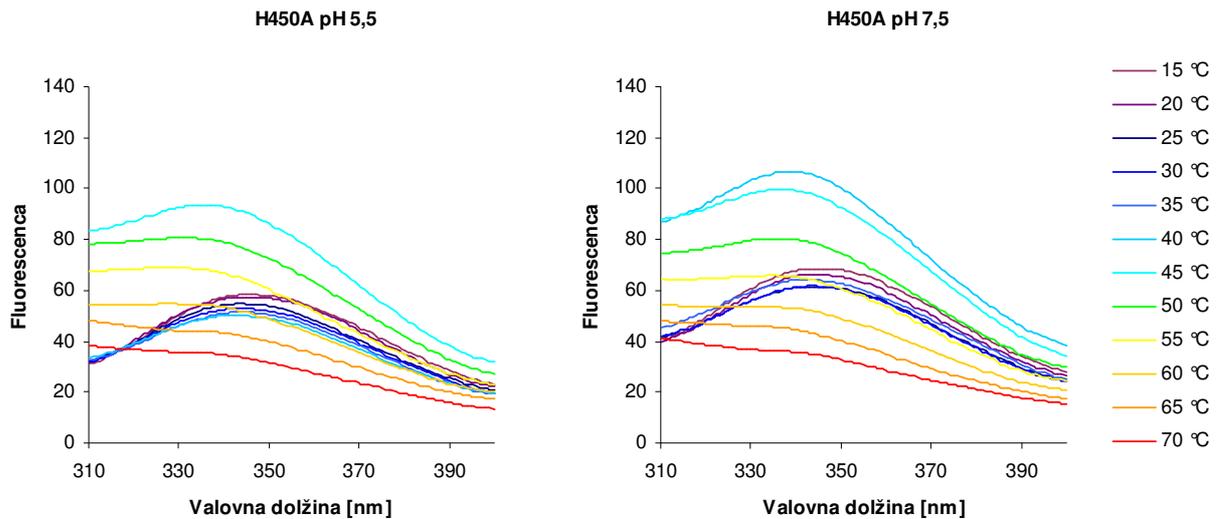
Slika 16. Trp spektri mutante H311A v temperaturnem območju 15 – 70 °C

Triptofanski spektri mutante H311A so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.



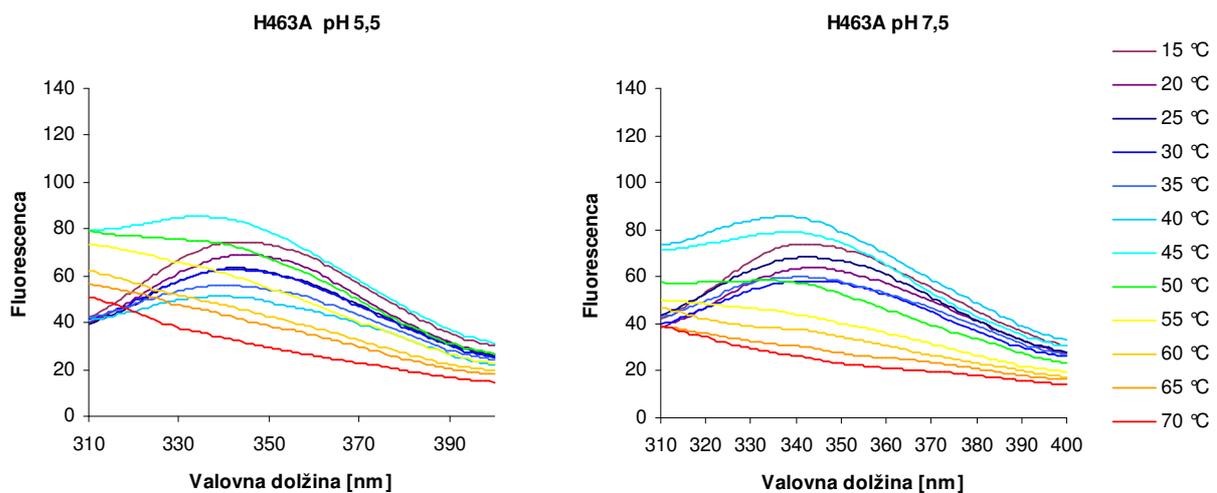
Slika 17. Trp spektri mutante H423A v temperaturnem območju 15 – 70 °C

Triptofanski spektri mutante H423A so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.



Slika 18. Trp spektri mutante H450A v temperaturnem območju 15 – 70 °C

Triptofanski spektri mutante H450A so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.



Slika 19. Trp spektri mutante H463A v temperaturnem območju 15 – 70 °C

Triptofanski spektri mutante H463A so bili posneti v območju 310–400 nm, pri ekscitacijski valovni dolžini 295 nm in pH vrednostih 5,5 in 7,5. Spektri so rezultat povprečja dveh meritev.

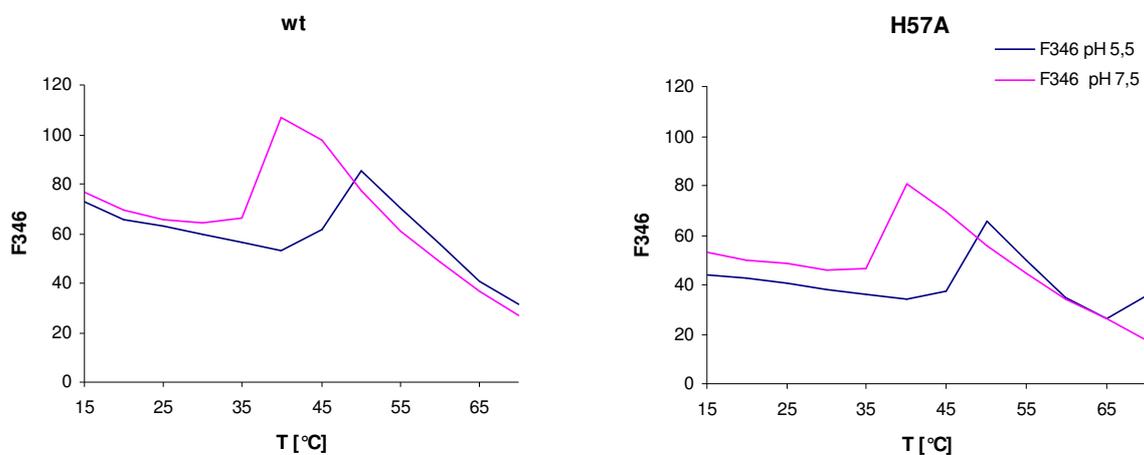
4.2.2 Vpliv temperature na intenziteto triptofanske fluorescence toksinov

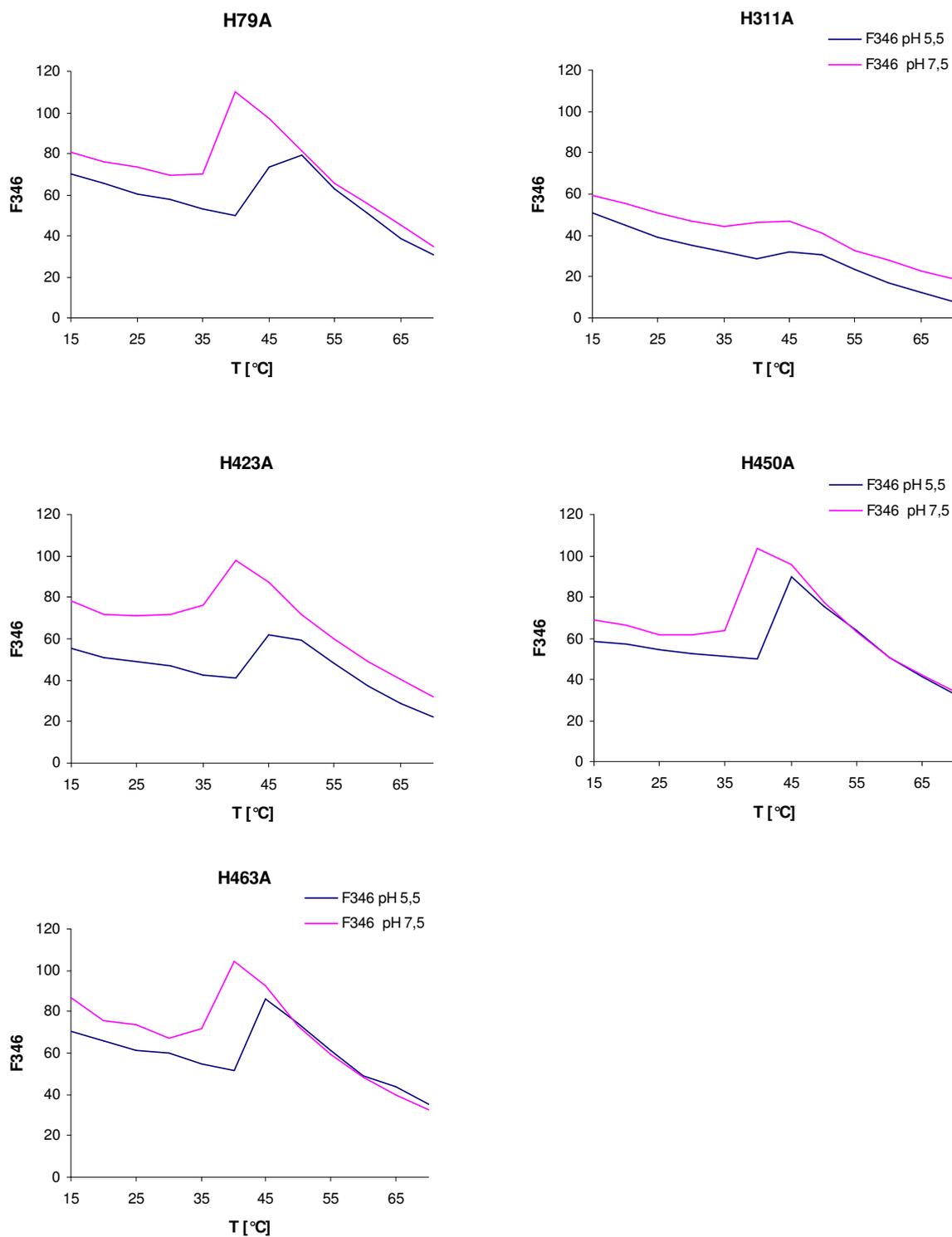
Primerjava emisijskih spektrov pri valovni dolžini 346 nm vseh toksinov pri pH vrednostih 5,5 in 7,5 pokaže, da je pri višjem pH intenziteta fluorescence pri vseh toksinih v splošnem višja (Slika 21). Do največjih razlik v intenziteti med obema pH pri vseh toksinih prihaja v temperaturnem območju med 35 °C in 50 °C (Slika 20). Največja razlika se pojavi pri 40 °C, saj pri tej temperaturi intenziteta fluorescence pri vseh vzorcih s pH 7,5, razen pri H311A, doseže vrh

(Slika 21B). Pri pH 5,5 pa se pri 40 °C intenziteta začne povečevati in doseže vrh pri 45 °C pri mutantih H423A, H450A in H463A ter pri 50 °C pri toksinu divjega tipa, H57A in H79A (slika 21A). Pri obeh pH vrednostih pri vzorcu H311A nismo opazili skoka intenzitete fluorescence pri naraščajoči temperaturi (Slika 20).

Intenziteta fluorescence vseh vzorcev, razen H311A, tekom poviševanja temperature sprva pada, nato v temperaturnem intervalu med 35 in 40 °C preseže začetno vrednost ter zopet pada. Iz Tabele 2 je razvidno, da se nenaden porast intenzitete fluorescence pri pH 5,5 zgodi pri temperaturi 40 °C, pri pH 7,5 pa pri temperaturi 35 °C. Pri pH 7,5 je temperaturna odvisnost intenzitete fluorescence ($\lambda=346$ nm) mutant H79A, H423A, H450A in H463A primerljiva s temperaturno odvisnostjo intenzitete fluorescence ($\lambda=346$ nm) LLO divjega tipa. Nekoliko manjšo intenziteto smo izmerili pri mutantih H57A in H311A, vendar pa pri mutanti H311A ni opaziti podobne temperaturne odvisnosti kot pri LLO divjega tipa (Slika 21B).

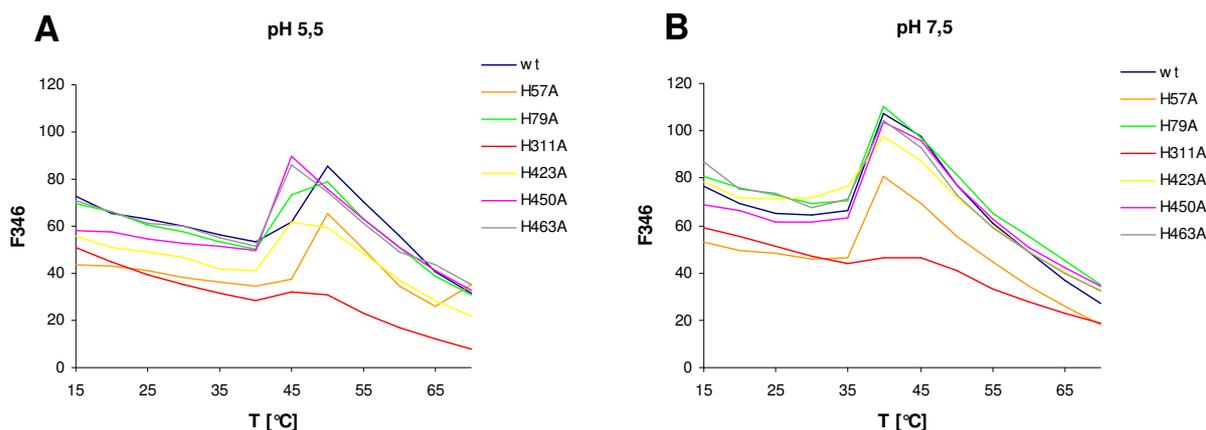
Pri pH 5,5 je temperaturna odvisnost intenzitete fluorescence mutant H79A, H450A in H463A primerljiva s temperaturno odvisnostjo fluorescence LLO divjega tipa. Pri mutantih H57A, H423A in H311A je intenziteta sicer nekoliko manjša, vendar pa pri mutanti H311A ni podobne temperaturne odvisnosti kot pri LLO divjega tipa. Najvišjo intenziteto fluorescence pri valovni dolžini 346 nm dosežejo LLO divjega tipa, mutanti H57A in H79A pri 50 °C, pri 45 °C pa H423A, H450A in H463A. Pri mutanti H311A je najvišja intenziteta fluorescence pri 15 °C in pri naraščanju temperature ne pride do povečanja, ki bi preseglo začetno vrednost (Slika 21A).





Slika 20. Vpliv temperature na intenziteto triptofanske fluorescence divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant.

Prikaz intenzitete fluorescence pri valovni dolžini 346 nm (F_{346}) v odvisnosti od temperature pri pH vrednostih 5,5 in 7,5 za posamezne vzorce. Grafi so rezultat povprečja dveh meritev.



Slika 21. Primerjava vpliva temperature na intenziteto triptofanske fluorescence divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant pri pH 5,5 in 7,5.

Prikaz intenzitete fluorescence pri valovni dolžini 346 nm (F_{346}) v odvisnosti od temperature pri pH vrednostih 5,5 in 7,5 za posamezne vzorce.

Tabela 2. Sprememba triptofanske fluorescence v odvisnosti od temperature in pH

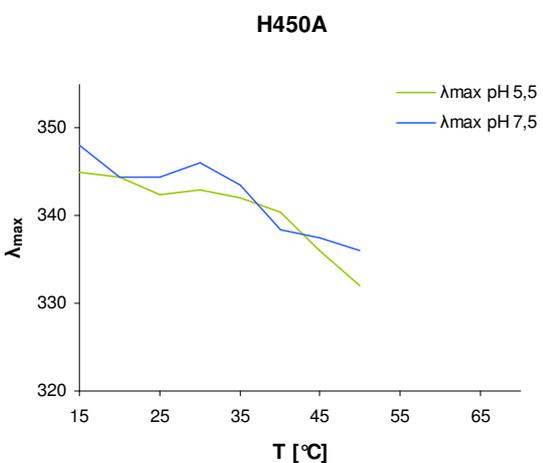
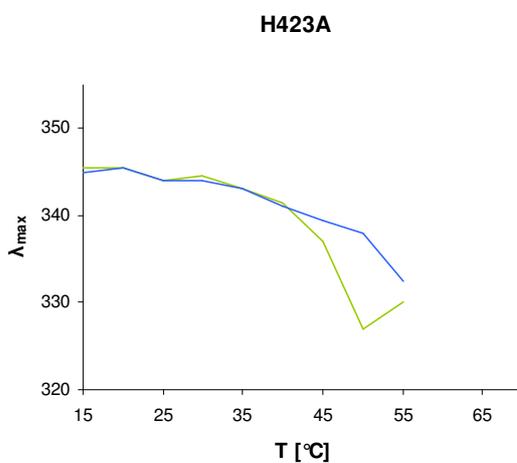
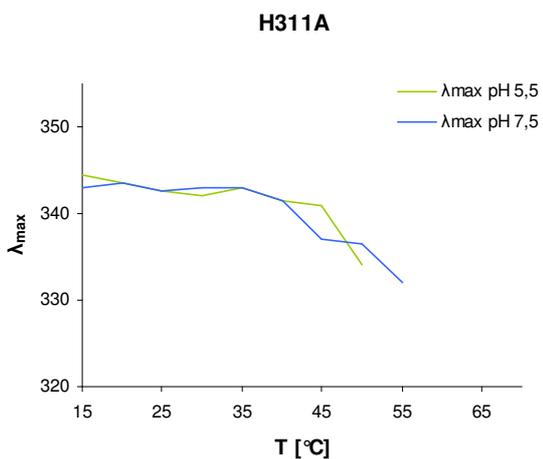
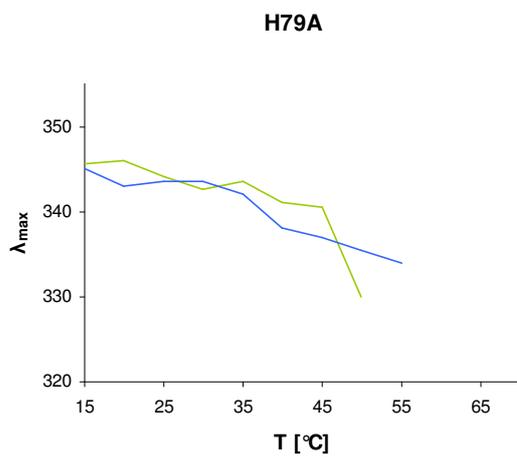
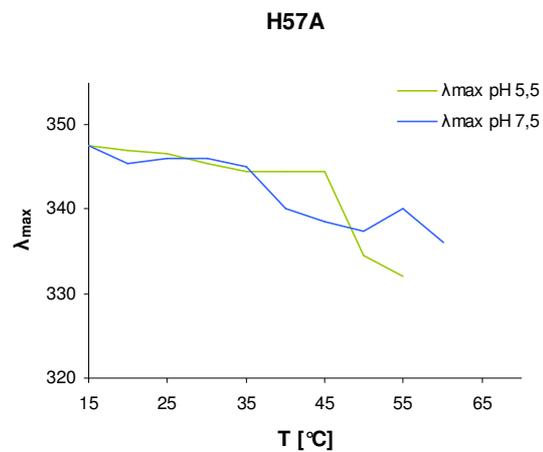
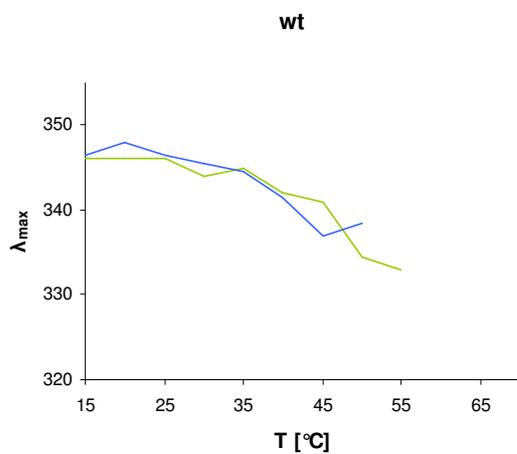
Pregled temperatur, pri katerih po začetnem padanju intenziteta fluorescence naraste. Temperature so povprečje dveh meritev.

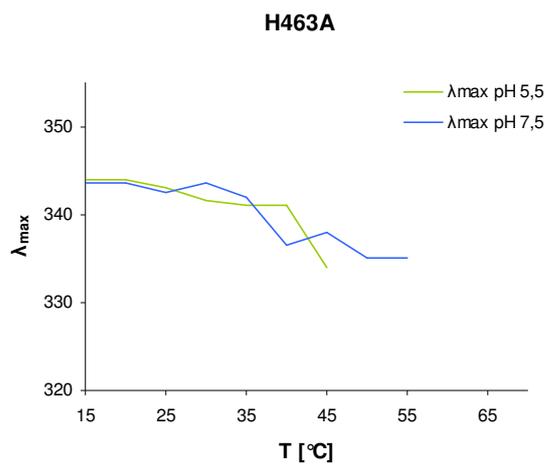
	Temperatura [°C]	
	pH 5,5	pH 7,5
wt	40	35
H57A	40	35
H79A	40	35
H311A	40	35
H423A	40	35
H450A	40	35
H463A	40	35

4.2.3 Prikaz valovne dolžine z najvišjo intenziteto fluorescence v odvisnosti od temperature

Poviševanje temperature vpliva na terciarno zgradbo proteina, in sicer vodi k razvitju polipeptidne verige. Zaradi vse večje izpostavitve triptofanskih ostankov manj polarnemu okolju se znižujeta intenziteta fluorescence in valovna dolžina, pri kateri je intenziteta fluorescence največja.

Pri vseh vzorcih se pri obeh pH vrednostih ob poviševanju temperature zmanjšuje valovna dolžina, pri kateri je intenziteta fluorescence največja. Pri visokih temperaturah je terciarna zgradba toksinov tako razvita, da vrednosti intenzitete triptofanske fluorescence emisijskih spektrov padajo in ne presežejo začetne vrednosti, kar pomeni, da ne moremo določiti vrha emisijskega spektra, torej valovne dolžine z največjo intenziteto fluorescence (Slika 22).





Slika 22. Primerjava valovnih dolžin z najvišjo intenziteto fluorescence divjega tipa listeriolizina O in njegovih mutant v odvisnosti od temperature pri pH 5,5 in 7,5.

Prikaz valovnih dolžin z najvišjo intenziteto fluorescence v odvisnosti od temperature pri pH 5,5 in 7,5 za posamezne vzorce. Grafi so rezultat povprečja dveh meritev.

5 RAZPRAVA

5.1 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

V primarni zgradbi LLO divjega tipa je šest histidinskih ostankov, in sicer na mestih 57, 79, 311, 423, 450 in 463. V sami terciarni zgradbi LLO se histidinski ostanki nahajajo v štirih domenah (His57 v D1, His79 v D2, His311 v D3 in His423, His459, His463 v D4), ki imajo različne vloge pri delovanju LLO. Eden izmed glavnih ciljev diplomskega dela je bil s tehniko merjenja hemolitične aktivnosti opredeliti vpliv mutacije histidinov v alanine na aktivnost listeriolizina O (LLO). Na voljo smo imeli že vnaprej pripravljene mutante H57A, H79A, H311A, H423A, H450A in H463A (Ramšak, 2009).

Pri proučevanju hemolitične aktivnosti nas je zanimal tako vpliv pH kot temperature, zato smo izbrali pH vrednosti 5,5 in 7,5 ter temperaturi 26 °C in 37 °C. Preverili smo hemolitično aktivnost LLO divjega tipa in šestih mutant pri vseh štirih kombinacijah izbranih parametrov (pH 5,5 pri 26 °C, pH 5,5 pri 37 °C, pH 7,5 pri 26 °C in pH 7,5 pri 37 °C).

Znano je, da se v kislem pufru LLO stabilno veže na membrane in je visoko hemolitično aktiven. Iz naših rezultatov je razvidno, da so pri nižjem pH tudi vse različice LLO z mutacijo histidina v alanin hemolitično visoko aktivne pri obeh temperaturah. Pri višjem pH je aktivnost toksinov v primerjavi z nižjim pH manjša. Znano je, da je pri fizioloških vrednostih pH in temperaturi (37 °C), kjer se LLO nahaja, aktiven pri pH 5,5, ki ustreza lumnu fagolizosoma, ter agregiran in neaktiven pri pH 7,5, ki ustreza citosolnemu pH (Bavdek, 2010). Na podlagi naših rezultatov ugotavljamo, da so tudi histidinske mutante LLO tako kot divji tip neaktivne pri temperaturi 37 °C in pH 7,5. Pri fizioloških pogojih z nižjim pH smo pokazali, da je aktivnost vseh toksinov največja, aktivnost mutant pa primerljiva z aktivnostjo LLO divjega tipa. Vendar pa pri vseh parametrih opazimo, da ima navkljub primerljivi aktivnosti največjo prav divji tip LLO, kar lahko pripišemo dejstvu, da so vse histidinske mutante LLO manj sposobne vezave oz. tvorbe popolne pore v lipidne vezikle v primerjavi z divjim tipom (Ramšak, 2009).

Največjo raznolikost v aktivnosti mutant je opaziti pri temperaturi 26 °C in pH 7,5. Glede na mesto mutacije histidina v alanin v terciarni zgradbi LLO in samo vlogo domen v aktivnosti toksina je težko sklepati na pomembnost vpliva mutacije pri danih parametrih.

Za boljšo razvidnost vpliva temperature in pH na aktivnost proučevanih toksinov smo med seboj primerjali hemolitično aktivnost pri različnih pogojih. Vpliv pH na aktivnost posamezne mutante je bistveno večji pri mutantah H57A, H311A, H423A in H463A kot pri LLO divjega tipa in H79A in H450A. Za mutante H57A, H311A, H423A in H463A je za aktivnost še bolj ugoden nižji pH kot pa za ostale mutante in divji tip.

Če primerjamo vpliv temperature na aktivnost posameznih mutant z vplivom temperature na aktivnost divjega tipa LLO, ugotovimo, da ni bistvenih razlik, torej mutacija histidinov v D1, D2 in D4 nima večjega vpliva na temperaturno odvisno aktivnost. Le mutanta H311A pri tem odstopa od ostalih toksinov, saj kaže bistveno manjši vpliv temperature na aktivnost. Lahko bi sklepali, da so v D3 nekoliko manj prisotni drugi temperaturno občutljivi odnosi med molekulami (vodikove vezi, van der Waalsove vezi, ionske vezi, dipoli) kot pri ostalih domenah. Na podlagi rezultatov smo zaključili, da pri primerjavi vpliva pH in vpliva temperature med vsemi mutantami izstopa H311A. Nanjo bistveno bolj kot temperatura vpliva pH. To veliko občutljivost na spremembo pH bi lahko pripisali histidinskemu ostanku na mestu 311 v D3, ki je v neposredni bližini druge TMH, v kateri se nahaja aminokislina asparaginska kislino na mestu 320, ki skupaj z asparaginsko kislino na mestu 208 in glutamatom na mestu 247, tvori pH tipalo (Schuerch in sod., 2005).

5.2 VPLIV TEMPERATURE IN pH NA STABILNOST TOKSINOV

Z merjenjem triptofanskih emisijskih spektrov fluorescence smo želeli opredeliti vpliv mutacije na stabilnost toksina. Znano je, da poviševanje temperature povzroča povečevanje hidrofobnega okolja triptofanov in hidrofobne površine proteina, izpostavljenega vodnemu okolju. Intenziteta spektra se poveča zaradi nastanka agregatov toksina LLO.

Primerjava emisijskih spektrov pri valovni dolžini 346 nm vseh toksinov pri pH vrednostih 5,5 in 7,5 pokaže, da je pri višjem pH intenziteta fluorescence pri vseh toksinih v splošnem višja. Pri nizkem pH se spremembe v strukturi proteina in agregacija zgodijo pri višjih temperaturah kot pri bazičnem pH. Pri pH 5,5, ki ustreza pH fagolizosoma, agregira LLO pri temperaturi nad 40 °C, pri pH 7,5 pa toksin tvori agregate že pri temperaturi nad 35 °C (Bavdek, 2010). Iz rezultatov meritev triptofanske fluorescence pri valovni dolžini 346 nm je razvidno, da pri pH 5,5 pride pri temperaturi nad 40 °C pri vseh toksinih, razen H311A, do hitrega povišanja v intenziteti fluorescence. Pri pH 7,5 pride že pri temperaturi 30 °C do minimalnega dviga v intenziteti (razen

pri razen H311A), do bistvenega povečanja pa pride pri 35 °C. Iz tega sklepamo, da začno toksini mutant agregirati že pri temperaturi nad 30 °C, torej podobno kot so pokazali Schuerch in sodelavci (2005), da LLO agregira šele pri temperaturi nad 31 °C.

Pri obeh pH je mutanta H311A drugačna od ostalih. Intenziteta triptofanske fluorescence ne doseže značilnega porasta, pač pa je v trendu upadanja intenzitete opaziti le minimalen dvig pri obeh pH vrednostih. Pri obeh pH je to opaziti kot pri ostalih mutantah in divjemu tipu pri pH 5,5 pri 40 °C, pri pH 7,5 pri 35 °C. Rezultati nakazujejo, da kisel pH omogoča ohranjati topnost mutant in divjega tipa LLO do temperature 40 °C, medtem ko začno v bazičnem pH proteini agregirati pri temperaturi med 30 in 35 °C. Zaradi netipičnih triptofanskih emisijskih spektrov fluorescence pri mutanti H311A bi lahko sklepali, da toksin pri poviševanju temperature od 15 do 70 °C ne agregira ali pa agregira le minimalno število monomerov. Prav tako bi lahko sklepali, da mutacija histidina v alanin na mestu 311 v D3, povzroči nekoliko bolj konformacijsko stabilno strukturo toksina LLO.

6 SKLEPI

Hemolitična aktivnost histidinskih mutant listeriolizina O na mestih 57, 79, 311, 423, 450 in 463 je največja pri temperaturi 37 °C in kislem pH, ki ustreza lumnu fagolizosoma. Pri pogojih, ki ustrezajo citosolu celice, so vse mutante skorajda neaktivne.

Večji vpliv pH na hemolitično aktivnost kot pri divjem tipu LLO se kaže pri mutantih H57A, H311A, H423A in H463A, pri mutantih H79A in H450A pa je vpliv primerljiv z vplivom pH na aktivnost divjega tipa LLO.

Temperatura ima bistveno manjši vpliv na hemolitično aktivnost mutante H311A kot na ostale mutante in divji tip LLO.

Pri primerjavi vpliva pH in vpliva temperature na hemolitično aktivnost mutant med vsemi izstopa H311A. Nanjo bistveno bolj kot temperatura vpliva pH. To veliko občutljivost na spremembo pH pripišemo mutaciji na mestu 311 v D3, kjer se tudi nahaja pH tipalo.

Pri histidinskih mutantih, z izjemo mutante H311A, prihaja do agregacije proteinov pri takih temperaturah kot pri divjem tipu LLO. Pri kislem pH pri temperaturi 40 °C, medtem ko začno v bazičnem pH proteini agregirati pri temperaturi med 30 in 35 °C.

Sklepamo, da mutanta H311A pri poviševanju temperature ne tvori agregatov in je bolj stabilna od ostalih histidinskih mutant ter divjega tipa LLO.

7 VIRI

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. 2010. Molekularni mehanizem vezave listeriolizina O na lipidne membrane. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Bavdek A, Gekara NO, Priselac D, Gutierrez Aguirre I, Darji A, Chakraborty T, Maček P, Lakey JH, Weiss S, Anderluh G, 2007. Sterol and pH Interdependence in the Binding, Oligomerization, and Pore Formation of Listeriolysin O. *Biochemistry* 46: 4425-4437.

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

Beauregard K.E., Lee KD, Collier RJ, Swanson JA, 1997. pH-dependent Perforation of Macrophage Phagosomes by Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 186: 1159-1163.

Bernheimer A. W., Rudy B. 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 864: 123–141

Bhakdi S., Trantum-Jensen J, Sziegoleit A, 1985. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect. Immun.* 47: 52-60.

Bhakdi S., Trantum-Jensen J. 1985. Complement activation and attack on autologous cell membranes induced by streptolysin-O. *Infect. Immun.* 48: 713–719.

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.

Blewitt M. G., Chung, L. A., London, E. 1985. Effect of pH on the conformation of diphtheria toxin and its implications for membrane penetration. *Biochemistry* 24, 5458–5464.

Bourdeau R.W., Malito E, Chenal A, Bishop BL, Musch MW, Villereal ML, Chang EB, Mosser EM, Rest RF, Tang WJ, 2009. Cellular functions and X-ray structure of anthrolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin secreted by *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.*: M807631200.

Caputo GA, London E. 2003. Cumulative effects of amino acid substitutions and hydrophobic mismatch upon the transmembrane stability and conformation of hydrophobic alpha-helices. *Biochemistry*. 25;42(11):3275-85.

Choe S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J. & Eisenberg, D. 1992. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357, 216–222.

Collier, R. J., Young, J. A. 2003. Anthrax Toxin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19, 45–70.

Conlan JW, North RJ, 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J Exp. Med.* 174: 741-744.

Conte MP, Petrone G, Longhi C, Valenti P, Morelli R, Superti F, Seganti L, 1996. The effects of inhibitors of vacuolar acidification on the release of *Listeria monocytogenes* from phagosomes of Caco-2 cells. *J Med Microbiol* 44: 418-424.

Dabiri GA, Sanger JM, Portnoy DA, Southwick FS, 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 87: 6068-6072.

Dalton CB, Austin CC, Sobel J, Hayes PS, Bibb WF, Graves LM, Swaminathan B, Proctor ME, Griffin PM, 1997. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk. *N Engl J Med* 336: 100-106.

Decatur AL, Portnoy DA, 2000. A PEST-Like Sequence in Listeriolysin O Essential for *Listeria monocytogenes* Pathogenicity. *Science* 290: 992-995.

Donald AS, Fenlon DR, Seddon B, 1995. The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. *J Appl. Bacteriol* 79: 141-148.

Dramsı S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P, 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* 16: 251-261.

Drevets, D. A., R. T. Sawyer, T. A. Potter, and P. A. Campbell. 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 63:4268–4276.

Duclos S, Desjardins M, 2000. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* 2: 365-377.

Duncan JL, Schlegel R, 1975. Effect of streptolysin O on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions. A protein-cholesterol interaction. *J Cell Biol.* 67: 160-174.

Farber J M, Peterkin P I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.*55:476–511.

Gaillard JL, 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. *Infect. Immun.* 55: 2822-2829.

Gaillard, J. L., F. Jaubert, and P. Berche. 1996. The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 183: 359–369.

Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P, 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 55: 1641-1646.

Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, Casiere 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: 78-85.

Gilbert R. J. 2010. Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv Exp Med Biol.*;677:56-66.

Glomski IJ, Decatur AL, Portnoy DA, 2003. *Listeria monocytogenes* Mutants That Fail To Compartmentalize Listeriolysin O Activity Are Cytotoxic, Avirulent, and Unable To Evade Host Extracellular Defenses. *Infect. Immun.* 71: 6754-6765.

Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA, 2002. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell Biol.* 156: 1029-1038.

Goebel W, Kreft J. 1997. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiol.* 5(3):86-8.

Goldberg M.B. 2001. Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 4.65. 595-626.

Gouaux, E. 1997. Channel-forming toxins: tales of transformation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 566-573.

Haas A, Dumbsky M, Kreft J, 1992. Listeriolysin genes: complete sequence of ilo from *Listeria ivanovii* and of liso from *Listeria seeligeri*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1130: 81-84.

Heuck AP, Hotze EM, Tweten RK, Johnson AE, 2000. Mechanism of Membrane Insertion of a Multimeric [beta]-Barrel Protein: Perfringolysin O Creates a Pore Using Ordered and Coupled Conformational Changes. *Molecular Cell* 6: 1233-1242.

Holm, L., Sander, C. 1994. Parser for protein folding units. *Prot. Struct. Funct. Genet.* 19, 256-268.

Hotze EM, Wilson-Kubalek EM, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AE, Tweten RK, 2001. Arresting Pore Formation of a Cholesterol-dependent Cytolysin by Disulfide Trapping Synchronizes the Insertion of the Transmembrane beta-Sheet from a Prepore Intermediate. *J. Biol. Chem.* 276: 8261-8268.

Iwamoto M, Ohno-Iwashita Y, Ando S, 1990. Effect of isolated C-terminal fragment of theta-toxin (perfringolysin O) on toxin assembly and membrane lysis. *Eur. J Biochem* 194: 25-31.

Jones S, Portnoy DA, 1994. Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect. Immun.* 62: 5608-5613.

Kehoe MA, Miller L, Walker JA, Boulnois GJ, 1987. Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infect. Immun.* 55: 3228-3232.

Kuhn, M., W. Goebel. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* 57:55–61.

Lakowicz, JR. 1999. Principles in fluorescence spectroscopy. (2nd Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, ZDA, 698 str.

Lescar J., Roussel A., Wien M. W., Navaza J., Fuller S. D., Wengler G. et al. (2001) The fusion glycoprotein shell of semliki forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105: 137–148.

Lesieur C., Vécsey-Semjén B., Abrami L., Fivaz M, Gisou van der Goot F. 1997. Membrane insertion: The strategies of toxins. *Molecular Membrane Biology.* 14.2. 45-64.

Lety MA, Frehel C, Beretti JL, 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.

Mackaness GB, 1962. Cellular resistance to infection. *J Exp. Med* 116: 381-406.

Marco A J, Prats N, Ramos J A, Briones V, Blanco M, Domínguez L, Domingo M. 1992. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol.* 107:1–9.

Marquis H, Hager EJ, 2000. pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 35: 289-298.

McGrath JL, Eungdamrong NJ, Fisher CI, Peng F, Mahadevan L, Mitchison TJ, Kuo SC, 2003. The Force-Velocity Relationship for the Actin-Based Motility of *Listeria monocytogenes*. *Current Biology* 13: 329-332.

McLauchlin J. 1990. Human listeriosis in Britain, 1967–1985, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol Infect.* 104:181–189

McLauchlin J. 1991. Epidemiology of listeriosis in Britain. *Proceedings of the International Conference on Listeria and Food Safety. Aseptic Processing Association*; pp. 38–47.

McLauchlin J, Greenwood M H, Pini P N. 1990. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *Int J Food Microbiol.* 10:255–262.

McLauchlin J, Hall S M, Velani S K, Gilbert R J. 1991. Human listeriosis and paté: a possible association. *Br Med J.* 303:773–775.

Mengaud, J., Vicente, M. F., Chenevert, J., Pereira, J. M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., in drugi. (1988). Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 56 (4), 766-772.

Michel E, Reich KA, Favier R, Berche P, Cossart P, 1990. Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Mol. Microbiol.* 4: 2167-2178.

Mindell, J. A., Silverman, J. A., Collier, R. J., Finkelstein, A. 1992. Locating a residue in the diphtheria toxin channel. *Biophys. J.* 62, 41-44.

Mindell, J. A., Zhan, H., Huynh, P. D., Collier, R. J., Finkelstein, A. 1994. Reaction of diphtheria toxin channels with sulfhydryl-specific reagents: observation of chemical reactions at the single molecule level *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 5272-5276.

Mitsui K, Sekiya T, Nozawa Y, Hase J, 1979. Alteration of human erythrocyte plasma membranes by perfringolysin O as revealed by freeze-fracture electron microscopy. *Studies on Clostridium perfringens exotoxins V. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 554: 68-75.

Morgan PJ, Hyman SC, Byron O, Andrew PW, Mitchell TJ, Rowe AJ, 1994. Modeling the bacterial protein toxin, pneumolysin, in its monomeric and oligomeric form. *J. Biol. Chem.* 269: 25315-25320.

Nagamune H, Ohnishi C, Katsuura A, Fushitani K, Whiley RA, Tsuji A, Matsuda Y, 1996. Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess. *Infect. Immun.* 64: 3093-3100.

Nagamune, H., Whiley, R. A., Goto, T., Inai, Y., Maeda, T., Hardie, J. M., in drugi. (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.

Nagamune H, Ohkura K, Sukeno A, Cowan G, Mitchell TJ, Ito W, Ohnishi O, Hattori K, Yamato M, Hirota K, Miyake Y, Maeda T, Kourai H, 2004. The human-specific action of intermedilysin, a homolog of streptolysin O, is dictated by domain 4 of the protein. *Microbiol. Immunol* 48: 677-692.

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. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 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.

Olofsson A, Hebert H, Thelestam M, 1993. The projection structure of Perfringolysin O (*Clostridium perfringens* [theta]-toxin). *FEBS Letters* 319: 125-127.

Pain, R. H. (1996). Determining the fluorescence spectrum of a protein. V G. Taylor, J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, P. T. Wingfield, & H. L. Ploegh (Ured.), *Current Protocols in Protein Science*. New York, ZDA: John Wiley & Sons, Inc.

Palmer M, 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39: 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.

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.

Pearson LJ, Marth EH, 1990. *Listeria monocytogenes* - Threat to a Safe Food Supply: A Review. *J. Dairy Sci.* 73: 912-928.

Pletnev S. V., Zhang W., Mukhopadhyay S., Fisher B. R., Hernandez R., Brown D. T. et al. 2001. Locations of carbohydrate sites on alphavirus glycoproteins show that E1 forms an icosahedral scaffold. *Cell* 105: 127-136

Polekhina G, Giddings KS, Tweten RK, Parker MW, 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 United States of America* 102: 600-605.

Portnoy DA, Auerbuch V, Glomski IJ, 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* 158: 409-414.

Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P, 1992. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60: 1263-1267.

Portnoy DA, Jacks PS, Hinrichs DJ, 1988. Role of Hemolysin for the Intracellular Growth of *Listeria-Monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine* 167: 1459-1471.

Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Sarnacki S, Monnet J-P, Berche P, Gaillard J-L. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun.* 66:747-755.

Ramachandran R, Heuck AP, Tweten RK, Johnson AE, 2002. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nat Struct Mol Biol* 9: 823-827.

Ramachandran R, Tweten RK, Johnson AE, 2004. Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit [beta]-strand alignment. *Nat Struct Mol Biol* 11: 697-705.

Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM, 2007. *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol. Immunol. Infect.* 40: 4-13.

Ramšak Ž. 2009. Lastnosti mutiranih različic Listeriolizina O. Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije

Robbins JR, Barth AI, Marquis H, de Hostos EL, Nelson WJ, Theriot JA, 1999. *Listeria monocytogenes* Exploits Normal Host Cell Processes to Spread from Cell to Cell. *J. Cell Biol.* 146: 1333-1350.

Rocourt J. 1996. Risk factors for listeriosis. *Food Control.* 7:195–202.

Rocourt J. 1989. Species of the genus *Listeria*. *Acta Microbiol. Hung.* 36: 285-288.

Rocourt J, Brosch R. 1990. Human listeriosis Document WHO/HPP/FOS/92.4. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1992.

Rocourt J., Catimel B, 1985. [Biochemical characterization of species in the genus *Listeria*]. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A* 260: 221-231.

Rocourt, J., Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. V M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Ured.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (str. 337-352).

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M, 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.

Rosado C.J., Buckle A.M., Law R.H., Butcher R.E., Kan W.T., Bird C.H., Ung K., Browne K.A., Baran K., Bashtannyk-Puhalovich T.A., Faux N.G., Wong W., Porter C.J., Pike R.N., Ellisdon A.M., Pearce M.C., Bottomley S.P., Emsley J., Smith A.I., Rossjohn J., Hartland E.L., Voskoboinik I., Trapani J.A., Bird P.I., Dunstone M.A., Whisstock J.C. 2007. A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science*; 317(5844):1548-51

Rosado CJ, Kondos S, Bull TE, Kuiper MJ, Law RHP, Buckle AM, Voskoboinik I, Bird PI, Trapani JA, Whisstock JC, Dunstone MA, 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology* 10: 1765-1774.

Rossjohn J, Feil SC, McKinstry WJ, Tweten RK, Parker MW, 1997. Structure of a Cholesterol-Binding, Thiol-Activated Cytolysin and a Model of Its Membrane Form. *Cell* 89: 685-692.

Rørvik LM, 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology* 62: 183-190.

Rudnick ST, Jost BH, Songer JG, Billington SJ, 2003. The gene encoding pyolysin, the pore-forming toxin of *Arcanobacterium pyogenes*, resides within a genomic islet flanked by essential genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 225: 241-247.

Ryser E T. 1999. Foodborne listeriosis. In: Ryser E T, Marth E H, editors. *Listeria, listeriosis, and food safety*. 2nd ed. New York, N.Y: Marcel Dekker Inc. pp. 299–358.

Schuchat A, Swaminathan B, Broome C V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev.* 4:169–183.

Schuerch DW, Wilson-Kubalek EM, Tweten RK, 2005. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12537-12542.

Sechi AS, Wehland J, Small JV, 1997. The Isolated Comet Tail Pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: A Tail of Two Actin Filament Populations, Long and Axial and Short and Random. *J. Cell Biol.* 137: 155-167.

Sekiya K, Satoh R, Danbara H, Futaesaku Y, 1993. A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J. Bacteriol.* 175: 5953-5961.

Shatursky O, Heuck AP, Shepard LA, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AE, Tweten RK, 1999. The Mechanism of Membrane Insertion for a Cholesterol-Dependent Cytolysin: A Novel Paradigm for Pore-Forming Toxins. *Cell* 99: 293-299.

Shepard LA, Heuck AP, Hamman BD, Rossjohn J, Parker MW, Ryan KR, Johnson AE, Tweten RK, 1998. Identification of a Membrane-Spanning Domain of the Thiol-Activated Pore-Forming Toxin *Clostridium perfringens* Perfringolysin O: An α -Helical to β -Sheet Transition Identified by Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry* 37: 14563-14574.

Shepard LA, Shatursky O, Johnson AE, Tweten RK, 2000. The Mechanism of Pore Assembly for a Cholesterol-Dependent Cytolysin: Formation of a Large Prepore Complex Precedes the Insertion of the Transmembrane β -Hairpins. *Biochemistry* 39: 10284-10293.

Soltani CE, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK, 2007a. Structural elements of the cholesterol-dependent cytolysins that are responsible for their cholesterol-sensitive membrane interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 20226-20231.

Sun AN, Camilli A, Portnoy DA, 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 58: 3770-3778.

Tilney LG, Portnoy DA, 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 109: 1597-1608.

Todar, K. (2008). "*Listeria monocytogenes*". *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Retrieved January 28, 2009.

Tweten RK, 2005. Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins. *Infect. Immun.* 73: 6199-6209.

Tweten RK, Harris RW, Sims PJ, 1991. Isolation of a tryptic fragment from *Clostridium perfringens* theta- toxin that contains sites for membrane binding and self-aggregation. *J. Biol. Chem.* 266: 12449-12454.

Tweten R.K., Parker M.W., Johnson A.E. 2001. The cholesterol-dependent cytolysins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 257:15-33.

Vazquez-Boland JA, 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. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 584-640.

Vivian JT, Callis PR. 2001. "Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins". *Biophys. J.* 80 (5): 2093–109.

Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ. 1987. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 55: 1184-1189.

Weis S, Palmer M. 2001. Streptolysin O: the C-terminal, tryptophan-rich domain carries functional sites for both membrane binding and self-interaction but not for stable oligomerization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1510: 292-299.

Weis J, Seeliger HP. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 30: 29-32.

Woolley, G. A. and B. A. Wallace. 1992. Model ion channels: gramicidin and alamethicin. *J. Membrane Biol.* 129:109 –136.